

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2015

Bc. Alena Ryšavá

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vývoj a charakterizace materiálů
pro vysokohustotní deleční mapování
chromosomu 4A pšenice**

Diplomová práce

Bc. Alena Ryšavá

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

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

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením Mgr. Miroslava Valárika, Ph.D. s použitím uvedených literárních a informačních zdrojů.

V Olomouci dne 27. 4. 2015

.....

Bc. Alena Ryšavá

SOUHRN

Analýza genomu pšenice je ztížena jeho velikostí a komplexitou a to hlavně nadbytkem repetitivních elementů, které komplikují dostupnost kvalitní genomové sekvence. Získání referenční sekvence pšeničného genomu je významným milníkem pro objasnění funkce mnoha agronomicky významných genů. Pro získání referenční sekvence je potřeba najít nové cesty, jak se vypořádat s velikostí a komplexitou genomu. Jednou z cest snížení komplexity genomu je třídění chromosomů pomocí průtokové cytometrie. Tříděné chromosomy slouží ke konstrukci chromosomově specifických DNA knihoven a fyzických map. Fyzické mapy jsou ideálním východiskem pro získání referenční sekvence. Ukotvení a orientace kontigů fyzické mapy může výrazně přispět ke spolehlivému poskládání referenční sekvence. Pro ukotvení fyzické mapy s genetickou mapou je potřeba mít dostatek molekulárních markerů se známým pořadím. K ukotvování fyzických map se používají rekombinační, cytogenetické nebo deleční mapy. Deleční mapy jako jediné umožňují dosáhnout dostatečné rozlišení v pericentromerických oblastech.

Cílem předložené práce bylo zvětšit rozlišovací schopnost deleční fyzické mapy chromosomu 4A. Zvětšit rozlišovací schopnost je možné navýšením počtu delečních linií a jejich charakterizací pomocí STS markerů. Původní deleční mapa 4A chromosomu (12 delečních linií a 9 binů) byla rozšířena o 206 nových delečních linií. Toto umožňuje zvětšit rozlišovací schopnost deleční mapy o více než 25×. Předběžná charakterizace 62 nových delečních linií pro telomerický bin 4AL ramene sedmi molekulárními markery potvrdila tento předpoklad. Telomerický bin byl rozdělen na dalších 6 binů. Tato nová deleční mapa s velkým rozlišením bude použita na ukotvení 4A fyzické mapy hlavně v centromerických a pericentromerických oblastech. Práce je součástí projektu sekvenování chromosomu 4A pšenice v rámci „International Wheat Genome Sequencing Consortium“ (IWGSC).

SUMMARY

Wheat genome analysis is complicated by its size and complexity and mainly due to excess of repetitive elements which complicates availability of high quality genomic sequences. Acquiring of the wheat genome reference sequence is important milestone for deciphering of function of many agronomically important genes. To tackle the complications with the genome size and complexity a new approaches have to be employed. One of the attractive ways of genome size and complexity reduction is flow cytometry chromosome sorting. The sorted chromosomes can be used for chromosome specific physical maps construction. The physical maps are an ideal starting point for reference sequence obtaining. Physical map orienting and anchoring can substantially contribute to correct reference sequence assembly. To orient and anchor the physical map a large number of molecular markers with known order is needed. A recombination, cytogenetic or deletion maps are used for anchoring of physical maps. However, only deletion maps can offer sufficient resolution in centromeric and pericentromeric regions.

The main aim of this work was enhance the resolution of deletion physical map of wheat chromosome 4A. The resolution enhancement was done by increasing of deletion lines number and their characterization using STS markers. The original EST deletion map of chromosome 4A with 12 deletion lines and 9 bins was extended to 206 new deletion lines. The new deletion lines can increase resolution of the deletion map by more than 25 fold. The preliminary characterization of 62 novel deletion lines with seven new STS markers from the original telomeric bin of the 4AL chromosome arm enabled division of the bin to six new bins. This new deletion map with high resolution will be used for 4A physical map anchoring mainly in centromeric and pericentromeric regions. This work is part of the wheat 4A chromosome sequencing project carried within frame of „International Wheat Genome Sequencing Consortium“ (IWGSC).

CÍLE PRÁCE

Předložená diplomová práce se skládá z teoretické části a praktické části. Cílem teoretické části je literární rešerše zaměřená na téma fyzické deleční mapování 4A chromosomu u pšenice. Cílem praktické části je zvětšit rozlišovací schopnost deleční mapy 4A chromosomu navýšením fyzicky definovaných intervalů, tzv. binů, pomocí nové populace delečních linií pšenice seté *Triticum aestivum* kultivaru Chinese Spring. Nové deleční linie pro 4A chromosom byly získány pomocí gametocidálního systému:

Hlavními cíli práce bylo:

- 1) Vývoj markerů pro charakterizaci mapovací populace
- 2) Dopěstovat a vybrat nové linie deleční mapovací populace
- 3) Ukotvení s fyzickou mapou chromosomu 4A
- 4) Vývoj markerů pro neukotvené oblasti fyzické mapy

Ráda bych poděkovala především svému školiteli Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, podnětné připomínky a veškerý čas, který mi laskavě věnoval při konzultacích a vzniku této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat prof. Takashi R. Endovi, Ph.D. za poskytnutí biologického materiálu a za cenné rady týkající se křížení pšenice. Můj dík patří zahradnici Marii Vyhlídalové za ošetřování rostlinného materiálu, Ph.D. studentkám Mgr. Evě Komínkové a Mgr. Barboře Klocové za poskytnutí navrhnutých markerů, laborantkám za vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratoři Molekulární biologie a prof. Ing. Jaroslavu Doleželovi, DrSc. za umožnění vypracování diplomové práce na Ústavu experimentální botaniky, AV ČR v.v.i., v Olomouci. Tímto bych chtěla poděkovat i svým rodičům, kteří mě podporovali při studiu na vysoké škole.

OBSAH

1	ÚVOD	- 9 -
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	- 10 -
2.1	PŠENICE SETÁ (<i>TRITICUM AESTIVUM</i> L.)	- 10 -
2.2	GENOM PŠENICE	- 13 -
2.2.1	Chromosomová strategie.....	- 14 -
2.2.2	Fyzické mapy	- 16 -
2.2.2.1	Linie s přestavěným karyotypem	- 17 -
2.2.2.2	Fyzická kontigová mapa	- 18 -
2.2.2.3	DNA fingerprinting.....	- 18 -
2.2.3	Deleční mapování	- 19 -
2.2.4	Radiační hybridní mapování	- 22 -
2.3	INTEGRACE FYZICKÉ A GENETICKÉ MAPY	- 23 -
2.3.1	Genetické DNA markery	- 24 -
2.4	4A CHROMOSOM PŠENICE	- 24 -
2.5	ÚVOD K PRAKTICKÉ ČÁSTI.....	- 25 -
3	MATERIÁL A METODIKA	- 26 -
3.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	- 26 -
3.2	PĚSTOVÁNÍ MAPOVACÍ POPULACE	- 26 -
3.3	EXTRAKCE A PURIFIKACE DNA.....	- 27 -
3.3.1	Kit Agencourt® Genfind™ v2 Blood Binding Buffer	- 27 -
3.3.2	Kit Invisorb® Spin Plant Mini Kit a kit NucleoSpin® Plant II.....	- 28 -
3.4	STS MARKERY SPECIFICKÉ PRO 4A CHROMOSOM.....	- 29 -
3.5	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	- 32 -
3.6	ELEKTROFORÉZA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU.....	- 33 -
3.7	ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT	- 33 -
4	VÝSLEDKY	- 34 -
4.1	ZVĚTŠOVÁNÍ DELEČNÍ MAPOVACÍ POPULACE	- 34 -
4.2	VÝVOJ A UKOTVENÍ MARKERŮ NA 4A CHROMOSOM PŠENICE	- 37 -
5	DISKUZE	- 47 -
5.1	ZVĚTŠOVÁNÍ DELEČNÍ MAPOVACÍ POPULACE	- 48 -
5.2	VÝVOJ A UKOTVENÍ MARKERŮ NA 4A CHROMOSOM PŠENICE	- 48 -
6	ZÁVĚR	- 51 -
7	LITERATURA	- 52 -
8	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	- 58 -

1 ÚVOD

Pšenice setá (*Triticum aestivum*) je alohexaploidní zemědělská plodina, která poskytuje ~20 % živin pro lidstvo. Vysoká nutriční hodnota, bezproblémové uskladnění a transport způsobily, že pšenice našla uplatnění v různých odvětvích hospodářství. V potravinářském průmyslu se z pšenice vyrábí pečivo, cereálie, těstoviny, krupice a alkoholické nápoje, v živočišné výrobě se pšenice využívá ke krmným účelům, v průmyslu slouží jako základní surovina pro výrobu lihu a škrobu, v energetice k výrobě tuhého biopaliva, v alternativním stavebnictví jako izolační materiál a v domácnosti k výrobě dekorací. Pěstování pšenice je závislé na environmentálních podmínkách zahrnujících abiotické a biotické stresy, které výrazně ovlivňují výnos a kvalitu pšenice. Zároveň s rostoucí spotřebou pšenice související s narůstající celosvětovou populací a změnou stravovacích návyků lidí je potřeba vyšlechtit nové výnosnější odrůdy pšenice. Šlechtění nových a výnosnějších odrůd klasickými přístupy není dostatečně efektivní. Dle IRIWI (*International Research Initiative for Wheat Improvement*) by roční přírůstek výnosu měl být 1,7%, avšak v současnosti je cca 1%. Efektivní implementace nových metod genomiky do šlechtění vyžaduje znalost referenční sekvence genomu, charakterizaci agronomicky důležitých genů a jejich regulačních oblastí. Pšenice setá má velký a komplexní genom ($2n = 42$, AABBDD) s velkým obsahem repetitivních sekvencí (přes 80 %), které ztěžují získání referenční sekvence pšeničného genomu. Komplexitu pšeničného genomu lze snížit pomocí chromosomové strategie, kdy genom je roztržiděn na jednotlivé pšeničné chromosomy. Tato strategie se stala základem pro vznik *International wheat genome sequencing consortium* (IWGSC). Prvním krokem sekvenace chromosomů je konstrukce ukotvené, a pokud možno orientované fyzické mapy chromosomu. K ukotvování fyzických map se používají rekombinační, cytogenetické nebo deleční mapy. Deleční mapy jako jediné umožňují dosáhnout dostatečného rozlišení v pericentromerických oblastech.

Předložená diplomová práce pojednává o konstrukci a charakterizaci deleční mapovací populace s velkým rozlišením pro 4A chromosom pšenice. Práce se skládá z teoretické a praktické části. V teoretické části práce jsou shrnuty poznatky o pšenici seté a jejím genomu, dále se zabývá mapováním u pšenice a integraci fyzické a genetické mapy s důrazem na deleční mapování, které bylo využito v rámci praktické části diplomové práce. Praktická část diplomové práce je zaměřena na konstrukci linií deleční mapovací populace pro 4A chromosom, vývoj STS markerů pro charakterizaci linií mapovací populace a demonstraci zlepšeného rozlišení této mapovací populace.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

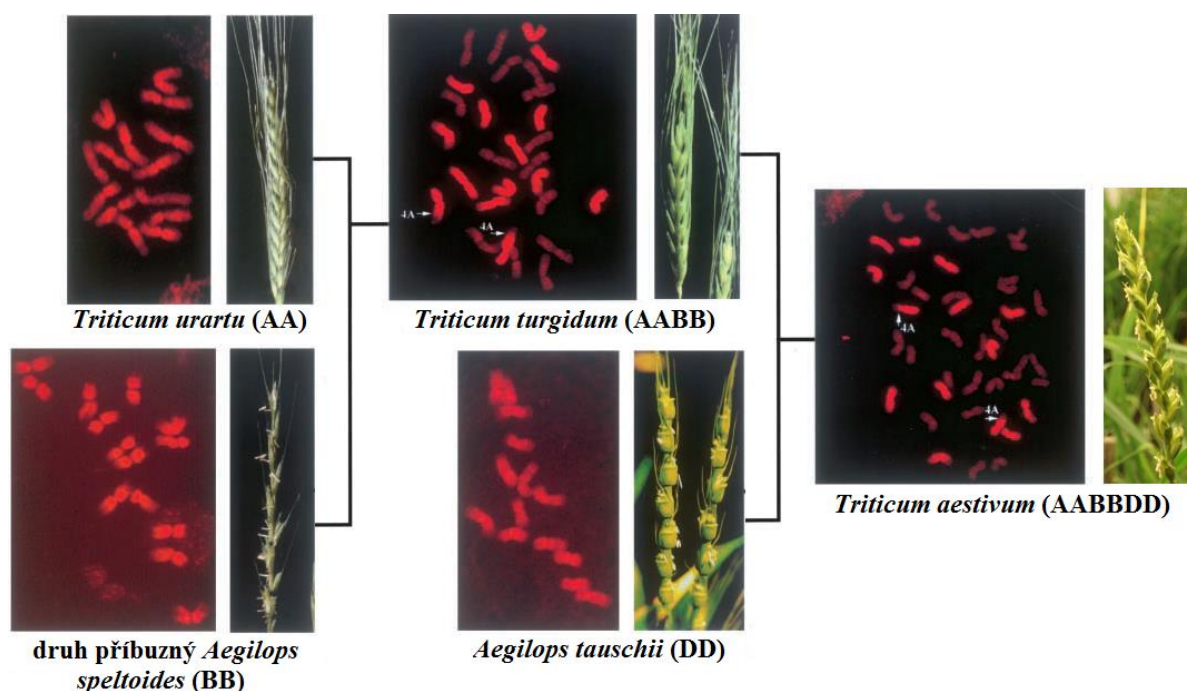
Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) patří mezi nejvýznamnější plodiny. Poskytuje kalorie pro téměř 30 % světové populace (<http://faostat3.fao.org>), a proto důkladná znalost organizace, funkce a složení jejího genomu je nezbytná pro efektivní a cílené šlechtění nových výnosnějších a odolnějších odrůd. Pšenice je jednoděložná rostlina (*Liliopsida*). Z taxonomického hlediska patří pšenice do čeledi *Poaceae* a kmene *Triticeae* (Kellogg, 2001) s více než 10 000 druhy (Clayton a Renvoize, 1986) a více než 800 rody (Watson a Dallwitz, 1992) trav využívaných lidmi k urbanizaci krajiny. Některé traviny z kmene *Triticeae* byly domestikovány, například ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.), žito seté (*Secale cereale* L.) a pšenice setá (*Triticum aestivum* L.). Pšenice setá byla domestikována přibližně 10 000 let před našim letopočtem (Dubcovsky a Dvořák, 2007) v jihozápadní Asii v tzv. Úrodném půlměsíci představující dnešní Egypt, Izrael, Libanon, Jordánsko, Turecko, Sýrii, Irák a Írán (Obr. 1), (Heun a kol., 1997; Luo a kol., 2007).



Obr. 1: Mapa předpokládaného území vzniku pšenice (Feuillet a kol., 2008).

Tmavě zelenou barvou je znázorněn tzv. Úrodný půlměsíc, kde došlo k domestikaci pšenice seté přibližně 10 000 let před našim letopočtem na území dnešního Egypta, Izraele, Libanonu, Jordánska, Sýrie, Turecka, Iráku a Íránu.

Alohexaploidní pšenice setá vznikla na základě dvou po sobě následujících hybridizací (Obr. 2). První hybridizace nastala před 0,5 až 3 miliony lety (Huang a kol., 2002) mezi diploidní pšenicí *Triticum urartu* ($2n = 2x = 14$, genom AA) a dosud neznámým druhem pšenice ze sekce *Sitopsis* (Feuillet a kol., 2008), který poskytl genom BB a je příbuzný s diploidní pšenicí *Aegilops speltoides* ($2n = 2x = 14$, genom SS), (Dvořák a Zhang, 1990). Vznikla tetraploidní pšenice *Triticum turgidum* ($2n = 4x = 28$, genom AABB), která byla vitálnější, měla vyšší výnos a lépe se přizpůsobila environmentálním podmínkám oproti diploidním předkům (Luo a kol., 2007; Feuillet a kol., 2008). Z *Triticum turgidum* bylo vyšlechtěno spousta poddruhů. V současnosti má malý ekonomický význam pouze poddruh *Triticum turgidum* ssp. *durum*, takzvaná pšenice tvrdá, která se pěstuje pro výrobu těstovin (Feuillet a kol., 2008). Druhá hybridizace nastala před 8 000 až 10 000 lety (Keller a kol., 2005) mezi tetraploidní pšenicí *Triticum turgidum* ($2n = 4x = 28$, genom AABB) a diploidní pšenicí *Aegilops tauschii* ($2n = 2x = 14$, genom DD). Touto hybridizací vznikla hexaploidní pšenice setá *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$, genom AABBDD), (Feldman a kol., 1995). D genom vnesl do pšenice *Triticum aestivum* geny kódující proteiny zlepšující vlastnosti kynutých produktů (Chantret a kol., 2005)



Obr. 2: Schéma evoluce pšenice seté *Triticum aestivum* upravené podle Gill a kol. (2004).

Obrázek představuje dvě evoluční události mezi pšenicemi. Hybridizaci *Triticum urartu* s druhem příbuzným *Aegilops speltoides* a hybridizaci *Triticum turgidum* s *Aegilops tauschii* za vzniku pšenice *Triticum aestivum*. Na levé straně jsou červeně nabarveny metafázní chromosomy dělicích se buněk a na pravé straně jsou klasy jednotlivých pšenic podílejících se na evoluci.

a geny zodpovědné za lepší adaptaci ke klimatickým podmínkám, což umožnilo větší geografické rozšíření pšenice (Feuillet a kol., 2008). Pšenice je pěstována od Norska a Ruska 65° s.š. po Argentinu 45° j.š. V tropických oblastech je pěstování pšenice situováno pouze do vyšších nadmořských výšek (Lantican a kol., 2005; Dubcovsky a Dvořak, 2007). Na celém světě v roce 2013 byla pšenice pěstována na 219 milionů ha osevni plochy s produkcí více než 700 mil tun (faostat3.fao.org). Z hlediska celosvětové produkce obilovin byla pšenice v roce 2013 na třetím místě (Obr. 3). Vzhledem k rostoucí lidské populaci je potřeba ročně zvyšovat výnos o 1,7 %, avšak současný růst je pouze 1,1 % (<http://www.wheatinitiative.org>). Proto je potřeba vývoj nových genomických přístupů k studiu genomu pšenice pro efektivnější šlechtění odrůd s vyšším a stabilnějším výnosem a odolností k biotickým a abiotickým stresům. Pro zefektivnění šlechtění odrůd pšenice, je potřeba znát uspořádání genů. To vyžaduje dostupnost kvalitní genomové sekvence, takzvané referenční sekvence.



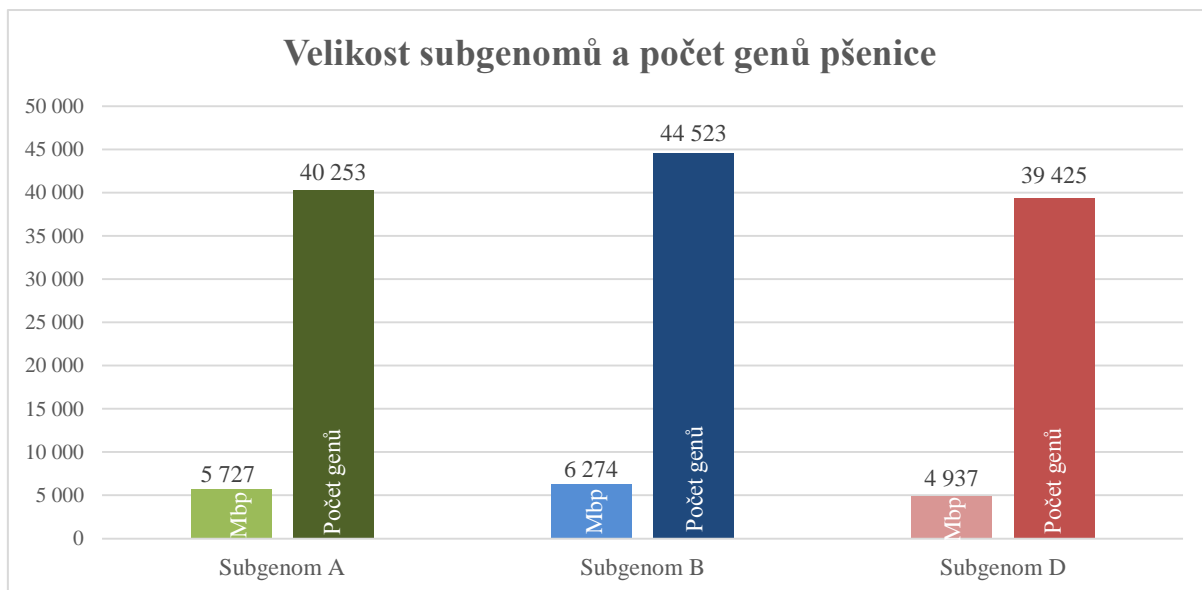
Obr. 3: Porovnání světové produkce mezi jednotlivými vybranými obilovinami v roce 2013 podle údajů z (<http://faostat3.fao.org/compare/E>).

Světová produkce v milion tunách vybraných obilovin v roce 2013. Kukuřice, rýže a pšenice tvoří největší podíl světové produkce. Do minoritní skupiny s nižší produkcí patří ječmen, čirok, proso, oves a žito. Červenou barvou je zvýrazněna světová produkce pšenice, která činí 715,9 milionů tun.

2.2 Genom pšenice

Šlechtění pšenice pomocí selekce zprostředkované markery, tzv. MAS, umožňuje identifikovat přítomnost genů pro agronomicky významné znaky v raných stádiích šlechtění. Avšak doposud využití MAS ve šlechtění pšenice je výrazně omezoováno velikostí a komplexností genomu pšenice. V pšeničném genomu s velikostí ~17 Gbp (16 938 Mbp; IWGSC, 2014) bylo identifikováno 124 201 genových lokusů (Obr. 4) na 21 chromosomech (IWGSC, 2014). Tento obrovský genový pool (lidský genom pouze ~24 000 genů; IHGSC, 2004) dává pšenici dostatečnou plasticitu pro adaptaci na široké spektrum přírodních podmínek.

Jak již bylo zmíněno, pšenice je alohexaploidní druh s třemi homeologními sadami po 7 chromosomech ve třech subgenomech A, B a D. Subgenom A je velký 5 727 Mbp (IWGSC, 2014) a v převážné míře ovlivňuje autogamii a morfologické vlastnosti zahrnující strukturu květu, tvar zrna a rostlinný habitus (Rong, 1999; Nalam a kol., 2006). Subgenom B je velký 6 274 Mbp (IWGSC, 2014) a v převážné míře ovlivňuje ekologickou adaptaci a toleranci k biotickým i abiotickým stresům (Peng a kol., 2003a, b). Subgenom D je velký 4 937 Mbp (IWGSC, 2014) a v převážné míře ovlivňuje pekařskou kvalitu mouky a odolnost pšenice vůči chladu, vlhkosti a odlišné fotoperiodě (Dubcovsky a Dvořak, 2007). Převážnou část pšeničného genomu tvoří repetitivní elementy (>80 %), z nichž nejčastější jsou LTR retrotransposony typu Gypsy, DNA transpozony typu Mutator a Mariner (IWGSC, 2014), které značně komplikují analýzu a dostupnost referenční sekvence pšeničného genomu. Protein kódující sekvence představují méně než 2 % genomu (IWGSC, 2014) a to je pravděpodobným důvodem minimálního počtu klonovaných genů. Klonovanými geny jsou tři geny vernalizace *VRN-1*, *VRN-2* a *VRN-3* (Yan a kol., 2003; 2004; 2006), gen *Q*, který má vliv na fragilitu klasů a náročnost vymlácení zrn (Faris a kol., 2003), gen *Nax1*, který reguluje toleranci k salinitě (Huang a kol., 2006), gen *Nac* s vlivem na senescenci a obsah zinku a železa v zrnu (Uauy a kol., 2006), gen *Rht1* redukující výšku pšenice (Peng a kol., 1999; Hedden, 2003), gen *Ppd-D1* mající vliv na fotoperiodu (Beales a kol., 2007) a geny rezistence k padlí travnímu *Pm3* (Yahiaoui a kol., 2004) a ke rzi pšeničné *Lr1*, *Lr10* a *Lr21* (Cloutier a kol., 2007; Feuillet a kol., 2003; Huang a kol., 2003).



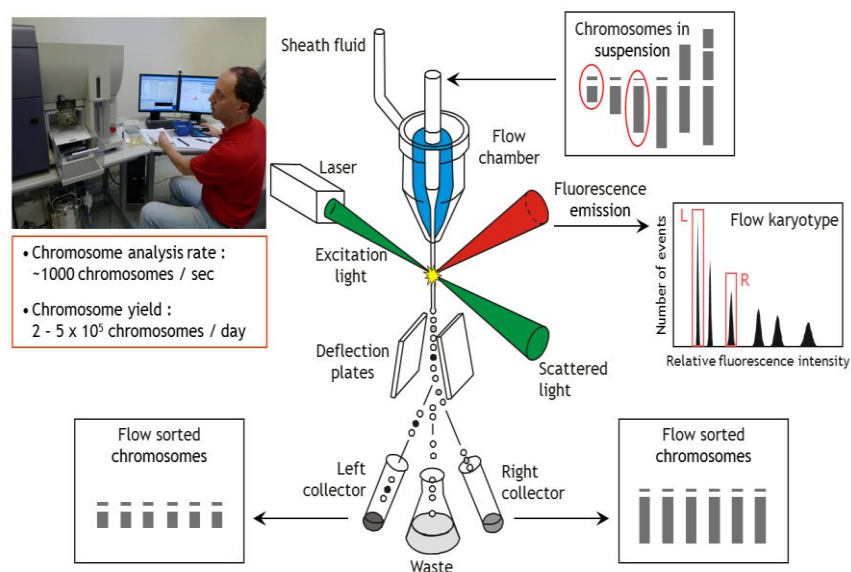
Obr. 4: Velikost jednotlivých subgenomů s celkovým počtem identifikovaných genů u pšenice podle IWGSC (2014).

Velikost pšeničných subgenomů v Mbp a počet anotovaných genů pro jednotlivé subgenomy pšenice. Zeleně je znázorněn subgenom A o velikosti 5 727 Mbp s počtem 40 253 genů, modře subgenom B o velikosti 6 274 Mbp s počtem 44 523 genů a červeně subgenom D o velikosti 4 937 Mbp s počtem 39 425 genů.

2.2.1 Chromosomová strategie

Velká komplexita genomu a vysoká sekvenční podobnost mezi geny v pšeničných subgenomech překáží efektivnímu studiu genomu pšenice a vývoji markerů pro agronomicky významné geny (IWGSC, 2014). Jednou z možností překlenutí těchto problémů je redukce ploidie rozdělením pšeničného genomu na jednotlivé chromosomy a ramena pomocí průtokové cytometrie (Doležel a kol., 2014).

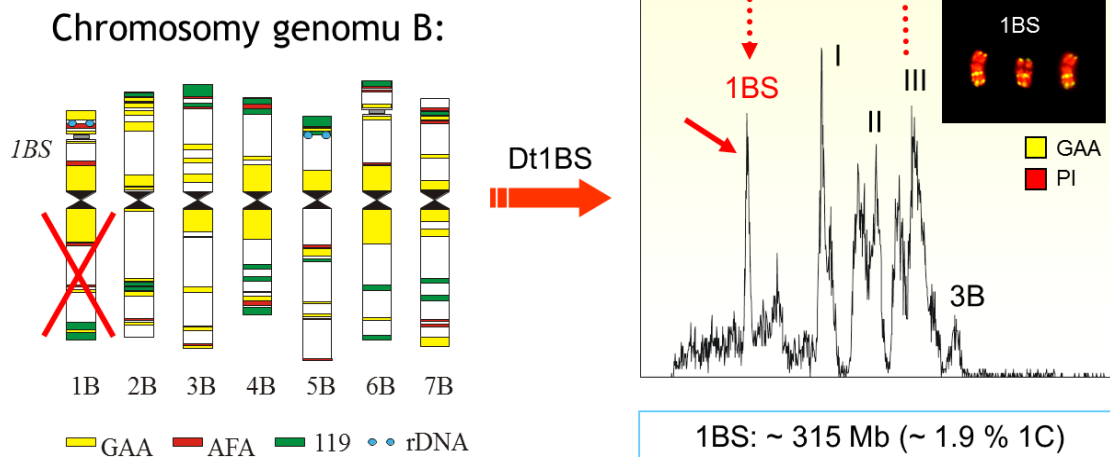
Třídění chromosomů u pšenice je založeno na přípravě suspenze intaktních chromosomů s následným fluorescenčním barvením a analýze jejich vlastností (obsahu DNA a rozptylu světla) po průchodu excitačním laserovým paprskem. Částice s požadovanými vlastnostmi jsou pak v elektrickém poli vychýleny do připravených nádob (Vrána a kol. 2000), (Obr. 5).



Obr. 5: Princip třídění pšeničných chromosomů a ramen pomocí průtokové cytometrie.

Schéma průtokového cytometru skládajícího se z fluidiky, optického a elektronického zařízení. Fluorescenčně označené chromosomy v suspenzi procházejí úzkým proudem fluidní tekutiny a jsou detekovány světelným paprskem (z laseru). Výsledkem je tzv. flow karyotyp sestavený na základě intenzity fluorescence. Vybrané částice jsou následně nasměrovány pomocí nabitých desek do připravených zkumavek. Nenabitě částice směřují do odpadní nádoby. Obrázek laskavě poskytnul Dr. J. Bartoš, UEB Olomouc.

Třídění chromosomů je možné tehdy, pokud se liší alespoň o 3 % obsahu DNA (Vrána, J. osobní sdělení). Pro třídění pšeničných chromosomů se proto používají adiční linie nebo ditelosomické linie (Pfosser a kol., 1995). Ditelosomické linie pro téměř všechny chromosomy kutivaru Chinese Spring byly připraveny v šedesátých letech minulého století Dr. Searsem pro studium párování chromosomů (Sears, 1966). Takovéto linie umožňují jasnou identifikaci jednotlivých chromosomálních ramen a třídění s velkou čistotou (Kubaláková a kol., 2002). Čistota tříděných chromosomů nebo jejich ramen se určuje pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s použitím repetitivních sond pro GAA mikrosatelit, Afa a psc119.2 repetice a 18S ribozomální DNA (Molnár a kol., 2014), (Obr. 6). DNA tříděných chromosomů je využívána v mnoha aplikacích molekulární biologie, například k fyzickému mapování, k tvorbě DNA arrayí, k vývoji DNA markerů nebo k takzvaným „survey“ chromosom specifickým sekvencím. Pro získání referenční sekvence je nejdůležitější aplikací konstrukce chromosomově specifických BAC knihoven a z nich odvozených fyzických map (Doležel a kol., 2014). Díky chromosomovému třídění lze studovat strukturu, velikost, evoluci polyploidního genomu a konstruovat fyzické mapy po jednotlivých chromosomech.



Obr. 6: Fluorescenční in situ hybridizace repetitivních sond GAA, Afa, psc119.2 a ribosomální DNA 18S.

Ideogram pro pšeničné chromosomy subgenomu B, histogram velikostí, jak je zobrazuje průtokový cytometr, a vyznačení populace chromosomálního ramene 1BS, které byly tříděny. Identita a čistota chromosomálního ramene byla určena FISH (vpravo nahoře) s repetitivními sondami pro mikrosatelit GAA (žlutě). DNA chromosomu je obarvena fluorescenční barvou propidium jodidem PI (červená barva). V levé části obrázku je znázorněn B genom s 1BS telosomickým chromosomem – 1BS krátké rameno 1B chromosomu (bez červeného křížku). V pravé části obrázku je flow karyotyp skládající se z I, II a III píků reprezentující skupiny chromosomů, z píku pro 3B chromosom (vpravo) a navíc píku (vlevo), který reprezentuje krátké rameno 1B chromosomu značně odděleného od ostatních chromosomů. Obrázek laskavě poskytl prof. J. Doležel.

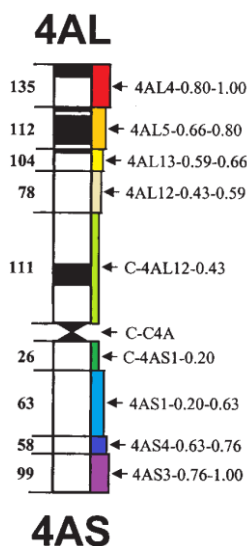
Dobrým příkladem je největší pšeničný chromosom 3B (993 Mbp; IWGSC, 2014), který lze jednoduše cytometricky oddělit od ostatních chromosomů na základě obsahu DNA. Proto byl tento chromosom použit k sestrojení první chromosom specifické fyzické mapy (Paux a kol., 2008) a k získání referenční sekvence (Choulet a kol., 2014).

2.2.2 Fyzické mapy

Kromě referenční sekvence, kde je vzdálenost markerů udávána přesně v počtu bp, a fyzické kontigové mapy, kde se odhaduje vzdálenost v bp, se k fyzickému uspořádání markerů na chromosomu nejčastěji používá mapa cytogenetická (vzdálenost markerů se udává v μm) a mapa deleční. Deleční mapa udává pozici markeru na chromosomu v intervalu mezi dvěma delecemi označeným jako „bin“. Deleční linie pro deleční mapování u pšenice byly připraveny na základě gametocidálního systému (Endo, 1990). Gametocidální systém je založen na chromosomových zlomech vyvolaných v gametách pomocí gametického letálního genu z adičního chromosomu pocházejícího z blízké příbuzného druhu pšenice

viz (kap. 2.2.3). Endo a Gill (1996) zkonstruovali celkem 338 delečních linií pro všechny pšeničné chromosomy.

Pro celý pšeničný genom byly vytvořeny EST bin mapy financované nadací NSF (*the National Science Foundation*) za účelem identifikace a charakterizace jedinečných genů EST (*Expressed Sequence Tag Unigenes*). Cílem projektu bylo mapovat jedinečné ESTy do specifických chromosomových regionů, tzv. binů, pomocí delečních, nulli-tetrasomických a ditelosomických linií (Miftahudin a kol., 2004). V rámci NSF projektu byly vytvořeny EST bin mapy pro homeologní skupinu 4. Pro 4A chromosom bylo mapováno 786 jedinečných EST, z toho 246 EST do 4 binů na krátkém rameni a 540 EST do 5 binů na dlouhém rameni 4A chromosomu (Miftahudin a kol., 2004), (Obr. 7).



Obr. 7: C-banding ideogram pro 4A chromosom s vyznačenými biny deleční mapy (Miftahudin a kol., 2004).

Tmavé pásy odpovídají C-bandům. Šipky označují jednotlivé biny. Čísla na levé straně znamenají počet mapovaných EST (*Expressed Sequence Tag*) do jednotlivých binů. Celkem 786 EST bylo mapováno do odpovídajících 9 delečních binů. Chromosom je převrácen kvůli pericentrické inverzi.

2.2.2.1 Linie s přestavěným karyotypem

U polyploidní pšenice mezi subgeny A, B a D může docházet k nezávislému párování chromosomů během meiózy (Griffiths a kol., 2006). To umožňuje vytvořit aneuploidní linie, protože pšenice toleruje ztrátu celého chromosomu nebo i jeho části. Například u nullisomické linie (Sears, 1954), které chybí homologní pár chromosomu, je homologní pár nahrazen jiným homologním párem jiného subgenomu pšenice. Homologní pár pšeničného chromosomu 4A je nahrazen homologním párem pšeničného chromosomu 4B

za vzniku nulli-tetrasomické linie pšenice N4AT4B (Sears, 1966). Tato linie umožní zjistit, zda navržený marker na 4A chromosom je opravdu specifický pro 4A chromosom. Dr. Sears připravil aneuploidní linie pšenice z kultivaru Chinese Spring, čímž byly objeveny skupiny homeologních chromosomů.

U ditelosomické linie (Sears a Sears, 1978), které chybí buď krátká, nebo dlouhá ramena homologního páru chromosomu, lze zjistit, na kterém rameni například 4A chromosomu leží nově navržený marker. Jde například o pšeničné linie dT4AL a dT4AS. U deleční linie (Endo, 1990) chybí určitá část ramene chromosomu. Rameno chromosomu je rozděleno na deleční frakce, tzv. biny, což následně umožní zjistit přesnější lokalizaci markeru a genu na daném rameni chromosomu. Nulli-tetrasomické, ditelosomické a deleční linie umožní mapovat markery ve vazbě s geny na konkrétní chromosomy, ramena a deleční biny pšenice (McIntosh, 1988; Hossain a kol., 2004b).

V pšenici bylo na delečních liniích mapováno pomocí RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) 16 000 pšeničných EST (Qi a kol., 2004). Toto rozlišení je však nedostatečné pro ukotvení většího počtu kontigů fyzické mapy.

2.2.2.2 Fyzická kontigová mapa

Fyzická kontigová mapa je sestava tzv. kontigů. Kontig představuje soubor překrývajících se BAC klonů, které tvoří spojitý úsek. Identifikovat překryvy BAC klonů lze buď pomocí DNA markerů, nebo dnes nejčastěji používaným DNA fingerprintingem (Meyers a kol., 2004; Doležel a kol., 2007). Alternativním postupem je takzvaný „Whole Genome Profiling“ (WAG), (van Oeveren a kol., 2011). Pro získání referenční sekvence, jak tomu bylo u chromosomu 3B, se používá MTP (*MinimalTilling Path*), což je minimální soubor BAC klonů, které s daným překryvem reprezentují daný kontig nebo celou fyzickou mapu.

2.2.2.3 DNA fingerprinting

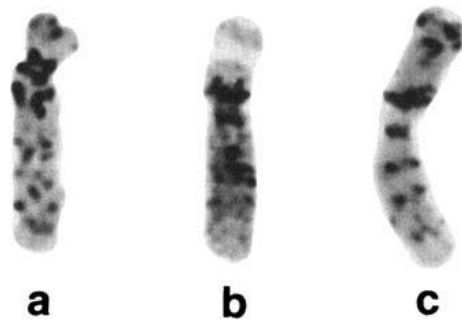
DNA fingerprinting využívá restriční endonukleázy se specifickým rozpoznávacím místem. Po štěpení a separaci DNA fragmentů vzniká charakteristický patern specifický pro danou DNA (Fingerprint). Fingerprinting využívá pro enzymatické štěpení 1 až 5 restričních endonukleáz. Podle počtu použitých restričních enzymů se bude následně lišit rozlišení a kvalita fyzické mapy (Xu a kol., 2004). Každý BAC klon je naštěpen na kratší fragmenty, které jsou separovány a detekovány. Klony odvozené ze stejné oblasti, které se překrývají, budou mít podobné fingerprinty. Na základě porovnání fingerprintů jsou identifikovány překryvy mezi BAC klony a ty jsou následně poskládány do kontigu.

Fingerprinting využívá fluorescenční značení restričních fragmentů. Separaci a detekci fluorescenčně značených fragmentů na automatickém kapilárním genetickém analyzátoru odvodil (Luo a kol., 2003). Fingerprintingová data se zpracovávají v programu FPC (*FingerPrint Contigs*), (Soderlund a kol., 2000) pomocí tzv. Sulstonova skóre, které počítá, s jakou pravděpodobností jsou fragmenty z restričního spektra společné pro dva fingerprintované klony na základě náhody (Meyers a kol., 2004). Fragmenty pocházející z repetitivních oblastí genomu můžou způsobovat větvení kontigů. Větvení kontigů program FPC není schopný detekovat. Tento problém vyřešil (Frenkel a kol., 2010) s novým přístupem, takzvaným LTC (*LinearTopological Contig*).

2.2.3 Deleční mapování

Deleční mapování u pšenice využívá linie s rozdílnou velikostí koncových delecí na jednotlivých chromosomových ramenech (Endo, 1988). Tyto linie umožňují mapovat lokusy významných genů na fyzickou bin mapu. Například Gill a kol. (1993) mapovali *Ph1* lokus, který kontroluje párování homologních chromosomů na 5B chromosom v delečním binu 5BL-11.

Deleční linie jsou konstruovány pomocí adičního chromosomu z pšenice *Aegilops cylindrica* Host ($2n = 28$, CCDD) v monosomickém stavu v kultivaru Chinese Spring (Obr. 8). Přítomnost tohoto chromosomu vyvolává chromosomové zlomy v gametách (Endo a Gill, 1996). Zlomy na koncích chromosomů nejsou zřizovány s jinými koncovými zlomy, ale jsou stabilizovány rychlým vznikem telomerní struktury (Werner a kol., 1992). Vzniklé delecce jsou pravidelně pšenášeny do potomstva bez adičního chromosomu z *Ae. cylindrica*. Kromě chromosomu z *Ae. cylindrica* mohou chromosomální zlomy vyvolávat také přítomnost chromosomu z pšenice *Ae. triumcialis* L. ($2n = 28$, UUCC) a satelitního chromosomu z *Ae. speltoides* Tausch ($2n = 14$, SS), (Endo a Gill, 1996). Chromosom 2B z kultivaru Chinese Spring nese translokaci chromosomálního segmentu z *Ae. speltoides*, který je umístěn na konec dlouhého ramene 2BL (T2BS.2BL-2SL). Tato translokace přinesla gametocidální gen *Gclb* (Tsujimoto a Tsunewaki, 1988), který vyvolává zlomy na chromosomech. Z této linie byl odvozen tzv. gametocidální systém pro přípravu delečních linií.

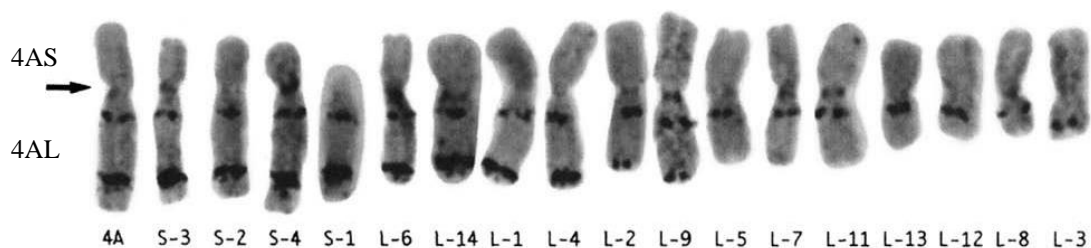


Obr. 8: C-banding adičních chromosomů a chromosomu s translokací podílejících se na tvorbě zlomů u pšenice převzato z (Endo a Gill, 1996).

Chromosomy s C-banding vzorem vyvolávající zlomy na chromosomech u pšenice *Triticum aestivum* kultivar Chinese Spring. a) *Aegilops cylindrica*, b) *Aegilops triuncialis*, c) 2B chromosom *Triticum aestivum* kultivar Chinese Spring s translokací pocházející z *Aegilops speltoides* T2BS.2BL-2SL.

Pomocí C-banding byly analyzovány chromosomové konstituce v potomstvu. Rostliny, které nesly deletované chromosomy bez adičního chromosomu byly samosprášeny, nebo zpětně zkříženy do kultivaru Chinese Spring s následným samosprášením. Následně byli z potomstva samosprášených rostlin selektováni homozygoti pro delece v sledovaných chromosomech. Pokud nebylo možné získat homozygota s danou delecí, byl heterozygot zkřížen s odpovídající nuli-terasomickou linií a selektován hemizygot s delecí v sledovaném chromosomu (Endo a Gill, 1996).

Pro 4A chromosom byly vytvořeny 4 homozygotní deleční linie krátkého ramene s redukovanou fertilitou a 11 homozygotních linií z 13 delecí pro dlouhé rameno 4A chromosomu (Obr. 9). Díky deficienci v produkci semen ze samosprášených rostlin deleční homozygoty pro delece 4AL-3, 4AL-8 a 4AL-12 nebylo možné získat (Endo a Gill, 1996).

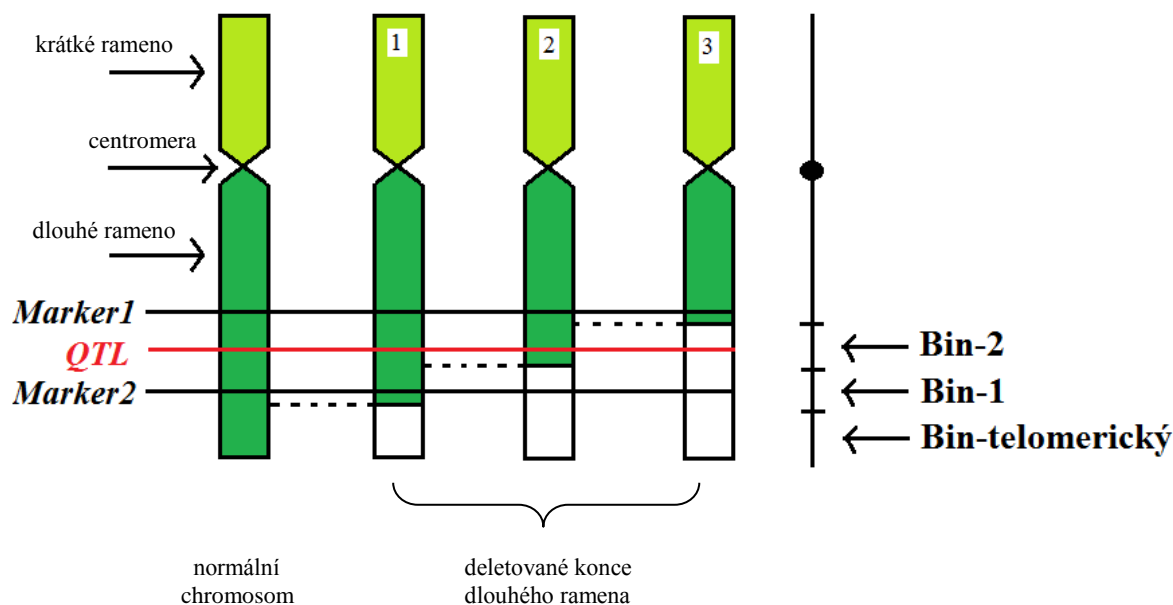


Obr. 9: C-banding deletovaných ramen 4AS a 4AL chromosomu 4A pšenice *Triticum aestivum* kultivar Chinese Spring převzato z (Endo a Gill, 1996).

C-banding chromosomů 4A s různými delecemi. První chromosom je normální 4A chromosom, který slouží pro srovnání s následujícími deletovanými 4A chromosomy. Krátké rameno (S) má 4 deletované konce chromosomu a dlouhé rameno (L) má 13 deletovaných konců chromosomu. 4AL-10 delece není, protože deleční linie byla sterilní. Černou šipkou je označena centromera.

Deleční linie jsou vhodné pro mapování genů, *QTL*, biochemických a DNA markerů bez polymorfismu, avšak rozlišení je limitováno počtem delečních linií (Obr. 10).

Alternativou delečního mapování je radiační hybridní mapování, které je založeno na podobném principu jako deleční mapování. U radiačního hybridního mapování nejsou zlomy na chromosomech vyvolány adičním chromosomem, ale radiačním zářením.



Obr. 10: Princip delečního mapování na delečních binech pomocí DNA markerů ve vazbě ke *QTL* (*Quantitative trait loci*).

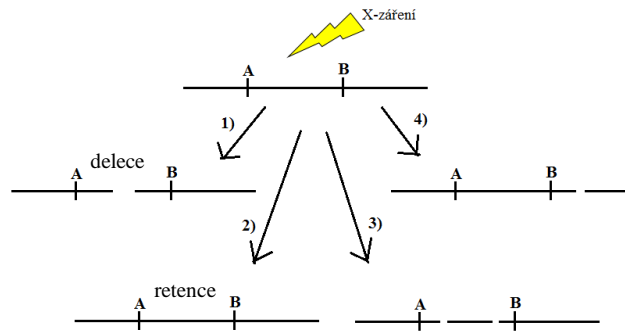
Princip delečního mapování na delečních binech. Hranice binů jsou vyznačeny přerušovanou čarou. Na normálním chromosomu v určité oblasti dlouhého ramene je lokalizován *QTL* (*Quantitative trait loci*), který je ve vazbě s *markerem1* a *markerem2*. Při delečním mapování je zjištěno, že *QTL* se nevyskytuje v rostlině, která má delecii ve 3. chromosomu. V Binu-1 je lokalizován pouze *marker2*, v Binu-2 je lokalizován *QTL* a *Marker1* je lokalizován za hranici zlomu na 3. chromosomu. To umožní identifikovat *QTL* do Binu 1 a mezi markery 1 a 2.

2.2.4 Radiační hybridní mapování

U radiačního hybridního (RH) mapování jsou zlomy na chromosomech uměle vyvolány například gama nebo rentgenovým zářením. Záření vytváří menší i větší delece v chromosomech. Ve většině případů zlomy nejsou opraveny vytvořením telomerní struktury, ale projením s přilehlým chromosomálním zlomem. Tyto linie jsou stejně jako u gametocidálního systému kříženy do nulli-tetrasomických linií. Hemizygotické linie jsou analyzovány pro prezenci nebo absenci genetických DNA markerů (Obr. 11), (Hass-Jacobus a Jackson, 2005). RH mapování bylo použito například u pšeničného genu *scs^{ae}* (Hossain a kol., 2004a) pro zvětšení rozlišení v dané chromosomové oblasti u pšenice tvrdé *Triticum turgidum* (Kalavacharla a kol., 2006).

RH mapování umožňuje integraci genetické a fyzické mapy. RH mapy jsou konstruovány na základě koretenční analýzy mezi DNA markery a indukovanými zlomy. Pořadí markerů na RH mapě nemusí odrážet skutečné pořadí markerů na chromosomu, protože zlomy na chromosomech mohou zfúzovat s jinými vzniklými fragmenty (Hass-Jacobus a Jackson, 2005). Jednotkou RH map je tzv. centiRay [cR], který odpovídá 1 % frekvenci zlomu po vystavení určité dávky záření (Boehnke a kol., 1991). Například koretenční vzdálenost 1 cR_{8 000} mezi dvěma markery na RH mapě odpovídá 1 % frekvenci zlomu po vystavení 8 000 rad X-záření (Cox a kol., 1990). RH mapy mají různou hodnotu rozlišení, protože k indukci zlomů na chromosomech mohou být použity různé dávky záření. Na RH mapě může být rozlišení až 100 kb (Schuler a kol., 1996; Steward a kol., 1997). RH mapování na rozdíl od rekombinačního mapování umožňuje studovat oblasti na chromosomech s výrazně sníženou pravděpodobností rekombinace, například v oblasti centromer nebo introgresních segmentů.

Deleční a RH mapování na rozdíl od genetického mapování není závislé na meiotické rekombinaci. Meiotická rekombinace je nahrazena uměle indukovanými zlomy. Deleční a RH mapování je rychlejší, protože nepotřebuje velkou mapovací populaci a polymorfní markery. Umožní to studovat specifickou oblast na chromosomu, například v oblasti centromer, které se pojí s menší pravděpodobností rekombinace. Výhodou delečního mapování oproti RH mapování je, že chromosomové zlomy jsou rychle stabilizovány vznikem telomerní struktury, tudíž nedochází k zfúzování zlomeného konce chromosomu s jiným chromosomovým fragmentem. Nevýhodou delečního mapování je nižší rozlišení, protože jednotlivé chromosomy jsou rozděleny na menší počet binů.



Obr. 11: Princip radiačního hybridního mapování (Ryšavá, 2013).

Princip radiačního hybridního mapování. Schématicky znázorněný chromosom nese dva markery A a B blízko sebe, mezi kterými mohou nastat různé situace zlomení na chromosomu po vystavení určité dávky X-radiačního záření. 1) vzniknou dva fragmenty, z nichž každý nese jeden marker, mezi markery A a B dochází k tzv. deleci, 2) ke zlomení nedochází, jde o tzv. retenci, 3) díky dvěma zlomům mezi markerem A a B vzniknou tři fragmenty, z nichž jeden nese žádný marker, 4) zlom za jedním markerem dá vzniknout dvěma fragmentům, z nichž jeden nese žádný marker.

2.3 Integrace fyzické a genetické mapy

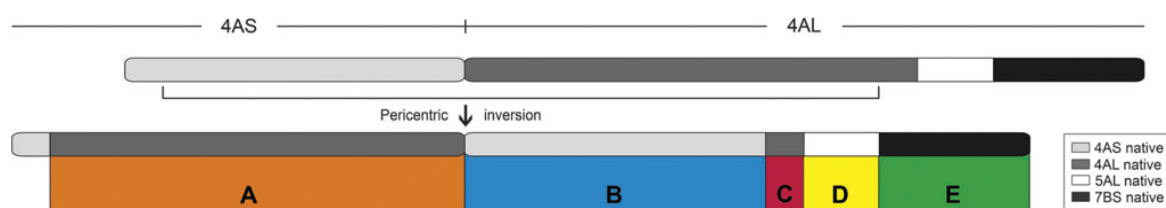
Pro zvýšení pravděpodobnosti správného poskládání referenční sekvence je důležité znát pořadí a orientaci BAC kontigů na chromosomu. Toho lze dosáhnout ukotvením kontigů na rekombinační nebo fyzickou (cytogenetickou nebo deleční) mapu chromosomu. Problémem při ukotvování kontigů na genetickou mapu je nízká hustota markerů a malé fyzické rozpětí BAC kontigů. K integraci mapy je nezbytně nutné mít vysokohustotní mapu DNA markerů (Nguyen a kol., 2005). Nejpoužívanější dostupnou mapou pro většinu rostlin je rekombinační mapa. Markery, které jsou vhodné pro ukotvování genetické a fyzické mapy, jsou nejčastěji SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), EST (*Expressed Sequence Tag*) a STS (*Sequence tagged Site*).

2.3.1 Genetické DNA markery

Mezi nejvíce rozšířené a využívané DNA markery patří tzv. SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), jednoduchý nukleotidový polymorfismus, jehož příčinou jsou substituce purinových a pyrimidinových bází. Na základě SNP lze zjistit rozdíly mezi dvěma sekvencemi (Nguyen a Wu, 2005). Například hustota pšeničných SNP je dva SNP na jednu kilobázi (Bhatramakki a Rafalski, 2001). Dalšími využívanými DNA markery jsou tzv. SSR (*Simple Sequence Repeat*), jednoduché opakující se sekvence neboli mikrosatelity, které umožní rozlišit více alel najednou díky změně v počtu opakujících se jednotek složených z 2 až 6 bp krátkých DNA sekvencí (Nguyen a Wu, 2005). Výhodou SSR je, že jsou relativně rovnoměrně rozptýlené v genomu (Li a kol., 2002). EST (*Expressed Sequence Tag*) markery jsou krátké sekvence cDNA dlouhé 200 až 700 bp (Adams a kol., 1991). A v poslední řadě markery tzv. STS (*Sequence tagged Site*), které byly využívány i v rámci této diplomové práce (kap. 3.4). Koncept STS markerů byl navržen (Olson a kol., 1989) a jsou navrhovány pro známé DNA sekvence.

2.4 4A chromosom pšenice

4A chromosom je nejvýrazněji rekonstruovaným chromosomem pšenice, a proto patří k těm nejzajímavějším. 4A chromosom během evoluce podstoupil pericentrickou inverzi, 4AL/5AL translokaci u diploidního předka a další 4AL/7BS translokaci u tetraploidního předka pšenice seté (Obr. 12), (Devos a kol., 1995; Hernandez a kol., 2012; Ma a kol., 2013; Miftahudin a kol., 2004; Naranjo a kol., 1987).



Obr. 12: Struktura pšeničného 4A chromosomu převzato z (Hernandez a kol., 2012).

Během evoluce 4A chromosomu došlo nejdříve k pericentrické inverzi mezi segmentem A (krátké rameno 4AS, oranžová barva) a segmentem B (dlouhé rameno 4AL, modrá barva) na 4A chromosomu. Takto vzniklo moderní krátké 4AS rameno. Následná translokace segmentu D (dlouhé rameno 5AL, žlutá barva) a translokace segmentu E (krátké rameno 7BS, zelená barva) dala vzniknout modernímu dlouhému 4AL ramenu pšenice.

Praktická část této práce je zaměřena na konstrukci deleční mapy 4A chromosomu se zvýšeným rozlišením a vývojem specifických molekulárních markerů pro charakterizaci nových linií deleční mapovací populace. V rámci snahy o získání referenční sekvence chromosomu 4A byla na pracovišti UEB Olomouc připravena 4A chromosom specifická BAC knihovna a fyzická mapa (nepublikovaná data).

2.5 Úvod k praktické části

Praktická část diplomové práce se zabývá vývojem a charakterizací delečních linií a vysokohustotním delečním mapováním pro 4A chromosom u pšenice. Cílem praktické části je zvětšit rozlišovací schopnost deleční fyzické mapy 4A chromosomu navýšením počtu binů a navýšením počtu delečních linií. Před více než deseti lety byla pro 4A chromosom zhotovena EST bin mapa na delečních, nulli-tetrasomických a ditelosomických liniích získaných gametocidálním systémem. EST bin mapa 4A chromosomu má pouze 9 delečních binů (Obr. 5), (Miftahudin a kol., 2004). Rozlišovací schopnost fyzické mapy závisí na počtu delečních binů.

Na Ústavu experimentální botaniky AV v Olomouci byla zhotovena chromosom 4A-specifická BAC knihovna a následně fyzická mapa (nepublikovaná data). Pro ukotvení této mapy je potřeba mapa molekulárních markerů s velkým rozlišením. Deleční mapa je jednou z možností hlavně pro oblasti s nízkou frekvencí rekombinací. Pro zvětšení deleční mapy a charakterizaci nových delečních linií bylo potřeba navrhnout markery rovnoměrně distribuované po chromosomu. K identifikaci sekvencí pro takovéto markery byl využit „GenomeZipper“. GenomeZipper představuje virtuální uspořádání genových sekvencí na 4A chromosomu, který je založen na syntenii genů pšenice s geny příbuzných druhů (IWGSC, 2014). Navrhnuté markery byly testovány na F_1 populaci hemizygotních delečních linií opracovaných gametocidálním systémem pro 4A chromosom.

Hlavním cílem praktické části diplomové práce bylo navýšit počet binů, a tím i zvětšit rozlišovací schopnost na deleční mapě 4A chromosomu.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Biologický materiál

Výchozím materiálem pro deleční mapování byla semena F_1 hemizygotních linií z gametocidálního systému pro 4A chromosom odvozených z *Triticum aestivum* kultivaru Chinese Spring. Hemizygotní linie byly získány křížením hybridu s gametocidálním lokusem s nulli-tetrasomickou linií N4AT4B nebo N4AT4D pšenice kultivaru Chinese Spring. Semena připravil a laskavě poskytnul prof. Takashi R. Endo, Ph.D. (Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Olomouc). Ke zpětnému křížení sterilních hemizygotů byla použita pšenice kultivaru Chinese Spring se standardním karyotypem.

Pro ověření specifity navržených STS markerů (Tab. I) na 4A chromosom a jeho ramena za účelem identifikace delecí v 4A chromosomu byla použita genomická DNA extrahovaná z kultivaru Chinese Spring se standardním karyotypem (CS), MDA (*Multiple Displacement Amplification*) amplifikovaná DNA z tříděných 4AL a 4AS chromosomových ramen kultivaru Chinese Spring, DNA nulli-tetrasomických linií N4AT4B a N4AT4D.

K zjištění chromosomální pozice nově navržených markerů na 4A chromosomu bylo použito patnáct delečních linií pro 4A chromosom (4 pro krátké rameno 4AS a 11 pro dlouhé rameno 4AL), (Endo a Gill, 1996). Deleční linie pro 4A chromosom z pšenice *Triticum aestivum* kultivar Chinese Spring poskytlo NBRP-Wheat, (Kyoto Univerzita, Japonsko) a DNA těchto delečních linií poskytla Mgr. Barbora Klocová (Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Olomouc).

3.2 Pěstování mapovací populace

F_1 semena z křížení nulli-tetrasomické linie N4AT4B a N4AT4D s liniemi z gametocidálního systému byla sterilizována 1 min v 5% savu a následně omyta 30 min ve vodě. Semena byla vložena do Petriho misek na navlhčený filtrační papír a buničitou vatu a inkubována 5 dnů při 6°C za účelem odstranění dormance semen. Poté byla semena inkubována 1 den při 25°C ve tmě. Naklíčená semena byla sázena do zahradnického substrátu s přísadkou vícesložkového minerálního hnojiva s mikroprvky (Rašelina Premium, Soběslav) v rašelinových květináčcích, tzv. jiffech (5×5 cm). Rostliny byly pěstovány ve skleníku při 22°C den/10°C noc. Za 20 - 29 dní od výsevu byly odebrány listové segmenty pro extrakci DNA. Vyselektované linie s delecemi byly přesazeny do květináčů (10×10 cm). Odnožující rostliny byly přemístěny do skleníku s teplotou 28°C den/18°C noc a osvětlením 12 hod den. Jednou týdně byly mladé rostliny přihnojovány roztokem Kristalonu Start 1 g/l.

Sterilní rostliny byly zkříženy s pšenicí kulivar Chinese Spring obsahující standardní karyotyp za účelem obnovení fertility. V průběhu vegetace byla také hodnocena morfologie klasů, protože deleční linie vykazovaly odchylky.

3.3 Extrakce a purifikace DNA

Genomická DNA delečních linií byla extrahována pomocí kitu Agencourt[®] Genfind[™] v2 Blood Binding Buffer (Beckman Coulter, USA) v 96jamkových PCR miskách. Za účelem ověření vybraných delečních linií a získání většího množství DNA byla DNA extrahována pomocí kitu Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit (STRATEC Biomedical AG, Německo) nebo kitu NucleoSpin[®] Plant II (Macherey-Nagel, Německo).

3.3.1 Kit Agencourt[®] Genfind[™] v2 Blood Binding Buffer

Kit Agencourt[®] Genfind[™] v2 Blood Binding Buffer (Beckman Coulter, USA) byl původně určen k extrakci DNA z krve. Postup extrakce DNA byl ale modifikován a optimalizován pro vysokokapacitní extrakci DNA z listů pšenice ve formátu 96 jamek. Vysokokapacitní extrakce DNA je založena na vazbě molekul DNA na magnetické částice, které jsou v průběhu extrakce fixovány na stěny jamek 96jamkové PCR misky po přiložení magnetické destičky 96 direct Inject Magnet (Beckman Coulter, USA). Imobilizace magnetických částic nesoucí molekuly DNA umožňuje rychlou a výkonnou purifikaci vyextrahované DNA.

Byly odebrány dva až tři segmenty (2 cm) mladého listu z F₁ hemizygotů delečních linií do 96jamkové misky s 2ml jamkami. Odebrané listy byly usušeny v termostatu BT 120M (Laboratorní přístroje Praha, ČR) při 37°C 2 dny. Rostlinný materiál byl homogenizován v oscilačním mlýnu MM301 (Retsch, Německo) s 2 skleněnými kuličkami (5 mm) při 27 Hz 4 min.

Ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 ml Lysis Buffer, který byl připraven z 0,5 % hydrogensířičitanu sodného (Sigma-Aldrich, USA), 0,1 % kyseliny L-askorbové (Sigma-Aldrich, USA), 1 % 2-merkptoethanolu (Sigma-Aldrich, USA) a Basic Lysis Buffer (5mol/l NaCl, 1mol/l Tris-HCl, 0,5mol/l EDTA, pH 7,2). Lýza vzorků probíhala 45 min při 65°C ve vodní lázni (Grant Instruments SUB, UK). Lyzát byl centrifován 2 146× g, 10 min při 4°C (Jouan CR4i, Thermo, USA).

100 µl supernatantu z každého vzorku bylo přepipetováno do nové 96jamkové PCR misky a smícháno s 5 µl magnetických částic, s 1 µl ribonukleasy A (30 mg/ml, Invitrogen, USA) a 70 µl isopropanolu. Po promíchání a 5 min inkubaci na ledě došlo k vazbě DNA

na magnetické částice. Po 5 min inkubaci na magnetické destičce 96 direct Inject Magnet (Beckman Coulter, USA) byl supernatant odpipetován.

Magnetické částice s navázanou DNA byly promyty 100 μ l 70% ethanolem mimo magnetickou destičku a umístěny na led na 5 min. Purifikace byla provedena ještě jedenkrát. Za účelem odstranění zbytkového 70% ethanolu byla miska vysušena fénem. Nakonec byla DNA eluována ve 40 μ l sterilní vody mimo magnet. Po 10 min inkubaci na magnetě bylo přeneseno 35 μ l roztoku DNA do nové 96jamkové PCR misky.

Úspěšnost extrakce a stupeň degradace vyextrahované DNA byly u náhodně vybraných vzorků odhadnuty po elektroforetické separaci v 0,86% agarosovém gelu (Serva, Německo) v 0,5 \times TBE pufru (5 \times TBE: 450mmol/l Tris-HCl, Sigma; 570mmol/l kyselina boritá, Lachner; 10mmol/l Na₂EDTA \times 2H₂O, Fluka; pH 8,0) na základě porovnání se 100bp standardem molekulové hmotnosti DNA Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (1 μ g; Thermo Scientific, USA).

DNA byla separována v elektroforetické komoře Thermo Scientific Owl A6 (Separation Systems, Inc., USA) se zdrojem napětí MP-300 V (Major Science, USA) 60 min při 4 V/cm a následně obarvena v 0,05% roztoku ethidium bromidu (Sigma-Aldrich, USA) 20 min. fragmenty DNA byly vizualizovány na dokumentačním systému GeneSnap (SynGene, UK).

Koncentrace extrahované DNA byla změřena na fluorometru ModulusTM single tube multi mode reader (Turner BioSystems, USA) za použití fluorescenčního barviva Quant - iTTM PicoGreen[®] dsDNA Reagent (Life Technologies, USA) podle návodu doporučeného výrobcem. Výtěžek vyextrahované DNA se pohyboval v rozmezí 2 až 30 ng/ μ l v závislosti na výchozím množství rostlinného materiálu. Extrahovaná DNA byla uskladněna při -20°C.

3.3.2 Kit Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit a kit NucleoSpin[®] Plant II

Kit Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit (STRATEC Biomedical AG, Německo) a kit NucleoSpin[®] Plant II (Macherey-Nagel, Německo) umožnili extrakci a purifikaci genomické DNA ve větším množství a kvalitě. Extrakce DNA je založena na speciálních mikrokolonách obsahujících membránu z oxidu křemičitého a na hydratovaném povrchu chaotropní soli v promývacím pufru.

Byly odebrány tři až pět segmentů listu (3 cm) z každé rostliny F₁ generace delečních linií do mikrozkušavky. Příprava a homogenizace rostlinného materiálu byly provedeny jako v (kap. 3.3.1).

Extrakce DNA byla provedena podle návodu doporučených výrobcí (<http://www.stratec.com>) pro kit Invisorb[®] Spin Plant Mini Kit a (<http://www.mn-net.com>) pro kit NucleoSpin[®] Plant II s upraveným množstvím ribonukleasy A. Bylo přidáno 15 µl ribonukleasy A (30 mg/ml, Invitrogen, USA) nebo 45 µl ribonukleasy A (10 mg/ml, NucleoSpin[®] Plant II, Macherey-Nagel, Německo).

Výtěžek extrahované DNA se pohyboval v rozmezí 30 až 300 ng/µl v závislosti na výchozím množství rostlinného materiálu. Extrahovaná DNA byla naředěna na 5 ng/µl a uskladněna při -20°C.

3.4 STS markery specifické pro 4A chromosom

V této diplomové práci byly navrženy specifické markery pro 4A chromosom za účelem selekce linií s deletovaným 4A chromosomem. Markery byly navrženy do genů a intergenových oblastí 4A chromosomu. Výběr sekvencí pro navrhování markerů vycházel z původní deleční mapy (Miftahudin a kol, 2004), 4A GenomeZipperu a chromosom specifických „survey“ sekvencí pšenice (IWGSC, 2014).

8 sekvenčních kontigů bylo vybráno pro dlouhé rameno a 7 pro krátké rameno 4A chromosomu o minimální délce 3 kbp. Repetitivní sekvence byly identifikovány porovnáním s databází TREP (<http://wheat.pw.usda.gov>) a vyloučeny pro navrhování primerů. Kódující oblasti byly identifikovány algoritmem FGENESH (<http://www.softberry.com>), (Solovyev a kol., 2006). Primery byly navrženy webovým programem Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) tak, aby jeden z dvojice primerů byl ukotven v exonu predikovaného genu. Pokud sekvenční kontig neobsahoval gen, byla sekvence náhodně zvolena. Délka amplikonu byla volena v rozmezí 200 až 300 bp s ohledem na detekční schopnost 4% polyakrylamidového gelu. Přehled navržených primerů je uveden v (Tab. I).

Bylo použito 9 (*owm32* - *owm89*) markerů pro telomerický bin dlouhého ramene 4A chromosomu, které navrhla Mgr. Eva Komínková v rámci klonování *QPm.tut-4A* genu s cílem ověřit zvětšení rozlišovací schopnosti nových delečních linií (Tab. II). Dále bylo vybráno 15 specifických markerů pro 4A chromosom (*owm119* - *owm167*), které navrhla podle fyzické EST bin mapy 4A chromosomu Mgr. Barbora Klocová (Tab. II). Tyto markery sloužily k identifikaci delečních binů a charakterizaci nových delečních linií (Tab. III). Jako interní standard v PCR reakci byl použit marker *gdm136* (F_CTCATCCGGTGAGTGCATC, R_CCCGCATGTCTACATGAGAA) s 100 bp amplikonem.

Tab. I: Přehled navržených STS markerů na distální kontigy 4A chromosomu.

Lokalizace kontig	Název primeru	Sekvence primeru 5' → 3'	Geny
4AS_6009105	4AS_6009105_F1 4AS_6009105_R1	F1_GTGCAGAGGCTCGAATAATTG R1_ACAAGAAGATCCTGCTGCAAA	<i>Os03g0181800</i> <i>Bradi1g72510.4</i> <i>Sb01g045130.1</i>
4AS_5979030	4AS_5979030_F1 4AS_5979030_R1	F1_CCATGAAACGGGTTTTGAAT R1_ATATTCGCCCGTTCAAAATG	<i>Os03g0181600</i> <i>Sb01g045140.1</i>
4AS_5977075	4AS_5977075_F1 4AS_5977075_R1	F1_ACTTGAGGTTCCACCGACTGC R1_AACACCCAGCACTCCCCT	<i>Os03g0181500</i> <i>Bradi1g72560.1</i> <i>Sb01g045150.1</i>
4AS_5997030	4AS_5997030_F1 4AS_5997030_R1	F1_CCGCGTTAGGATTTAACGAA R1_TGAGTTCCGCATAATTGTGGT	<i>Os03g0180300</i> <i>Bradi1g72650.1</i> <i>Sb01g045220.1</i>
4AS_5925969	4AS_5925969_F1 4AS_5925969_R1	F1_ATGCCCTAGCAGATTTTGTCA R1_AAGTGCTCGGATGGCTCTTA	<i>Os03g0179900</i> <i>Bradi1g72690.1</i> <i>Sb01g045240.1</i>
4AS_5995370	4AS_5995370_F1 4AS_5995370_R1	F1_TTCACCTCCAGACTACCATTGA R1_GCCTTTGTGATTGGCGTAAT	<i>Os03g0179700</i> <i>Bradi1g72700.1</i> <i>Sb01g045250.1</i>
4AS_6003347	4AS_6003347_F1 4AS_6003347_R1	F1_GGCGGTGAAGTTGAAGAGTC R1_CCTGCATGTAGGACATACGC	<i>Os03g0179400</i> <i>Bradi1g72740.1</i> <i>Sb01g045260.1</i>
4AL_7172486	4AL_7172486_F1 4AL_7172486_R1	F1_TGAGCAGACCTCCCTAGATACA R1_CTGTCCAGAAACCGGCACAG	<i>Os06g0102700</i> <i>Bradi1g52390.1</i> <i>Sb10g000280.1</i>
4AL_7148983	4AL_7148983_F1 4AL_7148983_R1	F1_CACCCAATCCTCATGCTCTT R1_CACCACCATCCTGCTGCT	<i>Os06g0101600</i> <i>Bradi1g52460.1</i> <i>Sb10g000230.1</i>
4AL_7158673	4AL_7158673_F1 4AL_7158673_R1	F1_CATCCATCCATTACCACCTG R1_CGATCTTGCCCTTGAGGTAG	<i>Os06g0101800</i> <i>Bradi1g52480.1</i> <i>Sb10g000101.1</i>
4AL_7067163	4AL_7067163_F1 4AL_7067163_R1	F1_AGCTCTCCGTCTTTGCATGT R1_CTGCACGGATGGACAAATAG	-
4AL_7067163	4AL_7067163_F2 4AL_7067163_R2	F2_GCTATCAGGTCCATGCCAAT R2_TCGTCACATCTTCCTTGTGG	-
4AL_7171348	4AL_7171348_F1 4AL_7171348_R1	F1_ACAGGGCATGAAGGGTAATG R1_TGATCCATAGCACCATCCAA	-
4AL_7171348	4AL_7171348_F2 4AL_7171348_R2	F2_CATCTGACCGGAGCTTCTTC R2_ATGGCACCATTCTATCGAG	-
4AL_7095239	4AL_7095239_F1 4AL_7095239_R1	F1_GGTGACAGCCTCGTAAGCAT R1_CTGATGCCATTTGCTCTTGA	-
4AL_7177317	4AL_7177317_F1 4AL_7177317_R1	F1_TGTGTAAATTGGCAGGCAAG R1_TGCTGGCATGTTCTTGTAGG	-
4AL_7177317	4AL_7177317_F2 4AL_7177317_R2	F2_GTGACACCTCGAAGAATGA R2_TATCCGTGCACAAGAAGCTG	-
4AL_7169252	4AL_7169252_F1 4AL_7169252_R1	F1_AGTTAGTCCCACCACGCTGT R1_CTTGATCTTGGGTTGAACAA	-

Tab. II: Přehled specifických markerů pro 4A chromosom, které poskytly Mgr. Eva Komínková a Mgr. Barbora Klocová.

Lokalizace kontig	Marker	Geny	Sekvence primeru 5' → 3'	Délka amplikonu [bp]	Zdroj
4AL_7020240	<i>owm32</i>	-	F1_ACGGTCTTCCTTCGTGGGTA R1_ACGCTCACGACATCGCTAAT	283	Mgr. Komínková
4AL_7149432	<i>owm66</i>	<i>Os06g0115100</i> <i>Bradi1g50510.1</i>	F1_GACCAAGTGCATCATCGGTG R_GCATCCTATGGGCATGTTATGT	135	Mgr. Komínková
4AL_7127109	<i>owm70</i>	<i>Os06g0114500</i> <i>Bradi1g50470.1</i>	F_AACACTACCTCGCGTACCTT R_AGTGTGTCTTAGGTATGGTGA	142	Mgr. Komínková
4AL_7134722	<i>owm92</i>	<i>Bradi1g50420.1</i>	F_CGGCTTGAAGTAACTGCTGA R_TCTAAGTTGAATAAGCTCAGCCA	180	Mgr. Komínková
4AL_7159908	<i>owm96</i>	<i>Os06g0111100</i> <i>Bradi1g49930.1</i>	F1_GGTTTGATGGTTGCTCGTG R1_AAGCATCTTACCGAACTGAACC	442	Mgr. Komínková
4AL_7153715	<i>owm76</i>	<i>Os06g0118700</i>	F_TGCACTGCCTTGGACTTCT R_CTGGCCAGTACAAGAGGA	151	Mgr. Komínková
4AL_7173954	<i>owm81</i>	-	F_GGTTGTCTGTGTGCACATA R_TGTCCCTCCTTTTATCTAGCCT	169	Mgr. Komínková
4AL_7162736	<i>owm86</i>	-	F_AAACCTACACCATGCCTTTTCAAA R_TGCCAAGTCAGTGCAATCG	166	Mgr. Komínková
4AL_7095772	<i>owm89</i>	-	F_ATGGGTGATGGCGTGTCTAG R_TTTGATTCTTCGTAATGGTGAC	181	Mgr. Komínková
4AL_7142517	<i>owm119</i>	<i>Os03g0854800</i> <i>Bradi1g01170.1</i> <i>Sb01g000700.1</i>	F1_ACTTGGGAACATTCAGCTCTT R1_TTTCTCCTCTGTTGGAACATCA	346	Mgr. Klocová
4AL_4377497	<i>owm120</i>	<i>Os03g0712700</i> <i>Bradi1g11440.1</i> <i>Sb01g010280.1</i>	F1_GCAAATCACCTGTTCTATGTAATC R1_ATCGTGTACAACCAAATACAT	382	Mgr. Klocová
4AL_7166434	<i>owm121</i>	<i>Os03g0736300</i> <i>Bradi1g09460.1</i> <i>Sb01g008860.1</i>	F1_ATTGCCGTCGCGAACTAGA R1_CGGGACGAGCTTGACGAT	351	Mgr. Klocová
4AS_6015094	<i>owm126</i>	<i>Os03g0297400</i> <i>Bradi1g65140.2</i> <i>Sb01g038160.1</i>	F1_CCAGTCAGAAATTATTATGAACCTATC R1_CGCTGTCTCGAGATTGGAGT	331	Mgr. Klocová
4AS_6015094	<i>owm127</i>	<i>Os03g0297400</i> <i>Bradi1g65140.2</i> <i>Sb01g038160.1</i>	F1_CAGCAAATGCATGATTTCACTAAT R1_TTCAGATACAGTTTCTGATCTTGC	251	Mgr. Klocová
4AS_5951951	<i>owm128</i>	<i>Os03g0267300</i> <i>Bradi1g67020.1</i> <i>Sb01g039980.1</i>	F1_GCACCTTAGAATGCGCGGTTA R1_GTCTGGGAGCGACACCATTA	334	Mgr. Klocová
4AS_5934571	<i>owm129</i>	<i>Os03g0203700</i> <i>Bradi1g70920.1</i> <i>Sb01g043620.1</i>	F1_TGATGATACCAGAGCGTACAAT R1_CCTTTGATAAGAGGCCCTCAG	232	Mgr. Klocová

Pokračování Tab. II: Přehled specifických markerů pro 4A chromosom, které poskytly Mgr. Eva Komínková a Mgr. Barbora Klocová.

Lokalizace kontig	Marker	Geny	Sekvence primeru 5' → 3'	Délka amplikonu [bp]	Zdroj
4AS_5944159	<i>owm160</i>	<i>Os03g0180400</i> <i>Bradi1g72640.1</i> <i>Sb01g045210.1</i>	F1_AAGGGCCCATATCATATCACAC R1_AACAGTGGAGGGCTTTGCTA	251	Mgr. Klocová
4AS_5934783	<i>owm161</i>	<i>Os03g0161800</i> <i>Bradi1g74360.1</i> <i>Sb01g046360.1</i>	F1_TTTTCAAGCAGGTTTTGTGC R1_TCACCTCTCTCTTTGCGTTCA	317	Mgr. Klocová
4AL_7166434	<i>owm162</i>	<i>Os03g0736300</i> <i>Bradi1g09460.1</i> <i>Sb01g008860.1</i>	F1_TGTTCAAGGACAGCAAGACG R1_CATTTAGATGCTGTCATATTGCTTG	409	Mgr. Klocová
4AL_7157194	<i>owm163</i>	<i>Os03g0652100</i> <i>Bradi1g13450.1</i> <i>Sb01g013110.1</i>	F1_CATGTATGCTTAGTCTTATTGTTGTTT R1_CATTAGCGAGGTGCAGCGTA	365	Mgr. Klocová
4AL_7157194	<i>owm164</i>	<i>Os03g0652100</i> <i>Bradi1g13450.1</i> <i>Sb01g013110.1</i>	F1_CTGGGCATGGCCAAAAAT R1_AGTCCCTGGGCTGTGGAAG	350	Mgr. Klocová
4AL_7176697	<i>owm165</i>	<i>Os03g0684700</i> <i>Bradi1g12280.1</i> <i>Sb01g011780.1</i>	F1_TGAGTTACAGCCACTCTGTGC R1_ACCACCTGCCAAGGTTCCCTA	243	Mgr. Klocová
4AL_7176697	<i>owm166</i>	<i>Os03g0684700</i> <i>Bradi1g12280.1</i> <i>Sb01g011780.1</i>	F1_TGCTACCATGGTTCAGAATGA R1_AGTTGACGAAGCGGCCTTT	323	Mgr. Klocová
4AL_7091911	<i>owm167</i>	<i>Os03g0145800</i> <i>Bradi1g75360.1</i> <i>Sb01g047180.1</i>	F1_TTTTCTTGGTCAGTATAACCTGTTTTT R1_TGAGCAGAGAAAAATTTCCAAG	283	Mgr. Klocová

Teplota nasednutí primerů T_a byla pro markery *Owm32*, *Owm66*, *Owm70*, *Owm92* a *Owm96* 55°C. Pro ostatní markery byla T_a 60°C. Doba polymerace pro markery navrhuté Mgr. E. Komínkovou byla 30 sekund a Mgr. B.Klocovou 60 sekund.

3.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (Mullis a kol., 1986) byla využita k amplifikaci požadovaných fragmentů DNA a k mapování navržených markerů do delečních binů fyzické mapy 4A chromosomu. V každé sadě reakcí byly použity pozitivní kontroly: genomická DNA CS, 4AL specifická DNA, 4AS specifická DNA, DNA nulli-tetrasomických N4AT4B a N4AT4D linií. Jako negativní kontrola byla použita sterilní voda.

PCR reakce o objemu 15 μ l obsahovala 1 \times PCR pufr (10mmol/l Tris-HCl; 1,5mmol/l chlorid hořečnatý; 50mmol/l chlorid draselný; 0,1% Triton X-100 pH 8,2), 0,2mmol/l z každého dinukleotidu dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Fermentas, Kanada),

1× barvivo Cresol Red (0,01% o-cresolsulfonephthalein, Sigma-Aldrich, USA; 1,5% sacharosa, Lechemia, ČR), 0,04U/μl *Taq* polymerasu (Finzyme, Finsko), 1μmol/l F (forward) a 1μmol/l R (reverse) primer a templátovou DNA v rozmezí 20 pg až 3 ng. Tato standardní reakční směs byla rozšířena o 1μmol/l každého primeru interního standardu umožňující ověření průběhu PCR reakce.

PCR reakce byly prováděny v termocyklérech PTC – 200 (MJ Research, USA) a C1000TM (Bio-Rad, USA) za následujících podmínek: počáteční denaturace 95°C 5 min, 40 cyklů: denaturace 95°C 30 s, nasedání primerů T_a 55 - 64°C 30 s, polymerace 72°C 60 s a závěrečná polymerace 72°C 10 min (Tab. II). Optimální teplota nasedání primerů byla získána gradientovou PCR s teplotami nasedání v rozmezí 55 - 65°C (Tab. IV).

3.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Produkty PCR reakcí byly separovány v 4% nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu (PAA) o tloušťce 1 mm ve vertikálním uspořádání. Elektroforetická separace probíhala v aparatuře C-DASG-400-50 (C.B.S. Scientific Company, Inc., USA). Před přípravou PAA gelu bylo sklo silanizováno 3 μl 3-methakryloxypropyl-trimethoxysilanem (Serva Fein Biochemika, USA) v 1 ml 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu. PAA gel obsahoval 4% směs akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu v poměru 19:1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), 0,73% N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu (TEMED, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), 0,7% peroxodisíranu amonného (Sigma-Aldrich, USA). Gel polymerizoval 30 min při pokojové teplotě. Elektroforéza probíhala v 0,5× TBE pufru (5× TBE: 450mmol/l Tris-HCl, Sigma; 450mmol/l kyselina boritá, Lachner; 10mmol/l Na₂EDTA×2H₂O, Fluka). Gel byl nejdříve saturován 0,0003% ethidium bromidem (Top-Bio, s.r.o., ČR) 90 min při 300 V. Po nanesení DNA vzorků, probíhala elektroforéza 30 min při 350 V. DNA fragmenty, byly vizualizovány pomocí dokumentačního systému GeneSnap (SynGene, UK).

3.7 Zpracování získaných dat

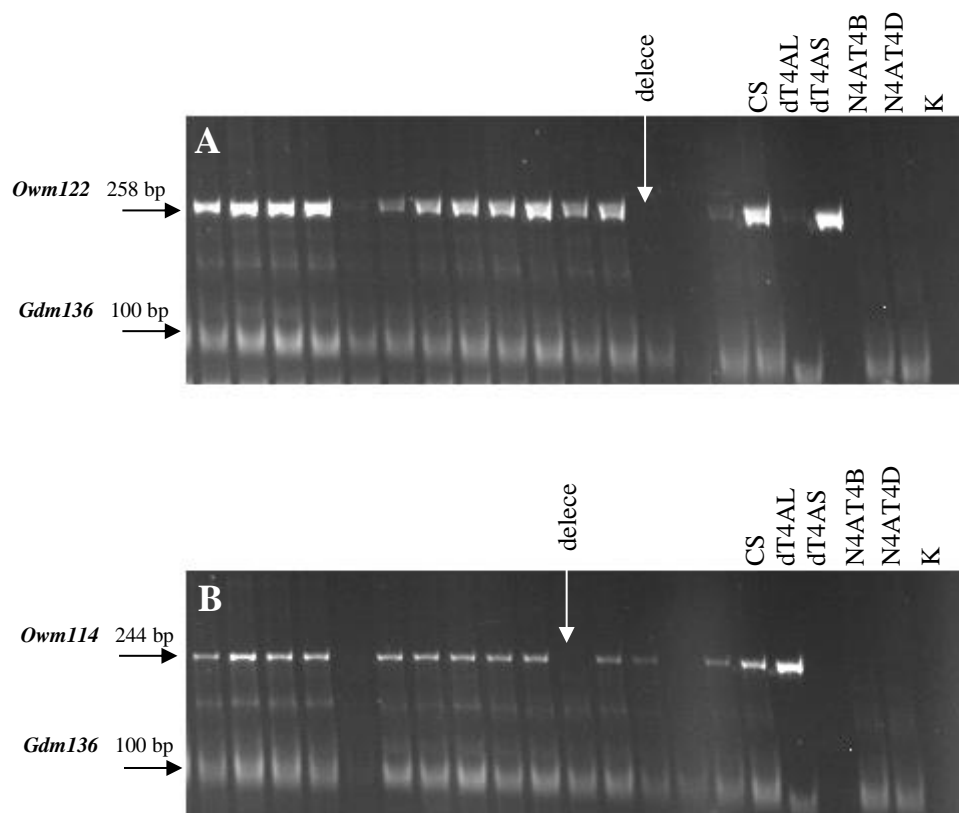
Výstupy z dokumentačního systému GeneSnap (SynGene, UK) byly upraveny v programu Adobe Photoshop CS5 verze 12.0 × 64 a hodnoceny manuálně. Jednodušší statistické výpočty byly provedeny v Microsoft Office Excel 2007.

4 VÝSLEDKY

4.1 Zvětšování deleční mapovací populace

Charakterizace delečních linií byla provedena pomocí navrhnutých markerů na distální části ramen 4A chromosomu (Tab. I, Tab. IV), markerů v oblasti lokusu *QPm.tut-4A* genu a rovnoměrně rozptýlených markerů na 4A chromosomu (Tab. II). Nejdříve byl proveden skrínig distálními markery *Owm122* a *Owm114* na 1 937 rostlinách F₁ generace delečních linií. Markerem *Owm122* bylo vyselektováno 58 delečních linií pro krátké rameno 4AS chromosomu, markerem *Owm114* bylo vyselektováno 125 delečních linií pro dlouhé rameno 4AL chromosomu. 23 delečních linií mělo delece na obou ramenech 4A chromosomu. Všechny 206 delečních linií bylo charakterizováno markery uvedenými v (Tab. II a Tab. IV) pro krátké a dlouhé rameno 4A chromosomu.

Všechny testované markery na delečních liniích byly vyhodnocovány jako polymorfismus absence a presence, tzv. PAV. K ověření správného průběhu PCR reakce byl do reakce přidáván interní standard *Gdm136*. Níže jsou uvedeny příklady výstupu polyakrylamidové elektroforézy pro marker *Owm114* identifikující delece na dlouhém rameni a marker *Owm122* identifikující delece na krátkém rameni 4A chromosomu (Obr. 13).



Obr. 13: Elektroforetogramy 4% polyakrylamidových gelů pro STS markery *Owm122* a *Owm114* testované na F₁ generaci hemizygotních delečních linií.

A) *Owm122* a B) *Owm114*. Příklad použití STS markerů k identifikaci delecí na chromosomu 4A. Markerem *Owm122* byly identifikovány delece na krátkém rameni a markerem *Owm114* byly identifikovány delece na dlouhém rameni 4A chromosomu. Kontroly v pravé části elektroforetogramu ověřují specifickost markeru a konkrétní PCR reakce. CS – genomická DNA z kultivaru Chinese Spring, dT4AL – 4AL specifická DNA, dT4AS – 4AS specifická DNA, N4AT4B a N4AT4D – DNA nulli-tetrasomických linií a K – negativní kontrola. Bílou šipkou jsou vyznačeny linie s delecí na chromosomu 4A.

Údaje o počtu identifikovaných delecí na krátkém rameni 4AS a dlouhém rameni 4AL chromosomu jsou shrnuty v (Tab. III). V průměru 10,6 % rostlin z F₁ generace po použití gametocidálního systému má delecí na 4A chromosomu.

Tab. III: Přehled údajů zahrnující počet semen, rostlin a delecí v testovaném souboru linií pro chromosom 4A po použití gametocidálního systému.

Původ	Počet semen	Počet rostlin	Počet 4AS delecí	Počet 4AL delecí	Počet 4AS/4AL delecí	∑ delecí	[%] delecí
4A.4B.2.X	105	85	4	13	2	19	18,10
4A.4B.3.X	141	119	3	6	3	12	8,51
4A.4B.4.X	146	112	6	7	1	14	9,59
4A.4B.5.X	122	73	3	6	0	9	7,38
4A.4B.6.X	72	67	0	5	0	5	6,94
4A.4B.7.X	42	34	2	1	2	5	11,90
4A.4B.8.X	104	65	2	5	0	7	6,73
4A.4B.9.X	124	102	5	5	0	10	8,06
4A.4B.10.X	92	56	0	3	0	3	3,26
4A.4B.11.X	98	60	0	2	1	3	3,06
4A.4B.12.X	187	133	2	11	0	13	6,95
4A.4B.13.X	155	114	2	6	1	9	5,81
4A.4B.14.X	157	128	4	9	0	13	8,28
4A.4B.15.X	55	45	1	6	0	7	12,73
∑ 4A.4B	1 600	1 193	34	85	10	129	8,06
4A.4D.2.X	26	20	0	0	1	1	3,85
4A.4D.3.X	110	76	4	4	10	18	16,36
4A.4D.4.X	17	7	0	0	0	0	0,00
4A.4D.5.X	198	103	3	4	1	8	4,04
4A.4D.6.X	35	22	1	2	0	3	8,57
4A.4D.7.X	107	54	0	2	0	2	1,87
4A.4D.9.X	188	108	4	5	1	10	5,32
4A.4D.10.X	81	70	1	3	0	4	4,94
4A.4D.11.X	56	30	0	0	0	0	0,00
4A.4D.12.X	46	39	1	3	0	4	8,70
4A.4D.13.X	120	91	7	5	0	12	10,00
4A.4D.14.X	78	73	3	10	0	13	16,67
4A.4D.15.X	94	51	0	2	0	2	2,13
∑ 4A.4D	1 156	744	24	40	13	77	6,66
∑	2 756	1 937	58	125	23	206	10,6

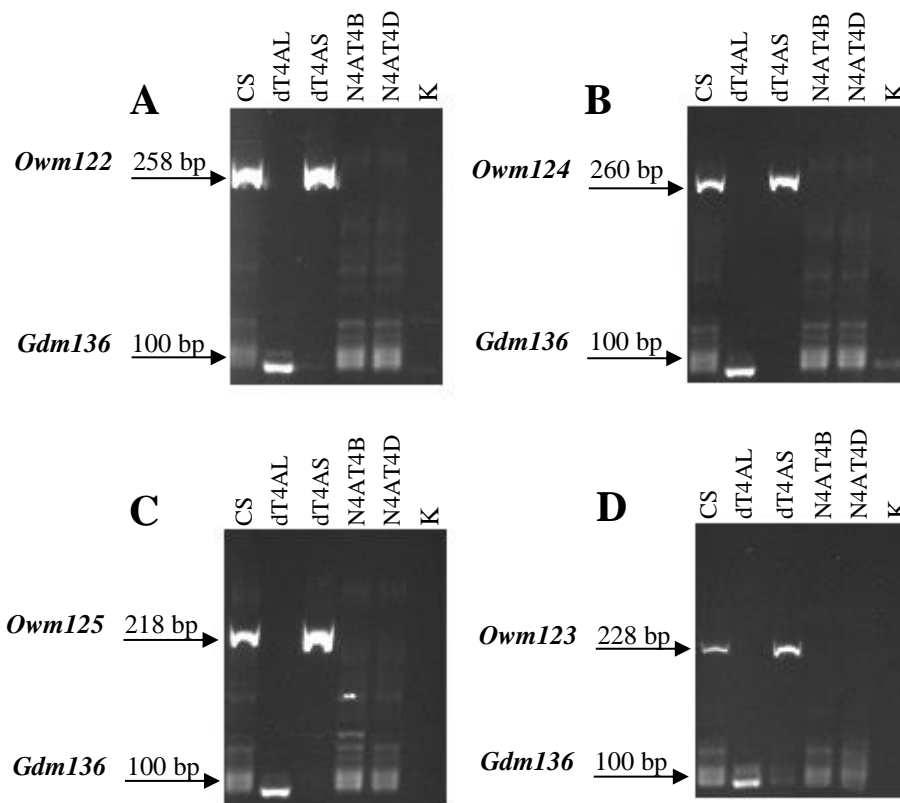
Pro přehlednost je N4AT4B a N4AT4D zkráceno na 4A.4B. a 4A.4D. V tabulce jsou uvedeny celkové hodnoty označeny symbolem ∑. 4AS/4AL znamená, že byly identifikovány delece na krátkém a zároveň i na dlouhém rameni 4A chromosomu. V tabulce jsou uvedeny procentuální hodnoty delecí pro jednotlivé linie F₁ generace.

4.2 Vývoj a ukotvení markerů na 4A chromosom pšenice

Za účelem selekce F_1 delečních linií pro chromosom 4A, bylo potřeba navrhnout chromosom specifické markery (Tab. I). Markery byly navrženy podle výše popsané metodiky (kap. 3.4) a testovány na kontrolních vzorcích DNA (kap. 3.1) pomocí gradientové polymerázové řetězové reakce (kap. 3.5) a elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (kap. 3.6).

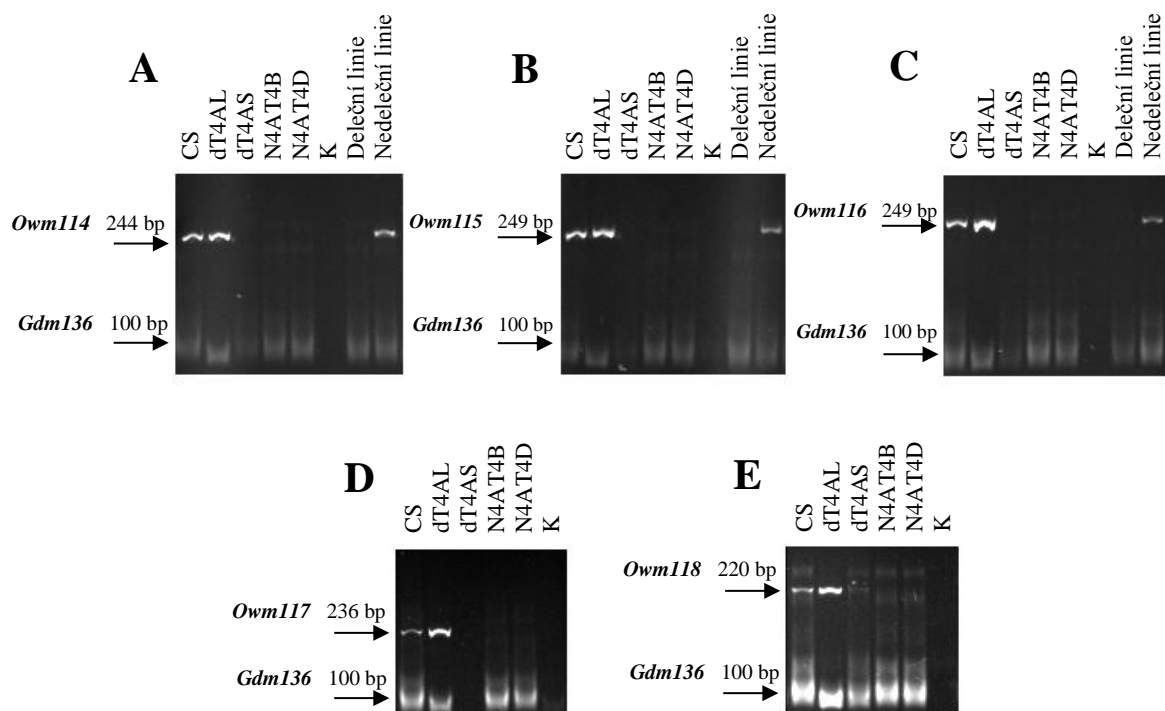
Aby STS markery mohly být použity k charakterizaci delečního materiálu, musely vykazovat úspěšnou amplifikaci s interním standardem *Gdm136*, spolehlivé skórování a reprodukovatelnost. Bylo navrženo 7 párů primerů na distální část krátkého ramena 4A chromosomu a 11 párů primerů na distální část dlouhého ramena 4A chromosomu. Pro charakterizaci delečních linií bylo celkem použito 9 navržených markerů, z toho 4 na krátké rameno a 5 na dlouhé rameno 4A chromosomu (Tab. IV). Markery, které nebyly vhodné k charakterizaci delečního materiálu díky špatné amplifikaci s interním standardem *Gdm136* nebo nespecifičnosti pro 4A chromosom, byly vyřazeny (Tab. IV).

Validované markery byly pojmenovány *Owm114* až *Owm118* pro dlouhé rameno 4A chromosomu a *Owm122* až *Owm125* pro krátké rameno 4A chromosomu (Obr. 14 a 15). Pro ověření správné funkce PCR reakce a specificity použitého markeru bylo použito 5 DNA pozitivních kontrol: CS, dT4AL^{CS}, dT4AS^{CS}, N4AT4B a N4AT4D pocházející z pšenice kultivaru Chinese Spring. V negativní kontrole byla DNA nahrazena sterilní vodou.



Obr. 14: Elektroforetogramy 4% polyakrylamidových gelů pro STS markery *Owm122*, *Owm123*, *Owm124* a *Owm125* testované na kontrolních DNA.

A) *Owm122*, B) *Owm124*, C) *Owm125* a D) *Owm123*. Markery pro krátké rameno 4A chromosomu testované na kontrolních DNA za použití interního standardu *Gdm136*. CS - genomická DNA kultivaru Chinese Spring, dT4AL - 4AL specifická DNA, dT4AS - 4AS specifická DNA, N4AT4B a N4AT4D - DNA nulli-tetrasomických linií, K - negativní kontrola.



Obr. 15: Elektroforetogramy 4% polyakrylamidových gelů pro STS markery *Owm114*, *Owm115*, *Owm116*, *Owm117* a *Owm118* testované na kontrolních DNA.

A) *Owm114*, B) *Owm115*, C) *Owm116*, D) *Owm117* a E) *Owm118*. Markery pro dlouhé rameno 4A chromosomu testované na kontrolních DNA za použití interního standardu *Gdm136*. CS - genomická DNA kultivaru Chinese Spring, dT4AL - 4AL specifická DNA, dT4AS - 4AS specifická DNA, N4AT4B a N4AT4D - DNA nulli-tetrasomických linií, K - negativní kontrola.

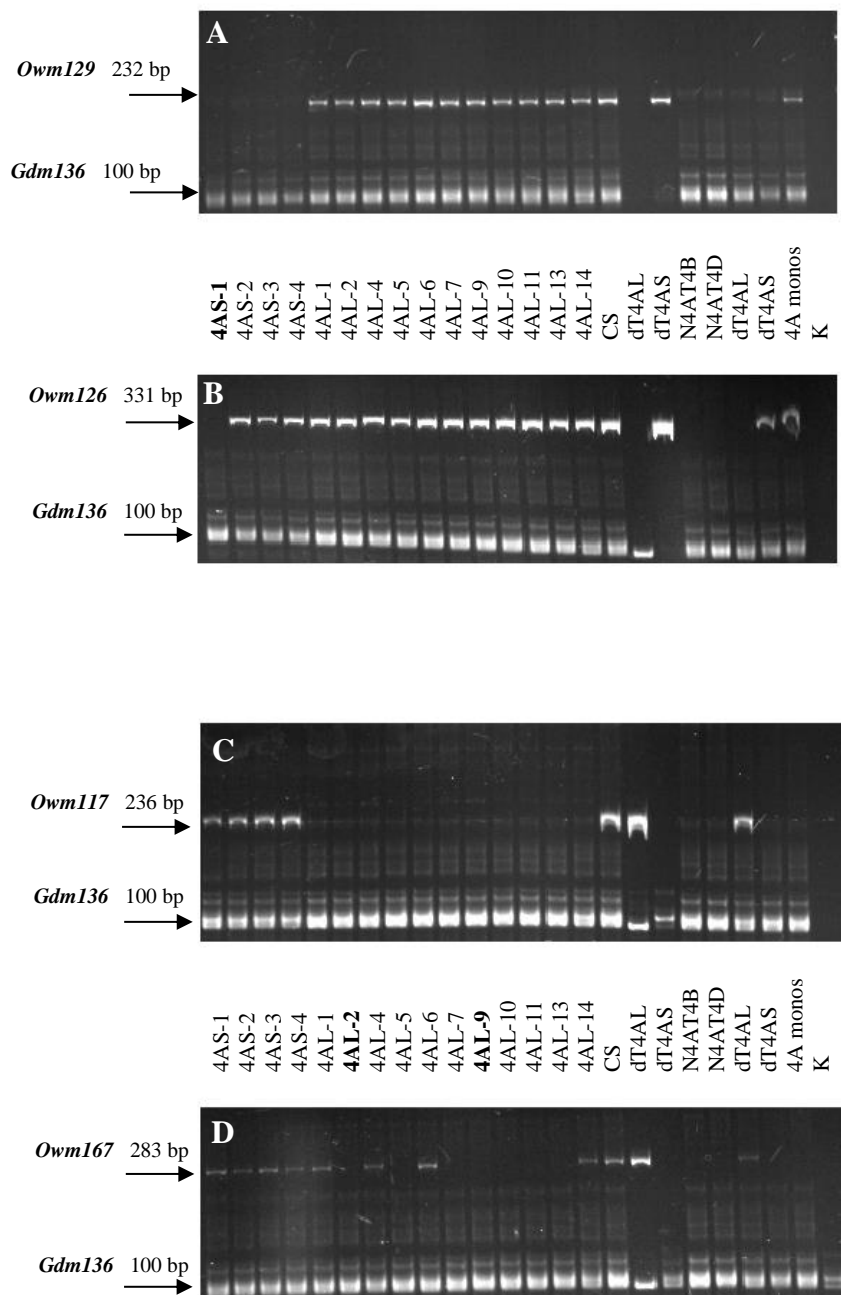
Souhrn všech navržených markerů na distální části dlouhého a krátkého ramena 4A chromosomu je uveden v (Tab. IV). Šedou barvou jsou vyznačeny markery, které byly použity k identifikaci delecí na distálních částech 4A chromosomu. V poznámkách (Tab. IV) je uvedeno, proč byl daný marker vyřazen z databáze a nebyl použit.

Tab. IV: Výsledky testování navržených STS markerů s interním standardem *Gdm136*.

(markery použité k charakterizaci delečního materiálu jsou vyznačeny šedě)

Název primeru	Marker	Délka ampliconu [bp]	Teplota nasednutí T _a [°C]	PCR produkt	Poznámka
4AS_6009105_F1 4AS_6009105_R1	<i>Owm122</i>	258	64	ANO, silný	Detekce 4AS distálních delecí
4AS_5979030_F1 4AS_5979030_R1	<i>Owm123</i>	228	57	ANO, silný	Detekce 4AS distálních delecí
4AS_5977075_F1 4AS_5977075_R1	-	233	55 - 65	ANO slabý/NE	Nižší teploty – větší počet bandů Vyšší teploty – nedošlo k amplifikaci Vyřazeno
4AS_5997030_F1 4AS_5997030_R1	<i>Owm124</i>	260	64	ANO, silný	Detekce 4AS distálních delecí
4AS_5925969_F1 4AS_5925969_R1	-	221	55 - 65	ANO, silný	Větší počet bandů, vyřazeno
4AS_5995370_F1 4AS_5995370_R1	-	204	55 - 65	ANO, silný	Větší počet bandů, vyřazeno
4AS_6003347_F1 4AS_6003347_R1	<i>Owm125</i>	218	64	ANO, silný	Detekce 4AS distálních delecí
4AL_7172486_F1 4AL_7172486_R1	-	204	55 - 65	ANO, slabý	Větší počet bandů, vyřazeno
4AL_7148983_F1 4AL_7148983_R1	<i>Owm118</i>	220	62	ANO, silný	Detekce 4AL distálních delecí
4AL_7158673_F1 4AL_7158673_R1	<i>Owm117</i>	236	62	ANO, slabý	Detekce 4AL distálních delecí
4AL_7067163_F1 4AL_7067163_R1	<i>Owm116</i>	249	59	ANO, silný	Detekce 4AL distálních delecí
4AL_7067163_F2 4AL_7067163_R2	-	268	55 - 65	ANO, silný	Špatná reprodukovatelnost, vyřazeno
4AL_7171348_F1 4AL_7171348_R1	<i>Owm115</i>	249	64	ANO, silný	Detekce 4AL distálních delecí
4AL_7171348_F2 4AL_7171348_R2	-	268	55 - 65	ANO, silný	Větší počet bandů, vyřazeno
4AL_7095239_F1 4AL_7095239_R1	-	262	55 - 65	ANO, silný	Větší počet bandů, vyřazeno
4AL_7177317_F1 4AL_7177317_R1	-	244	55 - 65	ANO, silný	Větší počet bandů, vyřazeno
4AL_7177317_F2 4AL_7177317_R2	-	246	55 - 65	ANO, slabý	Větší počet bandů, vyřazeno
4AL_7169252_F1 4AL_7169252_R1	<i>Owm114</i>	244	64	ANO, silný	Detekce 4AL distálních delecí

Navrhnuté markery *Owm114* až *Owm118* a *Owm122* až *Owm125* společně s markery, které poskytly Mgr. Eva Komínková a Mgr. Barbora Klocová (Tab. II), byly verifikovány mapováním na deleční mapu 4A chromosomu (Obr. 16), (Miftahudin a kol., 2004). K mapování markerů byla použita DNA z patnácti delečních linií pro 4A chromosom (Endo a Gill, 1996). Mapované markery byly následně použity k charakterizaci nových delečních linií.



Obr. 16: Elektroforetogramy 4% polyakrylamidových gelů pro STS markery *Owm129*, *Owm126*, *Owm117* a *Owm167* mapované do delečních binů 4A chromosomu.

A) *Owm129*, B) *Owm126*, C) *Owm117* a D) *Owm167*. Příklady vybraných markerů testovaných na DNA z delečních linií pro 4 biny na krátkém rameni 4AS-1 až 4AS-4 a 11 binů 4AL-1 až 4AL-14 na dlouhém rameni 4A chromosomu s interním standardem *Gdm136*. Kontrolní DNA: CS - genomická DNA kultivaru Chinese Spring, dT4AL - 4AL specifická DNA, dT4AS - 4AS specifická DNA, N4AT4B a N4AT4D - DNA nulli-tetrasomických linií, 4A monos – 4A monosomická linie, K - negativní kontrola. Tučně jsou vyznačeny biny, ve kterých jsou lokalizovány markery *Owm126* a *Owm167* použité pro test linií z gametocidálního systému.

Do binu 4AS_2+3 byly mapovány markery *Owm122*, *Owm123*, *Owm124*, *Owm125*, *Owm161*, *Owm160* a *Owm129*. Do binu 4AS_4 byl mapován marker *Owm128*, do binu 4AS_1 byly mapovány markery *Owm127* a *Owm128*. Do telomerického binu 4AL_6 byla mapována většina markerů. Jde o markery *Owm114*, *Owm115*, *Owm116*, *Owm117*, *Owm118*, *Owm32* a markery *Owm92*, *Owm70*, *Owm89*, *Owm86*, *Owm66*, *Owm81* a *Owm76*, které jsou z lokusu *QPm.tut-4A* genu. Do binu 4AL_2+9 byl mapován marker *Owm167*. Do binu 4AL_13 byly mapovány markery *Owm119*, *Owm163*, *Owm165* a *Owm166*. Do centromerického binu 4AL_C byly mapovány markery *Owm120*, *Owm121* a *Owm162*.

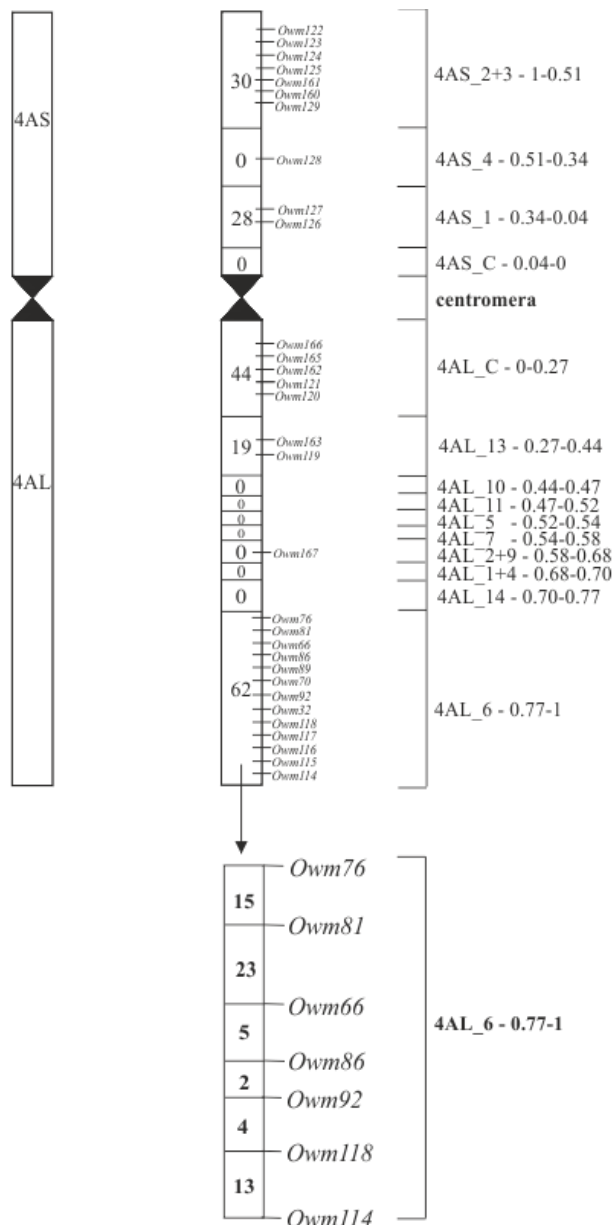
Pomocí testu markerů (Tab. II a Tab. IV) na vyselektovaných F₁ delečních liniích bylo zjištěno, že pouze v telomerickém binu 4AL_6 dlouhého ramene 4A chromosomu (62 nových delečních liniích) mohlo dojít až k 7× zvýšení rozlišovací schopnosti na fyzické bin mapě 4A chromosomu. K vyšší rozlišovací schopnosti na fyzické bin mapě přispěly markery *Owm114*, *Owm118*, *Owm92*, *owm86*, *Owm66*, *Owm81* a *Owm76* (Obr. 17, Tab. V).

Tab. V: Nové deleční linie mezi markery *Owm114*, *Owm118*, *Owm92*, *Owm86*, *Owm66*, *Owm81* a *Owm76* v telomerickém binu 4AL chromosomu.

Marker-marker	Počet delecí N4AT4B	Počet delecí N4AT4D	Počet delecí celkem
<i>Owm114-Owm118</i>	10	3	13
<i>Owm118-Owm92</i>	0	4	4
<i>Owm92-Owm86</i>	2	0	2
<i>Owm86-Owm66</i>	3	2	5
<i>Owm66-Owm81</i>	20	3	23
<i>Owm81-Owm76</i>	4	11	15

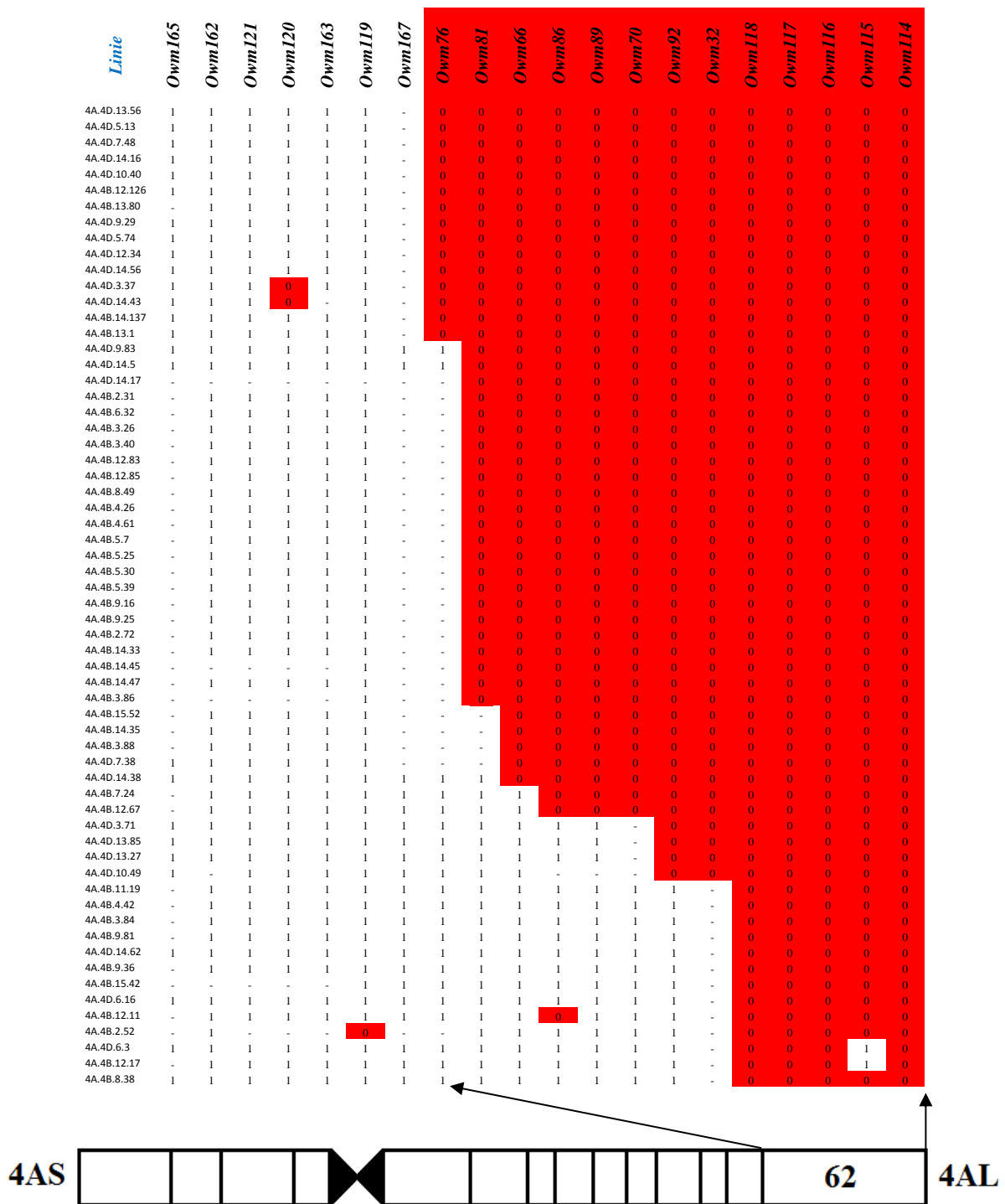
Mezi testovaným markerem *Owm114* a *Owm118* bylo identifikováno celkem 13 delecí, mezi markerem *Owm118* a *Owm92* byly identifikovány 4 delecce, mezi markerem *Owm92* a *Owm86* byly identifikovány 2 delecce, mezi markerem *Owm86* a *Owm66* bylo identifikováno 5 delecí, mezi markerem *Owm66* a *Owm81* bylo identifikováno 23 delecí a mezi markerem *Owm81* a *Owm76* bylo identifikováno 15 delecí na distální části dlouhého ramene 4A chromosomu. Těchto sedm markerů (Tab. V) testovaných na F₁ generaci delečních linií způsobilo rozdělení telomerického binu 4AL_6 dlouhého ramene 4A chromosomu na dalších šest binů na fyzické bin mapě 4A chromosomu (Obr. 17, Obr. 18).

Pro bin 4AS_2+3 bylo identifikováno 30 delečních linií nesoucích delece na krátkém rameni 4AS chromosomu, pro bin 4AS_1 bylo identifikováno 28 delečních linií nesoucích delece na krátkém rameni 4AS chromosomu. Pro centromerický bin 4AL_C bylo identifikováno 44 delečních linií nesoucích delece na dlouhém rameni 4AL chromosomu a pro bin 4AL_13 bylo identifikováno 19 delečních linií nesoucích delece na dlouhém rameni 4AL chromosomu. 23 delečních linií neslo delece pro krátké a zároveň i pro dlouhé rameno 4A chromosomu (Obr. 17). Nová populace o velikosti 206 delečních linií mohla by přispět více než 25× k vyššímu rozlišení na fyzické bin mapě 4A chromosomu.



Obr. 17: Fyzická bin mapa 4A chromosomu znázorňující rozpad telomerického binu 4AL₆ pomocí markerů Owm114, Owm118, Owm92, Owm86, Owm66, Owm81 a Owm76.

Schématicky znázorněna fyzická bin mapa pro 4A chromosom dle (Miftahudin a kol., 2004). 4A chromosom je rozdělen na biny, do kterých byly mapovány markery. Pouze u markerů Owm76 – Owm114 je pořadí podpořeno rekombinační mapou. Pořadí ostatních markerů v rámci binů odpovídá GenomeZipperu. Čísla v jednotlivých binech poukazují na počet nových delečních linií. Šipkou je znázorněn telomerický bin 4AL₆, který se rozpadl na šest binů. Na pravé straně fyzické bin mapy 4A chromosomu jsou uvedeny frakční délky binů v % délky ramene (Endo T. R., nepublikováno). 23 nových delečních linií nesoucí delece na obou ramenech 4A chromosomu nejsou zahrnuty.



Obr. 18: Nové delečních linie v telomerickém binu 4AL_6 na dlouhém rameni 4A chromosomu.

Rozpad telomerického binu 4AL_6 na dalších šest binů pomocí markerů *Owm114* - *Owm76* a 62 nových F₁ delečních linií. Jednotlivé linie jsou uvedeny v pravé části obrázku. V horní části obrázku jsou seřazeny markery podle GenomeZipperu. (0 v červeném poli - přítomnost delece, 1 v bílém poli - nedošlo ke zlomu na 4AL chromosomu po testování příslušným markerem, pomlčka - neproběhla PCR reakce). U linií 4A.4D.6.3, 4A.4B.12.17, 4A.4D.3.37, 4A.4D.14.43, 4A.4B.12.11 a 4A.4B.2.52 došlo k třikrát zlomení na 4AL dlouhém rameni 4A chromosomu.

Během vegetace testovaných rostlin bylo zjištěno, že deleční linie vykazují signifikantní rozdíly ve tvaru klasu. Za tímto účelem byla sestavena fenotypová stupnice klasů (Obr. 19) na základě tvaru, délky a osinatosti klasů podle klasifikátoru (Konvalina a kol., 2012).



Obr. 19: Fenotypová stupnice klasů pro F₁ generaci nových delečních linií ovlivněných gametocidálním systémem pro 4A chromosom.

Fenotypová stupnice klasů pro F₁ generaci delečních linií pšenice *T. aestivum* kultivaru Chinese Spring. Byla sestavena stupnice fenotypů klasu, ve které byly zahrnuty tři parametry, a to tvar klasu (větvený, větvenovitý, speltoidní, hranolovitý, kyjovitý a vejčitý), délka klasu (krátký, dlouhý a střední) a přítomnost osin (bezosinný a osinatý). Fenotypová stupnice má škálu 1 až 13, kdy čísla bez popisů identifikují klasy, které tvoří přechodné tvary klasů. Poslední klas je standardní – pšenice *Triticum aestivum* kultivar Chinese Spring, z které byly připraveny deleční linie.

5 DISKUZE

Klonování genů u pšenice je díky velikosti a komplexnosti pšeničného genomu stále výzvou a nedostatek markerů pro důležité geny je hlavní překážkou využití MAS ve šlechtění. Klonování genů u pšennice stále trvá i více než deset let. Získání referenční sekvence celého pšeničného genomu je očekávaným milníkem pro objasnění funkce mnoha důležitých genů a metabolických drah a jejich využití ve šlechtění, obdobně jak je tomu u rýže. Kde publikace referenční sekvence v 2002 (Goff a kol., 2002, Yu a kol., 2002) zkrátilo poziční klonování genů na 6 měsíců až jeden rok. V porovnání s rýží je genom pšenice více než 40 krát větší a výrazně komplexnější. Rozdělením genomu pšenice na jednotlivé chromosomy nebo jejich ramena se celý proces výrazně zjednodušuje a umožňuje rozdělit práci mezi různé laboratoře (www.wheatgenome.org). Laboratoř (UEB, Olomouc) je odpovědná za získání sekvence chromosomu 4A. První dva základní kroky k získání sekvence tohoto chromosomu již byly udělány a to konstrukce chromosomově specifických knihoven a fyzické mapy. Pro ukotvení kontigů fyzické mapy je potřeba dostatek molekulárních markerů se známým pořadím. Nejspolehlivější jsou fyzické mapy, avšak většinou nemají dostatečné rozlišení nebo jsou náročné na přípravu. Mapování na delečních liniích je atraktivní, protože jejich příprava je relativně jednoduchá, i když časově náročná. Rozlišení není ničím limitováno na rozdíl od cytogenetických map, kde je rozlišení závislé na spiralizaci chromatinu a limitacích optických mikroskopů nebo rekombinačních map, kde rekombinační frekvence není rovnoměrná po chromosomu. Deleční mapy byly s úspěchem použity na mapování EST a genů například u rajčete (*Lycopersicon esculentum* Mill.) v distálních euchromatických oblastech chromosomu (Van der Hoeven a kol., 2002), na mapování genů u rýže (Wu a kol., 2002) nebo genů u kukuřice (Davis a kol., 1999). Deleční mapa s největším počtem markerů byla konstruována využitím EST jako hybridizačních sond (Qi a kol., 2004) na 21 nullitetrasomických (Sears, 1966), 24 ditelosomických (Sears a Sears, 1978) a 101 delečních liniích (Endo, 1990) získaných pomocí gametocidálního systému. Rozlišovací schopnost fyzické bin mapy závisí na počtu delečních binů. I když bylo mapováno 786 EST, deleční mapa pro 4A chromosomu má pouze 9 delečních binů a 12 delečních linií (Miftahudin a kol., 2004). Takovéto rozlišení, ale není dostatečné pro ukotvení 250 a 924 kontigů 4AS a 4AL fyzické mapy (Klocová, B. osobní sdělení). Zvětšení počtu delečních linií, a tím i rozlišení deleční mapy je důležitým krokem k spolehlivému ukotvení kontigů fyzické mapy tohoto chromosomu.

5.1 Zvětšování deleční mapovací populace

Experimentální část diplomové práce je věnována fyzickému bin mapování s cílem zvětšit rozlišovací schopnost fyzické bin mapy 4A chromosomu navýšením počtu delečních linií. V této práci byla použita F_1 generace 4A hemizygotních delečních linií vycházejících z křížení linií kultivaru Chinese Spring ovlivněné gametocidálním systémem s nulli-tetrasomickými liniemi N4AT4B a N4AT4D. Z 2 756 F_1 semen vyrostlo 1 937 rostlin, což je 70 % rostlin. Snížená fertilita semen ovlivněných gametocidálním lokusem byla očekávaná, protože obdobné pozorování učinil Endo a Gill (1996). Z těchto 1 937 rostlin mělo 2,99 % (58) delecí na krátkém rameni a 6,4 % (125) na dlouhém rameni. 1,2 % (23) rostlin mělo delecí na krátkém i dlouhém rameni zároveň. Celkově 10,6 % (206) rostlin mělo delecí alespoň na jednom rameni chromosomu 4A. Tato frekvence je neočekávaně vyšší v porovnání s prací Endo a Gill (1996). Endo a Gill (1996) získali 2,5 % rostlin s delecí na chromosomu 4A, což je 4× nižší účinnost v porovnání s touto studií. Tato rozdílná účinnost může být důsledek vylepšení gametocidálního systému (Endo, osobní sdělení). 206 delečních linií získaných v této studii by mohlo zvětšit rozlišovací schopnost na fyzické mapě o více než 25× v porovnání s EST deleční mapou chromosomu 4A (Miftahudin a kol., 2004).

5.2 Vývoj a ukotvení markerů na 4A chromosom pšenice

Endo a Gill (1996) zjistili, že pomocí adičního chromosomu pocházejícího z blízkého příbuzného druhu pšenice například *Aegilops cylindrica* Host ($2n = 28$, CCDD), *Aegilops triuncialis* L. ($2n = 28$, UUCC) nebo *Aegilops speltoides* Tausch ($2n = 14$, SS) dochází ke chromosomovým zlomům v gametách u pšenice. Cameron a Moav (1957) pozorovali u *Nicotiana tabacum* L. euploidní pyl, který přináší adiční chromosom z divokého druhu, který vyvolává aborci mikrospor a Rick (1966) studoval eliminátor gamet u rajčete. Tyto eliminace a delece umožňují založit deleční materiál pro mapování genů a lokusů agronomických vlastností. Deleční mapování v porovnání s alternativním radiačním hybridním mapováním je spolehlivější, protože zlomy jsou ihned stabilizovány vznikem telomerní struktury (Werner a kol., 1992). Díky vzniku telomerní struktury nedochází k fúzím s dalšími fragmenty DNA a lze tak přesněji určit pořadí markerů a genů na fyzické mapě. Markery pro deleční mapování nemusí vykazovat polymorfismus alel, protože jsou hodnoceny jako polymorfismus absence a prezence. Pro spolehlivé určení absence je nutné do testování zařadit interní standard, který umožní ověřit správný průběh PCR reakce.

Za účelem navýšení rozlišení na fyzické bin mapě 4A chromosomu pomocí navýšení počtu binů a delečních linií byly navrženy markery na distální části 4A chromosomu vycházející z GenomeZiperu (IWGSC, 2014), který představuje virtuální uspořádání genových sekvencí pro 4A chromosom na základě syntenie genů s blízkými příbuznými druhy pšenice. Z 18 navržených párů primerů (Tab. IV) byla polovina vhodná k charakterizaci delečních linií. Pro krátké rameno 4A chromosomu byly použity čtyři markery *Owm122* - *Owm124*. Pro dlouhé rameno 4A chromosomu bylo použito pět markerů *Owm114* - *Owm118*. Tyto navržené markery vykazovaly specifitu pro 4A chromosom, úspěšnou amplifikaci s interním standardem *Gdm136*, spolehlivé skórování a reprodukovatelnost (Obr. 14 a 15). Pro charakterizaci delečního materiálu bylo navíc vybráno 9 markerů navržených Mgr. Evou Komínkovou do oblasti lokusu *QPm.tut-4A* genu. Dále bylo vybráno 15 markerů rovnoměrně rozptýlených na 4A chromosomu navržených Mgr. Barborou Klocovou.

Celkem 33 STS markerů bylo nejprve mapováno na 15 delečních liniích z původní mapovací populace (Endo a Gill, 1996) z toho čtyři (4AS_1, 4AS_4, 4AS_2 a 4AS_3) rozdělující krátké rameno na 3 biny a jedenáct (4AL_6, 4AL_14, 4AL_1, 4AL_4, 4AL_2, 4AL_9, 4AL_7, 4AL_5, 4AL_11, 4AL_10 a 4AL_13) rozdělující dlouhé rameno na 9 binů. Pomocí skrínungu mapovací populace (206 delečních linií) bylo vyselektováno pro bin 4AS_2+3 (30) a pro bin 4AS_1 (28) nových delečních linií. Do centromerického binu 4AL_C bylo vyselektováno (44), pro bin 4AL_13 (19) a pro bin 4AL_6 (62) nových delečních linií. 23 nových delečních linií neslo deletované oba dva konce 4A chromosomu a nejsou z důvodu různých délek delecí zahrnuty v žádném binu. Díky nízké hustotě molekulárních markerů v 4AS_2+3 a 4AS_1 nedošlo k rozdělení binů na další biny. Na dlouhém rameni 4AL chromosomu v oblasti binů 4AL_10 – 4AL_14 z důvodu absence markerů a malé frakční délky binů nedošlo také k identifikaci chromosomálních zlomů v této oblasti. Jak pro 4AS rameno, tak i pro 4AL rameno bude potřeba v navazující studii navrhnout další specifické markery za účelem zvětšit rozlišovací schopnost požadovaných oblastí 4A chromosomu na fyzické bin mapě například v oblasti mezi centromerou a distálním koncem dlouhého ramena 4A chromosomu.

Pouze v distálním binu na dlouhém rameni 4A chromosomu 4AL_6 pomocí markerů *Owm76*, *Owm81*, *Owm66*, *Owm86*, *Owm92*, *Owm118* a *Owm114* bylo identifikováno 62 delečních linií a 6 nových binů (Obr. 17), mezi kterými byla rozlišovací schopnost zvětšena 7×. Teoreticky by přidáním dostatečného počtu markerů mohlo být identifikovaných až 62 nových binů (Obr. 18).

Pro srovnání Gadaleta a kol. (2014) testovali 961 SNP markerů pro 5A chromosom na 12 delečních liniích z toho čtyři (C5AS_1, 5AS_3, 5AS_6 a 5AS_9) rozdělující krátké rameno na 5 binů a osm (5AL_1, 5AL_12, 5AL_5, 5AL_4, 5AL_8, 5AL_15, 5AL_17 a 5AL_7) rozdělující dlouhé rameno na 9 binů. Největší hustota SNP byla na krátkém rameni 5A chromosomu v distálním binu 5AS_3 (157 SNP) a na dlouhém rameni 5A chromosomu v binu 5AL_5 (485 SNP) a v distálním binu 5AL_7 (157 SNP). Integrace fyzické mapy 5A chromosomu s vysokohustotní genetickou mapou vedlo k identifikaci chromosomálních regionů zahrnujících klastr *QTL* (*Quantitative Trait Loci*) pro výnos. Gadaleta a kol. (2014) detekovali klastr *QTL* pro výnos v chromosomovém segmentu 23,5 cM zahrnujícího 111 markerů umístěných v sub-telomerické oblasti 5A chromosomu v binu 5AL_15 – 0.67-0.78.

V této studii stálo za povšimnutí, že F_1 generace hemizygotních delečních linií pro 4A chromosom vytvářela atypickou morfologii klasu. Na morfologii klasu se podílí hlavní domestikací gen *Q*, který byl zamapován na dlouhé rameno 5AL chromosomu (Faris a Gill, 2002). Zhang a kol. (2011) zamapovali recesivní lokusy tohoto genu potlačující speltoidní fenotyp na homeologních chromosomech 5BL a 5DL. Dále ovlivňuje morfologii a vývoj klasu gen *C* na 2DL chromosomu (Johnson a kol., 2007), gen *S-D1* na 3DL chromosomu (Rao, 1977), geny *Ppd-1* na homeologních chromosomech skupiny 2 (Sears, 1947; Pugsley, 1966; Worland, 1996) a lokusy na 1B, 4A, 5A, 6A a 7A chromosomu (Jantasuriyarat a kol., 2004). Delece na těchto chromosomech mohou přispívat k morfologické variabilitě klasů. Na základě těchto studií byl lokus/lokusy ovlivňující fenotyp klasu lokalizovány také na 4A chromosomu. Avšak pro přesnější mapování do některého z binů bude potřeba vyčistit genetické pozadí od vlivu delecí na ostatních chromosomech použitím zpětného křížení. Za tímto účelem byla vytvořena fenotypová stupnice morfologie klasů (Obr. 19) zahrnující tři parametry (tvar, délku a osinatost), která v navazujících studiích umožní mapovat lokus/lokusy ovlivňující tvar klasu.

6 ZÁVĚR

Cílem teoretické části diplomové práce bylo sepsat literární rešerši zaměřenou na téma deleční mapování 4A chromosomu u pšenice. Teoretická část se zabývá komplexitou pšeničného genomu, konstrukcí chromosomově specifické fyzické mapy s možností integrace s deleční mapou. Hlavní důraz byl věnován delečnímu mapování na liniích získaných gametocidálním systémem. Cílem praktické části diplomové práce bylo zvětšit rozlišovací schopnost existující deleční fyzické mapy 4A chromosomu. Větší rozlišení bylo dosaženo navýšením fyzicky definovaných intervalů „binů“ pomocí nové populace delečních linií pšenice seté *Triticum aestivum* kultivaru Chinese Spring.

Křížené F₁ linie z gametocidálního systému pro 4A chromosom z *Triticum aestivum* kultivaru Chinese Spring s nulli-tetrasomickou linií N4AT4B nebo N4AT4D byly vytvořeny F₁ hemizygotní deleční linie. Z 2 756 F₁ linií bylo dopěstováno a testováno 1 937 rostlin. Rostliny byly testovány dvojicí STS markerů (*Owm122*, *Owm114*) a bylo vyselektováno 206 nových delečních linií pro chromosom 4A. Pro krátké rameno 4A chromosomu bylo získáno 58 delečních linií, pro dlouhé rameno 125 delečních linií a 23 delečních linií mělo delecí pro krátké i dlouhé rameno zároveň.

Původní deleční mapovací populace použita pro konstrukci EST deleční mapy 4A chromosomu s 12 delecemi a 9 biny byla rozšířena o 229 nových delecí. Toto umožňuje zvětšit rozlišení mapovací populace o více než 25×. Příkladem je telomerický bin 4AL_6, který se pomocí 7 STS markerů (*Owm114*, *Owm118*, *Owm92*, *owm86*, *Owm66*, *Owm81* a *Owm76*) a 62 nových delečních linií rozpadl na 6 nových binů a přidáním dalších markerů to může být i ještě víc. Tato mapovací populace bude použita na ukotvování 4A specifické fyzické mapy a to hlavně v centromerických a pericentromerických oblastech.

7 LITERATURA

- Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M, Wu, A., Olde, B., Moreno, R. F., Kerlavage, A. R., McCombie, W. R., Venter, J. C., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merril, C. R. (1991): Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252: 1651 – 1656.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403 – 410.
- Beales, J., Turner, A., GriYths, S., Snape, J. W., Laurie, D. A. (2007): A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the fotoperiod insensitive *Ppd-D1* a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theoretical Applied Genetics* 115: 721 – 733.
- Bhatramakki, D., Rafalski, A. (2001): Discovery and application of single nucleotide polymorphism markers in plants. In: Henry, R. J. (ed.): *Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of Plants*. pp. 179 – 192. CAB International.
- Boehnke, M., Lange, K. D., Cox, R. (1991): Statistical Methods for Multipoint Radiation Hybrid Mapping., *The American Society of Human Genetics* 49: 1174 – 1188.
- Cameron, D. R., Moav, R. (1957): Inheritance in *Nicotiana tabacum* XXVII. Pollen killer, an alien genetic locus inducing aboration of microspores not carrying it. *Genetics* 42: 326 – 335.
- Clayton, W. D., Renvoize, S. A. (1986): *Genera Graminum*. Her Majesty's Stationery Office, London.
- 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.
- Cox, D. R., Burmeister, M., Price, E. R., Kim, S., Myers, R. M. (1990): Radiation Hybrid Mapping: A Somatic Cell Genetic Method for Constructing High-Resolution Map of Mammalian Chromosomes. *Science* 250: 245 – 250.
- Davis, G. L., McMullen, M. D., Baysdorfer, C., Musket, T., Grant, D. a kol. (1999): A maize map standard with sequenced core markers, grass genome reference points and 932 expressed sequence tagged sites (ESTs) in a 1736-locus map. *Genetics* 152: 1137 – 1172.
- Devos, K. M., Dubcovsky, J., Dvorak, J., Chinoy, C. N. and Gale, M. D. (1995): Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B and its impact on recombination. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 282 – 288.
- Doležel, J., Kubaláková, M., Paux, E., Bartoš, J., Feuillet, C. (2007): Chromosome-based genomics in the cereals. *Chromosome Research* 15: 51 – 66.
- Doležel, J., Vrána, J, Cápál, P., Kubaláková, M., Burešová, V., Šimková, H. (2014): Advances in plant chromosome genomics. *Biotechnology Advances* 32: 122 – 136.
- Dubcovsky, J., Dvorak, J. (2007): Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* 316: 1862 – 1866.
- Dvořák, J., Zhang, H. B. (1990): Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87: 9640 – 9644.
- Endo, T. R. (1988): Induction of chromosomal structural changes by a chromosome of *Aegilops cylindrica* L. in common wheat. *Journal of Heredity* 79: 366 – 370.

- Endo, T. R. (1990): Gametocidal Chromosomes and Their Induction of Chromosome Mutations in Wheat. *Japanes Journal of Genetics* 65: 135 – 152.
- Endo, T. R., Gill, B. S. (1996): The Deletion Stocks of Common Wheat. *Journal of Heredity* 87: 295 – 307.
- 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.
- Faris, J. D., Gill, B. S. (2002): Genomic targeting and high-resolution mapping of the domestication gene *Q* in wheat. *Genome* 45: 706 – 718.
- Feldman, M., Lupton, F. G. H., Miller, T. E. (1995): Wheats. In *Evolution of Crops*, 2nd edn. (ed. N. W. Simmonds), London: Longman Scientific, pp. 184 – 192.
- Feuillet, C., Langridge, P., Waugh, R. (2008): Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends In Genetics* 24: 24 – 32.
- Feuillet, C., Travella, S., Stein, N., Albar, L., Nublat, 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.
- Frenkel, Z., Paux, E., Mester, D., Feuillet, C., Korol, A. (2010): LTC: a novel algorithm to improve the efficiency of contig assembly for physical mapping in complex genomes. *BMC Bioinformatics* 11: 584.
- Gadaleta, A., Giancaspro, A., Nigro, D., Giove, S. L., Incerti, O., Simeone, R., Piarulli, L., Colasuonno, P., Valè, G., Cattivelli, L., Blanco, A. (2014): A new genetic and deletion map of wheat chromosome 5A to detect candidate genes for quantitative traits. *Molecular Breeding* 34 (4): 1599 – 1611.
- Gill, B. S., Appels, R., Botha-Oberholster, A. M., Buell, C. R., Bennetzen, J. L., Chalhoub, B. a kol. (2004): A Workshop Report on Wheat Genome Sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. *Genetics* 168: 1087 – 1096.
- Gill, K. S., Gill, B. S., Endo, T. R., Mukai, Y. (1993): Fine physical mapping of *Ph1*, a chromosome pairing regulator gene in polyploid wheat. *Genetics* 134: 1231 – 1236.
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M. a kol. (2002): A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Science* 296: 92 – 100.
- 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.
- Hass-Jacobus, B., Jackson, S. A. (2005): Physical Mapping of Plant Chromosomes. In: Meksem, K., Kahl, G. (eds): *The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping*, pp. 131 – 146, Wiley-WCH, Weinheim.
- Hedden, P. (2003): The genes of the Green Revolution, *TRENDS in Genetics* 19: 1.
- Hernandez, P., Martis, M., Dorado, G., Pfeifer, M., Gálvez, S., Schaaf, S., Jouve, N., Šimková, H., Valárik, M., Doležel, J., Mayer, K. F. X. (2012): Next-generation sequencing and syntenic integration of flow-sorted arms of wheat chromosome 4A exposes the chromosome structure and gene content. *Plant Journal* 69: 377 – 386.
- Heun, M., SchaferPregl, R., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B., Salamini, F. (1997): Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* 278 (5341): 1312 – 1314.
- Hossain, K. C., Kalavacharla, V., Lazo, G. R., Hegstad, J., Wentz, M. J., Kianian, P. M., Simons, K., Gehihar, S., Rust, J. L., Syaniala, R. F. T., Ohcori, K., Bhaniidimarri, S. (2004b): A chromosome bin of 2148 expressed sequence tag loci of wheat homocologous group 7. *Genetics* 168: 687 – 699.

- Hossain, K. G., Riera-Lizarazu, O., Kalavacharla, V., Vales, M. I., Maan, S. S., Kianian, S. F. (2004a): Radiation Hybrid Mapping of the Species Cytoplasm-Specific (*scs^{ae}*) Gene in Wheat. *Genetics* 168: 415 – 4.
- 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, S. B., Spielmeier, W., Lagudah, E. S., James, R. A., Platten, J. D., Dennis, E. S., Munns, R. (2006): A Sodium Transporter (HKT7) Is a Candidate for *Nax1*, a Gene for Salt Tolerance in Durum Wheat. *Plant Physiology* 142 (4): 1718 – 1727.
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X. J., Faris, J., Gill, B., Haselkorn, R. a Gornicki, P. (2002): Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99: 8133 – 8138.
- Chantret, N., Salse, J., Sabot, F., Rahman, S., Bellec, A., Laubin, B., Dubois, I., Dossat, C., Sourdille, P., Joudrier, P., Gautier, M. F., Cattolico, L., Beckert, M., Aubourg, S., Weissenbach, J., Caboche, M., Bernard, M., Leroy, P., Chalhou, B.(2005): Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* 17: 1033 – 1045.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004): Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931 – 945.
- Jantasuriyarat, C., Vales, M. I., Watson, C. J. W., Riera-Lizarazu, O. (2004): Identification and mapping of genetic loci affecting the free-threshing habit and spike compactness in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 108: 261 – 273.
- Johnson, E. B., Nalam, V. J., Zemetra, R. S., Riera-Lizarazu, O. (2008): Mapping the *compactum* locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relationship to other spike morphology genes of the *Triticeae*. *Euphytica* 163: 193 – 201.
- Kalavacharla, V., Hossain, K. G., Gu, Y., Riera-Lizarazu, O., Vales, M. I., Bhamidimarri, S., Gonzalez-Hernandez, J. L., Maan, S. S., Kianian, S. F. (2006): High-Resolution Radiation Hybrid Map of Wheat Chromosome 1D. *Genetics* 173: 1089 – 1099.
- Keller, B., Feuillet, C., Yahiaoui, N. (2005): Map-based isolation of disease resistance genes from bread wheat: cloning in a supersize geonome. *Genetics Research Cambridge* 85: 93 – 100.
- Kellogg, E. A. (2001): Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* 125: 1198 – 1205.
- Konvalina, P., Stehno, Z., Capouchová, I. (2012): Výběr a hodnocení genotypů jarních forem málo využívaných druhů pšenice, vhodných pro udržitelné systémy hospodaření. *Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha* 1 – 72.
- Kosambi, D. D. (1944): The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172 – 175.
- Kubaláková, M., J., Vrána, J., Čihakíková, J., Šimková, H., Doležel, J. (2002): Flow karyotyping and chromosome sorting in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1362 – 1372.
- Lantican, M. A., Dubin, H. J., Morris, M. L. (2005): “Impacts of international wheat breeding research in the developing world, 1988-2002.” *Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT)*.
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 245 – 65.
- 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 population, gene flow between them, and the site of emmer domesticaion. *Theoretical and Applied Genetics* 114 (6): 947 – 959.

- Luo, M. Ch., Thomas, C., You, F.M., Hsiao, J., Ouyang, S., Buell, C. R., Malandro, M., McGuire, P. E., Anderson, O. D., Dvorak, J. (2003): High-throughput fingerprinting of bacterial artificial chromosomes using the SNaPshot labeling kit and sizing of restriction fragments by capillary electrophoresis. *Genomics* 82: 378 – 389.
- Ma, J., Stiller, J., Berkman, P. J., Wei, Y., Rogers, J., Feuillet, C., Doležel, J., Mayer, K. F., Eversole, K., Zheng, Y. L., Liu, C. (2013): Sequence-based analysis of translocations and inversions in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLOS ONE* 8 (11): e79329.
- Ma, J., Stiller, J., Wei, Y., Zheng, Y. L., Devos, K. M., Doležel, J., Liu, C. (2014): Extensive Pericentric Rearrangements in the Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotype “Chinese Spring” Revealed from Chromosome Shotgun Sequence Data. *Genome Biology and Evolution* 6 (11): 3039 – 3048.
- McIntosh, R. A. (1988): Catalogue of Gene Symbols for Wheat. In: Proceedings of the Seventh International Wheat Genetics Symposium, Cambridge, England. 13 - 9 July 1988 (Miller, T. E. a Koebner, R. M. D., eds). Cambridge, England: Institute of Plant Science Research, 1225 – 1323.
- Meyers, B. C., Scalabrin, S., Morgante, M. (2004): Mapping and sequencing komplex genomes: Let’s get physical! *Nature* 5: 578 – 588.
- Miftahudin, R. K., Ma, X. F., Mahmood, A. A. a kol. (2004): Analysis of expressed sequence tag loci on wheat chromosome group 4. *Genetics*, 168: 651 – 663.
- Molnár, I., Kubaláková, M., Šimková, H., Farkas, A., Cseh, A., Megyeri, M., Vrána, J., Molnár-Láng, M., Doležel, J. (2014): Flow cytometric chromosome sorting from diploid progenitors of bread wheat, *T. urartu*, *Ae. speltooides* and *Ae. Tauschii*. *Theoretical and Applied Genetics* 27: 1091 – 1104.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, S., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263 – 273.
- Nalam, V. J., Vales, M. I., Watson, C. J. W., Kianian, S. F., Riera-Lizarazu, O. (2006): Map-based analysis of genes affecting the brittle rachis character in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 112: 373 – 381.
- Naranjo, T., Roca, A., Goicoechea, P., Giraldez, R. (1987): Arm homoeology of wheat and rye chromosomes. *Genome* 29: 873 – 882.
- Nguyen, H. T., Wu, X. (2005): Molecular Marker Systems for Gentic Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G. (eds): *The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping*, pp. 23 – 52, Wiley-WCH, Weinheim.
- Olson, M., Hood, L., Cantor, C. C., Botstein, D. (1989): A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434 – 1435.
- O'Sullivan, H. (2007): GrainGenes - A genomic database for Triticeae and Avena *Methods in Molecular Biology* 406: 301 – 314.
- Paux, E., Legeai, F., Guilhot, N., Adam-Blondon, A. F., Alaux, M., Salse, J., Sourdille, P., Leroy, P., Feuillet, C. (2008): Physical mapping in large genomes: accelerating anchoring of BAC contigs to genetic maps through in silico analysis. *Functional & Integrative Genomics* 8: 29 - 32.
- Peng, J. R., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D, Christou, P., Snape, J. W., Gale, M. D., Harberd, N. P. (1999): Green revolution genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400: 256 – 261.
- Peng, J., Ronin, Y., Fahima, T., Röder, M. S., Li, Y., Nevo, E., Korol, A. (2003a): Genomic distribution of domestication QTLs in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. In: Proceedings of the 10th international wheat genetics symposium Paestum, Italy, 3437.

- Peng, J., Ronin, Y., Fahima, T., Röder, M. S., Nevo, E., Korol, A. (2003b): Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 2489 – 2494.
- Pfossler, M., Heberle-Bors, E., Amon, A., Lelley, T. (1995): Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry* 21A: 387 – 393.
- Pugsley, A. T. (1966): The photoperiodic sensitivity of some spring wheats with special reference to the variety Thatcher. *Aust J Agric Res* 17: 591 – 599.
- Rick, C. M. (1966): Abortion of male and female gametes in the tomato determined by allelic interaction. *Genetics* 53: 85 – 96.
- Rao, M. V. P. (1977): Mapping of the *Sphaerococcum* gene 'S' on chromosome 3D of wheat. *Cereal Res Comm* 5: 15 – 17.
- Rong, J. K. (1999): Mapping and tagging by DNA markers of wild emmer alleles that affect useful traits in bread wheat. PhD thesis, submitted to the Scientific Council of The Weizmann Institute of Science Rehovot, Israel April 1999.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (eds): *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, pp 365 – 386, Humana Press, Totowa, New York.
- Ryšavá, A. (2013): Genetické a radiční hybridní mapování u pšenice. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta 1 – 67.
- Sears, E. R (1947): The *sphaerococcum* gene in wheat. *Genetics* 32: 102 – 103.
- Sears, E. R. (1954): The Aneuploids of Common Wheat. *Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin* 572: 1 – 58.
- Sears, E. R. (1966): Nullisomic-tetrasomic combination in hexaploid wheat in *Chromosome Manipulation and Plant Genetics*, edited by Riley, R. a Lewis, K. R. Oliver & Boyd, Edinburgh pp. 29 – 45.
- Sears, E. R. a Sears, L. M. S. (1978): The Telocentric chromosomes of Common Wheat. In: *Proceedings of the Fifth International Wheat Genetics Symposium, New Delhi, India, 23 - 28 February 1978* (Ramanujam S., ed), New Delhi, India: Indian Society of Genetics and Plant Breeding, IARI, 389 – 407.
- Schuler, G. D., Boguski, M. S., Stewart, E. A., Stein, L. D., Gyapay, G., Rice, K., White, R. E., Rodriguez-Tome, P., Aggarwal, A., Bajorek, E., Bentolila, S., Birren. B. B. (1996): A gene map of the human genome. *Science* 274: 340 – 346.
- Soderlund, C., Humphray, S., Dunham, A., French, L. (2000): Contigs Built with Fingerprints, Markers, and FPC V4.7. *Genome Research* 10: 1772 – 1787.
- Solovyev, V., Kosarev, P., Seledsov, I., Vorobyev, D. (2006): Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biology* 7 (1): 10.1 – 10.12.
- Stewart, E. A., McKusick, K. B., Aggarwal, A., Bajorek, E., Brady, S., Chu, A., Fang, N., Hadley, D., Harris, M., Hussain, S., Lee, R., Maratukulam, A. (1997): An STS based radiation hybrid map of the human genome. *Genome Research* 7: 422 – 433.
- Stothard, P. (2000): The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28 (6): 1102.
- The International Wheat Genome Sequencing Consortium (2014): A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* 345 (6194): 1251788-1 – 1251788-11.

- Tsujimoto, H. a Tsunewaki, K. (1988): Gametocidal genes in wheat and its relatives. III. Chromosome location and effects of two *Aegilops speltoides*-derived gametocidal genes In common wheat. *Genome* 30: 239 - 244.
- 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.
- Van der Hoeven, R., Ronning, C., Giovannoni, J., Martin, G., Tanksley, S. (2002): Deductions about the number, organization and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell* 14: 1441 – 1456.
- Van Oeveren, J., de Ruiter, M., Jesse, T., van der Poel, H., Tang, J., Yalcin, F., Janssen, A., Volpin, H., Stormo, K. E., Bogden, R., van Eijk, M. J., Prins, M. (2011): Sequence-based physical mapping of complex genomes by whole genome profiling. *Genome Research* 21: 618 - 625.
- Vrána, J., Kubaláková, M., Šimková, H., Číhalíková, J., Lysák, M. A., Doležel, J. (2000): Flow Sorting of Mitotic Chromosomes in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* 156: 2033 – 2041.
- Watson, L., Dallwitz, M. J. 1992: The grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references. Version: 12th August 2014. <http://delta-intkey.com/grass/>
- Werner, J. E., Kota, R. S., Gill, B. S., Endo, T. R. (1992): Distribution of telomeric repeats and their role In the healing of broken chromosome ends in wheat. *Genome* 35: 844 – 848.
- Worland, A. J. (1996): The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats. *Euphytica* 89: 49 – 57.
- Wu, J., Maehara, T., Shimokawa, T., Yamamoto, S., Harada, C. a kol. (2002): A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. *Plant Cell* 14: 525 – 535.
- Xu, Z., Sun, S., Covalada, I., Ding, K., Zhang, A., Wu, Ch., Scheuring, Ch., Zhang H. B. (2004): Genome physical mapping with large-insert bacterial clones by fingerprint analysis: methodologies, source clone genome coverage, and contig map quality. *Genomics* 84: 941 – 951.
- 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., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S., Dubcovsky, J. (2006): The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT. *The National Academy of Sciences of the USA* 103 (51): 19581 – 19586.
- Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., SanMigue, P., Bennetzen, J. L., Echenique, V., Dubcovsky, J. (2004): The Wheat *VRN2* Gene Is a Flowering Repressor Down-Regulated by Vernalization, *Science* 303 (5664): 1640 – 1644.
- 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.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K., Li, S., Liu, B. a kol. (2002): A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica*). *Science* 296: 79 – 92.
- Zhang, Z., Belcram, H., Gornicki, P., Charles, M., Just, J., Magdelenat, G., Couloux, A., Samain, S., Gill, B. S., Huneau, C., Rasmussen, J. B., Faris, J. D., Chalhou, B. (2011): Duplication and partitioning in evolution and function of homoeologous *Q* loci governing domestication characters in polyploid wheat. *PNAS* 108 (46): 18737 – 18742.

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

4AL	dlouhé rameno pšeničného chromosomu 4 z genomu A
4A monos	4A monosomická linie, monosomický 4A chromosom
4AS	krátké rameno pšeničného chromosomu 4 z genomu A
BAC	umělý bakteriální chromosom (<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>)
bp	počet párů bází (<i>base pairs</i>)
cDNA	komplementární DNA (<i>complementary DNA</i>)
cM	centimorgan, jednotka genetické vzdálenosti na genetické mapě
cR	centiray, jednotka genetické vzdálenosti na radiační mapě
CS	<i>Triticum aestivum</i> kultivar Chinese Spring
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ddNTP	dideoxyribonukleotidový trifosfát (<i>dideoxyribonucleotide triphosphate</i>)
dsDNA	dvouvláknová DNA (<i>double stranded DNA</i>)
dT4AL	ditelosomická linie dlouhého ramene 4A chromosomu
dT4AS	ditelosomická linie krátkého ramene 4A chromosomu
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EST	úsek exprimované sekvence, odvozený od mRNA (<i>Expressed Sequence Tags</i>)
FISH	fluorescenční in situ hybridizace (<i>Fluorescent In Situ Hybridisation</i>)
FPC	program pro sestavení kontigů (<i>FingerPrint Contigs</i>)
Gbp	giga báze (<i>giga base</i>)
IHGSC	<i>International Human Genome Sequencing Consortium</i>
IRWI	<i>International Research Initiative for Wheat Improvement</i>
IWGSC	<i>International wheat genome sequencing consortium</i>
kb	kilo báze (<i>kilo base</i>)
rad	jednotka γ -záření
LTC	program pro sestavení kontigů (<i>LinearTopological Contig</i>)
LTR	dlouhé koncové repetice (<i>Long Terminal Repeats</i>)
MAS	selekce zprostředkovaná markerem (<i>Marker Assisted Selection</i>)
MDA	celogenomová amplifikace (<i>Multiple Displacement Amplification</i>)
MTP	minimální sestava klonů pro sekvenování (<i>MinimalTilling Path</i>)
n	haploidní počet chromosomů
N4AT4B	nulli-tetrasomická linie, 4A chromosom nahrazen 4B chromosomem
N4AT4D	nulli-tetrasomická linie, 4A chromosom nahrazen 4D chromosomem
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NSF	<i>the National Science Foundation</i>

PAA	polyakrylamid
PAV	polymorfismus absence/prezence (<i>Presence Absence Variation Polymorphism</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
QTL	lokus kvantitativního znaku (<i>Quantitative Trait Locus</i>)
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
rDNA	ribosomální DNA
RH	radiační hybridní
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
ssp.	poddruh (<i>subspecies</i>)
SSR	mikrosatelit (<i>Simple Sequence Repeat</i>)
STS	krátká jedinečná sekvence (<i>Sequence Tagged Site</i>)
T_a	teplota nasednutí primerů (<i>Annealing temperature</i>)
TBE	Thris/Borate/EDTA pufr
WAG	celogenomové profilování (<i>Whole Genome Profiling</i>)