

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2016

Bc. Mira Mazáčová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Poziční klonování genu pro rezistenci
k mšici zhoubné u pšenice**

Diplomová práce

Bc. Mira Mazáčová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Mgr. Helena Staňková, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že tuto bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně. Vycházela jsem při tom ze svých znalostí, odborných konzultací a doporučené literatury uvedené v seznamu.

V Olomouci dne:

.....

podpis

Poděkování

Úvodem bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce Mgr. Heleně Staňkové, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování předkládané práce. Zároveň bych chtěla poděkovat paní Ing. Haně Šimkové, Ph.D., Mgr. Zuzaně Tulpové a celému kolektivu Centra strukturní a funkční genomiky Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci za pomoc při mé experimentální práci a přátelské prostředí.

Souhrn

Pšenice setá (*Triticum aestivum*) patří mezi ekonomicky i zemědělsky nejvýznamnější plodiny na světě. Je zdrojem potravy pro zhruba 30% lidské populace a znalost její genetické informace může významně napomoci ke zlepšování jejího výnosu, odolnosti vůči chorobám a škůdcům, či k adaptaci ke změnám klimatu. Studium genomu pšenice je však ztíženo v důsledku jeho značné velikosti, přítomnosti tří homeologních subgenomů (A, B a D) a dále z důvodu četného výskytu repetice, které tvoří více jak 80% genomu pšenice. Mezi významné škůdce pšenice seté patří mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*). Identifikace a izolace genů rezistence může významně napomoci k vývoji nových odrůd pšenice rezistentních vůči tomuto škůdci.

Krátké rameno chromozómu 7D linie CI2401 pšenice seté nese gen *Dn2401* podmiňující rezistenci k mšici zhoubné. Předkládaná práce je zaměřena na vývoj nových markerů za účelem zahuštění genetické mapy v oblasti zmíněného genu. Právě vysoko-hustotní genetická mapa představuje jeden z podstatných kroků v procesu pozičního klonování, jehož cílem je izolace studovaného genu.

V rámci experimentální části této diplomové práce došlo k rozšíření dostupné mapovací populace F2 s cílem zvýšit rozlišení genetické mapy v oblasti genu *Dn2401* a tím upřesnit vzdálenosti mezi stávajícími hraničními markery *Xowm705* a *Xowm711* a genem *Dn2401*. Stěžejním cílem práce byl pak vývoj nových markerů pro oblast mezi výše zmíněnými markery. V této oblasti byly identifikovány dva jednonukleotidové polymorfismy, z nichž pouze jeden bylo možno zamapovat v těsné blízkosti genu *Dn2401* jako marker *Xowm713*. Zamapováním tohoto markeru došlo ke zkrácení vzdálenosti mezi hraničními markery z původních 0,90 cM mezi *Xowm705* a *Xowm711* na 0,45 cM mezi *Xowm713* a *Xowm711*.

Summary

Bread wheat (*Triticum aestivum*) is one of the most economically and agriculturally important crops in the world. It is a staple food for about 30% of the world's population, and the knowledge of its genetic information can significantly help to improve the yield, the resistance to pests and diseases as well as the adaptation to the climate changes. Wheat genome research is hampered by a huge genome size, presence of three homoeologous subgenomes (A, B and D), and also by a large amount of repetitive DNA sequences (more than 80%). One of the major pests of the bread wheat is a Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*). Identification and isolation of resistance genes can significantly contribute to the development of new wheat varieties resistant to this pest.

Short arm of the chromosome 7D of bread wheat line CI2401 carries gene *Dn2401* that underlies a resistance to the Russian wheat aphid. Presented thesis is focused on the development of new genetic markers with the aim to saturate the genetic map in the gene region. High-density genetic map represents one of the essential steps in the process of positional cloning which leads to the isolation of the gene of interest.

Within the aims of this thesis, available F2 mapping population was enlarged in order to increase the resolution of the genetic map of *Dn2401* gene region and to refine the distances between existing flanking markers (*Xowm705* and *Xowm711*) and gene *Dn2401*. The main goal of this thesis was to develop new markers specific for the region between markers *Xowm705* and *Xowm711*. Two single nucleotide polymorphisms were identified of which only one could be mapped close to *Dn2401* as marker *Xowm713*. The distance between flanking markers was narrowed down from the original 0.90 cM between *Xowm705* and *Xowm711* to 0.45 cM between *Xowm713* and *Xowm711*.

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 Zjednodušení genomu pšenice	12
3.1.2 Krátké rameno chromozómu 7D pšenice	15
3.2 Mšice zhoubná (<i>Diuraphis noxia</i>)	16
3.2.1 Kategorie rezistence k mšici zhoubné	17
3.2.2 Geny podmiňující rezistenci k mšici zhoubné.....	18
3.3 Poziční klonování	22
3.3.1 Princip pozičního klonování.....	22
3.3.2 Další přístupy izolace genů	26
3.3.3 Poziční klonování u pšenice	26
4. Materiál a metodika	31
4.1 Materiál.....	31
4.1.1 Biologický materiál	31
4.1.2 Přístrojové vybavení.....	31
4.1.3 Chemikálie	32
4.1.4 Pufrý a roztoky	32
4.1.5 Komerční kity	33
4.2 Metodika	33
4.2.1 Pěstování mapovací populace	33
4.2.2 Izolace DNA	33
4.2.3 Hodnocení fenotypu	34
4.2.4 Genetické mapování markerů <i>Xowm705</i> a <i>Xowm711</i>	34
4.2.5 Odvozování genetických markerů pro oblast genu <i>Dn2401</i>	39
5. Výsledky	45
5.1 Genetické mapování markerů <i>Xowm705</i> a <i>Xowm711</i>	45
5.1.1 Genotypování mapovací populace	45
5.1.2 Konstrukce genetické mapy	46
5.2 Odvozování genetických markerů v oblasti genu <i>Dn2401</i>	47
5.2.1 Navrhování primerů specifických pro chromozómové rameno 7DS....	47
5.2.2 Amplifikace 7DS-specifických produktů PCR	48
5.2.3 Identifikace polymorfismů mezi rodiči mapovací populace.....	50
5.2.4 Genetické mapování nově odvozených markerů	50
4. Diskuze	52
4.1 Mapování hraničních markerů v populaci s vyšším rozlišením.....	53
4.2 Vývoj nových markerů pro oblast genu <i>Dn2401</i>	54
5. Závěr	57
Seznam použitých zkratk	58
Literatura	59

Seznam příloh.....	72
---------------------------	-----------

1. Úvod

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) představuje významný zdroj potravy pro 30% lidské populace a je tak právem řazena mezi ekonomicky i zemědělsky nejvýznamnější plodiny světa. V současné době je pěstována na větší osevní ploše než jakákoliv jiná plodina a v objemu produkce ji mezi obilovinami překonává pouze kukuřice a rýže. Vzhledem k neustálému nárůstu světové populace je nezbytné u této obiloviny zajistit její zvýšený výnos. Ten však může být snižován v důsledku měnících se klimatických podmínek či působením nejrůznějších škodlivých organismů.

Mezi významné škůdce pšenice seté patří mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*), která svým rychlým rozmnožováním a způsobem života dokáže způsobit v oblastech, kde je pšenice intenzivně pěstována, nemalé ekonomické ztráty. Jelikož jsou chemické i biologické mechanismy hubení mšice zhoubné nedostatečně účinné, jeví se jako nejvhodnější způsob boje proti tomuto škůdci vývoj odrůd nesoucích geny rezistence. Hostitelské rezistence může být dosaženo klasickým šlechtěním za pomoci markerů (MAS, *marker assisted selection*) či přímým přenosem genů do vybraných citlivých odrůd metodami genového inženýrství.

Předkládaná práce se zaměřuje na genetické mapování a vývoj nových markerů v těsné blízkosti genu *Dn2401*, který podmiňuje rezistenci k mšici zhoubné. Konstrukce vysoko-hustotní genetické mapy představuje jeden ze stěžejních kroků v procesu izolace zmíněného genu metodou pozičního klonování.

2. Cíle práce

V rámci teoretické části diplomové práce bylo cílem vypracovat literární rešerši na téma „Poziční klonování genu pro rezistenci k mšici zhoubné u pšenice“.

Praktická část práce byla zaměřena na genetické mapování v oblasti genu *Dn2401*, jenž podmiňuje rezistenci k mšici zhoubné. Jednotlivé cíle experimentální části práce byly následující:

- I. Rozšíření stávající mapovací populace F2 za účelem zvýšení rozlišení genetické mapy v oblasti genu *Dn2401*
- II. Mapování dostupných markerů v těsné vazbě na gen *Dn2401* v rozšířené mapovací populaci
- III. Vývoj nových markerů v těsné vazbě na gen *Dn2401* s cílem zúžit interval mezi markery, které gen ohraničují

3. Současný stav řešené problematiky

3.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednoděložná rostlina řazená do čeledi *Poaceae*, podčeledi *Pooideae*, tribu *Triticeae* a rodu *Triticum*. Díky své bohatosti na karbohydráty, proteiny a minerální látky patří mezi světově nejdůležitější obiloviny sloužící jako hlavní zdroj potravy pro 30 % lidské populace a je tak nejčastěji pěstovaným druhem pšenice vůbec (IWGSC 2014).

Druhy náležící do tribu *Triticeae* tvoří více než třetinu celkové produkce obilovin. Skupina obsahuje diploidní (ječmen a žito), tetraploidní (pšenice tvrdá), hexaploidní (pšenice setá), a také oktaploidní druhy (*Triticales*). Vzhledem k zemědělskému významu druhů tribu *Triticeae* byly tyto plodiny intenzivně zkoumány, což vedlo k velkému zvýšení pěstitelských výtěžků (Feuillet *et al.* 2008).

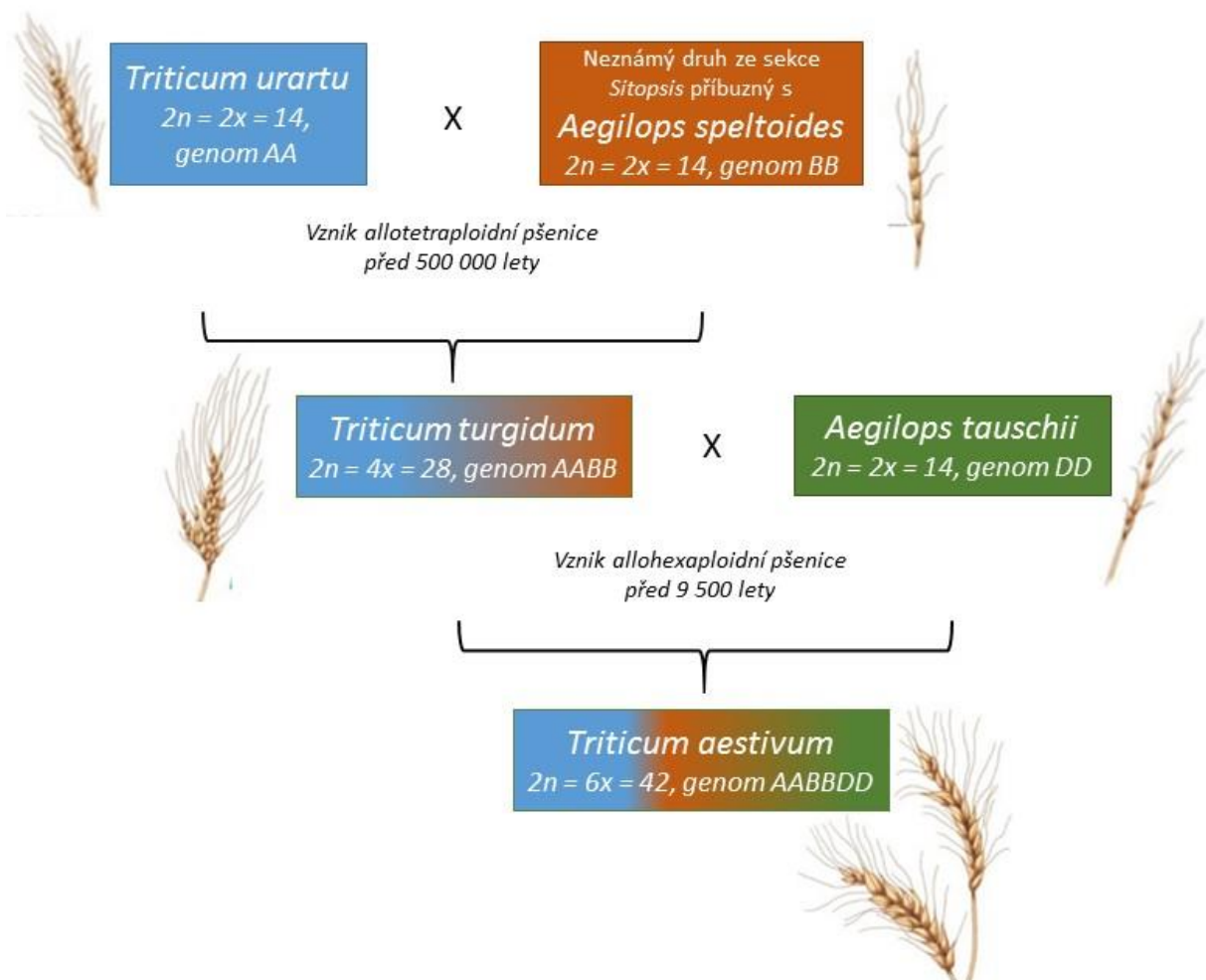
Pšenice setá je allohexaploidní druh ($2n = 6x = 42$), jehož genom je tvořen třemi homeologními subgenomy A, B a D. Velikost genomu činí téměř 17 Gb ($1C = 16\,974$ Mb; Bennett *et Smith* 1991) a jeho podstatnou část (> 80%) tvoří repetitivní sekvence, zejména pak transponovatelné elementy. Pouze méně než 2 % genomu pšenice obsahují kódující sekvence (Choulet *et al.* 2014; IWGSC 2014).

Allohexaploidní genom pšenice seté vznikl dvěma po sobě následujícími mezidruhovými hybridizacemi (Obr. 1), které byly následovány polyploidizací. Počátek evoluce pšenice je datován půl milionu let nazpět do oblasti tzv. Úrodného půlměsíce (oblast dnešního Izraele, Jordánska, Turecka, Sýrie, Íránu a Íráku; Feuillet *et al.* 2008). Na vzniku hexaploidní pšenice se podílely tři blízce příbuzné diploidní druhy trav - *Triticum urartu*, druh příbuzný s *Aegilops speltoides* a *Aegilops tauschii*. Genomy těchto druhů byly tvořeny sedmi páry chromozómů. Společně tak daly tyto druhy vzniknout hexaploidnímu genomu, který je tvořen třemi velmi podobnými soubory sedmi chromozómů (Choulet *et al.* 2013).

K první hybridizaci v průběhu evoluce hexaploidní pšenice došlo před 500 000 lety mezi druhem *T. urartu* ($2n = 2x = 14$, AA) a diploidním druhem ze sekce *Sitopsis* blízce příbuzným s *Aegilops speltoides*, který poskytl subgenom B. Výsledkem tohoto křížení byl tetraploidní druh *T. turgidum* ($2n = 4x = 28$, AABB). Druhou hybridizací, která proběhla před přibližně 9 500 lety, došlo ke spojení *T. turgidum* s *Ae. tauschii*

($2n = 2x = 14$, DD), diploidním donorem subgenomu D, a došlo tak ke vzniku hexaploidní pšenice *T. aestivum* ($2n = 6x = 42$, AABBDD) (Feldman *et* Levy 2005).

Jednotlivé hybridizační a polyploidizační události byly následovány řadou strukturálních a funkčních přestaveb, které vedly ke stabilizaci genomu a zvýšení variability. Samosprašný způsob rozmnožování pšenice poté umožnil upevnění těchto změn. Změny, ke kterým došlo v průběhu evoluce pšenice seté, daly vzniknout novému a úspěšnému druhu, který je schopen se adaptovat na široké spektrum podmínek životního prostředí (Gustafson *et al.* 2009).



Obr. 1: Schéma hybridizačních událostí v průběhu vývoje genomu pšenice seté (přepřacováno dle Feldman *et* Levy 2005, Pietrangelo, M. [cit. 13.4.]).

3.1.1 Zjednodušení genomu pšenice

Typické vlastnosti genomu pšenice, zejména jeho značná velikost, přítomnost tří homeologních subgenomů a velké procento repetitivních sekvencí, výrazně komplikují jeho analýzu. Proto vždy existovala snaha genom pšenice zjednodušit. Jednou z možností je využít diploidních a tetraploidních blízce příbuzných druhů z čeledi *Poaceae*. Genomy těchto druhů se vyznačují vysokou úrovní kolinearitě s genomem pšenice, avšak velikost genomu i ploidy příbuzných druhů je nižší. Díky kolinearitě je částečně možné využít informace o genomech příbuzných druhů k charakterizaci genomu pšenice bez nutnosti znát jeho kompletní sekvenci.

Další možností jak výzkum pšenice zjednodušit je snížit velikost samotného genomu pšenice. K tomuto účelu bylo v minulosti využito C₀t filtrace (Šimková *et al.* 2007) či methylfiltrace (Rabinowicz *et al.* 2003). Obě tyto metody byly použity k izolaci genově bohatých (nízko-kopiových) sekvencí. C₀t filtrace je metoda založená na principu reasociační kinetiky. Na základě rozdílné rychlosti renaturace DNA, v závislosti na počtu kopií dané sekvence v genomu, dochází k cílenému výběru nízko-kopiových sekvencí (Šimková *et al.* 2007). V případě methylfiltrace jsou z genomu odstraněny nekódující sekvence, které se vyznačují metylací cytozinu (Rabinowicz *et al.* 2003). Obě zmíněné metody umožňují výrazně snížit velikost genomu pšenice, avšak za cenu eliminace velké části genomu a tím ztráty informace.

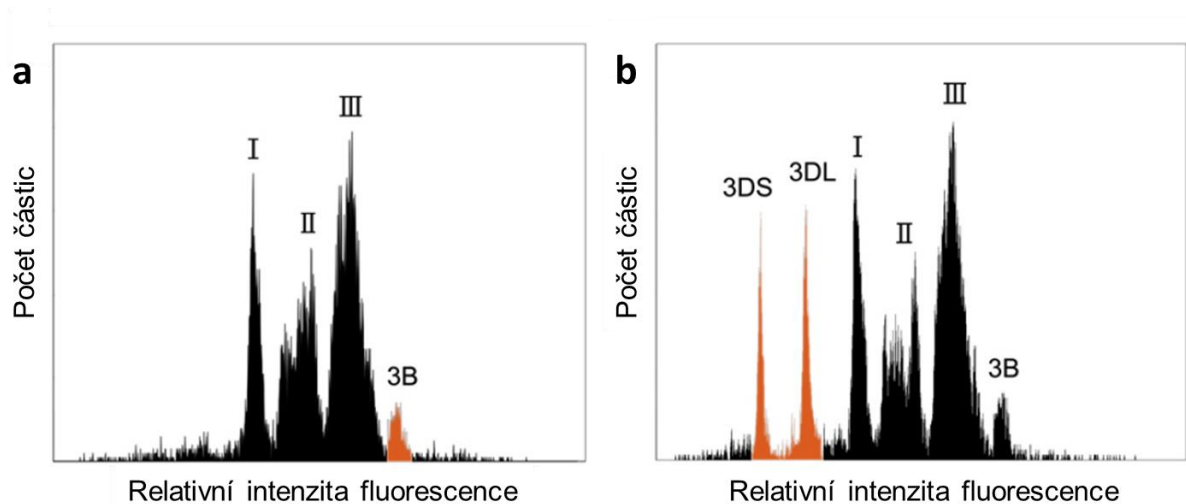
Jedinou možností, jak zachovat kompletní informaci o genomu pšenice a zároveň dosáhnout zjednodušení, je rozdělit genom na menší, přesně definované části. Jedním z přístupů je využití laserové mikrodisekce k izolaci jednotlivých chromozómů. Tato metoda je však velice pracná, časově náročná a neposkytuje dostatečné množství DNA. Nezbytný krok amplifikace DNA pak může do sekvence chromozómu vnášet chyby (Hobza *et Vyskot* 2007). Nejlepší nástroj k rozdělení genomu pšenice na jednotlivé chromozómy či ramena tak představuje průtoková cytometrie (Doležel *et al.* 2014).

3.1.1.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je vysoce účinnou a plně automatizovanou metodou umožňující získat velké množství nepoškozených chromozómů či chromozómových ramen pšenice, jejichž DNA je dále použitelná pro široké spektrum aplikací. Mezi tyto aplikace patří konstrukce knihoven DNA, fyzické a genetické mapování, poziční klonování či cytogenetické analýzy (Doležel *et al.* 2014).

Třídění pomocí průtokové cytometrie je založeno na analýze rozptylu světla a fluorescence tříděných fluorescenčně značených částic (mitotických chromozómů) v reálném čase. Výstupem analýzy je histogram relativní intenzity fluorescence, tzv. flow-karyotyp (Obr. 2). Chromozómy o stejné velikosti (se stejným obsahem DNA) se vyznačují stejnou intenzitou fluorescence a v histogramu vytvářejí jeden oddělený pík. V ideálním případě jsou jednotlivé chromozómy svou velikostí natolik odlišné, že je každý z nich reprezentován samostatným píkem (Doležel *et al.* 1992). Tyto případy se však v rostlinné říši prakticky nevyskytují. Obvykle tvoří samostatný pík pouze jeden či několik chromozómů a zbylé chromozómy jsou součástí několika složených píků. Stejně tomu je i v případě pšenice.

Standardní flow-karyotyp hexaploidní pšenice je tvořen čtyřmi charakteristickými píky (Obr. 2). Pouze jeden z chromozómů (3B) vytváří samostatný pík a lze jej tedy třídít ze standardních odrůd pšenice seté. Zbylé chromozómy jsou obsaženy ve třech složených pících. Jeden z těchto píků obsahuje chromozómy 1D, 4D a 6D, zatímco další dva jsou tvořeny směsí zbývajících chromozómů velmi podobné velikosti (Vrána *et al.* 2000).



Obr. 2: Histogramy relativní intenzity fluorescence (flow-karyotypy) získané tříděním mitotických chromozómů značených fluorescenčním barvivem DAPI. (a) Standardní flow-karyotyp hexaploidní pšenice odrůdy 'Chinese spring' obsahující 3 píky (I-III), obsahující skupiny chromozómů a dále pík obsahující pouze chromozóm 3B. (b) Flow-karyotyp dvojitě ditelosomické linie dDt3D odrůdy 'Chinese spring', která nese chromozóm 3D ve formě dvou telocentrickými chromozómů 3DS a 3DL (přepřacováno dle Doležel *et al.* 2014).

Třídění jednotlivých chromozómů a ramen pšenice je umožněno použitím speciálních aneuploidních (ditelozomických) linií (Sears *et Sears* 1978). Tyto linie nesou jedno či obě chromozómová ramena ve formě telozómu. Všechny telozómy jsou značně menší než zbývající standardní chromozómy a ve flow-karyotypu tak tvoří detekovatelné oddělené píky, čímž je umožněno jejich třídění (Doležel *et al.* 2014). Za použití ditelozomických linií je možnost třídít všechny chromozómy s výjimkou chromozómu 5BL, k jehož třídění se používá linie nesoucí toto rameno ve formě izochromozómu (Vrána *et al.* 2012).

Možnost tříděných chromozómů a chromozómových ramen za pomoci průtokové cytometrie umožňuje redukovat obsáhlý genom pšenice na jednotlivé frakce o velikosti 224 – 580 Mb, což představuje 1,3 – 3,4 % celkové velikosti genomu (Šafář *et al.* 2010).

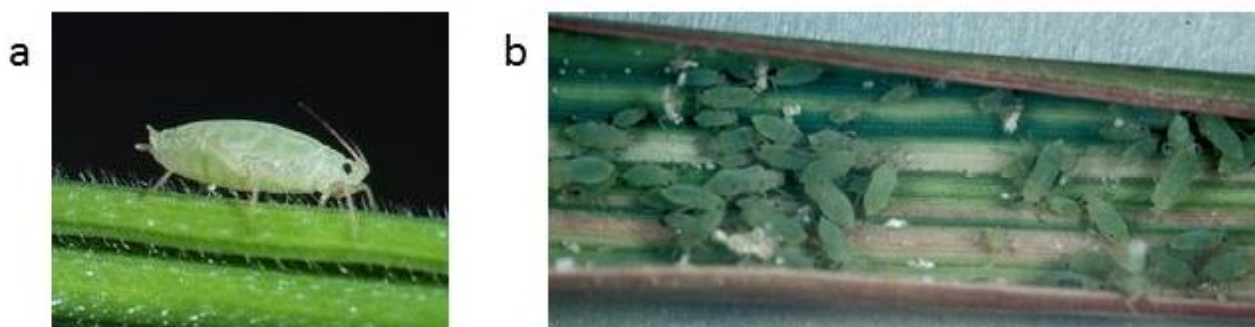
3.1.2 Krátké rameno chromozómu 7D pšenice

Krátké rameno chromozómu 7D (7DS) zaujímá délku 381 Mb (Šafář *et al.* 2010). Toto chromozómové rameno je nositelem mnoha genů kódujících agronomicky významné znaky, jako jsou například geny ovlivňující počet zrn v klasu, hmotnost tisíce zrn, hmotnost zrn na klas, výšku rostliny či dobu metání (Huang *et al.* 2004; Röder *et al.* 2008). Dále zde byla identifikována řada genů podmiňujících rezistenci k nejrůznějším patogenům. Z těchto genů je možno jmenovat např. geny *Stb4* a *Stb5* zapříčiňující rezistenci k braničnatce pšeničné (*Mycosphaerella graminicola*) či lokus *Lr34* podílející se na rezistenci k různým druhům rzí a k padlí travnímu. V neposlední řadě se na krátkém rameni chromozómu 7D nachází také klastr genů zodpovědných za rezistenci k mšici zhoubné (*Diuraphis noxia*). Jedním z těchto genů je i gen *Dn2401*, který je předmětem předkládané diplomové práce.

3.2 Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*)

Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*, Kurdjumov) je hmyz taxonomicky řazený do řádu polokřídílí (*Hemiptera*), čeledi mšicovití (*Aphididae*). Jedná se o významného škůdce pšenice a ječmene, jehož původní výskyt je v oblasti Afgánistánu, Íránu, jižního Ruska a v zemích sousedících se Středozezemním mořem. Z těchto míst se mšice zhoubná rozšířila do všech oblastí pěstujících pšenici a ječmen s výjimkou Austrálie (Ennahli *et al.* 2009).

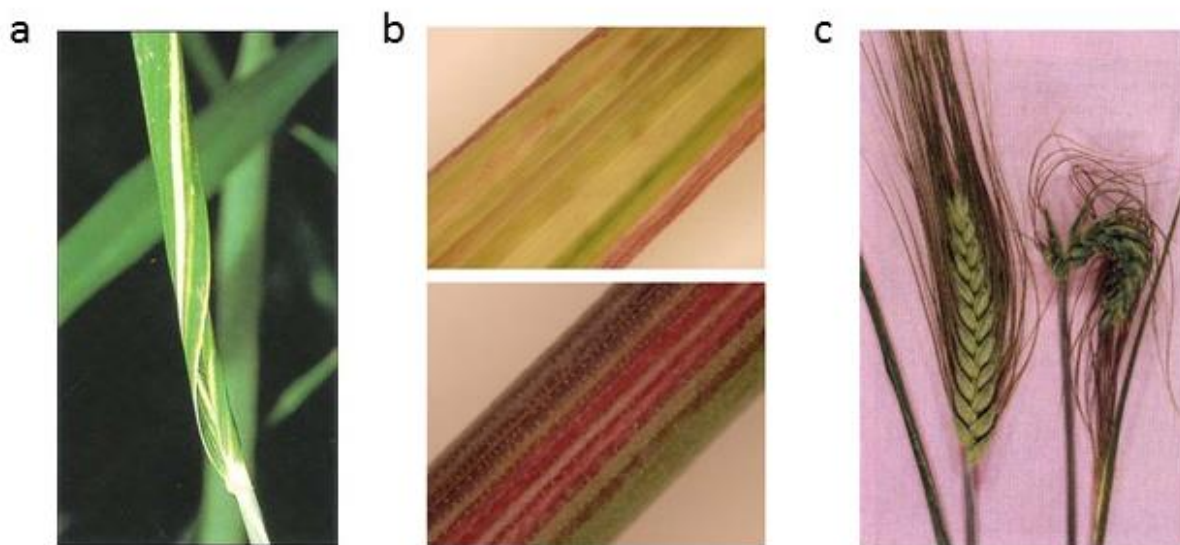
Mšice zhoubná (Obr. 3) je herbivorní hmyz s bodavě sacím ústním ústrojím. Při napadení rostliny mšicí dochází k sání tekutin z rostlinných pletiv, přičemž současně dochází k uvolňování enzymů obsažených ve slinách mšice, které rostlinu poškozují. Narušení pletiva rostliny může být spojeno také s přenosem virových onemocnění (Ennahli *et al.* 2009). Napadení rostliny mšicí vyvolává buď systémovou obrannou reakci, které se šíří celou rostlinou, či lokální reakci, která je soustředěna na místo napadení (Franzen *et al.* 2008).



Obr. 3: Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*). (a) Detail jedince mšice zhoubné (QuantiPest [cit. 24.2.2016]). (b) Kolonie mšic v částečně svinutém listu pšenice (myFields [cit. 13.4.2016])

Mezi nejvýznamnější příznaky napadení rostliny mšicí patří tzv. chloróza projevující se výrazným bílým, žlutým či fialovým pruhováním listů, a dále postupné svinování listů (Obr. 4). Nadměrné přemnožení kolonie mšic (Obr. 3b) může způsobit až úhyn rostliny (Puterka *et al.* 1992). Jednotlivé symptomy se na rostlině objevují zpravidla v průběhu sedmi dnů od napadení škůdcem. Napadená rostlina se vyznačuje redukcí výšky, sníženou hmotností, sníženým počtem klásků v klase a tím pádem sníženým výnosem (Fazel-Najafabadi *et al.* 2015).

Hlavní příčinou neúspěšné likvidace mšic na napadených rostlinách je fakt, že stočené listy vytvářejí úkryt pro kolonie mšic a brání tak kontaktu s pesticidy či biologickými agens (Fazel-Najafabadi *et al.* 2015). Jelikož je hubení mšice zhoubné chemickou i biologickou cestou nedostatečně účinné, existuje snaha vyvíjet nové odrůdy pšenice nesoucí geny rezistence vůči tomuto škůdci. Tento způsob ochrany je zároveň v porovnání s užíváním pesticidů bezpečný pro životní prostředí.



Obr. 4: Příznaky napadení mšicí zhoubnou. (a) Svinutí listu s nápadným pruhováním. (b) Chloróza – barevné varianty pruhování na listech pšenice. (c) Poškození klasu pšenice. (Nicholas, 2011).

3.2.1 Kategorie rezistence k mšici zhoubné

Rezistence je definována jako schopnost hostitelského (rezistentního) organismu odolávat působení škůdce, případně zmenšit nebo překonat následky jeho působení (Kúdela *et al.* 1989). Tato schopnost je podmíněna souborem dědičných vlastností, které vedou při napadení škůdcem k menšímu poškození rezistentního organismu v porovnání s citlivým (Smith 2005). Rezistenci pšenice k mšicím lze rozdělit do tří kategorií – antibióza, antixenóza a tolerance.

Antibiózu lze obecně charakterizovat jako reakci hostitele, která vede k potlačování růstu a jiných životních projevů škůdce. Rostlina se schopností antibiózy dokáže nepříznivě působit, ať už chemicky či morfoloogicky, na funkce škodlivého organismu. Příznaky působení antibiózy vyvolané u škůdce mohou být

bud' akutní či chronické. Při chronickém poškození dochází k úhynu škůdce v pozdějších fázích jeho vývoje. Jednotlivci, kteří jsou schopni přežít přímé účinky antibiomy, se zpravidla vyznačují sníženou velikostí těla i hmotností, prodloužením jednotlivých vývojových etap a sníženou fertilitou (Smith 2005).

Antixenóza (non-preference) je typem rezistence, který je definován jako soubor vlastností rostliny, které zapřičiňují její neschopnost sloužit jako hostitelský organismus. Rostliny se schopností antixenomy dokáží jak morfologicky, tak také chemicky ovlivnit soužití se škůdce, který si následně vybírá jiného hostitele. Mezi faktory, které se podílí na schopnosti antixenomy patří např. tvorba silnější epidermis, větší hustota trichomů či voskový povrch epidermis. Rezistentní rostliny mohou dále syntetizovat specifické fytochemikálie, které dokáží odradit škůdce od konzumace či kladení vajíček. V neposlední řadě mohou rostliny tvořit látky toxické, které jsou pro škůdce letální (Smith 2005).

Poslední ze tří kategorií rezistence je tolerance. Na rozdíl od předchozích dvou, nedochází při tomto typu rezistence k negativnímu působení hostitele na škodlivý organismus. Tolerance je popisována jako schopnost rostliny odolat napadení škůdce s následným zotavením. Rostliny vyznačující se schopností tolerance jsou schopny přežít napadení a zároveň u nich dochází k obnově a růstu poškozených pletiv. K faktorům, které se podílejí na schopnosti tolerance, patří zvýšená rychlost fotosyntézy, zvýšená rychlost růstu, lepší větvení a odnožování rostliny, vyšší hladina uhlíku v kořenech a schopnost jeho přenesení do výhonků v době růstu. Tolerance se velmi často vyskytuje v kombinaci s antibiomy nebo antixenomy (Smith. 2005).

3.2.2 Geny podmiňující rezistenci k mšici zhoubné

Hlavním předpokladem pro získání rezistentní odrůdy je identifikace a charakterizace zdrojů rezistence (Peng *et al.* 2009). Do současné doby bylo blíže charakterizováno 14 genů podmiňujících rezistenci k mšici zhoubné (Tab. 1), a to ve formě antixenomy, antibiomy, tolerance či jejich kombinací. Geny rezistence k mšici zhoubné byly nalezeny v různých liniích pšenice, žita a *Aegilops tauschii* (Peng *et al.* 2009). I přesto, že byly tyto geny blíže popsány, ani jeden z nich se dosud nepodařilo izolovat (Botha *et al.* 2014).

Osm z celkového počtu 14 genů bylo lokalizováno na chromozómovém rameni 7DS. S výjimkou genu *Dn8*, který se nachází v distální části ramene 7DS, bylo všech zbývajících 7 zamapováno do centrální oblasti ramene (Liu *et al.* 2005, Liu *et al.* 2001, Liu *et al.* 2002). Geny mapované do centrální oblasti 7DS jsou vázány na marker *Xgwm111* a představují buď jednotlivé alely jednoho genu či velmi příbuzné členy rodiny genů *Dn*.

Tab. 1: Přehled genů podmiňujících rezistenci k mšici zhoubné (Staňková, 2015)

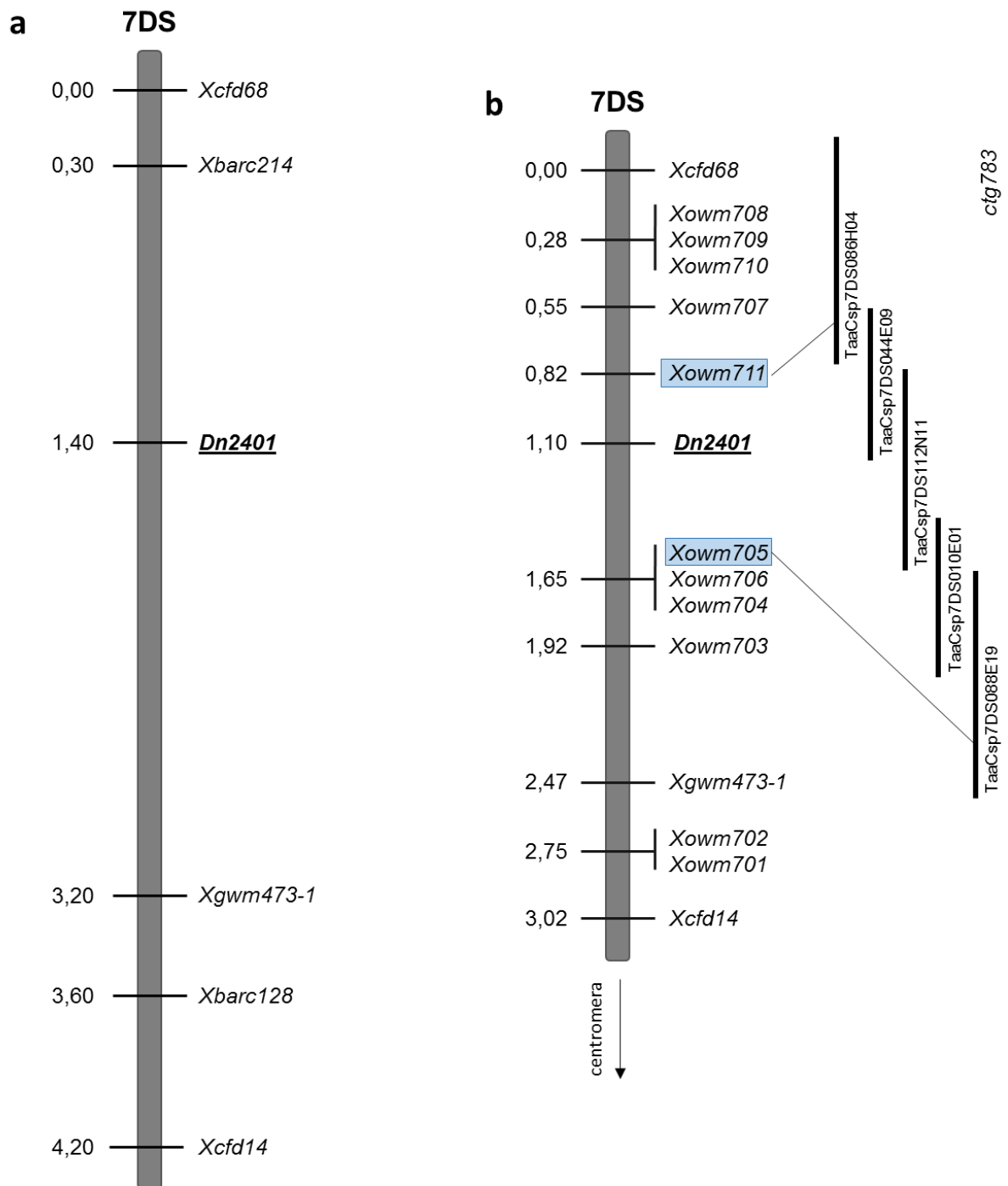
Gen	Zdroj rezistence (linie/odrůda)	Lokalizace v genomu	Původní výskyt (druh)	Reference
<i>Dn1</i>	PI 137739	7DS	pšenice	Du Toit (1987)
<i>Dn2</i>	PI 262660	7DS	pšenice	Du Toit (1987)
<i>dn3</i>	CO 03810	neznámá	<i>Aegilops tauschii</i>	Nkongolo <i>et al.</i> (1991)
<i>Dn4</i>	PI 372129	1DS	pšenice	Nkongolo <i>et al.</i> (1991)
<i>Dn5</i>	PI 294994	7DS	pšenice	Du Toit (1987)
<i>Dn6</i>	PI 243781 CI 6501	7DS	pšenice	Nkongolo <i>et al.</i> (1991)
<i>Dn7</i>	94M370	translokace 1RS.1BL	žito/pšenice	Marais <i>et al.</i> (1994)
<i>Dn8</i>	PI 294994	7DS	pšenice	Liu <i>et al.</i> (2001)
<i>Dn9</i>	PI 294994	1DL	pšenice	Liu <i>et al.</i> (2001)
<i>Dnx</i>	PI 220127	7DS	pšenice	Harvey <i>et al.</i> (1990)
<i>Dny</i>	PI 220350	neznámá	pšenice	Martin <i>et al.</i> (2001)
<i>Dn2401</i>	CI2401	7DS	pšenice	Voothuluru <i>et al.</i> (2006)
<i>Dn2414</i>	line 2414-11	translokace 1RS.1BL	žito/pšenice	Peng <i>et al.</i> (2007)
<i>Dn626580</i>	PI626580	7DS	pšenice	Valdez <i>et al.</i> (2012)

Populace mšic z celého světa vykazují značnou biotypovou variabilitu (Peng *et al.* 2009). Celkově byl potvrzen výskyt minimálně 8 biotypů mšice zhoubné (Puterka *et al.* 1992). Vzhledem k faktu, že popsané geny podmiňují rezistenci pouze k určitým biotypům mšice, sama přítomnost některého z výše popsaných genů nemusí zaručit rezistenci rostliny. Jako příklad mohou být uvedeny geny *Dn7*, *Dn2401* a *Dn626580*,

keré jako jediné ze všech 14 genů zajišťují rezistenci k vysoce virulentnímu biotypu 2. Ostatní geny nejsou schopny rezistenci vůči tomuto biotypu zajistit.

3.2.2.1 Gen *Dn2401*

Gen *Dn2401* byl identifikován v centrální oblasti krátkého ramene 7D (7DS) v linii CI2401 původně pocházející z Tádžikistánu. Tento dominantní gen podmiňuje rezistenci k mšici zhoubné biotypu 2 ve formě antibioly a tolerance (Voothuluru *et al.* 2006). Kromě genu *Dn2401* byl v linii CI2401 identifikován také gen *Dn4*, který však zajišťuje pouze rezistenci k biotypu 1. Fazel-Najafabadi *et al.* (2015) sestrojili za použití dostupných mikrosatelitových markerů první genetickou mapu oblasti genu *Dn2401* (Obr. 5a). V blízkosti genu byly zamapovány hraniční markery *Xbarc214* a *Xgwm473* vymezující interval o délce 2,9 cM. Staňková *et al.* (2015) navázali na tuto práci s cílem izolovat gen *Dn2401* metodou pozičního klonování. V rámci této studie byla zkonstruována vysoko-hustotní genetická mapa obsahující oproti původní mapě 11 nově odvozených markerů (Obr. 5b). Bylo tak dosaženo zkrácení intervalu mezi hraničními markery z původních 2,9 cM na 0,83 cM mezi *Xowm705* a *Xowm711*. Oblast mezi hraničními markery byla překlenuta pěti překrývajícími se BAC klony z fyzické mapy krátkého ramene chromozómu 7D (Obr. 5b). Tyto klony byly osekvenovány za účelem identifikace kandidátních genů. Délka intervalu mezi hraničními markery byla na základě sekvenování stanovena na ~310 kb (Staňková, osobní sdělení).



Obr. 5: Genetické mapy fyzická mapa oblasti genu *Dn2401*. (a) Genetická mapa dle Fazel-Najafabadi *et al.* (2015) tvořená mikrosatelitovými markery. (b) Genetická a fyzická mapa sestavená Staňkovou *et al.* (2015) - interval mezi hraničními markery je překlenut klony z fyzické mapy ramene 7DS. Vzdálenosti na genetické mapě jsou uvedeny v centimorganech (cM).

3.3 Poziční klonování

Poziční klonování je proces izolace genu, jehož sekvence není předem známá. Zároveň není znám ani výsledný produkt a jeho přesná metabolická funkce. Gen je izolován pouze na základě znalosti jeho pozice na genetické a fyzické mapě. Charakterizace genu a jeho následná izolace jsou nezbytnými kroky pro pochopení podstaty znaku na molekulární úrovni a určení jeho role v organismu (Krattinger *et al.* 2009). Gen izolovaný metodou pozičního může být následně vnesen do genomu jedince postrádajícího znak podmíněný tímto genem, a to buď pomocí klasického šlechtění, či metodami genového inženýrství. Takto je možno vytvořit například jedince odolného vůči patogennímu organismu či jedince se zvýšenou schopností adaptace k různým podmínkám životního prostředí.

3.3.1 Princip pozičního klonování

Poziční klonování slouží jak k izolaci genů velkého účinku (majorgenů), tak také pro geny kódující kvantitativní znaky (tzv. QTL, *quantitative trait loci*). Klonování QTL je však v porovnání klonováním majorgenů mnohem komplexnější proces zahrnující náročné genetické mapování, jehož nezbytnou součástí je mendelizace klonovaného QTL (Salvi *et Tuberosa*, 2005). Základní princip pozičního klonování bude pro větší jednoduchost blíže popsán na příkladu klonování genu velkého účinku (Obr. 6).

Genetické mapování

Základním předpokladem pro izolaci genu podmiňujícího určitý znak je nalezení jedinců s kontrastním fenotypem v daném znaku, kteří jsou pro daný znak homozygotní. Tito jedinci jsou použiti k odvození mapovací populace, která je nezbytným nástrojem pro určení pozice znaku na genetické mapě. Genetická mapa určuje relativní vzájemnou polohu polymorfních značek (markerů), a současně i fenotypového znaku, na základě frekvence rekombinace. Pro určení přibližné pozice znaku na chromozómu (hrubé mapování) je dostačující mapovací populace typu F₂ čítající 100 – 200 jedinců (Krattinger *et al.* 2009). Genetická mapa je konstruována na základě integrace fenotypových a genotypových dat. V první fázi je zapotřebí spolehlivě stanovit fenotypový projev studovaného znaku u všech

jedinců mapovací populace. Poté je mapovací populace genotypována pomocí širokého spektra genetických markerů, které rovnoměrně pokrývají všechny chromozómy. Jedná se o markery, které byly již dříve zamapovány v různých mapovacích populacích a jsou obvykle dostupné ve veřejných databázích (např. databáze GrainGenes pro druhy tribu *Triticeae* a rodu *Avena*; <http://wheat.pw.usda.gov/GG3/>). Klasický přístup, zahrnující genotypování populace markery pomocí PCR, je však velmi pracný a časově náročný. V dnešní době jsou proto pro tento účel často využívány genotypovací platformy na bázi čipů (*microarray*), které obsahují stovky až tisíce markerů různých typů (např. SNP, DArT, ISBP) a umožňují tak analyzovat genotyp jedinců mapovací populace pro velké množství markerů najednou, což značně urychluje fázi hrubého mapování (Gupta *et al.* 2013).

Přibližné určení pozice znaku na genetické mapě je následováno tzv. jemným mapováním, které zahrnuje konstrukci vysoko-hustotní genetické mapy. Zde je nutné odvodit dostatečné množství nových genetických markerů v těsné vazbě na studovaný gen, tj. ve vzdálenosti desetin až setin cM. Jemné mapování je prováděno v mapovací populaci čítající tisíce jedinců, která umožňuje dosáhnout dostatečného rozlišení genetické mapy (Krattinger *et al.* 2009, Schneider *et al.* 2005). Tímto je možné přesně určit pozici studovaného genu. V této fázi jsou pro genetické mapování a fenotypování vybráni pouze jedinci, u kterých došlo k rekombinaci mezi hraničními markery (v těsné vazbě na gen) a fenotypem (Krattinger *et al.* 2009).

Fyzické mapování

Dalším krokem v procesu pozičního klonování je sestavení fyzické mapy, které pokrývá oblast mezi markery v těsné vazbě na gen. Fyzická mapa je tvořena sestavou překrývajících se klonů z knihoven DNA dlouhých inzertů, které jsou uspořádány do kontigů. Stovky až tisíce kontigů pak pokrývají celý chromozóm či genom daného organismu.

První možností, jak překlenout oblast mezi markery, které vymezují oblast genu je provedení tzv. '*chromosome walkingu*', neboli procházení po chromozómu. V první fázi je knihovna DNA skrínována za pomoci hraničních markerů za účelem nalezení klonů, jenž nesou tyto markery. Konce klonů jsou sekvenovány a sekvence jsou použity pro vývoj nových jednolokusových markerů. Těmito markery je opět

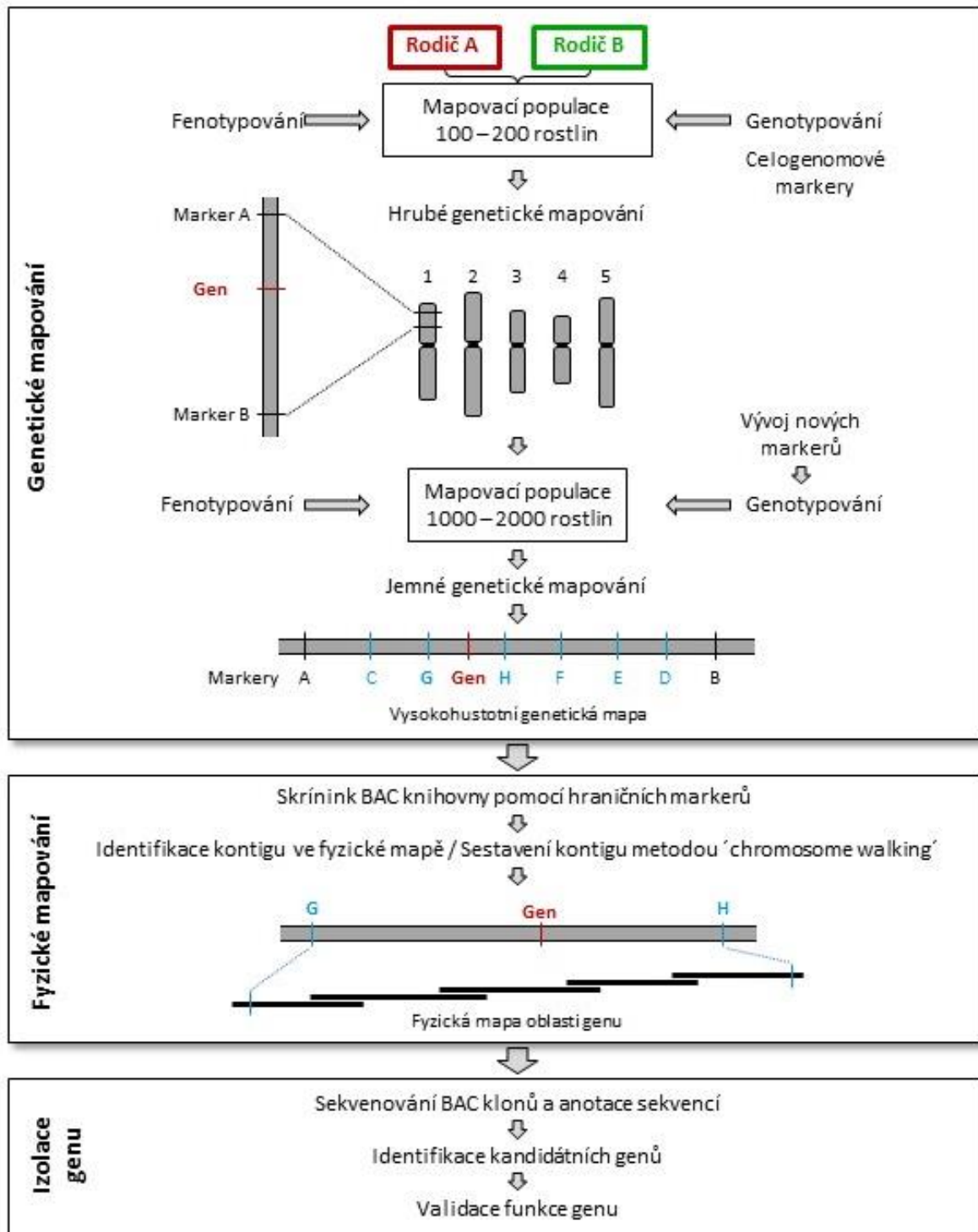
skrínována knihovna s cílem nalézt následující klon. Popsaný postup je opakován až do doby identifikace všech klonů, které překrývají oblast genu (Schneider *et al.* 2005).

Dostupnost fyzické mapy celého genomu či určitého chromozómu umožňuje přeskočit náročný krok procházení po chromozómu a dochází tak k výraznému zkrácení fáze fyzického mapování (Feuillet *et al.* 2012). Stejně jako v předchozím případě jsou hraniční markery použity pro skríníng knihovny DNA s cílem nalézt klony nesoucí tyto markery. Klony však umožňují nalézt přímo kontig ve fyzické mapě celého genomu či chromozómu. V ideálním případě jsou skríníngem nalezeny klony náležící do jednoho kontigu fyzické mapy, a tím je kontinuálně překlenuta cílová oblast genu. V opačném případě jsou z koncových klonů kontigů fyzické mapy odvozeny jednolokusové markery, kterými je opět skrínována knihovna DNA za účelem identifikace následujícího kontigu.

Izolace kandidátního genu

Poslední fází pozičního klonování je nalezení kandidátních genů a ověření jejich funkce s cílem nalézt gen odpovídající za studovaný znak. V této fázi jsou klony z knihovny DNA, které překlenují oblast mezi hraničními markery, osekvenovány a získané sekvence jsou anotovány. Anotace je založena na porovnání sekvencí klonů se sekvencemi dříve charakterizovaných genů či proteinů dostupných v databázích. Takto je možné identifikovat jeden či více kandidátních genů, které mohou teoreticky odpovídat za projev studovaného znaku.

Závěrečným krokem pozičního klonování je ověření funkce kandidátních genů. První možností je vnesení genu do genomu jedince, u kterého běžně nedochází k projevu daného znaku. Přenos může být proveden transformací rostliny pomocí *Agrobacteria* (Hensel *et al.* 2009) či bioloistickými metodami (Sanford 1988). Druhou možností je vyřazení genu z funkce prostřednictvím RNA interference (Waterhouse *et Helliwell* 2003) či prostřednictvím virem indukovaného umlčení genu (VIGS, *virus induced genome silencing*; Gupta *et al.* 2013b).



Obr. 6: Schéma pozičního klonování (převzato ze Staňková, 2015)

3.3.2 Další přístupy izolace genů

Je zapotřebí zmínit, že kromě pozičního klonování existují další metody umožňující izolovat gen podmiňující určitý konkrétní znak. Mezi ně patří například identifikace kandidátních genů na základě analýzy transkriptomu. V tomto případě dochází k porovnání úrovně exprese genů mezi standardním (*wild type*) jedincem a jedincem či skupinou jedinců, kteří byli vystaveni např. působení různých typů stresů, nebo podstoupili náhodnou mutagenezi. Nezbytnou součástí tohoto přístupu je přesné stanovení fenotypu zkoumaných jedinců. Na základě korelace mezi změnou fenotypu a změnou úrovně exprese u ovlivněných jedinců vzhledem k standardním jedincům jsou identifikovány kandidátní geny (Wang *et al.* 2015).

Rozvoj technik sekvenování nové generace (NGS, *next generation sequencing*) umožnil využít pro identifikaci kandidátních genů techniky NGS v kombinaci s metodami přímé mutační genetiky. Jedinec nesoucí studovaný znak je podroben náhodné mutagenezi s cílem vyřadit gen podmiňující tento znak z funkce. Následuje sekvenování genomu či vybraného chromozómu standardního jedince a jedince, u kterého došlo ke ztrátě funkce genu. Získané sekvence jsou navzájem porovnány s cílem nalézt kandidátní gen, tj. gen, ve kterém došlo k mutaci.

V neposlední řadě lze k identifikaci kandidátního genu využít znalosti již dříve popsaných genů pocházejících z jiných organismů a nalézt jejich homology ve studovaném organismu. Funkční varianta genu je poté identifikována metodami reverzní genetiky (Wang *et al.* 2015).

3.3.3 Poziční klonování u pšenice

Poziční klonování genů pšenice představuje časově náročný i pracný úkol jednak z důvodů složitosti genetické informace, ale také z důvodu nerovnoměrné úrovně rekombinace podél chromozómů (Saintenac *et al.* 2009) a nízké míry genetické diverzity mezi moderními odrůdami pšenice (Feuillet *et al.* 2008). Jedním z hlavních faktorů, který výrazně komplikuje poziční klonování, zejména pak vývoj nových markerů za účelem konstrukce vysoko-hustotní genetické mapy, je přítomnost tří velmi podobných (homeologních) subgenomů.

Poziční klonování bylo po dlouhou dobu komplikováno nedostatečnou znalostí sekvence genomu pšenice. Nedávno však došlo ke značnému rozvoji genetických a genomických nástrojů, které práci s genomem pšenice značně usnadňují.

Nepostradatelnou se v tomto případě stala průtoková cytometrie. Díky ní bylo možné vytvořit BAC knihovny DNA pro jednotlivá ramena či chromozómy (<http://olomouc.ueb.cas.cz/dna-libraries/cereals>). Na základě těchto knihoven jsou sestavovány fyzické mapy jednotlivých chromozómů, které pak slouží jako základ pro získání referenční sekvence metodou sekvenování klon po klonu. V roce 2014 uveřejnili Choulet *et al.* referenční sekvenci chromozómu 3B. Současně byly zveřejněny také sekvence jednotlivých ramen pšenice získané celochromozómovým neuspořádaným (*shotgun*) sekvenováním (IWGSC 2014).

Do dnešní doby bylo u pšenice metodou pozičního klonování izolováno celkem 16 genů (Tab. 2). Lepší znalost sekvenční informace a dostupnost výše zmíněných nástrojů však mohou značně přispět k urychlení procesu pozičního klonování a zvýšit tak počet úspěšně izolovaných genů (Wang *et al.* 2015).

Existuje řada přístupů v rámci jednotlivých kroků pozičního klonování u pšenice. Strategie závisí na lokalizaci zkoumaného genu a spektru dostupných genetických a genomických nástrojů. Pro každý z kroků pozičního klonování existuje řada postupů, které mohou být vzájemně nahrazovány, případně se doplňují. Několik příkladů přístupů uplatněných při pozičním klonování u pšenice a jejich případné výhody a nevýhody jsou popsány níže.

Konstrukce vysoko-hustotní genetické mapy

Konstrukce vysoko-hustotní genetické mapy je pro poziční klonování zásadní, a to jak pro případ pšenice, tak i jiných organismů. Ke stanovení přesné pozice genu na chromozómu je zapotřebí cíleně vyvinout mnoho nových genetických markerů v těsné blízkosti genu. V dřívějších dobách, kdy byla znalost sekvence genomu pšenice značně omezená, byly nové markery vyvíjeny zejména na základě sekvencí klonů cDNA a EST sekvencí (*expressed sequenced tags*). Nedostatek sekvenční informace byl dále kompenzován dostupností sekvencí genomů blízce příbuzných druhů. Tyto druhy vykazují vysoký stupeň kolinearity vzhledem k pšenici i mezi sebou navzájem.

Strategie vývoje markerů využívající znalosti EST sekvencí v kombinaci se sekvencemi příbuzných druhů byla uplatněna například při klonování genu *Bo1*, který podmiňuje toleranci pšenice k bóru (Schnurbusch *et al.* 2007) či genu *Pm6* zodpovědného za rezistenci k padlí travnímu (Qin *et al.* 2011). V těchto studiích byla za pomoci sekvencí markerů zamapovaných v blízkosti klonovaného genu identifikována ortologní oblast v genomu rýže, případně *Brachypodia*. Geny z této ortologní oblasti pak na základě homologie umožnily nalézt pšeničné EST sekvence náležící do oblasti klonovaného genu. EST sekvence byly použity k odvození makerů založených na PCR. Vzhledem k tomu, že primery byly navrhovány v oblastech exonů, které jsou mezi jednotlivými subgenomy konzervované (tedy značně podobné), docházelo často k amplifikaci produktů ze všech tří homeologních chromozómů, čímž se velmi snížila efektivita odvozování markerů.

Problém amplifikace homeologních sekvencí se pokusili vyřešit Terraciano *et al.* (2013), kteří se zabývali konstrukcí vysoko-hustotní genetické mapy v oblasti genu *Lr14*, který podmiňuje rezistenci ke rzi pšeničné. V této studii byla využita amplifikovaná DNA chromozómových ramen pšenice získaných tříděním průtokovou cytometrií. Za účelem vývoje markerů specifických pouze pro jedno z homeologních ramen byla provedena tzv. dvoukroková amplifikace. Primery navržené na základě EST sekvencí byly nejprve použity k amplifikaci DNA tříděných chromozómových ramen. PCR produkty byly poté sekvenovány a na základě rozdílů mezi sekvencemi homeologů byly odvozeny nové, subgenomově specifické primery.

Novým nástrojem, založeným na principu kolinearit mezi příbuznými druhy trav, který usnadňuje cílený vývoj markerů, je tzv. 'genome zipper'. Jedná se o virtuální uspořádání genů rýže, *Brachypodia* a čiroku seřazených na základě vzájemné kolinearit. Toto pořadí genů je integrováno s různými typy sekvencí pocházejícími z organismu, pro který byl daný 'genome zipper' sestaven. Zároveň je celá sestava genů ukotvena na kostru tvořenou geneticky zamapovanými markery ze zkoumaného organismu. První 'genome zipper' byl sestaven pro všechny chromozómy ječmene (Mayer *et al.* 2011). V současnosti jsou 'genome zippery' dostupné pro všechna chromozómová ramena pšenice (IWGSC 2014).

Zásadní průlom pro navrhování subgenomově specifických markerů znamenalo dokončení neuspořádaného (*shotgun*) sekvenování jednotlivých chromozómových ramen pšenice (IWGSC 2014). Znalost sekvence ze všech tří homeologních chromozómů umožňuje cílené navrhování subgenomově specifických markerů.

Možnost využití sekvencí specifických pro homeologní ramena 7AS, 7BS a 7DS, spolu s 'genome zipperem' specifickým pro chromozóm 7H ječmene, hrála klíčovou roli při cíleném vývoji markerů v těsné vazbě na gen *Dn2401* (Staňková *et al.* 2015). Tento gen podmiňuje rezistenci k mšici zhoubné a je lokalizován a krátkém rameni chromozómu 7D pšenice. Sekvence markerů dříve zamapovaných v blízkosti genu byly použity k identifikaci kolineární oblasti v 'genome zipperu'. Sekvence EST markerů z této oblasti pak posloužily k nalezení homologních sekvencí pocházejících z ramen 7AS, 7BS a 7DS. Ty pak byly použity k vývoji markerů specifických pro rameno 7DS. Výskyt genu na rameni 7DS umožnil zároveň využít k vývoji markerů genetickou mapu *Aegilops tauschii* (diploidního předka genomu D pšenice), která je integrována s geny rýže. Markery byly odvozovány obdobně jako při použití 'genome zipperu'. Zmíněný postup vývoje markerů využívající 'genome zipper', genetickou mapu *Ae. tauschii* a sekvence jednotlivých homeologních ramen se ukázal jako vysoce efektivní a specifický.

Fyzické mapování

Vytvoření vysoko-hustotní genetické mapy a nalezení markerů ve velmi těsné vazbě na klonovaný gen je následováno konstrukcí fyzické mapy oblasti genu. Jedny z prvních projektů zaměřených na klonování genů u pšenice využívaly strategie tzv. „kyvadlového“ (*shuttle*) mapování. V této době nebyly pro hexaploidní pšenici dostupné knihovny DNA ani fyzické mapy. Z toho důvodu bylo fyzické mapování prováděno za použití diploidních či tetraploidních předchůdců pšenice. Pro tyto předky pšenice byly konstruovány knihovny DNA, které poté sloužily pro sestavení kontigu tvořeného překrývajícími se klony, který překlenul oblast genu. Vzhledem k tomu, že pro předchůdce pšenice nebyla dostupná fyzická mapa, byl kontig sestaven metodou procházení po chromozómu (*chromosome walking*). Genetické mapování a vlastní izolace genů však probíhaly přímo v hexaploidní pšenici.

V dnešní době jsou dostupné knihovny DNA pro všechny chromozómy pšenice, fyzické mapy pěti ramen (Breen *et al.* 2013; Lucas *et al.* 2013; Raats *et al.* 2013; Philippe *et al.* 2013; Akpinar *et al.* 2015) a čtyř kompletních chromozómů (Barabaschi *et al.* 2015; Poursarebani *et al.* 2014; Paux *et al.* 2008; Kobayashi *et al.* 2015) již byly publikovány a fyzické mapy zbývajících chromozómů jsou před dokončením (<http://www.wheatgenome.org/Projects>). Konstrukce fyzické mapy je dnes tedy omezena pouze na skrínig knihovny DNA pomocí markerů v těsné vazbě na gen

s cílem nalézt klon obsahující tento marker a identifikovat kontig, případně více kontigů z fyzické mapy ramene či chromozómu pšenice, které překlenují oblast genu. Tímto postupem byla vytvořena fyzická mapa oblasti genu *Dn2401*. Skríníng knihovny DNA umožnil identifikaci jediného kontigu, který obsahoval současně oba hraniční markery a překlenul tak celou oblast genu (Staňková *et al.* 2015).

Tab. 2: Přehled genů izolovaných z genomu pšenice pozičním klonováním (přepřacováno dle Staňková *et al.* 2015)

Gen	Funkce	Chromozóm	Zdroj
<i>Lr1</i>	Geny rezistence vůči rzi pšeničné	5DL	Cloutier <i>et al.</i> 2007
<i>Lr10</i>		1AS	Feuillet <i>et al.</i> 2003
<i>Lr21</i>		1DS	Huang <i>et al.</i> 2003
<i>Lr34</i>		7DS	Krattinger <i>et al.</i> 2009
<i>Sr33</i>	Geny rezistence vůči rzi travní	1DS	Periyannan <i>et al.</i> 2013
<i>Sr35</i>		3AL	Saintenac <i>et al.</i> 2013
<i>Yr36</i>	Gen rezistence proti rzi plevové	6BS	Fu <i>et al.</i> 2009
<i>Pm3b</i>	Gen rezistence proti padlí travnímu	1AS	Yahianoui <i>et al.</i> 2004
<i>Tsn1</i>	Gen podílející se na rezistenci k braničňatce plevové a <i>Pyrenophora tritici</i>	5BL	Faris <i>et al.</i> 2010
<i>VRN1</i>	Geny zodpovědné za vernalizaci	5AL	Yan <i>et al.</i> 2003
<i>VRN2</i>		5AL	Yan <i>et al.</i> 2003
<i>VRN3</i>		7BS	Yan <i>et al.</i> 2003
<i>VRN4</i>		5DS	Kippes <i>et al.</i> 2015
<i>Q</i>	Gen podmiňující rozpadavost klasu	5AL	Faris <i>et al.</i> 2003
<i>Ph1</i>	Gen řídící párování homologních chromozómů	5BL	Griffiths <i>et al.</i> 2006
<i>Gpc-B1</i>	Transkripční faktor ovlivňující stárnutí rostliny a obsah proteinů, železa a zinku v zrnech	6BS	Uauy <i>et al.</i> 2006

4. Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Ke genetickému mapování byla použita mapovací populace F2 pšenice seté (*Triticum aestivum*), pocházející z křížení rezistentní linie CI2401 s citlivou odrůdou Glupro. Tato populace označená jako CI2401/Glupro-F2 vznikla spojením dvou mapovacích populací a čítala celkem 333 jedinců. První mapovací populace (CI2401/Glupro-F2-1) byla tvořena 184 jedinci. DNA jedinců této mapovací populace byla poskytnuta prof. Norou Lapitan (Colorado State University, Colorado, USA). Pro druhou mapovací populaci (CI2401/Glupro-F2-2) čítající 149 jedinců byla prof. Lapitan poskytnuta semena.

Při procesu odvozování nových markerů specifických pro oblast genu *Dn2401* byla použita amplifikovaná DNA ramen 7AS, 7BS a 7DS pšenice seté. Ramena byla tříděna pomocí průtokové cytometrie z odpovídajících double-ditelozomických linií odrůdy 'Chinese Spring' a amplifikována pomocí polymerázy Phi 29 (Šimková *et al.* 2008). Dále byla při odvozování markerů použita DNA rodičů mapovací populace F2 (CI2401, Glupro).

4.1.2 Přístrojové vybavení

- Biologický termostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)
- Centrifuga MICROMAX RF, CR 4i (Thermo Scientific, USA)
- Dokumentační systém pro analýzu elektroforetického gelu ChemiGenius Bioimaging Systém (Syngene, GB) s transluminátorem GVM20 (Syngene, Velká Británie)
- Elektroforetická aparatura C-DASG-400-50: Dual Adjustable Mega-Gel Kit (C. B. S. Scientific, USA)
- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort, Belgie)
- Mikrocentrifuga (Labnet)
- Mikropipety Nichipipet EX (NICHIRYO) (Japonsko)
- NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Termocyklér C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)

- Třepačka Vortex (Heidolph, Německo)

4.1.3 Chemikálie

- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva, Německo)
- Akrylamid : N, N'-metylenbisakrylamid 19:1, 40% roztok (Fluka Analytica, USA)
- Deionizovaná voda
- Ethidium bromid (Sigma Chemical, USA)
- Exonukleáza I (Fermentas, Kanada)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Fluka BioChemica, Sigma-Aldrich, USA)
- PCR primery (Eurofin Genomics, Rakousko)
- Taq DNA polymeráza (New England Biolabs, USA)
- Termosensitivní alkalická fosfatáza FastAP (Fermentas, Kanada)
- Velikostní marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Kanada)

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

Cresol Red (100 ml)

7,5 g sacharóza

50 mg Cresol Red

Doplnit do 100 ml H₂O

Nedenaturující 4% polyakrylamidový gel

4% akrylamid:bisakrylamid

0,073% (v/v) TEMED

0,066% (w/v) APS

0,5x TBE pufr

TBE pufr

5x

445 mM Tris báze

445 mM kyselina boritá

10 mM EDTA

pH 8

0.5x

45 mM Tris báze

45 mM kyselina boritá

1 mM EDTA

pH 8

4.1.5 Komerční kity

- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)
- NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, Německo)

4.2 Metodika

4.2.1 Pěstování mapovací populace

Celkem 149 semen představujících jednotlivé linie mapovací populace CI2404/Glupro-F2-2 bylo umístěno do Petriho misek na vodou navlhčenou buničitou vatu. Semena byla inkubována po dobu 5 dní při 5°C a následně byla přesunuta do termostatu, kde byla inkubována 1 den při 25°C. Naklíčená semena byla po jednom zasazena do rašelinových květináčů (tzv. *jiffů*) o rozměru 5 x 5 cm naplněných zahradnickým substrátem. Populace byla pěstována ve fytotronu po dobu tří týdnů za těchto podmínek: den 16 h/20°C, noc 8 h/ 16°C. Poté byly z jednotlivých rostlin odebrány listy, které byly použity pro izolaci DNA. Následně byla populace přesunuta na 6 týdnů do fytotronu s konstantní teplotou 6°C (10 h den, 14 h noc) za účelem vernalizace. Po uplynutí 6 týdnů byly rostliny vysazeny na pole, kde byla populace dopěstována. Z jednotlivých rostlin byla sklizena semena, která byla použita pro určení fenotypu.

4.2.2 Izolace DNA

Rostlinná DNA byla izolována pomocí kitu NucleoSpin® Plant II podle přiloženého originálního pracovního návodu. Pro izolaci bylo použito 80 – 100 mg čerstvých listů, které byly odebírány z 3 týdnů starých rostlin mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2. Odebraný materiál byl sušen po dobu přibližně 48 hodin při teplotě 37°C. Vysušené listy byly homogenizovány za pomoci skleněných kuliček

o průměru 0,5 cm za použití homogenizačního oscilačního mlýna. Dále bylo postupováno dle instrukcí v pracovním návodu. Koncentrace DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Jednotlivé vzorky DNA byly naředěny na konečnou koncentraci 20 ng/μl. Naředěná DNA byla použita pro následující analýzy.

4.2.3 Hodnocení fenotypu

Hodnocení fenotypu bylo prováděno v insektáriu Colorado State University (USA) pod záštitou profesora Franka Peirse. Fenotyp byl zjištěn u všech 333 jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2. Za účelem určení všech tří fenotypových štěpných tříd u jedinců generace F2 (dominantní homozygot – rezistentní; recesivní homozygot – citlivý; heterozygot) bylo fenotypování prováděno na potomstvu jednotlivých jedinců, tj. v mapovací populaci F_{2:3}. Od každého jedince populace F2 bylo fenotypováno 12 – 15 potomků. Na základě zjištěných fenotypů potomstva byl zpětně určen fenotyp každého jedince populace F2.

Na sedmidenní rostliny populace F_{2:3} byli přeneseni jedinci mšice zhoubné biotypu 2. Reakce rostliny byla hodnocena po 7 a 10 dnech od napadení. Nezávisle na sobě byly hodnoceny dva znaky – chloróza (žluté, bílé či fialové pruhování listů) a svinování listů. Chloróza byla hodnocena na stupnici od 1 do 9 (1 = zdravá rostlina s malým hypersenzitivním poškozením, 9 = uhynulá rostlina či rostlina s nevratným poškozením). Za rezistentní byly považovány rostliny s úrovní chlorózy v rozmezí 1 - 4, citlivé pak 5 – 9. Svinutí listů bylo hodnoceno na stupnici od 1 do 4 (1 = zcela plochý list, 4 = těsně svinutý list). Rezistentní rostliny byly hodnoceny stupni 1 a 2, citlivé 3 a 4 (Collins *et al.* 2005). Jako kontrolní rostliny byli použiti rodiče mapovací populace - CI2401 (rezistentní) a Glupro (citlivý).

4.2.4 Genetické mapování markerů *Xowm705* a *Xowm711*

V blízkosti genu *Dn2401* byly v předchozí studii prováděné Staňkovou *et al.* (2015) zamapovány SNP markery *Xowm705* a *Xowm711*. Za účelem upřesnění vzdáleností mezi markery a genem *Dn2401* bylo provedeno genotypování 149 jedinců nově vytvořené mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2. Získaná data byla sloučena s daty získanými genotypováním 184 jedinců mapovací populace

CI2401/Glupro-F2-1 (Staňková *et al.* 2015) a dále s fenotypovými daty všech 333 jedinců obou populací. Sloučená data odpovídající mapovací populaci CI2401/Glupro-F2 byla použita pro sestrojení genetické mapy oblasti genu *Dn2401*.

4.2.4.1 Analyzované markery

Mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2 byla genotypována markery *Xowm705* a *Xowm711*, jejichž charakteristika je uvedena v tabulce Tab. 3. Stanovení genotypu pro marker *Xowm705* bylo provedeno sekvenováním produktů PCR charakteristických pro jednotlivé jedince mapovací populace. Primery specifické pro marker *Xowm711* poskytovaly jeden specifický PCR produkt vykazující mezi rodiči mapovací populace délkový polymorfismus o velikosti 43 bp. Genotypování bylo proto možno provést po separaci produktů PCR pomocí nedenaturující polyakrylamidové (PAA) gelové elektroforézy.

Tab. 3: Charakteristika markerů *Xowm705* a *Xowm711*

Marker		Sekvence primeru	Polymorfismus	Délka produktu PCR (bp) (CI2401/Glupro)	T _a * (°C)
<i>Xowm705</i>	F	TGGCAGGAAATGGAAGTTTT	SNP (A/T)	394	65
	R	GAATGTTCAGAATTTCTCCGTA			
<i>Xowm711</i>	F	GCCGTGGTATGTGATTCTGTT	indel (43 bp)	584/541	67
	R	ACAACGTTTCATGGTCTGTGG			

* T_a = teplota nasedání primeru

4.2.4.2 Amplifikace lokusů analyzovaných markerů metodou PCR

Za použití primerů specifických pro markery *Xowm705* a *Xowm711* byla pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) provedena amplifikace DNA jednotlivých jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2. PCR byly prováděna v celkovém objemu 20 µl. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce Tab. 4. PCR probíhala v termocykléru za podmínek uvedených v tabulce Tab. 5.

Tab. 4: Složení reakční směsi pro PCR

Reagencie	Koncentrace v reakci	Množství na 1 reakci
10x PCR pufr (včetně MgCl ₂)	1x	2 µl
dNTPs (10 mM)	200 µM	0,4 µl
Primer F (10 µM)	1 µM	2 µl
Primer R (10 µM)	1 µM	2 µl
Taq polymeráza (2U/µl)	0,02 U/µl	0,2 µl
Cresol Red (5x)	1x	4 µl
DNA (20 ng/µl)	2 ng/µl	2 µl
Deionizovaná voda		7,4 µl
Celkem		20 µl

Tab. 5: Teplotní průběh PCR

		Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace		94°C	5 min	1
Amplifikace	Denaturace	94°C	30 s	35
	Nasedání primeru	65°C/67°C*	30 s	
	Elongace	72°C	1 min	
Závěrečná elongace		72°C	10 min	1

* Teplota nasedání primerů (T_a) v závislosti na použitém primeru (viz. Tab. 3)

4.2.4.3 Elektroforetická separace produktů PCR

Elektroforetická separace produktů PCR byla provedena v nedenaturujícím 4% polyakrylamidovém gelu o tloušťce 1 mm s použitím vertikální aparatury C-DASG-400-50 (C.B.S. Scientific, USA). Před sestavením aparatury bylo jedno ze skel silanizováno 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu s 3 µl/ml 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu, čímž bylo dosaženo přilnutí PAA gelu na silanizované sklo.

Smícháním složek uvedených v kapitole 4.1.4 byl připraven 4% nedenaturující polyakrylamidový gel. Směs byla nalita mezi skla aparatury, mezi která byl následně vsazen hřeben pro vytvoření jamek v gelu. Polymerizace gelu probíhala po dobu 45 min. Po dokončení polymerizace byla skla s gelem vsazena do aparatury, katodový a anodový prostor aparatury byl naplněn 800 ml 0,5x koncentrovaného roztoku pufru TBE a z gelu byl vyjmut hřeben. Do pufru v anodové části bylo přidáno

10 μl 10% roztoku ethidium bromidu. Následně byl spuštěn tzv. 'prerun' probíhající přibližně 1 hodinu při napětí 300 V, během kterého došlo k nasycení gelu ethidium bromidem. Po nasycení gelu ethidium bromidem byly do jednotlivých jamek v gelu nanášeny vzorky DNA (produkty PCR) v objemu 5 μl . Do první jamky bylo nanášeno 5 μl velikostního markeru 100 bp Plus DNA Ladder. Separace produktů PCR probíhala při napětí 350 V po dobu 30 min v případě markeru *Xowm705* a po dobu 60 min v případě markeru *Xowm711*. Po dokončení separace byla skla s gelem vyjmuta z aparatury, produkty PCR byly vizualizovány pomocí UV transluminátoru a gel byl vyfotografován.

4.2.4.4 Sekvenování produktů PCR

Za účelem stanovení genotypu jedinců mapovací populace pro marker *Xowm705* bylo provedeno sekvenování produktů PCR vzniklých amplifikací DNA pomocí primerů specifických pro tento marker. Před vlastním sekvenováním byly produkty PCR enzymaticky přečištěny směsí 1 U exonukleázy I a 0,5 U termosenzitivní alkalické fosfatázy (FastAP) za účelem odstranění nespotřebovaných nukleotidů a primerů. Reakce probíhala v objemu 7 μl v prostředí 1x PCR pufru. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce Tab. 6. Reakční směs byla inkubována v termocykléru při teplotě 37°C po dobu 30 min. Následně byly enzymy v reakční směsi deaktivovány denaturací při teplotě 95° po dobu 5 min.

Tab. 6: Složení reakční směsi

Reagencie	Objem
exonukleáza I (20 U/ μl)	0,05 μl
alkalická fosfatáza (1 U/ μl)	0,5 μl
PCR pufr (1x)	2,45 μl
PCR produkt	4 μl
Celkový objem	7 μl

Sekvenování bylo prováděno za použití sekvenačního kitu BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Reakce probíhala v objemu 10 μl . Reakční směs obsahovala sekvenační směs BigDye, pufr BDX64, 5x sekvenační pufr, specifický primer, deionizovanou vodu a přečištěný produkt PCR (Tab. 7). Reakce probíhala v termocykléru za podmínek uvedených v tabulce Tab. 8. Produkty sekvenační

reakce byly přečištěny pomocí magnetických kuliček Agencourt® CleanSeq® (Beckman Coulter, USA) na robotické stanici Biomek® NX^P (Beckman Coulter). Analýza sekvenačních produktů byla prováděna pomocí kapilární elektroforézy na 96-kapilárovém sekvenátoru 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, USA).

Tab. 7: Složení sekvenační reakční směsi

Reagencie	Objem
BigDye	0,125 µl
Pufr BDx64	0,875 µl
Primer	1 µl
5x sekvenační pufr	1,5 µl
Přečištěný produkt PCR	3 µl
Deionizovaná H ₂ O	3,5 µl
Celkový objem	10 µl

Tab. 8: Podmínky sekvenační reakce

Počet cyklů	Teplota	Čas
1x	98°C	5 min
60x	96°C	10 s
	50°C	5 s
	60°C	4 min

4.2.4.5 Stanovení genotypu a konstrukce genetické mapy

Genotypy jednotlivých jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2 pro marker *Xowm711* byly stanoveny na základě určení velikosti produktů PCR po separaci těchto produktů pomocí nedenaturující PAA elektroforézy. Velikost produktů byla určena porovnáním s velikostním markerem. Genotypy jednotlivých jedinců pro marker *Xowm705* byly určeny sekvenováním produktů PCR specifických pro tento marker na základě stanovení varianty jednonukleotidového polymorfismu (SNP). Sekvence byly analyzovány v programu Geneious v5.4.4 (Drummond *et al.* 2010). Genotypová data získaná pro oba analyzované markery v mapovací populaci CI2401/Glupro-F2-2 byla sloučena s daty získanými pro tyto markery v mapovací populaci CI2401/Glupro-F2-1 v práci prováděné Staňkovou *et al.* (2015). Genotypová data byla spolu s fenotypovými daty použita ke konstrukci genetické mapy. Mapa byla konstruována v programu JoinMap 4.0 (Van Ooijen *et Voorrips* 2001) za použití funkce Kosambi (Kosambi, 1943).

4.2.5 Odvozování genetických markerů pro oblast genu *Dn2401*

Princip odvozování nových markerů pro oblast genu *Dn2401* vycházel z metodiky publikované v práci Staňkové *et al.* (2015). Tento postup (viz. Schéma 1) zahrnoval navržení primerů specifických pro chromozómové rameno 7DS pšenice seté, testování jejich specifity pomocí PCR s použitím amplifikované DNA ramen 7AS, 7BS a 7DS získaných tříděním metodou průtokové cytometrie a případnou optimalizaci podmínek PCR. Primery, u kterých byla potvrzena specifita pro rameno 7DS byly použity k amplifikaci DNA rodičů mapovací populace (CI2401, Glupro). Vzniklé produkty PCR byly sekvenovány za účelem nalezení polymorfismů mezi rodiči mapovací populace. Případné polymorfismy byly po stanovení jejich varianty zamapovány v mapovací populaci.

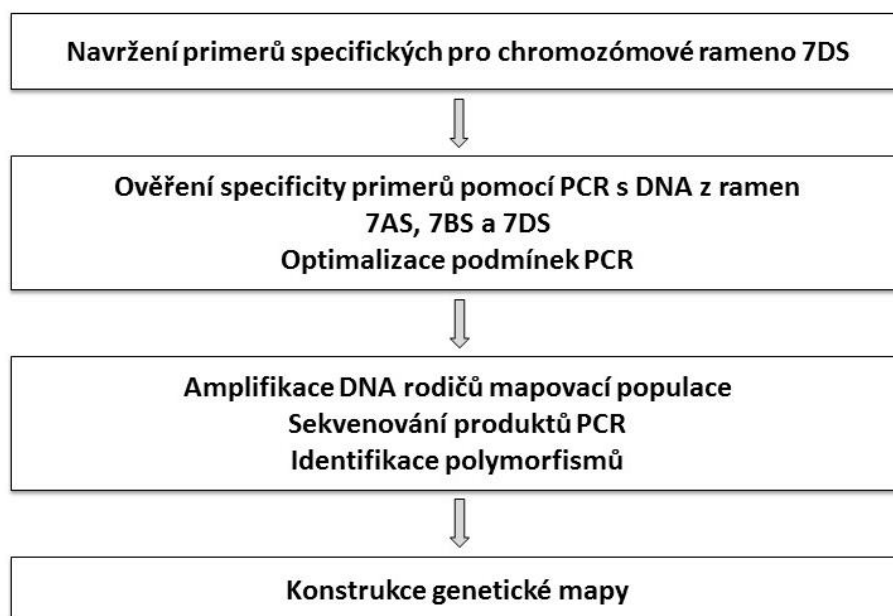
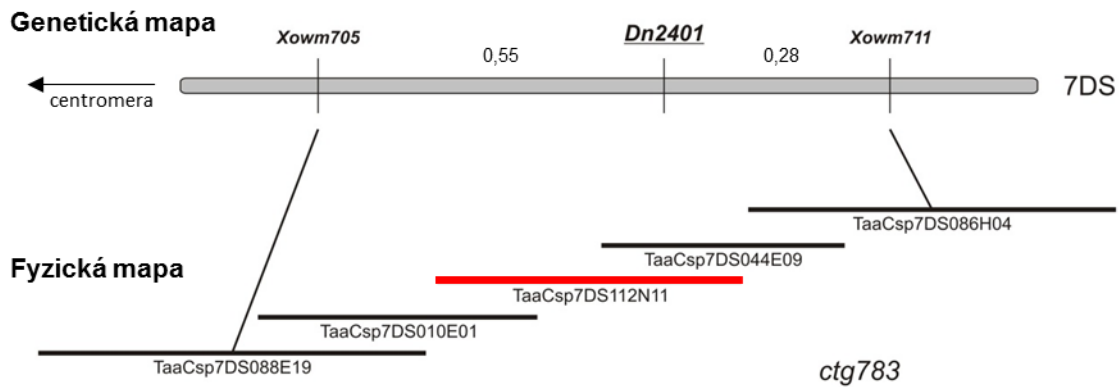


Schéma 1: Princip odvozování nových markerů.

4.2.5.1 Navrhování primerů specifických pro chromozómové rameno 7DS

Primery byly navrhovány specificky pro oblast mezi markery *Xowm705* a *Xowm711*, které ohraničují oblast genu *Dn2401*. Jako templát pro navrhování primerů byla použita sekvence BAC klonu TaaCsp112N11 (Obr. 7). Tento klon je součástí kontigu *ctg783* pocházejícího z fyzické mapy ramene 7DS, který překlenuje oblast mezi markery *Xowm705* a *Xowm711*. Sekvence BAC klonu byla za pomoci programu Blast porovnána se sekvencemi ramen 7AS a 7BS

získanými celochromozómovým neuspořádaným (*shotgun*) sekvenováním. Primery byly poté navrhovány v oblasti, pro kterou byly nalezeny homeologní sekvence pocházející z ramen 7AS a 7BS.



Obr. 7: Genetická a fyzická mapa oblasti genu *Dn2401*. BAC klon TaaCsp112N11, jehož sekvence byla použita pro navrhování primerů specifických pro rameno 7DS je vyznačen červeně. Vzdálenosti na genetické mapě jsou uvedeny v centimorganech (cM).

Primery byly přednostně navrhovány tak, aby každý z páru primerů obsahoval alespoň jeden jednonukleotidový polymorfismus odlišující sekvenci ramene 7DS od sekvencí obou homeologních ramen (7AS, 7BS). K navrhování primerů byl použit program Primer3 v.0.4.0 (Rozen *et* Skaletsky 2000). Přehled primerů je uveden v tabulce Tab. 9.

Tab. 9: Přehled primerů navržených specificky pro oblast genu *Dn2401*

Označení primeru	Sekvence primeru		Teoreticky stanovená T_a (°C)	Odhadovaná délka produktu PCR (bp)*
260	F	TCCGTGATCTTTTGTATTACGA	57	570
	R	TGGAGCAGTTGGTAGTCTCG		
261	F	CGAGACTACCAACTGCTCCA	57	410
	R	AGGTGAACTGAAATTACGCTAGT		
262	F	ACAAAGTTGAATAAAAGCACGCC	57	694
	R	CGATTTCTTCTGATCAGTTTGCT		
263	F	CTGTGCCGCTGTAGAAAGAA	56	532
	R	GGCTGATGGTAACTTCTATAG		
264	F	TGTTCCACTCGTGCTGGTAC	58	476
	R	TGGGTGTCAGGATAGTCACG		
265	F	GCATGTCATGGGTCCAGTG	57	377
	R	CATCATCATCATTATCACCATCATA		
266	F	CGTGCATGATCCTCGACTATGAT	58	467
	R	TTGCCATTTTTAACAAATGCTCGT		
267	F	ATCGCATAGTTCGTGATGATTGT	58	743
	R	TACCCGGCCCAAATCCAAT		
268	F	ATTCTGCTGACCACTGATTGAC	57	608
	R	TGTCCTTTATGTATGACGGCG		
269	F	TTGGGTGGTCGTTTTAGAA	56	372
	R	TCGATTGCCACTCTATTGCT		
270	F	AGCAATAGAGTGGCAATCGA	56	537
	R	TTTTAGCTTCAGTCACGGTGA		
271	F	TTTCTCACTTGCACAACTTGAAT	55	553
	R	TCCAATAAAAGGATATTTTCGG		
272	F	CATGGCAGTACGACGAACAC	57	516
	R	CAATATTTCAATCAAGAAGGTAT		
273	F	GTCTCAACATGACGTACCATACC	57	666
	R	CTCTTGTTGCTTCGATTCCG		
276	F	AAGTTTTGTACAAGTGTAAC	57	497
	R	CAAATGATGCTTACCGTTTCCG		
277	F	TGCAGGATAGAACAACGGAAAC	57	665
	R	CATGATTTCTTTGCTCGCGT		
278	F	CTGTATCCTCCACCTCCTCT	58	699
	R	ACACGTGGACAGAATGCGTA		
279	F	TCTAAACTGGGGAATGATTGGT	55	701
	R	TGGAAGACATCTATGCTGGC		
280	F	TCTATTACTGTGTGAGCGCCA	57	720
	R	TGGTTCCCAATGGCTAACA		
281	F	AAAATCCATGCCAAGACGG	57	618
	R	CTGTATTAGCAGTTCCCACGT		
282	F	AGAATGACGTGGGAACTGCT	57	610
	R	TGTCGTCAGGTTTCAAGAGTG		
283	F	ACCAAAGTAGAACTCTCAGACAA	58	543
	R	TCTGTGCCAAGGTGTGACAA		
284	F	GGTGGGAAGTTTAGTATCATGCT	56	588
	R	CGGACTCGCTTGGGTATC		
285	F	CCTTGTACAATGGAAGGTGCT	57	544
	R	GACCGTGGATGAATTTCACTGT		
286	F	ACACCGTGGATCCGTATTTTG	58	697
	R	GTCTGGACGCCTGCAAAC		
287	F	TCGGTCACTGGTCCTTTGG	60	545
	R	CATCCATGCCAGTGAGCGC		

* Délka byla odhadována na základě sekvence BAC klonu TaaCsp112N11

4.2.5.2 Amplifikace 7DS-specifických lokusů pomocí PCR

V prvním kroku byla pomocí PCR ověřena specifická navržených primerů. Templátem pro PCR byla amplifikovaná DNA chromozómových ramen 7AS, 7BS a 7DS. V případech, kdy došlo při použití teoreticky stanovené T_a (viz. Tab. 9) udávané výrobcem primeru k amplifikaci nesespecifických produktů PCR (produkty z homeologních ramen 7AS a 7BS, případně více produktů z ramene 7DS), bylo nutné teplotu nasedání primerů upravit. Optimalizace T_a byla provedena pomocí gradientové PCR. T_a byla nastavena v rozmezí 58 – 70°C, v odstupech 2°C. Primery, které po optimalizaci T_a poskytovaly pouze jeden produkt specifický pro rameno 7DS byly použity k amplifikaci DNA rodičů mapovací populace (CI2401 a Glupro).

PCR prováděná s použitím amplifikované DNA chromozómových ramen probíhala v objemu 10 μ l, v případě amplifikace DNA rodičů mapovací populace byl objem reakce zvýšen na 20 μ l s ohledem na následovné sekvenování produktů PCR. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce Tab. 10. Reakce probíhala v termocyklérů za podmínek uvedených v tabulce Tab. 11.

Tab. 10: Složení reakční směsi pro PCR

Reagencie	Koncentrace v reakci	Amplifikace DNA	Amplifikace DNA
		7AS, 7BS a 7DS	CI2401 a Glupro
		Objem v 1 reakci	Objem v 1 reakci
10x PCR pufr (včetně MgCl ₂)	1x	1 μ l	2 μ l
dNTPs (10 mM)	200 μ M	0,2 μ l	0,4 μ l
Primer F (10 μ M)	1 μ M	1 μ l	2 μ l
Primer R (10 μ M)	1 μ M	1 μ l	2 μ l
Taq polymeráza (2U/ μ l)	0,02 U/ μ l	0,1 μ l	0,2 μ l
Cresol Red (5x)	1x	2 μ l	4 μ l
DNA (10 ng/ μ l; 20 ng/ μ l)*	1 ng/ μ l; 2 ng/ μ l	1 μ l	2 μ l
Deionizovaná voda		3,7 μ l	7,4 μ l
celkem		10 μ l	20 μ l

* koncentrace 10 ng/ μ l odpovídá koncentraci amplifikované DNA chromozómových ramen 7AS, 7BS a 7DS; DNA rodičů mapovací populace byla naředěna na koncentraci 20 ng/ μ l

Tab. 11: Teplotní průběh PCR

		Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace		94°C	5 min	1
Amplifikace	Denaturace	94°C	30 s	35
	Nasedání primeru	58 - 70°C	30 s	
	Elongace	72°C	1 min	
Závěrečná elongace		72°C	10 min	1

Produkty PCR byly separovány v nedenaturujícím 4% PAA a následně vizualizovány stejným způsobem jako je uvedeno v kapitole 4.2.4.3. Separace probíhala po dobu 45 min při napětí 350 V.

4.2.5.3 Identifikace polymorfismů mezi rodiči mapovací populace

Polymorfismy mezi rodiči mapovací populace byly identifikovány prostřednictvím sekvenování PCR produktů vzniklých amplifikací rodičovské DNA. Sekvenovány byly pouze 7DS-specifické produkty vzniklé amplifikací jednoho lokusu. Produkty PCR byly přečištěny a následně sekvenovány stejně, jako je uvedeno v kapitole 4.2.4.4. Sekvence specifické pro rodiče mapovací populace byly vzájemně porovnány pomocí programu Geneious v5.4.4 (Drummond *et al.* 2010) za účelem nalezení polymorfismů. Pozice identifikovaných SNP vůči genům, případně jejich výskyt v exonech či introchech, byly určeny na základě porovnání s výsledky anotace BAC klonu TaaCsp112N11, která byla provedena pomocí programu TriAnnot v4.3 v rámci anotace sekvencí všech BAC klonů z MTP (*minimum tillig path*) ramene 7DS (Tulpová, nepublikováno).

4.2.5.4 Mapování polymorfismů v mapovací populaci

Mapování identifikovaných polymorfismů (markerů) bylo provedeno na 333 jedincích mapovací populace CI2401/Glupro-F2 (vzniklé sloučením populací CI2401/Glupro-F2-1 a CI2401/Glupro-F2-2). Identifikované polymorfismy byly mapovány prostřednictvím sekvenování polymorfních produktů PCR vzniklých amplifikací DNA jednotlivých jedinců mapovací populace. Amplifikace, přečištění PCR produktů a sekvenování probíhalo dle stejného postupu a při stejných podmínkách jako v případě identifikace polymorfismů mezi rodiči mapovací populace.

4.2.5.5 Stanovení genotypu a konstrukce genetické mapy

Sekvence produktů PCR jednotlivých jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2 byly v programu Geneious v5.4.4 (Drummond *et al.* 2010) porovnány se sekvencemi rodičů mapovací populace a na základě varianty polymorfismu byl stanoven genotyp. Genotypová data pro nově odvozené markery byla spolu s fenotypovými daty použita ke konstrukci genetické mapy. Mapa byla konstruována v programu JoinMap 4.0 (Van Ooijen *et Voorrips* 2001) za použití funkce Kosambi (Kosambi, 1943).

5. Výsledky

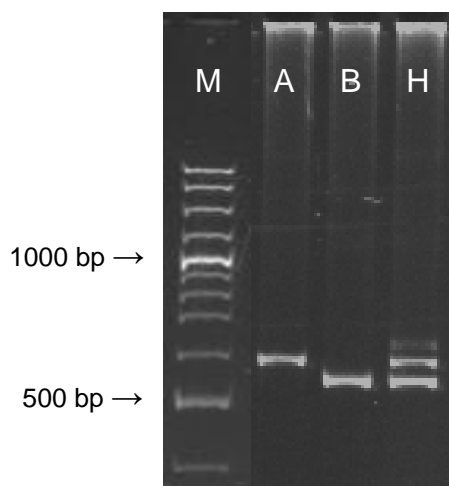
5.1 Genetické mapování markerů *Xowm705* a *Xowm711*

Původní mapovací populace použitá ve studii Staňkové *et al.* (2015) čítající 184 jedinců (zde označována jako CI2401/Glupro-F2-1) byla rozšířena o dalších 149 jedinců (mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2), ze kterých byla izolována DNA. Celá mapovací populace CI2401/Glupro-F2 tedy čítá celkem 333 jedinců.

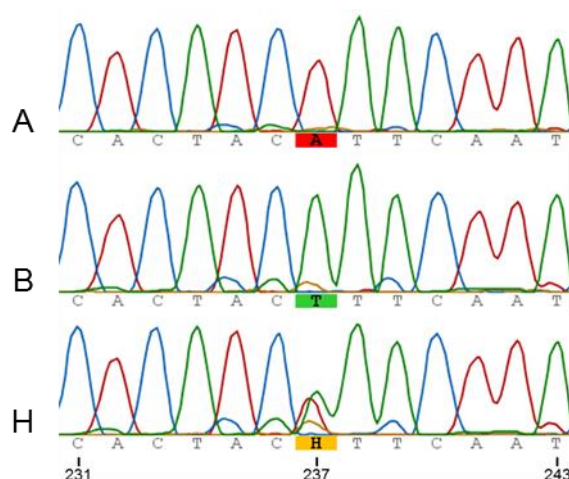
V práci Staňkové *et al.* (2015) byly v těsné blízkosti genu zamapovány markery *Xowm705* a *Xowm711*. Tyto markery byly v rámci předkládané diplomové práce genotypovány v mapovací populaci CI2401/Glupro-F2-2 a následně zamapovány ve sloučené populaci CI2401/Glupro-F2 za účelem zpřesnění vzdáleností mezi zmíněnými markery a genem *Dn2401*.

5.1.1 Genotypování mapovací populace

V rámci genotypizace byla provedena PCR s primery specifickými pro markery *Xowm705* a *Xowm711*. Marker *Xowm711* je charakterizován délkovým polymorfismem o velikosti 43 bp. Tento polymorfismus tedy bylo možné detekovat a vyhodnotit za pomoci nedenaturující PAA elektroforézy (Obr. 8), jejíž rozlišení je 2 - 3 bp. V případě markeru *Xowm705* se jedná o jednonukleotidový polymorfismus (A/T; Obr. 9). Produkty PCR poskytnuté s použitím primerů specifických pro marker *Xowm705* byly sekvenovány a následně byla identifikována varianta SNP pro jednotlivé jedince mapovací populace. Genotyp bylo možné určit v případě obou markerů pro všech 149 jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2. Kompletní přehled genotypů jedinců této mapovací populace pro markery *Xowm705* a *Xowm711* je uveden v příloze (Příloha 1) v rámci tabulky shrnující genotypová a fenotypová data celé mapovací populace CI2401/Glupro-F2.



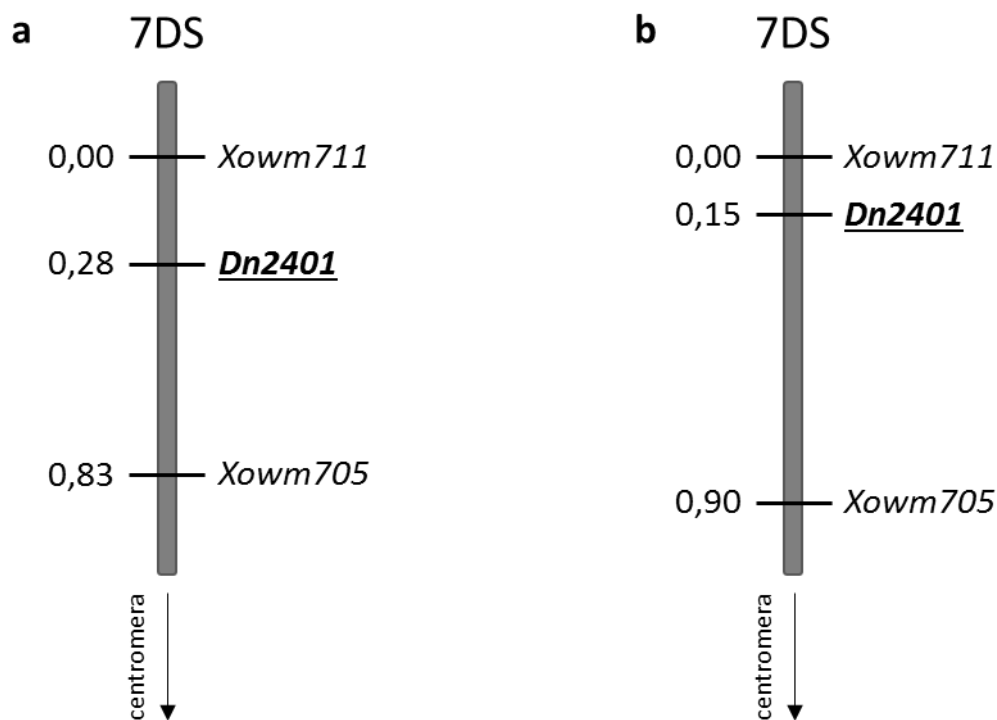
Obr. 8: Elektroforetogram markeru *Xowm711*. Produkty PCR byly separovány v 4% PAA gelu. Písmena A a B označují rodiče mapovací populace (A - CI2401, B – Glupro), H – heterozygot, M – velikostní marker 100 bp ladder.



Obr. 9: Chromatogram markeru *Xowm705*. Chromatogram zobrazuje variantu SNP charakteristickou pro rodiče mapovací populace (A – CI2401, B – Glupro). Písmenem H je označen chromatogram heterozygotního jedince.

5.1.2 Konstrukce genetické mapy

Pro konstrukci genetické mapy byla použita data získaná genotypováním mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2 spolu s daty získanými genotováním 184 jedinců mapovací populace CI2401/Gupro-F2-1 v rámci předchozí studie (Staňková *et al.* 2015). Genetická mapa byla konstruována na základě genotypových a fenotypových dat 333 jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2. Rozšíření mapovací populace umožnilo identifikaci tří nových jedinců nesoucích rekombinaci mezi markery *Xowm705* a *Xowm711*. Tímto byla vzdálenost mezi hraničními markery byly zpřesněna z 0,83 cM na 0,90 cM. Zároveň byla upřesněna pozice genu *Dn2401*, který se nyní nachází ve vzdálenosti 0,75 cM od markeru *Xowm705* a 0,15 cM od markeru *Xowm711* (Obr. 10).



Obr. 10: Genetická mapa oblasti genu *Dn2401*. (a) Mapa vytvořená ve studii Staňkové et al. (2015). (b) Mapa vytvořená na základě mapování hraničních markerů v populaci s vyšším rozlišením. Vzdálenosti na genetické mapě jsou uvedeny v centimorganech (cM).

5.2 Odvozování genetických markerů v oblasti genu *Dn2401*

Oblast genu *Dn2401* je vymezena hraničními markery *Xowm705* a *Xowm711*. V rámci této práce byla upřesněna vzdálenost mezi těmito markery na 0,90 cM (viz. Obr. 10). V rámci této práce byly odvozovány nové genetické markery za účelem zúžení intervalu mezi hraničními markery a zpřesnění lokalizace genu *Dn2401* v tomto intervalu.

5.2.1 Navrhování primerů specifických pro chromozómové rameno 7DS

K navrhování primerů byla využita sekvence BAC klonu TaaCsp112N11 pocházejícího z kontigu *ctg783*, který překrnuje oblast genu *Dn2401*. Porovnáním sekvence tohoto BAC klonu se sekvencemi ramen 7AS a 7BS byly v BAC klonu TaaCsp112N11 nalezeny tři oblasti, pro které byla dostupná sekvenční informace také z obou homeologních ramen (7AS, 7BS). Tyto tři oblasti vhodné pro navrhování 7DS-specifických primerů se nacházejí v intervalu 40 830 – 64 496 bp (Obr. 11).



Obr. 11: BAC klon TaaCsp112N11 s vymezenou oblastí v rozmezí 40 830 – 64 496 bp (oranžový box), která byla využita k navrhování 7DS-specifických primerů.

Snahou bylo navrhnout primery tak, aby alespoň jeden z páru obsahoval minimálně jeden jednonukleotidový polymorfismus mezi sekvencí 7DS a sekvencemi ramen 7AS a 7BS (Obr. 12). Celkem bylo navrženo 26 párů primerů (Tab. 12).



Obr. 12: Sekvence primeru 273 v kontextu s odpovídajícími sekvencemi homeologních ramen 7AS a 7BS. Primery byly navrženy na základě polymorfismů mezi homeologními subgenomy (zvýrazněny barevně).

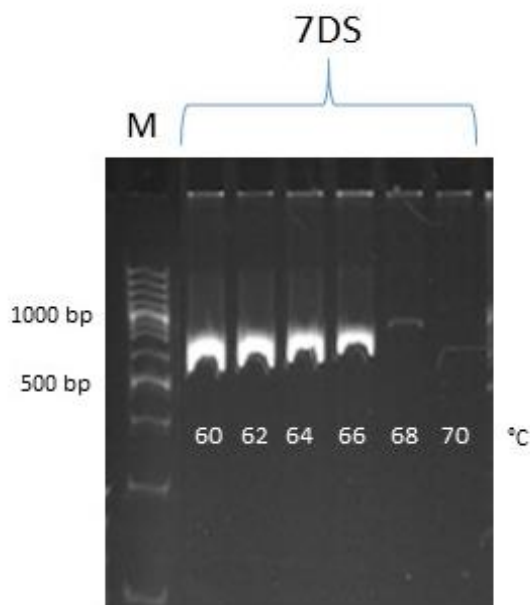
Tab. 12: Charakteristika navržených primerů

Charakteristika párů primerů	Počet párů primerů
Oba primery v páru jsou specifické pro 7DS	17
Pouze jeden z primerů v páru je specifický pro 7DS	2
Pro jeden z primerů v páru nebyla dostupná sekvence ramen 7AS nebo 7BS	6
Pro oba primery v páru nebyla dostupná sekvence ramene 7BS	1

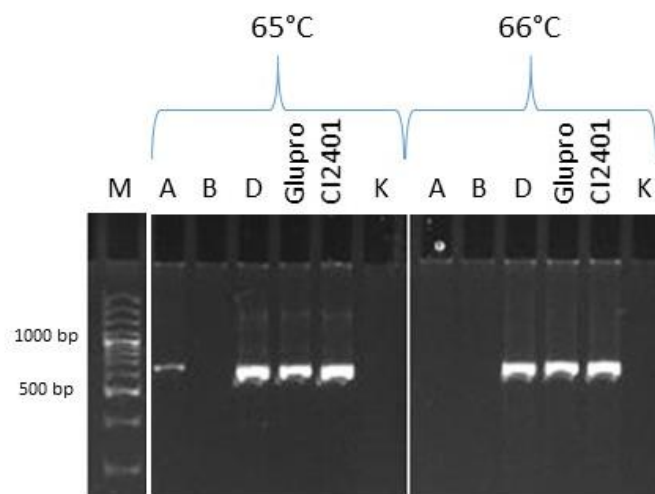
5.2.2 Amplifikace 7DS-specifických produktů PCR

V první fázi byla s použitím navržených primerů pomocí PCR amplifikována DNA tříděných ramen 7AS, 7BS a 7DS. Tento krok byl nezbytný k potvrzení specifity jednotlivých primerů. Z celkového počtu 26 párů primerů poskytovalo při teoreticky stanovené teplotě nasedání primeru produkt výhradně z ramene 7DS pouze 7 párů primerů. U zbylých 19 párů primerů docházelo také k amplifikaci nespecifických produktů PCR pocházejícího z jednoho nebo obou homeologních ramen, případně z ramene 7DS. Z tohoto důvodu musela být stanovena optimální teplota nasedání primerů (T_a) pomocí gradientové PCR (Obr. 13). 25 z 26 párů primerů poskytovalo

při optimální T_a produkt specifický pouze pro rameno 7DS. Účinnost navrhování primerů tedy činila 96 %. Pouze v případě jednoho z navržených párů primerů nebylo možno za pomoci zvýšené T_a zabránit vzniku nespecifických produktů PCR ramene 7DS. Tento pár primerů byl ze studie vyřazen.



Obr. 13: Optimalizace T_a pro primer 273 pomocí gradientové PCR. Elektroforetogram zobrazuje produkty PCR, která probíhala při různých T_a s použitím amplifikované DNA ramene 7DS. Produkty PCR byly separovány ve 4% PAA gelu. M – velikostní marker 100.



Obr. 14: Konečné stanovení T_a pro primer 273 a současná amplifikace DNA rodičů mapovací populace. Elektroforetogram zobrazuje produkty PCR, která byla provedena při dvou různých T_a s použitím amplifikované DNA ramen 7AS, 7BS a 7DS a také s DNA rodičů mapovací populace (Glupro a C12401). Produkty PCR vzniklé amplifikací DNA rodičů mapovací populace při optimální T_a (66 °C) byly sekvenovány. Elektroforetická separace produktů PCR probíhala ve 4% PAA gelu. Písmena A, B a D označují krátká ramena chromozómů 7A, 7B a 7D, M – velikostní marker 100 bp ladder, K– negativní kontrola.

5.2.3 Identifikace polymorfismů mezi rodiči mapovací populace

Primery, které poskytovaly pouze jeden 7DS-specifický produkt PCR, byly použity k amplifikaci DNA rodičů mapovací populace (Obr. 14). V případě všech 25 párů primerů, které poskytovaly pouze produkt PCR specifický pro rameno 7DS, došlo při amplifikaci DNA rodičů mapovací populace ke vzniku jednoho produktu. Po separaci produktů PCR v 4% PAA gelu nebyl identifikován délkový polymorfismus mezi rodiči mapovací populace pro žádný z použitých párů primerů. Proto bylo nutné všechny produkty PCR charakteristické pro rodiče mapovací populace následně sekvenovat.

Celkově bylo osekvenováno 13 814 bp z analyzované oblasti dlouhé 23 666 bp. Porovnání sekvencí PCR produktů pocházejících od obou rodičů mapovací populace odhalilo přítomnost dvou jednonukleotidových polymorfismů (SNP). Frekvence polymorfismů pro osekvenovanou oblast tedy činí 1 SNP na 6 907 bp. PCR produkt obsahující SNP poskytovaly primery 260 a 266 (Tab. 13). Oba identifikované jednonukleotidové polymorfismy se dle porovnání s anotovanou sekvencí BAC klonu TaaCsp112N11 nacházejí v mimogenové oblasti.

Tab. 13: Charakteristika primerů 260 a 266.

Primer (Marker)	Optimální Ta	Délka produktu PCR	Polymorfismus
260	67 °C	570	SNP A/G
266	67 °C	467	SNP G/A

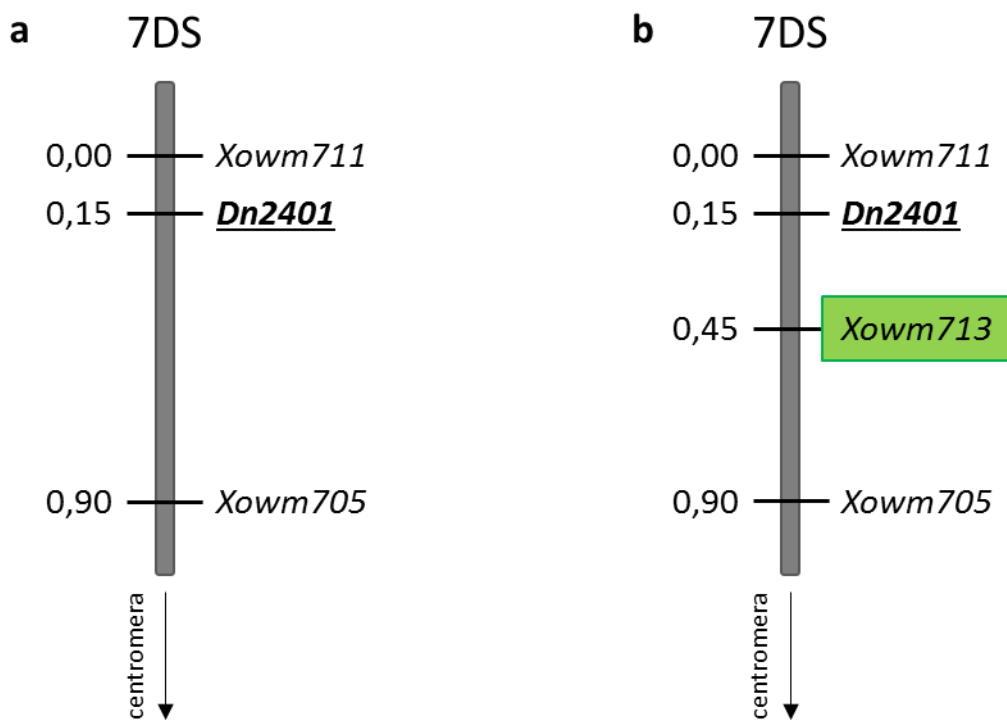
5.2.4 Genetické mapování nově odvozených markerů

Za použití primerů 260 a 266 bylo provedeno genotypování 333 jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2. DNA všech jedinců mapovací populace byla amplifikována pomocí PCR a amplikony byly sekvenovány Sangerovou metodou.

V případě primeru 260 nebylo možné spolehlivě určit genotyp jedinců velké části mapovací populace z důvodu přítomnosti pozadí na chromatogramu. Toto pozadí bylo způsobeno přítomností několik nespécifických produktů PCR o stejné délce pocházejících z ramene 7DS. Vzhledem k stejné velikosti produktů PCR nebylo možno jejich přítomnost předem odhalit za pomoci elektroforetické separace v PAA gelu. Následné porovnání sekvence specificky amplifikované primerem 260 se sekvencemi celého ramene 7DS pomocí programu Blast potvrdilo na rameni 7DS

přítomnost několika velmi podobných lokusů o stejné délce. Tento SNP marker byl z tohoto důvodu z genetického mapování vyloučen.

V případě primeru 266 byl získán jeden 7DS-specifický produkt PCR pro všechny jedince mapovací populace. Variantu SNP identifikovaného v PCR produktu primeru 266 bylo možno stanovit pro všechny jedince mapovací populace CI2401/Glupro-F2. Genotypy jednotlivých jedinců mapovací populace současně s fenotypovými daty jsou uvedeny v příloze. Detekovaný SNP byl zamapován do oblasti genu *Dn2401* jako marker *Xowm713* (Obr. 15). Interval vymezený původními hraničními markery *Xowm705* a *Xowm711* byl zúžen z 0,90 cM na 0,45 cM mezi markery *Xowm713* a *Xowm711*.



Obr. 15: Genetická mapa oblasti genu *Dn2401*. (a) Genetická mapa sestavená na základě mapování hraničních markerů *Xowm705* a *Xowm711* v populaci CI2401/Glupro-F2. (b) Genetická mapa oblasti genu *Dn2401* s novým hraničním markerem *Xowm713*.

4. Diskuze

Velikost genomu pšenice, výrazné zastoupení repetitivních sekvencí a zejména přítomnost tří velice podobných homeologních subgenomů A, B a D výrazně komplikují poziční klonování genů u pšenice. Další překážku představuje nerovnoměrná úroveň rekombinace podél chromozómů (Saintenac *et al.* 2009) a nízká míra genetické diverzity mezi moderními odrůdami pšenice (Feuillet *et al.* 2008). Možnost třídit jednotlivé chromozómy a chromozómová ramena pšenice pomocí průtokové cytometrie vedla k rozvoji řady genetický a genomických nástrojů, které mohou významně přispět ke zjednodušení procesu pozičního klonování (Wang *et al.* 2015). Mezi tyto nástroje patří zejména knihovny DNA dlouhých inzertů, fyzické mapy či sekvence jednotlivých ramen a chromozómů získané celochromozómovým neuspořádaným *'shotgun'* sekvenováním. Zásadním průlomem bylo také sestavení referenční sekvence chromozómu 3B. Historicky první geny izolované metodou pozičního klonování u pšenice byly geny *Lr10* a *Lr21* zodpovědné za rezistenci ke rzi pšeničné (Feuillet *et al.* 2003; Huang *et al.* 2003). Do dnešní doby byly z genomu pšenice seté, případně jejich předků, metodou pozičního klonování izolováno celkem 16 genů. Dostupnost výše zmíněných nástrojů, a zejména pak znalost referenční sekvence, vytvářejí předpoklad k urychlení procesu pozičního klonování, a tím také nárůstu počtu izolovaných genů. Důkaz pro zmíněné tvrzení poskytuje fakt, že uveřejnění referenční sekvence genomu ryže vedlo k výraznému zvýšení počtu genů izolovaných z tohoto genomu (Feuillet *et al.* 2011).

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na genetické mapování v oblasti genu *Dn2401*, který podmiňuje rezistenci k mšici zhoubné. Tato práce navazuje na studii Staňkové *et al.* (2015), v rámci které bylo vyvinuto 11 nových markerů v těsné vazbě na tento gen. První část experimentální práce si kladla za cíl rozšířit dostupnou mapovací populaci F2 za účelem zvětšení rozlišení genetické mapy a zamapovat pomocí nové mapovací populace markery *Xowm705* a *Xowm711*, které jsou v těsné vazbě na gen *Dn2401*. Hlavním cílem experimentální části práce pak bylo vyvinout nové markery mapující do oblastí mezi současnými hraničními markery a zúžit tak oblast předpokládaného výskytu genu *Dn2401*.

4.1 Mapování hraničních markerů v populaci s vyšším rozlišením

Mapovací populace CI2401/Glupro-F2-1 použitá pro konstrukci vysoko-hustotní genetické mapy v práci Staňkové *et al.* (2015) je tvořena 184 jedinci. Tato mapovací populace byla rozšířena o dalších 149 jedinců generace F2. Celý soubor čítající celkem 333 jedinců byl souhrnně označen CI2401/Glupro-F2. Mapování markerů *Xowm705* a *Xowm711* v mapovací populaci CI2401/Glupro-F2-2 odhalilo přítomnost tří nových jedinců nesoucích rekombinaci mezi markery *Xowm705* a *Xowm711*. To umožnilo zpřesnit vzdálenost mezi markery z původních 0,83 cM na 0,90 cM (0,75 cM mezi markerem *Xowm705* a genem *Dn2401* a 0,15 cM mezi *Dn2401* a *Xowm711*). Ačkoliv je pro účely konstrukce vysoko-hustotní genetické mapy doporučeno provádět mapování v mapovací populaci čítající tisíce jedinců (Krattinger *et al.* 2009, Schneider *et al.* 2005), v tomto případě byla populace o 333 jedincích dostačující. Tento fakt je dán poměrně vysokou mírou rekombinace v oblasti genu *Dn2401*. Na úseku 310 kb bylo v mapovací populaci o 333 jedincích zaznamenáno mezi markery *Xowm705* a *Xowm711* celkem 6 rekombinací, což odpovídá vzdálenosti 0,90 cM. Frekvence rekombinace tedy činí 2,9 cM/1 Mb (1cM je roven fyzické délce 345 kb). Tato hodnota je 18x vyšší ve srovnání se průměrnou frekvencí rekombinace charakteristickou pro chromozóm 3B, která odpovídá hodnotě 0,16 cM/1 Mb. Zmíněná hodnota byla stanovena na základě podrobného studia frekvence rekombinace podél celého chromozómu 3B (Choulet *et al.* 2014). Je známo, že frekvence rekombinace kolísá podél chromozómu. Proto je zapotřebí porovnávat frekvenci s ohledem na lokalizaci studované oblasti. Saintenac *et al.* (2009) ve své studii stanovili frekvenci rekombinací pro jednotlivé biny chromozómu 3B. Srovnání s touto studií ukazuje, že frekvence rekombinace v oblasti genu *Dn2401* je mnohonásobně vyšší, než průměrná frekvence zjištěná pro odpovídající biny chromozómu 3B (2,9 cM/1Mb v oblasti genu *Dn2401* versus 0,02 cM/1Mb v binech chromozómu 3B). Je třeba zmínit, že frekvence rekombinace může mezi jednotlivými chromozómy pšenice kolísat a porovnání ramene 7DS s chromozómem 3B tak nemusí poskytnout zcela přesné údaje. I přesto je však zřejmé, že je frekvence rekombinace v oblasti genu *Dn2401* vysoká. Dle Luo *et al.* (2013) mohou být oblasti s vysokou frekvencí rekombinace spojeny s výskytem genů

rezistence. Vysoká frekvence rekombinace (1,8 – 2,8 cM/1 Mb) byla pozorována také v okolí genu *Gb3*, který podmiňuje rezistenci k mšici obilné (Azhaguvel *et al.* 2012).

4.2 Vývoj nových markerů pro oblast genu *Dn2401*

Hlavní náplní experimentální části práce byl vývoj nových markerů za účelem zahuštění genetické mapy v oblasti genu *Dn2401*. Postup vývoje markerů použitý v této diplomové práci vychází z metodiky vyvinuté v předcházející studii Staňkové *et al.* (2015). Metodika však byla pro účely této diplomové práce částečně upravena. Cílem obou prací bylo vyvinout markery specifické pro přesně vymezenou oblast na chromozómu 7DS.

Účinnost navrhování primerů specifických pro rameno 7DS činila v případě této diplomové práce 96%. Celkem 25 z 26 párů primerů bylo specifických pro rameno 7DS. Vysoká účinnost navrhování specifických primerů byla očekávána, vzhledem k faktu, že metodika vyvinutá v práci Staňkové *et al.* (2015) vedla k dosažení účinnosti 86%. Dosažené hodnoty jsou daleko vyšší ve srovnání s předcházejícími studii, které se taktéž zabývaly vývojem subgenomově specifických markerů. Kupříkladu Schnurbush *et al.* (2007) v práci zabývající se vývojem markerů specifických pro rameno 7BL v rámci mapování genu *Bo1* dosáhli účinnosti 39 %. Podobné hodnoty (30 %) dosáhli také Terraciano *et al.* (2013) při vývoji markerů specifických pro stejné chromozómové rameno za účelem mapování genu *Lr14*. V obou zmíněných studiích byly primery pro nově vyvíjené markery navrhovány s použitím EST sekvencí. Jelikož jsou tyto sekvence mezi homeologními subgenomy konzervované, docházelo ve zmíněných studiích často k amplifikaci PCR produktů pocházejících ze všech tří homeologních subgenomů. Z tohoto důvodu myslely být provedeny další kroky zahrnující sekvenování produktů PCR, pocházejících z jednotlivých homeologních ramen, za účelem nalezení polymorfismů. Tyto polymorfismy pak umožnily navrhnout nové, subgenomově specifické primery. Ani toto však nevedlo ke zvýšení účinnosti, pravděpodobně z důvodu nedostatečné míry polymorfismů mezi homeologními sekvencemi. K vysoké míře specifity primerů pozorované v této diplomové práci značně přispěla především možnost použití celochromozómových sekvencí homeologních ramen 7AS, 7BS a 7DS. Primery bylo možno navrhovat přímo do oblastí, které obsahují polymorfismy mezi

homeologními subgenomy. Zároveň, v porovnání s dříve používanými EST sekvencemi, bylo možné primery navrhovat také v oblastech intronů a v mimogenových oblastech, které vykazují v porovnání s exony daleko vyšší míru polymorfismu (Quraishi *et al.* 2009).

Ačkoliv byly efektivita navrhování primerů vysoká, sekvenování DNA rodičů mapovací populace (CI2401 a Glupro) odhalilo v sekvenci o délce 13 814 bp pouze 2 jednonukleotidové polymorfismy (SNP) potenciálně použitelné jako markery. Frekvence polymorfismů tedy činila 1 SNP na 6 907 bp. Tato hodnota je zhruba desetkrát nižší než hodnota získaná ve studii, kterou provedli Schnurbusch *et al.* (2007) (1 SNP/ 613 bp). Je však srovnatelná s frekvencí polymorfismů pozorovanou mezi stejnými rodičovskými liniemi CI2401 a Glupro v práci Staňkové *et al.* (2015). Zde byla pozorována frekvence polymorfismů 1 SNP/6 089 bp. Nízká úroveň polymorfismu v oblasti genu *Dn2401* pravděpodobně souvisí s výskytem tohoto genu v subgenomu D. Subgenom D se obecně vyznačuje nižší mírou polymorfismu ve srovnání s dalšími dvěma subgenomy (Chao *et al.* 2009). Tento fakt potvrzuje i práce Berkmana *et al.* (2013), ve které byl analyzován výskyt jednonukleotidových polymorfismů charakteristických pro jednotlivé chromozómy skupiny 7 mezi několika odrůdami pšenice seté.

Oba jednonukleotidové polymorfismy identifikované mezi sekvencemi rodičů mapovací populace byly nalezeny v mimogenové oblasti. Toto zjištění odpovídá faktu, že právě tyto oblasti se vyznačují nejvyšší mírou polymorfismu. S tímto tvrzením koreluje i výsledek analýzy výskytu polymorfismů identifikovaných Staňkovou *et al.* (2015) mezi sekvencemi rodičů mapovací populace. Z celkového počtu 11 SNP se 6 nacházelo v mimogenových oblastech, 4 pocházely z oblasti intronu a pouze jeden SNP byl nalezen v exonu.

Přestože byly nalezeny 2 SNP potenciálně použitelné jako markery, pouze jeden z nich (marker *Xowm713*) bylo možno zamapovat v mapovací populaci CI2401/Glupro-F2. V případě druhého SNP bylo zjištěno, že PCR amplifikací dochází u některých jedinců mapovací populace ke vzniku několika produktů o stejné délce, které však všechny pocházejí z ramene 7DS. Tyto nesespecifické produkty tedy nebylo možno odhalit provedením PCR s amplifikovanou DNA ramen homeologních chromozómů ani elektroforetickou separací produktů PCR v polyakrylamidovém gelu. Výskyt většího počtu kopií PCR produktu na rameni 7DS a současně pozice této sekvence v mimogenové oblasti, ukazuje na fakt, že se pravděpodobně jedná

o sekvenci repetitivního charakteru. Anotace sekvencí před vlastním navrhováním primerů by potenciálně umožnila identifikovat repetitivní sekvence a cíleně se tak vyhnout jejich amplifikaci. S ohledem na fakt, že byl tento problém zaznamenán pouze u jednoho páru primerů a v práci Staňkové *et al.* (2015) nebyl zaznamenán vůbec, není zařazení tohoto kroku do zavedené metodiky nutné.

Metodika vývoje markerů specifických pro oblast genu *Dn2401* převzatá z práce Staňkové *et al.* (2015) umožnila odvození nového SNP markeru *Xowm713*. Zamapováním tohoto markeru v mapovací populaci CI2401/Glupro-F2 bylo dosaženo zkrácení intervalu mezi hraničními markery z původních 0,90 cM mezi *Xowm705* a *Xowm711* na 0,45 cM mezi markery *Xowm713* a *Xowm711*. Zároveň došlo k upřesnění pozice genu na genetické mapě, a tím k zúžení oblast potenciálního výskytu kandidátních genů. Použitý způsob vývoje markerů je na jednu stranu časově náročný a vyžaduje vysokou preciznost jak při navrhování primerů, tak při optimalizaci podmínek PCR, na druhou stranu však umožňuje navrhovat subgenomově specifické primery s vysokou účinností. Vysoká účinnost zároveň kompenzuje nízkou míru polymorfismu mezi rodiči použité mapovací populace.

5. Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na genetické mapování v oblasti genu *Dn2401*. Tento gen podmiňující rezistenci k mšici zhoubné se nachází na krátkém rameni chromozómu 7D (7DS). Konstrukce vysoko-hustotní genetické mapy v těsné blízkosti genu představuje jeden z nejdůležitějších kroků v procesu pozičního klonování.

S cílem zvýšit rozlišení genetické mapy v oblasti genu *Dn2401* došlo v rámci této práce k rozšíření původní mapovací populace CI2401/Glupro-F2-1 o dalších 149 jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2. Analýza genotypu jedinců nové mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2 umožnila identifikovat tři jedince nesoucích rekombinaci mezi hraničními markery *Xowm705* a *Xowm711*. Rozšíření mapovací populace tak vedlo ke zpřesnění vzdálenosti mezi hraničními markery z 0,90 cM na 0,45 cM a zároveň k upřesnění pozice genu *Dn2401* na genetické mapě.

Hlavní náplní experimentální části práce byl vyvoj markerů specifických pro oblast genu *Dn2401* s cílem zúžit interval mezi stávajícími hraničními markery *Xowm705* a *Xowm711*. V rámci procesu vývoje markerů bylo navrženo 26 párů primerů, z nichž 25 (96%) bylo specifických pro chromozómové rameno 7DS. Tyto primery byly použity k amplifikaci DNA rodičů mapovací populace (CI2401, Glupro). Sekvenování PCR produktů odhalilo mezi rodiči mapovací populace přítomnost dvou jednonukleotidových polymorfismů, z nich jeden bylo možno zamapovat v těsné blízkosti genu *Dn2401* jako marker *Xowm713*. Vývoj nového markeru umožnil zúžit interval mezi hraničními markery na 0,45 cM a zmenšit tak oblast potenciálního výskytu kandidátních genů.

Seznam použitých zkratek

7DS	krátké rameno chromozómu 7D
BAC	umělý bakteriální chromozóm (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
bp	pár bází (<i>base pair</i>)
cDNA	komplementární DNA (<i>complementary DNA</i>)
cM	centimorgan
DArT	<i>diversity array technology</i>
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoxynukleotidy
EST	koncová sekvence z cDNA (<i>expresses sequence tag</i>)
F primer	forward primer
F₂	druhá filiální populace
F_{2:3}	F ₃ populace odvozená z populace F ₂ (<i>F₂ derived F₃</i>)
Gb	miliardy párů bází (<i>giga pairs base</i>)
ISBP	polymorfismus založený na místě inserce (<i>insertion site-base polymorphism</i>)
IWGSC	<i>Internatiol Wheat Genome Sequencing Consortium</i>
Kb	tisíce párů bází (<i>kilo base pairs</i>)
MAS	<i>marker assisted selection</i>
Mb	miliony párů bází (<i>mega base pairs</i>)
MTP	minimální dráha k pokrytí (<i>minimum tiling path</i>)
n	haploidní počet chromozómů
NGS	sekvenování nové generace (<i>next generation sequencing</i>)
PAA	polyakrylamid
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
QTL	lokus pro kvantitavní znaky (<i>quantitative trait loci</i>)
R primer	reverse primer
RNA	ribonukleotidová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
SNP	jednonukleotivý polymorfismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
T_a	teplota nasedání primerů
VIGS	virem indukované umlčení genu (<i>virus induced genome silencing</i>)
x	základní chromozové číslo

Literatura

Akpinar, B.A., Magni, F., Yuce, M., Stuart, J., Lucas, S.J., Šimková, H., Šafář, J., Vautrin, S., Bergès, H., Cattonaro, F., Doležel, J., Budak, H. (2015) The physical map of wheat chromosome 5DS revealed gene duplications and small rearrangements. *BMC Genomics* 16:453

Azhaguvel, P., Rudd, J. C., Ma, Y., Luo, M., Weng, Y. (2012) Fine genetic mapping of greenbug aphid-resistance gene Gb3 in *Aegilops tauschii*. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 555 – 564

Barabaschi D, Magni F, Volante A, Gadaleta A, Šimková H, Scalabrin S, Maria Prazzoli MC, Bagnaresi P, Lacrima K, Michelotti V, Desiderio F, Orrù L, Mazzamurro V, Fricano A, MastrangeloxAM, Tononi P, Vitulo V, Jurman I, Frenkel Z, Cattonaro F, Morgante M, Blanco A, Doležel J, Delledonne M, Stanca AM, Cattivelli L, Valè G (2015) Physical mapping of bread wheat chromosome 5A: An integrated approach. *Plant Genome* 8: 1-24

Bennett, M.D., Smith, J.B. (1991) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society (Biological Sciences)* 334: 309-345

Berkman, P.J., Visendi, P., Lee, H.C., Stiller, J., Manoli, S., Lorenc, M.T., Lai, K., Batley, J., Fleury, D., Šimková, H., Kubaláková, M., Weining, S., Doležel, J., Edwards, D. (2013) Dispersion and domestication shaped the genome of bread wheat. *Plant Biotechnology Journal* 11: 564–571

Botha. A.M., van Eck, L., Burger, N.F., Swanevelder, Z.H. (2014): Near-isogenic lines of *Triticum aestivum* with distinct modes of resistance exhibit dissimilar transcriptional regulation during *Diuraphis noxia* feeding. *Biology Open* 3:1116-1126

Breen J, Wicker T, Shatalina M, Frenkel Z, Bertin I, Philippe R, Spielmeyer W, Šimková H, Šafář J, Cattonaro F, Scalabrin S, Magni F, Vautrin S, Bergès H, International Wheat Genome Sequencing Consortium, Paux E, Fahima T, Doležel J, Korol A, Feuillet C, Keller B (2013) A physical map of the short arm of wheat chromosome 1A. PLoS ONE 8: e80272

Clark, J.K., Peairs, F. <https://www.myfields.info/pests/russian-wheat-aphid>[online]. [cit. 13.4.2016]. Dostupný na webových stránkách: <https://www.myfields.info/pests/russian-wheat-aphid>

Cloutier, S., McCallum, B.D., Loutre, C., Banks, T.W., Wicker, T., Feuillet, C., Keller, B., Jordan, M.C. (2007) Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L) is a member of the large *psr567* gene family. Plant Molecular Biology 65: 93-106

Collins, M. B., Haley, S. D., Peairs, F. B., Rudolph, J. B. (2005) Biotype 2 Russian Wheat Aphid resistance among wheat germplasm accesions. Crop Science 45: 1877 – 1880

Confolent, C., Bortolini, F., Praud, S., Murigneux, A., Charmet, G., Salse, J. (2009) Genomics in cereals: from genome-wide conserved orthologous set (COS) sequences to candidate genes for trait dissection. Functional and Integrative Genomics 9: 473–484

Doebley, J., Stec, A., Hubbard, L. (1997) The evolution of apical dominance in maize. Nature 386: 485–488

Doležel, J., Číhalíková, J., Lucretti, S. (1992) A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L. Planta 188: 93 – 98

Doležel, J., Vrána, J., Cápál, P., Kubaláková, M., Burešová, V., Šimková, H. (2014) Advances in plant chromosome genomics. Biotechnology Advances 32: 122 - 136

Doveri, S., Lee, D., Maheswaran, M., Powell, W. (2008) Molecular markers – history, features and application. *Principles and practises of plant genomics 1*: 23-68

Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., Wilson, A. (2010) Geneious v5.3. <http://www.geneious.com>

Du Toit, F. (1987) Resistance in wheat (*Triticum aestivum*) to *Diuraphis noxia* (*Hemiptera: Aphididae*). *Cereal Research Communication 15*: 175–179

Ennahli, S., El Bouhssini, M., Grando, S., Anathakrishnan, R., Niide, T., Starkus, L., Starkey, S., Smith, M.C. (2009): Comparison of categories of resistance in wheat and barely genotypes against biotype 2 Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov). *Arthropod Plant Interactions 3*: 45-53

Faris, J.D., Zhang, Z., Fellers, J.P., Gill, B.S. (2003) Micro-colinearity between rice, *Brachypodium*, and *Triticum monococcum* at the wheat domestication locus Q. *Functional & Integrative Genomics 8*: 149-164

Faris, J.D., Zhang, Z., Lu, H., Lu, S., Reddy, L., Cloutier, S., Fellers, J.P., Meinhardt, S.W., Rasmussen, J.B., Xu, S.S., Oliver, R.P., Simons, K.J., Friesen, T.L. (2010) A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 107*: 13544–13549

Fazel-Najafabadi, M., Peng, J., Peairs, F.B., Šimková, H., Kilian, A., Laitan, N.L.V. (2015): Genetic mapping of resistance to *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) biotype 2 in wheat (*Triticum aestivum* L.) accession CI2401. *Euphytica 203*: 607-613

Feldman, M., Levy, A. A. (2005): Allopolyploidy- -a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic Genome Research 109*: 250-258

Feuillet, C., Stein, N., Rossini, L., Praud, S., Mayer, K., Schulman, A., Eversole, K., Appels, R. (2012): Integrating cereal genomics to support innovation in the *Triticeae*. *Functional & Integrative Genomics* 12: 573-583

Feuillet, C., Landgridge, P., Waugh, R. (2008): Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends In Genetics* 24: 24-32

Franzen, L.D., Gutsche, A.R., Heng-Moss, T.M., Higley, L.G., Macedo, T.B. (2008): Physiological responses of wheat and barely to Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) and bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.) (*hemiptera: Aphididae*). *Arthropod Plant Interactions* 2: 227-235

Fu, D., Uauy, C., Distelfeld, A., Blechl, A., Epstein, L., Chen, X., Sela, H., Fahima, T., Dubcovsky, J. (2009) A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* 323: 1357–1360

Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T.N., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., Colas, I., Moore, G. (2006) Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* 439: 749-752

Gupta, P.H., Rustgi, S., Mir, R.R. (2013): Array-based high-throughput DNA markers and genotyping platforms for cereal genetics and genomics. *Cereal Genomics II*. : 11-55

Gupta B, Saha J, Sengupta A, Gupta K (2013b) Recent advances on Virus induced gene silencing (VIGS): Plant functional genomics. *J Plant Biochem Physiol* 1:e116

Gustafson, P., Raskina, O., Ma, X., Nevo, E. (2009): Wheat evolution. Domestication, and improvement. *Wheat science and trade*: 3-30

Harvey, T.L., Martin, T.J. (1990) Resistance to Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia*, in wheat (*Triticum aestivum*). *Cereal Research Communication* 18: 127-129

Hensel, G., Kastner, Ch., Oleszcuk, S., Riechen, J., Kumlehn, J. (2009): Agrobacterium-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize, International Journal of Plant Genomics

Hobza, R., Vyskot, B. (2007): Laser microdissection-based analysis of plant sex chromosomes. Methods in Cell Biology 82: 433 - 453

Huang, X.O., Kempf, H., Ganal, 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

Chao, S., Zhang, W., Akhunov, E., Sherman, J., Ma, Y., Luo, M.C., Dubcovsky, J. (2009) Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Molecular Breeding 23: 23–33

Choulet, F., Caccamo, M., Wright, J., Alux, M., Šimková, H., Šafář, J., Leroy, P., Doležel, J., Rogers, J., Eversole, K., Feuillet, C. (2013): The wheat Black Jack: Advances toward sequencing the 21 chromosomes of the bread wheat genome. Genomics of Plant Genetics Resources: 405-438

Choulet, F., Alberti, A., Theil, S., Glover, N., Barbe, V., Daron, J., Pingault, L., Sourdille, P., Couloux, A., Paux, E., Leroy, P., Mangenot, S., Guilhot, N., Le Goudis, J., Balfourier, F., Alaux, M., Jamilloux, V., Poulain, J., Durand, C., Bellec, A., Gaspin, Ch., Šafář, J., Doležel, J., Rogers, J., Vandepoele, K., Aury, J-M., Mayer, K., Berges, H., Quesneville, H., Wincker, P., Feuillet, C. (2014): Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. Science 345: 1249721-1 - 1249721-7

IWGSC, The International Wheat genome Consortium (2014). Science 345: 1251788-1 – 1251788-11

Kippes, N., Debernardi, J.M., Vasquez-Gross, H.A., Akpinar, B.A., Budak, H., Kato, K., Chao, S., Akhunov, E., Dubcovsky, J. (2015) Identification of the VERNALIZATION 4 gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* E5401-E5410

Kobayashi, F., Wu, J., Kanamori, H., Tanaka, T., Katagiri, S., Karasawa, W., Kaneko, S., Watanabe, S., Sakaguchi, T., Hanawa, Y., Fujisawa, H., Kurita, K., Abe, C., Iehisa, J.C., Ohno, R., Šafář, J., Šimková, H., Mukai, Y., Hamada, M., Saito, M., Ishikawa, G., Katayose, Y., Endo, T.R., Takumi, S., Nakamura, T., Sato, K., Ogihara, Y., Hayakawa, K., Doležel, J., Nasuda, S., Matsumoto, T., Handa, H. (2015) A high-resolution physical map integrating an anchored chromosome with the BAC physical maps of wheat chromosome 6B. *BMC Genomics* 16:595

Luo, M.C., Gu, Y.Q., You, F.M., Deal, K.R., Ma, Y., Hu, Y., Huo, N., Wang, Y., Wang, J., Chen, S., Jorgensen, C.M., Zhang, Y., McGuire, P.E., Pasternak, S., Stein, J.C., Ware, D., Kramer, M., McCombie, W.R., Kianian, S.F., Martis, M.M., Mayer, K.F., Sehgal SK, Li W, Gill BS, Bevan, M.W., Šimková, H., Doležel, J., Weining, S., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 110:7940–7945

Kole, C., Abboott, A.G. (2008) *Fundamentals of plant genome mapping. Principles and practises of plant genomics* 1: 1-22

Kosambi, D. (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenic* 12: 172–175

Krattinger, S., Wicker, T., Keller, B. (2009): Map-based cloning of genes in Triticeae (wheat and barley). *Genetics and genomics of the Triticeae*: 337–358

Kůdela, V., Bartoš, P., Čača, Z., Dirlbek, J. (1989) *Obecná fytopatologie*. Academia, Praha

Liu, X.M, Smith, C.M., Friebe, B.R., Gill, B.S. (2005) Molecular mapping and allelic relationships of Russian wheat aphid–resistance genes. *Crop Science* 45:2273–2280

Liu, X.M., Smith, C.M., Gill, B.S. (2002): Identification of microsatellite markers linked to Russian wheat aphid resistance genes *Dn4* and *Dn6*. *Theoretical and Applied Genetics* 44: 397-401

Liu, X.M., Smith, C.M., Gill, B.S., Tolmay, V. (2001): Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 1042-1048

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

Nkongolo, K.K., Quick, J.S., Limin, E., Fowler, D.B. (1991) Sources and inheritance of resistance to Russian wheat aphid in *Triticum* species amphiploids and *Triticum tauschii*. *Canadian Journal of Plant Science* 71: 703-708

Nguyen, H.T., Wu, X. (2005): Molecular Marker Systems for Genetic Mapping. The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping: 23 – 52

Marais, G.F., Horn, M., Du Toit, F. (1994) Intergeneric transfer (rye to wheat) of a gene(s) for Russian wheat aphid resistance. *Plant Breeding* 113: 65–271

Martin, T.J., Sears, R.G., Seifers, D.L., Harvey, T.L., Witt, M.D., Schlegel, A.J., McCluskey, P.J., Hatchett, J.H. (2001) Registration of Trego wheat. *Crop Science* 41: 929-930

Mayer, K.F., Martis, M., Hedley, P.E., Šimková, H., Liu, H., Morris, J.A., Steuernagel, B., Taudien, S., Roessner, S., Gundlach, H., Kubaláková, M., Suchánková, P., Murat, F., Felder, M., Nussbaumer, T., Graner, A., Salse, J., Endo, T., Sakai, H., Tanaka, T., Itoh, T., Sato, K., Platzer, M., Matsumoto, T., Scholz, U., Doležel, J., Waugh, R., Stein, N. (2011) Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell* 23: 1249–1263

Paux, E., Faure, S., Choulet, F., Roger, D., Gauthier, V., Martinant, J.P., Sourdille, P., Balfourier, F., Le Paslier, M.C., Chauveau, A., Cakir, M., Gandon, B., Feuillet, C. (2010) Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. *Plant Biotechnology Journal* 8: 196-210

Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., Korol, A., Michalak, M., Kianian, S., Spielmeyer, W., Lagudah, E., Somers, D., Kilian, A., Alaux, M., Vautrin, S., Bergès, H., Eversole, K., Appels, R., Šafář, J., Šimková, H., Doležel, J., Bernard, M., Feuillet, C. (2008) A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science* 322:101-104

Peng, J.H., Bai, Y., Haley, S.D., Lapitan, N.L.V. (2009): Microsatellite-based molecular diversity of bread wheat germplasm and association mapping of wheat resistance to Russian wheat aphid. *Genetica* 135: 95-122

Periyannan, S., Moore, J., Ayliffe, M., Bansal, U., Wang, X., Huang, L., Deal, K., Luo, M., Kong, X., Bariana, H., Mago, R., McIntosh, R., Dodds, P., Dvorak, J., Lagudah, E. (2013) The gene *Sr33*, an ortholog of barley *Mla* genes, encodes resistance to wheat stem rust race *Ug99*. *Science* 341: 786–788

Philippe, R., Paux, E., Bertin, I., Sourdille, P., Choulet, F., Laugier, C., Šimková, H., Šafář, J., Bellec, A., Vautrin, S., Frenkel, Z., Cattonaro, F., Magni, F., Scalabrin, S., Martis, M.M., Mayer, K.F., Korol, A., Bergès, H., Doležel, J., Feuillet, C. (2013) A high density physical map of chromosome 1BL supports evolutionary studies, map-based cloning and sequencing in wheat. *Genome Biology* 14:R64

Pietrangelo, M. http://www.mpietrangelo.com/hbio/unit/13_darwinism/Chapter_14/B_Jpegs_of_Art_and_Photos/14_Labeled_Art_and_Photos/14_06b_WheatEvolution-L.jpg[online]. [cit. 13.4.2016] Dostupný na webových stránkách: [online]. [cit. 13.4.2016]

Poursarebani, N., Nussbaumer, T., Šimková, H., Šafář, J., Witsenboer, H., van Oeveren, J., Doležel, J., Mayer, K.F., Stein, N., Schnurbusch, T. (2014) Whole-genome profiling and shotgun sequencing delivers an anchored, gene-decorated, physical map assembly of bread wheat chromosome 6A. *Plant Journal* 79: 334-347

Puterka, G.J., Burd, J.D., Burton, R.L. (1992): Biotypic variation in worldwide collection of Russian wheat aphid (*Hemiptera: Aphididae*). *Journal of Economic Entomology* 96: 352-360

Qin, B., Cao, A., Wang, H., Chen, T., You, F.M., Liu., Y., Ji, J., Liu, D., Chen, P., Wang, X. (2011) Collinearity-based marker mining for the fine mapping of *Pm6*, a powdery mildew resistance gene in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 123: 207 – 218

Quraishi, U.M., Abrouk, M., Bolot, S., Pont, C., Throude, M., Guilhot, N., Confolent, C., Bortolini, F., Praud, S., Murigneux, A., Charmet, G., Salse, J. (2009) Genomics in cereals: from genome-wide conserved orthologous set (COS) sequences to candidate genes for trait dissection. *Functional & Integrative Genomics* 9: 473-484

Raats, D., Frenkel, Z., Krugman, T., Dodek, I., Sela, H., Šimková, H., Magni, F., Cattonaro, F., Vautrin, S., Bergès, H., Wicker, T., Keller, B., Leroy, P., Philippe, R., Paux, E., Doležel, J., Feuillet, C., Korol, A., Fahima, T. (2013) The physical map of wheat chromosome 1BS provides insights into its gene space organization and evolution. *Genome Biology* 14:R138

Rabinowicz, P.D., McCombie, W.R., Martienssen, R.A. (2003) Gene enrichment in plant genomic shotgun libraries. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 150–156

Rozen, S., Skaletsky, H.J. (2000): Primer3 dostupný na internetu. Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology. Humana Press: 365-386

Röder, M.S., Huang, X.Q., Börner, A. (2008) Fine mapping of the region on wheat chromosome 7D controlling grain weight. Functional & Integrative Genomics. 2008, 8(1):79-86.

Röder, M.S., Huang, X.Q., Ganai, M.V. (2004) Wheat microsatellites: potential and implications. Biotechnology in agriculture and forestry 55: 255-266

Saintenac, C., Falque, M., Martin, O.C., Paux, E., Feuillet, C., Sourdille, P. (2009) Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L). Genetics 181: 393–403

Salvi, S., Tuberosa, R. (2005) To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. Trends in Plant Science 10: 297-304

Sanford, J.C. (1988): The biolistic process. Trends in Biotechnology 6: 299-302.

Schliephake, Edgar. http://www6.inra.fr/quantipest_fre/Pest-and-pest-injury-identification/Arable-crops/Wheat/Animal-pests/Aphids [online]. [cit. 24.2.2016]. Dostupný na webových stránkách: http://www6.inra.fr/quantipest_fre/Pest-and-pest-injury-identification/Arable-crops/Wheat/Animal-pests/Aphids

Schneider, K. (2005) Mapping populations and principles of genetic mapping. The handbook of plant genome mapping: Genetic and physical mapping: 3 - 22

Schnurbusch, T., Collins, N.C., Eastwood, R.F., Sutton, T., Jefferies, S.P., Langridge, P. (2007) Fine mapping and targeted SNP survey using rice–wheat gene colinearity in the region of the *Bo1* boron toxicity tolerance locus of bread wheat. Theoretical and Applied Genetics 115: 451–461

Sears, E.R., Sears, L.M.S. (1978) The telocentric chromosomes of common wheat. In: Ramanujams S (ed) Proc 5th Int Wheat Genetics Symp. pp 389–407 Indian Agricultural Research Institute New Delhi

Šimková, H., Janda, J., Hřibová, E., Šafář, J., Doležel, J. (2007) Cot-based cloning and sequencing of the short arm of wheat chromosome 1B. *Plant, Soil and Environment* 53: 437-441

Smith, C.M. (2005): Plant resistance to arthropods. Molecular and conventional approaches.

Smith, C.M., Boyko, E.V. (2007): The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122: 1-16

Staňková, H. (2010): Mapování genu pro rezistenci k mšici zhoubné (*Diuraphis noxia*) na chromozómu 7D pšenice. Diplomová práce. Univezita Palackého Olomouc. Přírodovědecká fakulta.

Staňková, H. (2015): Construction of physical map of 7DS wheat chromosome arm and its use for positional cloning. Disertační práce. Univezita Palackého Olomouc. Přírodovědecká fakulta.

Staňková, H., Valárik, M., Lapitan, N.L.V., Berkman, P.J., Batley, J., Edwardes, D., Luo, M., Tulpová, Z., Kubaláková, M., Stein, N., Doležel, J., Šimková, H. (2015): Chromosomal genomics facilitates fine mapping of Russina wheat aphid resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics* 128: 1373-1383

Suenaga, K., Khairallah, M., William, H.M., Hoisington, D.A. (2005) A new intervarietal linkage map and its application for quantitative trait locus analysis of 'gigas' features in bread wheat. *Genome* 48: 65–75

Šafář, J., Šimková, H., Kubaláková, M., Číhalíková, J., Suchánková, P., Bartoš, J., Doležel, J. (2010) Development of chromosome-specific BAC resources for genomics of bread wheat. *Cytogenetic and Genome Research* 129: 211 – 23

Terracciano, I., Maccaferri, M., Bassi, F., Mantovani, P., Sanguineti, M.C., Salvi, S., Šimková, H., Doležel, J., Massi, A., Ammar, K., Kolmer, J., Tuberosa, R. (2013) Development of COS-SNP and HRM markers for haplotyping and marker-assisted selection of *Lr14* in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theoretical and Applied Genetics* 26: 1077–1101

This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Costantini, L., Crespan, M., Dangl, G. S., Eisenheld, C., Ferreira-Monteiro, F., Grando, S., Ibanez, J., Lacombe, T., Laucou, V., Magalhaes, R., Meredith, C. P., Milani, N., Peterlunger, E., Regner, F., Zulini, L., Maul, E. (2004) Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1448-1458

Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., Dubcovsky, J. (2006) A NAC Gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* 314: 1298-1301

Valdez, V.A., Byrne, P.F., Lapitan, N.L.V., Peairs, F.B., Bernardo, A., Bai, G., Haley, S.D. (2012) Inheritance and genetic mapping of Russian wheat aphid resistance in iranian wheat landrace accession *PI626580*. *Crop Science* 52: 676-682

Van Ooijen, J.W., Voorrips, R.E. (2001) JoinMap 3.0, software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Journal* 3: 739–744

Voothuluru, P., Meng, J., Khajuria, C., Louis, J., Zhu, L., Starkey, S. Wilde, G.E., Baker, C.A., Smith, C.M. (2006): Categories and inheritance of resistance to Russian wheat aphid (*Homoptera: Aphididae*) biotype 2 in a selection from wheat cereal introduction 2401. *Journal of Economic Entomology* 99: 1854-1861

Vrána, J., Kubaláková, M., Šimková, H., Číhalíková, J., Lysák, M.A., Doležel, J. (2000) Flow-sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L). *Genetics* 156: 2033–2041

Vrána, J., Šimková, H., Kubaláková, M., Číhalíková, J., Doležel, J. (2012) Flow cytometric chromosome sorting in plants: The next generation. *Methods* 57: 331-337

Wang, D., Shi, J., Carlson, S.R., Cregan, P.B., Ward, R.W., Diers, B.W. (2003) A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers. *Crop Science* 43: 1421-1434

Wang, M., Wang, S., Xia, G. (2015) From genome to gene: a new epoch for wheat research? *Trends in Plant Science* 20: 380-387

Waterhouse, P.M., Helliwell, C.A. (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics* 4: 29–38

Yahiaoui, N., Srichumpa, P., Dudler, R., Keller, B. (2004) Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *Plant Journal* 37: 528-538

Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., Dubcovsky, J. (2003) Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100: 6263-6268

Seznam příloh

- Příloha 1** Genotypy a fenotypy rodičů a jednotlivých jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2

Příloha 1

Tab. 1: Genotypy a fenotypy rodičů a jednotlivých jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2 (A – rezistentní homozygot, B – citlivý homozygot, H - heterozygot; rekombinantní jedinci jsou zvýrazněni modře)

		Genotypy a fenotyp rodičů a jedinců mapovací populace pro jednotlivé genetické markery a gen Dn2401			
	Označení rostliny	Xowm711	Dn2401	Xowm713	Xowm705
Rodiče	CI2401	A	A	A	A
	Glupro	B	B	B	B
CI2401/Glupro-F2-1	CI/G-F2-1-1	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-2	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-3	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-4	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-5	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-6	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-7	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-8	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-9	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-10	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-11	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-12	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-13	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-14	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-15	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-16	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-17	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-18	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-19	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-20	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-21	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-22	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-23	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-24	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-25	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-26	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-27	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-28	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-29	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-30	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-31	H	H	H	H

	Označení rostliny	Xowm711	Dn2401	Xowm713	Xowm705
CI2401/Glupro-F2-1	CI/G-F2-1-32	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-33	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-34	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-35	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-36	B	B	H	H
	CI/G-F2-1-37	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-38	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-39	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-40	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-41	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-42	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-43	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-44	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-45	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-46	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-47	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-48	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-49	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-50	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-51	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-52	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-53	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-54	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-55	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-56	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-57	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-58	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-59	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-60	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-61	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-62	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-63	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-64	A	A	A	A
CI/G-F2-1-65	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-66	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-67	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-68	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-69	B	B	B	B	
CI/G-F2-1-70	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-71	A	A	A	A	

	Označení rostliny	Xowm711	Dn2401	Xowm713	Xowm705
CI2401/Glupro-F2-1	CI/G-F2-1-72	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-73	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-74	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-75	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-76	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-77	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-78	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-79	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-80	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-81	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-82	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-83	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-84	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-85	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-86	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-87	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-88	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-89	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-90	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-91	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-92	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-93	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-94	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-95	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-96	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-97	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-98	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-99	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-100	H	B	B	B
	CI/G-F2-1-101	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-102	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-103	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-104	B	B	B	B
CI/G-F2-1-105	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-106	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-107	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-108	B	B	B	B	
CI/G-F2-1-109	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-110	B	B	B	B	
CI/G-F2-1-111	H	H	H	H	

	Označení rostliny	Xowm711	Dn2401	Xowm713	Xowm705
CI2401/Glupro-F2-1	CI/G-F2-1-112	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-113	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-114	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-115	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-116	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-117	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-118	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-119	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-120	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-121	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-122	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-123	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-124	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-125	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-126	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-127	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-128	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-129	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-130	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-131	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-132	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-133	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-134	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-135	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-136	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-137	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-138	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-139	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-140	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-141	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-142	B	B	B	B
CI/G-F2-1-143	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-144	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-145	B	B	B	B	
CI/G-F2-1-146	H	H	H	H	
CI/G-F2-1-147	A	A	A	A	
CI/G-F2-1-148	B	B	B	B	
CI/G-F2-1-149	A	A	A	A	
CI/G-F2-1-150	B	B	B	B	
CI/G-F2-1-151	B	B	B	B	

	Označení rostliny	Xowm711	Dn2401	Xowm713	Xowm705
C12401/Glupro-F2-1	CI/G-F2-1-152	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-153	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-154	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-155	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-156	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-157	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-158	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-159	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-160	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-161	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-162	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-163	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-164	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-165	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-166	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-167	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-168	B	B	B	B
	CI/G-F2-1-169	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-170	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-171	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-172	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-173	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-174	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-175	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-176	A	A	A	A
	CI/G-F2-1-177	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-178	H	H	H	H
	CI/G-F2-1-179	B	B	B	B
CI/G-F2-1-180	B	B	B	B	
CI/G-F2-1-181	B	B	B	B	
CI/G-F2-1-182	B	B	B	B	
CI/G-F2-1-183	B	B	B	H	
CI/G-F2-1-184	B	B	B	B	
C12401/Glupro-F2-2	CI/G-F2-2-1	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-2	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-3	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-4	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-5	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-6	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-7	A	A	A	A

	Označení rostliny	Xowm711	Dn2401	Xowm713	Xowm705
CI2401/Glupro-F2-2	CI/G-F2-2-8	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-9	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-10	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-11	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-12	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-13	H	H	A	A
	CI/G-F2-2-14	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-15	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-16	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-17	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-18	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-19	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-20	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-21	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-22	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-23	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-24	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-25	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-26	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-27	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-28	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-29	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-30	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-31	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-32	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-33	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-34	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-35	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-36	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-37	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-38	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-39	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-40	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-41	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-42	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-43	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-44	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-45	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-46	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-47	B	B	B	B

	Označení rostliny	Xowm711	Dn2401	Xowm713	Xowm705
CI2401/Glupro-F2-2	CI/G-F2-2-48	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-49	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-50	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-51	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-52	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-53	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-54	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-55	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-56	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-57	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-58	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-59	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-60	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-61	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-62	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-63	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-64	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-65	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-66	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-67	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-68	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-69	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-70	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-71	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-72	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-73	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-74	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-75	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-76	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-77	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-78	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-79	H	H	H	A
	CI/G-F2-2-80	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-81	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-82	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-83	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-84	B	B	B	B
CI/G-F2-2-85	H	H	H	H	
CI/G-F2-2-86	A	A	A	A	
CI/G-F2-2-87	H	H	H	H	

	Označení rostliny	Xowm711	Dn2401	Xowm713	Xowm705
CI2401/Giupro-F2-2	CI/G-F2-2-88	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-89	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-90	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-91	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-92	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-93	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-94	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-95	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-96	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-97	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-98	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-99	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-100	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-101	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-102	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-103	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-104	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-105	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-106	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-107	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-108	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-109	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-110	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-111	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-112	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-113	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-114	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-115	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-116	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-117	H	H	H	H
CI/G-F2-2-118	H	H	H	H	
CI/G-F2-2-119	H	H	H	H	
CI/G-F2-2-120	B	B	B	B	
CI/G-F2-2-121	A	A	A	A	
CI/G-F2-2-122	A	A	A	A	
CI/G-F2-2-123	H	H	H	H	
CI/G-F2-2-124	H	H	H	H	
CI/G-F2-2-125	H	H	H	H	
CI/G-F2-2-126	H	H	H	H	
CI/G-F2-2-127	H	H	H	H	

	Označení rostliny	Xowm711	Dn2401	Xowm713	Xowm705
CI2401/Glupro-F2-2	CI/G-F2-2-128	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-129	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-130	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-131	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-132	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-133	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-134	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-135	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-136	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-137	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-138	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-139	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-140	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-141	H	H	H	H
	CI/G-F2-2-142	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-143	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-144	H	H	H	A
	CI/G-F2-2-145	A	A	A	A
	CI/G-F2-2-146	B	B	B	B
	CI/G-F2-2-147	H	H	H	H
CI/G-F2-2-148	H	H	H	H	
CI/G-F2-2-149	H	H	H	H	