národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika použití molekulárních markerů k detekci genů rezistence ke rzem, padlí travnímu a stéblolamu a genů pro krátkostébelnost u pšenice

Sumíková, Taťána; Dumalasová, Veronika; Trávníčková, Martina
2016

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-317271

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 02.05.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

METODIKA POUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH MARKERŮ K DETEKCI GENŮ REZISTENCE KE RZEM, PADLÍ TRAVNÍMU A STÉBLOLAMU A GENŮ PRO KRÁTKOSTÉBELNOST U PŠENICE

Taťána Sumíková, Veronika Dumalasová, Martina Trávníčková

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2016

Publikaci bylo Ministerstvem zemědělství České republiky uděleno osvědčení č. 72387/2016-MZE-17221 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“. O uplatnění metodiky byla uzavřena smlouva se se šlechtitelskou společností Selgen, a. s.

Oponenti
Ing. Jana Mazáková, Ph.D., Česká zemědělská univerzita v Praze
MVDr. Kateřina Staňková, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Autoři
Mgr. Taťána Sumíková, Ph.D., 50 %
Mgr. Veronika Dumalasová, Ph.D., 20 %
Ing. Martina Trávníčková, 30 %

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.
Drnovská 507
161 06 Praha 6 - Ruzyně

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je uvést podrobné postupy k detekci následujících genů rezistence ke rzem, padlí travnímu a stéblolamu pšenice (*Lr10, Lr19, Lr24, Lr26+Sr31+Yr9+Pm8, Lr28, Lr34+Yr18, Lr37+Yr17+Sr38, Pch1) a* genů pro krátkostébelnost (*Rht-B1* a *Rht-D1*) pomocí molekulárních markerů založených na polymerázové řetězové reakci (PCR), spolehlivě optimalizovaných pro rutinní použití v běžné laboratoři se základním vybavením pro použití PCR.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

ÚVOD

Molekulární markery jsou v současnosti hojně využívány v procesu tzv. markery asistované selekce (MAS = marker-assisted selection) k detekci genů (zejména) rezistence během šlechtitelského procesu nebo k identifikaci genů u odrůd a linií s neznámým genotypem (Vida et al. 2009). Jsou to úseky DNA v těsné vazbě s daným genem a jejich detekcí pomocí specifických primerů je proto možné identifikovat přítomnost daného genu v genotypu testovaného materiálu. Čím těsnější je vazba s daným genem (geny), tím spolehlivější je marker při výběru rezistentních genotypů v procesu šlechtění.
Pro rutinní použití jsou nevhodnější molekulární markery založené na PCR. Principem PCR je amplifikace úseku DNA s párem druhově specifických primerů (forward a reverse). Nejprve dochází vlivem vysoké teploty k denaturaci dvoušroubovice DNA, poté se podle principu komplementarity na příslušné sekvence DNA navážou primery. Reakce je katalyzována termostabilním enzymem *Taq* polymerázou. Výsledkem reakce je mnohonásobné zmnožení úseku DNA označeném na obou koncích použitými primery. Produkt PCR reakce je detekován buď na agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem pod UV lampou, nebo kapilární elektroforézou.
Publikované markery však ne vždy spolehlivě fungují v rutinním použití s různými testovanými materiály (Blaszczyk et al. 2008, Chelkowski et al. 2003, Serfling et al. 2011) a to navzdory tomu, že v originálních publikacích ano. Často je to proto, že jsou testovány jen s genotypy zahrnutými v dané publikaci. V dalších případech je nutná zdlouhavá optimalizace reakce, aby bylo dosaženo reprodukovatelných výsledků, jak potvrzují např. Blaszczyk et al. (2008).
Metodika shrnuje vybrané publikované markery založené na PCR, včetně optimalizovaných podrobných protokolů, které mohou být spolehlivě využity k detekci následujících genů:

1. **Geny rezistence ke rzi pšeničné (*Lr* geny), rzi travní (*Sr* geny) a rzi plevové (*Yr* geny):**

- STS (sequence tagged site) marker *F1.2245/Lr10-6/r2* (Gultyaeva et al. 2009) detekuje gen rezistence ke rzi pšeničné *Lr10*, který je lokalizován na chromozomu pšenice 1A.
- SCAR (sequence characterized amplified region) marker $SCS265_{512}$ (Gupta et al. 2006a) detekuje gen rezistence ke rzi pšeničné *Lr19*, přenesený do pšenice z *Agropyron elongatum.* Gen byl lokalizován na pšeničném chromozomu 7DL.
- SCAR marker $SCS1302_{609}$ (Gupta et al. 2006b) detekuje gen rezistence ke rzi pšeničné *Lr24*, přenesený do pšenice z *Agropyron elongatum.* Gen byl lokalizován na pšeničném chromozomu 3DL.

- Marker odvozený od sekvence ω-secalinového genu (De Froidmont 1998) detekuje translokaci se žita *1BL/1RS* nesoucí geny rezistence ke rzem *Lr26+Sr31+Yr9* a padlí travnímu *Pm8*. Translokace je lokalizována na chromozomu pšenice 1B.
- TPSCAR (truncated polymorphic sequence characterized amplified region) marker $SCS421_{570}$ (Cherukuri et al. 2005) detekuje gen rezistence ke rzi pšeničné *Lr28*, přenesený do pšenice z *Aegilops speltoides*. Gen byl lokalizován na pšeničném chromozomu 4A.
- $csLV_{34}$ (codominant sequence tagged site) marker (Lagudah et al. 2006) detekuje oblast genů rezistence ke rzi pšeničné a plevové zodpovědných za tzv. slow rusting *Lr34+Yr18*. Geny jsou lokalizovány na chromozomu pšenice 7DS.
- Dominantní marker pro N-alellu lokusu *Xcmwg682* (Helguera et al. 2003) detekuje translokaci 2NS přenesenou do pšenice z *Triticum ventricosum* a nesoucí genový klastr *Lr37+Yr17+Sr38.* Translokace je lokalizována na pšeničném chromozomu 2AS.

Vzhledem k velmi blízké genové vazbě (+) je možné pomocí jednoho markeru detekovat dva resp. tři geny rezistence současně.

2. **Gen rezistence ke stéblolamu *Pch1***

- STS marker *Xorw1* (Leonard et al. 2008) detekuje gen rezistence k stéblolamu *Pch1*, přenesený do pšenice z *Aegilops ventricosa*. Gen byl lokalizován na 7DL chromozomu pšenice.

3. **Geny zakrslosti *Rht***

- Krátkostébelnost (geny zakrslosti) jsou označované jako *Rht* (reduced height) s různou lokalizací. Nejvíce využívané jsou alelické formy *Rht-B1b* a *Rht-D1b* (dříve označované jako gen *Rht1* a *Rht2*) pocházející z japonské odrůdy Daruma. Nejznámější potomek této odrůdy je odrůda Norin 10, který byl využit jako genetický zdroj alel krátkostébelnosti *Rht-B1b* (*Rht1*) a *Rht-D1b* (*Rht2*). *Rht-B1b* a *Rht-D1b* způsobují redukci výšky rostliny asi o 15 % a můžou způsobit nárůst výnosu až o 20 % (Worland and Law 1986). Pro detekci genu *Rht-B1* a *Rht-D1,* lokalizovaných na chromozomech 4B a 4D, byly použity PCR primery „perfekt markers“, které publikovali Ellis et al. (2002).

Vybrané geny jsou detekovány metodou PCR z DNA izolované z listů pšenice. Fragmenty DNA, specifické pro dané geny jsou během PCR namnoženy s primery umožňující detekci molekulárních markerů, které jsou v těsné vazbě s detekovanými geny. Produkty PCR jsou poté detekovány pomocí horizontální nebo kapilární elektroforézy.

TECHNICKÉ VYBAVENÍ LABORATOŘE A CHEMIKÁLIE

Přístroje

- Centrifuga s otáčkami min. 11 000 otáček/min. s rotorem na plastové mikrozkumavky o objemu 2 ml
- Mikrocentrifuga na PCR zkumavky
- Vodní lázeň nebo teplotní blok
- Vortex
- pH metr

- Lednička (+4 °C), mraznička (-20 °C), případně hlubokomrazící box (-80 °C)
- Vybavení na horizontální elektroforézu
- Transluminátor
- Mikrovlnná trouba
- Míchačka + magnetické míchadlo
- Kývačka
- Fotodokumentační zařízení
- Termocykler
- Genetický analyzátor např. ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer), včetně software GeneScan a Genotyper

Materiál

- Tekutý dusík
- Porcelánové třecí misky a tloučky nebo homogenizátor a karbidové kuličky
- Dvě samostatné sady automatických pipet o objemech 0,5 µl – 10 µl, 2 µl – 20 µl, 20 µl – 200 µl a 100 µl – 1000 µl, jedna na izolaci DNA a jedna k provedení reakcí PCR
- Špičky odpovídajících velikostí kompatibilní k pipetám
- Plastové mikrozkumavky (Eppendorf) o objemech 2 ml, 1,5 ml a 0,5 ml
- PCR plastové mikrozkumavky o objemu 0,2 ml nebo stripy + víčka nebo PCR destičky + víčka
- Jednorázové rukavice
- Laboratorní sklo pro přípravu roztoků (kádinky, odměrné válce, Erlenmeyerovy baňky)
- Plastové mikrozkumavky o objemu 0,5 ml + gumová víčka do analyzátoru ABI PRISM 310

Chemikálie

- Izolační souprava např. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), Exgene Plant SV mini (GeneAll)
- TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva)
- CTAB = Cetrimoniumbromid (též cetyltrimethylamoniumbromid) (Serva)
- EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich)
- NaOH = hydroxid sodný (Lach-Ner, s.r.o.)
- Velikostní standard Lambda*Hin*dIII (Thermo Scientific) a 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)
- Specifické primery k detekci sledovaných genů (syntéza firmou Sigma-Aldrich nebo Generi Biotech, sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 1).
- dNTPs = deoxynukleotidy (Thermo Scientific, Roche)
- *Taq* DNA polymeráza včetně pufru a chloridu hořečnatého ($MgCl_2$), (Qiagen, PCRBIO)
- Voda pro PCR = dd (double-distilled) H_2O (Sigma-Aldrich), destilovaná voda pro přípravu roztoků
- Nanášecí barva Blue loading dye, 6× (Promega)
- Agaróza (Serva)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich)
- Velikostní standard Tamra 500 (Applied Biosystems)
- Formamid (Sigma-Aldrich)
- Separační gel do sekvenátoru ABI PRISM 310 – polymer POP-4™ (Applied Biosystems)
- Pufr do sekvenátoru ABI PRISM 310 – 310 genetic analyzer buffer EDTA (Applied Biosystems)

- NaCl = chlorid sodný (Sigma-Aldrich)
- Absolutní etanol (Serva) – vymražený na -20 °C
- 70% roztok etanolu (Serva)
- Chloroform (ANALYTIKA®)
- Isopropanol (ANALYTIKA®)
- CH_3COOH = kyselina octová (Sigma-Aldrich)
- HCl = kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich)

Příprava roztoků a agarózových gelů

- **<u>50× TAE pufr (TRIS-acetát-EDTA)</u>**

TRIS	242 g
EDTA	100 ml 0,5M roztoku pH 8
Ledová CH_3COOH	57,1 ml 0,5M roztoku
Destilovaná H_2O	1000 ml

242 g TRIS rozpustit v 800 ml destilované vody. Přidat EDTA a kyselinu octovou. Upravit pH na 8 pomocí kyseliny octové. Pro přípravu agarózových gelů připravit pracovní koncentraci 1× TAE smícháním 20 ml 50× TAE s 1000 ml destilované vody.

- **<u>0,8% agarózový gel (cca 50 vzorků)</u>**

Agaróza	0,96 g
1×TAE pufr	120 ml
Ethidium bromid 10 mg/ml roztok	1 µl

- **<u>2% Agarózový gel (cca 50 vzorků)</u>**

Agaróza	2,4 g
1×TAE pufr	120 ml
Ethidium bromid 10 mg/ml roztok	1 µl

Navážit potřebné množství agarózy a smíchat v 200 ml Erlenmeyerově baňce s 120 ml 1×TAE pufru. Zahřátím v mikrovlnné troubě přivést k varu, dokud se všechna agaróza úplně nerozpustí (během procesu občas promíchat). Ochladit pod studenou tekoucí vodou a poté přidat za stálého míchání na míchačce 1 µl ethidium bromidu (nesmí se přidat do horkého gelu, jinak dojde k jeho odpaření). Nalít do formy na gel a vložit hřeben. Nechat ztuhnout minimálně 30 min.

- **<u>Směs chloroform a izoamylalkohol v poměru 24:1</u>**

- **<u>Roztok CTAB 500 ml</u>**

1M TRIS (pH 7,5)	75 ml
5M NaCl	105 ml
0,5M EDTA (pH 8)	15 ml
CTAB (s)	7,5 g
Destilovaná H_2O	do 500 ml

Navážit 7,5 g CTAB. Rozpustit v 200 ml H_2O (v 0,5 l kádince) na magnetické míchačce pomocí míchadla. Rozpuštění trvá cca ½ hodiny. Když je roztok lehce opalescentní, můžou se

přidávat další ingredience. Roztok se celkově dobře vyčeří. Pění. Přidat 75 ml TRIS (odměrným válcem), 105 ml NaCl a 15 ml EDTA. Promíchat na magnetické míchačce pomocí míchadla. Nalít do velkého odměrného válce a doplnit do 500 ml destilovanou H_2O.

- **<u>1M TRIS 200 ml</u>**

TRIS	24,2 g
Destilovaná H_2O	do 200 ml

24,2 g TRIS rozpustit v 100 ml H_2O (v 250 ml kádince na magnetické míchačce pomocí míchadla) a doplnit v odměrném válci na 200 ml. Upravit pH na 7,5 (pomocí HCl).

- **<u>0,5M EDTA 200 ml</u>**

EDTA	29,23 g
10M NaOH	dle potřeby
Destilovaná H_2O	do 200 ml

29,23 g EDTA nasypat do 250 ml kádinky. Přidat 100 ml H_20. Na magnetické míchačce míchat a upravovat pH na 8 (pomocí 10M roztoku NaOH). EDTA se rozpouští pouze při pH 8 (při míchání přidávat 10M roztok NaOH až do té doby, než se roztok EDTA vyčeří). Přesná úprava na pH 8 na pH metru. Po rozpuštění doplnit do 200 ml v odměrném válci destilovanou H_20.

- **<u>5M NaCl 100 ml</u>**

NaCl	29,22 g
H_2O	100 ml H_2O

- **<u>Roztok TE (Tris/EDTA) 100 ml</u>**

1M TRIS (pH 8)	1 ml
0,5M EDTA (pH 8)	0,2 ml
Destilovaná H_2O	98,8 ml

Roztoky EDTA, TRIS, CTAB a TE sterilizovat autoklávováním při 120 °C cca 20 minut, poté uchovávat při pokojové teplotě.

Tabulka č. 1: Seznam použitých primerů

Detekovaný gen	Název primerů a jejich sekvence 5'→3'	PCR produkt (bp)	Citace
Lr10	Lrk10D1: GAAGCCCTTCGTCTCATCTG Lrk10D2: TTGATTCATTGCAGATGAGATCACG	310	Gultyaeva et al. 2009
Lr19	SCS265F: GGCGGATAAGCAGAGCAGAG SCS265R: GGCGGATAAGTGGGTTATGG	512	Gupta et al. 2006a
Lr24	SCS1326F: GCATCGTGCAGCTAGTTCTG SCS1326R: AGGCATCGTGAAAAGAGAACA	607	Gupta et al. 2006b
Translokace 1BL/1RS	SecA2: GTTTGCTGGGGAATTATTTG SecA3: TCCTCATCTTTGTCCTCGCC	412	de Froidmont 1998
Lr28	SCS421F: ACAAGGTAAGTCTCCAACCA SCS421R: AGTCGACCGAGATTTTAACC	570	Cherukuri et al. 2005
Lr34+Yr18	csLV34F: GTTGGTTAAGACTGGTGATGG csLV34R: TGCTTGCTATTGCTGAATAGT	150	Lagudah et al. 2006
Lr37+Yr17+ Sr38	Ventriup: AGGGGCTACTGACCAAGGCT LN2: TGC AGCTACAGCAGTATGTACACAAAA	259	Helguera et al. 2003
Pch1	orw1F 6-FAM*: CTATTACATGAAATCTTATTCTCC orw1R: CAGCAGTAACGAGAATGTGG	183	Leonard et al. 2008
Rht-B1a	BF: GGTAGGGAGGCGAGAGGCGAG WR1: CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTG	237	Ellis et al. 2002
Rht-B1b	BF: GGTAGGGAGGCGAGAGGCGAG MR1: CATCCCCATGGCCATCTCGAGCTA	237	Ellis et al. 2002
Rht-D1a	DF2: GGCAAGCAAAAGCTTCGCG WR2: GGCCATCTCGAGCTGCAC	264	Ellis et al. 2002
Rht-D1b	DF: CGCGCAATTATTGGCCAGAGATAG MR2: CCCCATGGCCATCTCGAGCTGCTA	254	Ellis et al. 2002

* primer owr1F je fluorescenčně značen barvivem 6-FAM

PRACOVNÍ POSTUPY

1. Izolace DNA

Extrakce DNA se provádí z vysetých rostlin pšenice nejpozději ve fázi druhého listu. Nejvhodnější je použít směs minimálně 5 rostlin, aby byla zajištěna homogenita vzorku. Odebrané listy je možno ihned po odběru použít k izolaci, nebo je nutné je zabalené v alobalu zmrazit v tekutém dusíku a následně uchovat v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C až do doby potřeby. Mechanická destrukce pletiv se provádí buď třením v tekutém dusíku s použitím keramické třecí misky a tloučku nebo v homogenizátoru v plastové mikrozkumavce o objemu 2 ml s vloženou karbonovou kuličkou.

Vlastní extrakci (separace DNA od ostatních složek, zejména od proteinů, polysacharidů a barviv) lze provést dvěma základními metodami. Rychlejší, jednodušší, ale dražší metoda s nižším výtěžkem DNA je s použitím komerčních izolačních souprav (kitů) např. DNeasy Plant Mini Kit firmy Qiagen nebo Exgene Plant SV mini firmy GeneAll. Základní princip těchto kitů

je založen na schopnosti DNA vázat se v přítomnosti tzv. chaotropních solí na silikátový povrch (membránu) v kolonkách vložených do mikrozkumavek, které jsou součástí kitů. Kolonka s navázanou DNA je poté promyta a adherovanou čistou DNA lze následně z povrchu částic snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru (TE), který neobsahuje chaotropní soli.
Levnější, ale časově náročnější metoda s vyšším výtěžkem DNA je založena na použití CTAB. Jeho působením dochází za přítomnosti chloridu sodného k vytvoření ve vodě rozpustného komplexu CTAB-DNA. Ten se od proteinů a sacharidů oddělí působením směsi chloroformu a isoamylalkoholu a je vyvázán do vodné fáze. DNA se poté z vodné fáze vysráží pomocí absolutního etanolu a zbytky chloridu sodného a CTAB jsou odstraněny 70% roztokem etanolu. Pelety DNA se rozpustí v pufru TE, tj. velmi zředěném roztoku TRIS a EDTA. TRIS upravuje pH roztoku a EDTA působí jako chelační činidlo a vyvazuje Mg^{2+} ionty, a tím inhibuje činnost nukleáz, enzymů štěpících DNA.

1.1 Izolace izolační soupravou - pracovní postup

Postupujeme podle přiložených instrukcí výrobce vybrané izolační soupravy.

1.2 Izolace použitím metody CTAB – pracovní postup

Nejdříve je potřeba dát potřebné množství isopropanolu do mrazáku (počet vzorků x 450 µl) a připravit vodní lázeň 65 °C. Dále popsat 2 ml zkumavky Eppendorf a do každé napipetovat 700 µl roztoku CTAB. Přibližně 100 mg rostlinné tkáně zhomogenizujeme v tekutém dusíku, přemístíme do zkumavky a promícháme pomocí vortexu. Zkumavky inkubujeme ve vodní lázni při 65 °C po dobu 30 – 60 minut; vždy po cca 10 minutách zkumavky opatrně promícháme. Poté vychladíme na laboratorní teplotu. V digestoři do každé zkumavky přidáme 300 µl chloroformu, protřepeme a necháme 10 minut promíchávat na kývačce (cca 3 Hz). Následuje centrifugace 5 min a 30 s při 14 000 ot/min. Vodnou fázi (supernatant) odebereme pipetou (± 450 µl) do nových a popsaných 2 ml zkumavek, přidáme 450 µl vymraženého isopropanolu a promícháme. V dalším kroku je směs inkubována 5 min při teplotě -20 °C a následně centrifugována 5 min (14 000 ot/min). Isopropanol vylijeme (na dně by měla zůstat malá peletka) a přidáme 200 µl 70% etanolu. Následuje centrifugace 1 min (8 000 ot/min). Supernatant odpipetujeme a pelety DNA vysušíme (pelety změní barvu z bílé na průhlednou) - cca 10 - 15 minut. Peleta je rozpuštěna ve 100 µl destilované H_20 (přes noc při 4°C nebo 15 minut při 65°C) nebo v TE při 65 °C.

Před použitím v reakcích PCR je vhodné (zejména v případě izolace pomocí CTAB, kdy je dosaženo vyššího výtěžku DNA) ověřit kvalitu a koncentraci DNA každého vzorku buď spektrofotometricky nebo elektroforézou pomocí fluorescence pod UV lampou na agarózovém 0,8% gelu s ethidium bromidem, který se váže na DNA. Ke 2 µl vzorku DNA přidáme 2 µl nanášecí barvy a 8 µl sterilní vody a naneseme na gel. Elektroforéza probíhá při napětí 60 V cca 60 min (podle velikosti gelu), poté gel prohlédneme pod UV světlem na transluminátoru a vyfotíme s použitím fotodokumentačního zařízení. Fluorescence vyvolaná UV zářením působícím na vázaný ethidium bromid je úměrná množství DNA. Míra fluorescence vzorku DNA se porovnává s fluorescencí fragmentů o známé koncentraci u markeru Lambda DNA/*Hind*III, který naneseme v množství 5 µl do jamek před prvním a za posledním naneseným vzorkem. Optimální výchozí koncentrace DNA je cca 50 ng/1 µg při objemu PCR 25 µl. U délkového standardu Lambda DNA/*Hin*dIII tomu odpovídá fragment o velikosti 2322 párů bazí (bp). Při objemu PCR 15 µl je optimální výchozí koncentrace DNA cca 25 ng/1 µg. V případě potřeby je DNA na požadovanou koncentraci naředěna sterilní

destilovanou vodou. Izolovanou DNA lze dlouhodobě uchovávat při teplotě -20 °C, krátkodobě při +5 °C.

2. PCR k detekci genů rezistence *Lr, Sr* a *Yr*

Pracovní protokoly s přesným složením reakční směsi a podmínky amplifikace pro detekci každého z vybraných genů rezistence jsou uvedeny v tabulkách 2-7.

2.1 PCR - pracovní postup

Chemikálie potřebné pro PCR, s výjimkou *Taq* polymerázy, necháme roztát, krátce promícháme a stočíme v minicentrifuze. Dále vše uchováváme a pracujeme na ledu při teplotě 1-4 °C.

Všechny chemikálie kromě DNA smícháme v jedné sterilní mikrozkumace o objemu 1,5 nebo 2 ml. Množství jednotlivých složek reakční směsi pro jeden vzorek je uvedeno v tabulkách 2-5. Získaný premix důkladně promícháme na vortexu.

Premix rozdělíme do 0,2 ml PCR mikrozkumavek, stripů nebo destiček v množství, které je uvedeno v tabulkách 2-5 a přidáme odpovídající množství DNA. Na závěr zařadíme jeden vzorek jako pozitivní kontrolu (DNA linií obsahující konkrétní detekovaný gen) a jeden jako negativní kontrolu (místo DNA přidáme sterilní destilovanou vodu). Při analýze většího množství vzorků najednou je vhodné zařadit více pozitivní i negativních kontrol pro zvýšení spolehlivosti interpretace výsledků reakce.

Zkumavky (destičky/stripy) krátce promícháme a centrifugujeme.

Vzorky vložíme do termocykleru pro PCR a zahájíme reakci. Podmínky amplifikace markerů pro jednotlivé geny jsou uvedeny v tabulkách 6-7.

2.2 Reakční směsi

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro detekci genů *Lr10, Lr19, Lr24* a *Lr28*.

Chemikálie	Výsledná koncentrace	Množství v jedné reakci (µl)	
dd H_2O		10,8	
5× pufr PCRBIO $MgCl_2$ (součást pufru) $dNTP_s$ (součást pufru)	1× 3 mM 1 mM	3	
Primery pro odpovídající gen viz tabulka 1	0,17 µM	0,5	Premix
Taq polymeráza PCRBIO (5 U/µl)	1 U/reakci	0,2	14,5
DNA	25 ng		0,5
Celkový objem reakce			15 µl

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro detekci genů *Lr34+Yr18*.

Chemikálie	Výsledná koncentrace	Množství v jedné reakci (µl)	
dd H_2O		10,8	
5× pufr PCRBIO $MgCl_2$ (součást pufru) $dNTP_s$ (součást pufru)	1× 4 mM 1,33 mM	4	
Primery csLV34F a csLV34R	0,33 µM	1	Premix 14,5
Taq polymeráza PCRBIO (5 U/µl)	0,5 U/reakci	0,1	
DNA	25 ng		0,5
Celkový objem reakce			15 µl

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro detekci translokace *1BL/1RS*.

Chemikálie	Výsledná koncentrace	Množství v jedné reakci (µl)	
dd H_2O		16,8	
10× pufr Qiagen (včetně $MgCl_2$)	1×	2,5	
$MgCl_2$ Qiagen (celková koncentrace)	3 mM	1,5	
$dNTP_s$	0,2 mM	2	
Primery SecA2 a SecA3	0,5 µM	1	Premix 24
Taq polymeráza PCRBIO (5 U/µl)	1 U/reakci	0,2	
DNA	50 ng		1
Celkový objem reakce			25 µl

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro detekci genového klastru *Lr37+Yr17+Sr38*.

Chemikálie	Výsledná koncentrace	Množství v jedné reakci (µl)	
dd H_2O		15,8	
10× pufr Qiagen (včetně $MgCl_2$)	1×	2,5	
$MgCl_2$ Qiagen (celková koncentrace)	5 mM	3,5	
$dNTP_s$	0,1 mM	1	
Primery Ventriup a LN2	0,5 µM	1	Premix 24
Taq polymeráza PCRBIO (5 U/µl)	1 U/reakci	0,2	
DNA	50 ng		1
Celkový objem reakce			25 µl

2.3 Reakční podmínky

Tabulka č. 6: Reakční podmínky pro detekci genů *Lr10, Lr19, Lr24, Lr28*, translokace *1BL/1RS* a genového klastru *Lr37+Yr17+Sr38*.

<table>
<tr><th>Lr10</th><th colspan="2">Lr19, Lr24, Lr28</th><th colspan="2">translokace 1BL/1RS, Lr37+Yr17+Sr38</th></tr>
<tr><td colspan="2">Počáteční denaturace
95 °C – 3 min</td><td colspan="2">Počáteční denaturace
95 °C – 2 min</td><td colspan="2">Počáteční denaturace
94 °C – 3 min</td></tr>
<tr><td>Denaturace
94 °C – 45 s</td><td rowspan="3">35 cyklů</td><td>Denaturace
94 °C – 1 min</td><td rowspan="3">36 cyklů
(pro Lr19
jen 35)</td><td>Denaturace
95 °C – 45 s</td><td rowspan="3">35 cyklů</td></tr>
<tr><td>Nasedání primerů
57 °C – 45 s</td><td>Nasedání primerů
60 °C – 1 min</td><td>Nasedání primerů
62 °C – 45 s</td></tr>
<tr><td>Prodlužování
72 °C – 30 s</td><td>Prodlužování
72 °C – 1 min</td><td>Prodlužování
72 °C – 45 s</td></tr>
<tr><td colspan="2">Závěrečné prodlužování
72 °C – 3 min</td><td colspan="2">Závěrečné prodlužování
72 °C – 7 min</td><td colspan="2">Závěrečné prodlužování
72 °C – 10 min</td></tr>
</table>

Tabulka č. 7: Reakční podmínky pro detekci genů *Lr34+Yr18*.

Denaturace 94 °C – 1 min	5 cyklů
Nasedání primerů 55 °C – 1 min	
Prodlužování 72 °C – 2 min	
Denaturace 94 °C – 30 s	30 cyklů
Nasedání primerů 55 °C – 30 s	
Prodlužování 72 °C – 50 s	
Denaturace 94 °C – 30 s	1 cyklus
Nasedání primerů 55 °C – 30 s	
Prodlužování 72 °C – 5 min	

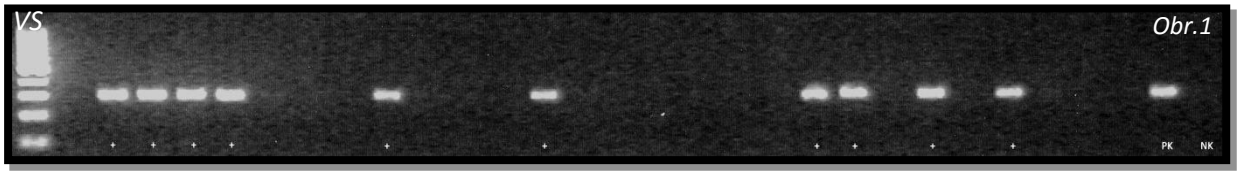
2.4 Separace a vizualizace PCR produktů

Po dokončení reakce PCR přidáme ke každému vzorku (včetně pozitivních a negativních kontrol) do mikrozkumavky 3 µl nanášecí barvy, promícháme a krátce stočíme na centrifuze. Do jamek 2% agarózového gelu naneseme 8 µl každého vzorku. Do jamek před prvním a za posledním naneseným vzorkem naneseme 5 µl velikostního standardu 100 bp DNA Ladder. Elektroforetická separace fragmentů DNA probíhá při 60 V, 60 – 90 min, podle velikosti gelu, poté gel prohlédneme pod UV světlem na transluminátoru a vyfotíme s použitím fotodokumentačního zařízení. Velikost vytvořených produktů amplifikace srovnáme

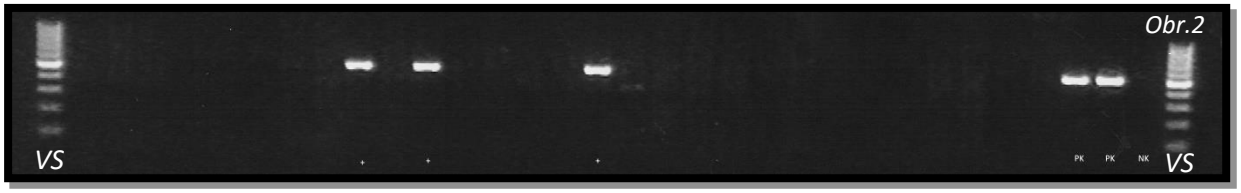
s velikostním standardem a s požadovanou délkou markerů detekujících sledované geny rezistence (Tab. 1).
Přítomnost fragmentu o požadované velikosti odpovídá přítomnosti daného genu (genů) rezistence v testovaném materiálu, absence tohoto fragmentu značí absenci příslušného genu (genů) v testovaném materiálu. V případě detekce genů *Lr34+Yr18* je jejich přítomnost detekována amplifikací fragmentu o velikosti 150 bp, zatímco absence genů *Lr34+Yr18* je detekována amplifikací fragmentu o velikosti 229 bp (Obr. 1-7).

2.5 Fotografie PCR produktů

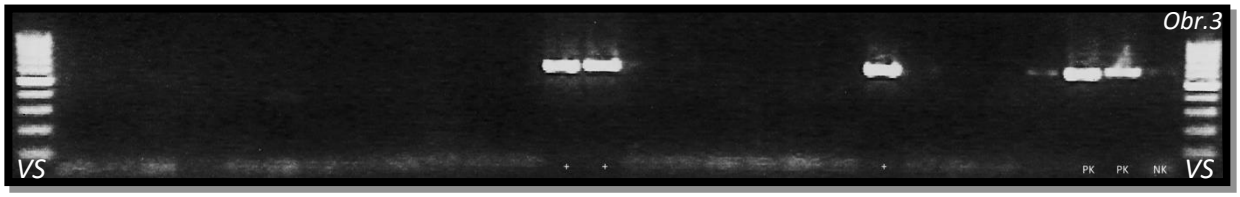
Obr. 1: Amplifikace STS markeru *F1.2245/Lr10-6/r2* specifického pro gen *Lr10*. PCR produkty o velikosti 310 bp značí přítomnost genu *Lr10* v testovaných materiálech, nepřítomnost tohoto produktu značí absenci daného genu. VS = velikostní standard 100 bp DNA ladder, PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola, + = přítomnost specifického produktu o velikosti 310 bp.



Obr. 2: Amplifikace SCAR markeru $SCS265_{512}$ specifického pro gen *Lr19*. PCR produkty o velikosti 512 bp značí přítomnost genu *Lr19* v testovaných materiálech, nepřítomnost tohoto produktu značí absenci daného genu. VS = velikostní standard 100 bp DNA ladder, PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola, + = přítomnost specifického produktu o velikosti 512 bp.



Obr. 3: Amplifikace SCAR markeru $SCS1302_{609}$ specifického pro gen *Lr24*. PCR produkty o velikosti 607 bp značí přítomnost genu *Lr24* v testovaných materiálech, nepřítomnost tohoto produktu značí absenci daného genu. VS = velikostní standard 100 bp DNA ladder, PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola, + = přítomnost specifického produktu o velikosti 607 bp.

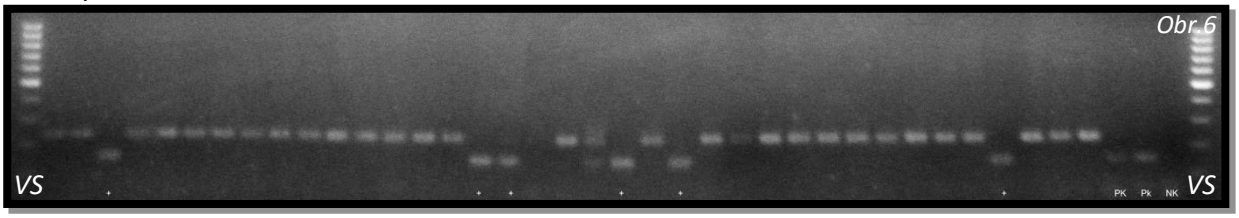


Obr. 4: Amplifikace kodominantního markeru specifického pro žitnou translokaci *1BL/1RS*, která je nositelem genů rezistence ke rzem *Lr26, Sr31, Yr9* a padlí travnímu *Pm8.* PCR produkty o velikosti 412 bp značí přítomnost translokace *1BL/1RS* v testovaných materiálech,

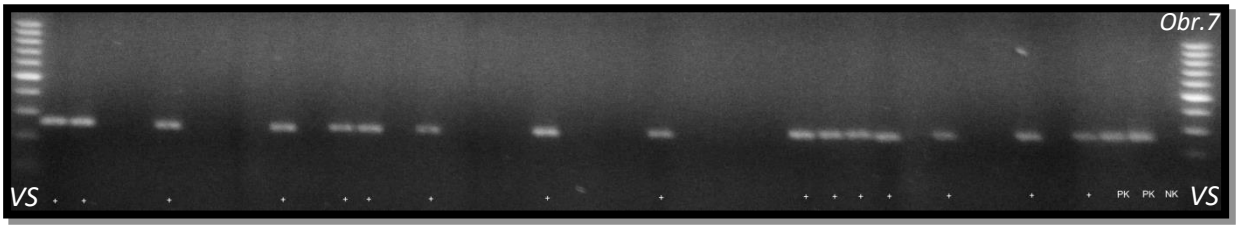
nepřítomnost tohoto produktu značí absenci dané translokace. VS = velikostní standard 100 bp DNA ladder, PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola, + = přítomnost specifického produktu o velikosti 412 bp.

Obr. 5: Amplifikace TPSCAR markeru *SCS421*$_{570}$ specifického pro gen *Lr28*. PCR produkty o velikosti 570 bp značí přítomnost genu *Lr28* v testovaných materiálech, nepřítomnost tohoto produktu značí absenci daného genu. VS = velikostní standard 100 bp DNA ladder, PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola, + = přítomnost specifického produktu o velikosti 570 bp.

Obr. 6: Amplifikace markeru *csLV34* specifického pro geny *Lr34+Yr18*. PCR produkty o velikosti 150 bp značí přítomnost genů *Lr34+Yr18* v testovaných materiálech, PCR produkt o velikosti 229 bp značí absenci daných genů. VS = velikostní standard 100 bp DNA ladder, PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola, + = přítomnost specifického produktu o velikosti 150 bp.



Obr. 7: Amplifikace markeru specifického pro genový klastr *Lr37+Yr17+Sr38*. PCR produkty o velikosti 259 bp značí přítomnost genového klastru v testovaných materiálech, nepřítomnost tohoto produktu značí absenci daného klastru. VS = velikostní standard 100 bp DNA ladder, PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola, + = přítomnost specifického produktu o velikosti 259 bp.



3. PCR k detekci genu rezistence *Pch1*

Pracovní protokoly s přesným složením reakční směsi a podmínky amplifikace pro detekci každé alely jsou uvedeny v tabulkách 8-9.

3.1 Pracovní postup

Viz. kapitola „2.1 PCR – pracovní postup“.

3.2 Reakční směs

Tabulka č. 8: Složení reakční směsi pro detekci genu *Pch1*.

Chemikálie	Výsledná koncentrace	Množství v jedné reakci (µl)	
dd H_2O		10,58	
10× pufr Qiagen (včetně $MgCl_2$)	1×	1,5	
$MgCl_2$ Qiagen (celková koncentrace)	1,7 mM	0,12	
$dNTP_s$	0,17 mM	1	
Primery (jeden z nich je značen fluorescenčním barvivem 6-FAM)	0,2 µM	0,6	Premix
Taq polymeráza (Qiagen, 5 U/µl)	1 U/reakci	0,2	14
DNA	25 ng		1
Celkový objem reakce			15 µl

3.3 Reakční podmínky

Tabulka č. 9: Reakční podmínky pro detekci genu *Pch1.*

Počáteční denaturace 95 °C – 5 min	
Denaturace 94 °C – 30 s	40 cyklů
Nasedání primerů 55 °C – 30 s	
Prodlužování 72 °C – 40 s	
Závěrečné prodlužování 72 °C – 5 min	

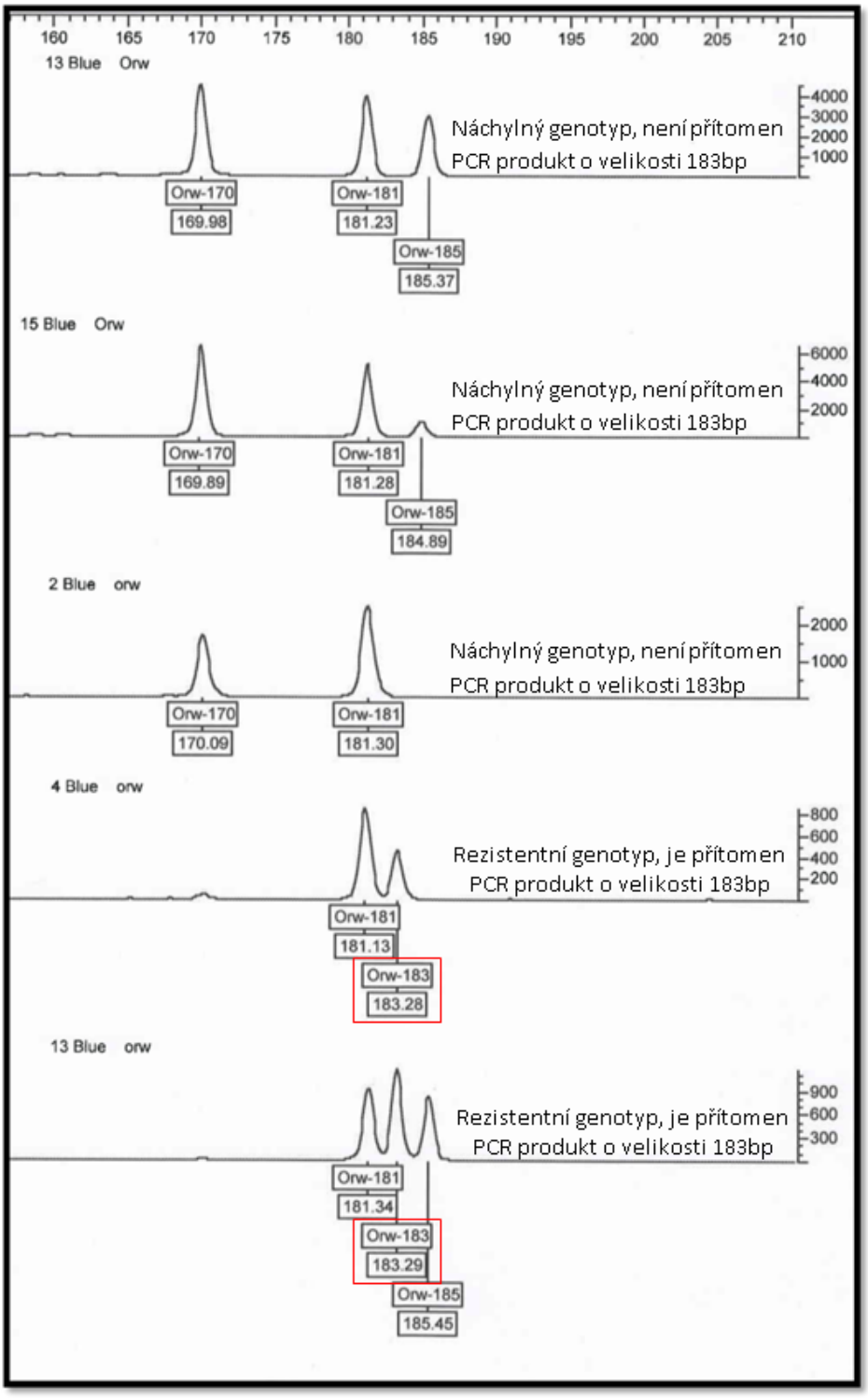
3.4 **Separace a vizualizace PCR produktů**

Produkty amplifikace jsou separovány pomocí kapilární elektroforézy v přístroji ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer). Před vlastní analýzou je nejprve provedena denaturace PCR produktů. 0,5 µl produktu smícháme s 5,2 µl směsi formamidu a velikostního standardu Tamra 500 (vzájemný poměr je 4,7 µl formamidu + 0,5 µl Tamra 500) v 0,5 ml zkumavkách s gumovým víčkem, kompatibilních s analyzátorem ABI PRISM 310. Denaturace probíhá 7 min při 95 °C v termocykleru. Poté jsou vzorky krátce ochlazeny na ledu. Vlastní elektroforéza (jednoho vzorku) probíhá 26 min při teplotě 60 °C. Analýza délky fragmentů se

provádí v programu GeneScan a Genotyper srovnáním s interním velikostním standardem Tamra 500 (Applied Biosystems). PCR produkt o velikosti 183 bp odpovídá rezistentnímu genotypu nesoucímu gen *Pch1*, absence tohoto fragmentu značí náchylný genotyp (Obr. 8).

3.5 Fotografie PCR produktů

Obr. 8: Amplifikace STS markeru *Xorw1* specifického pro gen *Pch1*. PCR produkty o velikosti 183 bp značí přítomnost genu *Pch1* v testovaných materiálech, nepřítomnost tohoto produktu značí absenci daného genu.



4. PCR k detekci genů krátkostébelnosti

Pracovní protokoly s přesným složením reakční směsi a podmínky amplifikace pro detekci každé alely jsou uvedeny v tabulkách 10-12.

4.1 Pracovní postup

Viz. kapitola „2.1 PCR – pracovní postup“.

4.2 Reakční směsi

Tabulka č. 10: Složení reakční směsi pro detekci alel *Rht-B1a, Rht-B1b, Rht-D1a* a *Rht-D1b*.

Chemikálie	Výsledná koncentrace	Množství v jedné reakci (µl)	
dd H_2O		10,87	Premix 14
10× pufr (včetně $MgCl_2$) (Roche)	1×	1,5	
$dNTP_s$ (Roche)	0,2 mM	1,5	
Primer F (Sigma-Aldrich)	0,2 µM	0,03	
Primer R (Sigma-Aldrich)	0,2 µM	0,03	
Taq polymeráza (Roche, 5 U/ µl)	0,35 U/reakci	0,07	
DNA	25 ng	1	
Celkový objem reakce		15 µl	

4.3 Reakční podmínky

Tabulka č. 11 a 12: Reakční podmínky pro detekci alel *Rht-B1a, Rht-B1b, Rht-D1a* a *Rht-D1b*.

Rht-B1a, Rht-B1b a *Rht-D1b*	
Počáteční denaturace 94 °C – 5 min	
Denaturace 94 °C – 30 s	7 cyklů „touchdown“
Nasedání primerů 65-58 °C – 30 s	
Prodlužování 72 °C – 1 min 20 s	
Denaturace 94 °C – 30 s	23 cyklů
Nasedání primerů 58 °C – 30 s	
Prodlužování 72 °C – 1 min 20 s	

Rht-D1a	
Počáteční denaturace 94 °C – 3 min	
Denaturace 94 °C – 1 min	45 cyklů
Nasedání primerů 58 °C – 1 min	
Prodlužování 72 °C – 2 min	
Prodlužování 72 °C – 10 min	

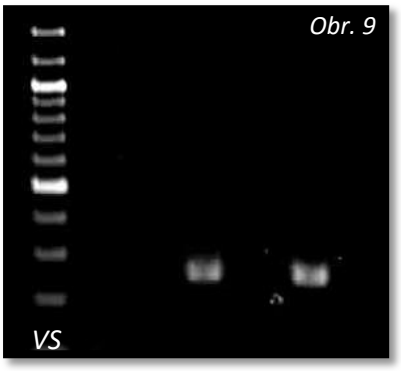
4.4 Separace a vizualizace PCR produktů

Separace produktů viz kapitola „2.4 Separace a vizualizace PCR produktů“.
Přítomnost fragmentu o požadované velikosti odpovídá přítomnosti dané alely genu v testovaném materiálu, absence tohoto fragmentu značí absenci příslušné alely genu

v testovaném materiálu. V případě detekce alel *Rht-B1a* a *Rht-B1b* je jejich přítomnost detekována amplifikací fragmentu o velikosti 237 bp. V případě detekce alely *Rht-D1a* je její přítomnost detekována amplifikací fragmentu o velikosti 264 bp a u alely *Rht-D1b* velikostí 254 bp (Obr. 9-11).

4.5 Fotografie PCR produktů

Obr. 9: Amplifikace specifického PCR produktu o velikosti 237 bp pro alely *Rht-B1a* a *Rht-B1b*. Přítomnost daného produktu značí přítomnost alel *Rht-B1a* a *Rht-B1b* v testovaných materiálech, nepřítomnost tohoto produktu značí absenci daných alel. VS = velikostní standard 100 bp DNA ladder.



Obr. 10: Amplifikace specifického PCR produktu o velikosti 264 bp pro alelu *Rht-D1a*. Přítomnost daného produktu značí přítomnost alely *Rht-D1a* v testovaných materiálech, nepřítomnost tohoto produktu značí absenci dané alely. VS = velikostní standard 100 bp DNA ladder.

Obr. 11: Amplifikace specifického PCR produktu o velikosti 254 bp pro alelu *Rht-D1b*. Přítomnost daného produktu značí přítomnost alely *Rht-D1b* v testovaných materiálech, nepřítomnost tohoto produktu značí absenci dané alely. VS = velikostní standard 100 bp DNA ladder.

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metodika uvádí jedinečný souhrn podrobných optimalizovaných postupů umožňující spolehlivou detekci následujících genů *Lr10, Lr19, Lr24, Lr26+Sr31+Yr9+Pm8, Lr28, Lr34+Yr18, Lr37+Yr17+Sr38, Pch1, Rht-B1 a Rht-D1*. Metodika vychází z publikovaných molekulárních markerů pro dané geny, ale všechny protokoly k jejich detekci uvádí v jedné publikaci s přesným spolehlivě ověřeným postupem. Díky tomu je možné uvedené geny rutinně stanovovat v běžné laboratoři s vybavením pro použití metody PCR.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je vhodná pro použití v laboratořích šlechtitelských stanic, případně jiných pracovišť, zabývajících se detekcí genů rezistence pšenice pomocí PCR markerů. Markery, uvedené v této metodice, jsou vhodné pro rutinní použití a poskytují reprodukovatelné výsledky. Pracovní postupy jsou optimalizované tak, že umožňují spolehlivou a rychlou detekci vybraných genů (*Lr10, Lr19, Lr24, Lr26+Sr31+Yr9+Pm8, Lr28, Lr34+Yr18, Lr37+Yr17+Sr38, Pch1, Rht-B1 a Rht-D1*).

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Cena izolace jednoho vzorku kitem GeneAll je přibližně 80 Kč, kitem Qiagen přibližně 115 Kč a s použitím CTAB 5 Kč. Časová náročnost izolace je přibližně jedna hodina s použitím izolační soupravy a tři hodiny s použitím CTAB, bez započítání času nutného k mechanickému rozdrcení vzorků a přípravě roztoků.

Náklady na jednu PCR pro jeden vzorek jsou přibližně v rozpětí 150 – 200 Kč, podle objemu reakce a použitých chemikálií. Náklady na elektroforézu s použitím agarózového gelu jsou 4 Kč za vzorek. Maximální počet vzorků, které je možné analyzovat v jednom běhu v termocykleru je 96. Reakce trvají přibližně 2 hodiny, horizontální elektroforéza 1 – 2 hodiny podle velikosti gelu (počtu vzorků).

Cena detekce genu *Pch1* s využitím kapilární elektroforézy je přibližně 250 Kč (včetně PCR) za jeden vzorek. Maximální počet vzorků, které je možné analyzovat v jednom běhu v genetickém analyzátoru ABI PRISM 310 je 48. Analýza jednoho vzorku trvá přibližně půl hodiny, dále je potřeba čas k vyhodnocení výsledků v programech GeneScan a Genotyper.

Nejsou započítány náklady na zařízení laboratoře, které jsou jednorázově vysoké (zejména vybavení pro kapilární elektroforézu), nicméně metodika je spíše určena pro již zařízené laboratoře molekulární biologie.

Hlavní ekonomický přínos metodiky spočívá v časové a finanční úspoře (zejména spotřeba chemikálií), které je dosaženo tím, že odpadá nutnost zdlouhavé optimalizace reakcí a testování spolehlivosti markerů. Všechny vybrané markery je možné podle uvedených protokolů rutinně používat při procesu markery asistované selekce.

Díky markery asistované selekci během procesu šlechtění dochází k další úspoře času i financí vzhledem k tomu, že není nutný výsev a hodnocení všech genetických materiálů v polních podmínkách. Náklady na roční agrotechnické úpravy polních pokusů jsou přibližně 6000 Kč, které lze ušetřit s využitím markery asistované selekce, protože vybrané geny lze stanovit pomocí PCR už v raném stadiu rostlin.

VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Blaszczyk L, Kramer I, Ordon F, Chelkowski J, Tyrka M, Vida G, Karsai I (2008): Validity of selected DNA markers for breeding leaf rust resistant wheat. Cereal Research Communication 36: 201 – 213.

Chelkowski J, Golka L, Stepien L (2003): Application of STS markers for leaf rust resistence genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. Thatcher. Journal of Applied Genetics 44: 323 – 338.

Cherukuri DP, Gupta SK, Charpe A, Koul S, Prabhu KV, Singh RB, Haq QMR (2005): Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. Euphytica 143: 19 – 26.

de Froidmont D. (1998): A co-dominant marker for the *1BL/1RS* wheat-rye translocation via multiplex PCR. Journal of Cereal Science 27: 229 – 232.

Ellis MH, Spielmeyer W, Gale KR, Rebetzke GJ, Richards RA (2002): "Perfect" markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. Theoretical and Applied Genetics 105: 1038-1042.

Gultyaeva EI, Kanyuka IA, Alpateva NV, Baranova OA, Dmitriev AP, Pavlyushin VA (2009): Molecular Approaches in Identifying Leaf Rust Resistance Genes in Russian Wheat Varieties. Plant Industry 35:316-319.

Gupta SK, Charpe A, Prabhu KV, Haque QMR (2006a): Identification and validation of molecular marker linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. Theoretical and Applied Genetics 113: 1027 – 1036.

Gupta SK, Charpe A, Koul S, Haque QMR, Prabhu KV (2006b): Development and validation of SCAR markers co-segregating with an Agropyron elongatum derived leaf rust resistance gene Lr24 in wheat. Euphytica 150: 233 – 240.

Helguera M, Khan IA, Kolmer J, Lijavetzky D, Zhong-gi L, Dubcovsky J (2003): PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. Crop Science 43: 1839-1847.

Lagudah ES, McFadden H, Singh RP, Huerta-Espino J, Bariana HS, Spielmeyer W (2006): Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. Theoretical and Applied Genetics 114:21–30.

Leonard JM, Watson CHJW, Carter AH, Hansen JL, Zemetra RS, Santra DK, Cambbell KG, Riera-Lizarazu O (2008): Identification of a candidate gene for the wheat endopeptidase *Ep-D1* locus and two other STS markers linked to the eyespot resistance gene *Pch1*. Theoretical and Applied Genetics 116: 261–270.

Serfling A, Kramer I, Lind V, Schliephake E, Ordon F (2011): Diagnostic value of molecular markers for Lr genes and characterization of leaf rust resistance of German winter wheat cultivars with regard to the stability of vertical resistance. European Journal of Plant Pathology 130: 559 – 575.

Vida G, Gál M, Uhrin A, Veisz O, Syed NH, Flavell AJ, Wang Z, Bedo Z (2009): Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. Euphytica 170: 67 – 76.

Worland AJ & Law CN (1986): Genetic analysis of chromosome 2D of wheat. 1. The location of genes affecting height, day-length insensitivity, hybrid dwarfism and yellow-rust resistance. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung - Journal of Plant Breeding 96: 331-345.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

1. *Lr, Sr* a *Yr* geny

Hanzalová A, Bartoš P, Sumíková T (2015): Molekulární analýza genů rezistence ke rzi pšeničné. Úroda 63: 18 – 20. Dedikace: QJ1210189, RO0415.

Hanzalová A, Bartoš P, Sumíková T (2013): Physiological specialization of wheat leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) in the Czech Republic in 2009-2011. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 49: 103-108. Dedikace: MZE0002700604, QJ1210189.

Hanzalová A, Sumíková T, Huzsár J, Bartoš P (2012): Physiologic specialization of wheat leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) in the Slovak Republic in 2009-2011: Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 48: 101 – 107. Dedikace: MZE0002700604, QJ1210189.

Hanzalová A, Sumíková T, Bartoš P (2011): Molekulární genetika a šlechtění pšenice na odolnost k chorobám. Úroda 59: 49 – 51. Dedikace: MZE0002700604.

Sumíková T, Hanzalová A (2010): Multiplex PCR assay to detect rust resistance genes *Lr26* and *Lr37* in wheat. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 46: 85 – 89. Dedikace: MZE0002700604.

Hanzalová A, Sumíková T, Bartoš P (2009): Determination of leaf rust resistance genes *Lr10, Lr26* and *Lr37* by molecular markers in wheat cultivars registered in the Czech Republic. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 45: 79 – 84. Dedikace: MZE0002700604.

Hanzalová A, Dumalasová V, Sumíková T, Bartoš P (2007): Rust resistance of the French wheat cultivar Renan. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 43: 53-60. Dedikace: MZE0002700602, 1G58083.

2. *Pch1* gen

Dumalasová V, Palicová J, Hanzalová A, Bížová I, Leišová-Svobodová L (2015): Eyspot resistence gene *Pch1* and methods of study of its effectivness in wheat cultivars. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 51: 166 – 173. Dedikace: QJ1210189, RO0415.

Dumalasová V, Leišová-Svobodová L, Sumíková T, Bartoš P (2013): Odrůdová odolnost pšenice vůči stéblolamu. Úroda 6: 24 – 27. Dedikace: MZE0002700604, QJ1210189.

Hanzalová A, Dumalasová V, Palicová J, Bartoš P (2013): Chroroby bází stébel a kořenů pšenice z hlediska odrůdové odolnosti. Rostlinolékař 3: 12 – 14. Dedikace: QJ1210189, MZE0002700604.

3. *Rht geny*

Chrpová J, Štěrbová L, Trávníčková M, Šíp V (2016): Využití genů pro krátkostébelnost ve šlechtění pšenice. Úroda 64(6): 32 – 37. Dedikace: QJ1210189, RO0416.

Šíp V, Chrpová J, Žofajová A, Milec Z, Mihalik D, Pánková K, Snape JW (2011): Evidence of selective changes in winter wheat in middle-European environments reflected by allelic diversity at loci affecting plant height and photoperiodic response. Journal of Agricultural Science 149: 313 – 326. Dedikace: MZE0002700604.

Šíp V, Chrpová J, Žofajová A, Pánková K, Užík M, Snape JW (2010): Effects of specific *Rht* and *Ppd* alleles on agronomic traits in winter wheat cultivars grown in middle Europe. Euphytica 172 (2): 221 – 233. Dedikace: MZE0002700604.

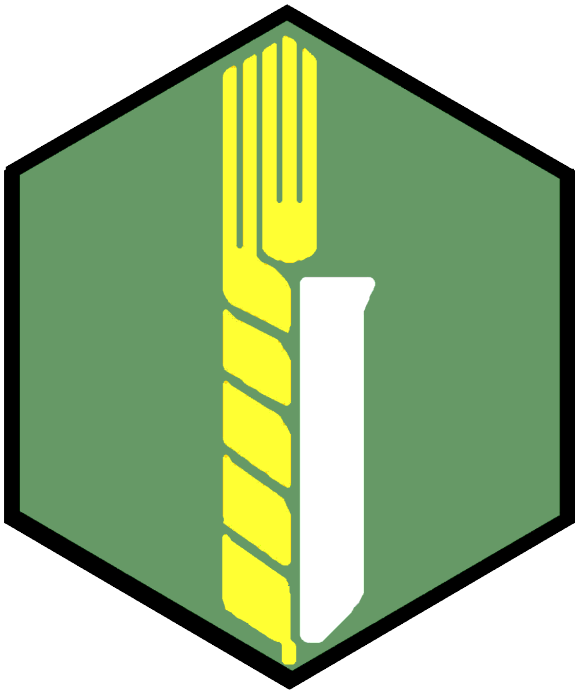
Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QJ 1210189 „Tvorba a identifikace nových zdrojů kombinované odolnosti k významným chorobám a škůdcům pšenice pomocí polních infekčních testů a molekulárních markérů“.

ISBN 978-80-7427-221-9

Náklad: 50 výtisků

Metodika je veřejně přístupná na www.vurv.cz



Výzkumný ústav rostlinné výroby. v.v.i. 2016