

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2019

Bc. Dominik Vitek

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Selekce linií pšenice seté obsahujících
chromozom 3D s delecí v dizomické konstituci**

Diplomová práce

Bc. Dominik Vitek

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: Mgr. Jan Bartoš, Ph. D.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Dominik Vítek
Název práce:	Selekce linií pšenice seté obsahujících chromozom 3D s delecí v dizomické konstituci
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Jan Bartoš, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2019
Abstrakt:	<p>Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i>) je významná zemědělská plodina, která tvoří nezanedbatelnou část světové produkce jídla. Informace o struktuře jejího genomu a funkci genů v něm obsažených nám může poskytnout cenné informace, jenž můžeme využít při šlechtění nových odrůd této rostliny. Jedním z genů, jehož porozumění by mohlo vést k průlomů v oblasti šlechtitelství je „pairing homologues“ <i>Ph2</i>, který se nachází na chromozomu 3D a hraje důležitou roli při správném párování homologních chromozomů během meiózy. Cílem této práce byla charakterizace potomstva rostlin obsahujících různé delece na chromozomu 3D v monozomické konstituci a selekce souboru 73 rostlinných linií pšenice seté obsahujících tyto delece v dizomické konstituci využitím metody ddPCR. Tento soubor dále poslouží pracovníkům Ústavu experimentální botaniky a jejich výzkumným partnerům k lokalizaci genu <i>Ph2</i> na chromozomu 3D. Klonování tohoto genu přispěje k porozumění genomu pšenice seté.</p>
Klíčová slova:	Pšenice setá, selekce pšeničných linií, deleční linie, 3D chromozom, párování homologů, <i>Ph2</i> , ddPCR, droplet digital PCR
Počet stran:	48 s. (62 393 znaků)
Počet příloh:	1 CD
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Dominik Vítek

Title: Screening of wheat lines for disomic 3D chromosome deletion

Department: Laboratory of growth regulators

Type of thesis: Master's

Supervisor: Mgr. Jan Bartoš, Ph.D.

The year of presentation: 2019

Abstract: Common wheat (*Triticum aestivum*) is an essential agricultural resource that makes up a significant portion of the world food supply. Insight into its genomic structure and gene functions could provide us with information which can be utilized in breeding of new interesting cultivars of the plant. One such gene located on chromosome 3D is „pairing homologues“ *Ph2* which, as its name suggests, plays a critical role in correct pairing of homologous chromosomes. Understanding of this gene's function could lead to a scientific breakthrough in common wheat breeding. The goal of this thesis is to conduct a screening of interspecies hybrid progeny containing different 3D chromosome deletions by using ddPCR method. The outcome of these efforts would be a library of 73 plant lines carrying these deletions in disomic constitution. The staff of the Institute of Experimental Botany CAS and their research partners will use the library to narrow down the location of *Ph2* gene. Cloning of the gene will contribute to our understanding of the genome of common wheat.

Keywords: Common wheat, wheat line screening, deletion lines, 3D chromosome, homologue pairing, *Ph2*, ddPCR, droplet digital PCR

Number of pages: 48 pages (62 393 symbols)

Number of appendices: 1 CD

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele
Mgr. Jana Bartoše, Ph.D. a použil pouze uvedené bibliografické a elektronické zdroje.

Olomouc 2. května 2019

podpis

Souhrn

Pšenice setá (*Triticum aestivum*) je významná zemědělská plodina, která tvoří nezanedbatelnou část světové produkce jídla. Informace o struktuře jejího genomu a funkci genů v něm obsažených nám může poskytnout cenné informace, jenž můžeme využít při šlechtění nových odrůd této rostliny. Jedním z genů, jehož porozumění by mohlo vést k průlomů v oblasti šlechtitelství je „pairing homologues“ *Ph2*, který se nachází na chromozomu 3D a hraje důležitou roli při správném párování homologních chromozomů během meiózy.

Cílem této práce byla charakterizace potomstva rostlin obsahujících různé delece na chromozomu 3D v monozomické konstituci a selekce souboru 73 rostlinných linií pšenice seté obsahujících tyto delece v dizomické konstituci využitím metody ddPCR. Tento soubor dále poslouží pracovníkům Ústavu experimentální botaniky a jejich výzkumným partnerům k lokalizaci genu *Ph2* na chromozomu 3D. Klonování tohoto genu přispěje k porozumění komplexního genomu pšenice seté.

Summary

Common wheat (*Triticum aestivum*) is an essential agricultural resource that makes up a significant portion of the world food supply. Insight into its genomic structure and gene functions could provide us with valuable information which can be utilized in breeding of new interesting cultivars of the plant. One such gene located on chromosome 3D is „pairing homologues“ *Ph2* which, as its name suggests, plays a critical role in correct pairing of homologous chromosomes. Understanding of this gene's function could lead to a scientific breakthrough in common wheat breeding.

The goal of this thesis is to conduct a screening of interspecies hybrid progeny containing different 3D chromosome deletions by using ddPCR method. The outcome of these efforts would be a library of 73 plant lines carrying these deletions in disomic constitution. The staff of the Institute of Experimental Botany CAS and their research partners will make use of the library to narrow down the location of *Ph2* gene. Cloning of the gene will contribute to our understanding of the complex genome of common wheat.

Poděkování

Rád by poděkoval Mgr. Janu Bartošovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, Mgr. Radimu Svačinovi za zaučení do metodiky analýzy a pěstování pšenice a nadlidskou trpělivost a zaměstnancům Ústavu experimentální botaniky za přívětivé přivítání do kolektivu. Také bych rád poděkoval své rodině a přátelům za psychickou oporu při vypracovávání této diplomové práce.

Obsah

1. ÚVOD	11
2. TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1. Genom pšenice seté a jeho evoluce	12
2.2. Princip párování chromozomů hexaploidní pšenice	15
2.3. Charakterizace delečních linií	20
2.4. Metodika Droplet Digital PCR	23
3. CÍLE PRÁCE	27
4. MATERIÁL A PŘÍSTROJE	28
4.1. Biologický materiál	28
4.2. Reagencie a chemikálie	28
4.3. Spotřební materiál	29
4.4. Přístroje	30
5. METODIKA	31
5.1. Sadba zástupců delečních linií pro chromozom 3D	31
5.2. Pre-screening chromozomu 3D s delecí pomocí Phire Plant PCR Master Mix kitu ...	31
5.3. Izolace čisté DNA vybraných rostlin pomocí Nucleospin Plant II kitu	33
5.4. Analýza počtu delečních chromozomů 3D využitím ddPCR	34
6. VÝSLEDKY	36
7. DISKUZE	42
8. ZÁVĚR	45
9. POUŽITÉ ZKRATKY	46
10. LITERATURA	47

1. ÚVOD

S postupným rozvojem zdravotnictví, sociálních služeb a celkovým globálním růstem životní úrovně dochází k nevyhnutelnému příbytku světové populace. Tento fenomén s sebou mimo jiné přináší zvýšenou spotřebu jídla. Pšenice setá (*Triticum aestivum*) zastupuje přibližně pětinu světové produkce jídla a řadí se tak mezi jednu z nejdůležitějších zemědělských plodin. Navýšení produkce této obiloviny by mělo patřit k jedné z hlavních priorit lidstva, pokud chceme kompenzovat náš populační růst. Naši předkové v období přechodu z lovců a sběračů na více usedlý agrikulturní životní styl čelili podobným problémům při prvotních pokusech o domestikaci tehdy divokých obilovin – pšenice jednozrnky, pšenice dvouzrnky a ječmenu. Tehdejší přístup k problematice spočíval v prostém křížení kultivarů a selekci nejvýnosnějších rostlin – strategie, která zůstala v módě po mnoho milénií.

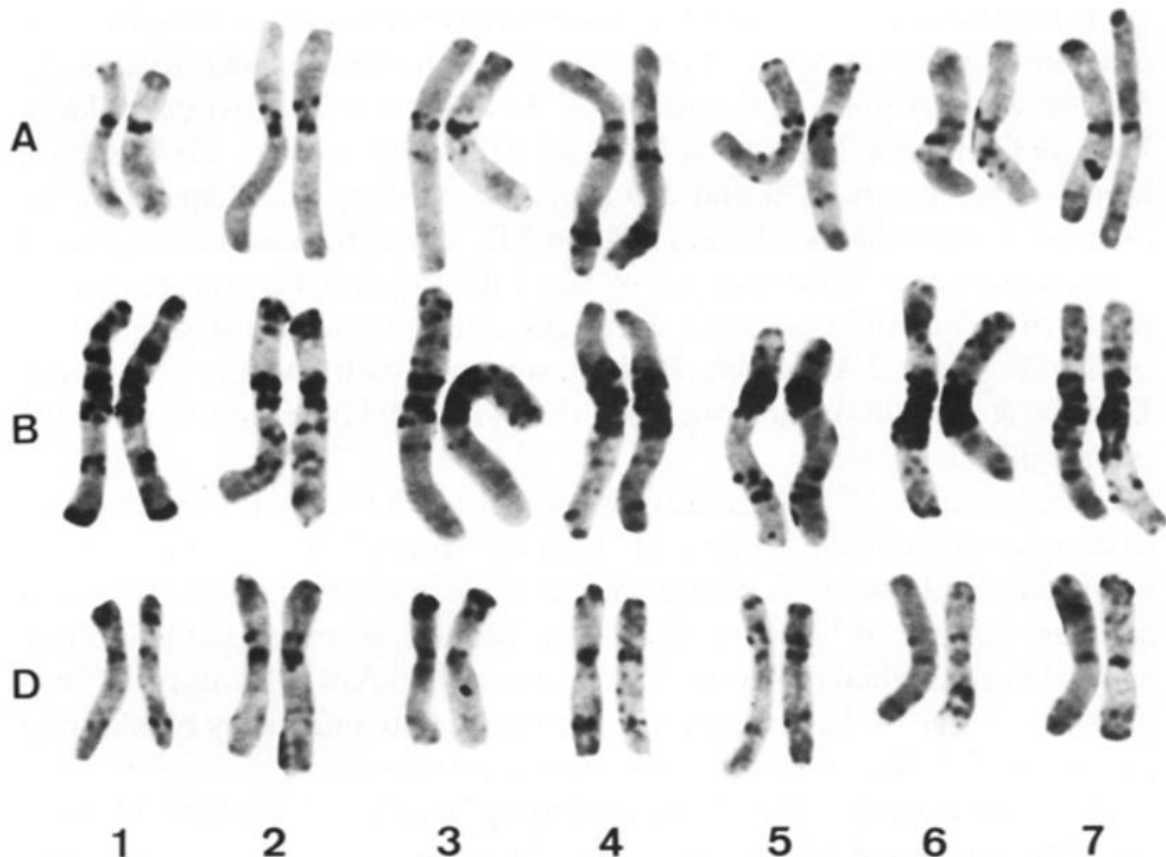
V současné době máme přístup k širokému spektru metodik, analýz a technologií, o kterých se našim předkům nemohlo zdát ani v tom nejdivočejším snu. Díky tomuto arzenálu nástrojů se nám podařilo učinit mnoho průlomových objevů – zjištění karyotypu pšenice seté, konstrukce genetických a fyzických map, anotace genů, proteomická analýza a charakterizace mnohých genových produktů. Ovšem i přes všechny naše pokroky a celé životy strávené studiem této překvapivě komplexní obiloviny nám stále mnoho esenciálních informací a spojitostí uniká.

Jedním velice zajímavým aspektem, který má bez pochyby veliký význam pro šlechtění budoucích výnosnějších kultivarů, je párování chromozomů u polyploidních obilovin. Tento systém dovoluje polyploidním pšenicím si zachovat všechny sady chromozomů bez vzniku aberantních nebo delečních stavů. Geny za tento systém zodpovědné – *Ph1* a *Ph2*, by mohli být klíčem nové generace šlechtitelství. Bohužel i přes signifikantní význam těchto genů nemáme doposud jejich kompletní anotaci, obzvláště pak u genu *Ph2*. Příspěvek k anotaci právě tohoto genu je účelem této diplomové práce.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Genom pšenice seté a jeho evoluce

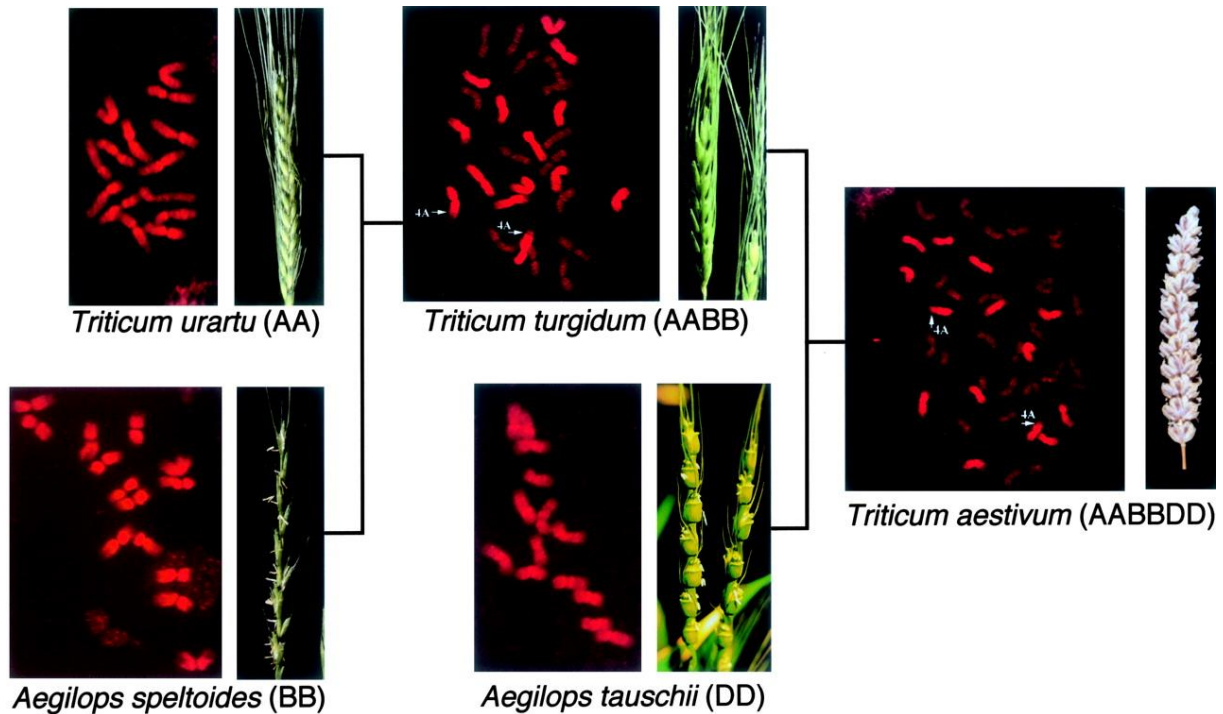
Prakticky všechny dnes pěstované obiloviny jsou polyploidní rostliny a výjimkou není ani allohexaploidní pšenice setá (*Triticum aestivum*) z čeledi lipnicovitých s chromozomální konstitucí $2n = 6\times = 42$ (Obr. č. 1), genomem o celkové přibližné délce 17 Gbp a obsahem 80–90 % repetitivních sekvencí (Wanjuli *et al*, 2009; Šafář *et al*, 2010).



Obr. č. 1: C-proužkování karyotypu pšenice seté (*T. aestivum*) cv. Chinese Spring; zvětšení 1780× (Převzato z Badaeva *et al*, 1986).

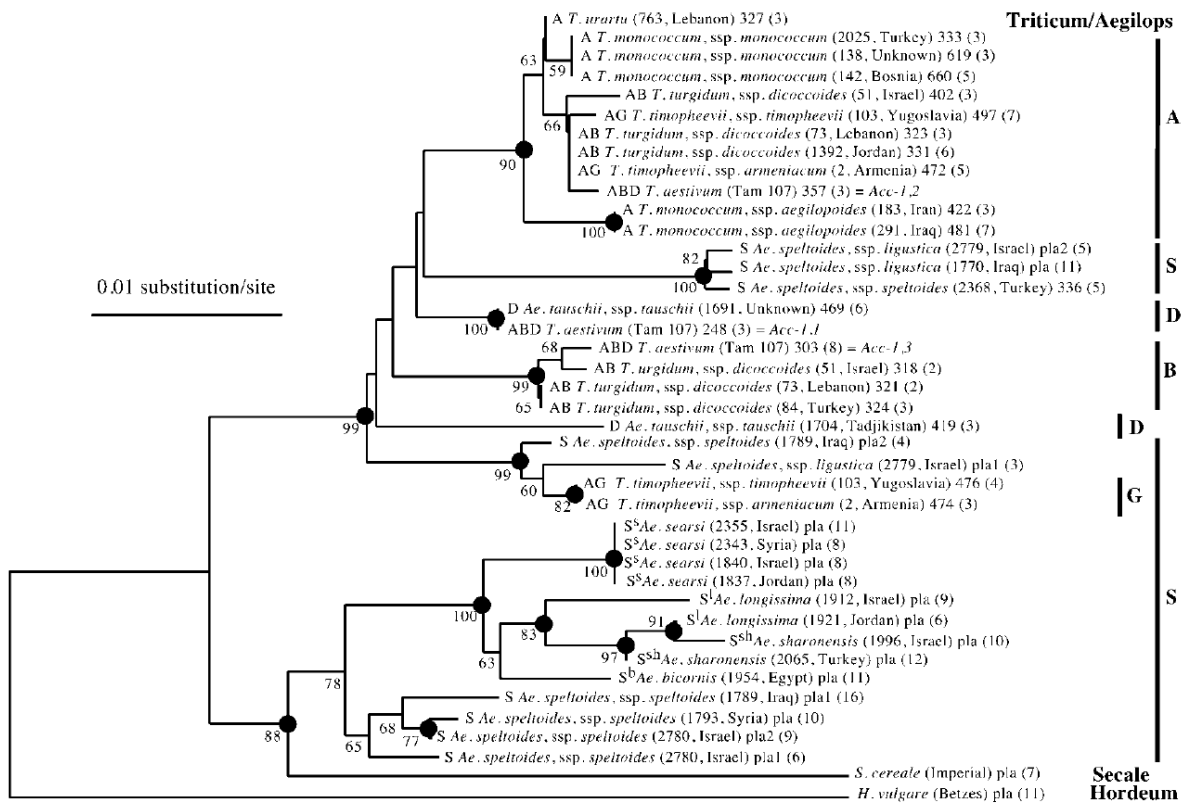
I když v přírodě není vznik polyploidních rostlin vzácná událost, tato rostlina je spíše produktem koevoluce lidského zemědělství. Za počátek vývoje pšenice seté by se daly považovat prvotní pokusy o domestikaci obilovin v západní Asii s pšenicí jednozrnkou (*Triticum monococcum*), pšenicí dvouzrnkou (*Triticum dicoccum*) a ječmenem (*Hordeum* sp, Dubcovsky *et* Dvorak, 2007). Produkty této domestikace, hlavně pak pšenice jednozrnka (*T. monococcum*, genom $A^m A^m$, $2n = 2\times = 14$) a pšenice naduřelá (*T. turgidum* ssp. *dicoccon*, genom AABB, $2n = 4\times = 28$), byly následně rozšířeny do Asie, Evropy a Afriky, kde byly pěstiteli kříženy s lokálními divokými kultivary za obohacení diverzity jejich genomů.

V určitých oblastech docházelo k sympatrii pšenice nadeřelé s mnohoštětem Tauschovým (*Aegilops tauschii*, genom DD, $2n = 2 \times = 14$) za vzniku hexaploidní pšenice seté (*Triticum aestivum*, genom AABBDD, $2n = 6 \times = 42$, Obr. č. 2).

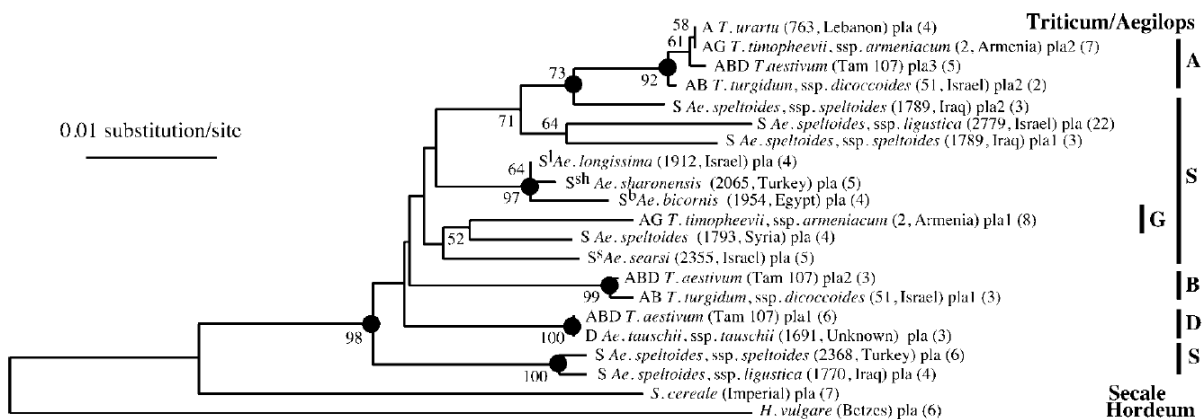


Obr. č. 2: Schéma evoluce allohexaploidní pšenice seté pomocí mezidruhové hybridizace (Převzato z Gill *et al.*, 2004).

Toto dogma bylo potvrzeno studii založenými na komparativní genomice (Huang *et al.*, 2002). V těchto studiích byly porovnávány intronové sekvence genů přítomných v genomech individuálních rostlin, ze kterých allopolyploidní potomstvo vzniklo. Podle teorie molekulárních hodin (Thorpe, 1982) dochází v průběhu času k akumulaci mutací a diferenciaci původně příbuzných druhů. Pro studii byly voleny geny, které jsou v subgenomech přítomny pouze v jedné kopii jako jsou geny pro enzymy acetyl-CoA karboxyláza (*Acc-1*) a 3-fosfoglycerát kináza (*Pgk-1*). Porovnáním sekvencí těchto genů u pšenice seté a jejich příbuzných druhů byly sestaveny dva fylogenetické stromy (Obr. č. 3 a 4). Tato studie potvrdila vysokou míru příbuznosti mezi genomy *T. monococcum* ($A^m A^m$) a *T. urartu* (AA). Dále bylo zjištěno, že *T. urartu* byl donorem subgenomu pro tetraploidní druhy pšenic jako *T. turgidum* (AABB) a *T. timopheevii* (AAGG). *A. aestivum* byl potom donorem D genomu pro *T. aestivum* (AABBDD). Ovšem vzhledem k tomu, že geny z D genomů těchto druhů jsou víceméně nerozlišitelné, musela toto být velice recentní událost v historii vývoje pšenice (přibližně před 8 tisíci lety).



Obr. č. 3: Fylogenetický strom *Triticum* / *Aegilops* komplexu vytvořený podle intronových sekvencí genu *Acc-1* (převzato z Huang et al, 2002).



Obr. č. 4: Fylogenetický strom *Triticum* / *Aegilops* komplexu vytvořený podle intronových sekvencí genu *Pgi-1* (převzato z Huang et al, 2002).

V průběhu tohoto řízeného vývoje docházelo k selekci a kumulaci jistých znaků u pěstovaných pšeničných kultivarů – tento fenomén je znám jako domestikací syndrom (Hammer, 1984). Pro obiloviny se tento syndrom projevil ztrátou některých zemědělsky nevýhodných znaků jako tříštění osin, které dovoľovalo uvolnění semen z dozrálých klasů (a zároveň znemožnilo sklizeň), determinované genem *Br* (*Brittle rachitis*) na chromozomu

3A a 3B (Nalam *et al*, 2006). Druhým podstatným znakem, který byl při šlechtění odstraněn skrze recesivní mutace, byla přítomnost přilnavé plevy závislá na dominantním genu *Tg* (*tenacious glume*, Jantasuriyarat *et al*, 2004). Ztráta přilnavé plevy usnadnila zemědělcům proces vymlácení zrn z klasů pšenice. Další významné fenotypové znaky, které byly obecně zohledňovány při šlechtění obilovin, jsou velikost zrna, snížené laterální větvení, vzpřímenější vzrůst stébla a snížená doba dormance semen.

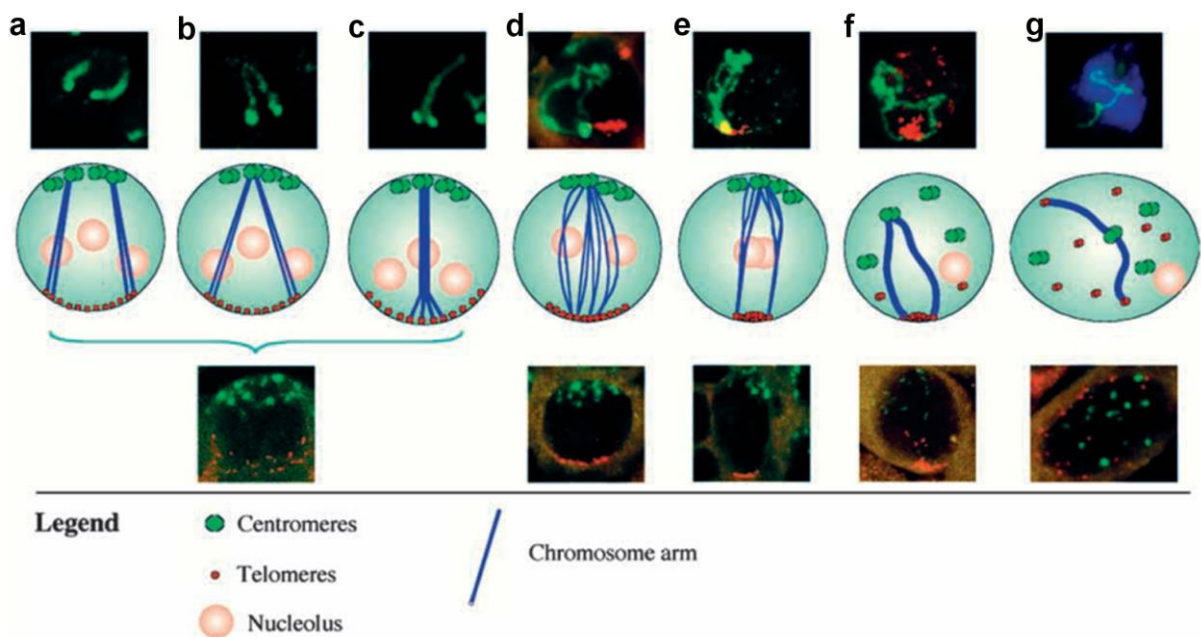
Je nutné zmínit ještě jeden aspekt, který přispěl k prvenství pšenice seté mezi ostatními obilovinami – a tím je allopolyploidie. Pšenice setá, stejně jako všechny allopolyploidní rostliny, vznikla hybridizací dvou nebo více různých rostlinných druhů. Vzhledem k tomu, že oba „mateřské“ druhy podstoupily adaptaci při odlišných podmínkách za akumulace různých genů, můžeme očekávat, že hexaploidní pšenice setá (obsahující D genom *A. tauschii*) bude obecně robustnější, přizpůsobivější na délku světelné periody, vlastnosti půdy (nízké pH, obsah soli nebo hliníku) a odolnější vůči mrazu, nemocem a parazitům než její tetraploidní protějšky (Dubcovsky *et* Dvorak, 2007). Adice subgenomu D se ovšem pojí i s jistým omezením. Vzhledem k tomu, že poslední hybridizace pšenice seté proběhla s omezeným počtem zástupců mnohoštetu Tauschova, můžeme očekávat relativně omezenou diverzitu subgenomu D (Talbert *et al*, 1998) v rámci druhu. I přes to vykazují kultivary pšenice seté překvapivou variabilitu s pangénomem o předpokládaném obsahu 128 656 genů, ze kterých je 64,3 % vždy přítomných v genomu. Zbytek genů vykazuje presence/absence variabilitu. Stojí za zmínění, že kultivar Chinese Spring vykazuje ještě o něco sníženou variabilitu svého genomu, což by mohlo být následkem selektivního šlechtění (Montenegro *et al*, 2017).

2.2. Princip párování chromozomů hexaploidní pšenice

Jak již bylo zmíněno výše, pšenice setá je allohexaploidní rostlina nesoucí tři sady chromozomových párů ($2n = 6 \times = 42$). Dříve v historii výzkumu genomu pšenice bylo předpokládáno, že jednotlivé subgeny allohexaploidní pšenice jsou velice odlišné a proces jejich párování tedy probíhá stejně jako u diploidní rostliny s vyšším počtem chromozomů. Tento konsensus byl ovšem vyvrácen v roce 1952 zjištěním, že subgenomy pšenice seté jsou si velice úzce příbuzné (Sears, 1952). Byla tehdy demonstrována schopnost kompenzovat absenci jednoho z chromozomů (nulizomik pro daný chromozom) přítomností dvojitě dávkou jeho ekvivalentu z jiného subgenomu (tetrazomik pro ekvivalentní chromozom). Můžeme

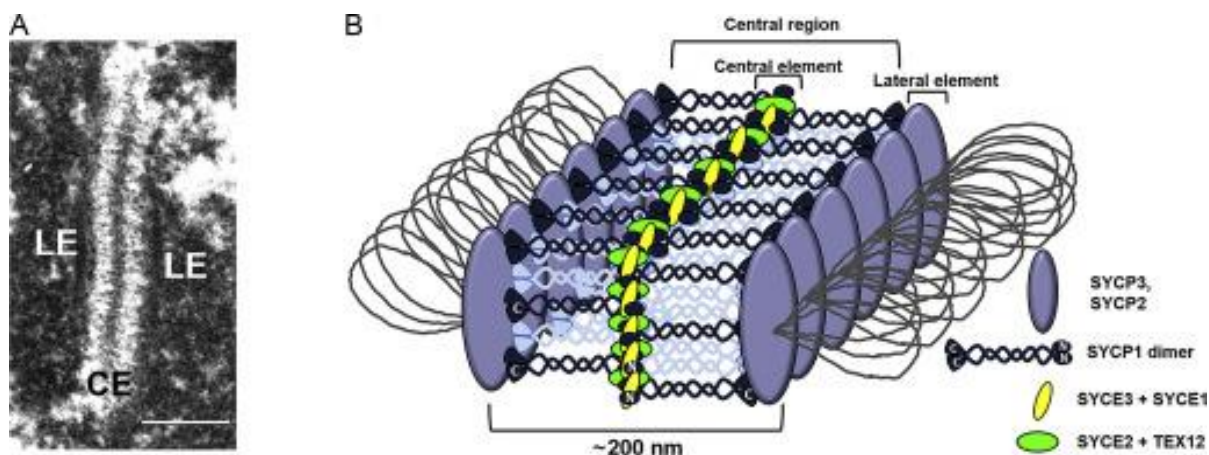
tedy uvažovat, že kterýkoliv z chromozomů pšenice se může teoreticky párovat při buněčném dělení s kterýmkoliv ze svých analogů. Přesto dochází za normálních podmínek u hexaploidní pšenice striktně k párování pravých homologů a celý systém se poté chová jako diploidní organismus s 21 chromozomovými páry (Sears, 1976). Tento systém je udržován sérií genů – *Ph1* (Riley *et al* Chapman, 1958), *Ph2* (Mello-Sampayo, 1971; Sutton *et al* 2003) a dalšího supresoru menšího účinku na krátkém raménku chromozomu 3A (Driscoll, 1972), které zabezpečují přenos správných chromozomů do gamet.

Samotný proces párování začíná již v premeiotické fázi buněčného dělení (Martínez-Pérez *et al*, 1999). Ve fázi vývoje když jsou meiocyty a tapetální buňky morfologicky nerozlišitelné, lze pozorovat rozdělené homologní chromozomy s typickou interfázní strukturou. Dochází k formaci Rablovi konfigurace s centromerami shromážděnými na jednom pólu buňky a telomerami na druhém. V této fázi je možné pozorovat diploidní počet telomer (42), ale pouze haploidní počet centromer (21), což indikuje párování centromer mezi převážně nehomologními chromozomy (Obr. č. 5a). Dále dochází k asociaci centromer homologních chromozomů za tvorby typické konfigurace tvaru „V“ a vzniku multivalentů, Rablova konfigurace je zachována (Obr. č. 5b). Následně dochází ke spojení homologních chromozomů po celé jejich délce do formy multivalentů (Obr. č. 5c). V další fázi vstupuje buňka do meiotické profáze I, dochází k replikaci chromatid a hromadění telomer (Obr. č. 5d). Páry homologních chromozomů poté začínají blíže asociovat od distálního konce (Obr. č. 5e). V konečných fázích asociace homologních chromozomů dochází k uvolnění centromer (Obr. č. 5f) a následně i telomer (Obr. č. 5g) za blízkého spojení chromozomů a vzniku synaptonemálních komplexů (Fawcett, 1956).



Obr. č. 5: Diagram párování chromozomů u pšenice seté před a v průběhu meiózy (Převzato z Martínez-Pérez *et al*, 1999).

Syneptonemální komplex (SC) je proteinová struktura tvořená mezi dvěma homologními chromozomy v meiotické profázi I, která dovoluje výměnu genetické informace (Obr. č. 6). SC je tvořen sérií tří proteinů – SYCP2 a SYCP3, které ve formě heterodimérů společně s chromatinem a DNA dohromady tvoří laterální elementy (LE). Ty jsou potom spojeny k C-konci třetího filamentního proteinu SYCP1 ve formě dimeru, který spojuje laterální elementy s centrálním elementem (CE, pojen N-koncem). N-konec proteinu SYCP1 má rovněž schopnost interagovat sám se sebou, což naznačuje, že v centrálním elementu leží podjednotky proteinu v přímém kontaktu. SYCP1 rovněž váže další proteiny – SYCE1, SYCE2, SYCE3 a nepřímo přes SYCE2 protein TEX12 (Schramm *et al*, 2011; Brenner *et Miller*, 2001). Proteiny SYCP1, SYCE1 a SYCE3 je při barvení možno pozorovat po celé délce SC při párování chromozomů, mezitím co SYCE2 a TEX12 nekolokalizují s proteinem SYCP1 a rozmístění jejich komplexů má více bodový charakter. Je předpokládáno, že hetero-oktamery proteinů SYCE2 a TEX12 hrají roli v architektuře centrálního elementu SC.

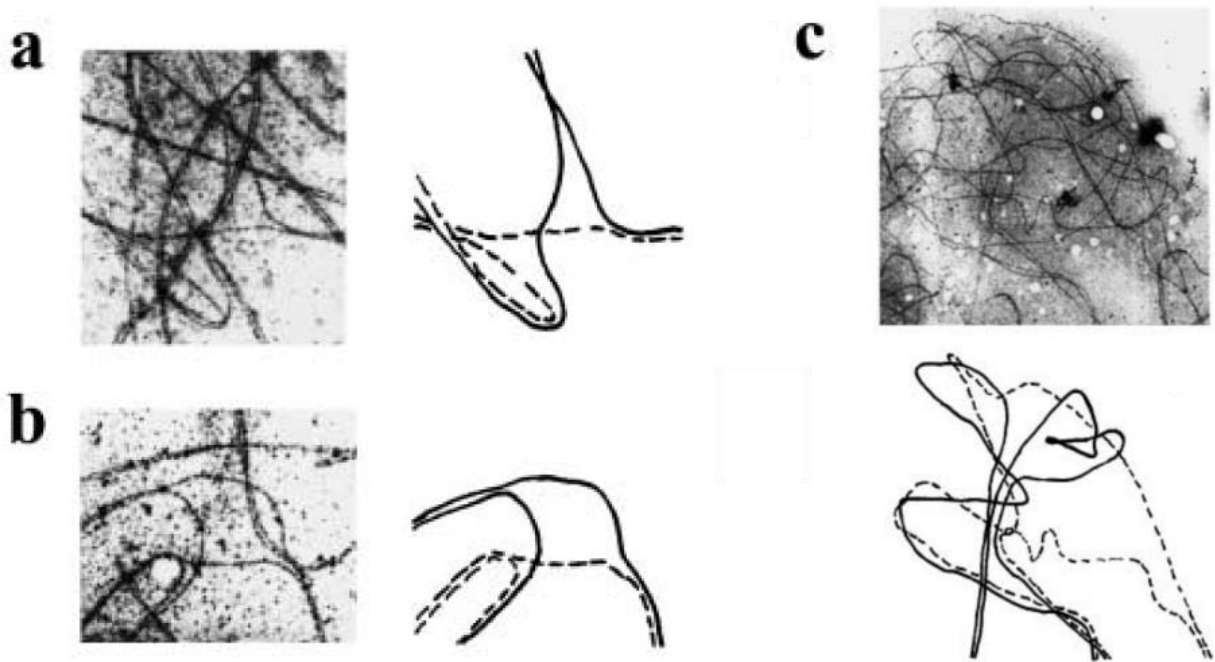


Obr. č. 6: A – Mikrograf myšičího SC, měřítko 0,2 μm ; B – ilustrace vazby proteinů v SC (převzato z Brenner et Miller, 2001).

Správné spojení, nebo synapse, homologních chromozomů u allohexaploidní pšenice seté je primárně udržováno dvěma geny – *Ph1* a *Ph2*. Oba z těchto genů ovšem v celkovém procesu hrají odlišnou funkci (Martinez *et al*, 2001). Co se týče účinků genu *Ph1* lokalizovaného na dlouhém raménku chromozomu 5B bylo na základě pozorování průběhu buněčného dělení ve wildtype liniích a liniích deficitních na gen *Ph1* popsáno několik jeho funkcí. První funkce genu je korekce párování multivalentů v průběhu profáze I. Tento proces probíhá průběžně mezi zygotene a pachytene u rostlin, které mají gen *Ph1*. Pokud gen není přítomen, je proces mírně opožděn a začíná až v pozdních fázích zygotene. Vzhledem k tomu, že korekce párování v jisté formě probíhá i přes nepřítomnost genu *Ph1* indikuje, že systém musí být kontrolován minimálně dvěma různými mechanismy, podobně jako bylo pozorováno u allotetraploidních pšenic jako je *Triticum timopheevii* (Martinez *et al*, 1996). Pokud je gen *Ph1* přítomen, dochází k rychlému rozpojování chromozomů, které nejsou striktně homologní. Jeho nepřítomnost má za následek pomalý rozestup těchto multivalentních komplexů, a později může i vést k párování mezi homoeologními (nepravými homology) chromozomy v rámci multivalentu během metafáze I. Rovněž bylo zjištěno, že při udržení multivalentů až do počátku crossing-over dochází v přítomnosti genu *Ph1* pouze ke crossing-over u pravých homologů. Lze tedy uvažovat, že gen má zároveň i restriktivní aktivitu na párování homoeologních chromozomů. Zajímavostí ovšem je, že pokud není přítomen pravý homolog chromozomu, jako například u hybridních nebo haploidních linií, dochází k párování homoeologních chromozomů pro daný pár i za přítomnosti *Ph1*. Tento fenomén poukazuje na skutečnost, že *Ph1* spíše podporuje párování pravých homologních chromozomů, než aby zabráňoval párování homoeologních chromozomů. Bylo rovněž spekulováno, že gen *Ph1* má účinek na stringenci synapsí mezi párujícími se chromozomy (Holm *et Wang*, 1988).

K tomuto závěru došli Holm a Wang pozorováním sníženého počtu laterálních elementů, které byly součástí multivalentních komplexů ve fázi zygotene, za přítomnosti chromozomu 5B. Zajímavé v tomto případě je, že přítomnost genu *Ph1* u *T. turgidum* (Martinez *et al*, 2001) neměl vliv na počet laterálních elementů ve formě multivalentů. Spekuluje se, že roli v tomto může hrát přítomnost subgenomu D.

Co se týče genu *Ph2* z krátkého raménka chromozomu 3D, nebyla u mutantů na něj deficitních pozorována přítomnost multivalentů v metafázi I. Jeho absence ovšem způsobuje častější párování mezi homoeologními chromozomy nebo chromozomy od blízce příbuzných rostlinných druhů. Původně bylo tedy předpokládáno, že gen *Ph2* plní stejnou funkci jako *Ph1* pouze se slabšími projevy. Výsledky práce M. Martineze (2001) ovšem poukazují, že *Ph2* spíše ovlivňuje dokončení synapsí mezi páry chromozomů. Při absenci genu vede opoždění v této synaptické tvorbě následně k nedokonalé aktivitě *Ph1* při korekci párování multivalentů – některé chromosomy zůstávají ve formě multivalentů až do pozdní zygotene (Obr. č. 7). Dochází tedy ke tvorbě a rekombinaci vyššího počtu homoeologních chromozomů. Homoeologní párování chromozomů u rostlin deficitních na *Ph2* je tedy nepřímý efekt aktivity genu *Ph1*.



Obr. č. 7: Elektronové mikrografie výměny genetické informace mezi quadrivalenty v synaptonemálním komplexu u pšenice seté (*T. aestivum*); a – wildtype, b – genotyp *ph1bph1bPh2Ph2* (deficitní na gen *Ph1*), c – genotyp *Ph1Ph1ph2bph2b* (deficit genu *Ph2*); (převzato z Martinez, 2001).

2.3. Charakterizace delečních linií

Existuje mnoho různých přístupů k problematice fyzického mapování genů. Molekulární biologie a genomika jsou velice progresivní obory s rychle se měnícími metodickými přístupy. I přes historický význam fyzicky mapovacích metod jako sekvenování s řetězec terminujícími inhibitory (Sanger, 1977) a chromosome walking pro účely mapování lokusu specifického genu, je tento postup příliš zdlouhavý. Proto dnes převládají přístupy jako radiační hybridní mapování, optické mapování nebo zachycení konformace chromatinu, které významně redukují část genomu, jenž je nutnou blíže analyzovat.

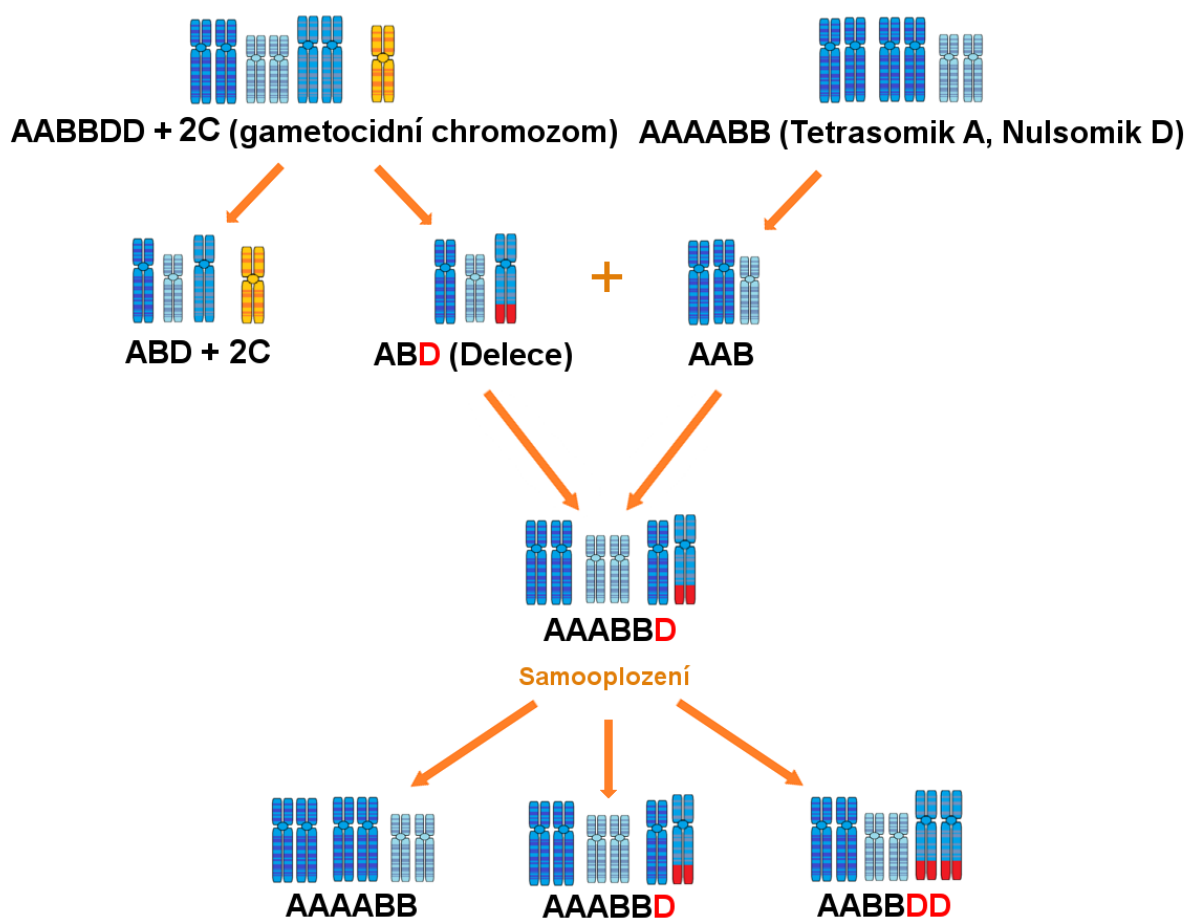
Díky výzkumu a pokroku šlechtitelských metod máme u pšenice seté více možností fyzického mapování genomu. Jedním možným přístupem je využití delečních map, které vzešly ze šlechtitelských experimentů mezi pšenicí setou a zástupci druhu mnohoštětu. Při zpětném mezidruhovém křížení hybrida mnohoštětu (*Aegilops triuncialis* L., $2n = 28$, C^uC^uCC nebo UUCC, ♀) a pšenice seté (*Triticum aestivum* L., ♂) s pšenicí setou jako rekurentním samcem (Endo *et* Tsunewaki, 1975) byl pozorován trend, kdy byla u potomstva snížena plodnost

samců a samic a zároveň zachování akrocentrického chromozomu samičího původu. Tento proces byl vysvětlen přítomností genetických elementů s gametocidní aktivitou u jednoho z chromozomů (Endo, 1982) původem od mnohoštětu (*Ae. triuncialis*). Podobná gametocidní aktivita byla rovněž pozorována u chromozomů jiných zástupců rodu mnohoštětu (*Ae. longissima*, *Ae. sharonensis*, Maan, 1975). Tyto gametocidní elementy mají dvojí funkci – indukce chromozomálních zlomů a tlumení této aktivity u gametofytu (Endo, 1988). Tímto způsobem jsou hybridní rostliny, u kterých cizí chromozom chybí, vystaveny působení jeho gametocidním účinkům ve fázi gametofytu. Rostliny obsahující tento chromozom jsou naopak chráněny. Chromozomální zlomy jsou většinou příliš rozsáhlé a gamety nejsou životaschopné (Finch *et al*, 1984). Tsujimoto a Tsunewaki (1985) zjistili, že kultivar pšenice seté „Norin 26“ obsahuje analog supresoru gametocidní aktivity. Podobně pozoroval Endo (1988) jistou supresi gametocidní aktivity při adici sady chromozomů mnohoštětu válcovitého (*Ae. cylindrica*) do pšenice seté cv. „Chinese Spring“. U obou případů byla pozorována vysoká míra chromozomálních změn a mutací u potomstva zpětného křížení, u kterých nebyl gametocidní chromozom přítomen (u *Ae. cylindrica* se vyskytovaly aberace i u potomstva nesoucí gametocidní chromozom, ovšem v menší míře).

Jak předpověděl Endo, chromozomové delece jsou velice užitečným nástrojem pro chromozomové mapování a s rozvojem cytogenetických metod, které usnadňují identifikaci genomových změn, byla odstraněna jedna z velkých překážek v charakterizaci takových linií. Deleční mapy mají od klasického mapování tu výhodu, že nejsou závislé na polymorfismu genů. Jednoduše řečeno ztráta fenotypového znaku, který se běžně vyskytuje v ostatních delečních liniích indikuje ztrátu chromozomového segmentu nesoucí gen za tento znak zodpovědný. My v dnešní době můžeme využít naší znalosti interakce genomů jistých druhů mnohoštětu a pšenice k tvorbě delečních linií, které nám mohou usnadnit anotaci genů jinými metodami obtížně dosažitelných.

Jak bylo zmíněno výše, produkty zpětného křížení pšenice seté s chromozomem 2C mnohoštětu válcovitého a pšenice seté cv. „Chinese Spring“ obsahují chromozomální aberace jako delece či inverze, ovšem většinou již neobsahují gametocidní chromozom mnohoštětu, který by způsoboval další genomové změny v potomstvu. Tato konstituce je vhodná pro tvorbu stabilních delečních linií pro daný kultivar pšenice. Obecná strategie pro tvorbu takových delečních linií (Endo, 1990) je nejdříve zpětně křížit jedince s monozomickou adicí chromozomu mnohoštětu válcovitého jako samici s euploidní pšenicí setou a následná kontrola chromozomální konstituce pomocí cytogenetických metod. Dále zvolit rostliny

obsahující vhodné delece a provést jejich samosprášení. Pokud není mezi potomstvem možno nalézt jedince s homozygotní konstitucí hledané mutace je heterozygotní potomstvo kříženo jako samice s nulizomik-tetrazomikem nebo ditelozomikem pšenice seté jako samcem za tvorby hemizygotů pro pozorovanou mutaci. U potomků samosprášení takových rostlin můžeme pozorovat jistý posun genotypového štěpného poměru ve prospěch nulizomiků (rostlina má třetinovou šanci na předání delečního chromozomu). Stejná metoda přípravy delečních linií byla použita i v této studii (Obr. č. 8).



Obr. č. 8: Schéma křížení rostlin za účelem tvorby linie pšenice seté nesoucí specifickou mutaci v dizomické konstituci.

Pro potřeby naší studie byly voleny rostliny obsahující delece různých rozsahů na chromozomu 3D. Selektce ovšem nebyla omezena na delece krátkého raménka, na kterém se gen *Ph2* nachází (Mello-Sampayo, 1971). I když tvorba linií obsahující delece na dlouhém raménku nemá význam pro lokalizaci genu *Ph2*, jedná se o výhodnou investici

do potenciálního budoucího mapování genů na tomto chromozomu. Mezi linie s delecí na krátkém raménku se řadí linie 130A, 303-2, 766-1, 977-1, A1S, A2S, A3S, A4S, A6S, A7S, A8S, A10S, A11S, A12S, A13S, A14S, A15S, B1S, B2S, B4S, B5S, B6S, B7S, B8S, B9S a B10S. Linie s delecí na dlouhém raménku jsou 30B, 38-8, 83-8, 173-2, 2057-6, A1L, A2L, A3L, A4L, A5L, A6L, A7L, A8L, A9L, A10L, A11L, A12L, A14L, A15L, A16L, A18L, A19L, A20L, A21L, B2L, B3L, B4L, B5L, B6L, B7L, B8L, B9L, B10L, B11L, B12L, B13L, B14L, B15L, B16L, B17L, B18L, B19L, B20L, B21L a U1L. Dvě linie obsahují delecce na dlouhém i krátkém raménku – 2758-1 a B1SL.

2.4. Metodika Droplet Digital PCR

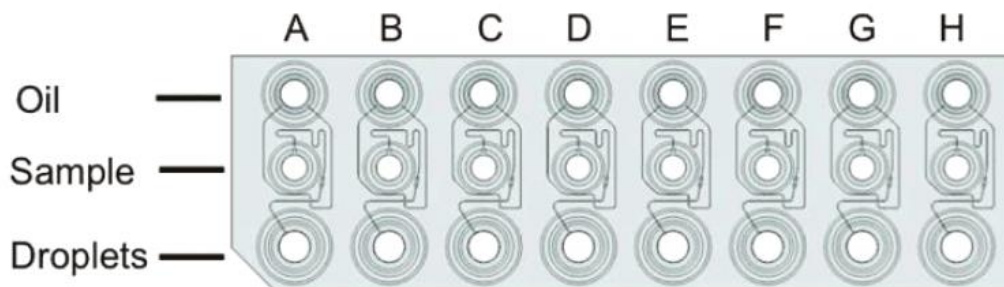
Detekce a kvantifikace specifických sekvencí nukleových kyselin lze považovat za páteř molekulárně-genetických technik a velké části výzkumu v oblasti genomiky. Není tedy překvapivé, že poptávka po přesnějších a statisticky spolehlivějších výsledcích vedla k postupnému rozvoji těchto technologií. Za takové kvantifikační technologie první generace lze považovat end-point PCR analýzu s následnou elektroforetickou analýzou, která poskytovala spíše kvalitativní výsledky s velice omezenou možností relativní kvantifikace. Druhou generací by byla kvantitativní PCR s možností pozorovat průběh reakce v reálném čase a pomocí externí kalibrace nebo vnitřních standardů kvantifikovat amplifikační produkt.

Metodou třetí generace je potom digitální PCR, která má mnoho předností oproti konvenční kvantitativní PCR. Mezi hlavní výhody metody patří využití limitující diluce, end-point terminace a Poissonovo rozdělení pravděpodobností (Sykes *et al*, 1992). Limitující diluce je princip, kde je celkové množství vzorku rozděleno do mnohých identických paralelně probíhajících reaktorů. Pomocí tohoto rozdělení budou přítomny reaktory obsahující templáty, které po end-point amplifikaci vykazují pozitivní signál a reaktory bez templátů vykazují signál negativní. Tímto způsobem může analyzátor binárně rozlišovat reakce v individuálních reaktorech na pozitivní a negativní. Počet přítomných DNA templátů pak lze vypočítat z frakce pozitivních end-point reakcí využitím Poissonova rozdělení pravděpodobností (Hindson *et al*, 2011).

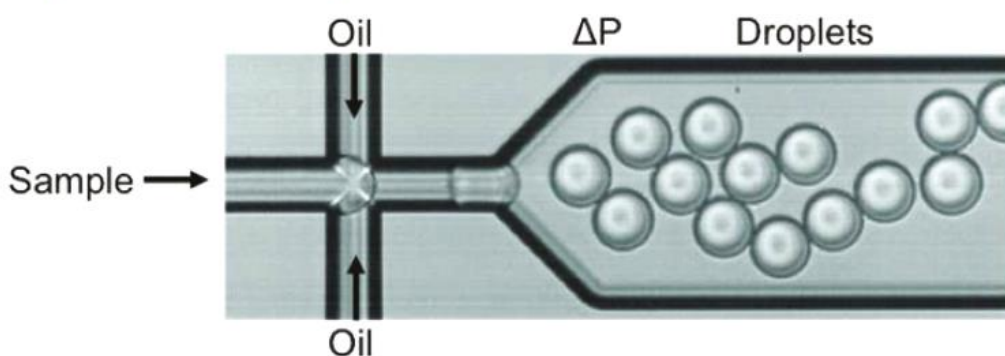
Praktické provedení metody droplet digital PCR je následovné: Nejdříve jsou PCR reakční směs obsahující DNA vzorek ve vhodné koncentraci se specifickými TaqMan sondami a olej pro tvorbu dropletů přepraveny do korespondujících jamek cartridge (Obr. č. 9, A). Aplikací podtlaku na sběrné jamky jsou roztoky z olejové a vzorkové jamky protaženy kanálky

za tvorby dropletů (Obr. č. 9, B). Vzniklé droplety proudí do sběrné jamky, kde díky rozdílu mezi olejovou a vodnou fází tvoří vrstvu nad nadbytečným olejem. Emulze je dále přenesena do klasické PCR 96-jamkové destičky, která je uzavřena a uložena do termocykléru k endpoint amplifikaci. Po amplifikaci je destička vložena do čtečky dropletů. Po odsátí emulze z jamek jsou jednotlivé droplety rozděleny pomocí spacerové kapaliny a analyzovány pomocí simultánní dvoubarevné detekce (Obr. č. 9, C) podobně jako u průtokové cytometrie. Analyzátor vyhodnotí signály dropletů, odstraní dublety a triplety na základě šířky píku a negativní droplety na základě residuální fluorescence dropletů. Amplituda fluorescence je užita k ustanovení mezní intenzity signálu pozitivní reakce pro danou TaqMan sondu.

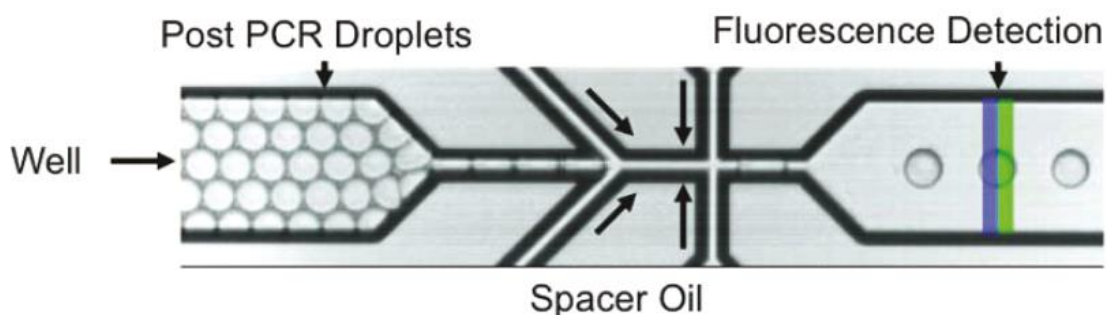
A) Schéma Cartridge



B) Generace dropletů

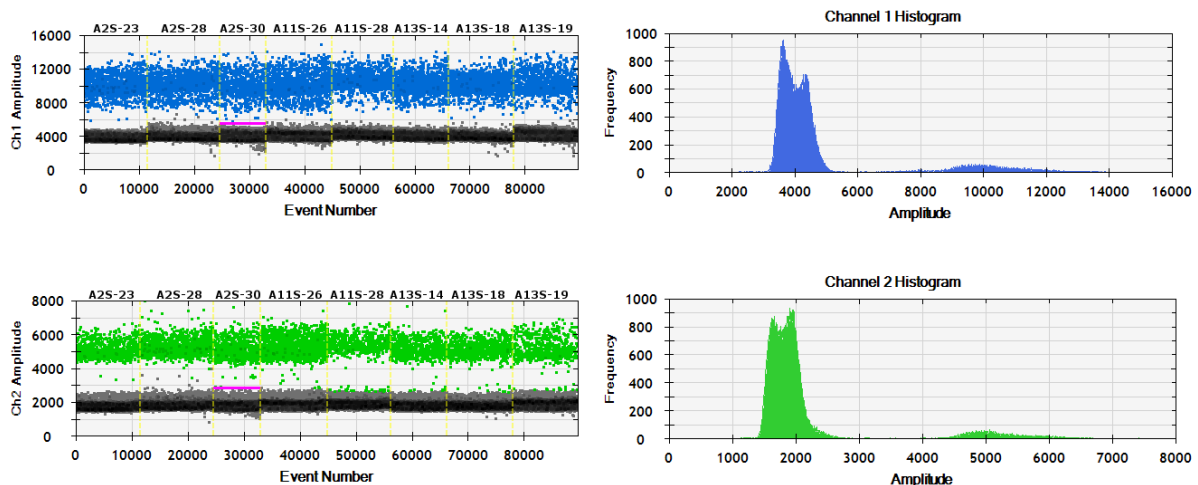


C) Analýza fluorescence dropletů

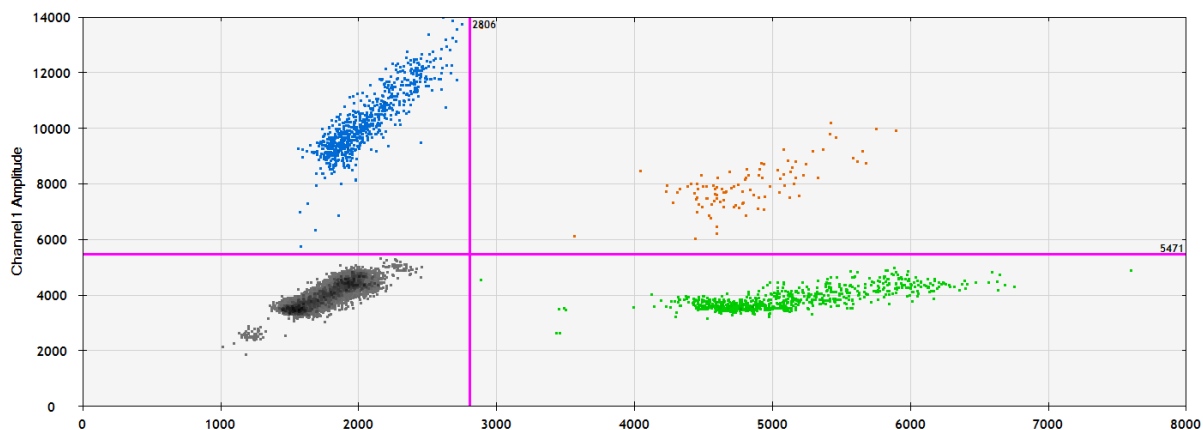


Obr. č. 9: Ilustrace metodického postupu digital droplet PCR (převzato z Hinderson et al, 2011).

Pro potřeby naší analýzy byla provedena PCR reakce s primery specifickými k chromozomu 4A, který slouží v analýze jako reference, a 3D, jehož zastoupení v genomu se snažíme zjistit. Analyzován je signál TaqMan sond komplementárních k produktům amplifikace – pro chromozom 4A je využita sonda značená fluoresceinem (FAMTM; absorpční λ_{\max} = 494 nm; emisní λ_{\max} = 518 nm) se sekvencí 5'-AAGAACTTCACACACGAACTCGGA-3'. Pro chromozom 3D byla využita sonda značená jiným fluorescenčním barvivem (VICTM; absorpční λ_{\max} = 538 nm; emisní λ_{\max} = 554 nm) se sekvencí 5'-CCTCACTCAAGCACCACATGC-3'. Pokud je v genomu přítomno stejné množství chromozomů 4A FAM a 3D VIC bude počet pozitivních dropletů pro oba kanály srovnatelné, kdežto u monozomiků budou jasně převažovat droplety indikující 4A chromozom. Při vyhodnocování lze jasně rozlišit negativní droplety od pozitivních podle úrovní jejich fluorescence (Obr. č. 10 a 11).



Obr. č. 10: Histogram intenzity fluorescenčního signálu dropletů vzorků rostlin A2S-23, A2S-28, A2S-30, A11S-26, A11S-28, A13S-14, A13S-18 a A13S-19; modře značen signál z 4A chromozomu, zeleně signál z 3D chromozomu.



Obr. č. 11: Distribuce intenzity fluorescenčního signálu dropletů vzorku rostliny A2S-30. Šedě znázorněny droplety bez fluorescence, modře znázorněny droplety obsahující materiál z chromozomu 4A, zeleně znázorněny droplety obsahující genetický materiál z chromozomu 3D, oranžově znázorněny droplety obsahující materiál z chromozomů 4A a 3D. Fialové linie značí nastavený threshold pro pozitivní droplety.

3. CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na téma charakterizace delečních linií, digital droplet PCR a párování chromozomů u hexaploidní pšenice seté *Triticum aestivum*.
- Aplikace molekulárních markerů pro určení přítomnosti a počtu kopií chromozomu 3D pšenice seté v delečních liniích.
- Selektce linií s chromozomem 3D nesoucím delecí v dizomické konstituci.

4. MATERIÁL A PŘÍSTROJE

4.1. Biologický materiál

Semena pšenice seté (*Triticum aestivum*) L. cv. 'Chinese Spring' vzniklé samosprášením nebo volnou polinací hemizygotního potomstva tetra-nulizomika (tetrazomik pro chromozom 3A, nulizomik pro chromozom 3D) a adiční linie sobeckého 2C chromozomu původem od mnohoštetu válcovitého (*Ae. cylindrica*) do genomu pšenice seté L. cv. 'Chinese Spring'. Z této populace byly vybrány pro potřeby práce rostliny obsahující delecii na chromozomu 3D.

4.2. Reagencie a chemikálie

Agaróza, VWR Life Science Agarose I™, VWR

Deionizovaná voda

Etanol (70%), Lach-Ner

Ethidium bromid, Sigma-Aldrich

Kapalný dusík, Cryotherm

SANAN KLASIK, Krystal

Kit na izolaci DNA z rostlin, NucleoSpin Plant II, Macherey-Nagel

Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific™) kit

Primery pro 3D, Eurofin Genomics

F: 5' - CTC ATC TCA GGC TGT CTA ATT AA - 3'

R: 5' - CAT AGA TCC CTC CTT GAA GGA - 3'

Primery pro 4A, Eurofin Genomics

F: 5' - ATT TTG GGT CCT TGT TGT TAT C - 3'

R: 5' - ACA CGC ATG AAG TGT ATA ATG C - 3'

Ribonukleáza A, Sigma-Aldrich

Standart relativní molekulové hmotnosti, FastGene 100 bp, Nippon Geneics

TaqMan sondy, Eurofin Genomics

Sonda pro A4: 5' - AAG AAC TTC ACA CAC GAA CTC GGA - 3'

Sonda pro 3D: 5' - CCT CAC TCA AGC ACC ACA TGC - 3'

0,1 × TE pufr (1 mM tris(hydroxymethyl)aminometan, 100 μM ethylendiaminotetraoctová kyselina, upraveno na pH 8,0)

5 × TBE pufr (450 mM tris(hydroxymethyl)aminometan, 450 mM kyselina boritá, 10 mM EDTA)

4.3. Spotřební materiál

96jamkové PCR destičky, SARSTEDT

CAREO Combi granulát proti škůdcům, SUBSTRAL

ddPCR™ Droplet Reader Oil, Bio-Rad

DG8™ Cartridges for QX100™/QX200™ Droplet generator, Bio-Rad

Matrix™ pipetové špičky s filtrem, Thermo Fisher Scientific

Mikrozkumavky 1,5 ml, Eppendorf

Mikrozkumavky 2 ml, Sorenson

Olej pro próby, Droplet generation oil for probes, Bio-Rad

Pipetovací špičky

Rašelinové květináče Jiffy Pot strips 6×6 cm, Jiffy

Skleněné kuličky

Substrát pro trávníky, Terrasan

4.4. Přístroje

Droplet Digital™ PCR System, QX200™, Bio-Rad

Droplet Generator, QX200™, Bio-Rad

Dvoudílná chladnička, FK 28b, Eurotech

Elektronická pipeta 30 µl, Matrix™ EXP, Thermo Fisher Scientific

Gelový dokumentační a analytický systém, InGenius, Syngene

Horizontální elektroforetický systém, Owl A6, Thermo Fisher Scientific

Laboratorní váha, Vibra AJ-820CE, Vibra

Lednice, CALEX 175, SAMSUNG

Lyofilizátor, Heto Drywinner CT 60 E, Thermo Fisher Scientific

Mikrocentrifuga, Micro Star 17R, VWR

Mikrovlnná trouba, Daewoo KOR 6C2B, Daewoo

Oscilační mlýnek, MM301, Retsch

PCR Plate Sealer, PX1™, Bio-Rad

Spektrofotometr, NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific

Stolní mikrocentrifuga, MiniStar silverline, VWR

Termocykler, C1000 Touch, Bio-Rad

Tiskárna digitální, UP-D897, Sony

Třepačka, Reax Top, Heidolph

Vakuová pumpa, RZ 2.5, Vacuubrand

Vodní lázeň, Jouan Nerez J18

Zdroj napětí pro elektroforézu, MP-300V, Major science

5. METODIKA

Pro selekci rostlin z delečních linií, které obsahovaly 3D chromozom s delecí v dizomické konstituci, byla potřeba volba správné strategie. Vzhledem k tomu, že selekce linií vyžaduje screening velkého počtu rostlin, u nichž není garantovaný výskyt hledaného delečního 3D chromozomu, není provedení ddPCR analýzy u každého vzorku vhodné – společně s izolací čisté DNA by takový přístup vedl k vysokým nákladům a časové i finanční náročnosti analýzy. Bylo tedy nutno zredukovat počet vzorků, u kterých je nutné izolovat čistou DNA a provést ddPCR analýzu. Tento problém byl vyřešen zavedením předběžné analýzy přítomnosti delečního chromozomu 3D pomocí Phire Plant PCR se specifickými primery na 3D chromozom. Tato analýza sice nedokáže rozlišit počet kopií delečního 3D chromozomu, ale nevyžaduje čistou DNA ani práci s fluorescenčními próbami, což nám dovolilo snadno a rychle odstranit ze souboru pěstovaných rostlin nulizomiky.

5.1. Sadba zástupců delečních linií pro chromozom 3D

Při pěstování delečních linií pšenice seté (*Triticum aestivum*) pro chromozom 3D bylo vysazováno 10 zástupců rostlin, pokud to zásoba semen pro danou deleční linii dovolovala. Sadba byla prováděna do sterilizovaného substrátu pro trávníky (sterilizace provedena autoklávováním) obohaceného o CAREO Combi granulát proti škůdcům s využitím rašelinových květináčů „Jiffy strips“ (6×6 cm). Každá zasazená rostlina byla umístěna do fytotronu. Fytotron byl nastaven na délku dne 16 hodin od 4:00 do 20:00 při teplotě 20 °C a délku noci 8 hodin od 20:00 do 4:00 při teplotě 16 °C. Vlhkosti vzduchu byla nastavena na konstantní hodnotu 60 %. Rostliny byly každý den zalévány.

5.2. Pre-screening chromozomu 3D s delecí pomocí Phire Plant PCR Master Mix kitu

Pre-screening byl prováděn u rostlin starších deseti dní. Z každé rostliny byl odebrán malý kousek (5 – 10 mm) nejstaršího lístku do jedné z jamek 96jamkové PCR destičky pro účely přepravy. V laboratoři byl postupně každý lístek vyjmut z jamky, do které bylo přidáno 20 µl dilučního pufru. Z každého listu byly odebrány dva disky o průměru 1,5 mm rostlinného materiálu pomocí vykrajovátka, které byly poté přeneseny do dilučního pufru v korespondující jamce PCR destičky. Proces byl opakován pro každý odebraný list. Takto uložený materiál v dilučním pufru byl inkubován po dobu 10 minut v termocykléru při teplotě

98 °C. Podle počtu prováděných reakcí byla dále připravena směs pro PCR dle rozpisu (Tab. č. 1), kvůli nepřesnosti pipetování u většího počtu vzorků bylo počítáno s 1 reakcí na 50 vzorků navíc.

Tab. č. 1: Složení reakční směsi pro Phire Plant PCR.

Reagencie	Zásobní koncentrace	Pracovní koncentrace	Objem na 1 reakci [μl]
Phire Plant Direct PCR Master Mix	2×	1×	10
Primery	50 μM	1 μM	0,4
Voda pro PCR	-	-	9,1
Celkem			19,5

Reakční PCR směs byla napipetována do 96jamkové PCR destičky po 19,5 μl. Do každé jamky bylo přidáno 0,5 μl izolované DNA z testovaných rostlin. Destička byla přenesena do termocykléru a byla provedena amplifikace DNA dle programu pro Phire Plant PCR (Tab. č. 2).

Tab. č. 2: Program termocykléru pro Phire Plant PCR.

Fáze programu	Teplota [°C]	Délka trvání [s]	Počet opakování
Prvotní denaturace	98	300	1×
Denaturace	98	5	35×
Annealing	60	5	
Extenze	72	20	
Finální extenze	72	60	1×
Chlazení	4	Infinite	

V případě potřeby byly vzorky uchovány v lednici při teplotě 4 °C.

Protože Phire Plant Direct PCR Master Mix již obsahuje nanášecí pufr, mohly být vzorky přímo naneseny na 1,2% agarózový gel společně se 100 bp standardem relativní molekulové hmotnosti. Elektroforéza byla prováděna při napětí 4,4 V/cm po dobu 60 minut. Po uplynutí této doby byl gel přenesen do roztoku ethidium bromidu v temné místnosti a inkubován po dobu 30 minut. Následovně byl gel opláchnut a přenesen do UV transluminátoru. Snímky gelu byly pořízeny a uloženy pro dokumentaci ve formátu .jpg. Po vyhodnocení snímků proběhla selekce pěstovaných rostlin na přítomnost delečního chromozomu 3D.

5.3. Izolace čisté DNA vybraných rostlin pomocí Nucleospin Plant II kitu

Z každé rostliny, u které byla ve fázi pre-screeningu prokázána přítomnost chromozomu 3D nesoucího delecii, byly odebrány tři kousky nejstaršího zeleného listu do 2 ml mikrozkušavky o přibližné délce lístku 3 cm. Takto odebrané vzorky byly dále vysušeny v otevřených mikrozkušavkách přes noc pomocí lyofilizátoru. Po vysušení vzorků listů byly do každé mikrozkušavky přidány 2 skleněné kuličky. Vzorky byly následně homogenizovány s užitím oscilačního mlýnku při frekvenci 27 otáček/sekundu po dobu 3 minut. Pokud po uplynutí času nebyly vzorky dostatečně rozemlety, byl tento krok opakován.

Izolace čisté DNA byla dále prováděna pomocí Nucleospin Plant II kitu. K homogenizovanému prášku bylo v laboratoři přidáno 400 μ l lyzačního pufru PL1 a 10 μ l ribonukleázy A. Směs byla protřepána a zkumavky přeneseny na 20 minut do vodní lázně předehřáté na 65 °C. Po uplynutí inkubace byly vzorky krátce centrifugovány a lyzát přenesen na sběrné zkumavky s Nucleospin[®] filtrem označeným fialovým proužkem. Zkumavky byly dále centrifugovány při 11 000 G po dobu 2 minut (použité filtry byly zlikvidovány). Lyzát byl dále přenesen do nové mikrozkušavky k připraveným 450 μ l vazebnému pufru PC. Z této směsi bylo po důkladném promíchání pipetou (prováděno dokud nebylo možno pozorovat vizuální spojení roztoků) přeneseno 700 μ l do nové sběrné zkumavky se Nucleospin[®] Plant II kolonou označenou zeleným proužkem. Zkumavky byly centrifugovány při 11 000 G po dobu 1 minuty. Tekutina ze sběrné zkumavky byla odstraněna, bylo přidáno 400 μ l promývacího pufru PW1 a centrifugováno při 11 000 G po dobu 1 minuty. Tekutina ve sběrné zkumavce byla odstraněna, bylo přidáno 700 μ l promývacího pufru PW2 a zkumavka byla centrifugována při 11 000 G po dobu 1 minuty. Tekutina ve sběrné zkumavce byla opět odstraněna a zkumavka byla znovu centrifugována při 11 000 G po dobu 2 minut. Zelená kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml mikrozkušavky a sběrná zkumavka byla odstraněna. Na zelenou kolonku bylo nanášeno 30 μ l předehřátého (65 °C) elučního pufru PE a zkumavky byly opět centrifugovány při 11 000 G po dobu 1 minuty. Tento krok byl jednou opakován pro každou kolonku pro finální objem 60 μ l.

U všech vzorků byla změřena koncentrace DNA, zkumavky byly důkladně popsány a následně zamrazeny a uchovávány při -20 °C.

5.4. Analýza počtu delečních chromozomů 3D využitím ddPCR

Část vzorků DNA izolované z rostlin pšenice seté obsahujících deleční chromozomy 3D byla naředěna na koncentraci DNA 10 ng/μl při objemu 20 μl do obyčejné PCR destičky.

Dle počtu analyzovaných vzorků bylo připraveno množství reakční směsi na ddPCR dle rozpisu (Tab. č. 3). Z důvodu nepřesnosti pipetování bylo za každých 24 analyzovaných vzorků připraveno množství reakční směsi o jednu reakci větší. Kvůli korekci nepřesnosti pipetování byl také navíc přidán 1 μl ddPCR supermix for probes (no UTP) do reakční směsi za každý analyzovaný vzorek.

Tab. č. 3: Rozpis reagensií potřebných pro jednu ddPCR.

Reagencie	Zásobní koncentrace	Pracovní koncentrace	Objem na 1 reakci [μl]
ddPCR supermix for probes (no dUTP)	2×	1×	10 (+1)
Reference primer 4A	50 μM	900 nM	0,36
Target primer 3D	50 μM	900 nM	0,36
Reference probe 4A (FAM)	10 μM	250 nM	0,5
Target probe 3D (VIC)	10 μM	250 nM	0,5
Voda bez nukleáz	-	-	3,28
Celkem			15 (+1)

Připravená reakční směs byla dále rozpipetována do obyčejné PCR destičky po 16 μl, do které bylo dále přidáno 5 μl individuálních vzorků čisté rostlinné DNA o koncentraci 10 ng/μl.

Do stojánku (DG8™ Cartridges for QX100™/QX200™ Droplet generator) byla vložena a zaklapnuta cartridge. Do spodních jamek (označeny „Oil“) bylo napipetováno 70 μl oleje pro próby. Do středních jamek bylo šetrně napipetováno 20 μl reakční směsi a DNA (pipetováno pod ostrým úhlem tak, aby nedocházelo ke tvorbě bublin v jamce). Po kontrole a odstranění bublin, byla přes cartridge přetažena gumička a následovně byla cartridge vložena do generátoru dropletů. Po tvorbě dropletů bylo z horních jamek cartridge velice šetrně nasáto pod tupým úhlem a poté pomalu vypouštěno na stěnu spodní části jamky ddPCR 96jamkové destičky 40 μl emulzní směsi (reakční směs a olej). Proces byl opakován, dokud nebyly všechny analyzované vzorky v ddPCR destičce. Destička byla uzavřena

propichovatelnou hliníkovou zatavovací folií, uložena do deepwell termocykléru a byl spuštěn program pro ddPCR (Tab. č. 4).

Tab. č. 4: Program termocykléru pro ddPCR.

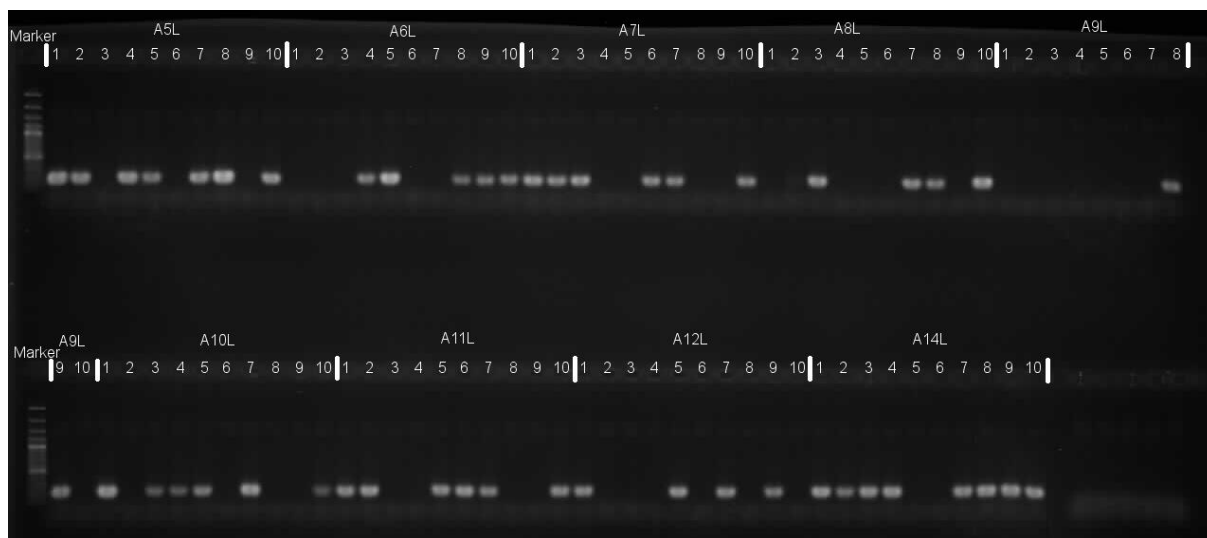
Fáze	Teplota [°C]	Délka trvání [s]	Počet opakování	Maximální rychlost změny teploty
Prvotní denaturace	95	600	1×	2 °C/s
Denaturace	94	30	40×	2 °C/s
Nasedání primerů/extenze	60	60		2 °C/s
Stabilizace	98	600	1×	2 °C/s
Chlazení	4	Infinite	-	2 °C/s

Po dokončení PCR programu byla destička vložena do držáku analyzátoru a po nastavení analytického programu dle počtu vzorků byla spuštěna analýza. Po dokončení programu byl porovnáván počet dropletů pozitivních pro FAM (reference – chromozom 4A), VIC (target – chromozom 3D), pro oba signály a z jejich poměru analyticky vypočten počet 3D chromozomů v rostlině. Pokud nebyl analyzátor schopen automaticky vyhodnotit výsledek, byl manuálně nastaven threshold pozitivní reakce. Destička byla vytažena z analyzátoru a odstraněna.

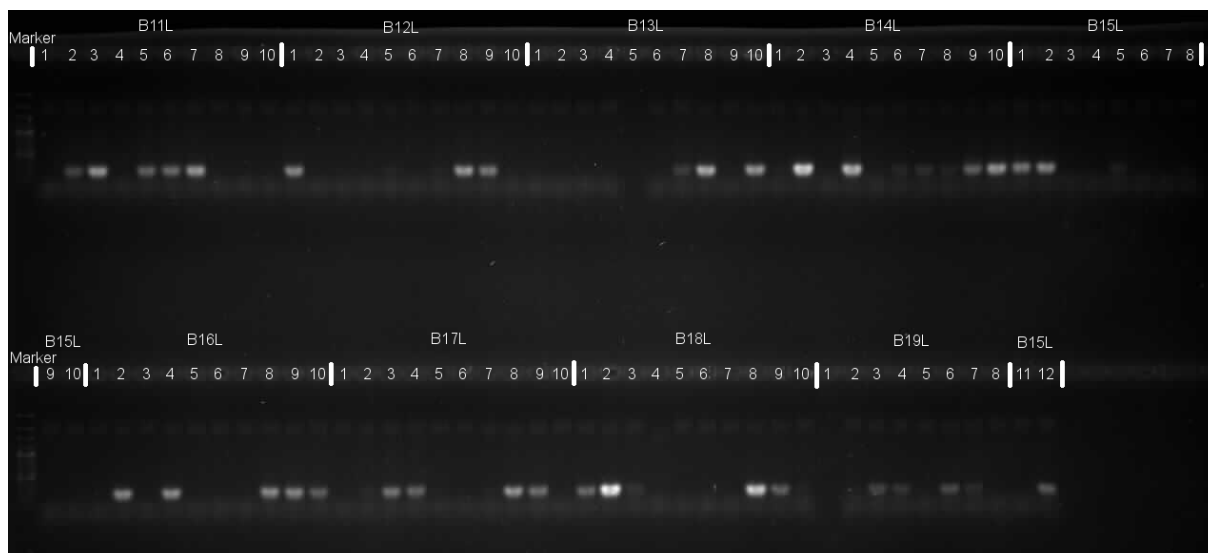
Rostliny jeví se v ddPCR analýze jako dizomické pro deleční chromozom 3D byly přesazeny do větších květináčů (15×15 cm) a umístěny zpět do fytotronu při stejném nastavení. Monozomické rostliny náležící do linií, u kterých semena došly, nebo jich byl nedostatek, byly rovněž přesazeny pro potřebu zachování linie. Ostatní rostliny byly odstraněny. Po dozrání vybraných rostlin byly sesbírány klasy do označených papírových sáčků. Semínka byla dále sklizena z klasů pomocí gumové trubičky a uložena do nových označených papírových sáčků.

6. VÝSLEDKY

K rozšíření souboru delečních linií bylo vysazeno 1248 semen ze 73 různých delečních linií generací F2 – F4. Z rostlin kultivovaných při předepsaných podmínkách 17 rostlin nevyklíčilo, z ostatních 1231 bylo možno odebrat dostatek rostlinného materiálu na provedení předběžné analýzy přítomnosti chromozomu 3D pomocí specifických primerů pro úsek blízký centromere 3D chromozomu (F: 5'-CTCATCTCAGGCTGTCTAATTA-3' a R: 5'-CATAGATCCCTCCTTGAAGGA-3') metodou Phire PCR. Výsledkem byla série elektroforetogramů (Obr. č. 12 a 13), kde byla u každé analyzované rostliny vyhodnocována přítomnost 168 bází dlouhého PCR produktu indikující přítomnost chromozomu 3D. Dohromady bylo tímto způsobem analyzováno 1231 rostlin pšenice seté a nalezeno 566 rostlin s přítomným chromozomem 3D (místa, která by obsahovala vzorky nevyklíčených rostlin, byla ponechána prázdná, aby byl zachován formát analýzy). Díky vysoké specifitě užitých primerů lze vyhodnotit jako pozitivní reakci i relativně slabě vizualizované PCR produkty (Obr. č. 13, B14L-6/7/8, B15L-5,...).



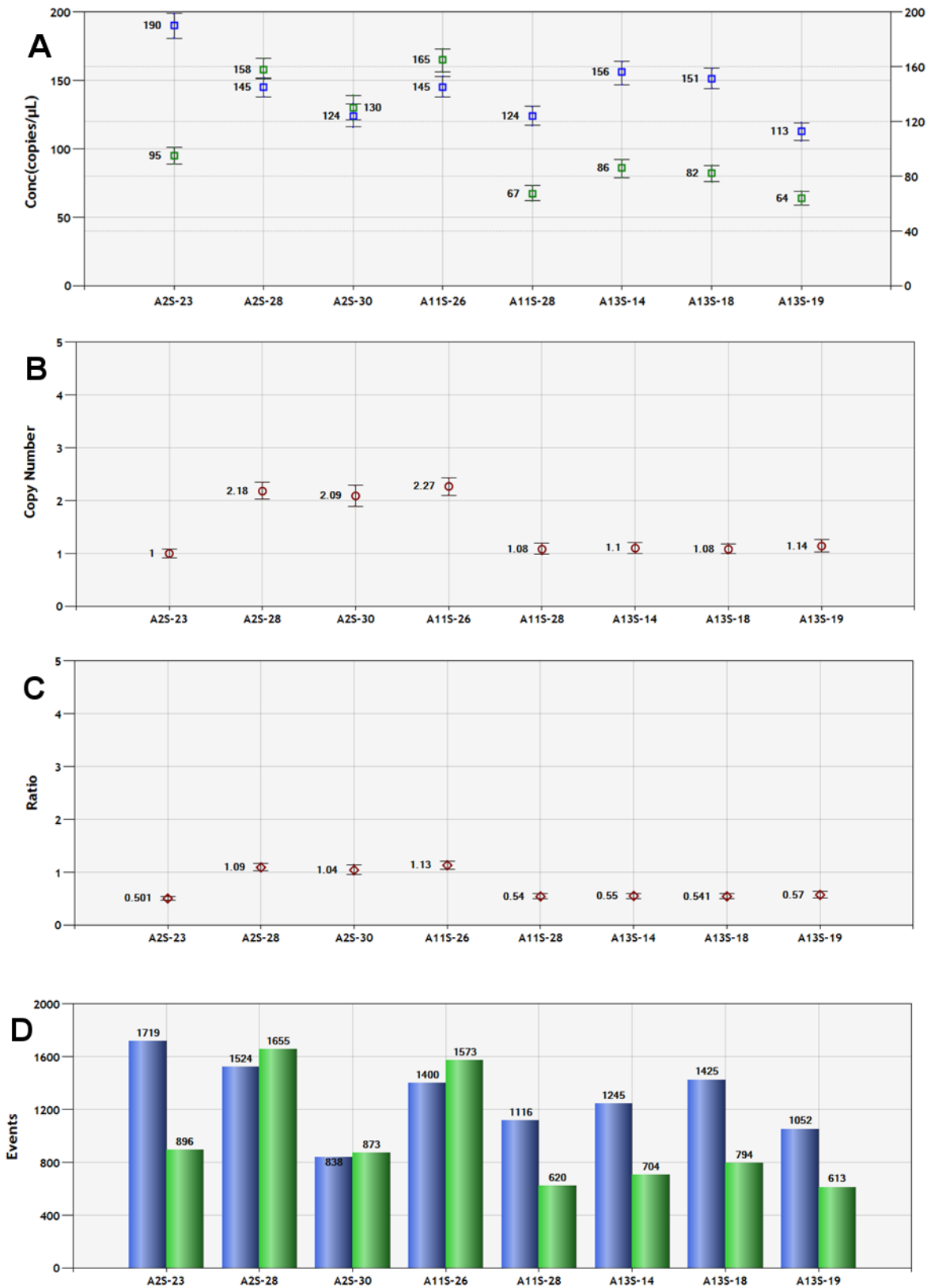
Obr. č. 12: Elektroforetogram přítomnosti 3D chromozomu u rostlinných linií A5L (10 zástupců), A6L (10 zástupců), A7L (10 zástupců), A8L (10 zástupců), A9L (10 zástupců), A10L (10 zástupců), A11L (10 zástupců), A12L (10 zástupců) a A14L (10 zástupců).



Obr. č. 13: Elektroforetogram přítomnosti 3D chromozomu u rostlinných linií B11L (10 zástupců), B12L (10 zástupců), B13L (10 zástupců), B14L (10 zástupců), B15L (12 zástupců), B16L (10 zástupců), B17 (10 zástupců), B18L (10 zástupců) a B19L (8 zástupců).

Po provedení selekce rostlin obsahujících chromozom 3D, byl odebrán materiál pro ddPCR. Pokud po Phire PCR analýze nebyly zvolené rostliny dostatečně vyvinuté, aby poskytly dostatečné množství rostlinného materiálu, byla izolace DNA o několik dnů (5 až 7) oddálena. Koncentrace izolované DNA z rostlin za použití uvedené metody kitem Nucleospin Plant II se obecně pohybovala v rozmezí 20 až 100 ng/μl s malým počtem vzorků překračující nebo nedosahující tyto hodnoty. V případě, že koncentrace izolované DNA nedosahovala hodnoty alespoň 8 ng/μl, byla izolace DNA dané rostliny opakována.

Po upravení koncentrace izolované DNA na hodnotu 10 ng/μl byla provedená ddPCR analýza počtu kopií chromozomů pro danou rostlinu. Dohromady bylo provedeno 8 ddPCR analýz a analyzováno 557 vzorků rostlin, u kterých byl analýzou Phire PCR prokázán chromozom 3D. 9 rostlin nebylo analyzováno buď z důvodů kapacitních, nebo kvůli nízké fitness rostliny. Pro použité množství čisté genomické DNA byla pro jednotlivá fluorescenční barviva získán průměrný počet 60 až 150 pozitivních dropletů na 1 μl. Celkové množství pozitivních dropletů na jednu reakci se potom pohybovalo v rozmezí 500 až 1500 pro jednotlivá fluorescenční barviva (Obr. č. 14). Dle poměru mezi počtem pozitivních dropletů pro chromozom 4A a 3D v reakci byly jednotlivé vzorky vyhodnoceny jako monozomické pro chromozom 3D nebo dizomické. Z celkového počtu 557 analyzovaných rostlin bylo 464 rostlin vyhodnoceno jako monozomických a 93 jako dizomických. Celkové výsledky Phire PCR a ddPCR analýzy jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6.



Obr. č. 14: Výsledky ddPCR analýzy. A – Počet pozitivních dropletů/μl, B – teoretický počet kopií chromozomu 3D, C – teoretický poměr chromozomů 3D:4A, D – celkový počet pozitivních dropletů (modře značené události pro 4A, zeleně značené události pro 3D) vzorků rostlin A2S-23, A2S-28, A2S-30, A11S-26, A11S-28, A13S-14, A13S-18 a A13S-19.

Tab. č. 5: Tabulka výsledků selekce linií s delecí na krátkém raménku chromozomu 3D; zeleně značené úspěšně izolované dizomické linie; šedě a bíle značené linie, u kterých nebyl nalezen dizomický zástupce (u šedých došel sadební materiál); červeně značené linie byly eliminovány.

Linie	Kultivace		Phire PCR	Droplet Digital PCR		Poměr		
	Vysazeno	Dorostlo	3D positive	Monozomik	Dizomik	Nulizomik	Monozomik	Dizomik
130A	20	20	13	12	1	0,350	0,600	0,050
303-2	20	20	11	10	1	0,450	0,500	0,050
766-1	10	10	8	7	1	0,200	0,700	0,100
977-1	20	20	17	15	2	0,150	0,750	0,100
A1S	10	10	4	3	1	0,600	0,300	0,100
A2S	30	29	7	5	2	0,759	0,172	0,069
A3S	10	10	4	3	1	0,600	0,300	0,100
A4S	10	10	6	5	1	0,400	0,500	0,100
A6S	10	10	7	5	2	0,300	0,500	0,200
A7S	10	10	4	2	2	0,600	0,200	0,200
A8S	30	30	15	14	1	0,500	0,467	0,033
A10S	10	10	7	5	2	0,300	0,500	0,200
A11S	30	29	10	9	1	0,655	0,310	0,034
A12S	10	10	5	4	1	0,500	0,400	0,100
A13S	44	43	12	12	0	0,721	0,279	0,000
A14S	10	10	5	4	1	0,500	0,400	0,100
A15S	10	10	2	2	0	0,800	0,200	0,000
B1S	10	10	8	7	1	0,200	0,700	0,100
B2S	10	10	4	3	1	0,600	0,300	0,100
B4S	10	10	7	5	2	0,300	0,500	0,200
B5S	10	10	5	4	1	0,500	0,400	0,100
B6S	3	1	0	0	0	1,000	0,000	0,000
B7S	10	10	5	3	2	0,500	0,300	0,200
B8S	10	10	8	6	2	0,200	0,600	0,200
B9S	10	10	9	7	2	0,100	0,700	0,200
B10S	10	9	4	4	0	0,556	0,444	0,000
B1SL	10	10	5	3	2	0,500	0,300	0,200
	387	381	192	159	33	0,496	0,417	0,087

Tab. č. 6a: Tabulka výsledků selekce linií s delecí na dlouhém raménku chromozomu 3D; zeleně značené úspěšně izolované dizomické linie; šedě a bíle značené linie, u kterých nebyl nalezen dizomický zástupce (u šedých došel sadební materiál); červeně značené linie byly eliminovány.

Linie	Kultivace		Phire PCR	Droplet Digital PCR		Poměr		
	Vysazeno	Dorostlo	3D positive	Monozomik	Dizomik	Nulizomik	Monozomik	Dizomik
30B	20	20	6	5	1	0,700	0,250	0,050
38-8	32	32	9	8	1	0,719	0,250	0,031
83-8	54	54	8	8	0	0,852	0,148	0,000
173-2	10	10	5	4	1	0,500	0,400	0,100
2057-6	10	10	5	4	1	0,500	0,400	0,100
2758-1	10	10	3	2	1	0,700	0,200	0,100
A1L	30	30	9	8	1	0,700	0,267	0,033
A2L	10	10	6	4	2	0,400	0,400	0,200
A3L	30	30	9	8	1	0,700	0,267	0,033
A4L	32	32	15	12	3	0,531	0,375	0,094
A5L	10	10	7	6	1	0,300	0,600	0,100
A6L	12	12	7	7	0	0,417	0,583	0,000
A7L	30	29	14	12	2	0,517	0,414	0,069
A8L	10	10	4	2	2	0,600	0,200	0,200
A9L	54	54	17	16	1	0,685	0,296	0,019
A10L	10	10	6	4	2	0,400	0,400	0,200
A11L	10	10	6	5	1	0,400	0,500	0,100
A12L	10	10	4	3	1	0,600	0,300	0,100
A14L	10	10	8	7	1	0,200	0,700	0,100
A15L	20	20	7	6	1	0,650	0,300	0,050
A16L	20	20	11	10	1	0,450	0,500	0,050
A18L	10	9	7	6	1	0,222	0,667	0,111
A19L	20	20	7	6	1	0,650	0,300	0,050
A20L	32	32	17	15	2	0,469	0,469	0,063
A21L	44	44	17	17	0	0,614	0,386	0,000
B2L	10	9	5	3	2	0,444	0,333	0,222
B3L	32	28	13	12	1	0,536	0,429	0,036
B4L	10	10	8	6	2	0,200	0,600	0,200
B5L	20	20	10	9	1	0,500	0,450	0,050
B6L	20	20	10	9	1	0,500	0,450	0,050
B7L	10	10	6	4	2	0,400	0,400	0,200
B8L	10	10	5	3	2	0,500	0,300	0,200

Tab. č. 6b: Pokračování tabulky výsledků selekce linií s delecí na dlouhém raménku chromozomu 3D; zeleně značené úspěšně izolované dizomické linie; šedě a bíle značené linie, u kterých nebyl nalezen dizomický zástupce (u šedých došel sadební materiál); červeně značené linie byly eliminovány.

Linie	Kultivace		Phire PCR	Droplet Digital PCR		Poměr		
	Vysazeno	Dorostlo	3D positive	Monozomik	Dizomik	Nulizomik	Monozomik	Dizomik
B9L	10	10	6	4	2	0,400	0,400	0,200
B10L	32	31	16	13	3	0,484	0,419	0,097
B11L	10	10	5	4	1	0,500	0,400	0,100
B12L	20	20	11	10	1	0,450	0,500	0,050
B13L	32	31	14	12	2	0,548	0,387	0,065
B14L	10	10	7	6	1	0,300	0,600	0,100
B15L	17	16	6	5	1	0,625	0,313	0,063
B16L	20	20	11	10	1	0,450	0,500	0,050
B17L	10	10	4	2	2	0,600	0,200	0,200
B18L	10	10	6	3	3	0,400	0,300	0,300
B19L	8	7	4	4	0	0,429	0,571	0,000
B20L	10	10	0	0	0	1,000	0,000	0,000
B21L	10	10	8	6	2	0,200	0,600	0,200
U1L	10	10	5	4	1	0,500	0,400	0,100
	861	850	374	314	60	0,560	0,369	0,071

Ze 73 analyzovaných delecčních linií pšenice seté se podařilo izolovat v dizomické konstituci rostliny 64 různých rostlinných linií, u zbylých linií toto nebylo možné. Delecční linie A13S, 83-8 a A21L, byly analyzovány za nalezení mnohých monozomiků, ovšem z časových důvodů nebylo možné analyzovat více rostlin. U delecčních linií A15S, B10S, A6L a B19L byly zanalyzovány všechny dostupná semena, nebyl mezi nimi ovšem nalezen žádný dizomik. Ve fytotronu jsou kultivováni monozomičtí zástupci těchto linií, které budou užity k produkci více potenciálně dizomických semen. U delecčních linií B6S a B20L nebylo možné nalézt žádné dizomické ani monozomické zástupce i přes opakovanou analýzu.

7. DISKUZE

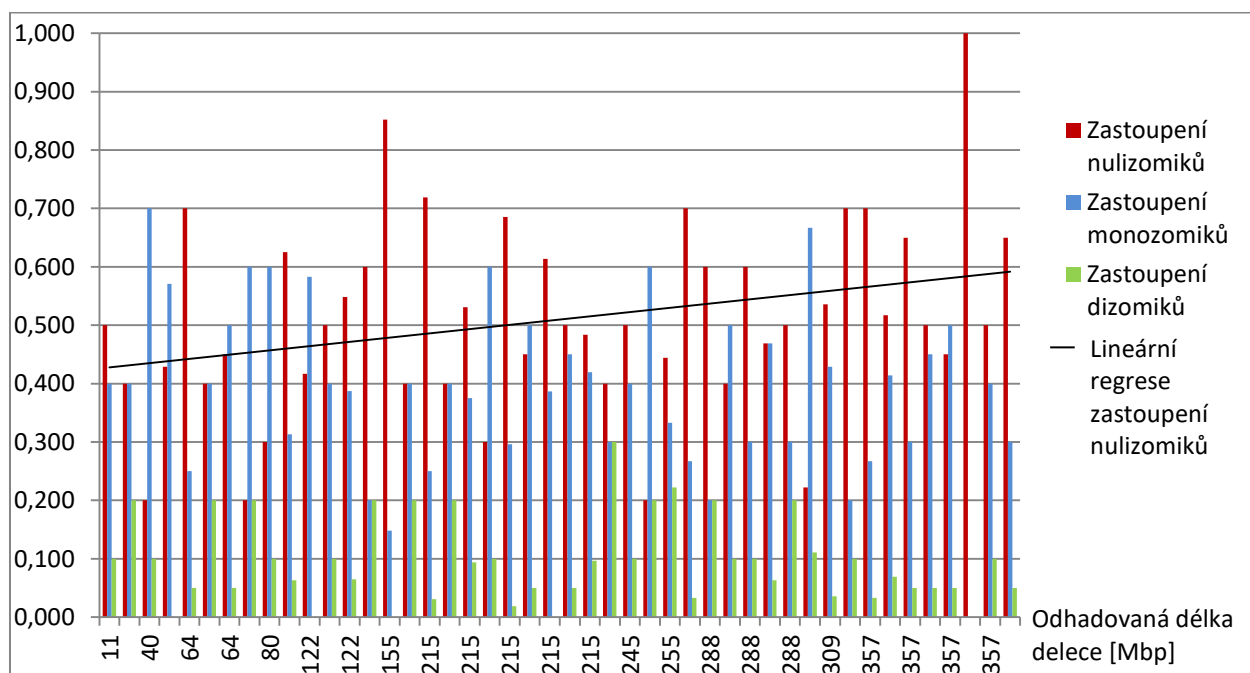
Cílem této diplomové práce byla tvorba souboru rostlinných linií pšenice seté (*T. aestivum*) cv. Chinese Spring nesoucí delece v různém rozsahu v dizomické konstituci. V tomto úkolu jsem byl schopen úspěšně izolovat alespoň jednoho dizomického jedince z 64 delečních linií. U pouhých 9 rostlinných linií nebylo možno izolovat zástupce v dizomické konstituci. Úspěšnost selekce tedy převyšovala 87 %. Bohužel i přes správný pracovní postup, linie B6S a B20L při izolaci úplně zanikly. Jak uvádí tabulky 5 a 6, v obou případech se jednalo i linie, které obsahovaly malý počet semen (3 pro B6S a 10 pro B20L). Situace navíc byla komplikována faktem, že pro linii B6S z 3 zasetých semen vyklíčilo pouze jedno. Po provedení předběžné Phire PCR analýzy byla u všech vzorků předběžná analýza pro jistotu opakována s nově izolovanou DNA v nově namíchané reakční směsi. Tato analýza ovšem vedla pouze k potvrzení předešlého výsledku – tedy, že mezi zasazenými rostlinami ani jedna neobsahuje deleční chromozom 3D. Podobný případ nastal i u linií A15S, B10S, A6L a B19L. Ovšem u těchto linií bylo alespoň možné izolovat monozomické zástupce nesoucí deleci, kteří mohou po samosprašení vyprodukovat potenciálně dizomické potomstvo pro deleci na 3D. Této situaci jsem se mohl vyhnout volbou lepší sadební strategie. Kdybych jako první provedl analýzu linií s malým počtem semen, mohl jsem mít mnohem dříve přístup k jejich potomstvu. U zbylých delečních linií, A13S, 83-8 a A21L, byl pozorován výrazný posun štěpného poměru k nulizomikům, což relativně zkomplikovalo selekci. Potenciálním řešením tohoto problému by bylo vysazení mnohem většího počtu zástupců této linie, jenž by kompenzovalo menší výskyt jedinců obsahujících deleční chromozom 3D. U žádné z rostlinných linií ovšem nebyl pozorována snížená klíčivost, jako bylo pozorováno u předchozích hybridizačních studií (Endo *et* Gill, 1996).

U ddPCR analýzy byla pozorována téměř u všech analyzovaných vzorků mírně vyšší počet pozitivních dropletů pro 3D chromozom. Vysvětlením tohoto fenoménu by mohla být délka fluorescenčních sond, která je u sondy pro 3D chromozom o 3 nukleotidy menší. Toto by mohlo vést ke snadnější hybridizaci sond na templát a pozorovanému navýšení dropletů pozitivních na 3D chromozom o přibližně 10 %. Tento jev není ve většině případů dostatečně signifikantní, aby změnil výsledek analýzy, ale je užitečné na něj myslet při vyhodnocování sporných výsledků.

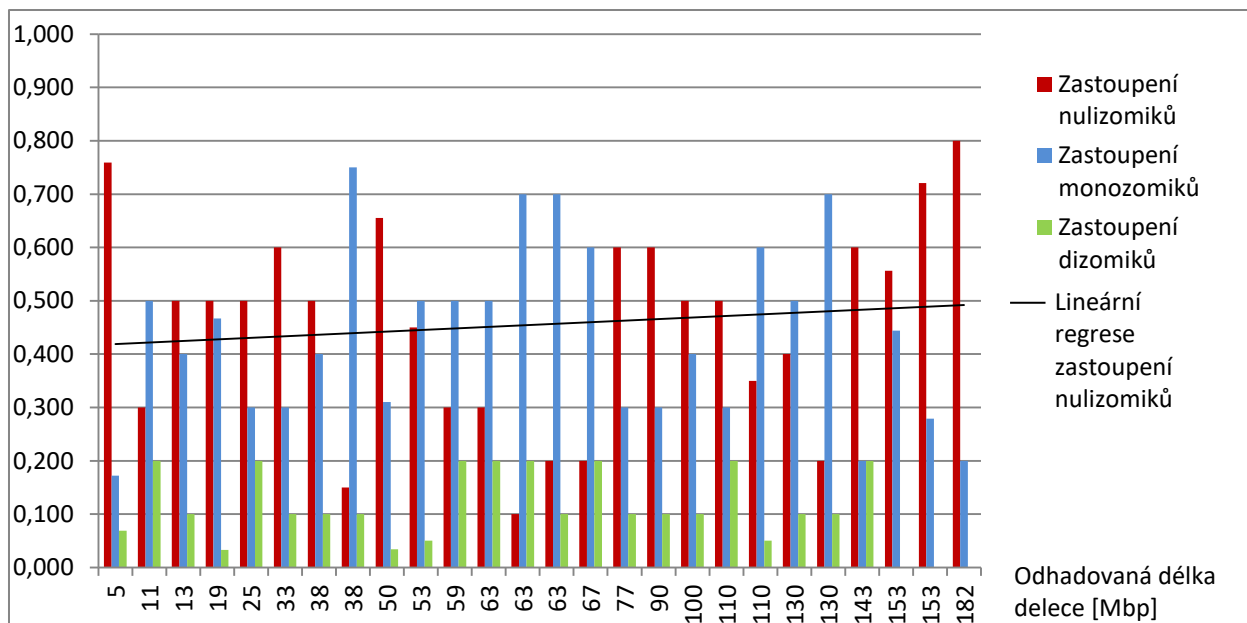
U vybraných rostlin nesoucích deleci na chromozomu 3D, které v průběhu selekce dosáhly plného vzrůstu a následně poskytly semena, bylo možné pozorovat jisté snížení počtu

vyprodukovaných semen oproti wildtype pšenici seté. Tyto výsledky byly očekávány z předešlých výzkumů (Endo, 1996) a pozorování v laboratoři. Zvláštností ovšem je, že rostliny kultivované v zimním období byly obecně menšího vzrůstu a nižší fitness než rostliny pěstované v jarních měsících i přes identické nastavení fytotronu, ve kterém byly kultivovány.

Byla rovněž pozorována odchylka od klasického genotypového štěpného poměru, jak diktuje 2. Mendelův zákon. Za normálních podmínek by u rostlin, které vznikly samosprášením monozomických jedinců, by měl být pozorován poměr 1:2:1. U našich delečních linií byl pozorován posun v tomto poměru ve prospěch nulizomiků. Toto je konsistentní s předchozími studii na delečních liniích (Endo *et* Tsunewaki, 1975; Endo, 2007). Vzhledem k velkému množství analyzovaných vzorků o různém rozsahu delecí jsme se rovněž pokusili stanovit, zda existuje nějaká korelace mezi rozsahem delecce na chromozomu 3D a posunem genotypového poměru. Seřazením delečních linií podle rozsahu jejich delecce (přibližně ustanoveno charakterizací linií užitím molekulárních markerů) a porovnáním štěpného poměru mezi nulizomiky, monozomiky a dizomiky bylo možno získat několik poznatků. Lineární regresí zastoupení nulizomiků bylo možné pozorovat slabou korelaci mezi rozsahem delecce a posunem štěpného poměru více ve prospěch nulizomiků u delecí na dlouhém raménku (Graf č. 1). U delecí krátkého raménka byl tento trend ještě méně výrazný a bylo ho možno pozorovat až po odstranění linie B6S, která obsahovala jediného nulizomického zástupce (Graf č. 2).



Graf č. 1: Graf zastoupení štěpného poměru v závislosti na odhadovaném rozsahu delecce dlouhého raménka 3D chromozomu.



Graf č. 2: Graf zastoupení štěpného poměru v závislosti na odhadovaném rozsahu delece krátkého raménka 3D chromozomu.

Pro tento jev může existovat několik různých vysvětlení. V první řadě délka delece je přirozeně omezena délkou raménka chromozomu – u dlouhého raménka se tedy budou přirozeně moci vyskytovat delece o větším rozsahu. Pokud opravdu existuje korelace mezi délkou delece a štěpným poměrem potomstva, bude mnohem znatelnější u delecí dlouhého raménka. Tato teorie by byla dále podporována faktem, že rostlinné linie s delecemi na krátkém raménku o největším rozsahu (153 – 182 Mbp) rovněž měli silný posun poměru k nulizomikům. Zajímavé však je, že několik linií s delecí o rozsahu 59 až 77 Mbp mají relativně normální štěpný poměr, mezitím co linie s delecemi o menším rozsahu mají opět silně posunutý štěpný poměr k nulizomikům. Pravděpodobným vysvětlením by mohla být přítomnost rozsáhlejší delece na jiném chromozomu, protože jak popisoval Endo (1990), gametocidní chromozomy i za přítomnosti supresorů mohou vyvolávat zlomy více chromozomů. V našem případě bychom si nebyli přítomnosti takové delece vědomi, protože screening byl prováděn pouze pro chromozom 3D. Samozřejmě cílem této práce nebylo provádět statistickou analýzu této závislosti a tak je i tento výsledek zatížen výraznou statistickou chybou – různé počty analyzovaných rostlin u linií, selekční a vzorkový bias.

8. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo provedení literární rešerše na téma genomu allohexaploidní pšenice seté *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring, specificky pak na jeho evoluci a systém párování homologních chromozomů. Dále charakterizovat tvorbu delečních linií této zemědělsky významné plodiny využitím gametocidních chromozomů původem od mnohoštetu vejčitého *Aegilops cylindrica* a popsat techniku Droplet Digital PCR a její užití k určení počtu přítomných delečních chromozomů.

V rámci praktické části byla provedena selekce zástupců 73 linií pšenice seté cv. Chinese Spring obsahujících delece na chromozomu 3D. Bylo celkově nalezeno 93 rostlin nesoucích deleci na chromozomu 3D v dizomické konstituci z 64 různých delečních linií. Dvě deleční linie, B6S a B20L, byly vyřazeny. Zbýlých 7 delečních linií nebylo možné izolovat v dizomické konstituci.

Získané charakterizované deleční linie v dizomické konstituci budou namnoženy a následně využity k fyzickému zakotvení genů na chromozomu 3D, především potom genu *Ph2* „Pairing homologues“, který hraje esenciální roli při párování homologních chromozomů.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

bp	párů bází
Br	gen tříštění osin
CE	centrální element
cv.	kultivar
ddPCR	digital droplet polymerázová řetězová reakce
DNA	deoxyribonukleová kyselina
LE	laterální element
PCR	polymerázová řetězová reakce
Ph1, Ph2	geny párování homologů
SC	synaptonemální komplex
TBE pufr	Tris-borát-EDTA pufr
TE pufr	Tris-EDTA pufr
Tg	gen přilnavé plevy

10. LITERATURA

Badaeva ED, Shkutina FM, Bogdevich IN, Badaey NS (1986): Comparative Study of *Triticum aestivum* and *T. timopheevi* Genomes Using C-Banding Technique. *Pl. Syst. Evol.* 154: 183-194.

Brenner S, Miller J (2001): *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press Inc. 1. vydání. ISBN 978-0-12-227080-2.

Driscoll CJ (1972): Genetic suppression of homoeologous chromosome pairing in hexaploid wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 14(1): 39-42.

Dubcovsky J, Dvorak J (2007): Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat Under Domestication. *Science* 316 (5833): 1862 – 866.

Endo TR, Tsunewaki K (1975): Sterility of common wheat with *aegilops triuncialis* cytoplasm. *Journal of Hereditary* 66: 13-18.

Endo TR (1982): Gametocidal chromosomes of three *Aegilops* species in common wheat. *Can J Genet Cytol* 24:201-206.

Endo TR (1988): Induction of chromosomal structural changes by a chromosome of *Aegilops cylindrica* L. in common wheat. *Journal of Heredity* 79: 366-370.

Endo TR (1990): Gametocidal chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat. *Jpn. J. Genet.* 65: 135-152.

Endo TR (2007): The gametocidal chromosome as a tool for chromosome manipulations in wheat. *Chromosome Research* 15: 67-75.

Endo TR, Gill BS (1996): The deletion stocks of common wheat. *Journal of Heredity* 87: 295-307.

Fawcett DW (1956): The fine structure of chromosomes in meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *Journal of Cell Biology* 2(4): 403.

Finch RA, Miller TE, and Bennett MD (1984): "Cuckoo" *Aegilops* addition chromosome in wheat ensures its transmission by causing chromosome breaks in melospores lacking it *Chromosoma* 90: 84-88.

Gill BS, Appels R, Botha-Oberholster AM, Buell CR, Bennetzen JL, Chalhoub B, Chumley F, Dvořák J, Iwanaga M, Keller B, Li W, McCombie WR, Ogihara Y, Quetier F, Sasaki T (2004): A Workshop Report on Wheat Genome Sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. *Genetics* 168: 1087-1096.

Griffiths S, Sharp R, Foote TN, 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.

Hammer K (1984): The domestication syndrome. *Die Kulturpflanze* 32(1): 11-34.

Hinderson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Blegrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW (2011): High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantification of DNA copy number. *Anal Chem* 83(22): 8604 – 8610.

Holm PB, Wang X (1988): The effect of chromosome 5B on synapsis and chiasma formation in wheat, *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring. *Carlsberg Res Commun* 53: 191-208.

Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, Gornicki P (2002): Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum / Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *PNAS* 99(12): 8133-8138.

Jantasuriyarat C, Vales MI, Watson CJW, Riera-Lizarazu O (2004): Identification and mapping of genetic loci affecting the free-threshing habit and spike compactness in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 108(2): 261-273.

Maan SS (1975): Exclusive Transmission of an Alien Chromosome in Common Wheat. *Crop Science* 15 (3): 287 – 292.

Martinez M, Naranjo T, Cuadrado, Romero C (1996): Synaptic behaviour of the tetraploid wheat *Triticum timopheevii*. *Theoretical and Applied Genetics* 93(7): 1139-1144.

Martinez M, Cunado N, Carcelén N, Romero C (2001): The *Ph1* and *Ph2* play different roles in the synaptic behavior of hexaploid wheat *Triticum aestivum*. *Theoretical Applied Genetics* 103: 398-405.

Martínez-Pérez E, Shaw P, Reader S, Aragón-Alcaide L, Miller T, Moore G (1999): Homologous chromosome pairing in wheat. *Journal of Cell Science* 112: 1761-1769.

Mello-Sampayo T (1971): Genetic regulation of meiotic chromosome pairing by chromosome 3D of *Triticum aestivum*. *Nat. New Biol.* 230: 23-24.

Montenegro JD, Golicz AA, Bayer PE, Hurgobin B, Lee H, Chan ChK, Visendi P, Lai K, Doležel J, Batley J, Edwards D (2017): The Pangenome of hexaploid bread wheat. *The plant journal* 90: 1007-1013.

Nalam VJ, Vales MI, Watson CJW, Kianian SF, Riera-Lizarazu O (2006): Map-based analysis of genes affecting the brittle rachitis character in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 112(2): 373-381.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS* 74: 5463-5467.

Schramm S, Fraune J, Naumann R, Hernandez-Hernandez A, Höög C, Cooke HJ, Alsheimer M, Benavente R (2011): A Novel Mouse Synaptonemal Complex Protein Is Essential for Loading of Central Element Proteins, Recombination, and Fertility. *PLOS Genetics* 7(5): e1002088. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002088>.

Sears ER (1952): Homoeologous chromosomes in *Triticum aestivum*. *Genetics* 37: 624.

Sears ER (1976): Genetic control of chromosome pairing in wheat. *Annual Review of Genetics* 10: 31-51.

Sutton T, Whitford R, Baumann U, Dong C, Able JA, Langridge P (2003): The *Ph2* pairing homoeologous locus of wheat (*Triticum aestivum*): Identification of candidate meiotic genes using comparative genetics approach. *The Plant Journal* 36: 443-456.

Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA (1992): Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques* 13(3): 444 – 9.

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. *Cytogenet Genome Res* 129: 211-223.

Riley R, Chapman V (1958): Genetic control of the Cytologically Diploid Behaviour of Hexaploid Wheat. *Nature* 182: 713-715.

Talbert LE, Smith LY, Blake NK (1998): More than one origin of hexaploid wheat is indicated by sequence comparison of low-copy DNA. *Genome* 41(3): 402-407.

Thorpe JP (1982): THE MOLECULAR CLOCK HYPOTHESIS: Biochemical Evolution, Genetic Differentiation and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13:139-168.

Tsujimoto H, Tsunewaki K (1985): Gametocidal genes in wheat and its relatives. II. Suppressor of the chromosome 3C gametocidal gene of *Aegilops triuncialis*. *Canadian Journal of genetics and cytology* 27(2): 178 – 185.

Wanjugi H, Coleman-Derr D, Huo N, Kianian SF, Luo MC, Wu J, Anderson O, Gu YQ (2009): Rapid development of PCR-based genome-specific repetitive DNA junction markers in wheat. *Genome* 52(6): 576-587.