

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2011

Kateřina Cviková

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Integrace genetické a fyzické mapy
chromozómu 3DS pšenice**

Kateřina Cviková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: Mgr. Jan Bartoš, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením Mgr. Jana Bartoše, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 6. 5. 2011

Ráda bych poděkovala Mgr. Janu Bartošovi, Ph.D. za jeho čas a odborné rady, které mi poskytl při zpracování mé diplomové práce a celému kolektivu Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci za vytvoření příjemného pracovního prostředí a pomoc při práci.

Souhrn

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) patří mezi nejdůležitější plodiny. Přechtením genomu pšenice mohou být získány cenné informace vedoucí k jejímu vylepšení. To je nezbytné vzhledem ke zvyšující se poptávce po výnosných a odolných liniích. Samotnému sekvenování předchází vytvoření genetických a fyzických map, jenž jsou potřebné pro získání orientačních bodů pro správné uspořádání sekvencí.

Teoretická část této práce podává přehled o možnostech tvorby fyzických map a technikách, které se využívají u rostlinných genomů. Zaměřuje se na ty nejpoužívanější, mezi než patří HAPPY mapování, mapy radiačních hybridů a zejména fyzické kontigové mapy. Dále popisuje integraci fyzických a genetických map a typy vhodných markerů. U přímého ukotvování je důraz kladen na N-dimenzionální poolovací strategii, která je součástí praktické části. Zmíněno je i reverzní a hybridní ukotvování.

Praktická část se zabývá ukotvováním již známých genetických mikrosatelitových markerů a markerů odvozených z genů rýže na MTP (minimum tiling path) fyzické kontigové mapy chromosomu 3DS pšenice. K tomu byla využita třídímenzionální poolovací strategie s technikou PCR skríníngu na agarosovém gelu. Tímto přístupem bylo ukotveno 111 kontigů o celkové délce 31,3 Mb, což odpovídá 10,1 % MTP chromosomu 3DS pšenice.

Summary

Bread wheat (*Triticum aestivum L.*) is one of the world's most important crop. Sequencing of the genome can gain valuable information leading to its improvement. This is necessary due to increasing demand for yield and resistant lines. Sequencing itself was preceded the creation of genetic and physical maps, which are necessary to obtain landmarks for the correct ordering of sequences.

The theoretical part is an overview of techniques for creation physical maps, which are used in plant genomes. It focuses on the most commonly used methods like HAPPY mapping, radiation hybrid maps and especially physical contig maps. It describes also integration of physical and genetic maps and types of suitable markers. The emphasis is placed on N-dimensional pooling strategy, which is a part of the practical section. Reverse and hybrid anchoring is also mentioned.

The practical part deals with anchoring of known genetic microsatellite markers and markers derived from genes of rice on MTP (minimum tiling path) of physical contigs map of wheat chromosome 3DS. PCR screening of three-dimensional pools on agarose gel was used for anchoring. 111 contigs with cumulative length of 31,3 Mb were anchored. This number corresponds to 10,1 % MTP of wheat chromosome 3DS.

1	Cíle práce	8
2	Úvod	9
3	Současný stav řešené problematiky	10
3.1	Fyzické mapy.....	11
3.1.1	HAPPY mapování	11
3.1.2	Mapování radiačními hybridy	12
3.1.3	Fyzické kontigové mapy.....	12
3.1.4	Fingerprinting	14
3.2	Použití FISH při mapování a integraci map	15
3.3	Integrace genetické a fyzické mapy.....	16
	EST (Expressed Sequence Tag)	17
	SSR (Simple Sequence Repeats)	17
	AFLP (Amplified Fragment Length Polymorfism).....	17
	DArT (Diversity Array Technology).....	18
	SNP (Single Nucleotide Polymorphism).....	18
3.3.1	Přímé ukotvování.....	19
	Hybridizace na membránách o vysoké hustotě	19
	N-dimenzionální směsné pooly	21
3.3.2	Reverzní ukotvování.....	24
3.3.3	Hybridní ukotvování.....	24
4	Materiál a metodika	25
4.1	Biologický materiál	25
4.2	Postup	25
4.2.1	Izolace DNA z poolů	25
4.2.2	PCR reakce	26
4.2.3	Elektroforetická separace a vizualizace.....	28
4.3	Vyhodnocení.....	28
4.4	Chemikálie a roztoky.....	28
4.4.1	Chemikálie.....	28
4.4.2	Pufry	29
4.4.3	Média	29
4.4.4	Roztoky.....	29
4.5	Vybavení laboratoře	30
5	Výsledky	31

6	Diskuse.....	41
7	Závěr.....	44
8	Literatura.....	45
9	Seznam použitých zkratek a symbolů.....	56
10	Přílohy.....	58

1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo

- vypracovat literární rešerši na téma konstrukce fyzické mapy a ukotvování kontigů na jednotlivé chromosomy,
- příprava DNA z BAC klonů,
- vyhledání vhodných markerů v databázích a odvození nových markerů z chromosomově specifických sekvencí,
- fyzické a genetické zamapování molekulárních markerů,
- bioinformatické zpracování výsledků, integrace fyzické a genetické mapy.

2 Úvod

Pšenice (*Triticum aestivum* L.) je pro 40 % světové populace hlavní potravinou a proto patří mezi jednu z nejvýznamnějších plodin. Zvětšující se lidská populace, zhoršující se klimatické podmínky a neustálý útok patogenů si žádají nové odolné kultivary s velkým výnosem. Šlechtitelé pomocí klasických metod nedovedou flexibilně reagovat na zvyšující se požadavky a proto je nutný zásah molekulárních biologů. Osekvenování genomu pšenice či nalezení specifických markerů pro selekci se může stát zásadním milníkem v urychlení šlechtění.

Experimentální část této diplomové práce byla zpracována v rámci projektu mezinárodního konsorcia zabývajícího se sekvenováním pšeničného genomu (International Wheat Genome Sequencing Consortium). Na pracovišti Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci se třídí pomocí průtokové cytometrie chromosomy a jejich jednotlivá ramena, z kterých se následně sestavují BAC knihovny. Knihovny pak slouží ke konstrukci fyzických map, které jsou důležité při samotném sekvenování. Kvalitní fyzická mapa je vytvořena na základě fingerprintingu BAC klonů, které jsou následně automaticky sestaveny pomocí počítačových programů (např. FPC).

Cílem předkládané práce bylo integrovat fyzickou kontigovou mapu chromosomu 3DS pšenice s již známými genetickými mapami za použití molekulárních markerů (nejčastěji mikrosatelitů). A dále zamapovat markery odvozené z genů rýže jak do fyzické, tak i genetické mapy. Tato integrace umožní zjistit uspořádání kontigů vůči sobě, případně je i prodloužit a spojit. K tomu byla využita výkonná a finančně dostupná třídídimenzionální poolovací strategie, která patří mezi jednodušší techniky a která je nenáročná na vybavení laboratoře.

3 Současný stav řešené problematiky

Pšenice je hlavní potravinou pro více než 40 % světové populace. V roce 2010 celková produkce činila 677 milionů tun. Z toho 69 % se spotřebovalo v potravinářském průmyslu, 18 % jako krmivo pro dobytek, 10 % mělo jiné využití a 3 % byla uskladněna jako rezerva pro další rok. Sklizená plocha měla velikost 22 443 ha což jsou přibližně 0,2 % z celkové rozlohy souše (OECD, 2010). Hexaploidní pšenice *Triticum aestivum* L. ($2n=6x=42$, 16979 Mbp) patří mezi druhy s největším genomem. Ten je složen ze subgenomů A, B a D. Hybridizací diploidních druhů *Triticum urartu* (AA) a *Aegilops speltoides* (BB) zhruba před 0,36-0,5 milióny lety (Dvorak *et al.*, 2005, Huang *et al.*, 2002) vznikla tetraploidní pšenice *Triticum turgidum* (AABB). Asi před 8000-8500 lety tato pšenice hybridizovala s *Aegilops tauschii* (DD) a vyvinul se tak nový druh, hexaploidní pšenice *Triticum aestivum* L. (AABBDD) (Heun *et al.*, 1997).

Analýza genomu pšenice je ztížena jeho velikostí a složitostí, nízkým stupněm polymorfismu a faktem, že je tvořen z nejméně osmdesáti procent (Smith *et al.*, 1975) repetitivními sekvencemi. Vytvoření knihoven velkých insertů z jednotlivých chromosomů či ramen, je jedna z možných strategií, která se umí vypořádat s těmito problémy (Doležel *et al.*, 2007, Janda *et al.*, 2004)

Mapování genomu slouží k lokalizaci důležitých genů, znaků nebo markerů a k vytvoření základní kostry genomu, která se dále používá např. k třídění a spojování sekvenčních dat (Meyers *et al.*, 2004). Získání sekvence genomu je důležité pro porozumění fenotypové variabilitě i pro zrychlení procesu šlechtění a vytvoření nových variet s vyšším výnosem a zlepšenou rezistencí k biotickým a abiotickým stresům. Tyto nové kultivary mohou být v budoucnu důležité vzhledem k populačnímu růstu a měnícím se klimatickým podmínkám (Paux *et al.*, 2008a).

Mapování genomu můžeme rozdělit na genetické a fyzické. Genetická mapa zobrazuje lineární uspořádání genů na chromosomu na základě meiotických rekombinací. Vzdálenosti jsou udávány v centi-Morganech ($1 \text{ cM} = 1 \% \text{ rekombinací mezi dvěma genetickými lokusy}$) (Kole *et al.*, 2008). Fyzické mapy jsou tvořeny sekvencemi nebo markery sestavenými dle pořadí na chromosomu. Vzájemná poloha dvou bodů se měří fyzickými jednotkami – bp (páry bází), μm nebo procentuálním podílem chromosomu nebo ramene (Meyers *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 1997). Dobrá mapa je důležitým zdrojem pro genomovou analýzu, srovnání genomů mezi druhy, pochopení velikosti a komplexity genomů, klonování specifických genů, které nás zajímají a shromáždění nově generovaných celogenomových sekvencí (Meyers *et al.*, 2004).

3.1 Fyzické mapy

Od vytvoření první fyzické mapy až do dnešní doby dochází k postupnému vylepšování a zlevňování jednotlivých metod a technik. Míra použitelnosti individuálních přístupů se liší s ohledem na to, zda je studován živočišný nebo rostlinný genom a zda je tento genom malý nebo pochází z polyploidních organismů.

Fyzické cytogenetické mapování, které měří vzdálenosti v mikrometrech nebo procentech podílu chromosomu či ramene, patří k jednodušším technikám, ale s menším rozlišením. Jednou z metod, které se používají je proužkování chromosomů, které slouží k mapování genů ve vztahu k cytologickým markerům na chromosomu. Velmi zřídka se používá mapování na polyténních chromosomech, které jsou vhodnější k vizualizaci mutací, např. delecí. (Hass-Jacobus *et* Jackson, 2005). Asi nejpoužívanější metodou je FISH (Fluorescenční *in situ* hybridizace), která umožňuje např. integraci genetických a fyzických map (Howell *et al.*, 2002). U některých rostlin lze pomocí aneuploidních linií geneticky zamapovaný marker přiřadit k danému chromosomu a pomocí delečních linií přímo do určité oblasti (binu). Substituční mapování využívá linie, u nichž je chromosom nebo jen jeho rameno nahrazeno homeologním segmentem z jiného druhu. Tyto tři typy linií, jejichž příprava je velmi pracná (Korzun *et al.*, 1997), se uplatňují při hrubém zamapování genetických markerů na fyzickou mapu nebo jen pro potvrzení jeho přítomnosti (Hass-Jacobus *et* Jackson, 2005).

U fyzických molekulárních map se využívají techniky mapování pomocí panelů radiačních hybridů, HAPPY mapování nebo sestavování kontigových map. Mapování pomocí panelů radiačních hybridů nebo HAPPY mapování je hojně využíváno u živočišných genomů. U rostlinných genomů je toto mapování stále v experimentální fázi, ale protože dokáže překlenout most mezi meiotickým mapováním a fyzickým mapováním BAC klonů, dostává se do zájmu rostlinných genetiků (Riera-Lizarazu *et al.*, 2008)

3.1.1 HAPPY mapování

HAPPY (HAPloid DNA samples using the POLYmerase chain reaction) mapování je *in vitro* technika založena na segregaci STS (sequence tagged site) markerů amplifikovaných z vysokomolekulární genomické DNA, která byla náhodně štěpena ozařováním nebo restriktasami. Tyto fragmenty jsou naředěny do mapovacích panelů, které jsou pak prohledávány pomocí PCR. Markery, které jsou blízko sebe jsou častěji přítomny v jednom panelu (Dear *et* Cook, 1989, Dear, 1997, Konfortov *et al.*, 2000, Piper *et al.*, 1998). Tato unikátní a univerzální metoda dovoluje konstrukci genomické mapy s flexibilním rozpětím a rozlišením. Může tak sloužit jako pomůcka k selekci markerů, komparativní genomice,

izolaci genů a fyzickému mapování. Velikost, komplexita nebo množství repetitivních sekvencí u velkých genomů ($1C > 2500$ Mbp) však vede k problémům při analýze pomocí HAPPY mapování (Thangavelu *et al.*, 2003). Jiang *et al.* (2009) předpokládají, že HAPPY mapování lze spojit se sekvenováním nové generace a to pod názvem HAPPY pipeline. Tradiční fragmentace a zaklonování fragmentů před sekvenováním je nahrazena vytvořením HAPPY panelů. Geny/markery, které se dříve genotypizovaly HAPPY mapováním se nyní analyzují sekvenováním.

3.1.2 Mapování radiačními hybridy

Princip mapování radiačními hybridy je založen na radiaci indukovaných zlomech v genomu donora a jeho fúzi s hostitelskými, radiací neošetřenými buňkami (Cox *et al.*, 1990). RH mapy jsou konstruovány na základě pravděpodobnosti zlomů mezi markery, které nemusí být polymorfní. Čím častěji se markery vyskytují v jednom hybridu, tím jsou k sobě blíže (Jann *et al.*, 2006). Buněčné linie radiačních hybridů se dříve používaly ke konstrukci fyzických map u savců, ale nyní dochází k expanzi této metody i do říše rostlinné (Meyers *et al.*, 2004, Riera-Lizarazu *et al.*, 1996).

Riera-Lizarazu *et al.* (2000) ozařovali adiční linii genomu ovsa (*Avena sativa* L.) s přidaným chromosomem 9 z kukuřice (*Zea mays* L.). Rostliny z linií, které byly vitální, byly použity k vytvoření panelů. Radiační panely však měly nižší stupeň zlomů a tím i menší rozlišení mapy. To mohlo být způsobeno tím, že se pracovalo s živými rostlinami a potřeba fertility a morfogenetické kapacity pravděpodobně limitovala četnost zlomů. Zachování životnosti a fertility rostlin je však výhodné z hlediska detailního mapování a budoucího použití (Riera-Lizarazu *et al.*, 2008). Podle Kalavacharla *et al.* (2006) lze rozlišení fyzické mapy zvýšit využitím polyploidních druhů. Riera-Lizarazu *et al.* (2010) vytvořili mapovací panely pro D subgenom pšenice. Křížením radiací ošetřeného pylu hexaploidní pšenice (*Triticum aestivum* L.; $2n = 6x = 42$; AABBDD) a tetraploidní pšenice (*T. turgidum* L.; $2n = 4x = 28$; AABB) vznikl mapovací panel kvazi-pentaploidní pšenice (AABBD). Životaschopnost jedinců byla zachována díky nepoškozeným subgenomům A a B z tetraploidní pšenice.

3.1.3 Fyzické kontigové mapy

Fyzické kontigové mapy jsou založené na technologiích detekujících překryvy mezi BAC klony, pomocí kterých je lze poskládat do tzv. kontigů. K identifikaci těchto překryvů se používají tři rozdílné přístupy, přičemž každý z nich může využívat několik technik.

První přístup vyhledává překryvy na základě přítomnosti společných DNA markerů.

Skrínovací technikou je PCR amplifikace krátkých fragmentů známých jako STSs (sequence-tagged sites) nebo hybridizace značených cDNA klonů či hybridizace krátkých, genově specifických oligonukleotidů. Tento přístup je pracný, a pokud se používá samostatně, tak je nutná vysoká hustota markerů, což není praktické pro většinu aplikací (Meyers *et al.*, 2004).

Většina fyzických map je dnes generována z BAC klonů DNA fingerprintingem. Každý klon je restrikcími enzymy nastříhán na fragmenty, které jsou pak separovány a detekovány. Překrývající se klony, derivované ze stejné oblasti, mají podobné restrikcí spektrum. Klony, které se překrývají se pak seřadí do kontingu (Doležel *et al.*, 2007, Meyers *et al.*, 2004). Fyzická mapa se tedy skládá z kontigů, jenž jsou tvořeny klony s velkými inserty genomické DNA (Zhang *et al.*, 1997). Fingerprinty se separují manuálně na agarosovém gelu, manuálně na DNA sekvenčním gelu, automatickou metodou na sekvenčním gelu nebo automatickou metodou pomocí kapilární elektroforézy. Podle počtu použitých restrikcí enzymů, kterých může být 1-5, se liší počet bandů na jeden klon a tedy i kvalita následně vytvořené fyzické mapy (Xu *et al.*, 2004). Tyto mapy slouží k ukotvení krátkých sekvencí na genomové lešení. Umožňují taktéž sekvenování klon po klonu a poziční klonování (Doležel *et al.*, 2007).

Třetí a nejnovější technika k detekci překryvů mezi klony je Whole Genome Profiling (WGP), který z BAC klonů sestavných do 2D poolů generuje pomocí sekvenování nové generace sekvenční značky. Ty jsou přiřazeny k individuálním BAC klonům a na základě sdílení společných tagů, se BAC klony sestavují do kontigů (van Oeveren *et al.*, 2011).

Fyzické kontigové mapování závisí na kvalitě knihoven dlouhých insertů, které se připravují nastříháním genomické DNA restriktasami a ligací vzniklých úseků do vektoru. Každý typ vektoru má své výhody i nevýhody. Ty závisí na velikosti insertů, náročnosti udržování knihoven a stabilitě klonovaných sekvencí ve vybraném vektoru (Hass-Jacobus *et al.*, 2005). Mezi vektory používané ke konstrukci knihoven dlouhých insertů patří kosmidové vektory, YAC (Yeast artificial chromosomes), PAC (P1 artificial chromosome), PBC (large-insert plasmid-based clone), TAC (transformation-competent artificial chromosome), BIBAC (plant-transformation-competent binary plasmid clone) a BAC (Xu *et al.*, 2004).

Jako nejvhodnější a v dnešní době nejpoužívanější vektor sloužící ke konstrukci knihoven dlouhých insertů se jeví BAC (Bacterial Artificial Chromosome), který se využívá již od roku 1992 (Shizua *et al.*, 1992). Vektor je derivován z F faktoru *Escherichia coli*, obsahuje gen resistance k antibiotikům, ATP řízenou helikázu (*repE*) pro DNA replikaci a *parA*, *parB*, *parC* lokusy, které zajišťují přesné rozdělení malého počtu plasmidu (1-2)

do dceřiných buněk. Hostitelskou buňkou je *E. coli*, která je schopna pojmout BAC vektor s inzertem do velikosti 1000 kb. V dosud známých knihovnách se velikost insertů pohybuje kolem 100-300 kb. BAC DNA se izoluje jednoduše a v BAC klonech se vyskytuje mnohem méně chimérické DNA než v YAC klonech (Asakawa, 1997, Hass-Jacobus *et al.*, 2005, Zhang *et Wing*, 1997).

3.1.4 Fingerprinting

Moderní metody fingerprintingu jsou derivovány ze tří základních studií, které používaly porovnání restričních profilů k tvorbě fyzické mapy (Meyers *et al.*, 2004):

1) Coulston *et al.* (1986) štěpili klony restričním enzymem *HindIII*, který rozpoznává 6 bp štěpné místo. Vzniklé konce fragmentů byly radioaktivně značeny [³²P]ATP pomocí DNA polymerasy a reversní transkriptasy. Již značené fragmenty byly nastříhány enzymem *Sau3AI*, který rozpoznává 4 bp restriční místa. Fragmenty pak byly separovány jako jednovláknové molekuly na sekvenačním denaturačním polyakrylamidovém gelu (PAA). Ačkoliv je metoda fingerprintingu na PAA gelu efektivní, díky použití radioaktivního značení dochází k horší manipulaci a nutnosti zachovat přísná bezpečnostní opatření. Zároveň pomocí ni nelze zjistit velikost klonu (Marra *et al.*, 1997).

2) Brenner, S. *et Livak*, K.J. (1989) používali enzymy typu IIS, které štěpí přesně definované oblasti a nechávají jedno-vláknové přesahy různého složení. Ty pak byly doplněny neznačenými deoxynukleotidy a jedním typem sukcinyl-fluorescein ddNTP, který odpovídal poslednímu nukleotidu na konci rozštěpeného vlákna. Dále byly tyto fragmenty podruhé štěpeny a pak rozděleny na denaturačním polyakrylamidovém gelu. Tento postup umožňuje rozlišit velikost bandu a zároveň určit poslední bázi z 3' konce. Znalost terminálních bází tak zvyšuje informativnost (Meyers *et al.*, 2004).

Derivací této metody je separace fragmentů kapilární elektroforézou a SNaPshot značící technika, což je v současnosti vysoce výkonná metoda ke konstrukci fyzické mapy. DNA se štěpí pěti endonukleasami, z nichž jedna má 4 bp rozpoznávací místo a tvoří tupé konce. Čtyři endonukleasy mají 6 bp rozpoznávací místo a tvoří kohezní konce, které začínají jiným nukleotidem podle použité endonukleasy. Přesahy na 5' koncích jsou použity jako templáty pro prodloužení 3' konců *AmpliTaq* FS polymerasou dideoxynukleotidem. Každý typ ddNTP přitom nese jiné barvivo (Luo *et al.*, 2003).

Podobný princip má metoda, který používá 4 restriktasy. Odděleně štěpí BAC knihovnu 3 páry enzymů: *HindIII/HaeIII*, *HindIII/RsaI* a *HindIII/DpnI*. Konce z *HindIII* se barví 3 různými fluorescenčními barvičkami a fragmenty se vyhodnocují kapilární elektroforézou. K sestavení kontigů se používají fragmenty o velikosti 75-500 bp (Xu *et al.*,

2004).

3) Marra et al. (1997) štěpili klony pouze jedním enzymem *HindIII* a fragmenty separovali na agarosovém gelu a barvili ethidium bromidem nebo SYBR Greenem. Tato metoda detekuje téměř všechny fragmenty klonu o velikosti 600-25000 bp.

Fingerprintová data se dále zpracovávají statisticky. K tomuto je běžně používán software FingerPrinted Contigs (FPC) (Soderlund *et al.*, 2000), který hodnotí toleranci na základě Sulstonova skóre. Sulstonovo skóre (p-hodnota) počítá, s jakou pravděpodobností jsou bandy společné pro 2 fingerprintované klony výsledkem náhody. Pokud je hodnota nižší, než uživatelem nastavené skóre, pak se klony považují za překrývající. Tato hodnota by měla být nastavena tak, aby falešná pozitivita a negativita byla co nejmenší a to v závislosti na velikosti a složitosti genomu (Meyers *et al.*, 2004). FPC však může být při spojování BAC klonů nepřesné, nedovede správně oddělit klony s velkým počtem společných bandů, které často pocházejí z repetitivních oblastí genomu. Ve výsledcích se může objevovat řada chimérických kontigů a falešně pozitivně spojených klonů a ve vytvořené MTP (minimum tiling path) se mohou vyskytovat mezery. K vyřešení těchto problémů Frenkel *et al.* (2010) vyvinuli nový přístup pod názvem Linear Topological Contig (LTC). Ten, narozdíl od FPC, umožňuje konstruovat dlouhé kontigy, detekovat chybné spojení BAC klonů, opravit je a kontigy postupně prodlužovat. To vše umí i s daty získanými z FPC. Lze ho tedy použít i ke kontrole stávajících fyzických map.

3.2 Použití FISH při mapování a integraci map

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se využívá k fyzickému mapování genů a DNA sekvencí, např. repetit, přímo na chromosomu. Denaturované DNA próby, které jsou značeny fluorchromy, jsou hybridizovány na denaturovaný chromosom, který je připevněn na mikroskopické sklíčko (Hass-Jacobus *et al.*, 2005). U rostlin, které obsahují velké množství repetitivních sekvencí není použití FISH tak jednoduché jako u živočichů (Jiang *et al.*, 1995).

Prostorové rozlišení signálu z FISH je limitováno vzdáleností 0,2 μm mezi sousedícími body, které může rozlišit světelná mikroskopie. Schopnost odlišit dvě sekvence je také dána velikostí genomu, stupněm kondenzace chromatinu a preparační technikou (Valárik *et al.*, 2004). Jako templát pro FISH se používají somatické metafázní chromosomy, meiotické pachyténní chromosomy nebo natažená DNA vlákna z interfázního chromosomu (Cheng et al, 2001). Poslední dva uvedené templáty lze použít k integraci genetické a fyzické mapy (Ohmido *et al.*, 2010). Próby odvozené z BAC klonů, které v sobě nesou geneticky

zamapované markery mohou být využity k ověření pozice ukotvených BAC klonů na chromosomu (Islam-Faridi *et al.*, 2002). Pomocí FISH na natažených DNA vláknech lze zjistit existenci mezer vzniklých nedostatečným pokrytím genomu BAC klony, které je časté v telomerických a pericentromerických oblastech. Lze i odhadnout velikost této mezery na základě fyzických vzdálenosti mezi dvěma BAC klony nebo markery (Sasaki *et al.*, 2005, Stack *et al.*, 2009).

Fluorescenčně barvené próby, odvozené z konců klonů nebo kontigů, lze použít k určení jejich překryvů (Gregory *et al.*, 1997). Aggarwal *et al.* (2009) ověřovali správnost nejdelsích kontigů u *Mayetiola destructor* pomocí FISH. BAC klon z jednoho kraje kontigu byl označen nick-translací biotinem značeným dUTP, BAC z druhého kraje digoxigeninem značeným dUTP. Oba BAC klony byly hybridizovány na stejný polyténní chromosom a pokud došlo ke kolokalizaci, byly kontigy považovány za správně spojené. Xiong *et al.* (2010) převedli 16 BAC klonů z A7 chromosomu *Brassica rapa* na próby pro mnohobarevnou FISH a ty hybridizovali na pachyténní chromosom a integrovali tak fyzickou mapu s cytogenetickou. Vícebarevná FISH se tedy využívá k mapování klonů (BAC, YAC,...) na chromosomy, určení jejich vzájemných pozic nebo potvrzení jejich umístění v kontigu.

3.3 Integrace genetické a fyzické mapy

Po vytvoření fyzické mapy z BAC fingerprintů je nutné určit pozici každého nebo alespoň většiny kontigů. Hlavním problémem při ukotvování kontigů je nízká hustota markeru na genetické mapě a relativně malé fyzické rozpětí většiny BAC kontigů. K vytvoření integrované mapy je tedy nutné mít vysoko-hustotní mapu DNA markerů, která poskytuje důležité informace pro utřídění fyzické mapy (Meksem *et al.*, 2005). Mezi takové patří např. genetická mapa, která je nejpoužívanější a je dostupná pro většinu rostlinných druhů. Nevýhodou je, že k jejímu vytvoření je potřeba polymorfních markerů (Jann *et al.*, 2006, Riera-Lizarazu *et al.*, 2008). Dalším problémem je nízká četnost rekombinací, hlavně kolem centromery, což znemožňuje rozlišit přesné pozice markerů. Tyto nedostatky lze kompenzovat použitím map radiačních hybridů nebo HAPPY mapováním. U těchto map jsou zlomy v DNA vyvolány radiací a jsou tedy rovnoměrně rozloženy po celém genomu (Riera-Lizarazu *et al.*, 2008). Markery nemusí být polymorfní (Thangavelu *et al.*, 2003). Tyto dvě metody se však u rostlin začaly využívat nedávno a proto nejsou dostupné pro všechny druhy.

Pro ukotvování genetických markerů ke kontigům, a tedy k integraci genetické a fyzické mapy, se využívají 3 přístupy ukotvování: přímé, reverzní a hybridní. Mezi markery vhodné k integraci map patří např. EST, SSR, SNP, AFLP a DArT.

EST (Expressed Sequence Tag)

EST jsou krátké sekvence cDNA dlouhé 200-700 bp (Adams *et al.*, 1991). Z EST lze odvodit markery, které jsou závislé na znalosti sekvence, jako např. SNP nebo mikrosatelity (Eujayl *et al.*, 2002, Mochida *et al.*, 2003).

SSR (Simple Sequence Repeats)

Mikrosatelity jsou tvořeny jedním až šesti páry tandemově se opakujících nukleotidů s minimální délkou 12 bp a maximální délkou 100 bp (Tautz, 1993). Negenové mikrosatelity se vyskytují v rámci celého genomu. Mají vyšší stupeň polymorfismu než ostatní typy molekulárních markerů a to i u druhů s nízkým stupněm variability jako je *Triticum aestivum* L.. Mikrosatelity z exprimovaných regionů EST-SSR, které jsou získány z cDNA, se v genomu vyskytují méně. Mají nižší polymorfismus než genomické SSR (Eujayl *et al.*, 2002, Paux *et al.*, 2009). Mikrosatelity můžeme rozdělit do dvou tříd: I. třídu tvoří 2-3 bp jednoduché repetice o více než deseti opakováních. II. třídu tvoří 2-5 bp sekvence do devíti opakování (Shultz *et al.*, 2007). Primery jsou většinou navrženy tak, aby se velikost produktu pohybovala od 100 do 500 bp (Shultz *et al.*, 2007).

Jak již bylo uvedeno, mikrosatelity jsou široce rozšířené po celém genomu a to jak rostlinném tak živočišném (Shoemaker *et al.*, 2008). SSR markery jsou informativní, spolehlivé, hojné, kodominantní, jednoduše použitelné (PCR) a lokusově specifické (Eujayl *et al.*, 2002, Nguyen *et al.*, 2005, Shultz *et al.*, 2007). U pšenice mohou některé z nich amplifikovat specifický lokus genomu A, B nebo D (Röder *et al.*, 1998). To může být výhodné při skríningu knihoven polyploidních genomů (Shultz *et al.*, 2007).

Kofler *et al.* (2008) při zkoumání genomu žita zjistili, že množství polymorfních mikrosatelitů vzrůstá od centromery k telomerám. Se zvětšující se délkou mikrosatelitu roste i stupeň polymorfismu. U rostlin jsou dominantní AT repetice (Powell *et al.*, 1996), u obilovin to jsou AAG, AG, CCG, C a AT (Kofler *et al.*, 2008), u pšenice se vyskytují GA, GT a AG repetice (Gupta *et al.*, 1999, Pestsova *et al.*, 2000). Z důvodu velkého genomu u pšenice je vývoj SSR markerů drahý a časově náročný. Pouze 30 % navržených primerů je funkčních a vhodných pro genetickou analýzu (Röder *et al.*, 1998).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP markery využívají polymorfismu restričních míst. DNA je rozštěpena restričními enzymy. Jedním, často štěpícím, např. *MseI* (4bp) a druhým, který má méně restričních míst v genomické DNA: *PstI* (Doveri *et al.*, 2008) nebo *EcoRI* (6 bp). Na oba

konce fragmentu jsou poté naligovány adaptory. Sekvence adaptoru a restrikčního místa je použita jako cílová sekvence pro nasedání primeru pro PCR. Ten může být pro selektivní amplifikaci prodloužen o 3 specifické nukleotidy. Pomocí selektivní PCR se redukuje množství získaných fragmentů, což umožňuje jednodušší vyhodnocení a získání většího stupně polymorfismu. Amplifikované fragmenty jsou pak separovány a analyzovány na denaturujícím PAA (Paux *et al.*, 2009, Vos *et al.*, 1995).

Metoda umožňuje specifickou ko-amplifikaci vysokého počtu restrikčních fragmentů (50-100), aniž bychom museli znát jejich sekvenci. AFLP markery detekují polymorfismus, který je dán absencí nebo přítomností produktu (Doveri *et al.*, 2008, Gupta *et al.*, 1999).

DArT (Diversity Array Technology)

DArT technologie je metoda založená na hybridizaci, která může detekovat několik stovek až tisíce lokusů současně. DArT technologie vytváří velké množství kvalitních markerů, které mohou být bialelické, dominantní i kodominantní (Jaccoud *et al.*, 2001, Paux *et al.*, 2009, Wenzl *et al.*, 2004). Mapovací platforma DArT využívá tzv. genomové reprezentace. Každá je připravena štěpením genomické DNA pomocí restrikčních enzymů a ligací enzymově specifických adaptorů. Fragmenty jsou amplifikovány pomocí PCR. Reprezentace jsou pak zaklonovány a nanoseny na mikroskopické sklíčko. Srovnávací DNA je připravena stejným postupem a navíc je označena fluorescenční barvičkou a pak hybridizována na microarray (Jaccoud *et al.*, 2001)

Polymorfismus je ovlivněn SNP nebo insercemi/delecemi v restrikčních místech a detekuje tedy přítomnost nebo absenci fragmentu (Jaccoud *et al.*, 2001, Paux *et al.*, 2009, Wenzl *et al.*, 2004). K redukci komplexity lze použít metylsenzitivní enzymy (např. *PstI*), které neštěpí restrikční místa s metylovaným cytosinem. Tím se snižuje počet fragmentů. Ty jsou však pro efektivní DArT analýzu příliš dlouhé. Proto se používají v kombinaci s jinou endonukleasou, ale adaptory se ligují jen na *PstI* konce. Tyto enzymy zároveň produkují polymorfní fragmenty, které spadají do nízko-kopiových oblastí a neobsahují repetyce (Akbari *et al.*, 2006, Fellers, 2008, Wenzl *et al.*, 2004). Polyploidie u těchto markerů nemá negativní vliv na detekci polymorfismu, který může být limitující u jiných markerů, vzhledem k tomu, že je reprezentace tvořena velmi malou frakcí genomu. Kvalita dat je podobná s kvalitou dat diploidních druhů (Akbari *et al.*, 2006). Tyto markery mohou být použity pro ukotvování fyzických map (Paux *et al.*, 2009).

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

U markerů SNP je polymorfismus mezi jedinci dán změnou jednoho nukleotidu,

příčemž se obě alely musí alespoň v jednom procentu vyskytovat v populaci, jinak se jedná o mutaci. SNP mohou mít bi-, tri- nebo tetra-alelický polymorfismus. Jsou kodominantní a v genomu jsou zastoupeny hojně, ale nerovnoměrně. Méně často se objevují v kódujících sekvencích. (Brookes, 1999, Kahl *et al.*, 2005, Paux *et al.*, 2009). Nalezení SNP je v diploidních genomech jednoduché, u polyploidních genomů musí být SNP rozlišitelné z homeologních variant, protože se v jednotlivých subgenomech vyskytují velice podobné sekvence. (Paux *et al.*, 2009, Somers *et al.*, 2003).

Mezi techniky identifikující jednonukleotidové záměny patří sekvenování, prodlužování primerů, alelově specifická oligonukleotidová hybridizace, alelově specifická oligonukleotidová ligace, štěpení nukleasou v místě záměny (Brookes, 1999, Kahl *et al.*, 2005, Rafalski, 2002). Nejčastěji používanými metodami jsou v dnešní době specifická PCR, SNaPshot, SNPlex a Illumina GoldenGate. Velké množství sekvenčních dat a EST dostupných ve veřejných databázích je bohatým zdrojem pro nalezení nových SNP bioinformatickým přístupem (Chao *et al.*, 2008, Kota *et al.*, 2003).

Mochida *et al.* (2003) přiřadili EST z hexaploidní pšenice pomocí nullisomic-tetrasomických linií k jednotlivým subgenomům. Ty, které se vyskytovaly jen v jednom z nich sekvenovali a ze sekvencí generovali SNP. Close *et al.* (2009) generovali SNP z EST získaných z 9 kultivarů ječmene. Vytvořili tak vysokohustotní genetickou mapu, která umožňovala porovnání s jinými genomy obilovin a identifikovat syntenické oblasti.

3.3.1 Přímé ukotvování

Přímé ukotvování (viz Obr. 1) probíhá ve směru od genetických map ke kontigům a to za použití geneticky zamapovaných markerů. Kontig, který asociuje s genetickým markerem může být jednoznačně přiřazen na specifickou genetickou lokaci. (Cone *et al.*, 2002). Mezi používané markery patří SSR, EST, DArT, SNP. Snadným přístupem ukotvení BAC kontigů na genetickou mapu je hybridizace zamapovaných prób (RFLP, STS, EST) na vysokohustotní membrány tvořené BAC knihovnou (Chen *et al.*, 2002, Meksem *et al.*, 2005) nebo N-dimenzionální poolovací strategie (Barillot, 1991).

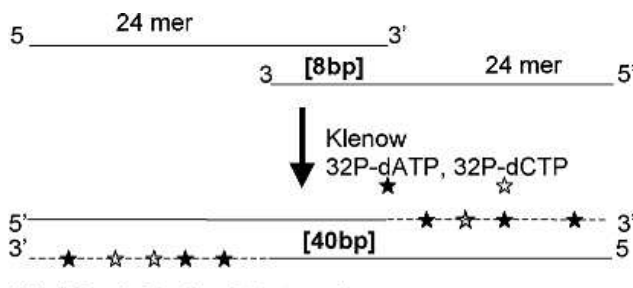
Hybridizace na membránách o vysoké hustotě

Hybridizace na membránách o vysoké hustotě využívá radioaktivně značené próby nebo próby vizualizované na základě chemiluminiscence, které jsou odvozené z DNA fragmentů klonů, nebo to jsou amplifikované PCR produkty či DNA oligonukleotidy. První dva typy prób jsou preferovány, protože se snadněji barví „nick“ translací nebo „random primingem“ (Gardiner *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2000).

Největší překážkou je, že próby často hybridizují s více klony z důvodu genové duplikace a přítomnosti repetitivních sekvencí. Jednoznačné zařazení BAC klonu do genetické mapy, tak vyžaduje další kroky (Luo *et al.*, 2009), jinak by mohlo dojít ke zkreslení získaných výsledků (Gardiner *et al.*, 2004). U oligonukleotidů je jednodušší eliminovat repetice z próby, ale koncové značení nevytvoří vysoce specifickou próbu a hybridizační kinetika není tak silná jako u větších prób (Han *et al.*, 2000).

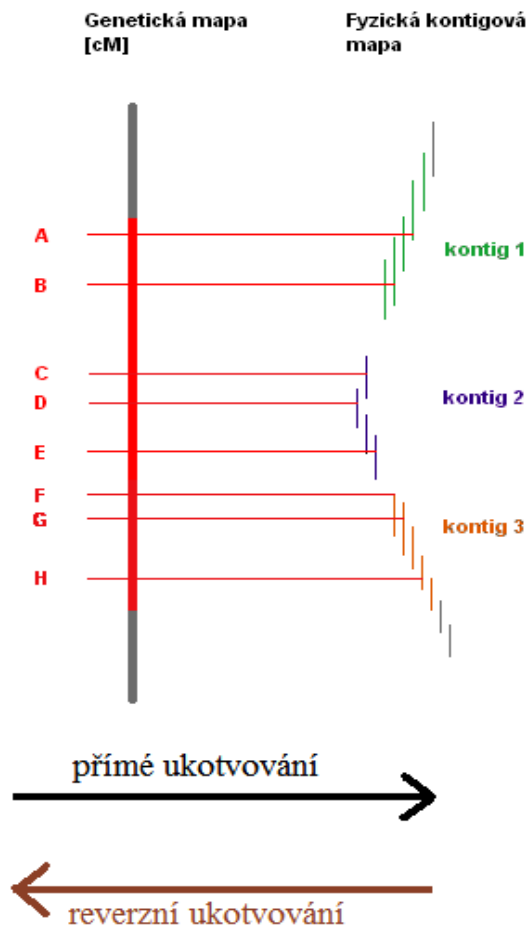
Významným zlepšením jsou overgo próby, které hybridizují jen na specifické lokusy. Jsou navrženy z unikátních sekvencí z EST a neobsahují žádný ze známých repetitivních elementů (Coe *et al.*, 2002, Cone *et al.*, 2002, Gardiner *et al.*, 2004). Jsou vytvořeny nasedáním dvou překrývajících se oligonukleotidů a přesahy z 3' konce jsou doplněny radioaktivně značenými oligonukleotidy [³²P]dCTP a [³²P]dATP použitím Klenowova fragmentu DNA polymerasy (Obr. 2) (Gardiner *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2000).

Obr. 2: Overgo próba podle Meksem *et al.* (2005)



velkého počtu cDNA na kontigovou mapu. Zároveň i samotné overgo próby lze sestavit do poolů a pomocí nich pak skrínovat celou knihovnu (Gardiner *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2008).

Obr. 1: Schématický náčrt principu přímého a reverzního ukotvování



Klenowova fragmentu DNA polymerasy

Overgo próby získaly popularitu jako markery pro fyzické mapování genomů rostlin i živočichů. Jsou částečně využívány pro skrínování knihoven velkých insertů a identifikaci klonů obsahující genově specifické STS. V kombinaci s poolovací strategií jsou výkonným přístupem v ukotvování

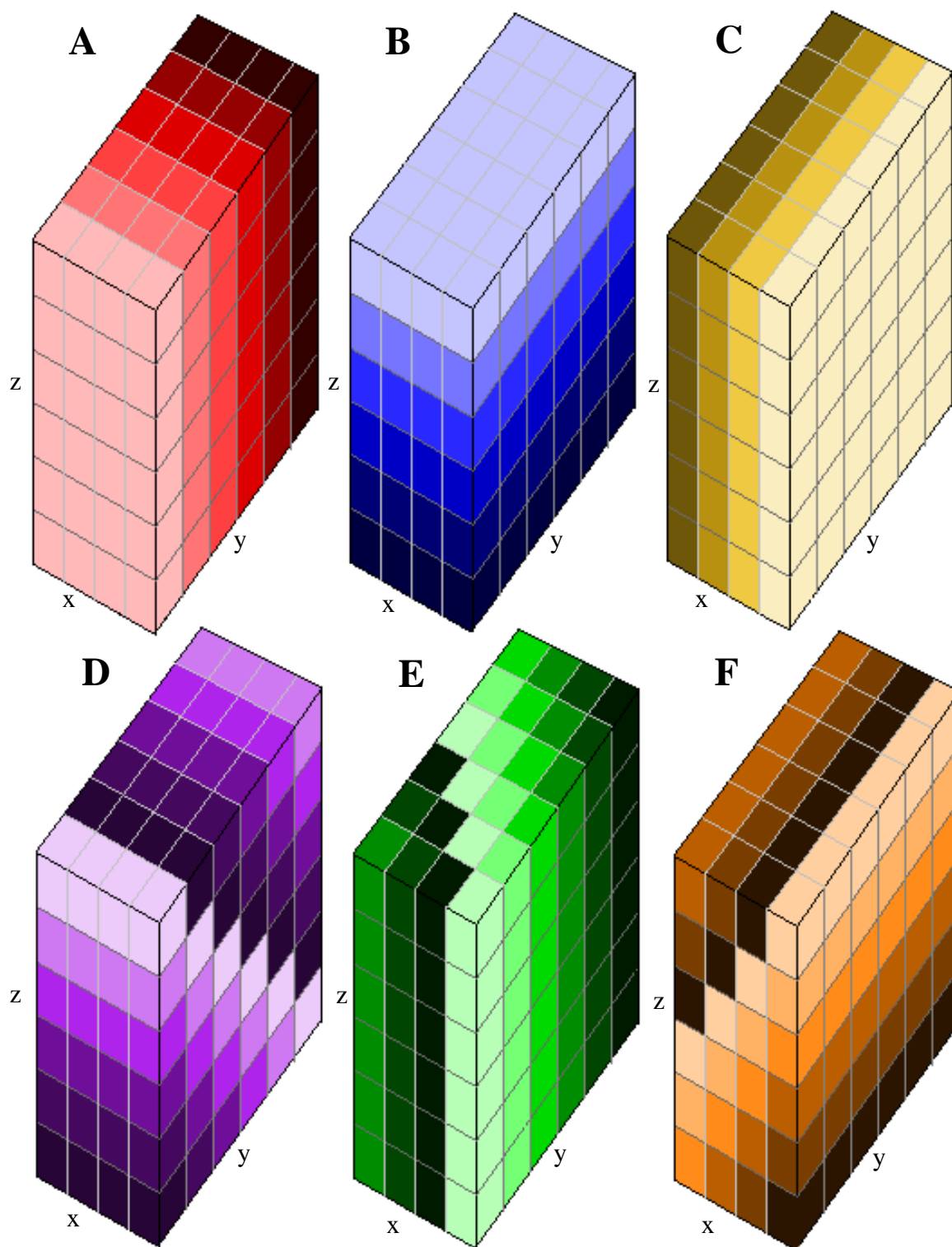
N-dimenzionální směsné pooly

Cílem poolovací strategie je snížit počet skríníngů knihovny na minimum. Počet poolů se zmenšuje s počtem dimenzí (Barillot, 1991), kterých může být 2-6. 2D poolovací strategie dělí knihovnu na dvojdímenzionální matrix, která tvoří pooly z jednotlivých řádků a sloupců na destičce. Pozitivní klon je nalezen na průsečíku pozitivního řádku a sloupce (Barillot, 1991). Nejhojněji používané jsou 3D pooly, které umožňují získat kompletní a jasné BAC adresy. U velkých genomů může být použití 3D poolovací strategie nedostatečné pro jednoznačnou identifikaci individuálních BAC klonů obsahujících jedinečnou DNA sekvenci (Klein, 2000). Avšak pro malé genomy nebo pro BAC knihovny z části genomu je vyhovující.

U velkých genomů se využívá 6D poolovací strategie (viz Obr. 3), nebo jako předstupeň může sloužit vytvoření superpoolů seskupením jednotlivých poolů, které mohou samotné zacílení hledaného pozitivního klonu ještě více zúžit (Wu *et al.*, 2008). K usnadnění a minimalizaci počtu skríníngů se může využít software Elephant, který spojuje FPC data z kontigů a data z PCR a určí tak pozitivní klon (Paux *et al.*, 2008b). Dalším ulehčujícím přístupem je výběr subknihoven s nejmenším počtem překrývajících se klonů pokrývajících celý genom, tzv. „minimal tiling path“ (MTP) (Green, 2001). Pro další zjednodušení lze při prohledávání knihovny použít více než 10 párů primerů v jediné reakci, které se nejprve testují na genomické DNA pro určení velikosti amplifikovaného fragmentu. Ty primery, které amplifikují fragmenty odlišných velikostí, se pak mohou použít v multiplex PCR (Meksem *et al.*, 2005).

Skríníng na gelu nemusí být jediným přístupem, který se využívá při poolovací strategii. Dále lze použít mimo jiné např. analýzu křivek tání (High Resolution Melt, HRM), Illumina GoldenGate nebo hybridizaci na čípech. Vu *et al.* (2010) kombinovali Multiplexní tandemovou PCR (MT-PCR) s HRM. Postup zahrnoval tři kroky: 1) poolování BAC knihovny; 2) multiplexní preamplifikace BAC poolů 50 páry primerů, což zvýšilo citlivost a specifitu MT-PCR-HRM na poolových templátech; 3) lokalizace pozitivního BAC klonu selektivní amplifikací a HRM. Jednoduchý protokol, který nezahrnuje použití gelu je podle autorů spolehlivější, rychlejší a levnější než tradiční PCR skríníng na gelu.

Obr. 3: 3D a 6D poolovací strategie na modelu o šesti miskách (osa z) a velikosti 4 (osa x) krát 6 (osa y) jamek.



Každý odstín barvy tvoří jeden pool. A-C znázorňují 3-D poolovou strategii. A rozděluje BAC klony do řádkových poolů (face pool), B do miskových poolů (plate pool) a C do sloupcových poolů (side pool). Celkem 16 poolů. A-F znázorňuje 6-D poolovou strategii. D rozděluje BAC klony do diagonálně řádkových poolů (row pool), E do diagonálních poolů (diagonal pool) a F do diagonálně sloupcových poolů (column pool). Celkem 34 poolů.

Další možností je ukotvování kontigů pomocí Illuminy přes MTP pooly, což vede k ukotvení geneticky zamapovaných SNPů do BAC kontigů. Luo *et al.* (2009) použili při mapování SNP *Aegilops tauschii* (1C = 4020 Mb) 5D poolovou strategií, která maximalizuje pravděpodobnost zisku jednoho pozitivního klonu mezi BAC pooly a minimalizuje tak potřebu dalšího PCR skrínungu k rozlišení pozitivních a falešně pozitivních BAC klonů. Vytvořili 3 typy poolů které skrínováli danými metodami: miskové pooly (PCR), 2D pooly z miskových poolů (super-pooly, Illumina) a 2D pooly z jednotlivých misek (PCR). Narozdíl od SNP genotypingu, který řeší, který ze dvou nukleotidů je ve SNP přítomen, BAC-pool genotyping se ptá, zda je cílová sekvence přítomná či nikoliv. Rustenholz *et al.* (2010) ukotvovali BAC klony z MTP chromosomu 3B pšenice na expresní čipy ječmene, který patří do stejné podčeledi. Mezi chromosomem pšenice 3B a chromosomem ječmene 3H je vysoká kolinearita. Paux *et al.* (2008a) chtěli při integraci map využít DArT markery. Podařilo se jim 233 markerů DArT přiřadit na genetickou mapu a 600 markerů DArT ukotvili na 3D MTP pooly chromosomu pšenice 3B. Z těchto markerů bylo pouze 31 zamapovaných na chromosomu 3B a zároveň ukotveno na 3B fyzickou mapu. To mohlo být způsobeno tím, že používali metylsenzitivní endonukleasu, která mohla vytvořit odlišné reprezentace vzhledem k absenci metylací v BAC klonech. Pokud by se však DArT markery převedly na PCR DArT, zvýšila by se tím efektivita, protože primery nejsou závislé na metylacích DNA.

Meksem *et al.* (2005) aplikovali metodu AFLP na jednotlivé BAC klony (KeyMaps metoda). V prvním kroku štěpili BAC DNA enzymy *HindIII/MseI* a provedli amplifikaci selektivními primery. Výsledkem bylo 50-60 fragmentů pro jeden BAC klon, což umožnilo BAC klony shromáždit do kontigů. Druhým krokem byl skrínung BAC poolů se stejnou kombinací enzymů a primerem *HindIII* prodlouženým o 2 bp a *MseI* o 3 bp. Markery odvozené tímto způsobem a kontigy, v nichž byly markery obsaženy, byly pak *in silico* ukotveny na již známou genetickou mapu. KeyMaps metoda může být použita k vytvoření fyzické mapy a zároveň usnadňuje generaci nových AFLP markerů k integraci genetické a fyzické mapy.

Výkonná poolovací strategie je výhodná pro velké knihovny z velkých genomů. Multidimenzionální poolovací strategie založená na PCR je alternativou k vysoko-hustotní filtrační hybridizaci klonů, ale narozdíl od ní má menší stupeň falešných pozitiv, je výkonnější a levnější (Gardiner *et al.*, 2004, Vu *et al.*, 2010, Yim *et al.*, 2007). Pooly mohou být použity k zaměření BAC klonů s genovými rodinami, které je pak nutné specificky detekovat. Dále mohou být použity k identifikaci duplikovaných regionů, u nichž je nezbytné odlišit jejich jednotlivé varianty (Wu *et al.*, 2008).

3.3.2 Reverzní ukotvování

Reverzní ukotvování probíhá ve směru od kontigů na genetickou mapu (Obr. 1) pomocí mapovacích populací a polymorfních markerů odvozených z BAC klonů nebo BES (BAC end sequence) (Paux *et al.*, 2010). Tyto markery mohou ukotvit odpovídající BAC klon na genetickou mapu, aniž by se musel dělat skrínig knihovny. Ten může být časově náročný a vytváří množství falešných pozitiv, které jsou např. v genomu jablka způsobeny množstvím duplikací (Han *et al.*, 2009). Mezi nejčastěji používané markery patří SNP, EST, SSR. Paux *et al.* (2010) využili BES k odvození ISBP (Insertion Site-Based Polymorphism) markerů. U těchto markerů první primer zasahuje do oblasti mobilního elementu a druhý do přilehlé DNA sekvence. ISBP markery dále převedli na markery SNP, které potom geneticky mapovali analýzou křivky tání a metodami SNaPshot a Illumina GoldenGate. Analýza křivky tání se vzhledem k nízké ceně jevila jako výhodný přístup. Jejimi zápory však byla nízká míra detekce polymorfismu (pouze 27 % vzorků) zapříčiněná nerovnoměrnou distribucí barviva, které má vliv na tvar a umístění křivky a nedostatečná sekvenční specifita. U SNaPshot analýzy se problém vyskytoval při genetickém mapování. Pouze u 57 % vzorků byli autoři schopní jednoznačně rozlišit alely rodičů. Pokud však byl jeden z rodičů heterozygot, přístroj vzorky nedovedl vyhodnotit. Zároveň vysoká cena této metody nečinila příliš atraktivní. Illumina GoldenGate patřila mezi nej přesnější. Detekovala až 70 % polymorfních markerů. Výhodou byla i vysoká kapacita, nízká cena a malá spotřeba genomické DNA.

3.3.3 Hybridní ukotvování

U hybridního ukotvování se sekvenují fragmenty z vybraných chromosomů a z těchto sekvencí se pak navrhnu markery (ISBP, SSR, EST, SNP, ...), které se ukotví na genetickou mapu i do kontigů (Paux *et Akhunov*, 2010). To je umožněno s postupujícím rozvojem průtokové cytometrie pomocí níž lze separovat jednotlivé chromosomy nebo ramena z celého genomu. U pšenice jsou už z ramen chromosomů 1AS, 1AL, 1BS, 1BL, 3AS, 3AL, 3B, 3DS, 3DL, 4AL, 5AS, 5AL, 7DS a 7DL zkonstruovány i BAC knihovny (Šafář *et al.*, 2010). Tento přístup se dnes neobejde bez sekvenování nové generace, efektivního odvozování polymorfních markerů a nových rychlejších technik skrínigu knihovny, jelikož v prvních fázích není známá pozice markerů na mapě genetické i fyzické. Další možností je využití kolinearity genů s příbuznými genomy. Např. již osekvenovaný genom rýže nebo fyzické mapy ječmene mohou pomoci při orientačním ukotvování kontigů. Popřípadě lze markery z těchto genomů využít k odvození nových markerů pro studovaný genom. Tento přístup využili Berkman *et al.* (2011) při srovnávání sekvencí chromosomu 7DS pšenice s genomy, fyzickými a genetickými mapami druhů *Ae. tauschii*, *Brachypodium* a *Oryza sativa*.

4 Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

K zamapování genetických markerů do fyzické mapy byla použita knihovna z 3DS chromosomu pšenice *Triticum aestivum* L. kultivaru Chinese Spring. Knihovna byla tvořena ~ 36 tisíci BAC klony umístěnými do 96 misek o 384 jamkách. Pro potřeby skrínungu byla vytvořena MTP s 3823 BAC klony v 10 miskách. Genomická DNA z kultivarů pšenice Chinese Spring, Renan, Opata a Synthetic byla využita jako pozitivní kontrola.

4.2 Postup

Pro skrínung knihovny byla vyizolována DNA z poolů z MTP 3DS BAC knihovny. Poté byl proveden skrínung této knihovny pomocí vybraných markerů PCR reakcí a elektroforetickou separací na agarosovém gelu, který byl následně barven ethidium bromidem a vizualizován v UV transiluminátoru. Gel byl vyhodnocen a pomocí programu FPC byl marker přiřazen k určitému kontigu nebo kontigům.

4.2.1 Izolace DNA z poolů

1) Příprava 2YT média

80 g enzymového kaseinového hydrolyzátu, 50 g kvasničného autolyzátu a 25 g NaCl bylo naváženo a rozpuštěno v destilované vodě. Celkový objem média byl 5000 ml. Přímo do láhví bylo přidáno 80 g agaru, který byl zalit 300 ml připraveného média. Láhve s médiem byly sterilizovány vyautoklávováním a médium bylo rozlito do misek po 50 ml, které se 30 minut nechaly vysušit a do dalšího dne byly umístěny v chladové komoře při 4 °C. Na ztuhlém médiu se poté rozetřelo 300 µl chloramfenikolu (12,5 mg na 1 ml etanolu).

2) Příprava poolů

Pooly DNA byly připraveny pomocí robota GeneTac G3 z knihovny DNA, která byla uspořádaná v 10-ti miskách o 384 jamkách. Robot přenášel BAC klony z jedné misky, jednoho sloupce (ze všech 10 misek) nebo jednoho řádku (ze všech 10 misek) do misky s 2YT médiem a chloramfenikolem, na níž pak byly kultivovány při 37 °C. Po dvou dnech kultivace bylo do misek napipetováno 5 ml 2YT média, škrabkou byly opatrně kolonie přesunuty do 15ml zkumavky. Obsah zkumavek byl pak zamíchán a stočen na centrifuze 10 min při 3000 g, 5 °C. Dále se pracovalo pouze se sedimentem.

3) Izolace DNA

K sedimentu bylo přidáno 100 µl GET s RNasou (1000 ml GET, 4 µl RNasy) a důkladně zvortexováno. Celý obsah byl zastříženou špičkou přenesen do mikrozkušavky a nechán 5 min. na ledu. Bylo přidáno 400 µl alkalického SDS, opatrně promícháno a necháno na ledu 10 min. Dále bylo přidáno 300 µl neutralizačního roztoku, řádně promícháno a necháno na ledu 10-15 min a poté centrifugováno 10 min, 15000 g, 4°C. Supernatant byl odebrán zastříženou špičkou (cca 800 µl) do čisté mikrozkušavky, bylo přidáno 800 µl isopropanolu a 10 min inkubováno při laboratorní teplotě a centrifugováno 10 min, 15000 g, 4°C. Sediment byl opláchnut 70% etanolem, vysušen, rozpuštěn ve 100 µl vody s RNasou (1 ml vody, 4 µl RNasy) a inkubován v termostatu při 37 °C, 30 min. Bylo přidáno 100 µl 7,5M octanu amonného, opatrně promícháno, inkubováno na ledu přesně 10 min a centrifugováno 10 min, 15000 g, 4°C. Supernatant (cca 200 µl) byl přemístěn do čisté mikrozkušavky, bylo přidáno 400 µl 96% etanolu, opatrně promícháno, inkubováno 1 hodinu při -20 °C a centrifugováno 10 min, 15000 g, 4°C. Sediment byl opláchnut 70% etanolem, vysušen fénem a rozpuštěn v 20 µl deionizované vody.

4.2.2 PCR reakce

Premix PCR reakce byl namíchán podle Tab. I. Byla použita DNA z 10 miskových, 16 řádkových, 24 sloupcových poolů a 4 pozitivní kontroly genomické DNA z kultivarů pšenice Chinese Spring (CS), Renan (Re), Opata (Op) a Synthetic (Sy).

Tab. I: Reakční směs PCR reakce.

Reakční směs	Zásobní roztok	1 reakce na 10 µl
H ₂ O		5,4
Cresol Red	0,05% Cresol Red 7,5% sacharosa	2
Pufř	10x	1
Primer (F+R) ¹	100 µmol/µl	0,2
dATP/dTTP/dCTP/dGTP	10 µM	0,2
Taq polymerasa	0,5 U/µl	0,2
DNA	10 ng/µl	1 ² /0,5 ³

¹ Příloha, ² DNA z poolů, ³ DNA klonů

Teplotní průběh reakce (Tab. II) se řídil podle teploty nasedání primerů (Ta) vybraných markerů (Příloha). V případě, že produkt nebyl detekován, Ta se snižovala. Pokud

bylo vizualizováno více bandů, než se očekávalo, Ta se zvyšovala nebo byla použita TouchDown PCR reakce (Tab. III). Pokud po těchto úpravách PCR reakce nebylo možno určit pozitivní BAC klony, marker byl vyřazen.

Tab. II: Teplotní průběh PCR reakce.

Pre-denaturace	95°C	5 min	1x
PCR amplifikace	95°C	30 s	35x
	Ta ¹	30 s	
	72°C	30 s	
Elongace	72°C	5 min	1x

¹ Příloha

Tab. III: Teplotní průběh TouchDown PCR reakce.

Pre-denaturace		95°C	5 min		1x
PCR amplifikace	TouchDown	95°C	30 s		35x
		65°C → 50°C (-1°C/cyklus)	30 s	15x	
		50°C	30 s	10x	
		72°C	30 s		
Elongace		72°C	5 min		1x

Geneticky zamapované markery *barc*, *cdo*, *cfb*, *gdm*, *gpw*, *gwm* a *wmc* (Příloha), které byly ukotvovány do kontigů, byly vybrány na základě referencí z článků Gupta *et al.* (2002), Heun *et al.* (1991), Korzun *et al.* (1997), Ma *et al.* (1996), Paillard *et al.* (2003), Pestsova *et al.* (2000), Röder *et al.* (1995), Röder *et al.* (1998), Somers *et al.* (2004), Song *et al.* (2005), Sourdille *et al.* (2004) a z genetických map uložených na stránkách GrainGenes (http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/map_summary.html): Wheat, Synthetic x Opata, GPW; Wheat-Composite2004-3D; Wheat, Consensus SSR, 2004.

Delphine Fleury (Faculty of Sciences University of Adelaide, Australian Centre for Plant Functional Genomics, PMB1 Glen Osmond, SA 5064, Australia) nám poskytla markery označované jako DF. Ty odvodila porovnáním genů rýže (*Oryza sativa*), která již byla osekvenována, s již známými sekvencemi ESTů pšenice. Z ESTů pšenice, které odpovídaly genům z rýže, pak byly navrženy primery. Sekvence ESTů pšenice, ze kterých se získaly DF markery pak byly porovnány programem blast se sekvencemi ESTů zamapovaných na chromosom 3DS (http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/map_locus.cgi) a DF markery

tak byly ukotveny do třech binů na chromosomu 3DS pšenice. Markery DF byly také zamapovány *in silico* do genetické mapy rýže porovnáváním sekvencí z nichž byly odvozeny s celou sekvencí rýže (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/>).

4.2.3 Elektroforetická separace a vizualizace

Produkty PCR reakce byly separovaných na 1,5% agarosovém gelu v horizontální elektroforetické komoře. Agarosový gel byl připraven smícháním 4,5 g agarosy a 300 ml 0,5xTBE, rozpuštěn v mikrovlnné troubě, zchlazen na cca 60 °C a nalit do komůrky s hřebínky. Po 30 minutách tuhnutí byly hřebínky vyjmuty a komůrka s gelem vložena do elektroforetické komory a zalita 0,5xTBE. Do jednotlivých jamek bylo nanášeno cca 10 µl PCR produktu nebo velikostního markeru. Samotná separace probíhala při 120 V přibližně 80 minut. Gel byl vložen do roztoku ethidia bromidu na přibližně 30 minut.

4.3 Vyhodnocení

Gely barvené ethidium bromidem byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru. Pozitivní bandy na gelu byly přiřazeny k jednotlivým poolům, které pocházely z jednotlivých misek, sloupců a řádků. Porovnáním průsečíků pozitivních poolů získaných použitím jednoho markeru se získala jedna nebo více pozic kandidátních BAC klonů. Pokud spadaly dva BAC klony do jednoho kontigu, byly považovány za pozitivní. Pokud ne, bylo provedeno ověření daným markerem přímo na kandidátních BAC klonech.

4.4 Chemikálie a roztoky

4.4.1 Chemikálie

- isopropanol (Lachema)
- 7,5M octan amonný (Lachema)
- ethanol – 96% roztok (Lachema)
- deionizovaná voda
- primery (Integrated DNA Technologies)
- deoxyribonukleosid trifosfáty dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Fermentas)
- Taq polymerasa (0,5 U/µl)
- velikostní marker GeneRuler, 100bpDNA Ladder Plus (Fermentas)
- agarosa (SERVA)
- ethidium bromid (Sigma Chemical)

4.4.2 Pufry

- 10 x PCR puf (40 ml)
 - 4 ml 100mM Tris-HCl (pH 8,2)
 - 20 ml 500mM KCl
 - 600 μ l 15mM MgCl₂
 - 400 μ l 1% Triton X-100
 - 15 ml H₂O
- 5xTBE (1000 ml, pH 8)
 - 54 g TRIS base
 - 27,5 g kyseliny borité
 - 20 ml 0,5 M EDTA
 - kyselina chlorovodíková na úpravu pH
 - doplnit do 1 l H₂O

4.4.3 Média

- tuhé 2YT médium (5000 ml)
 - 80 g enzymový kaseinový hydrolyzát (16 g/l)
 - 50 g kvasničný autolyzát (10 g/l)
 - 25 g NaCl (5 g/l)
 - 80 g agar (16 g/l)
 - doplnit do 5 l H₂O

4.4.4 Roztoky

- chloramfenikol
 - 12,5 mg chloramfenikolu
 - 1 ml etanolu
- Cresol Red (100 ml)
 - 7,5 g sacharosa
 - 50 mg Cresol Red
 - doplnit do 100 ml H₂O
- alkalický SDS
 - NaOH
 - 1% SDS
- RNasa
 - 1 ml vody

- 4 µl RNasy
- neutralizační roztok (500 ml)
 - 300 ml 3M octan sodný
 - 57,5 ml 5M ledová kyselina octová
 - 142,5 ml vody

4.5 Vybavení laboratoře

- robotická stanice GeneTac G3 (Genomic Solutions)
- centrifuga MICROMAX RF, CR 4i (Thermo Scientific)
- PCR cycler: iCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA); C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad)
- mikrocentrifuga (Labnet)
- třepačka Reax Top (Vitrum)
- elektroforetická komůrka Owl System (Thermo Scientific)
- elektroforetický zdroj: Lighting Volt™ Power Supply (BioTech)
- laboratorní váhy (ViBRA)
- UV transiluminátor InGenius (Syngene)
- mikropipety Nichipipet EX 0,2 – 1000 µl (NICHIRYO)
- zkumavky 12 ml
- mikrozkušavky 0,6 a 1,5 µl
- destičky na PCR: FLAT 96 WELL PLATE

5 Výsledky

Cílem praktické části této diplomové práce bylo ukotvit co nejvíce genetických markerů, dostupných ve veřejně přístupných databázích a člancích a markerů odvozených z genů rýže do MTP fyzické kontigové mapy chromosomu 3DS pšenice (*Triticum aestivum* L.). Pro každý marker byla využita 3-dimenzionální poolovací strategie za použití PCR (viz. kapitola 4.2.2). DNA byla získána izolací 10 miskových, 16 řádkových a 24 sloupcových poolů z MTP BAC knihovny. Koncentrace vyizolované DNA se pohybovala od 10 do 150 ng/μl ve 20μl. DNA tedy stačila na 20 až 300 reakcí. Koncentrace byla dána zručností osoby, která izolaci prováděla, ale i typem poolu. Z miskových poolů byla získaná vždy největší koncentrace DNA, což je dáno větším počtem BAC klonů. Nebo např. ze sloupcových poolů O a P bylo množství DNA nejmenší, protože obsahují nejméně BAC klonů. Proto se u některých poolů vzhledem k počtu markerů musela izolace opakovat i desetkrát, u jiných poolů stačila jen jedna. Amplifikovaná DNA pak byla separována na agarosovém gelu a vizualizovaná.

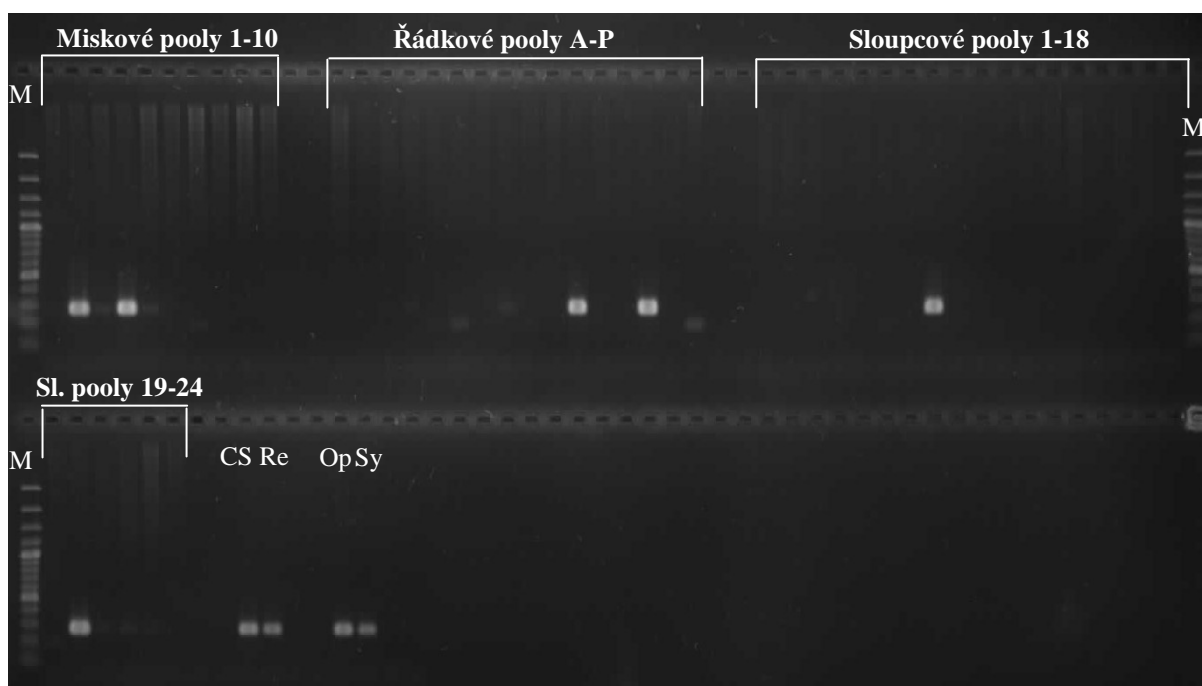
Celkem bylo použito 232 markerů (viz. Příloha) dvou typů. Mikrosatelity (SSR) s názvy *barc*, *cdo*, *cfđ*, *gdm*, *gpw*, *gwm* nebo *wmc* a markery označované jako DF (EST). 100 markerů nevykazovalo žádný nebo nehodnotitelný amplifikační produkt. Ze 132 pozitivních markerů ukotvených do BAC klonů se musela u 40 z nich ověřit pozice na jednotlivých BAC klonech, protože amplifikovaly ve více poolech, než bylo očekáváno (Tab. IV).

Tab. IV: Porovnání použitých markerů

Typ markeru	Celkový počet	Počet nehodnotitelných markerů	Počet hodnotitelných markerů	Počet markerů ověřovaných na klonech
EST	144	52	92	32
SSR	88	48	40	8

Z Obr. 4 je patrné, jak byly za sebou uspořádané miskové, řádkové a sloupcové pooly a 4 pozitivní kontroly genomické DNA kultivarů pšenice Chinese Spring (CS), Renan (Re), Opata (Op) a Synthetic (Sy). U markeru *gpw333* byly pozitivní miskové pooly M2, M4, sloupcové K, N a řádkové 8, 20. V takovém případě bylo 8 kandidátních klonů (Tab. V). U všech klonů byly určeny příslušné kontigy. U markeru *gpw333* byly jako pozitivní považovány BAC klony TaaCsp3DS015I13 a TaaCsp3DS033M17, protože patřily do jednoho kontigu a to ctg1469.

Obr. 4: Produkty PCR DNA poolů s primery markeru gpw333



M-velikostní marker, pozitivní pooly-M2, M4, K, N, 8, 20

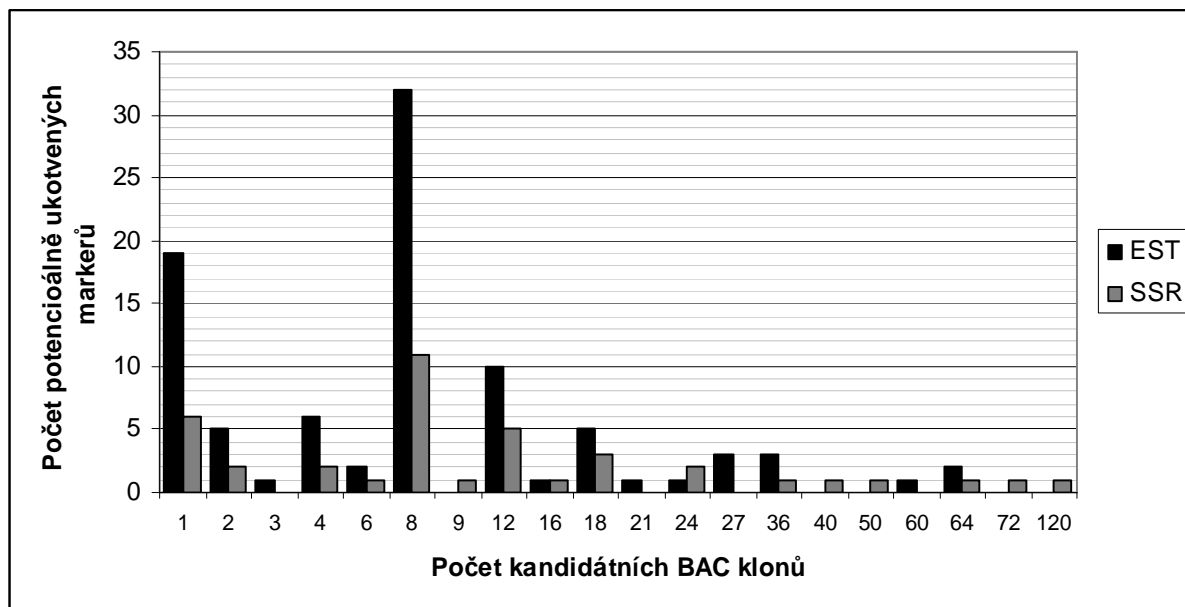
Jednotlivé markery se lišily počtem kandidátních BAC klonů, což je shrnuto v Obr. 5. Bylo předpokládáno, že nejčastější počet kandidátních BAC klonů bude 1, 8 (2^3), popřípadě i 27 (3^3). Množství však bylo mnohem variabilnější. To mohlo být způsobeno mnoha faktory. Např. 2 adresy BAC klonů mohly mít částečně stejnou pozici v knihovně (byly ve stejné misce, řádku nebo sloupci). Nebo mohlo dojít ke ztrátě amplifikačního produktu v jedné z dimenzí.

Tab. V: Možné adresy markeru gpw333, jejich BAC klony a kontigy do kterých patří

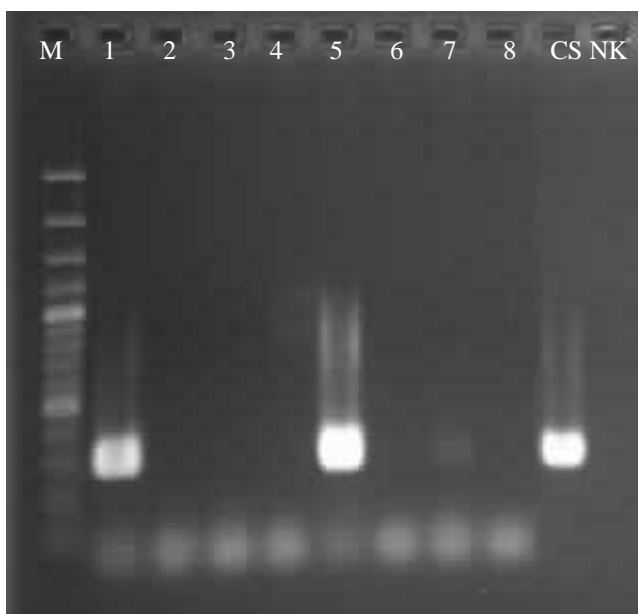
adresa BAC klonu v MTP	BAC klon	kontig
P2K8	TaaCsp3DS014L05	ctg2728
P2K20	TaaCsp3DS015I13	ctg1469
P2N8	TaaCsp3DS018D03	ctg156
P2N20	TaaCsp3DS018M24	ctg445
P4K8	TaaCsp3DS029H04	ctg58
P4K20	TaaCsp3DS030I08	ctg180
P4N8	TaaCsp3DS033M17	ctg1469
P4N20	TaaCsp3DS034K16	ctg2705

Pomocí jednoho markerů se nejčastěji získalo 8 kandidátních BAC klonů, což je zobrazeno i na Obr. 5. U mikrosatelitů bylo získáno i 120 možných adres BAC klonů, ale po přímém ověření byl získán jen jeden pozitivní BAC klon z jednoho kontigu.

Obr. 5: Počet kandidátních BAC klonů vztahovaný na jednotlivé markery



Obr. 6: PCR s osmi kandidátními BAC klony amplifikovanými markerem DF123

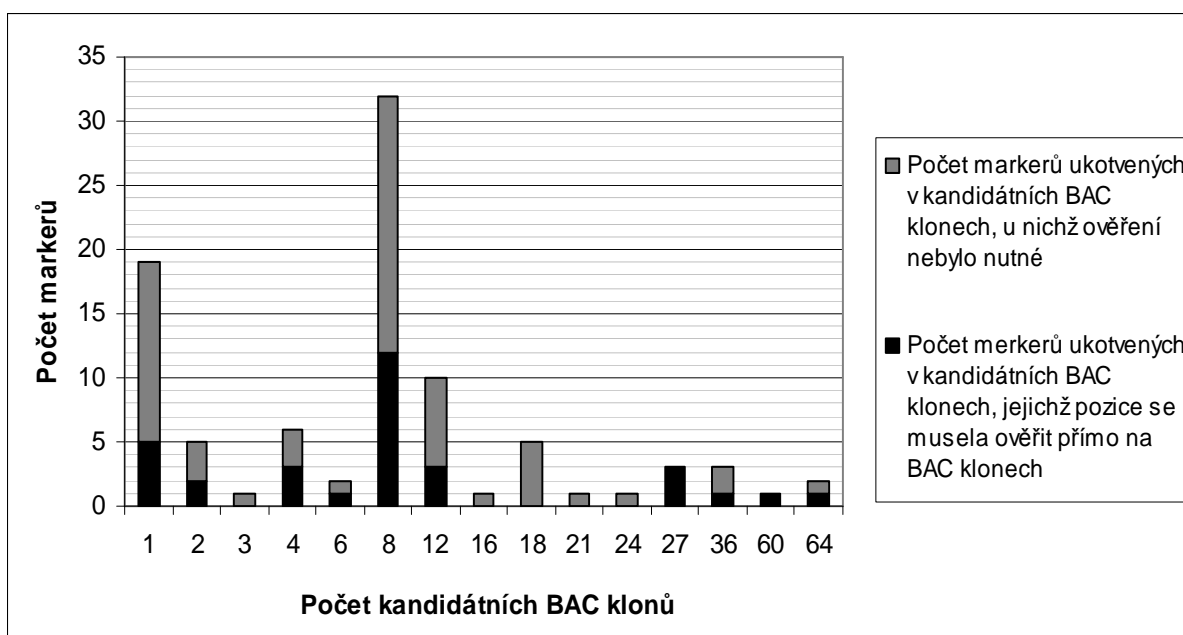


M-velikostní marker, 1-M3G5, 2-M3G8, 3-M3E5, 4-M3E8, 5-M10E8, 6-M10E5, 7-M10G8, 8-M10G5, CS-pozitivní kontrola Chinese Spring, NK-negativní kontrola

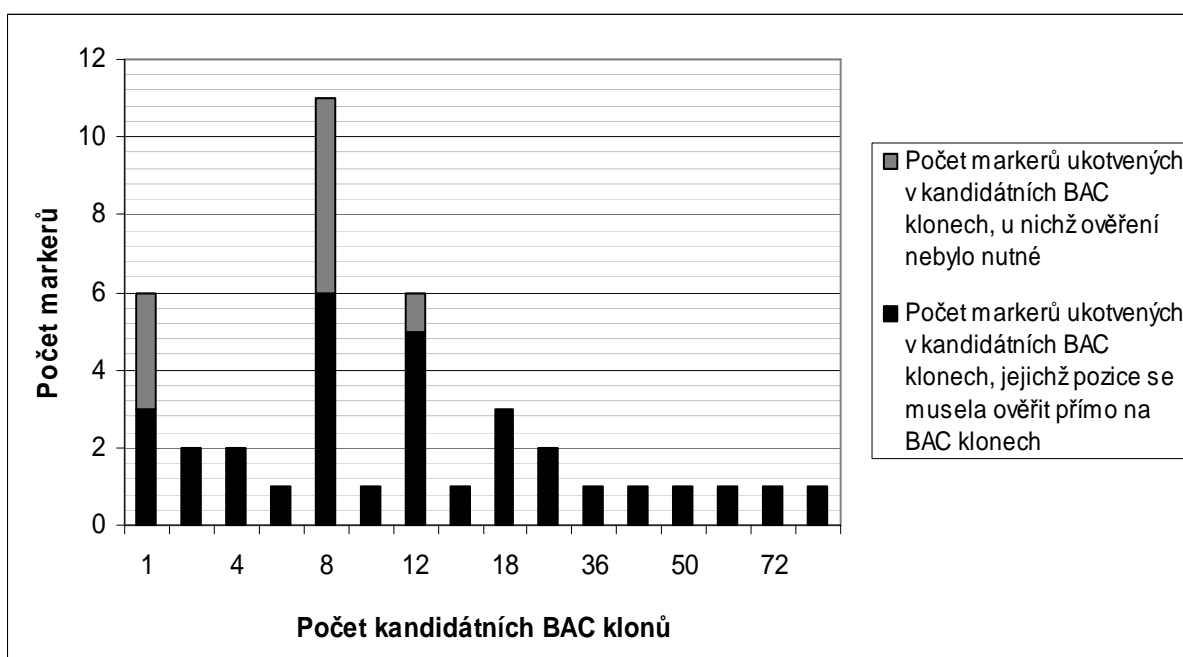
Velké počty potencionálních BAC klonů mohou být dány nespecifičností určitého mikrosatelitu. Některé markery vykazovaly více amplifikačních produktů, než se očekávalo

nebo se ve výčtu kandidátních BAC klonů nevyskytovaly dva v jednom kontigu. Tyto markery se pak ověřovaly individuálním skríníngem BAC klonů (Obr. 6). Přičemž počet markerů, které bylo nutné ověřit PCR na klonech, se lišil nejen s počtem potencionálních adres BAC klonů, ale i podle typu markeru (Obr. 7, Obr. 8).

Obr. 7: Počet markerů EST v závislosti na počtu kandidátních BAC klonů u nichž bylo nutné ověřit jejich adresu

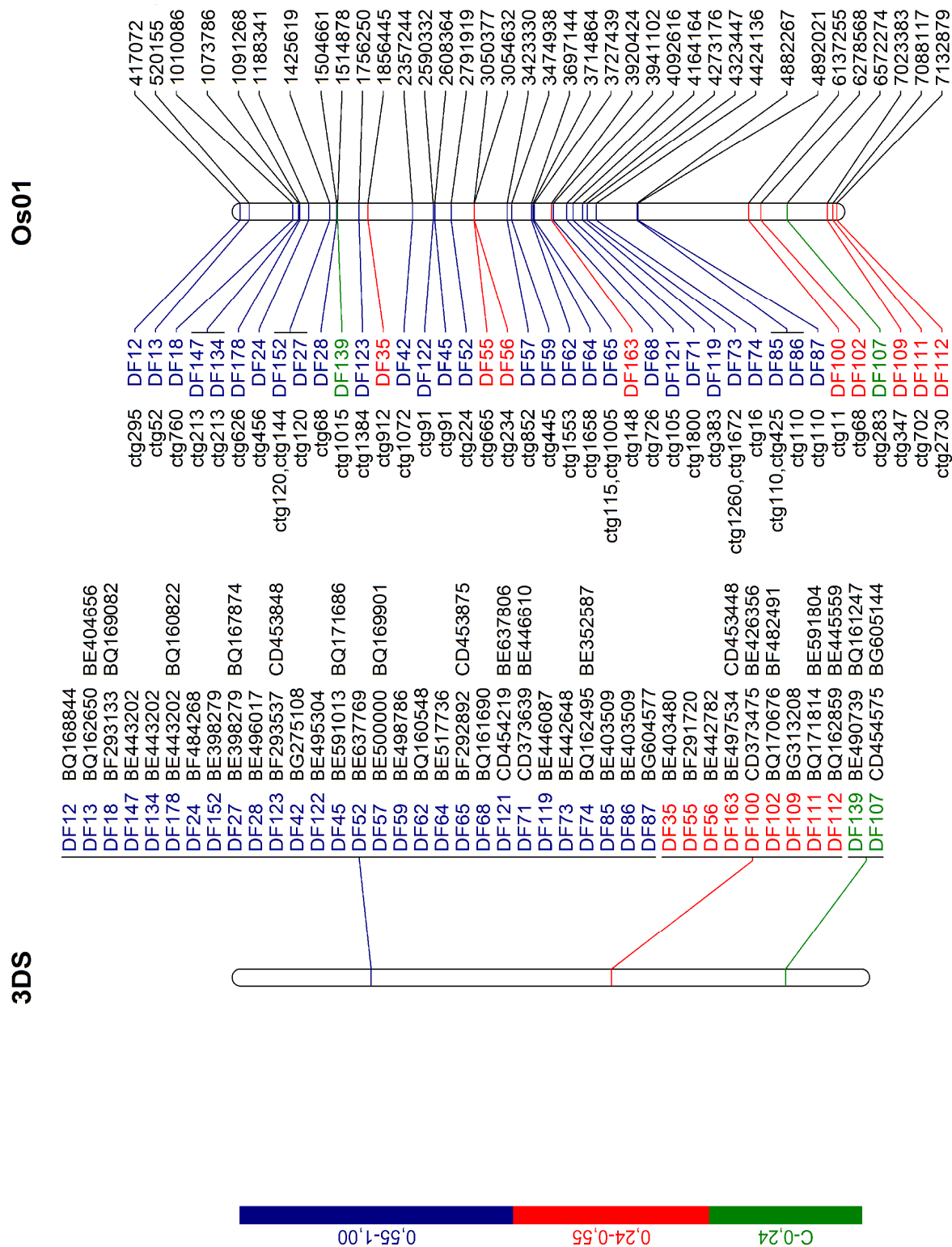


Obr. 8: Počet markerů SSR v závislosti na počtu kandidátních BAC klonů u nichž bylo nutné ověřit jejich adresu



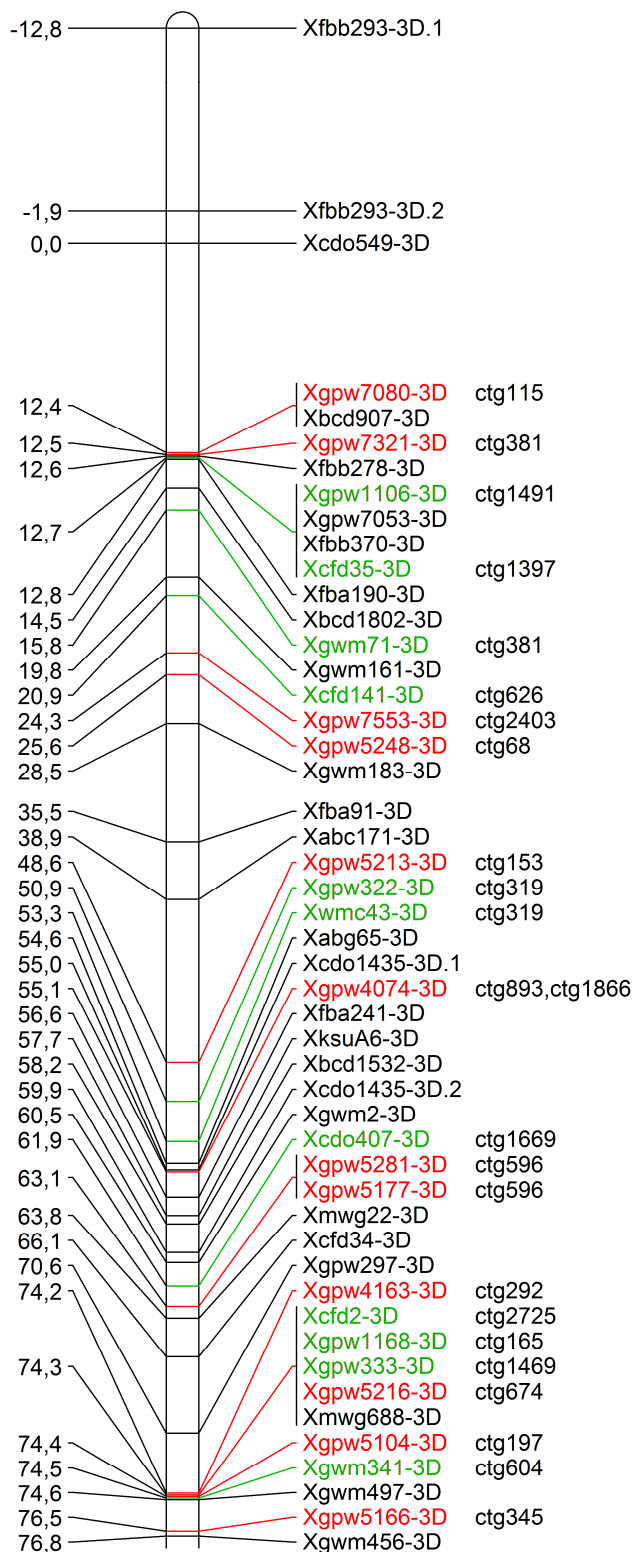
109 markerů EST bylo *in silico* zamapováno na chromosom 1 rýže (Obr. 9), čímž se určila pozice u 19692 kb fyzické kontigové mapy. 42 markerů EST bylo zamapováno do tří binů pšenice: C-0,24; 0,24-0,55; 0,55-1,0 (12199 kb fyzické mapy).

Obr. 9: Ukotvení markerů DF na genetickou mapu chromosomu 3DS *Triticum aestivum* do binů C-0,24; 0,24-0,55; 0,55-1,00 a jejich pozice na chromosomu 1 rýže (*Oryza sativa*).

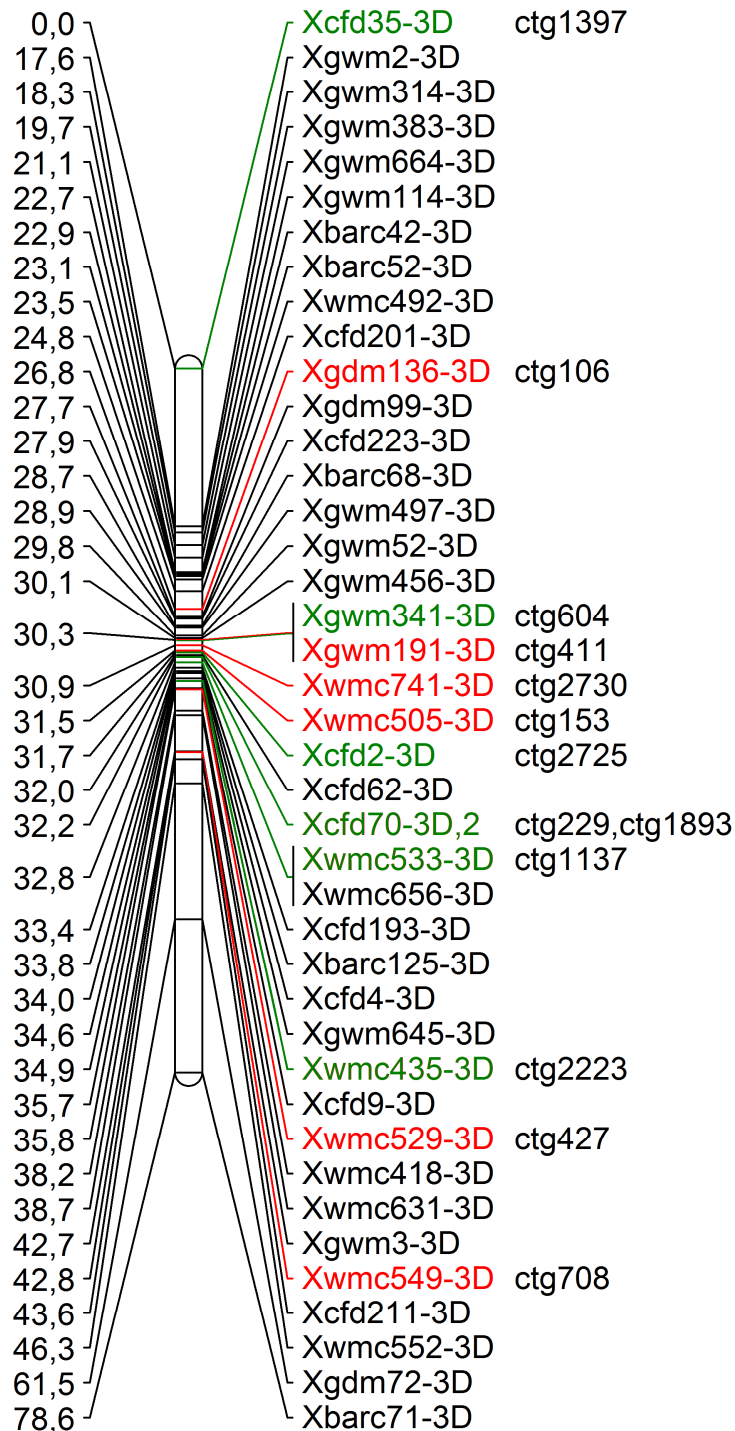


39 mikrosatelitů ze 40 bylo lokalizováno v jedné ze tří genetických map chromosomu 3D (Obr. 10, 11 a 12).

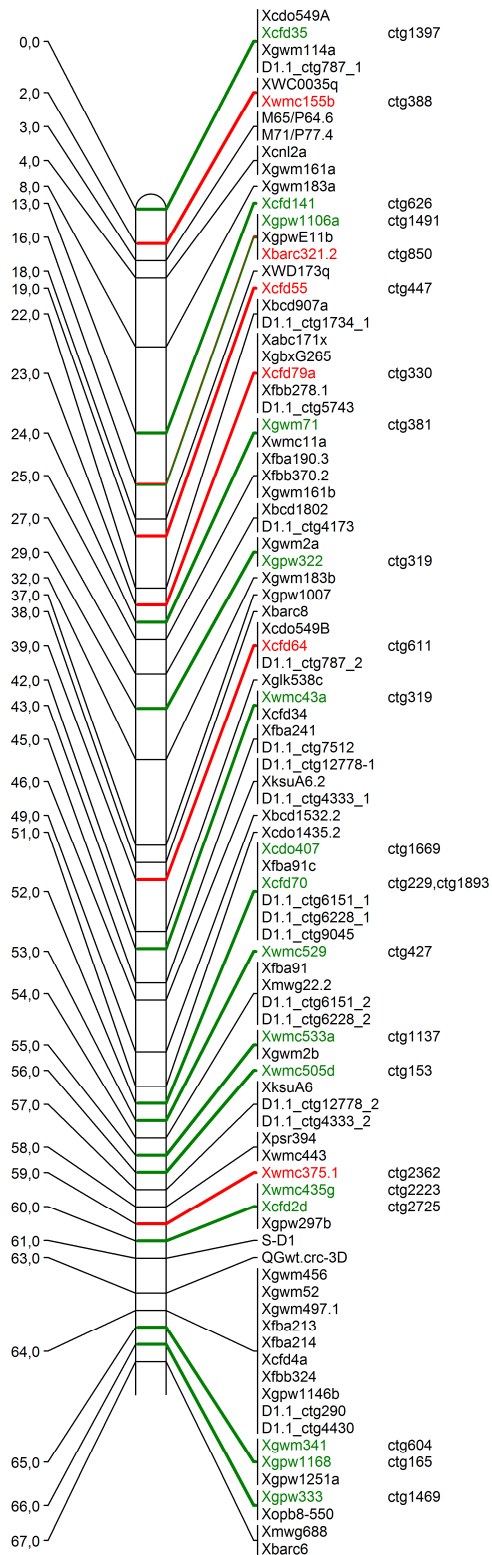
Obr. 10: Výsek genetické mapy chromosomu 3D *Triticum aestivum* – Syntetic/Opata – GPW o původní velikosti -12,8 až 153,3 cM s barevně označeným fyzicky zamapovanými markery do daných kontigů. Červeně jsou označeny ty markery, které se vyskytují jen v této mapě, zeleně ty, které najdeme i v následujících dvou mapách.



Obr. 11: Genetická mapa chromosomu 3D *Triticum aestivum*-SSR-2004-3 s barevně označeným fyzicky zamapovanými markery do daných kontigů. Zeleně jsou označeny ty, které se vyskytují i v mapách v Obr. 11 a Obr. 13, červeně ty markery, které se vyskytují pouze v této mapě.



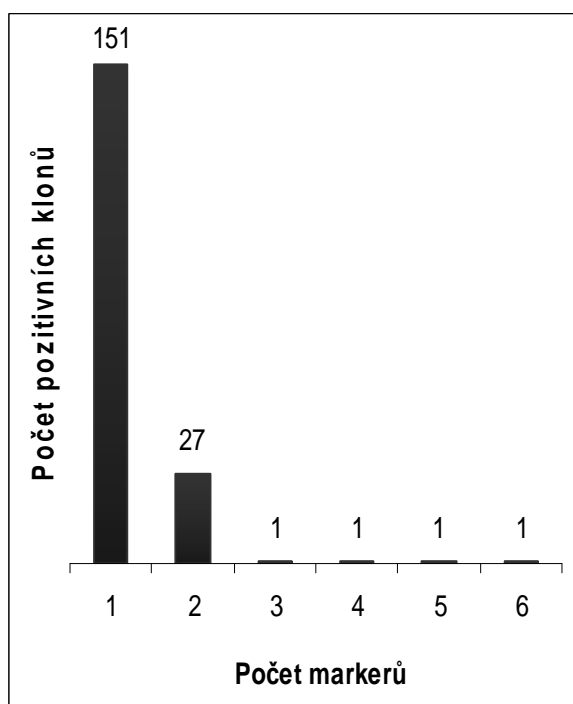
Obr. 12: Výsek genetické mapy chromosomu 3D Wheat-Composite2004-3D o původní velikosti 121 cM s barevně vyznačenými fyzicky zamapovanými markery do daných kontigů. Červeně jsou označeny markery vyskytující se pouze v této mapě a zeleně ty, které můžeme najít i v předchozích dvou mapách



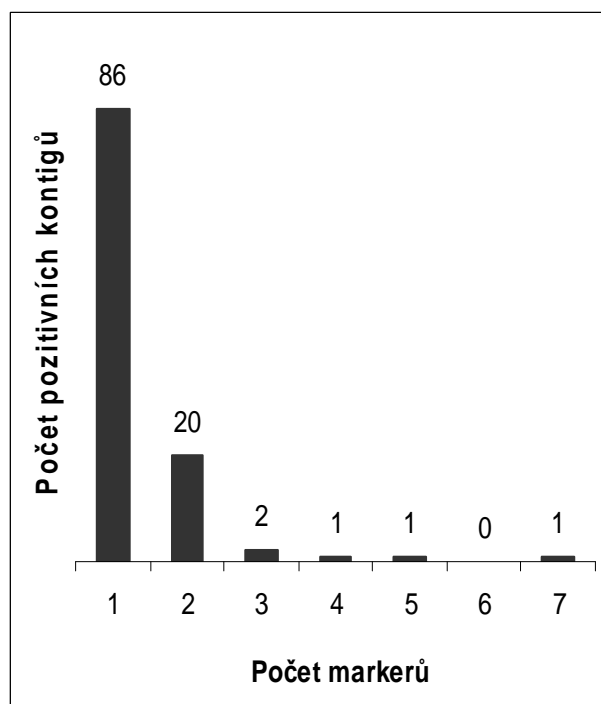
92 markerů EST bylo ukotveno do 121 BAC klonů a 79 kontigů. Všechny 40 mikrosatelitů se vyskytovalo v 68 BAC klonech a 39 kontizích. 132 markerů bylo zamapováno do 182 BAC klonů a 111 kontigů o celkové délce 31330 kb, což tvoří 10,1 % ze 310450 kb MTP chromosomu 3DS pšenice. 151x se v jednom BAC klonu vyskytoval pouze jeden marker, 27x v jenom BAC klonu 2 markery a 1x byl jeden BAC klon reprezentován třemi, čtyřmi, pěti a šesti marker (Obr. 13).

86x byl v jenom kontigu ukotven jeden marker, 20x dva markery, 2x 3 markery a 1x 4, 5 a 7 markerů (Obr. 14). 25 kontigů bylo tedy zamapováno dvěma a více markery, což umožňuje určit i jejich orientaci na mapě.

Obr. 13: Distribuce BAC klonů v závislosti na počtu markerů



Obr. 14: Distribuce kontigů v závislosti na počtu markerů



U třech kontigů (ctg110, 801, 1091) byla orientace určena podle umístění DF markerů na prvním chromosomu rýže (Obr. 9). Ctg110 byl zamapován čtyřmi markery ve dvou BAC klonech, ctg1091 7 markery ve dvou BAC klonech. U ostatních kontigů, které byly zamapovány 2 a více markery nebylo možno orientaci určit. Mezi příčiny patřilo, že se markery vyskytovaly v jiných genetických mapách, nebo byl v kontigu jeden marker SSR a druhý EST, popřípadě jeden z markerů nebyl vůbec zamapován.

Informace získané ukotvením markerů do jednotlivých BAC klonů byly dále využity ke spojení kontigů fyzické mapy. Pomocí 15 markerů bylo spojeno 13 dvojic kontigů. V jenom případě byly dva kontigy spojeny třemi markery přes 4 jejich klony. V ostatních případech byly dva kontigy spojeny pomocí dvou BAC klonů v nich obsažených.

6 Diskuse

Paux *et al.* (2008) pomocí genetických markerů vytvořili a uspořádali fyzickou mapu největšího chromosomu pšenice 3B (995 Mb). 1036 kontigů ukotvili 1443 markery (711 ISBP, 394 EST a 291 SSR). V mé práci jsem 40 SSR a 109 EST markery ukotvila pouze 10,1 % fyzické kontigové mapy chromosomu 3DS, což představuje pouze malý krůček k získání kvalitní fyzické mapy. K tomu jsem však použila nejjednodušší a technicky nenáročnou metodu, která se k tomuto účelu využívá, a to skrínig MTP BAC DNA poolů PCR a následnou separaci amplifikačních produktů na agarosovém gelu. Skrínig BAC poolů na základě PCR má bezesporu spoustu výhod, mezi něž patří nižší stupeň falešných pozitivit a vyšší výkonnost než u hybridizačních metod a malá finanční dostupnost. Zároveň se stupeň falešných pozitivit dá snížit použitím 6D strategie, namísto 2D nebo 3D (Yim *et al.*, 2007). Avšak s příchodem nových technik, jako je např. Illumina či hybridizace na čípech dochází k výraznému urychlení prohledávání BAC knihovny. K tomu je však nutné mít náležité přístrojové vybavení.

Při skrínigu knihovny jsem použila 88 mikrosatelitů, které jsem získala z genetických map chromosomu 3D a 3DS dostupných ve veřejných databázích. Do fyzické mapy se mi podařilo ukotvit jen 40 SSR. Zde se nabízí otázka, jak moc jsou tyto genetické mapy kvalitní a tedy použitelné. Pravdou je, že většina markerů byla odvozena z klonů s domnělými repeticemi (Eujayl *et al.*, 2002) nebo z knihoven obohacených o repetice (Powell *et al.*, 1996), tede ne vždy, z genových oblastí. Tyto markery bývají polymorfnější než jiné typy markerů, ale narozdíl od SSR-EST, amplifikované produkty nemusí být specifické. SSR-EST jsou odvozeny z cDNA, a tedy z genových sekvencí, ale většina z nich není polymorfní. Pozice těchto markerů se dá zamapovat např. do binů pomocí delečních linií, ale ty neumožní zjistit jejich přesné uspořádání.

S rychlým rozvojem sekvenačních technik nové generace se při integraci fyzické mapy s genetickou mohou také uplatňovat SSR odvozené z BES. Nespornou výhodou těchto markerů je již známá pozice na fyzické mapě. Zde je naopak cílem, ukotvit tyto markery na genetickou mapu. K tomu je nutné, aby byly markery polymorfní (Shoemaker *et al.*, 2008). Kofler *et al.* (2007) vyvinuli nový vyhledávací program mikrosatelitů pod názvem SciRoKo. Ten byl např. aplikovaná na chromosom 1 žita. Ze sekvencí BAC klonů bylo navrženo 724 specifických primerů. 119 z nich vytvořilo specifický band a 74 z nich bylo polymorfních (Kofler *et al.*, 2008). Proto jsme tento program využili v našem výzkumu (zde nepublikovaném). Z BES některých BAC klonů a genomické DNA chromosomu 3DS získané 454 sekvenováním byly odvozeny tisíce SSR markerů. Podle motivu a délkové varianty

mikrosatelitu lze určit pravděpodobnost s jakou bude polymorfní (Kofler *et al.*, 2008). Proto jsme získaná data ještě redukovali a zároveň zvýšili šanci, že markery budou polymorfní. S požadavkem minimálně osmnácti nukleotidů repetic a třemi opakováními, maximální záměnou (mismatch) pěti nukleotidů, velikostí amplifikačního produktu do 500 bp, stejnou T_m primerů a vyřazení jednonukleotidových repetic byl počet markerů snižen na přibližně jeden tisíc. Tyto markery pak budou ukotveny na fyzickou mapu chromosomu 3DS a u těch, které budou polymorfní, bude z mapovacích linií určena i genetická pozice.

Hledání genetických markerů v D genomu pšenice *Triticum aestivum* L. není jednoduché, vzhledem k nízkému zastoupení polymorfních lokusů. Proto jsou i genetické mapy tohoto subgenomu nedostatečné. Naopak donor D genomu *Aegilops tauschii* disponuje vyšším stupněm polymorfismu, a proto se jeví jako výhodný zdroj markerů. (Boyko *et al.*, 1999, Pestsova *et al.*, 2000). Ancestrální genom *Aegilops tauschii* lze tedy využít k odvozování markerů pro D genom *Triticum aestivum*. Wanjugi *et al.* (2009) zjistili, že pouze 3 % markerů ISBP derivovaných z *Aegilops tauschii* se nedalo zamapovat do D genomu pšenice. Fyzická mapa *Aegilops tauschii* může tedy poskytovat doplňující informace pro konstrukci fyzické mapy *Triticum aestivum* (Fleury *et al.*, 2010).

Zároveň ostatní příbuzné druhy mohou být užitečné při sestavení map. Bylo zjištěno, že chromosom 1 rýže, chromosom 3H ječmene (Close *et al.*, 2009, Stein *et al.*, 2007) nebo chromosom 2 válečky (*Brachypodium*) (Fleury *et al.*, 2010) jsou vysoce kolineární s chromosomem 3D pšenice. Nedostatečnost genetické mapy D genomu pšenice může být tak nahrazena známým uspořádáním markerů nebo i sekvencí těchto diploidních genomů. Tohoto bylo využito i v této práci. Sekvence genů rýže, lokalizované na chromosomu 1, byly porovnávány programem blast se všemi EST spadajícími do 3DS chromosomu pšenice. Z EST, které byly podobné sekvencím rýže byly navrženy markery. Tyto markery bylo možno ukotvit do fyzické kontigové mapy a do třech binů chromosomu 3DS pšenice. Zároveň díky tomu, že je rýže již osekvenována, bylo možno určit přesné pořadí markerů na chromosomu 1 rýže, a tedy i pravděpodobné uspořádání kontigů fyzické mapy pšenice, v kterých byly markery ukotveny. Ačkoliv rýže či ječmen patří do stejné čeledi, je použití této kolinearity v uspořádání kontigů limitováno, a tudíž by se mělo brát pouze orientačně. To je dokázáno i v této práci. Některé markery DF ukotveny do jednotlivých binů pšenice (Obr. 9) nekorespondují s uspořádáním těchto markerů na chromosomu rýže. Např. marker DF139, který byl ukotven do binu C-0,24 chromosomu 3DS pšenice se v chromosomu rýže vyskytuje na straně blíž k telomeře. To může být způsobeno nesprávným zamapováním ESTů pšenice do jednotlivých binů. Nebo to může být zapříčiněno přestavbou chromosomů,

kteřá je vzhledem k divergenci těchto dvou druhů z ancestrálního zástupce před 46 milióny lety (Gaut, 2002), více než možná.

7 Závěr

Cílem této práce bylo ukotvit co nejvíce markerů do kontigů fyzické mapy chromosomu 3DS pšenice (*Triticum aestivum* L.) a určit jejich pozici podle genetické mapy. MTP fyzické mapy bylo tvořeno 3823 BAC klony. Proto k prohledávání knihovny pomocí PCR byla využita 3D poolovací strategie. Tato technika nepatří sice mezi ty nejrychlejší, ale je levná a technicky nenáročná.

88 SSR markerů dostupných ve veřejně přístupných databázích bylo využito při prohledávání knihovny. Pouze 40 těchto markerů se podařilo ukotvit do 39 kontigů fyzické mapy. U 39 markerů byla známa i jejich genetická pozice. Dále bylo použito 144 markerů EST odvozených z genů rýže. 92 markerů bylo ukotveno do 79 kontigů, 42 do třech binů chromosomu 3DS pšenice a u 109 byla určena pozice podle sekvence chromosomu 1 rýže. Celkem bylo 132 markerů ukotveno do 111 kontigů, které tvořily 10,1 % fyzické mapy. U třech kontigů byla určena i jejich orientace na mapě. Třináct dvojic kontigů bylo spojeno patnácti markery.

Vzhledem k tomu, že již byly vyčerpány všechny známé markery lokalizované na chromosomu 3DS pšenice, další kroky tohoto výzkumu musí vést jinými směry. Mezi ně patří např. odvozování nových markerů ze sekvencí BAC klonů knihovny 3DS pšenice. V tomto už byly učiněny první kroky. Pomocí programu SciRoKo bylo odvozeno z BES a z genomických sekvencí tisíc nových markerů SSR. Vzhledem k tomu, že je u některých známa jejich pozice v jednotlivých BAC klonech, následujícím krokem bude zjistit, zda jsou polymorfní a zda je tedy možné je geneticky zamapovat. Tím by se pak určilo pořadí kontigů fyzické mapy.

8 Literatura

- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M, Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCombie, W.R., Venter, J.C., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H. *et* Merrill, C.R. (1991): Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252: 1651-1656.
- Aggarwal, R., Benatti, T.R., Gill, N., Zhao, Ch., Chen, M.-S., Fellers, J.P., Schemerhorn, B.J. *et* Stuart, J.J. (2009): A BAC-based physical map of the Hessian fly genome anchored to polytene chromosomes. *BMC Genomics* 10: 293.
- Akbari, M., Wenzl, P., Caig, V., Carling, J., Xia, L., Yang, S., Uszynski, G., Mohler, V., Lehmensiek, A., Kuchel, H., Hayden, M.J., Howes, N., Sharp, P., Vaughan, P., Rathmell, B., Huttner, E. *et* Kilian, A. (2006): Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1409-1420.
- Asakawa, S., Abe, I., Kudoh, Y., Kishi, N., Wang, Y., Kubota, R., Kudoh, J., Kawasaki, K., Minoshima, S. *et* Shimizu, N. (1997): Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene* 191: 69-79.
- Barillot, E., Lacroix, B. *et* Cohen, D. (1991): Theoretical analysis of library screening using a N-dimensional pooling strategy. *Nucleic Acids Research* 19: 6241-6247.
- Boyko, E.V., Gill, K.S., Mickelson-Young, L., Nasuda, S., Raupp, W.J., Ziegler, J.N., Singh, S., Hassawi, D.S., Fritz, A.K., Namuth, D., Lapitan, N.L.V. *et* Gill, B.S. (1999): A high-density genetic linkage map of *Aegilops tauschii*, the D-genome progenitor of bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 16-26.
- Brenner, S. *et* Livak, K.J. (1989): DNA fingerprinting by sampled sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 8902-8906.
- Brookes, A.J. (1999): The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186.
- Chao, S., Zhang, W., Akhunov, E., Sherman, J., Ma, Y., Luo, M.-Ch. *et* Dubcovsky, J. (2008): Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Molecular Breeding* 23: 23-33.
- Chen, M., Presting, G., Barbazuk, W.B., Goicoechea, J.L., Blackmon, B., Fang, G., Kim, H., Frisch, D., Yu, Y., Sun, S., Higingbottom, S., Phimphilai, J., Phimphilai, D., Thurmond, S., Gaudette, B., Li, P., Liu, J., Hatfield, J., Main, D., Farrar, K., Henderson, C., Barnett, L.,

- Costa, R., Williams, B., Walser, S., Atkins, M., Hall, C., Budiman, M.A., Tomkins, J.P., Luo, M., Bancroft, I., Salse, J., Regad, F., Mohapatra, T., Singh, N.K., Tyagi, A.K., Soderlund, C., Dean, R.A. *et* Wing, R.A. (2002): An Integrated Physical and Genetic Map of the Rice Genome. *The Plant Cell* 14: 537-545.
- Cheng, Z., Presting, G.G., Buell, C.R., Wing, R.A. *et* Jiang, J. (2001): High-Resolution Pachytene Chromosome Mapping of Bacterial Artificial Chromosomes Anchored by Genetic Markers Reveals the Centromere Location and the Distribution of Genetic Recombination Along Chromosome 10 of Rice. *Genetics* 157: 1749-1757.
- Close, T.J., Bhat, P.R., Lonardi, S., Wu, Y., Rostoks, N., Ramsay, L., Druka, A., Stein, N., Svensson, J.T., Wanamaker, S., Bozdog, S., Roose, M.L., Moscou, M.J., Chao, S., Varshney, R.K., Szűcs, P., Sato, K., Hayes, P.M., Matthews, D.E., Kleinhofs, A., Muehlbauer, G.J., DeYoung, J., Marshall, D.F., Madishetty, K., Fenton, R.D., Condamine, P., Graner, A. *et* Waugh, R. (2009): Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* 10: 582.
- Coe, E., Cone, K., McMullen, M., Chen, S.-S., Davis, G., Gardiner, J., Liscum, E., Polacco, M., Paterson, A., Sanchez-Villeda, H., Soderlund, C. *et* Wing, R. (2002): Access to the Maize Genome: An Integrated Physical and Genetic Map. *Plant Physiology* 128: 9-12.
- Cone, K.C., McMullen, M.D., Vroh Bi, I., Davis, G.L., Yim, Y.-S., Gardiner, J.M., Polacco, M.L., Sanchez-Villeda, H., Fang, Z., Schroeder, S.G., Havermann, S.A., Bowers, J.E., Paterson, A.H., Soderlund, C.A., Engler, F.W., Wing, R.A. *et* Coe, E.H. (2002): Genetic, Physical, and Informatics Resources for Maize. On the Road to an Integrated Map. *Plant Physiology* 130: 1598-1605.
- Coulston, A., Coulston, J., Brenner, S. *et* Karn, J. (1986): Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 7821-7825.
- Cox, D. R., Burmeister, M., Price, E. R., Kim, S. *et* Myers, R. M. (1990). Radiation hybrid mapping: A somatic cell genetic method for constructing high resolution maps of mammalian chromosomes. *Science* 250: 245-250.
- Dear, P.H. *et* Cook, P.R. (1989) Happy mapping-a proposal for linkage mapping the human genome. *Nucleic Acids Research* 17: 6795-6807.
- Dear, P.H. (1997) *Genome Mapping- a Practical Approach*, pp. 95–124. Oxford, UK: IRL Press.

- Doležel, J., Kubaláková, M., Paux, E., Bartoš, J. *et* Feuillet, C. (2007): Chromosome-based genomics in the cereals. *Chromosome Research* 15: 51-66.
- Doveri, S., Lee, D. Maheswara, M. *et* Powell, W. (2008): Molecular Markers: History, Features and Applications. In: Kole, Ch. *et* Abbott, A.G. (ed.): *Principles and Practices of Plant Genomics*, pp. 23-68, Science Publisher, Enfield, NH, USA.
- Dvořák, J *et* Akhunov, E.D. (2005): Tempos of Gene Locus Deletions and Duplications and Their Relationship to Recombination Rate During Diploid and Polyploid Evolution in the *Aegilops-Triticum* Alliance. *Genetics* 171: 323-332.
- Eujayl, I., Sorrells, M.E., Baum, M., Wolters, P. *et* Powell, W. (2002): Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 399-407.
- Fellers, J.P. (2008): Genome Filtering Using Methylation-Sensitive Restriction Enzymes with Six Base Pair Recognition Sites . *The Plant Genome* 1: 146-152.
- Fleury, D., Luo, M.-Ch., Dvorak, J., Remsay, L., Gill, B.S., Anderson, O.D., You, F.M., Shoaie, Z., Deal, K.R. *et* Langridge, P. (2010): Physical mapping of a large plant genome using global high-information-content-fingerprinting: the distal region of the wheat ancestor *Aegilops tauschii* chromosome 3DS. *BMC Genomics* 11(382): 1471-2164.
- Frenkel, Z., Paux, E., Mester, D., Feuillet, C. *et* Korol, A. (2010): LTC: a novel algorithm to improve the efficiency of contig assembly for physical mapping in complex genomes. *BMC Bioinformatics* 11: 584.
- Gardiner, J., Schroeder, S., Polacco, M.L., Sanchez-Villeda, H., Fang, Z., Morgante, M., Landewe, T., Fengler, K., Useche, F., Hanafey, M., Tingey, S., Chou, H., Wing, R., Soderlund, C. *et* Coe, E.H. (2004): Anchoring 9,371 Maize Expressed Sequence Tagged Unigenes to the Bacterial Artificial Chromosome Contig Map by Two-Dimensional Overgo Hybridization. *Plant Physiology* 134: 1317-1326.
- Gaut, B.S. (2002): Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Phytologist* 154: 15-28.
- Green, E.D. (2001): Strategies for the systematic sequencing of complex genomes. *Nature Reviews Genetics* 2: 573-583.
- Gregory, S.G., Howell, G.R. *et* Bentley, D.R. (1997): Genome Mapping by Fluorescent Fingerprinting. *Genome Research* 7:1162-1168.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C. *et* Ramesh, B. (1999): Molecular marker and their

- applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118: 369-390.
- Han, C.S., Sutherland, R.D., Jewett, P.B., Campbell, M.L., Meincke, L.J., Tesmer, J.G., Mundt, M.O., Fawcett, J.J., Kim, U.-J., Deaven, L.L. et Doggett, N.A. (2000): Construction of a BAC Contig Map of Chromosome 16q by Two-Dimensional Overgo Hybridization. *Genome Research* 10: 714-721.
- Han, Y., Chagné, D., Gasic, K., Rikkerink, E.H.A., Beever, J.E., Gardiner, S.E. et Korban, S.S. (2009): BAC-end sequence-based SNPs and Bin mapping for rapid integration of physical and genetic maps in apple. *Genomics* 93 : 282-288.
- Hass-Jacobus B. et Jackson, S.A. (2005): Physical Mapping of Plant Chromosomes. In: Meksem, K. et Kahl, G. (ed.): *The Handbook of Plant Genome Mapping*, pp. 131-149, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Winheim.
- Heun, M., Kennedy, A.E., Anderson, J.A., Lapitan, N.L.V., Sorrells, M.E. et Tanksley, S.D. (1991) Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*) *Genome* 34: 437-447.
- Heun, M., Schafer-Pregl, R., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B. et Salamini, F. (1997): Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* 278: 1312-1314.
- Howell, E.C., Barker, G.C., Jones, G.H., Kearsey, M.J., King, G.J., Kop, E.P., Ryder, C.D., Teakle, G.R., Vicente, J.G. et Armstrong, S.J. (2002): Integration of the Cytogenetic and Genetic Linkage Maps of *Brassica oleracea*. *Genetics* 161: 1225-1234.
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X., Faris, J., Gill, B., Haselkorn, R. et 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 8133-8138.
- Islam-Faridi, M.N., Childs, K.L., Klein, P.E., Hodnett, G., Menz, M.A., Klein, R.R., Rooney, W.L., Mullet, J.E., Stelly, D.M. et Price, H.J. (2002): A Molecular Cytogenetic Map of Sorghum Chromosome 1: Fluorescence in Situ Hybridization Analysis With Mapped Bacterial Artificial Chromosomes. *Genetics* 161: 345-353.
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D. et Kilian, A. (2001): Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research* 29: e25.
- Janda, J., Bartoš, J., Šafář, J., Kubaláková, M., Valárik, M., Číhalíková, J., Šimková H.,

- Caboche, M., Sourdille, P., Bernard, M., Chalhoub, B. *et* Doležel, J. (2004): Construction of a subgenomic BAC library specific for chromosomes 1D, 4D and 6D of hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1337-1345.
- Jann, O.C., Aerts, J., Jones, M., Hastings, N., Law, A., McKay, S., Marques, E., Prasad, A., Yu, J., Moore, S.S., Floriot, S., Mahé, M-F., Eggen, A., Silveri, L., Negrini, R., Milanese, E., Ajmone-Marsan, P., Valentini, A., Marchitelli, C., Savarese, M.C., Janitz, M., Herwing, R., Hennig, S., Gorni, Ch., Connor, E.E., Sonstegard, T.S., Smith, T., Drögemüller, C. *et* Williams, J.L (2006): A second generation radiation hybrid map to aid the assembly of bovine genome semence. *BMC Genomics* 7: 283.
- Jiang, J., Gill, B.S., Wang, G.-L., Ronald, P.C. *et* Ward, D.C. (1995): Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 92: 4487-4491.
- Jiang, Z., Rokhsar, D. *et* Harland, R.M. (2009): Old can be new again: HAPPY whole genome sequencing, mapping and assembly. *International Journal of Biological Sciences* 5: 298-303.
- Kahl, G., Mast, A., Tooke, N., Shen, R. *et* van den Boom, D. (2005): Single nucleotide Polymorphisms: Detection Techniques and Their Potential for Genotyping and Genome Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G. (ed.): *The Handbook of Plant Genome Mapping*, pp. 75-107, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Winheim.
- Kalavacharla, V., Hossain, K., Gu, Y., Riera-Lizarazu, O., Vales, M.I., Bhamidimarri, S., Gonzalez-Hernandez, J.L., Maan, S.S. *et* Kianian, S.F. (2006): High-Resolution Radiation Hybrid Map of Wheat Chromosome 1D. *Genetics* 173: 1089-1099.
- Klein, P.E., Klein, R.R., Cartinhour, S.W., Ulanich, P.E., Dong, J., Obert, J.A., Morishige, D.T., Schlueter, S.D., Childs, K.L., Ale, M. *et* Mullet, J.E. (2000): A High-throughput AFLP-based Method for Constructing Integrated Genetic and Physical Maps: Progress Toward a Sorghum Genome Map. *Genome Research* 10: 789-807.
- Kofler, R., Schlotterer, Ch. *et* Lelley, T. (2007): SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioninformatics applications note* 23: 1683-1685.
- Kofler, R., Bartoš, J., Gong, Li., Stift, G., Suchánková, P., Šimková, H., Berenyi, M., Burg, K., Doležel, J. *et* Lelley, T. (2008): Development of microsatellite markers specific for the short arm of rye (*Secale cereale* L.) chromosome 1. *Theoretical and Applied Genetics* 117:

915-926.

- Kole, Ch. *et* Abbott, A.G. (2008): Fundamentals of Plant Genome Mapping. In: Kole, Ch. *et* Abbott, A.G. (ed.): Principles and Practices of Plant Genomics, pp. 1-22, Science Publisher, Enfield, NH, USA.
- Konfortov, B.A., Cohen, H.M., Bankier, A.T. *et* Dear, P.H. (2000): A high-resolution HAPPY map of *Dictyostelium discoideum* chromosome 6. *Genome Research* 10: 1737-1742.
- Korzun, V., Börner, A., Worland, A.J., Law, C.N. *et* Röder, M.S. (1997): Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 95:149-155.
- Kota, R., Rudd, S., Facius, A., Kolesov, G., Thiel, T., Zhang, H., Stein, N., Mayer, K. *et* Graner, A. (2003): Snipping polymorphisms from large EST collections in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 270: 24-33.
- Luo, M.-Ch., Thomas, C., You, F.M., Hsiao, J., Ouyang, S., Buell, C.R., Malandro, M., McGuire, P.E., Anderson, O.D. *et* Dvorak, 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.
- Luo, M.-Ch., Xu, K., Ma, Y., Deal, K.R., Nicolet Ch.M. *et* Dvorak, J. (2009): A high throughput strategy for screening of bacterial artificial chromosome libraries and anchoring of clones on a genetic map constructed with single nucleotide polymorphisms. *BMC Genomics* 10: 28.
- Ma, Z.Q., Röder, M. *et* Sorrells, M.E. (1996) Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetranucleotide microsatellites in wheat. *Genome* 39:123-130.
- Marra, A.M., Kucaba, T.A., Dietrich, N.L., Green, E.D., Brownstein, B., Wilson, R.K., McDonald, K.M., Hillier, L.W., McPherson, J.D. *et* Waterston R.H. (1997): High Throughput Fingerprint Analysis of Large-Insert Clones. *Genome Research* 7: 1072-1084.
- Meksem, K., Ishihara, H. *et* Jesse, T. (2005): Integration of Physical and Genetic Maps. In: Meksem, K., Kahl, G. (ed.): *The Handbook of Plant Genome Mapping*, pp. 215-232, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Meyers, B.C., Scalabrin, S. *et* Morgante, M. (2004): Mapping and sequencing complex genomes: Let's get physical! *Nature* 5: 578-588.
- Mochida, K., Yamazaki, Y. *et* Ogihara, Y. (2003): Discrimination of homoeologous gene

- expression in hexaploid wheat by SNP analysis of contigs grouped from a large number of expressed sequence tags. *Molecular Genetics and Genomics* 270: 371-377.
- Nguyen, H.T. *et* Wu, X. (2005): Molecular Marker Systems for Genetic Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G. (ed.): *The Handbook of Plant Genome Mapping*, pp. 23-52, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Www.oecd.org* [online]. 2010 [cit. 2011-04-14]. OECD. Dostupné z WWW: <<http://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?QueryId=23342&vh=0000&vf=0&l&il=blank>>.
- Ohmido, N., Fukui, K. *et* Kinoshita, T. (2010): Recent advances in rice genome and chromosome structure research by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 6: 103-116.
- Paillard, S., Schnurbusch, T., Winzeler, M., Messmer, M., Sourdille, P., Abderhalden, O., Keller, B. *et* Schachermayr, G. (2003): An integrative genetic linkage map of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 107: 1235-1242.
- Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., Korol, A., Michalak, M., Kianian, S., Spielmeier, W., Laguadah, E., Somers, D., Kilian, A., Alaux, M., Vautrin, S., Bergès, H., Eversole, K., Appels, R., Šafář, J., Šimková, H., Doležel, J., Bernard, M. *et* Feuillet, C. (2008a): A Physical Map of the 1-Gigabase Bread Wheat Chromosome 3B. *Science* 322: 101-104.
- Paux, E., Legeai, F., Guilhot, N., Adam-Blondon, A.-F., Alaux, M., Salse, J., Sourdille, P., Leroy, P. *et* Feuillet, C. (2008b): Physical mapping in large genomes: accelerating anchoring of BAC contigs to genetic maps through in silico analysis. *Functional & Integrative Genomics* 8: 29-32.
- Paux, E. *et* Sourdille, P. (2009): A Toolbox for Triticeae Genomics. In: Feuillet, C. *et* Muehlbauer, G.J. (ed.): *Genetics and Genomics of the Triticeae*, pp. 255-283, Springer Science, Business Media, LLC.
- Paux, E., Faure, S., Choulet, F., Roger, D., Gauthier, V., Martinant, J.-P., Sourdille, P., Balfourier, F., Paslier, M.-Ch., Chauveau, A., Cakir, M., Gandon, B. *et* Feuillet, C. (2010): Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. *Plant Biotechnology Journal* 8: 196-210.
- Paux, E., Akhunov, E. *International Wheat Genome Sequencing Consortium* [online]. 2010 [cit. 2011-04-14]. Dostupné z WWW: <www.wheatgenome.org>.

- Pestsova, E., Ganal, M.W. *et Röder, M.S.* (2000): Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome* 43: 689-697.
- Piper, M.B., Bankier, A.T. *et Dear, P.H.* (1998) A HAPPY map of *Cryptosporidium parvum*. *Genome Research* 8: 1299-1307.
- Powell, W., Machray, G.C. *et Provan, J.* (1996): Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1: 215-222.
- Rafalski, J.A. (2002): Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science* 162: 329-333.
- Riera-Lizarazu, O., Rines, H.W. *et Phillips, R.L.* (1996): Cytological and molecular characterization of oat x maize partial hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 123-135.
- Riera-Lizarazu, O., Vales, M.I., Ananiev, E.V., Rines, H.W. *et Phillips, R.L.* (2000): Production and Characterization of Maize Chromosome 9 Radiation Hybrids Derived From an Oat-Maize Addition Line. *Genetics* 156: 327-339.
- Riera-Lizarazu, O., Vales, M.I. *et Kianian, S.F.* (2008): Radiation hybrid (RH) and HAPPY mapping in plants. *Cytogenetic and Genome Research* 120: 233-240.
- Riera-Lizarazu, O., Leonard, J.M., Tiwari, V.K. *et Kianian, S.F.* (2010): A Method to Produce Radiation Hybrids for the D-Genome Chromosomes of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cytogenetic and Genome Research* 129: 234-240.
- Röder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D. *et Ganal, M.W.* (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics* 246:327-333.
- Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.-H., Leroy, P. *et Ganal, M.W.* (1998): A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
- Rustenholz, C., Hedley, P.E., Morris, J., Choulet, F., Feuillet, C., Waugh, R. *et Paux, E.* (2010): Specific patterns of gene space organisation revealed in wheat by using the combination of barley and wheat genomic resources. *BMC Genomics* 11: 714.
- Sasaki, T., Matsumoto, T., Antonio, B.A. *et Nagamura, Y.* (2005): From Mapping to Sequencing, Post-sequencing and Beyond. *Plant Cell Physiology* 46: 3-13.
- Shizua, H., Birren, B., Kim, U.-J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. *et Simon, M.* (1992): Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in

- Escherichia coli* using an F-factor-based vector. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89: 8794-8797.
- Shoemaker, R.C., Grant, D., Olson, T., Warren, W.C., Wing, R., Yu, Y., Kim, H., Cregan, P., Joseph, B., Futrell-Griggs, M., Nelson, W., Davito, J., Walker, J., Wallis, J., Kremitski, C., Scheer, D., Clifton, S.W., Graves, T., Nguyen, H., Wu, X., Luo, M., Dvorak, J., Nelson, R., Cannon, S., Tomkins, J., Schutz, J., Stacey, G. et Jackson, S. (2008): Microsatellite discovery from BAC end sequences and genetic mapping to anchor the soybean physical and genetic maps. Genome 51: 294-302.
- Shultz, J.L., Kazi, S., Bashir, R., Afzal, J.A. et Lightfoot, D.A. (2007): The development of BAC-end sequence-based microsatellite markers and placement in the physical and genetic maps of soybean. Theoretical and Applied Genetics 114: 1081-1090.
- Smith, D.B. et Flavell, R.B. (1975): Characterisation of the wheat genome by renaturation kinetics. Chromosoma 50: 223-242.
- Soderlund, C., Humphray, S., Dunham, A. et French, L. (2000): Contigs Built with Fingerprints, Markers, and FPC V4.7. Genome Research 10: 1772-1787.
- Somers, D.J., Kirkpatrick, R., Moniwa, M. et Walsh, A. (2003): Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. Genome 49: 431-437.
- Song, Q.J., Shi, J.R., Singh, S., Fickus, E.W., Costa, J.M., Lewis, J., Gill, B.S., Ward, R. et Cregan, P.B. (2005): Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. TAG Theoretical and Applied Genetics 110: 550-560.
- Sourdille, P., Singh, S., Cadalen, T., Brown-Guedira, G., Gay, G., Qi, L., Gill, B., Dufour, P., Murigneux, A. et Bernard, M. (2004): Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). Functional & Integrative Genomics 4: 12-25.
- Stack, S.M., Royer, S.M., Shearer, L.A., Chang, S.B., Giovannoni, J.J., Westfall, D.H., White, R.A. et Anderson, L.K. (2009): Role of Fluorescence in situ Hybridization in Sequencing the Tomato Genome. Cytogenetic Genome Research 124: 339-350.
- Stein, N., Prasad, M., Scholz, U., Thiel, T., Zhang, H., Wolf, M., Kota, R., Varshney, R.K., Perovic, D., Grosse, I. et Graner, A. (2007): A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. Theoretical and Applied Genetics 114: 823-839.
- Šafář, J., Šimková, H., Kubaláková, M., Čihalíková, J., Suchánková, P., Bartoš, J. et Doležel,

- J. (2010): Development of chromosome-specific BAC resources for genomics of bread wheat. *Cytogenetic and Genome Research* 129: 211-223.
- Tautz, D. (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena, S.D.J., Chakraborty, R., Epplen, J.T., Jeffreys, A.J. (ed.): *DNA fingerprinting: state of the science*, pp. 21-28, Birkhäuser Verlag, Switzerland.
- Thangavelu, M., James, A.B., Bankier, A., Bryan, G.J., Dear, P.H. *et* Waugh, R. (2003): HAPPY mapping in a plant genome: reconstruction and analysis of a high-resolution physical map of a 1.9 Mbp region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4. *Plant Biotechnology Journal* 1: 23-31.
- Valárik, M., Bartoš, J., Kovářová, P., Kubaláková, M., de Jong, J.H *et* Doležel, J. (2004): High-resolution FISH on super-stretched flow-sorted plant chromosomes. *The Plant Journal* 37: 940-950.
- Van Oeveren, J., de Ruiter, M., Jesse, T., van der Poel, H., Tang, J., Yalcin, F., Janssen, A., Volpin, H., Stormo, K.E., Bogden, R., van Eijk, M.J. *et* Prins, M. (2011): Sequence-based physical mapping of complex genomes by whole genome profiling. *Genome Research* 21: 618-625.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. *et* Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Vu, G.T.H., Caligari, P.D.S. *et* Wilkinson, M.J. (2010): A simple, high throughput method to locate single copy sequences from Bacterial Artificial Chromosome (BAC) libraries using High Resolution Melt analysis. *BMC Genomics* 11: 301.
- Wanjugi, H., Coleman-Derr, D., Huo, N., Kianian, S.F., Luo, M.-Ch., Wu, J., Anderson, O. *et* Gu, Y.Q. (2009): Rapid development of PCR-based genomespecific repetitive DNA junction markers in wheat. *Genome* 52: 576-587.
- Wenzl, P., Carling, J., Kudrna, D., Jaccoud, D., Huttner, E., Kleinhofs, A. *et* Kilian, A. (2004): Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9915-9920.
- Wu, X., Zhong, G., Findley, S.D., Cregan, P., Gary Stacey, G. *et* Nguyen, H.T. (2008): Genetic marker anchoring by six-dimensional pools for development of a soybean physical map. *BMC Genomics* 9: 28.

- Xiong, Z., Kim, J.S. *et* Pires, J.C. (2010): Integration of Genetic, Physical, and Cytogenetic Maps for Brassica rapa Chromosome A7. *Cytogenetics and Genome Research* 129: 190-198.
- Xu, Z., Sun, S., Covalada, I., Ding, K., Zhang, A., Wu, Ch., Scheuring, Ch. *et* Zhang H.-B. (2004): Genome physical mapping with large-insert bacterial clones by fingerprint analysis: methodologies, source clone genome coverage, and contig map quality. *Genomics* 84: 941-951.
- Yim, Y.-S., Moak, P., Sanchez-Villeda, H., Musket, T.A., Close, P., Klein, P.E., Mullet, J.E., McMullen1,, M.D., Fang, Z., Schaeffer, M.L., Gardiner, J.M., Coe, E.H. *et* Davis, G.L. (2007): A BAC pooling strategy combined with PCR-based screenings in a large, highly repetitive genome enables integration of the maize genetic and physical maps. *BMC Genomics* 8: 47.
- Zhang, H.-B. *et* Wing, R.A. (1997): Physical mapping of the rice genome with BACs. *Plant Molecular Biology* 35: 115-127.
- Zhong, X.-B., Bodeau, J., Fransz, P.F., Williamson, V.M., Kammen, A., de Jong , J.H. *et* Zabel, P. (1999): FISH to meiotic pachytene chromosomes of tomato locates the root-knot nematode resistance gene Mi-1 and the acid phosphatase gene Aps-1 near the junction of euchromatin and pericentromeric heterochromatin of chromosome arms 6S and 6L, respectively. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 365-370.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

1C C hodnota, množství jaderné DNA v nereplikovaném haploidním jádře

A adenin

AFLP délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (*amplified fragment length polymorphism*)

ATP adenosintrifosfát (*adenosine triphosphate*)

BAC umělý bakteriální chromozóm (*bacterial artificial chromosome*)

BES sekvence konce BAC klonu (*BAC-end sequence*)

bp páry bází (base pairs)

C cytosin

CAPS štěpené amplifikované polymorfní sekvence (*cleaved amplified polymorphic sequences*)

cDNA komplementární DNA (*complementary DNA*)

Ctg kontig

cM centimorgan

DArT (*Diversity Array Technology*)

ddNTP dideoxynukleotidfosfát (*dideoxynucleotide triphosphate*)

DNA deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)

dNTPs deoxyribonukleosid trifosfáty

EST koncové sekvence z cDNA (*expressed sequence tag*)

FISH Fluorescenční *in situ* hybridizace (*Fluorescence in situ hybridization*)

FPC program pro sestavení kontigů z fingerprintů (*FingerPrinted Contigs*)

G guanin

HAPPY (*HAPloid DNA samples using the PolYmerase chain reaction*)

HRM metoda analýzy křivek tání (High Resolution Melt)

ISBP polymorfismus založený na místě inserce (*insertion site-base polymorphism*)

LTC program pro sestavení kontigů z fingerprintů (*Linear Topological Contig*)

Mb milióny párů bází (*mega base pairs*)

MTP (*minimum tiling path*)

n haploidní počet chromozómů

PAA polyakrylamid

PCR polymerázová řetězová reakce (*polymerase chain reaction*)

primer F forward primer

primer R reverse primer

RFLP délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (*restriction fragment length polymorphism*)

RH radiační hybridy

RNáza ribonukleáza

SCAR amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí (*sequence characterized amplified region*)

SDS dodecylsírany sodný (*Sodium dodecyl sulfate*)

SNP jednonukleotidový polymorfismus (*single nucleotide polymorphism*)

SSR mikrosatelit (*simple sequence repeat*)

STSs místo se sekvenční adresou (*sequence-tagged sites*)

T thymin

T_a teplota nasedání primeru (*annealing temperature*)

T_m teplota, kdy DNA disociuje na jednotlivá vlákna (*melting temperature*)

YAC umělý kvasinkový chromosom (*Yeast artificial chromosomes*)

10 Přílohy

MARKER	Ta	[bp]	Primer F	Primer R	Adresa BACu	BAC klon	Kontig
DF003	58	399	CCAGCCTCAATTCAGGAATCCA	CACATCGGTCACGGTAATATCACCA	M7J15	TaaCsp3DS057C10	ctg678
					M7J16	TaaCsp3DS059C05	ctg678
DF006	62	567	AGTTGGGCCAAGTACATGTCCATTT	AAAGGGTACACAGCTTCAGGAGCA	M5F13	TaaCsp3DS039L05	ctg1625
					M6C16	TaaCsp3DS047E20	ctg1625
DF008	54	280	TTTGGCTAAGATGCGTGGAA	GCTGTATGCGGTTCTTGAAA	M9C3	TaaCsp3DS071J24	ctg278
DF009	58	200	CGTTCTACTTCTGGGCATATTTTCAT	AAGCAAATTTCTGGTGATAAAACAA	M1N4 M7M23	TaaCsp3DS009P14 TaaCsp3DS053D01	ctg963 ctg963
DF010	61	600	ACATTTCAAAGGAGGGACAAAAG	GCATCTCTTACAACCAGCTAAC	M5E1	TaaCsp3DS035C17	ctg1397
					M8J13	TaaCsp3DS067P03	ctg1397
DF012	52	502	AGAAGATCCAGTTAAGGCAGAGATT	GAGTCCCTTTCCAGGTTATTTATTT	M7J5	TaaCsp3DS056D21	ctg295
DF013	54	347	ACAAGCAGAACATTCAAGGTTAGAC	AGTGGTTTAGCCGAGTACAGAAAG	M4M4 M5M3	TaaCsp3DS029D10 TaaCsp3DS035g14	ctg524 ctg524
DF015	55	429	TGCAGTCAAGCGATCTGAAC	ATCTGCAATGGTGGAGAGGT	M5E24	TaaCsp3DS038E22	ctg1473
DF018	58	228	TTCACCGAGGAGGACATGAG	GATGATCCCTCCGGTGTAGA	M8I17 M8O20	TaaCsp3DS061N11 TaaCsp3DS065K07	ctg760 ctg760
DF020	57	200	GTCCAATCCGGTCACTCATT	CAGTCCACTGCTCATCTGGT	M1D2 M1E23	TaaCsp3DS009G11 TaaCsp3DS004D04	ctg1091 ctg1091
DF021	60	495	AGAAGGCACAGGAAACATGG	ACCCTTCGCTCATCATCATC	M1E23 M10M23	TaaCsp3DS004D04 TaaCsp3DS087O11	ctg1091 ctg801
DF022	60	300	GTGTAGATCTAAGGAAGGGCAGATT	GTATGTCTCCCACAGAACTTGAAC	M1B18	TaaCsp3DS011A13	ctg432
DF024	56	212	AATTCTGTTTCCGATCTTGGTGA	TGCATCAGAAAATAGTATACGCAGA	M7J1	TaaCsp3DS055O10	ctg456
					M1B18	TaaCsp3DS011A13	ctg432
DF025	58	325	GAAGAATCCAAGTCAAGCAACAG	ATTACACTCCCTACAAGCTCAGGTA	M3E17	TaaCsp3DS020J23	ctg354
					M7K1	TaaCsp3DS051F05	ctg354

MARKER	Ta	[bp]	Primer F	Primer R	Adresa BACu	BAC klon	Kontig
DF027	58	523	TCAGAATCTGGCACTAGTGTATCAA	GATTCCATAGGATGTGAAACAGATG	M2P10 M9K4	TaaCsp3DS018F06 TaaCsp3DS074M03	ctg120 ctg120
DF028	52	203	TTGTGGTACAGGAAATGGTATTTTT	CAGGGAAACATGTATATGTAACCAAA	M2P4 M3D5	TaaCsp3DS017N21 TaaCsp3DS023L16	ctg68 ctg68
DF034	55	300	GGATGTTGTCTCTGCCTTTTATGTA	AATATAATTACACATCACGCTTTGAA	M4K4	TaaCsp3DS029D09	ctg522
DF035	60	455	GCTGTCCGAGTCGTGCAT	TAGTAGCAGTCGCCGTAGCC	M6G20 M10L21	TaaCsp3DS047I22 TaaCsp3DS094C09	ctg912 ctg912
DF037	58	250	CTCGTGCCGAAAGCACACAGCAT	ACCGCCTGACAACTTGC	M2J23 M10B8	TaaCsp3DS017H07 TaaCsp3DS095C13	ctg18 ctg18
DF038	62	300	GAGTGGAGATGGCAGTGATTG	ACTTCAATTGCTTGGTTTGCTGT	M1A18 M5A4	TaaCsp3DS006G10 TaaCsp3DS036M01	ctg57 ctg57
DF042	56	338	GTTGAGGAGATCCCAGATAGCTT	CAGGTGAATTCGAGACTTGGAC	M3D23	TaaCsp3DS025A22	ctg1072
DF045	58	212	TTTCAAATTCAGCCACTGGA	CAATCAGGGCATTGCATCTT	M3B23	TaaCsp3DS025A21	ctg91
DF051	58	200 a 300	CGAGGAAGTGCCTAAGAG	ATGTACAAGTCTCCATGTCATGCT	M3I12	TaaCsp3DS022F10	ctg372
DF052	57	500	CACAAGGCTCTGAATTCCAAC	TTGCACTATCAACTCAAGTATACGC	M3E15	TaaCsp3DS020I05	ctg224
DF054	60	500	AGAATGCCTCGCTACGATGA	GTTCTGGCAATCCCTTCTATGT	M5P11	TaaCsp3DS039K10	ctg1497
DF055	57	500	AGCAATAGGNAAGGAAAGAAGAGAA	TACTTGAATGGGAGGTACTTCAGAC	M6N22	TaaCsp3DS051B18	ctg665
DF056	58	400	AAAGCTTTTCGTGCCAATGT	CCAGTGAGGGGTACTACGGA	M1B11 M2G17	TaaCsp3DS008C12 TaaCsp3DS013I19	ctg234 ctg1148
DF057	60	150	AGAGCAGAGATGCATATATGAGGAG	GTTTAACCACAGAACTCCAAGAAGA	M6H11 M8E3	TaaCsp3DS048M04 TaaCsp3DS060D23	ctg852 ctg852
DF058	58	500 a 600	CACTTGACATTTGATGAACTCTCTT	TGGTAAATCTCAGGTTCAAGAACT	M6H11 M8E3	TaaCsp3DS048M04 TaaCsp3DS060D23	ctg852 ctg852
DF059	56	1 kb	GTCAGTGCTTGAATCTGCTAAACTT	GCCTCTGATAATACATTTGAGCTTT	M2N20	TaaCsp3DS018M24	ctg445
DF062	58	260	GGCCCTGGCCTGCTACTT	AGTGTAGTAAAGGAAGACGCTCCAT	M3G13 M9E14	TaaCsp3DS020G05 TaaCsp3DS075K17	ctg1553 ctg695

MARKER	Ta	[bp]	Primer F	Primer R	Adresa BACu	BAC klon	Kontig
DF064	58	363	ATCTACTTGTCTATATGGCGGTGCT	ACATGCTGGGTGATTGACTTATTT	M4A10	TaaCsp3DS029I09	ctg1658
					M6L15	TaaCsp3DS049A15	ctg1658
DF065	56	391	CAAGAGAGCCATGGCATGAT	CAGCAGTAGGAACTTCCAAGG	M3B6	TaaCsp3DS025I02	ctg1005
					M1I17	TaaCsp3DS001O01	ctg115
DF066	58	270	GGGTTGCCACCAATCAAT	AGGGGGTGGTGCAGAAGTA	M1I7	TaaCsp3DS001O01	ctg115
					M3A12	TaaCsp3DS022E17	ctg115
DF068	56	372	TGTTGTGTACAAGGAACAACCTCA	TAACTCATTGTTGAAGTCCCTTCTC	M3P3	TaaCsp3DS023K23	ctg726
					M5J7	TaaCsp3DS039C15	ctg726
DF070	57	400	GTGTTAGCTGAGTTGGGAATTTCT	CTCCGACACTTCAGCTTCCTT	M7F23	TaaCsp3DS057N06	ctg1032
DF071	57	230	CTATGATGTGACAGACCAAGATAGC	CCATGAAAGCCTGTTCAACATT	M2H11	TaaCsp3DS016K24	ctg1800
					M4I10	TaaCsp3DS029J01	ctg1800
DF072	58	450	GTATCGTTCATATCCAATTCCTTTG	CAATGAGCTGATTTACCTTCTTAT	M6N20	TaaCsp3DS050O07	ctg1584
DF073	54	260	TTTTCCAGCAGCAGATTCTCT	ATTCAGCAATGGAACCAAGG	M5O6	TaaCsp3DS037A03	ctg1260
					M10G17	TaaCsp3DS086L24	ctg1260
					M7F10	TaaCsp3DS058K08	ctg1672
					M7L22	TaaCsp3DS059K08	ctg1672
DF074	58	400	CCTCGGACCAAACCTTGTTGA	ATTCCACAACCAAAGCAAGG	M4D3	TaaCsp3DS031B07	ctg16
					M10A9	TaaCsp3DS084P01	ctg16
DF077	56	250	GATGTAAGCAGCCTGATCAATTC	CGAGTCTTTCTCATTAGCACCAGTA	M6D6	TaaCsp3DS049N19	ctg679
					M9H12	TaaCsp3DS081P01	ctg679
DF079	58	500	AATCAAGGAATACAGGGAAAAGAAG	AGGCAACAAGTAGCCAGTAGTATGA	M6D6	TaaCsp3DS049N19	ctg679
					M9H12	TaaCsp3DS081P01	ctg679
DF080	57	300	CGCTCAAGACGCAGTACAAG	ATCATGTCGATAACCTCCATCAC	M5K6	TaaCsp3DS036P04	ctg194
DF084	54	350	TGGAGATCAATTTTGCAGTAATAAA	GCTCTGTGTCCTTATTACACTCGTT	M10B21	TaaCsp3DS093O20	ctg30
DF085	62	301	CCTAAGCAAGCATTCTTCCATC	GTAGAAGATCTTGCAAACGACGAG	M7J8	TaaCsp3DS058I13	ctg110
					M1B3	TaaCsp3DS007E24	ctg425
DF086	56	256	AGGAGGTTGGTATAGGTGCTGAT	AATTTGTCGTGGTGGAGAAAAT	M7J8	TaaCsp3DS058I13	ctg110

MARKER	Ta	[bp]	Primer F	Primer R	Adresa BACu	BAC klon	Kontig
DF087	58	516	ATGCCTGAATGGTGGAAAGTG	CAGACAGGAGTGGTTCAGCA	M7J8 M8M9	TaaCsp3DS058I13 TaaCsp3DS060P09	ctg110 ctg110
DF088	54	200	GTCATATTGTGGCTTTGAAAGTTCT	CAACTCCTTGTACAGCTCTCCTTT	M8M9	TaaCsp3DS060P09	ctg110
DF091	58	400	TTTACAGAACCTACCCCTATCCAGT	CTTTTTGAAGATCACGAACTTGAGG	M4O22	TaaCsp3DS030J06	ctg1161
DF098	60	300	GAACACCTGATGCAGTTTATAGTCA	GAATTTACAGTAGCGTCATCAAACC	M9H6	TaaCsp3DS081G08	ctg956
DF100	55	307	CTTAACGATGACGGCTCACCTAAT	CGTGGTAGTCGTTGACAACTTATT	M1F23 M3E14	TaaCsp3DS009E15 TaaCsp3DS022H05	ctg11 ctg11
DF102	56	500	ACTACAACCTCGCCGCTCTTC	CTCAGCATCCCCATTCTC	M3A21 M4A8	TaaCsp3DS020M09 TaaCsp3DS029F21	ctg68 ctg68
DF103	56	400	CTTGCAGGTTCAAGCTAGGG	CTGGCAAGGAAGTAGCCATC	M9O9	TaaCsp3DS072E12	ctg1176
DF104	52	250	CTGGAAGAGCAGGAACACCAG	CAATATTAATGTGATCTACCGATGC	M5P1 M8G20	TaaCsp3DS038J21 TaaCsp3DS065J10	ctg551 ctg551
DF106	56	200	CTGAGATCGGACCGGAGAAC	TCCAATAAGCACAGAAATAATACATCA	M5A18 M10C10	TaaCsp3DS037M19 TaaCsp3DS089L04	ctg1261 ctg108
DF107	60	800	GAAATATCCAGCACCTCCGA	CATGCGCATTGGATGATAAC	M1G7	TaaCsp3DS001N24	ctg283
DF109	56	218	CCCTCAGATTAAGAAAAGGGTAAAT	TGCTATACATTTTTGAAGGGTACAA	M1B23 M10P6	TaaCsp3DS009E07 TaCsp3DS095C10	ctg347 ctg347
DF110	58	600 a 700	CTTGCACCAGAGTATGCTTCTTC	CTAAGTGGGGATCCACTAAAGCAT	M1G11	TaaCsp3DS002F11	ctg705
DF111	60	218	CTTCCTTTCCTTCCTTCCTTC	GTTCTTGGCGTGGTGGTG	M5I8 M6F5	TaaCsp3DS037B12 TaaCsp3DS048F20	ctg702 ctg702
DF112	56	377	AGCACAGTACTACAACCAGGGAAG	AAAAACTGAAGCTTACACATCCAAC	M2E24	TaaCsp3DS015L03	ctg2730
DF114	56	300	CAAGATACCCTGCTGATTCTC	GAATCTGACGGAAACAGAACTACAG	M5O2	TaaCsp3DS036L23	ctg1808
DF119	64	226	CAAGGCTGTCATCAGGTGTG	CGCATAGTAGGGCTGAGCA	M2E14 M3D8	TaaCsp3DS015C17 TaaCsp3DS025K08	ctg383 ctg383
DF121	56	300	GTTGTGGGGAATGTGTGGATATT	CTTTGTTTCATATCCAGATCCTCGT	M2G8 M3P18	TaaCsp3DS014K03 TaaCsp3DS026I08	ctg105 ctg326

MARKER	Ta	[bp]	Primer F	Primer R	Adresa BACu	BAC klon	Kontig
DF122	58	500	TGAGATGCTTGTCAACCTCG	CTGTTTCAGCGACAACCTCCA	M3B23 M4G1	TaaCsp3DS025A21 TaaCsp3DS027B14	ctg91 ctg91
DF123	56	300	AAGTGGAGGTGAAGAGCAAGTATC	CGAGCCTCCTACATAATTTATCAGA	M3G5 M10E8	TaaCsp3DS019J09 TaaCsp3DS089H17	ctg1384 ctg765
DF128	56	240	AACTCCTTGGCGCAGCTC	AGGCAACCCTAGAGTTTCTTGC	M10N10	TaaCsp3DS095J21	ctg835
DF129	54	190	CGGCAACAACAACAACCA	ATGAGGCTCCCAACTCCAC	M2F12	TaaCsp3DS018F21	ctg180
DF131	56	200	ATGGACGAGCTCTTCGAGTG	GGGAGCACACTTGTCAACCT	M4M10 M9K6	TaaCsp3DS029J22 TaaCsp3DS074O10	ctg2622 ctg2622
DF132	56	300	AAGTGCACCAGGATGAGTC	ACGTTGAGCTCCTCGCTAAC	M3L2 M9C21	TaaCsp3DS025E15 TaaCsp3DS073N15	ctg2405 ctg2405
DF133	62	420	AGACGTTGGACAATGGGTTC	TATCTATGCGGGCTTTCGAC	M4M4 M5N5	TaaCsp3DS029D10 TaaCsp3DS039A04	ctg524 ctg524
DF134	61	600	ACAAGAAGCCGAGGATGATG	AGGAAGAGCGAGTTGGTGAG	M7K6	TaaCsp3DS053N07	ctg213
DF135	56	200	CAAGATCAAGAAGGCCAAGC	AGGTACACCCCGTTCTCGAT	M1D2 M4J9	TaaCsp3DS009G11 TaaCsp3DS031N24	ctg1091 ctg1091
DF136	62	200	CTGATGGTGTCTGGTCGTG	GACGTAGAGCGGGAGCTTG	M6M9 M2C24	TaaCsp3DS044N21 TaaCsp3DS015K19	ctg2733 ctg2733
DF137	56	200	AGTTGATGCATTGCTTGCAAG	CTTGCTGGTTACGCAACTGT	M4M10 M9K6	TaaCsp3DS029J22 TaaCsp3DS074O10	ctg2622 ctg2622
DF139	58	189	CGAGGTGTAAGTGTCCAAATCTTAT	TACATGTGCCGGGAGACCTAC	M1B12 M4G6	TaaCsp3DS010F21 TaaCsp3DS029E10	ctg1015 ctg1015
DF141	56	215	AGCCACTAGTGCCCTTGAGA	TGCGGACAAGTAGGTTGATG	M5H12	TaaCsp3DS041O13	ctg26
DF142	62	170	TGCCGCCTACATATCTGGTTG	CTCGGCAAGTTCAGTGCATATC	M7E23	TaaCsp3DS053B17	ctg487
DF143	62	260	CGACGACGTAGATCCAGATG	TGCTCATGATCGTCATCTCC	M2C24 M6M9	TaaCsp3DS015K19 TaaCsp3DS044N21	ctg2733 ctg2733
DF146	62	380	GGATCAGGGTTCTGGCGAAT	TCCAAACATCAACGGAAATG	M3E17 M7K1	TaaCsp3DS020J23 TaaCsp3DS051F05	ctg354 ctg354

MARKER	Ta	[bp]	Primer F	Primer R	Adresa BACu	BAC klon	Kontig
DF147	58	228	AGCGGCTACTCTCTGAGCAT	GGACATGGGGCTCAAGTACA	M7K6	TaaCsp3DS053N07	ctg213
DF152	56	300	GGAGAGCACCCTGTGGCAA	AGTATGCCCCATTCTTGCTG	M2P10 M9K4	TaaCsp3DS018F06 TaaCsp3DS074M03	ctg120 ctg120
DF153	56	250	AGAAGAAGGAAGCCCCTCTG	GCCATGTCTTTTGTGCCTTT	M10M23 M1E23	TaaCsp3DS087O11 TaaCsp3DS004D04	ctg801 ctg1091
DF154	58	250	AGGAGCCGCTCTATGTCCTT	ATGCCAATCAGGTTCTGAGG	M1E23 M10M23	TaaCsp3DS004D04 TaaCsp3DS087O11	ctg1091 ctg801
DF159	56	226	GGAATGAGATGAAGCGAGACAT	TGCTGAGCTTGCTGTTGTA ACT	M5J6 M9G10	TaaCsp3DS041F04 TaaCsp3DS075D21	ctg94 ctg94
DF162	58	270	AATATTCACAACAACCTCAGCCTAC	CAGAAAAGCTACTTCCCTCCGT	M10P1	TaaCsp3DS091L11	ctg85
DF163	56	300	ACATGATGCACTGGTGGAC	ACATCGCATTTTCAGCTCTTCTT	M6F9 M7H5	TaaCsp3DS048J12 TaaCsp3DS056D13	ctg148 ctg148
DF173	60	180	TTCAGTAACCACGGAGCTTT	GAAAAAGGGAGGAGGTGTCC	M2M18 M7J1	TaaCsp3DS015G21 TaaCsp3DS055O10	ctg456 ctg456
DF174	56	250	ACAGTCATCGGCAAGATTCC	ACCCGGAATATCAATCACCA	M1J13 M3F3	TaaCsp3DS008G17 TaaCsp3DS023I21	ctg447 ctg447
DF178	60	200	GAGGTGCAGTTCCTCGTCTC	GGTGAAGTCGACCATGGAGT	M5C10 M9G11	TaaCsp3DS037C23 TaaCsp3DS072H10	ctg626 ctg626
DF223	60	480	GTCCAATCCGGTCACTCATT	CCTCAGTCATCTGTTTATGTCCA	M1D2 M1E23	TaaCsp3DS009G11 TaaCsp3DS004D04	ctg1091 ctg1091
DF224	57	300	TGACCCGAGGGCTCTACTAA	CAATGCCTTTAGTCCCTGA	M10M23	TaaCsp3DS087O11	ctg801
DF225	60	322	AAAAGCACAGGAGACGAAGC	CGCTCATCATCATCACTGCT	M10M23	TaaCsp3DS087O11	ctg801
barc132	TD 56-44	300	GCGGGGGAAAAACAAGTTGAGACTTT	GCGGTAGTTTGTGGTGAAAAAATG	M5P18 M6G5	TaCsp3DS042O15 TaCsp3DS044D14	ctg611 ctg611
barc321	52	250	TGC ACT TCC CAC AAC ACA TC	TTGCCACGTAGGTGATTTATGA	M3C18	TaCsp3DS022N02	ctg850
cdo407	60	288	CACGCTGCAGCTGTTTATCT	ACCAAATGCTGCCAAGTTTC	M1G22 M2A17	TaaCsp3DS006N08 TaaCsp3DS013I07	ctg1669 ctg1669

MARKER	Ta	[bp]	Primer F	Primer R	Adresa BACu	BAC klon	Kontig
cf2	60	288	GGTTGCAGTTTCCACCTTGT	CATCTATTGCCAAAATCGCA	M8D14 M9J17	TaaCsp3DS070A24 TaaCsp3DS079J22	ctg2725 ctg2725
cf35	60	191	GGGATGACACATAACGGACA	ATCAGCGGCGCTATAGTACG	M5E1 M8J13	TaaCsp3DS035C17 TaaCsp3DS067P03	ctg1397 ctg1397
cf55	60	263	CCAGTAGCCGGCCCTACTAT	GCACGAGATACGGACAATCA	M9I13	TaaCsp3DS072N17	ctg447
cf64	62	263	ACAGTGTTGTTGCCCTTTC	CCCATGTTACAGCTTTGGGT	M1O10 M2K16	TaaCsp3DS005M23 TaaCsp3DS015F07	ctg611 ctg611
cf70	60	172	GTCGGCATAGTCGCACATAC	ACTATGCCAAGGGGAGTGTG	M4B15 M9D6 M4O15 M8B17	TaaCsp3DS032H13 TaaCsp3DS081F09 TaaCsp3DS028D13 TaaCsp3DS068D17	ctg229 ctg229 ctg1893 ctg1893
cf79	60	172	TCTGGTCTTGGGAGGAAGA	CATCCAACAATTTGCCCAT	M2N12 M3L9	TaaCsp3DS018G19 TaaCsp3DS024D12	ctg330 ctg320
cdf141	60	155	CGTAAAGATCCGAGAGGGTG	TCCGAGGTGCTACCTACCAG	M5C10 M9G11	TaaCsp3DS037C23 TaaCsp3DS072H10	ctg626 ctg626
gdm136	56	100	CTCATCCGGTGAGTGCATC	CCCGCATGTCTACATGAGAA	M1G12	TaaCsp3DS005N23	ctg106
gpw322	60	170	GCCCCAAAGGACCATAAC	GATGTAAAATGCTAGGACCCG	M9J5	TaaCsp3DS077N01	ctg319
gpw333	60	300	GAAGCACATCCTATCCTGACG	GACTAACCTCCATATTCCTC	M2K20 M4N8	TaaCsp3DS015I13 TaaCsp3DS033M17	ctg1469 ctg1469
gpw1106	64	180	GCAAGAAGAGAAGCACCACC	ATCCACGTATCCTCCACTGC	M9A14 M9P13	TaaCsp3DS075J23 TaaCsp3DS079B23	ctg1491 ctg1348
gpw1168	60	200	TTCCACCCCTAAATCCTTCC	CACGCAACCACTCCTCTCTA	M9G9	TaaCsp3DS072C19	ctg165
gpw4074	60	233	CTCGCTGTTTTGTGAGTTGG	TGGATACATTTACTCTCGCA	M4L17 M9L17 M9J23 M9O22	TaaCsp3DS032L07 TaaCsp3DS079K11 TaaCsp3DS080L05 TaaCsp3DS076H24	ctg893 ctg893 ctg1866 ctg1866
gpw4163	58	450	TGGCAATGGAGGTAATGACA	TGGTGCCCTAAAATTGGTTT	M2K3	TaaCsp3DS011N24	ctg292

MARKER	Ta	[bp]	Primer F	Primer R	Adresa BACu	BAC klon	Kontig
gpw5104	60	173	ATCTGTCCGCCTACATCCAG	AACCATCCAACACACAAGCA	M4P2 M7K9	TaaCsp3DS033F05 TaaCsp3DS052B12	ctg197 ctg197
gpw5166	61	140	TTTCACTAGCAATGAGGGGG	TACACGTTGGAGTCTCGGTG	M10C9	TaaCsp3DS085B08	ctg345
gpw5177	300	377	CCGGTTTTCTTTGTTTGCAT	AGTGCTACAGATCCGCCG	M3C8 M6E20	TaaCsp3DS021O16 TaaCsp3DS047I14	ctg596 ctg596
gpw5213	60	278	TCCACCCAGGTATAAGACGG	CCCTCCGATTGCACGTAG	M10M6	TaaCsp3DS089F22	ctg153
gpw5216	62	392	CGGCCAAGTAGTAGCCCC	AGGGCGAAAGGACAAAGATT	M8G16	TaaCsp3DS065E13	ctg674
gpw5248	62	242	TAGGAGCCATAGCCAATTTCC	GAAGAACACTTTCGTCCTCACA	M2P4 M6M15	TaaCsp3DS017N21 TaaCsp3DS045F22	ctg68 ctg68
gpw5281	60	314	TTCGTTTCATATTGTCCCGGT	TAGTGCTACAGATCCGCCG	M6E20	TaaCsp3DS047I14	ctg596
gpw7080	60	200	ATGCCAACCAGACATCACAG	CAAAACCTACAGCTCCCTCG	M3A12 M9P12	TaCsp3DS022E17 TaCsp3DS082A11	ctg115 ctg115
gpw7321	60	200	TGAGACCATCTCTTGCTCCA	TCACAGTCGCTGCATAAAGG	M7I5 M9L8	TaCsp3DS051M01 TaCsp3DS081J24	ctg381 ctg381
gpw7553	60	165	CAGGTTGTTTCATCATCGCC	AGCCACCCGTCCTCCTAC	M1L20 M9N5	TaaCsp3DS011E06 TaaCsp3DS077O08	ctg2403 ctg2403
gwm71	60	100	GGCAGAGCAGCGAGACTC	CAAGTGGAGCATTAGGTACACG	M8A9 M9A10	TaaCsp3DS060M05 TaaCsp3DS075C23	ctg381 ctg381
gwm161			GATCGAGTGATGGCAGATGG	TGTGAATTACTTGGACGTGG	M1D2 M1E23	TaaCsp3DS009G11 TaaCsp3DS004D04	ctg1091 ctg1091
gwm191	60	150	AGACTGTTGTTTGCGGGC	TAGCACGACAGTTGTATGCATG	M8N17 M10L10	TaaCsp3DS068E13 TaaCsp3DS095J13	ctg411 ctg411
gwm341	60	160	TTCAGTGGTAGCGGTTCGAG	CCGACATCTCATGGATCCAC	M2F2 M7P24	TaaCsp3DS017J24 TaaCsp3DS059N09	ctg604 ctg604
wmc43	63	321	TAGTCAACCACCACCCTACTG	ACTTCAACATCCAAACTGACCG	M4F7 M9J5	TaaCsp3DS031J04 TaaCsp3DS077N01	ctg319 ctg319
wmc155	59	200	TAGTCTTTCCTCATTCTCCCCC	CGCGGAAGAAGAAGCACTTACA	M6C3	TaaCsp3DS043P05	ctg388

MARKER	Ta	[bp]	Primer F	Primer R	Adresa BACu	BAC klon	Kontig
wmc375	61	200	CGCCGACCAAAAACATCATAA	GATTGACATGAAACTATGGACCC	M3B12 M5B1	TaCsp3DS025P05 TaCsp3DS038H03	ctg2362 ctg2362
wmc435	55	146	GCACTATACTTATTGGATTGTCA	CATGGTATCCCTAGTAAGTTTTT	M6G22 M7K24	TaaCsp3DS047L16 TaaCsp3DS055K05	ctg2223 ctg2223
wmc505	62	125	AGGGGAGGAAAACCTTGTAATC	ACGACCTACGTGGTAGTTCTTG	M5P7 M10M6	TaaCsp3DS039D08 TaaCsp3DS089F22	ctg153 ctg153
wmc529	56	180	ATTGCATGCAAATTAGTAGTAG	GTGTTGACAAATTTGAGTTAG	M1D12	TaaCsp3DS010G24	ctg427
wmc533	64	147	AATTGGATCGGCAGTTGGAG	AGCAAGCAGAGCATTGCGTT	M10D13	TaaCsp3DS093B03	ctg1137
wmc549	64	185	TTGTCACACACGCACTCCC	GTCCTTCCCTCGTTCATCCT	M1E3 M10L9	TaaCsp3DS001E17 TaaCsp3DS092I03	ctg708 ctg708
wmc741	61	290	CAACAACGCTAGAGGCCAAC	GGGCTCCATGCTCTTCC	M5I9 M10K23	TaCsp3DS035N05 TaCsp3DS087N04	ctg2730 ctg2730

