

## 1. Úvod

Řepka se v současné době řadí mezi sedm nejvýznamnějších olejnin pěstovaných ve světě. Podle serveru Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin byla produkce řepky v České Republice v roce 2005 775 tis. t. Význam této olejnin spočívá hlavně v obsahu oleje, který je výchozí surovinou pro velkou škálu výrobků, biomasa se spotřebovává jako zelené krmení, či hnojení, je výbornou předplodinou pro obiloviny a v neposlední řadě je řepka potravinářskou surovinou, která slouží k lidské výživě.

Pro dosažení maximálních výnosů a požadované kvality řepkového oleje je zásadní výběr vhodné odrůdy. Šlechtění řepky je dlouhodobý proces, který zahrnuje složitou selekci rostlin s vhodnými vlastnostmi. Z těchto důvodů je aplikace molekulárních markerů ve šlechtění řepky velmi přínosné. Obecně se pomocí molekulárních markerů dají detekovat rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými druhy, populacemi, klony, jedinci nebo buňkami a jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA. Molekulární markery jsou ve šlechtitelských programech využívány při sledování určitých genů v průběhu šlechtitelského procesu pomocí různých metod molekulární biologie. Dále slouží např. pro genetické mapování, populační genetiku a při studiu evoluce.

Cílem této bakalářské práce bylo využití metody PCR–RFLP pro detekci *S*-haplotypů u řepky a různých alel genu *SLG II*, které byly klonovány a sekvenovány. Tento gen se podílí na autoinkompatibilní reakci u řepky, která znemožňuje opylení rostliny vlastním pylem. Přítomnost různých alel tohoto genu určuje *S*-haplotyp, který je nezbytný pro rozlišení autoinkompatibilních linií. Dvě autoinkompatibilní linie s různým *S*-haplotypem mohou být použity pro tvorbu hybridní řepky s vyšším výnosem. Klasické stanovení *S*-haplotypů vzájemným sprašováním a hodnocením pomocí semenného testu je snadno ovlivnitelné vnějším prostředím a musí se několikrát opakovat. Výsledky molekulárních analýz by toto mohly určit spolehlivěji.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Šlechtění hybridní řepky

Řepka (*Brassica napus* var. *Arvensis*) vznikla spontánním křížením *B. oleracea* ( $2n=18$ ) s *B. campestris* ( $2n=20$ ), a je tedy amfidiploid. Je převážně samosprašná, ale s vysokým podílem cizosprašení (30-40%), což závisí i na aktivitě včel, na povětrnostních podmínkách v době kvetení i na genetické dispozici (Chloupek, 1995).

Pro získání a produkci hybridního osiva u řepky je nutné provést řízené opylení s využitím genové (jaderné), cytoplazmatické či cytoplazmaticko-genové (CMS) pylové sterility (Agritec.cz, 2006).

Pylová sterilita se využívá k produkci hybridního osiva. Díky pylové sterilitě odpadá nutnost ručního kastrování mateřských rostlin.

### 2.2 Řízené opylení

Pro zabránění samosprašení u řepky se využívá několika způsobů: jaderné samčí sterility (GMS), cytoplasmatické formy samčí sterility (CMS), genově-cytoplasmatické formy pylové sterility a autoinkompatibility (Ondřej a Drobník, 2002).

#### 2.2.1 Jaderná (genová) samčí sterilita (GMS)

Jaderná samčí sterilita je determinována převážně recesivní alelou jednoho genu *rf*, v praxi využitelné geny dominantního typu *Rf*, byly do řepky vneseny transformací pomocí bakterií rodu *Agrobacterium*, oba typy jsou sporofytického typu (Anonym1, 2006).

Po zkřížení pylově sterilních dominantních homozygotů s recesivními homozygoty tedy vznikají pylově sterilní heterozygoti. U řepky je nutné, aby rostliny F<sub>1</sub>- generace byly úplně fertillní, proto jeden z partnerů křížení musí obsahovat gen pro obnovu fertility, což umožňuje například systém barnáza-barstar (Ondřej a Drobník, 2002). Barnáza je RNáza z *Bacillus amyloliquefaciens*, která také produkuje inhibitor barnázy nazývaný barstar, což je malý protein o velikosti 89 aminokyselin. Mechanismus pylové sterility, navozené transgenozí, spočívá ve využití kódující sekvence pro barnázu, řízenou promotorem, specifickým pro tapetovou vrstvu buněk prašníků. Tapetum obklopuje pylový váček, v němž jsou pylové mateřské buňky a v průběhu vývoje pylových zrn degraduje. Tapetum produkuje mnoho proteinů, které napomáhají

vývoji pylu, nebo se dokonce stávají komponentami vnějších buněčných stěn pylových zrn. Předčasná degenerace tapeta, podmíněná transgenem, má za následek i degeneraci pylových zrn a to je podstatou pylové sterility. V následující generaci lze sterilitu odstranit, jestliže druhý rodič je homozygotní pro transgen, který kóduje protein barstar se stejným promotorem (Káš et al., 2004).

### 2.2.2 Cytoplazmatická sterilita

Cytoplazmatická pylová sterilita je kontrolována výlučně faktory přítomnými v cytoplazmě a vyskytuje se velmi vzácně. Cytoplazmaticko-jaderný typ pylové sterility je často označován jako cytoplazmatická samčí sterilita CMS (cytoplasmatic male sterility). Cytoplazmatické faktory samčí sterility (plazmotypy) spolupůsobí s jedním nebo i více párem alel, z nichž jedna je plazmon-senzitivní a s plazmotypem S dává pylově sterilní rostliny. Tato alela je většinou recesivní a označuje se *rf* nebo *ms*. Dominantní alela *Rf* obnovuje s plazmotypem S fertilitu, říká se jí proto obnovitel fertility (restorer) (Anonym1).

U řepky se vyskytuje několik druhů CMS, uvádí se jich 7, ale nejvýznamější jsou 4 typy: CMS nap, CMS pol, CMS jun, CMS ogu. Tyto 4 typy CMS mají původ ve vnitrodruhovém i mezidruhovém křížení, případně ve spontánní mutaci.

- **CMS nap** - nejznámější je tzv. systém „Bronowski“, který pochází z křížení odrůd ozimé a jarní řepky s polskou odrůdou „Bronowski“. Sterilitu pylu kontrolují dva jaderné geny (*rf1rf1*, *rf2rf2*). Systém je však nestálý, podléhá vlivu teploty vzduchu. Byl poprvé popsán Thompsonem v roce 1972, stejný typ objevili Shiga a Obkawa (Bartkowiak - Broda, 1991).
- **CMS pol** - byl objeven v populaci jarní řepky „Polima“ a je podmiňován genotypem *rf rf*, ale jsou známy i obnovitelé s *Rf* geny (Barsby, 1987).
- **CMS jun** - vykazuje vysokou stabilitu a možnost obnovy fertility.
- **CMS ogu** - pochází z japonské ředkve druhu *Raphanus sativus* (Ogura, 1968). Do řepky byla přenesena mezirodovým křížením po přenosu jádra druhu *B. oleracea* do cytoplasmu druhu *Raphanus sativus*.

V praktickém využití CMS nastává i nadále problém vhodných udržovatelů sterility a hlavně získání účinných obnovitelů fertility s *Rf* geny, bez negativního ovlivnění dalších znaků a vlastností (Graman, 1995).

### 2.3 Autoinkompatibilita (AI) u řepky

Pro heterozní šlechtění je nutné vyloučit samosprášení uvnitř linií. To je možné zajistit buď samčí sterilitou nebo autoinkompatibilitou (Chloupek, 1995). U řepky se přirozená autoinkompatibilní linie vyskytuje vzácně a navíc je u těchto linií autoinkompatibilita recesivního typu, což znesnadňuje šlechtění (Sobotka, 2001).

Autoinkompatibilita je u řepky sporofytického typu, reakci určuje celá otcovská rostlina, nejenom genotyp pylového zrna. Autoinkompatibilitu u řepky v roce 1953 popsal Olson jako úplnou inhibici vývinu pylových láček při samoopylení rostlin. Růst pylové láčky zastaví aktivní glykoproteiny na povrchu blizny. Každý glykoprotein je definován jednou *S*-alelou (Graman et al., 1999).

Systém AI je kontrolován sporofyticky úsekem DNA, tzv. *S*-lokusem s mnohačetným vzájemným působením mezi různými *S*-alelami (Bateman, 1955; Ockendon, 1974). *S*-alely u rodu *Brassica* jsou podle fenotypu rozděleny na skupinu alel s vysokým stupněm dominance (třída I.) a na skupinu považovanou za recesivní (třída II.) (Nasrallah et al., 1991).

*S*-lokus také obsahuje vysoce polymorfní geny, *SLG* a *SRK*. Zatímco *SRK* (*S*-locus receptor kinase, Stein et al., 1991) se jeví jako určující determinant specifčnosti samičí AI, gen *SLG* (*S*-locus glycoprotein, Nasrallah et al., 1985) je považován za prvek podporující funkci *SRK* (Suzuki T, 2000). Další významný gen účastnící se AI je *SCR* (*S* – locus cystein rich protein, Schopfer et al., 1999), někdy také nazývaný *SP11* (Suzuki et al., 1999).

*SRK* gen kóduje transmembránový protein. Exprimuje se v blizně a slouží jako klíčový gen pro rozpoznávací reakci a AI odpověď. Jeho nukleotidová sekvence je velice podobná genu *SLG* (Stein et al., 1991).

*SCR* gen je exprimován pouze v prašnicích. Jeho produktem je protein, který je považován za samčí determinant AI a produkují ho buňky tapeta. Váže se na protein *SLG* genu (PCP- pollen coat protein) a je lokalizován mezi geny *SLG* a *SRK* (Schopfer et al., 1999; Suzuki et al., 1999).

U genu *SLG* zatím není přesně známá jeho funkce, ale mohl by podporovat proces rozpoznání SCR nebo tento gen transportovat k cytoplazmatické membráně. Gen *SLG* není nezbytně nutný pro AI reakci (Takasaki et al., 2000). Gen *SLG* je dlouhý 1300 bp. Podle Takasaki et al. má gen *SLG* velice podobnou nukleotidovou sekvenci jako gen *SRK*.

## 2.4 Molekulární markery používané ve šlechtění řepky

### 2.4.1 Metody založené na PCR

Metoda PCR (Polymerase Chain Reaction - polymerázová řetězová reakce) byla popsána v roce 1984 (SAIKI et al., 1985).

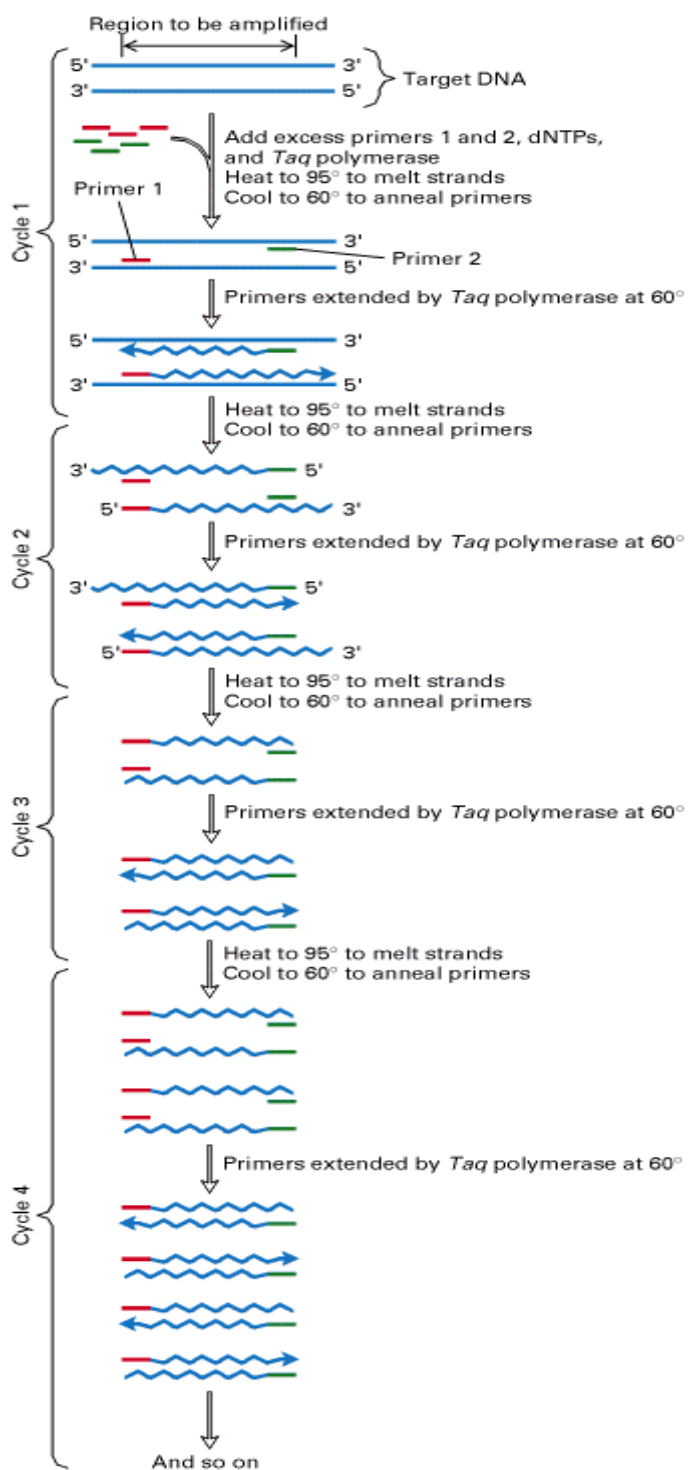
Zavedení a rychlý rozvoj této techniky na přelomu 80. a 90. let minulého století výrazně zjednodušil řadu protokolů používaných v molekulární biologii. PCR umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA v libovolném množství *in vitro*, což je jednou z jejích výhod (Šmarda et al, 2005).

Principem této metody (Obr.1) je amplifikace úseku jaderné DNA, pokud známe nukleotidové sekvence ležící v blízkosti naší cílové oblasti – tzv. primery. Primery jsou uměle nasyntetizované oligonukleotidy (10-30 bází dlouhé), které jsou komplementární k sekvencím *dsDNA*. Při PCR se cyklicky opakuje enzymová syntéza nových řetězců úseků *dsDNA* ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'- konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou řetězcích proti směru. K syntéze DNA se používá většinou *Taq* DNA-polymeráza, která byla poprvé izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* v roce 1968 Thomasem D. Brockem. Je specifická tím, že odolává vysokým teplotám, při nichž už DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů. PCR je proces při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu a fragmenty DNA se množí exponenciální řadou:

- ⇒ denaturace dvouřetězcové DNA při teplotě 94°C,
- ⇒ annealing ( neboli nasedání) primerů k odděleným řetězcům DNA (30-65°C),
- ⇒ syntéza nových řetězců DNA za použití DNA-polymerázy (65-75°C)

Tento proces se cyklicky opakuje 30-50x.

Obrázek č. 1: Polymerázová řetězová reakce (Anonym3)



Výsledným produktem PCR jsou amplikony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítky až tisíce bp. Po skončení PCR reakce se amplifikovaná DNA detekuje pomocí gelové elektroforézy (Šmarda et al., 2005).

#### 2.4.1.1 PCR-RFLP

Restriktion Fragment Length Polymorphism - polymorfismus délky restričních fragmentů

V některých případech se pro tuto metodu používá anglický název CAPS = Cleaved Amplified Polymorphic Sequences. Metodou PCR-RFLP se zjišťuje sekvenční polymorfismus stejně dlouhých PCR fragmentů. Takto se dají rozlišit různé alely jednoho genu nebo nekódujícího úseku, který se využívá jako marker, např. vnitřní transkribované spacery mezi geny pro ribozomální RNA (ITS). Princip metody PCR-RFLP spočívá v tom, že se pomocí PCR amplifikuje specifický fragment DNA (např. úsek genu), který se dále štěpí restriční endonukleázou. Rozpoznávací místo restriční endonukleázy musí být v místě odlišné nukleotidové sekvence tak, aby od sebe byly odlišeny dva úseky DNA lišící se například pouze v jedné bázi, nebo aby výsledkem byl co nejvyšší polymorfismus. Vznikají fragmenty různé délky, které jsou následně separovány na agarózovém gelu. Pro rozlišení vyššího polymorfismu se někdy používají různé restriční endonukleázy. Vizualizace se provádí pomocí ethidium bromidu. Výhodou této metody je její nenáročnost a možnost určení místa mutace. Mezi nevýhody patří to, že pravděpodobnost detekce mutace je relativně nízká a závisí na počtu použitých enzymů (Knoll a Vykoukalová 2005).

Této metody se taktéž využívá např. k charakterizaci odlišných S – alel u *Brassica napus*, či k restričnímu štěpení genu *SLG* amplifikovaného pomocí klasické PCR.

#### 2.4.1.2 RADP

Randomly Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA

Tato metoda patří mezi PCR techniky a poprvé byla publikována v roce 1990. Vytváří produkty, pro jedince, náhodně rozdělené v genomu templátové DNA (WILLIAMS a kol., 1990). RAPD (někdy označována jako AP-PCR= Arbitrarily Primed PCR) používá jeden nebo více krátkých primerů o délce 8- 12 nukleotidů libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA a málo přísné podmínky pro připojení primeru. Za těchto podmínek dochází k nasedání primeru

s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích DNA. Obvykle se vyskytne několik míst, která nejsou od sebe příliš vzdálená a umožňují připojení primerů na protilehlých řetězcích 3'-konci směřujícími k sobě. Výsledkem bude celá velká skupina amplifikovaných fragmentů, které se pak dále rozdělí na elektroforéze a vytvoří elektroforetický obraz charakteristický pro daný genom (Ondřej, 1999). Pro RAPD analýzu je vhodné optimalizovat všechny parametry, především koncentraci DNA, koncentraci hořčnatých iontů a primerů, podmínky PCR reakce (teplotu annealingu) a typ a množství termostabilní DNA polymerázy (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

Genomy příbuzných, ale často vzdálenějších druhů jsou velmi shodně organizovány. Většina proužků bývá shodná. Proto je třeba vyhledat primer, který vykazuje různou polohu proužků u třeba i velmi příbuzných organismů – polymorfismus. Soubor několika takových primerů charakterizuje např. odrůdu velmi přesně (Čurn a Sáková, 199).

#### **2.4.1.3 AFLP**

Amplified Fragment Length Polymorphism – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů

Základem této techniky, někdy také označované jako „fragmentová analýza“, je rozštěpení komplexní genomové DNA dvěma restričními endonukleázami, z nichž jedna rozpoznává delší cílové místo a druhá kratší. V dalším kroku se k oběma takto získaných fragmentů připojí dva různé adaptéry, krátké úseky DNA, které se na jednom konci párují s jednořetězcovými úseky DNA vzniklými štěpením jednou nebo druhou endonukleasou a zároveň obsahují každý svou vlastní specifickou sekvenci nukleotidů, která bude následně sloužit k přisednutí PCR-primerů. V dalším kroku se pomocí dvojice specifických primerů amplifikují všechny fragmenty DNA, které jsou na koncích opatřeny touto dvojicí adaptérů. PCR-primery jsou navrženy tak, že se mohou párovat s nukleotidy adaptérů, a zároveň na svém konci přesahují o jeden nukleotid délku adaptéru, takže se mohou párovat s jedním ze 4 možných nukleotidů fragmentu studované DNA. Díky tomuto přesahu se namplifikují všechny fragmenty, ale pouze ty, které mají na obou koncích správné nukleotidy. Amplifikuje se tedy v průměru každý 16. fragment. V dalším kroku se tento postup ještě jednou opakuje, ale PCR- primery zasahují o dva nukleotidy hlouběji do nitra amplifikovaných fragmentů a primer, který dosedá na adaptér je fluorescenčně značen. Díky tomu se ampifikuje každý 256.



fragment. Zároveň budou fluorescenčně značeny pouze ty fragmenty, které jsou alespoň na jednom konci ohraničeny cílovým místem pro vzácněji štěpící endonukleázou. Následně provedeme elektroforézu. Díky fluorescenčně označenému primeru můžeme velikost jednotlivých fragmentů zjistit pomocí kapilárové elektroforézy v automatickém sekvenátoru (Flegr, 2005).

Princip je založen na selektivní amplifikaci restričních fragmentů celého genomu. Postup se skládá ze tří základních kroků: 1. rozštěpení genomické DNA na fragmenty, na něž se naligují adaptory, 2. selektivní amplifikace fragmentů pomocí speciálních primerů a 3. elektroforéza produktů a počítačová analýza (PERKIN ELMER, 1995).

Použitím AFLP je tedy možno vizualizovat sadu restričních fragmentů pomocí PCR bez znalosti jejich nukleotidové sekvence. Polymorfismus je založen na ztrátě nebo získání restričních míst a je analogický s polymorfismem RFLP (Šmarda et al., 2005.)

#### **2.4.1.4 SSR- mikrosatelity**

Simple Sequence Repeats = Short Tandem Repeats – tandemová opakování krátkých motivů

Mikrosatelity jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů. Délka motivu je 2-, 3-, 4- nebo 6-bází. Jejich významnou vlastností je, že vykazují vysoký stupeň polymorfismu, který je způsobený variabilním počtem tandemových repetit ( obvykle 10-30). Díky metodě PCR a následném vizualizování na polyakrylamidovém gelu (PAGE) může být polymorfismus mikrosatelitů spolehlivě testován.

Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností SSR se používá k odlišení blízce příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi zejména v genetice populací (Šmarda et al., 2005).

Velkou výhodou této metody je její značná kapacita, tj. možnost současně zpracovávat velké množství vzorků, rychlost a nízká cena (Flegr, 2005).

### **2.4.2 Metody založené na hybridizaci**

#### **2.4.2.1 RFLP**

Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfismus délky restričních fragmentů

RFLP je metoda založená na restričním štěpení DNA pomocí restričních endonukleáz, elektroforetické separaci štěpů a hybridizaci se specifickou sondou (Southernův přenos). Mutace v restričním místě změni velikost restričních fragmentů a tedy i velikost proužků po hybridizaci (Čurn a Sáková 1996). Selektivní hybridizace umožní snazší interpretaci výsledků analýzy RFLP snížením počtu srovnávaných fragmentů, které lze využít i jako signální znaky při mapování genomu (Šmarda et al., 2005).

Metoda využívá restričních endonukleáz typu II, které se specificky váží na DNA.

## 2.5 Sekvenování

Tato metoda slouží k přesnému určení nukleotidové sekvence jakéhokoliv izolovaného fragmentu DNA. Na konci sedmdesátých let loňského století byly objeveny rychlé a jednoduché metody, z nichž nejpoužívanější jsou Maxam-Gilbertova metoda a Sangerova (Dideoxy) metoda. (Alberts et al., 2005).

a) Sangerova metoda byla pojmenována po svém objeviteli v roce 1977. Je také nazývána „dideoxy sekvenování“, protože zahrnuje použití 2 ,3-dideoxynukleotid trifosfátů (ddNTPs), které postrádají na svém 3'- konci hydroxylovou skupinu. V této metodě, jednovláknová (ss) DNA je osekvenována a slouží jako templát pro *in vitro* DNA syntézu; synteticky značený 5'-konec oligodeoxynukleotidu se používá jako primer. Sekvenovaný úsek DNA se rozdělí do čtyř částí a každá část obsahuje nízkou koncentraci dideoxynukleotid trifosfátů (ddNTP) (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) a navíc k tomu vyšší koncentraci volných deoxynukleotidů. V každé reakci je ddNTP náhodně připojen v pozici k odpovídajícímu deoxynukleotidu (dNTP). Přidání ddNTP ukončí polymeraci, protože nepřítomnost 3'- OH skupiny předejde přidání dalšího nukleotidu. Směs zakončených fragmentů se rozdělí souběžně na gelové elektroforéze; oddělené fragmenty jsou detekovány autoradiograficky (Lodish et al., 2005).

Sangerova metoda se používá častěji než metoda Maxam-Gilbertova, protože se dá touto metodou sekvenovat úsek o délce 500-800 kb. Její nevýdou je, že při čtení sekvence nečteme sekvenci původní DNA, ale sekvenci k ní komplementární.

b) Maxam-Gilbertova metoda- taktéž pojmenována po svých objevitelích, kteří tuto první metodu sekvenování vymysleli koncem 70. let. Metoda se používá k sekvenování DNA fragmentů obsahujících až 500 nukleotidů. Maxam-Gilbertova metoda využívá toho, že čtyři vzorky DNA jsou restričně štěpeny a vystaveny různým chemickým

reakcím, které selektivně štěpí DNA v různých specifických nukleotidech. DNA je na svých koncích značená. Získané fragmenty jsou odděleny gelovou elektroforézou a pouze koncově značená vlákna jsou následně vizualizována autoradiograficky. Sekvence původního koncově značeného restričního fragmentu může být stanovena přímo z paralelní elektroforézy čtyř jednotlivých reakcí (Lodish et al., 2005).

Důvod proč se této metody moc nevyužívá je několik, z nichž bych uvedla nutnost používání radioaktivně značených konců, přinášející vysokou úroveň radioaktivity.

Dnes je známa kompletní nukleotidová sekvence desítek tisíc genů, několika bakteriálních genomů a genomové DNA eukaryotního organismu kvasinky, octomilky, hlístice a v neposlední řadě také člověka (Alberts et al., 2005).

## 2.6 Klonování

Klonování jako takové má dva významy. Zaprvé, tímto termínem můžeme rozumět vytvoření mnoha identických kopií molekuly DNA a za druhé můžeme tento termín chápat jako proces izolace určitého úseku DNA (obvykle genu) z celkové buněčné DNA, který je usnadněn specifickou amplifikací požadovaného úseku. Pro mnoho aplikací technologie DNA je nutné klonovat (vytvořit identické kopie) úsek DNA. K tomu nám slouží rychle se dělící bakterie, které nám požadovaný úsek namnoží v relativně krátké době. Výhodou je, že při každé replikaci bakteriální DNA je zkopírována i naše DNA. Aby se cizorodá DNA v bakteriální buňce udržela, je pro její amplifikaci využít nosič neboli vektor, kterým je bakteriální plazmid nebo virový genom (Alberts, 2005).

Vznik metody byl umožněn studiem replikace plazmidů a bakteriofágů, objevením restričních endonukleáz a izolací ligázy, která vybrané kusy DNA zase spojuje (Lodish et al., 2005).

Klonování zahrnuje tři základní kroky:

1. Přípravu rekombinantní molekuly DNA;
2. Přenos rekombinantní molekuly do hostitelské buňky;
3. Selekcí klonů obsahujících rekombinantní DNA (Šmarda et al., 2005).

### 2.6.1 Vektory

Nejvíce jsou používány dva typy vektorů: plazmid *Escherichia coli* a bakteriofág  $\lambda$ . Plazmidové vektory se kopírují společně s hostitelskou buňkou, zatímco  $\lambda$  vektory se

replikují jako lytické viry tak, že zabijí hostitelskou buňku a zabalí DNA do virionu. Klonovací vektory sestávají ze tří základních částí: replikátor, struktury selekčního systému a restrikční místo (místa), umožňující snadnou inserci klonovaného fragmentu (Lodish et al., 2005).

## 2.6.2 Plazmidy

Plazmidy jsou kruhové, dvouvláknové DNA (dsDNA) molekuly, které jsou odděleny od buněčné chromozomální DNA. Tyto mimochromozomální DNA molekuly, které se přirozeně vyskytují v bakteriích, v jádře kvasinek a ve vyšších eukaryontních buňkách, existují v parazitním nebo symbiotickém vztahu s jejich hostitelskou buňkou. Plazmidy mohou být velké od několika tisíc párů bází (bp) až více než 100 kilobází (kb). Stejně jako chromozomální DNA je plazmidová DNA kopírována před každým buněčným dělením.

Tyto plazmidy byly upraveny a zkonstruovány pro použití jako vektorů v DNA klonování. Plazmidy nejběžněji užívané v rekombinantních DNA technologiích se kopírují v *E. coli*. (Lodish et al., 2005).

Ideální plazmid by měl mít následující vlastnosti:

- ◆ malou velikost; malé plazmidy se snadno izolují a v buňkách dosahují vysokého počtu kopií
- ◆ měly by mít schopnost snadného a účinného přenosu do hostitelských buněk a zároveň se v ní i replikovat a udržet cizorodou DNA při replikaci
- ◆ musí obsahovat replikátor (ORI=replication origin), což je specifická DNA sekvence o velikosti 50-100 bp a zajišťuje replikaci klonovacího vektoru v hostitelské buňce (Lodish et al., 2005)
- ◆ musí obsahovat geny, na základě jejichž fenotypového projevu lze buňky snadno selektovat, označují se jako selekční markery a jsou to geny, které buňkám propůjčují rezistenci k antibiotikům, např. k ampicilinu, tetracyklinu nebo chloramfenikolu
- ◆ musí nést vhodná klonovací místa, tj. jedinečná restrikční místa pro restrikční endonukleázy, do nichž se začleňuje cizorodá DNA; vektory většinou obsahují začleněné nukleotidové sekvence, označované jako polylinker (multiple cloning site), do tohoto místa lze vložit cizorodou DNA připravenou štěpením různými restrikčními enzymy (Šmarda et al., 2005).

### 2.6.3 Bakteriofág $\lambda$

Bakteriofág  $\lambda$  je pravděpodobně nejvíce studovaným bakteriálním virem. Jeho tělo se skládá z hlavy, ve které je obsažena virová genomová DNA a z bičíku, který infikuje hostitelskou buňku *E.coli* (Lodish et al., 2005).

U fága lambda není jeho střední třetina genomu nezbytná pro jeho lytický růst a lze ji tedy nahradit cizorodou DNA. Do fágových kapsidů lze *in vitro* zabalit rekombinantní DNA ohraničenou místy *cos* vzdálenými 37- 52 kb. Vektory z bakteriofága jsou přednostně používány ke klonování genomové DNA a cDNA (Šmarda et al., 2005).

### 2.6.4 Kosmidy

Jsou to vektory odvozené z plazmidů, do nichž byla naklonována místa *cos* bakteriofága lambda. Přítomnost míst *cos* umožňuje sbalení rekombinantní DNA, připravené začleněním cizorodé DNA do klonovacího místa kosmidu. Jejich prostřednictvím lze klonovat DNA o velikosti 32- 47 kb, jsou proto vhodné jako vektory ke konstrukci genových knihoven eukaryot (Šmarda et al., 2005).

### 2.6.5 YAC („yeast artificial chromosome“) vektory

Umělé kvasinkové vektory se replikují v buňkách *E.coli* a v kvasinkách. Vedle sekvencí bakteriálního plazmidu obsahují části kvasinkového chromozomu (centromeru, sekvence pro autonomní replikaci, dvě kvasinkové telomery a selektovatelné signální znaky). Výhodou klonování v těchto vektorech je jejich obrovská klonovací kapacita (několik stovek kb). Nevýhodou je nestabilita inzertů cizorodé DNA.

### 2.6.6 Transformace plazmidů do hostitelských buněk

Transformace je nejčastější způsob, při níž jsou bakteriální buňky nejprve uvedeny do stavu kompetence, jež se navodí působením chloridu vápenatého za nízké teploty nebo kapalným dusíkem. Kompetentní buňky jsou buňky, kterým se naruší jejich buněčná stěna a mohou přijmout cizorodou DNA. Po přidání DNA ke kompetentním buňkám a krátkém zahřátí na 42°C přechází transformující DNA do buněk. Transformované buňky se selektují na agarových plotnách obsahující příslušné antibiotikum (Šmarda et al., 2005).

## 2.6.7 Identifikace kolonií s rekombinantní DNA

**2.6.7.1 Metoda negativní selekce:** na klonovacím plazmidu jsou umístěny dva geny zodpovědné za rezistenci k určitým antibiotikům (Atb), přičemž v jednom je klonovací místo. Vnesením cizorodé DNA do hostitelské buňky způsobíme inaktivaci tohoto genu, a proto se buňky nesoucí plazmid stávají citlivé k tomuto Atb. Buňky obsahující plazmid bez cizorodé DNA zůstávají rezistentní.

Pokud používáme např. gen rezistentní k tetracyklinu a k ampicilinu (Amp), ve kterém je klonovací místo, pak se buňky vysejí na plotny s tetracyklinem a na těchto plotnách vyrostou všechny transformované buňky. Vyrostlé kolonie přepícheme na plotny s ampicilinem, na kterém nevyrostou buňky obsahující rekombinantní plazmid, protože gen pro Amp byl přerušen. Tyto kolonie pak vyhledáme na plotně s tetracyklinem a používáme k dalšímu množení.

Nejčastěji používaným plazmidem pro negativní selekci je plazmid pBR322 (Bolivar et al., 1977). Byl vytvořen z divoké *E.coli*, má ampicilinovou a tetracyklinovou rezistenci, obsahuje čtyři unikátní restrikční místa. Další používaný plazmid je ColE1 (Dougan et al., 1978). Buňky nesoucí tento plazmid produkují proteiny pro imunitu představující imunitu hostitele k smrtícím účinkům. Má jedno unikátní místo pro *EcoRI*. Na jednu buňku připadá až 15 kopií. Prodává se pod obchodní zkratkou JC411.

**2.6.7.2 Metoda pozitivní selekce:** vektor nese krátký segment laktóзовého operonu *E.coli* obsahující regulační sekvence a část genu kódující  $\beta$ -galaktozidázu (*lacZ*), jehož expresí vzniká N-koncový fragment, označován také jako  $\alpha$  fragment. Vektory tohoto typu jsou používány v hostitelských buňkách *E.coli*, které kódují C-koncový fragment, označovaný též zadní  $\omega$ -část,  $\beta$ -galaktozidázy. Tyto fragmenty se mohou spojovat za vzniku enzymově aktivního proteinu. Bakterie, do nichž je přenesen vektor bez inzertu, tvoří aktivní  $\beta$ -galaktozidázu, jejíž tvorbu lze prokázat na plotnách s chromogenním substrátem X-gal. Jeho rozkladem  $\beta$ -galaktozidázou vzniká produkt zbarvující bakteriální kolonie modře. Inzerce cizorodé DNA inaktivuje N-koncový fragment enzymu a nedojde ke komplementaci a kolonie s rekombinantním plazmidem jsou pak bílé. Indukce tvorby  $\beta$ -galaktozidázy je zajištěna izopropyl- $\beta$ -D-tiogalaktozidem (IPTG), který se přidává do živného média (Šmarda et al., 2005).

Pro pozitivní selekci používáme plazmidy: pUC18, pUC19, Bluescript (Anonym4), pGem:

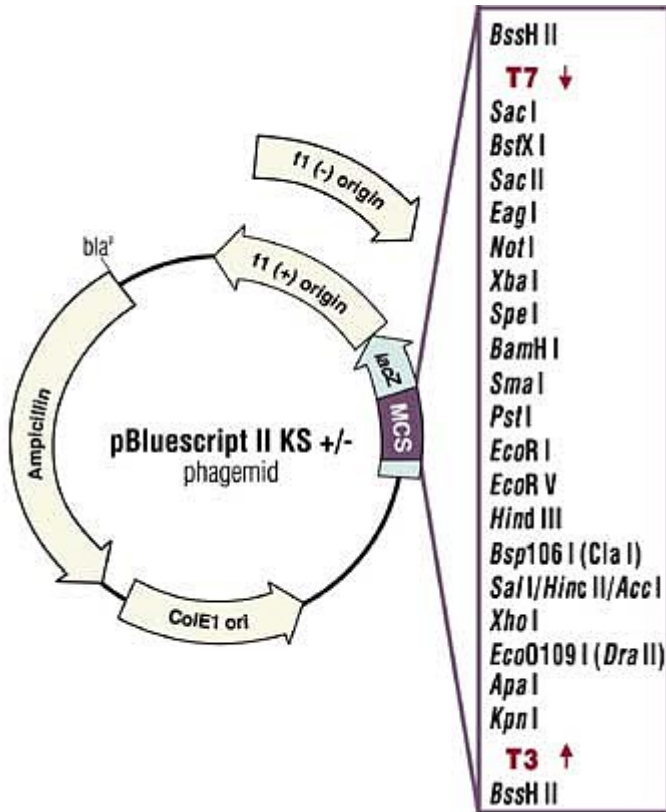
- ✓ pUC18 (Yannisch-Perron et al., 1985): obsahuje stejná klonovací místa v *lacZα* jako plazmid M13
- ✓ pUC19 (Yannisch-Perron et al., 1985): podobný plazmidu pUC7, ale obsahuje jiná unikátní restrikční místa v *lacZα*, má ampicilinovou rezistenci.

### **Obrázek č. 2: Vektor pBluescript (Anonym4)**

Plazmid pBluescript je příkladem pravděpodobně nejčastěji používaného tradičního vektoru, umožňujícího různé typy manipulací s vloženou cizí DNA. Protože obsahuje replikační začátek vláknitého fága f1, je označován jako fasmid, v bakterii se ale chová jako normální plazmid. Obrázek dole ukazuje hlavní genetické elementy, ze kterých se skládá:

- ⇒ gen pro rezistenci k antibiotiku Ampicilinu,
- ⇒ replikační začátek *Col E1 ori* pro bakteriální replikaci,
- ⇒ replikační začátek *f1 ori* pro tvorbu jednovláknové DNA při koinfekci hostitelské bakterie tzv. pomocným fágem,
- ⇒ část genu pro beta-galaktosidázu *lacZ* pro tzv. modro/bílou neboli pozitivní selekci
- ⇒ uvnitř tohoto genu tzv. mnohočetné klonovací místo (*angl.* MCS = multiple cloning site), ve kterém lze štěpit fasmid různými restrikčními endonukleázami (zkratky uvedeny v seznamu vpravo)
- ⇒ po stranách mnohočetného klonovacího místa promotory pro *in vitro* transkripci pomocí DNA-polymeráz z bakteriofágů T7, příp. T3

Tento vektor je k dispozici v různých variantách a produkuje ho například firma Stratagene.





### **3. Materiál a metody**

#### **3.1 Materiál**

Pro tuto práci byly použity autoinkompatibilní linie START, Tandem6/85, AIK3, Tandem 1/85, Catty, Liropa, Tandem AIK6 a odrůdy Global, Ramiro, Rasmus, Local

V průběhu analýz se ukázalo, že u linií Catty a Tandem AIK6 došlo k nežádoucímu cizosprášení a jsou tedy autokompatibilní.

#### **3.2 Metody**

##### **3.2.1 Izolace genomové DNA (Invisorb Spin Plant Mini Kit – Invitek)**

1. 60 mg rostlinného materiálu se homogenizuje v tekutém dusíku
2. přidat 400  $\mu$ l lyzačního pufru P a 20  $\mu$ l proteinázy K, zvortexovat a 30minut inkubovat při 65°C
3. převést lyzační roztok na kolonku, centrifugovat 1 min. při 12000 rpm
4. k filtrátu přidat 200  $\mu$ l vázacího pufru a důkladně zvortexovat
5. přenést suspenzi na kolonku a inkubovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát
6. přidat 550  $\mu$ l promývacího pufru I a centrifugovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát
7. přidat 550  $\mu$ l promývacího pufru II a centrifugovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát, tento krok opakovat 2x a nakonec centrifugovat 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění zbývajících ethanolu
8. kolonky s navázanou DNA dát do nových 1,5ml eppendorfek, přidat 100  $\mu$ l elučního pufru D, který je předehřátý na 65°C, 3 min. inkubovat, centrifugovat 2 min. při 12000 rpm

##### **3.2.2 Izolace plazmidové DNA (Invisorb Spin Plastid Mini Kit – Invitek)**

1. 2  $\mu$ l plazmidové DNA centrifugovat 1 min. na maximální rychlost, odstranit důkladně supernatant
2. nesuspendovat pelet ve 200  $\mu$ l nesuspendačního roztoku
3. přidat 200  $\mu$ l alkalického lyzačního roztoku, 5x převrátit eppendorfku a nechat lyzovat 5 min.

4. přidat 200  $\mu$ l neutralizačního roztoku, 4-6krát převrátit eppendorfku, centrifugovat 5 min. na maximální rychlost
5. přenést čirý supernatant 200  $\mu$ l na kolonku, přidat 200  $\mu$ l vázacího roztoku, jednou převrátit, centrifugovat 1 min. při 8000 rpm, slít filtrát
6. přidat 750  $\mu$ l promývacího pufru, centrifugovat 1 min. při 8000 rpm, slít filtrát
7. centrifugovat 3 min. na plnou rychlost kvůli odstranění ethanolu
8. kolonky s navázanou DNA dát do nových 1,5 ml eppendorfek, přidat 50  $\mu$ l sterilní vody, inkubovat 1 min., centrifugovat 1 min. při 8000 rpm

### **3.2.3 Eluce fragmentů DNA z agarózového gelu (JETQUICK)**

1. z agarózového gelu vyříznout bloček s požadovaným fragmentem DNA
2. na každých 100 mg gelu přidat 300  $\mu$ l roztoku L1, inkubovat při 50° C 15 min., každé 3 min. protřepávat
3. roztok přenést do kolonek, centrifugovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát
4. přidat 500  $\mu$ l roztoku L2, centrifugovat 1 min. při 12000 rpm, slít filtrát
5. kolonky s navázanou DNA dát do nových 1,5 ml eppendorfek, přidat 50  $\mu$ l sterilní vody, centrifugovat 1 min. při 12000 rpm

### **3.2.4 Klonování (Topo TA cloning for sequencing kit – Invitrogen)**

#### **1. den**

1. 2  $\mu$ l PCR produktu (nesmí být starší než jeden den) + 0,4  $\mu$ l Salt solution.
2. zamíchat, nechat stát 5 min. (větší PCR produkty 20 – 30 min.) při pokojové teplotě
3. přidat 17  $\mu$ l kompetentních buněk *E. coli* uříznutou špičkou, zamíchat
4. 30 min. nechat stát na ledu (je možné i skladování přes noc při -20°C)
5. tepelný šok – 30 s ve vodní lázni při 42° C bez míchání a pak 2 min. na ledu
6. přidat 150  $\mu$ l temperovaného SOC media, promíchat, nenasávat
7. 1 hod. třepat při 37° C v hnízdě

8. mezitím rozetřít na misky s LB médiem 40  $\mu$ l Xgal (sterilní hokejkou) a dát na misky a temperovat na 37° C
9. vylít na misky buňky a pečlivě rozetřít
10. nechat kultivovat při 37° C

## 2. den

1. vypíchnout 2 bílé kolonie (obsahují plazmid s produktem) + 3 ml LB media + 12  $\mu$ l AMP
2. kultivovat 16 hod. při 37° C přes noc

## 3. den

1. odebrat 850  $\mu$ l kultury + 150  $\mu$ l glycerolu, zamrazit při -80° C pro dlouhodobé uchování
2. izolace plazmidu kitem
3. vyštěpení plazmidu z vektoru *Eco RI*, elektroforéza

### **3.2.5 Sekvenační reakce (CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit – Beckman Coulter)**

dH <sub>2</sub> O (doplnit na objem 20 $\mu$ l)	0-9,5 $\mu$ l
325 ng plazmidové DNA (do 5 kbp)	0,5-10,0 $\mu$ l
1,6 $\mu$ M primer (M13 reverse, T7)	2,0 $\mu$ l
DTCS Quick Start Master mix	8,0 $\mu$ l

Denaturace plazmidu před přidáním do reakce: 86° C 5 min., 20° C 1 min.

Cyklus: 96° C 20 s

50° C 20 s

60° C 4 min.

Celkem se opakuje 30 cyklů.

### **3.2.6 Přečištění sekvenační reakce:**

1. připravit čerstvý roztok stop pufru před každým přečištěním, složení na jednu reakci: 2  $\mu$ l 100 mM EDTA, 2  $\mu$ l 3M octanu sodného (pH 5,2), 1  $\mu$ l glykogenu
2. přidat 60  $\mu$ l chlazeného 96% ethanolu
3. centrifugovat 15 min. při 14000 rpm a při 4° C
4. pipetou odsát supernatant a přidat 200  $\mu$ l chlazeného 70% ethanolu, 5 min. při 14000 rpm a při 4° C
5. pipetou odsát supernatant a pelet nechat uschnout na vzduchu

### **3.2.7 PCR pro SLG II**

H <sub>2</sub> O	18,4 $\mu$ l
Pufr	2,5 $\mu$ l
DNT's	2,0 $\mu$ l
Primery PS <sub>21</sub> + PS <sub>3</sub>	0,2 $\mu$ l + 0,2 $\mu$ l
Taq polymeráza	0,2 $\mu$ l
DNA – templát	1,5 $\mu$ l

Cyklus: 35x

Denaturace 93°C 1 minuta

Annealing (nasedání primerů) 58°C 2 minuty

Elongace (syntéza řetězce) 72°C 3 minuty

Počáteční denaturace je 93°C 5 minut a konečná elongace 72°C 10 minut.

### **3.2.8 Restrikční štěpení**

Restrikční štěpení se provádí podle instrukcí v příbalovém letáku jednotlivých enzymů. Většinou provádíme štěpení s 20  $\mu$ l produktu PCR a 5 U enzymu, reakce probíhá přes noc.

### 3.2.9 Příprava agarózového gelu

Tabulka č.1: složení 1,5% agarózového gelu

objem	agaróza	5 × TBE	voda	ethidium bromid
50 ml	0,75 g	10 ml	40 ml	1,5 µl
100 ml	1,5 g	20 ml	80 ml	2 µl
200 ml	3,0 g	40 ml	160 ml	4 µl

Tabulka č.2: složení 1,0 % agarózového gelu

objem	agaróza	5 × TBE	voda	ethidium bromid
50 ml	0,50 g	10 ml	40 ml	1,5 µl
100 ml	1,0 g	20 ml	80 ml	2 µl
200 ml	2,0 g	40 ml	160 ml	4 µl

- ⇒ rozvařit v mikrovlnné troubě, nesmí být vidět vlákna
- ⇒ připravit vanu a hřebeny
- ⇒ zchladit (cca 60°C)
- ⇒ přidat Ethidium bromid
- ⇒ nalít a odstranit bubliny

Elektroforéza probíhá podle potřeby, obvykle 2 hod při napětí 90 V.

Složení 5 × TBE (1 l) pufu

Tris 54 g

k. boritá 27,5 g

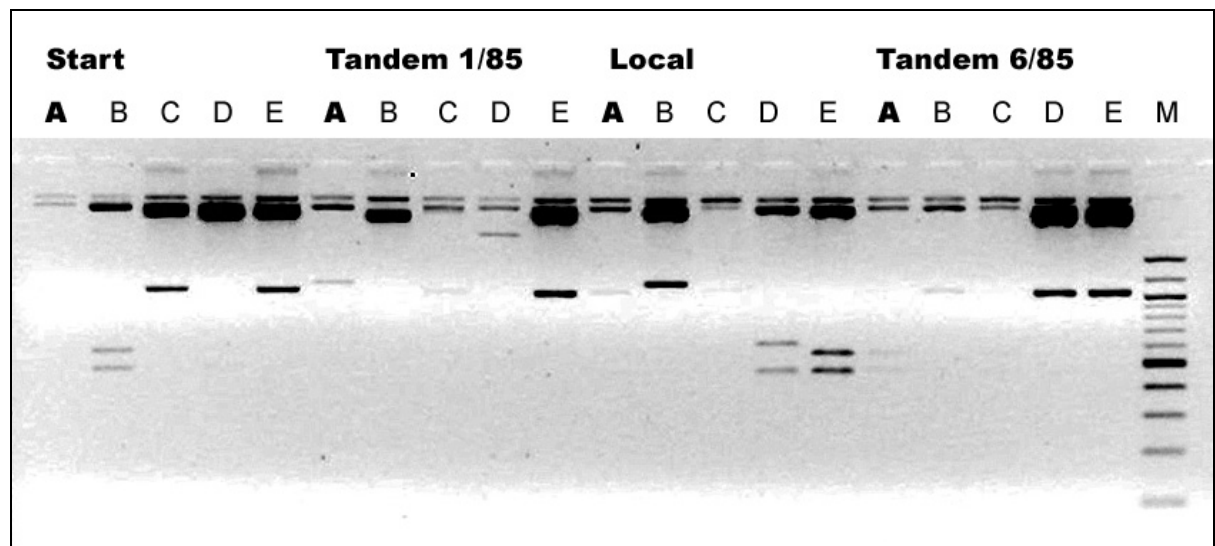
0,5 M EDTA (pH=8,0) 20 ml

## 4 Výsledky

Pomocí specifických primerů pro gen *SLG* třídy II byly amplifikovány fragmenty přibližné velikosti 1100 bp u autoinkompatibilních linií řepky a některých odrůd. Fragment předpokládané velikosti 1100 bp byl po elektroforetické separaci vyříznut z agarózového gelu, přečištěn a klonován pomocí plazmidového vektoru v *Escherichia coli*. Získané kolonie obsahující inzert genu *SLG* II představovaly směs klonů různých alel genu *SLG* II. Kontrola úspěšnosti klonování byla provedena pomocí restričního štěpení enzymem *EcoR* I (obr.1). Tímto enzymem se rovněž štěpily některé alely, což sloužilo také pro selekci klonů. Podle obr.1 vykazovala linie Start dvě různé alely, Tandem 1/85 dvě alely, Local tři alely a Tandem 6/85 dvě alely. Selektce klonů ostatních linií a odrůd byla hodnocena obdobně.

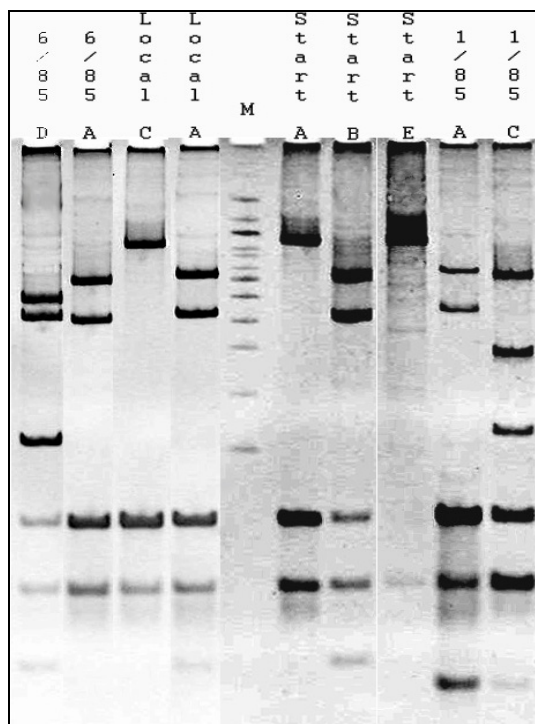
**Obr. 3. Ukázky klonování genu *SLG* II ze čtyř AI linií.** Úspěšnost klonování byla ověřována restričním štěpením za pomoci enzymu *EcoR*, který má na klonovacím plasmidu pCR 4-TOPO dvě unikátní restriční místa ohraničující PCR produkt. Na fotografii je zhruba 4 kb fragment plasmidu s různou mobilitou a další fragmenty, které odpovídají genu *SLG* II. Protože alely genu *SLG* II mohou obsahovat také restriční místo pro enzym *EcoR* I, můžeme po tomto štěpení rozlišovat i klony obsahující různé alely genu *SLG* II.

U linie Start a Tandem 1/85 byly rozlišeny 2 alely, u linie Local 3 alely a u linie Tandem 6/85 2 alely.



Další selekce klonů byla provedena restričním štěpením PCR klonů pomocí enzymu *Afa* I (obr. 4). Tímto enzymem bylo možné rozlišit další klony, které vypadaly po štěpení

enzymem *EcoRI* stejně. Pro PCR byly vybrány pouze klony, které obsahovaly inzert.



**Obr. 4 PCR-RFLP genu *SLG II* AI linie Tandem 1/85, Tandem 6/85, Start a Local za použití restriktázy *Afa I*** Zaklonované alely genu *SLG II* byly naamplifikovány a rozštěpeny enzymem *Afa I*. U AI linií Tandem 6/85, Tandem 1/85 a Local byly rozlišeny 2 alely. U AI linie Start byly rozlišeny 3 alely.

Podle obr. 3 a 4 se linie Start B, Tandem 1/85 A, Local A a Tandem 6/85 A po štěpení enzymem *Afa I* štěpily stejně, zatímco linie Start B a Tandem 6/85A se po štěpení enzymem *EcoR I* štěpily rozdílně, z toho se dá usoudit, že se u těchto linií jedná o jiný délkový polymorfismus.

Tyto dva obrázky sloužily jako názorná ukázka toho, jak byla provedena selekce klonů. V praktické části se prováděla selekce všech klonů uvedených v použitém materiálu. Všechny klony od každé AI linie nebo odrůdy, které vypadaly odlišně byly poté sekvenovány na sekvenátoru ABI Prism. Sekvenovány byly také klony, které se jevily po PCR-RFLP stejně, protože po sekvenování prvních vzorků bylo patrné, že v sekvencích existuje určitá odlišnost. Sekvence byly upravovány a hodnoceny v programu BioEdit. Pro nízkou koncentraci plazmidů se zatím podařilo získat pouze 31 sekvencí genu *SLG II* autoinkompatibilních linií a různých odrůd řepky.

Po srovnání jednotlivých sekvencí byly zjištěné časté nukleotidové substituce, delece a inserce (příloha 1). U třech sekvencí byly zjištěny poměrně velké inserce, okolo 50 bp, v oblasti nasedání primeru. Jsou to duplikované úseky oblastí primeru spojené krátkými sekvencemi nukleotidů. Kromě jednobázových substitucí se v sekvencích také vyskytují krátké, přibližně 2-4 bp dlouhé substituované úseky a je zde přítomný jeden úsek o velikosti 33 bp, kde se vyskytuje délkový polymorfismus. Rovněž jsou zde zastoupeny

značně konzervní úseky, z nichž nejdelší má 40 bp. Výraznější změny mezi sekvencemi genu *SLG II* AI linií a odrůd řepky nebyly zjištěny.

Na základě informací o sekvencích daných klonů byla sestavena tabulka (tab. 3), kde jsou uvedeny pozice štěpných míst a počty restričních fragmentů pro enzymy *EcoR I* a *Afa I*. Enzym *EcoR I* má v genu *SLG II* víceméně konzervativní pozici pro jedno štěpné místo, které se vyskytuje u části sekvenovaných klonů. Údaje z tabulky 3 byly použity k sestavení devíti odlišných skupin (tab. 4), které by odpovídaly rozlišení pomocí PCR-RFLP a agarózovém gelu, který se k této analýze rutinně používá.

**Tabulka 3. Pozice štěpných míst pro restriční endonukleázy u jednotlivých sekvenovaných klonů.** V tabulce jsou shrnuty pozice štěpných míst pro restriční endonukleázy pro enzymy *EcoR I* a *Afa I*, které byly získány z po analýze sekvencí.

Analyzovaná sekvence	Frekvence <i>Afa I</i>	Pozice	Frekvence <i>EcoR I</i>	Pozice
AIK6-3	3	11, 64, 657	neštěpí	neštěpí
Liropa-1	3	11, 372, 604	neštěpí	neštěpí
1/85-E	2	11, 604	neštěpí	neštěpí
Liropa-6	1	11	neštěpí	neštěpí
Start-C	1	11	neštěpí	neštěpí
AIK3-B	1	11	neštěpí	neštěpí
Start-A	1	11	neštěpí	neštěpí
Rasmus-34	2	10, 603	1	550
Rasmus-16	1	10	neštěpí	neštěpí
Rasmus-5	2	11, 604	1	551
Rasmus-11	2	11, 34	neštěpí	neštěpí
Liropa-5	2	11, 34, 604	1	551
Local-B	5	11, 34, 604, 1044, 1097	neštěpí	neštěpí
1/85-4	2	11, 1044	neštěpí	neštěpí
Local-E	3	11, 34, 603	1	550
6/85-E	3	11, 34, 604	neštěpí	neštěpí
Start-B	3	11, 34, 602	1	549
Liropa-3	3	11, 34, 604	neštěpí	neštěpí
6/85-D	4	11, 34, 155, 604	neštěpí	neštěpí
Rasmus-30	3	11, 34, 604	neštěpí	neštěpí
Rasmus-23	2	11, 604	1	551
Rasmus-22	2	12, 605	1	552
Ramiro-5	1	12	neštěpí	neštěpí
Cathy-2	2	8, 31	neštěpí	neštěpí
Cathy-4	2	10, 603	1	550
Cathy-6	2	10, 603	neštěpí	neštěpí
Rasmus-1	2	11, 604	1	551
6/85-5	2	10, 603	1	550
6/85-2	1	12	neštěpí	neštěpí
Global-A	4	11, 597, 604, 730	neštěpí	neštěpí
AIK6-2	2	11, 604	neštěpí	neštěpí



**Tabulka 4. Rozdělení do skupin na základě rozlišitelnosti metodou PCR-RFLP na agarózovém gelu.** K sestavení tabulky byly použity sekvence, ze kterých byla odvozena štěpná místa pro enzymy *EcoR* I a *Afa* I. Podle předpokládaných možností rozlišitelnosti na agarózovém gelu bylo stanoveno devět skupin (označení A' - I').

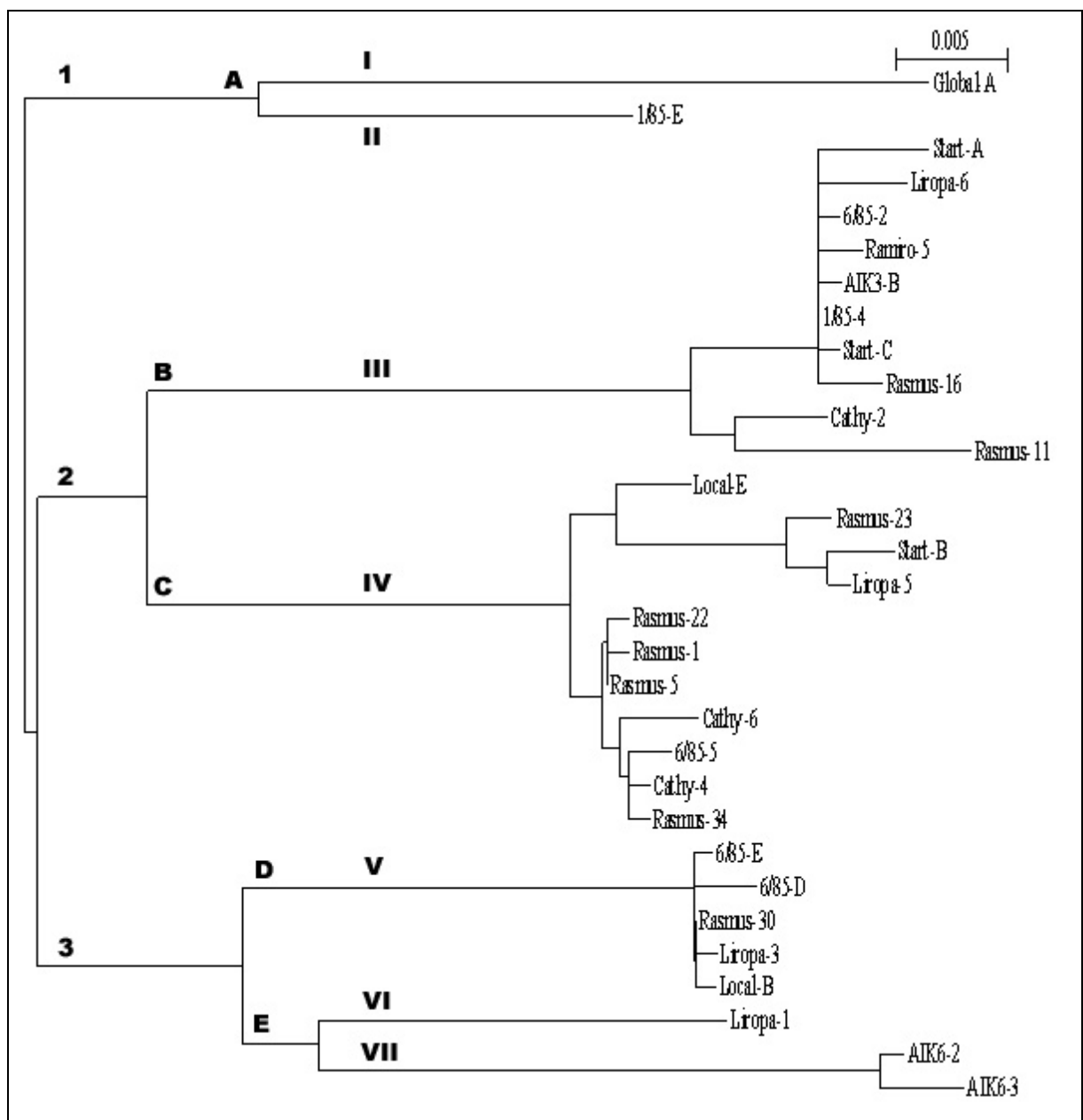
Skupina	Pozice štěpení <i>Afa</i> I	Frekvence štěpení	Pozice štěpení <i>EcoR</i> I	Analyzovaná sekvence
A'	8-34	1; 2	neštěpí	Liropa-6, Start-C, AIK3-B, Start-A, Ramiro-5, 6/85-2, Rasmus-16; Rasmus-11, Cathy-2
B'	11, 34, 604; 11, 34, 604, 1044, 1097	3; 5	neštěpí	6/85-E, Liropa-3, Rasmus-30; Local-B
C'	11, 34, 155, 604	4	neštěpí	6/85-D
D'	11, 372, 604	3	neštěpí	Liropa-1
E'	11, 64, 657	3	neštěpí	AIK6-3
F'	11, 597, 604, 730;	4	neštěpí	Global-A
G'	10-11, 603- 604	2	neštěpí	Cathy-6, 1/85-E, AIK6-2
H'	10-34, 602- 604	2	549-552	Liropa-5, Local-E, Start-B, Rasmus-22, Rasmus-1, Rasmus-5, Rasmus-23, Rasmus-34, Cathy-4, 6/85-5
I'	11, 1044	2	neštěpí	1/85-4

Sekvence byly upraveny v programu BioEdit a statisticky vyhodnoceny metodou Neighbor Joining v programu Phylip, kterým byl také vytvořen fylogenetický strom. Sekvence byly rozděleny do třech velkých skupin (1-3), které byly rozděleny na 5 podskupin (A-E). Skupiny A a E byly pak dále rozděleny na dvě (označení I-VII).

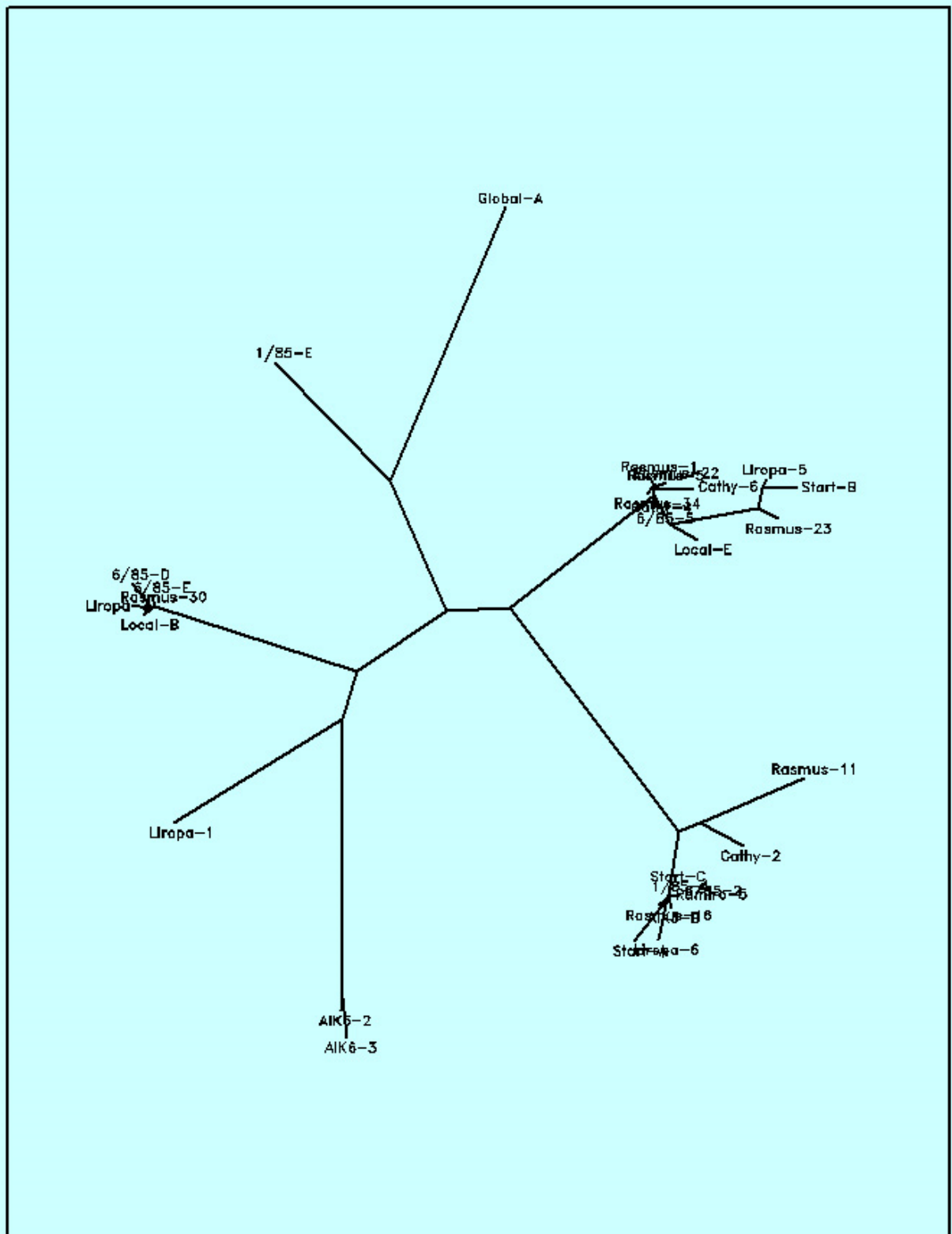
Devět skupin (A'-I') odvozených od PCR-RFLP jsem poté porovnávala s kladogramem vytvořeným na základě analýzy sekvencí. Tři hlavní skupiny sekvencí podle PCR-RFLP rozdělení (A', B', H') odpovídaly třem velkým skupinám kladogramu (B, D, C). Nicméně v každé skupině se vyskytly odlišnosti v zařazení. Ve skupině B podle kladogramu byl zařazen jinak klon 1/85-4, ve skupině D klon 6/85-D a ve skupině C klon Cathy 6. Dále se vyskytly odlišnosti ve skupině E kladogramu, kde byly zařazeny 3 klony, které podle metody PCR-RFLP byly zařazeny do samostatných skupin (D', G', E'). U klonů Cathy-6, 1/85-E a AIK6-2 došlo pomocí metody PCR-RFLP k zařazení do jedné skupiny (G'), zatímco podle kladogramu se nacházejí ve třech různých skupinách (A, C, E). Klon 1/85-4 byl podle PCR-RFLP v samostatné skupině I', ale v kladogramu náležel do skupiny B. Stejně tomu bylo i u klonu 6/85-D, který se podle PCR-RFLP řadil ke skupině C', ale

podle kladogramu byl zařazen do skupiny D. Klon Global-A náleží podle metody PCR-RFLP do skupiny F' a v kladogramu ho řadíme do skupiny A, takže byl od ostatních odlišen oběmi metodami. V programu Phylip byl vytvořen další kladogram (obr. 4) a zde byly patrné tři větve zahrnující většinu klonů genu *SLG II*, které jsou od sebe dostatečně vzdálené. Klony byly od ostatních zcela oddělené, z nichž 1 větev obsahovala 2 velmi podobné klony (AIK6-2, AIK6-3).

**Obr. 5. Kladogram klonů genu *SLG II* 31 AI linií a odrůd.** Fylogenetický strom byl vytvořen metodou Neighbor Joining v programu Phylip. Sekvence byly rozděleny do třech velkých skupin (1-3), které byly rozděleny na 5 podskupin (A-E). Skupiny A a E byly pak dále rozděleny na dvě (označení I-VII).



**Obr. 6. Kladogram klonů genu *SLG II* 31 AI linií a odrůd vytvořený programem *Phylip*. Na obr. 6 je ukázka dalšího kladogramu, na kterém jsou lépe znázorněny skupiny klonů genu *SLG II*. Sekvence klonů byly rozděleny do sedmi odlišných větví. Tři z větví obsahovaly shluk na základě sekvencí podobných klonů**



## 5 Diskuse

Získáno bylo celkem 31 sekvencí genu *SLG* II autoinkompatibilních linií a různých odrůd řepky. Po srovnání jednotlivých sekvencí byly zjištěné poměrně časté nukleotidové substituce, delece a inserce. U třech sekvencí byly zjištěny poměrně velké inserce, okolo 50 bp, v oblasti nasedání primeru. Jsou to duplikované úseky oblastí primeru spojené krátkými sekvencemi nukleotidů. Kromě jednobázových substitucí se v sekvencích také vyskytují krátké, přibližně 2 - 4 bp dlouhé substituované úseky a je zde přítomný jeden úsek o velikosti 33 bp, kde se vyskytuje délkový polymorfismus. Rovněž jsou zde zastoupeny značně konzervní úseky, z nichž nejdelší má 40 bp. Výraznější změny mezi sekvencemi genu *SLG* II AI linií a odrůd řepky nebyly zjištěny.

Aminokyselinová sekvence *SLG* genů je velice polymorfní, ale vždy má v podobné pozici 12 cysteinů. Na každém aminokyselinovém řetězci je několik potenciálních N-glykosylačních míst, z toho 2 místa jsou konzervovaná (Kusaba et al., 1997).

Ze získaných sekvencí byl vytvořen fylogenetický strom metodou Neighbor-joining, kde bylo rozlišeno 7 různých skupin sekvencí. Tyto jsou navíc součástí třech velkých skupin, které by se mohly lišit ve specificitě a mohly by představovat různé alely. Zatím není zřejmé, zda bylo identifikováno 7 různých skupin alel nebo pouze 3 a ostatní rozdíly mezi sekvencemi představují pouze postupnou diferenciaci jednotlivých alel při vzniku nových *S*-haplotypů v populaci. U *B. oleracea* a *B. rapa* byly nalezeny velmi podobné *S*-haplotypy (Kusaba a Nishio, 1999) a také byla prokázána společná specificita pro rozpoznání vlasního pylu mezi těmito druhy pomocí křížení s mezidruhovými hybridy, využití transgenozie a použitím rekombinantních proteinů SP11 (Kimura et al., 2002; Sato et al., 2003). Kimura et al., 2002 předpokládá, že stejná rozpoznávací specificita zůstala zachována i po rozdělení obou druhů.

Na základě těchto výsledků byl odhadnut *S*-haplotyp u třech odrůd a jedné AI linie. Pro stanovení přesného *S*-haplotypu by bylo nutné sekvenovat alespoň 10 klonů od každé linie či odrůdy. Toto se zatím nepodařilo a bude to cílem mé další práce.

PCR-RFLP je jednou z nejpoužívanějších metod pro rozlišení *S*-haplotypů. Využívá se pro analýzu polymorfismu třech důležitých *S* genů: *SLG*, *SRK* a *SCR*, které leží na *S*-lokusu (Brace et al., 1993; Brace et al., 1994; Nishio et al., 1996; Park et al., 2001; Park et al., 2002).

## 6 Závěr

Metoda PCR-RFLP byla úspěšně použita pro rozlišování klonů genu *SLG II* s různými alelami, které byly pak následně určeny pro sekvenování. Sekvenováním klonů genu *SLG II* u autoinkompatibilních linií a různých odrůd řepky bylo získáno 31 sekvencí, které byly navzájem velmi variabilní. Na základě analýzy podobnosti pomocí metody Neighbor-joining byl vytvořen kladogram, kde byly sekvence rozděleny na 3 velké skupiny a dále na 7 podskupin. Podle výsledků této analýzy byl odhadnut *S*-haplotyp u třech odrůd a jedné AI linie. Získané sekvence budou sloužit jako podklad pro zjišťování přítomnosti jednotlivých alel genu *SLG II* v AI liniích, popřípadě v odrůdách řepky, a určení tak jejich *S*-haplotypu. Také budou nápomocné při studiu vývoje nových *S*-haplotypů a vzniku nových alel v populaci řepky.

## 7 Přehled použité literatury

Anonym1: <http://www.agritec.cz/slechteni03.htm>, 12.2.2006

Anonym2: <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/pBluescript.htm> 20.4.2006

Anonym3: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb.figgrp.1719>, 26.3.2006

Anonym4: <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/pBluescript.htm> , 26.3. 2006

**Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** (2005): Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky, Espero publishing, Ústí nad Labem, ČR, s630.

**Bartkowiak – Broda Iwona.** (1991): Studia nad systemami meskej nieplodnosciu rzepaku Br. Napus, var.eleifera. Hodowla roslin, aklimat.,nasienistvo, T 35, č. 3-4, 3-60.

**Barsby T.L. a kol.** (1987): The combination of Polima CMS and cytoplasmatic triasine resistance in Brassica napus. Teor. Appl. Gent.,73, 809-814.

**Bateman A. J.** (1955): Self- incompatibility systems in angiosperms: III. Cruciferae, Heredity 9, 52 – 68.

**Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heyneker H. L., Boyer H. W.** (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2, 95-113.

**Brace, J., Ockendon, D.J., King, G.J.** (1993): Development of a method for identification of *S* alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR-amplified DNA with restriction endonucleases. Sex. Plan. Reprod. 6: 133-138.

**Brace, J., King, G.J., Ockendon, D.J.** (1994): A molecular approach to the identification of *S* alleles in *Brassica oleracea*. Sex. Plant Reprod. 7: 203-208.

**Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M.** (1997): DNA markers protocols, applications, and overviews. Wiley-Liss, New York, 364.

**Čurn V., Sáková L.** (1996): Speciální genetika rostlin, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Česká republika, s79.

**DE Nettancourt D.** (1977): Incompatibility in Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

**Dougan G., Saul M., Warren G., Sherratt D.** (1978): A functional map of plasmid ColE1. Mol. Gen. Genet. 158, 325-327.

**Flegr J.** (2005): Evoluční biologie, Academia, Praha, ČR, s559.

- Graman J.** (1995): Šlechtění zemědělských plodin (Olejniny, technické plodiny, okopaniny). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Česká republika, s125.
- Graman J., Čurn V.** (1997): Šlechtění rostlin (Obecná část). Jihočeská univerzita, zemědělská fakulta, ČB, ČR, s133.
- Graman J., Černý J., Houba M., Beran J.** (1999): Semenářství (Dodatky k učebním textům). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Česká republika, s
- Chloupek O.** (1995): Genetická diverzita, šlechtění a semenářství, Academia, Praha, ČR, s186.
- Káš J., Pačes V., Ondřej M., Petr J., Maršálek J., Demnerová K., Ruml T., Zdeňková K., Janotová P., Roudná M., Jenč P., Lipov J.** (2004): Geneticky modifikované organismy – současnost a perspektivy, 1. vydání, Vysoká škola chemicko-technologická ve spolupráci s Ministerstvem životního prostředí, s29-30.
- Kimura, R., Sato, K., Fujimoto, R., Nishio, T.** (2002): Recognition specificity of self-incompatibility maintained after the divergence of *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. Plant J. 29: 215-223.
- Knoll, A. a Vykoukalová Z.** (2002): Molekulární genetika zvířat: (metody detekce polymorfizmů DNA genů), 1. vydání, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, s168.
- Kusaba, M., Nishio, T., Satt, Y., Hinata, K., Ockendon, D.** (1997): Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparison of class I SLG alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implication for evolution and recognition mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7673-7678.
- Kusaba, M., Nishio, T.** (1999): Comparative analysis of *S* haplotypes with very similar *SLG* alleles in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. Plant J. 17: 83-91.
- Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Darnell J.** (2000): Molecular cell biology, W.H. Freeman company, New York, USA, 221-260.
- Maxam A. M., Gilbert W.** (1977): A new method for sequencing DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 560-4.
- Nasrallah J. B., Kao T.H., Goldberg M. L., Nasrallah M.E.** (1985): A cDNA clone encoding an *S*- locus specific plectroprotein from *Brassica oleracea*. Nature 318: 263-267.

- Nasrallah J. B., Nishio T., Nasrallah M. E.** (1991): The self-incompatibility genes of Brassica: expression and use in genetic ablation of floral tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 393-422.
- NISHIO, T., KUSABA M., WATANABE, M., HINATA, K.** (1996): Registration of S alleles in *Brassica campestris* L by the restriction fragment sizes of SLGs. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 1329-1334.
- Ockendon D. J.** (1974): Distribution of self-incompatibility alleles and breeding structure of open-pollinated cultivars of Brussels sprouts. *Heredity* 33: 159-171.
- Ogura H.** (1968): Studies on the male sterility in Japanese radish with special reference to the utilization of this male sterility towards the practical raising of hybrid seed. *Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ.*, 6 (2), 39-78.
- Ondřej M., Drobník J.** (2002): Transgenozé rostlin, Academia, Praha, ČR, s316.
- Ondřej M.**, (1999): Genové inženýrství, Praha, ČR, s79.
- Park, J.I., Nou, I.S., Lee, S.S., Kang, K.K., Watanabe, M.** (2001): Identification of S-genotypes by PCR-RFLP in breeding lines of *Brassica*. *Mol. Cells* 12: 227-232.
- Sanger F., Coulson A. R.** (1977): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94: 441-8, 1975 (Cited 375 times.).
- Sato, K., Fujimoto, R., Toriyama, K., Nishio, T.** (2003): Commonality of self-recognition specificity of S haplotypes between *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. *Plant Mol Biol* 52: 617-626.
- Schopfer C.R., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B.** (1999): The male determinant of self-incompatibility in Brassica, *Science*, 286, 1697 – 1700.
- Sobotka R.** (2001): Analýza genu a jeho využití jako selekčního markeru ve šlechtění řepky olejné. *Disertační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, ČR, s67.*
- Stein J. C., Howlett B., Boyes D. C., Nasrallah M. E., Nasrallah J. B.** (1991): Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 8816- 8820.
- Suzuki G., Kai W., Hirose T., Fukui K., Nishio T., Takayama S., Isogai A., Watanabe M., Hinata K.** (1999): Genomic organisation of the S-locus, identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S9 haplotype of *Brassica campestris* (syn. *Rapa*), roč. 1953, 391 – 400.



**Suzuki T., Kusaba M., Matsushita M., Okazaki K., Nishio T.** (2000): Characterization of Brassica S-haplotypes lacking S-locus glycoprotein. *Febs Letters* 482 (1-2): 102-108

**Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J.** (2005). *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno – Kraví Hora, Česká republika, s188.

**Takasaki T., Hatakeyama K., Suzuki G., Watanabe M., Isogai A., Hinata K.,** (2000): The S receptor kinase determines self-incompatibility in Brassica stigma. *Nature* 403: 913-916.

**Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.** (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids, res.* 18: 6531-3635.

**Yannisch-Perron C., Vieira J., Messing J.** (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

## 8 Seznam použitých zkratek

AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism)
AG	agarózový gel
AI	autoinkompatibilita, autoinkompatibilní reakce
AK	autokompatibilita, autokompatibilní reakce
AMP	adeninmonofosfát
AP-PCR	Arbitrarily Primed PCR = jiný název pro RAPD
Ap <sup>r</sup>	ampicilinová resistance
Atb	antibiotika
bp	páry bází, base pairs
CMS	cytoplasmatická forma samčí sterility, (cytoplasmatic male sterility)
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty
dTTP	deoxythimidintrifosfát
ddNTPs	dideoxynukleotid trifosfáty
DNA	kyselina deoxyribonukleová
<i>ds</i> DNA	dubble stranded DNA, dvouvláknová kys. deoxyribonukleová
EDTA	kyselina ethyléndiamintetraoctová
Elfo	elektroforéza
Etbr	ethidium bromid
F1 hybrid	hybrid vznikající v první filiální generaci u něhož dochází k největšímu projevu heterózního efektu
GMS	jaderná samčí sterilita
IPTG	izopropyl-β-D-tiogalaktosidáza
Kb	kilobáze
L1	komerční roztok sloužící k rozpouštění agarózy
L2	komerční roztok sloužící k přečištění agarózy
LB medium	Luria-Bertaniho médium
MCS	polylinker, multiklonovací místo (multiple cloning site)
ORI	počátek replikace (replication origin)

PAGE	polyakrylamidový gel
PCP	pollen coat protein; protein, který se váže na gen <i>SCR</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PCR-RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů u produktů PCR = CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)
RAPD	polymorfismus náhodně amplifikované DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA )
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	kyselina ribonukleová
<i>SCR</i>	S locus cystein rich protein
<i>SLG</i>	S-locus glycoprotein
<i>SP11</i>	jiný název pro gen <i>SCR</i>
<i>SRK</i>	S-locus receptor kinase
<i>ssDNA</i>	single stranded DNA, jednovláknová DNA
SSR	mikrosatelity- tandemová opakování krátkých motivů (Simple Sequence Repeats = Short Tandem Repeats)
Taq	termofilní polymeráza izolovaná z bakterie <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	směs 0,089 M Tris Base, 0,089 M kys. Boritá, 0,002 M Na <sub>2</sub> EDTA
Tris	N-tris(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonová kyselina
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galaktozidáza

## 9 Přílohy

**Příloha 1. Srovnání sekvencí v programu Clustal.** Černě jsou vyznačeny nukleotidové substituce, popřípadě inserce a delece. Otazníky jsou vyplněny chybějící sekvence na začátku a na konci, což nezbytné pro další analýzu sekvencí v programu Phylip.

AIK6-2	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
AIK6-3	TGAAAGGGT	ACAGAACATA	TATACCGCAG	CAGTGGGACT	TGAGACTTGA	GTATGAAAGG	GG	TACAGAA	
AIK3-B	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
1/85-E	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
1/85-4	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
6/85-2	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
6/85-5	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
6/85-D	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
6/85-E	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Start-A	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Start-B	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Start-C	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Liropa-1	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Liropa-3	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Liropa-5	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Liropa-6	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Cathy-2	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Cathy-4	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Cathy-6	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Local-B	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Local-E	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Rasmus-1	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Rasmus-5	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Rasmus-11	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Rasmus-16	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Rasmus-22	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Rasmus-23	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Rasmus-30	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Rasmus-34	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Ramiro-5	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA
Global-A	?????????	?????????	?????????	?????????	?????????	???	TGAAAGG	GG	TACAGAA

AIK6-2	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGAT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATTTTATT	TCATCCTGCC
AIK6-3	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGAT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATTTTATT	TCATCCTGCC
AIK3-B	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGAC	TTCCCTTTTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
1/85-E	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATATATT	TCATCAGCC
1/85-4	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTTTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
6/85-2	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTTTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
6/85-5	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
6/85-D	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
6/85-E	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Start-A	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTTTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Start-B	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Start-C	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTTTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Liropa-1	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Liropa-3	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Liropa-5	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Liropa-6	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTTTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Cathy-2	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Cathy-4	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Cathy-6	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Local-B	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Local-E	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Rasmus-1	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Rasmus-5	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Rasmus-11	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Rasmus-16	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTTTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Rasmus-22	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Rasmus-23	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Rasmus-30	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Rasmus-34	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Ramiro-5	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTTTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC
Global-A	CATTTA	CCAC	CATTCTTACA	CCTTCTCGTT	CTTGCTAGTC	TTCCCTTGTCT	TGAATCTATT	TCATCCTGCC







6/85-D	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACCT	TCCGAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
6/85-E	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACCT	TCCGAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Start-A	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACAT	ACAAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Start-B	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	ACCACGTACA	AGATCGACAC	TCAAAGGGGA	TTGCCAGAGT	TTATTCTTAT
Start-C	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACAT	ACAAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Liropa-1	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	GACTCGACAT	TCCGAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Liropa-3	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACCT	TCCGAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Liropa-5	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	ACCACGTACA	AAATCGACAC	TCAAAGGGGA	TTGCCAGAGT	TTATTCTTAT
Liropa-6	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACAT	ACAAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Cathy-2	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACAT	ACAAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Cathy-4	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	ACCACGTACA	AAATCGACAC	TCAAAGGGGA	TTGCCAGAGT	TTATTCTTAT
Cathy-6	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	ACCACGTACA	AAATCGACAC	TCAAAGGGGA	TTGCCAGAGT	TTATTCTTAT
Local-B	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACCT	TCCGAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Local-E	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	ACCACGTACA	AAATCGACAC	TCAAAGGGGA	TTGCCAGAGT	TTATTCTTAT
Rasmus-1	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	ACCACGTACA	AAATCGACAC	TCAAAGGGGA	TTGCCAGAGT	TTATTCTTAT
Rasmus-5	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	ACCACGTACA	AAATCGACAC	TCAAAGGGGA	TTGCCAGAGT	TTATTCTTAT
Rasmus-11	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACAT	ACAAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Rasmus-16	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACAT	ACAAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Rasmus-22	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	ACCACGTACA	AAATCGACAC	TCAAAGGGGA	TTGCCAGAGT	TTATTCTTAT
Rasmus-23	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	ACCACGTACA	AAATCGACAC	TCAAAGGGGA	TTGCCAGAGT	TTATTCTTAT
Rasmus-30	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACCT	TCCGAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Rasmus-34	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	ACCACGTACA	AAATCGACAC	TCAAAGGGGA	TTGCCAGAGT	TTATTCTTAT
Ramiro-5	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	TTCCGCTACA	AACTCGACAT	ACAAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT
Global-A	ATGATCCGTC	AAGCGGGAAT	ACCACGTACA	AAATCGACAT	TCCGAGGGGA	TTGCCGAGT	TTATTCTTAT

AIK6-2	AAATCAATTT	TTGAATCAAC	GTATTGAAAC	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ACGGAATGA	GTTTAGTGGC
AIK6-3	AAATTAATTT	TTGAATCAAC	GTATTGAAAC	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ACGGAATGA	GTTTAGTGGC
AIK3-B	AAATCGATTT	TTGAATCAAC	GTGTTGTAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAATGGC
1/85-E	AAATACATTT	TTGAATCAAC	GTGTTGAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
1/85-4	AAATCGATTT	TTGAATCAAC	GTGTTGTAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAATGGC
6/85-2	AAATCGATTT	TTGAATCAAC	GTGTTGTAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAATGGC
6/85-5	--ATCAAG--	-----GAC	GTTATGAGAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
6/85-D	AAATACATTT	TTGAATCAAA	GTGTTGAAAC	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
6/85-E	AAATACATTT	TTGAATCAAA	GTGTTGAAAC	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Start-A	AAATCGATTT	TTGAATCAAC	GTGTTGTAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAATGGC
Start-B	--ATCAAG--	-----GAC	GTTATGAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Start-C	AAATCGATTT	TTGAATCAAC	GTGTTGTAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAATGGC
Liropa-1	-----	---GAATCAAA	GTTATGAAAT	GCAAAGGAGT	GGTCCATGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Liropa-3	AAATACATTT	TTGAATCAAA	GTGTTGAAAC	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Liropa-5	--ATCAAG--	-----GAC	GTTATGAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Liropa-6	AAATCGATTT	TTGAATCAAC	GTGTTGTAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAATGGC
Cathy-2	AAATCGATTT	TTGAATCAAC	GTGTTGTAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAATGGC
Cathy-4	--ATCAAG--	-----GAC	GTTATGAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Cathy-6	--ATCAAG--	-----GAC	GTTATGAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Local-B	AAATACATTT	TTGAATCAAA	GTGTTGAAAC	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Local-E	--ATCAAG--	-----GAC	GTTATGAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Rasmus-1	--ATCAAG--	-----GAC	GTTATGAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Rasmus-5	--ATCAAG--	-----GAC	GTTATGAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Rasmus-11	AAATCGATTT	TTGAATCAAC	GTGTTGTAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAATGGC
Rasmus-16	AAATCGATTT	TTGAATCAAC	GTGTTGTAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAATGGC
Rasmus-22	--ATCAAG--	-----GAC	GTTATGAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Rasmus-23	--ATCAAG--	-----GAC	GTTATGAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Rasmus-30	AAATACATTT	TTGAATCAAA	GTGTTGAAAC	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Rasmus-34	--ATCAAG--	-----GAC	GTTATGAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC
Ramiro-5	AAATCGATTT	TTGAATCAAC	GTGTTGTAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAATGGC
Global-A	TCAAGCACCT	TA-----	-----TAAAAAT	GCAAAGGAGC	GGTCCCTGGA	ATGGAATGA	GTTTAGTGGC

AIK6-2	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
AIK6-3	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
AIK3-B	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
1/85-E	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
1/85-4	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
6/85-2	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
6/85-5	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
6/85-D	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
6/85-E	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
Start-A	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
Start-B	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
Start-C	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
Liropa-1	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
Liropa-3	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
Liropa-5	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
Liropa-6	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
Cathy-2	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
Cathy-4	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
Cathy-6	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT
Local-B	ATACCGGAGG	TGCAAGGATT	AAATTACATG	GTTTACAATT	ATACCGAGAA	CAGTGAGGAG	ATCGCTTACT



Local-E ATACCGGAGG TGCAAGGATT AAATTACATG GTTTACAATT ATACCGAGAA CAGTGAGGAG ATCTCTTACA  
Rasmus-1 ATACCGGAGG TGCAAGGATT AAATTACATG GTTTACAATT ATACCGAGAA CAGTGAGGAG ATCTCTTACA  
Rasmus-5 ATACCGGAGG TGCAAGGATT AAATTACATG GTTTACAATT ATACCGAGAA CAGTGAGGAG ATCTCTTACA  
Rasmus-11 ATACCGGAGG TGCAAGGATT AAATTACATG GTTTACAATT ATACCGAGAA CAGTGAGGAG ATCTCTTACA  
Rasmus-16 ATACCGGAGG TGCAAGGATT AAATTACATG GTTTACAATT ATACCGAGAA CAGTGAGGAG ATCTCTTACA  
Rasmus-22 ATACCGGAGG TGCAAGGATT AAATTACATG GTTTACAATT ATACCGAGAA CAGTGAGGAG ATCTCTTACA  
Rasmus-23 ATACCGGAGG TGCAAGGATT AAATTACATG GTTTACAATT ATACCGAGAA CAGTGAGGAG ATCTCTTACA  
Rasmus-30 ATACCGGAGG TGCAAGGATT AAATTACATG GTTTACAATT ATACCGAGAA CAGTGAGGAG ATCTCTTACT  
Rasmus-34 ATACCGGAGG TGCAAGGATT AAATTACATG GTTTACAATT ATACCGAGAA CAGTGAGGAG ATCTCTTACA  
Ramiro-5 ATACCGGAGG TGCAAGGATT AAATTACATG GTTTACAATT ATACCGAGAA CAGTGAGGAG ATCTCTTACA  
Global-A ATACCGGAGG TGCAAGGATT AAATTACATG GTTTACAATT ATACCGAGAA CAGTGAGGAG ATCTCTTACA

AIK6-2 CTTCCAAAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TTCACACTCG ATCGATTTAC  
AIK6-3 CTTCCAAAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TTCACACTCG ATCGATTTGC  
AIK3-B CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT ATGCACTGAC TATGCACTCA ATCGATACAC  
1/85-E CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTCAC  
1/85-4 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATACAC  
6/85-2 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATACAC  
6/85-5 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTGAC  
6/85-D CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AATCAGTGAG TTGACACTCG ATCGATTCAC  
6/85-E CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AATCAGTGAG TTGACACTCG ATCGATTAC  
Start-A CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATACAC  
Start-B CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTGAC  
Start-C CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATACAC  
Liropa-1 CTTCCAAAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AATCAGTGAG TTGACACTCG ATCGATTCAC  
Liropa-3 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AATCAGTGAG TTGACACTCG ATCGATTCAC  
Liropa-5 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTGAC  
Liropa-6 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATACAC  
Cathy-2 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATACAC  
Cathy-4 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTGAC  
Cathy-6 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTGAC  
Local-B CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AATCAGTGAG TTGACACTCG ATCGATTAC  
Local-E CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTGAC  
Rasmus-1 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTGAC  
Rasmus-5 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTGAC  
Rasmus-11 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATACAC  
Rasmus-16 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATACAC  
Rasmus-22 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTGAC  
Rasmus-23 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTGAC  
Rasmus-30 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AATCAGTGAG TTGACACTCG ATCGATTAC  
Rasmus-34 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTGAC  
Ramiro-5 CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AGTCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATACAC  
Global-A CTTCCATAT GACCAACAA AGCATCTACT CCAGATTGAC AATCAGTGAG TATGCACTCA ATCGATTAC

AIK6-2 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCGCTTTAC  
AIK6-3 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCGCTTTAC  
AIK3-B GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC  
1/85-E GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTATCTTTAC  
1/85-4 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC  
6/85-2 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC  
6/85-5 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCACTTTAC  
6/85-D GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAATGG ACGTGTGCGA TCCGCTTTAC  
6/85-E GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAATGG ACGTGTGCGA TCCGCTTTAC  
Start-A GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC  
Start-B GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC  
Start-C GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC  
Liropa-1 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAATGG ACGTGTGCGA TCCGCTTTAC  
Liropa-3 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAATGG ACGTGTGCGA TCCGCTTTAC  
Liropa-5 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCACTTTAC  
Liropa-6 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC  
Cathy-2 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC  
Cathy-4 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCACTTTAC  
Cathy-6 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCACTTTAC  
Local-B GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAATGG ACGTGTGCGA TCCGCTTTAC  
Local-E GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCACTTTAC  
Rasmus-1 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCACTTTAC  
Rasmus-5 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCACTTTAC  
Rasmus-11 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC  
Rasmus-16 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC  
Rasmus-22 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCACTTTAC  
Rasmus-23 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCACTTTAC  
Rasmus-30 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAATGG ACGTGTGCGA TCCGCTTTAC  
Rasmus-34 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TCCACTTTAC  
Ramiro-5 GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGAGT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC  
Global-A GTGGATCCCG CCATCATGGG GATGGAGCCT GTTCTGGACT TTACCAACGG ACGTGTGCGA TTCTCTTTAC

AIK6-2 TTAGTGGAT CTTATCTTA CTGTGACCTA AACACCTCAC CTAAGTGA CTGTATTAA GGGTTCGTTT



Liropa-5	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Liropa-6	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Cathy-2	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Cathy-4	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Cathy-6	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Local-B	TGGGACTTGA	GATTTGAGTA	TGAAAGGGGT	ACAGAACATA	TATACCGCAG	CAGTGGGACT	TGAG
Local-E	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Rasmus-1	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Rasmus-5	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Rasmus-11	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Rasmus-16	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Rasmus-22	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Rasmus-23	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Rasmus-30	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Rasmus-34	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Ramiro-5	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Global-A	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????
Global-A	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	??????????	?????

