

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2013

Bc. Zuzana Tulpová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**UKOTVOVÁNÍ FYZICKÉ MAPY KRÁTKÉHO RAMENE
CHROMOZÓMU 7D PŠENICE**

Diplomová práce

Bc. Zuzana Tulpová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Ing. Hana Šimková, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a uvedla veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především mé vedoucí práce paní Ing. Haně Šimkové, CSc. za trpělivost, odborné vedení v průběhu celé mé práce, poskytnutí dostupné literatury, ochotě ke konzultacím, ale i za lidský přístup. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Heleně Staňkové za pomoc nejen při provádění experimentů i celému kolektivu Centra strukturní a funkční genomiky Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci za přátelské prostředí a výborné podmínky pro mou práci. S díky bych nerada zapoměla na pana Ajaye Kumara (North Dakota State University of Queensland ve Fargu) a pana Paula Visendiho (University of Queensland v Brisbane) za poskytnutí nepublikovaných výsledků. Zároveň chci tímto poděkovat i mé rodině, která mě podporovala po dobu celého mého studia na VŠ.

SOUHRN

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.; $2n = 6x = 48$; AABBDD) je zdrojem potravy pro 35% světové populace a je tak možné ji považovat za jednu z nejdůležitějších plodin na světě. Vytvoření fyzické mapy celého genomu pšenice je nezbytným krokem pro získání jeho kompletní referenční sekvence. Sekvenování pšenice je ztíženo značnou velikostí jejího genomu (17 Gb) a jeho polyploidním charakterem (subgenomy A, B a D). Tyto překážky je možné překonat pomocí průtokové cytometrie, díky níž lze třídit jednotlivé chromozómy, nebo jejich ramena, a tím studium genomu pšenice výrazně zjednodušit.

Předkládaná práce je zaměřena na krátké rameno chromozómu 7D pšenice (7DS), přesněji na ukotvování jeho fyzické mapy. Tématem teoretické části je konstrukce fyzických map a jejich ukotvování. Cílem praktické části bylo ukotvení fyzické mapy ramene 7DS a testování nových přístupů ukotvování, včetně využití integrace s fyzickou mapou *Aegilops tauschii* (donor D genomu pšenice) nebo odvozování STS markerů pro reverzní ukotvování ze sekvencí BAC klonů získaných technologií Illumina. Celkově bylo prostřednictvím 585 markerů ukotveno 309 kontigů fyzické mapy, které reprezentují 51% fyzické mapy 7DS. Jako nejefektivnější se ukázalo *in silico* ukotvování, které umožnilo lokalizovat 285 kontigů na rameni 7DS. Spolehlivost *in silico* ukotvování byla ověřena prostřednictvím 11 markerů, které byly rovněž ukotveny ručně. Manuálním ukotvováním za použití markerů z databáze GrainGenes bylo ukotveno dalších 23 kontigů. Pro reverzní ukotvování neukotvených kontigů byly použity jednak koncové sekvence BAC klonů (BES), jednak sestavené sekvence několika BAC klonů. Ze sekvencí bylo odvozeno celkem 18 STS markerů. Dosud se podařilo zamapovat dva z nich metodou radiačního hybridního mapování. Metoda vyžaduje další optimalizaci pro zefektivnění postupu.

SUMMARY

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.; $2n = 6x = 48$; AABBDD) is a staple food for 35% of the world's population and can be thus considered one of the most important crops in the world. Construction of a physical map of the whole wheat genome appears an essential step towards obtaining its complete reference sequence. Sequencing of wheat is complicated by its huge genome size (17 Gb) and polyploid nature (A, B and D subgenomes). These obstacles can be overcome by flow cytometry, which enables sorting individual chromosomes or their arms and thus simplifying the wheat genome studies.

This thesis is focused on the short arm of wheat chromosome 7D (7DS), namely anchoring of its physical map. The subject of the theoretical part is a construction of physical maps and their anchoring. The aim of the practical part was anchoring of the 7DS physical map and testing of new anchoring approaches, including integration of wheat 7DS physical map with that of *Aegilops tauschii* (wheat D genome donor) and deriving STS markers for reverse anchoring from BAC sequences obtained by Illumina technology. Overall, we have anchored 585 markers into 309 contigs, which represent 51% of the 7DS physical map. *In silico* anchoring proved the most efficient approach, which allowing to land 285 contigs on the 7DS arm. Reliability of the *in silico* anchoring was verified by 11 markers, which were anchored both *in silico* and manually. Another 23 contigs were anchored manually by using markers from GrainGenes database. For reverse anchoring we used both BAC-end sequences (BES) and sequence assemblies of several BAC clones. Overall, 18 STS markers have been derived from the sequences and to date, two of them were localized on the 7DS arm using radiation hybrid mapping. The method requires further optimization to streamline the procedure.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	CÍLE PRÁCE	9
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	10
3.1	Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L.)	10
3.1.1	Krátké rameno chromozómu 7D pšenice	11
3.2	Sekvenování genomu pšenice	12
3.2.1	Strategie sekvenování.....	12
3.2.2	Fyzické kontigové mapy	14
3.2.2.1	Fingerprinting.....	15
3.2.3	Ukotvování fyzické mapy	17
3.2.3.1	Cytogenetické mapy.....	18
3.2.3.2	Genetické mapy.....	18
3.2.3.3	Mapy radiačních hybridů.....	19
3.2.3.4	Markery pro ukotvování.....	20
3.2.3.5	Přímé ukotvování	25
3.2.3.6	Reverzní ukotvování	28
3.2.3.7	Hybridní ukotvování	29
4	MATERIÁL A METODIKA	30
4.1.1	Biologický materiál	30
4.1.2	Přístrojové vybavení.....	30
4.1.3	Chemikálie	31
4.1.4	Pufry a roztoky	31
4.2	Metodika	32
4.2.1	Přímé ukotvování fyzické mapy.....	32
4.2.1.1	Manuální ukotvování.....	32
4.2.1.2	<i>In silico</i> ukotvování.....	35
4.2.2	Reverzní ukotvování	35
4.2.2.1	Odvozování STS markerů	36
4.2.2.2	Mapování odvozených STS markerů na RH liniích.....	37
5	VÝSLEDKY	38
5.1	Přímé ukotvování	38
5.1.1	Manuální ukotvování.....	38
5.1.2	<i>In silico</i> ukotvování.....	48
5.2	Reverzní ukotvování	48

5.2.1	Odvozování STS markerů z BES	48
5.2.2	Odvozování STS markerů ze sekvencí BAC klonů	50
5.2.3	Mapování odvozených STS markerů na RH liniích.....	51
6	DISKUSE.....	54
6.1	Přímé ukotvování	54
6.1.1	Manuální ukotvování.....	54
6.1.2	<i>In silico</i> ukotvování.....	55
6.2	Reverzní ukotvování	55
6.2.1	Odvozování STS markerů	55
6.2.2	Mapování na panelu radiačních hybridů	57
7	ZÁVĚR	59
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	71

1 ÚVOD

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.; $2n = 6x = 48$; AABBDD) je jednou z nejdůležitějších zemědělských plodin na světě a genetické zlepšování jejích vlastností v podobě výnosu nebo odolnosti vůči biotickým a abiotickým stresovým faktorům je klíčem k dosažení takové úrovně produkce, která by uspokojila nároky neustále se zvětšující lidské populace. Výzkum zaměřený na genom pšenice je však komplikován jeho značnou velikostí (17 Gb), velkým obsahem repetitivních sekvencí (> 90%) a polyploidním charakterem, což dlouho představovalo neřešitelnou překážku v sestavení jeho referenční sekvence. Řešení nabídla průtoková cytometrie, díky níž lze třídít jednotlivé chromozómy pšenice nebo jejich samotná ramena, a tím výrazně zjednodušit studium genomu pšenice. Popsaný přístup byl uplatněn i v případě krátkého ramene chromozómu 7D (7DS), jehož fyzická mapa je předmětem této diplomové práce.

Dlouhodobým cílem výzkumu zaměřeného na pšenici je sestavení referenčních sekvencí jednotlivých chromozómů. Tomu předchází vytvoření jejich fyzických map. Fyzickou mapu lze získat s využitím fingerprintingů klonů knihovny dlouhých insertů, které jsou následně sestavovány do kontigů pomocí počítačových programů na základě jejich překryvu. Aby bylo možné využít veškerý potenciál fyzické mapy, provádí se její integrace s dalšími typy map, která slouží k ukotvení fyzické mapy na chromozómy. Integrovaná mapa má pak nemalý význam nejenom pro sekvenování, ale i pro poziční klonování významných genů nebo komparativní genomiku.

Předkládaná práce se zabývá využitím různých metod ukotvování fyzických map, včetně nových přístupů využívajících integrace s fyzickou mapou donora subgenomu D - *Aegilops tauschii*, nebo odvozování STS marekrů pro reverzní ukotvování ze sekvencí BAC klonů nebo jejich koncových sekvencí. Bylo provedeno přímé ukotvování fyzické mapy krátkého ramene chromozómu 7D pšenice (7DS), a to skříninkem BAC knihovny pomocí PCR na směsných vzorcích BAC klonů (manuální ukotvování), nebo pomocí *in silico* ukotvování na základě integrace s fyzickou mapou *Ae. tauschii* (Luo *et al.*, 2013). Reverzní ukotvování zahrnovalo odvození STS markerů specifických pro rameno 7DS, které byly následně podrobeny mapování na panelu radiačních hybridů vytvořeném pro D genom křížením syntetické pšenice SW58 a tetraploidního kultivaru Langdon (Kumar *et al.*, 2012b) s cílem zanést je do kontextu RH mapy tvořené DArT a SSR markery (A. Kumar, nepublikováno).

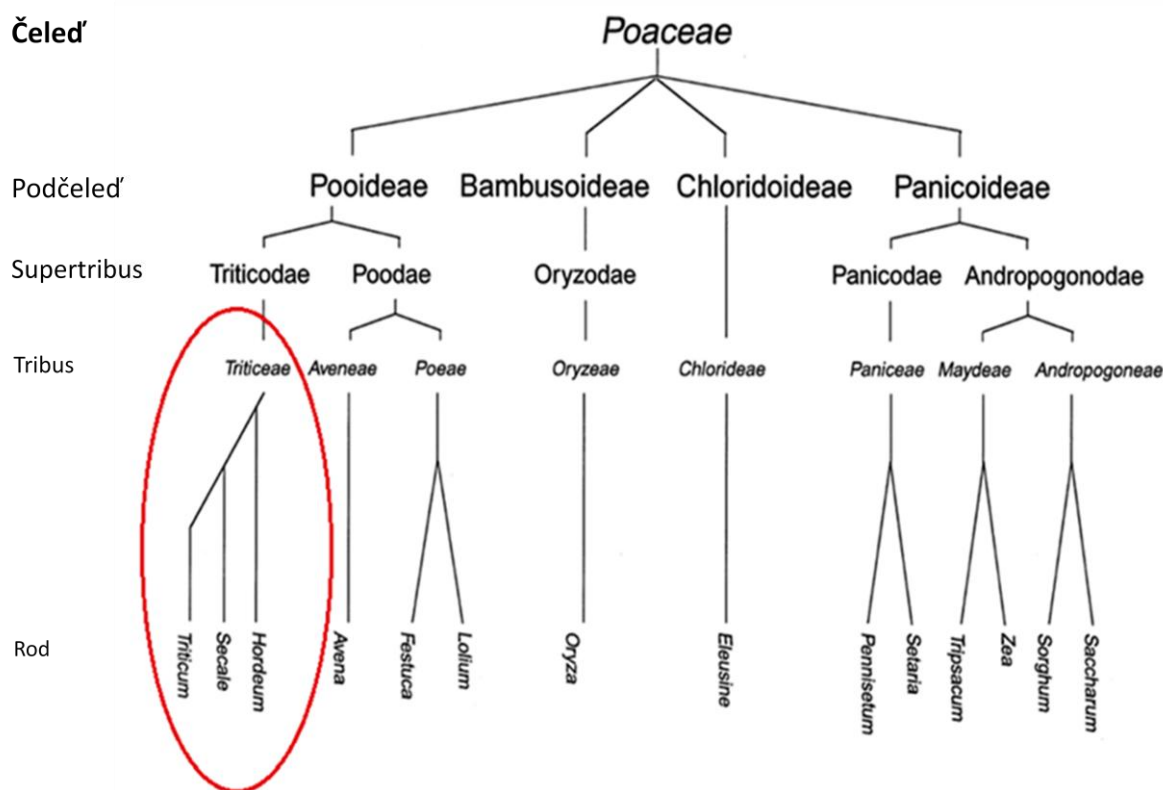
2 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši na téma konstrukce fyzických map a jejich ukotvování. V praktické části pak bylo cílem otestovat různé metody pro přímé a reverzní ukotvování BAC kontigů, odvozování nových markerů z dosud neukotvených kontigů a mapování nově odvozených markerů na panelu radiačních hybridů.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

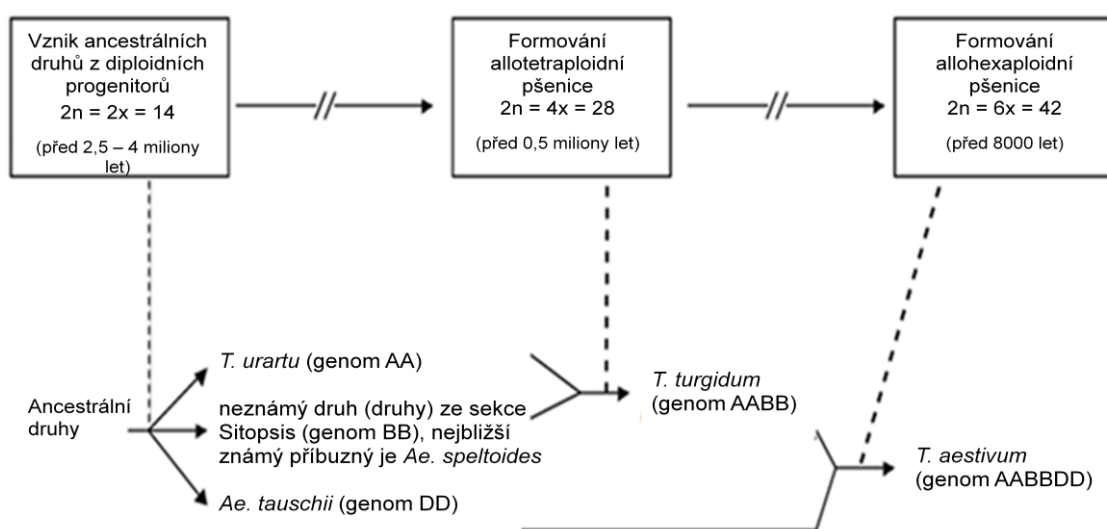
Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednoděložná rostlina zařazovaná do rodu *Triticum* a je nejčastějším pěstovaným typem pšenice na světě (až 90% celkové světové produkce pšenice; <http://wheatdoctor.cimmyt.org/index.php/en/getting-started/13?task=view>). Zároveň je zdrojem potravy pro ~35% procent světové populace, takže ji můžeme označit za jednu z nejdůležitějších plodin na světě. Rod *Triticum* dále řadíme do tribu *Triticeae*, podčeledi *Pooideae* a čeledi *Poaceae* (lipnicovité) (obr.1) (Devos *et* Gale, 1997).



Obr.1: Taxonomické vztahy v čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Červeně je vyznačený tribus *Triticeae*, do nějž je zařazen rod *Triticum*, kam patří pšenice setá (*Triticum aestivum* L.). (Upraveno dle: Devos *et* Gale, 1997).

Původ genomu pšenice (obr.2) sahá až do doby před 2,5 - 4 miliony let, kdy vznikly různé diploidní druhy rodu *Triticum/Aegilops*. Ancestrální pšenice setá je výsledkem dvou spontánních hybridizací, díky nimž vznikl genom se třemi subgenomy A, B a D ($2n = 6x = 42$; AABBDD) (Dubcovský *et* Dvořák, 2007). K první hybridizaci došlo přibližně před půl milionem let mezi *Triticum urartu* ($2n = 2x = 14$, AA) a jedním nebo více druhy ze sekce Sitopsis, donory genomu B. Za nejbližšího příbuzného donora B genomu je považován

Aegilops speltoides ($2n = 2x = 14$; SS). První hybridizací tak vznikl tetraploidní druh pšenice, který následně prodělal přes 10 000 let domestikace a je známý jako *Triticum turgidum* ($2n = 4x = 28$; AABB). Ke druhé hybridizaci došlo před přibližně 8000 let mezi tetraploidem *T. turgidum* a diploidem *Aegilops tauschii*, donorem genomu D ($2n = 2x = 14$; DD), což vedlo ke vzniku hexaploidní pšenice *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$; AABBDD; obr.3) s komplexním genomem o velikosti 17 Gb. Každý jeho chromozóm je větší než celý genom rýže. Genom hexaploidní pšenice obsahuje > 90% repetitivních sekvencí, přičemž velkou většinu tvoří transponovatelné elementy (TE) (Choulet *et al.*, 2013) a pouze ~1% genomu tvoří geny (Paux *et al.*, 2006). Zároveň došlo ke strukturálním a funkčním přestavbám, které vedly ke stabilizaci genomu, ale také došlo k menším redukcím ve velikostech jednotlivých subgenomů (o 2 - 10%) ve srovnání s jejich diploidními donory (Feldman *et Levy*, 2009).



Obr.2: Původ allohexaploidní pšenice *T. aestivum* (upraveno dle: Feldman *et Levy*, 2005; Choulet *et al.*, 2013).

3.1.1 Krátké rameno chromozómu 7D pšenice

Předmětem studia v této diplomové práci je krátké rameno chromozómu 7D pšenice (7DS). Toto rameno o délce 381 Mb je nositelem celé řady genů pro agronomicky významné znaky, včetně genů pro kvantitativní znaky (QTL, *quantitative trait loci*). Patří sem geny ovlivňující výnos pšenice nebo geny rezistence k širokému spektru patogenů. Co se týká znaků souvisejících s výnosem, jsou to např. velikost rostliny,



Obr.3: Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.), odrůda Chinese Spring (<http://biotechwiz.com/?tag=triticum-aestivum-l-cv-chinese-spring-wheat>)

počet zrn na klas, doba vzniku klasu nebo hmotnost tisíce zrn. Bylo zjištěno, že poslední tři zmíněné znaky jsou ve vazbě s markerem *Xgwm1220* a velikost rostliny je ve vazbě s markerem *Xgwm1002*. Vzdálenost markerů je přibližně 30 cM a byly lokalizovány v distálním delečním binu 7DS (Huang *et al.*, 2004; Röder *et al.*, 2008). V tomto binu se také nachází lokus *Lr34* podmiňující rezistenci k různým typům rzi i rezistenci k padlí travnímu (Krattinger *et al.*, 2009).

3.2 Sekvenování genomu pšenice

3.2.1 Strategie sekvenování

Genom pšenice byl díky své velikosti, množství repetitivních sekvencí a vysoké homologii mezi subgenomy, dlouho považován za neosekvenovatelný. Při sekvenování pšeničného genomu jako celku by patrně nebylo možno dosáhnout takových výsledků, aby bylo možné získanou genomovou sekvencí označit za referenční. Kromě potíží se sestavováním sekvencí v polyploidním genomu zde bylo například riziko, že během sestavování sekvence dojde ke ztrátám informací o duplikovaných genových rodinách, které mohou hrát klíčovou roli např. ve speciaci (Choulet *et al.*, 2013).

Elegantním řešením tohoto problému je tzv. chromozómový přístup (Doležel *et al.*, 2007), který redukuje komplexitu genomu pšenice. Přístup využívá průtokovou cytometrii, s jejíž pomocí je možné roztrždit genom pšenice na jednotlivé chromozómy nebo jejich části, což následně usnadňuje fyzické mapování i sekvenování. Pomocí této techniky se třídí DNA fluorochromem nabarvené intaktní mitotické chromozómy, které byly získány mechanickou homogenizací kořenových špiček fixovaných ve formaldehydu. V případě, že se chromozómy analyzovaného druhu dostatečně neliší svou velikostí, používají se pro třídění speciální cytogenetické linie, např. translokační nebo adiční. U polyploidů lze připravit také linie deleční nebo aneuploidní. U pšenice jsou významné zejména linie telosomické, které umožňují třídění jednotlivých ramen (Šafař *et al.*, 2010). Pouze největší z chromozómů pšenice, chromozóm 3B, je možné purifikovat bez použití zmiňovaných linií (Kubaláková *et al.*, 2005), a právě proto byly všechny pilotní genomické studie prováděny nejprve na tomto chromozómu. Díky možnosti třídění chromozómů a jejich ramen byly už vytvořeny BAC knihovny pro 19 z 21 chromozómů genomu pšenice (<http://olomouc.ueb.cas.cz/dna-libraries/cereals>). Na sekvenování a studium genomu pšenice je zaměřeno několikero projektů, které probíhají pod záštitou mezinárodního konzorcia IWGSC (International Wheat

Genome Sequencing Consortium; <http://www.wheatgenome.org>). Toto konsorcium v roce 2005 zvolilo chromozómový přístup za základ pro sekvenování genomu hexaploidní pšenice.

Projekty zaměřené na sekvenování velkých eukaryotických genomů využívají dva přístupy - sekvenování "klon po klonu" (hierarchické) a celogenomové neuspořádané, tzv. *shotgun* sekvenování (*whole genome shotgun* = WGS).

Pro první zmiňovaný přístup je nutné mít fyzickou kontigovou mapu, která byla sestavena na základě překrývajících se klonů z knihovny dlouhých insertů. Z těchto klonů je vybrána minimální sestava nutná pro pokrytí celého genomu, případně chromozómu, tzv. *minimum tiling path* (MTP), v níž je velikost překryvů mezi klony ~30% (Choulet *et al.*, 2013). MTP představuje templát pro sekvenování. Následně je každý klon osekvenován pomocí *shotgun* sekvenování náhodných fragmentů a jeho sekvence je sestavena z krátkých čtení, tzv. *reads*. Konečná sekvence genomu je pak sestavena z poskládaných sekvencí klonů s pomocí fyzické mapy, díky níž jsou známy jejich pozice a orientace na chromozómu.

Druhým zmiňovaným je WGS přístup. V tomto případě je genomová sekvence sestavena z jednotlivých čtení, která byla vytvořena sekvenováním fragmentů získaných z kompletního genomu. Většinou je využito čtení z obou konců fragmentů, tzv. *pair ends* nebo *mate pairs*. Velikosti fragmentů se pohybují většinou mezi 1 kb a 5 kb (Choulet *et al.*, 2013). Sestavování probíhá tak, že nejprve jsou překrývající se čtení poskládána do kontigů a následně jsou použity informace z párových konců pro propojení kontigů a vytvoření delší kostry, tzv. *scaffoldu*. Ta představuje lešení pro sestavování menších kontigů. *Mate pair* informace výrazně zefektivňuje sestavování sekvence genomu (Choulet *et al.*, 2013). WGS přístup byl použit např. pro sekvenování jednotlivých ramen chromozómů 1A, 1B a 1D (Wicker *et al.*, 2011) nebo 7A, 7B a 7D pšenice (Berkman *et al.*, 2011).

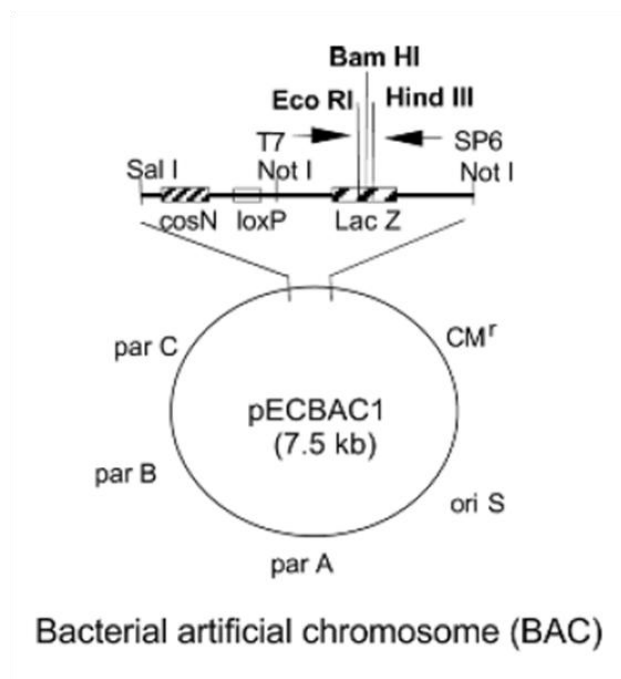
Hlavní výhodou sekvenování "klon po klonu" oproti WGS je, že následné sestavování kontigů je jednodušší, a to i v případě oblastí obsahujících transponovatelné elementy nebo genové rodiny (Miller *et al.*, 2010). Je tak považováno za zlatý standard pro sekvenování genomů s velkým množstvím repetitivních sekvencí. WGS přístup začal být s nástupem sekvenačních technologií nové generace (*next-generation sequencing*, NGS) preferovanější v celé řadě sekvenačních projektů proto, že umožňuje osekvenování, nikoliv však sestavení, jakéhokoli organismu nevhledě na velikost jeho genomu, a to levně a za velice krátkou dobu (Ariyadasa *et al.*, 2012). Nicméně je zde zvýšené riziko vzniku chimerických kontigů nebo

nesestavených klonů. Proto je pro komplexní genomy naopak upřednostňovaný přístup sekvenování "klon po klonu" (Philippe *et al.*, 2012).

3.2.2 Fyzické kontigové mapy

Vytvoření fyzických map všech 21 chromozómů pšenice si pokládá za cíl IWGSC. Samotná fyzická mapa totiž usnadňuje poziční klonování genů a QTL pro agronomicky významné znaky (Choulet *et al.*, 2013), ale je jednou z pre-rekvizit pro získání referenční sekvence každého chromozómu (Lucas *et al.*, 2013). Fyzická kontigová mapa je konstruována s pomocí metod, díky nimž je možné detekovat překryvy mezi klony z knihovny dlouhých insertů.

Mezi vektory, které se používají pro konstrukce knihoven dlouhých insertů, patří umělé bakteriální chromozómy (= BAC, *bacterial artificial chromosome*) (Shizuya *et al.*, 1992), umělé kvasinkové chromozómy (= YAC, *yeast artificial chromosome*), umělé chromozómy odvozené od bakteriofága P1 (= PAC, *P1 articial chromosome*), BIBACy (*plant-transformation-competent binary plasmid clone*), PBC (*conventional plasmid-based cloning vectors*) nebo transformačně kompetentní umělé chromozómy (= TAC, *transformation-competent artificial chromosomes*) (Ren *et al.*, 2005). Převažujícím vektorem pro účely konstrukce fyzické mapy je BAC (obr.4).



Obr.4: Umělý bakteriální chromozóm (BAC) typu pECBAC1. (převzato z: Ren *et al.*, 2005)

Pro odhalení překryvů mezi klony je možné použít tři přístupy. První možností je skrínig klonů na (ne)přítomnost markerů s pomocí technik založených na PCR nebo hybridizaci. Tento přístup je aplikován zpravidla jen pro malou oblast genomu. Druhou možností je pak fingerprinting. Fingerprinting je vhodnější pro relativně neprozkoumané genomy a je více kompatibilní s vysokokapacitními metodami (Meyers et al., 2004). Nejnovějším přístupem je tzv. celogenomové profilování (*whole genome profiling*, WGP).

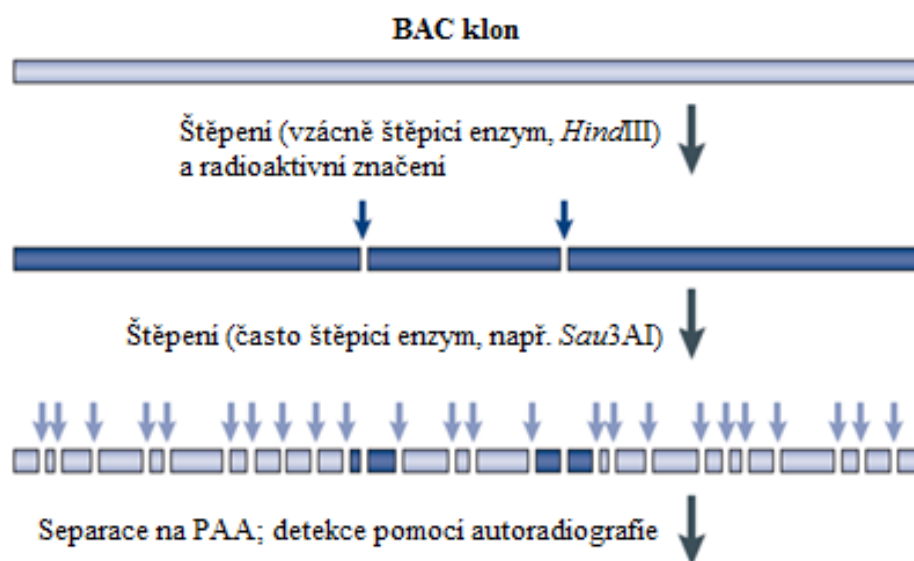
3.2.2.1 Fingerprinting

Nejčastěji používanou metodou pro identifikaci překryvů mezi BAC klony je fingerprinting. Obecný princip fingerprintingu spočívá ve štěpení klonů pomocí restričních enzymů, separaci vzniklých fragmentů a jejich následné detekci. Překrývající se klony ze stejné genomové oblasti jsou identifikovány na základě výskytu shodných restričních fragmentů, kdy počet sdílených fragmentů určuje stupeň překryvu klonů. Problémem jsou genomy s vysokým obsahem repetitivních sekvencí, díky nimž se mohou objevovat falešně pozitivní výsledky (Meyers et al., 2004).

Fingerprinting lze provádět několika metodami. První a nejstarší metoda využívá dvě restriční endonukleázy (RE; schéma obr.5). Nejprve jsou klony štěpeny vzácně štěpicím enzymem (např. *HindIII*) a vzniklé fragmenty jsou na svých koncích radioaktivně označeny s pomocí DNA polymerázy. Následuje štěpení druhou, často štěpicí restriktázou, aby byly získány menší fragmenty vhodné pro separaci a detekci na polyakrylamidovém (PAA) gelu. Poprvé byla tato metoda použita pro konstrukci fyzické mapy *Caenorhabditis elegans* (Coulson et al., 1986).

Druhá možná metoda zahrnuje už použití automatických sekvenátorů. V tomto případě se používá restriktáza, která štěpí DNA v přesně definovaných vzdálenostech od restričních míst. Po štěpení pak zanechává na jednom vlákně přesahy. Ty jsou doplněny neoznačenými deoxynukleotidy (dNTPs) a fluorescenčně značenými dideoxynukleotidy (ddNTPs). Poslední nukleotid je potom detekován sekvenátorem (Brenner et Livak, 1989). Přestože i tato metoda detekuje pouze určitou podskupinu všech vzniklých fragmentů, ve srovnání s metodou využívající radioaktivní značení má vyšší informační obsah, kdy lze rozlišit velikost fragmentu a určit poslední bázi na 3' konci (Meyers et al., 2004). Třetí metoda se od dvou předchozích liší tím, že používá pouze vzácně štěpicí restriktázu (*HindIII*), fragmenty separuje na agarózových gelech a detekuje pomocí ethidium bromidu nebo SYBR Green.

Detekovány jsou tak všechny vzniklé fragmenty, nikoli pouze jejich část (Marra *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 1986).



Obr.5 Schématické znázornění fingerprintingu se dvěma restričními endonukleázami. (Upraveno dle: Meyers *et al.*, 2004)

Výše popsané metody fingerprintingu (Brenner *et Livak*, 1989; Coulson *et al.*, 1986; Olson *et al.*, 1986) nejsou schopny detekovat malé překryvy mezi klony. Proto byly zavedeny metody využívající větší počet oddělených štěpících kroků, např. dva nebo tři páry RE, které už detekci minimálních překryvů sousedních klonů umožňují (Ding *et al.*, 1999, 2001). Xu *et al.* (2004) zavedli dvě metody, kdy v jedné použili tři RE a ve druhé dokonce pět RE. Fragmenty byly značeny pomocí fluorescenčně značených ddNTPs a separovány a detekovány pomocí kapilární elektroforézy (*capillary electrophoresis* = CE). Jedna z pěti použitých RE tvoří fragmenty s tupými konci. Tyto fragmenty pak nelze fluorescenčně označit, tedy ani detekovat. Tím dochází k redukci počtu analyzovaných fragmentů. Obecně můžeme tyto metody označit jako HICF (*high-information-content fingerprinting*), tedy fingerprinting s vysokým informačním obsahem nebo jako SNaPshot technologie a jsou považovány za nejefektivnější pro tvorbu fyzické mapy (Marra *et al.*, 1999).

Přestože SNaPshot technologie byla použita pro konstrukci první fyzické mapy chromozómu pšenice (Paux *et al.*, 2008a) a pomohla k dokončení fyzické mapy kukuřice (Wei *et al.*, 2007), potýká se s výskytem chimerických kontigů nebo nesestavených klonů díky falešně negativním/pozitivním překryvům BAC klonů. Tyto problémy překonává

modernější technologie označovaná jako celogenomové profilování (*whole genome profiling* = WGP) (van Oeveren *et al.*, 2011). Z knihovny dlouhých insertů (BAC) jsou vytvořeny směsné vzorky, které jsou dále podrobeny štěpení a na restriční fragmenty jsou navázány adaptory. Fragmenty s adaptory jsou sekvenovány a jsou tak získány značky, tzv. *tags*, o velikosti 26 - 31 nukleotidů. Dekonvolucí je pak nalezen konkrétní klon nesoucí příslušnou značku. Porovnávání značek umožňuje i detekci překryvů mezi jednotlivými BACy. WGP je tedy technologie hledání překryvů na základě sekvenování a s její pomocí je možné získat robustní fyzické mapy pšenice, dokonce lepší než s použitím SNaPshot technologie, jak bylo prokázáno srovnáním těchto dvou technologií při konstrukci fyzické mapy chromozómu 3B pšenice (Phillipe *et al.*, 2012).

Data získaná fingerprintingem jsou následně statisticky vyhodnocena pomocí algoritmu FPC (*FingerPrinted Contigs*), jehož autory jsou Soderlund *et al.* (2000). FPC umožňuje nejenom sestavení klonů do kontigů, ale také navržení nejkratší cesty pro sekvenování, tedy MTP. Pro hodnocení překryvů FPC využívá Sulston cutoff skóre, které udává, zda je překryv mezi klony stále ještě výsledkem náhody či nikoliv. Pokud je skóre analyzovaných klonů nižší než skóre zadané, pak se klony překrývají. FPC se potýká s problémem výskytu falešných pozitivit nebo negativit, díky nimž mohou vznikat chimérické kontigy nebo mezery. Proto by mělo být cutoff skóre nastaveno tak, aby byly falešně pozitivní nebo negativní výsledky minimalizovány, což souvisí hlavně s komplexitou genomu. Zpravidla je nastavena nejprve vysoká přísnost (*stringency*), která je postupně snižována (Meyers *et al.*, 2004). Některé problémy FPC lze překonat použitím novějšího algoritmu LTC (*Linear Topology Contig*). Narozdíl od FPC je v případě LTC nejprve nastaveno nízké cutoff skóre, ale zároveň je pro získání delších kontigů s reálnou (lineární) strukturou využívána topologie signifikantních překryvů mezi klony. LTC je schopno kontrolovat překryvy mezi klony, zároveň ty chybně určené opravovat a krátké kontigy prodlužovat (Frenkel *et al.*, 2010).

3.2.3 Ukotvování fyzické mapy

Aby bylo možné využít veškerý potenciál a výhody fyzické mapy, provádí se její integrace s dalšími typy map, která slouží k ukotvení fyzické mapy na chromozómy. Integrovaná mapa má nemalý význam pro poziční klonování významných genů, komparativní genomiku nebo pro hierarchické sekvenování (Yim *et al.*, 2007). Kromě genetické mapy je možné provádět ukotvování markerů na další dva typy map - na mapy cytogenetické a mapy konstruované pomocí radiačních hybridů (RH).

Obecně lze rozdělit strategie ukotvování fyzických map na přímé, reverzní a hybridní. Přímé ukotvování probíhá ve směru od genetických map k fyzickým. Jinými slovy pro přímé ukotvování musí být dostupné geneticky zamapované markery, které jsou následně lokalizovány v kontizích fyzické mapy. Naproti tomu reverzní ukotvování pak probíhá v obráceném směru. V tomto případě jsou dostupné koncové sekvence BAC klonů fyzické mapy nebo sekvence celých BACů, ze kterých jsou odvozovány specifické markery a ty jsou následně geneticky zamapovány (Paux *et al.*, 2010). Poslední možností ukotvování fyzických map je využití hybridního ukotvování, které lze považovat za kombinaci obou výše zmíněných strategií. V tomto případě jsou k dispozici sekvence získané pomocí *shotgun* sekvenování, z nichž jsou odvozovány markery, které jsou potom zaneseny jak do genetické mapy, tak do kontigů (Paux *et al.*, 2010).

3.2.3.1 Cytogenetické mapy

Fyzické mapování i ukotvování na cytogenetickou mapu je možné provádět s pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Principem FISH je hybridizace fluorescenčně značených sond s komplementární DNA upevněnou na mikroskopickém sklíčku. V cytogenetice je pak FISH aplikována na celé chromozómy, jádra nebo natažená vlákna DNA a lze detekovat sekvence i o velikosti několika kb. Jako templát pro odvození sondy pro integraci s pomocí FISH slouží BAC klony nesoucí ve své sekvenci molekulární marker (Islam-Faridi *et al.*, 2002). Příkladem použití FISH v kombinaci s BACy (BAC-FISH) pro integraci fyzické a cytogenetické mapy je práce Xiong *et al.* (2010). S pomocí tohoto přístupu bylo z BACů z chromozómu A7 *Brassica rapa* odvozeno 16 sond, které byly hybridizovány na pachytenní chromozómy.

Ne nevýznamným nástrojem pro mapování jsou i deleční linie, v jejichž případě lze pro detekci polohy molekulárních markerů také využívat fluorescenčně značené sondy. Každá deleční linie nese chromozóm, který je deletovaný v různé vzdálenosti od centromery. Je tak možné lokalizovat molekulární markery v konkrétních částech chromozómových ramen, v tzv. binech, které jsou vymezeny sousedními delečními místy (Gill *et al.*, 1993; Qi *et al.*, 2004).

3.2.3.2 Genetické mapy

Přestože fyzická mapa může být nezávislá na genetických informacích, pro další aplikace je hodnotnější a vhodnější, pokud již byla provedena její integrace s genetickou mapou (Meyers *et al.*, 2004). Pro integraci je pak nutné, aby použitá genetická mapa měla

vysokou hustotu polymorfních markerů a vysoké rozlišení (Riera-Lizarazu *et al.*, 2008). Ukotvování fyzické mapy na genetickou se pak provádí pomocí skříninku BAC knihoven na přítomnost specifických markerů. Metody skříninku knihoven můžeme rozdělit do dvou kategorií. První kategorii tvoří metody založené na PCR, druhou kategorii pak představují metody založené na DNA - DNA hybridizaci využívající vysoko-hustotní filtry (Luo *et al.*, 2009).

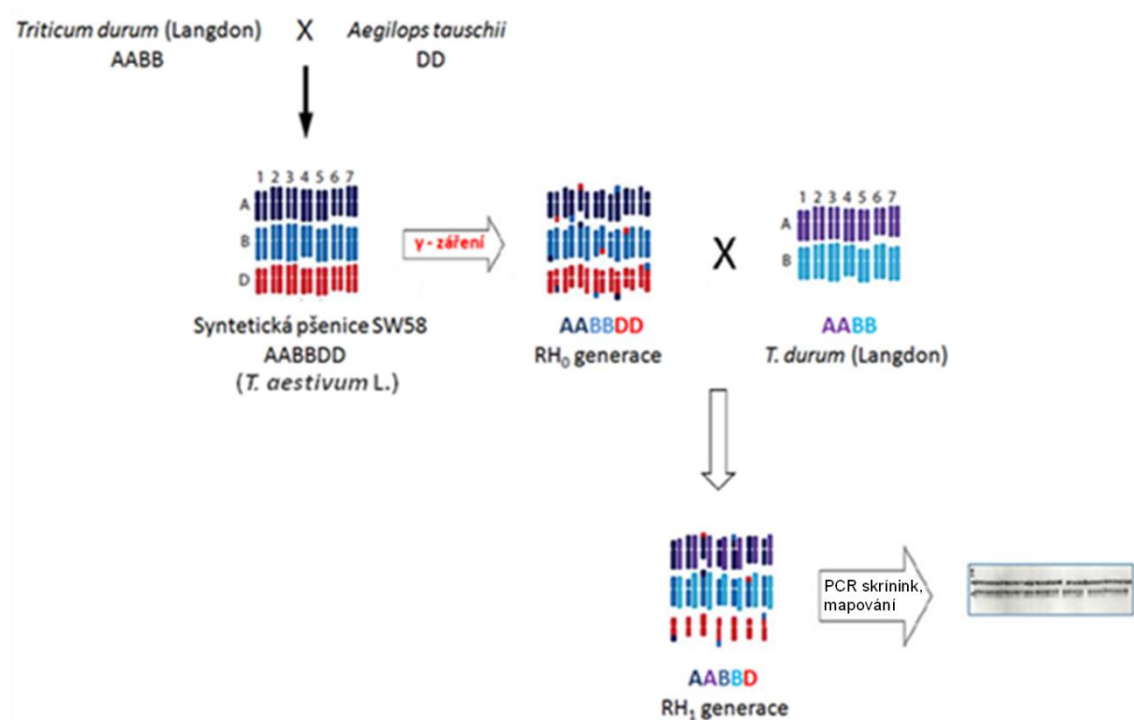
3.2.3.3 Mapy radiačních hybridů

Mapování pomocí radiačních hybridů je alternativou pro genetické mapování založené na rekombinaci. Překonává problémy spojené s omezeným (resp. nulovým) výskytem rekombinace v oblasti centromery a usnadňuje lokalizaci markerů v této oblasti. V případě chromozómu 3B pšenice bylo například zjištěno, že až k 90% rekombinací dochází v subtelomerických oblastech, které představují ~40% chromozómu (Kumar *et al.*, 2012a). RH mapování je založeno na zlomech DNA, které vznikají jako důsledek působení radiace. Další výhodou tohoto typu mapování je, že nevyžaduje polymorfní markery (Cox *et al.*, 1990), poskytuje mapy s vysokým rozlišením a umožňuje přesné převedení vzdáleností v cR (centi Ray) na fyzické vzdálenosti v párech bází (bp).

Přestože byla metoda RH původně navržena pro mapování lidského genomu (Goss *et Harris*, 1975), používá se i pro mapování genomů rostlinných. První pokus s mapováním pomocí RH na rostlinném genomu popsali Riera-Lizarazu *et al.* (2000). Byla použita adiční linie allohexaploidního ovsa (*Avena sativa*), jejíž buňky obsahovaly DNA chromozómu 9 kukuřice (*Zea mays*). Pro přípravu panelu radiačních hybridů bylo použito gama záření, jímž byla ozářena semena. Ta byla zasetá a u přeživších rostlin pak bylo provedeno samosprášení. V potomstvu se vyskytovaly rostliny obsahující normální chromozóm 9 kukuřice, ale i chromozóm 9, u něž došlo k vnitřním nebo i koncovým delecím. Radiační hybridů byli produktem živých buněk, jejichž přežití je umožněno polyploidním stavem genomu, který díky tomu toleruje ztráty svých částí. A zatímco u člověka je předmětem vyhodnocování koretnence markerů, tedy jejich společný výskyt, v případě rostlin je tomu právě naopak. Vyhodnocuje se tedy společná ztráta daných markerů.

Co se týká pšenice, je zde tendence vytvořit panely radiačních hybridů pro jednotlivé chromozómy hexaploidní nebo tetraploidní pšenice nebo pro jejich subgenomy. Tím se zabývají např. práce Riera-Lizarazu *et al.* (2010), Kumar *et al.* (2012b) nebo práce Tiwari *et al.* (2012). Kumar *et al.* (2012b) vytvořili panel radiačních hybridů pro donora genomu D -

Ae. tauschii (obr.6). Panel byl připraven křížením ozářené syntetické hexaploidní pšenice SW58 (*T. aestivum* L.; $2n = 42$; AABBDD) a neozařené tetraploidní pšenice kultivaru Langdon (*T. durum*; $2n = 28$; AABB). Ozařování bylo provedeno na semenech. Riera-Lizarazu *et al.* (2010) se také zabývali tvorbou RH panelu pro D genom pšenice, nicméně pro jeho přípravu použili hexaploidní pšenici kultivaru Chinese Spring. Další RH panel pro kultivar Chinese Spring vytvořili Tiwari *et al.* (2012). V tomto případě byla DNA pro RH mapování izolována z endospermu semen vzniklých po oplození ozářeným pylem.



Obr.6: Příprava panelu radiačních hybridů (RH₁) pro D genom *Ae. tauschii*. (převzato z: Riera-Lizarazu *et al.*, 2010; upraveno dle: Kumar *et al.*, 2012b)

Až donedávna se předpokládalo, že zlomy indukované radiací vznikají na rozdíl od rekombinace zcela náhodně. Studie provedená na chromozómu 3B pšenice (Kumar *et al.*, 2012a) však vyvrátila nezávislost RH mapování na rekombinaci. Byla zjištěna silná korelace mezi frekvencí rekombinace a výskytem zlomů DNA, což vede k předpokladu, že stav chromatinu pravděpodobně ovlivňuje vznik zlomů DNA stejným způsobem jako ovlivňuje rekombinaci (Kumar *et al.*, 2012a).

3.2.3.4 Markery pro ukotvování

Mezi markery vhodné k ukotvování map patří např. SSR, SNP, EST, DArT a ISBP, které byly použity k ukotvení fyzické mapy chromozómu 3B pšenice (Paux *et al.*, 2008a) a STS markery, které se uplatňují zejména při mapování pomocí radiačních hybridů.

SSR (*Simple Sequence Repeat*)

Mikrosatelity (= SSR, *Simple Sequence Repeat*) jsou markery, jejichž analýza je založena na PCR. Jsou to krátké tandemové repetice s opakujícími se motivy o délce 3- 5 bp, jejichž variabilita spočívá právě v počtu opakujících se sekvencí (Ganal *et Röder*, 2007), které pravděpodobně vznikly sklouznutím polymerázy v průběhu replikace nebo nepravidelné rekombinace (Tóth *et al.*, 2000). Obecně jsou mikrosatelity vysoce informativní, u mnoha druhů lokusově specifické, kodominantní markery s vysokým stupněm polymorfismu, pro jejichž odvození je nutná předchozí znalost sekvence. Odvozování SSR je finančně i časově náročné (Gupta *et al.*, 2002). Jsou vhodné pro analýzu QTL, MAS (*marker assisted selection*), evoluční studie, analýzy příbuzenských vztahů mezi druhy, ale i pro genetické mapování a integrace genetických a fyzických map (Bhargava *et al.*, 2010; Ganal *et Röder*, 2007; Oliveira *et al.*, 2006; Paux *et al.*, 2008a; Richard *et Pâques*, 2000; Röder *et al.*, 1998).

Mikrosatelity u pšenice hrají významnou roli v genetickém mapování, ale i v dalších analýzách. Bylo zjištěno, že ve srovnání s RFLP markery sice detekují méně homologních lokusů, nicméně tento nedostatek je bohatě kompenzován jejich vysokým stupněm polymorfismu. A to je naopak velikou výhodou vzhledem k nízkému vnitrodruhovému polymorfismu pšenice (Röder *et al.*, 1995). Mikrosatelity můžeme najít kdekoli v genomu, tedy v kódujících i nekódujících oblastech (Tóth *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že u pšenice se nejvíce vyskytují mikrosatelity s motivy (GA)_n nebo (GT)_n (Röder *et al.*, 1995). Pro zvýšení jejich množství je možné odvodit další SSR z genomů diploidních předků subgenomů pšenice, např. z *Aegilops tauschii* (Guyomarc'h *et al.*, 2002). První mikrosatelitová mapa pšenice, která obsahovala 279 mikrosatelitových markerů, byla publikována Röder *et al.* v roce 1998 a v následujících letech pak byla dále zahušťována (Gupta *et al.*, 2002; Somers *et al.*, 2004). Ale i v posledních letech bylo pro pšenici navrženo relativně velké množství nových mikrosatelitových markerů (Gupta *et al.*, 2003; Gupta *et Varshney*, 2000; Guyomarc'h *et al.*, 2002a, b).

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SNP (jednonukleotidové polymorfismy) jsou bi-alelické markery založené na rozdílech sekvencí v jednom nukleotidu a představují tak nejmenší jednotku genetické variability mezi jednotlivci (Ganal *et Röder*, 2007). Jedná se o výskyt několika přirozených variant (alel) v populaci zasahujících jediný nukleotid, přičemž minimální četnost alely musí

být 1%. Příčinou jejich vzniku může být transverze nebo tranzice. Možnou příčinou jsou i delece a inserce, nicméně ty by formálně neměly být za SNP považovány (Brookes, 1999; Kahl *et al.*, 2005). Výhodou SNP je jejich velká početnost v genomu, fakt, že např. oproti mikrosatelitům méně podléhají mutacím, jsou rovnoměrně rozmístěny podél celého genomu a jejich detekce je relativně jednoduchá (Kahl *et al.*, 2005). Jednonukleotidové polymorfismy představují markery vhodné pro konstrukce genetických a fyzických map, sekvenování genomu, MAS a další genetické a genomické aplikace (You *et al.*, 2011).

SNP jsou většinou identifikovány na základě srovnávání sekvencí jednotlivých linií nebo odrůd nebo pomocí počítačových analýz veřejně přístupných databází ESTů (Rafalski, 2002). Srovnávací přístup je vhodný především pro diploidní organismy, nikoli však pro komplexní genom hexaploidní pšenice. Důvodem je, že navržený pár primerů často amplifikuje lokusy současně ze tří subgenomů, takže výsledná směs PCR produktů může být směsí tří různých sekvencí, což výrazně ztěžuje sekvenční analýzu. Ve spoustě případů ani není možné rozlišit, ze kterého subgenomu daná sekvence pochází (Ganal *et Röder*, 2007). Překonání této překážky umožňuje právě využití bioinformatiky a databází ESTů, ve kterých se nachází přibližně 500 000 těchto sekvencí odvozených z genomu pšenice (Lazo *et al.*, 2004). Jiným přístupem identifikace SNP je redukce komplexity hexaploidního genomu pšenice, a to pomocí primerů specifických pro jednotlivé subgenomy. Nicméně ani specifická primery nezaručí, že amplifikovaný produkt bude skutečně specifický pro daný subgenom. Samotná komplexita genomu pšenice ale umožňuje použití nullitetrasomických linií a v tom případě je pak jednoduché určit genomově specifický amplifikovaný produkt a zároveň jej přiřadit ke konkrétnímu chromozómu. Přístup využívající specifické primery je používán i v projektu s názvem *Haplotype polymorphism in polyploid wheats and their diploid ancestors* (<http://wheat.pw.usda.gov/SNP>). Cílem projektu je vytvořit co největší množství genomově specifických primerů pro identifikaci SNPů v hexaploidní pšenici, ale i v diploidních a tetraploidních genomech jejich předků (Ganal *et Röder*, 2007).

Podle You *et al.* (2011) je nejvhodnějším přístupem objevování nových SNP resekvenování genomu pomocí sekvenačních technologií nové generace (NGS) bez nutnosti referenční genomové sekvence. Tento přístup využívá data z transkriptomu nebo knihoven s redukovaným zastoupením genomových sekvencí a je vhodný i pro komplexní genomy s velkým obsahem repetitivních sekvencí, tedy i pro genom pšenice (Lai *et al.*, 2012).

EST (*Expressed Sequence Tag*)

Zkratka EST (*Expressed Sequence Tag*) označuje sekvence o délce 200 - 700 bp (Lazo *et al.*, 2004) vzniklé osekvenováním klonů z jednoho konce, které byly náhodně vybrány z cDNA knihovny (Ali *et al.*, 2000). Nevýhodou ESTů je, že není možné docílit vyšší kvality sekvence, než je 99%, tedy že v průměru 1 báze ze 100 není správně (Ganal *et Röder.* 2007). U pšenice byly ESTy mapovány s využitím delečních linií do tzv. binů. Celkem bylo zamapováno 16 099 ESTů (Qi *et al.*, 2004). Ze samotných ESTů však není možné určit pořadí lokusů v jednotlivých binech. Tuto překážku lze překonat využitím kolinearity u příbuzných druhů a lokusy je možné seřadit *in silico* (Sorrells *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2009). I přes všechna uvedená omezení jsou knihovny a databáze ESTů jedním z významných zdrojů pro poziční klonování nebo pro odvozování nových molekulárních markerů, např. SSR (Varshney *et al.*, 2005). Také jsou užitečným zdrojem pro genetické a fyzické mapování a pro anotaci genových a genomových sekvencí (Choulet *et al.*, 2013).

V prosinci roku 2011 bylo v databázi GenBank dostupných 1 361 630 ESTů odvozených z genomu pšenice (Xu *et al.*, 2012).

DArT (*Diversity Array Technology*) markers

Jako alternativa pro markery založené na PCR technikách, vyznačující se zpravidla nižší kapacitou, byly vytvořeny vysokokapacitní technologie založené na hybridizaci - např. DArT (*diversity array technology*) (Jaccoud *et al.*, 2001). DArT markery vykazují mendelistickou dědičnost (Akbari *et al.*, 2006), jsou finančně nenákladné, rychlé a dobře reprodukovatelné. Největší jejich výhodou ale je, že umožňují analýzu až stovek tisíců lokusů najednou bez předchozí znalosti sekvence. Naopak jejich nevýhodou je nerovnoměrná distribuce podél chromozómu.

Prvním krokem pro vytvoření mapovací platformy je snížení komplexity genomu - tvorba genomových reprezentací. Genomová DNA je štěpena dvěma restričními enzymy, kdy jeden enzym štěpí DNA vzácně a je citlivý k metylaci (např. *PstI*) a druhý enzym štípe naopak často. Na fragmenty vzniklé štěpením *PstI* jsou naligovány adaptory. Po vytvoření reprezentace je provedena amplifikace pomocí PCR s primery komplementárními k adaptorům. Amplikony jsou zaklonovány do vektorů a nanoseny na mikroskopické sklíčko (= *microarray*). Srovnávané reprezentace jsou připraveny stejným způsobem a po označení různými fluorescenčními barvivy jsou nanoseny na připravenou array. Po hybridizaci je array skenována a analyzována pomocí počítačových programů, které převádějí intenzitu

fluorescenčního záření do dvojkové soustavy (0 - 1). Použitím této mapovací platformy tedy zjišťujeme, zda je přítomen nebo nepřítomen určitý fragment DNA v genomu analyzovaného organismu nebo populace (Jaccoud *et al.*, 2001).

Přestože byly DArT markery původně navrženy pro rýži a obilniny s malým diploidním genomem (Jacoud *et al.*, 2001), ukázalo se, že jsou spolehlivými markery i pro analýzu větších genomů jako má např. ječmen (Wenzl *et al.*, 2004), a dokonce i genomů polyploidů jako je pšenice (Akbari *et al.*, 2006). Lze je odvodit i z tříděných chromozómů pšenice, což umožňuje cílený vývoj markerů pro určitou oblast komplexního genomu (Wenzl *et al.*, 2010).

ISBP (*Insertion Site Based Polymorphism*) markery

Přírozenou součástí velkých genomů jsou oblasti repetitivní DNA, které obsahují i transponovatelné elementy (TE). Tyto elementy se často vkládají do jiných TE. Vznikají tak unikátní spoje. Amplifikací těchto spojů a jim přilehlých oblastí je možné odvodit markery označované jako ISBP (*Insertion Site Based Polymorphism*). Primery pro PCR amplifikaci pak mohou být navrženy tak, aby byly oba komplementární s místy spojů mezi jednotlivými TE, nebo aby byl jeden komplementární ke spojení a druhý byl odvozen z přilehlé sekvence DNA (Paux *et al.*, 2006). ISBP markery tedy patří do skupiny markerů, u kterých je nutná předchozí znalost sekvence. Pro odvozování primerů je možné využít počítačový program *IsbpFinder*, který automaticky detekuje spoje mezi TE a primery na ně navrhne (Paux *et al.*, 2010).

Obecně jsou ISBP dominantní markery založené na přítomnosti či nepřítomnosti daného spoje TE. Jejich úroveň polymorfismu lze zvýšit sekvenční analýzou místa spoje a identifikací případných SNP. Jsou vhodné pro MAS, evoluční studie, ale i pro mapování genetické i fyzické, včetně mapování pomocí radiačních hybridů (Paux *et al.*, 2010). V některých pracích se můžeme setkat také s označením RJM (*repeat DNA junction markers*), což je alternativní označení ISBP markerů. Příkladem je práce Wanjugi *et al.* (2009), kteří se zabývali odvozováním genomově specifických RJM markerů z diploidního genomu *Ae. tauschii*.

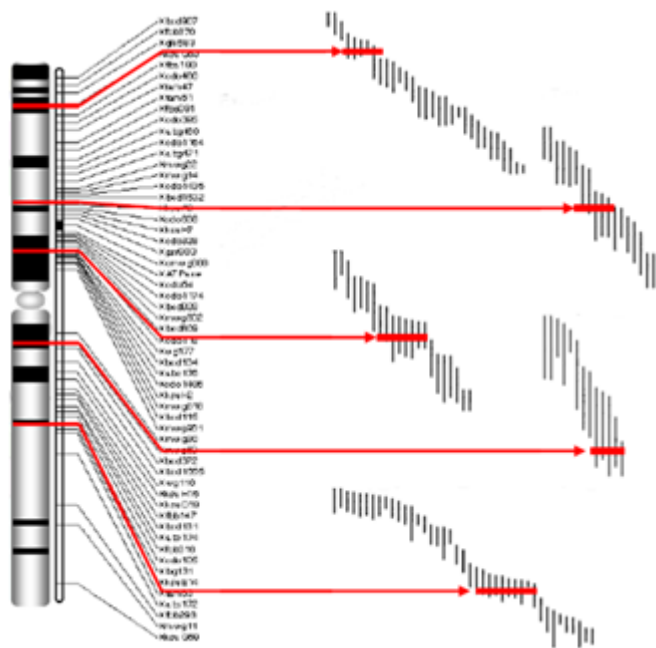
STS (*Sequence Tagged Site*) markery

Sequence tagged site (STS) jsou krátké unikátní sekvence, jejichž délka nepřesahuje 1000 bp (Meyers *et al.*, 2004). Pro odvození těchto markerů je nutné znát sekvenci. Jsou jednoduše detekovatelné pomocí PCR (Lem *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005; Wang,

2009). Za STS marker lze považovat jakoukoli unikátní sekvenci v genomu, s jejíž pomocí je možné identifikovat skupiny překrývajících se klonů, které reprezentují stejnou oblast genomu. V praxi to tedy znamená, že STS markery mohou být odvozeny z vícero zdrojů, jimiž mohou být např. RFLP markery nebo cDNA (Palazzolo, 1991). Kromě unikátnosti mají STS markery v porovnání s jinými typy markerů i další výhody. Například ve srovnání s mikrosatelity je odvozování STS markerů levnější (Lem *et* Lallemend, 2003).

3.2.3.5 Přímé ukotvování

Přímé ukotvování (obr.7) využívá markery již dříve zamapované v genetických nebo RH mapách. Cílem metod přímého ukotvování je vytipovat kandidátní BAC klony obsahující příslušný marker. Následně jsou tyto klony lokalizovány v odpovídajících kontizích pomocí FPC (*FingerPrintedContigs*). Díky tomu je možné určit nebo potvrdit překryvy BAC klonů a orientovat jednotlivé kontigy. V ideálním případě by marker neměl být obsažen v BAC klonech z různých kontigů. Ve skutečnosti to ale často neplatí. Důvodem může být sekvence samotné sondy nebo primerů, které mohou být komplementární k duplikovaným či repetitivním sekvencím.



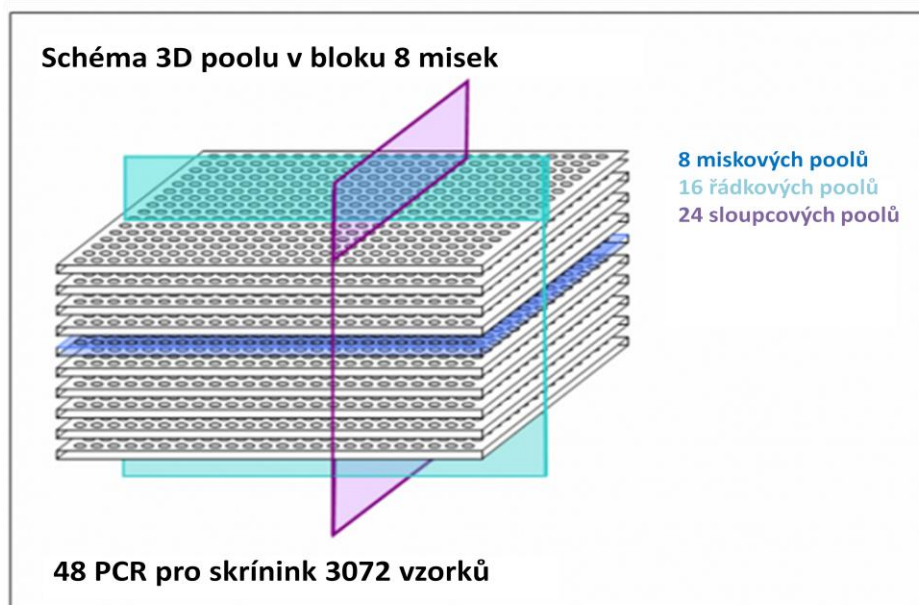
Obr.7: Znárodnění přímého ukotvování (převzato z: Paux *et* Akhunov, 2010)

Postupný skrínink celých BAC knihoven s pomocí PCR je časově náročný díky velkému množství reakcí nutných pro identifikaci klonů pozitivních na daný marker. Řešením problému se stalo vytvoření směsných vzorků (*pools*) z klonů knihovny. Prvním způsobem tvorby poolů byla dvoudimenzionální (2D) strategie, kdy byly vytvořeny směsné vzorky

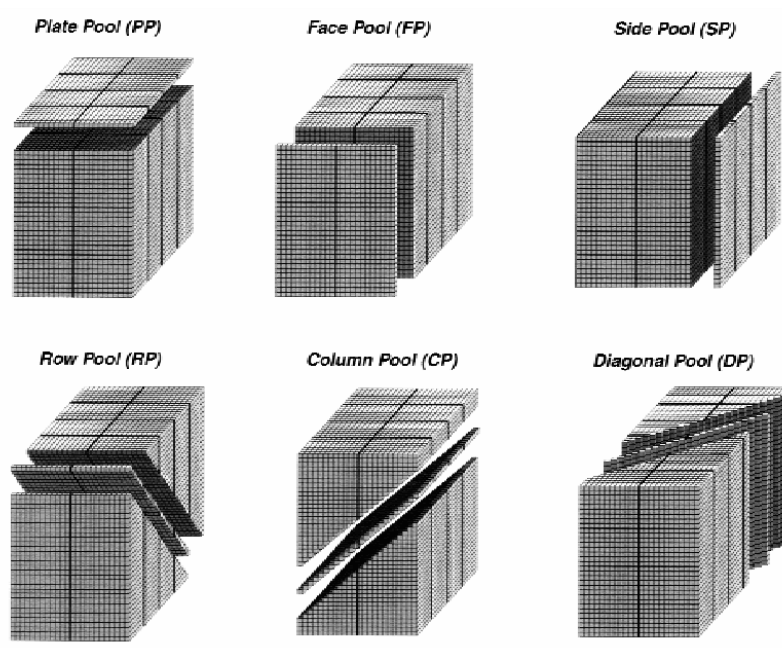
z řádků a sloupců. Pozitivní klon se pak nacházel na průsečíku pozitivního sloupce a řádku. Nicméně přesné určení konkrétního klonu není ve 2D strategii jednoduché díky většímu počtu falešně pozitivních klonů (Barillot *et al.*, 1991). Tento problém řeší využití třetí dimenze, tedy třídídimenzionální (3D) strategie, která poskytuje kompletní adresu pozitivního klonu (obr.8). Pozitivní klon se nachází na průsečíku řádku, sloupce a misky. Poolovací strategie aplikovaná na BAC klony je používána pro skrínink knihoven s pomocí PCR, ale je možné ji kombinovat i s metodami skríninku založenými na DNA-DNA hybridizaci. V tom případě lze připravit směsné vzorky i ze sond (Luo *et al.*, 2009).

Dle Paux *et al.* (2008b) je pro komplexní genomy s velkým obsahem repetitivní DNA nejlepší šestidímenzionální (6D) strategie (obr.9), která byla poprvé použita pro skrínink knihovny čiroku (Klein *et al.*, 2000) nebo později kukuřice (Yim *et al.*, 2007). 6D poolovací strategie zahrnuje tvorbu miskových (*plate pools*, PP), čelních (*face pools*, FP) a bočních (*side pools*, SP) poolů, které jsou souhrnně označovány jako 3D zásobník (3D *stack*). Dále jsou vytvořeny pooly řádkové (*row pools*, RP), sloupcové (*column pools*, CP) a diagonální (*diagonal pools*, DP). 3D zásobník se používá pro identifikaci pozitivních klonů, zatímco zbylé pooly se používají pro potvrzení pozitivních klonů (Ariyasada *et Stein*, 2012). Podle Luo *et al.* (2009) je pro komplexní genom pšenice a diploidní genomy jejich předchůdců nejvýhodnější 5D strategie. Pro skrínink BAC knihovny připravené z krátkého ramene chromozómu 7D pšenice byla ovšem použita strategie 3D poolů (Šimková *et al.*, 2010). 3D pooly je možné vytvořit i z klonů MTP. Tuto možnost využili Paux *et al.* (2008a) pro skrínink knihovny připravené z chromozómu 3B. Strategie 3D poolů má oproti šestidímenzionální strategii finančně méně náročnou přípravu poolů. Ale i 3D strategie má svoje úskalí v podobě zvýšeného množství nejednoznačných BAC adres, což pro přesné určení vyžaduje další doplňkové reakce. Pro překonání tohoto problému byl vytvořen program Elephant (*electronic physical map anchoring tool*), který kombinuje informace o BAC kontizích z programu FPC s výsledky skríningu 1D - 6D poolů (Paux *et al.*, 2008b) a napomáhá tak dekonvoluci nejednoznačných BAC klonů.

Problém nejednoznačné lokalizace markerů ve více BAC klonech řeší technologie Illumina GoldenGateTM *oligonucleotide assays*, jinak označované jako *Oligonucleotide Pool Assays* (OPAs). Tuto strategii je možné používat jako vysokokapacitní a současně provádět skrínink až pro 1536 lokusů. Uvedená platforma vykazuje vysoké procento jednoznačně přiřazených klonů a kontigů k lokusům na genetické mapě (Luo *et al.*, 2009).



Obr.8: Schéma třidimenzionální poolovací strategie (Upraveno dle: <http://cnrgv.toulouse.inra.fr/Services/DNA-Pool-production>)



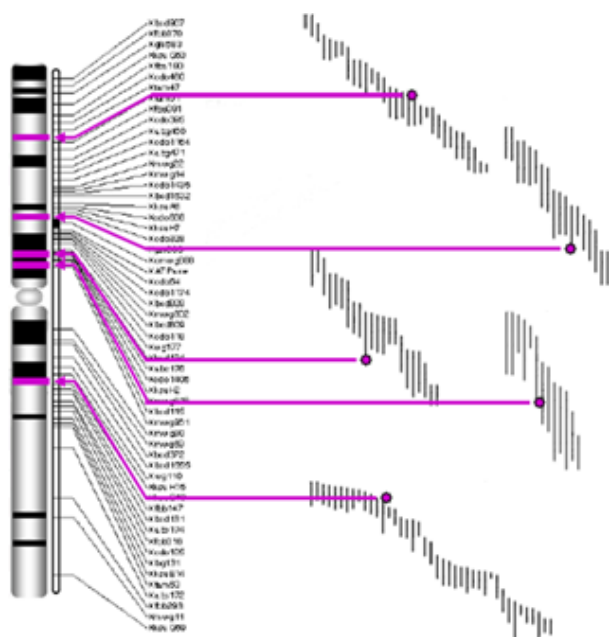
Obr.9: Schéma šestidimenzionální poolovací strategie (převzato z: Klein *et al.*, 2000)

Pro zjištění velkého množství adres najednou je vhodnější použít strategii založenou na DNA-DNA hybridizaci, kdy radioaktivně značené sondy hybridizují s klony z knihovny na vysokohustotních filtrech (Gardiner *et al.*, 2004). Jako sondy mohou sloužit DNA subklony, PCR amplikony nebo DNA oligonukleotidy. Velikost DNA subklonů a PCR amplikonů se pohybuje ve stovkách bp a pro jejich značení se používá *nick* translace nebo

random priming. Jejich nevýhodou je zvýšená pravděpodobnost výskytu repetitivních elementů. V kratších DNA oligonukleotidech je pravděpodobnost výskytu repetitivních elementů podstatně nižší, nicméně se hůře značí a jejich hybridizační kinetika je horší než kinetika prvních dvou zmiňovaných typů sond (Han *et al.*, 2000). Existuje ale i další typ sond (Ross *et al.*, 1999 cit. Gardiner *et al.* 2004, Han *et al.*, 2000). Jsou označovány jako *overgo* (*overlapping oligonucleotide*) sondy. Sondy se na rozdíl od obyčejných oligonukleotidů snadno značí a jejich délka se pohybuje do 40 bp. Jsou navrženy na cDNA nebo klony, které již prošly preskríníngem pro eliminaci repetice. Metoda skříninku hybridizací byla použita např. pro ukotvování fyzické mapy člověka (Han *et al.*, 2000; Asakawa *et al.*, 1997) nebo kukuřice (Gardiner *et al.*, 2004).

3.2.3.6 Reverzní ukotvování

Postup reverzního ukotvování (obr.10) je opačný k ukotvování přímému. Vychází se ze sekvenční informace získané z celých BAC klonů nebo jejich konců (*BAC-end sequence* = BES). Na základě znalosti těchto sekvencí jsou vyhledávány polymorfismy a z nich odvozeny markery. Navržené markery jsou potom mapovány rekombinačním mapováním. Pokud jsou markery unikátní sekvence (STS), lze je mapovat za použití aneuploidních, delečních nebo RH linií. Tento postup byl použit pro integraci genetické a fyzické mapy např. u pšenice, kde byly z BES odvozovány ISBP markery (Paux *et al.*, 2010), nebo u *Aegilops tauschii*, kdy byly z BES nebo sekvencí získaných pomocí *shotgun* sekvenování odvozovány RJM markery (Wanjugi *et al.*, 2009).



Obr.10: Schématické znázornění reverzního ukotvování (převzato z: Paux *et Akhunov*, 2010)

3.2.3.7 Hybridní ukotvování

Hybridní ukotvování je metoda integrace map, která využívá sekvenování. Z náhodně vybraných chromozómových sekvencí, získaných pomocí *shotgun* sekvenování, jsou odvozovány nové markery (ISBP, SSR, EST, SNP), které jsou potom použity pro skríníng BAC knihoven nebo pro RH či deleční mapování. Odvozené markery jsou tedy zaneseny jak do kontigů, tak do genetické mapy (Paux *et Akhunov*, 2010). K ukotvování je možné použít také tzv. GenomeZipper, který představuje virtuální uspořádání genových sekvencí na chromozómech, které je založeno na syntenii s příbuznými druhy, pro něž je dostupná kompletní genomová sekvence (Mayer *et al.*, 2009).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1.1 Biologický materiál

Fyzická mapa byla sestavena z klonů BAC knihovny krátkého ramene chromozómu 7D pšenice *Triticum aestivum* L. kultivaru Chinese Spring (označení TaaCsp7DShA). Knihovna obsahuje 49 152 BAC klonů, které jsou uchovávány ve 128 miskách o 384 jamkách. Fyzická mapa byla sestavena na základě 39 765 použitelných fingerprintů získaných pomocí SNaPshot technologie. K sestavení bylo použito FPC. Fyzická mapa se skládá z 931 kontigů větších než dva klony, které pokrývají rameno z 95%. MTP ramene 7DS tvoří 4608 klonů uspořádaných ve 12 miskách o 384 jamkách

Pro skrínink knihovny za účelem ukotvení fyzické mapy bylo vytvořeno 16 superpoolů obsahujících klony vždy z 8 misek, 128 miskových poolů a 768 třídimenzionálních poolů (Šimková *et al.*, 2010). Dále bylo připraveno 52 3D poolů z MTP.

Pro ověření specifčnosti navržených primerů pro lokusy na 7DS byla použita DNA izolovaná z ditelosomické linie pro rameno 7DL pšenice kultivaru Chinese Spring, amplifikovaná DNA krátkého ramene chromozómu 7D pšenice a DNA z rostlin kultivaru Chinese Spring se standardním karyotypem.

Pro mapování nově odvozených STS markerů byl použit panel radiačních hybridů pro D genom připravený křížením hexaploidní syntetické pšenice SW58 (*T. aestivum* L., $2n = 42$; AABBDD) s D genomem pocházejícím z *Ae. tauschii*, a tetraploidního kultivaru pšenice Langdon (*T. durum*; $2n = 28$; AABB) (Kumar *et al.*, 2012) Z celého panelu bylo vybráno 121 linií, u kterých byly za pomoci série DArT, SSR a EST markerů detekovány delece chromozómu 7D (tzv. informativní linie: A.Kumar, nepublikováno).

4.1.2 Přístrojové vybavení

- centrifuga MICROMAX RF, CR 4i (Thermo Scientific)
- dokumentační systém Syngene s UV transiluminátorem (Syngene)
- komůrka pro elektroforézu Owl System (Thermo Scientific)
- zdroj pro elektroforézu: Lightning Volt™ Power Supply (model OSP-300, Biotech)
- laboratorní váhy (ViBRA)
- mikrocentrifuga (Labnet)
- mikropipety Nichipipet EX (NICHIRYO), Discovery
- mikrovlnná trouba

- multikanálové mikropipety Discovery
- iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad); C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad)

4.1.3 Chemikálie

- deoxyribonukleosid trifosfáty dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Fermentas)
- PCR primery (Invitrogen; Sigma-Aldrich)
- Taq polymeráza
- agarosa (SERVA)
- velikostní marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas)
- ethidium bromid (Sigma Chemical)

4.1.4 Pufry a roztoky

10x PCR pufr

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

STOP C pufr

- 100 mM EDTA pH 8
- 1% (w/v) SDS
- 0,05% (w/v) xylencyanol
- 42,5% glycerol

5x TBE (pH 8)

- 445 TRIS base
- 445 mM kyselina boritá
- 10 mM EDTA

Cresol Red (100 ml)

- 7,5 g sacharosa
- 50 mg Cresol Red
- doplnit do 100 ml H₂O

4.2 Metodika

4.2.1 Přímé ukotvování fyzické mapy

Přímé ukotvování fyzické mapy na mapu genetickou bylo provedeno jednak pomocí skríningu BAC knihovny TaaCsp7DShA dostupnými genetickými markery, jednak na základě *in silico* integrace s ukotvenou fyzickou mapou donora D genomu pšenice seté - mnohoštetu *Aegilops tauschii* (Luo *et al.*, 2013). Výsledky získané manuálním skríninkem i na základě *in silico* ukotvování byly zaneseny do fyzické mapy 7DS pomocí počítačového programu FPC.

4.2.1.1 Manuální ukotvování

PCR reakce

Skrínig BAC knihovny TaaCsp7DShA byl proveden pomocí PCR s vybranými genetickými markery na superpoolech, miskových poolech nebo 3D poolech BAC klonů připravených dle Šimková *et al.* (2010), a 3D poolech z klonů MTP této knihovny. Byl připraven premix pro 96-jamkovou misku (složení reakční směsi viz tabulka I) a provedena PCR reakce (teplotní průběh viz tabulka II). Teplota nasedání primerů (T_a) byla určena na základě teploty tání (T_m) udané výrobcem, nebo na základě reference v databázi GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>; tabulka III). Prvotně byla T_a stanovena o 2 - 3°C nižší než T_m , v některých případech však bylo nutné ji dále optimalizovat pro dosažení lepšího výsledku. Pokud ani po úpravách teplot nebyl detekován produkt nebo bylo nalezeno příliš mnoho pozitivních klonů, byl marker vyřazen.

Tabulka I: Složení reakční směsi pro PCR

Složky	Konc. v reakci	1 reakce	Premix na 100 reakcí
Deionizovaná voda*		4,4 μ l	455 μ l
10x pufr pro polymerázu (včetně $MgCl_2$)	1x	1 μ l	100 μ l
5x Cresol Red	1x	2 μ l	200 μ l
dNTPs (10 mM)	200 μ M	0,2 μ l	20 μ l
Primery R + F (50 μ M)	1 μ M	0,2 μ l	20 μ l
Taq polymeráza (2U/ μ l)	4U/100 μ l	0,2 μ l	20 μ l
DNA z naředěných BAC poolů	cca 10 ng/ μ l	2 μ l	---
Celkem		10 μ l	815 μ l

*) objem vody byl kvůli odparu v premixu navýšen o 15 μ l

Tabulka II: Teplotní průběh PCR

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95°C	5 min	1
PCR amplifikace	95°C	30 s	35
	Ta	30 s	
	72°C	1 min	
Závěrečná elongace	72°C	10 min	1

Sekvence primerů pro markery *barc*, *cfđ*, *fbá*, *wmc*, *gpw*, *gwm* a *mag* (tabulka III), byly zjištěny z genetických map dostupných na stránkách databáze GrainGenes.

Tabulka III: Markery z databáze Graingenes použité pro přímé ukotvování

Marker	Typ markeru	Sekvence primerů	Použitá Ta
<i>barc70</i>	SSR	F: GCGAAAAACGATGCGACTCAAAG R: GCGCCATATAATTCAGACCCACAAAA	68°C
<i>barc92</i>	SSR	F: GCGGTTGTGATGTGCTGAAAGATGAATGT R: GCGTGGGCTGTTTCTTCTTTTGTTTTC	66°C
<i>barc128</i>	SSR	F: GCGGGTAGCATTATGTTGA R: CAAACCAGGCAAGAGTCTGA	52°C
<i>barc154</i>	SSR	F: GTAATCCGGTTCCACTTGACATT R: GGATGGGCAGCTTCAAGGTATGTT	50°C
<i>barc184</i>	SSR	F: TTCGGTGATATCTTTTCCCCTTGA R: CCGAGTTGACTGTGTGGGCTTGCTG	65°C
<i>cfa2174</i>	SSR	F: ACGGCATCACAGGTTAAAGG R: GGTCTTTGCAGTGCTAGCCT	61°C
<i>cfđ14</i>	SSR	F: CCACCGGCCAGTAGTATT R: TCCTGGTCTAACAACGAGAAGA	60°C
<i>cfđ21</i>	SSR	F: CCTCCATGTAGGCGGAAATA R: TGTGTCCCATTCACTAACCG	60°C
<i>cfđ31</i>	SSR	F: GCACCAACCTTGATAGGGAA R: GTGCCTGATGATTTTACCCG	60°C
<i>cfđ41</i>	SSR	F: TAAAGTCTCAGGCGACCCAC R: AGTGATAGACGGATGGCACC	60°C
<i>cfđ46</i>	SSR	F: TGGTGGTATAGTCGTTGGAGC R: CCACACACACACACCATCAA	60°C
<i>cfđ66</i>	SSR	F: AGGTCTGGTGGTTTTGGTG R: TTTTCACATGCCACAGTTG	60°C
<i>fbá253</i>	SSR	F: AACAGCTATGACCATG R: GTAAAACGACGG CCAGT	53°C
<i>gpw1108</i>	SSR	F: TGCAAGTGTCTTAGAATCTGAAC R: TCTTGAACCTGAACCTTGC	61,5°C
<i>gpw1142</i>	SSR	F: TACTTGTGCGAGGTTCTCGG R: CCTCCCATTCACTCCTCTT	60°C
<i>gpw2160</i>	SSR	F: ATTTACGGCTCGACCACTCA R: ACTGGAAAGGGGCGCAAGC	61,5°C
<i>gpw5054</i>	SSR	F: CATTGTGTCCCCTTGACCA R: AATTGCCAACTCAGCCATCT	60°C
<i>gpw5181</i>	SSR	F: AAGCACAGGGGAAAGTTCAA R: TTAGCACAATAGACCGGCTG	60°C
<i>gpw8188</i>	SSR	F: CATGGTCAACGTCTGGGTG R: CTTGGAGAGTAGGACGGCAG	61°C
<i>gwm121</i>	SSR	F: TCCTCTACAAACAAACACAC R: CTCGCAACTAGAGGTGTATG	55°C

Tabulka III (pokračování): Markery z databáze GrainGenes použité pro přímé ukotvování

Marker	Typ markeru	Sekvence primerů	Použitá Ta
<i>gwm295</i>	SSR	F: GTGAAGCAGACCCACAACAC R: GACGGCTGCGACGTAGAG	61°C
<i>gwm296</i>	SSR	F: AATTCAACCTACCAATCTCTG R: GCCTAATAAACTGAAAACGAG	53°C
<i>gwm350</i>	SSR	F: ACCTCATCCACATGTTCTACG R: GCATGGATAGGACGCCC	55°C
<i>mag1132</i>	STS	F: GTCATCTTCAGCCAGTCAACA R: GCTTGCGGAGGGATAATG	50°C
<i>mag2934</i>	STS	F: TGTTCAACAAGCGATTCAAGG R: AATGCAAGATGGTGGCTTCT	52°C
<i>mag3318</i>	STS	F: AGTTCAGCAGGGCATAACAGG R: GCGGCACCTTCATCTACTTC	52°C
<i>wmc450</i>	SSR	F: GCAGGACAGGAGGTGAAGAAG R: AGGCGTTGCTGATGACACTAC	61°C
<i>wmc463</i>	SSR	F: GATTGTATAGTCGGTTACCCCT R: ATTAGTGCCCTCCATAATTGTG	56°C
<i>wmc506</i>	SSR	F: CACTTCCTCAACATGCCAGA R: CTTTCAATGTGGAAGGCGAC	61°C
<i>wmc702</i>	SSR	F: GAATCACATCGAATGGATCTCA R: GAGGCCTTTTCGATATTCTGC	61°C
<i>gwm635</i>	SSR	F: TTCCTCACTGTAAGGGCGTT R: CAGCCTTAGCCTTGGCG	55°C

Elektroforetická separace

Po PCR reakci byla provedena elektroforetická separace PCR produktů na 1,2% agarózovém gelu v prostředí 0,5x TBE pufru při 120 V po dobu přibližně 80 min. Do jamek bylo naneseno 10 µl PCR produktu. Jako velikostní marker byl použit 100 bp DNA Ladder Plus. Po uplynutí doby separace byl gel obarven v 0,002% roztoku ethidium bromidu. Doba barvení gelu byla přibližně 30 min.

Vyhodnocení

Obarvené gely byly vizualizovány a vyfoceny pomocí dokumentačního systému Syngene. Kompletní adresa pozitivního BAC klonu pak byla identifikována na základě přiřazení specifických PCR produktů k miskovým, řádkovým a sloupcovým poolům a určením jejich průsečíku. V případě přítomnosti více pozitivních klonů na jeden superpool (osmice misek) bylo k jednoznačnému určení adersy pozitivního BAC klonu (dekonvoluci) využito údajů z fyzické mapy 7DS. Pokud byly tři BAC klony zařazeny do jednoho kontigu, byl kontig považován za jednoznačně identifikovaný. Rovněž se přihlíželo k tomu, zda BAC klony, které se ve fyzické mapě překrývaly s určenými pozitívními klony, pocházejí z misek, jež byly identifikovány jako pozitivní při skříninku miskových poolů. Při využití údajů z fyzické mapy stačilo pro identifikaci pozitivních kontigů skřínovat jen malou část 3D poolů.

4.2.1.2 *In silico* ukotvování

In silico ukotvování využívalo integrace fyzické mapy 7DS s ukotvenou mapou *Ae. tauschii*. Propojení fyzických map provedl Dr. Mingcheng Luo (university of California, Davis, USA) na základě vysoké podobnosti fingerprintů pocházejících z orthologních oblastí genomu obou druhů. Fyzická mapa 7DS z *Ae. tauschii* obsahovala 635 markerů se známou pozicí na genetické mapě (Luo *et al.*, 2013). Prostřednictvím grafického zobrazení v FPC byly identifikovány BAC klony ze 7DS pšenice, které měly překryv s klony z *Ae. tauschii* nesoucími marker. Z některých genetických markerů *Ae. tauschii* byly v Centru strukturní a funkční genomiky Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci odvozeny STS markery specifické pro pšenici (tabulka IV, Staňková, nepublikováno). Těmi byla skrínována BAC knihovna TaaCsp7DShA (viz podkapitola 4.2.1.1) za účelem ověření pozice markeru, predikovaného na základě integrace s mapou *Ae. tauschii*.

Tabulka IV: Markery pšenice odvozené ze sekvence markerů *Ae. tauschii* (Luo *et al.*, 2013)

Marker <i>Ae. tauschii</i>	Odvozený marker pšenice	Sekvence primerů pro pšenici	Ta
AT7D6458	<i>owm704</i>	F: AAGCGGATCCCAGTAACGAT R: CGATGTAATCTCGGCGGAAC	67°C
AT7D6434	<i>owm705</i>	F: TGGCAGGAAATGGAAGTTTT R: GAATGTTTCAAGAATTTCTCCGTA	61°C
AT7D6440	<i>owm706</i>	F: TAGCACAGGATAAATACAACCACT R: AAGACGAATGCAGTAAATAACACA	66°C
AT7D6421	<i>owm707</i>	F: ATGGACATCTTCAATAGGAATGG R: GCTAAGTTCTTGAACATTTTCTCAT	64°C
AT7D6420	<i>owm708</i>	F: CTGTCTCTCCACAGCGTGTC R: CGCCCCTGCATGGTAGTA	66,5°C
AT7D6420	<i>owm709</i>	F: AGGTTGTCAACTTCCACTGC R: AAATAATATAGGAGTGACTGAGCAAT	66,5°C
BE443936	<i>owm710</i>	F: TGACAATTTTGACAAGCCACA R: CGAAAGCATTTTGGAGCATT	64°C
AT7D6433	<i>STS123</i>	F: AGGGGTGCATCACATTTGTC R: AACTCCACAGGAAATAGCTCAAG	67°C
AT7D6433	<i>STS125</i>	F: CGTCTGCTATTATTCTTCCATGC R: TTGCCTTTGTGTATTGGTAGTGA	66°C
AT7D6427	<i>STS163</i>	F: AAGCAAGCATCTAACAGAACAAT R: AATGCTTGAATCAGGCAGA	65°C
AT7D6427	<i>STS164</i>	F: CTCTTTTTCTGCCTGATTCCA R: CTGTGGATGACCTCACAATAA	64°C

4.2.2 Reverzní ukotvování

Pro reverzní ukotvování byly použity BES klonů z MTP nebo kompletní sekvence BACů. Pomocí BLASTu byly v rámci těchto sekvencí identifikovány úseky unikátní pro 7DS. Pro takovéto sekvence byly navrženy páry primerů. Markery specifické pro 7DS byly mapovány na liniích radiačních hybridů a zaneseny do RH mapy.

4.2.2.1 Odvozování STS markerů

Pro odvozování STS markerů bylo k dispozici 9 216 BES získaných Sangerovým sekvenováním obou konců BAC klonů z MTP z knihovny TaaCsp7DShA. Dále byly použity kompletní sekvence sedmi BAC klonů z MTP, které byly získány *pair-end* sekvenováním technologií Illumina. Sekvence byly sestaveny do kontigů programem SaSSY (<http://sassy.mikeimelfort.com>) na pracovišti prof. Davida Edwardse (University of Queensland, Brisbane). Jednotlivé BACy byly reprezentovány dvěma až jedenácti kontigy. MTP. Přestože šlo v této fázi zejména o ověření vhodnosti postupu, byly pro odvozování markerů použity sekvence klonů z neukotvených kontigů.

Identifikace unikátních sekvencí

Pro identifikaci sekvencí unikátních pro lokusy na 7DS byl s danými BAC sekvencemi proveden na webovém rozhraní IWGSC (www.wheatgenome.org) BLAST proti sekvenčním kontigům ramen všech chromozómů pšenice. Na základě grafického výstupu BLASTu byly vybrány úseky unikátní pro 7DS. Pro ověření byly tyto sekvence následně pomocí BLAST porovnány se sekvenčními kontigy 7AS, 7BS a 7DS sestavenými na pracovišti prof. Davida Edwardse (www.wheatgenome.info)

Navrhování primerů

Pro navrhování primerů bylo provedeno vícenásobné porovnání (*multiple alignment*) vytipovaných sekvencí ze 7AS, 7BS a 7DS (Berkman *et al.*, 2011) pomocí počítačového programu Geneious Pro 5.4.4 (Biomatters). Následně byly vyhledány polymorfismy, na něž byly navrženy primery pomocí počítačového programu Primer3 (v. 0.4.0) dostupného na internetu (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Páry primerů byly navrhovány tak, aby výsledné PCR produkty, byly specifické pouze pro 7DS a měly velikost mezi 400 - 700 bp.

Gradientová PCR

Pro optimalizaci podmínek amplifikace s navrženými páry primerů byla provedena gradientová PCR (teplotní průběh viz tabulka V, složení reakční směsi viz tabulka I). Byla tak zjištěna optimální teplota nasedání primerů a tím zajištěna maximální specifická PCR. Jako pozitivní kontrola byla použita amplifikovaná DNA ze 7DS a DNA izolovaná z rostlin kultivaru Chinese Spring. Pro kontrolu specifčnosti primerů byla použita linie ditelosomika 7DL (negativní kontrola).

Tabulka V: Podmínky gradientové PCR

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95°C	5 min	1
PCR amplifikace	95°C	30 s	35
	58 - 68°C	30 s	
	72°C	1 min	
Závěrečná elongace	72°C	10 min	1

Elektroforetická separace a vizualizace produktů PCR byla provedena, jak bylo popsáno v kapitole 4.2.1.1.

4.2.2.2 Mapování odvozených STS markerů na RH liniích

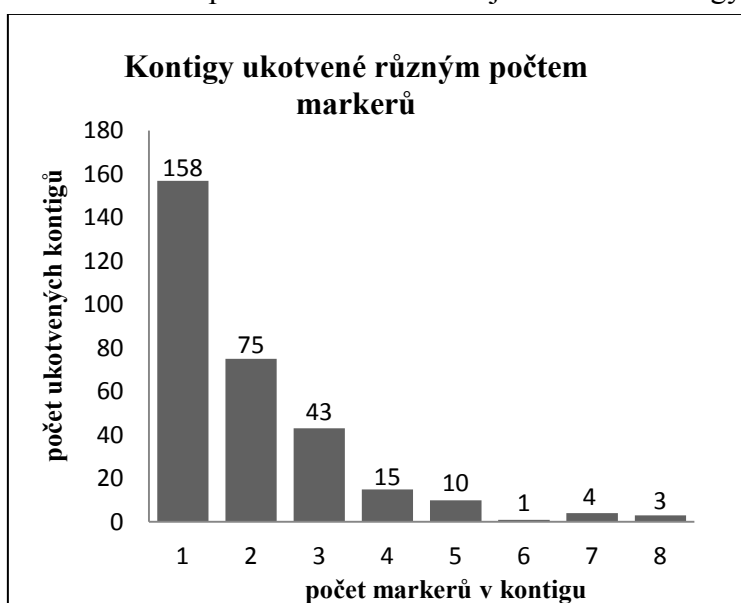
Oproti původnímu předpokladu nebyl pro mapování použit panel radiačních hybridů odvozený z kultivaru Chinese Spring (Riera-Lizarazu *et al.*, 2010), ale panel pro D genom odvozený z křížení syntetické pšenice SW58 a tetraploidního kultivaru Langdon (Kumar *et al.*, 2012b). Proto byly primery specifické pro 7DS z Chinese Spring nejprve otestovány na syntetické pšenici a kultivaru Langdon. Pro vlastní mapování byly použity jen ty páry primerů, které vytvořily PCR produkt na syntetické pšenici, nikoli však na DNA kultivaru Langdon. Pro mapování bylo použito 121 linií informativních pro chromozóm 7D (viz kapitola 4.1.1).

Mapování bylo provedeno na základě skríníngu RH panelu pomocí PCR (složení reakční směsi viz tabulka I, podmínky viz tabulka II, optimalizovaná Ta) na (ne)přítomnost jednotlivých STS markerů. Pro vyloučení falešně negativních výsledků byly linie nejprve otestovány pomocí ISBP markeru *cfp54* z chromozómu 3B pšenice (Paux *et al.*, 2008a). Pro samotné mapování byla PCR provedena v několika (minimálně dvou) opakováních. Získané výsledky byly zasazeny do kontextu stávající RH mapy chromozómu 7D, tvořené 215 DArT a třemi SSR markery (A. Kumar, nepublikováno) za pomoci softwaru Carthagene.

5 VÝSLEDKY

Cílem praktické části této diplomové práce bylo ukotvení fyzické mapy ramene 7DS a testování nových přístupů ukotvování, včetně využití integrace s fyzickou mapou *Ae. tauschii*, nebo odvozování STS markerů pro reverzní ukotvování ze sekvencí BAC klonů získaných technologií Illumina. Celkově bylo prostřednictvím 585 markerů ukotveno 309 kontigů, které reprezentují 51% fyzické mapy 7DS. Jednotlivé kontigy byly ukotveny jedním až osmi markery (graf 1).

Graf 1: Přehled počtu markerů ukotvujících BAC kontigy fyzické mapy 7DS



5.1 Přímé ukotvování

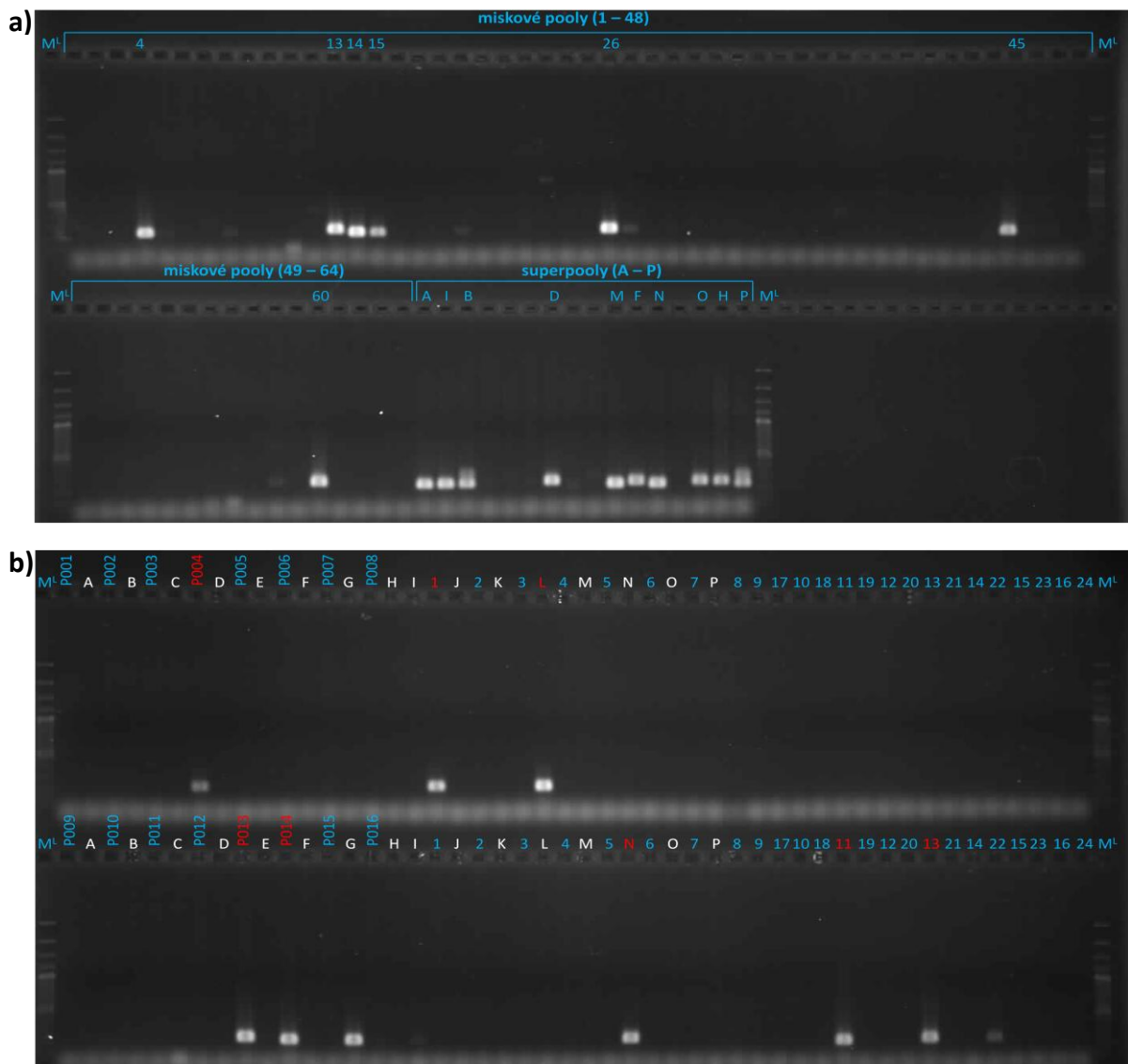
Přímé ukotvování BAC kontigů fyzické mapy 7DS bylo provedeno dvěma metodami. První metodou bylo manuální ukotvování prostřednictvím skríningu BAC knihovny. Druhou metodu pak představovalo *in silico* ukotvování na základě integrace s fyzickou mapou *Ae. tauschii*.

5.1.1 Manuální ukotvování

Skrínink BAC knihovny byl proveden pomocí PCR s vybranými markery z databáze GrainGenes (tabulka III) na poolech BAC klonů. K manuálnímu ukotvování bylo použito 31 markerů. Prostřednictvím 20 z nich (tabulka VII) se podařilo ukotvit 23 kontigů.

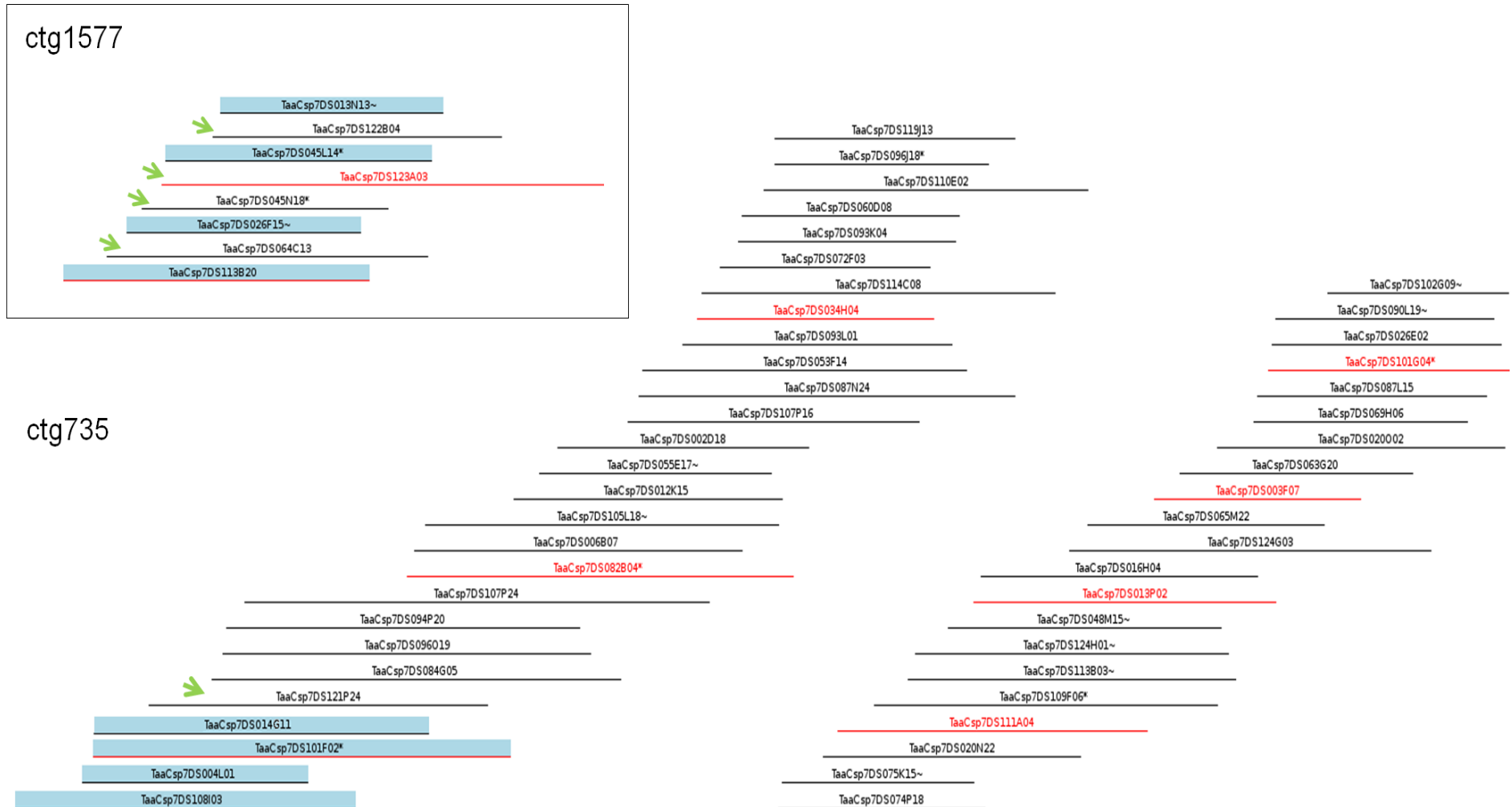
Na obrázku 11 je znázorněn příklad skríninku markerem *barc154* na miskových poolech, superpoolech (a) a 3D poolech pro misky 1 - 16 (b). Dvojí velikost získaných PCR produktů pro *barc154* naznačuje, že primery amplifikují dva lokusy na 7DS. Tento poznatek

usnadnil určení adres pozitivních klonů. Z výsledků skríninku 3D poolů misek 1 - 16 byly určeny adresy pozitivních klonů TaaCsp7DS004L01, TaaCsp7DS014G11 a TaaCsp7DS013N13. Konfrontací těchto údajů s údaji z fyzické mapy (obr.12) bylo potvrzeno, že klony TaaCsp7DS004L01 a TaaCsp7DS014G11 pocházejí z kontigu ctg735, zatímco klon TaaCsp7DS013N13 se nachází v kontigu ctg1577. Identifikované pozitivní BAC klony se v kontizích překrývají s klony pocházejícími z misek, jež byly identifikovány jako pozitivní při skríninku miskových poolů (obr.11a). To potvrzuje správnost určení pozitivních klonů.



Obr.11: Produkty PCR na miskových poolích 1 - 64 a superpoolích A - P (a) a na 3D poolích z misek 1 - 16 (b) s primery markeru *barc154* (M^L = velikostní marker 100 bp DNA LadderPlus).

- (a) Číselně jsou označeny pozitivní miskové pooly, písmeny jsou označeny pozitivní superpooly.
- (b) P001 - P016 = misky 1 - 16; A - P = řádky; 1 - 24 = sloupce; červeně jsou označeny pozitivní pooly

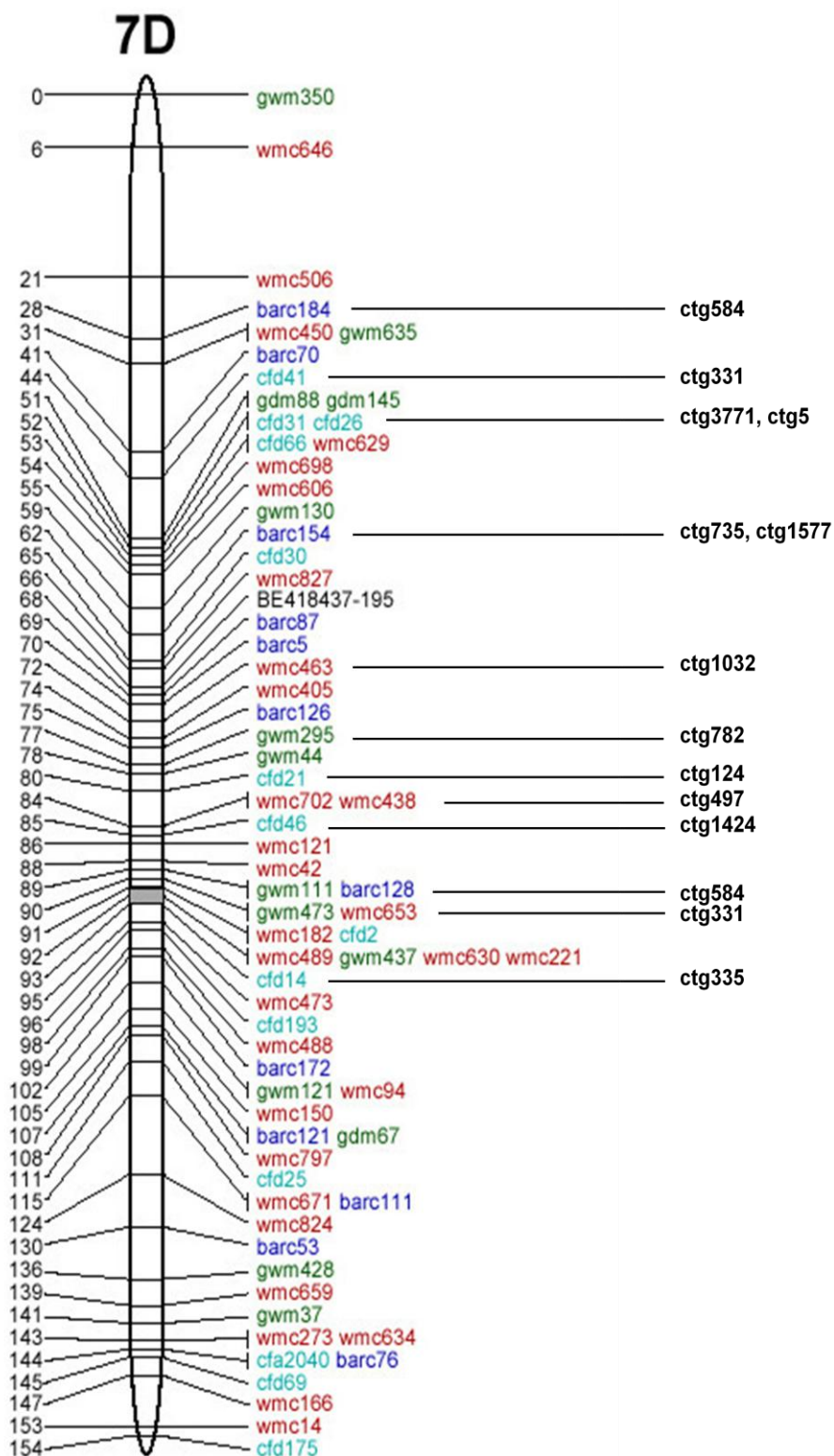


Obr. 12: Kontigy ctg1577 a ctg735 fyzické mapy 7DS pozitivní na marker *barc154*. Modře jsou označeny klony, jejichž adresa byla získána ze skříninku 3D poolů, zelenou šipkou jsou označeny klony, které byly identifikovány na základě porovnání fyzické mapy s miskovými pooly.

Z testovaných 31 markerů z databáze GrainGenes uvedených v tabulce III se podařilo do kontigů ukotvit 20 markerů, z čehož se dva SSR markery a jeden STS marker nacházejí ve dvou lokusech na 7DS (tabulka VII). Naopak se nepodařilo ukotvit 11 markerů (10 SSR a 1 STS). Důvodem byla absence jakéhokoli PCR produktu, tedy adresy pozitivního BACu, nebo naopak velké množství PCR produktů, které bylo patrně důsledkem nedostatečné specifičnosti primerů. Markery bylo možné lokalizovat na čtyřech genetických mapách *Wheat, Consensus SSR, 2004*; *Wheat, Composite, 2004*; *Wheat, Physical, SSR, 2004* a *Wheat, Nanda2419 x Wangshuibai 2008* dostupných na internetových stránkách GrainGenes (obr.13 až 16).

Tabulka VII: Markery z databáze GrainGenes ukotvené do kontigů

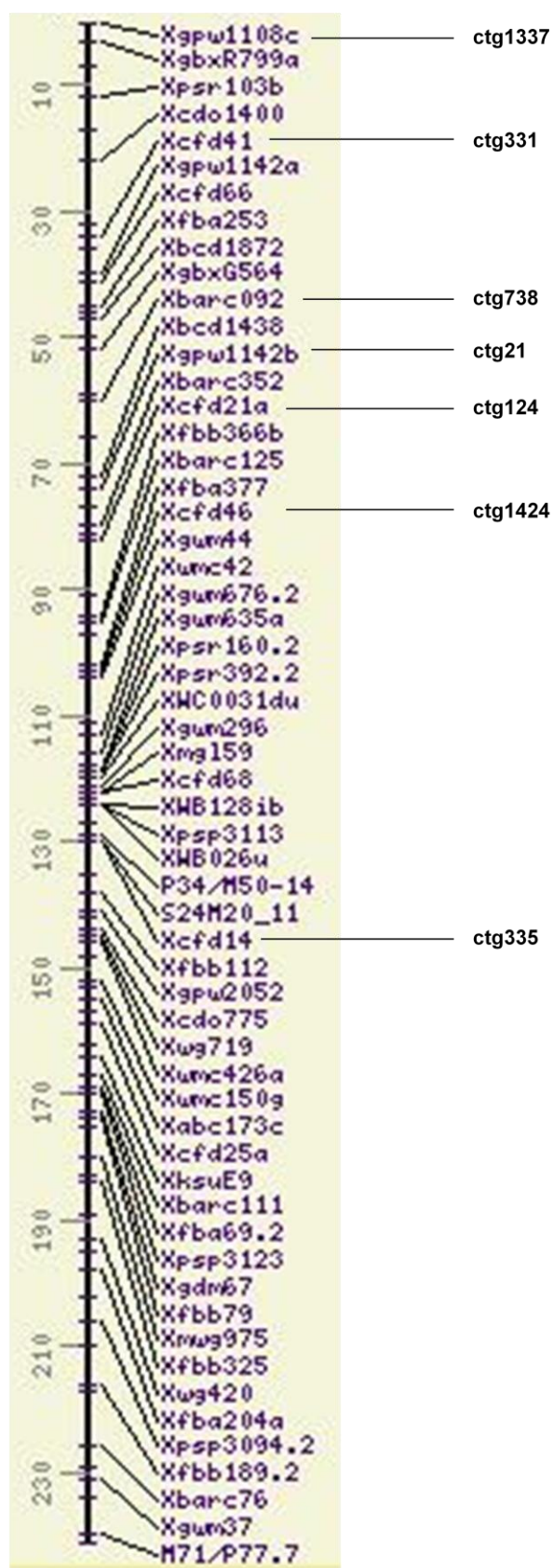
Marker	Typ markeru	Ukotvený kontig
<i>barc092</i>	SSR	ctg 738
<i>barc128</i>	SSR	ctg 584
<i>barc154</i>	SSR	ctg 735, ctg 1577
<i>barc184</i>	SSR	ctg 1298
<i>cfa2174</i>	SSR	ctg 905
<i>cfid14</i>	SSR	ctg 335
<i>cfid21</i>	SSR	ctg 124
<i>cfid31</i>	SSR	ctg 3771, ctg 5
<i>cfid41</i>	SSR	ctg 331
<i>cfid46</i>	SSR	ctg 1424
<i>gpw1108</i>	SSR	ctg 1337
<i>gpw1142</i>	SSR	ctg 21
<i>gpw5181</i>	SSR	ctg 3877
<i>gwm121</i>	SSR	ctg 869
<i>gwm295</i>	SSR	ctg 782
<i>mag2934</i>	STS	ctg 3259, ctg 1150
<i>mag3318</i>	STS	ctg 1411
<i>wmc463</i>	SSR	ctg 1032
<i>wmc506</i>	SSR	ctg 3773
<i>wmc702</i>	SSR	ctg 497



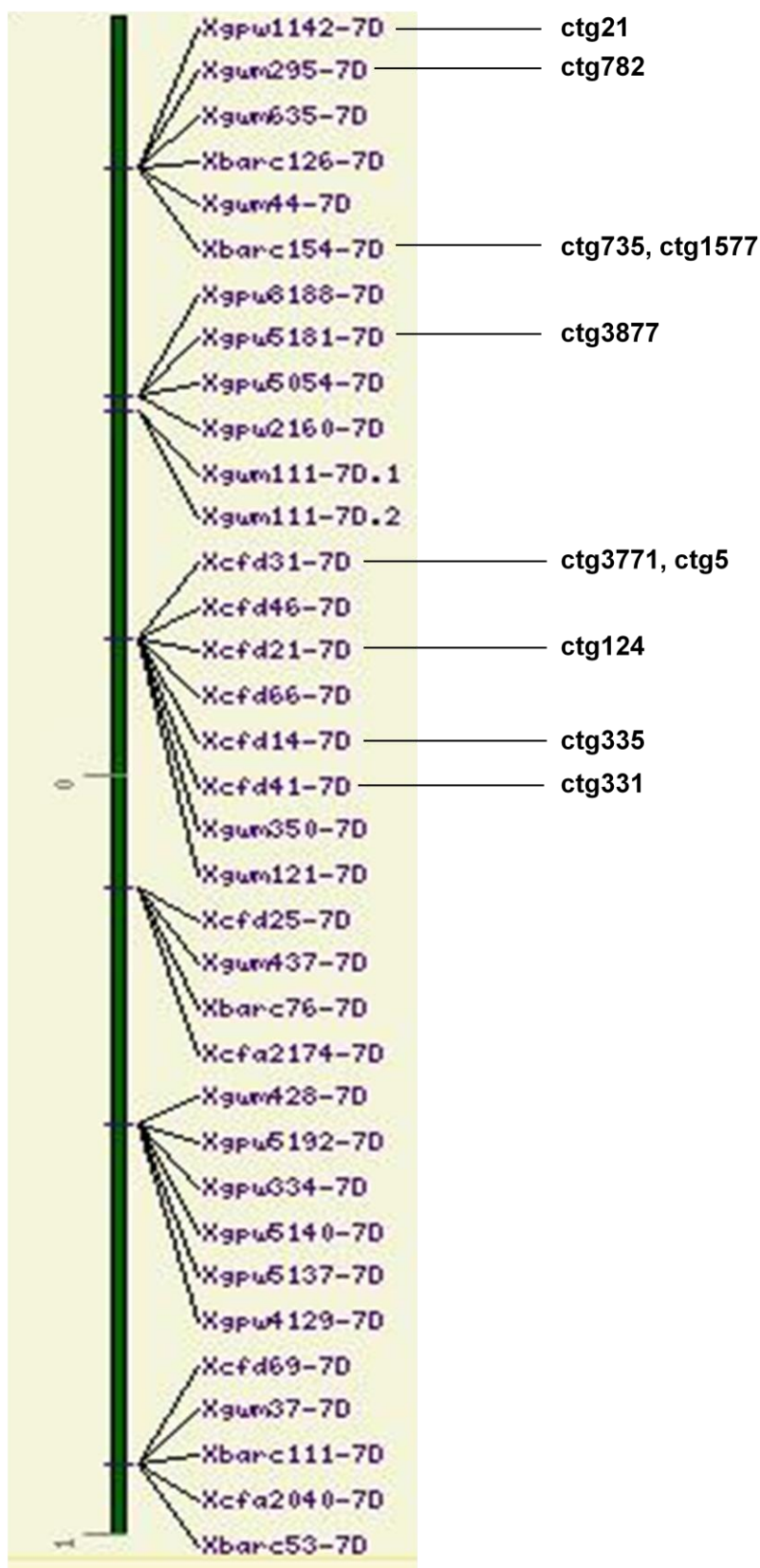
Obr.13: Ukotvení kontigů fyzické mapy 7DS na genetickou mapu *Wheat, Consensus SSR, 2004* (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>).

Wheat, Composite, 2004

Kontigy z fyzické mapy 7DS



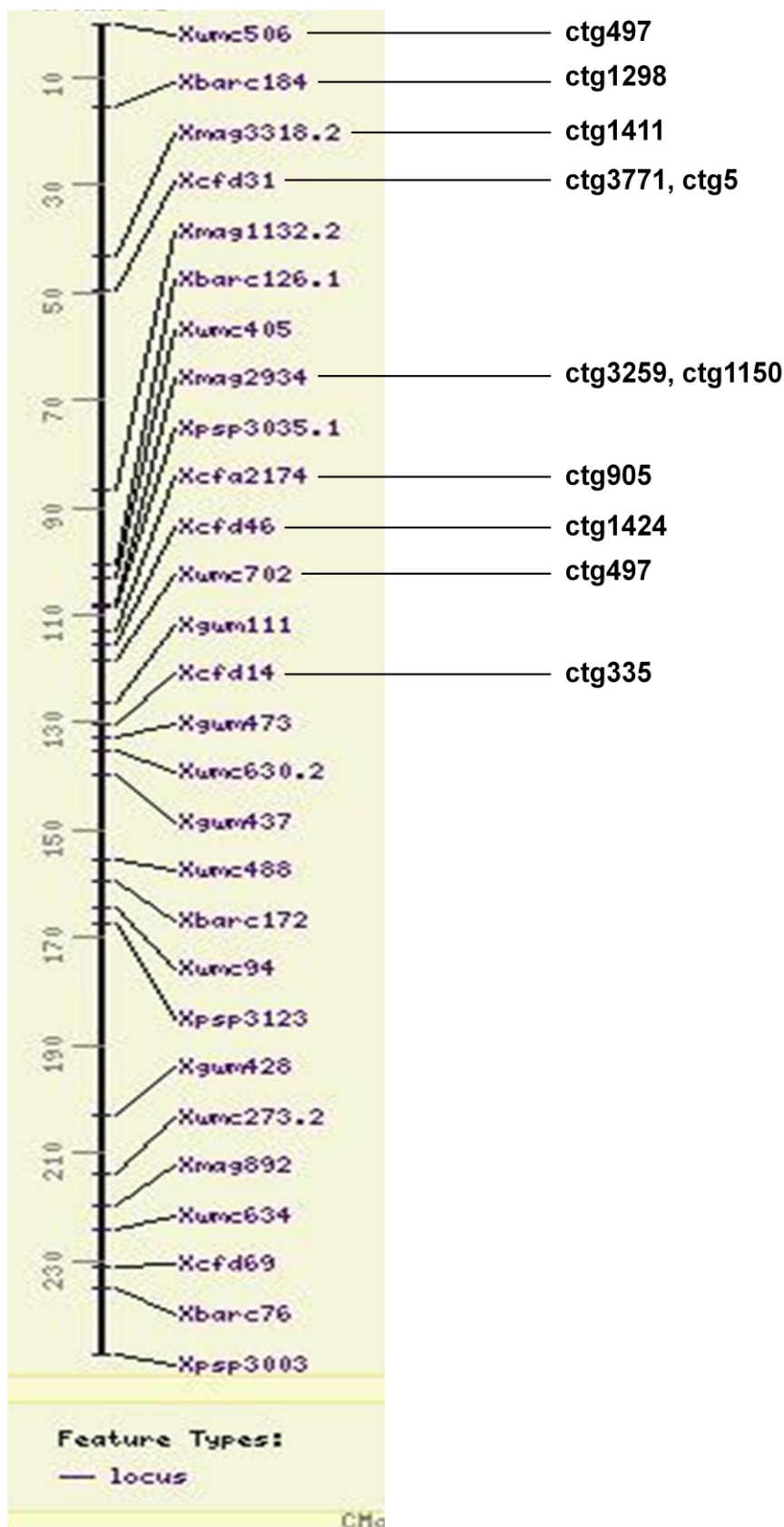
Obr.14: Ukotvení kontigů fyzické mapy 7DS na genetickou mapu *Wheat, Composite, 2004* (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>).



Obr.15: Ukotvení kontigů fyzické mapy 7DS na genetickou mapu *Wheat, Physical, SSR, 2004* (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>).

Wheat, Nanda2419 x Wangshuibai
2008

Kontigy z fyzické mapy 7DS



Obr.16: Ukotvení kontigů fyzické mapy 7DS na genetickou mapu *Wheat, Nanda2419 x Wangshuibai, 2008* (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>).

5.1.2 *In silico* ukotvování

Pro *in silico* ukotvování bylo využito integrace fyzické mapy 7DS pšenice s fyzickou mapou *Ae. tauschii*, která je ukotvena na genetickou mapu *Ae. tauschii* (Luo *et al.*, 2013). Genetická mapa ramene 7DS z *Ae. tauschii* obsahuje 635 markerů, přičemž 619 je jich ukotveno na fyzické mapě *Ae. tauschii*. Z těchto 619 markerů se podařilo 541 markerů ukotvit do kontigů fyzické mapy 7DS.

Pro ověření spolehlivosti ukotvení na základě integrace byly z některých markerů *Ae. tauschii* odvozeny STS markery pro pšenici (tabulka IV), které byly použity pro skřínink knihovny TaaCsp7DShA, čímž byla ověřena jejich pozice na fyzické mapě 7DS (tabulka VIII). Z jedenácti odvozených markerů bylo ukotveno všech jedenáct a bylo potvrzeno jejich předpokládané umístění.

Tabulka VIII: Umístění pšeničných STS makerů na fyzické mapě 7DS pšenice a ukotvení kontigů na genetickou mapu *Ae. tauschii*.

Odvozený STS marker	Marker z <i>Ae. tauschii</i>	Pozice na genetické mapě [cM]	Ukotvený kontig
<i>owm708</i>	AT7D6420	108,591	ctg 317
<i>owm709</i>	AT7D6420	108,591	ctg 317
<i>owm710</i>	BE443936	108,591	ctg 360
<i>owm707</i>	AT7D6421	108,591	ctg 360
<i>STS 163</i>	AT7D6427	108,636	ctg 517
<i>STS 164</i>	AT7D6427	108,636	ctg 517
<i>owm705</i>	AT7D6434	110,185	ctg 783
<i>STS 123</i>	AT7D6434	110,185	ctg 783
<i>STS 125</i>	AT7D6434	110,185	ctg 783
<i>owm706</i>	AT7D6440	110,594	ctg 3800
<i>owm704</i>	AT7D6458	111,276	ctg 1974

5.2 Reverzní ukotvování

Pro odvozování markerů pro reverzní ukotvování byly k dispozici BES všech klonů z MTP ramene 7DS a kompletní sekvence několika BAC klonů z MTP.

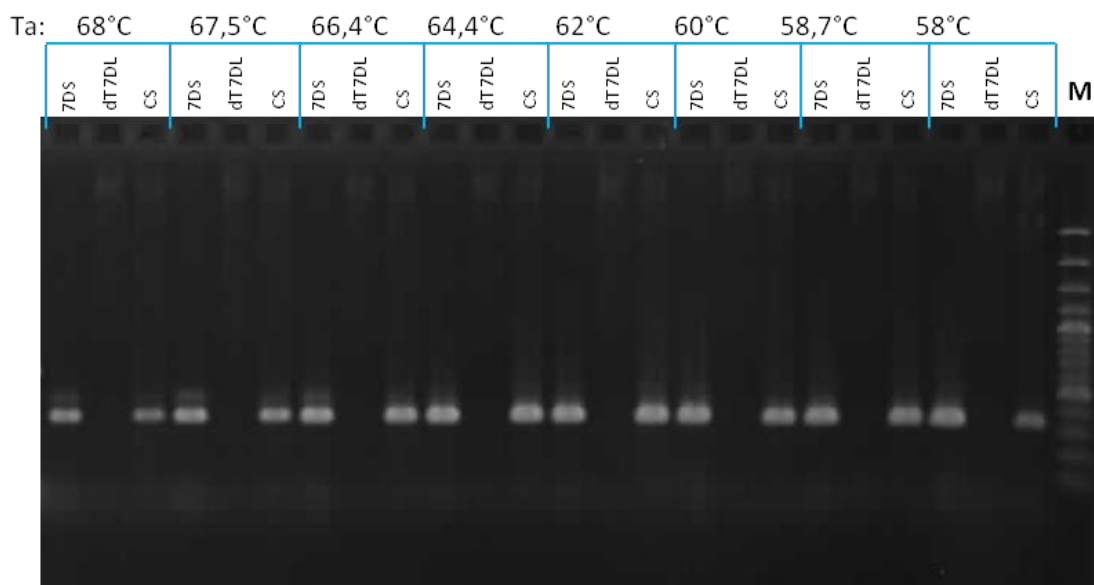
5.2.1 Odvozování STS markerů z BES

Pro odvozování STS markerů bylo použito 545 z 9 612 dostupných BES získaných z 308 klonů z MTP, které se nacházejí ve 49 neukotvených kontizích fyzické mapy 7DS. Byl proveden BLAST s těmito sekvencemi proti sekvencím všech chromozómů pšenice seté. Na základě výsledků bylo vytipováno 27 částečně nebo zcela unikátních sekvencí vhodných pro navrhování primerů. Zastoupení unikátní sekvence představuje 2% (7,6 kb) z celkové otestované délky BES (334 kb). Na jedenáct BES pocházejících z jedenácti různých BACů

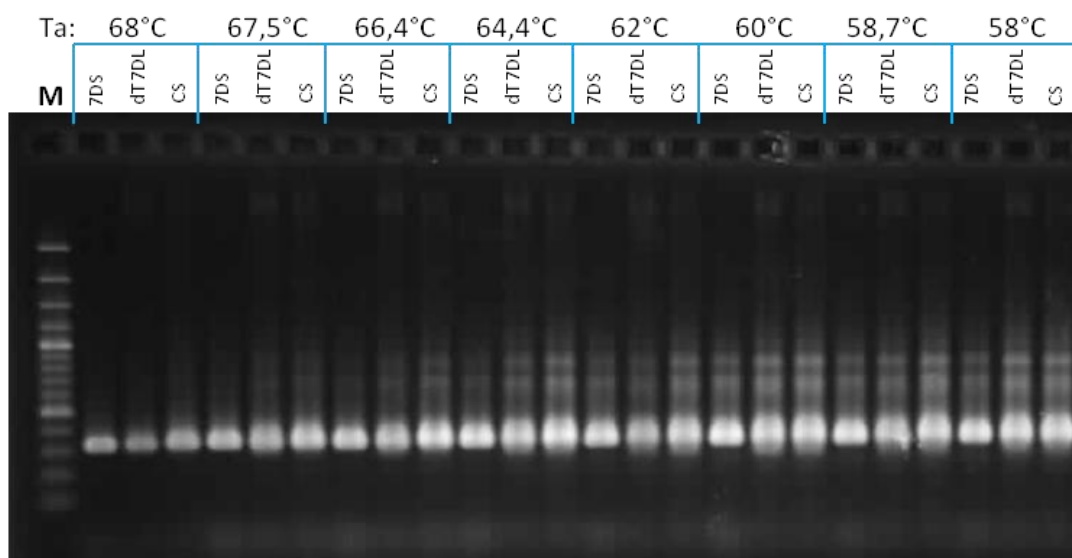
bylo navrženo celkem třináct párů primerů, které byly následně otestovány na specifčnost pro lokusy na 7DS. V některých případech bylo navrženo vícero párů primerů pro jednu BES (označení římskými číslicemi). Za specifický byl označen takový pár primerů, který po optimalizaci na gradientové PCR poskytoval produkty s DNA ze 7DS a z kultivaru Chinese Spring, nikoli však s DNA z ditelosomika 7DL (obr.17 a 18). Z třinácti testovaných párů primerů bylo devět specifických a tři nespecifické. Jeden pár primerů neposkytl žádný amplifikační produkt (tabulka IX). Úspěšnost navrhování STS markerů na základě BES tedy byla 69%.

Tabulka IX: Primery navržené na základě BES.

BAC klon	Primer pro BES	Sekvence navržených primerů	Velikost produktu [bp]	Specifičnost pro 7D	Optim. Ta
TaaCsp7DS009K05	9K5	F: AGATGAGCCATCTATCCTTCTGT R: CCAAAGGGTTTAGTCCGTAGAG	359	ne	-
TaaCsp7DS124G08	124G8	F: CAGATGAATTAATGAAGCGATGAC R: CTACATTCCGTATGAATTGTAATTGT	738	ano	64,5°C
TaaCsp7DS051E05	51E5	F: CATGTTGCTACAGGAGGTATAGAGA R: GCAAACAGGACTATTCCTTAATA	755	ano	66,5°C
TaaCsp7DS069E02	69E2	F: AGGAATTTTCATGGCAGAAGACACG R: TGGAAACCCGTTACAATTACAG	663	ano	64,5°C
TaaCsp7DS069E02 (II)	69E2 (II)	F: ATTTGAGAAAAGTGGGCAATC R: CCCAGGTAAGTAGCATCATGTTC	328	ano	66,5°C
TaaCsp7DS075H07	75H7	F: GGTGGTTCTGGGTCGT R: CATGTTGCTACAGGAGGTATAGAGA	777	ano	66,5°C
TaaCsp7DS095H05	95H5	F: GCCTCAGATCAGCTCTTGTTT R: ATTCATGTATGCCTGTCCCATA	594	ano	68°C
TaaCsp7DS100A04	100A4	F: TGCATGCGTGATTAGTGAGAT R: TCTAATTCACCCGATCCGATA	434	žádný produkt	-
TaaCsp7DS100A04 (II)	100A4 (II)	F: GCTTCCTTTTTGCTAATCACACA R: GATGACTTACGTAGCACATACATGG	445	ano	66,4°C
TaaCsp7DS097L20	97L20	F: GGTCCATCTAGTGCCCTTA R: CCACTGTGTAGGCAATCCAC	525	ne	-
TaaCsp7DS106F06	106F6	F: AGGCCCTCCATGATCAATTC R: CGAAGCATGGCCACAGAT	782	ano	64,5°C
TaaCsp7DS107P05	107D	F: ACCAGCTTATTACTATAAATTTGC R: CATCACCCCTTGAACGCTTA	584	ano	68°C
TaaCsp7DS106N03	106N3	F: TTCATGTGATCTACTTGATGTATGTTT R: TTCTGATCGATCTATTCAAGAGTCC	428	ne	-



Obr.17: Produkty gradientové PCR pro STS marker odvozený z BES klonu TaaCsp7DS069E02 (II) (Ta = teplota nasedání primerů; M = velikostní marker 100 bp DNA LadderPlus; 7DS = produkt amplifikovaný ze 7DS; dT7DL = produkt amplifikovaný z ditelosomika 7DL; CS = produkt amplifikovaný z DNA kultivaru Chinese Spring).



Obr.18: Produkty gradientové PCR, při které byl použit pár primerů odvozený z BES klonu TaaCsp7DS009K05. Tento pár primerů neposkytl produkt specifický pro 7DS (Ta = teplota nasedání primeru; M = velikostní marker 100 bp DNA LadderPlus; 7DS = produkt amplifikovaný ze 7DS; dT7DL = produkt amplifikovaný z ditelosomika 7DL; CS = produkt amplifikovaný z DNA kultivaru Chinese Spring).

5.2.2 Odvozování STS markerů ze sekvencí BAC klonů

Pro odvozování STS markerů byly k dispozici kompletní sekvence sedmi BAC klonů z MTP, sestavené do sekvenčních kontigů. S těmito sekvencemi byl proveden BLAST proti sekvencím ramen všech chromozómů pšenice. Ze 44 otestovaných sekvenčních kontigů bylo

vytipováno devět sekvencí unikátních pro 7DS a na sedm z nich bylo navrženo a otestováno jedenáct párů primerů. V některých případech bylo navrženo vícero párů primerů pro jeden sekvenční kontig BAC klonu (označení římskými číslicemi). Po ověření specifčnosti navržených primerů pomocí gradientové PCR bylo zjištěno, že devět z navržených párů primerů je skutečně specifických pro 7DS. Jeden navržený pár primerů nebyl specifický pro 7DS a v jednom případě vůbec nedošlo k amplifikaci (tabulka X). Úspěšnost navrhování primerů na základě celých BAC klonů tedy byla 81%. Zastoupení unikátní sekvence představuje 6,5% (49 kb) z celkové otestované délky sekvencí BAC klonů (764 kb)

Tabulka X: Markery navržené na základě sekvencí BAC klonů

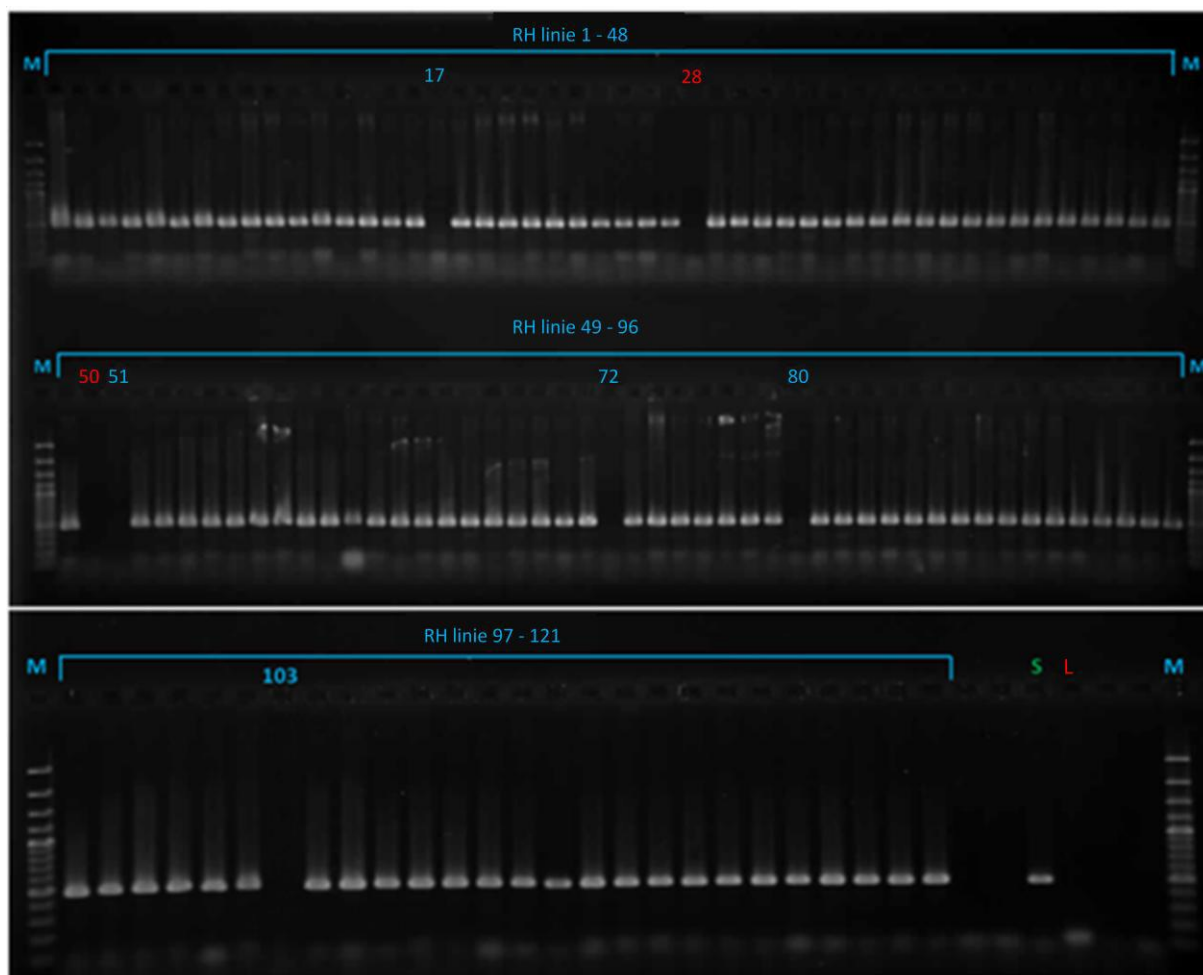
BAC klon	Označení primerů	Sekvence navržených primerů	Velikost produktu [bp]	Specifičnost pro 7DS	Optim. Ta
TaaCsp7DS001D04	1D4-1	F: GGTATAGGATGCCAACTTTGATG R: AATCATGGGACAGGCTTGACT	703	ano	67,5°C
TaaCsp7DS001D04	1D4-1-II	F: GTTGGGAGGAAATGATGGTT R: CCAAGTGCATCACACCAGTT	427	ano	64,5°C
TaaCsp7DS001D04	1D4-1-III	F: AGGTGTGGTAAAATTGTTGACG R: CGAATGAGTGGAGATTCTACAGG	466	ano	68°C
TaaCsp7DS001D04	1D4-4	F: TTGGGATTCCGAGTCTGGTC R: TGCACCTATTTGGTAGTATCTGTG	636	ne	-
TaaCsp7DS001D04	1D4-5	F: ACGTCCGTGGAGCAATGT R: GACAACGAAAAACATGGAAGG	639	ano	67,5°C
TaaCsp7DS001F24	1F24-1	F: CGCCCCCTTATGGCTAATGC R: ATTGATAGTATATGACGAATCCATGT	356	ano	64,5°C
TaaCsp7DS001F24	1F24-2	F: TCGTGACCCTGTCTTTACATCT R: CAGGGATCAAAATTGCAGAAC	400	ano	66,5°C
TaaCsp7DS001E11	1E11-1	F: CCTTTAATAGTACCGTGTTCCTATG R: TGATACTGGGTTTTGTACAATTT	687	ano	64,5°C
TaaCsp7DS001E11	1E11-1-II	F: CGTAGGATTGGTTACCTTTGG R: AGAGCTTTACTTACGCGAGGA	587	ano	67,5°C
TaaCsp7DS001H18	1H18-4	F: TTGGATCCTCGCGAAGTG R: CCGTATTAACATGTCCTCATCC	676	ano	66,5°C
TaaCsp7DS001H18	1H18-4-II	F: GAAAGGTCCAGCTAGGTCACA R: GATCTCCCGCCGTTAAT	724	žádný produkt	-

5.2.3 Mapování odvozených STS markerů na RH liniích

Mapování odvozených STS markerů bylo provedeno pomocí skrínungu panelu radiačních hybridů obsahujícího 121 linií na (ne)přítomnost daných markerů. Z původního počtu osmnácti STS markerů specifických pro 7DS bylo vyřazeno jedenáct párů primerů, protože neposkytovaly produkt PCR na syntetické pšenici s D genomem *Ae. tauschii*. Pro mapování bylo tedy vhodných pouze sedm párů primerů (*69E2*, *51E5*, *1D4-1-II*, *1D4-1-III*, *1D4-5*, *1E11-1*, *1E11-1-II*), které poskytovaly produkty amplifikace s DNA syntetické pšenice SW58, ale nikoli s DNA tetraploidní pšenice kultivaru Langdon. Z těchto sedmi párů primerů byly pouze dva páry přímo použity pro mapování (*69E2*, *1D4-1-II*). Zbýlých pět párů

primerů (*51E5*, *1D4-1-III*, *1D4-5*, *1E11-1*, *1E11-1-II*) neposkytovalo dostatečně reprodukovatelné výsledky, patrně v důsledku neúplné komplementarity primerů. Jejich použití je teoreticky možné, nicméně by musela být provedena důkladná optimalizace podmínek PCR.

Na obrázku 19 je znázorněn příklad mapování na RH panelu STS markerem *69E2*. Jako pozitivní kontrola sloužila DNA syntetické pšenice SW58. Jako negativní kontrola byla použita redestilovaná voda (50), DNA tetraploidní pšenice kultivaru Langdon (L) a RH linie 28, která sice obsahovala DNA, nicméně neposkytovala PCR produkt ani v případě použití primerů pro ISBP marker *cfp54* z chromozómu 3B pšenice. RH linie 17, 51, 72, 80 a 103 byly na testovaný marker *69E2* negativní.



Obr.19: Produkty PCR získané při mapování markeru *69E2* na panelu radiačních hybridů. Červeně jsou znázorněny negativní kontroly, zeleně pozitivní kontrola. Modrými čísly jsou označeny linie negativní na přítomnost daného markeru (S = produkt amplifikovaný ze syntetické pšenice SW58; L = produkt amplifikovaný z tetraploidní pšenice kultivaru Langdon; M = velikostní marker 100 bp DNA LadderPlus).

Dva z markerů použitých pro RH mapování (*69E2*, *ID4-1-II*) se nakonec podařilo zanést do RH mapy tvořené DArT a SSR markery (A. Kumar, nepublikováno). Oba markery jsou na této mapě lokalizovány v těsné blízkosti centromery mezi markery wPt-743405 a wPt-665936, ve vzájemné vzdálenosti 3,7 cR (obr. 20).

	Jméno markeru	Vzdálenost
162	wPt663995	5 cR
163	wPt-732688	77,1 cR
164	wPt-743405	38,5 cR
165	69E2	3,7 cR
166	C1/II	52,4 cR
167	wPt-665936	3 cR
168	wPt-7508	2,5 cR
169	wPt-667127	61,4 cR

Obr.20: Výřez z RH mapy chromozómu 7D (A. Kumar, nepublikováno)

6 DISKUSE

6.1 Přímé ukotvování

6.1.1 Manuální ukotvování

Přímé ukotvování je jednou ze strategií ukotvování fyzických map, jejímž cílem je identifikovat BAC klony obsahující příslušný marker. Metoda skříninku knihovny za pomoci superpoolů a miskových a třídimenzionálních poolů (Šimková *et al.*, 2010) se ukázala jako spolehlivá, nicméně časově náročná metoda pro určení pozitivních klonů. V případě použití samotných 3D poolů jsme nezdědk pozorovali falešně pozitivní nebo chybějící souřadnice klonu. Tento problém byl překonán kombinováním informací získaných z fyzické mapy 7DS a ze skříninku na miskových poolech a superpoolech. Využití údajů z fyzické mapy pomohlo k vyselektování skutečně pozitivních BAC klonů a k jednoznačné identifikaci kontigů při skříninku pouze malé části 3D poolů. Tím se celý postup výrazně urychlil, a to i díky tomu, že odpadla nutnost provádět dekonvoluci kandidátních BAC klonů za pomoci PCR na kandidátních klonech.

Vyhodnocování bylo ovlivněno také samotným typem použitého markeru. Zatímco STS markery celý proces vyhodnocování díky své unikátnosti často urychlily, u mikrosatelitových markerů tomu tak vždy nebylo. V některých případech byly markery lokalizovány ve více lokusech na 7DS. Poskytovaly tak více PCR produktů, někdy s různou velikostí. K určení jednoznačných souřadnic klonů opět pomohla fyzická mapa 7DS. Na problém s nejednoznačnou lokalizací mikrosatelitových markerů upozorňuje Shoemaker *et al.* (2008), kteří jej pozorovali při ukotvování fyzické mapy sóji. Důvodem mohou být duplikace, které se vyskytují u pšenice i v rámci jednoho ramene, jak prokázali Šimková *et al.* (2010) v případě mikrosatelitového markeru *gwm473*.

Problémy s jednoznačným určením klonů měli i Lucas *et al.* (2013) při ukotvování fyzické mapy 1AL. V případě ramene 1AL bylo pro skřínink knihovny pomocí 3D poolů testováno mimo jiné, 38 mikrosatelitových a 21 EST markerů, které byly už dříve geneticky zamapovány. Pouze 12 SSR a 10 EST markerů bylo možno jednoznačně přiřadit k učitým klonům. Lucas *et al.* (2013) se domnívají, že jedním z důvodů mohou být sekvenční rozdíly mezi liniemi pšenice použitými pro konstrukci genetické a fyzické mapy.

S rychlejší alternativou ukotvování přišli Luo *et al.* (2013), kteří poprvé použili kombinaci pětidimenzionálních poolů připravených z BAC knihovny s Illumina Infinium

SNP arrayí pro ukotvování kontigů fyzické mapy *Ae. tauschii*. Ukázalo se, že použití Infinium SNP arraye umožňuje ukotvování kontigů prostřednictvím neomezeného množství SNPů s minimem vynaložené práce, která byla nutná pouze pro přípravu 5D poolů. Tímto zjištěním překonaly i jejich původní strategii, kdy kombinovali opět 5D pooly, ale tentokrát s Illumina GoldenGate assayí (Luo *et al.*, 2009). Obě tyto strategie snižují pracnost a časovou náročnost ukotvování kontigů fyzické mapy, nicméně použití Illumina GoldenGate assaye je finančně náročnější a počet použitých markerů je relativně malý (Luo *et al.*, 2013).

Paux *et al.* (2008a) použili pro skřínink knihovny z chromozómu 3B pooly připravené z MTP. V ideálním případě by s použitím těchto směsných vzorků měla být urychlena jednoznačná identifikace kontigů. V naší práci byl tento postup také testován, ale ve většině případů nebylo možno identifikovat kompletní adresu pozitivních klonů díky chybějícím souřadnicím. Nejčastěji chyběl údaj o misce, ve které se klon nacházel. Vyšší výskyt negativních výsledků PCR ve srovnání s pooly připravenými z celé knihovny patrně souvisel s odlišným postupem přípravy poolů. Adresy klonů ve 3D poolech připravených z MTP se neshodují s adresami klonů v knihovně, proto nebylo možné přímo použít údaje z miskových poolů a superpoolů knihovny. V důsledku toho bylo velice časově náročné, někdy nemožné, dohledat skutečnou adresu pozitivního klonu, a to i s pomocí fyzické mapy 7DS. Problém byl řešen doplňujícími PCR, s jejichž pomocí bylo možné doplnit chybějící údaje v adresách, což ale nekoresponduje s myšlenkou urychlení a zefektivnění celého postupu.

6.1.2 *In silico* ukotvování

In silico ukotvování na základě fyzické mapy *Ae. tauschii* se ukázalo ve srovnání s ukotvováním manuálním jako velice spolehlivá metoda, která umožňuje v relativně krátkém čase ukotvení velkého množství markerů. Spolehlivost tohoto přístupu byla ověřena pomocí jedenácti STS markerů odvozených pro pšenici (Staňková, nepublikováno), a to jejich použitím i v případě manuálního ukotvování. Oba přístupy poskytly stejné výsledky a lokalizovaly tyto markery ve stejných kontizích fyzické mapy 7DS. Propojení obou typů map navíc umožní komparativně genomické studie pro pšenici a *Aegilops tauschii*.

6.2 Reverzní ukotvování

6.2.1 Odvozování STS markerů

Reverzní ukotvování obecně probíhá ve směru od fyzické mapy ke genetické. Obvykle jsou k němu využívány koncové sekvence BAC klonů (BES) nebo sekvence celých klonů

z MTP používané knihovny, z nichž jsou odvozovány nové markery. BES pro odvozování nových markerů použili Paux *et al.* (2008a) v případě chromozómu 3B pšenice, kteří pak nově odvozené markery použili na rekombinační i RH mapování, nebo Bartoš *et al.* (2008), kteří odvozovali ISBP markery z BES ramene 1RS žita. Nejnověji použili BES pro reverzní ukotvení fyzické mapy u pšenice Lucas *et al.* (2013), kterým se díky nově odvozeným 164 ISBP markerům, specifickým pro dlouhé rameno chromozómu 1A, podařilo ověřit překryvy mezi klony, nebo odhalit překryvy, které nebyly detekovány pomocí fingerprintingu. Markery byly umístěny na genetickou mapu 1 AL na základě rekombinačního mapování.

Vzhledem k tomu, že D genom pšenice se vyznačuje nízkým výskytem polymorfismů, které jsou nezbytné pro rekombinační mapování, dali jsme v našem případě přednost odvozování STS markerů a RH mapování, které polymorfismy nevyžaduje.

V diplomové práci byly pro odvozování STS markerů použity kromě BES také sekvence získané technologií Illumina, sestavené do sekvenčních kontigů. V případě BES bylo analyzováno 545 sekvencí, z nichž pouze 5% obsahovalo unikátní sekvence. Zastoupení unikátní sekvence představuje 2% z celkové otestované délky BES. V případě odvozování STS markerů z celých sekvencí BAC klonů dosahovalo zastoupení unikátních sekvencí 6,5%. To souvisí patrně s tím, že BAC knihovna 7DS byla konstruována za použití enzymu *HindIII*, jehož rekogniční místo je bohaté na GC báze a vyskytuje se častěji v repetitivních oblastech genomu. Choulet *et al.* (2013) uvádějí, že se na základě analýzy frekvence výskytu a distribuce rekogničního místa pro *HindIII* podél 18 Mb dlouhého sekvenčního kontigu chromozómu 3B pšenice ukázalo, že se toto rekogniční místo nachází 1,5x častěji v transponovatelných elementech, než v náhodně vybraných sekvencích. Možná i proto byla úspěšnost navrhování primerů na základě unikátních sekvencí vyšší při použití celé sekvence ve srovnání s BES (81 proti 69%). Obecně je možné říct, že úspěšnost navrhování specifických primerů na základě dostupných sekvencí byla vysoká. To potvrzuje i srovnání s literaturou, např. s prací Lucase *et al.* (2013), kteří odvozovali ISBP markery specifické pro 1AL. Z 280 markerů odvozených z BES bylo 164 markerů specifických pro 1AL, což je 59%. V případě této práce byla celková úspěšnost navrhování 75% (z BES 69% a ze sekvencí BAC klonů 81%).

BAC klony sekvenované technologií Illumina se podařilo sestavit do dvou až jedenácti sekvenčních kontigů (P. Visendi, nepublikováno). V rámci práce jsme se snažili ověřit hypotézu, že množství unikátních sekvencí je v negativní korelaci s počtem kontigů na BAC

klon. Hypotéza vycházela z předpokladu, že klony s nižším výskytem repetitivních sekvencí se lépe sestavují do sekvenčních kontigů. Tato hypotéza však nebyla potvrzena. Největší počet specifických párů primerů byl navržen ze sekvence BAC klonu, která se skládala z největšího počtu sekvenčních kontigů a naopak, nejmenší počet specifických párů primerů byl navržen ze sekvence BAC klonu sestavené z nejmenšího počtu sekvenčních kontigů. K vyvození závěru o existenci, případně typu korelace mezi počtem sekvenčních kontigů na BAC a množstvím unikátních sekvencí by však bylo potřeba zanalyzovat mnohem větší množství BAC klonů.

6.2.2 Mapování na panelu radiálních hybridů

Radiační hybridní (RH) mapování je založeno na zlomech DNA, které vznikají jako důsledek působení radiace. Umožňuje tedy mapovat i v oblasti centromery a je tak alternativou ke genetickému mapování založenému na rekombinaci. RH mapování použili pro ukotvování fyzické mapy Paux *et al.* (2008a) v případě chromozómu 3B pšenice, kdy bylo mapováno 65 ISBP markerů a podařilo se ukotvit 32 kontigů. Panel pro RH mapování na 3B byl odvozen z kultivaru Chinese Spring. V naší práci byl použit RH panel pro D genom pšenice, který byl odvozen z genomu *Ae. tauschii*, konkrétně 121 informativních linií pro 7DS (Kumar *et al.*, 2012). Existující RH panel odvozený z kultivaru Chinese Spring (Riera-Lizarazu *et al.*, 2010) má díky vyšší citlivosti kultivaru Chinese Spring k radiaci nižší rozlišení než panel RH z *Ae. tauschii* (Kumar *et al.*, 2012) a pro naše účely nebyl k dispozici. Původ použitého panelu se ukázal jako největší nedostatek našeho mapování. Během vzniku allohexaploidního genomu pšenice došlo kromě dvojí spontánní hybridizace i k částečné strukturní a funkční přestavbě jednotlivých subgenomů ve srovnání s jejich donory (Feldman *et al.*, 2009). Proto došlo k tomu, že jedenáct z osmnácti párů primerů navržených ze sekvencí kultivaru Chinese Spring neposkytlo produkt při použití DNA ze syntetické pšenice s D genomem z *Ae. tauschii*. U zbývajících primerů vedla nižší komplementarita primerů a templátu k horší reprodukovatelnosti skříninku. U dvou párů primerů byl tento problém vyřešen snížením teploty a prodloužením doby nasedání primerů, další optimalizace podmínek PCR by patrně umožnila použití i dalších párů primerů. Paux *et al.* (2008a) použili v souvislosti s RH mapováním tzv. *touch down* PCR, při které se postupně snižuje specifita PCR reakce. *Touch down* PCR v naší práci použita nebyla, ale představuje alternativu pro námi zvolený postup i pro jeho rychlejší optimalizaci. Asi nejúčinnějším řešením by však bylo odvozování markerů nikoli ze sekvencí kultivaru

Chinese Spring, ale přímo ze sekvencí *Ae. tauschii*, nebo použití RH panelu odvozeného z kultivaru Chinese Spring.

Skrínink panelu radiačních hybridů byl úspěšně proveden se dvěma markery. Pro určení jejich pozice na rameni 7DS byla k dispozici RH mapa chromozómu 7D s 215 DArT a třemi SSR markery (A. Kumar, nepublikováno). Oba naše STS markery se nachází ve vzájemné blízkosti a na uvedené mapě se nacházejí v těsné blízkosti centromery, mimo oblast s největší hustotou DArT markerů. DArT markery bývají lokalizovány převážně v distálních částech chromozómů (Paux *et* Sourdille, 2009), díky tomu nebylo možno zamapovat naše markery s velkou přesností. Pozice markeru 69E2 na genetické mapě není známá. Marker *ID4-1-II* však pochází z klonu, který se na fyzické mapě 7DS nachází v těsné blízkosti (50 - 100 kb) klonu nesoucího marker AT7D6345. Tento marker se na genetické mapě *Ae. tauschii* nachází v pozici 101,331 cM (Luo *et al.*, 2013). Na základě integrace fyzické mapy 7DS a *Ae. tauschii* se mezi markerem AT7D6345 a centromerou chromozómu 7D nachází přibližně 300 dalších markerů. To naznačuje další potenciál pro zvýšení hustoty RH mapy, zejména v blízkosti centromery, kde má RH mapování největší význam. V současné době také probíhá skrínink RH a markerů odvozených z genů (<http://avena.pw.usda.gov/RHmapping/>). To by mělo přispět k další saturaci RH mapy pro D genom.

7 ZÁVĚR

V této práci byly testovány a porovnávány různé metody ukotvování fyzické mapy. Bylo provedeno přímé ukotvování fyzické mapy krátkého ramene chromozómu 7D pšenice (7DS), a to skříninkem BAC knihovny pomocí PCR na směsných vzorcích BAC klonů (manuální ukotvování), nebo pomocí *in silico* ukotvování na základě integrace s fyzickou mapou *Ae. tauschii*. Manuálně se podařilo ukotvit 42 převážně mikrosatelitových markerů, zatímco *in silico* se podařilo ukotvit 541 markerů. Celkově tak bylo ukotveno 585 markerů do 309 kontigů, což reprezentuje 51% fyzické mapy 7DS. Obě metody lze tedy spolehlivě použít pro ukotvování fyzické mapy. Z hlediska časové a finanční náročnosti a objemu získaných dat se jako efektivnější ukázalo ukotvování *in silico*.

Dále bylo provedeno reverzní ukotvování, kdy byly na základě koncových sekvencí BAC klonů (BES) a kompletních sekvencí několika BAC klonů z MTP ramene 7DS odvozovány STS markery pro radiační hybridní mapování. Celkově bylo odvozeno 18 STS markerů pro kultivar Chinese Spring. Výběžnost unikátních sekvencí vzhledem k celkovému množství analyzovaných sekvencí byla lepší pro kompletní sekvence BAC klonů (6,5 % oproti 2% pro BES). Rovněž úspěšnost navrhování primerů na základě kompletních sekvencí byla vyšší než pro BES (81 procent oproti 69 procentům). Vzhledem k tomu, že byl k mapování použit RH panel vytvořený z jiného zdroje než fyzická mapa 7DS, došlo k výrazné redukci počtu použitelných STS markerů pro RH mapování. Nakonec byl skřínink panelu radiačních hybridů proveden dvěma STS markery, které se podařilo zanést do RH mapy chromozómu 7D, tvořené 215 DArT a třemi SSR markery. Oba markery se nacházejí ve vzájemné blízkosti a na uvedené mapě jsou lokalizovány v těsné blízkosti centromery. Předpokládáme, že po optimalizaci postupu odvozování STS markerů a po plánovaném zvýšení hustoty RH map bude navržený postup reverzního ukotvování představovat efektivní způsob lokalizace kontigů fyzické mapy na chromozómy.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akbari, M., Wenzl, P., Caig, V., Carling, J., Xia, L., Yang, S., Uszynski, G., Mohler, V., Lehmansiek, A., Kuchel, H., Hayden, M.J., Howes, N., Sharp, P., Vangham, P., Rathmell, B., Hutter, E., Kilian, A. (2006): Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1409 - 1420.
- Ariyasada, R., et Stein, N. (2012): Advances in BAC-based physical mapping and map integration strategies in plants. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: p.11.
- Asakawa, S., Abe, I., Kudoh, Y., Kishi, N., Wang, Y., Kubota, R., Kudoh, J., Kawasaki, K., Minoshima, S., Shimizu, N. (1997): Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene* 191: 69 - 79.
- Ali, S., Holloway, B. et Taylor, W. (2000): Normalisation of cereal endosperm EST libraries for structural and functional genomic analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 123 - 132.
- Barillot, E., Lacroix, B. et Cohen, D. (1991): Theoretical analysis of library screening using a N-dimensional pooling strategy. *Nucleic Acids Research* 19: 6241 - 6247.
- 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*. Volume 8, DOI: 10.1186/1471-2229-8-95
- Berkman, P.J., Skarszewski, A., Manoli, S., Lorenc, M.T., Stiller, J., Smits, L., Lai, K., Campbell, E., Kubaláková, M., Šimková, H., Batley, J., Doležel, J., Hernandez, P., Edwards, D. (2012): Sequencing wheat chromosome arm 7BS delimits the 7BS/4AL translocation and reveals homoeologous gene conservation. *Theoretical and Applied Genomics* 124: 423 - 432.
- Berkman, P.J., Skarszewski, A., Lorenc, M.T., Lai, K., Duran, C., Ling, E.Y.S., Stiller, J., Smits, L., Imelfort, M., Manoli, S., McKenzie, M., Kubaláková, M., Šimková, H., Batley, J., Fleury, D., Doležel, J., Edwards, D. (2011): Sequencing and assembly of low copy genic regions of isolated *Triticum aestivum* chromosome arm 7DS. *Plant Biotechnology Journal* 9: 768 - 775.
- Bhargava, A. et Fuentes, F.F. (2009): Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular Biotechnology* 44: 250 - 266.

- Brenner, S. *et* Livak, K.J. (1989): DNA fingerprinting by sampled sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 8902 - 8906.
- Brookes, A.J. (1999): The essence of SNPs. *Gene* 234: 177 - 186.
- Choulet, F., Caccamo, M., Wright, J., Alaux, M., Šimková, H., Šafář, J., Leroy, P., Doležel, J., Rogers, J., Eversole, K., Feuillet, C. (2013): The wheat Black Jack: Advances towards sequencing the 21 chromosomes of the bread wheat genome. In: Tuberosa, R. (ed): *Advances in Genomics of Plant Genetic Resources*. Springer, in press.
- Coulson, A., Sulston, J., Brenner, S., Karn, J. (1986): Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 7821 - 7825.
- Cox, D.R., Burmeister, M., Price, E.R., Kim, S., Myers, R.M. (1990): Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science* 250: 245 - 250.
- Devos, K.M. *et* Gale, M.D. (1997): Comparative genetics in the grasses. *Plant Molecular Biology* 35: 3 - 15.
- Ding, Y., Johnson, M.D., Colayco, R., Chen, Y.J., Melnyk, J., Schmitt, H., Shizuya, H. (1999): Contig assembly of bacterial artificial chromosome clones through multiplexes fluorescence-labeled fingerprinting. *Genomics* 56: 237 - 246.
- Ding, Y., Johnson, M.D., Chen, W.Q., Wong, D., Chen, Y.-J., Benson, S.C., Lam, J.Y., Kim, Y.-M., Shizuya, H. (2001): Five-color-based high-information-content fingerprinting of bacterial artificial chromosome clones using type IIS restriction endonucleases. *Genomics* 74: 142 - 154.
- Doležel, J., Kubaláková, M., Paux, E., Bartoš., J., Feuillet, C. (2007): Chromosome-based genomics in the cereal. *Chromosome Research* 15: 51 - 66.
- Dubcovsky, J. *et* Dvořák, J. (2007): Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* 316: 1862 - 1866.
- Feldman, M. *et* Levy, A.A. (2005): Allopolyploidy - a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic Genome Research* 109: 250 - 258.

- Feldman, M. *et* Levy, A.A. (2009): Genome evolution in allopolyploid wheat - a revolutionary reprogramming followed by gradual changes. *Journal of Genetics and Genomics* 36: 511 - 518.
- Fenkel, Z., Paux, E., Mester, D., Feuillet, C., Korol, A. (2010): LTC: a novel algorithm to improve the efficiency of contig assembly for physical mapping in complex genomes. *BMC bioinformatics* 11: 584.
- Ganal, M. V. *et* 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.
- Gardiner, J., Schroeder, S., Polacco, M.L., Sanchez-Villeda, H., Fang, Z., Morgante, M., Landewe, T., Fengler, K., Useche, F., Hanafey, M., Tingey, S., Chou, H., Wing, R., Soderlund, C., Coe Jr, E.H. (2004): Anchoring 9 371 maize expressed sequence tagged unigenes to the bacterial artificial chromosomes contig map by two-dimensional overgo hybridization. *Plant Physiology* 134: 1317 - 1326.
- Gill, K.S., Gill, B.S., Endo, T.R. (1993): A chromosome region-specific mapping strategy reveals gene-rich telomeric ends in wheat. *Chromosoma* 102: 374 - 381.
- Goss, S. *et* Harris, H. (1975): New method for mapping genes in human chromosomes. *Nature* 255: 680 - 684.
- Gupta, P.K. *et* Varshney, R.K. (2000): The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163–185.
- Gupta, P.K., Balyan, H.S., Edwards, K.J., Isaac, P., Korzun, V., Röder, M., Gatier, 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.
- Gupta, P.K., Rustgi, S., Sharma, S., Singh, R., Kumar, N. and Balyan, H.S. (2003): Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 270: 315–323.

- Guyomarc'h, H., Sourdille, P., Charmet, G., Edwards, K.J., Bernard, M. (2002a): Characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1164 - 1172.
- Guyomarc'h, H., Sourdille, P., Edwards, K., Bernard, M. (2002b) Studies of the transferability of microsatellites derived from *Triticum tauschii* to hexaploid wheat and to diploid related species using amplification, hybridization and sequence comparisons. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 736–744.
- Han, C.S., Sutherland, R.D., Jewett, P.B., Campbell, M.L., Meincke, L.J., Tesmer, J.G., Mundt, M.O., Fawcett, J.J., Kim, U.-J., Deaven, L.L., Doggett, N.A. (2000): Construction of BAC contig map of chromosome 16q by two-dimensional overgo hybridization. *Genome Research* 10: 714 - 721.
- Huang, X.Q., Kempf, H., Ganai, M.W., Röder, M.S. (2004): Advanced backcross QTL analysis in progenies derived from a cross between a German elite winter wheat variety and synthetic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109: 933 - 943.
- Islam-Faridi, M.N., Childs, K.L., Klein, P.E., Hodnett, G., Menz, M.A., Klein, R.R., Rooney, W.L., Mullet, J.E., Stelly, D.M., Price, H.J. (2002): A molecular cytogenetic map of *Sorghum* chromosome 1: Fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes. *Genetics* 161: 345 - 353.
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., Kilian, A. (2001): Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acid Research* 29: 4e25.
- Kahl, G., Mast, A., Tooke, N., Shen, R., van den Boom, D. (2005): Single nucleotide polymorphisms: Detection techniques and their potential for genotyping and genome mapping. In: Meksem, K., Kahl, G. (ed.): *The Handbook of Plant Genome Mapping*, pp. 75 - 107, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Klein, P.E., Klein, R.R., Cartinhour, S.W., Ulanich, P.E., Dong, J., Obert, J.A., Morishige, D.T., Schlueter, S.D., Childs, K.L., Ale, M., Mullet, J.E. (2000): A high-throughput AFLP-based method for constructing integrated genetic and physical maps: progress toward a sorghum genome map. *Genome Research* 10: 789 - 807.

Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeier, W., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L.L., Keller, B. (2009): A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323: 1360 - 1363.

Kubaláková, M., Kovářová, P., Suchánková, P., Čihalíková, J., Bartoš, J., Lucretti, S., Watanabe, N., Kianin, S.F., Doležel, J. (2005): Chromosome sorting in tetraploid wheat and its potential for genome analysis. *Genetics* 170: 823 - 829.

Kumar, A., Bassi, F.M., Paux, E., Al-Azzam, O., Michalak de Jimenez, M., Denton, A.M., Gu, Y.Q., Huttner, E., Kilian, A., Kumar, S., Goyal, A., Iqbal, M.J., Tiwari, V.K., Dogramaci, M., Balyan, H.S., Dhaliwal, H.S., Gupta, P.K., Randhawa, G.S., Feuillet, C., Pawlowski, W.P., Kianian, S.F. (2012a): DNA repair and crossing over favor similar chromosome regions as discovered in radiation hybrid of *Triticum*. *BMC Genomics* 13: 339.

Kumar, A., Simons, K., Iqbal, M.J., Michalak de Jimenez, M., Bassi, F.M., Ghavami, F., Al-Azzam, O., Drader, T., Wang, Y., Luo, M.-Ch., Gu, Y.Q., Denton, A., Lazo, G.R., Xu, S.S., Dvorak, J., Kianian, P.M., Kianian, S.F. (2012b): Physical mapping resources for large plant genomes: radiation hybrids for wheat D-genome progenitor *Aegilops tauschii*. *BMC Genomics* 13: 597.

Lai, K., Duran, Ch., Berkman, P.J., Lorenc, M.T., Stiller, J., Manoli, S., Hayden, M.J., Forrest, K.L., Fleury, D., Baumann, U., Zander, M., Mason, A.S., Batley, J., Edwards, D. (2012): Single nucleotide polymorphism discovery from wheat next-generation sequence data. *Plant Biotechnology Journal* 10: 743 - 749.

Lazo, G.R., Chao, S., Hummel, D.D., Edwards, H., Crossman, C.C., Lui, N., Matthews, D.E., Carollo, V.L., Hane, D.L., You, F.M., Butler, G.E., Miller, R.E., Close, T.J., Peng, J.H., Lapitan, N.L.V., Gustafson, J.P., Qi, L.L., Echalié, B., Gill, B.S., M. Dilbirli, Randhawa, H.S., Gill, K.S., Greene, R.A., Sorrells, M.E., Akhunov, E.D., Dvořák, J., Linkiewicz, A.M., Dubcovsky, J., Hossain, K.G., Kalavacharla, V., Kianian, S.F., Mahmoud, A.A., Miftahudin, Ma, X.-F., Conley, E.J., Anderson, J.A., Pathan, M.S., Nguyen, H.T., McGuire, P.E., Qualset, C.O., Anderson, O.D. (2004): Development of an expressed sequence tag (EST) resource for wheat (*Triticum aestivum* L.): EST generation, unigene analysis, probe selection and bioinformatics for a 16 000-locus bin-delineated map. *Genetics* 168: 585 - 593.

Lem, P. et Lallemand, J. (2003): Grass consensus STS markers: an efficient approach for detecting polymorphism in *Lolium*. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1113 - 1122.

- Lucas, S.J., Akpinar, B.A., Kantar, M., Weinstein, Z., Aydinoglu, F., Šafář, J., Šimková, H., Frenkel, Z., Korol, A., Magni, F., Cattonaro, F., Vautrin, S., Bellec, A., Bergès, H., Doležel, J., Budak, H. (2013): Physical mapping integrated with syntenic analysis to characterize the gene space of the long arm of wheat chromosome 1A. *PLOS ONE* 8: e59542.
- Luo, M.C., Gu, Y.Q., You, F.M., Deal, K.R., Ma, Y.Q., Hu, Y., Huo, N., Wang, Y., Wang, J.R., Chen, S.Y., Jorgensen, C.M., Zhang, Y., McGuire, P.E., Pasternak, S., Stein, J.C., Ware, D.H., Kramer, M., McCombie, W.R., Kianian, S.F., Martis, M.M., Mayer, K.F.X., Seghal, S.K., Gill, B.S., Bevan, M.W., Šimková, H., Doležel, J., Song, W., Lazo, G.R., Anderson, O.D., Dvorak, J. (2013): A 4-gigabase physical map unlocks the structure and evolution of the complex genome of *Aegilops tauschii*, the wheat D-genome progenitor. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* (in press).
- Luo, M.C., Xu, K., Ma, Y., Deal, K.R., Nicolet Ch.M., Dvorak, J. (2009): A high-throughput strategy for screening of bacterial artificial chromosome libraries and anchoring of clones on genetic map constructed with single nucleotide polymorphisms. *BMC Genomics* 10: 28.
- Marra, M.A., Kucaba, T.A., Dietrich, N.L., Green, E.D., Brownstein, B., Wilson, R.K., McDonald, K.M., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Waterston, R.H. (1997): High throughput fingerprint analysis of large-insert clones. *Genome Research* 7: 1072 - 7084.
- Mayer, K.F.X., Taudien, S., Martis, M., Šimková, H., Suchánková, P., Gundlach, H., Wicker, T., Petzold, A., Felder, M., Steuemagel, B., Scholz, U., Graner, A., Platzer, M., Doležel, J., Stein, N. (2009): Gene content and virtual gene order of barley chromosome 1H. *Plant Physiology* 151: 496 - 505.
- Meyers, B.C., Scalabrin, S. et Morgante, M. (2004): Mapping and sequencing complex genomes: Let's get physical! *Genetics* 5: 578 - 589.
- Miller, J.R., Koren, S. et Sutton, G. (2010): Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics* 95: 315 - 327.
- Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Carneiro Vieira, M.L. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genomics and Molecular Biology* 29: 294 - 307.

- Olson, M., Dutchik, J.E., Graham, M.Y., Brodeur, G.M., Helms, C., Frank, M., MacCollin, M., Scheinman, R., Frank, T. (1986): Random-clone strategy for genomic restriction mapping in yeast. *Proceeding of the National Academy of the United States of America* 83: 7826 - 7830.
- Palazzolo, M. J., Sawyer, S. A., Martin, CH. H., Smoller, D. A., Hartl, D. L. (1991): Optimized strategies for sequence-tagged-site selection in genome mapping. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 88: 8034 - 8038.
- 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. *The 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, et al. (2008a): A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science* 322:101-104.
- Paux, E., Legeai, F., Guilhot, N., Adam-Blondon, A.-F., Alaux, M., Salse, J., Sourdille, P., Leroy, P., Feuillet, C. (2008b): Physical mapping in large genomes: accelerating anchoring of BAC contigs to genetic maps through in silico analysis. *Functional & Integrative Genomics* 8: 29 - 32.
- Paux, E. et Sourdille, P. (2009): A toolbox for triticeae genomics. In: Muehlbauer, G.J., Feuillet, C. (ed.): *Genetics and Genomics of the Triticeae*, pp. 255 - 283, Springer.
- Paux, E. et Akhunov, E., International Wheat Genome Sequencing Consortium [online]. 2010 [cit. 2013-04-23]. Dostupné z WWW: <www.wheatgenome.org>.
- Paux, E., Faure, S., Choulet, F., Roger, D., Gauthier, V., Martinant, J.-P., Sourdille, P., Balfourier, F., LePaslier, M.-Ch., 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.
- Pestsova, E. et Röder, M. (2002): Microsatellite analysis of wheat chromosome 2D allows the reconstruction of chromosomal inheritance in pedigrees of breeding programmes. *Theoretical and Applied Genetics* 160: 84 - 91.

Philippe, R., Choulet, F., Paux, E., van Oeveren, J., Tang, J., Wittenberg, A.H.J., Janssen, A., van Eijk, M.J.T., Stormo, K., Alberti, A., Wincker, P., Akhunov, E., van der Vossen, E., Feuillet, C. (2012): Whole genome profiling provides a robust framework for physical mapping and sequencing in the highly complex and repetitive wheat genome. *BMC Genomics* 13: 47.

Qi, L.L., Echalier, B., Lazo, G.R., Butler, G.E., Anderson, O.D., Akhunov, E.D., Dvořák, J., Linkiewicz, A.M., Ratnasiri, A., Dubcovsky, J., Bermudez-Kandianis, C.E., Greene, R.A., Kantety, R., La Rota, C.M., Munkvold, J.D., Sorrells, S.F., Sorrells, M.E., Dilbirli, M., Sidhu, D., Erayman, M., Randhawa, H.S., Sandhu, D., Bondareva, S.N., Gill, K.S., Mahmoud, A.A., Ma, X.-F., Miftahudin, Gustafson, J.P., Conley, E.J., Nduati, V., Gonzalez-Hernandez, J.L., Anderson, J.A., Peng, J.H., Lapitan, N.L.V., Hossain, K.G., Kalavacharla, V., Kianian, S.F., Pathan, M.S., Zhang, D.S., Nguyen, H.T., Choi, D.-W., Fenton, R.D., Close, T.J., McGuire, P.E., Qualset, C.O., Gill, B.S. (2004): A chromosome bin map of 16 000 expressed sequence tags loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat. *Genetics* 168: 701 - 712.

Rafalski, J.A. (2002): Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science* 162: 329 - 333.

Ren, C., Xu, Z., Sun, S., Lee, M.-K., Wu, C., Scheuring, C., Zhang, H.-B. (2005): Genomic DNA libraries and physical mapping. In: Meksem, K., Kahl, G. (ed.): *The Handbook of Plant Genome Mapping*, pp. 173 - 213, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Richard, G.-F. *et* Pâques, F. (2000): Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Reports* 1: 122 - 126.

Riera-Lizarazu, O., Vales, M.I., Ananiev, E.V., Rines, H.W., Philips, R.L. (2000): Production and characterization of maize chromosome 9 radiation hybrids derived from an oat-maize addition line. *Genetics* 156: 327 - 339.

Riera-Lizarazu, O., Vales, M.I. *et* Kianian, S.F. (2008): Radiation hybrid (RH) and HAPPY mapping in plants. *Cytogenetic and Genome Research* 120: 233 - 240.

Riera-Lizarazu, O., Leonard, J.M., Tiwari, V.K., Kianian, S.F. (2010): A method to produce radiation hybrids for the D-genome chromosomes of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cytogenetic and Genome Research* 129: 234 - 240.

- Röder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., Ganal, M.W. (1995): Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular & General Genetics* 246: 327 - 333.
- 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.
- Röder, M.S., Huang, X.-Q. et Börner, A. (2008): Fine mapping of the region on wheat chromosome 7D controlling grain weight. *Functional & Integrative Genomics* 8: 79 - 86.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.-J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., Simon, M. (1992): Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragment of human DNA in *Escherichia coli* using F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 8794 - 8797.
- Shoemaker, R.C., Grant, D., Olson, T., Warren, W.C., Wing, R., Yu, Y., Kim, H., Cregan, P., Joseph, B., Futrell-Griggs, M., Nelson, W., Davito, J., Walker, J., Wallis, J., Kremitski, C., Scheer, D., Clifton, S.W., Graves, T., Nguyen, H., Wu, X., Luo, M., Dvorak, J., Nelson, R., Cannon, S., Tomkins, J., Schutz, J., Stacey, G. et Jackson, S. (2008): Microsatellite discovery from BAC end sequences and genetic mapping to anchor the soybean physical and genetic maps. *Genome* 51: 294-302.
- Soderlund, C., Humphray, S., Dunham, A., French, L. (2000): Contig built with fingerprints, markers and FPC V4.7. *Genome Research* 10: 1772 - 1787.
- Somers, D.J., Isaac, P. et Edwards, K. (2004): A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1105 - 1114.
- Sorrells, M.E., La Rota, M., Bermudez-Kandianis, C.E., Greene, R.A., Kantety, R., Munkvold, J.D., Mahmoud, M.A, Ma, X., Gustafson, P.J., Qi, L.L., Echalié, B., Gill, B.S., Matthews, D.E., Lazo, G.R., Chao, S., Anderson, O.D., Edwards, H., Linkiewicz, A.M., Dubcovsky, J., Akhunov, E.D., Dvorak, J., Zhang, D., Nguyen, H.T., Peng, J., Lapitan, N.L.V., Gonzalez-Hernandez, J.L., Anderson, J.A., Hossain, K., Kalavacharla, V., Kianian, S.F., Choi, D.-W., Close, T.J., Dilbirligi, M., Gill, K.S., Steber, C., Walker-Simmons, M.K., McGuire, P.E., Qualset, C.O. (2003): Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome Research*: 1818 - 1827.

Sun, D.J., He, Z.H., Xia, X.C., Zhang, L.P., Morris, C.F., Appels, R., Ma, W.J., Wang, H. (2005): A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat. *Molecular Breeding* 16: 209 - 218.

Šafář, J., Šimková, H., Kubaláková, M., Čihalíková, J., Suchánková, P., Bartoš, J., Doležel, J. (2010): Development of chromosome-specific BAC resources for genomics of bread wheat. *Cytogenetic Genome Research* 129: 211 - 223.

Šimková, H., Šafář, J., Kubaláková, M., Suchánková, P., Čihalíková, J., Robert-Quarte, H., Azhaguvel, P., Weng, Y., Peng, J., Lapitan, N.L.V., Ma, Y., You, F.M., Luo, M.-C., Bartoš, J., Doležel, J. (2010): BAC libraries from wheat chromosome 7D: efficient tool for positional cloning of aphid resistance genes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2011, pages 11.

Tiwari, V.K., Riera-Lizarazu, O., Gunn, H.L., Lopez, K., Iqbal, M.J., Kianian, S.F., Leonard, J.M. (2012): Endosperm tolerance of paternal aneuploidy allows radiation hybrid mapping of the wheat D-genome and a measure of γ ray-induced chromosome breaks. *PLOS ONE* 7, Issue 11, e48815.

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

van Oeveren, J., de Ruiter, M., Jesse, T., van der Poel, H., Tang, J., Yalcin, F., Janssen, A., Volpin, H., Stormo, K.E., Bogden, R., van Eijk, M.J.T., Prins, M. (2011): Sequence-based physical mapping of complex genomes by whole genome profiling. *Genome Research* 21: 618 - 625.

Varshney, R.K., Graner, A. *et* Sorrells, M.E. (2005): Genic microsatellite markers in plants: features and application. *Trends in Biotechnology* 23: 48 - 55.

Wang, L.H., Zhao, X.L., He, Z.H., Ma, W., Appels, R., Peña, R.J., Xia, X.C. (2009): Characterization of low-molecular-weight glutenin subunit *Glu-B3* genes and development of STS markers in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 118: 525 - 539.

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.

- Wei, F., Coe, E., Nelson, W., Bharti, A.K., Engler, F., Butler, E., Kim, H., Goicoechea, J.L., Chen, M., Lee, S., Fuks, G., Sanchez-Villeda, H., Schroeder, S., Fang, Z., McMullen, M., Davis, G., Bowers, J.E., Paterson, A.H., Schaeffer, M., Gardiner, J., Cone, K., Messing, J., Soderlund, C., Wing, R.A. (2007): Physical and genetic structure of the maize genome reflects its complex evolutionary history. *PLoS Genetics* 3: e123.
- Wenzl, P., Carling, J., Kudrna, D., Jaccoud, D., Huttner, E., Kleinhofs, A., Kilian, A. (2004): Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9915-9920.
- Wicker, T., Mayer, K.F.X., Gundlach, H., Martis, M., Steuernagel, B., Scholtz, U., Šimková, H., Kubaláková, M., Choulet, F., Taudien, S., Platzer, M., Feuillet, C., Fahima, T., Budak, H., Doležel, J., Keller, B., Stein, N. (2011): Frequent gene movement and pseudogene evolution is common to the large and complex genomes of wheat, barley, and their relatives. *The Plant Cell* 23: 1706 - 1718.
- Xu, H., Yin, D., Li, L., Wang, Q., Li, X., Yang, X., Liu, W., An, D. (2012): Development and application of EST-based markers specific for chromosome arms of rye (*Secale cereale* L.). *Cytogenetical and Genome Research* 136: 220 - 228.
- Xu, Z., Sun, S., Covalada, L., Ding, K., Zhang, A., Wu, C., Scheuring, C., Zhang, H.-B. (2004): Genome physical mapping with large-insert bacterial clones by fingerprint analysis: methodologies, source clone genome coverage, and contig map quality. *Genomics* 84: 941 - 951.
- Yim, Y.-S., Moak, P., Sanchez-Villeda, H., Musket, T.A., Close, P., Klein, P.E., Mullet, J.E., McMullen, M., Fang, Z., Schaeffer, M.L., Gardiner, J.M., Coe Jr., E.H., Davis, G.L. (2007): A BAC pooling strategy combined with PCR-based screening in a large, highly repetitive genome enables integration of the maize genetic and physical maps. *BMC Genomics* 8: 47.
- You, F.M., Huo, N., Deal, K.R., Gu, Y.Q., Luo, M.-Ch., McGuire, P.E., Dvorak, J., Anderson, O.D. (2011): Annotation-based genome-wide SNP discovery in the large and complex *Aegilops tauschii* genome using next-generation sequencing without a reference genome sequence. *BMC Genomics* 12: 59.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

7DS	krátké rameno chromozómu 7
AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (<i>amplified fragment length polymorphism</i>)
BAC	umělý bakteriální chromozóm (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
BES	BAC- <i>end sequences</i>
bp	pár bazí (<i>base pair</i>)
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequence</i>
cR	centi Ray
DArT	<i>diversity array technology</i>
ddNTP	dideoxynukleotidy
dNTP	deoxynukleotidy
EST	koncová sekvence z cDNA (<i>expressed sequence tag</i>)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
HICF	fingerprinting s vysokým informačním obsahem (<i>high-information-content fingerprinting</i>)
ISBP	polymorfismus založený na místě inserce (<i>insertion site-base polymorphism</i>)
IWGSC	<i>International Wheat Genome Sequencing Consortium</i>
MAS	<i>marker assisted selection</i>
MTP	minimální sestava klonů pro sekvenování (<i>minimum tilling path</i>)
NGS	technologie sekvenování nové generace (<i>next-generation sequencing</i>)
OPAs	<i>oligonucleotide pool assays</i>
PAA	polyakrylamid
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
QTL	lokus pro kvantitativní znaky (<i>quantitative trait locus</i>)
RAPD	náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (<i>random amplified polymorphic DNA</i>)
RE	restrikční endonukleáza/enzym

RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RH	radiační hybrid
SCAR	amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí (<i>sequence characterized amplified region</i>)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SSR	mikrosatelit (<i>simple sequence repeat</i>)
STS	místo se sekvenční adresou (<i>sequence tagged site</i>)
T_a	teplota nasedání primerů
TE	transponovatelné elementy
WGP	celogenomové profilování (<i>whole genome profiling</i>)
WGS	celogenomové shotgun sekvenování (<i>whole genome shotgun</i>)