

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2011

Štěpán Stočes

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza genomů pícních a trávnickových
trav pomocí DArT markerů**

Diplomová práce

Štěpán Stočes

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: RNDr. David Kopecký, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pouze za pomoci mého vedoucího práce RNDr. Davida Kopeckého, Ph.D.

V Olomouci dne

.....

(podpis)

SOUHRN

Předkládaná diplomová práce se zaměřuje na analýzu genomů píceňích a trávnickových trav pomocí SNP markerů. Trávy rodů kostřava (*Festuca* spp.) a jílek (*Lolium* spp.) z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) patří mezi agronomicky významné druhy. Využívají se jako kvalitní krmivo pro hospodářská zvířata, k okrasným, rekreačním, sportovním a krajinným účelům. Kostřavy jsou žádané pro jejich toleranci vůči abiotickým a biotickým stresům a jílky pro jejich výnos, rychlost růstu a nutriční charakteristiky. V posledních čtyřiceti letech byla vytvořena celá řada odrůd mezirodových kříženců kostřav a jílků, tzv. Festulolium, které často nesou agronomicky výhodné vlastnosti obou rodičovských druhů. Přestože jsou tyto kříženci široce užíváni v pícninářství a trávnickářství, struktura jejich genomu zůstává často zcela neznámá.

V rámci této práce bylo cílem odvodit 70 SNPs (s polymorfismem mezi kostřavou a jílkem) rovnoměrně rozložených na každém ze sedmi chromozómů. Pro účely detekce byly testovány metody HRM (High Resolution Melting) a SBE (Single Base Extension). Metoda HRM se ukázala být nevhodná pro identifikaci genomů obou rodů, jelikož nebyla schopná spolehlivě detekovat druhově specifické SNPs. Naproti tomu metoda SBE se ukázala jako vhodná pro identifikaci mezirodových kříženců *Festuca* × *Lolium*. Pro masivnější využití této metody by bylo ale třeba získat více funkčních SNPs markerů.

SUMMARY

This MSc. thesis is focused on the analysis of genomes of forage and turf grasses of *Festuca-Lolium* complex using SNP markers. Fescues (*Festuca* spp.) and ryegrasses (*Lolium* spp.) are agronomically important grass species from *Poaceae* family. They provide high-quality fodder and are also widely used for ornamental, recreational, sports and landscape purposes. Ryegrasses are dominant grass species in temperate zone because of their agronomical attributes such as high yield, good re-grow, high nutrient content and excellent turf characteristics. However, ryegrass species are susceptible to abiotic stresses such as summer drought and winter freezing. On the other hand, fescues are well known for their tolerance to abiotic and biotic stresses. Such complementary characteristics resulted in the effort to combine these species by intergeneric hybridization. Nowadays, over forty hybrid cultivars (called Festulolium) were developed and released. Despite of the popularity of such hybrids, structure of their genomes usually remains unknown.

The aim of this work was identification of 70 SNPs (with polymorphisms between *Festuca* and *Lolium*), evenly distributed over all seven chromosomes. Methods of HRM (High Resolution Melting) and SBE (Single Base Extension) were tested for the ability to detect these SNPs. Use of HRM method was completely unsuccessful because of the unavailability to detect species-specific SNPs. On contrary, SBE method proved to be suitable for identification and SNPs and thus, it could be used for analysis of genome structure of intergeneric *Festuca* × *Lolium* hybrids. However, it would be necessary to obtain more functional SNPs markers for the massive use of this method.

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval všem, kteří mi pomohli s přípravou mé diplomové práce. V první řadě bych rád poděkoval svému vedoucímu diplomové práce RNDr. Davidu Kopeckému, Ph.D., dále Mgr. Janu Bartošovi Ph.D. a RNDr. Janu Šafářovi Ph.D., kteří mi po celou dobu vycházeli vstříc a poskytovali mi odborné konzultace. Další velký dík patří všem pracovníkům Laboratoře molekulární cytogenetiky a cytometrie Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. v Olomouci. Tato práce byla vypracována v rámci Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v. v. i. v Olomouci.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1. Kostřava (<i>Festuca</i> L.)	10
2.2. Jílek (<i>Lolium</i> L.).....	11
2.3. Festulolium (mezirodový kříženec)	13
2.4. Identifikace kříženců.....	13
2.4.1. Morfologické znaky	14
2.4.2. Průtoková cytometrie	14
2.4.3. Molekulárně cytogenetické metody používané k identifikaci hybridů ...	15
2.4.4. Molekulární markery používané k identifikaci hybridů.....	16
2.4.4.3. Diversity Arrays Technology (DArT)	17
2.4.5. Analýza jedno-nukleotidových polymorfismů (SNPs)	20
3. CÍLE PRÁCE	22
4. MATERIÁL A METODY	23
4.1. Rostlinný materiál	23
4.2. Použité chemikálie, přístroje, komerční kity, pufry a roztoky.....	23
4.2.1. Chemikálie	23
4.2.2. Přístroje a pomůcky	24
4.2.3. Komerční kity	24
4.2.4. Pufry a roztoky.....	25
4.2.5. Pufry	25
4.2.6. Roztoky	25
4.3. Výběr DArT markerů a navržení primerů	26
4.4. Izolace DNA	27
4.5. Ověření specifity primerů	28

4.6. Sekvenování PCR produktů.....	28
4.7. SNP analýza	30
4.7.1. Analýza teplotních křivek DNA (HRM).....	30
4.7.2. Single-base extension analýza (SBE).....	31
4.8. Zaklonování PCR produktu pomocí TOPO® XL PCR klonovacího kitu ...	32
5. VÝSLEDKY	34
5.1. Výběr markerů, anotace a navržení sekvencí	34
5.2. Izolace DNA	34
5.3. Ověření specifity primerů	34
5.4. Sekvence PCR produktů	36
5.5. SNP analýza	37
5.5.1. Analýza teplotních křivek DNA (HRM).....	37
5.5.2. Single-base extension analýza.....	40
5.6. Zaklonování PCR produktu pomocí TOPO® XL PCR klonovacího kitu ...	43
6. DISKUZE.....	45
6.1. Identifikace kříženců pomocí analýzy jedno-nukleotidových polymorfismů (SNPs)	45
6.1.1. Metoda analýzy teplotních křivek DNA (HRM)	45
6.1.2. Metoda analýzy Single-base extension (SBE)	46
7. ZÁVĚR.....	48
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	49
9. POUŽITÁ LITERATURA.....	51

1. ÚVOD

Diplomová práce na téma „Analýza genomů pícních a trávnickových trav pomocí DArT markerů“ byla řešena v rámci grantového projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) QH71267 „Vývoj a využití DNA čipů DArT pro šlechtění nových odrůd *Festulolium*“ (Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. v Olomouci) a jejím dlouhodobým cílem bylo přispět ke zjednodušení a zrychlení analýzy mezidruhových kříženců pícních a trávnickových trav.

Trávy jsou nepostradatelné a často kultivované plodiny, které poskytují kvalitní krmivo pro hospodářská zvířata. Využívají se také k okrasným, rekreačním, sportovním a krajinným účelům. Tím zaujímají podstatnou hospodářskou roli, ale i roli při ochraně životního prostředí. Mezi takto pěstovanými trávami převládají zástupci rodu jílek (*Lolium* spp.) a kostřava (*Festuca* spp.). Jílek je využíváný vzhledem k jeho vysokým výnosům, dobré stravitelnosti, rychlému klíčení osiva na jaře, sytě zelené barvě, dobré hustotě porostu a uniformitě drnu. Jeho velkým hendikepem je citlivost na abiotický a biotický stres. Kostřavy se naopak vyznačují schopností stresové podmínky přežít. Mnoholetá snaha šlechtitelů spojit vlastnosti obou rodů vyvrcholila vypěstováním křížence *Festuca* × *Lolium*. Aby bylo možné přesně identifikovat rodičovské genomy kříženců, bylo nutné použít molekulárně genetické metody.

Jednou z prvních molekulárně-biologických metod, která se začala používat k identifikaci rodičovských genomů v křížencích kostřav a jílků, byla genomová *in situ* hybridizace (GISH). Tato metoda však patří mezi časově náročnější. Proto je třeba aplikovat nové metody - časově méně náročné, automatizovatelné a jednodušší.

Tato diplomová práce se snaží o nový přístup k analýze genomů obou druhů, za využití mezidruhové variability ve formě SNPs pomocí analýzy teplotních křivek DNA (HMR) a Single-base extension (SBE).

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Kostřava (*Festuca L.*)

Kostřavy jsou vytrvale rostoucí traviny z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Jejich přirozená stanoviště jsou louky a pastviny. Jsou jedny z nejvýznamnějších pícních odrůd.

Stéblo má přímé, někdy obloukovitě vystoupavé. Čepele listů jsou ploché, naspodu lesklé. Vyznačuje se květenstvím tvaru vzpřímené laty, v nejnižším rozvětvení laty bývají dvě větve (Straková et al., 2007).

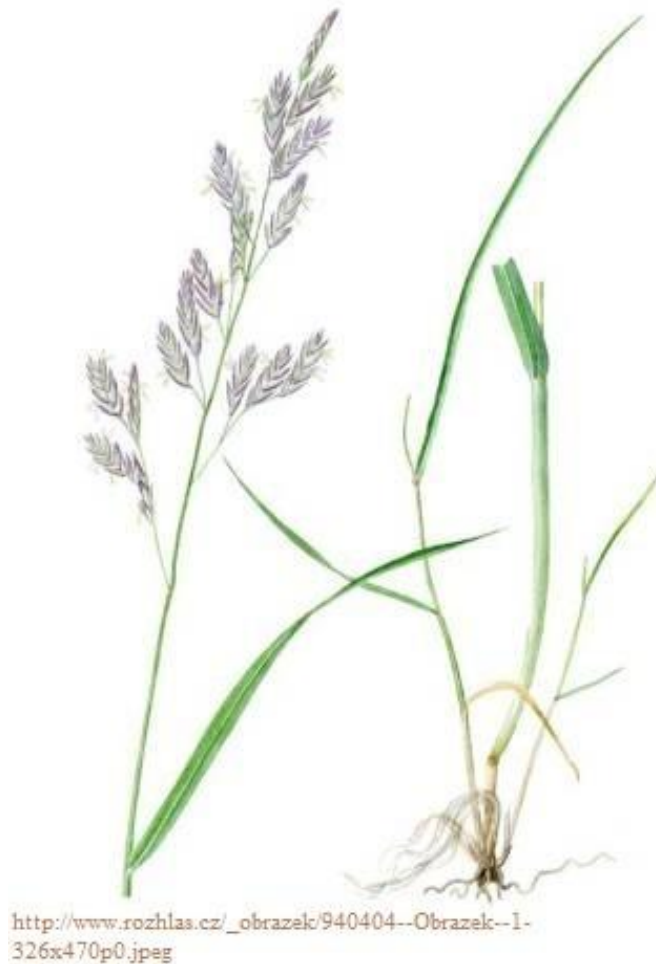
Rod *Festuca* je různorodý a zahrnuje téměř 500 druhů. Byl rozdělen do šesti sekcí: *Ovinae*, *Bovinae*, *Sub-bulbosae*, *Variae*, *Scariosae* a *Montanae* (Hackel 1882) a do devíti podrodů: *Hesperochloa*, *Xanthochloa*, *Drymanthele*, *Schedonorus*, *Subulatae*, *Subuliflorae*, *Obtusae*, *Festuca* a *Helleria*. (Clayton a Renvoize, 1986)

Studiem anatomie listů a fylogeneze na základě sekvence mezerníkových regionů (ITS) byl rod *Festuca* definován dvěma hlavními evolučními liniemi: širokolisté a úzkolisté (Charmet et al., 1997; Torrecilla a Catalán et al., 2002). Zástupci tohoto rodu se rovněž značně liší v úrovni ploidie, od diploidních ($2n = 2x = 14$) po dodecaploidní ($2n = 12x = 84$), avšak drtivá většina je allopolyploidní (Loureiro et al., 2007; Smarda et al., 2008). Na základě častého výskytu polyploidie se kostřavy považují za starobylejší než jílky, jejichž všech osm druhů je diploidních (Malik a Thomas, 1966).

Některé druhy kostřav se využívají v zemědělství. Kromě úzkolisté kostřavy červené a kostřavy ovčí, jež se využívají v trávníkářství, jsou to zejména kostřava rákosovitá a kostřava luční, které patří do sekce *Bovinae* (podrod *Schedonorus*). Kostřava rákosovitá *Festuca arundinacea* Schreb. ($2n = 6x = 42$), je pro svoji schopnost odolávat suchu oblíbeným druhem využívaným v pícninářství. V poslední době se rovněž stává důležitým trávníkářským druhem, v USA dokonce patří mezi nejčastější druh trávníků. Kostřava luční, *Festuca pratensis* Huds. ($2n = 2x = 14$) je využívána v pícninářství a je známá svojí tolerancí k nízkým teplotám v zimě (Bartoš et al., 2011). I proto se stala velmi populárním druhem v pícních směsích používaných v chladném (Skandinávie) či kontinentálním (střední Evropa) klimatu. Velikost genomu

kostřavy luční je 3,175 Gbp (Kopecký et al., 2010), což je asi 6 – 7 krát více než u genomů *Brachypodium distachyon* a rýže (Bennett a Leitch, 2005).

Obr. 1 – Kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.)



2.2. Jílek (*Lolium* L.)

Jílek je další významný pícní rod, který patří do čeledi lipnicovitých (Poaceae). Často se využívá na orné půdě a v intenzivně obhospodařovaných dočasných loukách, kde poskytuje vysoké výnosy velmi kvalitní píce. Je původem z jižní a střední Evropy a severozápadní Asie. Jde o jednoletou, dvouletou až vytrvalou bylinu, která je rozšířena ve většině oblastí mírného pásu, včetně Austrálie a Nového Zélandu, kam byla zavlečena prvními osadníky.

Jílky mají přímé nebo vystoupavé stéblo, v kolénkách rýhované. Listy mají široké čepele, světle zelené barvy na rubu lesklé a lysé. Květenství jsou dvouřadé zploštělé lichoklasy. Klásky jsou přitisklé úzkou stranou k větenu (Straková et al., 2007).

Rod *Lolium* zahrnuje osm druhů (*Lolium canariense* Steud., *L. edwardii* H. Scholz., *L. multiflorum* Lam., *L. perenne* L., *L. persicum*, *L. remotum* Schrank, *L. rigidum* Gaudin, *L. temulentum* L.), přičemž všechny jsou diploidní ($2n = 2x = 14$) (Humphreys et al., 1995).

V zemědělství se výrazně uplatňují jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* Lam., $2n = 2x = 14$) a jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L., $2n = 2x = 14$) (Obr. 2). Ve šlechtění trav jsou rovněž významným zdrojem genetického materiálu pro mezirodové křížení (*Lolium* x *Festuca*) (Straková et al., 2007). Velikost genomu jílku mnohokvětého je 2,567 Gbp (Kopecký et al., 2010).

Obr. 2 – Jílek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* Lam.) a jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.)



2.3. Festulolium (mezirodový kříženec)

Kostřavy a jílky jsou široce používány jako hlavní zdroj píce v mírném pásu. Oba rody se spolu snadno kříží a v průběhu meiózy se jejich homeologní chromozómy párují a dochází k častým homeologním rekombinacím, což umožňuje kombinaci komplementárních znaků v jednom genotypu (Kosmala et al., 2006). Mezirodoví kříženci jsou buď amfiploidi (zastoupení genomu obou rodičů je přibližně nebo zcela stejné) nebo introgresní typy (v genomu jednoho rodiče je jen velmi malá část genomu druhého rodiče) (Yamada et al., 2005). Kříženci *Festulolium* se čím dál častěji používají po celém světě, zejména díky jejich vynikajícím agronomickým vlastnostem kombinujícím výnos jílků s tolerancí vůči abiotickým a biotickým stresům kostřav (Kopecký et al., 2006).

Komerční odrůdy *Festulolium* jsou vypěstované z různých mezirodových kříženců. Většinou pocházejí z recipročných mezirodových tetraploidních kříženců: *L. multiflorum* × *F. pratensis* a *F. pratensis* × *L. multiflorum* (Kopecký et al., 2006).

2.4. Identifikace kříženců

Křížení rostlin je přirozený proces a hraje důležitou roli při šlechtění (Rieseberg et al. 1999, 2003). Přestože jsou kříženci *Festulolium* široce využíváni, ekonomicky významní a počet jejich odrůd se stále zvyšuje, struktura jejich genomu zatím zůstává neznámá. V současné době existuje asi 30 odrůd *Festulolium*, které jsou registrované a rozšířené po celém světě. Kopecký et al., (2006) ve své studii struktury genomu různých odrůd *Festulolium* pomocí metody genomové *in situ* hybridizace (GISH) ukázal výrazné rozdíly v poměru rodičovských genomů mezi rostlinami v rámci jedné odrůdy, které byly často větší než rozdíly mezi samotnými odrůdami, vytvořenými stejným typem křížení. Mezi metody, které se mohou využít k identifikaci kříženců, patří odlišení na základě morfologických znaků, využití izoenzymů, náhodně amplifikované polymorfni DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), analýzy transkribovaného mezerníkového regionu (ITS) a jednoduchých opakujících se sekvencí (SSRs). Další využívané metody jsou genomová *in situ* hybridizace (GISH), fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), Diversity Arrays technology (DArT), průtoková cytometrie, sekvenování a v této práci použité metody analýzy jedno-

nukleotidových polymorfismů pomocí Single-base extension (SBE) a analýzy teplotních křivek DNA (HRM).

2.4.1. Morfologické znaky

Morfologické znaky jsou viditelné pouhým okem nebo za pomoci optiky, tudíž jde o vnější znaky stavby rostlinného těla. U trav jsou nejčastěji sledované morfologické znaky bohatost a rozvětvenost kořenové soustavy, typy výhonků, tvar a složení listů, typ květenství a výška porostu. Tyto znaky lze uplatnit pro rozlišení jednotlivých rodů a druhů rostlin. Avšak u identifikace mezirodových a mezidruhových F1 kříženců, jejich následných F2 generací, nebo u generací vzniklých zpětným křížením, je takovéto rozlišení na základě morfologických znaků většinou problematické, především u mladých jedinců.

2.4.2. Průtoková cytometrie

Jedna z metod s velkým potenciálem, který se dá využít k analýze mezirodových kříženců je průtoková cytometrie. Tato metoda analyzuje vzorky ve formě mikroskopických částic, pohybujících se ve vodním sloupci, pomocí jejich optických parametrů. Mezi měřené parametry zahrnujeme čelní a boční rozptyl světla, emitovanou fluorescenci, tvar a čas trvání světelného pulzu, a to jak rozptylu světla, tak fluorescence. Průtoková cytometrie je schopná mimo jiné měřit relativní obsah jaderné DNA. Pro analýzu mezidruhových kříženců ji lze využít jen v tom případě, že rodičovské druhy mají dostatečně rozdílný obsah DNA. Pro identifikaci ploidie *Festulolium* tuto metodu použili Kerlan a Ghesquière (1997), kteří analyzovali F1 křížence *L. multiflorum* × *F. arundinacea* (L4F4) a *L. multiflorum* × *F. arundinacea* (L4F6), dále BC1 a BC2 křížence L4F4 × *L. multiflorum* a L4P4 *L. perenne*. Jako kontrolní vzorky použili *F. arundinacea* (4x) a *F. arundinacea* (6x).

Nevýhody průtokové cytometrie představují vysoká pořizovací cena vybavení, nutnost kvalifikovaných vyškolených pracovníků a skutečnost, že analýza může být ovlivněna přítomností sekundárních metabolitů, které mají vliv na vazbu

fluorescenčních barviv na DNA. U rostlinného materiálu je další nevýhodou přítomnost rigidní buněčné stěny.

2.4.3. Molekulárně cytogenetické metody používané k identifikaci hybridů

Ještě v první polovině devadesátých let dvacátého století nebylo možné určit genomové složení kříženců kostřav a jílků. Přitom tyto kříženci jsou velmi zajímaví také z cytogenetického hlediska, protože rodičovské chromozómy se v meióze párují a dochází k homeologní rekombinaci. Tento fakt byl prokázán zavedením molekulárně cytogenetických nástrojů, jako jsou FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a GISH (genomová *in situ* hybridizace), které umožňují podrobné studie mezirodových chromozomálních rekombinací a karyotypování odrůd *Festulolium* (Kopecký et al., 2008).

Metoda GISH je založena na hybridizaci sondy genomové DNA jednoho či obou rodičovských druhů obarvené specifickými fluorescenčními barvivy (flouochromy) a DNA templátu v podobě metafázních chromozómů fixovaných na mikroskopickém sklíčku (Schwarzacher et al., 1989). Tato metoda tak umožňuje vizualizaci chromatinu rodičovských druhů na chromozómech křížence. GISH je velmi efektivní jednoduchá metoda pro studium struktury a evoluce genomů kříženců *Festulolium*. Její nevýhoda je omezené rozlišení a nízká kapacita, což brání širšímu využití této metody v průběhu křížení a tvorby nových odrůd (Kopecký et al., 2009). Pomocí metody GISH se ukázalo, že složení genomů komerčních odrůd *Festulolium* se významně liší v závislosti na rodičích daných odrůd a také na použité strategii křížení (Kopecký et al., 2006).

Další z metod *in situ* hybridizace je FISH, která jako sondy používá fluorescenčně obarvené specifické sekvence (určité části genomu). Touto metodou byla studována variabilita v chromozomálním umístění a počtu ribozomálních DNA (rDNA) míst v diploidních a autotertraploidních odrůdách *F. pratensis* a *L. perenne* a zároveň v jejich triploidních a tetraploidních křížencích. Získaná data ukázala, že lokusy rDNA jsou u *F. pratensis* přítomny na chromozómech 2 (5S rDNA) a 3 (45S rDNA), u *L. perenne* na chromozómech 2 (5S rDNA a 45S rDNA), 3 a 7 (45S rDNA). Jsou tedy užitečnými markery těchto chromozómů při analýze mezirodových kříženců *Festuca* ×

Lolium (Ksiazczyk et al., 2010). Vyhodnocení metody se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu, kvalitních CCD kamer a počítačových softwarů.

2.4.4. Molekulární markery používané k identifikaci hybridů

2.4.4.1. Izoenzymy

Izoenzymy jsou enzymy, které mají stejnou katalytickou funkci, ale liší se ve struktuře. Díky tomu se dají použít jako markery. Jejich variace byly použity například pro zkoumání vztahů mezi druhy v rodu *Lolium*. Byly zaznamenány alelické frekvence na lokusech třinácti izoenzymů a ze získaných dat se dalo přepokládat, že *L. rigidum* je druh s největší rozmanitostí a mohl by být společným předkem celého rodu (Charmet et al., 1994). K identifikaci mezirodových hybridů *Festuca* × *Lolium* použili izoenzymy jako molekulární markery Eizenga a Buckner (1986). Pomocí gelové elektroforézy zjišťovali u zkoumaných kříženců přítomnost fosfoglucoizomerázy (PGI), glutamát oxaloacetát transaminázy (GOT), malát dehydrogenázy (MDH), fosfatázy (ACPH) a 6-fosfoglukonát dehydrogenázy (6-PGD). MDH, 6-PGD a PGI měly méně detekovaných bandů u diploidního jílku ve srovnání s hexaploidní kostřavou rákosovitou a tetraploidním křížencem *F. arundinacea* ($2n = 6x = 42$) × *L. multiflorum* ($2n = 2x = 14$). Podle jejich práce se diploidní rostliny pravděpodobně liší od kříženců s vyšší úrovní ploidie různými izoenzymy kódovanými na místech, které jsou lokalizovány na homologních chromozómech polyploidních kříženců.

Velkou nevýhodou analýzy izoenzymů je nízká kapacita a existence jen omezeného počtu markerů. Další nevýhodou je například variabilita izoenzymů příslušných ke kódujícím oblastem genomu, která podléhá selekčnímu tlaku, což často vede k monomorfním lokusům.

2.4.4.2. Délkový polymorfismus restričních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)

Metoda využívající délkový polymorfismus restričních fragmentů je postavena na třech základních technikách. Nejprve na štěpení DNA restričními endonukleázami,

dále na separaci fragmentů pomocí elektroforézy a nakonec na přenesení separovaných produktů na nylonovou membránu, kde proběhne hybridizace se specifickou sondou (Southern blotting). Získané vzorky DNA od různých jedinců se pomocí specifických restričních endonukleáz naštěpí v přesně stanovených místech. Když je v daném místě štěpení přítomna mutace, dojde ke změně velikosti získaných fragmentů. Pomocí takto získaných srovnávacích map založených na RFLP markerech se například zjistilo, že jílek vytrvalý a zástupci *Triticeae* jsou velmi konzervativní, pokud jde o syntenii a kolinearitu (převzato Mian et al., 2005). RFLP markery byly použity k monitorování introgrese chromosomů *F. mairei* do *L. perenne*. Pomocí RFLP markerů byla identifikována přítomnost genomu *F. mairei* v křížencích F1, F2 a BC1 generacích, ale nebyly již schopné identifikace v BC2 generaci (Chen a Sleper, 1999). Nevýhodou RFLP je, že se jedná o časově náročnou a nízkokapacitní metodu, pro kterou je nutno získat velmi kvalitní a čistou DNA v dostatečném množství. Další nevýhodou je (stejně jako u isoenzymů) existence jen omezeného počtu markerů.

2.4.4.3. Diversity Arrays Technology (DArT)

Jedna z metod, která byla vyvinuta pro analýzu vnitrodruhové a mezidruhové genetické variability, je Diversity Arrays Technology (DArT). Tato metoda vychází z hybridizace na microarray s využitím redukce komplexity. Metoda umožňuje simultánní skrining tisíců lokusů a to bez předchozí informace o jejich sekvencích (Jaccoud et al., 2001). Obecně platí, že DArT metoda je vysoko kapacitní, s nízkými náklady, je rychlá a reprodukovatelná (Kopecký et al., 2009).

Nedávno byla vyvinuta DArTFest array pro komplex *Festuca-Lolium* (Kopecký et al., 2009). Tato tištěná microarray obsahuje 7680 sond z methylfiltrované genomové reprezentace tří druhů kostřav (*F. arundinacea* Schreb., *F. glaucescens* Boiss. a *F. pratensis* Huds.) a dvou druhů jílku (*L. multiflorum* Lam. a *L. perenne* L.). DArTFest array má potenciál poskytnout informace o struktuře genomu a vývoji druhů v rámci *Festuca-Lolium* komplexu (Bartoš et al., 2011). V prvním experimentu byla tato array použita k analýze genetické diverzity čtyřiceti genotypů každého druhu a podařilo se identifikovat 3884 polymorfních markerů (Kopecký et al., 2009). Tyto markery byly použity pro charakterizaci genomu pěti odrůd *Festulolium*. Díky tomu bylo možné

poprvé určit genomové složení těchto hybridů. Minimální počet markerů rozlišujících *Lolium* a *Festuca* genom bylo 361 a 171 (Kopecký et al., 2011).

2.4.4.4. Polymorfismus náhodně amplifikované DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) a polymorfismus délký amplifikovaných fragmentů (Amplification Fragment Length Polymorphism, AFLP)

Další z metod, jak odlišit jílky od kostřav, je založena na náhodně amplifikovaných polymorfních DNA (RAPD) markerech (Kölliker et al., 1999). Tato metoda se zařazuje mezi PCR techniky, kdy vznikají různě dlouhé fragmenty genomové DNA, které jsou specifické pro každého jedince. K tomu se používají krátké (6-10 bp) primery. Tato metoda byla testována pro identifikaci hybridních genomů *L. perenne* × *F. arundinacea*. RAPD markery byly na základě výsledků rozděleny do několika tříd. RAPD markery, které se vyskytovaly v genomu F1 kříženců zděděných z jednoho rodiče a z druhého rodiče, prokázaly, že mají potenciál identifikovat hybridní genom (Šiffelová et al., 1997/98).

Další metoda využívající polymorfismu tentokráté délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) je založena na kombinaci PCR reakce a restriční štěpení DNA. AFLP technika je podle Kosmala et al, (2003) efektivním nástrojem pro sledování přenosu genů mezi druhy kostřav a jílků. Ve své práci provedl AFPL analýzu potomstva, které vzniklo zpětným křížením diploidního jílku mnohokvětého majícího introgresovaný segment kostřavy luční na jednom chromozómu. K analýze bylo použito 54 kombinací primerů a bylo zjištěno, že 11 AFLP markerů segregovalo spolu s vloženým segmentem.

Hlavní nevýhodou těchto typů markerů (AFLP i RAPD) je, že mají anonymní a dominantní povahu, což má za následek omezení využití při genetických studiích, a to zejména mezi druhy (Mian et al., 2005). Dominantnost se projeví v nemožnosti rozlišit, zda amplifikovaný lokus je heterozygotní, nebo homozygotní. Další nevýhody plynoucí z použití RAPD markerů jsou nízká reprodukovatelnost PCR a interference znaků. Metoda využívající AFLP markery je nevýhodná mimo jiné pro její nároky na kvalitní DNA.

2.4.4.5. Analýza mezerníku (ITS) a chloroplastové sekvence *trnL-F*

Další metodou, která by mohla mít potenciál identifikovat mezidruhovou hybriditu, je analýza ribozomálního mezerníkového regionu ITS (internal transcribed spacer) a chloroplastové sekvence *trnL-F*. ITS odkazuje na nefunkční RNA nacházející se mezi strukturními ribozomálními RNA (rRNA). Srovnávání sekvencí ITS regionů se používá zejména v taxonomii a molekulární fylogenezi, jelikož i blízké příbuzné druhy vykazují v této oblasti velkou variabilitu. Zároveň analýza ITS regionu má výhodu v tom, že na ni stačí relativně malé množství DNA.

Oblasti *trnL-trnF* jsou umístěny ve velké jednokopiové oblasti chloroplastového genomu. Skládá se z *trnL* genu, intronu skupiny I a *trnL-F* mezerníku (Hao et al., 2009). Vlastní analýza je založena na srovnávání chloroplastové sekvence mezerníku *trnL-F*. K fylogenetické rekonstrukci čeledi lipnicovitých tuto metodu použil Catalán et al. (2004). Přes její značný potenciál však nebyla nikdy použita k identifikaci mezidruhových hybridů kostřav a jílků.

2.4.4.6. Jednoduché opakující se sekvence (SSR)

Jako molekulární markery se dají rovněž použít mikrosatelity, neboli jednoduché opakující se sekvence (SSR). Mají kodominantní charakter (Mian et al., 2005). Jsou to tandemové repetice o velikosti několika párů bází (1 – 6 bp), jejich variabilita je založena na počtu opakování motivu. SSR markery jsou široce používány při fingerprintingu, hodnocení genetické rozmanitosti, genetickém mapování a využívají se při šlechtění pomocí markerů (Marker Assisted Selection; MAS). Metody využívající SSR markery se používají pro rozlišování mezi příbuznými genotypy v mnoha druzích rostlin (Yang et al., 1994; Russell et al., 1997; Rödel et al., 1998). Pro identifikaci odrůd *Lolium*, *Festuca* a jejich křížence *Festulolium* je použil Momotaz et al. (2004), kdy použil 44 primerů odpovídající SSR markerům. Primery pro SSR markery byly navrženy z odlišných alel pro *Lolium* ssp., *F. pratensis* a *F. arundinacea*. Získané frekvence alel přítomných ve zkoumaných *Festulolium* křížencích indikovaly jejich hybriditu.

Použití SSR markerů je časově a finančně náročné. Obvykle je metoda doprovázena nižší variabilitou, která by se dala srovnat s variabilitou RAPD. Rovněž

rozložení SSR markerů na jednotlivých chromozómech není ideální, jelikož se markery vyskytují především v distálních oblastech chromozómů a naproti tomu v centromerických oblastech se vyskytují pouze v omezené míře.

2.4.5. Analýza jedno-nukleotidových polymorfismů (SNPs)

Jedno-nukleotidové polymorfismy (SNPs) jsou místa v sekvenci DNA, která se mezi jedinci liší jediným nukleotidem (Nollou and Wagener, 1997). Běžně se využívají v mnoha oblastech, například ke studiu evoluce, charakterizaci a složení populace, jako markery ve šlechtění (MAS) a při pozičním klonování genů. SNP markery jsou výhodné pro jejich velký počet v genomu, oproti SSR markerům mají mnohem menší náchylnost k mutacím a zároveň mají výhodné rovnoměrné rozložení po celém genomu.

Nejčastější metody detekce SNPs jsou založeny na amplifikaci cílové DNA pomocí PCR techniky nebo amplifikačními metodami, které dovolují citlivou a specifickou analýzu sekvence cílové DNA (Syvänen,1999). Patří mezi ně např. Golden Gate Assay Basics (<http://dnatech.genomecenter.ucdavis.edu/illumina.html>), dynamická alelo-specifická hybridizace (DASH, http://www.thermo.com/eThermo/-CMA/PDFs/Various/241File_16451.pdf), molekulární majáky (<http://www.genelink.com/newsite/products/mbintro.asp>), pyrosekvenování, hmotnostní spektrometrie, Single-base extension (SBE) nebo analýza teplotních křivek (HRM). Vzhledem k tomu, že pro účely skórování SNPs byly použity v této diplomové práci metody SBE a HRM, následuje podrobnější popis právě těchto dvou metod.

2.4.5.1. Single-base extension analýza (SBE)

SBE je metoda, která se využívá při identifikaci jednotlivého nukleotidu na konkrétní pozici nukleové kyseliny. Je založena na prodlužování neoznačeného oligonukleotidového primeru označeným dideoxynukleotidem. Primer je navržen tak, že nasedá na komplementární templátovou DNA přiléhajíc těsně k variabilní nukleotidové pozici. Během reakce je primer prodloužen o jeden nukleotid, kterým je fluorescenčně značený terminální ddNTP. Takto vzniklý produkt je separován kapilární elektroforézou a analyzován pomocí počítačového programu, např. GeneMarker[®]

(Bernat et al., 2002). SBE se ukázala jako velmi výhodná metoda právě pro její jednoduchost. K její realizaci jsou potřeba pouze tři komponenty: primer, polymeráza a nukleosidový trifosfátový substrát (ddNTP) (Giusto and King, 2003).

SBE byla použita pro identifikaci homologních a paralogních sekvenčních variant alloplodních nepříbuzných kříženců *Trifolium* spp., na základě srovnání s jejich taxonomickým předkem. Metoda je široce použitelná pro detekci SNPs u celé řady alloplodních taxonů s nejasným původem (Hand et al., 2008).

2.4.5.2. Analýza teplotních křivek DNA (High-resolution melting, HRM)

HRM je účinná a levná metoda pro rozlišení DNA polymorfismů. Byla použita k identifikaci mutací v lidských genech a k detekci SNP, INDELS a mikrosatelitů v rostlinách. Nepotřebuje žádné oligonukleotidové sondy, pouze dva standardní primery. Je založena na detekci fluorescenčního signálu, který vzniká uvolněním fluorescenčního barviva navázaného ve dsDNA, při její degradaci vlivem teploty, tzv. táním DNA. Za pomoci této metody lze snadno detekovat SNPs a heteroduplexy vznikající po PCR reakci, identifikovat nové mutace a analyzovat metylaci DNA. DNA v místech SNPs a heteroduplexů vykazuje odlišné křivky a teploty tání (T_m) DNA (Gundry et al., 2008). V poslední době se metoda stala velmi citlivou a spolehlivě reprodukovatelnou díky výkonnějšímu přístrojovému vybavení a vývinem nových DNA barviv, která umožňují dostatečné nasycení PCR produktů. Tato nová barviva vykazují minimální redistribuci během tání a zároveň neinhibují PCR reakci (Erali et al., 2008).

3. CÍLE PRÁCE

- Vypracovat literární rešerši na téma analýzy genomů pícních a trávnickových trav (*Festuca* spp. a *Lolium* spp.) za využití SNP markerů.
- Ze sekvencí DArT markerů navrhnout primery pro odvození SNP markerů a ty poté identifikovat.
- Navrhnout jednoduchou a spolehlivou metodu detekce SNP markerů, které by bylo možné využít k identifikaci kříženců kostřav a jílků.
- Získat 70 SNP markerů rovnoměrně rozložených v genomu (10 SNP markerů na chromozóm) s polymorfismem mezi kostřavou a jílkem a tím umožnit detailní analýzu jejich kříženců.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Rostlinný materiál

K analýze genomů kostřavy luční (*F. pratensis* Huds.) a jílku vytrvalého (*L. perenne* L.) pomocí SNP markerů byly použity dvě odrůdy kostřavy luční LAURA a FURE a dvě odrůdy jílku mnohokvětého MITOS a PROLOG. Semenný materiál laskavě poskytl Ing. Vladimír Černoch (DLF Hladké Životice) a Prof. Adam J. Lukaszewski (University of California, Riverside).

4.2. Použité chemikálie, přístroje, komerční kity, pufry a roztoky

4.2.1. Chemikálie

- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosid trifosfáty dATP, dCTP, dTTP, dGTP
- Ethanol – 96% roztok (Lachema, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma Chemical, USA)
- ExoSap-IT® (Affymetrix, USA)
- Exonukleáza I (Fermentas, Kanada)
- Formamid Hi-Di (Applied Biosystems, USA)
- Lyzační pufir P2 (QIAGEN, Německo)
- Shrimp alkalická fosfatáza (SAP) (Affymetrix, USA)
- S.O.C médium (Invitrogen, USA)
- Taq polymeráza
- Termosensitivní alkalická fosfatáza FastAP (Fermentas, Kanada)
- Velikostní standard GeneScan-120 Liz Size Standard (Applied Biosystems, USA)
- Quick-Load® 100 bp DNA Ladder

4.2.2. Přístroje a pomůcky

- 96-kapilárový sekvenátor 3730xl DNA analyzátor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Agencourt SPRIPlate (Beckman Coulter, USA)
- Biologický termostat BT120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)
- Bioimaging System (Syngene, GB) s transiluminátorem model GVM20 (Syngene, GB)
- Cell-porator (Life Technologies™, USA)
- Homogenizační oscilační mlýn MM301 (Retsch, Německo)
- Magnetická destička 96 DIRECT INJECT MAGNET (Beckman Coulter, USA)
- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Multifunkční centrifuga JOUAN CR3i Multifunction Centrifuge
- Spectrophotometer ND-1000, NanoDrop®
- Stolní centrifuga IEC Micromax RF (Thermo Scientific, USA)
- Thermo Electron Corporation, Forma Orbital Shakers
- Termocykler C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)
- Třepačka Forma Orbital Shaker 420 (Thermo Scientific, USA)

4.2.3. Komerční kity

- Agencourt® CleanSEQ (Beckman Coulter, USA)
- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Invitex, Německo)
- SNaPshot™ Kitu (ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kitu)
- Sso Fast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- One Shot® TOP10 Electrocomp Cells (Invitrogen, USA)
- TOPO® XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, USA)

4.2.4. Pufry a roztoky

4.2.5. Pufry

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

- 0,5 x TBE pufr (pH 8)
 - 0,5x
 - 45 mM Tris báze
 - 45 mM kyselina boritá
 - 1 mM EDTA

4.2.6. Roztoky

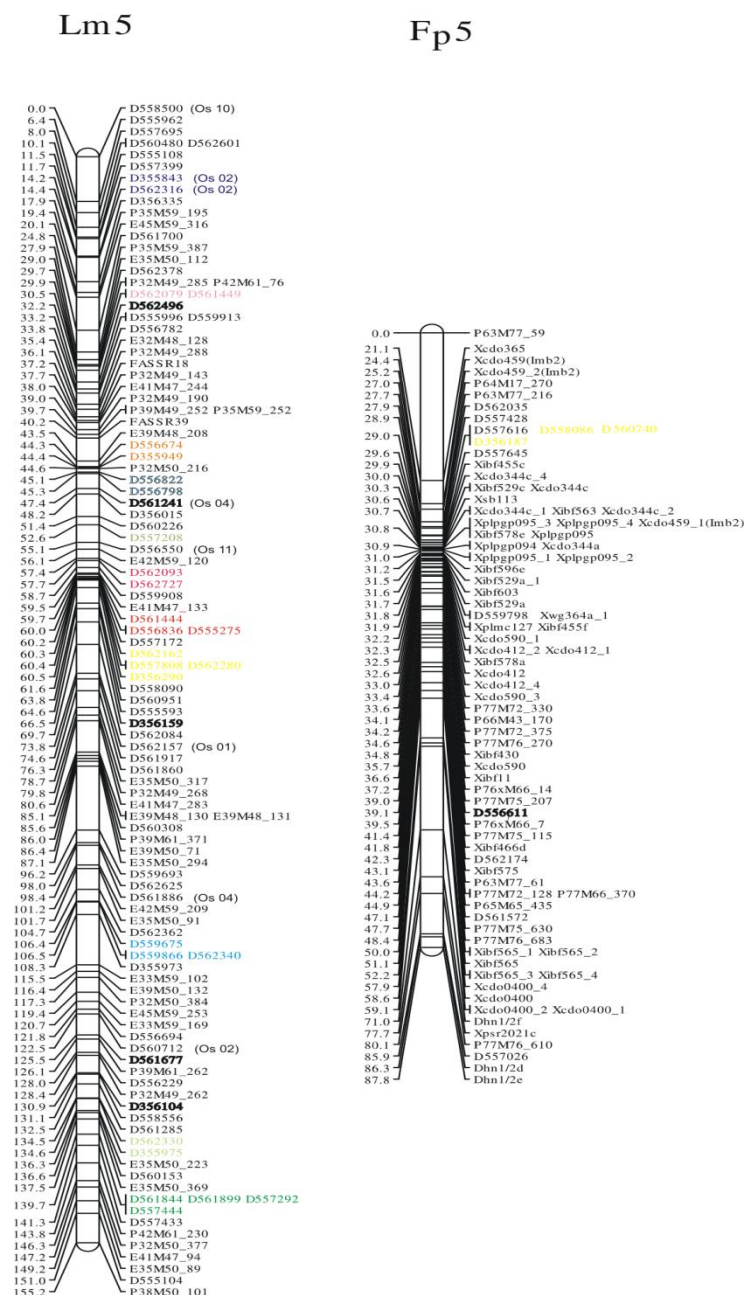
- LB médium (pH 7,2 – 7,4)
 - 10 g/l enzymový kaseinový hydrolyzát
 - 5 g/l kvasničný autolyzát
 - 5 g/l pepton
 - 10 g/l NaCl

- 2YT médium
 - 16 g/l enzymový kaseinový hydrolyzát
 - 10 g/l kvasničný autolyzát
 - 5 g/l NaCl
 - 6 g/l Agar

4.3. Výběr DARt markerů a navržení primerů

Díky vyvinuté DARtFest array pro komplex *Festuca-Lolium* (Kopecký et al. 2009) byly získány DARt markery a bylo třeba vybrat takové, které byly přítomny na genetických mapách jílku mnohokvětého (*L. multiflorum* Lam.) (Obr 3).

Obr. 3 – Ukázka DARt markerů vyznačených na genetické mapě chromozómu č. 5 u kostřavy a jílku. Tučně zvýrazněné DARt markery jsou duplikacemi, barevně zvýrazněné DARt markery jsou repeticemi.



Pro každý chromozóm bylo vybráno 10 DArT markerů z genetické mapy jílku mnohokvětého tak, aby pokrývaly rovnoměrně vždy celý chromozóm. Vybrány byly jen takové markery, které nebyly duplikacemi ani repeticemi. Na základě jejich sekvence byly navrženy primery pomocí počítačového programu Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) tak, aby výsledný produkt byl délky 300 až 500 bp s optimální teplotou nasedání primeru ~58°C a optimální délkou 20 bp.

4.4. Izolace DNA

DNA byla izolovaná pomocí kitu Invisorb® Spin Plant Mini Kit podle návodu výrobce. Rostlinný materiál byl vysušen při teplotě 37°C po dobu 24 hodin v biologickém termostatu. Každých 100 mg takto usušeného rostlinného materiálu bylo homogenizováno pomocí oscilačního mlýna a přeneseno na spin filtry umístěné do 1,5 mililitrových mikrozkušavek. Bylo přidáno 400 µl lyzačního pufru P a 20 µl proteinázy K a vzorek byl inkubován ve vodní lázni při teplotě 65 °C po dobu 30 minut. Poté byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 12 000 otáčkách za vteřinu. Bylo přidáno 20 µl RNázy, byla provedena filtrace, promíchání a inkubace po dobu 10 minut při laboratorní teplotě (RT). Nakonec bylo přidáno 200 µl vazebného pufru P.

Dalším krokem v izolaci DNA bylo promývání. Vzorek byl přenesen na nový spin filtr umístěný v nové 1,5 mililitrové mikrozkušavce. Byla provedena inkubace po dobu 1 minuty a následná 1 minutová centrifugace v předem vychlazené centrifuze při 12 000 otáčkách za vteřinu. Dále bylo přidáno 550 µl pufru I a byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 12 000 otáčkách za vteřinu. Bylo přidáno 550 µl pufru II, byla provedena centrifugace a krok s pufrém I byl zopakován. Centrifugace kvůli odstranění etanolu byla provedena po dobu 2 minut. Posledním krokem byla eluce DNA, kdy bylo ke vzorku přidáno 200 µl elučního pufru D, který byl přehřátý na 65°C, proběhla 3 minutová inkubace a centrifugace při 10 000 otáček za vteřinu po dobu 1 minuty. Koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometru.

4.5. Ověření specifity primerů

U 70 vybraných dvojic primerů bylo třeba ověřit jejich specifitu (zdali vytvoří PCR produkt) pomocí PCR reakce a následné elektroforetické separaci na 1,5% agarózovém gelu. Podmínky PCR reakce jsou popsány v Tab. 1 a Tab. 2. Stejným způsobem probíhalo ověřování specifity nově navrhovaných primerů během celého experimentu.

Tab. 1 – Premix PCR reakce

Chemikálie	Objem v μ l
Creasol red	2
10x PCR pufr	1
10 mM dNTPs	0,2
Taq polymeráza (4 U/ μ l)	0,2
Primer (F+R)	0,2
DNA (10 ng/ml)	2
Destilovaná voda	4,4

Tab. 2 – Průběh PCR reakce k ověření specifity primerů

Pre-denaturace	95°C	5 min	1x
PCR amplifikace	95°C	1 min	25x
	55,58,60°C	2 min	
	72°C	2 min	
Elongace	72°C	10 min	1x

4.6. Sekvenování PCR produktů

Pro sekvenování PCR produktů byl použit BigDye kit. Po ověření specifity primerů byly vybrány jen ty, které vytvořili během PCR reakce DNA produkt u všech čtyř genotypů. U nich byla provedena sekvenační reakce.

Nejdříve bylo třeba přečistit PCR produkty před sekvenační reakcí pomocí tzv. ExoSapu. Do každé jamky 96 jamkové destičky byly přeneseny 3 μ l PCR produktu a byly přidány 4 μ l premixu (3,45 μ l 1xPCR pufru, 0,05 μ l enzymu exonukleáza a 0,5 μ l alkalické fosfatázy). Proběhla inkubace na termocykleru (37°C/30 min, 95°C/5 min).

Takto přečištěné vzorky byly rozděleny na polovinu. K rozděleným vzorkům bylo přidáno 7 μ l premixu (1,5 μ l 5 x sequencing pufru, 1 μ l BigDye, k jedné polovině vzorků F primer a k druhé polovině R primer ve výsledné koncentraci 1 μ M a sterilní voda pro doplnění do celkového objemu 7 μ l). Na termocykleru proběhla sekvenační reakce BigDye (Tab. 3).

Tab. 3 - Průběh sekvenační reakce BigDye

98°C	5 min	60x
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	
60°C	4 min	
4°C	Forever	

Dalším krokem bylo přečištění PCR produktu po sekvenační reakci pomocí Agencourt CleanSEQ kitu. Resuspendované magnetické kuličky Agencourt CleanSEQ byly po 5 μ l přidány ke každému vzorku po sekvenační reakci. Dále se přidal 85% etanol (Tab. 4) a vzniklý roztok se promíchal pomocí pipety, dokud nebyl dostatečně homogenní.

Tab. 4 – Množství 85% etanolu na reakční objem sekvenační reakce

Reakční objem sekvenační reakce v μ l	Objem přidávaného 85% etanolu v μ l
5	31
10	42
15	52
20	62
25	73

Destička se vzorky byla umístěna na magnet Agencourt SPRIPlate, a ponechána stát po dobu 5 minut. Poté byl odpipetován supernatant a bylo provedeno promývání. Nejdříve bylo přidáno do každé jamky se vzorkem 100 μ l 85% etanolu, po 30 vteřinách se etanol odpipetoval a proces se jedenkrát opakoval.

Po druhém odpipetování etanolu se nechaly vzorky vysušit při laboratorní teplotě po dobu přibližně 10 minut. Po vysušení byla přidána sterilní redestilovaná voda o objemu 80 μ l, vzorek byl 5 minut inkubován v laboratorní teplotě a již mimo Agencourt SPRIPlate magnet přenesen do nové destičky.

Přečištěné PCR produkty po sekvenační reakci byly analyzovány na genetickém analyzátoru ABI 3730xl DNA. Pomocí programu DNA Baser v. 2 (Heracle-software, <http://www.DnaBaser.com>) byla sestavena jejich sekvence (ze sekvencí získaných z obou konců daného produktu).

4.7. SNP analýza

Získané sekvence PCR produktů u všech čtyř genotypů byly porovnány pomocí programu Clustal W v softwarovém programu MEGA 4 při standardním nastavení. Výsledkem bylo získání informací o delecích a SNPs mezi jednotlivými genotypy. Toho se následně využilo ke kontrole a optimalizaci analýzy teplotních křivek DNA (HRM) a analýze Single-base extension (SBE).

4.7.1. Analýza teplotních křivek DNA (HRM)

Pro detekci SNPs byla jako první použita metoda HRM. Pro tuto analýzu byly nejdříve použity původní primery a následně byly navrženy nové primery pomocí počítačového programu Primer 3, jelikož bylo třeba získat produkt o menší celkové délce (~100 bp). U původních primerů se délka produktu pohybovala kolem 300 až 400 bp.

Byl připraven premix pomocí kitu Sso Fast™ EvaGreen® (Tab. 5). Byly analyzovány všechny čtyři genotypy kostřavy a jílku (Fp_LAURA, Fp_FURE, Lm_MITOS, Lm_PROLOG), jejichž produkty byly osekvenovány. Dále byly použity další tři genotypy jílků mnohokvětého, odrůda MITOS (Lm MITOS 1, 2, 3), osm rekombinačních linií jílků mnohokvětého nesoucího část chromozómu 7 kostřavy luční (3108, 3626, 3635, 3650, 3659, 3660, 3661, 3662) a tři substituční linie s celým chromozómem kostřavy luční (C_1341, C_1342, C_1348).

DNA byla spolu s premixem napipetována do 96 jamkové MicroAmp destičky a proběhla PCR reakce (Tab. 2). U takto připravených vzorků byla měřena fluorescence v rozmezí 75 – 95°C, přičemž se teplota zvyšovala o 0,1°C každých 10 vteřin. Výsledné údaje byly zpracovány pomocí počítačového programu Melt Analysis™ Software (Bio-Rad)

Tab. 5 – Premix použitý pro analýzu teplotních křivek DNA (HMR)

Chemikálie	Objem v μl
Eva mix	7,5
Primer	0,15
DNA (10 ng/ml)	2,25
Destilovaná voda	5,1

4.7.2. Single-base extension analýza (SBE)

Další metodou pro analýzu SNPs je single-base extension, konkrétně prováděná pomocí SNaPshot™ Kitu. Před vlastní analýzou byla připravena templátová DNA pomocí PCR (Tab. 1 a Tab. 2), následně byla přečištěna reakcí ExoSap. Poté byla připravena SNaPshot pozitivní a negativní kontrolní reakce podle instrukcí výrobce (Tab. 6).

Tab. 6 – Příprava SNaPshot kontrolních reakcí

Chemikálie	Pozitivní kontrola (μl)	Negativní kontrola (μl)
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	5	5
SNaPshot Multiplex Control Primer Mix	1	1
SNaPshot Multiplex Control Template	2	0
Deionizovaná voda	2	4

Dalším krokem byla příprava vlastních SNaPshot reakcí, kdy byly na ledu smíchány SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix spolu s PCR produkty, SNaPshot primery a deionizovanou vodou (Tab. 7). SNaPshot primery byly navrženy tak, aby sledovaný SNP přiléhal k 3' konci primeru. Takto vzniklý premix byl rozdělen po 10 μl do MicroAmp zkumavek a ty pak byly vloženy opět na led. Takto připravené vzorky byly vloženy do termocykleru a prošly teplotními cykly SNaPshot reakce (Tab. 8). Po skončení reakce byla teplota snížena na 4°C. Ke vzorkům z předchozího kroku byla přidána 1 jednotka Shrimp (garnát) alkalické fosfatázy (SAP) a vzorky byly inkubovány po dobu 1 hodiny při 37°C. Enzymy z reakční směsi byly následně deaktivovány inkubací při 75°C po dobu 15 minut a vzorky byly dále uchovány při 4°C.

Tab. 7 – Příprava SNaPshot reakce.

Chemikálie	1 x vzorek (μl)
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	5
Pooled PCR produkt	3
Pooled SNaPshot primery	1
Deionizovaná voda	1

Tab. 8 - Teplotní cykly SNaPshot reakce.

Teplota	Čas	Počet cyklů
96°C	10 sec	25x
50°C	5 sec	
60°C	30 sec	
4°C	For ever	

Po přečištění bylo k 0,5 μl SNaPshot produktů přidáno 9 μl HI-Di formamid, 0,5 μl velikostního standardu GeneScan™ 120 LIZ™. Vzorky byly promíchány, krátce stočeny a dále denaturovány při teplotě 95°C po dobu 5 minut.

Takto upravené vzorky po denuraci byly analyzovány pomocí genetického analyzáru ABI 3730xl DNA a výsledky byly vyhodnoceny pomocí počítačového programu GeneMarker®.

4.8. Zaklonování PCR produktu pomocí TOPO® XL PCR klonovacího kitu

Vzhledem k tomu, že některé vzorky se jeví jako heterozygotní, bylo provedeno zaklonování PCR produktů a sekvenace. Zaklonování PCR produktů proběhlo pomocí klonovacího kitu TOPO® XL PCR dle pokynů výrobce. Ligační směs byla připravena smícháním 0,3 μl vektoru pCR-XL-TOPO s 40 až 50 ng DNA (10 ng/μl) a dále byla inkubována při teplotě 25°C po dobu 5 minut. Do ní bylo poté přidáno 0,6 μl 6x TOPO klonovacího stop roztoku, vzorek byl stočen na mikrocentrifuze a přemístěn na led.

K 0,7 μl připravené ligační směsi bylo přidáno 14 μl elektrokompetentních bakterií *Escherichia coli*. Tato směs byla přenesena do elektroporační kyvety mezi kovové plošky. Byla provedena transformace elektroporátorem (Cell-porator, Life Technologies™) s nastavením 330 až 350 V, 4 kΩ, 330 μF, low Ω.

Tato transformační směs byla následně přenesena zpět z elektroporační kyvety do 1,5 ml mikrozkuřavky s 250 μ l SOC média a byla inkubována na třepačce při teplotě 37°C po dobu 1 hodiny. Po inkubaci bylo přidáno 500 μ l LB média. Pomocí sterilních hokejek byly transformační směsi rozetřeny na předem připravené bakteriální plotny (Bioassay trays 22 x 22; Genetix) s tuhým médiem 2YT médiem, které byly posléze uloženy dnem vzhůru do inkubátoru s teplotou 37°C po dobu 48 hodin, dokud na nich nevyrostly pozitivní kolonie. Ty byly následně pomocí sterilních párátek přeneseny do jamek na 96 jamkové destičce, ve kterých byl již rozdělen premix PCR reakce (Tab. 1). Potom byla provedena PCR reakce, následovaná elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu. Produkty PCR reakce byly sekvenovány na genetickém analyzáru ABI 3730xl DNA.

5. VÝSLEDKY

5.1. Výběr markerů, anotace a navržení sekvencí

Z celkového počtu 7680 DArT markerů bylo 529 markerů zamapováno na genetickou mapu jílku mnohokvětého (*L. multiflorum* Lam.). Z těchto 529 zamapovaných markerů bylo vybráno 70 markerů tak, aby vždy 10 markerů rovnoměrně pokrývalo jeden ze 7 chromozómů po celé jeho délce. Z vybraných 70 DArT markerů byly navrženy primery, které byly objednány a použity v dalších krocích.

5.2. Izolace DNA

Z vysušeného rostlinného materiálu byla získána DNA všech čtyř genotypů a byla změřena její koncentrace pomocí spektrofotometru (Tab. 9). Vzhledem k objemu, do kterého byla DNA eluována (200 μ l), bylo u všech genotypů získáno dostatečné množství DNA pro všechny analýzy.

Tab. 9 – Koncentrace vyizolované DNA naměřená pomocí spektrofotometru.

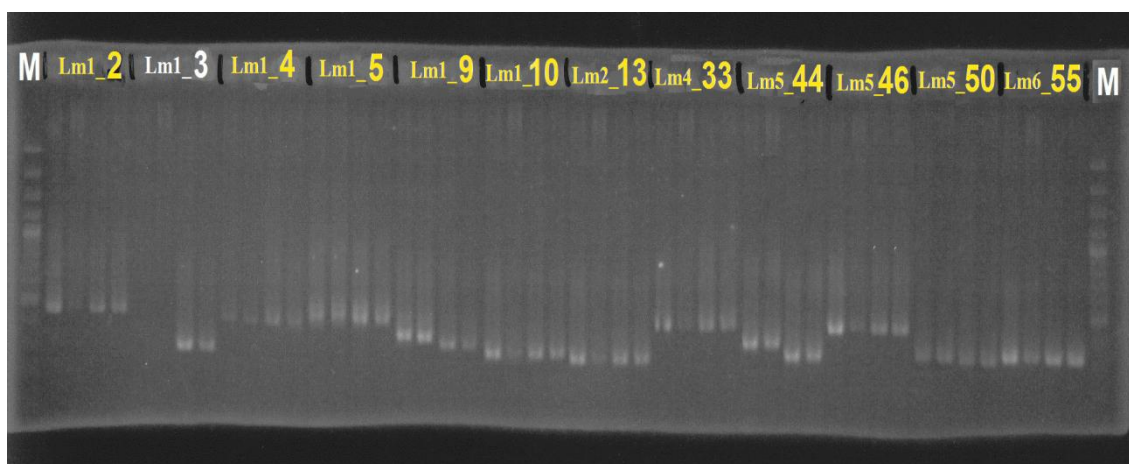
Rostlina, genotyp	Koncentrace DNA v ng/ μ l
<i>Festuca pratensis</i> LAURA	282,25
<i>Festuca pratensis</i> FURE	60,1
<i>Lolium perenne</i> MITOS	198,27
<i>Lolium perenne</i> PROLOG	199,3

5.3. Ověření specifity primerů

Bylo navrženo 70 dvojic primerů, které byly použity při PCR reakcích s DNA všech čtyř genotypů (Obr. 4). DNA produkt u všech čtyř genotypů byl získán u 29 ze 70 (41 %) dvojic primerů (Tab. 10). V pěti případech (7 %) nebyl získán produkt pro žádný z genotypů. Výsledky amplifikace daných lokusů jsou shrnuty

na Obr. 5. Pro další využití byly vybrány jen ty primery, které amplifikovaly DNA produkty u všech čtyř genotypů.

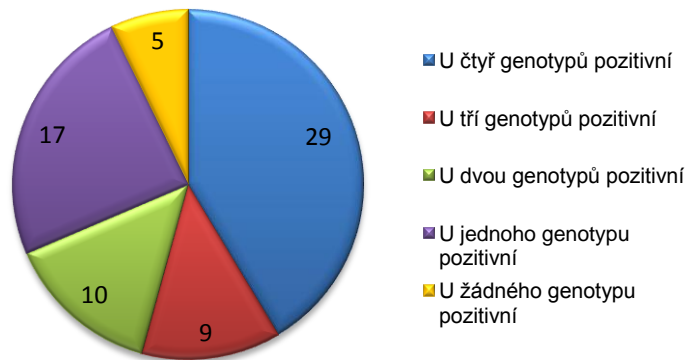
Obr. 4 – Příklad produktů amplifikace po elektroforetické separaci na 1,5% agarózovém gelu, vytvořených pomocí primer setů Lm1_2 , Lm1_3, Lm1_4, Lm1_5, Lm1_9, Lm1_10, Lm2_13, Lm4_33, Lm5_44, Lm5_46, Lm5_50 a Lm6_55 (M = Quick-Load® 100 bp DNA Ladder). Primery amplifikující DNA produkt všech čtyř genotypů jsou zvýrazněny žlutou barvou.



Tab. 10 – Konkrétní primery amplifikující DNA produkty všech čtyř použitých genotypů.

Primer amplifikující DNA produkt všech čtyř genotypů	DArT marker	LG	Primer amplifikující DNA produkt všech čtyř genotypů	DArT marker	LG
Lm1_2	555505	Lm1	Lm4_35	559734	Lm4
Lm1_4	561021	Lm1	Lm4_38	356397	Lm4
Lm1_5	562432	Lm1	Lm5_44	555996	Lm5
Lm1_9	560659	Lm1	Lm5_46	557172	Lm5
Lm1_10	558668	Lm1	Lm5_50	560153	Lm5
Lm2_13	557403	Lm2	Lm6_55	556542	Lm6
Lm2_16	356211	Lm2	Lm6_56	557966	Lm6
Lm2_20	355701	Lm2	Lm6_57	560359	Lm6
Lm3_21	561745	Lm3	Lm6_59	557419	Lm6
Lm3_23	557585	Lm3	Lm7_63	560247	Lm7
Lm3_26	562424	Lm3	Lm7_64	560268	Lm7
Lm3_28	560605	Lm3	Lm7_65	559867	Lm7
Lm3_30	557112	Lm3	Lm7_66	561977	Lm7
Lm4_32	557849	Lm4	Lm7_68	556838	Lm7
Lm4_33	561092	Lm4			

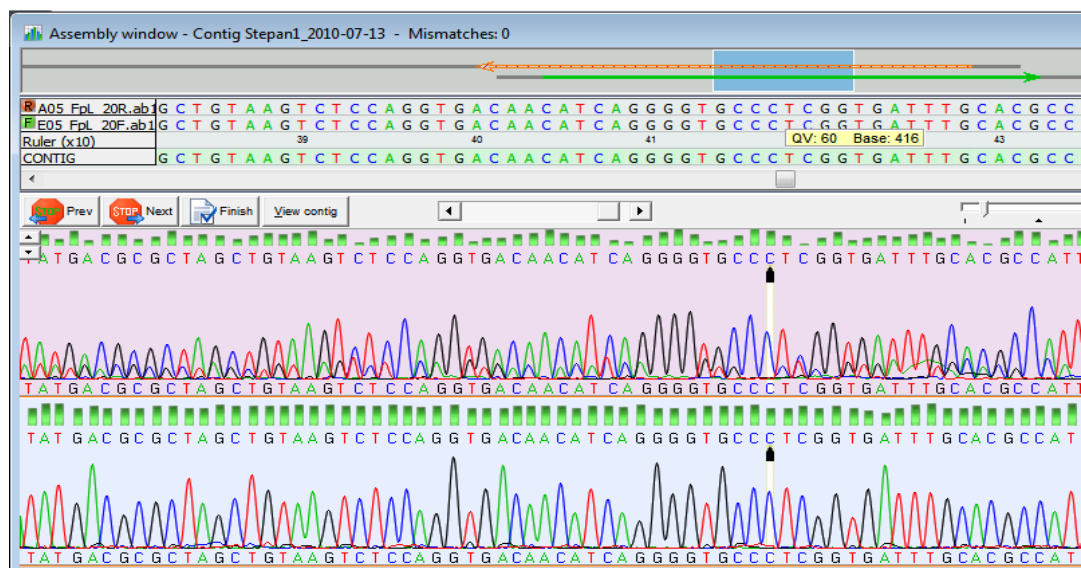
Obr. 5 – Specifita primerů



5.4. Sekvence PCR produktů

DNA produkty získané PCR reakcí byly sekvenovány (pomocí primerů forward i reverse) a pomocí počítačového programu DNA Baser v. 2 byly sekvence získané z obou konců spojeny do kontigů (Obr. 6). U devíti dvojic primerů (Lm2_20, Lm3_21, Lm3_28, Lm3_30, Lm5_46, Lm6_56, Lm7_64, Lm7_66 a Lm7_68) se podařilo získat sekvenci ze všech čtyř genotypů. V dalších analýzách byly použity právě tyto markery.

Obr. 6 – Část sekvence contigu DNA produktů primerů Lm2_20R a Lm2_20F.



Tab. 11 – Přesná data analýzy teplotních křivek DNA (HRM) u primer setu Lm3_21. Červeně jsou uvedeny genotypy jílku, zeleně genotypy kostřavy a fialově genotypy jejich kříženců.

Vzorek	Cluster	Percent Confidence	Vzorek	Cluster	Percent Confidence
Fp_Laura	Cluster 1	97.9	Lm_Mitos	Cluster 1	98.1
Fp_Fure	Cluster 1	97.3	Lm_Mitos2	Cluster 1	98.9
Lm_Prolog	Cluster 1	99.6	Lm_Mitos3	Cluster 1	98.2
3108	Cluster 1	98.8	3650	Cluster 2	98.1
3661	Cluster 1	99.6	3659	Cluster 2	98.6
3662	Cluster 1	98.2	Lm_Mitos1	Cluster 2	97.9
C_1341	Cluster 1	98.0	3626	Cluster 3	98.5
C_1342	Cluster 1	99.2	3635	Cluster 3	99.0
C_1348	Cluster 1	98.7	3660	Cluster 3	100.0

Pro další analýzy byly proto navrženy nové primery (Tab. 12) tak, aby byl jejich výsledný produkt kratší (~100 bp) a obsahoval nejmenší možné množství polymorfismů. I v tomto případě však výsledné teplotní křivky nepotvrdily polymorfismy pozorované na základě sekvencí. Do stejného clusteru se zařadily opět genotypy kostřavy i jílku (Tab. 13), a to i přes omezení teplotního intervalu (Obr. 9). Tato metoda se tak ukázala jako nevhodná pro identifikaci SNPs mezi oběma druhy.

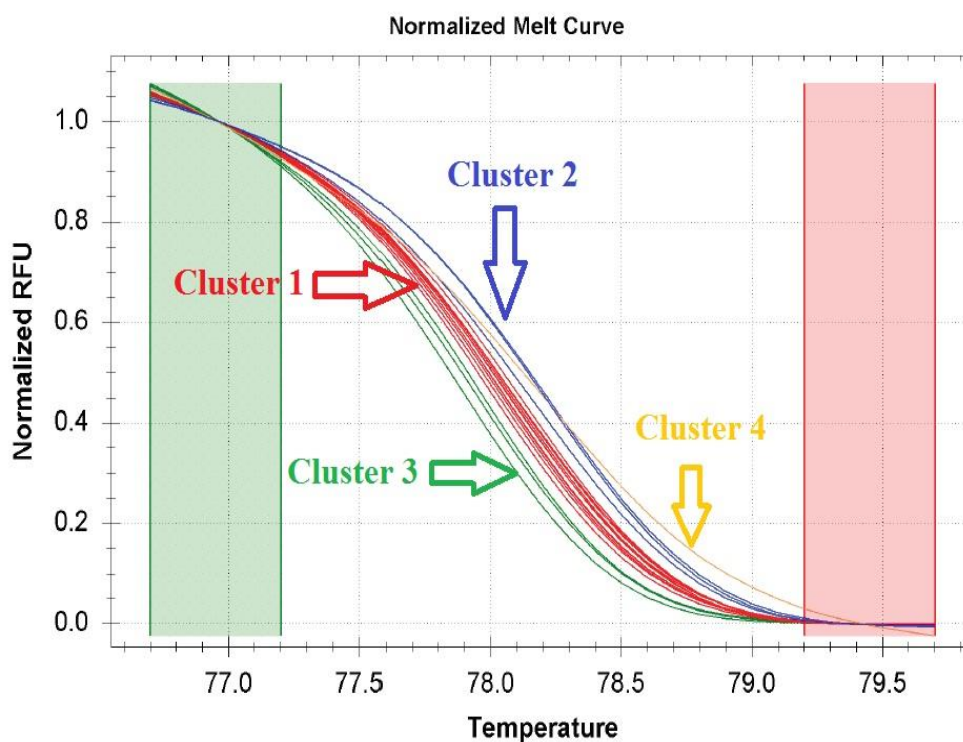
Tab. 12 - Primery navržené pro HRM reakce.

Název primer		sekvence primeru
Lm5_46S	L	CAGGTGAAGTGCATATAGTCATGT
	R	TCCGTATGAATTGCCAGT
Lm6_56S	L	GCTCCGTAGCTTCCTGTG
	R	TGAAATGTGGATGGTACAGGT
Lm7_64S	L	AGAGGAAAAGCGAAGAGGAG
	R	GCACCAGCACATAACTCCAT

Tab. 13 – Přesná data analýzy teplotních křivek DNA (HRM) u primeru Lm5_46S. Červeně jsou uvedeny genotypy jílku, zeleně genotypy košťavy a fialově genotypy jejich kříženců.

Vzorek	Cluster Percent	Confidence	Vzorek	Cluster Percent	Confidence
Lm_Prolog	Cluster 1	92.0	3662	Cluster 1	99.7
Lm_Mitos	Cluster 1	99.5	C_1348	Cluster 1	99.7
Lm_Mitos1	Cluster 1	96.8	3659	Cluster 2	99.6
Lm_Mitos3	Cluster 1	99.3	C_1341	Cluster 2	96.5
3108	Cluster 1	98.1	C_1342	Cluster 2	98.6
3626	Cluster 1	98.8	Fp_Laura	Cluster 3	99.1
3635	Cluster 1	99.8	Lm_Mitos2	Cluster 3	87.6
3661	Cluster 1	95.2	3660	Cluster 3	99.6
3650	Cluster 1	99.4	Fp_Fure	Cluster 4	100.0

Obr. 9 – Normalizované teplotní křivky při použití primeru Lm5_46S s omezením teplotního intervalu (77,2 – 79,2 °C).



5.5.2. Single-base extension analýza

Detekce SNPs metodou SBE byla provedena pomocí ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kitu, následně s použitím genetického analyzáru ABI 3730xl DNA. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu GeneMarker®.

K single-base extension analýze byly navrženy nové primery, které při SNaPshot reakci nasedají na templátovou DNA na místech bez SNPs tak, aby právě první prodlužující značený dideoxynukleotid byl na místě druhově specifického SNP. Ze získaných sekvencí bylo možno navrhnout primery splňující tyto podmínky jen ve čtyřech případech (Tab. 14).

Tab. 14 – Primery navržené pro SNaPshot reakce.

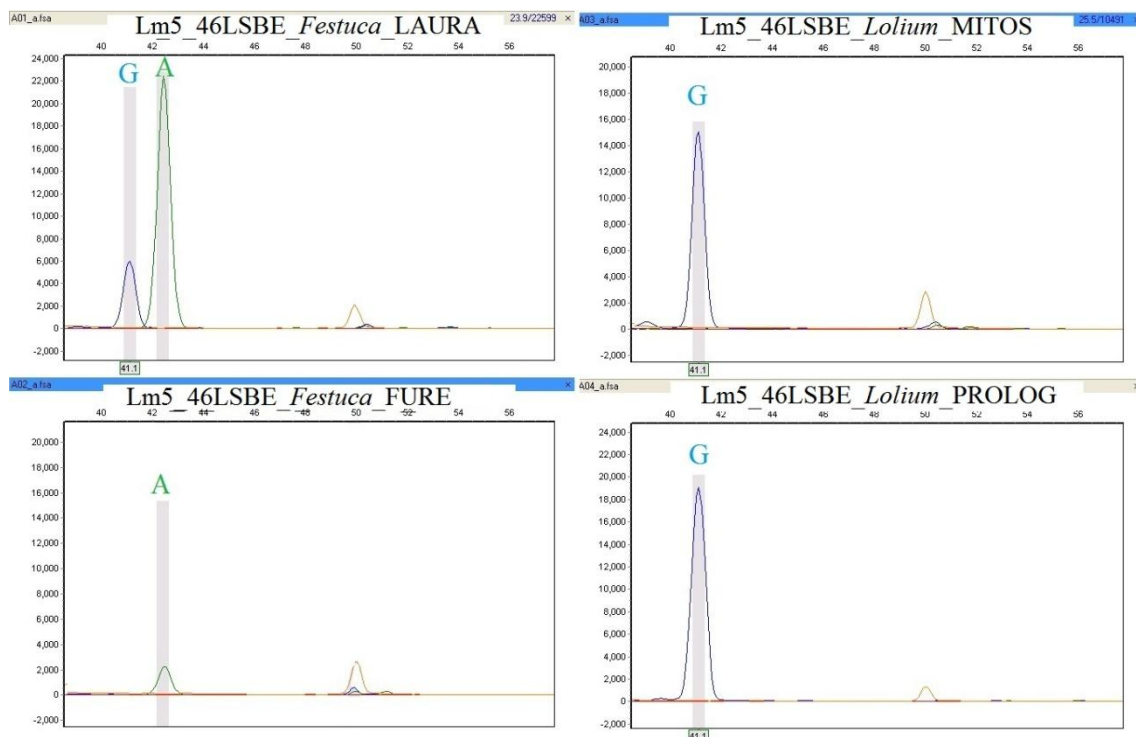
Název primeru	Sekvence 5' - 3'
Lm5_46LSBE	TGGTAACATACAAAGGTGATAGTAAGAG
Lm6_56LSBE	GTACCATCCACATTTCAAGAGTATAAT
Lm7_64LSBE	ATGTTTTTCTCTTCTCTGGGGAT
Lm7_68LSBE	TCATCATGTCTGTAGAAAGCATCAT

V případě markeru Lm5_46LSBE byl u dvou genotypů *L. multiflorum* pozorován jeden pík odpovídající nukleotidu A. V případě *F. pratensis* byl u genotypu FURE detekován pík odpovídající G a v případě genotypu LAURA byly pozorovány dva píky odpovídající jak G tak A (Obr. 10).

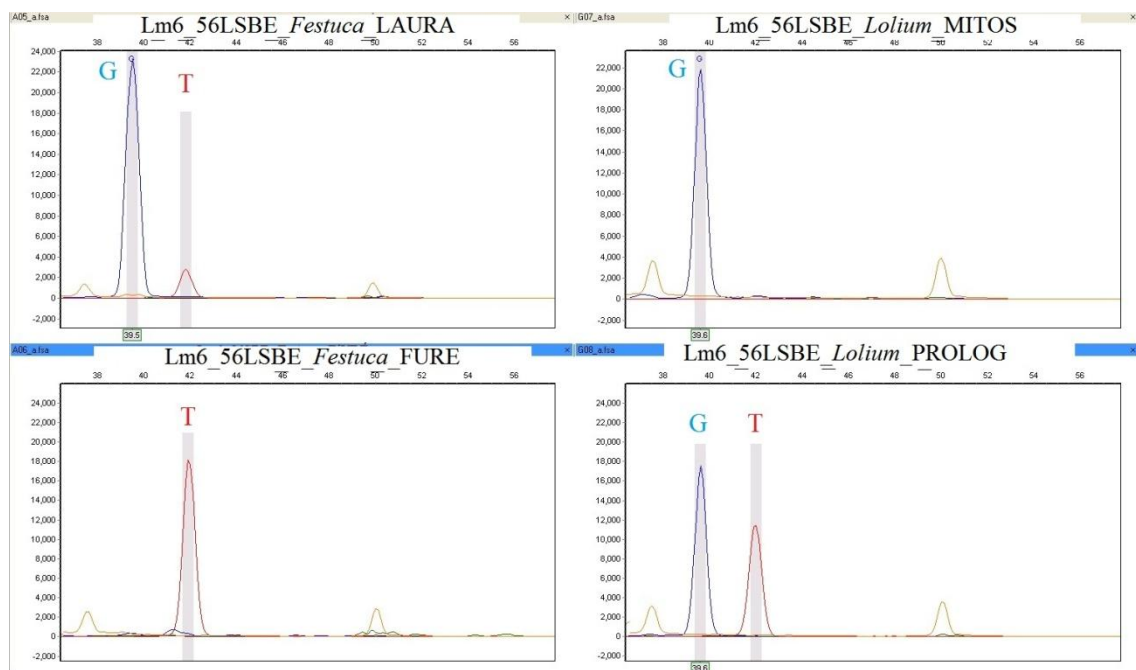
U markeru Lm6_56LSBE byly u *F. pratensis* genotypu LAURA detekovány dva píky odpovídající G a T. U genotypu FURE byl pozorován jeden pík odpovídající T. V případě *L. multiflorum* byl u genotypu MITOS detekován jeden pík odpovídající G. U genotypu PROLOG byly detekovány dva píky odpovídající G a T (Obr. 11).

V případě primeru Lm7_64LSBE byly pozorovány u obou genotypů *F. pratensis* dva píky odpovídající G a A. U obou genotypů *L. multiflorum* byl lokalizován jeden pík odpovídající G (Obr. 12). U primeru Lm7_68LSBE byly u obou genotypů *F. pratensis* detekovány dva píky odpovídající G a A. U obou genotypů *L. multiflorum* byl pozorován jeden pík odpovídající G. (Obr. 13).

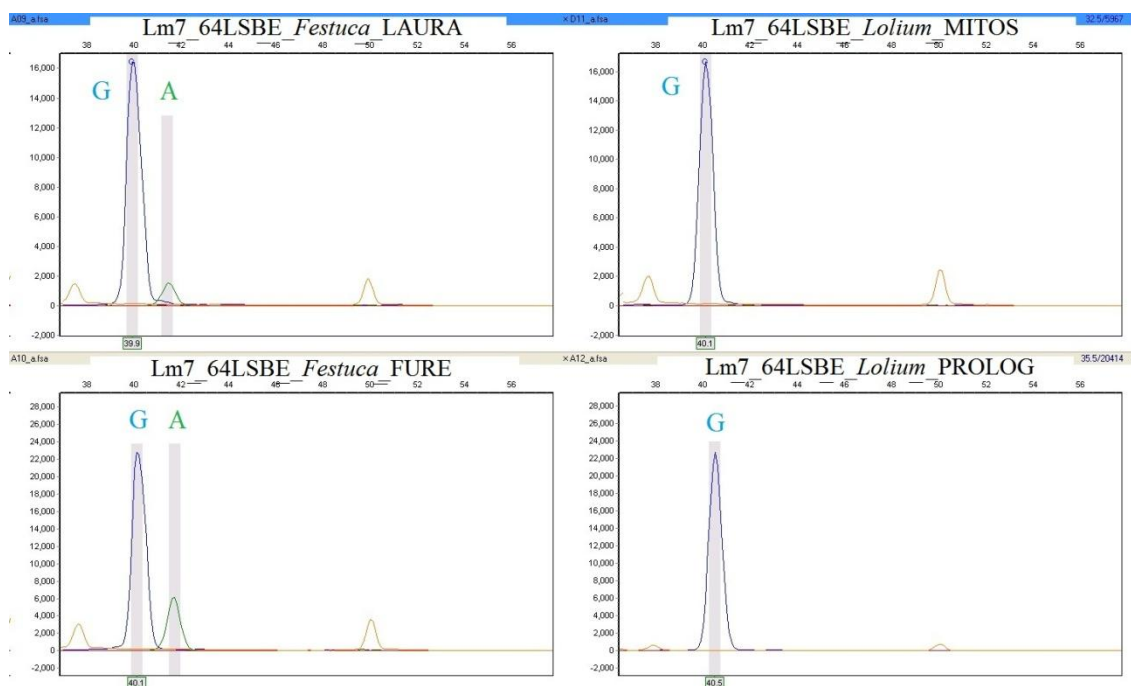
Obr. 10 – SNaPshot analýza produktu primeru Lm5_46LSBE



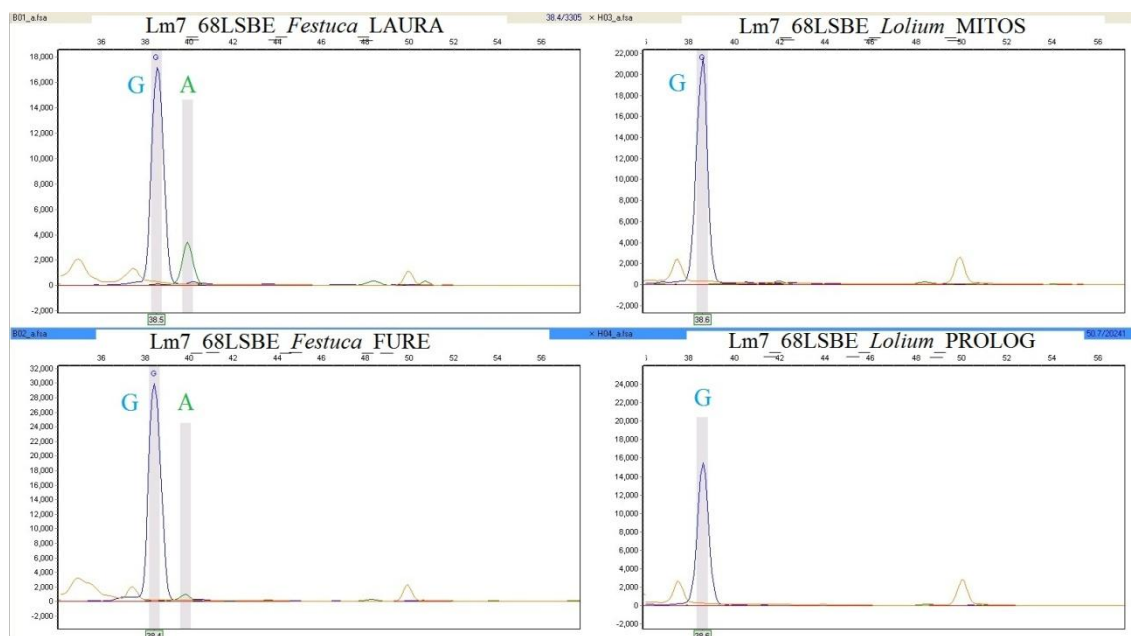
Obr. 11 – SNaPshot analýza produktu primeru Lm6_56LSBE



Obr. 12 – SNaPshot analýza produktu primeru Lm7_64LSBE

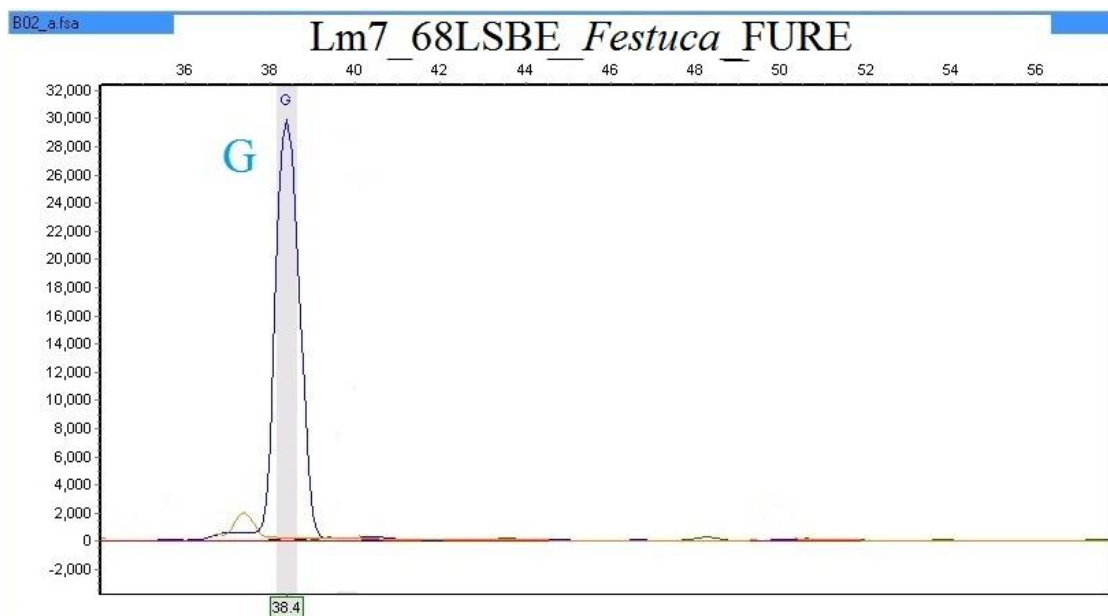


Obr. 13 – SNaPshot analýza produktu primeru Lm7_68LSBE



SNaPshot reakce byla znovu provedena u primerů Lm7_64LSBE a Lm7_68LSBE. Nové výsledky u primeru Lm7_64LSBE potvrdily předchozí analýzu. V případě primeru Lm7_68LSBE u genotypu FURE *F. pratensis* byl pozorován pouze jeden pík odpovídající G (Obr. 14).

Obr. 14 – Druhá SNaPshot analýza produktu primeru Lm7_68LSBE u genotypu *F. pratensis* FURE



5.6. Zaklonování PCR produktu pomocí TOPO® XL PCR klonovacího kitu

Metoda SBE v několika případech detekovala v místech druhově specifických SNPs přítomnost dvou možných nukleotidů, což naznačovalo, že by dané vzorky mohly být v daných SNPs heterozygotní. Ke zjištění, zda se jedná o heterozygoty nebo homozygoty, byla použita sekvenace. PCR produkty byly zaklonovány do kompetentních buněk TOP10 OR pomocí TOPO® XL PCR klonovacího kitu. Poté byly přeneseny na bakteriální plotny, kde přes noc vyrostly pozitivní kolonie. Pro každý genotyp a primer set bylo vybráno 10 kolonií.

Byla provedena PCR reakce a získané DNA produkty byly sekvenovány. Sekvence DNA produktu dvojice primeru Lm3_46 u genotypu *Festuca* LAURA vykazoval z 86 % přítomnost adeninu a ze 14 % přítomnost guaninu v daném SNP. Přítomností druhého nukleotidu nelze vyloučit, že genotyp *Festuca* LAURA v Lm3_46 SNP není heterozygotní. Obdobný výsledek byl i u DNA produktu dvojice primeru

Lm6_56 u genotypu *Festuca LAURA*, kdy z 89 % byl v místě SNP přítomen guanin a z 11 % thymin. Nelze tedy vyloučit, že genotyp *Festuca LAURA* v Lm6_56 SNP není heterozygotní. DNA produkt stejné dvojice primeru u genotypu *Lolium PROLOG* vykazoval 50% přítomnost thyminu a guaninu zároveň. Genotyp *Lolium PROLOG* je v Lm6_56 SNP heterozygotní. U sekvencí DNA produktů, získaných pomocí dvojice primerů Lm7_64 (*Festuca FURE* a *Festuca LAURA*) a Lm7_68 (*Festuca LAURA*), byl přítomen ve 100 % případů guanin. Oba genotypy nejsou v Lm7_64 SNP a Lm7_68 SNP heterozygotní.

6. DISKUZE

6.1. Identifikace kříženců pomocí analýzy jedno-nukleotidových polymorfismů (SNPs)

Rody *Lolium* a *Festuca* jsou nejdůležitější pícní traviny pro evropské zemědělství. Oba rody se mezi sebou snadno kříží a dvojice jejich homeologních chromozómů spolu rekombinují s vysokou frekvencí, to umožnilo vzniku mezirodovým křížencům s jejich doplňujícími se vlastnostmi (Humphreys et al., 1997), tzv. Festulolium. Od té doby bylo po celém světě vyprodukováno mnoho úspěšných komerčních kříženců Festulolium, kteří se využívají po celém světě, a roste jejich ekonomický význam. I přes to je znalost genomické struktury těchto kříženců malá. Prvními metodami, které umožnily analýzu mezirodových kříženců, byly metody FISH a GISH (Kopecký et al., 2008). Dnes se k identifikaci kříženců častěji využívají především molekulární markery a do popředí se dostávají SNPs markery, které se vyskytují hojně napříč celým genomem (Kwok 2001). Technologie detekce SNP byla původně nákladná a časově náročná, ale postupem času se vyvinula v automatizovatelnou, účinnou a relativně levnou metodu detekce DNA markerů (Kwok a Chen, 2003)

Cílem této práce bylo získat 70 SNPs markerů rovnoměrně rozložených na každém ze sedmi chromozómů *L. multiflorum* (10 markerů na každém chromozómu) a tyto SNPs detekovat pomocí metod analýzy teplotních křivek DNA (HRM) a Single-base extension (SBE). To by umožnilo rychle a levně detekovat genomové složení mezirodových kříženců *Festuca* × *Lolium*. Zvýšila by se tím výrazně znalost o struktuře jejich genomů. V konečném důsledku by tato metodika mohla výrazně zefektivnit a urychlit proces selekce během šlechtění nových odrůd.

6.1.1. Metoda analýzy teplotních křivek DNA (HRM)

V této práci byla metoda HRM použita k detekci druhově specifických SNPs u dvou genotypů rodu jílku a kostřavy za účelem identifikace rodičovských genomů v křížencích. K detekci SNPs byla metoda HRM již dříve použita pro detekci SNPs, SSR markerů a INDELS u *L. perenne* L. (Studer et al., 2009).

V této práci však metoda HRM nepotvrdila přítomnost SNPs, které byly předem detekovány porovnáním získaných sekvencí. Do vzniklých clusterů se sdružovaly vzorky z obou rodů i přes přítomný polymorfismus. Proto byly navrženy nové primery zkracující délku produktu (~100 bp). Přesto ani analýza s novými primery nedokázala detekovat jednotlivé SNPs. Z tohoto hlediska se metoda ukázala být neúspěšná pro identifikaci SNPs mezi oběma rody. V dalších experimentech by bylo vhodné nově navrhnout primery tak, aby jejich výsledný produkt byl kratší než námi generovaný (~100 bp). Délka produktu by se podle Studera et al., (2009) měla pohybovat ~ 43 bp s délkou primeru od 18 do 24 bp a teplotou nasedání v rozmezí 57 až 61 °C. Tím by mohly být eliminovány možné chyby, které vznikají při analyzování delších vláken.

6.1.2. Metoda analýzy Single-base extension (SBE)

Další z použitých metod detekce SNPs byla metoda Single-base extension (SBE). V práci Hand et al., (2008) bylo z jedenácti TrZPT2 SNPs pomocí SBE úspěšně detekováno sedm (64 %), které ukazovaly segregaci F1 generací rodu *Trifolium* spp. Studie je podle autorů široce použitelná na celou řadu allopolyploidních taxonů. Výsledky potvrzuje i předkládaná práce, kde se prokázalo, že metoda SBE je vhodná pro identifikaci SNPs mezi rody jílku a kostřavy. U čtyř analyzovaných genotypů bylo s pomocí dvou (50 %) speciálně navržených primerů (Lm5_46LSBE a Lm6_56LSBE) možno úspěšně detekovat SNPs markery. Díky tomu bylo možné určit, zda daný marker v daném kříženci pochází z kostřavy nebo jílku.

V našem případě bylo hodnocení komplikováno detekcí sekundárních píků, které indikovaly, že testované genotypy jsou v daném SNP heterozygotní. Z tohoto důvodu, bylo provedeno zaklonování PCR produktů testovaných genotypů pomocí TOPO® XL PCR klonovacím kitem. Sekvenací PCR produktu byla potvrzena heterozygotnost v Lm6_56 SNP u genotypu *L. multiflorum* PROLOG. U genotypu *Festuca* LAURA v Lm3_46 SNP a Lm6_56 SNP nebylo možné heterozygotnost vyloučit. V ostatních případech byla přítomnost heterozygotnosti vyvrácena. Metoda SBE se tak ukázala jako nadějná k identifikaci druhově specifických SNPs u jílku a kostřav a tudíž k podrobným studiím struktury hybridních genomů. K širšímu využití této metody pro tyto účely by bylo ale nezbytné získat velké množství SNPs a vyselektovat pouze takové, které bude možné úspěšně detekovat. Pouze větší množství druhově specifických SNPs

rovnoměrně rozložených po genomu by nám mohlo zajistit detailnější pohled na strukturu hybridních genomů.

7. ZÁVĚR

Cílem předkládané práce bylo identifikovat druhově specifické SNPs a otestovat metodu vhodnou k jejich detekci. To by v dlouhodobém horizontu významně prohloubilo znalost o struktuře hybridních genomů. V práci bylo vybráno celkem 70 SNPs markerů rovnoměrně rozložených na každém ze sedmi chromozómů jílku mnohokvětého (10 SNPs na každém chromozómu).

Druhově specifické SNPs byly identifikovány na základě sekvenování PCR produktů při použití primerů odvozených z DArT markerů zamapovaných na genetické mapě jílku mnohokvětého. Porovnáním jejich sekvence byly tyto druhově specifické SNPs identifikovány. Pro rychlou a spolehlivou detekci těchto SNPs byly testovány dvě metody: analýza teplotních křivek (HRM) a Single-base extension (SBE).

Metoda HRM byla neúspěšná i přes navržení nových primerů, které velikost analyzovaných DNA produktů zkracovaly na cca 100 bp, což mělo pomoci zpřesnit analýzu. Vytvořené clusterly ale nedokázaly postihnout přítomný polymorfismus mezi jednotlivými genotypy. Metoda by mohla mít uplatnění v daném tématu při dalším omezení velikosti PCR produktů, které by obsahovaly vždy pouze jeden SNP. Toto opatření by mělo dále zpřesnit výsledné údaje a zamezit seskupování genotypů do jednoho clusteru.

Data získaná metodou SBE prokázaly potenciál této metody pro studium struktury genomu mezirodových kříženců *Festuca* × *Lolium*. Pro širší využití by však bylo třeba získat větší množství druhově specifických SNP markerů, které by byly rovnoměrně rozmístěny na všech 7 chromozómech.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	adenin
AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (<i>amplified fragment length polymorphism</i>)
BC1	první generace vzniklá zpětným křížením
BC2	druhá generace vzniklá zpětným křížením
bp	páry bází (<i>base pairs</i>)
C	cytosin
DArT	Diversity Arrays Technology
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
dsDNA	dvojřetězcová DNA
F1	první filiální generace
F2	druhá filiální generace
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
G	guanin
Gbp	miliardy párů bází (<i>giga base pairs</i>)
GISH	genomová <i>in situ</i> hybridizace
INDELS	inzerce a delece (<i>insertions and deletions</i>)
ITS	vnitřní transkribovaný mezerník (<i>internal transcribed spacer</i>)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
RAPD	náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA (<i>randomly amplified polymorphic DNA</i>)
RFLP	délkový polymorfismus restričních fragmentů (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RT	pokojobá (laboratorní) teplota (<i>room temperatur</i>)
SFP	Jedno-bodový polymorfismus (<i>single feature polymorphism</i>)
SNPs	jednonukleotidový polymorfismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SBE	Single-base extension
SSRs	jednoduché opakující se sekvence (<i>simple sequence repeat</i>), mikrosatelity

T	thymin
T _a	teplota nasedání primeru (<i>annealing temperature</i>)
T _m	teplota tání (<i>melting temperature</i>)
trnL-F	vnitřní mezerník (<i>intergenic spacer</i>)

9. POUŽITÁ LITERATURA

Bartoš J., Sandve R. S., Kölliker R., Kopecký D., Christelová P., Stočes Š., Østrem L., Larsen A., Killian A., Rognli A. O., Doležel J. (2011) Genetic mapping of DArT markers in the *Festuca–Lolium* complex and their use in freezing tolerance association analysis. *Theor. Appl. Genet.* 122(6):1133-47.

Bennett M., Leitch I. (2005) Nuclear DNA amounts in angiosperms: Progress, problems and prospects. *Annals of Botany* 95:45-90.

Bernat M., Titos E., Clària J. (2002) Rapid identification of single nucleotide polymorphisms by fluorescence-based capillary electrophoresis. *Genet. Mol. Res.* 1:72-78.

Catalàn P., Torrecilla P., Rodríguez J. A. L., Olmstead R. G. (2004) Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe Loliinae and allies (Poeae, Pooideae) inferred from ITS and trnL-F sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 31(2):517-41.

Clayton W. D., Renvoize S. A. (1986) *Genera graminum: Grasses of the World*. Kew Bull, Add Ser 13: 1–389.

Eizenga G. C. and Buckner R. C. (1986) Cytological and isozyme Evaluation of Tall Fescue × Italian Ryegrass Hybrids. *Plant Breeding* 97, 340-344.

Erali M., Voelkerding V. K., Wittwer T. C. High Resolution Melting Applications for Clinical Laboratory Medicine. *Exp Mol Pathol.* 85(1): 50–58.

Gundry N. C., Dobrowolski F. S., Martin R. Y., Robbins T. C., Nay M. L., Boyd N., Coyne T., Wall D. M., Wittwer T. C., Teng H.-F. D. (2008) Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons. *Nucleic Acids Research* 36 (10): 3401-3408.

Giusto D., King G. C. (2003) Single base extension (SBE) with proofreading polymerases and phosphorothioate primers: improved fidelity in single-substrate assays. *Nucleic Acids Res.* 1;31(3):e7.

Hackel E. (1882) *Monographia Festucarum Europearum*. Theodor Fischer, Kassel et Berlin.

Hand L. M., Cogan O. N., Stewart V. A., Forster W. J. (2010) Evolutionary history of tall fescue morphotypes inferred from molecular phylogenetics of the *Lolium-Festuca* species complex. *BMC Evolutionary Biology* 10:303.

Hand L. M., Ponting R. C., Drayton M. C., Lawless K. A., Cogan N. O. I., Brummer E. CH., Sawbridge T. I., Spangenberg G. C., Smith K. F. and Forster J. W. (2008) Identification of homologous, homoeologous and paralogous sequence variants in an outbreeding allopolyploid species based on comparison with progenitor taxa. *Mol Genet Genomics* 280: 293-304.

Hao da C., Huang B. L., Chen S. L., Mu J. (2009) Evolution of the chloroplast *trnL* - *trnF* region in the gymnosperm lineages Taxaceae and Cephalotaxaceae. *Biochem. Genet.* 47(5-6):351-69.

Humphreys M. W., Thomas H. M., Morgan W. G. (1995) Discriminating the ancestral progenitors of hexaploid *Festuca arundinacea* using genomic in situ hybridization. *Heredity* 75: 171–174.

Humphreys M. W., Thomas H. M., Harper J., Morgan M., James A., Zare A. G. (1997) Dissecting drought- and cold-tolerance traits in the *Lolium-Festuca* complex by introgression mapping. *New Phytol* 137: 55–60.

Charmet G., Balfourier F. (1994) Izozyme variation and species relationships in the genus *Lolium* L. (ryegrasses, Graminaceae). *Theor Appl Genet* 87:641-649.

Charmet G., Ravel C., Balfourier F. (1997) Phylogenetic analysis in the *Festuca-Lolium* complex using molecular markers and ITS rDNA. TAG Theoretical and Applied Genetics 94(8):1038.

Chen C. a Sleper D. A. (1999) FISH and RFLP Marker-Assisted Introgression of *Festuca mairei* Chromosomes into *Lolium perenne*. Crop Sci. 39:1676-1679.

Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A. (2001) Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. Nucleic Acids Res. 15;29(4):E25

Jeong H. J., Jo Y. D., Park S. W., Kang B. C. (2010) Identification of Capsicum species using SNP markers based on high resolution melting analysis. Genome. 53(12):1029-40.

Kerlan M. C., Ghesquière M. (1997) Use of Flow Cytometer in breeding *Festuca X Lolium* Hybrids. Conventional and Novel Methodologies for Plant Improvement, ID NO. 857

Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Nakashima H., Koike T. (2010) Genotyping and mapping assay of single-nucleotide polymorphisms in CYP3A5 using DNA-binding zinc(II) complexes. Clin Biochem. 43(3):302-6.

Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Koike T. (2009) Phosphate-affinity polyacrylamide gel electrophoresis for SNP genotyping. Methods Mol Biol. 578:183-92.

Kopecký D., Bartoš J., Christelová P., Černoch V., Kilian A., Doležel J. (2011) Genomic constitution of *Festuca x Lolium* hybrids revealed by the DArTFest array. Theor Appl Genet 122: 355-363.

Kopecký D., Bartoš J., Lukaszewski A. J., Baird J. H., Černoch V., Kölliker R., Rogli A. O., Blois H., Caig V., Lübberstedt T., Studer B., Shaw P., Doležel J., Kilian A. (2009) Development and mapping of DArT markers within the *Festuca - Lolium* complex. BMC Genomics 10:473.

- Kopecký D., Havránková M., Loureiro J., Castro S., Lukaszewski A. J., Bartoš J., Kopecká J., Doležel J. (2010) Physical distribution of homoeologous recombination in individual chromosomes of *Festuca pratensis* in *Lolium multiflorum*. *Cytogenetic and genome research* 129: 162-172, 2010
- Kopecký D., Loureiro J., Zwierzykowski Z., Chesquière M., Doležel J. (2006) Genome constitution and evolution in *Lolium X Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). *Theor Appl Genet* 113:731–742.
- Kopecký D., Lukaszewski A. J., Doležel J. (2005) Genomic constitution of Festulolium cultivars released in the Czech Republic. *Plant Breeding* 124, 454—458
- Kopecký D., Lukaszewski A. J., Doležel J. (2008) Cytogenetics of Festulolium (*Festuca X Lolium* hybrids). *Cytogenet Genome Res* 120, 370-383.
- Kosmala A., Skibińska M., Zwierzykowski Z., Humphreys M. W., Rapacz M. and Jokš W. (2003) Introgression of genes for abiotic stress resistance from *Festuca pratensis* and *F. arundinacea* into *Lolium multiflorum* germplasm. *Votr. Pflanzenzüchtg* 59: 225-231.
- Kölliker R., Stadelmann F. J., Reidy B. and Nösberger J. (1999) genetic variability of forage grass cultivars: A comparison of *Festuca pratensis* Huds., *Lolium perenne* L., and *Dactylis glomera* L. *Euphytica* 106: 261-270.
- Ksiazczyk T., Taciak M., Zwierzykowski Z. (2010) Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH. *J Appl Genet.* 51(4):449-60.
- Kwok P. Y. (2001) Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:235–258.
- Kwok P. Y., Chen X. (2003) Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol* 5:43–60.

- Langdon T., Thomas A., Huang L., Farrar K., King J., Armstead I. (2009) Fragments of the key flowering gene *GIGANTEA* are associated with helitron-type sequences in the Pooideae grass *Lolium perenne*. *BMC Plant Biology* 9:70.
- Li Y. D., Chu Z. Z., Liu X. G., Jing H. C., Liu Y. G., Hao D. Y. (2010) A cost-effective high-resolution melting approach using the EvaGreen dye for DNA polymorphism detection and genotyping in plants. *J Integr Plant Biol.* 52(12):1036-42.
- Loureiro J., Doležal J., Greilhuber J., Snatos C., Suda J. (2008) Plant Flow Cytometry 22 Far Beyond the Stone Age. *Cytometry Part A* 73A:579-580
- Loureiro J., Kopecký D., Castro S., Santos C., Silveira P. (2007) Flow cytometric and cytogenetic analyses of Iberian Peninsula *Festuca* spp. *Plant Systematics and Evolution* 269(1):89-105.
- Marie D. and Spencer C. B. (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol. Cell.* 78: 41-51.
- Mian M. A. R., Saha M. C., Hopkins A. A., Wang Z. (2005) Use of tall fescue EST-SSR markers in phylogenetic analysis of cool-season forage grasses. *Genome* 48: 637–647.
- Momotaz A., Forster J. W. and Yamada T. (2004) Identification of cultivars and accessions of *Lolium*, *Festuca* and *Festulolium* hybrids through the detection of simple sequence repeat polymorphism. *Plant Breeding* 123: 370-376.
- Nollou P., Wagener C. (1997) Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin. Chem.* 43: 1114-1128.
- Ouyang S., Buell R. (2004) The TIGR Plant Repeat Databases: a collective resource for the identification of repetitive sequences in plants. *Nucleic Acids Res.* 1;32

Rieseberg L. H., Archer M. A., Wayne R. K. (1999) Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity* 83:363–372.

Rieseberg L. H., Raymond O., Rosenthal D. M., Lai Z., Livingstone K., Nakazato T., Durphy J. L., Schwarzbach A. E., Donovan L. A., Lexer CH. (2003) Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301:1211–1216.

Reed G. H. and Wittwer C. T. (2004) Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem.* 50:1748–54.

Schwarzacher T., Anamthawat-Jonsson K., Harrison G. E., Islam A. K. M. R., Jia J., Z., Leitch A., R., Miller T. E., Reader S. M., Rogers W. J., Shi M., Heslop-Harrison J. S. (1992) Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. *Theor Appl Genet* 84:778-786.

Schwarzacher T., Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS (1989) *In situ* localization of parental genomes in a wheat hybrid. *Ann Bot* 64:315–324

Smarda P., Bures P., Horova L., Foggi B., Rossi G. (2008) Genome size and GC content evolution of *Festuca*: ancestral expansion and subsequent reduction. *Annals of Botany* 101(3):421-433.

Smith, A. and Nelson, R. J. (1998) Capillary electrophoresis of DNA. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* 10:Unit 10.9.

Straková M., Straka J., Michalíková L., Plevová K. (2007) Kapesní atlas trav. str.7-12 Agrotis Trávníky, s.r.o.

Studer B., Bach L., Fiil A. and Asp T. (2009) “Blind” mapping of genic DNA sequence polymorphisms in *Lolium perenne* L. by high resolution melting curve analysis. *Molecular Breeding* 24: 191-199.

Syvänen CH. A. (1999) From Gels to Chips: „Minisequencing“ Primer extension for analysis of Point Mutations and Single Nucleotide Polymorphisms. *Hum. Mutat.* 13:1-10.

Šiffelová G., Pavelková M., Klabouchová A., Wiesner I., Našinec V. and Našinec I. (1997/98) Rapid fingerprinting of diploid *Lolium perenne* × hexaploid *Festuca arundinacea* hybrid genomes. *Biologia Plantarum* 40: 183-192.

Torrecilla P., Catalán P. (2002) Phylogeny of broad-leaved and fine-leaved *Festuca* lineages (Poaceae) based on nuclear ITS sequences. *Systematic Botany* 27(2):241-251.

Yamada T., Forster J. W., Humphreys M. W., Takamizo T. (2005) Genetics and molecular breeding in *Lolium/Festuca* grass species complex. *Grassl Sci* 51:89-106.

Yang G. P., Maroof M. A., Xu C. G., Zhang Q and Biyashev R. M. (1994) Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivar of rice. *Mol. Gen. Genet.* 245: 187-194.

Wu S. B., Franks T. K., Hunt P., Wirthensohn M. G., Gibson J. P. and Sedgley M. (2009) Discrimination of SNP genotypes associated with complex haplotypes by high resolution melting analysis in almond: implications for improved marker efficiencies. *Molecular Breeding* 25: 351-357.