

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2011

Hana Vanžurová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Zavedení nových typů markerů do mapy
Triticum monococcum L. pro mapování výnosu
a prvků výnosu**

Bakalářská práce

Hana Vanžurová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod metodickým vedením Mrg. Miroslava Valárika, Ph.D a za použití citované literatury.

V Olomouci 5. 5. 2011

Hana Vanžurová

Souhrn

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) patří z hlediska výživy mezi jednu z nejdůležitějších plodin světa. V současnosti však její produkce nedokáže plně pokrýt poptávku stále se rozrůstající lidské populace a je ohrožována měnícími se klimatickými podmínkami. Osevné plochy není možné neomezeně rozšiřovat, proto je nutné šlechtit kultivary odolné vůči biotickým a abiotickým stresům a se stabilním a vysokým výnosem. K tomu je potřeba dostatek kvalitních genetických map s markery v těsné vazbě s lokusy pro agronomicky významné znaky. Velikost a komplexita genomu pšenice je hlavní obstrukcí v tomto úsilí, proto jsou pro zjednodušení mapování používány příbuzné druhy se sníženou ploidií. V případě genomu A pšenice to nejčastěji bývá *T. monococcum*. Cílem předložené práce bylo přispět k mapování agronomicky důležitých znaků testováním vhodnosti IRAP markerů pro mapování u pšenice. Práce se skládá ze dvou částí, teoretické a praktické.

Teoretická část práce je zaměřena na přehled mapovacích a markerovacích technik a výnosových prvků pšenice. Praktická část práce je zaměřena na testování vhodnosti IRAP markerů pro zahuštění genetické mapy a mapování výnosu a prvků výnosu u *T. monococcum*. Celkem bylo analyzováno 108 IRAP primerů na 89 liniích RIL mapovací populace z křížení planého *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* G3116 a kultivovaného *T. monococcum* ssp. *monococcum* DV92. Polymorfní DNA fragmenty mezi rodiči mapovací populace byly pozorovány u 20 % z nich. Počet polymorfních DNA fragmentů na jeden IRAP se pohyboval v rozmezí 1 až 5. Celkově bylo získáno 40 IRAP markerů, které byly použity k zahuštění mapy *T. monococcum* a byl u nich hodnocen potenciál pro mapování prvků výnosu.

Summary

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) belongs in term of nutrition among one of the most important crops in the world. Recently, its production does not fully cover requirements of growing human population and above that is compromised by changing climatic conditions. Also, extension of arable land is limited. Breeding cultivars resistant to biotic and abiotic stress and with stable high yield is the main solution to these problems. For fast and efficient breeding high-quality genetic maps with markers tightly linked to agronomically important traits are crucial. However, size and complexity of wheat genome is the main obstruction in this efforts. One of a ways to facilitate the mapping is using wheat relatives with lower ploidy. In case of wheat genome A the *T. monococcum* it is the most common substitute. The aim of the proposed work was to contribute to the *T. monococcum* mapping by testing suitability of the IRAP markers for wheat mapping. The work is composed of two parts, theoretical and practical.

The theoretic part of the work is targeted to reviewing of present state of wheat markers and yield traits mappings. The practical part of this work is focused to testing of the IRAP markers for implementation to wheat genetic maps and for mapping of yield traits in *T. monococcum*. 108 IRAP primers were analysed on 89 lines of RIL mapping population from the cross of wild *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* G3116 and cultivated *T. monococcum* ssp. *monococcum* DV92. 20 % of them showed polymorphic DNA fragments between parental lines of the mapping population. In general 1 to 5 polymorphic DNA fragments per primer were observed. Totally 40 IRAP markers were acquired and mapped to the *T. monococcum* map and their value for yield traits mapping was evaluated.

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí literatury, trpělivost a připomínky při psaní této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Barboře Klocové za cenné rady a pomoc při práci v laboratoři, za ochotu a čas, který mi věnovala. Můj dík patří také laborantkám i celému kolektivu Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci.

Obsah

1 Úvod	9
2 Cíle práce	10
3 Současný stav řešené problematiky	11
3.1 OBILOVINY	11
3.1.1 <i>Triticum monococcum</i> L.....	13
3.2 GENETICKÉ MARKERY A TYPY GENETICKÝCH MARKERŮ	15
3.2.1 Morfologické markery	15
3.2.2 Molekulární markery	15
3.2.2.1 Biochemické markery.....	16
3.2.2.2 DNA markery	16
3.2.2.2.1 Techniky založené na hybridizaci	17
3.2.2.2.1.1 RFLP.....	17
3.2.2.2.1.2 ISH.....	18
3.2.2.2.1.3 DNA čipy.....	18
3.2.2.2.2 Techniky založené na PCR	19
3.2.2.2.2.1 <i>PCR techniky s nescifickou sekvencí primerů</i>	19
3.2.2.2.2.1.1 RAPD	19
3.2.2.2.2.1.2 AP-PCR	20
3.2.2.2.2.1.3 DAF	20
3.2.2.2.2.2 <i>PCR techniky se specifickou sekvencí primerů</i>	20
3.2.2.2.2.2.1 AFLP	20
3.2.2.2.2.2.2 SCAR.....	21
3.2.2.2.2.2.3 STS	21
3.2.2.2.2.2.4 SSR	21
3.2.2.2.2.2.5 DNA markery založené na mobilních genetických elementech	22

3.2.2.2.2.5.1 IRAP a REMAP markery	26
3.2.2.2.2.5.2 iPBS	28
3.2.2.2.2.5.3 ISBP	28
3.3 GENETICKÉ MAPOVÁNÍ A TYPY GENETICKÝCH MAP.....	29
3.3.1 Vazebné mapy	29
3.3.1.1 QTL mapování.....	31
3.3.2 Fyzické mapy.....	32
3.3.2.1 Cytogenetické mapy	32
3.3.2.2 Deleční mapy.....	32
3.3.2.3 Restrikční a kontigové mapy	33
3.3.2.4 Sekvenční mapy.....	34
4 Materiál a metodika	35
4.1 Rostlinný materiál	35
4.2 Přístroje.....	35
4.3 Chemikálie a roztoky.....	35
4.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	35
4.3.2 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza	36
4.4 Metodika.....	37
4.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	37
4.4.2 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza	39
5 Výsledky	41
6 Diskuze.....	52
7 Závěr	54
8 Literatura	55
9 Seznam použitých zkratk	63
10 Přílohy	67

1 Úvod

Již na začátku zemědělství (zhruba před 10 000 lety) měly obiloviny obrovský význam pro výživu lidstva. Kvůli svému výnosu, nutriční hodnotě a snadnému uskladnění byly mnohé druhy domestikovány. V současnosti je jednou ze zemědělsky nejdůležitějších plodin pšenice setá (*Triticum aestivum* L.), která tvoří ~ 90 % světové produkce pšenice a je hlavní potravinou pro 35 % světové populace. Vzhledem ke stále se rozrůstající lidské populaci je nutné zvyšovat produkci této obiloviny. Tímto problémem se zabývá řada šlechtitelských programů, které však naráží na překážky v podobě velikosti genomu ($2n = 6x = 42$, AABBDD, 1C = 16 974 Mb) a v přítomnosti tří subgenomů s homeologními chromozómy. Proto se pro zjednodušení mapování používají blízké příbuzné druhy s nižším stupněm ploidie, které slouží jako modely pro jednotlivé subgenomy. Pro mapování genomu A to nejčastěji bývá *T. monococcum*, které je příbuzné s *T. urartu*, donorem tohoto genomu. Dalším předpokladem efektivního šlechtění je dostatek kvalitních genetických map a vhodných markerů pro agronomicky významné znaky nebo markerů v těsné vazbě k těmto znakům. S rozvojem molekulární biologie a s rozšiřováním znalostí o sekvenci genomu pšenice bylo vyvinuto mnoho různých typů markerů.

Předkládaná práce se zabývá testováním potenciálu IRAP markerů pro mapování výnosu a jeho prvků u *T. monococcum*.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše o využití genetických markerů pro tvorbu genetických map a o výnosových prvcích pšenice.
2. Testování potenciálu IRAP markerů pro zahuštění genetické mapy a mapování výnosu a prvků výnosu u *Triticum monococcum* L.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 OBILOVINY

Obiloviny patří mezi nejvýznamnější plodiny z hlediska výživy lidstva. Třetinu celosvětové produkce obilovin tvoří rostliny z kmene *Triticeae*, jehož součástí jsou rody *Triticum*, *Secale* a *Hordeum*. Kmen *Triticeae* řadíme do podčeledi *Pooideae* a čeledi *Poaceae* (Devos a Gale, 1997).

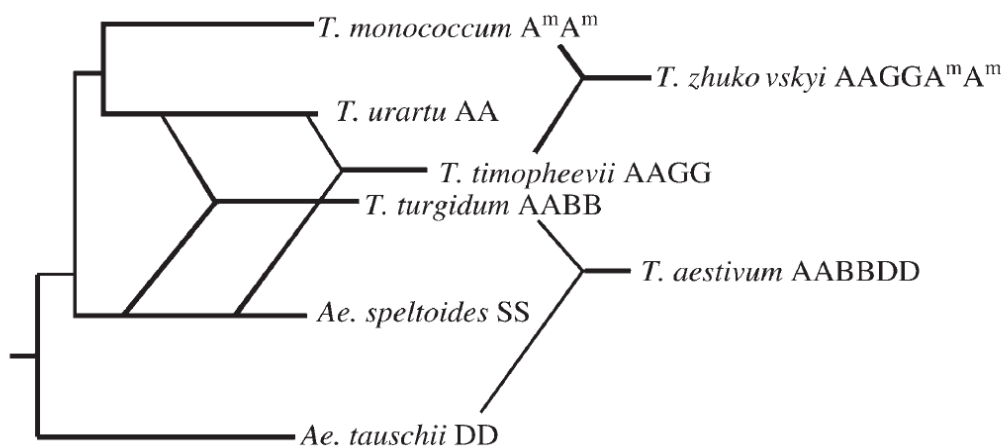
Rod *Triticum* zahrnuje diploidní ($2n = 2x = 14$) *Triticum monococcum* L. a *T. boeoticum* Boiss., *T. urartu*, tetraploidní ($2n = 4x = 28$) *T. turgidum* L., *T. turgidum* ssp. *durum*, *T. turgidum* ssp. *dicoccum* atd. a hexaploidní ($2n = 6x = 42$) *T. spelta* L. a *T. aestivum* L. Nejproduktivnější plodinou tohoto rodu je *T. aestivum* L., která tvoří ~ 90 % světové produkce pšenice (<http://faostat.fao.org/>). Zároveň je základní potravinou pro 35 % světové populace (<http://www.cimmyt.org/>), takže se jedná o nejdůležitějšího zástupce rodu *Triticum*.

Pšenice setá je allohexaploidní ($2n = 6x = 42$, AABBDD) obilovina, jejíž genom je složen ze tří sad homeologních chromozómů (A, B, D). Tyto chromozómy jsou částečně homologní (zachovaný obsah a pořadí genů), takže se mohou během meiózy párovat a rostlina je tak schopna produkovat fertilní potomstvo (Devos a Gale, 1997; Keller a kol., 2005).

Evoluce genomu moderní hexaploidní pšenice započala před 0,5 až 3 miliony lety (Schéma 1). V té době došlo k hybridizaci diploidní pšenice *T. urartu* ($2n = 2x = 14$, A^uA^u), která byla donorem genomu A (Dvořák a kol., 1988; Dvořák a kol., 1993), s dosud neznámým diploidním druhem ze sekce *Sitopsis*, donorem genomu B, který byl blízce příbuzný s *Aegilops speltoides* (SS; Dvořák a Zhang, 1990). Výsledkem byla tetraploidní pšenice *T. turgidum* ($2n = 4x = 28$, A^uA^uBB). *T. turgidum* v sobě kombinovala vlastnosti svých diploidních předků. Díky tomu měla vyšší výnos a větší schopnost adaptace na měnící se podmínky prostředí. Před více než 10 000 lety byla *T. turgidum* domestikována. Následně z ní bylo vyšlechtěno několik odrůd, z nichž je v současnosti nejvíce pěstován poddruh *T. turgidum* ssp. *durum* (pšenice tvrdá). Před 8 000 až 10 000 lety došlo k druhé hybridizaci, tentokrát *T. turgidum* s divokým diploidním druhem *Aegilops tauschii* ($2n = 2x = 14$, DD), donorem genomu D. Výsledkem křížení byla hexaploidní pšenice *T. aestivum* ($2n = 6x = 42$, AABBDD). Díky genům z genomu D získala *T. aestivum* lepší schopnost adaptace na

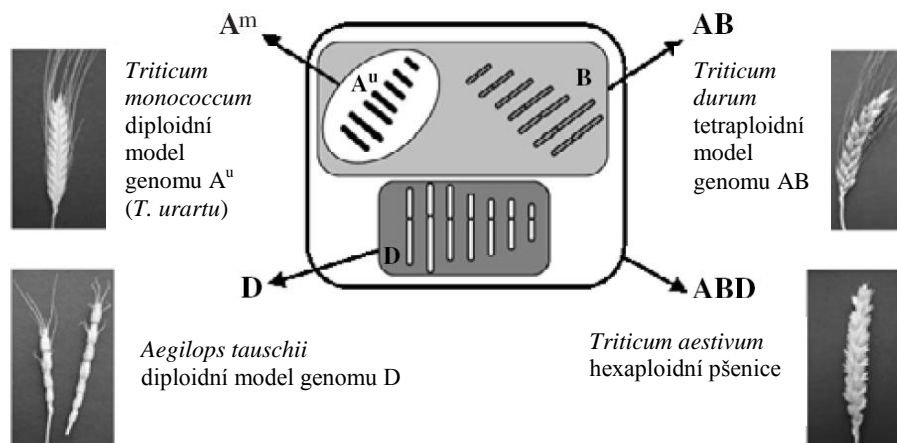
kontinentální klima, což vedlo k jejímu většímu geografickému a ekologickému rozšíření oproti *T. turgidum* (Feuillet a kol., 2007).

Schéma 1: Evoluce genomů pšenice



(převzato z Dvořák a kol., 2006)

Mapování genomu pšenice je značně komplikováno jeho velikostí (1C = 16 974 Mb), přítomností tří homeologních subgenomů a obsahem repetitivních sekvencí (~ 80 % genomu). Pro zjednodušení se využívají genomy diploidních a tetraploidních blízkých příbuzných obilovin, které slouží jako modely pro jednotlivé subgenomy (A, B, D) hexaploidní pšenice (Keller a kol., 2005). Pro mapování subgenomu A lze použít diploidní *T. monococcum* (A^mA^m), které je blízké příbuzné *T. urartu* (A^uA^u; Dvořák a kol., 1993), nebo tetraploidní *T. durum*, které může být použito i pro subgenom B (Obr. 1). Subgenom D je nejvíce podobný genomu *Ae. tauschii*. Tuto strategii původně navrhl Gill a kol. (1991).



Obr. 1: Strategie mapování genomu hexaploidní pšenice seté

Pro zjednodušení se používají blízkce příbuzné druhy s nižší ploidii, které slouží jako modely jednotlivých subgenomů (A, B, D; upraveno podle Keller a kol., 2005).

3.1.1 *Triticum monococcum* L.

Pšenice jednozrnka (*Triticum monococcum* L.) je diploidní pšenice ($2n = 2x = 14$, $A^m A^m$) s plochým dvouřadým osinatým klasem a pluchatými zrny (Obr. 2). Jak již název napovídá, produkuje jedno semeno na obilku. Minoritně se však vyskytují i dvousemenné kultivary.

Vyšlechtěné jednozrnky jsou blízkce příbuzné s plevelnými formami pšenice, označovanými jako divoká jednozrnka nebo *Triticum boeoticum* Boiss. emend. Schiem., jejichž hlavní lokalitou je Blízký východ. Mezi *T. boeoticum* Boiss. emend. Schiem. a *T. monococcum* L. není žádný morfologický rozdíl, také geneticky si jsou velmi blízké (diploidní s identickými chromozómy). Z toho důvodu bývá *T. boeoticum*, jakožto divoký předek současné *T. monococcum* L. (Heun a kol., 1997), uváděn jako poddruh *T. monococcum* L. Jednou z mála odlišností, mezi divokou a kulturní jednozrnkou, je způsob, jakým šíří svá semena. *T. boeoticum* má křehký klas, který se v době zralosti začne samovolně rozpadat. Tím pádem dojde k uvolnění obilek a k jejich rozptýlu po okolí. Naproti tomu u kulturních jednozrnek se obilky z klasu uvolňují až za působení tlaku. Jsou tak plně odkázány na činnost člověka (Zohary a Hopf, 2000).

V současnosti má jednozrnka minimální zemědělský význam. Kvůli malému výnosu je pěstována převážně jen jako krmivo a to v hornatých oblastech Turecka, Itálie, Španělska, Německa, Švýcarska a Balkánského poloostrova (Zohary a Hopf, 2000).



Obr. 2: *Triticum monococcum* L.

(převzato z <http://botany.cz/cs/triticum-monococcum/>)

3.2 GENETICKÉ MARKERY A TYPY GENETICKÝCH MARKERŮ

V ekologických, evolučních, taxonomických, fylogenetických a genetických studiích se na popis sledovaných znaků používají definované značky – markery (barva, tvar, přítomnost/nepřítomnost znaku atd.). Markery se podle druhu studovaných značek rozdělují na morfologické, popisující vnější kvalitativní a kvantitativní znaky, a molekulární, popisující rozdíly na úrovni DNA, proteinů a dalších metabolitů. V poslední době se molekulární markery dostaly do popředí hlavně díky prudkému rozvoji biochemie a molekulární biologie (Agarwal a kol., 2008; Schulman, 2007).

3.2.1 Morfologické markery

Vizuální hodnocení morfologických znaků, bez použití speciálních biochemických a molekulárních metod, má počátky již v 19. století. Tehdy Johan Gregor Mendel zkoumal dědičnost rozdílných fenotypových projevů u hrachu (barvu květu, tvar semen atd.; Agarwal a kol., 2008).

Morfologický znak lze použít jako marker za předpokladu, že je řízen jedním lokusem a vnější podmínky nemají vliv na jeho expresi. V mnoha případech je však fenotypový projev výsledkem interakce více genů nebo genů a vnějších vlivů, což limituje množství použitelných morfologických markerů (Kumar, 1999; Schulman, 2007).

3.2.2 Molekulární markery

Pro charakterizaci studovaných organismů se dlouho používaly pouze morfologické markery. Tato technika je však omezena nízkým stupněm polymorfizmu fenotypových znaků, které jsou silně ovlivňovány vnějšími podmínkami. Navíc u některých rostlin (mechy a řasy) je obtížné najít dostatečné množství těchto markerů. V současnosti se pro detailnější a přesnější studium variability používají molekulární markery, které detekují polymorfizmus na úrovni molekul. Konkrétně se jedná o biochemické a DNA markery (Weising a kol., 2005c).

3.2.2.1 Biochemické markery

Biochemické markery detekují variabilitu na úrovni produktů genů, jako jsou protilátky, enzymy, hormony, sekundární metabolity a další látky, které se vyskytují v pletivech, tkáních, krvi atd. Nejčastější metodou je izozymová a alozymová analýza. **Izozymy** jsou enzymy, které vznikly z různých genů. Mají odlišnou strukturu, ale katalyzují stejnou chemickou reakci. **Alozymy** jsou produkty ortologních genů. Liší se od sebe několika málo aminokyselinami.

Principem analýzy polymorfizmu je separace jednotlivých enzymů směsi nativní elektroforézou. Takto lze detekovat přítomnost/nepřítomnost jednotlivých forem enzymů, což může sloužit jako znak příbuznosti, nemoci nebo jiné abnormality (Flegr, 2009).

Biochemické markery se uplatňují v populační biologii, ekologii, fylogenetice a v soudním lékařství. Výhodou je jejich kodominantní charakter a nízké náklady na zpracování, které je časově nenáročné. Problémem je častá nestabilita proteinů, která vyžaduje rychlé zpracování vzorků. Tento typ markerů lze použít pouze pro analýzu kódujících oblastí DNA. Navíc polymorfizmus je hodnocen pouze na základě přítomnosti a nepřítomnosti produktu genu. Sekvence proteinů je však mnohem více konzervovaná, než sekvence jeho genu, ve kterém se mohou hromadit synonymní mutace, které nelze touto technikou detekovat (Weising a kol., 2005e).

3.2.2.2 DNA markery

DNA markery jsou nukleotidové sekvence odpovídající specifickému místu v genomu. Tyto sekvence se mohou mezi jednotlivými organizmy lišit (jsou polymorfní). Využití DNA markerů, pro vyhledávání rozdílů v nukleotidových sekvencích, bylo umožněno až s rozvojem molekulárních metod. Podstatnou výhodou DNA markerů oproti biochemickým a morfologickým markerům je nezávislost na vnějších podmínkách, detekovatelnost ve všech tkáních a informace o polymorfizmu v kódujících i nekódujících oblastech DNA.

Pro odvozování a mapování markerů se využívá dvou přístupů, na základě kterých lze markerovací techniky rozdělit na techniky (1) založené na hybridizaci, jako jsou například: DNA čipy, ISH (*in situ hybridization*), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) a (2) používající PCR: AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), AP-PCR (*arbitrarily primed-PCR*), CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*), DAF (*DNA amplification fingerprinting*), IMP (*inter-MITE polymorphism*), iPBS (*inter-PBS amplification*), IRAP

(*inter-retrotransposon amplified polymorphism*), ISBP (*insertion site based polymorphism*), RAMP (*randomly amplified microsatellite polymorphism*), RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), REMAP (*retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism*), SCAR (*sequence characterized amplified region*), SNP (*single nucleotide polymorphism*), S-SAP (*sequence-specific amplification polymorphism*), SSCP (*single strand conformation polymorphism*), SSR (*simple sequence repeats*), STS (*sequence tagged site*) a mnohé další. Bohužel žádná z nich není ideální pro všechny případy. Při volbě techniky se bere v potaz stupeň polymorfizmu, kterého marker u studovaného organismu dosahuje, frekvence jeho výskytu, specifčnost, reprodukovatelnost, pracnost a cenová náročnost (Agarwal a kol., 2008; Kumar, 1999). Některé techniky, významné pro mapování genomu rostlin, jsou blíže charakterizovány v následujících podkapitolách.

3.2.2.2.1 Techniky založené na hybridizaci

Podstatou těchto technik je schopnost denaturované DNA za vhodných podmínek renaturovat a vytvářet opět dvouvlákno. Během tohoto procesu mohou vznikat vodíkové vazby mezi komplementárními vlákny DNA (tvorba homoduplexů) ale i mezi DNA a RNA vlákny z různých zdrojů, která mohou být modifikována (vznik heteroduplexů). Heteroduplexy jsou produkty nehomologních reasociačních reakcí - hybridizací. Specifčnost hybridizace lze ovlivnit reakčními podmínkami (koncentrace DNA, RNA, solí a formamidu, teplota atd.). Použitím označených fragmentů nukleových kyselin lze hybridizaci využít k detekci specifických lokusů. Hybridizace se provádí *in situ* (na chromozómu/ jádře) nebo na pevných nosičích (nitrocelulósová/nylonová membrána/čip).

3.2.2.2.1.1 RFLP

RFLP je nejstarší technikou mapování využívající hybridizaci DNA, která byla jako první použita pro detekci DNA polymorfizmu a tvorbu genetických map. Využívá schopnosti restričních endonukleáz štěpit molekulu DNA ve specifických sekvencích. Restrikcí vzniklé fragmenty jsou podle velikosti separovány gelovou elektroforézou, denaturovány a přeneseny na membránu, kde jsou specifické lokusy vizualizovány hybridizací se značenou sondou. Délkový polymorfismus RFLP fragmentů je dán mutacemi v restričním místě nebo mezi dvěma restričními místy (Brown, 2007).

Metoda RFLP je spolehlivá, vysoce reprodukovatelná a RFLP markery jsou v převážné míře kodominantní. RFLP markery se používají při analýze genomů různých organismů (Botstein a kol., 1980). Nevýhodou RFLP je potřeba velkého množství kvalitní DNA, v kombinaci se Southernovou hybridizací časová náročnost a nutnost značené sondy. Pro svoji pracnost je RFLP metoda v současnosti nahrazována PCR-RFLP, která vyžaduje menší množství DNA a umožňuje rychle analyzovat změny v sekvenci DNA (Haliassos a kol., 1989).

3.2.2.2.1.2 ISH

Hybridizace *in situ* je technika, která prostřednictvím značených sond lokalizuje konkrétní sekvence DNA v mitotických a meiotických chromozómech (de Jong a kol., 1999) nebo v interfázních jádrech (Fransz a kol., 1996). Metoda se používá pro identifikaci polymorfizmů repetitivních nebo jednotlivých genů (Fransz a kol., 1996). Pro detekovaný úsek je připravena sonda (jednovláknová molekula DNA), která se komplementárně váže na cílové místo a označí ho. Dříve se sondy pro hybridizaci značily radioaktivně, v současnosti především fluorescenčně (FISH, *fluorescence in situ hybridization*). FISH sonda může být značena přímo, fluorochrom je navázán rovnou na nukleotidech, nebo je sonda značena chemicky a až následně se detekuje prostřednictvím fluorescenčně značené protilátky. Vizualizace navázaných sond se provádí fluorescenčním mikroskopem (Doškař a Šmarda, 2005). FISH lze provést na interfázních jádrech, na mitotických a meiotických chromozómech, nebo na vláknech DNA (fiber-FISH), kde se dosahuje nejlepšího rozlišení (Fransz a kol., 1996).

3.2.2.2.1.3 DNA čipy

DNA čipy se nejčastěji využívají ke studiu genové exprese, k detekci mutací a polymorfizmů. Technika DNA čipů je založena na rozdílné hybridizaci jednotlivých vzorků DNA se sondami na povrchu čipu. Během jedné hybridizační reakce lze testovat až desetitisíce různých nukleotidových sekvencí, což značně urychluje analýzu DNA a snižuje její finanční náklady (Gojová a Kozák, 2006; Saiki a kol., 1989; Weising a kol., 2005a).

3.2.2.2.2 Techniky založené na PCR

V 80. letech minulého století byla v laboratořích Cetus Corporation v Kalifornii Kary Mullisem vyvinuta metoda s převratným významem pro analýzu DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR, *polymerase chain reaction*). Během PCR se *in vitro* amplifikují požadované sekvence DNA. Pro použití této metody je třeba znát nukleotidové sekvence, které obklopují studovanou oblast. Na ně pak komplementárně nasedají primery, od kterých je zahájena enzymatická polymerace. Výsledkem je až miliarda kopií zvoleného úseku DNA, který se dále analyzuje (Brown, 2007).

Podle typu použitého primeru lze PCR markerovací techniky rozdělit do dvou kategorií: (1) používající k amplifikaci obecné primery nasedající na anonymní místa DNA (AP-PCR, DAF, RAPD) a (2) detekující specifické cílové sekvence v genomu (geny, specifické jednokopiové sekvence, repetice, nebo sekvence adaptorů: AFLP, IRAP, iPBS, ISBP, REMAP, SCAR, SSR, STS; Agarwal a kol., 2008).

3.2.2.2.2.1 PCR techniky s nesespecifickou sekvencí primerů

3.2.2.2.2.1.1 RAPD

RAPD technika je založena na PCR amplifikaci fragmentů DNA za použití jednoho primeru libovolné sekvence bez palindromů (9 až 10 nukleotidů), který nasedá na homologní, předem neznámé, oblasti obou vláken dvoušroubovice. Málo stringentní podmínky (nízká teplota nasedání primeru), za kterých reakce probíhá a krátká délka primeru, zvyšují nespecifičnost jeho nasedání na templát. Výsledkem je množství amplikonů o různé délce. Polymorfismus mezi testovanými vzorky DNA se projevuje přítomností, respektive nepřítomností amplikonů v daném místě. Příčinou rozdílů jsou mutace v místech nasedání primeru, inserce úseků homologních k primeru nebo inserce/delece mezi vazbovými místy primeru (Williams a kol., 1990).

Používání RAPD markerů pro identifikaci polymorfizmů v DNA má několik výhod. Primery s náhodnou sekvencí jsou univerzální. Mohou být použity ke genomické analýze různých druhů. Jedná se o rychlou a účinnou metodu. Nicméně výsledky získané RAPD technikou se mezi laboratořemi liší a nelze je použít pro srovnání mezi různými studii. Další nevýhodou je dominantní charakter RAPD markerů, kvůli kterému nelze zjistit, zda je

DNA segment amplifikovaný z heterozygotního nebo homozygotního lokusu (Williams a kol., 1990).

3.2.2.2.1.2 AP-PCR

AP-PCR byla poprvé použita Welshem a McClellandem (1990) při studiu genetické variability mezi blízce příbuznými druhy bakterií. Jedná se o složitější variantu RAPD techniky. Pro PCR jsou navrženy náhodné primery o délce 20 a více nukleotidů. První dva cykly amplifikace probíhají za nízké stringence, následných 10 až 40 cyklů za vyšší stringence. PCR produkty jsou separovány gelovou elektroforézou. Polymorfismus se projevuje přítomností/nepřítomností amplikonů v určité pozici na gelu. AP-PCR je používána při genetickém mapování, populační genetice a šlechtitelských programech (Welsh a McClelland, 1990).

3.2.2.2.1.3 DAF

Na stejném principu, jako RAPD, je založena i technika DAF. Během PCR se amplifikuje DNA mezi dvěma primery s náhodnou nukleotidovou sekvencí. Délka DAF primerů se pohybuje v rozmezí 5 až 8 nukleotidů. Během polymerázové řetězové reakce se střídají dva teplotní cykly namísto tří. Díky nízké stringenci a krátké délce primerů vzniká velké množství amplikonů, které jsou separovány gelovou elektroforézou a poskytují DNA fingerprint. Polymorfismus mezi vzorky DNA se projevuje přítomností, respektive nepřítomností DNA fragmentů dané délky (Weising a kol., 2005d).

3.2.2.2.2 PCR techniky se specifickou sekvencí primerů

3.2.2.2.2.1 AFLP

AFLP je technika založená na selektivní PCR amplifikaci restrikčních fragmentů vzniklých enzymatickým štěpením genomické DNA. AFLP je spolehlivá, vysoce reprodukovatelná a lze ji použít pro detekci restrikčních fragmentů u DNA různých organismů bez předchozí znalosti nukleotidové sekvence. Vysoká hustota AFLP markerů umožňuje jejich využití při tvorbě genetických a fyzických map (Vos, 1995). Dále se uplatňují při studiu fylogeneze, struktury populace a při QTL mapování. Nevýhodou je dominantní charakter AFLP markerů a náročnost optimalizace této relativně komplikované metody (Mueller a Wolfenbarger, 1999).

3.2.2.2.2.2 SCAR

SCAR jsou kodominantní markery odvozené z RAPD (Sobir a kol., 2000), případně AFLP markerů (Noguera a kol., 2005). A to tak, že DNA fragment odpovídající AFLP/RAPD markeru je klonován a sekvencován. K oběma koncům AFLP/RAPD fragmentům jsou komplementárně navrženy SCAR primery. PCR amplifikací vzniká SCAR marker, který je ve vazbě se stejným lokusem, s jakým byl marker, z něhož byl převeden. SCAR markery jsou vysoce reprodukovatelné, avšak časově a finančně náročné. Používají se ve šlechtitelských programech a při MAS (Noguera a kol., 2005).

3.2.2.2.2.3 STS

STS jsou krátké jedinečné sekvence genomu. Jako STS lze použít např. sekvence exonů, které mohou být vyhledány v databázi nebo odvozeny z klonů cDNA. Polymorfismus se detekuje prostřednictvím PCR amplikonů, které představují namnoženou DNA mezi STS. Technika STS může být na základě přítomnosti/nepřítomnosti polymorfních DNA fragmentů využita k analýze variability v oblastech intronů (Lem a Lallemand, 2003), pro určení přítomnosti konkrétních genů nebo při ukotvování kontigů (Palazzolo a kol., 1991).

3.2.2.2.2.4 SSR

Mikrosatelity, neboli SSR, jsou krátké tandemové repetitivní sekvence složené z opakujících se jednotek (motivů) o délce 1 až 6 nukleotidů, které se vyskytují v genomech eukaryot, zejména v nekódujících oblastech. Jedná se o velmi variabilní oblasti genomu, ve kterých často dochází k nelegitimním rekombinacím a ke „klouzání“ DNA polymerázy během replikace. Výsledkem je značně variabilní počet repetice mezi jedinci (Li, 2002; Tautz a Renz, 1984).

Polymorfismus SSR se analyzuje pomocí PCR. Pro PCR amplifikaci se používají primery komplementární k oblastem obklopujícím SSR, které bývají v rámci druhu konzervativní. Výsledkem jsou amplikony, které mají kvůli variabilnímu počtu opakujících se motivů různou délku. Na základě velikosti jsou PCR produkty separovány gelovou elektroforézou. Nejlepšího rozlišení (1 bp) je možné dosáhnout na kapilárních elektroforetických systémech s DNA značenou fluorescenčně. Také se však používají agarózové a polyakrylamidoné elektroforetické systémy s DNA vizualizovanou stříbrem, nebo etidium bromidem.

SSR markery jsou pro svoji vysokou variabilitu, kodominantní dědičnost a reprodukovatelnost používány při studiu genetické diverzity, v genetickém mapování, MAS, v taxonomii a v populační genetice mnoha organismů (Zietkiewicz a kol., 1994).

3.2.2.2.2.5 DNA markery založené na mobilních genetických elementech

Mobilní elementy (ME) jsou repetitivní úseky DNA, které mohou měnit svoji pozici v genomu, nebo se v něm šířit prostřednictvím svých dceřiných kopií. Jako součást genetického materiálu se vyskytují u většiny eukaryot. U člověka tvoří přinejmenším 45 % genomu, u trav je to 50 až 80 % (Feschotte a kol., 2002). O objev mobilních elementů se na přelomu 40. a 50. let minulého století zasloužila Barbara McClintock.

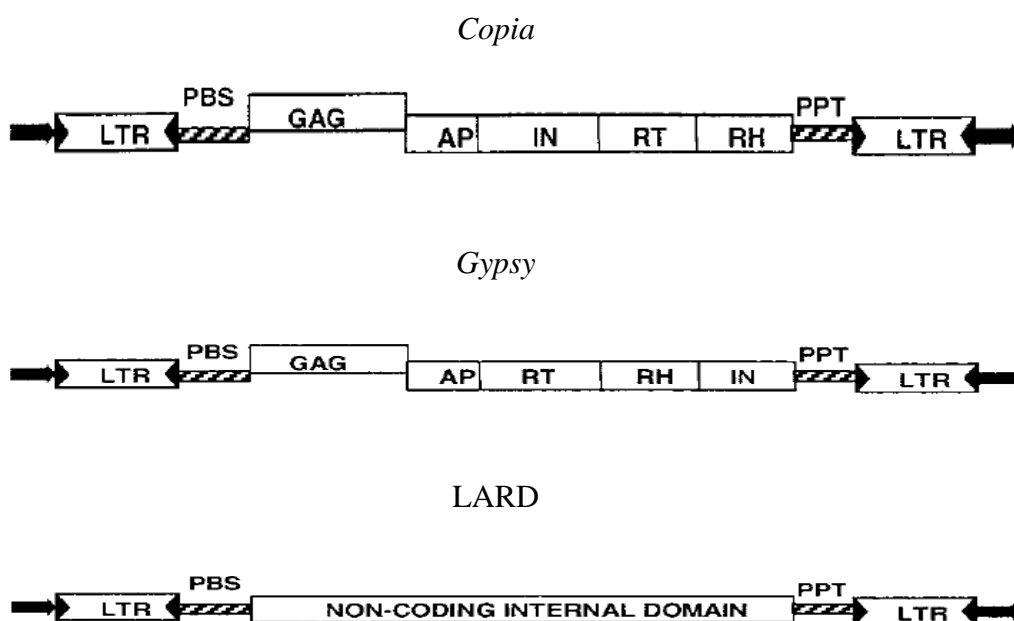
Mobilní elementy jsou v současnosti podrobně studovány a na základě jejich replikačního aparátu jsou rozdělovány do dvou tříd: třída I (RNA elementy) a třída II (DNA elementy). Elementy třídy I se v genomu pohybují prostřednictvím RNA intermediátu. Oproti tomu transpozice ME třídy II probíhá přes DNA intermediát. V obou třídách jsou zastoupeny jak autonomní, tak neautonomní elementy. Pro autonomní elementy je typická přítomnost otevřeného čtecího rámce (ORF), který kóduje proteiny potřebné k transpozici (retropozici). Neautonomním elementům ORF chybí, proto musí pro svoji transpozici (retropozici) využívat proteiny jiných elementů.

Příklady konkrétních rostlinných a živočišných mobilních elementů jsou uvedeny v Tab. I (viz. kapitola 10). S některými zástupci, kteří mají důležitou roli v organizaci a evoluci genomu, se seznámíme blíže. U rostlin to jsou malé neautonomní elementy MITE (*miniature inverted-repeat transposable elements*) a LTR retrotranspozóny s dlouhými koncovými repeticemi (LTRs, *long terminal repeats*). Naproti tomu u člověka jsou hojně zastoupeny *L1* a *Alu* elementy ze skupiny dlouhých rozptýlených nukleárních elementů (LINE, *long interspersed nuclear element*), respektive krátkých rozptýlených nukleárních elementů (SINE, *short interspersed nuclear element*; Feschotte a kol., 2002).

Elementy třídy I

Mezi ME třídy I patří LTR retrotranspozóny a Non-LTR retrotranspozóny zahrnující autonomní LINE a neautonomní SINE. Retrotranspozóny jsou součástí genomu rostlin, živočichů a hub (Feschotte a kol., 2002).

LTR retrotranspozóny svojí strukturou připomínají retroviry (Obr. 3). Konce mají ohraničeny identickými LTR sekvencemi, obsahujícími transkripční promotor a terminátor. LTR jsou vysoce konzervativní oblasti specifické pro každou rodinu elementů. Středová část autonomních elementů kóduje specifické proteiny nutné pro jejich životní cyklus. Konkrétně integrázu (IN), která vkládá cDNA do genomu a reverzní transkriptázu (RT) s RNázou H (RH), které se podílejí na syntéze cDNA. Dále jsou zde geny důležité pro sestavení infekčních virových částic (*gag* – kóduje proteiny virových částic, *env* - kóduje glykoproteiny lipidového obalu viru a *pol* - kóduje reverzní transkriptázu a integrázu). U endogenních retrovirů je vždy alespoň jeden z nich mutován, nebo zcela chybí. Mezi kódující doménou a LTR konci jsou PBS (*primer binding site*, vazebné místo pro primer) a PPT (*polypurine tract*) oblasti (Kalendar a kol., 2004; Schulman, 2007). Na základě pořadí kódujících domén a podobnosti jejich sekvencí dělíme LTR retrotranspozóny do tříd *Copia* a *Gypsy*. Zástupcem neautonomních LTR retrotranspozónů jsou LARD elementy (*large retrotransposon derivative*) s vysoce konzervativní centrální doménou avšak bez kódující funkce (Kalendar a kol., 2004).



Obr. 3: Struktura LTR retrotranspozónů (*Copia*, *Gypsy*, LARD)

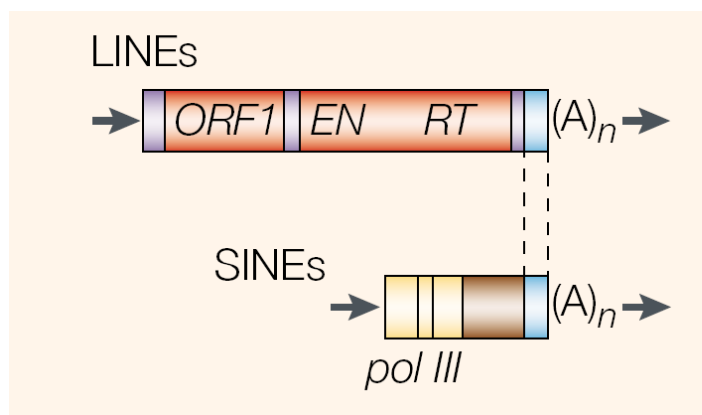
Centrální oblast, kódující **GAG** – proteiny virových částic, **AP** – aspartik proteinázu, **IN** – integrázu, **RT** – reverzní transkriptázu a **RH** – RNázu H, je ohraničena dlouhými koncovými repeticemi (**LTR** - *long terminal repeats*) a sekvencemi důležitými pro zahájení syntézy vláken cDNA (**PBS**, *primer binding site*, vazebné místo

pro primer; **PPT**, *polypurine tract*, polypurinový úsek). **NON-CODING INTERNAL DOMAIN** označuje nekódující oblast neautonomních retroelementů LARD (převzato z Kalendar a kol., 2004).

LTR retrotranspozóny obecně patří mezi nejhojnější repetitivní elementy genomu rostlin, kde představují 40 až 60 % genomu a to díky jejich replikační strategii „kopírovat a vložit“ („*copy and paste*“). Během tohoto cyklu je DNA sekvence ME přepsána do mRNA. Nasednutím tRNA na PBS oblast RNA intermediátu je zahájena reverzní transkripce. tRNA slouží jako primer pro reverzní transkriptázu, která podle templátu nasyntetizuje (-) DNA. Následně RNáza H v heteroduplexu mRNA/DNA štěpí mRNA. Syntéza (+) DNA vlákna je zahájena z PPT oblasti. Templátem reverzní transkriptázy je tentokrát (-) DNA. Vzniklá cDNA se pomocí integrázy liguje na novém místě (Marquet a kol., 1995).

Nejrozšířenějšími ME u člověka jsou Non-LTR retrotranspozóny (LINE a SINE), které tvoří zhruba 30 % genomu. Retropozice jsou schopny pouze *L1* a *Alu*. Stejně jako LTR elementy využívají mechanismus „kopírovat a vložit“, avšak s určitými odlišnostmi. Syntéza dceřiné cDNA probíhá v oblasti bohaté na A a T báze. Působením ORF2 proteinu dojde v těchto místech k rozštěpení jednoho vlákna cílové DNA. Na takto uvolněný 3' konec nasedne svým poly (A) koncem mRNA intermediát, který slouží jako templát pro syntézu prvního cDNA řetězce. Rozštěpením druhého řetězce cílové DNA vzniká volná 3' OH skupina, která funguje jako primer pro syntézu druhého cDNA vlákna. Konečným výsledkem je kopie *L1* elementu obklopená duplikovanou cílovou sekvencí. LINE elementy se v genomu šíří autonomně. Všechny potřebné proteiny kódují dva čtecí rámce (ORF1 a ORF2). ORF1 kóduje protein vázající se na DNA a ORF2 endonukleázu (EN) a reverzní transkriptázu (RT). 3' konec je obvykle tvořen poly (A) sekvencí, LTR chybí (Obr. 4).

SINE jsou neautonomní elementy, které v blízkosti 5' konce mají vnitřní promotor pro RNA polymerázu III (Obr. 4). Další enzymy, potřebné pro reverzní transkripci, si nedokážou syntetizovat a využívají enzymy produkované autonomními LINE (Snustad a Simmons, 2009f).



Obr. 4: Struktura Non-LTR retrotranspozónů (LINE, SINE)

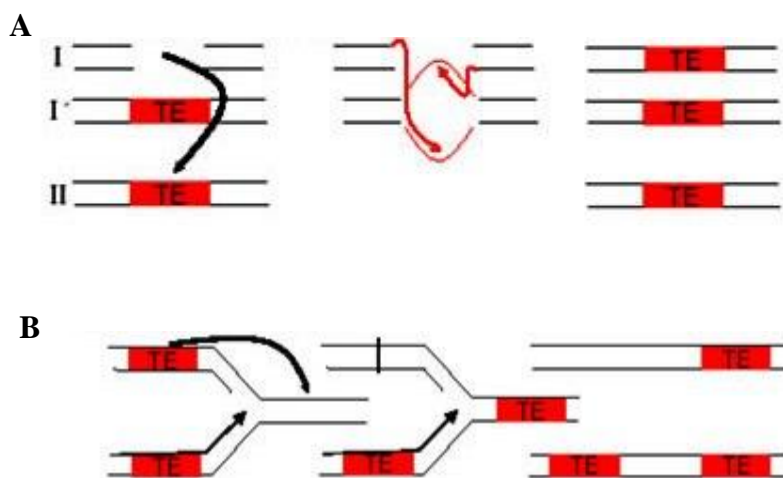
LINE: První čtecí rámec (**ORF1**) kóduje protein nutný pro návrat *LI* RNA z cytoplazmy zpět do jádra, druhý (**ORF2**) kóduje endonukleázu (**EN**) a reverzní transkriptázu (**RT**). $(A)_n$ představuje jednoduchou opakující se sekvenci A:T bází. **SINE:** *pol III* je vnitřní promotor pro RNA polymerázu III. $(A)_n$ jsou opakující se A:T báze. Spojení modrých úseků LINE a SINE elementů značí jejich homologii (převzato z Feschotte a kol., 2002).

Elementy třídy II

DNA transpozóny mají koncové invertované repetice (TIR, *terminal inverted repeat*), které u autonomních elementů obklopují oblast kódující transpozázu. Tento enzym se váže na TIR oblasti elementu, který následně vyjme a liguje ho na novém místě DNA. Existují dva mechanismy, při kterých se tento způsob přenosu DNA elementů uplatňuje. Jeden z nich probíhá během S-fáze, kdy se na sesterské chromatidě vytváří kopie ME. Jeden z těchto elementů se může transponovat do nereplikované oblasti genomu, ve které je pak ještě jednou replikován. Tímto způsobem dochází k nárůstu počtu kopií (Obr. 5). Jestliže se ME přesune do již replikované oblasti, nezvýší se počet kopií. Další možností je vyjmutí elementu z nereplikované dvoušroubovice a jeho transpozice. Vzniklá mezera může být reparována podle homologního chromozómu s pozůstalým ME (Obr. 5). Tento způsob opravy (ds) DNA bývá kvůli „klouzáni“ DNA polymerázy a špatnému párování často nepřesný. Následkem toho jsou deletovány vnitřní oblasti elementu, které kódují enzym transpozázu. Takto vzniklé odchylky jsou zodpovědné za vznik nových rodin elementů, např. MITE.

MITE jsou malé (méně než 600 bp) neautonomní elementy třídy II, převážně se vyskytující v nekódujících oblastech genomů trav, ale i některých živočichů, včetně člověka. S autonomními elementy, ze kterých vznikly, mají stejné pouze TIR domény, na základě

kterých lze MITE elementy rozdělit do několika podrodin, např. *Tourist*, *Stowaway* a další (Feschotte a kol., 2002).



Obr. 5: Způsoby transpozice DNA elementů

(A) Mobilní element (TE) je za katalýzy transpozázy vyjmut z (ds) DNA (I) a transponován na jiný chromozóm (II). Vzniklá mezera na chromozómu I je opravena podle homologního chromozómu (I') s pozůstalým TE. (B) Během replikace se na sesterské chromatidě vytváří dceřiná kopie TE. TE je z již replikované oblasti vyjmut, prostřednictvím transpozázy, a přemístěn na místo ještě nereplikované, ve kterém je pak znova replikován (převzato z <http://johnmm.bol.ucla.edu/GMM.htm>).

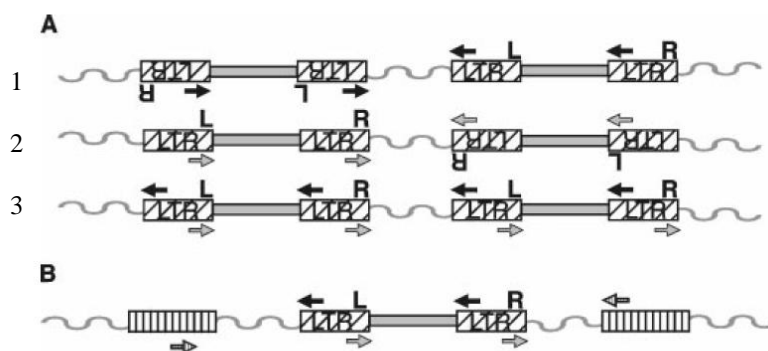
3.2.2.2.2.5.1 IRAP a REMAP markery

Mobilní elementy jsou kvůli své replikační strategii, četnosti výskytu a určitým konzervativním sekvencím využívány pro detekci genomického polymorfizmu. U rostlin se používají např. metody IRAP a REMAP, které jsou založeny na přítomnosti LTR retrotranspozónů. DNA se analyzuje prostřednictvím PCR, během které dochází k amplifikaci genomického úseku ohraničeného dvěma LTR sekvencemi (IRAP), nebo se amplifikuje oblast DNA, která se nachází mezi LTR a SSR sekvencí (REMAP; Kalendar a kol., 1999; Kalendar a Schulman, 2006).

IRAP technika používá při PCR primery navržené tak, aby odpovídaly konzervativní oblasti LTR, reprezentativní pro konkrétní rodinu elementů. Primery mohou nasedat na koncové oblasti této terminální repetice nebo na její středovou část (Obr. 6). Pro snížení množství ampliconů lze ke konci primeru přidat dodatečné selektivní báze (Kalendar

a Schulman, 2006). Počet použitých primerů závisí na způsobu začlenění retroelementů. Ty mohou být k sobě orientovány „head to head“ a „tail to tail“, nebo „head to tail“. V prvním případě stačí pro vytvoření PCR produktu jeden primer odpovídající 5', nebo 3' konci LTR. Pro amplifikaci DNA, ležící mezi retroelementy v uspořádání „head to tail“, musí být použity primery komplementární k oběma koncům LTR. U REMAP techniky se používají vždy dva primery. Jeden je komplementární k LTR oblasti, druhý k mikrosatelitové sekvenci (Obr. 6; viz. kapitola 3.2.2.2.2.4).

Během PCR vznikají amplikony různých délek, které jsou na základě svojí velikosti separovány gelovou elektroforézou. Délka amplifikovaného fragmentu je určena vzdáleností dvou sousedních LTR, případně LTR a SSR. Polymorfismus je způsoben inzercemi či delecemi a projevuje se jako přítomnost/nepřítomnost DNA fragmentů (PCR produktů) v určité oblasti gelu (Kalendar a kol., 1999).



Obr. 6: Amplifikační strategie IRAP (A) a REMAP (B)

LTR retrotranspozóny jsou zobrazeny jako **tmavé obdélníky** (kódující oblasti) ohraničené **LTR** (*long terminal repeats*, dlouhé terminální repetice). **L** a **R** značí levou, respektive pravou LTR sekvenci retroelementu. Mikrosatelity jsou zobrazeny jako **dělené obdélníky**. **Vlnovka** představuje přilehlou DNA. Šipky znázorňují směr amplifikace při použití primeru navrženého k 5' konci (**černá šipka**) nebo ke 3' konci (**světlá šipka**) LTR. **(A)** V sekci 1 a 2 jsou elementy uspořádány způsobem „head to head“/„tail to tail“. Pro vytvoření PCR produktu z oblasti DNA mezi těmito dvěma elementy stačí použít pouze jeden primer navržený ke 3', nebo 5' konci LTR sekvence. V sekci 3 jsou retroelementy orientovány „head to tail“. Pro úspěšnou PCR amplifikaci DNA ležící mezi nimi musí být primery dva, každý komplementární k jinému konci LTR. **(B)** U REMAP se používá vždy jeden primer nasedající na jeden z konců LTR a druhý na přilehlé oblasti mikrosatelitu (převzato z Kalendar a kol., 1999).

3.2.2.2.2.5.2 *iPBS*

PBS doména je součástí LTR retrotranspozónů *Gypsy* a *Copia*, stejně tak neautonomních LARD a TRIM elementů (Obr. 3; Kalendar a kol., 2010). Její sekvence je komplementární ke specifickým tRNA, které svým navázáním na PBS zahajují reverzní transkripci a podílí se tak na šíření retroelementů v genomu. Některé tRNA, nejčastěji $tRNA_i^{Met}$, $tRNA^{Lys}$, $tRNA^{Arg}$, $tRNA^{Ser}$, $tRNA^{Leu}$, se využívají jako primery (Marquet a kol., 1995).

Protože jsou PBS sekvence vysoce konzervativní a existuje jen omezené množství tRNA, které se na ně vážou, jsou PBS primery, navržené z tRNA, efektivní u různých organismů s LTR retrotranspozóny. Produkty *iPBS* amplifikace slouží k detekci polymorfizmu v oblastech mezi retrotranspozóny. Krom toho lze jejich následným sekvencováním a nalezením LTR sekvence, která je 0 až 5 bp od 3' konce PBS, selektovat konkrétní rodinu LTR retrotranspozónů (Kalendar a kol., 2010).

Kalendar a kol. (2010) na pokusu s ječmenem demonstrovali efektivnost *iPBS* ve srovnání s dalšími technikami založenými na přítomnosti retrotranspozónů (IRAP, REMAP a S-SAP). V tomto experimentu každý jednotlivě použitý PBS primer při *iPBS* zobrazil zhruba 23 DNA fragmentů, z nichž 15 % bylo polymorfních. Naproti tomu technika IRAP demonstrovala polymorfizmus v rozmezí 10 až 60 %, v závislosti na použitém primeru.

3.2.2.2.2.5.3 *ISBP*

ISBP je flexibilní a vysoce výkonná detekční metoda založená na polymorfizmu v místech inzerce transponovatelných elementů (RBIP, *retrotransposon-based insertion polymorphism*), které se dokážou včlenit i do jiných elementů. Vznikají tak unikátní místa inzerce ME, jejichž sekvence je získávána sekvencováním částí genomu, např. konců BAC klonů (Paux a kol., 2006). Software *IsbpFinder* umožňuje automatickou detekci takovýchto inzerčních míst a navrhuje k nim vhodné primery pro PCR amplifikaci.

ISBP jsou univerzální dominantní markery s vysokým stupněm polymorfizmu vhodné pro mapování, MAS a evoluční studie organismů, především organismů s velkým obsahem ME v genomu (Paux a kol., 2010).

3.3 GENETICKÉ MAPOVÁNÍ A TYPY GENETICKÝCH MAP

Genetické mapy zobrazují vzájemnou polohu a vzdálenost markerů/genů v genomu na základě (1) průměrného počtu rekombinací (vazebné nebo rekombinační mapy) nebo (2) fyzické vzdálenosti na chromozómu nebo pozice v sekvenci DNA (fyzické mapy).

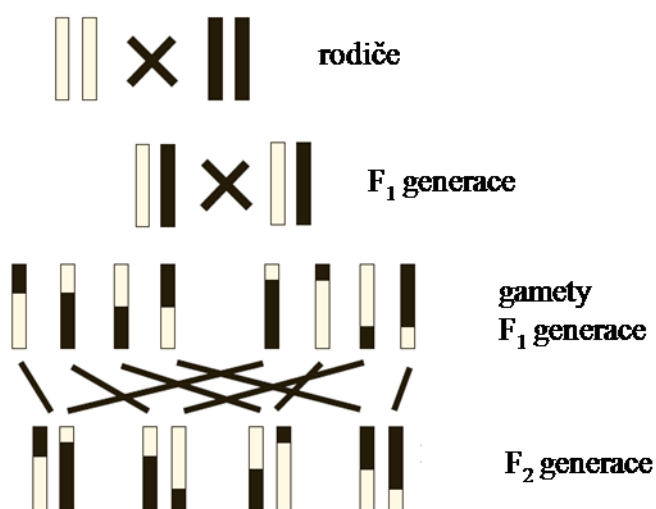
Jak již bylo naznačeno, rozlišujeme mapy vazebné a fyzické. Přesnost vazebných map je ovlivněna četnostmi rekombinací, které se v jednotlivých oblastech chromozómu liší a také schopností jejich detekce. Tento způsob mapování proto není zcela přesný a zachycené vzdálenosti jsou pouze relativní. Výhodou této techniky je schopnost lokalizovat geny pouze na základě fenotypových znaků. Většího stupně rozlišení a přesnosti dosáhneme fyzickým mapováním. To umožňuje přesné určení vzájemné pozice markerů a jejich vzdálenosti na chromozómu nebo molekule DNA. Jsou-li markery v těsné vazbě s fenotypem, lze takto „ohraničené“ geny rychle lokalizovat, izolovat a následným klonováním zpřístupnit studiu dalšími metodami.

3.3.1 Vazebné mapy

Vazebné mapování je založeno na analýze vazeb mezi geny/markery. Podle třetího Mendelova zákona o volné kombinovatelnosti alel se alely během meiózy rozcházejí nezávisle na sobě do dvou gamet. Výjimkou jsou geny ve vazbě. Vazba genů/markery vyjadřuje pravděpodobnost, s jakou budou při rekombinaci tyto dva geny/markery přeneseny společně. Čím jsou blíže u sebe, tím je tato pravděpodobnost větší a vazba silnější. Jednotkou genetické vzdálenosti je 1 Morgan [M], respektive 1 centiMorgan [cM], který představuje vzdálenost (mezi dvěma geny/markery) odpovídající 1% četnosti rekombinace mezi nimi (Morgan, 1915; Weising a kol., 2005b). U člověka v průměru 1 cM odpovídá zhruba 1 Mb. Tato korelace však neplatí po celé délce chromozómu. A to proto, že na chromozómech jsou místa s odlišnou „náchylností“ k rekombinaci (*crossing-overu*), což vytváří disproporci mezi genetickými a fyzickými mapami (Snustad a Simmons, 2009).

Pro konstrukci genetických map se používají mapovací populace vzniklé z křížení kontrastních rodičů, ideálně v homozygotním stavu. U rostlin, kde je situace jednodušší, protože je možno získat velké množství potomků z jednoho křížení, lze proces tvorby vazebných map rozdělit do několika kroků. Na začátku je třeba vybrat homozygotní rodiče, kteří jsou polymorfni ve sledovaném znaku. Volba mapovací populace závisí na rostlinném

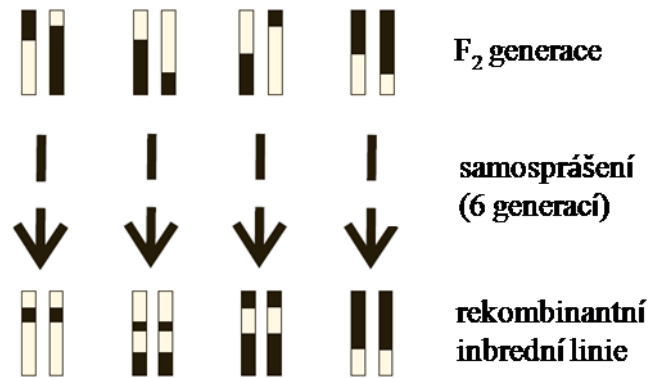
materiálu (samosprašné/cizosprašné rostliny). V tomto případě se nejčastěji používají mapovací populace F_2 nebo rekombinantní inbrední linie (RIL). **F_2 populace** (Obr. 7) je odvozena křížením homozygotních rodičů, jejichž potomci jsou, na základě Mendelova zákona o uniformitě F_1 jedinců, stejného genotypu a podobného fenotypu. Rostliny F_1 generace jsou samosprašeny. Během meiotického dělení dochází k rekombinaci mezi heterozygotními chromozómy, což vede k produkci potomků (F_2) s odlišnou (rekombinovanou) genetickou informací. Nevýhodou je, že F_2 populaci nelze přemnožovat (Schneider, 2005).



Obr: 7: Schéma přípravy F_2 mapovací populace

(upraveno podle Schneider, 2005)

RIL (Obr. 8) jsou konstruovány z F_2 jedinců samosprašením po dobu nejméně šesti generací. Tímto procesem je dosaženo téměř homozygotního potomstva a dojde k takzvané fixaci znaků. V dalších generacích již prakticky nedochází k segregaci znaků, takže se linie mohou libovolně dlouho přemnožovat. Kvůli většímu počtu meiotických dělení, před dosažením homozygotního stavu, je zde oproti F_2 populaci vyšší stupeň rekombinací. Ten umožňuje tvorbu map s vyšším rozlišením (Schneider, 2005). Pro korekci genetických vzdáleností u RIL populací a pro jejich vztažení k F_2 mateřské populaci se nejčastěji používá Haldanova (Haldane, 1919) nebo Kosambiho funkce (Kosambi, 1944).



Obr. 8: Schéma přípravy rekombinantní inbrední linie (RIL)
(upraveno podle Schneider, 2005)

3.3.1.1 QTL mapování

Lokusy ovlivňující kvantitativní znaky (QTL, *quantitative trait loci*) jsou oblasti na chromozómech, s jedním nebo více geny, které se různou měrou podílejí na projevu kvantitativních znaků. Mezi zemědělsky významné kvantitativní znaky, ovlivňované více geny, patří výška rostliny, doba kvetení, tolerance ke stresu, odolnost vůči chorobám a škůdcům, kvalita zrna a především výnos (Börner a kol., 2002; Slafer, 2003). Výnos je komplexní znak, který lze rozdělit do tří komponent: množství klasů na m^2 , počet zrn na klas a váhu tisíce zrn. Dědivost výnosu jako celku je nízká a výrazně ovlivňována podmínkami prostředí. To však neplatí pro jednotlivé komponenty, u kterých je situace přesně opačná (Cuthbert a kol., 2008).

Genetika výnosu je intenzivně studována (Hai a kol., 2008; Röder a kol., 2008; Slafer, 2003; Slafer a Araus, 2007). QTL výnosu a jeho prvků byly zamapovány téměř na všech chromozómech pšenice (Börner a kol., 2002). Geny QTL lokusů, ohraničené DNA markery, mohou být prostřednictvím transgenních technologií vnášeny do jiných rostlinných druhů a podílet se tak na zlepšení jejich fenotypového projevu daného znaku (Mohan a kol., 1997). Nebo se markery v těsné vazbě na QTL dají použít jako diagnostické pro MAS ve šlechtění (Mohan a kol., 1997).

3.3.2 Fyzické mapy

Fyzické mapy zobrazují reálné uspořádání genetických komponent (geny, markery, restriční místa) na spiralizovaném chromozómu (cytogenetické mapy) nebo na vlákne DNA (deleční, fyzické kontigové a sekvenční mapy). Takže na základě typu použitého mapovacího templátu dělíme fyzické mapy na cytogenetické, deleční, restriční, kontigové a sekvenční. Vzdálenost mezi dvěma markery se vyjadřuje v párech bází [bp]. Výjimkou jsou cytogenetické mapy, ve kterých se vzdálenost udává v mikrometrech [μm] nebo v procentech daného chromozómu či jeho ramene. Při delečním mapování se markery lokalizují do tzv. binů. Biny jsou oblasti chromozómu vymezené sousedními zlomy (*breakpoints*). Pozice zlomu se vyjadřuje jako vzdálenost od centromery vzhledem k délce kompletního ramene chromozómu (Qi a kol., 2004).

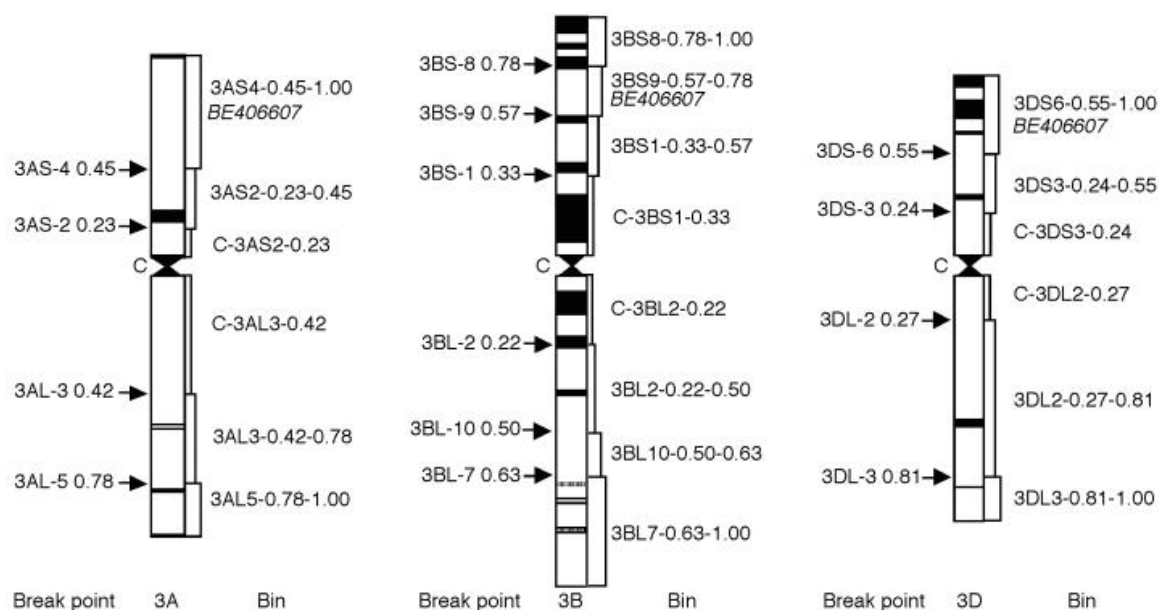
3.3.2.1 Cytogenetické mapy

Cytogenetické mapování využívá jako markery odlišnosti mezi jednotlivými chromozómy v superspiralizovaném stavu (metafázní a pachyténní chromozómy; de Jong a kol., 1999). Základními morfologickými markery jsou velikost, poloha centromery a sekundární konstriktce a délka ramen. Tato kritéria však nejsou pro přesnou identifikaci jednotlivých chromozómů vždy dostatečná. S použitím cytogenetických metod (pruhování - *banding*, ISH; Fransz a kol., 1996; Talia kol., 2010) lze ramena chromozómů podrobněji identifikovat a použit je pro mapování dalších markerů, genů a jiných nukleotidových sekvencí. Jednotkou vzdálenosti na těchto mapách je pozice na chromozomálním rameni, udávaná v %, nebo vzdálenost dvou markerů v μm .

3.3.2.2 Deleční mapy

Deleční mapování se používá pro lokalizaci genů a molekulárních markerů na specifické oblasti chromozómu, tzv. biny (Obr. 9). Mapování se provádí pomocí delečních linií polyploidních rostlin, které tolerují ztrátu chromozómu nebo jeho části. Každá deleční linie obsahuje chromozóm deletovaný v odlišné vzdálenosti od centromery. Proto čím více linií, tím přesnější lokalizace. Poloha genu/RFLP/AFLP/PCR produktu se detekuje fluorescenčně nebo radioaktivně značenou sondou. Na základě přítomnosti/nepřítomnosti hybridizačního signálu, v jednotlivých delečních liniích, zjistíme oblast výskytu dané sekvence. Jestliže nedojde k hybridizaci, je to znamení toho, že se hledaná sekvence vyskytuje v deletovaných oblastech daných linií.

Deleční mapování je užitečné pro lokalizaci genů a jiných specifických sekvencí. Používá se při komparativním mapování, strukturních analýzách a k zahuštění vazebných map (Qi a kol., 2004; Serizawa a kol., 2001; Tsujimoto a kol., 2001).



Obr. 9: Deleční mapa – umístění EST do binů tří chromozómů pšenice

Chromozómy skupiny 3 pšenice (*Triticum aestivum* L.). **Break point** jsou oblasti chromozómu, ve kterých došlo ke zlomům a následným delecím částí ramen. Rozsah delecce se v každé deleční linii liší. **Biny** jsou oblasti mezi sousedními zlomy. Jejich poloha se určuje jako vzdálenost od centromery vzhledem ke kompletní délce daného ramene. Čím více zlomů, tím menší biny a větší rozlišení deleční mapy (převzato z Qi a kol., 2004).

3.3.2.3 Restrikční a kontigové mapy

Restrikční mapy využívají jako markery polohu restrikčních míst. Vzdálenost mezi jednotlivými místy se uvádí v počtu nukleotidů. Při restrikčním mapování se vychází z jednotlivých chromozómů, z nukleových kyselin organel, z fragmentů připravených prostřednictvím PCR nebo z BAC (*bacterial artificial chromosome*; Luo a kol., 2003; McPherson a kol., 2001) a YAC (*yeast artificial chromosome*) klonů (Fonstein a Haselkorn, 1995; Venter a kol., 1996). V poslední době se nejčastěji používá fingerprintování pomocí „Snap-shot“ kitu, separace na kapilárních elektroforézách a skládání kontigů na základě

identifikovaných překryvů testovaných DNA fragmentů (Luo a kol., 2003). Tento přístup umožňuje konstrukci fyzických map u velkých a komplexních genomů, např. pšenice (Paux a kol., 2008)

3.3.2.4 Sekvenční mapy

Sekvenční mapy jsou ve srovnání s výše uvedenými mapami nejpodrobnější. Znárodnují uspořádání kompletní nukleotidové sekvence v molekule DNA. Mezi nejstarší techniky sekvencování, schopné stanovit sekvence dlouhé přibližně 300 až 1 000 bází (restrikční fragmenty naklonované v klonovacím vektoru, PCR fragmenty atd.), patří Maxam-Gilbertova metoda, založená na specifické chemické degradaci řetězců nukleových kyselin, a Sangerova metoda, při které je enzymatická syntéza DNA řetězců specificky inhibována. Předpokladem obou metod je stejný počátek všech DNA fragmentů. V posledních ~ 7 letech se objevilo množství nových technik (Pyrosekvencování, Solexa, SOLiD, SMRT atd.) spadajících do tzv. druhé generace sekvencování (*next-generation sequencing*). Ty využívají alternativních přístupů, které vedou především ke zrychlení a zlevnění sekvencování (Gupta, 2008; Mardis, 2008a,b; Shendure a Ji, 2008).

4 Materiál a metodika

4.1 Rostlinný materiál

F₈ RIL mapovací populace vytvořená z F₂ jedinců vzniklých křížením *T. monococcum* ssp. *monococcum* DV92 s *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* G3116. Semena rodičů (DV92 a G3116) a RIL F₈ byla poskytnuta prof. J. Dubcovským (University of California, Davis, USA).

4.2 Přístroje

Dokumentační systém pro analýzu ELFO gelů (Syngene, UK)

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

Chlazená centrifuga Jouan CR4i (Thermo, USA)

Thermocycler C-1000 (Bio-Rad, USA)

Thermocycler gradientový PTC-200 (MJ RESEARCH, USA)

Váhy Scaltec SPO 51 (Scaltec, Německo)

Zdroj, MP-500V Power Supply (Major Science, USA)

Zdroj, Standard Power Pack P25 (Biometra, Německo)

4.3 Chemikálie a roztoky

4.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

10x PCR pufr (40 ml)

4 ml 100 mmol/l Tris-HCl (pH 8,2)

20 ml 500 mmol/l KCl

600 µl 15 mmol/l MgCl₂

0,4 ml 1% Triton X-100

doplnit destilovanou vodou na 40 ml

Nukleotidy (Fermentas, Litva)

100 mmol/l dTTP

100 mmol/l dATP

100 mmol/l dGTP

100 mmol/l dCTP

Cresol red (Sigma-Aldrich, UK)

Sacharóza (Lachema, ČR)

Taq polymeráza (Finzyme, Finsko)

100 µmol/l primery pro IRAP markery (Invitrogen, USA)

Primery pro IRAP markery laskavě poskytl Dr. Ruslan Kalendar (University of Helsinki, Finsko)

4.3.2 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza

5x TBE (1 000 ml)

54 g Tris base

27,5 g kyselina boritá

20 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8)

doplnit destilovanou vodou na 1 000 ml

10% APS - peroxodisulfát amonný (Fluka BioChemika, USA)

40% směs akrylamid : N, N'-metylenbisakrylamid 19 : 1 (Bio-Rad, USA)

10% etidium bromid (Sigma Chemical CO., USA)

TEMED - tetrametyletylendiamin (Bio-Rad, USA)

Velikostní marker, Gene Ruler 100 bp, DNA Ladder Plus (Fermentas, Kanada)

4.4 Metodika

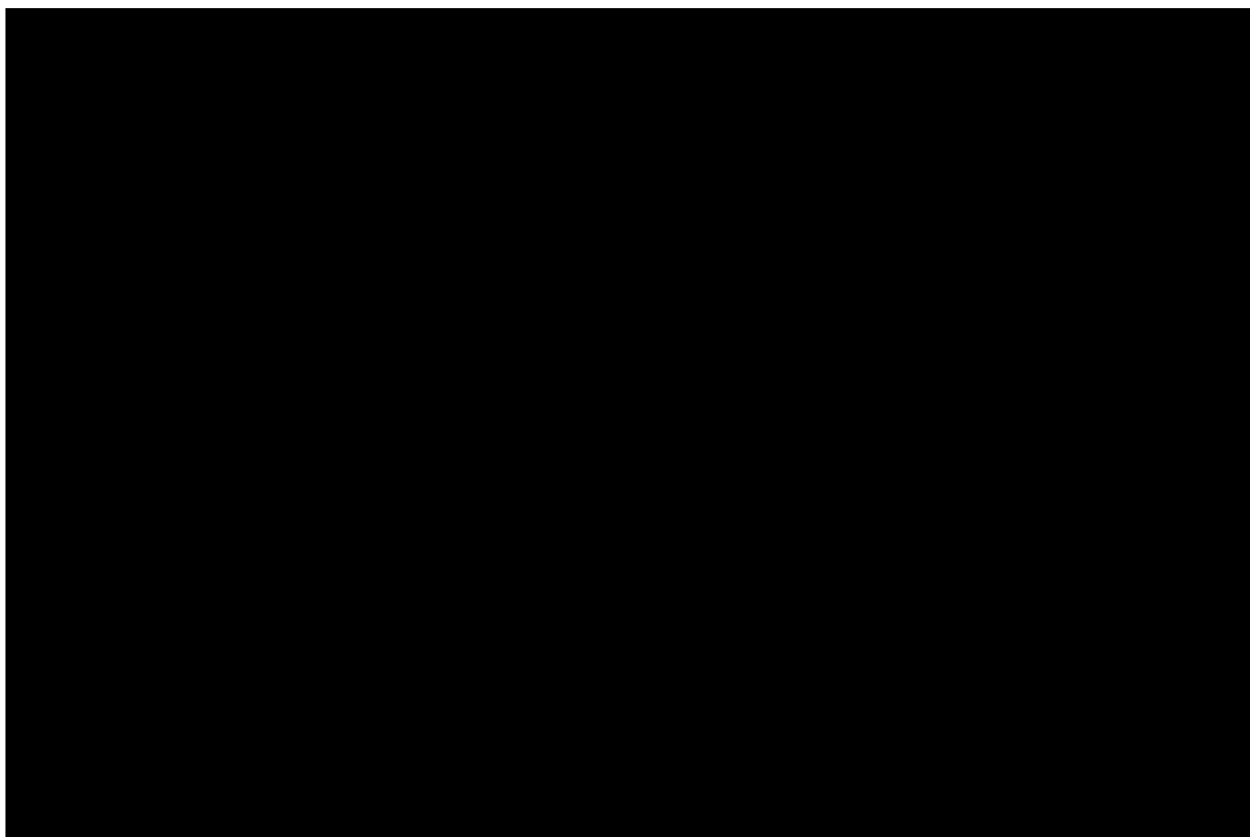
4.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR byla provedena v 25 μ l. Reakční směs obsahovala 1x PCR pufr, 200 μ mol/l každého dNTP, 0,4 μ mol/l primeru (Tab. II), 0,5U *Taq* polymerázy, 0,01% Cresol red, 1,5% Sacharózu a 25 ng, respektive 125 ng DNA, v závislosti na použitém primeru.

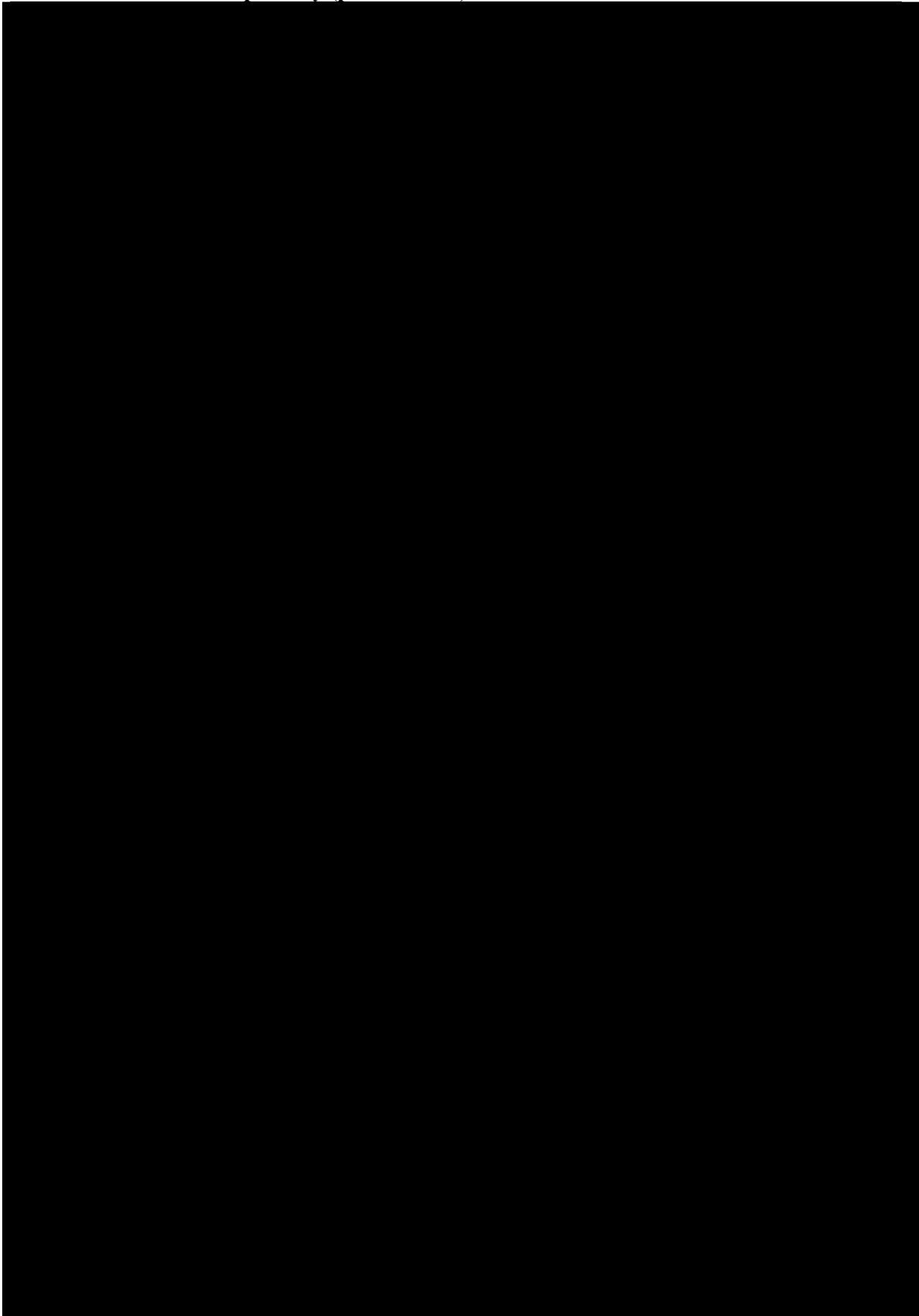
Podmínky PCR pro IRAP primery:

Zahřátí	95°C – 5 min	
Denaturace	95°C – 30s	} 30 cyklů
Přisedání	60°C – 1 min	
Polymerace	72°C – 1 min	
Závěrečná polymerace	72°C – 10 min	

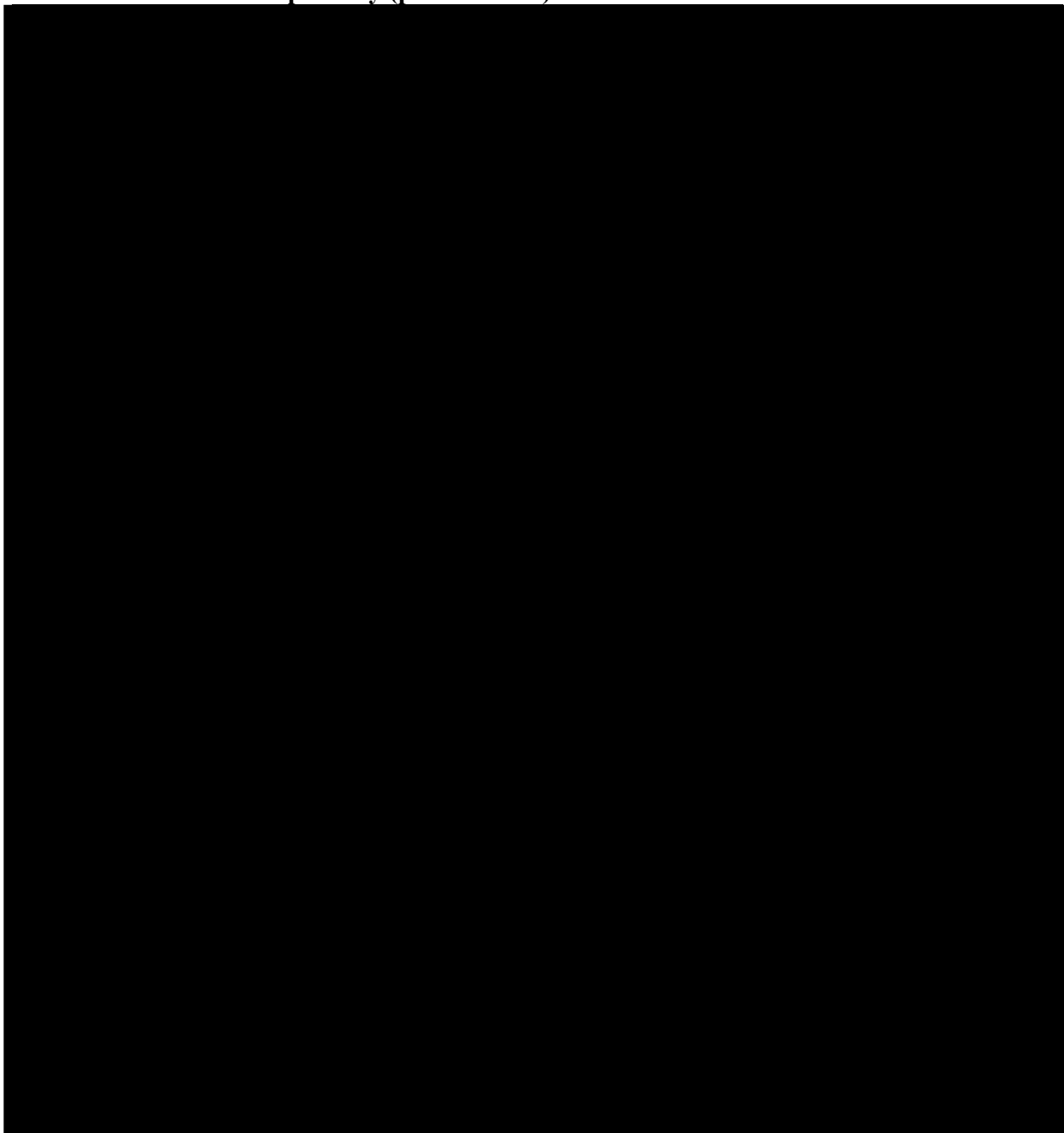
Tab. II: Použité IRAP primery



Tab. II: Použité IRAP primery (pokračování)



Tab. II: Použité IRAP primery (pokračování)



4.4.2 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza

PCR produkty byly separovány pomocí nedenaturující polyakrylamidové elektroforézy na 1mm 3,5% gelu použitím vertikální elektroforetické aparatury MegaGel (C.B.S. Scientific, USA). Gel byl připraven smícháním 15 ml 5x TBE, 15 ml 40% směsi akrylamid : N, N'-metylenbisakrylamid 19 : 1, 110 μ l TEMED, 1 ml 10% APS a doplněn destilovanou vodou na 150 ml. Po polymeraci (~ 45 minut při pokojové teplotě) byl gel vložen do vertikální

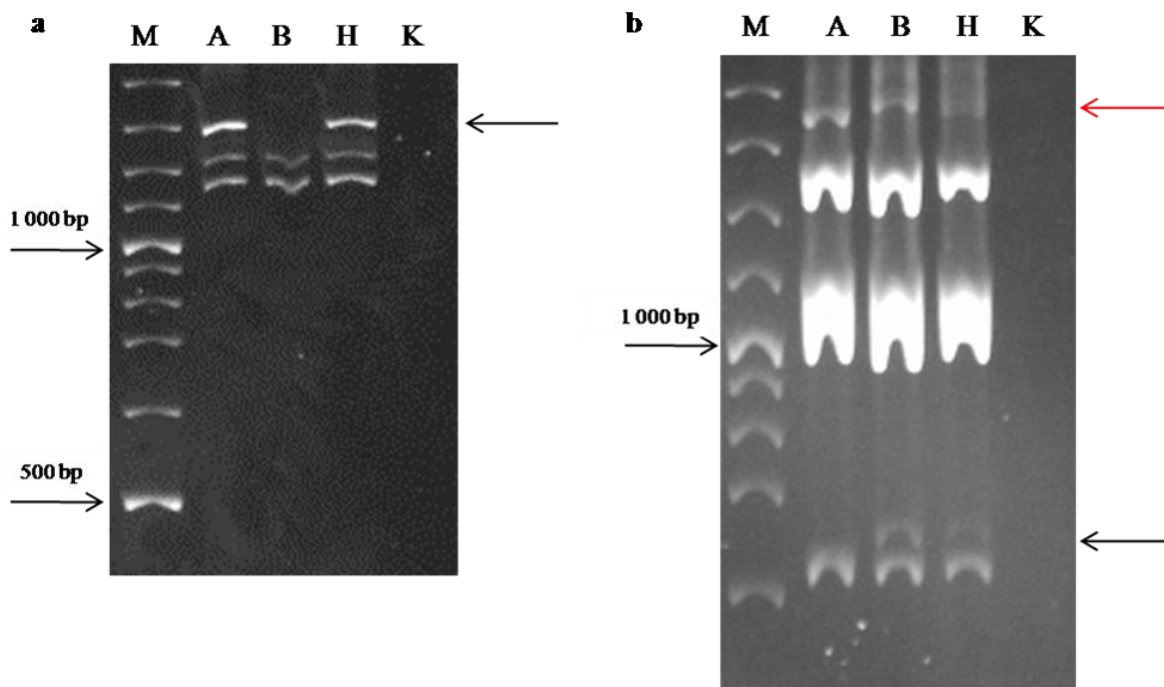
elektroforetické aparatury, jejíž katodový i anodový prostor byl naplněn 1 l 0,5x TBE pufrem. K pufru v anodovém prostoru bylo přidáno 10 μ l 10% etidium bromidu. Aby došlo k nasycení gelu etidium bromidem, byl spuštěn „prerun“, který běžel ~ 1 hodinu při 300 V. Poté byly nanášeny 3 μ l velikostního markeru a 15 μ l vzorku. Separace amplifikované DNA probíhala 60 až 90 min při 350 V. DNA byla vizualizována dokumentačním zařízením Syngene (UK).

5 Výsledky

Celkově bylo testováno 108 IRAP primerů (Tab. II), z toho bylo 56 součástí diplomové práce Mgr. Klocové (2010). Pro získání přesnějšího přehledu o využitelnosti IRAP markerů pro mapování u *T. monococcum* byl tento set doplněn o dalších 52 IRAP primerů, což je tématem této práce. Dále byl v této práci vyhodnocen celý set 108 IRAP primerů.

IRAP primery byly navrženy na konzervativní sekvence 18 rodin LTR retrotranspozónů (Tab. III). Celkově z 22 (20 %) primerů byly amplifikovány fragmenty, které vykazovaly polymorfizmus. Další dva primery, 3111 a 3152, poskytly polymorfnní fragmenty na rodičovských DNA, ale signály se nepovedlo spolehlivě reprodukovat na DNA z linií mapovací populace a proto byly z testování vyřazeny. Počet polymorfnních fragmentů na jednu IRAP reakci se pohyboval v rozmezí 1 až 5 (Obr. 10; Tab. IV). Celkový počet fragmentů nebylo možné přesně stanovit. Fragmenty poměrně často splývaly nebo byly špatně viditelné. Nejvíce zřetelně oddělených fragmentů (17) poskytl IRAP primer 994. Celkem bylo získáno 40 IRAP markerů, z toho jeden (3153) kodominantní (Obr. 10b). Průměrně na jeden IRAP primer připadá 0,37 polymorfnních fragmentů. Tyto markery byly odvozeny ze 14 rodin LTR retrotranspozónů (78 %) z celkových 18 testovaných. Nejvíce IRAP markerů (5) pocházelo z rodin *CEREBA* a *SABRINA* (Tab. III). Bez markeru byly rodiny *ANGELA*, *TAT-1*, *VALERIE* a *WHAM*.

Získané polymorfnní fragmenty byly mapovány na *T. monococcum* mapovací populaci. 27 z nich bylo mapováno úspěšně (Obr. 11). Zbylé markery byly vyřazeny jako artefakty kvůli nesprávné segregaci (χ^2) nebo nemožnosti je reprodukovatelně skórovat na většině linií z mapovací populace. Distribuce mapovaných markerů byla rovnoměrná, s největším počtem 9 markerů na chromozómu 5A a jedním markerem na chromozómu 4A (Obr. 11).



Obr. 10: Příklady polymorfizmů z IRAP primerů

a - primer 3134; **b** - primer 3153; **M** – velikostní marker; **A** – rodič DV92; **B** – rodič G3116; **H** – heterozygot; **K** – negativní kontrola; šipkou značen polymorfizmus: černá – dominantní fragmenty, červená – kodominantní fragmenty

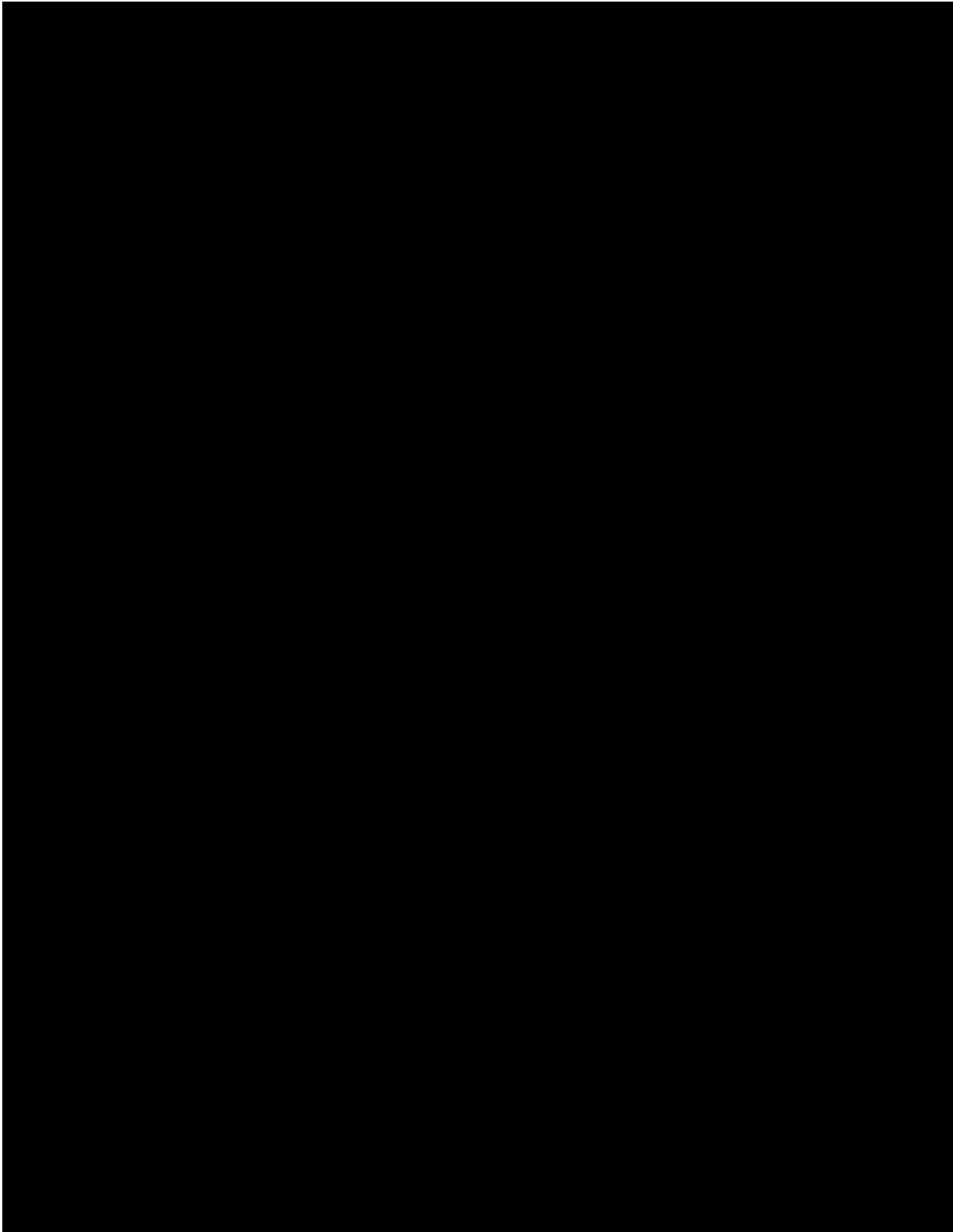
Tab. III: Porovnání polymorfizmu testovaných rodin retrotranspozónů

Rodiny retrotranspozónů	Počet IRAP primerů odvozených z LTR dané rodiny	Počet IRAP markerů
<i>ANGELA</i>	8	0
<i>BARBARA</i>	4	1
<i>BARE-1</i>	7	2
<i>CASPAR</i>	6	1
<i>CEREBA</i>	3	5
<i>DANIELA</i>	3	1
<i>ERIKA</i>	5	1
<i>FATIMA</i>	3	3
<i>JELI</i>	2	2
<i>LAURA</i>	5	2
<i>SABRINA</i>	9	5
<i>SURYA</i>	9	1
<i>TAT-1</i>	5	0
<i>TAT-2</i>	1	1
<i>VALERIE</i>	2	0
<i>WHAM</i>	3	0
<i>WILMA</i>	6	1
<i>WIS</i>	1	2

Tab. IV: Analýza DNA polymorfizmu v populaci *T. monococcum* pomocí techniky IRAP

IRAP primer	Počet polymorfních fragmentů	Rodina retrotranspozónu, k jehož LTR sekvenci byl navržen IRAP primer
554	2	<i>BARE-1</i>
675	1	neurčena
679	1	<i>SURYA</i>
692	5	<i>CEREBA</i>
994	1	neurčena
1032	2	
1105	2	
1107	1	
1108	3	
1181	2	
2106	2	
3109	1	<i>ERIKA</i>
3116	1	<i>SABRINA</i>
3117	4	
3122	3	<i>FATIMA</i>
3124	1	<i>CASPAR</i>
3134	1	<i>BARBARA</i>
3136	1	<i>TAT-2</i>
3139	1	<i>WILMA</i>
3145	1	<i>DANIELA</i>
3149	2	<i>LAURA</i>
3153	2	<i>JELI</i>

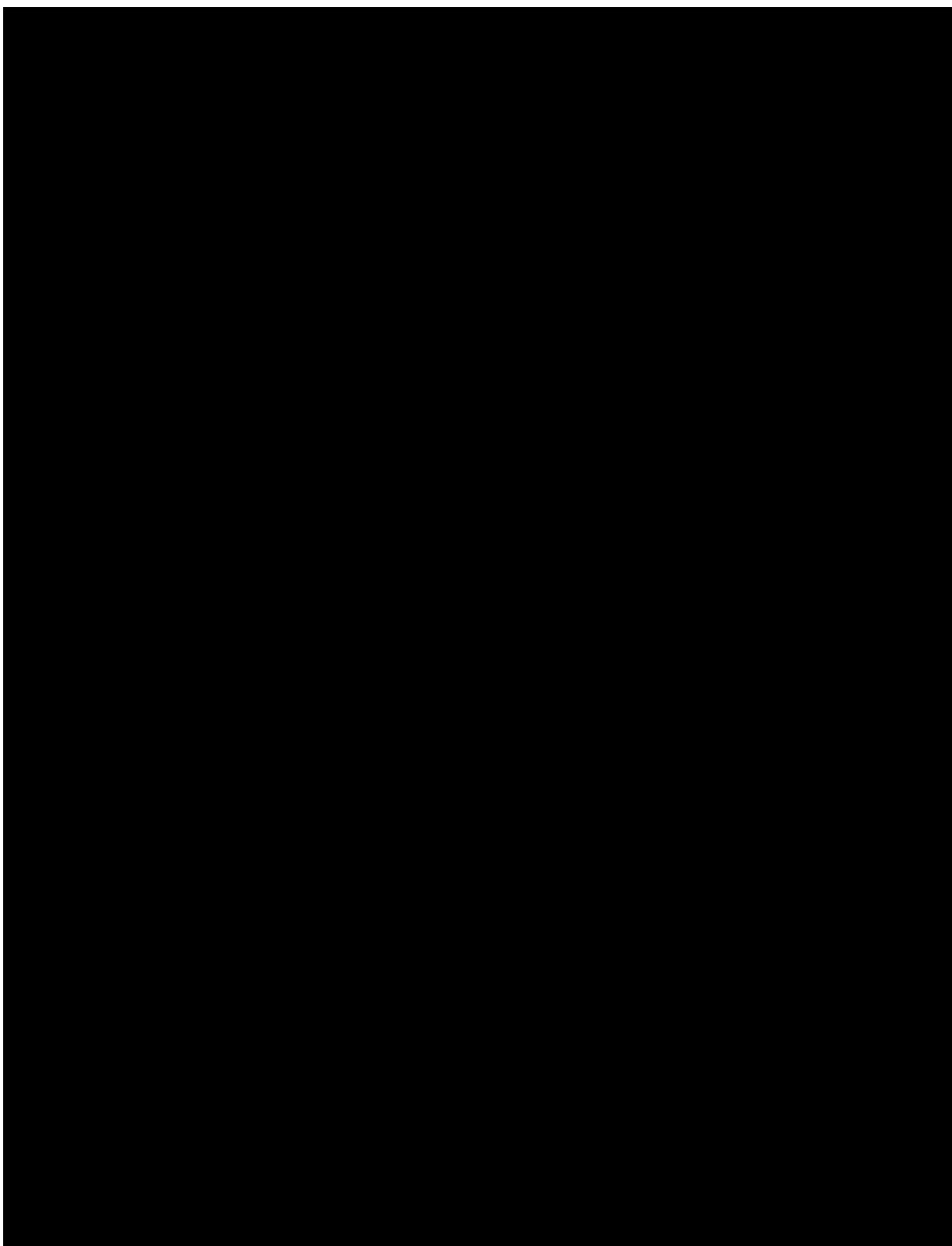
Chromozóm 1A



Obr. 11: Genetická mapa sedmi chromozómů *Triticum monococcum* L.

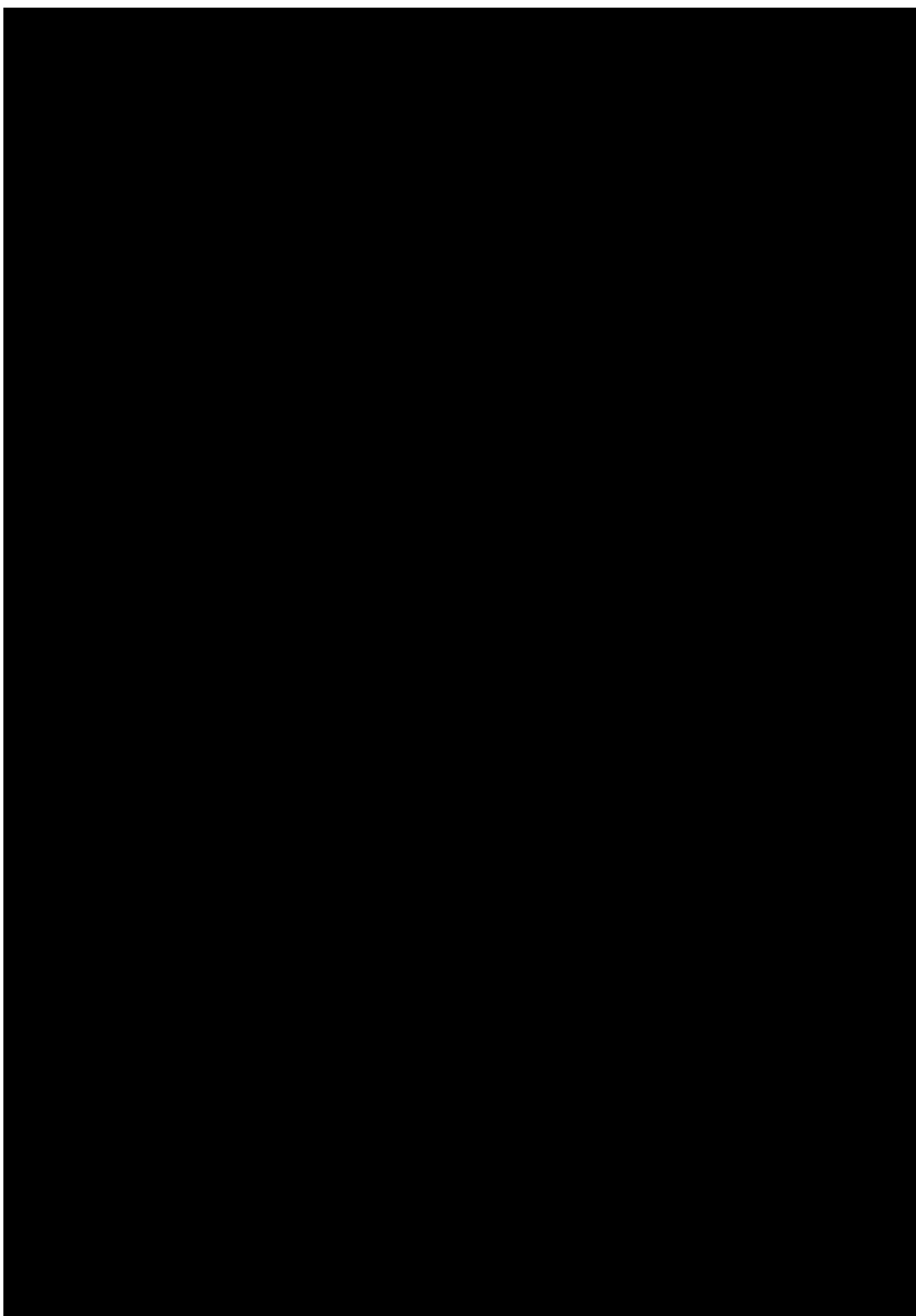
Na levé straně mapy jsou vzdálenosti jednotlivých markerů [cM], na pravé straně jsou jednotlivé markery. IRAP markery jsou označeny šipkou.

Chromozóm 2A



Obr. 11: Genetická mapa sedmi chromozómů *Triticum monococcum* L. (pokračování)

Chromozóm 3A



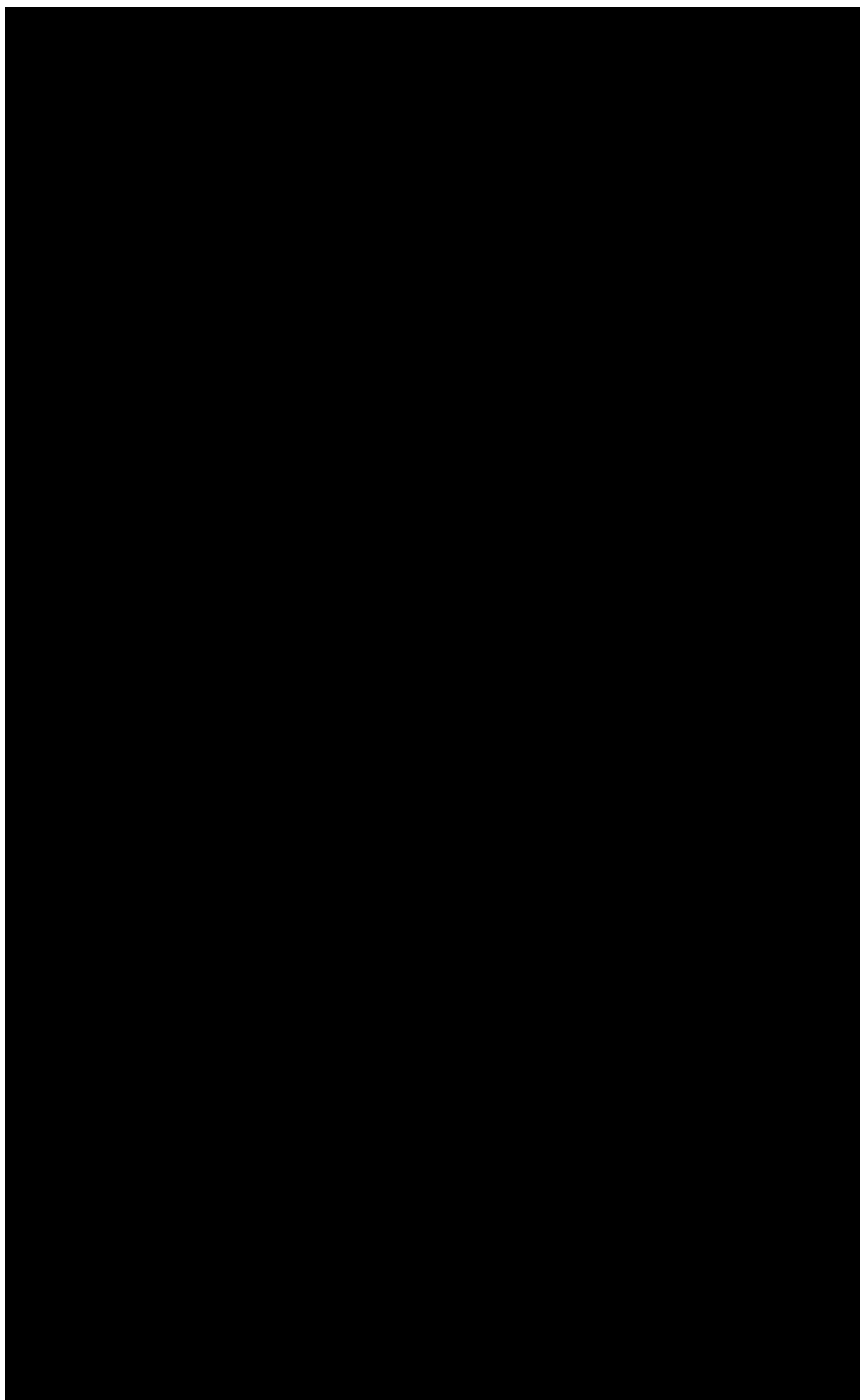
Obr. 11: Genetická mapa sedmi chromozómů *Triticum monococcum* L. (pokračování)

Chromozóm 4A



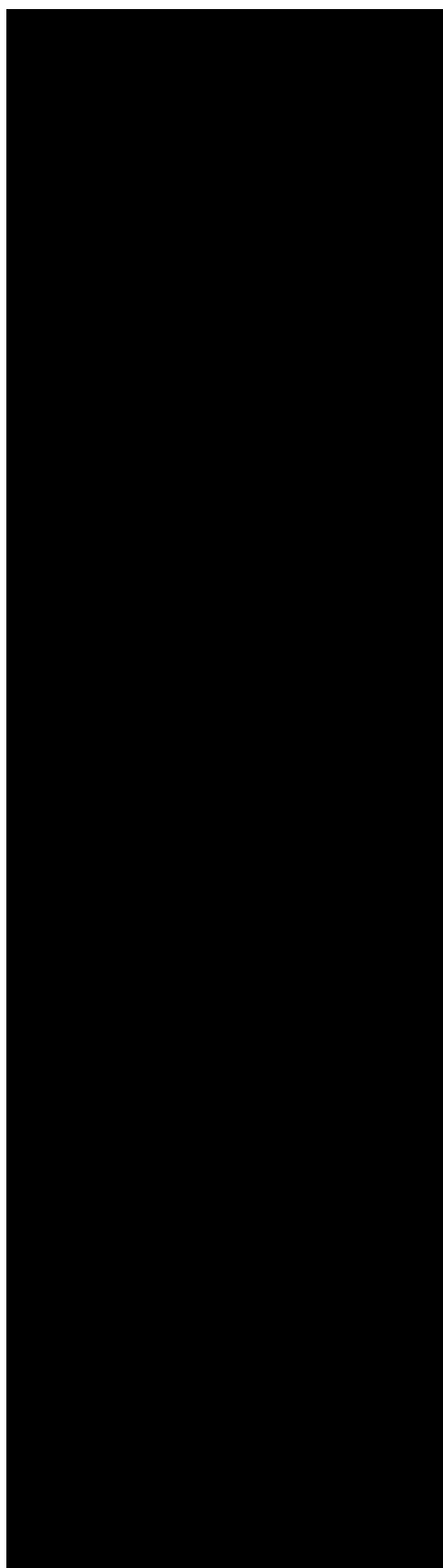
Obr. 11: Genetická mapa sedmi chromozómů *Triticum monococcum* L. (pokračování)

Chromozóm 5A



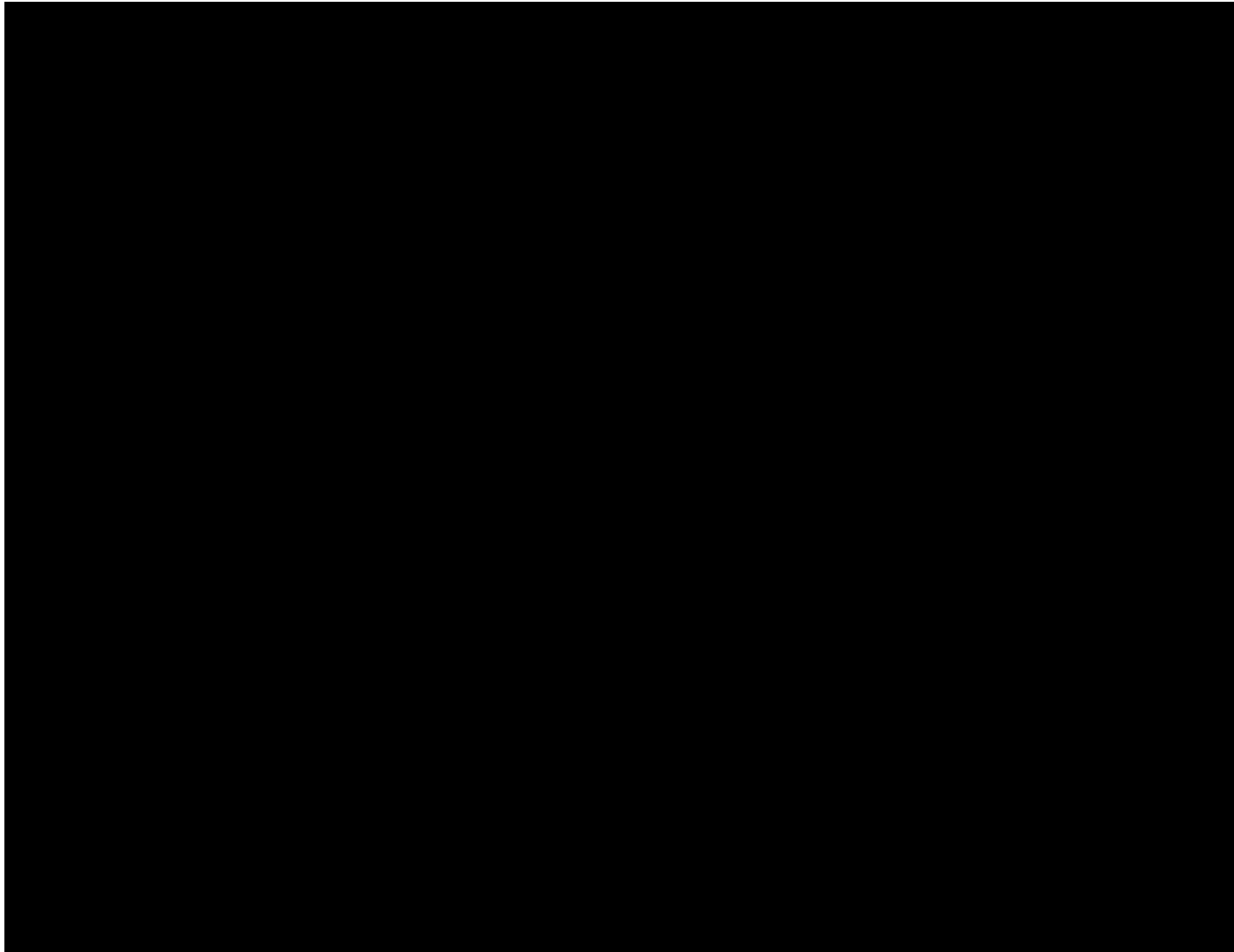
Obr. 11: Genetická mapa sedmi chromozómů *Triticum monococcum* L. (pokračování)

Chromozóm 6A



Obr. 11: Genetická mapa sedmi chromozómů *Triticum monococcum* L. (pokračování)

Chromozóm 7A



Obr. 11: Genetická mapa sedmi chromozómů *Triticum monococcum* L. (pokračování)

6 Diskuze

LTR retrotranspozóny jsou kvůli svojí četnosti výskytu, replikační strategii a konzervativním LTR sekvencím využívány mnohými technikami k detekci polymorfizmu v genomu rostlin, nejčastěji však ISBP (Paux a kol., 2010). Pro odvozování ISBP markerů je nevyhnutelnou podmínkou znalost sekvence oblasti inserce retrotranspozónu, která u většiny organismů není splněna. Naproti tomu IRAP markery vyžadují pouze znalost sekvence LTR pro různé rodiny LTR retrotranspozónů. Sekvence těchto se, například pro pšenici, dají získat z databází retroelementů, jakou je např. TREP (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/blast.shtml>) databáze pro pšenici. Technika IRAP je založena na PCR amplifikaci neznámé nukleotidové sekvence mezi dvěma LTR retrotranspozóny. Prostřednictvím IRAP byl úspěšně detekován DNA polymorfizmus např. u ječmene (Kalendar a kol., 1999), spartiny (Baumel a kol., 2002), hlaváčku (Boronnikova a Kalendar, 2010) a slunečnice (Vukich a kol., 2009). U pšenice zatím tyto markery nebyly intenzivně využívány a jejich potenciál pro mapování agronomicky významných znaků je předmětem praktické části této práce.

Celkem bylo otestováno 108 IRAP primerů z 18 rodin retrotranspozónů. Pouze u 22 (20 %) z nich byl pozorován polymorfizmus mezi rodiči a v rámci mapovací populace. Nejvíce bylo dosaženo pěti polymorfních fragmentů na jeden IRAP (IRAP primer 692). Tato hodnota se výrazně liší od výsledků Kalendar a kol. (1999), kteří technikou IRAP analyzovali polymorfizmus mezi druhy *Hordeum*. Použitím kombinace dvou primerů získali až 18 polymorfních fragmentů. Celkový počet fragmentů přitom byl 27. V případě mapovací populace *T. monococcum* většinou nebylo možné přesně stanovit celkový počet fragmentů. Ty často splývaly nebo byly špatně viditelné. Nejvíce (zřetelně odlišitelných) fragmentů (17) na jednu IRAP reakci bylo pozorováno u IRAP primeru 994. Vukich a kol. (2009) studovali prostřednictvím techniky IRAP genetickou variabilitu uvnitř rodu *Helianthus*. Byl pozorován výrazný rozdíl (až 19 fragmentů) ve stupni polymorfizmu mezi divokou a kulturní formou *Helianthus annuus*. U divoké formy byly při některých kombinacích primerů polymorfní všechny fragmenty (60). Míra polymorfizmu souvisí s aktivitou rodiny, k jejíž sekvenci byl navržen IRAP primer. Nedávno aktivní rodiny vyprodukovaly další kopie retrotranspozónů, které se včlenily do nových oblastí DNA a generují tak polymorfní fragmenty. V případě *T. monococcum* bylo analyzováno 18 rodin. Jejich srovnání však nemá dostatečně vypovídající hodnotu, protože počet testovaných IRAP primerů byl mezi rodinami značně variabilní. Navíc u některých primerů nebyla určena rodina retrotranspozónů, k jejíž

konzervativní sekvenci byl primer navržen. Pro přesné porovnání aktivity rodin LTR retrotranspozónů je nutné provést další testy tak, aby počet testovaných IRAP primerů byl v rámci rodin rovnoměrný a výsledky porovnatelné.

Do mapovací populace *T. monococcum* bylo do této doby zamapováno 726 markerů z různých zdrojů (nepublikované výsledky). Testované IRAP markery poskytly celkově 27 spolehlivých markerů s rovnoměrnou distribucí v genomu pšenice *T. monococcum* (Obr. 11). Toto zjištění ukazuje na potenciál IRAP markerů jako markerů pro doplnění genetické mapy. Avšak množství práce nutné k identifikaci jednoho markeru, kde je nutné otestovat v průměru 4 primery, je řadí na úroveň SSR markerů. Nemožnost jejich použití pro „high-throughput“ platformy značně znevýhodňuje jejich použití. Nadto mají IRAP markery diskutabilní reprodukovatelnost, protože relativně velký počet identifikovaných polymorfních fragmentů (13) nebylo možné spolehlivě mapovat. Z tohoto důvodu IRAP markery u pšenice nemohou být považovány za markery první volby, ale jako markery na zahustění mapy. Především u organismů, u kterých není dostatek jiných typů markerů, jsou dobře použitelné.

7 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat rešerši o markerovacích a mapovacích technikách a otestovat vhodnost IRAP markerů pro zahuštění genetické mapy a mapování výnosu a jeho prvků u *Triticum monococcum* L.

Potenciální IRAP markery byly testovány na RIL mapovací populaci, která byla odvozena z křížení *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* G3116 s *T. monococcum* ssp. *monococcum* DV92. Celkem bylo analyzováno 108 IRAP primerů, jejichž sekvence byla navržena k LTR oblastem retrotranspozónů, které reprezentovaly 18 rodin. Polymorfni DNA fragmenty (1 až 5) byly pozorovány pouze v případě 22 IRAP primerů. Bylo tak získáno 40 IRAP markerů, které byly použity k zahuštění genetické mapy *T. monococcum*.

Na základě publikací o efektivní detekci genetické variability prostřednictvím techniky IRAP se zdály být IRAP markery nadějným nástrojem pro zahuštění mapy a mapování výnosu u *T. monococcum*. Získaná data tomu však nenasvědčují. Kvůli tomu, že IRAP markery vykazují relativně nízký stupeň polymorfizmu a společně s pracností a relativně nízkou reprodukovatelností, se nestanou markery první volby. Dále nemožnost jejich použití pro „high-throughput“ přístupy je znevýhodňuje oproti markerům, jako jsou SNP. Ale díky rovnoměrné distribuci v genomu, jednoduchosti odvozování a taky kvůli tomu, že nevyžadují znalost kompletní genomické sekvence, jsou IRAP markery dobře použitelné pro zahuštění existujících genetických map.

8 Literatura

- AGARWAL, M., SHRIVASTAVA, N., PADH, H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant. Cell Rep.* 27: 617 – 631.
- BAUMEL, A., AINOUCHE, M., KALENDAR, R., SCHULMAN, A.H. (2002): Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (*Poaceae*). *Mol. Biol. Evol.* 19: 1218 – 1227.
- BÖRNER, A., SCHUMANN, E.S., FÜRSTE, A., CÖSTER, H., LEITHOLD, B., RÖDER, M.S., WEBER, W.E. (2002): Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105: 921 – 936.
- BORONNIKOVA, S.V., KALENDAR, R. (2010): Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants. *Russ. J. Genet.* 46: 36 – 42.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314 – 331.
- BROWN, T.A. (2007): Enzymy specificky štěpící DNA – restriční endonukleázy. In: Brown, T.A.: Klonování genů a analýza DNA – Úvod, s. 61 – 78, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- CUTHBERT, J.L., SOMERS, D.J., BRULÉ-BABEL, A.L., BROWN, P.D., CROW, G.H. (2008): Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 117: 595 – 608.
- DEVOS, K.M., GALE, M.D. (1997): Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol. Biol.* 35: 3 – 15.
- DOŠKAŘ, J., ŠMARD, J. (2005): Manipulace s nukleovými kyselinami. In: Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J.: *Metody molekulární biologie*, s. 17 – 28, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno.
- DVOŘÁK, J., AKHUNOV, E.D., AKHUNOV, A.R., DEAL, K.R., LUO, M.C. (2006): Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat. *Mol. Biol. Evol.* 23: 1386 – 1396.

- DVOŘÁK, J., MCGUIRE, P.E., CASSIDY, B. (1988): Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome* 30: 680 – 689.
- DVOŘÁK, J., TERLIZZI, P., ZHANG, H.B., RESTA, P. (1993): The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21 – 31.
- DVOŘÁK, J., ZHANG, H.B. (1990): Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9640 – 9644.
- FESCHOTTE, C., JIANG, N., WESSLER, S.R. (2002): Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat. Rev. Genet.* 3: 329 – 341.
- FEUILLET, C., LANGRIDGE, P., WAUGH, R. (2007): Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet.* 24: 24 – 32.
- FLEGR, J. (2009): Molekulární fylogenetika. In: Flegr, J.: *Evoluční biologie*, s. 447 - 472, Nakladatelství Academia, Praha.
- FONSTEIN, M., HASELKORN, R. (1995): Physical mapping of bacterial genomes. *J. Bacteriol.* 177: 3361 – 3369.
- FRANZ, P.F., ALONSO-BLANCO, C., LIHARSKA, T.B., PEETERS, A.J.M., ZABEL, P., DE JONG, J.H. (1996): High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibres. *Plant J.* 9: 421- 430.
- GILL, K.S., LUBBERS, E.L., GILL, B.S., RAUPP, W.J., COX, T.S. (1991): A genetic-linkage map of *Triticum tauschii* (DD) and its relationship to the D-genome of bread wheat (AABBDD). *Genome* 34: 362 – 374.
- GOJOVÁ, L., KOZÁK, L. (2006): Možnosti využití DNA čipů v molekulární diagnostice dědičných onemocnění. *Klin. Biochem. Metab.* 14: 89 – 95.
- GUPTA, P.K. (2008): Single-molecule DNA sequencing technologies for future genomics research. *Trends Biotech.* 26: 602 – 611.
- HAI, L., GUO, H., WAGNER, C., XIAO, S., FRIEDT, W. (2008): Genomic regions for yield and yield parameters in Chinese winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes tested under varying environments correspond to QTL in widely different wheat materials. *Plant Scien.* 175: 226 – 232.

- HALDANE, J.B.S. (1919): The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8: 299-309.
- HALIASSOS, A., CHOMEL, J.C., TESSON, L., BAUDIS, M., KRUIH, J., KAPLAN, J.C., KITZIS, A. (1989): Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic. Acids Res.* 17: 3606.
- HASS-JACOBUS, B., JACKSON, S.A. (2005): Physical mapping of plant chromosomes. In: Meksem, K., Kahl, G., (ed.): *The handbook of plant genome mapping*, s. 133 - 150, Strauss Offsetdruck GmbH, Mörlenbach.
- HEUN, M., SCHÄFER-PREGL, R., KLAWAN, D., CASTAGNA, R., ACCERBI, M., BORGHI, B., SLAMINI, F. (1997): Site of Einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* 278: 1312 – 1314.
- DE JONG, J.H., FRANZ, P., ZABEL, P. (1999): High resolution FISH in plants – techniques and applications. *Trends Plant Sci.* 4: 258 – 263.
- KALENDAR, R., ANTONIUS, K., SMÝKAL, P., SCHULMAN, A.H. (2010): iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor. Appl. Genet.* 121: 1419 - 1430.
- KALENDAR, R., GROB, T., REGINA, M., SUONIEMI, A., SCHULMAN, A. (1999): IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* 98: 704 – 711.
- KALENDAR, R., SCHULMAN, A. (2006): IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols* 1: 2478 – 2484.
- KALENDAR, R., VICIENT, C.M., PELEG, O., ANAMTHAWAT-JONSSON, K., BOLSHOY, A., SCHULMAN, A.H. (2004): Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes. *Genetics* 166: 1437 – 1450.
- KELLER, B., FEUILLET, C., YAHIAOUI, N. (2005): Map-based isolation of disease resistance genes from bread wheat: cloning in a supersize genome. *Genet. Res.* 85: 93 – 100.
- KLOCOVÁ, B. (2010): Mapování genů kvantitativních znaků u diploidní pšenice *T. monococcum* L. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- KOSAMBI, D.D. (1944): The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics* 12: 172 - 175.

- KUMAR, L.S. (1999): DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotech. Adv.* 17: 143 – 182.
- LEM, P., LALLEMAND, J. (2003): Grass consensus STS markers: an efficient approach for detecting polymorphism in *Lolium*. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1113 – 1122.
- LI, Y.C., KOROL, A.B., FAHIMA, T., BEILES, A., NEVO, E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11: 2453 – 2465.
- LUO, M.C., THOMAS, C., YOU, F.M., HSIAO, J., OUYANG, S., BUELL, C.R., MALANDRO, M., MCGUIRE, P.E., ANDERSON, O.D., DVOŘÁK, J. (2003): High-throughput fingerprinting of bacterial artificial chromosomes using the SNaPshot labeling kit and sizing of restriction fragments by capillary electrophoresis. *Genomics* 82: 378 – 389.
- MARDIS, E.R. (2008a): Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9: 387 – 402.
- MARDIS, E.R. (2008b): The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* 24: 133 – 141.
- MARQUET, R., ISEL, C., EHRESMANN, C., EHRESMANN, B. (1995): tRNAs as primer of reverse transcriptases. *Biochimie* 77: 113 – 124.
- MOHAN, M., NAIR, S., BHAGWAT, A., KRISHNA, T.G., YANO, M., BHATIA, C.R., SASAKI, T. (1997): Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol. Breed.* 3: 87 – 103.
- MORGAN, T.H. (1915): Localization of the hereditary material in the germ cells. *Natl. Acad. Sciences* 1: 420 – 429.
- MUELLER, U.G., WOLFENBARGER, L.L. (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14: 389 – 394.
- NOGUERA, F.J., CAPEL, J., ALVAREZ, J.I., LOZANO, R. (2005): Development and mapping of a codominant SCAR marker linked to the *andromonoecious* gene of melon. *Theor. Appl. Genet.* 110: 714 – 720.

- PALAZZOLO, M.J., SAWYER, S.A., MARTIN, C.H., SMOLLER, D.A., HARTL, D.L. (1991): Optimized strategies for sequence-tagged-site selection in genome mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8034 – 8038.
- PAUX, E., FAURE, S., CHOLET, F., ROGER, D., GAUTHIER, V., MARTINANT, J.P., SOURDILLE, P., BALFOURIER, F., 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 Biotech. J.* 8: 196 – 210.
- PAUX, E., ROGER, D., BADAIEVA, E., GAY, G., BERNARD, M., SOURDILLE, P., FEUILLET, C. (2006): Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. *Plant J.* 48: 463 – 474.
- PAUX, E., SOURDILLE, P., SALSE, J., SAINTENAC, C., CHOLET, 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.
- QI, L.L., ECHALIER, B., CHAO, S., LAZO, G.R., BUTLER, G.E., ANDERSON, O.D., AKHUNOV, E.D., DVOŘÁK, J., LINKIEWICZ, A.M., RATNASIRI, A., DUBKOVSKY, J., BERMUDEZ-KANDIANIS, C.E., GREENE, R.A., KANTETY, R., LA ROTA, C.M., MUNKVOLD, J.D., SORRELLS, S.F., SORRELLS, M.E., DILBIRLIGI, M., SIDHU, D., ERAYMAN, M., RANDHAWA, H.S., SANDHU, D., BONDAREVA, S.N., GILL, K.S., MAHMOUD, A.A., MA, X.F., MIFTAHUDIN, GUSTAFSON, J.P., CONLEY, E.J., NDUATI, V., GONZALEZ-HERNANDEZ, J.L., ANDERSON, A.J., PENG, J.H., LAPITAN, N.L.V., HOSSAIN, K.G., KALAVACHARLA, V., KIANIAN, S.F., PATHAN, M.S., ZHANG, D.S., NGUYEN, H.T., CHOI, D.W., FENTON, R.D., CLOSE, T.J., MCGUIRE, P.E., QUALSET, C.O., GILL, B.S. (2004): A chromosome bin map of 16,000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat. *Genetics* 168: 701 – 712.
- RÖDER, M.S., HUANG, X.Q., BÖRNER, A. (2008): Fine mapping of the region on wheat chromosome 7D controlling grain weight. *Funct. Integr. Genomics* 8: 79 – 86.
- SAIKI, R.K., WALSH, P.S., LEVENSON, C.H., ERLICH, H.A. (1989): Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6230 – 6234.

- SERIZAWA, N., NASUDA, S., SHI, F., ENDO, T.R., PRODANOVIC, S., SCHUBERT, I., KÜNZEL, G. (2001): Deletion-based physical mapping of barley chromosome 7H. *Theor. Appl. Genet.* 103: 827 – 834.
- SHENDURE, J., JI, H. (2008): Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotech.* 26: 1135 – 1145.
- SCHNEIDER, K. (2005): Mapping populations and principles of genetic mapping. In: Meksem, K., Kahl, G., (ed.): *The handbook of plant genome mapping*, s. 3 – 21, Strauss Offsetdruck GmbH, Mörlenbach.
- SCHULMAN, A.H. (2007): Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158: 313 – 321.
- SLAFER, G.A. (2003): Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Ann. Appl. Biol.* 142: 117 – 128.
- SLAFER, G.A., ARAUS, J.L. (2007): Physiological traits for improving wheat yield under a wide range of conditions. In: Spiertz, J.H.J., Struik, P.C., van Laar, H.H., (ed.): *Scale and complexity in plant systems research: Gene-plant-crop relations*, s. 147 – 156, Springer.
- SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J. (2009): Chromozómové mapování. In: Mizerová, A., (ed.): *Genetika*, s. 150 - 156, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno.
- SOBIR, OHMORI, T., MURATA, M., MOTOYOSHI, F. (2000): Molecular characterization of the SCAR markers tightly linked to the *Tm-2* locus of the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 101: 64 – 69.
- TALIA, P., GREIZERSTEIN, E., QUIJANO, C.D., PELUFFO, L., FERNÁNDEZ, L., FERNÁNDEZ, P., HOPP, H.E., PANIEGO, N., HEINZ, R.A., POGGIO, L. (2010): Cytological characterization of sunflower by *in situ* hybridization using homologous rDNA sequences and a BAC clone containig highly represented repetitive retrotransposon-like sequences. *Genome* 53: 172 – 179.
- TAUTZ, D., RENZ, M. (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12: 4127 – 4138.
- TSUJIMOTO, H., YAMADA, T., HASEGAWA, K., USAMI, N., KOJIMA, T., ENDO, T.R., OGIHARA, Y., SASAKUMA, T. (2001): Large-scale selection of lines with deletions in chromosome 1B in wheat and applications for fine deletion mapping. *Genome* 44: 501 – 508.

- VENTER, J.C., SMITH, H.O., HOOD, L. (1996): A new strategy for genome sequencing. *Nature* 381: 364 – 366.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407 – 4414.
- VUKICH, M., SCHULMAN, A.H., GIORDANI, T., NATALI, L., KALENDAR, R., CAVALLINI, A. (2009): Genetic variability in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and in the *Helianthus* genus as assessed by retrotransposon-based molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 119: 1027 – 1038.
- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K., KAHL, G. (2005a): DNA microarrays. In: Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G.: DNA fingerprinting in plants - Principles, methods, and applications, s. 305 - 308, CRC Press, Spojené státy americké.
- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K., KAHL, G. (2005b): Generating high-density genetic maps. In: Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G.: DNA fingerprinting in plants - Principles, methods, and applications, s. 277 - 286, CRC Press, Spojené státy americké.
- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K., KAHL, G. (2005c): Morphological characters and allozymes vs. DNA markers. In: Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G.: DNA fingerprinting in plants - Principles, methods, and applications, s. 293 - 294, CRC Press, Spojené státy americké.
- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K., KAHL, G. (2005d): PCR with arbitrary primers: RAPD and its variants. In: Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G.: DNA fingerprinting in plants - Principles, methods, and applications, s. 32 - 40, CRC Press, Spojené státy americké.
- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K., KAHL, G. (2005e): Protein markers and allozymes. In: Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G.: DNA fingerprinting in plants – Principles, methods, and applications, s. 22 - 23, CRC Press, Spojené státy americké.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213 – 7218.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 – 6535.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176 – 183.

ZOHARY, D., HOPF, M. (2000): Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley (3rd ed.). Oxford University Press, Oxford.

9 Seznam použitých zkratek

A	adenin
AFLP	polymorfismus amplifikovaných fragmentů (<i>amplified fragment length polymorphism</i>)
AP	aspartik proteináza
AP-PCR	<i>arbitrarily primed-polymerase chain reaction</i>
Arg	arginin
BAC	umělý bakteriální chromozóm (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
bp	páry bází (<i>base pairs</i>)
1C	množství DNA jedné haploidní sady chromozómů v nereplikovaném jádře
C	cytozin
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequence</i>
cDNA	komplementární DNA (<i>complementary DNA</i>)
cM	centiMorgan
DAF	<i>DNA amplification fingerprinting</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ds	dvouvlákno (<i>double stranded</i>)
EN	endonukleáza
EST	místo s expresní adresou (<i>expressed sequence tag</i>)
F ₁	první filiální generace
F ₂	druhá filiální generace
F ₈	osmá filiální generace
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (<i>fluorescence in situ hybridization</i>)
G	guanin
Gb	gigabáze (<i>giga base</i>)
IMP	<i>inter- miniature inverted repeat transposable element polymorphism</i>

IN	integráza
iPBS	<i>inter- primer binding site amplification</i>
IRAP	amplifikovaný polymorfismus mezi retrotranspozóny (<i>inter-retrotransposon amplified polymorphism</i>)
ISBP	polymorfismus založený na místě inzerce (<i>insertion site based polymorphism</i>)
ISH	<i>in situ</i> hybridizace (<i>in situ hybridization</i>)
kb	kilobáze (<i>kilobase</i>)
LARD	<i>large retrotransposon derivative</i>
Leu	leucin
LINE	dlouhé rozptýlené nukleární elementy (<i>long interspersed nuclear elements</i>)
LTR	dlouhá koncová repetice (<i>long terminal repeat</i>)
Lys	lyzin
M	Morgan
MAS	selekce za pomoci markeru (<i>marker assisted selection</i>)
Mb	megabáze (<i>mega base</i>)
ME	mobilní element
Met	metionin
MITE	<i>miniature inverted repeat transposable element</i>
mRNA	mediátorová RNA (<i>messenger RNA</i>)
n	haploidní počet chromozómů
NGS	druhá generace sekvencování (<i>next-generation sequencing</i>)
ORF	otevřený čtecí rámec (<i>open reading frame</i>)
p	krátké rameno chromozómu (<i>petit</i>)
PBS	vazebné místo pro primer (<i>primer binding site</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLP	<i>polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism</i>

PPT	polypurinový úsek (<i>polypurine tract</i>)
q	dlouhé rameno chromozómu
QTL	lokusy s kvantitativním znakem (<i>quantitative trait loci</i>)
RAMP	<i>randomly amplified microsatellite polymorphisms</i>
RAPD	náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (<i>random amplified polymorphic DNA</i>)
RBIP	<i>retrotransposon-based insertion polymorphism</i>
REMAP	amplifikovaný polymorfizmus mezi retrotranspozónem a mikrosatelitem (<i>retrotransposon–microsatellite amplified polymorphism</i>)
RFLP	délkový polymorfizmus restrikčních fragmentů (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RH	RNáza H
RIL	rekombinantní inbrední linie (<i>recombinant inbred line</i>)
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	reverzní transkriptáza
SCAR	amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí (<i>sequence characterized amplified region</i>)
Ser	serin
S-fáze	syntetická fáze (<i>synthesis phase</i>)
SINE	krátké rozptýlené nukleární elementy (<i>short interspersed nuclear elements</i>)
SMRT	<i>single molecule real time</i>
SNP	polymorfizmus v jednom nukleotidu (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOLiD	<i>sequencing by oligo ligation and detection</i>
ss	jednovlákně (<i>single stranded</i>)
S-SAP	<i>sequence-specific amplification polymorphism</i>
SSCP	polymorfizmus konformace jednořetězcové DNA (<i>single strand conformation polymorphism</i>)

SSR	opakování jednoduchých sekvencí, mikrosatelity (<i>simple sequence repeats</i>)
STS	místo se sekvenční adresou (<i>sequence tagged site</i>)
T	tymin
TE	mobilní element (<i>transposable element</i>)
TIR	koncová obrácená repetice (<i>terminal inverted repeat</i>)
TRIM	<i>terminal repeat retrotransposons in miniature</i>
tRNA	transferová RNA (<i>transfer RNA</i>)
x	základní chromozómové číslo
YAC	umělý kvasinkový chromozóm (<i>yeast artificial chromosome</i>)

10 Přílohy

Tab. I: Příklady vybraných mobilních elementů

(převzato z Feschotte a kol., 2002)

Třída/podtřída/rodina	Druhy organizmů	Autonomní elementy	Neautonomní elementy
Třída I			
Non-LTR retrotranspozóny			
LINE; <i>L1</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Cin4</i>	-
	<i>Lilium speciosum</i>	<i>Del2</i>	-
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Tal1</i>	-
SINE	<i>Nicotiana tabacum</i>	-	<i>TS</i>
	<i>Brassica napus</i>	-	<i>S1</i>
LTR retrotranspozóny			
<i>Copia</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Tnt1A</i>	-
	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Tto1</i>	-
	<i>Hordeum sp.</i>	<i>BARE-1</i>	-
	<i>Oryza sativa</i>	<i>Tos17</i>	-
	<i>Zea mays</i>	<i>Hopscotch</i>	-
	<i>Zea mays</i>	<i>Opie-2</i>	-
	<i>Zea mays</i>	-	<i>BS1</i>
<i>Gypsy</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Magellan</i>	-
	<i>Zea mays</i>	<i>Huck-2</i>	-
	<i>Oryza sativa</i>	<i>RIRE2</i>	<i>Dasheng</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Athila 4</i>	-
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Athila 6</i>	-
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Ta3</i>	-
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Tar17</i>	-
Třída II			
DNA transpozóny			
<i>hAT</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Ac</i>	<i>Ds</i>
CACTA	<i>Zea mays</i>	<i>Spm</i>	<i>dSpm</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>CAC1</i>	<i>CAC2</i>
<i>Mutator</i>	<i>Zea mays</i>	<i>MuDR</i>	<i>Mu1</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtMu1</i>	-
PIF/ <i>Harbinger</i>	<i>Zea mays</i>	<i>PIFa</i>	<i>mPIF</i>
	Angiosperm	<i>PIF</i>	<i>Tourist</i>
Tc1/ <i>mariner</i>	Angiosperm	<i>MLE</i>	<i>Stowaway</i>