

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2010

Bc. Monika Kladivová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**KONSTRUKCE VYSOKOHUSTOTNÍ MAPY A VÝVOJ
MARKERŮ V LOKUSECH ODPOVĚDNÝCH ZA
REZISTENCI K PADLÍ TRAVNÍMU U OBILOVIN**

Diplomová práce

Bc. Monika Kladivová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2008

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, s pomocí vedoucího práce, a že uvádím veškerou použitou literaturu.

Dne

Podpis.....

SOUHRN

Jedním z nejzávažnějších houbových patogenů obilovin je *Blumeria graminis*, původce onemocnění zvaného padlí travní. U pšenice byl v mapovací populaci z křížení kultivaru Tähti a hybridní linie 8/1 (Tähti x *T. militinae*) nedávno identifikován hlavní QTL *QPm.tut-4A* odpovědný za rezistenci k padlí travnímu, a to na 4AL mezi hraničními markery *gwm160* a *wmc232*. Do oblasti genu byly zamapovány čtyři nové SSR markery *barc70*, *barc78*, *gwm832* a *gwm855*. V mapovací populaci o 1111 F_{2:3} a DH liniích nedocházelo k rekombinacím mezi markery v blízkosti *gwm160*. Z tohoto důvodu byly do experimentu zahrnuty mapovací populace z křížení linie 8/1 a kultivaru Chinese Spring a mapovací populace ITMI, v nichž se podařilo lokalizaci některých markerů objasnit. Výsledky naznačují, že sledovaná oblast mapuje do translokace 7BS/4AL. Všechny markery z oblasti genu rezistence byly testovány v kultivaru Chinese Spring pro jejich další využití ke skríningu BAC knihovny a dále na tříděném chromosomálním rameni 4AL z linie 8/1. Jejich specifita pro 4AL byla potvrzena. Dále bylo testováno 12 genů z potenciálně kolineární oblasti krátkého ramene rýžového chromosomu 6. Tyto selektované geny však v mapovací populaci 8/1 x Tähti nebyly polymorfní a proto byla tato oblast rozšířena o dalších 100 genů, které budou použity k verifikaci kolinearit této oblasti k *QPm.tut-4A* lokusu. V druhé části předložené diplomové práce byly u ječmene identifikovány sekvenční varianty genu rezistence k padlí travnímu *Mla*. Bylo potvrzeno, že gen *Mla* je v genomu ječmene multialelický, ve čtyřiceti kultivarech ječmene bylo získáno celkem 16 různých alel tohoto genu. Poprvé bylo zjištěno, že jeden typ fenotypu může být podmíněn více než jednou alelou *Mla* genu.

SUMMARY

One of the most severe cereal crop disease is powdery mildew caused by the fungus *Blumeria graminis*. The main QTL *QPm.tut-4A* for resistance to powdery mildew was recently identified in the mapping population from a cross between cultivar Tähti and hybrid line 8/1 (Tähti x *T. militinae*) on 4AL between flanking markers *gwm160* and *wmc232*. Four new SSR markers *barc70*, *barc78*, *gwm832* and *gwm855* were mapped to the region of the gene. No recombination was detected between markers close to *gwm160* in mapping population involving 1111 F_{2:3} a DH lines. Therefore mapping population from a cross between 8/1 and cultivar Chinese Spring and ITMI mapping population were included in the experiment and led to explanation of some markers location. The results suggest, that the targeted region maps to translocation 7BS/4AL. All markers from locus of the resistance gene were for their subsequent use in the BAC library screening tested in cultivar Chinese Spring and also on flow-sorted chromosome arm 4AL carrying the *QPm.tut-4A* locus. Their specificity for 4AL was confirmed. 12 genes from the potential colinear region on the short arm of rice chromosome 6 were tested, however none of them showed polymorphism. Another 100 rice genes from the region were selected and these genes will be used for verification of this region colinearity to the *QPm.tut-4A* locus. In the second part of this study sequence variants of the powdery mildew resistance gene *Mla* were identified in barley. It was confirmed, that *Mla* gene is multiallelic in barley genome, generally 16 different *Mla* gene alleles were obtained and in the first time was confirmed that one phenotypic effect could be coded by more than one allele of the *Mla* gene.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala v první řadě svému školiteli Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, trpělivost a pomoc při tvorbě této práce, dále kolektivu laboratoře Dr. Kadri Järve za spolupráci a poskytnutí mapovací populace, Ing. Tiboru Sedláčkovi za pomoc se zpracováním výsledků a všem, kteří se ať už na pšeničném nebo ječmenném projektu podíleli. Velký dík patří také všem laborantkám za nezbytné a skvěle fungující zázemí v laboratoři a celému kolektivu Ústavu experimentální botaniky v Olomouci za příjemné pracovní prostředí, ohleduplnost a umožnění provést všechny experimenty, získat data a tedy vypracovat tuto diplomovou práci.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	PŠENICE A JEČMEN	10
2.2	<i>BLUMERIA GRAMINIS</i>	13
2.3	REZISTENCE U OBILOVIN.....	17
2.3.1	Rasově specifická.....	17
2.3.2	Rasově nespecifická	19
2.3.3	Nehostitelská	21
2.3.4	Částečná a indukovaná rezistence	22
2.4	POZIČNÍ KLONOVÁNÍ	23
2.5	MAPOVÁNÍ GENU REZISTENCE DOSPĚLÝCH ROSTLIN K PADLÍ TRAVNÍMU U PŠENICE.....	27
2.6	IDENTIFIKACE JEDNOTLIVÝCH ALEL GENU <i>Mla</i> ODPOVĚDNÉHO ZA RASOVĚ SPECIFICKOU REZISTENCI K PADLÍ TRAVNÍMU U JEČMENE	30
3	CÍLE PRÁCE	31
4	MATERIÁL A METODY.....	32
4.1.1	MATERIÁL	32
4.1.2	ROZTOKY A MEDIA.....	33
4.1.3	KOMERČNÍ KITY	34
4.1.4	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	34
4.1.5	IZOLACE DNA	35
4.1.6	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	35
4.1.7	ELEKTROFORÉZA	38
4.1.8	ŠTĚPENÍ PCR PRODUKTU.....	38
4.1.9	PURIFIKACE PCR PRODUKTU	39
4.1.10	KLONOVÁNÍ PCR PRODUKTU.....	39

4.1.11	IZOLACE Z PLASMIDU	40
4.1.12	SEKVENOVÁNÍ	41
4.1.13	DESIGN COS (conserved ortholog set) MARKERŮ <i>in silico</i>	42
5	VÝSLEDKY	43
5.1	SATURACE MAPY V OBLASTI GENU REZISTENCE DOSPĚLÝCH ROSTLIN K PADLÍ TRAVNÍMU U PŠENICE.....	43
5.2	IDENTIFIKACE SEKVENČNÍCH VARIANT GENU <i>Mla</i> U JEČMENE.....	49
6	DISKUZE	54
6.1	SATURACE MAPY V OBLASTI GENU REZISTENCE DOSPĚLÝCH ROSTLIN K PADLÍ TRAVNÍMU U PŠENICE.....	54
6.2	IDENTIFIKACE SEKVENČNÍCH VARIANT GENU <i>Mla</i> U JEČMENE.....	58
7	ZÁVĚR.....	59
8	LITERATURA	60
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	69

1 ÚVOD

Tato práce je tematicky zaměřena na pšenici a ječmen, jedny z nejvýznamnějších kulturních plodin, jež mají ve výživě lidstva své nezastupitelné místo. Jejich pěstování je však komplikováno mnohými biotickými i abiotickými vlivy. K nejzávažnějším patogenům jak pšenice tak ječmenu, jež každoročně ohrožuje výnos i výslednou kvalitu mouky, patří celosvětově rozšířená houba *Blumeria graminis*, původce onemocnění zvaného padlí travní. Kapitola „Stav řešené problematiky“ si kladla za úkol zmínit základní vlastnosti, původ a taxonomické začlenění obou hostitelských rostlin, a taktéž vlastnosti, životní cyklus a ekologii zmíněného patogena, zvláště pak přiblížit mechanismy interakce patogena s hostitelem. Pozornost je věnována zejména jednotlivým typům rezistence rostlin vůči patogenům i konkrétním genům odpovědným za tuto rezistenci, jež byly u pšenice a ječmene doposud zamapovány. Právě využití těchto genů může být účinnou a zároveň k životnímu prostředí šetrnou zbraní v boji s rostlinnými patogeny. To však mnohdy vyžaduje znalost sekvence daného genu a jeho poziční klonování nebo navržení markerů pro efektivní, markerem zprostředkovanou selekci.

Praktická část se zabývá dvěma hlavními tématy, jedním z nich je konstrukce vysokohustotní mapy v oblasti genu rezistence dospělých rostlin k padlí travnímu u pšenice, který byl nedávno zamapován na chromosomálním rameni 4AL. Tato práce je součástí grantového projektu GA521/08/1629 s názvem „Konstrukce BAC knihoven specifických pro chromosom 4AL a poziční klonování genu pro rezistenci dospělých rostlin k padlí travnímu u pšenice“ a vznikla ve spolupráci s laboratoří Dr. Järve (Department of Gene Technology, Tallinn University of Technology, Estonia)

Druhé téma se týká identifikace COS markerů pro rozlišení jednotlivých alel genu *Mla*, genu pro rasově specifickou rezistenci k padlí travnímu u ječmene. Tento projekt vznikl ve spolupráci se Šlechtitelskou stanicí Stupice, SELGEN, a.s.

2 STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 PŠENICE A JEČMEN

Pšenice a ječmen patří mezi nejvýznamnější kulturní plodiny. Ječmen je s roční světovou produkcí 145 mil. tun čtvrtou a pšenice s roční světovou produkcí 633 mil. tun dokonce třetí nejrozšířenější obilovinou na světě v závěsu za kukuřicí a rýží. Produkce pšenice v České republice se pohybuje kolem 4,2 mil. tun/rok, produkce ječmenu kolem 2,1 mil. tun/rok (uvedeny jsou průměrné hodnoty z let 2004 – 2008). Obě tyto obiloviny mají nazastupitelnou úlohu ve výživě lidstva. Pšenice je základní potravinou pro 35 % lidské populace, pokrývá až pětinu lidstvem konzumovaných kalorií. Průměrná roční spotřeba připadající na jednoho obyvatele je 65,89 kg u pšenice a 1,03 kg u ječmene (údaj z roku 2005), (<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>).

Počátky pěstování pšenice i ječmenu se datují do období před asi 10 tisíci lety a jsou spojeny s rozvojem zemědělství v tzv. úrodném půlměsíci, který sahá od východního pobřeží Středozemního moře po jihovýchod dnešního Turecka, sever Iráku až na severozápad Iránu. Během této tzv. neolitické revoluce byly domestikovány tři druhy obilovin, diploidní pšenice *T. monococcum* L. (genom A^mA^m), tetraploidní pšenice *T. turgidum* L. ssp. *dicoccon* (BBAA) a diploidní ječmen *Hordeum vulgare* L. (HH). Divoká forma tetraploidní pšenice *T. turgidum* L. ssp. *dicocoides* vznikla hybridizací dvou diploidních druhů *T. urartu* (AA) a *Aegilops speltoides* (BB). Následnou hybridizací *T. turgidum* s *Aegilops tauschii* (DD) vznikla před asi 8 - 10 tisíci lety allohexaploidní pšenice setá *T. aestivum* (AABBDD).

Umělá selekce související s domestikací pšenice i ječmenu během zemědělské revoluce byla zacílena na znaky, které zvyšují výnos a adaptabilitu k prostředí. Patří mezi ně nerozpadavost klasu, nahé obilky, větší zrna, přímý vzrůst, nižší počet odnoží, redukce dormance semen, a zvláště u ječmenu pak šestiřadý klas, který nese třikrát více zrn než dvouřadý klas divoké formy. Šíření pšenice i ječmenu v průběhu neolitické expanze zemědělství do Evropy, Asie i Afriky bylo umožněno vznikem mutací a s tím spojené diverzity v genech odpovědných za potřebu vernalizace a citlivost k fotoperiodě.

V současnosti je hexaploidní pšenice *T. aestivum ssp. aestivum* pěstována téměř celosvětově od 65° s.š. v Norsku a Rusku až po 45° j.š. v Argentině, ve větších nadmořských výškách i v tropických a subtropických oblastech a je dnes se zastoupením 95 % nejčastěji pěstovanou pšenicí, využívanou zejména v pekárenství a k přípravě těstovin. Zbylých 5 % světové produkce zaujímá tetraploidní *T. turgidum ssp. durum*, vhodná pro výrobu těstovin a krupice, ostatní druhy tvoří pouze minoritní podíl. Ječmen je plodinou mírného pásu jižní i severní polokoule, dosahuje však i k subtropickým oblastem jižní Ameriky a arktickým oblastem severní Ameriky i Asie a roste v nadmořských výškách nad 4500 m v Andách a Himalájích. Nachází využití zejména ve sladovnictví, jako krmivo pro hospodářská zvířata, k výrobě krup a mouky (Dubcovsky *et* Dvorak, 2007; Levy *et* Feldman, 2002; Luo *et al.*, 2007; Petersen *et al.*, 2006; Pourkheirandish *et* Komatsuda, 2007; <http://gramene.org/>).

Rod *Hordeum* patří do čeledi *Poaceae*, podčeledi *Triticeae*, obsahuje 32 druhů a celkem 45 taxonů. Většinu druhů představují trvalky s diploidním ($2n = 2x = 14$), tetraploidním ($2n = 4x = 28$) i hexaploidním ($2n = 6x = 42$) počtem chromosomů, existují však i rostliny s aneuploidním počtem, u nichž byl chromosom eliminován nebo duplikován. Diploidní druhy mají karyotyp sestaven převážně ze čtyř párů metacentrických, jednoho páru submetacentrických a dvou párů satelitních chromosomů. Kulturní ječmen *H. vulgare ssp. vulgare* L. a jeho divoký předek *H. vulgare ssp. spontaneum* C. Koch tvoří samostatný jednoletý diploidní druh, spontánně a s vysokou četností mezi nimi dochází k introgresnímu křížení (von Bothmer *et al.*, 1995; Pourkheirandish *et* Komatsuda, 2007). Avšak využití divokých druhů ječmene k přenosu žádaných genetických znaků do genomu kulturního druhu nebylo tolik úspěšné, jako je tomu např. u kulturní pšenice. Důvodem je jednak skutečnost, že diploidní organismy jsou, na rozdíl od polyploidních, mnohem citlivější již k malé genetické nerovnováze, tak i mnohem vzdálenější příbuznost mezi divokými druhy a kulturním ječmenem než je tomu mezi druhy rodu *Triticum* či *Aegilops* a kulturní pšenicí (von Bothmer *et al.*, 1995).

Množství jaderné DNA ječmenu (*Hordeum vulgare* L.) je 5,2 pg/1C, což odpovídá $5,1 \times 10^9$ bp (Bennet *et* Leitch, 2005). Většina genů, kromě genů ribosomálních a genů některých zásobních proteinů, se nachází v genových oblastech. Ty reprezentují 12 % genomu a jsou obklopeny sekvencemi tvořenými převážně transpozóny (Barakat *et al.*, 1997).

Ječmen (*Hordeum vulgare* L. cv. Betzes) se díky nespornému ekonomickému významu a genetickým výhodám, kterými jsou diploidie, samosprašnost, nenáročné pěstování a mno-

žení v laboratorních podmínkách či vysoká syntenie mezi chromosomy v rámci *Triticae*, stal modelovou rostlinou celé skupiny *Triticeae* (Linde-Laursen *et al.* 1997; Ramsay *et al.*, 2000).

Rod *Triticum* patří do čeledi *Poaceae* a je podle Slagerena (1994) rozdělen do tří skupin 1) *Monococca* se zástupci *T. monococcum* L. (genom A^m) a *T. urartu* Tumanian ex Gandilyan (A^u), 2) *Dicoccoidea*, mezi něž patří *T. turgidum* (AB) a *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. (AG), a 3) *Triticum* představován druhy *T. aestivum* L. (synonym *Triticum vulgare*) (ABD) a *T. zhukovskyi* Menabde *et* Ericzjan (AAG), (<http://www.k-state.edu/wgrc/Taxonomy/taxintro.html>).

Genom *T. aestivum* je složen z 21 párů chromosomů ($2n = 6x = 42$) a má velikost asi 17×10^9 bp, což odpovídá množství 17,3 pg/1C (Bennett *et* Smith, 1976). Je tedy asi 110 krát větší než genom *Arabidopsis* a 40 krát větší než genom rýže. Více než 80 % genomu tvoří repetitivní sekvence (Flavell *et al.*, 1974, cit. Devos *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 1995). Analýza sekvencí z *Ae. tauschii* pokrývajících asi 0,075 % genomu D naznačuje, že pšeničný genom obsahuje z 91,6 % repetitivní elementy, pouze 2,5 % známých genů a 5,9 % nízkokopiových sekvencí o neznámé funkci. 53,5 % genomu D zaujímají retroelementy, největší mírou LTR retrotranspozóny (51,2 % genomu) a 13,3 % DNA transpozóny, nejčastěji CACTA elementy (12,3% genomu), (Li *et al.*, 2004).

Diploidní rodičovské druhy mají společného předka, jednotlivé genomy A, B a D jsou tedy homeologní a pořadí markerů mezi nimi je obvykle vysoce konzervováno, zvláště v kolineárních centromerických oblastech, kde je výskyt rekombinací minimální. Genom pšenice však během evoluce prošel několika chromosomálními přestavbami. Již u diploidního předka došlo k reciproké translokaci mezi chromosomem 4A a dlouhým ramenem chromosomu 5A. Následnou pericentrickou inverzí na chromosomu 4A se z původního dlouhého ramene stalo krátké. V oblasti translokace 5AL/4AL proběhla druhá reciproká translokace se 7BS. Identifikována byla také translokace 2BS/6BS a pericentrické inverze u chromosomů 2B, 3B, 4B, 5A a 6B. V genomu D žádné přestavby zjištěny nebyly, jeho uspořádání je proto považováno za nejbližší ancestrálnímu uspořádání (shrnutí v Devos *et al.*, 2009).

Mezi tetraploidní druhy pšenice, které se svým genomem A¹A¹GG nepodílely na formování genomu *T. aestivum*, patří divoká *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. *ssp.* *armeniicum*, domestikovaná *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. *ssp.* *timopheevii* a *T. militinae* Zhuk. *et* Migusch.

T. militinae je považována buďto za mutovanou formu *T. timopheevii* nebo za introgresního křížence mezi *T. timopheevii* a *Ae. triuncialis* var. *persica* (syn. *T. persicum*) (shrnutí v Jakobson *et al.*, 2006). Tyto druhy se vyvinuly pravděpodobně později a nezávisle na vzniku tetraploidního předka pšenice seté, taktéž hybridizací diploidních *Ae. speltooides* a *T. urartu*, *Ae. speltooides* jako mateřské a *T. urartu* jako otcovské rostliny (Levy *et Feldman*, 2002; Salina *et al.*, 2006). Jejich genomy se vyznačují charakteristickými, druhově specifickými přestavbami 6A¹S/1GS, 1GS/4GS, 4GS/4A¹L a 4A¹L/3A¹L, nikoli však translokací 4AL/5AL/7BS a inverzemi chromosomu 4A, aberacemi typickými pro *T. aestivum*. Chromosom 4A *T. aestivum* se od chromosomu 4A¹ *T. timopheevi* liší přítomností celkem jedné paracentrické a dvou pericentrických inverzí (Rodriguez *et al.*, 2000; Salina *et al.*, 2006).

Pro skupinu tetraploidních pšenic *timopheevii* je typická přítomnost genů rezistence k mnoha onemocněním rostlin, zejména houbovým. Žádný z těchto genů typických pro *T. militinae* nebyl v pšenici seté identifikován. Proto jsou tyto druhy využívány v křížení jako zdroje genů rezistence vůči patogenům. (Jakobson *et al.*, 2006; Salina *et al.*, 2006).

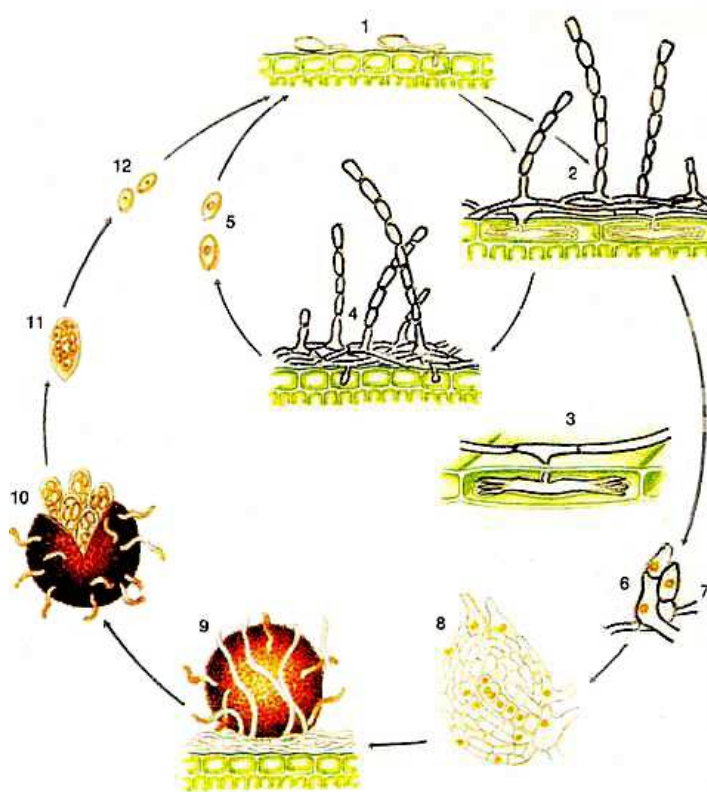
K nejzávažnějším houbovým onemocněním jak pšenice tak ječmenu patří padlí travní. Může mít na svědomí až 45 % ztráty výnosu, rozsah onemocnění závisí na použitém kultivaru a vnějších podmínkách. Padlí však ovlivňuje i další vlastnosti pšenice jakou je např. kvalita mouky. Způsobuje totiž změnu složení a obsahu proteinů v ní obsažených, a snižuje tak její hodnotu až o 50 % (shrnutí v Srnić, 2003). Původcem padlí travního je *Blumeria graminis*.

2.2 *BLUMERIA GRAMINIS*

Vláknitá houba *B. graminis* DC z čeledi *Erysiphales* třídy *Ascomycetes* je původcem onemocnění obilovin zvaného padlí travní. Dělí se na několik hostitelsky specifických forem, např. ječmen postihuje *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, pšenici pak *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Jedná se o obligátně biotrofního parazita, přestože na rozdíl od jiných obligátních parazitů nepostrádá žádnou metabolickou dráhu ani schopnost metabolismus regulovat. Možné vysvětlení je, že k metabolické regulaci vyžaduje signály hostitele (Both *et al.*, 2005).

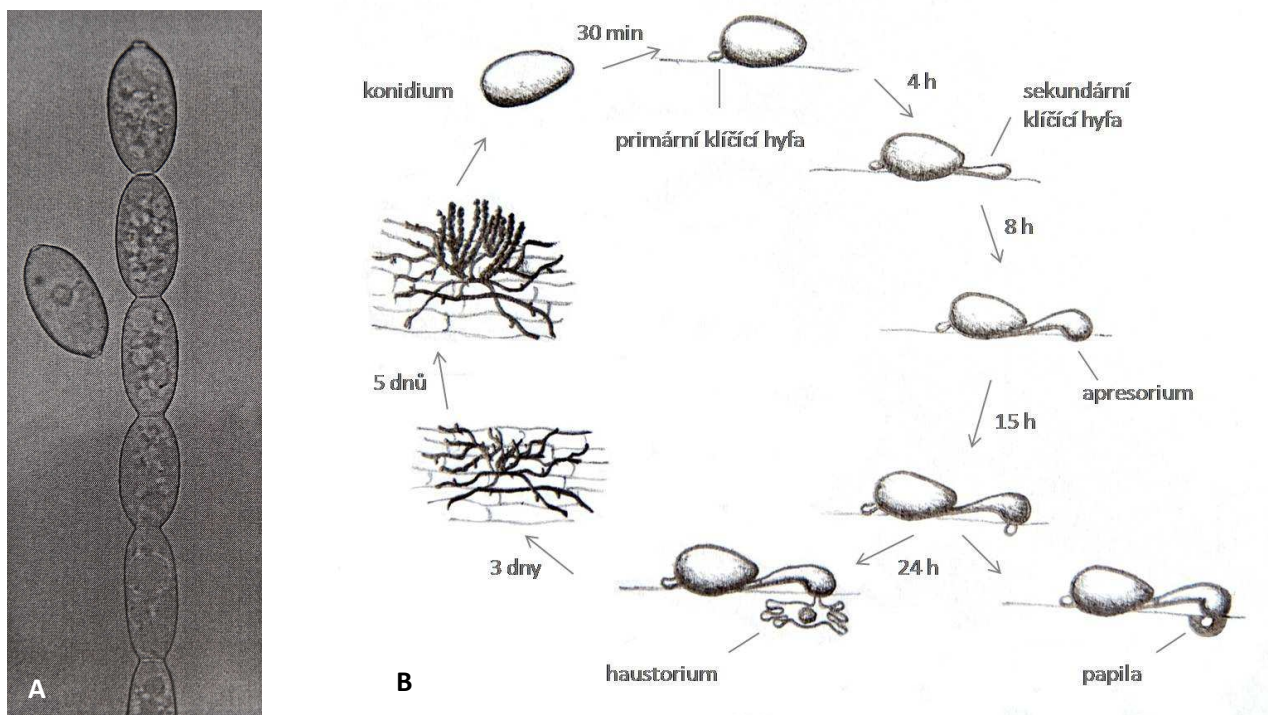
Projevuje se růstem konidií a mycelia na povrchu listů, napadá rostliny v jakémkoli stádiu růstu, je rozšířen celosvětově, přičemž nejzávažnější dopad na výnos byl zaznamenán v Evropě, jihozápadní Asii a východních a západních částech Severní Ameriky. Vzhledem k tomu, že se tato houba vyvíjí pouze na zelených rostlinách, její spory se během roku přenášejí větrem mezi postupně dozrávajícími populacemi rostlin a to až do vzdálenosti 100 km za rok. Optimálními podmínkami pro rozvoj padlí je stín, vysoká relativní vlhkost, nejlépe 100%, a teplota v rozmezí 15 – 25 °C. Patogenní aktivita je vykazována i při teplotách 3 - 31 °C, avšak po překročení 28 °C bývá epidemie padlí inhibována. K závažnosti rozsahu onemocnění přispívá i zavlažování, používání dusíkatých hnojiv a nadměrná hustota porostu.

B. graminis se rozmnožuje pohlavně i nepohlavně, oba cykly mohou probíhat na jedné rostlině. Tato houba je heterothalická, během pohlavního neboli teleomorfního stádia se tedy z haploidního zárodečného mycelia tvoří morfologicky odlišná gametangia, samičí askogonia a samčí antheridia. Při jejich spojení dochází nejprve k fúzi buněk a tvorbě askální mateřské buňky – dikaryonu, následuje fúze jader a vznik zygoty. Ta vyrůstá v silnostěnnou, tmavě zbarvenou plodnici (askokarp) uzavřeného typu (kleistothecium), v níž meiotickým dělením vznikají vřecka s haploidními askosporami (Obr. 1). Kleistothecia umožňují houbě přežití v nepříznivých podmínkách, tvoří se zejména na konci vegetačního období hostitele. *B. graminis* však může přežít zimu i jako myceliální povlak např. na slámě. Pohlavní rozmnožování poskytuje širokou genetickou diverzitu důležitou pro evoluci patogena. V nepohlavním neboli anamorfním stádiu jsou produkovány bezbarvé, jednobuněčné, jednojaderné a tenkostěnné nepohlavní spory – konidie, které rostou v řetězcích a postupně dozrávají. V bazální části řetězce vznikají A konidie s přepážkami, následují prodlužující se B konidie, C konidie jsou již zralé spory, s řetězcem spojené pouze papilou. Dokud nejsou C konidie z konce řetězce odděleny, zůstávají protoplasty sousedních spor propojeny pórem (Obr. 2, A). Zrání konidií je závislé na stavu listu, teplotě a vlhkosti. Jsou uvolňovány v průběhu celého dne, mají vzhled bílého prášku. Obě stádia, jak pohlavní tak nepohlavní, jsou schopna vyvolat infekci (Jarvis *et al.*, 2002; Srnić, 2003).



Obr. 1: Životní cyklus *Blumeria graminis*: 1 - klíčící haploidní askospora nebo konidie; 2, 4 – konidiofory s konidiemi; 3 - haustoria; 5 - konidie; 6 - askogonia; 7 - antheridia; 8 - tvorba askokarpu, dikaryon; 9, 10 - kleistothecium; 11 - askus s haploidními askosporami; 12 - askospory (<http://www.scribde.com/biologie/botanica/BOLILE-GRAULUI1211191616.php>)

Penetrace zralé askospory nebo konidie je zahájena tvorbou extracelulární hmoty, která způsobuje enzymatické oslabení kutikuly. Během hodiny po inokulaci se objevuje krátká primární klíčící hyfa, krátce poté sekundární hyfy, na jejichž špičce se tvoří zahnutá apresoria znatelná asi 8 hodin po inokulaci. Ta přibližně 15 hodin po inokulaci pronikají přes buněčnou stěnu a invaginují cytoplasmatickou membránu epidermální buňky, z níž čerpají vodu, aniž by do samotné buňky pronikla. Po úspěšné infekci následuje penetrace do buňky pomocí jednobuněčných haustorií, která dále prorůstají do epidermální tkáně a slouží houbě k čerpání živin z hostitelské buňky. První konidie a konidiofory se objevují asi 4 až 5 dnů po úspěšné primární infekci (Obr. 2, B), (Both *et al.*, 2005).



Obr. 2: Nepohlavní cyklus *Blumeria graminis*. **A)** Fotografie řetězce zrajících konidií (Shin *et La*, 1993, cit. Braun *et al.*, 2002). **B)** Časový sled tvorby infekčních struktur, po tvorbě apresoria dochází k penetraci do buňky, pokud tomu hostitelská buňka nezabrání tvorbou papily. Infekce pokračuje tvorbou haustorií a 5 dnů po inokulaci jsou na listech viditelné konidiofory, které uvolňují nové konidie (převzato z Both *et al.*, 2005; Kunoh, 2002).

Houby čeledi *Erysiphales* nejsou příliš geneticky prozkoumané, jelikož práce s nimi je velmi náročná, jednak vyžaduje speciální podmínky pro zabránění vzájemných kontaminací mezi izoláty, jednak jsou tyto obligátně biotrofní paraziti obtížně kultivovatelní na médiích. Výjimkou je *B. graminis f. sp. hordei*, která se stala modelovým organismem nejen pro studium padlí, ale i pro obligátní houbové patogeny obecně. Poskytuje představu o základních mechanismech biologie těchto patogenů, ty však nemusí být vždy totožné, neboť existují geny, které jsou u jednotlivých druhů i v rámci jednoho druhu odlišné (Brown, 2002). V roce 1990 bylo v genomu *B. graminis f. sp. hordei* pomocí 31 RFLP lokusů a 5 lokusů virulence charakterizováno 7 vazebných skupin (Christiansen *et Giese*), v roce 1994 byla připravena genomová YAC knihovna (Borbye *et Giese*, cit. Pedersen *et al.*, 2002) a v roce 2002 BAC knihovna (Pedersen *et al.*, 2002). Velikost genomu *B. graminis* je odhadována na 118,3 Mb,

přibližně 70 % tvoří repetitivní sekvence. Předpokládaný počet genů tohoto parazita je asi 6400 (Spanu, 2008).

Jedním ze způsobů, jak s houbovými patogeny bojovat, je použití fungicidů. Tento přístup je ovšem spojen nejen s vysokými náklady, ale hlavně s negativním vlivem na životní prostředí. Navíc, některé kmeny si během své evoluce vytvořily rezistenci k určitým fungicidním přípravkům (Brown, 2002). Zřejmě nejefektivnějším, ekonomickým a k životnímu prostředí šetrným řešením je využití vlastních genů rostliny, které odpovídají za rezistenci k jejím patogenům.

2.3 REZISTENCE U OBILOVIN

Rostliny jsou rezistentní k většině patogenů ve svém prostředí. Důvodem selhání ataku patogena může být to, že rostlina nevyhovuje konkrétně jeho požadavkům a je tedy pro něj nehostitelská, nebo to, že je vybavena geny rezistence (R geny) a pro svou obranu vytváří strukturální bariéry či toxické sloučeniny nebo využívá takových obranných mechanismů, při nichž infekce zůstává lokalizována. Rezistence může být podmíněna kvalitativně i kvantitativně. Existuje několik typů rezistence, ty se však často překrývají a biochemické procesy, které se v nich uplatňují, bývají obdobné. Rozlišujeme rezistenci specifickou k určité rase patogena, rezistenci rasově nespecifickou, rezistenci nehostitelskou, částečnou nebo indukovanou (Věchet, 2008).

2.3.1 Rasově specifická

Většina známých R genů rostlin kóduje proteiny, které obsahují centrální doménu s vazebným místem pro ATP nebo GTP (NBS – nucleotide binding site) a karboxyterminální doménu složenou z řady degenerovaných repetitivních bohatých na leucin (LRR – leucine-rich repeat residues). Tyto tzv. NBS-LRR proteiny jsou u rostlin rozděleny na dvě skupiny. TIR-NBS-LRR obsahují TIR doménu, která je homologní s Toll proteinem *Drosophily* a savčím receptorem pro interleukin-1. U druhé skupiny tato doména chybí, často je

nahrazena CC doménou se šroubovicovou strukturou (coiled-coil). U jednoděložných rostlin byly detekovány pouze CC-NBS-LRR proteiny, u dvouděložných typy oba, s převahou TIR-NBS-LRR. NBS-LRR proteiny umožňují rozpoznání nejen houbových a virových patogenů, ale i parazitujících hlístů a hmyzu (Ayliffe *et* Lagudah, 2004). Takřka všechny izolované R geny obilovin jsou rasově specifické, zprostředkovávají rezistenci pouze k takovým druhům patogenu, u nichž je exprimován odpovídající specifický gen avirulence (*Avr*). Podle Florovy teorie „gen proti genu“ (1971, cit. Ayliffe *et* Lagudah, 2004) rozeznává každý R gen pouze jeden produkt avirulentního genu patogena. Tento proces může být chápán jako specifická interakce receptor - ligand, která následně vede k aktivaci obranné odpovědi. Vzhledem k tomu, že u patogena může docházet ke ztrátám nebo mutacím genu avirulence, je pro rasově specifickou rezistenci typické pouze krátkodobé využití v zemědělství (Ayliffe *et* Lagudah, 2004).

Rasově specifická rezistence je obvykle spojena s hypersenzitivní reakcí, jejíž známkou je hromadění fenolických látek v celé napadené buňce a její následná apoptóza. Rychlá smrt napadené buňky je vzhledem k tomu, že obligátně biotrofní patogen jako je *B. graminis* vyžaduje ke svému vývoji živé buňky hostitele, efektivní obrana. Významnou roli v tomto procesu hraje hromadění H_2O_2 , který se nejprve objevuje ve stěnách mezofylových buněk obklopujících napadené epidermální buňky jako produkt patogenem indukované mezofylové oxalát-oxidasy. Tato oxidasa je aktivovaná okyselením apoplastu cestou hypotetické ATPasy přenášející H^+ . Následně dochází k hromadění H_2O_2 v celé napadené epidermální buňce, která podléhá hypersenzitivní reakci. To souvisí i s vzestupem aktivity peroxidasy, zvýšením obsahu glutathionu a jeho konverzí na oxidovanou formu. V místě úspěšné penetrace patogena přes buněčnou stěnu jsou produkovány reaktivní formy kyslíku (Collins *et al.*, 2002).

Rasově specifická rezistence je podmíněna kvalitativně, geny velkého účinku, projevuje se u klíčících i dospělých rostlin. U pšenice bylo dosud identifikováno 40 lokusů pro rasově specifickou rezistenci k padlí travnímu *Pm1-Pm43* (*Pm18*, *Pm22* a *Pm23* byly vyňaty), u lokusů *Pm1*, *Pm3*, *Pm4*, *Pm5* a *Pm8* je za rezistenci odpovědná více než jedna alela. Většina z nich však nemůže být použita ve šlechtění. Některé z lokusů byly odvozeny z diploidních i tetraploidních kulturních i divokých druhů pšenice, problémem tedy mohou být nevýhodné vlastnosti spojené s vnesením fragmentu cizího chromosomu, jenž lokus nese. Problémem u přenosu lokusu z rozdílného kultivaru bývá lokální adaptace, či snížený účinek genu vinou

odlišného genetického pozadí (Chen *et al.*, 2009; Hua *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). Klonován byl doposud jediný gen *Pm3b* z chromosomálního ramene 1AS, který má 10 alel. Bylo zjištěno, že u citlivé alely kandidátního genu *Pm3b*, genu pro CC-NBS-LRR protein, došlo k delecii jednoho bázevého páru v kódující oblasti (Yahiaoui *et al.*, 2004).

V ječmeni byly lokusy odpovědné za rezistenci k padlí travnímu zamapovány na chromosomech 1H (*Mla*, *Mlk*, *Mlat*, *Mlnn*, *Mlra*, *MlGa*), 2H (*MILa*), 4H (*Mlg*, *mlo*), 5H (*Mlj*), 6H (*Mlh*) a 7H (*mlt*, *Mlf*), (shrnuté v Řepková *et al.*, 2006). Genová rodina *Mla* zahrnuje 32 známých alel, v telomerické části 1HS, v úseku o velikosti 240 kbp tvoří tři rozdílné skupiny homologních NBS-LRR genů, které kódují R proteiny specifické k určitému souboru izolátů padlí travního (Wei *et al.*, 1999). Proteiny *Mla1* a *Mla6* jsou z 91 % identické, avšak *Mla6*, narozdíl od *Mla1*, vyžaduje k účinnému spuštění obranné odpovědi přinejmenším dva další geny, jsou jimi *Rar1*, kódující zinek vázající protein, a *Sgt1*, gen pro podjednotku SCF ubiquitin ligasového komplexu. Oba proteiny interagují vzájemně a dále s podjednotkami COP9 signalosomu, což může vést k cílené ubiquitinaci a následné degradaci proteinů (Obr. 1), (Ayliffe *et Lagudah*, 2004).

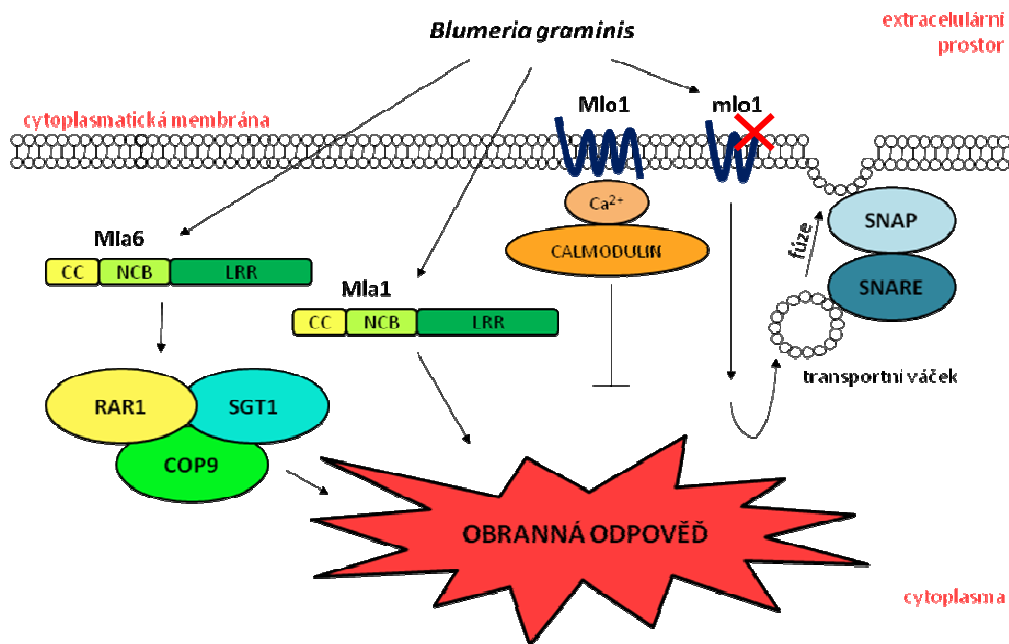
2.3.2 Rasově nespecifická

Rezistence k většině biotrofním i nekrotrofním patogenům je podmíněna kvantitativně, fenotyp vykazuje v segregující populaci kontinuální charakter, je ovlivněn jak mnoha geny malého účinku, tak i prostředím. Výhodou polygenně dědičných rezistencí, ve smyslu jejich využití v zemědělství, je jejich trvalost, patří mezi ně i většina tzv. rezistencí dospělých rostlin (APR - adult plant resistance), (Ayliffe *et Lagudah*, 2004). V genomu pšenice bylo zamapováno značné množství QTL odpovědných za rezistenci k padlí travnímu, již v roce 1999 Keller *et al.* mapovali 18, Chantret *et al.*, Liu *et al.* a Mingeot *et al.* v letech 2000 až 2002 celkově taktéž 18 QTL lokusů (cit. v Huang *et Röder*, 2004) a v pracích Liang *et al.*, (2006), Jakobson *et al.* (2006), Tucker *et al.* (2006), Muranty *et al.* (2009), Lan *et al.* (2009) a Lan *et al.* (2010) bylo zamapováno dalších 17 QTL. Tyto rezistentní lokusy byly získány z různých křížení a mapovaly téměř na všechny chromosomy pšenice.

Pro rasově nespecifickou rezistentní odpověď je typické, že se u rezistentních linií na vnitřní straně buněčné stěny pod apesorii patogena tvoří efektivní papily, jež jsou rozsáhlejší

a objevují se dříve než papily u linií citlivých. Atakované epidermální buňky, narozdíl od rezistence rasově specifické, která obvykle vede k hypersenzitivní buněčné smrti, přežívají.

Ječmenný gen rezistence k padlí travnímu *mlo* je mezi R geny zcela unikátní, neboť se jedná o mutovaný endogenní gen, který zprostředkovává rasově nespecifickou rezistenci, podmíněnou homozygotně recesivně. Funkční alela kóduje potenciální membránový receptor o sedmi doménách, který pravděpodobně negativně reguluje obrannou odpověď rostliny tak, že vazbou na calmodulin, a tedy regulací hladiny Ca^{2+} iontů, ovlivňuje rozpoznávání intracelulárních a extracelulárních signálů. Pro účinnou rezistenci je vedle genu *mlo* nutná i přítomnost genů *Ror1*, jehož mechanismus působení není znám, a *Ror2* kódující syntaxin, SNARE protein cytoplasmatické membrány, který tvorbou komplexu s ječmenným homologem SNAP proteinu HvSNAP34, taktéž nezbytným v obranné odpovědi, a se SNARE proteiny lokalizovanými na membráně vezikulů, umožňuje exocytózu váček obsahujících H_2O_2 (Obr. 3), (Ayliffe *et Lagudah*, 2004). Je známo, že H_2O_2 zprostředkovává propojování komponentů buněčné stěny, zvýšená tvorba H_2O_2 tedy může vést k rychlejší tvorbě pevnější fyzické bariery. H_2O_2 se zřejmě uplatňuje nejen v rezistenci zprostředkované *mlo*, kdy dochází k jeho hromadění v efektivních papilách, ale může mít také přímé antimikrobiální účinky a ve vyšších koncentracích i evokovat buněčnou smrt. U hypersenzitivní reakce zprostředkované lokusy *Mla12* a *Mlg* se prokazatelně zvyšuje jeho koncentrace v buňce. V nižších koncentracích může H_2O_2 vystupovat jako signální molekula, která podněcuje odpověď v okolních hostitelských buňkách. Na obranné odpovědi se podílejí také fytoalexiny, nízkomolekulární antimikrobiální látky, k jejichž hromadění dochází za biotického i abiotického stresu. U linií nesoucích rezistentní *mlo* alelu je fytoalexinu (konkrétně *p*-kumaroyl-hydroxyagmatinu) produkováno až dvakrát více než u linií citlivých (Hückelhoven *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2002).



Obr. 3: Funkce genů *Mla1*, *Mla6* a *Mlo/mlo* v rezistenci k padlí travnímu u ječmene. *Mla1* a *Mla6* jsou geny odpovědné za rasově specifickou rezistenci, kódují CC-NBS-LRR proteiny, které spouštějí obrannou odpověď. *Mla6* vyžaduje pomocné proteiny Rar1 a Sgt1, které se vážou na COP9 podjednotku signalosomu, což má za následek ubiquitinaci a následnou degradaci proteinů. Gen *Mlo* kóduje membránový receptor, který pravděpodobně interakcí s calmodulinem negativně reguluje obrannou odpověď. Jeho mutantní forma *mlo* spolu s pomocnými proteiny, mezi něž patří SNARE a SNAP umožňující exocytózu váčku s H₂O₂, zprostředkovávají rostlině rasově nespecifickou obrannou odpověď (převzato z Ayliffe *et* Lagudah, 2004).

2.3.3 Nehostitelská

Nehostitelskou rezistenci můžeme chápat jako obecnou rezistenci všech jedinců, kultivarů či ekotypů daného druhu hostitele ke všem známým izolátům nebo kmenům daného druhu patogena. (Schweizer, 2007). Nehostitelská rezistence využívá fyzických i chemických bariér rostliny, její princip předpokládá existenci dvou modelů. První je založen na nepřítomnosti adaptovaného efektoru patogena, což vede k aktivaci vysoce konzervovaných spouštěčů obranné odpovědi, jedná se o základní, trvalý typ rezistence. Druhý model staví na přítomnosti R genů mnohočetné rezistence kódujících NBS-LRR proteiny, které interagují s *Avr* a vedou k dlouhodobé rezistenci. Nehostitelská rezistence zůstává málo prozkoumána (Ayliffe *et* Lagudah, 2004; Schweizer, 2007).

U ječmene je známo velmi málo lokusů odpovědných za nehostitelskou rezistenci. Nejčastější reakcí na neodpovídající typ padlí travního je přestavba buněčné stěny a vytvoření efektivních papil. Podobně lokalizovanou odpověď, která nevede k apoptóze, indukuje i gen *mlo*, zprostředkovatel rasově nespecifické, dlouhodobé a hostitelské rezistence. Stejně jako při rezistenci podmíněné *mlo* genem se i v nehostitelské rezistenci uplatňují geny *Ror1*, *Ror2* a *HvSNAP34*, tedy podobné mechanismy. To potvrzuje i skutečnost, že buňky s nadměrnou expresí funkční alely *Mlo* se v důsledku negativní regulace hostitelské i nehostitelské odpovědi stávají citlivými i k neodpovídajícímu typu padlí.

Mezi projevy nehostitelské rezistence můžeme v některých případech zařadit i hypersenzitivní odpověď, typickou pro specifickou rezistenci R genů. Příkladem je reakce k neodpovídajícímu typu padlí travního např. k *Blumeria graminis f. sp. hordei* u pšenice (Schweizer, 2007).

2.3.4 Částečná a indukovaná rezistence

Při částečné rezistenci dochází ke zpomalení vývoje epidemie navzdory vysokému infekčnímu typu, je charakteristická závislostí na vnějších podmínkách. Indukovaná rezistence vzniká zesílením obranyschopnosti rostliny působením vnějších stimulů, je rozlišováno několik typů, LAR - lokálně získaná rezistence (local acquired resistance), SAR - systémově získaná rezistence (systemic acquired resistance), ISR - indukovaná systémová rezistence (induced systemic resistance) a WIR - indukovaná rezistence proti poranění býložravého hmyzu (wound-induced resistance). SAR je chápána jako rezistence tkání vzdálených od místa indukce, projevuje se jako úplná a vyžaduje signální molekulu kyseliny salicylové (SA). K indukci je používáno virulentních i avirulentních a nepatogenních mikrobů, chemických (např. SA, benzothiadiazol) nebo biologických látek. Indukovaná rezistence pšenice k padlí travnímu je studována, výsledky naznačují, že se efektivita různých induktorů oproti neošetřené kontrole pohybuje mezi 40 až 80 % a je závislá na počasí, tedy na podmínkách pro rozvoj padlí (Věchet *et* Burketová, 2008).

Vzhledem ke značné diverzitě a mutabilitě ve virulentních genech patogena je žádoucí hledat nové geny rezistence vůči konkrétním izolátům v určitém prostředí a pro dosažení efektivní rezistence při získávání rezistentní odrůdy kombinovat více genů různých typů

rezistence, které mapují v různých lokusech (tzv. pyramiding genů, Hsam *et al.*, 2002). Využití genů rezistence spočívá v jejich vnesení do citlivého hostitele ať již cestou moderního šlechtění, které je založeno na selekci zprostředkované markerem mapujícím v těsné vazbě k danému genu (MAS), nebo jejich přímým přenosem pomocí molekulárních metod, což vyžaduje získání sekvence genu a jeho regulačních oblastí cestou pozičního klonování.

2.4 POZIČNÍ KLONOVÁNÍ

Poziční klonování je experimentální postup, který vede k izolaci sekvence DNA odpovědné za určitý fenotyp. Je postaveno na souhře mnoha technik, které umožňují izolovat neznámý gen na základě znalosti jeho pozice v genomu. Pozičního klonování bylo úspěšně využito ke klonování řady biologicky i zemědělsky významných genů i QTL (Gresshoff, 2005). Prvním klonovaným genem byl v roce 1989 lidský gen odpovědný za cystickou fibrózu (Rommens *et al.*), u rostlin byla tato metoda poprvé aplikována v roce 1992 při klonování genu *ABI3* (Giraudat *et al.*, cit. Zhang, 2008) a genu pro desaturasi omega-3 mastných kyselin (Arondel *et al.*, cit. Zhang, 2008) u *Arabidopsis thaliana*. Poziční klonování u tak velkého a komplexního genomu, jaký má pšenice setá, který se navíc skládá ze tří homeologních genomů a je tvořen převážně repetitivními sekvencemi, bylo donedávna považováno za nemožné. Díky rozvoji molekulárních a sekvenačních technik a zejména s přípravou knihoven dlouhých inzertů byla tato domněnka vyvrácena a první úspěšné klonování genů u pšenice bylo publikováno v roce 2003. Doposud se podařilo klonovat celkem deset pšeničných genů, tři zodpovědné za vernalizaci *VRN-1*, *VRN-2* a *VRN-3* (Yan *et al.* 2003, 2004, 2006, cit. Devos *et al.*, 2009), jeden související se znaky domestikace *Q* (Faris *et al.*, 2003), jeden odpovědný za kontrolu homeologního párování *Ph1* (Griffiths *et al.*, 2006), jeden ovlivňující senescenci a obsah proteinů, Zn a Fe, gen *NAC* (Uauy *et al.*, 2006) a čtyři geny rezistence, z toho tři ke rzi pšeničné *Lr1*, *Lr10* a *Lr21* (Cloutier *et al.*, 2007; Feuillet *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003) a pouze jeden k padlí travnímu *Pm3* (Yahiaoui *et al.*, 2004).

K prvním krokům pozičního klonování genu patří detekce jeho spolehlivého fenotypu a odvození mapovací populace křížením dvou fenotypově kontrastních rodičů. Mapovací

populace umožňuje objasnit způsob dědičnosti tohoto genu a jeho lokalizaci na genetické mapě, a to vyhodnocením vazby dostupných markerů na mutantní fenotyp a identifikací hraničních markerů lokusu tohoto genu. Genetické vzdálenosti mezi jednotlivými lokusy jsou odhadovány na základě pravděpodobnosti rekombinace mezi nimi. K prvotnímu zamapování se používají zejména F_2 mapovací populace. Jejich výhodou je poměrně rychlá příprava, variabilita, možnost sledovat větší počet znaků, nevýhodou pak skutečnost, že jednotlivé linie nelze přemnožovat. Nesmrtelné linie mohou být z F_2 odvozeny několikerým samosprášením, jedná se o tzv. rekombinantní inbrední linie (RIL), jejichž výhodou je nejen nesmrtelnost, ale i vyšší rozlišení ve srovnání s F_2 , z nichž byly odvozeny, a taktéž skutečnost, že tyto linie již během šesti generací dosahují téměř úplné homozygotnosti (asi 95 %). Zcela homozygotní jsou dihaploidní linie (DH), které v jádře obsahují dvě naprosto identické sady chromosomů. Jsou ideálními rodiči pro křížení a tvorbu mapovacích populací. Dalším typem mapovacích populací jsou populace zpětných kříženců (BC). Jejich využití spočívá zejména ve studiu určitého fragmentu na genetickém pozadí kontrastního rodiče či ve vnášení cizího fragmentu do genomu, jehož ostatní výhodné znaky mají být zachovány. Šestou generaci zpětných kříženců tvoří již tzv. téměř izogenní linie (NILs), jež jsou takřka identické, liší se pouze selektovaným fragmentem kontrastního rodiče. Vnesením DNA fragmentu odlišné odrůdy vznikají tzv. meziodrůdové substituční linie, vnesením fragmentu jiného druhu tzv. introgresní linie. (Schneider, 2005).

Lokus, do něhož byl hledaný gen zamapován, je dále potřeba saturovat novými markery a identifikovat ten, který bude mapovat v co nejtěsnější vazbě s fenotypem a tedy ohraničovat oblast genu v co nejmenší vzdálenosti. Vzhledem k tomu, že v genomu existují sekvence s vyšším výskytem rekombinací a naopak místa, zejména heterochromatinové oblasti kolem centromery, kde k rekombinacím téměř nedochází, a že v případě křížení druhově vzdálenějších rodičů může být rekombinace v důsledku inverzí a translokací inhibována, genetické vzdálenosti zpravidla neodpovídají vzdálenostem fyzickým (Gresshoff, 2005). Faris *et al.* (2003), Yahiaoui *et al.* (2004) a Cloutier *et al.* (2007) získali při mapování pšeničných genů poměry fyzické a genetické vzdálenosti 212,5 kb/cM, 900 kb/cM a 51,9 kb/cM. Doporučována genetická vzdálenost hraničních markerů se pohybuje mezi 0,1 až 1,0 cM. (Gresshoff, 2005).

K získání nových markerů v pšenici je v poslední době využíváno kolinearit s příbuznými genomy. Přestože se jednotlivé druhy čeledi *Poaceae* evolučně rozdělily již před 65 miliony lety, mají různý počet chromosomů i různé ploidie a velikosti jejich genomů, které navíc prošly početnými přestavbami, se liší až 40 krát, zastoupení genů i jejich pořadí zůstalo ve velké míře konzervováno. To potvrzuje několik srovnávacích analýz nejen genomů jednotlivých druhů pšenice, ale i genomů pšenice, rýže, ječmene, žita, ovsa, kukuřice, prosa, cukrové třtiny a čiroku (Devos *et al.*, 2000; shrnuto ve Frary *et al.*, 2008; Sorrells *et al.*, 2003; Hackauf *et al.*, 2009). Zdrojem nových markerů tedy mohou být jak dostupné mapy pšenice, tak i mapy příbuzných plodin. Nejdůležitějším modelovým organismem pro obiloviny je bezesporu rýže setá (*Oryza sativa* L.), jímž se stala díky svému významu a své relativně malé velikosti genomu (430 Mb). Pro molekulárně biologické studie obilovin rýže jako model poskytuje jednak značné množství genetických zdrojů, mapovacích populací, introgresních/substitučních linií, NILs a mutantních linií, jednak tisíce ESTs, cDNA, DNA čipů, několik genomových databází (shrnuté v Xu *et al.*, 2005) a od roku 2002 i celogenomovou sekvenci obou poddruhů *indica* a *japonica* (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002, cit. Xu *et al.*, 2005), jejíž dostupnost značně usnadňuje poziční klonování u obilovin. V roce 2009 byla publikována také sekvence genomu čiroku (*Sorghum bicolor* L.) o velikosti 730 Mb (Paterson *et al.*). Jako nový model pro obiloviny se jeví *Brachypodium distachyon*, jehož genomová sekvence byla publikována v roce 2010 (Vogel *et al.*).

Dalším postupem pozičního klonování je skríníng knihovny dlouhých inzertů markery identifikovanými v těsné vazbě s hledaným genem. V současné době jsou nejčastěji používány knihovny založené na bakteriálních chromosomech (BAC). Využití BAC knihovny hexaploidní pšenice je z důvodu značného rozsahu jejího genomu dosti časově i finančně náročné, např. knihovna *T. aestivum*, která byla připravena v roce 2003 pro kultivar Chinese Spring a pokrývala genom 9,3 krát čítala 1,2 mil. klonů (Allouis *et al.*, 2003, cit. Devos *et al.*, 2009). Z tohoto důvodu přispěly k úspěšnému klonování převážně knihovny genomů menších, diploidních *T. monococcum* (Yan *et al.*, 2003; Yahiaoui *et al.*, 2004; Faris *et al.*, 2003) a *A. tauschii* (Cloutier *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2003) a tetraploidní *T. turgidum ssp. durum* (Yahiaoui *et al.*, 2004; Griffiths *et al.*, 2006). Yan *et al.* v roce 2003 využili také BAC knihoven rýže a čiroku, Cloutier *et al.* (2007) a Griffiths *et al.* (2006) BAC knihovny hexaploidní pšenice a Griffiths *et al.* (2006) získali nové markery díky BAC knihovny *Brachypodium sylvaticum*. Možnost redukovat velikost genomu hexaploidní pšenice

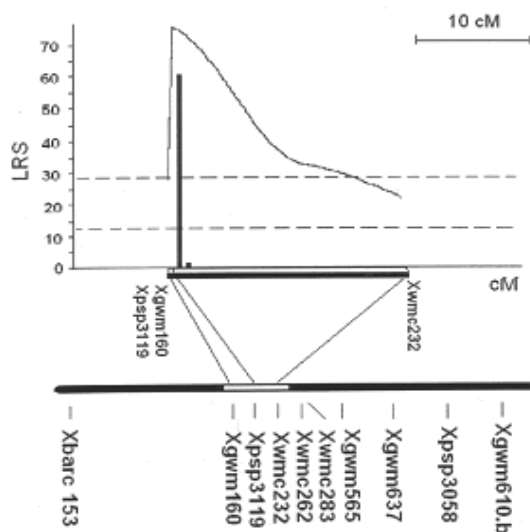
efektivněji než pomocí druhů s nižší ploidií a další usnadnění pozičního klonování nabízejí BAC knihovny připravené z jednotlivých cytometricky tříděných chromosomů nebo ramen chromosomu. První chromosomově specifická BAC knihovna pro eukaryotický organismus byla připravena v roce 2004 z 3B chromosomu pšenice (Šafář *et al.*, cit. Devos *et al.*, 2009).

BAC knihovna je identifikovanými hraničními markery skrínována buďto hybridizací na membránách s nanesenými replikami knihoven nebo pomocí PCR. Pozitivní BAC klony nebo jejich konce jsou osekvenovány, získané sekvence mohou být zdrojem nových markerů polymorfních v mapovací populaci s těsnou vazbou a blíže ke genu. Skrínováním knihovny koncovou sekvencí BAC klonu je nalezen sousední klon. Tento postup je nazýván „chromosome walking“. Pokud je za účelem překlenutí větší vzdálenosti nebo mezery v sekvenci využita speciální knihovna s klony, jejichž inzert vznikl spojením dvou sekvencí vzdálených od sebe až 200 kb, pak hovoříme o „chromosome jumping“ (shrnuto v Gresshoff, 2005; Doškař, 2005). Cílem je sestavit lokální kontig a vybrat BAC klon, který obsahuje kandidátní gen či geny. V případě, že je k dispozici integrovaná fyzická a genetická mapa a/nebo sekvence celého genomu a je tedy znám poměr genetické a fyzické vzdálenosti v jednotlivých částech genomu, není „chromosome walking“ nutný a pozice genu i klony, které jej obsahují, lze předpovědět a identifikovat přímo (tzv. „gene golfing“), (Zhang *et Wing*, 1997, cit. Zhang, 2008). Vybraný kandidátní klon je osekvenován, anotace sekvence umožní identifikovat potenciální funkční geny i pseudogeny a předpovědět proteinovou strukturu a funkci genu. Následuje přesná sekvenace mutantních i kontrastních alel vybraných kandidátních genů a detekce polymorfismů (SNP). Je charakterizováno, jaký má identifikovaný SNP vliv na změnu struktury proteinu. (Zhang, 2008; Gresshoff, 2005).

Závěrečnou fází pozičního klonování je verifikace kandidátního genu a jeho charakterizace z hlediska regulace a funkce. Existuje několik přístupů, jak gen verifikovat, např. křížením, transformací nebo využitím RNA interference. Geny *Pm3*, *Lr21* a *Lr1* byly verifikovány pozitivní transformací bombardováním citlivé rostliny plasmidy s kandidátním a reportérovým genem (Yahiaoui *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2003), *Lr1* navíc i pomocí virem indukovaného umlčení genu (VIGS – virus-induced gene silencing), kdy genom viru obsahoval vnesenou část kandidátního genu v „antisense“ orientaci (Cloutier *et al.*, 2007). *Q* gen byl verifikován detekcí delece v kandidátním genu u *q* mutantů, jejichž fenotyp byl indukován neutronovým zářením (Faris *et al.*, 2003).

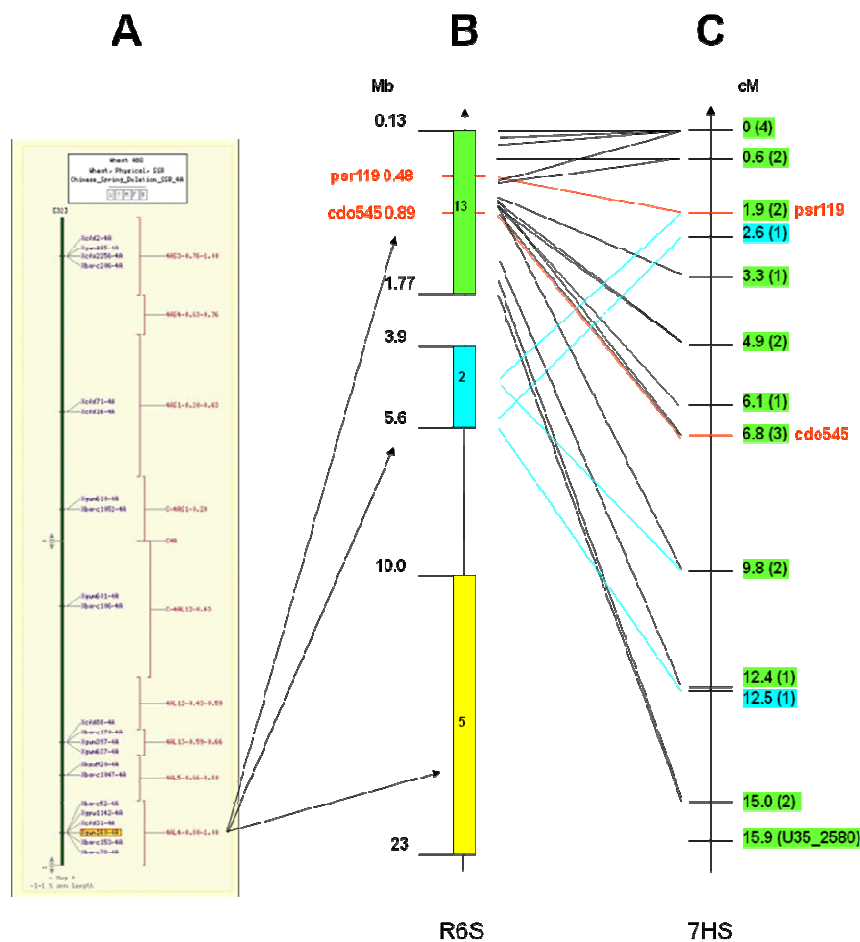
2.5 MAPOVÁNÍ GENU REZISTENCE DOSPĚLÝCH ROSTLIN K PADLÍ TRAVNÍMU U PŠENICE

Křížením citlivého kultivaru pšenice seté Tähti a tetraploidní *T. militinae* byly získány hybridní linie, jež byly rezistentní k padlí travnímu ve stádiu klíčících i dospělých rostlin (Jakobson *et al.*, 2006). Křížením Tähti s jednou z těchto linií označenou 8/1, pro kterou byla charakteristická vysoká a v průběhu tří let stabilní rezistence, byla odvozena $F_{2:3}$ populace, v níž byly identifikovány dva QTLs odpovědné za rezistenci k padlí travnímu u dospělých rostlin. Hlavní lokus byl nazván *QPm.tut-4A* a zamapován na dlouhé rameno 4A mezi markery *gwm160* a *wmc232* s těsnou vazbou ke *gwm160* (Obr. 4). Rezistentní linie nesly v této oblasti translokovaný úsek z *T. militinae*. Stejná translokace souvisela i s rezistencí klíčících rostlin. Druhý QTL pro rezistenci u dospělých rostlin byl detekován na 5A, bylo prokázáno, že pokud tento QTL lokus obsahuje segment z *T. militinae*, účinek genu *QPm.tut-4A* je zvyšován.



Obr. 4: Mapa lokusu *QPm.tut-4A*. QTL odpovědný za rezistenci k padlí travnímu u dospělých rostlin mapuje v populaci 8/1 x Tähti na dlouhé rameno chromosomu 4A do oblasti mezi hraničními markery *gwm160* a *wmc232*, blíže *gwm160*. Markery *barc153* a *gwm610.b* na okrajích zobrazeného úseku 4AL orientují oblast genu, *barc153* podle dostupných genetických map směřuje k telomeře a *gwm610.b* k centromeře.

Studium kolinearity mezi mapou sledovaného lokusu a ostatními mapami hexaploidní pšenice, či sekvencemi rýže a *Brachypodia* vedlo k identifikaci markerů a genů, jimiž by genetická mapa v oblasti genu *QPm.tut-4A* mohla být satureována (Valárik *et al.* 2009). 91 jednokopiových ESTs z distálního binu deleční mapy 4AL (4AL-0.80-1.00) bylo mapováno do rýže, 48 z nich mapovalo na rýžových chromosomech 1 až 6, přičemž nejrozsáhlejší skupina 20 ESTs mapovala do konce krátkého ramene rýžového chromosomu 6 (R6S). Jako nejpravděpodobnější kolineární oblast k *QPm.tut-4A* lokusu, s nejvyšší koncentrací kolineárních genů, byla vybrána oblast R6S od telomery po 1,77 Mb. Do tohoto úseku mapovalo celkem 13 ESTs z binu 4AL-0.80-1.00, z nichž byly odvozeny markery *owm10* až *owm22* (Obr. 5, Tab. V, výsledky). Porovnáním kolinearity genetických map založených na markerech z kódujících oblastí s SSR mapami chromosomu 4AL pšenice byly identifikovány dva z genů odvozené markery (*psr119* a *cdo545*), které nejpravděpodobněji ohraničují oblast genu reprezentovanou markerem *gwm160*. *Psr119* mapoval na R6S ve vzdálenosti 0,48 Mb a *cdo545* ve vzdálenosti 0,89 Mb od telomery, oba tedy podpořily hypotézu, že oblast R6S od telomery po 1,77 Mb je kolineární s *QPm.tut-4A* lokusem. Na základě kolinearity rýžového genomu s EST mapou ječmene byla identifikována 16 cM dlouhá oblast na konci ječmenového chromosomu 7S, do níž mapovalo 11 genů identifikovaných na R6S v oblasti kolineární k lokusu *QPm.tut-4A*, včetně *psr119* a *cdo545* (Obr. 5). V genomu *Brachypodia distachyon* byl úsek kolineární k těmto oblastem identifikován na chromosomu 1.



Obr. 5: Kolinearita mezi pšenící, rýží a ječmenem v oblasti genu *QPm.tut-4A* (převzato z Valárik *et al.*, 2009). **A) Deleční mapa chromosomu 4A pšenice s markerem *gwm160* zamapovaným v posledním binu 4AL-0.80-1.00. **B**) Segment krátkého ramene rýžového chromosomu 6 (R6S) se zamapovanými ESTs z posledního binu 4AL. Obdélníky představují oblasti, do kterých ESTs mapovaly, jejich číslo pak počet ESTs mapovaných do této oblasti. Markery *psr119* a *cdo545* identifikované na několika dalších pšeničných mapách jako markery ohraničující *gwm160* mapovaly společně do oblasti nejbliže telomeře. **C**) Segment krátkého ramene sedmého chromosomu ječmene (7HS) se zamapovanými ESTs z posledního binu 4AL. Všimněte si, že první dvě oblasti označené na R6 se v ječmenu překrývají, což naznačuje, že by se pravděpodobně nemusely oddělovat ani v rýžovém genomu.**

2.6 IDENTIFIKACE JEDNOTLIVÝCH ALEL GENU *Mla* ODPOVĚDNÉHO ZA RASOVĚ SPECIFICKOU REZISTENCI K PADLÍ TRAVNÍMU U JEČMENE

Významná rodina genů *Mla*, které zprostředkovávají rasově specifickou rezistenci k padlí travnímu u ječmene, zahrnuje 32 známých alel se specifitou k určitému izolátu padlí travního, u divokého ječmene bylo popsáno nejméně 20 alel vysoce efektivních (Jahoor *et al.* 1993, Kintzios *et al.*, 1995, cit. Mejlhede *et al.*, 2006). Pro jejich využití ve šlechtitelství je ovšem nezbytné jednotlivé efektivní alely snadno a správně identifikovat. Alely *Mla* jsou běžně determinovány podle fenotypového projevu pomocí sady izolátů padlí travního. Pro efektivnější selekci alel zprostředkovanou markerem (MAS) byly v roce 1992 odvozeny RFLP markery (Schüller *et al.*) a v roce 2006 Mejlhede *et al.* využili pro identifikaci SNP v jednotlivých alelách *EcoTILLING*.

Gen *Mla* má délku 4665 bp a skládá se ze dvou exonů. Mejlhede *et al.* (2006) navrhli primery na základě porovnání dostupných kódujících sekvencí alel *Mla1*, *Mla6*, *Mla12* a *Mla13* z *H. vulgare ssp. vulgare* v prvním exonu v místech, jež nebyly mezi těmito alelami polymorfní. Délka PCR produktů byla po štěpení enzymem CEL I stanovována na sekvenátoru s využitím fluorescenčního značení. Nevýhodou je, že tato metoda není pro své vysoké finanční nároky i nároky na laboratorní vybavení přístupná šlechtitelům. Cílem projektu, jehož součástí je i tato práce, je tedy navrhnout takové markery pro identifikaci jednotlivých alel *Mla*, které by byly využitelné ve šlechtitelské praxi. Úkolem této práce bylo osekvenovat PCR produkt *Mla* alel u diverzního souboru vzorků ječmene a na základě sekvenčních rozdílů identifikovat COS markery pro jednotlivé alely.

3 CÍLE PRÁCE

První okruh cílů této práce byl zaměřen na saturaci genetické mapy v lokusu genu rezistence dospělých rostlin k padlí travnímu u pšenice, patřilo mezi ně:

- 1) zvětšit rozlišení F_3 mapovací populace 8/1 x Tähti a selektovat linie rekombinantní v oblasti genu *Q_{Pm.tut-4A}*,
- 2) otestovat a zamapovat nové markery,
- 3) pro umožnění skríningu BAC knihovny markery z oblasti genu *Q_{Pm.tut-4A}* ověřit, zda tyto markery poskytují v modelovém kultivaru Chinese Spring tentýž produkt jako v mapovací populaci 8/1 x Tähti,
- 4) ověřit kolinearitu oblasti na R6S identifikované jako homologní k *Q_{Pm.tut-4A}* lokusu.

Druhá část této práce se zabývá studiem sekvenční diverzity alel genu *Mla*, genu rasově specifické rezistence k padlí travnímu u ječmene, cílem bylo:

- 1) osekvenovat u diverzního souboru vzorků ječmene část exonu genu *Mla* a na základě sekvenčních rozdílů identifikovat COS markery pro jednotlivé alely.

4 MATERIÁL A METODY

4.1.1 MATERIÁL

Pšenice:

- 1) F_{2:3} a DH linie mapovací populace z křížení *T. aestivum* cv. Tähti s hybridní linií 8/1, která byla odvozena křížením *T. aestivum* cv. Tähti a *T. militinae* a vykazovala vysokou a stabilní rezistentní odpověď k padlí travnímu u dospělých rostlin (Jakobson *et al.*, 2006).
- 2) F₂ mapovací populace z křížení hybridní linie 8/1 a *T. aestivum* cv. Chinese Spring (Kadri Järve, Tallinn University of Technology, Estonsko)
- 3) 4AL telosomická linie nesoucí *T. militinae* translokaci odvozená z křížení hybridní linie 8/1 a *T. aestivum* cv. Chinese Spring 4AL telosomické linie. (Kadri Järve, Tallinn University of Technology, Estonsko), z jejichž synchronizovaných semen bylo cytometricky natříděno a metodou MDA amplifikováno rameno 4AL (Hana Šimková, ÚEB, Olomouc)
- 4) ITMI populace RILs z křížení syntetické hexaploidní pšenice W-7984 a *T. aestivum* cv. Opata 85 (Piere Sourdile, INRA, Francie)
- 5) Ditelosomická (4AS) a nullitetrasomická linie (N4AT4D) (Prof. Endo, Japonsko)

Ječmen:

Pro sekvenování úseku genu rezistence k padlí travnímu z rodiny *Mla* bylo použito celkem 40 kultivarů *Hordeum vulgare*, viz Tab. I. (Dr. Dreiseitl, Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o.)

Tab I: Genové zdroje alel *Mla* ječmene, jednotlivé alely byly identifikovány na základě fenotypového projevu.

genový zdroj	alela <i>Mla</i>	genový zdroj	alela <i>Mla</i>	genový zdroj	alela <i>Mla</i>
DIAMANT	<i>Mla8</i>	KM G 995/97	<i>Mla19</i>	KM C 351/03	<i>Mla25</i>
AMULET	<i>Mla13</i>	KM D 407/99	<i>Mla20</i>	KM B 192/00	<i>Mla26</i>
KM A 84/99	<i>Mla16</i>	KM D 464/99	<i>Mla20</i>	KM C 213/01	<i>Mla26</i>
KM B 223/98	<i>Mla16</i>	KM D 487/99	<i>Mla20</i>	KM D 294/01	<i>Mla26</i>
KM B 300/98	<i>Mla16</i>	KM J 1450/98	<i>Mla20</i>	KM D 413/03	<i>Mla26</i>
KM B 141/99	<i>Mla17</i>	KM H 657/95	<i>Mla21</i>	KM D 473/ 03	<i>Mla26</i>
KM C 330/98	<i>Mla17</i>	KM H 663/95	<i>Mla21</i>	KM C 420/00	<i>Mla27</i>
KM D 535/98	<i>Mla17</i>	KM H 723/94	<i>Mla21</i>	KM E 465/01	<i>Mla27</i>
KM C 120/96	<i>Mla18</i>	KM L 1711/98	<i>Mla21</i>	KM E 530/01	<i>Mla27</i>
KM C 358/99	<i>Mla18</i>	KM A 1/01	<i>Mla25</i>	KM G 733/01	<i>Mla28</i>
KM E 713/98	<i>Mla18</i>	KM A 19/01	<i>Mla25</i>	KM G 789/01	<i>Mla28</i>
KM A 1386/94	<i>Mla19</i>	KM A 73/00	<i>Mla25</i>	KM G 800/01	<i>Mla28</i>
KM E 241/96	<i>Mla19</i>	KM A 92/00	<i>Mla25</i>	KM I 756/99	<i>Mla28</i>
KM F 1094/95	<i>Mla19</i>				

4.1.2 ROZTOKY A MEDIA

5 x TBE pufr 5,4 % Tris base, 2,75 % kyseliny borité, 10 mM EDTA (pH = 8), pH 8,0

6 x STOP C 0,1M EDTA (pH = 8), 1% SDS, 0,05 % bromfenolové modři, 0,05 % xylencyanolu, 0,425 % glycerolu

Basic Lysis Buffer 0,5 M NaCl, 0,1M Tris-HCl, 0,05M EDTA, pH 7,2

2YT medium 1,6 % enzymatického kaseinového hydrolyzátu, 1 % kvasničného autolyzátu, 0,5 % NaCl, 1,6 % agaru

Tekuté LB medium 1 % enzymatického kaseinového hydrolyzátu, 0,5 % kvasničného autolyzátu, 0,5 % peptonu, 1 % NaCl, pH 7,2 – 7,4

10 x PCR pufr 100 mM Tris-HCl (pH = 8,2), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100

P1 resuspendační pufr 50 mM Tris-Cl (pH 8,0), 10 mM EDTA

P2 lyzační pufr 200 mM NaOH, 1 % SDS

P3 neutralizační pufr 3 M octan draselný, pH 5,5

4.1.3 KOMERČNÍ KITY

Agencourt® Genfind™ V2 Blood and Serum DNA Isolation Kit (Beckman Coulter, USA)

Agencourt AMPure (Beckman Coulter, USA)

Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter, USA)

Agencourt CosMCPrep (Beckman Coulter, USA)

Invisorb Spin PCRapid kit (Invitek, Německo)

TOPO® XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, USA)

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)

4.1.4 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

homogenizátor MM 301 (Retsch, Německo)

centrifugy MICROMAX RF, CR 4i (Thermo Scientific, USA)

třepačka s inkubátorem NBS C24 (New Brunswick Scientific Co., Inc., USA)

hybridizační inkubátor, model 400 (Robbin Scientific, Kanada)

fluorometr GloMax®-Multi Jr Single Tube (Turner BioSystems, USA)

NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)

PCR cyclery PTC – 200 (MJ Research, USA), C1000™ (Bio-Rad, USA)

vertikální elektroforetická aparatura C-DASG-400-50 (C.B.S. Scientific Company, Inc., USA)

elektroforetická komůrka Owl B2 EasyCast Mini Gel System (Thermo Scientific, USA)

zdroje Standard Power Pack P25 (Biometra) a MP 300V (Major Science, USA)

dokumentační systém (Syngene, Velká Británie)

cell-porator (BRL Life Technologies, USA)

sekvenátor 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)

robotická stanice Biomek® NX^P (Beckman Coulter, USA)

4.1.5 IZOLACE DNA

DNA byla izolována z mladých listů pšenice. Tři 3 cm dlouhé segmenty listu byly usušeny 24 h při 37 °C a homogenizovány skleněnými kuličkami 4 min při 27 otáčkách. Poté byl každý vzorek resuspendován v 1 ml lyzačního pufru. Lyzační pufr byl připraven z Basic Lysis Buffer, 0,5 % thiosíranu sodného, 0,1 % kyseliny askorbové, 0,2 mM merkaptoethanolu a 10 µg/l RNAasy (Invitrogen, USA). Buňky byly lyzovány při 65 °C po dobu 45 min. Následovala centrifugace 10 min při 1300 g pro 96 jamkové misky anebo 5 min při 9300 g pro mikrozkuřavky.

K purifikaci byl použit Agencourt® Genfind™ V2 Blood and Serum DNA Isolation Kit (Beckman Coulter, USA). K 5 µl suspenze magnetických kuliček bylo přidáno 100 µl lyzátu a 70 µl izopropanolu. Pro navázání DNA na magnetické kuličky byly vzorky inkubovány 5 min při pokojové teplotě a poté umístěny na magnet. Po vyčíření byl supernatant odpipetován a kuličky byly promývány dvakrát 100 µl Wash Buffer I a jednou 100 µl Wash Buffer II. Magnetické kuličky byly v promývacích pufrech resuspendovány vždy mimo magnet a po umístění na magnet byl čirý roztok odpipetován. DNA byla eluována 40 µl H₂O a odebrána do čisté misky. Koncentrace izolované DNA byla měřena na NanoDropu či fluorometru za použití barviva PicoGreen (Molecular Probes, USA) nebo odhadnuta po separaci na agarózovém gelu na základě porovnání se standardem molekulové váhy.

4.1.6 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Polymerázové řetězové reakce bylo použito ke genytopování, mapování nových markerů a skrínování bakterií. 100 µl reakční směsi PCR standardně obsahovalo *Taq* polymerasu (2U), 1x PCR pufr, nukleotidy (0,2 mM každého), (Fermentas, Kanada), F (forward) a R (reverse) primery (1 µM každého), (Invitrogen, USA), DNA (5 – 50 ng) nebo stěr bakteriální kolonie. Směsi byly připravovány v různých objemech podle potřeby. Reakce probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 5 min při 95 °C, 40 cyklů: denaturace 30 s při 95 °C, „annealing“ 30 s a „elongace“ při 72 °C, teploty nasedání primerů a doby „elongace“ jsou pro jednotlivé markery uvedeny v Tab. II. Reakce byla zakončena polymerací 10 min při 72 °C.

Tab. II: Seznam používaných markerů a jejich podmínky PCR

Marker	Primery	Teplota pro „annealing“	Doba „elongace“
Barc70	F_GCGAAAAACGATGCGACTCAAAG R_GCGCCATATAATTCAGACCCACAAAA	55 °C	30 s
Barc78	F_CTCCCCGGTCAAGTTTAATCTCT R_GCGACATGGGAATTTGAGAAGTGCCTAA	55 °C	30 s
Gwm160	F_TTCAATTCAGTCTTGGCTTGG R_CTGCAGGAAAAAAGTACACCC	60 °C	20 s
Gwm832	F_TGGGTTTCTGACCATGTTTG R_GCAGAGTTGCTCATACTCAA	55 °C	30 s
Gwm855	F_ACCTTGAGGACATACAGAAT R_AAAGGATATCTAACTCCCAC	50 °C	20 s
Psp3119	F_GATCGGTCGCGAGTTGTTTCTTTT R_GATCATGGCTGCAACACACACA	55 °C	30 s
Psr119	F4_TGGGAAGATGAAGGCGAAG R5_GCTCGGACTTCTTCAGTTGC	50 °C	30 s
Wmc232	F_GAGATTTGTTTCATTTTCATCTTCGCA R_TATATTTAAAGGTTAGAGGTAGTCAG	51 °C	30 s
Wmc283	F_CGTTGGCTGGGTTATATCATCT R_GACCCGCGTGTAAGTGATAGGA	60 °C	20 s
3.1.1	F1_GCAAGTATGAGAAAGTTAATGGCT R1_ATCAGGGCATGATTTATTGTCCAT	55 °C	30 s
Mla*	F_AGCAGCTCGACAGCCAAGACAA R_CCCAACCCTCCAAATCCAACAA	64 °C	30 s

*Primery byly použity podle Mejlhede *et al.* (2006).

Podmínky reakce pro markery *owm10* až *owm22* byly vždy při prvním testování následující: počáteční denaturace 5 min při 95 °C, 40 cyklů: denaturace 30 s při 95 °C, „annealing“ 30 s při 55 °C a „elongace“ 3 min při 72 ° a závěrečná polymerace 10 min při 72 °C. Podmínky byly u jednotlivých markerů následně podle potřeby optimalizovány. Pro každý marker byly testovány všechny smysluplné kombinace primerů, jejichž sekvence jsou uvedeny v Tab. III.

Tab. III: Sekvence primerů navržené pro markery *owm10* až *owm22*

Marker	Primer	Sekvence	Marker	Primer	Sekvence
<i>owm10</i>	F1	GAAGAGAAGGACGGGGTGAT	<i>owm16</i>	R3	GCTTACCAAAAACGCCACAA
	R1	GCAACGCACAGCCTCTATATC		R4	GCATGGTTCAAATAGCACAA
	F2	TGAAGCCTACAGCCAGTCAA	<i>owm17</i>	F1	GCGTCCAGATCACAACAAC
	F3	CAGTTGGAGTGAGAAGTGACAGA		F2	CACCTAATGGATTTTCAGAAGC
	R3	GATCACCTTTTTCAAGTTTCTGC		R2	CCGCGTGCTGAGAACTG
	R4	GGTAGAACAGTGGCACGATCA		F3	ACAACATCATGACCCCTCT
<i>owm11</i>	F1	CATCTCGGGCTTCGTATAC		R3	TCATCTGCTCCGAGTATGTCC
	R1	TGCACTGGTTTATCAGATGCTT		F4	CCCTTAATCGTTCAACAGC
	F2	ACTCCTCCAAATGGACATGG	R4	TGATGAGATGAATCAAAGGCTCT	
	R2	GAAGATCCACAAGGAACCA	<i>owm18</i>	F2	GGCATGGAGTCGGTGATAGA
	F3	AGGTGAAACTTGACTGGGACA		R2	GGTGGCCGAGATTTGTAGA
	R3	CGAGAGATGCGCTTCAAAGT		F3	TGAGGAAAACATCAGAACCTTG
	F4	TCCAGGCTGAACGAGAAATC		R3	TCCATGCATGTCATCAACTG
	R4	CTCCATTACCGTTGTTGT		F4	TTGGAGCTACGAATAGACCTGA
<i>owm13</i>	F1	TCCCTTCAGAATGCAATCAA		R4	CCCTGCTGTATCAACCAACG
	F2	GGATCCAGTATTCCGGAGAG		R5	CATGTGACATCAGGCACAGA
	R2	AGACAGCATCTACATGGATATCACC		<i>owm19</i>	F1
	F3	TGTTCAAGTGCCAACTCTCG	R1		TAGTCCATACCCCTTTGTTTTCA
	R4	TTGAAATGGACATATTGGTCTCC	F2		TGAAAAACAAAAGGGTATGGA
	F5	AACAGCGCATGCTTCTCG	R2		ACAAATGCGATAGACTGGTATCTA
	R5	CAGGTGGCAGGTGTAGCTTT	F3		TCCAACCTTGAGTGCCTCAGC
<i>owm14</i>	F1	GCATGTCGTGCGAGCAG	R3	GGCAGATATTCCTGCTGGTG	
	R1	CATAAAAGAACATTAATTGCAGTGAG	<i>owm20</i>	F1	AAGAGGTTTTTGGTGATGG
<i>owm15</i>	F1	ACAGGACAACGTCCAAGGTC		R1	GCCGCCAATTGTTAGAAAAG
	R1	CTGCCTGTCCATGATCTCCT		F2	CAGCCAAGAAGTGGGAGGAC
	F2	CGAGCCTGGCCTACTTTGAC		R2	CGCAATCTCCTCGGAAT
	R2	TCATTTATGCTAAAATTCAGTCAG		F3	GCGCAAGATCAACTGGATG
<i>owm16</i>	F1	TGTAACAACATCTTGATTCTGTAATGA	R3	GGGTCCCACTCGCTAACAT	
	R1	TGTCCATGGAGCAGAACAGT	<i>owm21</i>	F1	ATAAGCAAGGAGACGGTGGA
	F2	CACTGCCACTTTGAGTGCAT		R1	ATGGAAGAAGGGAGCATGG
	R2	ACAACATCTCCTGGCGTACC	<i>owm22</i>	F1	TTTAAGAAGGCGTACAGAACTGC
	F3	CACCACTGCTGCGCTTTC		R1	AGCATCAGGCTATTGGTAGC

4.1.7 ELEKTROFORÉZA

Fragmenty DNA byly separovány elektroforézou v 3,5% nebo 6% polyakrylamidovém (PAA) nebo 1% agarózovém gelu. PAA gel byl připraven ze směsi akrylamid/bisakrylamid v poměru 19:1 (Sigma-Aldrich, USA), 0,073 % TEMED (Sigma-Aldrich, USA) a 0,07 % persíranu amonného v 0,5 x TBE pufru. Polymerace gelu trvala asi 40 min. Elektroforéza byla prováděna v 0,5 x TBE pufru, do pufru v anodové nádobě elektroforetické aparatury bylo rozmícháno 10 µl 10% roztoku ethidium bromidu a po „pre-run“ 1 h při 300 V byly na gel naneseny vzorky. Ke vzorkům byla přidána 1/10 objemu nanášecího pufru 6 x STOP C. Standardem molekulové váhy byl 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Kanada) v 1 x STOP C v množství 100 ng. Samotná separace probíhala při 350 V 30 až 120 min v závislosti na délce separovaných fragmentů. DNA byla vizualizována na UV transluminátoru.

Agarózový gel byl připraven jako 1% roztok agarózy v 0,5 x TBE pufru. Vzorky byly nanášeny s 6 x STOP C pufrům a separovány při 90 V. Poté byl gel vložen do roztoku EtBr (0,5 mg/ml) po dobu 20 min. Obarvená DNA byla vizualizována na UV transluminátoru.

4.1.8 ŠTĚPENÍ PCR PRODUKTU

Některé markery, jejichž PCR produkt nebyl mezi rodiči polymorfní v délce fragmentu, byly převedeny buďto na RFLP-PCR markery, kdy byl tento produkt štěpen náhodně vybranými endonukleasami, nebo na CAPS markery, kdy byl produkt štěpen konkrétní endonukleasou, navrženou pomocí programu NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) s restrikčním místem zahrnujícím SNP, jež byl detekován na základě znalosti sekvence. Reakční směs obsahovala 5 µl PCR reakce, 5 U enzymu a pufr do celkového objemu 10 µl. U většiny enzymů se jednalo o 1x PCR pufr, pouze u HpyCH4IV o NEB1 a u SmaI o NEB4 pufr. Štěpení probíhalo 1 h při teplotě vhodné pro daný enzym. V této práci byly použity endonukleasy SmaI, štěpena při 25 °C, AluI, BamHI, FokI, HaeIII, HpyCH4IV, MboII, NlaIII, RsaI, XbaI, (BioLabs, USA), KpnI SacI, (Fermentas, Kanada), jež byly štěpeny při 37 °C a BsrI, TseI (BioLabs, USA) a TaqI (Fermentas, Kanada), štěpené při 65 °C.

4.1.9 PURIFIKACE PCR PRODUKTU

PCR produkty určené pro zaklonování byly před ligací purifikovány dvěma metodami, pomocí kitu Invisorb Spin PCRapid (Invitek, Německo) nebo magnetických kuliček Agencourt AMPure (Beckman Coulter, USA).

Při purifikaci kitem Invisorb Spin PCRapid Kit, který je určen pro purifikaci PCR fragmentů v délce 80 bp až 30 kb, bylo postupováno podle pokynů výrobce. Ke vzorku bylo přidáno 130 μ l Buffer P a směs přenesena na kolonku. Po 1min inkubaci následovala centrifugace 30 s při 9300 g, promytí kolonky 700 μ l Wash Buffer, opětovná centrifugace 30 s při 9300 g, vylití roztoku a centrifugace 3 min při maximálních otáčkách (20000 g) pro odstranění zbytku ethanolu z Wash Buffer. Poté byla kolonka přenesena do čisté mikrozkušavky, do jejího středu bylo napipetováno 20 μ l Elution Buffer a po minimálně 3 min inkubace při pokojové teplotě byly vzorky stočeny 1 min při 9300 g.

Při purifikaci PCR produktu magnetickými kuličkami Agencourt AMPure, jež jsou určeny pro purifikaci PCR produktů delších než 100 bp, bylo postupováno následovně. K PCR produktu byl přidán stejný objem suspenze kuliček, jako byl objem PCR reakce. Po promíchání a 5 min inkubace byla destička se vzorky umístěna na magnet. Po vyčíření byl roztok odpipetován a kuličky s navázanou DNA dvakrát promyty 200 μ l 70% ethanolu, přičemž miska zůstala umístěna stále na magnetu. Po odpipetování veškerého ethanolu byly vzorky vysušeny v inkubátoru při 37 °C (cca 5 min). DNA byla mimo magnet eluována do 40 μ l H₂O a po 5 min inkubace při pokojové teplotě odebrána, opět na magnetu, do čisté misky.

4.1.10 KLONOVÁNÍ PCR PRODUKTU

PCR produkt určený k sekvenování byl do bakterií zaklonován pomocí TOPO® XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, USA). Ligační směs tvořily 0,3 μ l klonovacího vektoru a 4 μ l purifikované DNA. Po 5 min inkubace při pokojové teplotě byla ligace zastavena 0,7 μ l Cloning Stop Solution. 0,7 μ l ligační směsi bylo smícháno s 15 μ l elektrokompetentních buněk *E. coli*. Po krátké inkubaci na ledu byly bakterie transformovány elektroporací při 330 V, následně resuspendovány v S.O.C. mediu (500 μ l media na 1 bioassay) a inkubovány za třepání 1 h při 37 °C. Poté byla suspenze buněk nanášena na 2YT selekční medium

s kanamycinem v koncentraci 0,05 mg/ml (SERVA, Německo). Bakterie byly kultivovány do druhého dne při 37 °C. Jestliže byly klonovány delší fragmenty, bakterie byly přímo skrínovány na přítomnost žádaného inzertu PCR reakcí se specifickými primery v objemu 50 µl. PCR produkt byl poté sekvenován. V případě klonování krátkých fragmentů, které měly být následně sekvenovány z nescifických primerů z plasmidu, byly bakterie přeočkovány na nové medium, kultivovány do druhého dne při 37 °C, poté skrínovány pomocí PCR a z vybraných pozitivních klonů byl izolován plasmid (viz izolace plasmidu).

4.1.11 IZOLACE PLASMIDU

Plasmidy byly z bakterií izolovány tehdy, když bylo zapotřebí sekvenovat krátké inzerty z univerzálních primerů M13 (F - GTAAAACGACGGCCAGT, R – GGAAACAGCTATGACCATG), (Invitrogen, USA). Kolonie pozitivní na žádaný inzert byly přeneseny do 3 ml tekutého LB média, k němuž byl přidán kanamycin do koncentrace 0,05 mg/ml, a inkubovány do druhého dne za třepání při 37 °C a 250 rpm. Narostlé kolonie bakterií byly stočeny 10 min při 3100 g. Supernatant byl slit a pelet resuspendován ve 100 µl resuspendačního pufru P1 s 1 µl RNAsy (10 mg/ml) a přenesen do čisté 1,5ml mikrozkušavky. Posléze k němu bylo přidáno 100 µl lyzačního pufru P2 a po 5 min inkubace při pokojové teplotě 100 µl vychlazeného neutralizačního pufru P3. Vzorky byly inkubovány na ledu po dobu 10 min a nato centrifugovány 10 min při 9300 g.

K přečištění plasmidu bylo použito magnetických kuliček Agencourt CosMCPrep (Beckman Coulter, USA), jež jsou určeny pro plasmidy nebo fosmidy v délce 5 kb až 150 kb. K 110 µl lyzátu bylo přidáno 10 µl suspenze magnetických kuliček a 80 µl izopropanolu. Po 5 min inkubace byla miska se vzorky přenesena na magnet, roztok po vyčíření odpipetován a kuličky s navázanou DNA dvakrát promyty 100 µl 80% ethanolu. Po odebrání veškerého ethanolu byly vzorky vysušeny při 37 °C (cca 5 min). DNA byla mimo magnet eluována do 40 µl H₂O a po 5 min inkubace při pokojové teplotě opět na magnetu odebrána do čisté misky. Koncentrace izolovaného plasmidu byla měřena fluorometricky nebo odhadnuta na základě porovnání se standardem molekulové váhy po elektroforetické separaci na agarózovém gelu.

4.1.12 SEKVENOVÁNÍ

Sekvence byly získány metodou klasického Sangerova sekvenování kitem BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA) a následnou separací kapilární elektroforézou. Na jednu sekvenační reakci bylo zapotřebí 5 – 20 ng PCR produktu (pro fragmenty v délce 200 – 1000 bp) nebo 100 – 200 ng plasmidu. Každý vzorek byl sekvenován z obou primerů. PCR produkt byl před samotnou sekvenační reakcí purifikován působením enzymů exonukleasy I a alkalické fosfatasy (ExoSap).

Reakční směs ExoSap obsahovala na jeden vzorek 0,05 µl ExoI (20 U/µl, Fermentas, Kanada), 0,5 µl FastAP (1 U/µl, Fermentas, Kanada), PCR produkt v množství potřebném pro dvě sekvenační reakce (obvykle 3 µl) a 1 x PCR pufr do celkového objemu 7 µl. Vzorky byly inkubovány 30 min při 37 °C a následně 5 min při 95 °C. Do sekvenační reakce byly přidány 3 µl ExoSap směsi.

Sekvenační reakční směs byla složena z 1 µl BigDye, 1,5 µl 5 x Sequencing buffer, 1 µl 10µM primeru, vzorku s požadovaným množstvím DNA a H₂O v množství doplňujícím celkový objem do 10 µl. Sekvenační reakce probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 5min při 98 °C a 50 cyklů 10 s při 96 °C, 5 s při 50 °C a 4 min při 60 °C.

Sekvenační směs byla před kapilární elektroforézou purifikována magnetickými kuličkami Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter, USA). Ke vzorku bylo přidáno 5 µl suspenze kuliček a 42 µl 85% ethanolu, směs byla promíchána. Po 5 min inkubace byla destička se vzorky umístěna na magnet, po vyčíření roztok odpipetován a kuličky s navázanou DNA dvakrát promyty 100 µl 85% ethanolu. Po odpipetování veškerého ethanolu byly vzorky sušeny 10 min při pokojové teplotě nebo cca 5 min při 37 °C. Nato byla DNA mimo magnet eluována do 40 µl H₂O, po 5 min inkubace destička umístěna na magnet a roztok s DNA přepipetován do ABI destičky. Purifikace byla prováděna ručně nebo automaticky přímo v ABI destičce.

Následovala denaturace 2 min při 98 °C, centrifugace 1 min při 100 g a kapilární elektroforéza. Získané sekvence byly analyzovány pomocí Sequencing Analysis software v 5.1 (Applied Biosystems, USA), porovnání sekvencí a konstrukce fylogenetického stromu byly provedeny pomocí programu MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

4.1.13 DESIGN COS (conserved ortholog set) MARKERŮ *in silico*

Vzhledem k tomu, že rýžová sekvence nemůže být pro příliš velkou evoluční vzdálenost použita pro odvozování pšeničných markerů přímo, pro vybrané rýžové geny z oblasti kolineární ke sledovanému lokusu byly vyhledány homologní ESTs ze skupiny *Triticeae* nebo bylo využito již identifikovaných ESTs. V získaných ESTs byla na základě homologie s rýžovými geny určena struktura exonů a intronů. Primery byly navrženy uvnitř exonů tak, aby výsledný PCR produkt překlenul intron mezi nimi, neboť právě v rámci intronů předpokládáme vyšší míru polymorfismů než v kódující oblasti. K navrhování primerů byl použit program Primer3 v. 0.4.0 (Rozen *et* Skaletsky, 2000). Testovány byly markery *owm10* až *owm22* (Tab. V, výsledky).

5 VÝSLEDKY

5.1 SATURACE MAPY V OBLASTI GENU REZISTENCE DOSPĚLÝCH ROSTLIN K PADLÍ TRAVNÍMU U PŠENICE

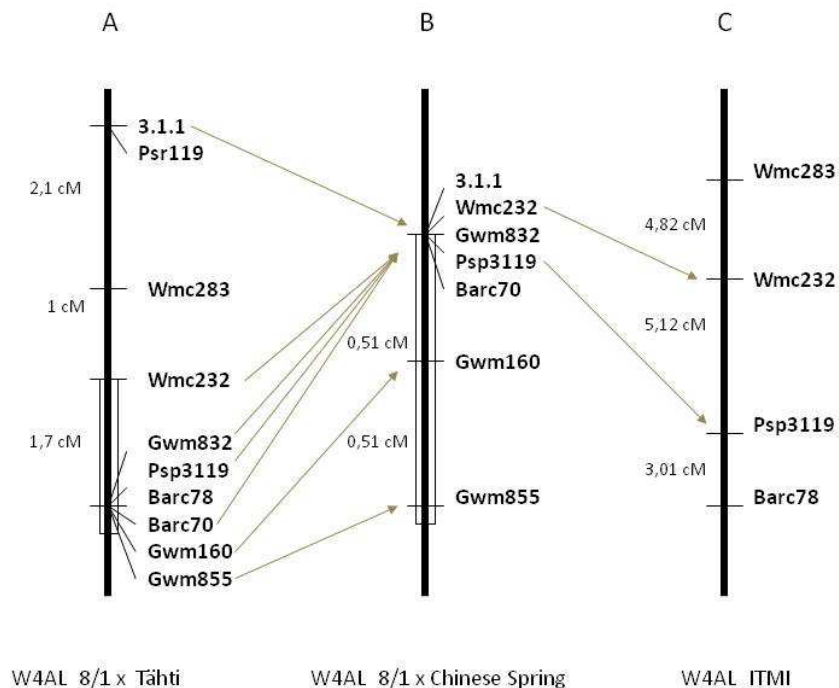
Pro saturaci mapovaného lokusu v oblasti genu *QPm.tut-4A* dalšími markery byly prohledány dostupné veřejné databáze (Gramene, GrainGenes, Komugi,...) a markery z kolineárních oblastí byly testovány na polymorfismus v mapovací populaci odvozené z křížení citlivého kultivaru Tähti s rezistentní hybridní linií 8/1. Z celkového počtu 34 testovaných markerů, většinou SSR markerů, byly získány pouze čtyři, jež byly polymorfní a mapovaly do sledovaného 4AL lokusu, a to *barc70*, *barc78*, *gwm832* a *gwm855*. Ostatní markery se buďto neamplifikovaly, nebo nebyly polymorfní, anebo polymorfní fragmenty mapovaly do jiných částí genomu (Tab. IV). Laboratoř Dr. Järve testovala rozdíl v expresi mezi rezistentními a citlivými liniemi a identifikovala více než 400 odlišností v expresi infikovaných rostlin. Výsledkem testování několika genů s různou expresí bylo odvození dominantního markeru *3.1.1.*, jež mapoval do oblasti genu. Nově byl zamapován taktéž marker *psr119*, použitý v práci Valárika *et al.* (2009) jako marker, který je v dostupných pšeničných mapách lokalizován v blízkosti *gwm160*.

Tab. IV: Výsledek testování 34 markerů v mapovací populaci 8/1 x Tähti.

Testované markery	Výsledek
psp3028, psp3058, psp3142, gwm162, gwm192, gwm350, gwm397, gwm565, gwm613, gwm637, wmc262, barc52, barc327, barc184, gwm131, cfd31, wmc500, ak466	nebyly polymorfní
barc70, barc78, gwm832, gwm855	polymorfní a zamapované na 4AL
cfd2, cfd30, gwm610, wmc283, barc153, locus - GBSS	polymorfní fragmenty nespecifické pro 4AL
wmc219, wmc313, wmc497	neamplifikovaly se
gwm742, wmc772, wmc776	nespecifická amplifikace

Původní mapovací populace 8/1 x Tähti obsahovala 244 $F_{2:3}$ a 180 DH linií. Tato populace má relativně malé rozlišení, proto byla rozšířena o dalších 687 linií. Původními hraničními markery lokusu rezistence k padlí travnímu byly *wmc232* a *gwm160*. Nové markery *psr119* a *3.1.1* byly ovšem zamapovány dále od sledovaného lokusu a rozšířily tak testovaný úsek. Mezi markery *gwm160*, *gwm855*, *gwm832*, *psp3119*, *barc70* a *barc78* nebyla pozorována žádná rekombinace, avšak mezi touto skupinou markerů, markery *wmc232*, *wmc283* a *psr119* k rekombinacím docházelo. Markery *psr119* a *3.1.1* mapovaly opět v těsné vazbě. *Psr119* mapoval v rozporu s dostupnými genetickými mapami od *gwm160* směrem k centroměře, mezi těmito dvěma markery bylo získáno 23 nových rekombinantů, což odpovídá vzdálenosti 4,8 cM. 8 z uvedených rekombinací rozdělovalo markery *gwm160* a *wmc232*, čímž se odhadovaná genetická vzdálenost mezi těmito dvěma markery snížila z původních 10 cM (Jakobson *et al.*, 2006) na 1,7 cM. (Obr. 6 A).

V mapovací populaci 8/1 x Tähti nebyla ani na velkém počtu linií pozorována rekombinace mezi markery mapujícími v blízkosti *gwm160*. Dá se tedy předpokládat, že v této oblasti je přirozená rekombinační frekvence narušena, z tohoto důvodu byly do pokusů zařazeny další dvě mapovací populace, F_2 mapovací populace z křížení rezistentní linie 8/1 a citlivého kultivaru Chinese Spring (CS) a ITMI mapovací populace. Celkem 98 linií mapovací populace 8/1 x CS bylo genotypováno markery *gwm160*, *gwm855*, *gwm832*, *psp3119*, *barc70*, *wmc232* a *3.1.1*. Markery *barc78* a *psr119* nebyly v této populaci polymorfní. Markery *gwm832*, *barc70*, *wmc232* a *3.1.1* mapovaly v úplné vazbě, dva získaní rekombinanti oddělili od této skupiny markery *gwm160* a *gwm855* ve vzdálenostech 0,51 cM směrem k telomeře. (Obr. 6 B). *Wmc283* nevykazoval v této populaci vazbu s markery z oblasti genu rezistence na 4AL, byl zamapován na chromosom 7A. V ITMI mapovací populaci byly polymorfní pouze *barc78*, *psp3119*, *wmc232* a *wmc238*. Mezi každým z těchto markerů k rekombinacím docházelo. Mezi nejvzdálenějšími markery *barc78* a *wmc283* bylo získáno celkem 43 rekombinantů, což odpovídá genetické vzdálenosti 12,95 cM. Umístění a vzdálenosti jednotlivých markerů na mapě je znázorněno na Obr. 6 C).

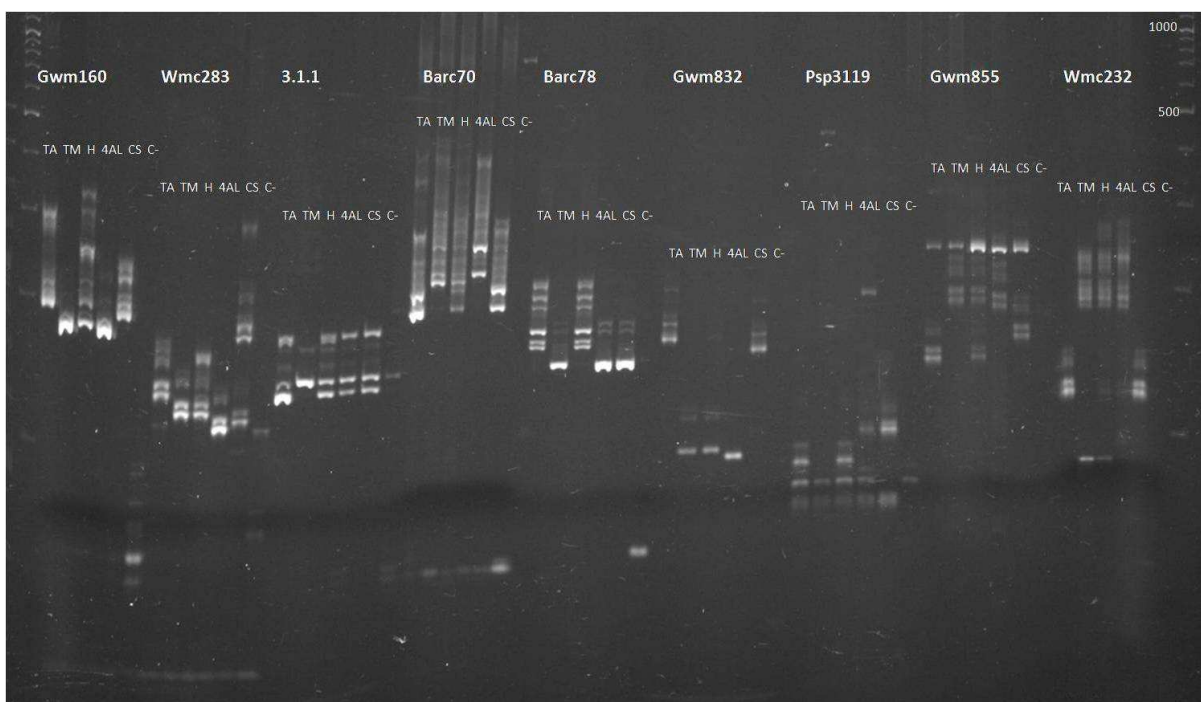


Obr. 6: Genetické mapy oblastí genu rezistence k padlí travnímu na 4AL ve třech různých mapovacích populacích. A) Mapa *QPm.tut-4A* lokusu v $F_{2:3}$ mapovací populaci 8/1 x Tähti, rekombinace byly pozorovány pouze mezi dvojicí markerů *psr119* a *3.1.1*, markery *wmc283*, *wmc232* a skupinou markerů *gwm832*, *psp3119*, *barc78*, *barc70*, *gwm160* a *gwm855*, jež mapovaly v úplné vazbě. **B)** Mapa *QPm.tut-4A* lokusu v F_2 mapovací populaci 8/1 x CS, kde naopak k rekombinacím nedocházelo mezi markery *3.1.1*, *wmc232*, *gwm832*, *psp3119* a *barc70*, od této skupiny se oddělily pouze markery *gwm160* a *gwm855*. **C)** V mapovací populaci ITMI byly mapovány markery *barc78*, *psp3119*, *wmc232* a *wmc283*, všechny se podařilo rekombinacemi navzájem oddělit. Z porovnání těchto map je patrné, že v použitých mapovacích populacích je kolinearita v oblasti genu rezistence zachována.

Markery, které byly v populaci 8/1 x Tähti zamapovány do oblasti genu *QPm.tut-4A*, byly pro ověření jejich specifity pro danou oblast testovány i na tříděném chromosomu 4AL z linie 8/1, který nese v oblasti genu translokaci z *T. militinae*. U markerů *gwm160*, *barc70*, *barc78*, *gwm832*, *psp3119*, *gwm855* a *wmc232* bylo prokázáno, že polymorfní fragmenty jsou specifické pro 4AL chromosom a mapují do translokace z *T. militinae*. Marker *3.1.1* je také specifický pro 4AL, ale mapuje mimo translokaci. Marker *wmc283* se na tříděném

chromosomu amplifikoval, PCR produkt má na PAA gelu podobný patern jako *T. militinae*, je ovšem kratší (Obr. 7).

Aby tyto markery mohly být použity také k identifikaci BAC klonů z knihovny, jež byla připravena ze 4AL ramene kultivaru CS (Valárik, osobní sdělení), bylo nutné ověřit, zda se v CS amplifikují a zda výsledný produkt sekvenčně odpovídá polymorfnímu fragmentu z mapovací populace 8/1 x Tähti. Všechny markery se v CS amplifikovaly (Obr. 7), PCR produkty markerů *3.1.1*, *gwm160*, *gwm832* a *barc78* z CS byly osekvenovány a získané sekvence porovnány se sekvencí rodiče, jehož PCR produkt po elektroforetické separaci odpovídal produktu CS. Sekvence CS markerů *3.1.1*, *gwm160* a *gwm832* byly porovnány se sekvencemi z Tähti a sekvence *barc78* se sekvencí z tříděného chromosomu 4AL s translokací z *T. militinae*. Bylo prokázáno, že polymorfní fragmenty testovaných markerů z CS sekvenčně odpovídají polymorfním fragmentům z mapovací populace 8/1 x Tähti.



Obr. 7: Fotografie 3,5% PAA gelu s PCR produkty jednotlivých markerů mapujících do oblasti genu *QPm.tut-4A*. TA - citlivý rodič Tähti, TM - rezistentní rodič *T. militinae*, H - heterozygot, 4AL - tříděný chromosom z linie 8/1 s translokací z *T. militinae* v oblasti genu, CS - Chinese Spring, C⁻ - negativní kontrola.

Pro zahuštění mapy v oblasti testovaného lokusu bylo v mapovací populaci 8/1 x Tähti testováno 12 markerů *owm10* až *owm 22* (Tab. V), jež byly navrženy z pšeničných ESTs zamapovaných do kolineární oblasti na R6S. Pro všechny smysluplné kombinace primerů každého markeru byla provedena PCR se sedmi vzorky DNA, s DNA citlivého rodiče Tähti, rezistentního rodiče *T. militinae*, heterozygota, který byl připraven smícháním DNA obou rodičů v poměru 1:1, s DNA nullitetrasomické linie N4AT4D a ditelosomické linie 4AS a dále se dvěma směsnými vzorky z DNA desíti dihaploidních linií mapovací populace, z nichž jeden nesl v okolí hledaného genu úsek z Tähti - „bulk A“ (BA) a druhý z *T. militinae* - „bulk B“ (BB). Pro každou kombinaci primerů byla provedena negativní kontrola. U žádného z markerů *owm10* – *owm22* nebyl získán polymorfismus v délce PCR produktu. Některé z nich byly převedeny na RFLP-PCR nebo CAPS markery. PCR produkty BA, BB a heterozygota markeru *owm17F₂R₃* byly štěpeny náhodně vybranými endonukleasami (AluI, BamHI, FokI, HaeIII, KpnI, NlaIII, RsaI, SacI a XbaI). Produkty BA a BB markerů *owm11F₁R₃*, *owm11F₂R₃*, *owm15F₁R₁*, *owm17F₂R₄* a *owm18F₃R₅* byly osekvenovány, vždy bylo sekvenováno deset klonů, aby bylo možné identifikovat homologní a falešné SNPs. SNPs vyskytující se pouze v jednom klonu nebyly brány v potaz. U *owm15F₁R₁* a *owm18F₃R₅* nebyl žádný polymorfismus v sekvenci prokázán. PCR produkty markerů *owm11F₁R₃*, *owm11F₂R₃* a *owm17F₂R₄* byly štěpeny endonukleasami specifickými pro detekované SNP, v případě *owm11F₁R₃* endonukleasami BsrI, MboII, NlaIII, RsaI a SmaI, *owm11F₂R₃* endonukleasami BsrI, MboII a HaeIII a *owm17F₂R₄* byl štěpen MboII a HpyCH4IV. Ani poté nebyl získán spolehlivý, v dané populaci polymorfní marker mapující do oblasti genu *QPm.tut-4A*.

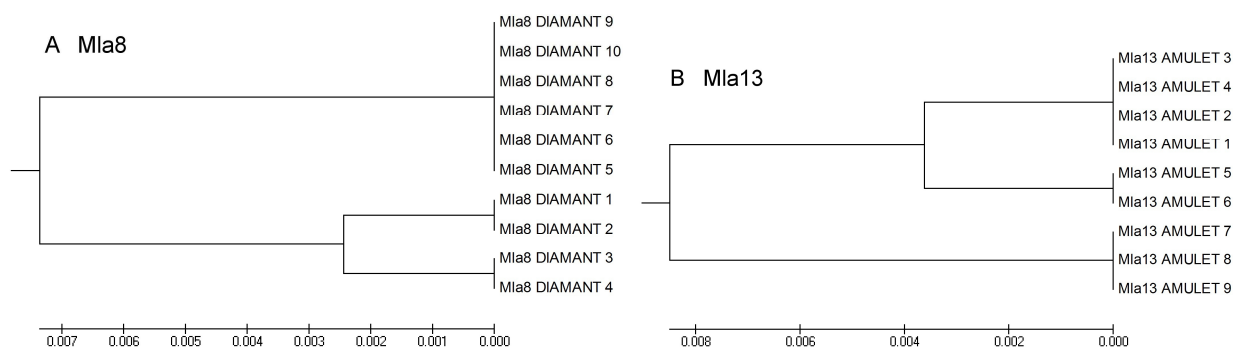
Vzhledem k tomu, že žádný z markerů *owm10* až *owm22*, jež mapují na R6S ve vzdálenosti 1,77 až 0,55 Mb od telomery, nebyl mapovací populaci 8/1 x Tähti polymorfní, byly navrženy nové COS markery v téže oblasti kolineární k distálnímu binu 4AL pšenice, ovšem dále směrem k telomeře. Tato oblast byla reprezentována již testovaným markerem *owm17* (0,38 Mb), u něj se však taktéž nepodařilo prokázat polymorfismus. Nové markery byly odvozeny z dostupných ESTs skupiny *Triticeae*, které odpovídaly rýžovým genům lokalizovaným na R6S ve vzdálenosti od 0,48 do 0,37 Mb s homologií nad 71 % a „expect value“ nižší než e-20. Celkem bylo do této oblasti zamapováno 27 ESTs. Z nich bylo odvozeno 11 markerů *owm23* až *owm34* (Tab. V.) a pro tyto markery byly navrženy primery, které budou dále testovány.

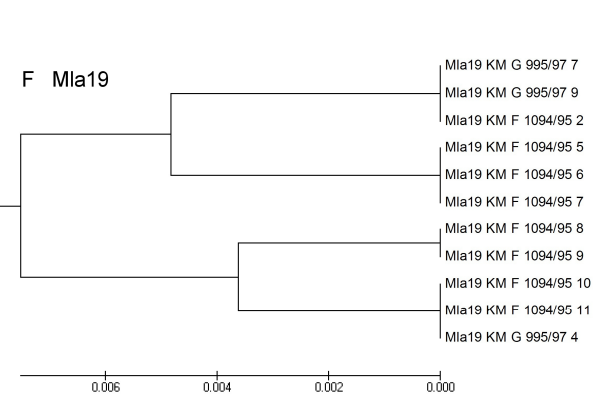
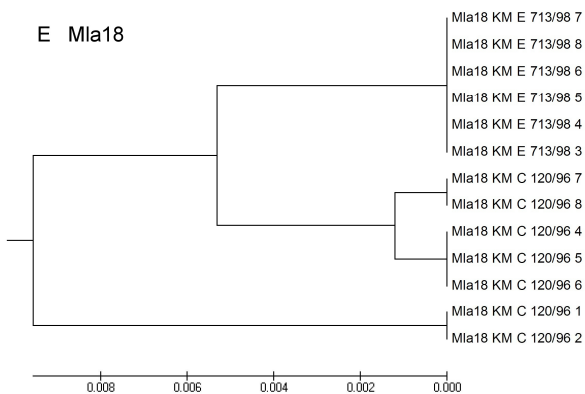
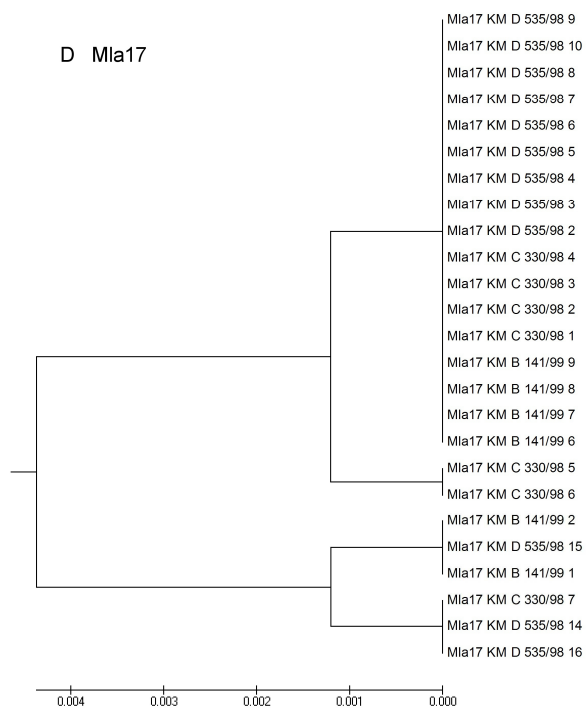
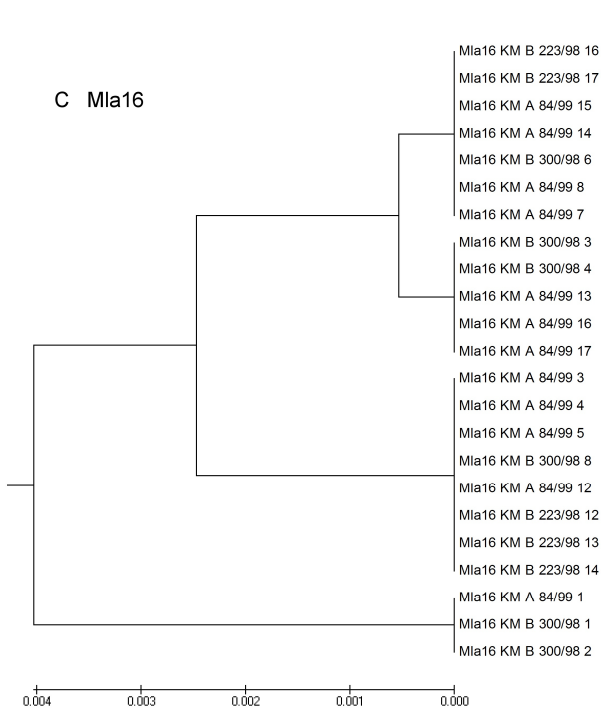
Tab. V.: ESTs skupiny *Triticeae*, které mapují do R6S, oblasti s nejvyšší kolinearitou k distálnímu binu 4AL pšenice. Jejich pozice v rýži je uvedena v Mb ve směru od telomery. Jako *owm* jsou označovány markery odvozené ze selektovaných ESTs. *Owm10-22* korespondují s ESTs mapovanými do distálního binu 4AL pšenice. *Owm23-34* jsou odvozeny z ESTs odpovídajícím dalším genům z R6S oblasti kolineární k *QPm.tut-4A* lokusu.

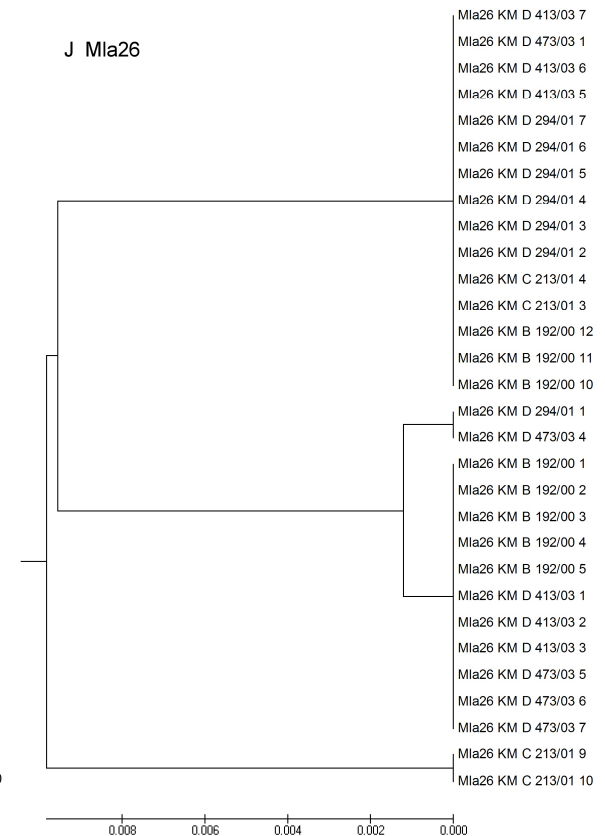
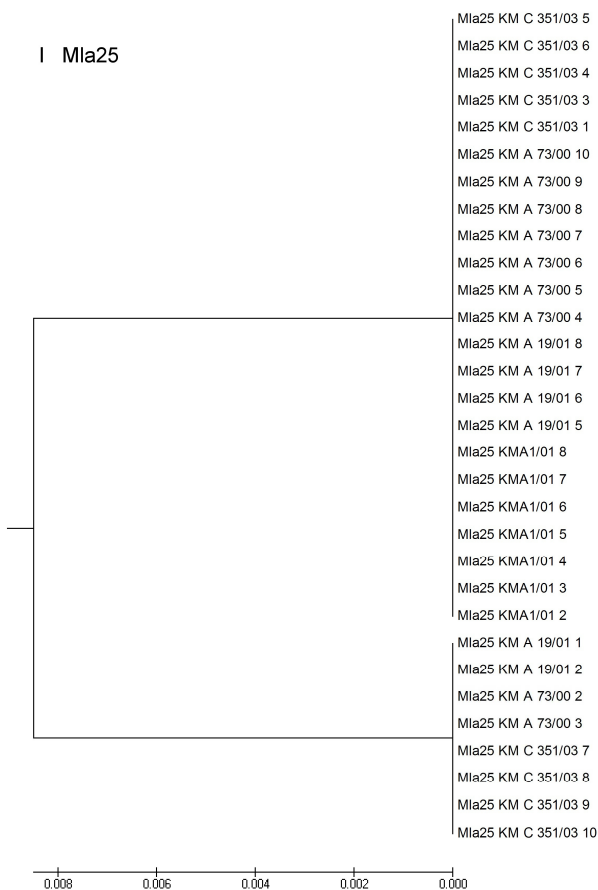
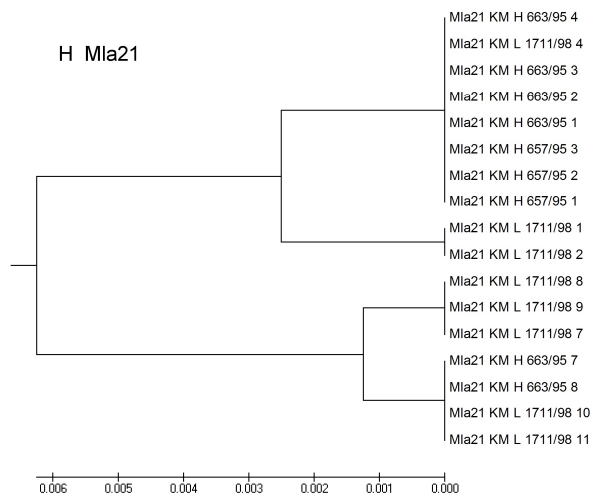
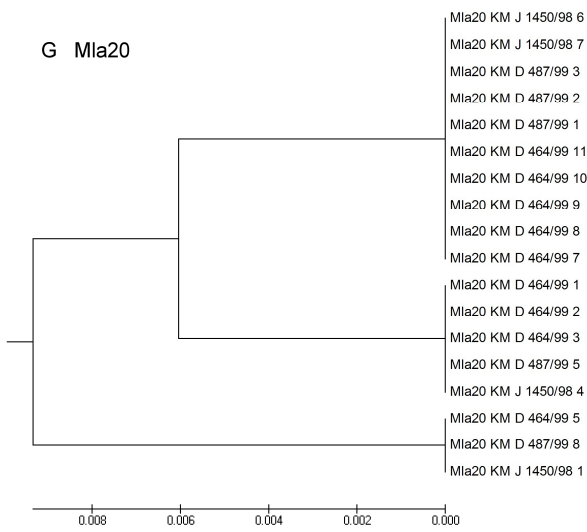
ESTs skupiny <i>Triticeae</i> mapující do R6S	Pozice v rýži	Marker
gb BE606874.1 BE606874 WHE0902_B02_C04ZS Wheat 5-15 DAP spike cD 188 2e-045	1.77 M	<i>owm20</i>
gb BE490191.1 BE490191 WHE0366_D10_H20ZS Wheat cold-stressed see 262 2e-067	1.73 M	<i>owm19</i>
gb BG607226.1 BG607226 WHE2472_H11_O22ZS Triticum monococcum ear 92 3e-016	1,6 M	<i>owm10</i>
gb BG604519.1 BG604519 WHE0834_F06_K12ZS Wheat vernalized crown 297 3e-078	1,6 M	<i>owm11</i>
gb BE498338.1 BE498338 WHE0952_G06_M12ZS Wheat pre-anthesis spik 88 5e-015	0,9 M	<i>owm13</i>
gb BE517802.1 BE517802 WHE0803_F03_L05ZS Wheat vernalized crown 174 3e-041	0.86 M	<i>owm21</i>
gb BE443120.1 BE443120 WHE1113_D10_G19ZS Wheat etiolated seedlin 72 3e-010	0,7 M	<i>owm14</i>
gb BF429350.1 BF429350 WHE1804_D12_H24ZS Secale cereale anther c 339 8e-091	0,6 M	<i>owm15</i>
gb BE499049.1 BE499049 WHE0960_H01_O02ZS Wheat pre-anthesis spik 456 e-126	0,6 M	
gb BE443444.1 BE443444 WHE1104_B03_D06ZS Wheat etiolated seedlin 216 8e-054	0,6 M	<i>owm16</i>
gb BE638019.1 BE638019 WHE0995-0998_K05_K05ZS Wheat pre-anthesis. 274 5e-071	0.55 M	<i>owm22</i>
gi 32555493 gb CD871677.1 Ogihara unpublished cDNA library 210 2e-52	0.55 M	<i>owm18</i>
gb BF200736.1 BF200736 WHE0821-0824_M13_M13ZS Wheat vernalized c 58 5e-006	0,38 M	<i>owm17</i>
gb BI960110.1 HVSMEEn0023E10f Hordeum vulgare rachis EST library 134 4e-35	0,48 M	<i>owm23</i>
gb CV774211.1 FGAS068608 Triticum aestivum FGAS 134 6e-35		
gb DN828913.1 KUCD01_04_F02_T3 WSWR cDNA library Triticum aestivum cDNA 201 4e-55		
dbj CJ813278.1 CJ813278 Y. Ogihara unpublished cDNA library 123 1e-31	0,47 M	<i>owm24</i>
gb BU998314.1 HI10K14r HI Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone 266 1e-74	0,45 M	<i>owm26</i>
gb FF593427.1 BG03012A1D11.f1 BG03- primary and normalized libraries Elymus 300 7e-85		
gb CD924655.1 G750.113021F010706 G750 Triticum aestivum cDNA clone 293 4e-83	0,44 M	<i>owm27</i>
gb CK210095.1 FGAS021886 Triticum aestivum FGAS 800 0.0	0,44 M	<i>owm28</i>
gb FF356193.1 BG02023B2C11.f1 BG02 - libraries Pseudoroegneria 798 0.0		
gb FF356194.1 BG02023B2C11.r1 BG02 - libraries Pseudoroegneria 468 2e-135		
gb CA005889.1 HU08F12u HU Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone 201 3e-55		
dbj CJ786604.1 CJ786604 Y. Ogihara unpublished cDNA library 221 1e-60	0,41 M	<i>owm29</i>
gb FF344956.1 BG02006A1A09.f1 BG02 - ibraries Pseudoroegneria 529 2e-153	0,41 M	<i>owm30</i>
gb FF344957.1 BG02006A1A09.r1 BG02 - libraries Pseudoroegneria 426 1e-122		
dbj BJ301258.1 BJ301258 Y. Ogihara unpublished cDNA library 91,5 2e-21	0,40 M	<i>owm31</i>
gb BF258634.2 HVSMEF0016E08f Hordeum vulgare seedling root EST library 241 3e-66		
gb CD916024.1 G550.128023F010726 G550 Triticum aestivum cDNA clone 412 6e-118		
dbj CJ646698.1 CJ646698 Y.Ogihara unpublished cDNA library 486 2e-140		
dbj CJ563954.1 CJ563954 Y.Ogihara unpublished cDNA library 399 4e-114		
dbj CJ785046.1 CJ785046 Y. Ogihara unpublished cDNA library 228 7e-63	0,40 M	<i>owm32</i>
dbj CJ937685.1 CJ937685 Y. Ogihara unpublished cDNA library 134 2e-34		
dbj CJ925660.1 CJ925660 Y. Ogihara unpublished cDNA library 149 8e-39		
gb CA599474.1 waw1c.pk002.m16 waw1c Triticum aestivum cDNA clone 203 3e-55	0,38 M	<i>owm33</i>
gb CA021510.1 HZ40E23r HZ Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone 194 1e-52		
dbj CJ677754.1 CJ677754 Y.Ogihara unpublished cDNA library 223 4e-61		
gb FD525017.1 RUS117E05r HY Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone 201 1e-54		
NSFT03P2_Contig17099 228 2e-62	0,37 M	<i>owm34</i>

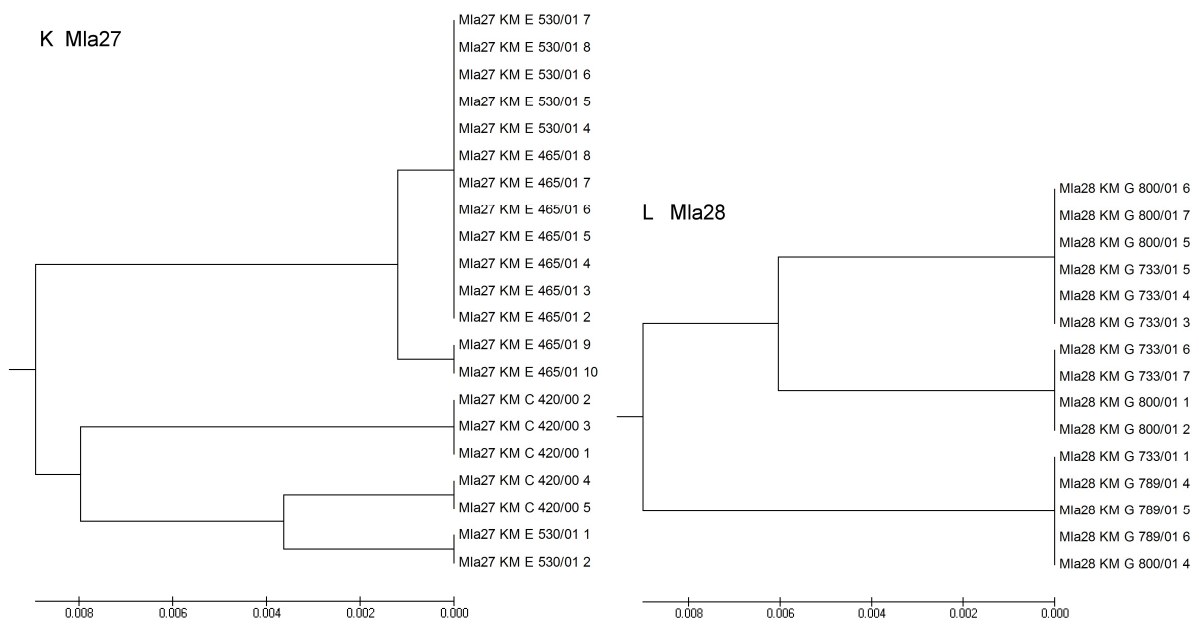
5.2 IDENTIFIKACE SEKVENČNÍCH VARIANT GENU *Mla* U JEČMENE

U 40 diverzních vzorků ječmene byl osekvenován úsek prvního exonu genu *Mla* v délce 451 bp. Z každého vzorku bylo sekvenováno minimálně 8 klonů. Získané sekvence byly analyzovány, sekvence pro jednotlivé alely *Mla* určené na základě fenotypového projevu byly porovnány. Na Obr. 8 jsou znázorněny fylogenetické stromy pro jednotlivé alely. Z nich je patrné, že linie s určitým fenotypovým projevem nesou různé sekvenční varianty genu *Mla*. U linií s fenotypově detekovanými alelami *Mla8*, *Mla13*, *Mla20* a *Mla28* byly identifikovány tři sekvenční varianty genu, u *Mla16*, *Mla17*, *Mla18*, *Mla19*, *Mla21* a *Mla26* po čtyřech variantách, u *Mla25* pouze dvě, zato u *Mla27* dokonce pět variant. Celkem tedy bylo získáno 43 sekvenčních variant. Z každé varianty byla vybrána konsenzuální sekvence a tyto byly vzájemně porovnány. Fylogenetický strom zkonstruovaný na základě tohoto porovnání je znázorněn na Obr. 9. Z něj plyne, že u daného souboru vzorků ječmene se podařilo identifikovat celkem 16 různých alel genu *Mla*. Některé z alel byly společné pro linie s odlišným fenotypovým projevem. Pouze u linií s fenotypově určenými alelami *Mla8*, *Mla18* a *Mla19* byla identifikována jedna u *Mla21* a *Mla26* dokonce dvě unikátní sekvenční varianty.

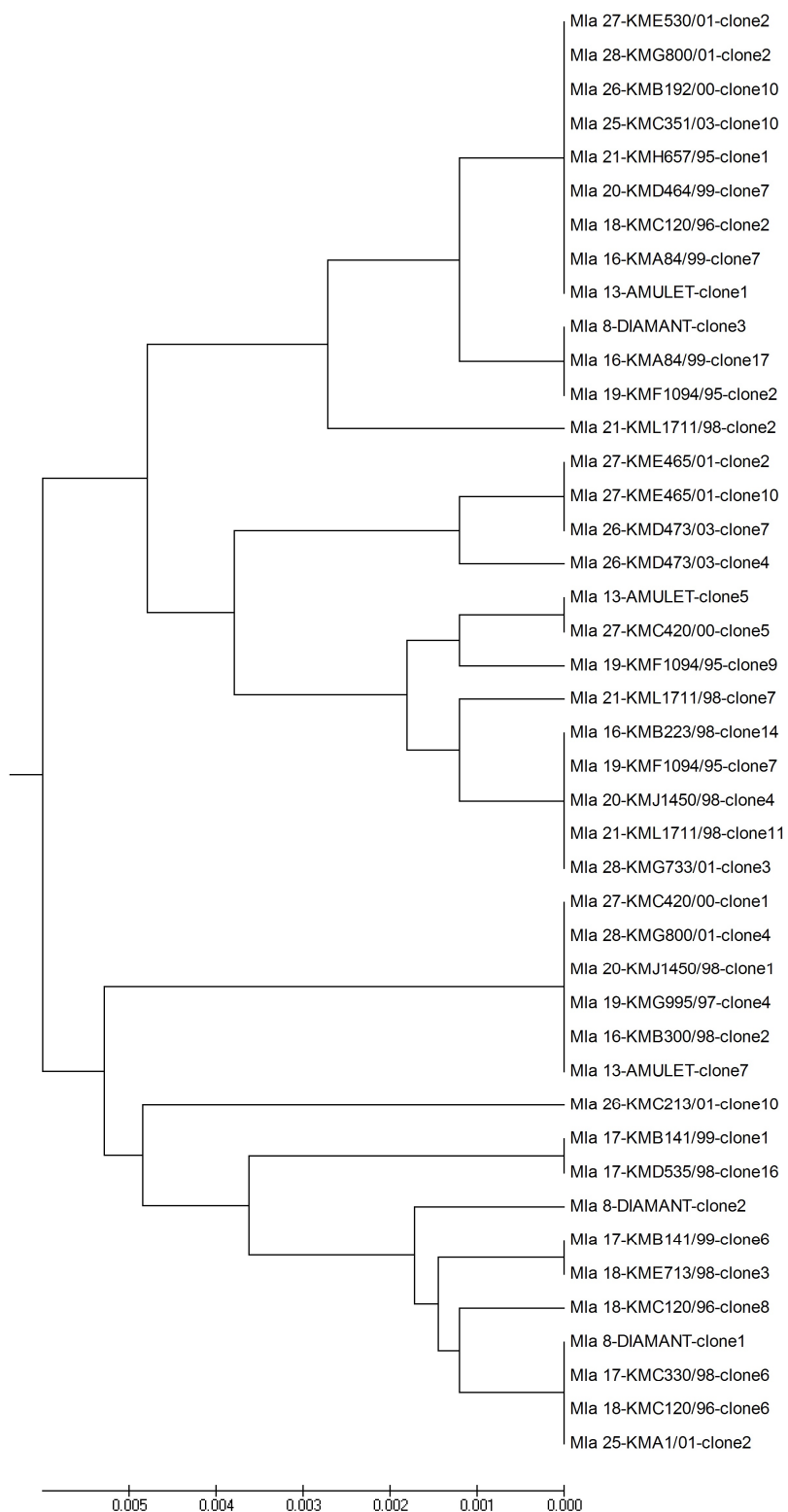








Obr. 8: Schemata fylogenetických stromů sekvencí genu *Mla* z linií ječmene, u nichž byly na základě fenotypu determinovány následující alely: **A)** *Mla8*, **B)** *Mla13*, **C)** *Mla16*, **D)** *Mla17*, **E)** *Mla18*, **F)** *Mla19*, **G)** *Mla20*, **H)** *Mla21*, **I)** *Mla25*, **J)** *Mla26*, **K)** *Mla27* a **L)** *Mla28*. Z obrázků je patrné, že linie s určitým fenotypovým projevem nesou několik variant genu *Mla*.



Obr. 9: Schema fylogenetického stromu srovnávající všechny sekvenční varianty získané u jednotlivých fenotypově určených alel genu *Mla*. Strom je členěn do 16 větví, jež představují jednotlivé sekvenčně rozdílné alely. Je zřejmé, že mnohé z těchto alel jsou společné pro linie s rozdílným fenotypovým projevem.

6 DISKUZE

6.1 SATURACE MAPY V OBLASTI GENU REZISTENCE DOSPĚLÝCH ROSTLIN K PADLÍ TRAVNÍMU U PŠENICE

V roce 2006 byl u pšenice na $F_{2:3}$ mapovací populaci z křížení rezistentní hybridní linie 8/1 a citlivého kultivaru Tähti identifikován hlavní QTL lokus odpovědný za rezistenci dospělých rostlin k padlí travnímu. Tento lokus s názvem *Q_{Pm.tut-4A}* byl zamapován v distální části dlouhého ramene chromosomu 4A mezi hraničními markery *gwm160* a *wmc232*, blíže ke *gwm160* (Jakobson *et al.*). Původní mapovací populace, která čítala 244 $F_{2:3}$ a 180 DH linií byla v této práci rozšířena o 687 linií. Všechny 1111 linií bylo testováno markery *gwm160*, *psp3119*, *wmc232* a *wmc283*, které byly zamapovány již v práci Jakobson *et al.* (2006), dále markerem *psr119* z práce Valárika *et al.* (2009) a markery, jež se podařilo do oblasti genu rezistence nově zamapovat *barc70*, *barc78*, *gwm832*, *gwm855* a *3.1.1* (Järve, osobní sdělení). Dvojice markerů *psr119* a *3.1.1*, markery *wmc283*, *wmc232* a skupina markerů *psp3119*, *barc70*, *barc78*, *gwm855*, *gwm832* a *gwm160* byly rekombinacemi rozděleny (Obr. 6A). Markery kolem *gwm160* však mapovaly v úplné vazbě i v poměrně reprezentativní mapovací populaci o 1111 $F_{2:3}$ a DH liniích. Pro srovnání, k mapování pšeničného genu *Q* byla použita F_2 mapovací populace o 465 liniích (Faris *et al.*, 2003) či k mapování *Lr21* $F_{2:3}$ mapovací populace o 520 liniích (Huang *et al.*, 2003). Skutečnost, že v okolí markeru *gwm160* nedochází k rekombinacím, může tedy mít dvě vysvětlení. Buďto je tato oblast fyzicky krátká nebo je ve zmíněné oblasti rekombinace v této mapovací populaci inhibována.

Vzhledem k pravděpodobné inhibici přirozené rekombinační frekvence v oblasti markeru *gwm160* v mapovací populaci 8/1 x Tähti, byly jako možné zdroje informací o pořadí a vzdálenostech markerů z oblasti genu testovány další dvě mapovací populace, ITMI mapovací populace a F_2 mapovací populace z křížení rezistentní linie 8/1 a citlivého kultivaru CS. ITMI mapovací populace z křížení kultivaru Opata85 a syntetické linie W-7984 by měla poskytnout maximální polymorfismus možný u hexaploidní pšenice. Výhodou populace z křížení 8/1 x CS je kombinace linie se sledovanou translokací z *T. militinae* a linie kultivaru, ze kterého byla konstruována 4AL chromosomově specifická knihovna (Valárik, osobní sdělení).

Všechny markery mapované v této populaci ve vazbě k fenotypu by mohly přímo sloužit k identifikaci BAC klonů z této knihovny.

Na základě porování genetických map získaných ze všech tří použitých populací lze říci, že kolinearita v oblasti genu rezistence je v těchto populacích zachována (Obr. 6). Ze skupiny markerů *psp3119*, *barc70*, *barc78*, *gwm855*, *gwm832* a *gwm160*, mezi nimiž v mapovací populaci 8/1 x Tähti k rekombinacím nedochází, se v mapovací populaci 8/1 x CS podařilo směrem k telomeře oddělit marker *gwm160* a ještě distálněji marker *gwm855*, a to ve vzdálenostech 0,51 cM (Obr. 6B). V mapovací populaci ITMI bylo zjištěno vzájemné umístění markerů *psp3119* a *barc78* a sice, že *barc78* mapuje dále směrem k telomeře (Obr. 6C). Lokalizace takřka všech markerů ve sledované oblasti, jak vyplývá z těchto výsledků, koresponduje s jejich umístěním v genetických mapách dostupných v databázi GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>). Výjimkou je marker *psr119*, který bývá lokalizován od *gwm160* směrem k telomeře, v naší mapovací populaci 8/1 x Tähti však mapuje směrem od *wmc283* k centromeře. Buďto se jedná o odlišný lokus tohoto markeru, nebo tato skutečnost svědčí o odlišnosti v kolinearitě s jinými mapami.

Na chromosom 4A byly již dříve zamapovány tři QTL lokusy zodpovědné za rezistenci dospělých rostlin k padlí travnímu a rasově specifický gen rezistence *Pm16* (shrnutu v Huang *et Röder*, 2004), dva z těchto QTL lokusů však byly zamapovány na 4AS a *Pm16* zřejmě mapuje na translokovaný úsek 4A/5BS (Chen *et al.*, 2005, cit. Jakobson *et al.*, 2006). Jakobson *et al.* (2006) navíc potvrdili, že ani jeden s těchto lokusů nemá vazebnou souvislost s translokací z *T. militinae* mezi markery *gwm160* a *wmc232*, která tedy zahrnuje, podle všeho, dosud nezamapovaný gen rezistence *QPm.tut-4A*. Oblast tohoto genu je pravděpodobně na dlouhém rameni 4A pšenice seté lokalizována na translokovaném úseku ze 7BS. Odpovídající oblast v *T. militinae* by tedy vzhledem k tomu, že na 4A chromosomu *T. militinae* k obdobné translokaci nedošlo, pocházela zřejmě z některého z chromosomů 7, lze předpokládat, že ze 7G, neboť B genom *T. aestivum* je příbuzný genomu G *T. militinae* (Salina *et al.*, 2005). Domněnka, že se oblast genu nachází v translokaci 7BS/4AL, je založena na několika skutečnostech. Jeden z hraničních markerů translokace z *T. militinae* v linii 8/1 *wmc283* nebyl zamapován v populaci 8/1 x CS do sledované oblasti, ale podařilo se jej zamapovat na chromosom 7A. Jedná se zřejmě o ortologní lokus, neboť specifita pro sledovaný lokus na 4AL byla u všech použitých markerů včetně *wmc283* ověřena

na tříděném chromosomu 4AL s translokací z *T. militinae*. Všechny markery byly specifické pro 4AL, většina mapovala dovnitř translokace, pouze marker 3.1.1 mapoval vně. Právě u markeru *wmc283* byl pozorován sice obdobný patern jako u rodiče *T. militinae*, ovšem kratší. To by mohlo být vysvětleno tím, že se *wmc283* pravděpodobně nachází na samé hranici translokace, kdy k rekombinaci došlo uvnitř tohoto markeru.

Dalším důkazem hovořícím proto, že oblast zájmu leží na translokaci ze 7BS je zama-
pování markerů *wmc283* a *psr119* na chromosom 7A^m v mapovací populaci diploidní pšenice
T. monococcum z křížení Dv92 a G3116, jejíž genetická mapa byla nedávno zkonstruována
(Valárik, osobní sdělení). Marker *wmc283* mapoval 7,1 cM a *psr119* 0,6 cM od markeru
ksuD91 na krátkém rameni 7A^m směrem k telomeře. Tento úsek je pravděpodobně kolineární
s oblastí genu *QPm.tut-4A*, proto markery, které zde mapují, budou v mapovací populaci
8/1 x Tähti testovány. Jedním z nich je i *Rpg1*. Jedná se o marker z genu rasově specifické
rezistence ke rzi travní u ječmene. Vzhledem k tomu, že v mnoha případech, jak různé
mapovací studie naznačují, jsou rozdílné rodiny NBS-LRR genů v genomu lokalizovány
ve shlucích (Ayliffe *et* Lagudah, 2004), je tento marker nadějným kandidátem na marker těsně
vázaný ke genu *QPm.tut-4A*.

Domněnka, že oblast genu *QPm.tut-4A* se nachází na translokovaném úseku ze 7BS, je
i v souladu s výsledky Valárika *et al.* (2009), kteří označili za hlavní kolineární oblast
k distálnímu binu 4AL pšenice, kde gen *QPm.tut-4A* mapuje, úsek na krátkém rameni
rýžového chromosomu 6. Do tohoto úseku byl zamapován největší počet, celkem 20 pře-
ničných ESTs ze zmíněného binu (Obr. 5). Přitom rýžový chromosom 6 vykazuje nejvyšší
kolinearitu s pšeničným chromosomem 7, zatímco pšeničný chromosom 4 je nejvíce kolineár-
ní s rýžovým chromosomem 3 a pšeničný chromosom 5, jehož část je taktéž translokována
na 4AL pšenice, je kolineární zejména k rýžovému chromosomu 12, ale také 9 a 3 (Sorrels *et*
al., 2003). Potvrzením, že ke sledovanému úseku je kolineární skutečně daná oblast na R6S,
bylo zamapování markerů *cdo545* a *psr119* z blízkosti *gwm160* do této oblasti. Část krátkého
ramene R6 je duplikována na dlouhém rameni chromosomu 2 (Guyot *et* Keller, 2004),
na tento chromosom však mapovalo pouze 6 ESTs, z toho dva shodné s těmi, které mapovaly
na chromosom 6. Bylo prokázáno, že vybraný úsek na R6S je navíc kolineární s pšeničnými
chromosomálními rameny W7AS, W7DS a ječmenným 7HS.

12 markerů *owm10* až *owm22*, které byly navrženy z ESTs zamapovaných do kolineární oblasti R6S ve vzdálenosti 1,77 až 0,55 Mb od telomery, bylo testováno, avšak u žádného z nich nebyl v mapovací populaci 8/1 x Tähti prokázán polymorfismus. Jedním z možných vysvětlení je, že uvedené markery skutečně nejsou v této populaci polymorfní. Dalším postupem tedy bude snaha tyto markery zamapovat v mapovací populaci ITMI, kde je předpokládána vyšší míra polymorfismu. Jiné vysvětlení, proč u markerů *owm10* až *owm22* nebyl pozorován polymorfismus, by bylo, že tyto markery nemapují do oblasti genu v důsledku možné odchylky v kolinearitě pro tuto oblast mezi rýží a pšenicí anebo mezi mapou získanou z populace 8/1 x Tähti a dalšími pšeničnými mapami, jak naznačuje již zmíněná odlišná lokalizace markeru *psr119*. Z tohoto důvodu byla pro následující postup testována kolineární oblast na R6S rozšířená o dalších 100 genů, jež mohou být použity k verifikaci kolinearitě této oblasti k *QPm.tut-4A* lokusu. V této práci byly prozatím odvozeny markery z ESTs skupiny *Triticeae*, které v této kolineární oblasti na R6S mapovaly ve vzdálenosti 0,48 až 0,37 Mb od telomery. Pro tyto markery označené jako *owm23* až *owm 34* byly navrženy primery a budou dále testovány.

Novým zdrojem markerů by měla být také chromosomově specifická BAC knihovna, která byla nedávno připravena z chromosomálního ramene 4AL kultivaru CS (Valárik, osobní sdělení). Pro účely skrínování BAC knihovny bylo ověřeno, že se markery zamapované v mapovací populaci 8/1 x Tähti do oblasti genu rezistence amplifikují i v CS a porovnáním sekvencí PCR produktů markerů *gwm160*, *gwm832*, *barc78* a *3.1.1* bylo prokázáno, že sekvence těchto markerů v CS odpovídá sekvencím amplifikovaným v populaci 8/1 x Tähti. BAC knihovna je těmito markery v současné době skrínována. Sekvence konců pozitivních BAC klonů mohou poskytnout další markery pro zahuštění mapy v oblasti genu a přesnou lokalizaci kolineárních oblastí v genomu rýže.

6.2 IDENTIFIKACE SEKVENČNÍCH VARIANT GENU *Mla* U JEČMENE

Pro identifikaci jednotlivých efektivních alel genové rodiny *Mla* se využívá testu sadou izolátů padlí travního a alely jsou determinovány na základě jejich fenotypového projevu. Pro efektivnější identifikaci a selekci zprostředkovanou markerem byly navrženy RFLP markery (Schüller *et al.*, 1992) nebo *Eco*Tilling markery (Mejlhede *et al.*, 2006). Pomocí metody *Eco*Tilling se podařilo rozlišit jednotlivé alely podle SNP, kterým se liší. Pro šlechtitelské účely je však žádoucí navrhnout pro identifikaci jednotlivých alel metodu taktéž vysoce účinnou, ale zároveň jednoduchou a cenově přístupnou. Proto je snahou odvodit pro jednotlivé efektivní alely specifické a spolehlivé CAPS markery. V této práci byly pro celkem 40 diverzních vzorků ječmene, u nichž byly jednotlivé alely určeny podle fenotypu, osekvenovány PCR produkty reprezentující část prvního exonu genu *Mla*, primery byly použity podle Mejlhede *et al.* (2006).

Po porovnání sekvencí z linií s určitým fenotypovým projevem jsme došli ke stejnému závěru jako Mejlhede *et al.*, (2006) a sice, že v genomu každé fenotypové varianty jsou přítomny polymorfismy v sekvenci genu *Mla* a že *Mla* lokus je tedy multikopiový. Porovnáním všech získaných variant bylo identifikováno celkem 16 alel, které se lišily SNP v sekvenci. Některé z nich byly unikátní pro určitý fenotypový projev, dá se předpokládat, že právě tyto jsou alely zodpovědné za specifickou rezistenci k určitému izolátu padlí travního. Jiné byly společné pro linie s rozdílnými fenotypovými projevy. Buďto je tedy možné, že se tatáž alela podílí na rozdílném fenotypovém projevu, nebo se jedná o alely nefunkční. Na základě detekovaných sekvenčních rozdílů mezi alelami budou dále identifikovány endonukleasy, které budou specificky štěpit v místě SNP charakteristického pro určitou alelu a tyto CAPS markery budou testovány.

Podle Wei *et al.*, (1999) se v telomerické části krátkého ramene 1H nachází shluk rezistentních genů *Mla*, který obsahuje tři oddělené genové rodiny. Vzhledem k tomu, že v rámci těchto rodin dochází k rekombinacím jen zřídka, je zřejmě málo pravděpodobné kombinovat více efektivních alel *Mla* v jedné linii, ale identifikace efektivní alely může sloužit pro „pyramiding genů“ spolu s jinými lokusy odpovědnými taktéž k rezistenci k padlí travnímu u ječmene.

7 ZÁVĚR

K cílům této práce patřilo saturovat genetickou mapu pšenice v lokusu genu rezistence k padlí travnímu, jež byl zamapován na 4AL, novými markery a získat mezi nimi rekombinanty, kteří by objasnili lokalizaci těchto markerů v daném lokusu. Do oblasti genu byly zamapovány 4 nové SSR markery a v $F_{2:3}$ mapovací populaci 8/1 x Tähti, jež byla rozšířena na celkový počet 1111 linií, byly všechny markery z oblasti genu testovány. Na základě toho byly selektovány linie rekombinující ve sledovaném úseku. Vzdálenost mezi hraničními markery *gwm160* a *wmc232*, jež byla původně odhadována až na 10 cM se snížila na 1,7 cM. Vzhledem k tomu, že mezi markery z blízkosti *gwm160* nebyly získány žádné rekombinace, byly do experimentu zahrnuty další dvě mapovací populace 8/1 x CS a ITMI, které přispěly k objasnění lokalizace některých markerů. Výsledky také naznačují, že se oblast genu rezistence nachází na translokovaném úseku ze 7BS. Pro všechny markery z oblasti genu byla ověřena jejich specifita pro 4AL chromosom a pro účely skrínování BAC knihovny připravené ze 4AL chromosomu CS bylo potvrzeno, že se všechny markery v CS amplifikují, a u markerů *3.1.1*, *gwm160*, *gwm832* a *barc78* byla potvrzena i sekvenční shoda polymorfních fragmentů s těmi, které se amplifikují v mapovací populaci 8/1 x Tähti. Mapovací populace 8/1 x CS bude pro zvýšení jejího rozlišení dále rozšiřována a jako zdroj nových markerů budou využity klony BAC knihovny, která je v současné době skrínována markery z lokusu genu. V mapovací populaci 8/1 x Tähti byly dále testovány markery *owm10* až *owm22*, jež byly získány z kolineárního úseku na R6S ve vzdálenosti 1,77 až 0,55 Mb od telomery, nebyl však u nich získán polymorfismus. Proto budou tyto markery mapovány i v mapovacích populacích ITMI a 8/1 x CS a zároveň budou testovány markery *owm23* až *owm34*, které byly získány z téže oblasti rýže, avšak dále směrem k telomeře.

Dalším cílem této práce bylo identifikovat sekvenční polymorfismy v oblasti genu rezistence k padlí travnímu *Mla* v diverzním souboru vzorků ječmene. Osekvenováním části prvního exonu genu *Mla* bylo potvrzeno, že gen *Mla* je v genomu ječmene multialelický. Identifikováno bylo celkem 16 sekvenčně odlišných alel, z nichž některé byly charakteristické pro určitý fenotypový projev, jiné byly společné liniím s odlišným fenotypovým projevem. Na základě detekovaných SNP mezi alelami budou nyní vybrány a testovány endonukleasy vhodné pro rozlišení jednotlivých alel. Takto získané CAPS markery mohou být využity k identifikaci jednotlivých alel genu *Mla* a pro „pyramiding genů rezistence“ ve šlechtitelství.

8 LITERATURA

- Ayliffe, M.A., Lagudah, E.S. (2004): Molecular genetics of disease resistance in cereals. *Annals of Botany* 94: 765 - 773
- Barakat, A., Carels, N., Bernardi, G. (1997): The distribution of genes in the genomes of *Gramineae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 94: 6857 - 6861
- Bennett, M.D., Leitch, I.J. (2005): Nuclear DNA amounts in angiosperms: Progress, problems and prospects. *Annals of Botany* 95: 45 - 90
- Bennett, M.D., Smith, J.N. (1976): Nuclear - DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* 274: 227 - 274
- Both, M., Csukai, M., Stumpf, M.P.H., Spanu, P.D. (2005): Gene Expression Profiles of *Blumeria graminis* Indicate Dynamic Changes to Primary Metabolism during Development of an Obligate Biotrophic Pathogen. *The Plant Cell* 17: 2107 – 2122
- Braun, U., Cook, R.T.A., Inman, A.J., Shin, H.-D. (2002): The Taxonomy of the Powdery Mildew Fungi. In: Bélanger, R.R. (ed.): *The powdery mildews: comprehensive treatise*, pp. 13 – 55, St. Paul: APS Press
- Brown, J.K.M. (2002): Comparative Genetics of Avirulence and Fungicide Resistance in the Powdery Mildew Fungi. In: Bélanger, R.R. (ed.): *The powdery mildews: comprehensive treatise*, pp. 56 – 65, St. Paul: APS Press
- Cloutier, S., McCallum, B.D., Loutre, C., Banks, T.W., Wicker, T., Feuillet, C., Keller, B., Jordan, M.C. (2007): Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family. *Plant Molecular Biology* 65: 93 - 106
- Collins, N.C., Sadanandom, A., Schulze-Lefert, P. (2002): Genes and Molecular Mechanisms Controlling Powdery Mildew Resistance in Barley. In: Bélanger, R.R. (ed.): *The powdery mildews: comprehensive treatise*, pp. 134 – 145, St. Paul: APS Press

- Devos, K.M., Doležel, J., Feuillet, C. (2009): Genome organization and comparative genomics. In: Carver, B.F. (ed.): Wheat – Science and Trade, pp. 327 – 367, Wiley-Blackwell, Iowa
- Devos, K.M., Gale, M.D. (2000): Genome relationships: The grass model in current research. *Plant Cell* 12: 637 - 646
- Doškař, J. (2005): Klonování DNA. In: Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. (ed.): *Metody molekulární biologie*, pp. 29 – 44, MU Brno
- Dubcovsky, J., Dvorak, J. (2007): Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication, *Science* 316: 1862 - 1866
- Faris, J.D., Fellers, J.P., Brooks, S.A., Gill, B.S. (2003): A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus *Q* in wheat and identification of a candidate gene. *Genetics* 164: 311 - 321
- Feuillet, C., Travella, S., Stein, N., Albar, L., Nublát, A., Keller, B. (2003): Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15253 - 15258
- Frary, A., Doganlar, S., Ratnaparkhe, M.B. (2008): Comparative Mapping. In: Kole, Ch., Abbott, A.G. (ed.): *Principles and Practices of Plant Genomics, Genome mapping*, pp. 205 - 228, Science Publishers
- Gresshoff, P.M. (2005): Positional Cloning of Plant Developmental Genes. In: Meksem, K., Kahl, G. (ed.): *The Handbook of Plant Genome Mapping, Genetic and Physical Mapping*, pp. 3 – 22, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA
- Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T.N., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., Colas, I., Moore, G. (2006): Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* 439: 749 - 752
- Guyot, R., Keller, B. (2004): Ancestral genome duplication in rice. *Genome* 47: 610 - 615

- Hackauf, B., Rudd, S., van der Voort, J.R., Miedaner, T., Wehling, P. (2009): Comparative mapping of DNA sequences in rye (*Secale cereale* L.) in relation to the rice genome. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 371 - 384
- Hsam, S.L.K., Zeller, F.J. (2002): Breeding for Powdery Mildew Resistance in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Bélanger, R.R. (ed.): *The powdery mildews: comprehensive treatise*, pp. 219 – 238, St. Paul: APS Press
- Hua, W., Liu, Z.J., Zhu, J., Xie, C.J., Yang, T.M., Zhou, Y.L., Duan, X.Y., Sun, Q.X., Liu, Z.Y. (2009): Identification and genetic mapping of *Pm42*, a new recessive wheat powdery mildew resistance gene derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*). *Theoretical and Applied Genetics* 119: 223 - 230
- Huang, L., Brooks, S.A., Li, W.L., Fellers, J.P., Trick, H.N., Gill, B.S. (2003): Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics*: 164: 655 - 664
- Huang, X.Q., Roder, M.S. (2004): Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: A review. *Euphytica* 137: 203 - 223
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C., Kogel, K.H. (1999): Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* 119: 1251 - 1260
- Chen, Y., Hunger, R.M., Carver, B.F., Zhang, H., Yan, L. (2009): Genetic characterization of powdery mildew resistance in U.S. hard winter wheat. *Molecular Breeding* 24: 141 – 152
- Christiansen, S.K., Giese, H. (1990): Genetic - analysis of the obligate parasitic barley powdery mildew fungus based on RFLP and virulence loci. *Theoretical and Applied Genetics* 79: 705 - 712
- Jakobson, I., Peusha, H., Timofejeva, L., Järve, K. (2006): Adult plant and seedling resistance to powdery mildew in a *Triticum aestivum* x *Triticum militinae* hybrid line. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 760 - 769

- Jarvis, W.R., Gubler, W.D., Grove, G.G.: Epidemiology of Powdery Mildews in Agricultural Pathosystems. In: Bélanger, R.R. (ed.): The powdery mildews: comprehensive treatise, pp. 169 – 199, St. Paul: APS Press
- Kunoh, H. (2002) Localized Induction of Accessibility and Inaccessibility by Powdery Mildew. In: Bélanger, R.R. (ed.): The powdery mildews: comprehensive treatise, pp. 126 – 133, St. Paul: APS Press
- Lan, C.X., Liang, S.S., Wang, Z.L., Yan, J., Zhang, Y., Xia X.C., He, Z.H. (2009): Quantitative Trait Loci Mapping for Adult-Plant Resistance to Powdery Mildew in Chinese Wheat Cultivar Bainong 64. *Phytopathology* 99: 1121 - 1126
- Lan, C.X., Ni, X.W., Yan, J., Zhang, Y., Xia, X.C., Chen, X.M., He, Z.H. (2010): Quantitative trait loci mapping of adult-plant resistance to powdery mildew in Chinese wheat kultivar Lumai 21. *Molecular Breeding* 25: 615 - 622
- Levy, A.A., Feldman, M. (2002): The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant Physiology* 130: 1587 - 1593
- Li, G.Q., Fang, T.L., Zhang, H.T., Xie, C.J., Li, H.J., Yang, T.M., Nevo, E., Fahima, T., Sun, Q.X., Liu, Z.Y. (2009): Molecular identification of a new powdery mildew resistance gene *Pm41* on chromosome 3BL derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*). *Theoretical and Applied Genetics* 119: 531 - 539
- Li, W.L., Zhang, P., Fellers, J.P., Friebe, B., Gill, B.S. (2004): Sequence composition, organization, and evolution of the core *Triticeae* genome. *Plant Journal* 40: 500 - 511
- Liang, S.S., Suenaga, K., He, Z.H. Wang, Z.L., Liu, H.Y., Wang, D.S., Singh, R.P., Sourdille, P., Xia, X.C. (2006): Quantitative trait loci mapping for adult-plant resistance to powdery mildew in bread wheat. *Phytopathology* 96: 784 - 789
- Linde-Laursen, I., Heslop-Harrison, J.S., Shepherd, K.W., Taketa, S. (1997): The barley genome and its relationship with the wheat genomes. A survey with an internationally agreed recommendation for barley chromosome nomenclature. *Hereditas* 126: 1 - 16

- Luo, M.-C., Yang, Z.-L., You, F. M., Kawahara, T., Waines, J. G., Dvorak, J. (2007): The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 947 – 959
- Mejlhede, N., Kyjovska, Z., Backes, G., Burhenne, K., Rasmussen, S. K., Jahoor, A. (2006): *EcoTILLING* for the identification of allelic variation in the powdery mildew resistance genes *mlo* and *Mla* of barley. *Plant Breeding* 125: 461 – 467
- Moore, G., Devos, K.M., Wang, Z., Gale, M.D. (1995): Cereal genome evolution – grasses, line up and form a circle. *Current Biology* 5: 737 - 739
- Muranty, H., Pavoine, M.T., Jaudeau, B., Radek, W., Doussinault, G., Barloy, D. (2009): Two stable QTL involved in adult plant resistance to powdery mildew in the winter wheat line RE714 are expressed at different times along the growing season. *Molecular Breeding* 23: 445 - 461
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A., Schmutz, J., Spannagl, M., Tang, H.B., Wang, X.Y., Wicker, T., Bharti, A.K., Chapman, J., Feltus, F.A., Gowik, U., Grigoriev, I.V., Lyons, E., Maher, C.A., Martis, M., Narechania, A., Ollilar, R.P., Penning, B.W., Salamov, A.A., Wang, Y., Zhang, L.F., Carpita, N.C., Freeling, M., Gingle, A.R., Hash, C.T., Keller, B., Klein, P., Kresovich, S., McCann, M.C., Ming, R., Peterson, D.G., Mehboob-ur-Rahman, Ware, D., Westhoff, P., Mayer, K.F.X., Messing, J., Rokhsar, D.S. (2009): The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457: 551 - 556
- Pedersen, C., Wu, B.Q., Giese, H. (2002): A *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* BAC library - contig building and microsynteny studies. *Current Genetics* 42: 103 - 113
- 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: 70 - 82

- Pourkheirandish, M., Komatsuda, T. (2007): The importance of barley genetics and domestication in a global perspective. *Annals of Botany* 100: 999 - 1008
- Ramsay, L., Macaulay, M., Ivanissevich, S.D., MacLean, K., Cardle, L., Fuller, J., Edwards, K.J., Tuvešson, S., Morgante, M., Massari, A., Maestri, E., Marmioli, N., Sjakste, T., Ganal, M., Powell, W., Waugh, R. (2000): A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156: 1997 - 2005
- Řepková, J., Dreiseitl, A., Lízal, P., Kyjovská, Z., Teturová, K., Psoťková, R., Jahoor, A. (2006): Identification of resistance genes against powdery mildew in four accessions of *Hordeum vulgare ssp. Spontaneum*. *Euphytica* 151: 23 - 30
- Rodriguez, S., Perera, E., Maestra, B., Diez, M., Naranjo, T. (2000): Chromosome structure of *Triticum timopheevii* relative to *T. turgidum*. *Genome* 43: 923 - 930
- Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B.S., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J.R., Tsui, L.C., Collins, F.S. (1989): Identification of the cystic - fibrosis gene – chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059 - 1065
- Rozen, S., Skaletsky, H.J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (ed.): *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365 - 386
- Salina, E.A., Leonova, I.N., Efremova, T.T., Röder, M.S. (2006): Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization. *Functional and Integrative Genomics* 6: 71 – 80
- Schneider, K. (2005): Mapping Populations and Principles of Genetic Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G. (ed.): *The Handbook of Plant Genome Mapping, Genetic and Physical Mapping*, pp. 3 – 22, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA
- Schüller, C., Backes, G., Fischbeck, G., Jahoor, A. (1992): RFLP markers to identify the alleles on the *Mla* locus conferring powdery mildew resistance in barley. *Theoretical and applied genetics* 84: 330 – 338

- Schweizer, P. (2007): Nonhost resistance of plants to powdery mildew – New opportunities to unravel the mystery. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70: 3 - 7.
- Sorrells, M.E., La Rota, M., Bermudez-Kandianis, C.E., Greene, R.A., Kantety, R., Munkvold, J.D., Miftahudin, Mahmoud, A., Ma, X.F., Gustafson, P.J., Qi, L.L., Echaliier, B., Gill, B.S., Matthews, D.E., Lazo, G.R., Chao, S.M., Anderson, O.D., Edwards, H., Linkiewicz, A.M., Dubcovsky, J., Akhunov, E.D., Dvorak, J., Zhang, D.S., Nguyen, H.T., Peng, J.H., Lapitan, N.L.V., Gonzalez-Hernandez, J.L., Anderson, J.A., Hossain, K., Kalavacharla, V., Kianian, S.F., Choi, D.W., Close, T.J., Dilbirligi, M., Gill, K.S., Steber, C., Walker-Simmons, M.K., McGuire, P.E., Qualset, C.O. (2003): Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome Research* 13: 1818 - 1827
- Spanu, P. (2008): Exploring the genome of barley powdery mildew. Online: <http://www.ebi.ac.uk/industry/Documents/workshop-materials/CropPathogenGenomics2008/Sequencing%20the%20Barley%20powdery%20mildew%20genome%20-%20Pietro%20Spanu.pdf>.
- Srnić, G. (2003): Genetics of Resistance to Powdery Mildew in Several Wheat Germplasm Lines. Graduate Faculty of North Carolina State University
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596 - 1599.
- Tucker, D.M., Griffey, C.A., Liu, S., Maroof, M.A.S. (2006): Potential for effective marker-assisted selection of three quantitative trait loci conferring adult plant resistance to powdery mildew in elite wheat breeding populations. *Plant Breeding* 125: 430 – 436
- Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., Dubcovsky, J. (2006): A *NAC* gene regulating senescence improves grain protein zinc, and iron content in wheat. *Science* 314: 1298 - 1301
- Valárik, M., Jakobson, I., Timofejeva, L., Kladivova, M., Järve, K., Doležel, J. (2009): Colinearity-based marker mining for high density mapping of the wheat powdery

mildew resistance locus *Q_{Pm.tut-4A}*. In: Abstracts of the 19th International *Triticeae* Mapping Initiative - 3rd COST Tritigen. p. 88. INRA, Clermont-Ferrand

Věchet, L. (2008): Rezistence obilnin k chorobám. In: Věchet, L.: Rezistence obilnin k chorobám, pp. 1 - 4 , Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Věchet, L., Burketová, L. (2008): Indukovaná rezistence pšenice k padlí travnímu (*Blumeria graminis f. sp. tritici*). In: Věchet, L.: Rezistence obilnin k chorobám, pp. 14 - 17 , Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Vogel, J.P., Garvin, D.F., Mockler, T.C., Schmutz, J., Rokhsar, D., Bevan, M.W., Barry, K., Lucas, S., Harmon-Smith, M., Lail, K., Tice, H., Grimwood, J., McKenzie, N., Huo, N.X., Gu, Y.Q., Lazo, G.R., Anderson, O.D., You, F.M., Luo, M.C., Dvorak, J., Wright, J., Febrer, M., Idziak, D., Hasterok, R., Lindquist, E., Wang, M., Fox, S.E., Priest, H.D., Filichkin, S.A., Givan, S.A., Bryant, D.W., Chang, J.H., Wu, H.Y., Wu, W., Hsia, A.P., Schnable, P.S., Kalyanaraman, A., Barbazuk, B., Michael, T.P., Hazen, S.P., Bragg, J.N., Laudencia-Chingcuanco, D., Weng, Y.Q., Haberer, G., Spannagl, M., Mayer, K., Rattei, T., Mitros, T., Lee, S.J., Rose, J.K.C., Mueller, L.A., York, T.L., Wicker, T., Buchmann, J.P., Tanskanen, J., Schulman, A.H., Gundlach, H., de Oliveira, A.C., Maia, L.D., Belknap, W., Jiang, N., Lai, J.S., Zhu, L.C., Ma, J.X., Sun, C., Pritham, E., Salse, J., Murat, F., Abrouk, M., Bruggmann, R., Messing, J., Fahlgren, N., Sullivan, C.M., Carrington, J.C., Chapman, E.J., May, G.D., Zhai, J.X., Ganssmann, M., Gurazada, S.G.R., German, M., Meyers, B.C., Green, P.J., Tyler, L., Wu, J.J., Thomson, J., Chen, S., Scheller, H.V., Harholt, J., Ulvskov, P., Kimbrel, J.A., Bartley, L.E., Cao, P.J., Jung, K.H., Sharma, M.K., Vega-Sanchez, M., Ronald, P., Dardick, C.D., De Bodt, S., Verelst, W., Inze, D., Heese, M., Schnittger, A., Yang, X.H., Kalluri, U.C., Tuskan, G.A., Hua, Z.H., Vierstra, R.D., Cui, Y., Ouyang, S.H., Sun, Q.X., Liu, Z.Y., Yilmaz, A., Grotewold, E., Sibout, R., Hematy, K., Mouille, G., Hofte, H., Pelloux, J., O'Connor, D., Schnable, J., Rowe, S., Harmon, F., Cass, C.L., Sedbrook, J.C., Byrne, M.E., Walsh, S., Higgins, J., Li, P.H., Brutnell, T., Unver, T., Budak, H., Belcram, H., Charles, M., Chalhoub, B., Baxter, I. (2010): Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. Nature 463: 763 - 768

- von Bothmer, R., Jacobsen, N., Baden, C., Jørgensen, R.B., Linde-Laursen, I. (1995): An Ecogeographical Study of the Genus *Hordeum*, International Plant Genetic Resources Institute
on-line: http://www2.bioversityinternational.org/publications/Web_version/271/
- Wei, F.S., Gobelman-Werner, K., Morroll, S.M., Kurth, J., Mao, L., Wing, R., Leister, D., Schulze-Lefert, P., Wise, R.P. (1999): The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240-kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. *Genetics* 153: 1929 - 1948
- Xu, Y.B., McCouch, S.R., Zhang, Q.F. (2005): How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome? *Plant Molecular Biology* 59: 7 - 26
- Yahiaoui, N., Srichumpa, P., Dudler, R., Keller, B. (2004): Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *Plant Journal* 37: 528 - 538
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., Dubcovsky, J. (2003): Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6263 - 6268
- Zhang, H.-B. (2008): Map-based Cloning of Genes and Quantitative Trait Loci. In: Kole, Ch., Abbott, A.G. (ed.): *Principles and Practices of Plant Genomics, Genome mapping*, pp. 229 - 268, Science Publishers

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- 1C - velikost haploidního jaderného genomu
- 7A^m - chromosom 7 z *T. monococcum*
- 8/1 - hybridní rezistentní linie z křížení *Triticum aestivum* kultivaru Tähti a *Triticum militinae*
- 8/1 x CS - mapovací populace z křížení hybridní rezistentní line 8/1 a *Triticum aestivum* kultivaru Chinese Spring
- 8/1 x Tähti - mapovací populace z křížení hybridní rezistentní line 8/1 a *Triticum aestivum* kultivaru Tähti
- ABI - Applied Biosystems
- APR - rezistence dospělých rostlin (Adult Plant Resistance)
- Avr – gen avirulence
- BA - směsný vzorek z DNA desíti dihaploidních linií mapovací populace, který nese v okolí hledaného genu úsek z Tähti (bulk A)
- BAC - umělý bakteriální chromosom (Bacterial Artificial Chromosome)
- BB - směsný vzorek z DNA desíti dihaploidních linií mapovací populace, který nese v okolí hledaného genu úsek z *T. militinae* (bulk B)
- BC - populace zpětných kříženců (Backcross population)
- bp - počet párů bazí (base pairs)
- CAPS - štěpené amplifikované polymorfnní sekvence (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)
- CC - proteinová doména se šroubovicovou strukturou (Coiled-Coil)
- cM - centimorgan, jednotka genetické vzdálenosti
- COS – markery pro identifikaci ortologních genů (Conserved Ortholog Set)
- CS - *T. aestivum* cv. Chinese Spring
- cv. - kultivar
- DH - dihaploidní linie (Dihaploid lines)
- EcoTilling – metoda pro detekci SNP s využitím CEL I nukleasy
- EST - úsek exprimované sekvence, odvozený z mRNA (Expressed Sequence Tags)
- ExoSap - směs pro purifikaci DNA před sekvenací, která obsahuje exonukleasu I a alkalickou fosfatasu
- F primer – forward primer

F2 - druhá filiální generace

F_{2,3} - mapovací populace linií druhé a třetí filiální generace

ISR - indukovaná systémová rezistence (Induced Systemic Resistance)

ITMI - „International *Triticeae* Mapping Initiative“

LAR - lokálně získaná rezistence (Local Acquired Resistance)

Lr1, *Lr10*, *Lr21* – pšeničné geny rezistence ke rzi pšeničné

LRR - doména složená z řady degenerovaných repetice bohatých na leucin (Leucine-rich Repeat Residues)

LTR - dlouhé koncové repetice (Long Terminal Repeats)

MAS - selekce zprostředkovaná markerem (Marker Assisted Selection)

MDA - celogenomová amplifikace (Multiple Displacement Amplification)

Mla - ječmenný gen rasově specifické rezistence k padlí travnímu

mlo - ječmenný gen rasově nespecifické rezistence k padlí travnímu

NAC - pšeničný gen ovlivňující senescenci a obsah proteinů, Zn a Fe

NBS - doména s vazebným místem pro ATP nebo GTP (Nucleotide Binding Site)

NIL - téměř izogenní linie (Nearly Isogenic Line)

PAA - polyakrylamid

PCR - polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

Ph1 - gen odpovědný za kontrolu homeologního párování chromosomů

Pm3 - pšeničný gen rasově specifické rezistence k padlí travnímu (powdery mildew)

Q - pšeničný gen související se znaky domestikace

QTL - lokus kvantitavních znaků (Quantitative Trait Locus)

R geny – geny rezistence

R primer – reverse primer

R6S - krátké rameno rýžového chromosomu 6

RFLP - délkový polymorfismus restričních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RIL- rekombinační inbrední linie (Recombinant Inbred Line)

SA - kyselina salicylová

SAR - systémově získaná rezistence (Systemic Acquired Resistance)

SNAP - protein, který je součástí SNARE komplexu a zodpovídá za specifickou fúzi membrán (Synaptosomal-Associated Protein)

SNARE - proteinový komplex, který zprostředkovává fúzi membrán (Soluble N-ethylmaleimide - sensitive factor Attachment Protein)

SNP - jednonukleotidový polymorfismus (Single Nucleotide Polymorphism)

SSR - mikrosatelit (Simple Sequence Repeat)

TA - *Triticum aestivum* kultivar Tähti

TEMED - N,N,N',N'-*tetra*-methyl-ethylendiamin

TIR - proteinová doména homologní s proteinem Toll a receptorem pro Interleukin-1 (Toll/Interleukin-1 Receptor)

TM - *Triticum militinae*

VIGS - virem indukované umlčování genu (Virus-Induced Gene Silencing)

VRN - pšeničný gen odpovědný za potřebu vernalizace

W4AL - dlouhé rameno pšeničného chromosomu 4 z genomu A

WIR - indukovaná rezistence proti poranění býložravého hmyzu (Wound-Induced Resistance)

YAC - umělý kvasinkový chromosom (Yeast Artificial Chromosome)