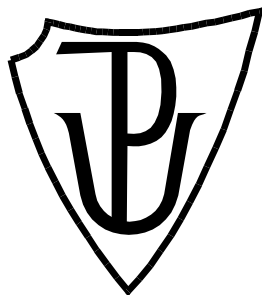


**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Olomouc 2016**

**Karolína Wojewodová**



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Genetické mapování a jeho využití pro poziční  
klonování genu rezistence ke mšici zhoubné u  
pšenice**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Karolína Wojewodová</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Zuzana Tulpová
Termín odevzdání práce:	2016

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

*/vlastnoruční podpis/*

## **Poděkování**

Na úvod bych chtěla poděkovat především vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Zuzaně Tulpové za odborné vedení, poskytnutí dostupné literatury, cenné rady, trpělivost a ochotu ke konzultacím. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Heleně Staňkové, Ph.D. a Mgr. Miře Mazáčové za poskytnutá data.

## Souhrn

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) patří mezi nejvýznamnější zemědělské plodiny na světě a pro více než 30% světové populace představuje základní zdroj potravy. Se zvětšujícím se počtem lidí zároveň stoupají i nároky na kvalitu a vlastnosti této plodiny, nicméně, studium pšenice je znesnadněno velikostí jejího genomu a přítomností tří homeologních subgenomů (A, B, D). K významným ztrátám při pěstování pšenice dochází působením mšice zhoubné. Jelikož je mšice zhoubná odolná vůči působení pesticidů je vhodnou alternativou pěstování rezistentních odrůd vůči tomuto škůdci.

Předkládaná práce je zaměřena na genetické mapování v oblasti genu *Dn2401*, podmiňujícího rezistenci ke mšici zhoubné (*Diuraphis noxia*, Kurdjumov), který se nachází na krátkém rameni chromozómu 7D pšenice. Konstrukce vysoko-hustotní genetické mapy je důležitým krokem procesu pozičního klonování, jehož cílem je izolace studovaného genu.

V rámci experimentální části předkládané bakalářské práce byl zamapován nový marker *Xowm714* v rámci mapovací populace CI2401/Glupro-F2, s cílem zmenšit interval mezi hraničními markery *Xowm711* a *Xowm713* (Mazáčová, 2016). Zároveň byl v oblasti mezi markery *Xowm713* a *Xowm714* nalezen nový rekombinant CI2401/Glupro-F2-1-38.

## Summary

Bread wheat (*Triticum aestivum*) is one of the most agriculturally important crops species in the world and it is also a staple food for more than 30 % of world human population. At the same time with the growing population, demands on the wheat quality and characteristics increase. However, studying of wheat genome is hampered by its huge genome size and presence of three homoeologous subgenomes (A, B and D). Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*, Kurdjumov) causes huge loss in wheat cultivation. Russian wheat aphid is resistant against pesticides, so the right alternative is breeding resistant variety.

Presented thesis is focused on genetic mapping of Dn2401 gene underlying a resistance to the Russian wheat aphid, which is located on the short arm of chromosome 7D. Construction of high-density genetic map represents important step in the process of positional cloning which leads to the isolation of the gene of interest.

Within the aims of this thesis, a new marker Xowm714 has been mapped in population CI2401/Glupro-F2, to shorten the distance between flanking markers Xowm711 and Xowm713 (Mazáčová, 2016). Between markers Xowm713 and Xowm714 has been found a new recombinant CI2401/Glupro-F2-1-38.

## Obsah

Úvod.....	9
1 Cíle práce .....	10
2 Současný stav řešené problematiky.....	11
2.1 Pšenice setá .....	11
2.1.1 Charakteristika pšenice seté .....	11
2.1.2 Krátké rameno chromozómu 7D pšenice .....	14
2.2 Mšice zhoubná .....	15
2.2.1 Charakteristika mšice zhoubné.....	15
2.2.2 Rezistence k mšici zhoubné u pšenice seté .....	17
2.3 Poziční klonování.....	19
2.3.1 Princip pozičního klonování.....	19
2.4 Genetické mapování .....	22
2.4.1 Mapovací populace .....	22
2.4.2 Markery pro genetické mapování.....	24
3 Materiál a metodika.....	26
3.1 Materiál .....	26
3.1.1 Biologický materiál.....	26
3.1.2 Přístrojové vybavení.....	26
3.1.3 Chemikálie .....	27
3.1.4 Pufry a roztoky .....	27
3.1.5 Komerční kity.....	28
3.2 Metodika .....	28
3.2.1 Izolace rostlinné DNA.....	28
3.2.2 Genetické mapování markeru <i>Xowm714</i> .....	28
3.2.3 Optimalizace PCR podmínek .....	29
3.2.4 Analýza genotypu populace CI2401/Glupro-F2 .....	31
3.2.5 Sekvenování .....	32
4 Výsledky .....	34

4.1	Genetické mapování markeru <i>Xowm714</i> .....	34
4.1.1	Charakterizace markeru <i>Xowm714</i> .....	34
4.1.2	Genotypování populace CI2401/Glupro-F2 a konstrukce fyzické mapy .....	35
5	Diskuze.....	37
5.1	Charakterizace markeru <i>Xowm714</i> .....	37
5.2	Genetické mapování markeru <i>Xowm714</i> .....	37
6	Závěr .....	39
7	Seznam použité literatury.....	40
8	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	47
9	Seznam příloh .....	48



## Úvod

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.,  $2n = 6x = 42$ , AABBDD) patří mezi nejvýznamnější zemědělské plodiny na světě, jelikož představuje zdroj potravy pro 30% lidské populace. Se vzrůstajícím počtem obyvatel je nutné vylepšit vlastnosti této plodiny, jako lepší odolnost vůči biotickému a abiotickému stresu nebo její výnos. Výnos může být snižován působením klimatických podmínek a škůdců.

Mezi nejvýznamnější škůdce pšenice patří mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*, Kurdjumov), která způsobuje nemalé ekonomické ztráty ve většině významných oblastí kde je pšenice pěstována. Jedním z projevů napadení rostliny mšicí zhoubnou je svinování listů, které tak poskytují škůdcům ochranu před insekticidy. Jelikož jsou chemické i biologické přístupy hubení mšic neúčinné jeví se jako nejvhodnější alternativa pěstování odrůd rezistentních vůči tomuto škůdci. Tyto odrůdy je možné získat buď šlechtěním odrůd nesoucích geny pro rezistenci, nebo vkládáním těchto genů do rostlin metodami genového inženýrství.

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na genetické mapování jednoho z nově odvozených markerů v oblasti genu *Dn2401* podmiňujícího rezistenci ke mšici zhoubné. Zahuštění genetické je nedílnou součástí procesu pozičního klonování, který by měl v budoucnu vézt k izolaci studovaného genu.

## 1 Cíle práce

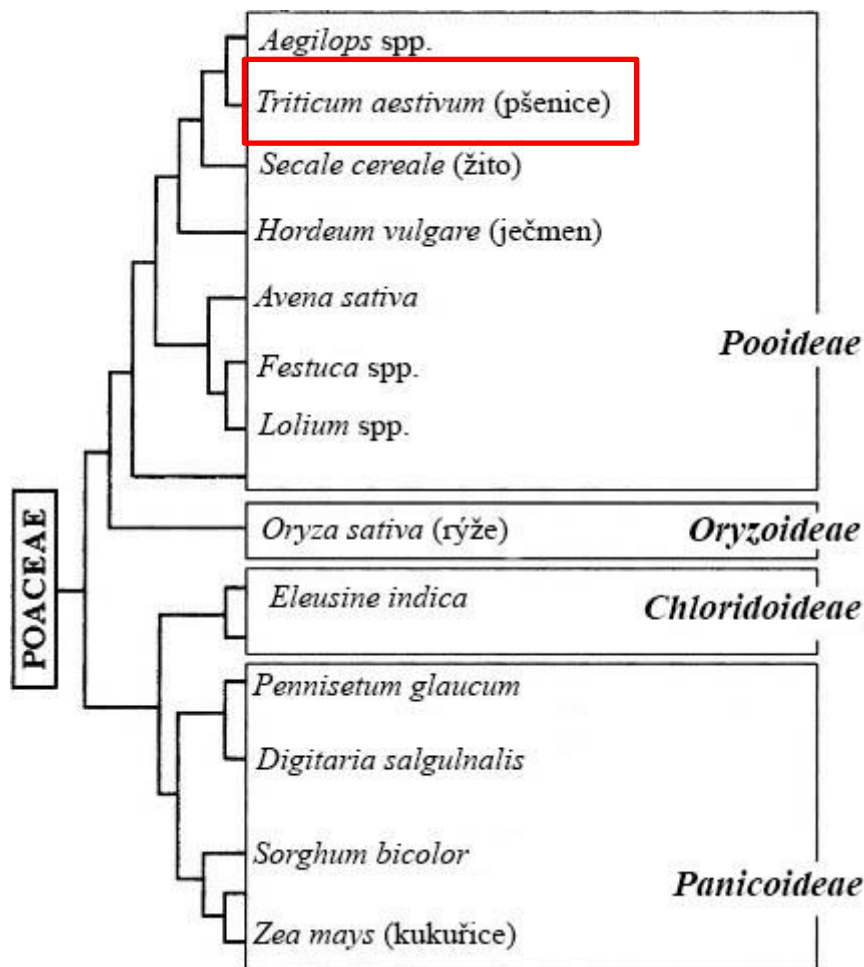
- Vypracovat literární rešerši na téma genetické mapování a jeho využití pro poziční klonování
- Osvojení si základních metod používaných v molekulární biologii se zaměřením na genetické mapování (izolace rostlinné DNA, PCR, elektroforetická separace na polyakrylamidovém gelu)
- Saturace genetické mapy v okolí genu *Dn2401* pro rezistenci ke mšici zhoubné

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Pšenice setá

#### 2.1.1 Charakteristika pšenice seté

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednoděložná, krytosemenná rostlina. Náleží do čeledi *Poaceae* (lipnicovitě), podčeledi *Pooideae* a tribu *Triticeae*. Čeď *Poaceae* (Obr. 1) je jednou z nejpočetnějších čeledí krytosemenných rostlin, kromě pšenice seté sem náleží také například ječmen (*Hordeum*), kukuřice (*Zea*), oves (*Avena*) a žito (*Secale*).



Obr. 1: Taxonomie čeledi *Poaceae* (červeně je vyznačena Pšenice setá-*Triticum aestivum*) (upraveno dle: [http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2012/schuh\\_anth/classification.htm](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2012/schuh_anth/classification.htm), online: 19.7. 2016)

Pšenice setá (Obr. 2) je jednou z nejstarších zemědělských plodin a její pěstování je neoddělitelně spjato s rozvojem moderní civilizace. Klíčovým faktorem úspěšnosti v pěstování pšenice je její vysoká adaptabilita na široký rozsah klimatických podmínek.

V současnosti je zhruba 65% vypěstované pšenice využito v potravinářském průmyslu, 17% procent slouží jako krmivo pro zvířata a 12% je průmyslově zpracováno například jako biopalivo (<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>). Pšenice je základním zdrojem potravy, jelikož je bohatým zdrojem proteinů, karbohydrátů a minerálů (Mayer, 2014). Proto je vzhledem k růstu světové populace nutné zvyšovat její produkci, což nebude možné bez šlechtění odrůd s vyššími výnosy.



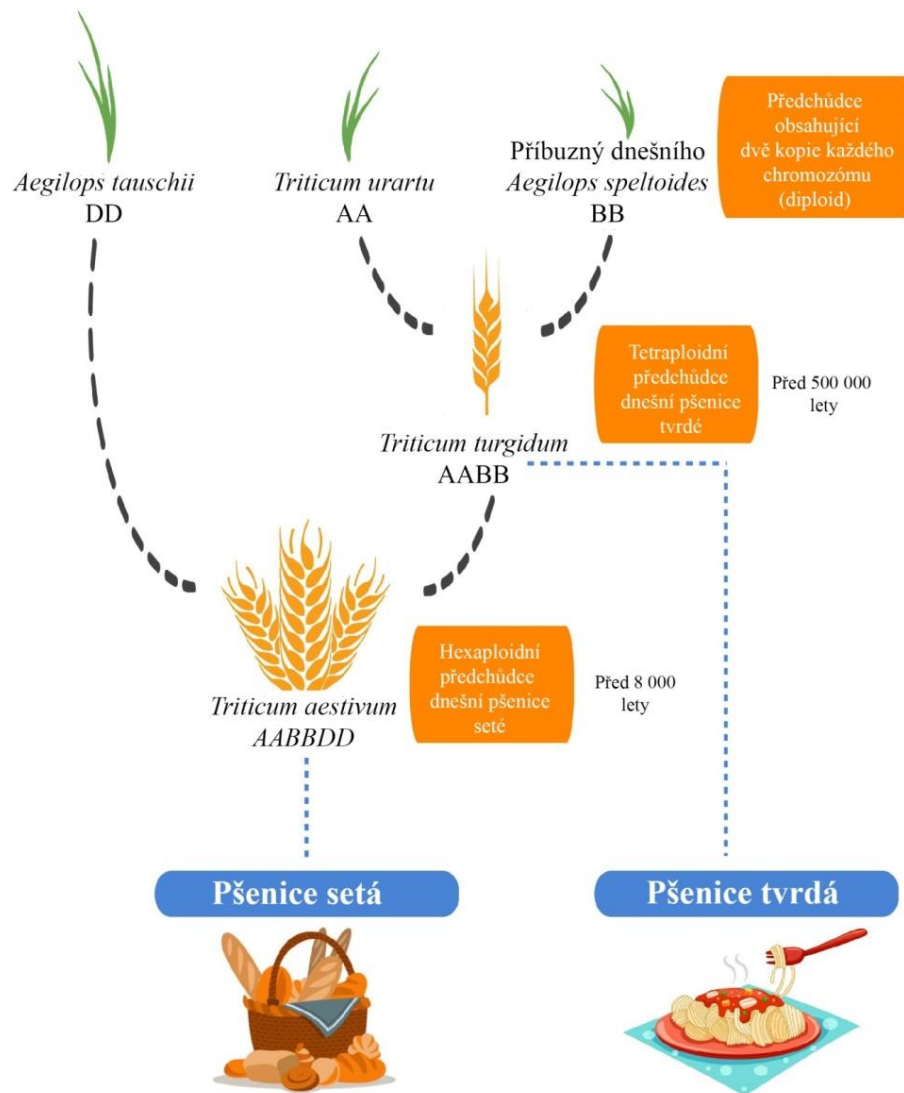
Obr. 2: Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

([http://www.phytoimages.siu.edu/imgs/paraman1/r/Poaceae\\_Triticum\\_aestivum\\_48681](http://www.phytoimages.siu.edu/imgs/paraman1/r/Poaceae_Triticum_aestivum_48681),  
online:19.7. 2016)

Studium a šlechtění pšenice je znesnadněno samotným charakterem jejího genomu. Pšenice setá ( $2n = 6x = 42$ , AABBDD) je allopolyploidní rostlina, jejíž jaderný genom je složen ze tří homeologních subgenomů A, B a D a vyniká svou velikostí (17 Gb) (Bennett *et* Smith., 1991). Přítomnost tří subgenomů je výsledkem dvou na sobě nezávislých hybridizačních procesů mezi třemi diploidními druhy *Triticum urartu*, blízké příbuzným druhem dnešnímu *Aegilops speltoides* a *Aegilops tauschii* (Obr. 3). K první hybridizaci došlo před 0,5 až 3 miliony let mezi druhem *T. urartu* ( $2n = 2x = 14$ , AA) a druhem ze sekce *Sitopsis* blízké příbuzným dnešnímu *Ae. speltoides*, který byl donorem subgenomu B. Výsledkem této hybridizace byl tetraploidní druh pšenice *Triticum turgidum* ( $2n = 4x = AABB$ ) (Petersen *et al.*, 2006; Feuillet *et al.*, 2008) jehož poddruh *Triticum turgidum ssp. durum* (pšenice tvrdá) je v současnosti využíván pro výrobu těstovin. K druhé hybridizaci došlo před 8 000 lety a to mezi druhy *T. turgidum* a *Ae. tauschii* ( $2n = 2x = 14$ ), který se tak stal donorem subgenomu D. Výsledkem tohoto křížení

je hexaploidní pšenice *T. aestivum* ( $2n = 6x = 42$ , AABBDD) (Feldman *et al.*, 2005; Salamini *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2005).

Každý ze tří homeologních subgenomů (A, B a D) je tvořen z více než 80% repetitivními sekvencemi DNA (Paux *et al.*, 2008). Přítomnost obrovského počtu navzájem si podobných sekvencí DNA ztěžuje čtení genomu pšenice, vývoj DNA markerů pro použití ve šlechtění a klonování důležitých genů.



Obr. 3: Schéma původu hexaploidní pšenice *Triticum aestivum* (upraveno dle <http://www.wheatgenome.org/News/Media-resources/Fact-Sheets-Infographics/Origin-of-Wheat>, online:19.7. 2016)

Jak je uvedeno výše, studium pšenice znesnadňuje složitost jejího genomu, proto bylo důležité ho nějakým způsobem zjednodušit. V této oblasti má obrovský význam průtoková cytometrie, jelikož umožňuje třídění chromozómů a tím snižuje komplexitu hexaploidního genomu (Doležel *et al.*, 2007; Doležel *et al.*, 2012). Pomocí této metody, je možno třídit až 1000 neporušených, mitotických, rostlinných chromozómů za sekundu (Šafář *et al.*, 2010). Chromozómy jsou izolovány z kořenových špiček, které jsou bohaté na mitoticky dělicí se buňky zastavené v metafázi (Doležel *et al.*, 1992). Výsledkem analýzy v průtokovém cytometru je histogram, kde je v ideálním případě každý chromozóm představován jedním píkem (Šafář *et al.*, 2010). Třídění chromozómů, nebo jejich ramen, tvorba knihoven dlouhých insertů specifických pro jednotlivá ramena (<http://olomouc.ueb.cas.cz/dna-libraries/cereals>) a z nich vzniknuvší fyzické mapy byly Světovým konsorciem pro studium genomu pšenice (International Wheat Genome Sequencing Consortium = IWGSC <http://www.wheatgenome.org>) po dlouhou dobu považovány za nezbytné kroky pro získání kompletní referenční sekvence genomu pšenice, nicméně do současné doby byly vytvořeny a publikovány fyzické mapy pouze pro některá chromozómová ramena nebo chromozómy (Akpınar *et al.*, 2015; Breen *et al.*, 2013; Kobayashi *et al.*, 2015; Lucas *et al.*, 2013; Paux *et al.*, 2008; Philippe *et al.*, 2013; Poursarebani *et al.*, 2014; Raats *et al.*, 2013).

### **2.1.2 Krátké rameno chromozómu 7D pšenice**

Na krátkém rameni chromozómu 7D (7DS) o délce 381Mb (Šafář *et al.*, 2010) se nachází celá řada genů, mimo jiné i geny podmiňující rezistenci k mšici zhoubné. Konkrétně osm, z dosud známých čtrnácti genů rezistence ke mšici, bylo zamapováno do oblasti tohoto ramene (Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2001). Na rameni 7DS jsou lokalizovány i další geny rezistence, např. v lokusu Lr34 se nacházejí geny podmiňující rezistenci k rzím a padlí (Krattinger *et al.*, 2009b). Dále byly na tomto rameni charakterizovány geny kódující významné znaky související s výnosem, podmiňující např. počet zrn na klas, hmotnost zrn v klasu nebo velikost rostliny. (Huang *et al.*, 2004; Röder *et al.*, 2008).

## 2.2 Mšice zhoubná

### 2.2.1 Charakteristika mšice zhoubné

Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*, Kurdjumov) (Obr. 4) je řazena do řádu stejnokřídlí (*Homoptera*) a čeledi mšicovitě (*Aphididae*). Objevena byla teprve v roce 1986 ve Spojených státech amerických (Webster *et al.*, 1987). Jedinci mají světle zelené zbarvení a dosahují velikosti až 2,3 mm (Fryč *et* Rychlý, 2014). Vyskytují se v mnoha charakteristických formách, které závisejí na období jejich životního cyklu (Edwards *et* Heath, 1964). Populace se skládají z okřídlených a bezkřídlých živorodých samic (Honěk *et al.*, 2002).

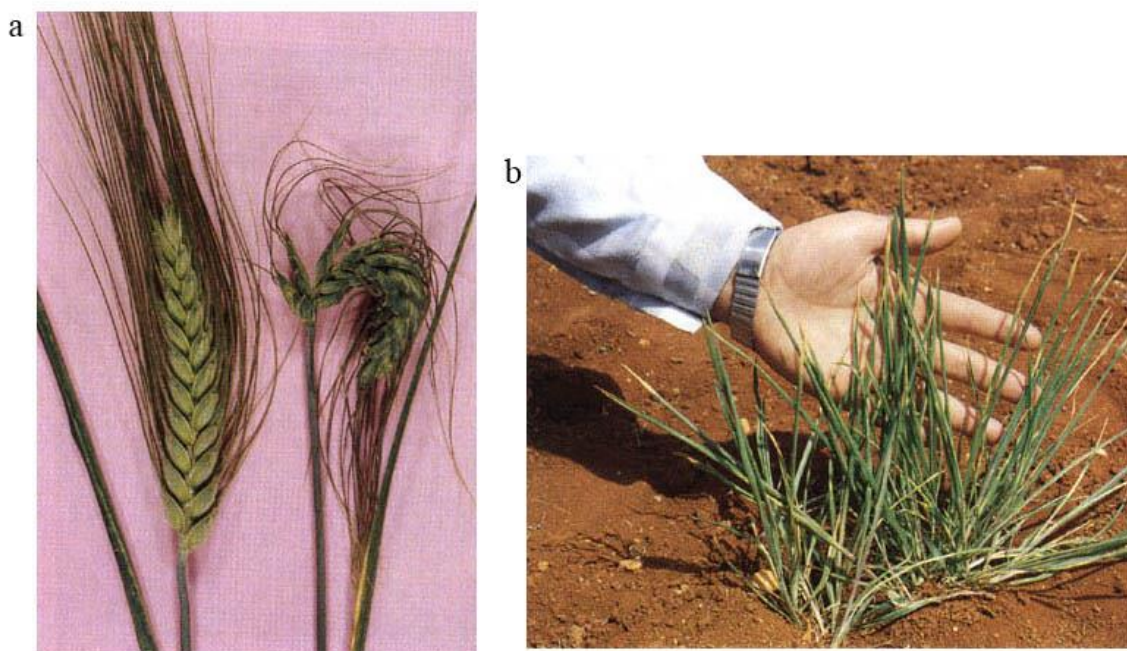


Obr. 4: Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*) (Převzato z: <http://cg-base.org/>, online: 19.7. 2016)

Mšice patří mezi významné škůdce obilnin, nejvíce pak napadají pšenici (*Triticum aestivum* L.) a ječmen (*Hordeum vulgare* L.) (Fazel-Najafabadi *et al.*, 2014). Rostliny jsou mšicemi poškozovány jak přímo tak nepřímo. Přímé škody vznikají sáním, kdy mšice rostlinám odčerpávají velký díl asimilátů transportovaných do sinků z blízkých zdrojových orgánů. Z rostlinné šťávy odebírají především volné aminokyseliny, zatímco cukerné složky, které jsou v potravě v nadbytku, vylučují jako nažloutlou lepkavou tekutinu, která na listech zanechává skvrny. Tyto skvrny mohou následně porůstat mycelia černí, čímž dochází ke ztrátě asimilační plochy (Honěk *et al.*, 2002).



Napadení mšicí zhoubnou (Obr. 5) se na rostlině projevuje bílými, žlutými či fialovými podélnými pruhy na listech, za současného podélného svinování listů. Listy svinuté do ruliček poskytují mšicím nejenom úkryt a ochranu před insekticidy a přirozenými nepřáteli, ale je to také vhodné místo k rozmnožování (Fryč *et* Rychlý, 2014). Mezi přirozené nepřátele mšic se řadí různé druhy hmyzu, jako jsou zejména slunéčkovití (*Coccinellidae*), larvy much pestřenek (*Syrphidae*) nebo brouci z čeledi zlatoočkovití (*Chrysopidae*) (Honěk *et al.*, 2002).



Obr. 5: Znaky napadení pšenice mšicí zhoubnou. (a) Deformace klasu ve srovnání se zdravým klasem. (b) Podélně svinuté listy se žlutým pruhováním. (Převzato z: <http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e0x.htm>, online: 19.7. 2016)

Běžně používanou ochranou rostlin před mšicemi jsou insekticidy. Významný nástup chemické ochrany proti mšicím nastal v padesátých letech, ovšem zavedení syntetických přípravků vedlo k rychlému vývoji rezistence mšic proti těmto přípravkům (Honěk *et al.*, 2002). Nejvhodnějším přístupem je pěstování odrůd rezistentních vůči mšici zhoubné, jelikož je to ekonomicky výhodné a nedochází k zatěžování životního prostředí insekticidy (Liu *et al.*, 2005).



## 2.2.2 Rezistence k mšici zhoubné u pšenice seté

### 2.2.2.1 Typy rezistence

Každý rostlinný druh je denně ohrožován stovkou různých druhů patogenů a škůdců. Náchylné rostliny jim mohou za vhodných teplotních a vlhkostních podmínek podlehnout, zatímco rezistentní rostliny přežívají (Kúdela *et al.*, 1989). Rezistence je tedy schopnost hostitelského organismu odolávat útokům patogenů nebo škůdců. Rezistenci ke škůdcům, tedy i k mšicím, dělíme do tří kategorií-antibióza, antixenóza a tolerance (Smith, 2005).

Jako antibiόza je označována reakce hostitelského organismu, která ovlivňuje životaschopnost škůdce. Obranné mechanismy rostliny mohou být jak chemické tak morfologické. Takto zasažení škůdci se vyznačují menší velikostí, ztrátou váhy a nižší plodivostí. Antibiotické účinky rezistentní rostliny jsou buď akutní, nebo chronické. V obou případech je toto působení pro škůdce letální, ale u chronického poškození dochází k úmrtí ve vyšších stádiích vývoje (Smith, 2005).

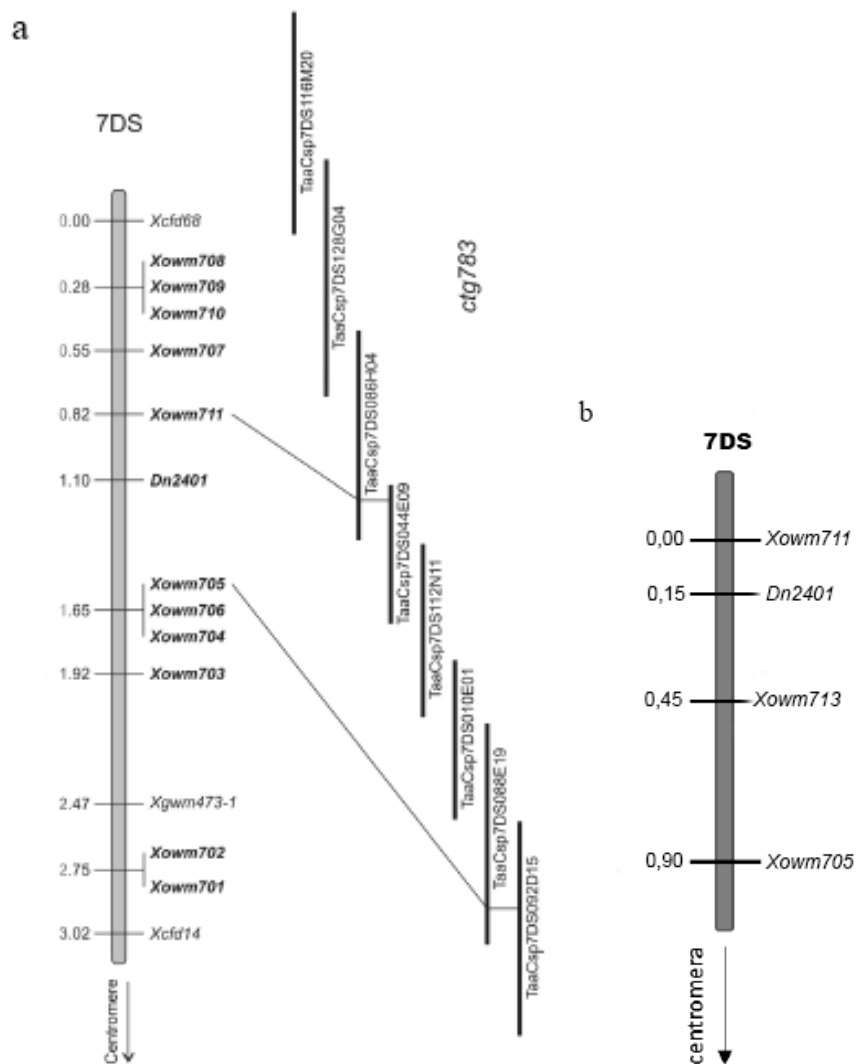
Antixenóza je schopnost rostliny působit na škůdce jako nevhodný hostitel. Potenciální škůdce si poté vybírá alternativní rostlinu. Rostlina se může bránit pomocí fyzických bariér, jako jsou ztlustělá epidermis, zvýšení počtu trichomů, voskovité listy, stonky nebo plody. V jiném případě rostliny produkují specifické látky, které škůdce odrazují od konzumace či kladení vajíček (Smith, 2005).

Posledním typem rezistence je tolerance, schopnost rostliny poskytovat patogenu živné prostředí, aniž by se jeho přítomnost projevila silnými příznaky (Kúdela *et al.*, 1989). Tolerantní rostliny tedy mají schopnost útok škůdce ustát a následně se z něj zotavit. Rostliny jsou schopny opravovat poškozená pletiva díky zvýšené fotosyntéze, rychlejšímu růstu a lepšímu větvení (Smith, 2005). Tento typ rezistence jako jediný není pro škůdce letální.

### 2.2.2.2 Geny podmiňující rezistenci k mšici zhoubné

Geny rezistence k mšici zhoubné byly identifikovány v různých kultivarech a liniích pšenice, rýže a *Aegilops tauschii* (Nkongolo *et al.*, 1991; Marais *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001, 2002; Peng *et al.*, 2009). V současné době je na chromozómech 7D a 1D blíže charakterizováno 14 genů podmiňujících tuto rezistenci, ale pouze některé z nich udělují rezistenci k vysoce virulentní mšici zhoubné (US RWA biotype 2). Jedním z těchto genů je *Dn2401* (Obr. 6), který se nachází

v centrální oblasti krátkého ramene chromozómu 7D ( 7DS) (Staňková *et al.*, 2015). I přes tyto znalosti se zatím žádný nepodařilo izolovat (Botha *et al.*, 2014).



Obr. 6: Lokalizace oblasti genu *Dn2401*. (a) Na genetické a fyzické mapě ramene 7DS (převzato z: Staňková *et al.*, 2015). (b) Genetická mapa oblasti genu *Dn2401* s novým hraničním markerem *Xowm705* *Xowm713* (převzato z Mazáčová, 2016)

## 2.3 Poziční klonování

Poziční klonování je metoda používaná pro izolaci genu, jehož sekvence není předem známá, a to na základě znalosti jeho pozice na genetické a fyzické mapě. V ideálním případě je výstupem celého procesu pozičního klonování izolovaný gen, který je díky klasickému šlechtění nebo díky metodám genového inženýrství možné vnést do jiného jedince a tím i znak izolovaným genem podmíněný. Lze tak vytvořit například jedince odolnější vůči patogenům, či jedince s lepší schopností přizpůsobit se okolním podmínkám.

### 2.3.1 Princip pozičního klonování

Pomocí pozičního klonování je možné izolovat geny velkého účinku (majorgeny) i geny podmiňující kvantitativní znaky (tzv. QTL = quantitative trait loci) (Salvi *et Tuberosa*, 2005). Nicméně klonování QTL je výrazně složitější. Pro zjednodušení bude tedy základní princip pozičního klonování popsán na příkladu izolace genu velkého účinku (Obr. 7).

Jak již bylo zmíněno výše pro izolaci genu, je nezbytná znalost jeho pozice na genetické mapě. Proces určování pozice genu/markeru na genetické mapě je označován jako genetické mapování a jeho hlavním nástrojem jsou mapovací populace. Prvním krokem pro odvození mapovací populace je nalezení jedinců stejného druhu s kontrastním fenotypem v daném znaku, kteří jsou v daném znaku homozygotní. V počáteční fázi pozičního klonování se provádí tzv. hrubé mapování, pro nějž je dostačující F<sub>2</sub> mapovací populace čítající 100 – 200 jedinců (Krattinger *et al.* 2009). Nezbytnou podmínkou je znalost fenotypového projevu sledovaného znaku u všech jedinců dané mapovací populace. Dalším krokem je genotypizace populace pomocí širokého spektra již zamapovaných genetických markerů, které by měly rovnoměrně pokrývat všechny chromozomy v genomu. Dříve se genotypování populace provádělo pomocí PCR, tento přístup je však časově náročný a proto se v dnešní době více využívá genotypovacích platforem na bázi čipů (microarray) čítající stovky až tisíce markerů (např. DArT, SNP, ISBP) (Gupta *et al.*, 2008).

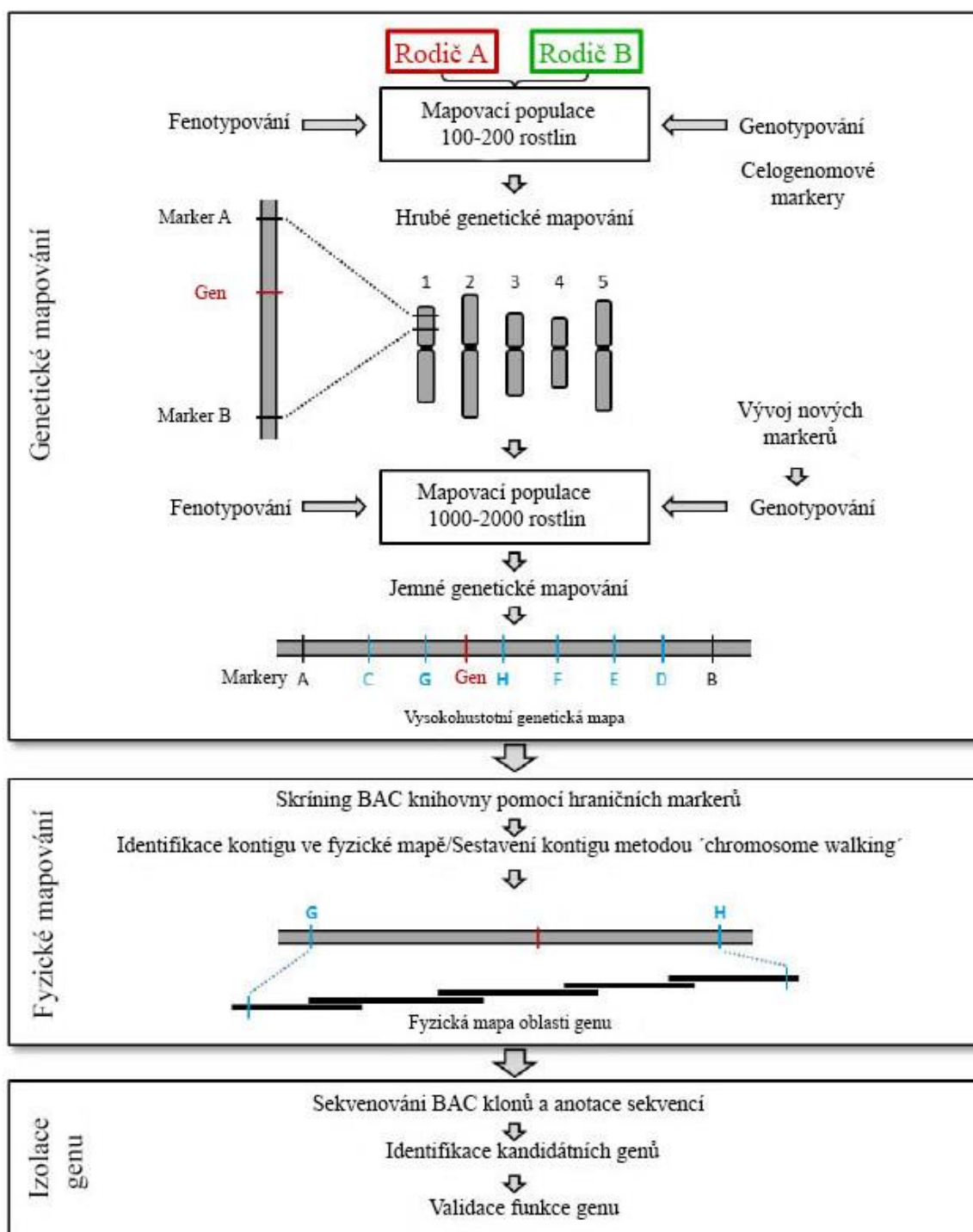
Dalším krokem je tzv. jemné genetické mapování, které více upřesní pozici studovaného genu nav rámci konkrétního chromozómu/chromozómového ramene. Součástí je tedy konstrukce vysoko-hustotní genetické mapy, k čemuž je nezbytné, nejenom odvození dostatečného množství nových genetických markerů, které jsou v těsné vazbě se studovaným genem, ale i mapovací populace čítající tisíce jedinců (Krattinger

*et al.*, 2009). Tímto postupem lze určit co nejpřesnější pozici studovaného genu na chromozomu, která je vymezena dvěma hraničními markery s co nejtěsnější vazbou k danému genu. Nyní už jsou pro další genetické mapování a fenotypování vybíráni jedinci z populace, u kterých došlo k rekombinaci mezi hraničními markery (Krattinger *et al.*, 2009).

Následujícím krokem pozičního klonování je tvorba fyzické mapy pokrývající oblast vymezenou hraničními markery. Fyzická mapa je tvořena překrývajícími se klony z DNA knihoven dlouhých insertů, které jsou uspořádány do kontigů. Pokud fyzická mapa pro danou oblast není dostupná, je možné ji nově vytvořit a danou oblast tak překlenout pomocí metody označované jako chromosome walking. Nicméně v případě genu, který je předmětem této bakalářské práce, nebylo nutné chromosome walking provádět. Důvodem je dostupnost fyzické mapy ramene 7DS pšenice, která byla vytvořena z BAC knihovny specifické pro 7DS (Šimková *et al.*, 2010) v rámci projektu podporovaného světovým konsorciem IWGSC. Dostupnost fyzické mapy tak výrazně urychlila celý proces pozičního klonování daného genu. V tomto případě byl proveden skrínig BAC knihovny pro 7DS hraničními markery pomocí PCR, čímž byly identifikovány klony z jednoho kontigu fyzické mapy a tím byla zároveň kontinuálně překlenuta oblast studovaného genu. Pokud by byly klony nalezeny v různých kontigích, bylo by nutné z konců daných kontigů odvodit nové, jednolokusové markery, s jejichž pomocí by byla opět skrínována knihovna za účelem nalezení dalších kontigů v pořadí.

Posledním krokem pozičního klonování je izolace a ověření funkce studovaného genu. Tato fáze zahrnuje sekvenování oblasti (klonů/kontigů fyzické mapy) vymezené hraničními markery a jejich následnou anotaci, což je porovnávání sekvencí klonů s již dříve charakterizovanými sekvencemi z různých databází. Finálním krokem je pak ověření funkce izolovaného genu, kdy jsou využívány např. metody genového inženýrství pro vnesení genu do genomu jedince, u kterého nedochází k projevu studovaného znaku. V opačném případě je pak možné u jedinců, u kterých k projevu studovaného znaku dochází, gen vypnout.

Jednou z nejvýznamnějších částí pozičního klonování je genetické mapování, které je také hlavním tématem této bakalářské práce. Proto jsou následující kapitoly zaměřeny právě na genetické mapování, jeho princip, mapovací populace a markery, které jsou pro tento proces vhodné.



Obr. 7: Schéma postupu pozičního klonování (upraveno dle Staňková, 2015)

## 2.4 Genetické mapování

Genetické mapování je základním přístupem ke studiu genomu, umožňující mapování genů detekovatelných pouze jako fenotypové znaky, jehož výstupem jsou genetické mapy zobrazující vzájemnou vzdálenost různých genetických komponent (markery, geny) v genomu. Vzdálenost markerů na genetických mapách je vyjadřována v centimorganech (cM) a odráží frekvenci rekombinace mezi těmito markery. Pravděpodobnost 1% výskytu rekombinací mezi dvěma znaky (markery) v potomstvu odpovídá 1 cM. Genetická mapa udává pouze relativní vzdálenost a pořadí genů na chromozómu. Jejich vzdálenosti tak neodpovídají reálným vzdálenostem vyjádřených v párech bazí, které udávají mapy fyzické.

Základem genetického mapování je rekombinace mezi polymorfními úseky DNA. Pravděpodobnost, že dojde k rekombinaci na dvou úsecích chromozómu, obecně závisí na jejich fyzické vzdálenosti. Čím je jejich fyzická vzdálenost menší, tím větší je pravděpodobnost, že po průchodu meiotickým dělením zůstanou markery při sobě, nedojde k rekombinaci a jejich oddělení. Se zvětšující se vzdáleností mezi těmito úseky se zároveň snižuje genetická vazba a tím se naopak pravděpodobnost rekombinace zvyšuje. Proto je síla genetické vazby měřítkem fyzické vzdálenosti. Nicméně frekvence rekombinací je ovlivněna strukturou chromozómu, což má za následek, že není v celém genomu konstantní. Příkladem je potlačení rekombinace v okolí heterochromatinu (např. centromerická oblast).

Analýza genetické vazby je založená na frekvenci rekombinací a pořadí vazebných úseků. Vyhodnocení se provádí statisticky za použití pravděpodobnostních rovnic (Haldane *et* Smith 1947) Velké objemy dat jsou poté zpracovávány počítačovými programy, které na jejich základě sestaví genetickou mapu. Mezi nejznámější patří JoinMap (Stam 1993) a MAPMAKER (Lander *et al.* 1987).

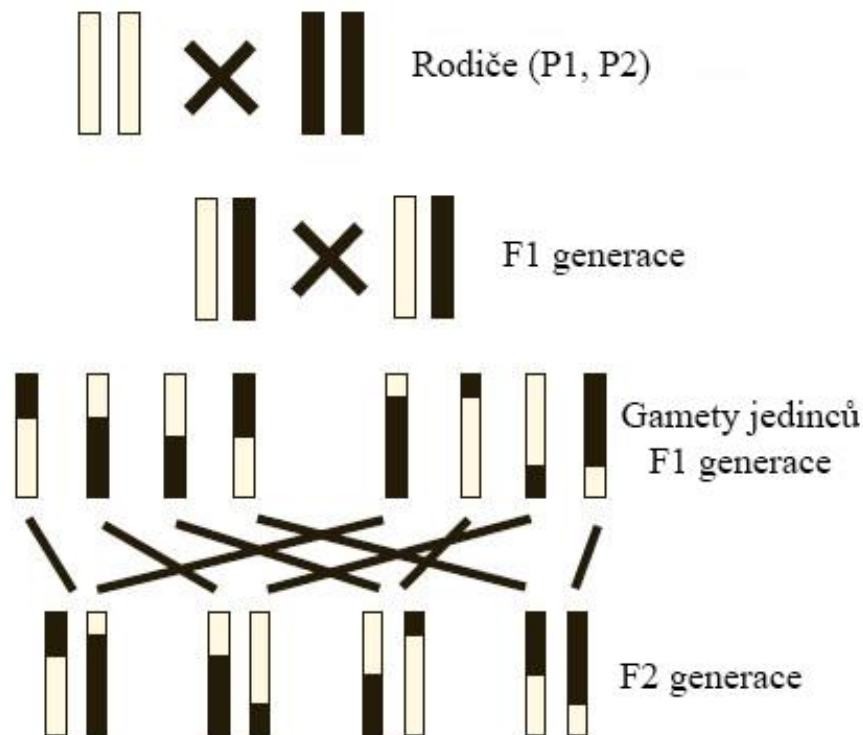
### 2.4.1 Mapovací populace

Nezbytným nástrojem pro genetické mapování jsou mapovací populace. Základem pro vytvoření mapovací populace je výběr rodičů polymorfních (kontrastních) v určitém znaku, v ideálním případě v homozygotním stavu. Čím více se budou daní rodiče lišit, tím bude popsáno více genetických faktorů. Dalším důležitým bodem, který je při vytváření mapovací populace nutno zvážit je způsob reprodukce dané rostliny. Rozlišujeme dva typy, rostliny cizosprašné jako např. kukuřice a cukrová řepa, které k opylení potřebují pyl

jiné rostliny a rostliny samosprašné u kterých dochází k opylení vlastním pylem, jako např. rajče, sója nebo pšenice (Meksem *et* Kahl, 2006).

#### 2.4.1.1 F2 mapovací populace

Populace jedinců F2 generace (Obr. 8) je nejjednodušší formou mapovací populace. Vznik této populace je popsán Mendelovými zákony. Nejdříve dochází ke zkřížení homozygotních rodičů (P1 a P2), všichni výslední potomci (F1 generace) jsou heterozygotní. Následně u potomků dochází k samosprašení a vzniká populace F2 v poměru 1:2:1 (homozygoti jako P1:heterozygoti:homozygoti jako P2). Jedinci F2 populace jsou tedy výsledkem meiózy, během které dochází k rekombinaci genetického materiálu. Nevýhodou F2 mapovacích populací je fakt, že není možné tyto populace přemnožovat (Schneider, 2005).



Obr. 8: Schéma vzniku F2 generace. Jako P1 je označen homozygot recesivní, jako P2 potom homozygot dominantní. Označení F1 je pro potomky heterozygotních jedinců. F2 je označení pro potomky vzniklé samosprašením (Upraveno dle: Schneider, 2005).

#### 2.4.1.2 Rekombinantní inbrední linie (RIL)

Rekombinantní inbrední linie jsou homozygotními potomky vzniklými několikanásobným samosprašením jedinců z F2 generace (minimálně 6 generací). Tyto

linie jsou také často nazývány jako single-seed descent lines což znamená, že jedno semeno každé linie je základem další generace. Výhodou RIL je, že genom projde mnoha meiózami, než vznikne homozygotní jedinec, proto je vyšší i počet rekombinací ve srovnání s F2 populací (Meksem *et* Kahl, 2006). Výhodou tohoto typu populací je, že opakovaným samosprášením po několik generací je dosaženo téměř homozygotního potomstva, tedy i k fixaci studovaných znaků. V dalších generacích lze tak linie libovolně přemnožovat, protože je již natolik potlačena segregace znaků, že k ní prakticky nedochází.

#### 2.4.1.3 Populace zpětných kříženců (backcross populations) a téměř izogenní linie (NILs)

Využívají se pro analýzu specifického DNA fragmentu nacházejícího se u jednoho z rodičů (donor) na pozadí genotypu druhého rodiče (recipient). Tento postup se označuje jako zpětné křížení, jelikož heterozygotní jedinec F1 generace je zpětně zkřížen s recipientním rodičem. Díky tomu jsou úseky donorového rodiče, které nejsou ve vazbě odděleny segregací. Zároveň je díky rekombinaci s recipientním rodičem minimalizována délka fragmentů DNA, které ve vazbě jsou. Zpětné křížení se mnohokrát opakuje, aby došlo k ještě větší redukci fragmentů donorového rodiče. Každé opakování tak sníží velikost úseku o 50% (Schneider, 2005).

Opakovaným zpětným křížením vznikají tzv. téměř izogenní linie linie (= *Near Isogenic Lines*, NILs). Tyto rostliny obsahují již jen velmi malý úsek DNA donora, který zahrnuje jeden nebo málo donorových lokusů a aby došlo k zafixování genomu donora, je nutné provést dvě kola samosprášení. (Schneider, 2005).

Zpětné křížení je vhodným přístupem, pro přenesení sledovaného znaku do kultivaru, který již nese jiné požadované vlastnosti. Jedinou podmínkou je, aby se tyto dvě linie daly křížit a zároveň měli fertlní potomky (Meksem *et* Kahl, 2006).

#### 2.4.2 Markery pro genetické mapování

Jako genetické markery označujeme určité dědičné znaky, které umožňují detekovat rozdíl v sekvenci DNA mezi dvěma jedinci. Ideální markery jsou takové, které lze velmi jednoduše použít a reprodukovat, zároveň jsou finančně nenáročné a vykazují vysoký stupeň polymorfismu. V současné době je pak také kladen důraz na možnost automatizace a navyšování kapacity analýzy (*high-throughput analysis*), během které jsou markery používány.



Markery dělíme do tří základních skupin podle toho, na jaké úrovni je detekován rozdíl mezi jedinci. Pokud je rozdíl na úrovni fenotypové hovoříme o markerech morfologických, pokud na úrovni proteinů jedná se o markery biochemické a jako DNA markery označujeme takové, které zahrnují variace na úrovni DNA. Pro bližší vysvětlení byly vybrány typy markerů, které jsou v současné době aktuální právě z hlediska automatizace a vysoké kapacity jejich analýzy.

#### 2.4.2.1 SNP markery

Jako jednonukleotidové polymorfismy (*Single Nucleotide Polymorphism*) označujeme kodominantní markery, které mají polymorfismus na sekvenční úrovni. K hledání jednonukleotidových polymorfismů se využívá sekvenování daného lokusu a následné porovnání sekvencí zkoumaných jedinců. Tento přístup však není vhodný pro komplexní genom hexaploidní pšenice, jelikož primery současně amplifikují lokusy ze tří subgenomů, což znesnadňuje sekvenční analýzu (Ganal *et Röder*, 2007). Jedním z řešení jak tuto překážku překonat je využití bioinformatiky a databází ESTů (*Expressed Sequence Tags* = koncové sekvence z cDNA), ve kterých je přibližně 500 000 těchto sekvencí odvozených z genomu pšenice (Lazo *et al.*, 2004). Další možností jak zredukovat komplexitu hexaploidního genomu pšenice je identifikace SNP pomocí specifických primerů pro jednotlivé subgenomy.

#### 2.4.2.2 ISBP markery

ISBP (*Insertion Site Based Polymorphism*) jsou markery odvozené z repetitivních sekvencí DNA (Paux *et al.*, 2006). Do těchto sekvencí jsou inzercí vloženy transponované elementy. V místech inzerce vznikají spoje, které je následně možné nalézt pomocí specifických primerů. Pro odvození primerů je možné využít počítačový program *IsbpFinder*, který detekuje spoje mezi transponovanými elementy a automaticky na ně navrhne primery (Paux *et al.*, 2010). ISBP markery mají využití v evolučních studiích, genetickém i fyzickém mapování včetně mapování pomocí radiačních hybridů (Paux *et al.*, 2010).

#### 2.4.2.3 DArT (Diversity Array Technology) markery

DArT je vysokokapacitní technologie založená na hybridizaci, které byla vyvinuta jako alternativa pro markery založené na PCR (Jaccoud *et al.*, 2001). Jejich výhodou je, že umožňují analýzu několik stovek tisíců lokusů bez předchozí znalosti sekvence. DArTy vytvářejí celo-genomové fingerprinty tím, že vyhodnocují přítomnost nebo

nepřítomnost DNA fragmentů ve vzorcích genomické DNA (Peleg *et al.*, 2008). V současné době dochází k prudkému vývoji sekvenačních technologií nové generace (NGS), což má v případě analýzy genotypu za následek stále častější využití varianty DArT markerů, markerů s označením DArTseq.

### **3 Materiál a metodika**

#### **3.1 Materiál**

##### **3.1.1 Biologický materiál**

Pro účely předkládané bakalářské práce byla použita mapovací populace F2 pšenice seté (*Triticum aestivum*), pocházející z křížení kontrastních rodičů pro rezistenci ke mšici zhoubné, odrůd pšenice CI2401 (rezistentní) a Glupro (citlivá). Výsledná mapovací populace s označením CI2401/Glupro-F2 a čítající 333 jedinců pak vznikla spojením dvou mapovacích populací, kdy první z nich (184 jedinců, CI2401/Glupro-F2-1) byla poskytnuta prof. Norou Lapitan (Colorado State University, Colorado USA). Pro druhou mapovací populaci (149 jedinců, CI2401/Glupro-F2-2), pak byla prof. Lapitan dána k dispozici semen a mapovací populace byla dopěstována na Ústavu Experimentální Botaniky AV ČR, v.v.i. Olomouc a rostliny byly poskytnuty pro účely bakalářské práce.

V rámci analýzy genotypu jedinců mapovací populace byla pro optimalizaci podmínek PCR testovaného markeru použita DNA tříděných chromozómových ramen pšenice seté 7AS, 7BS a 7DS, DNA rodičů mapovací populace (CI2401, Glupro) a zároveň celogenomová DNA izolovaná z rostlin pšenice kultivaru Chinese Spring.

##### **3.1.2 Přístrojové vybavení**

- Elektroforetický zdroj EV232 (Consort, Belgie)
- Elektroforetická aparatura C-DASG-400-500: Dual Adjustable Mega-Gel Kit (C.B.S. Scientific, USA)
- Dokumentační systém pro analýzu elektroforetického gelu ChemiGenius Bioimaging System (Syngene, GB) s transluminátorem model GVM20 (Syngene, GB)
- Termocykler C1000 Thermal Cyclor (Bio-Rad, USA)
- Vodní lázeň GRANT SUB6 (Grant Instruments, GB)
- 96-kapilárový sekvenátor 3730xl DNA analyzer, (Applied Biosystems, USA)

- Homogenizační oscilační mlýn MM301 (Retsch, Německo)
- Stolní centrifuga IEC Micromax RF (Thermo Scientific, USA)
- NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)

### 3.1.3 Chemikálie

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

### 3.1.4 Pufry a roztoky

#### 10xPCR pufr

100 mM Tris-HCl pH 8,8

15 mM MgCl<sub>2</sub>

500 mM KCl

1% Triton X-100

#### Cresol Red

7,5 g sacharóza

50 mg Cresol Red

Doplňit do 100 ml H<sub>2</sub>O

### Nedenaturující 3,5 % polyakrylamidový gel

3,5 % akrylamid:bisakrylamid

0,073 % (v/v) TEMED

0,066 % (w/v) APS

0,5× pufr TBE

#### TBE pufr

5x

0,5x

445 mM Tris báze

45 mM Tris báze

445 mM Kyselina boritá

45 mM Kyselina boritá

10 mM EDTA

1 mM EDTA

pH 8

pH 8

#### 3.1.5 Komerční kity

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

### **3.2 Metodika**

#### 3.2.1 Izolace rostlinné DNA

Pro izolaci bylo použito přibližně 100 mg čerstvých listů, které byly odebrány ze tři týdnů starých rostlin, mapovací populace CI2401/Glupro-F2. Následně byly listy sušeny po dobu přibližně 48 hodin při teplotě 37 °C. Vysušené listy byly homogenizovány pomocí skleněných kuliček o průměru 0,5 cm v homogenizačním oscilačním mlýnu. Poté byla rostlinná DNA mapovací populace izolována pomocí komerčního kitu NucleoSpin<sup>®</sup> Plant II. Výsledná koncentrace izolované DNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

#### 3.2.2 Genetické mapování markeru *Xowm714*

V práci Staňkové *et al.* (2015) byly v blízkosti genu *Dn2401* lokalizovány markery *Xowm705* a *Xowm711* a označeny jako hraniční markery tohoto regionu. V rámci diplomové práce Mgr. Miry Mazáčové (Mazáčová, 2016) byla upřesněna vzdálenost mezi těmito markery a genem *Dn2401* a zároveň byl odvozen a zamapován nový marker *Xowm713*. Na tyto dvě studie (Mazáčová, 2016; Staňková *et al.*, 2015) pak navázalo

odvození nového markeru *Xowm714* dle metodiky Staňková *et al.*(2015) (odvození není předmětem předkládané bakalářské práce) a jeho zamapování do genetické mapy. Byla provedena genotypizace 149 jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2 a získaná data pak byla sloučena s informacemi o genotypu 184 jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2-1 a fenotypovými daty všech 333 jedinců z obou populací. Kompletní data pak byla použita pro aktualizaci genetické mapy oblasti genu *Dn2401*.

V rámci práce byl použit nově odvozený marker *Xowm714*. Vzhledem k tomu bylo nejprve nutné určit jeho charakteristiku, tedy stanovit optimální podmínky pro PCR, délku PCR produktu nebo identifikovat polymorfismus markeru mezi rodiči mapovací populace CI2401/Glupro-F2. Genotypová analýza byla tedy v první fázi provedená pouze na DNA rodičů mapovací populace CI2401/Glupro-F2, kdy byly provedeny všechny níže uvedené kroky. Ve druhé fázi pak byla genotypizace provedena na DNA jedinců populace CI2401/Glupro-F2-2, kdy již nebylo nutné provádět krok optimalizace PCR podmínek.

### 3.2.3 Optimalizace PCR podmínek

#### 3.2.3.1 Gradientová PCR

Optimalizace PCR podmínek markeru *Xowm714* (tabulka č. 1) a zároveň ověření specificity primerů pro rameno 7DS byla provedena pomocí gradientové PCR v celkovém objemu reakce 10  $\mu$ l. Jako templátová DNA byla použita DNA rodičů (CI2401, Glupro) o koncentraci 20 ng/ $\mu$ l a jako kontrola pro určení specificity markeru byla použita DNA tříděných chromozómových ramen 7AS, 7BS a 7DS o koncentraci 10 ng/ $\mu$ l. Jako pozitivní kontrola sloužila celogenomová DNA z rostlin kultivaru Chinese Spring o koncentraci 20 ng/ $\mu$ l a jako negativní kontrola byla použita voda. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 2.. PCR byla prováděna v termocykleru C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Reakční podmínky jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 1: Sekvence primerů pro marker *Xowm714*

Marker	Sekvence primerů
<i>Xowm714</i>	R: GGCT-GAAACAAAGAATCCATC
	F: TCTGTAATGTGGAATGTTGTCTTAGT

Tabulka č. 2: Složení reakční směsi pro PCR

Reagencie	Objem	Koncentrace v reakční směsi
Deionizovaná voda	3,6 $\mu$ l	-
10 $\times$ PCR pufr	1,0 $\mu$ l	1 $\times$
5 $\times$ Cresol red	2,0 $\mu$ l	1 $\times$
10 mM dNTPs	0,2 $\mu$ l	200 $\mu$ M
10 $\mu$ M primer R	1,0 $\mu$ l	1 $\mu$ M
10 $\mu$ M primer F	1,0 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Taq polymeráza (4U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l	4U/100 $\mu$ l
DNA 10-20 ng/ $\mu$ l	2,0 $\mu$ l	-
<b>Celkový objem</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>	

Tabulka č. 3: Reakční podmínky pro gradientovou PCR

Proces	Počet opakování	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	-	94 °C	5 min
Denaturace	-	94 °C	30 s
Nasedání primeru-Gradient	35 $\times$	58-68 °C	30 s
Elongace	-	72 °C	30 s
Závěrečná elongace	-	72 °C	10 min

#### Elektroforetická separace produktů PCR

Pro provedení PCR byly amplifikované produkty separovány v 3,5 % nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu za použití elektroforetické aparatury C-DASG-400-500: Dual Adjustable Mega-Gel Kit (C.B.S. Scientific, USA). Tloušťka gelu byla vymezena mezerníky na 1 mm. Separace probíhala v prostředí pufru 0,5 x TBE.

Smícháním jednotlivých složek (podkapitola 4.1.4 Pufry a roztoky) byl připraven 3,5 % nedenaturující polyakrylamidový gel, který byl nalit mezi skla aparatury. Pro vytvoření jamek v gelu byl mezi skla vložen hřebínek. Následně probíhala

polymerizace přibližně 45 minut, po jejímž skončení byl gel vložen do aparatury. V katodovém a anodovém prostoru aparatury byl nalit 0,5x koncentrovaný pufr TBE. Do pufru v anodovém prostoru bylo přidáno 10 µl roztoku ethidium bromidu. Následně byl spuštěn prerun. Samotná separace probíhala při napětí 350 V přibližně 30 minut. Výsledné produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru a dokumentačního zařízení SynGene.

### 3.2.4 Analýza genotypu populace CI2401/Glupro-F2

#### 3.2.4.1 Amplifikace lokusu *owm 714*

Přestože byla provedena optimalizace podmínek PCR pro marker *Xowm714*, v rámci analýzy genotypu mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2 byla pro větší výtěžnost a čistotu PCR produktů použita *touch-down* PCR. Reakce probíhala v celkovém objemu 10 µl a složení reakční směsi se shodovalo s reakční směsí pro gradientovou PCR (tabulka 2). Reakční podmínky, při kterých reakce probíhala, jsou uvedeny výše v tabulce číslo 4.

Tabulka č. 4: Reakční podmínky pro *Touch-down* PCR

Proces	Počet opakování	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	-	94 °C	5 min
Denaturace	-	94 °C	30 s
Nasedání primeru-Increment (-0,5 °C)	17×	68-60 °C	30 s
Elongace	-	72 °C	30 s
Denaturace	-	94 °C	30 s
Nasedání primeru	18×	60 °C	30 s
Elongace	-	72 °C	30 s
Závěrečná elongace	-	72 °C	10 min

### 3.2.4.2 Elektroforetická separace produktů PCR

Viz kapitola optimalizace PCR podmínek (4.2.3)

### 3.2.5 Sekvenování

Pro určení genotypu pro marker *owm 714* u rodičů i jedinců použité mapovací populace bylo provedeno sekvenování PCR produktů vzniklých amplifikací DNA pomocí primerů specifických pro daný marker.

Před samotnou sekvenační reakcí byly PCR produkty enzymaticky přečištěny pomocí exonukleázy a termosenzitivní alkalické fosfatázy. Reakce probíhala v celkovém objemu 7  $\mu$ l. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 5. Reakce probíhala v termocykleru C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Reakční podmínky jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Sekvenační reakce byla provedena pomocí sekvenačního kitu BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Celkový objem reakce byl 10  $\mu$ l. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 7. Reakce probíhala v termocykleru C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) za reakčních podmínek, které jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Po proběhnutí sekvenační reakce byly její produkty přečištěny pomocí magnetických kuliček Agencourt<sup>®</sup> CleanSeq<sup>®</sup> (Beckman Coulter, USA) na robotické stanici Biomek<sup>®</sup> NXP (Beckman Coulter). Samotná sekvenační analýza pak byla provedena pomocí kapilární elektroforézy na 96-kapilárovém sekvenátoru 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, USA).

Tabulka č. 5: Složení reakční směsi pro enzymatické přečištění

Reagencie	Objem pro jeden vzorek
Exonukleáza I	0,05 $\mu$ l
Alkalická fosfatáza	0,5 $\mu$ l
PCR produkt	3 $\mu$ l
1 $\times$ PCR pufr	3,45 $\mu$ l
Celkový objem	7 $\mu$ l



Tabulka č. 6: Reakční podmínky pro enzymatické přečištění

Proces	Teplota	Čas
Inkubace vzorků	37 °C	30 min
Deaktivace enzymů	95 °C	5 min
	4 °C	∞

Tabulka č. 7: Složení reakční směsi sekvenační reakce

Reagencie	Objem pro jeden vzorek
5×sekvenační pufr	1,5 µl
Pufr BDX64	0,875 µl
BIG DYE	0,125 µl
Primer (10 µM)	1 µl
Přečištěný PCR produkt	3 µl
Deionizovaná H <sub>2</sub> O	3,5 µl
Celkový objem	10 µl

Tabulka 8: Reakční podmínky pro sekvenační reakci

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

### 5.2.5 Stanovení genotypu a konstrukce genetické mapy

Sekvence PCR produktů byly porovnány pomocí programu Geneious Pro v 9.1.5 (Drummond *et al.*, 2010) a na základě varianty polymorfismu příslušící jednomu nebo druhému rodiči byl stanoven genotyp populace. Získaná genotypová data pak byla sloučena s předem stanovenými fenotypovými daty (stanovení fenotypu není předmětem bakalářské práce) a použita ke konstrukci genetické mapy pomocí programu JoinMap 4.0 (Van Ooijen *et Voorrips*, 2001) za použití funkce Kosambi (Kosambi, 1943).

## 4 Výsledky

### 4.1 Genetické mapování markeru *Xowm714*

Populace CI2401/Glupro-F2-1 použitá v dřívější studii (Staňková *et al.*, 2015), byla rozšířena o dalších 149 jedinců, celkem tedy bylo analyzováno 333 jedinců mapovací populace souhrnně označované jako CI2401/Glupro-F2. V práci Staňkové *et al.* (2015) byly v těsné blízkosti genu *Dn2401* zamapovány markery *Xowm705* a *Xowm711*, a v diplomové práci Mgr. Míry Mazáčové (Mazáčová, 2016) pak byl nově odvozen zamapován další marker *Xowm713*. V návaznosti na obě studie byl pak navržen marker *Xowm714* (není předmětem bakalářské práce) a v rámci předkládané práce byl tento marker zamapován za účelem zpřesnění pozice genu *Dn2401*.

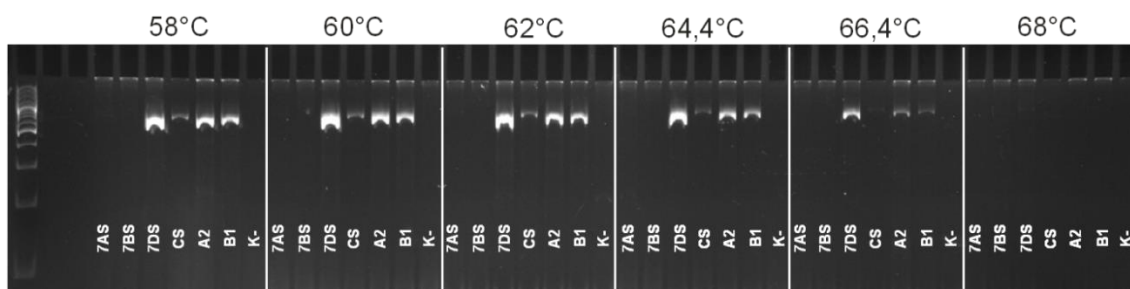
#### 4.1.1 Charakterizace markeru *Xowm714*

Součástí charakterizace markeru *Xowm714* bylo ověření specifity markeru pro rameno 7DS a zároveň stanovení optimálních podmínek pro PCR. V rámci optimalizace PCR podmínek markeru *Xowm714* (Tabulka č. 9) byla provedena gradientová PCR, na jejímž základě zjištěno, že primery pro marker *Xowm714* jsou vysoce specifické pro rameno 7DS a optimální teplota jejich nasedání se tak pohybuje mezi 58 – 66,4°C (Obr. 9). Jako kontrola pro určení specifity markeru byla použita DNA tříděných chromozómových ramen 7AS, 7BS a 7DS. Jako pozitivní kontrola sloužila celogenomová DNA z rostlin kultivaru Chinese Spring a jako negativní kontrola byla použita deionizovaná voda.

Tabulka č. 9: Charakteristika markeru *Xowm714*

Marker	Sekvence primerů	Polymorfismus	Délka PCR produktu (bp)	T <sub>a</sub> * °C
<i>Xowm714</i>	R: GGCT-GAAACAAAGAATCCATC	SNP (A/G)	574	66
	F: TCTGTAATGTGGAATGTTGTCTTAGT			

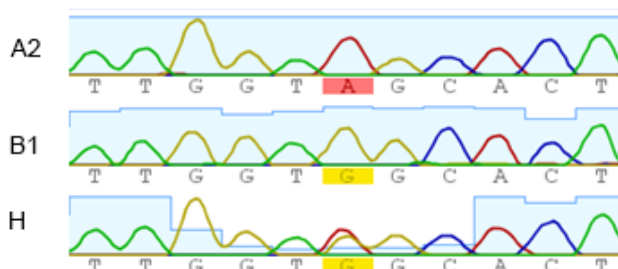
\*T<sub>a</sub>=teplota nasedání primeru



Obr. 9: Elektroforetogram z optimalizace PCR podmínek markeru *Xowm714*. Produkty PCR byly separovány v 3,5% polyakrylamidovém gelu. Jako A2 a B1 jsou označeni rodiče mapovací populace (A2- CI2401, B1- Glupro), označení CS je pro DNA kultivaru Chinese Spring. K- je negativní kontrola (deionizovaná H<sub>2</sub>O).

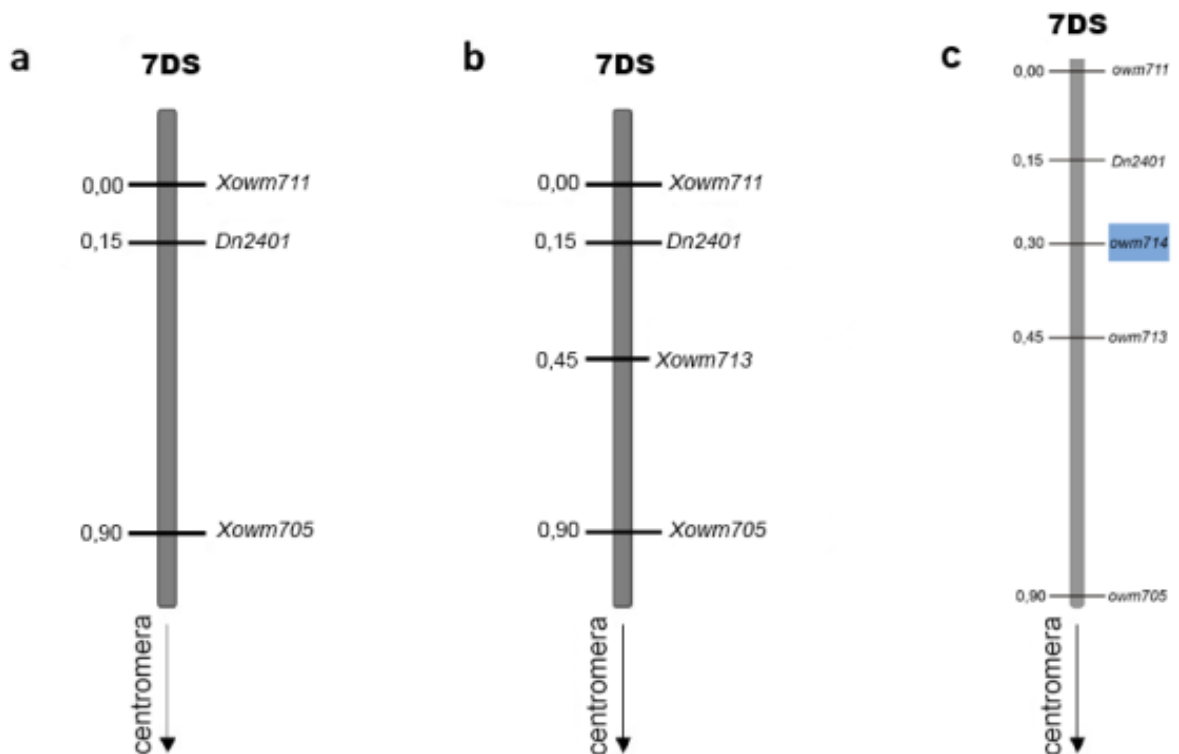
#### 4.1.2 Genotypování populace CI2401/Glupro-F2 a konstrukce fyzické mapy

V rámci genotypování populace CI2401/Glupro-F2 byla provedena PCR s primery specifickými pro marker *Xowm714*. Tento marker je charakterizován jednonukleotidovým polymorfismem A/G (Obr. 10). Tento polymorfismus není možné charakterizovat na základě nenedenaturující polyakrylamidové elektroforézy, tudíž bylo nutné vzniklé produkty PCR následně sekvenovat s použitím specifických primerů pro marker *Xowm714*. Na základě sekvenace byla identifikována varianta SNP pro jednotlivé jedince mapovací populace (tabulka č. 10). Genotyp byl určen u všech 149 jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2. Kompletní přehled genotypů i pro markery *Xowm705*, *Xowm711* (Staňková *et al.*, 2015), *Xowm713* (Mazáčová, 2016) a *Xowm714*, včetně fenotypových dat, je uveden v kapitole 10 (Seznam příloh). V rámci tohoto souboru jedinců byl identifikován pouze jeden jedinec CI2401/Glupro-F2-1-38 nesoucí rekombinaci mezi markery *Xowm713* a *Xowm714* (Příloha 1).



Obr. 10: Chromatogram markeru *Xowm714* zobrazující jednonukleotidový polymorfismus na úrovni A/G charakteristický pro rodiče mapovací populace označených jako A2 a B1 (A2- CI2401, B1- Glupro) jako H je označen heterozygotní jedinec.

Data získaná genotypováním mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2 byla, spolu s daty získanými genotypováním 184 jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2-1 v rámci práce (Staňková *et al.*, 2015), využita pro konstrukci genetické mapy (Obr. 11). Marker Xowm714 se tedy podařilo úspěšně zamapovat a došlo ke zmenšení intervalu mezi hraničními markery a genem *Dn2401* z 0,45 cM (Mazáčová, 2016) na 0,30 cM.



Obr. 11: Lokalizace genu *Dn2401* na genetické mapě. (a) Mapa vytvořená v rámci práce Staňkové *et al.* (2015). (b) Mapa vytvořená ve studii Mazáčová (2016) na základě mapování markerů v populaci s vyšším rozlišením. (c) Genetická mapa oblasti genu *Dn2401* vytvořená na základě mapování hraničního markeru *Xowm714*. Vzdálenosti na mapách jsou v centimorganech (cM).

## 5 Diskuze

### 5.1 Charakterizace markeru *Xowm714*

V rámci charakterizace markeru *Xowm714* byla před samotnou identifikací polymorfismu (sekvenací rodičovské DNA) provedena gradientová PCR za účelem optimalizace PCR podmínek pro primery daného markeru a vzhledem k přítomnosti tří homoelogních subgenomů A, B a D v genomu pšenice i ověření jeho specificity pro rameno 7DS. Primery pro marker *Xowm714* byly navrhovány dle metodiky popsané v práci Staňková et al. (2015), ve které je přítomnost homoelogních subgenomů zohledněna a primery jsou navrhovány v místech, kde se sekvence ramen homoelogních chromozómů liší alespoň v jednom nukleotidu. Zároveň jsou to právě oblasti mezi geny (popř. introny), které ve srovnání s exony vykazují vysoký stupeň polymorfismu (Quraishi *et al.* 2009). Vzhledem k vysokému obsahu repetitivních sekvencí v genomu pšenice lze však i tak předpokládat, že se při méně přísných podmínkách PCR budou amplifikovat produkty ze všech tří subgenomů. Primery markeru *Xowm714* byly navrhovány na mezigenovou oblast v rámci BAC klonu TaaCSp7DS044H09 (Tulpová, ústní sdělení), nicméně ani při ne příliš přísných podmínkách PCR ( $T_a = 58^\circ\text{C}$ ) nedošlo k amplifikaci žádného lokusu z ramen 7AS a 7BS. Získané výsledky tak poukazují na vysokou specificitu markeru *Xowm714*, což potvrzují i sekvence primerů, kdy se v místě primeru F liší sekvence ramen 7AS, 7BS a 7DS v 6 různých nukleotidech a v místě primeru R se sekvence liší v 5 různých nukleotidech.

### 5.2 Genetické mapování markeru *Xowm714*

Původní mapovací populace CI2401/Glupro-F2-1 použitá ve studii Staňkové *et al.* (2015) čítala 184 jedinců. Tato mapovací populace byla v rámci diplomové práce (Mazáčová, 2016) rozšířena o dalších 149 jedinců s označením CI2401/Glupro-F2-2. Tento soubor celkem 333 jedinců byl souhrnně označen jako mapovací populace CI2401/Glupro-F2. Rozšíření mapovací populace se ukázalo jako krok důležitý ke zpřesnění genetického mapování markerů v oblasti genu *Dn2401*, díky čemuž byli identifikováni tři noví jedinci nesoucí rekombinaci mezi markery *Xowm705* a *Xowm711* a upřesněna vzdálenost mezi hraničními markery z 0,83 cM na 0,90 cM (Mazáčová, 2016; Staňková *et al.*, 2015). Zároveň byl pak v diplomové práci Mazáčová (2016) nově zamapován marker *Xowm713*, čímž byl interval mezi hraničními markery oblasti genu *Dn2401* zmenšen na 0,45 cM.

Základním principem genetického mapování je frekvence rekombinace mezi studovanými znaky. Čím menší je vzdálenost mezi markery, tím je výrazně snížena pravděpodobnost rekombinace, tedy i pravděpodobnost, že bude v rámci mapovací populace identifikován další jedinec, který rekombinaci mezi marker nese. Interval o velikosti 0,45 cM, který byl stanovený v diplomové práci, na níž navazuje předkládaná bakalářská práce, je už natolik malý, že se vůbec nepředpokládalo, že by bylo možné zamapováním nového markeru *Xowm714* interval ještě zúžit. V práci Komatsuda *et al.* (2007) se podařilo zamapovat gen podmiňující šestiřadost u klasů ječmene v intervalu 0,07 cM, nicméně podstatným rozdílem byla velikost používané mapovací populace, která v případě Komatsuda *et al.* (2007) čítala 4 900 jedinců, zatímco populace CI2401/Glupro-F2 použitá v této práci má pouze 333 jedinců. Stejně tak Krattinger *et al.* (2009) doporučuje pro jemné mapování, v rámci procesu pozičního klonování, populace čítající tisíce jedinců. Jak se ale ukázalo již v případě diplomové práce Mazáčová (2016), i podstatně menší mapovací populace může být pro jemné genetické mapování dostačující. Potvrzují to i výsledky předkládané práce, kdy byl oproti předpokladu i v intervalu 0,45 cM identifikován jedinec CI2401/Glupro-F2-2-38 nesoucí rekombinaci mezi markerem *Xowm713* a novým markerem *Xowm714*. Díky tomu se podařilo zúžit interval mezi hraničními markery *Xowm711* a *Xowm714* na 0,30 cM a vzdálenost mezi genem *Dn2401* a novým hraničním markerem na 0,15 cM. Důležitým faktorem je tak i již zmiňovaná frekvence rekombinace v dané oblasti. V rámci práce Mazáčová (2016) bylo mezi markery *Xowm705* a *Xowm711* nalezeno celkem 6 rekombinantů na vzdálenosti 0,90 cM, což odpovídá četnosti rekombinace 2,9 cM/ 1 Mb (1 cM odpovídá fyzické délce 345 bp). V porovnání s průměrnou frekvencí rekombinace podél chromozómu 3B, která je 0,16 cM/ 1 Mb (Choulet *et al.*, 2014), je frekvence rekombinace ve studované oblasti genu *Dn2401* na rameni 7DS 18x vyšší. Je třeba také zmínit, že vyšší frekvenci rekombinace dávají do souvislosti s výskytem genů rezistence i práce Luo *et al.* (2013) nebo práce Azhaguvel *et al.* (2012), jež se zabývá studiem genu *Gb3* podmiňujícího rezistenci ke mšici obilné.

## 6 Závěr

Předkládaná bakalářská práce je zaměřená na genetické mapování v okolí genu *Dn2401*. Tento gen se nachází na krátkém rameni chromozómu 7D a podmiňuje rezistenci k mšici zhoubné. Konstrukce vysoko-hustotní genetické mapy v oblasti genu *Dn2401* je velice důležitým krokem pro proces pozičního klonování. Hlavním cílem práce tedy bylo zamapovat marker *Xowm714* za účelem nalezení nových rekombinantů a zúžení intervalu mezi hraničními markery stanoveného v dřívějších studiích.

Aby bylo zvýšeno rozlišení genetické mapy v oblasti genu *Dn2401* byla původní mapovací populace CI2401/Glupro-F2-1 (Staňková *et al.*, 2015) rozšířena o dalších 149 jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2-2. Analýza nové populace CI2401/Glupro-F2 čítající 333 jedinců, markerem *Xowm714*, umožnila identifikovat jednoho jedince (CI2401/Glupro-F2-1-38) nesoucího rekombinaci. Zároveň došlo díky zamapování nového markeru k zúžení intervalu mezi hraničními markery z 0,45 cM (*Xowm711* – *Xowm713*, Mazáčová, 2016) na 0,30 cM (*Xowm711* – *Xowm714*), přičemž vzdálenost mezi genem *Dn2401* a oběma hraničními markery je 0,15 cM.

## 7 Seznam použité literatury

- Akpinar**, B.A., Magni, F., Yuce, M., Lucas, S.J., Šimková, H., Šafář, J., Vautrin, S., Bergès, Cattonaro, F., Doležel, J., Budak, H. (2015) The physical map of wheat chromosome 5DS revealed gene duplications and small rearrangements. *BMC Genomics* 16, 453.
- Azhaguvel**, P., Rudd, J. C., Ma, Y., Luo, M. C., & Weng, Y. (2012). Fine genetic mapping of greenbug aphid-resistance gene Gb3 in *Aegilops tauschii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 124(3), 555-564.
- Bennett**, M. D., & Smith, J. B. (1991). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the royal Society B: Biological Sciences*, 334(1271), 309-345.
- Botha**, A. M., Van Eck, L., Burger, N. F. V., & Swanevelder, Z. H. (2014). Near-isogenic lines of *Triticum aestivum* with distinct modes of resistance exhibit dissimilar transcriptional regulation during *Diuraphis noxia* feeding. *Biology open*, BIO201410280.
- Breen**, J., Wicker, T., Shatalina, M., Frenkel, Z., Bertin, I., Philippe, R., Spielmeier, W., Šimková, H., Šafář, J., Cattonaro, F., Scalabrin, S., Magni, F., Vautrin, S., Bergès H., International Wheat Genome Sequencing Consortium, Paux, E., Fahima, T., Doležel, J., Korol, A., Feuillet, C., Keller, B. (2013) A physical map of the short arm of wheat chromosome 1A. *PLoS ONE* 8 (11), e80272.
- Choulet**, F., Alberti, A., Theil, S., Glover, N., Barbe, V., Daron, J., Pingault, L., Sourdille, P., Coloux, A., Paux, E., Leroy, P., Mangenton, S., Guilhot, N., Gouis, J., Balfourier, F., Alaux, M., Jamilloux, V., Poulain, J., Durand, C., Bellec, A., Gaspin, Ch., Šafář, J., Doležel, J., Rogers, J., Vandepoele, K., Aury, J.M., Mayer, K., Berges, H., Quesneville, H., Wincker, P., Feuillet, C. (2014). Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science*, 345(6194), 1249721.
- Doležel**, J., Vrána, J., Šafář, J., Bartoš, J., Kubaláková, M., & Šimková, H. (2012). Chromosomes in the flow to simplify genome analysis. *Functional & integrative genomics*, 12(3), 397-416.
- Doležel**, J., Číhalíková, J., & Lucretti, S. (1992). A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L. *Planta*, 188(1), 93-98.



- Doležel, J., Kubaláková, M., Paux, E., Bartoš, J., & Feuillet, C. (2007).** Chromosome-based genomics in the cereals. *Chromosome Research*, 15(1), 51-66.
- Edwards, C. A., Heath, G. W. (1964):** The principles of Agricultural Entomology, pp. 168, Richard Clay and Company, Ltd, Bungay, Suffolk
- Fazel-Najafabadi, M., Peng, J., Peairs, F. B., Simkova, H., Kilian, A., & Lapitan, N. L. V. (2014).** Genetic mapping of resistance to *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) biotype 2 in wheat (*Triticum aestivum* L.) accession CI2401. *Euphytica*, 203(3), 607–614.  
<http://doi.org/10.1007/s10681-014-1284-0>
- Feldman, M., Lupton FGH, Miller, TE (1995)** Wheat. In: Smartt J, Simmonds NW (eds) Evolution of crop plants. 2nd ed. Pp 184-192 Longman Scientific and Technical New York
- Feldman, M., & Levy, A. A. (2005).** Allopolyploidy—a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic and genome research*, 109(1-3), 250-258.
- Feuillet, C., Langridge, P., & Waugh, R. (2008).** Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in genetics*, 24(1), 24-32
- Fryč, D., Rychlý, S., Mšice: malý atlas do ruky. 1. vydání. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2014-2015. 2 svazky (39; 33 stran). ISBN 978-80-7401-093-4**
- Ganal, M. W., & Röder, M. S. (2007).** Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. In *Genomics-assisted crop improvement* (pp. 1-24). Springer Netherlands.
- Gupta, P. K., Rustgi, S., & Mir, R. R. (2008).** Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity*, 101(1), 5-18.
- Haldane, J. B. S., & Smith, C. A. B. (1947).** A new estimate of the linkage between the genes for colour-blindness and haemophilia in man. *Annals of Eugenics*, 14(1), 10-31.
- Honěk, A., et al. Mšice na obilninách: biologie, prognóza a ochrana. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2002. 44 s. ISBN 80-86555-19-4**
- Huang, X. Q., Kempf, H., Ganal, M. W., & Röder, M. S. (2004).** Advanced backcross QTL analysis in progenies derived from a cross between a German elite winter wheat variety and a synthetic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 109(5), 933-943.

**Jaccoud**, D., Peng, K., Feinstein, D., & Kilian, A. (2001). Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic acids research*, 29(4), e25-e25.

**Keller**, B., Feuillet, C., & Yahiaoui, N. (2005). Map-based isolation of disease resistance genes from bread wheat: cloning in a supsize genome. *Genetical Research*, 85(02), 93-100.

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

**Komatsuda**, T., Pourkheirandish, M., He, C., Azhaguvel, P., Kanamori, H., Perovic, D., Stein, N., Graner, A., Wicker, T., Tagiri, A., Lundqvist, U., Fujimura, T., Matsuoka, T., Matsumo, T., Yano, M. (2007). Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4), 1424-1429.

**Kosambi**, D. D. (1943). The estimation of map distances from recombination values. *Annals of eugenics*, 12(1), 172-175.

**Krattinger**, Simon, Thomas Wicker, and Beat Keller. "Map-based cloning of genes in Triticeae (wheat and barley)." *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Springer US, 2009.

**Krattinger**, S. G., Lagudah, E. S., Spielmeier, W., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L. L., Keller, B. (2009b). A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, 323(5919), 1360-1363.

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

**Lazo**, G. R., Chao, S., Hummel, D.D., Edwards, H., Crossman, C.C., Lui, N., Matthews, D.E., Carollo, V. L., Hane, D.L., You, F.M., Butler, G.E., Miller, R.E., Close, T.J., Peng, J.H., Lapitan, N.L.V., Gustafson, J.P., Qi, L.L., Echaliier, B., Gill, B.S., Dilbirligi, M.,

Randhawa, H.S., Gill, K.S., Greene, R.A., Sorrells, M.E., Akhunov, E.D., Dvořák, J., Linkiewicz, A.M., Dubcovsky, J., Hossain, K.G., Kalavacharla, V., Kianian, S.F., Mahmoud, A.A., Miftahudin, Ma, X.-F., Conley, E.J., Anderson, J. A., Pathan, M.S., Nguyen, H.T., McGuire, P.E., Qualset, C.O., Anderson, O.D. (2004). Development of an Expressed Sequence Tag (EST) Resource for Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*, 168(2), 585-593.

**Liu, X. M., Smith, C. M., Gill, B. S., & Tolmay, V. (2001).** Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(4), 504-510.

**Liu, X., Smith, C., & Gill, B. (2002).** Identification of microsatellite markers linked to Russian wheat aphid resistance genes *Dn4* and *Dn6*. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(6-7), 1042-1048.

**Liu, X. M., Smith, C. M., Friebe, B. R., & Gill, B. S. (2005).** Molecular mapping and allelic relationships of Russian wheat aphid–resistance genes. *Crop Science*, 45(6), 2273-2280.

**Lucas, S.J., Akpinar, B.A., Kantar, M., Weinstein, Z., Aydinoglu, F., Šafář, J., Šimková, H., Frenkel, Z., Korol, A., Magni, F., Cattonaro, F., Vautrin, S., Bellec, A., Bergès H., Doležel, J., Budak, H. (2013)** Physical mapping integrated with syntenic analysis to characterize the gene space of the long arm of wheat chromosome 1A. *PLoS ONE* 8 (4), e59542.

**Luo, M. C., Gu, Y.Q., You, F. M., Deal, K.R., Ma, Y., Hu, Y., Huo, N., Wang, Y., Wang, J., Chen, S., Jorgensen, C.M., Zhang, Y., McGuire, P.E., Pasternak, S., Stein, J.C., Ware, D., Kramer, M., McCombie, W. R., Kianian, S. F., Martis, M. M., Mayer, K. F. X., Seghal, S.K., Li, W., Gill, B.S., Bevan, M.W. Šimková, H., Doležel, J., Weining, S., Lazo, G.R., Anderson, O.D., Dvorak, J. (2013).** A 4-gigabase physical map unlocks the structure and evolution of the complex genome of *Aegilops tauschii*, the wheat D-genome progenitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(19), 7940-7945.

**Marais, GF, Wessels WG, Horn M (1998)** Association of a stem rust resistance gene (*Sr45*) and two Russian wheat aphid resistance genes (*Dn5* and *Dn7*) with mapped structural loci in common wheat. *S Afr J Plant Soil* 15:67-71

- Martin**, T. J., Sears, R. G., Seifers, D. L., Harvey, T. L., Witt, M. D., Schlegel, A. J., McCluskey PJ, Hatchett, J. H. (2001). Registration of Trego'Wheat. *Crop Sci* 41:929-930
- Mayer**, K. F., Rogers, J., Doležel, J., Pozniak, C., Eversole, K., Feuillet, C., Endo, T. R. *et al.* (2014). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, 345(6194), 1251788.
- Mazáčová**, M. (2016): Poziční klonování genu pro rezistenci k mšici zhoubné u pšenice. Diplomová práce. Univerzita Palackého Olomouc. Přírodovědecká fakulta.
- Meksem**, K., & Kahl, G. (Eds.). (2006). The handbook of plant genome mapping: genetic and physical mapping. John Wiley & Sons.
- Nkongolo**, KK, Quick JS, Limin AE, Fowler DB (1991) Sources and inheritance of resistance to Russian Wheat aphid in *Triticum* species amphiploids and *Triticum tauschii*. *Can J Plant Sci* 71:703-708
- Paux**, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., Korol, A., Michalak, M., Kianian, S., Spielmayer, W., Lagudah, E., Somers, D., Kilian, A., Alaux, M., Vautrin, S., Bergès H., Eversole, K., Appels, R., Šafař, J., Šimková, H., Doležel, J., Bernard, M., Feuillet, C. (2008) A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science* 322, 101 – 104.
- Paux**, E., Roger, D., Badaeva, E., Gay, G., Bernard, M., Sourdille, P., & Feuillet, C. (2006). Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. *The Plant Journal*, 48(3), 463-474.
- Paux**, E., Faure, S., Choulet, F., Roger, D., Gauthier, V., Martinant, J. P., Sourdille, P., Balfourier, F., LePaslier, M. Ch., Chauveau, A., Cakir, M., Gandon, B., Feuillet, C. (2010). Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. *Plant biotechnology journal*, 8(2), 196-210.
- Peleg**, Z., Saranga, Y., Suprunova, T., Ronin, Y., Röder, M. S., Kilian, A., Korol, A.B., Fahima, T. (2008). High-density genetic map of durum wheat × wild emmer wheat based on SSR and DArT markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(1), 103-115.
- Peng**, J. H., Bai, Y., Haley, S. D., & Lapitan, N. L. V. (2009). Microsatellite-based molecular diversity of bread wheat germplasm and association mapping of wheat resistance to the Russian wheat aphid. *Genetica*, 135(1), 95-122.

- Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., & Berthelsen, K. (2006).** Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular phylogenetics and evolution*, 39(1), 70-82.
- Philippe, R., Paux, E., Bertin, I., Sourdille, P., Choulet, F., Laugier, Ch., Šimková, H., Šafář, J., Bellec, A., Vautrin, S., Frenkel, Z., Cattonaro, F., Magni, F., Scalabrin, S., Martis, M.M., Mayer, K.F.X., Korol, A., Bergès H., Doležel, J., Feuillet, C. (2013)** A high density physical map of chromosome 1BL supports evolutionary studies, map-based cloning and sequencing in wheat. *Genome Biology* 14, R64.
- Poursarebani, N., Nussbaumer, T., Šimková, H., Šafář, J., Witsenboer, H., van Oeveren, J., Doležel, J., Mayer, K.F.X., Stein, N., Schnurbusch, T. (2014)** Whole-genome profiling and shotgun sequencing delivers an anchored, gene-decorated, physical map assembly of bread wheat chromosome 6A. *The Plant Journal* 79, 334 – 347.
- Quraishi, U. M., Abrouk, M., Bolot, S., Pont, C., Throude, M., Guilhot, N., Confolent, C., Bortolini, F., Praud, S., Murigneux, A., Charmet, G., Salse, J. (2009).** Genomics in cereals: from genome-wide conserved orthologous set (COS) sequences to candidate genes for trait dissection. *Functional & integrative genomics*, 9(4), 473-484.
- Raats, D., Frenkel, Z., Krugman, T., Dodek, I., Sela, H., Šimková, H., Magni, F., Cattonaro, F., Vautrin, S., Bergès H., Wicker, T., Keller, B., Leroy, P., Philippe, R., Paux, E., Doležel, J., Feuillet, C., Korol, A., Fahima, T. (2013)** The physical map of wheat chromosome 1BS provides insights into its gene space organization and evolution. *Genome Biology* 14, R138.
- Röder, M. S., Huang, X. Q., & Börner, A. (2008).** Fine mapping of the region on wheat chromosome 7D controlling grain weight. *Functional & integrative genomics*, 8(1), 79-86.
- Salamini, F., Özkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R., & Martin, W. (2002).** Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 429-441.
- Salvi, S., & Tuberosa, R. (2005).** To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in plant science*, 10(6), 297-304.
- Schneider, K. (2005).** Mapping populations and principles of genetic mapping. Wiley VCH, Weinheim.

**Smith**, C. M. (2005). Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches. Springer Science & Business Media.

**Staňková**, H., Valárik, M., Lapitan, N. L., Berkman, P. J., Batley, J., Edwards, D., Luo, M., Tulpová, Z., Kubálková, M., Stein, N., Doležel, J., Šimková, H. (2015). Chromosomal genomics facilitates fine mapping of a Russian wheat aphid resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(7), 1373-1383.

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

**Šafář**, J., Šimková, H., Kubaláková, M., Číhalíková, J., Suchánková, P., Bartoš, J., & Doležel, J. (2010). Development of chromosome-specific BAC resources for genomics of bread wheat. *Cytogenetic and genome research*, 129(1-3), 211-223.337-357.

**Šimková**, H., Šafář, J., Kubaláková, M., Suchánková, P., Číhalíková, J., Robert-Quatre, H., Azhaguvel, P., Weng, Y., Peng, J., Lapitan, N.L.V., Ma, Y., You, F.M., Luo, M.Ch., Bartoš, J., Doležel, J. (2010). BAC libraries from wheat chromosome 7D: efficient tool for positional cloning of aphid resistance genes. *BioMed Research International*, 2011.

**Van Ooijen**, J. W., & Voorrips, R. E. (2001). JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant research international*, Wageningen, 1-51.

**Webster**, J. A., Starks, K. J., & Burton, R. L. (1987). Plant resistance studies with *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae), a new United States wheat pest. *Journal of economic entomology*, 80(4), 944-949.

## 8 Seznam použitých zkratek a symbolů

7AS	Krátké rameno chromozómu 7A pšenice
7BS	Krátké rameno chromozómu 7B pšenice
7DS	Krátké rameno chromozómu 7D pšenice
BAC	Umělý bakteriální chromozóm ( <i>bacterial artificial chromosome</i> )
Bp	Pár bází
cDNA	Komplementární DNA ( <i>complementary DNA</i> )
cM	Centimorgan
DArT	Diversity array technology
DNA	Deoxyribonukleotidová kyselina
dNTP	Deoxynukleotidy
EST	koncová sekvence z cDNA ( <i>expressed sequence tag</i> )
F primer	Forward primer
F2	Druhá filiální populace
Gb	Miliardy párů bází ( <i>giga pairs base</i> )
ISBP	Polymorfismus založený na místě inserce ( <i>insertion site based polymorphism</i> )
IWGSC	International Wheat Genome Sequencing Consortium
Mb	Miliony párů bází
PCR	Polymerázová řetězová reakce
QTL	Lokus pro kvantitativní znaky ( <i>quantitative trait loci</i> )
R primer	Reverse primer
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
T <sub>a</sub>	Teplota nasedání primerů

## **9 Seznam příloh**

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



## Příloha 1

Tabulka č. 10: Genotypy a fenotypy rodičů a jednotlivých jedinců mapovací populace CI2401/Glupro-F2 (A-rezistentní homozygot, B-citlivý homozygot, H-heterozygot; rekombinantní jedinci jsou zvýrazněni modře)

	Genotyp a fenotyp rodičů a jedinců mapovací populace pro jednotlivé genetické markery a gen <i>Dn2401</i>				
	<i>Xowm711</i>	<i>Dn2401</i>	<i>Xowm714</i>	<i>Xowm713</i>	<i>Xowm705</i>
CI2401	A	A	A	A	A
Glupro	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-1	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-2	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-3	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-4	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-5	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-6	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-7	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-8	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-9	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-10	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-11	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-12	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-13	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-14	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-15	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-16	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-17	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-18	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-19	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-20	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-21	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-22	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-23	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-24	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-25	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-26	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-27	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-28	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-29	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-30	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-31	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-32	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-33	H	H	H	H	H

	Xowm711	Dn2401	Xowm714	Xowm713	Xowm705
CI/G-F2-1-34	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-35	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-36	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-37	A	A	A	A	A
<b>CI/G-F2-1-38</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>H</b>	<b>H</b>
CI/G-F2-1-39	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-40	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-41	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-42	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-43	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-44	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-45	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-46	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-47	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-48	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-49	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-50	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-51	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-52	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-53	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-54	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-55	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-56	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-57	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-58	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-59	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-60	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-61	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-62	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-63	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-64	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-65	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-66	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-67	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-68	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-69	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-70	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-71	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-72	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-73	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-74	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-75	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-76	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-77	H	H	H	H	H

	Xowm711	Dn2401	Xowm714	Xowm713	Xowm705
CI/G-F2-1-78	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-79	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-80	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-81	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-82	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-83	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-84	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-85	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-86	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-87	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-88	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-89	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-90	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-91	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-92	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-93	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-94	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-95	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-96	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-97	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-98	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-99	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-100	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-101	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-102	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-103	H	H	H	H	H
<b>CI/G-F2-1-104</b>	H	B	B	B	B
CI/G-F2-1-105	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-106	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-107	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-108	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-109	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-110	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-111	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-112	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-113	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-114	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-115	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-116	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-117	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-118	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-119	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-120	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-121	H	H	H	H	H

	Xowm711	Dn2401	Xowm714	Xowm713	Xowm705
CI/G-F2-1-122	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-123	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-124	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-125	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-126	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-127	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-128	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-129	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-130	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-131	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-132	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-133	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-134	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-135	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-136	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-137	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-138	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-139	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-140	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-141	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-142	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-143	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-144	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-145	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-146	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-147	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-148	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-149	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-150	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-151	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-152	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-153	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-154	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-155	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-156	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-157	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-158	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-159	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-160	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-161	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-162	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-163	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-164	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-165	B	B	B	B	B

	Xowm711	Dn2401	Xowm714	Xowm713	Xowm705
CI/G-F2-1-166	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-167	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-168	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-169	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-170	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-171	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-172	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-173	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-174	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-175	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-176	A	A	A	A	A
CI/G-F2-1-177	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-178	H	H	H	H	H
CI/G-F2-1-179	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-180	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-181	B	B	B	B	B
CI/G-F2-1-182	B	B	B	B	B
<b>CI/G-F2-1-183</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>H</b>
CI/G-F2-1-184	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-1	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-2	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-3	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-4	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-5	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-6	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-7	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-8	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-9	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-10	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-11	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-12	H	H	H	H	H
<b>CI/G-F2-2-13</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
CI/G-F2-2-14	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-15	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-16	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-17	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-18	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-19	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-20	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-21	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-22	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-23	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-24	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-25	B	B	B	B	B

	Xowm711	Dn2401	Xowm714	Xowm713	Xowm705
CI/G-F2-2-26	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-27	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-28	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-29	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-30	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-31	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-32	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-33	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-34	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-35	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-36	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-37	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-38	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-39	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-40	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-41	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-42	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-43	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-44	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-45	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-46	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-47	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-48	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-49	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-50	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-51	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-52	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-53	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-54	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-55	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-56	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-57	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-58	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-59	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-60	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-61	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-62	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-63	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-64	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-65	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-66	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-67	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-68	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-69	H	H	H	H	H

	Xowm711	Dn2401	Xowm714	Xowm713	Xowm705
CI/G-F2-2-70	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-71	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-72	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-73	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-74	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-75	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-76	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-77	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-78	H	H	H	H	H
<b>CI/G-F2-2-79</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>A</b>
CI/G-F2-2-80	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-81	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-82	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-83	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-84	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-85	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-86	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-87	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-88	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-89	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-90	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-91	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-92	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-93	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-94	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-95	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-96	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-97	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-98	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-99	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-100	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-101	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-102	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-103	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-104	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-105	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-106	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-107	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-108	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-109	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-110	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-111	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-112	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-113	A	A	A	A	A

	<i>Xowm711</i>	<i>Dn2401</i>	<i>Xowm714</i>	<i>Xowm713</i>	<i>Xowm705</i>
CI/G-F2-2-114	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-115	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-116	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-117	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-118	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-119	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-120	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-121	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-122	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-123	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-124	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-125	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-126	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-127	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-128	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-129	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-130	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-131	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-132	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-133	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-134	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-135	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-136	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-137	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-138	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-139	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-140	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-141	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-142	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-143	B	B	B	B	B
<b>CI/G-F2-2-144</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>A</b>
CI/G-F2-2-145	A	A	A	A	A
CI/G-F2-2-146	B	B	B	B	B
CI/G-F2-2-147	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-148	H	H	H	H	H
CI/G-F2-2-149	H	H	H	H	H