

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2022**

**Lenka Vranová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Vysoko-hustotné mapovanie rasovo nešpecifického  
génu rezistencie k múčnatke trávovej  
(*Blumeria graminis*) na chromozóme 2A  
tetraploidnej pšenice**

**Bakalářská práce**

**Lenka Vranová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2022**

**Vedúci práce: Mgr. Zuzana Korchanová**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Lenka VRANOVÁ  
Osobní číslo: R19865  
Studijní program: B1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Vysoko-hustotné mapovanie rasovo nešpecifického génu rezistencie k múčnatke trávovej (*Blumeria graminis*) na chromozóme 2A tetraploidnej pšenice  
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

1. Rozšírenie mapovacej populácie.
2. Vývoj a optimalizácia vhodných molekulárných markerov.
3. Genomická selekcia línií a fenotypovanie.
4. Spracovanie literárnej rešerše, vyhodnotenie výsledkov a ich interpretácia.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Jazyk zpracování: Slovenština

Seznam doporučené literatury:

- Bennett, F.G.A. (1984). Resistance to powdery mildew in wheat: A review of its use in agriculture and breeding programmes. *Plant Pathol.* 33:279-300.
- Schweizer P. (2007) Nonhost resistance of plants to powdery mildew – New opportunities to unravel the mystery. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70: 3-7
- Jorgensen, I. H. (1992): Discover, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63: 141-152.
- Schneider, K. (2005): Mapping populations and principles of genetic mapping. In: Meksem, K. and Kahl, G., ed. *The handbook of plant genome mapping: genetic and physical mapping*. Weinheim: WILEY-VCH, 2005.
- Flor, H. H. (1971): Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Glawe A. D. (2008): The powdery mildew: A review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 46: 27-51.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Zuzana Korchanová  
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 26. dubna 2021  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice  
tel.: +420 585 634 901  
-2-

L.S.

30-04-2021

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

## Bibliografické údaje

Meno a priezvisko	Lenka Vranová
Názov práce	Vysoko-hustotné mapovanie rasovo nešpecifického génu rezistencie k múčnatke trávovej ( <i>Blumeria graminis</i> ) na chromozóme 2A tetraploidnej pšenice
Typ práce	bakalárska
Pracovisko	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedúci práce	Mgr. Zuzana Korchanová
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Pšenica je jednou z celosvetovo najvýznamnejších poľnohospodárskych plodín a múčnatka trávová (<i>Blumeria graminis</i> (DC.) E.O. Speer f. sp. <i>tritici</i>) patrí k jej najzávažnejším ochoreniam. Toto ochorenie môže mať za následok až 40 % strát na výnose a kvalite. Ekologicky a ekonomicky najvhodnejšou možnosťou ochrany je pestovanie rezistentných kultivarov. Použitie štandardných R-génov je však komplikované ich krátkou životnosťou, čo vyžaduje pátranie po nových zdrojoch rezistencie. Lína GZ1 (<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccum</i>) v sebe nesie dva gény podmieňujúce rezistenciu k múčnatke trávovej. QTL analýza identifikovala tieto gény v lokusoch <i>QPm.GZ1-2A</i> na chromozóme 2AL a <i>QPm.GZ1-7A</i> na chromozóme 7AL. Táto práca bola zameraná na vysoko-hustotné mapovanie lokusu <i>QPm.GZ1-2A</i>, ktorý poskytuje úplnú rezistenciu proti všetkým testovaným rasám. Lokus <i>QPm.GZ1-2A</i> bol saturovaný 14 markermi a pôvodná oblasť s veľkosťou 22,7 Mb tak bola zúžená na 5,08 Mb. Lokus je vymedzený hraničnými markermi <i>owm2016</i> a <i>owm2028</i>. V tejto oblasti bolo identifikovaných 60 kandidátnych génov, z ktorých iba tri majú vzťah k rezistencii. Žiadny z nich však nie je vhodným kandidátom pre <i>QPm.GZ1-2A</i>. Pretože <i>QPm.GZ1-2A</i> gén podmieňuje rezistenciu homozygotne recesívne, čo je vzácna charakteristika, jedná sa pravdepodobne o nový gén rezistencie.</p>
Kľúčové slová	pšenica, <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccum</i> , múčnatka trávová, <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> , R-gény, molekulárne markery, vysoko-hustotné mapovanie
Počet strán	50
Počet príloh	0
Jazyk	slovenský

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Lenka Vranová
Title	High-density mapping of race non-specific resistance gene to powdery mildew ( <i>Blumeria graminis</i> ) on chromosome 2A of tetraploid wheat
Type of thesis	bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Zuzana Korchanová
The year of presentation	2022
Abstract	<p>Wheat is one of the most important agricultural crop worldwide and powdery mildew (<i>Blumeria graminis</i> (DC.) E.O. Speer f. sp. <i>tritici</i>) is one of its most devastating fungal diseases. Powdery mildew can decrease the yield and quality up to 40 %. The utilization of resistant cultivars represents the most ecological and economical way of protection. Unfortunately, the use of standard R-genes is complicated by their short-term lifespan, which requires searching for new sources of resistance. The GZ1 line (<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccum</i>) carries two genes determining the resistance to powdery mildew. QTL analysis located these genes in loci <i>QPm.GZ1-2A</i> on chromosome 2AL and <i>QPm.GZ1-7A</i> on chromosome 7AL. Present work is focused on high-density mapping of the <i>QPm.GZ1-2A</i> locus, which determines total resistance to all tested races. The <i>QPm.GZ1-2A</i> locus was saturated with 14 markers and the original 22.7 Mb region was narrowed down to 5.08 Mb. The locus is delimited by flanking markers <i>owm2016</i> and <i>owm2028</i>. In this region, 60 candidate genes have been identified and only three of these genes have relation to the resistance genes. However, none of them is a suitable candidate gene for <i>QPm.GZ1-2A</i>. Since the <i>QPm.GZ1-2A</i> gene determines homozygous recessive resistance, which is rare, it is probably a novel powdery mildew resistance gene.</p>
Keywords	wheat, <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccum</i> , powdery mildew, <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> , R-genes, molecular markers, high-density mapping
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	slovak

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením Mgr. Zuzany Korchanovej a za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci 27. 4. 2022

Lenka Vranová

## **Pod'akovanie**

Chcela by som sa poďakovať Mgr. Zuzane Korchanovej, za jej odborné vedenie, rady, pripomienky, čas pri spracovaní tejto bakalárskej práce a pomoc pri prevedení tohto experimentu. Taktiež ďakujem všetkým pani laborantkám za pomoc pri práci a príjemné pracovné prostredie. A na záver moje poďakovanie patrí Mgr. Miroslavovi Valárikovi, Ph. D. a prof. Ing. Jaroslavovi Doleželovi, DrSc. za možnosť vypracovať bakalársku prácu na Ústave experimentálnej botaniky AV ČR v.v.i. v Olomouci.



# OBSAH

<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>13</b>
<b>2 CIELE PRÁCE.....</b>	<b>14</b>
<b>3 LITERÁRNY PREHLAD .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Pšenica.....</b>	<b>15</b>
3.1.1 História vývoja pšenice .....	15
3.1.2 Genóm pšenice.....	17
<b>3.2 Múčnatka trávová.....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Životný cyklus múčnatky trávovej.....	20
3.2.2 Interakcia hostiteľ-patogén.....	21
3.2.3 Rezistencia k múčnatke trávovej u pšenice .....	23
<b>3.3 Mapovanie génov .....</b>	<b>24</b>
3.3.1 Mapovacie populácie.....	24
3.3.2. Markery pre genetické mapovanie .....	27
3.3.3. Genetické mapy a ich konštrukcia .....	28
<b>4 MATERIÁL A METÓDY .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Materiál.....</b>	<b>29</b>
4.1.1 Biologický materiál .....	29
4.1.2 Chemikálie, súpravy.....	30
4.1.3 Použité roztoky .....	31
<b>4.2. Použité metódy .....</b>	<b>32</b>
4.2.1 Mendelizácia znaku a rozšírenie mapovacej populácie .....	32
4.2.2 Izolácia DNA .....	32
4.2.3 Vývoj molekulárnych markerov .....	32
4.2.4 Polymerázová reťazová reakcia a restričné štiepenie .....	33
4.2.5 Elektroforetická separácia produktov .....	34
4.2.6 Fenotypovanie.....	35
4.2.7 Identifikácia kandidátnych génov .....	35

<b>5 VÝSLEDKY</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1 Mendelizácia znaku a rozšírenie mapovacej populácie</b> .....	<b>36</b>
<b>5.2 Molekulárne markery lokusu <i>Q<sub>Pm</sub>.GZ1-2A</i></b> .....	<b>36</b>
<b>5.3 Fenotypovanie rekombinantných línií</b> .....	<b>37</b>
<b>5.4 Saturácia <i>Q<sub>Pm</sub>.GZ12-A</i> a identifikácia kandidátnych génov</b> .....	<b>38</b>
<b>6 DISKUSIA</b> .....	<b>40</b>
<b>7 ZÁVER</b> .....	<b>42</b>
<b>8 LITERATÚRA</b> .....	<b>43</b>

## Zoznam symbolov a skratiek

Avr	avirulentný
BC	spätne križenie, <i>backcross</i>
bp	páry báz, <i>base pair</i>
cM	centiMorgan
DArTseq	Diversity arrays technology
DH	dihaploidný genotyp, <i>double haploid</i>
F primer	<i>forward</i> primer
F <sub>n</sub>	<i>n</i> -tá filiálna generácia
GBS	Genotyping by sequencing
n	haploidný počet chromozómov
NIL	takmer izogénna línia, <i>nearly isogenic lines</i>
PCR	polymerázová reťazová reakcia, <i>polymerase chain reaction</i>
QTL	lokusy kvantitatívnych znakov, <i>quantitative trait loci</i>
R primer	<i>reverse</i> primer
RIL	rekombinantné inbredné línie, <i>recombinant inbred lines</i>
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus, <i>single nucleotide polymorphism</i>
x	základné chromozómové číslo

## ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1: Úrodný polmesiac.....	16
Obr. 2: Morfológické rozdiely medzi divokou a domestikovanou pšenicom jednozrnka. ....	17
Obr. 3: Fylogenetický vývoj pšenice.....	18
Obr. 4: <i>Blumeria graminis</i> na povrchu listu hostiteľskej rastliny. ....	19
Obr. 5: Životný cyklus <i>Blumeria graminis</i> . ....	21
Obr. 6: Princíp konštrukcie F <sub>2</sub> populácie.....	25
Obr. 7: Princíp konštrukcie rekombinantnej inbrednej línie (RIL). ....	26
Obr. 8: Princíp konštrukcie BC populácie. ....	26
Obr. 9: Fenotypová reakcia rekombinantných línií na izoláty múčnatky A17, A23 a A3ab. ....	38
Obr. 10: Pozície génu <i>PmHnk54</i> a <i>Qpm.GZ1-2A</i> lokusov.....	41

## ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1: Rastlinný materiál použitý pre genetické mapovanie. ....	29
Tab. 2: Zloženie PCR reakčnej zmesi.....	33
Tab. 3: Teplotný priebeh PCR reakcie.....	33
Tab. 4: Hraničné markery použité pre ukotvenie oblasti rezistentného lokusu <i>Qpm.GZ1-2A</i> k referenčnej sekvencii Zavitan. ....	35
Tab. 5: Markery navrhnuté do oblasti <i>Qpm.GZ1-7A</i> pre mendelizáciu znaku.....	36
Tab. 6: Špecifikácia primerov jednotlivých markerov navrhnutých do oblasti lokusu <i>Qpm.GZ1-2A</i> . ....	37
Tab. 7: Saturácia lokusu <i>Qpm.GZ1-2A</i> novými markermi u rekombinantných línií .....	39

# 1 ÚVOD

Pšenica siata (*Triticum aestivum* subsp. *aestivum*) a pšenica tvrdá (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) patria medzi najvýznamnejšie poľnohospodárske plodiny na svete, nakoľko predstavujú základný zdroj potravy pre viac ako 40 % ľudskej populácie. Jej pestovanie sa viaže so snahou chrániť ľudí pred hladom a so získaním kontroly nad zásobovaním potravinami, nakoľko predpoklad nárastu populácie do roku 2050 sa odhaduje približne na 9,7 miliárd ľudí, a pravdepodobne dosiahne vrchol približne 11 miliárd do konca storočia (Roser, Ortiz-Ospina *et al.*, 2019).

Jej produkcia môže byť ohrozená rôznymi patogénmi a ochoreniami. Jedným z takýchto patogénov je múčnatka trávová (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), ktorá spôsobuje ochorenie zvané múčnatka. V prípade napadnutia náchylných odrôd môže spôsobiť až 40% straty na výnose. Jedným zo spôsobov ochrany pred týmto patogénom je pestovanie rezistentných kultivarov pšenice. Vytváraníu odolnejších kultivarov pšenice predchádza hľadanie a identifikácia nových rezistentných génov voči múčnatke. Efektívne využitie takýchto génov v šľachtiteľskom procese je však podmienené identifikáciou molekulárnych markerov segregujúcich alebo úzko viazaných k cieľovému génu.

Rezistencia tetraploidnej pšenice *Triticum turgidum* subsp. *dicoccum* (DIM140, pomenovaná ako GZ1) bola objavená doc. RNDr. Švecom, CSc. (UK Bratislava, Komenského). QTL analýza odhalila, že rezistencia línie GZ1 voči múčnatke je podmienená dvomi génmi. Homozygotne recesívnym génom v lokuse *Q<sub>Pm</sub>.GZ1-2A* na chromozóme 2AL a dominantným génom v lokuse *Q<sub>Pm</sub>.GZ1-7A* na chromozóme 7AL. Predkladaná bakalárska práca je zameraná na vysoko-hustotné mapovanie lokusu *Q<sub>Pm</sub>.GZ1-2A*, ktorý je zodpovedný za rasovo nešpecifickú rezistenciu voči *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* v homozygotne recesívnej konštitúcii a identifikáciu kandidátnych génov.

## 2 CIELE PRÁCE

Predložená bakalárska práca je zložená z teoretickej a praktickej časti. Cieľom teoretickej časti bolo vypracovanie literárnej rešerše na tému pšenica, charakteristika múčnatky trávovej a jej interakcie s hostiteľom a genetické mapovanie. Cieľom praktickej časti bol vývoj molekulárnych markerov a saturácia lokusu *QPm.GZ1-2A*, fenotypovanie rekombinantných F<sub>2</sub> línií a rozšírenie F<sub>2</sub> mapovacej populácie k identifikácii nových rekombinantných línií v oblasti lokusu *QPm.GZ1-2A*.

# 3 LITERÁRNY PREHLAD

## 3.1 Pšenica

Rod pšenica (*Triticum* L.) patrí medzi jednoklíčnolistové rastliny a je súčasťou čeľade tráv lipnicovité (*Poaceae*) radu lipnicotvaré (*Poales*). Táto čeľaď zahŕňa aj ďalšie poľnohospodársky významné plodiny, ako sú jačmeň (*Hordeum* L.), raž (*Oryza* L.), kukurica (*Zea* L.), ovos (*Avena* L.) alebo žito (*Secale* L.). Tieto rody prešli počas procesu domestikácie mnohými zmenami, pričom domestikované taxóny sú odlišné od ich divokých predkov (Doebly, Gaut *et al.*, 2006). Avšak práve vďaka domestikácii sa tieto taxóny stali dôležitými pre poľnohospodárstvo, pričom pšenica sa stala jedným z najdôležitejších druhov plodín na svete (Kilian *et al.*, 2009).

Pšenica je v 21. storočí plodina s celosvetovo najvyšším výnosom. Pestuje sa na viac ako 218 miliónov hektároch (<https://www.fao.org>), vo väčšom rozsahu ako ktorákoľvek plodina, s celosvetovou produkciou 777 miliónov ton ročne (<https://www.fao.org>, 2021). Je dôležitou zložkou potravín, ako sú chlieb, cestoviny alebo sušienky a dodáva 20 % kalórií pre ľudskú stravu (Tilman *et al.*, 2011). Pestuje sa celosvetovo takmer vo všetkých oblastiach; od 67° severnej šírky v Škandinávii a Rusku po 45° južnej šírky v Argentíne, v trópoch a subtropoch (Feldman, 1995). Medzi najviac pestované druhy patrí pšenica siata (*Triticum aestivum* subsp. *aestivum*) a pšenica tvrdá (*Triticum turgidum* subsp. *durum*). Dnes je asi 95 % pestovanej pšenice hexaploidná pšenica siata, pričom ďalších 5 % tvorí tetraploidná pšenica tvrdá pestovaná v oblasti Stredozemného mora a používaná väčšinou pre výrobu cestovín (Shewry, 2009).

### 3.1.1 História vývoja pšenice

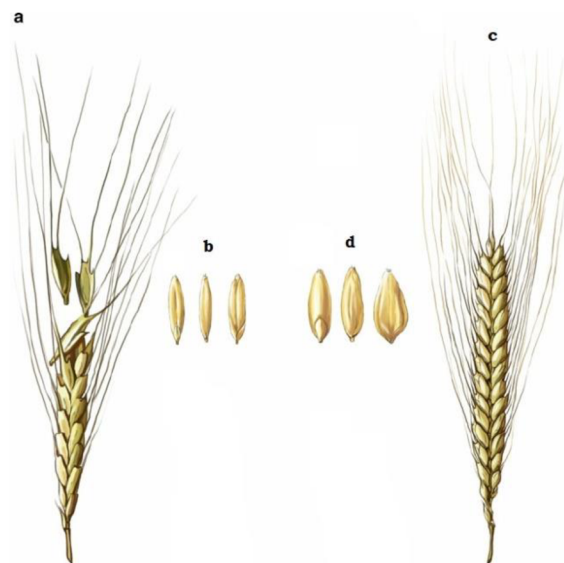
Pšenica bola jednou z prvých domestikovaných potravinárskych plodín. Domestikácia pšenice v oblasti úrodného polmesiaca (Obr.1) približne pred 10 000 rokmi bola najdôležitejším krokom v prechode ľudstva od lovca k farmárovi. Najskoršie kultivované formy boli diploidná pšenica jednozrnka (Obr.2) a tetraploidná pšenica emmer. Jedná sa o druhy pochádzajúce z pohoria Karacadag v juhovýchodnej časti Turecka (Özkan *et al.*, 2002). Domestikácia pšenice priniesla rôzne zmeny, ako napríklad zväčšenie zrna (Shewry, 2009).

Shewry (2009) okrem tejto zmeny zdôrazňuje tiež stratu rozpadavosti klasu pri dozretí, ktorá je spôsobená mutáciami v lokuse *Br* (*brittle rachis*; Pourkheirandish *et al.*, 2018; Nalam *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2002). Rozpadavosťou klasu je zabezpečené šírenie semien vo voľnej prírode, v poľnohospodárstve však naopak spôsobuje stratu semien. Ďalšiu výraznú zmenu predstavuje prechod od lúpaných foriem, pri ktorých plôšky pevne prilnú k zrnu, na formy s voľným mlátením. Tieto formy vznikli súhrou dvoch mutácií: dominantnou mutáciou v lokuse *Q* a recesívnou mutáciou v lokuse *Tg* (Jantasuriyarat *et al.*, 2004; Simons *et al.*, 2006; Dubkovsky a Dvorak, 2007).



**Obr. 1: Úrodný polmesiac.** Úrodný polmesiac v oblasti východného Stredomoria je znázornený červenou farbou. Zahŕňa časti dnešných krajín Izraelu, Libanonu, Jordánska, Sýrie, severného Egyptu a Iraku. (upravené podľa Adamo. 2018).





**Obr. 2: Morfológické rozdiely medzi divokou a domestikovanou pšenicom jednozrnka.**

Na obrázku sú znázornené časti divokej pšenice jednozrnky *T. boeoticum*: rozpadavý klas (a), zrná (b) a časti domestikovanej pšenice *T. monococcum*: domestikovaný klas (c) a domestikované zrná (d) (upravené podľa Benjamin Kilian, William Martin, 2010).

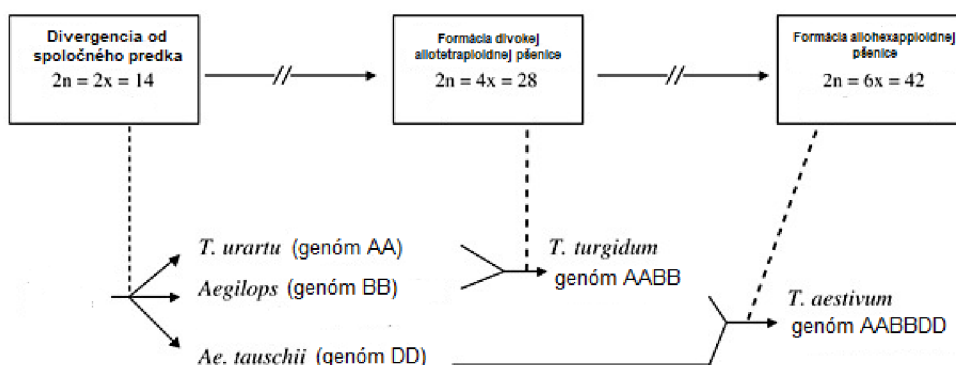
Ďalšia významná zmena nastala v 50. a 60. rokoch 20. storočia. V období označovanom ako „Zelená revolúcia“ došlo k vývinu tzv. „semi-dwarf“ odrôd pšenice, a to zavedením génu *Rht1* a *Rht2*. *Rht* gény riadia výšku rastliny. Ich mutácia má za následok znížený rast rastlín. Steblá vysokých rastlín neboli dostatočne silné, aby udržali silný klas odrôd. Dochádzalo tak k ich poliehaniu a k strate výnosu v porovnaní s rastlinami s krátkym stebлом, ktoré boli menej náchylné na poliehanie (Hedden, 2003). Zavedením semi-dwarf odrôd do Indie a Pakistanu sa zamedzilo hladomoru, ktorý hrozil v týchto oblastiach.

### 3.1.2 Genóm pšenice

Genóm *Triticum* pozostáva zo 7 chromozómov ( $1x=7$ ) a podľa ich stupňa ploidie sa hybridné línie delia do troch skupín: diploidné ( $2n=2x=14$ ), alotetraploidné ( $2n=4x=28$ ) a alohexaploidné ( $2n=6x=42$ ). Ploidia pšenice je výsledkom niekoľko po sebe idúcich hybridizácií (Obr. 3, Feldman, 2001).

Na diploidnej úrovni existujú dve pšenice jednozrnové: *T. monococcum* (genóm  $A^m A^m$ ) a *T. urartu* (genóm  $A^u A^u$ ), ktorý prispel svojím genómom tetraploidnej pšenici *T. turgidum* subsp. *dicoccoides* ( $A^u A^u BB$ : Dvořák *et al.*, 1988; Dvořák *et al.*, 1993). Za darcu genómu BB je považovaný blízky príbuzný *Aegilops speltoides* (genóm SS; Kilian *et al.*, 2007; Gornicki *et al.*, 2014). Domestikácia *T. turgidum* subsp. *dicoccoides* viedla k vzniku dnes stále pestovanej pšenici tvrdej *T. turgidum* subsp. *durum* (Dubkovsky a Dvořák, 2007).

Zvýšená adaptabilita tetraploidnej pšenice k meniacim sa podmienkam umožnila jej rozšírenie v oblasti juhovýchodného Turecka a následnú hybridizáciu s divoko rastúcim diploidným druhom *Ae. Tauschii*, ktorý je donorom genómu D. Výsledkom tejto hybridizácie bol vznik hexaploidnej pšenice satej *T. aestivum* subsp. *aestivum* (genóm  $A^u A^u BBDD$ ). S následným subgenómom D získala pšenica ďalšie významné znaky, ako je napríklad adaptácia na podmienky jarovizácie a fotoperiody, zlepšená tolerancia voči soli, nízkemu pH a hliníku v pôde, odolnosť proti mrazu a niektorým škodcom. Významné sú aj jej pekárenské vlastnosti (Feuillet *et al.*, 2008), a práve vďaka tomu sa stala pšenica siata tak rozšíreným druhom.



**Obr. 3: Fylogenetický vývoj pšenice.** Pšenica prešla počas svojej evolúcie niekoľkými hybridizačnými udalosťami, ktoré mali za následok zvýšenie úrovne ploidie pšenice. Vznikla tak línia *T. aestivum* (AABBDD), ktorá predstavuje najvyššiu známu úroveň ploidie u pšenice.

(prevzaté z [https://www.researchgate.net/figure/Origin-of-allopolyploid-wheat\\_fig1\\_7979903](https://www.researchgate.net/figure/Origin-of-allopolyploid-wheat_fig1_7979903) )

## 3.2 Múčnatka trávová

Múčnatka trávová patrí z hľadiska spôsobu života k biotrofným obligátnym patogénom a nie je tak schopná rozmnožovania a rastu mimo hostiteľskú rastlinu. Múčnatka je najbežnejšou listovou chorobou obilnín, ktorá je spôsobená druhom huby *Blumeria graminis* z rodu *Blumeria*. Podľa adaptácie na konkrétneho hostiteľa sa v rámci tohto druhu rozlišuje ďalších 8 poddruhov (forme speciales; f. sp.). K najvýznamnejším poddruhom infikujúcim obilniny patrí *Blumeria graminis* f. sp. *secalis* (napádajúca žito), *hordei* (napádajúca jačmeň), *avenae* (napádajúca ovos) alebo *tritici* (napádajúca pšenicu, Braun a Cook, 2012).

U pšenice *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Obr. 4) výrazne ovplyvňuje výnos zrna, pričom strata na výnose môže dosiahnuť až 40 % na náchylných odrodách (Draz *et al.*, 2019). Vhodné podmienky pre šírenie huby sú mierne teploty, vysoká relatívna vlhkosť a husté porasty pšenice. Za optimálnych podmienok produkuje múčnatka nové konídiá každých 7 – 10 dní (Salgado a Pierce, 2016). Rastliny sú najviac náchylné v štádiu medzi predlžovaním stonky a rastom záhlavia. K infekcii rastliny dochádza často už na jeseň, avšak takúto skorú infekciu je náročné odhaliť. Preto sú rastliny najviac infikované koncom apríla a začiatkom mája, keď sa pšenica nachádza v období rýchleho rastu (Salgado a Pierce, 2016).



**Obr. 4:** *Blumeria graminis* na povrchu listu hostiteľskej rastliny. Na obrázku sa nachádza infekcia hostiteľskej rastliny hubou *Blumeria graminis*. Na povrchu listu sú viditeľné kolónie múčnatky tvoriace biele povlaky. (prevzaté z <https://www.imtrade.com.au/wp-content/uploads/2015/10/Powdery-Mildew-Mace-Wheat-Buntine-WA-Small-399x600.jpg>)

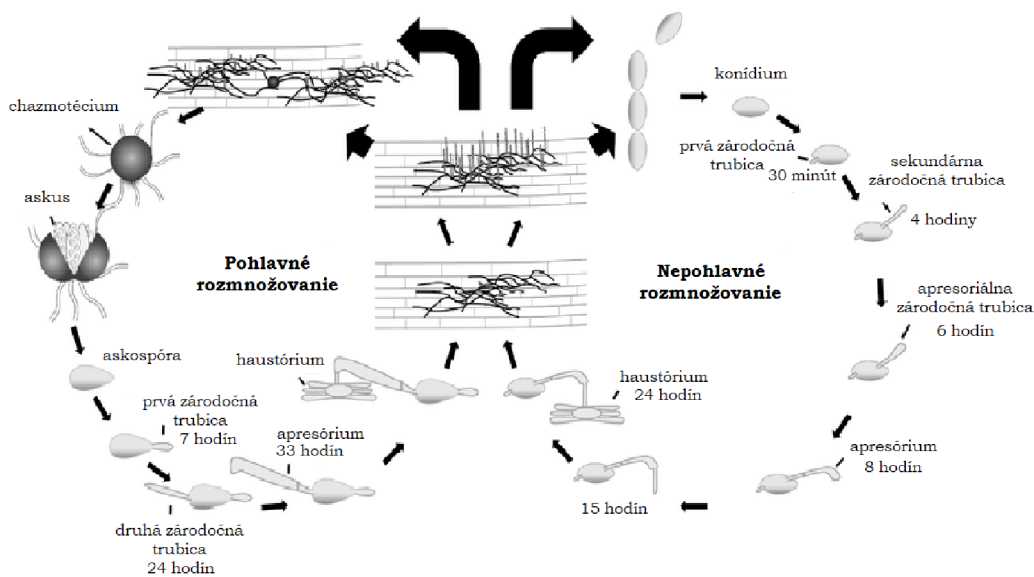
### 3.2.1 Životný cyklus múčnatky trávovej

Životný cyklus *Blumeria graminis* zahŕňa 2 fázy: pohlavné rozmnožovanie a nepohlavné rozmnožovanie (Glawe, 2008) a po väčšinu svojho životného cyklu je haploidná s výnimkou krátkej diploidnej fázy počas pohlavného rozmnožovania. Tento patogén sa rozmnožuje počas vegetačného obdobia hostiteľa nepohlavným spôsobom, v priebehu ktorého dochádza k produkcii konídií. Pohlavný cyklus je pozorovaný hlavne pred nepriaznivými podmienkami a vytvára kleistotécia, ktoré obsahujú askospóry.

Životný cyklus *Blumeria graminis* (Obr. 5) je zahájený inokuláciou náchylného hostiteľa konídiom alebo askospórou a ich klíčením. Rýchlosť klíčenia je ovplyvnená vonkajšími faktormi ako je napríklad vhodná teplota a absencia vody, ktoré tento proces urýchľujú. Po inokulácii dochádza k tvorbe primárneho klíčiaceho hýfu a k tvorbe apresória. Jedná sa o rozšírenú štruktúru, vďaka ktorej huba prilne k povrchu hostiteľa. Z apresória vyrastá penetračný hýf, ktorý pomocou enzymatickej aktivity narušuje bunkovú stenu rastlín a umožňuje hube prienik do epidermálnej bunky hostiteľa (Francis *et al.*, 1996; Pryce-Jones *et al.*, 1999). Jeho vetvením vytvára huba vo vnútri hostiteľskej bunky haustórium, cez ktoré získava z hostiteľa živiny. Potom, ako sú na povrchu hostiteľa tvorené sekundárne hýfy, ktoré sa predlžujú a vetvia, vznikajú aj nové apresória formujúce ďalšie haustória. Po 3 – 4 dňoch postinokulácie je na povrchu listov viditeľná kolónia húb tvoriaca biele mycélium. V závislosti na podmienkach dochádza buď k pohlavnému alebo nepohlavnému cyklu.

Pri nepohlavnom cykle tvoria kolónie konídióforý zakončené reťazcami postupne dozrievajúcich a uvoľňujúcich sa konídií, ktoré sa šíria vetrom do iných hostiteľských rastlín a môžu tak infikovať hostiteľskú rastlinu. Konídie obsahujú veľké množstvo vody, čo pravdepodobne prispieva k schopnosti klíčiť v jej neprítomnosti (Glawe, 2008; Jørgensen, 1994; Yarwood, 1957; Zhang *et al.*, 2005).

K pohlavnému rozmnožovaniu dochádza na konci vegetačného obdobia hostiteľa, kedy dochádza k tvorbe gametangií. *Blumeria graminis* patrí medzi heterotalické vláknité huby, ktoré tvoria morfológicky odlišné gametangia – samičie askogónia a samčie anterídiá. Ich fúziou vzniká zygota a nasleduje tvorba plodníc – chazmotécií, ktoré produkujú haploidné askospóry. Chazmotéciá sú spočiatku svetlé, neskôr žltkasté a v štádiu zrelosti nadobúdajú čiernu farbu (Glawe, 2008). Majú dôležitú úlohu pri prezimovaní *Blumeria graminis*, z ktorých sa na konci leta askospóry uvoľňujú a na jeseň infikujú výhonkové rastliny (Salgado a Pierce, 2016).



**Obr. 5: Životný cyklus *Blumeria graminis*.** Životný cyklus *B. graminis* pozostáva z 2 fáz: pohlavného a nepohlavného rozmnožovania. Jej šírenie v životnom cykle znázorňujú čierne šípky. Cyklus sa líši v tvorbe konídií v prípade nepohlavného rozmnožovania, u pohlavného rozmnožovania dochádza k tvorbe chazmotécií a askospór. (prevzaté z [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-life-cycle-of-Blumeria-graminis-The-black-arrows-indicate-propagation-in-the\\_fig2\\_343305651](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-life-cycle-of-Blumeria-graminis-The-black-arrows-indicate-propagation-in-the_fig2_343305651) ).

### 3.2.2 Interakcia hostiteľ-patogén

Pre úspešnú patogenézu vyvolávajú fytopatogény húb zmeny fyziológie a štruktúry hostiteľskej bunky, ako aj poškodenie bunkových funkcií hostiteľa. Rastliny majú na ochranu voči patogénom vyvinutý prirodzený imunitný systém. Aby mohlo dôjsť k úspešnej infekcii hostiteľa, musí byť patogén schopný preniknúť do hostiteľskej bunky. To závisí na ich vzájomnej adaptácii. V prípade, že patogén nie je schopný infikovať rastlinu napr. kvôli mechanickým bariéram alebo rastline chýba faktor nutný pre vyvolanie infekcie, nie je rastlina pre daný patogén hostiteľom a jedná sa o **nehostiteľskú rezistenciu**. V opačnom prípade, kedy je patogén schopný vyvolať infekciu, sa rastlina stáva pre daný patogén hostiteľom a rezistencia je označovaná ako **hostiteľská** (Burdon, 1993).

Interakcia medzi rastlinnou bunkou a patogénom je umožnená produkciou tzv. efektorov patogénom, ktoré interagujú s receptormi rastlinnej bunky (Lu *et al.*, 2016). Po vzniku väzby medzi efektorom a receptorom sa vytvára signál a dochádza k spusteniu obrannej reakcie. V mieste penetrácie patogénu dochádza napríklad k zosilneniu bunkovej steny alebo k tvorbe reaktívnych kyslíkových radikálov (ROS), ktoré často spôsobujú hypersenzitívnu reakciu (HR). Jedná sa o rýchlu bunkovú smrť v mieste infekcie, ktorá vedie k vytvoreniu lokálnych nekrotických nálezov, čím sa zabráni ďalšiemu šíreniu patogéna (Torres, 2010). Receptory hostiteľskej bunky sú produktom exprese rezistentných génov (**R-génov**) rastliny (Arora *et al.*, 2019). Efektorom patogénu *Blumeria graminis* môžu byť napríklad fragmenty bunky huby uvoľňované počas infekčného procesu alebo špecifické produkty génov **avirulencie** (avr).

U plodín je odrodová odolnosť voči múčnatke trávovej založená na rozpoznávaní produktov konkrétnych avr génov produktmi génov rezistencie (Jones, 2001). Avr gény určujú genotyp patogénu, na ktorého základe je potom rozdelený na jednotlivé rasy. Rastliny môžu vykazovať odolnosť voči konkrétnej rase alebo niekoľkým rasám, niektoré môžu byť rezistentné voči širokému spektru rás (Crute a Pink, 1996).

### **3.2.2.1 Rasovo špecifická rezistencia**

Rasovo špecifická rezistencia je založená na koncepcii gén-proti-génu, ktorá bola popísaná v roku 1971 Florom. Pre každý R-gén, ktorý udeľuje hostiteľovi rezistenciu, existuje zodpovedajúci avr gén v patogéne, ktorý podmieňuje jeho virulenciu. Ich vzájomná interakcia je kľúčom k určeniu, či je rastlina náchylná alebo rezistentná k napadnutiu patogénom.

V prípade páru génu rezistencie a avirulentného génu patogénu dochádza k vytvoreniu rezistencie. Ak rezistentný gén chýba alebo je neaktívny, patogén sa stáva virulentným a rastlina sa stáva náchylnou (Flor, 1971). Rasovo špecifická rezistencia je teda účinná len proti určitému genotypu (rase) patogénu a je zvyčajne kontrolovaná dominantnými génmi veľkého účinku (major génmi) v hostiteľovi (McIntosh *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020).

### **3.2.2.2 Rasovo nešpecifická rezistencia**

Jedná sa o rezistenciu ku širokému spektru rás patogénu. Jej najväčšou prednosťou je jej dlhodobý účinok (Vanderplank, 1963). Zvyčajne ale poskytuje len čiastočnú odolnosť, čo sa fenotypovo prejavuje len obmedzením rastu patogénu.

Rasovo nešpecifická rezistencia je často tiež označovaná ako kvantitatívna, pretože je zvyčajne podmienená niekoľkými génmi s kumulatívnym účinkom (Kou a Wang, 2010). Tieto gény sa nachádzajú na rôznych miestach (lokusoch) v genóme. To komplikuje ich zapojenie do šľachtiteľských programov. Hlavným dôvodom je problematický prenos všetkých génov súčasne pri krížení, čo môže mať za následok zníženú účinnosť rezistencie (Kou a Wang, 2010). Rasovo nešpecifickú rezistenciu však môžu poskytovať tiež major gény, ako je tomu v prípade celkom unikátneho jačmenného génu *Mlo*. Strata jeho funkcie sprostredkováva homozygotne recesívnu rasovo nešpecifickú rezistenciu (Jorgensen, 1992). Jedná sa o celkom unikátny R-gén, ktorý je už cez 40 rokov úspešne používaný v poľnohospodárstve.

### 3. 2. 3 Rezistencia k múčnatke trávovej u pšenice

V súčasnej dobe bolo identifikovaných viac ako 70 *Pm* (powdery mildew) génov rezistencie a ich alel (*Pm1* – *Pm65*, *Pm8* alelický k *Pm17*, *Pm18* = *Pm1c*, *Pm22* = *Pm1e*, *Pm23* = *Pm41c*, *Pm31* = *Pm21*) u rôznych druhov pšenice (McIntosh *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020). Väčšina týchto génov sú dominantné R-gény, ktoré sa riadia konceptom gén-proti-génu (Flor, 1971). Gény rasovo špecifickej rezistencie voči múčnatke sú vo veľkej miere používané v šľachtení pšenice. Avšak pestovaním kultivarov so špecifickým génom rezistencie na veľkých plochách vytvára silný selekčný tlak na populáciu patogéna a rezistencia tak býva často skoro prekonaná (Dreiseitl, 2003). Rasovo špecifická rezistencia býva efektná asi 3 – 5 rokov (Wolfe a McDermott, 1994; Dreiseitl, 2003) a kultivary, ktoré strácajú svoju rezistenciu musia byť nahradzované odolnejšími. K tomu je nutná identifikácia nových génov alebo ich nových variantov (alel) a znalosť ich presnej pozície v genóme. Okrem toho to umožňuje kombinovanie viac rezistentných génov v jednej odrode známej ako pyramídovanie génov, kedy je kumulatívnym účinkom major génov možné dosiahnuť dlhodobejšie rezistenciu k viac rasám (Fukuoka *et al.*, 2015).

## 3.3 Mapovanie génov

Každý znak je určený hlavným génom alebo skupinou génov, ktorá ho ovplyvňuje. Znalosť ich presnej pozície v genóme je základným predpokladom pre ich ďalšiu charakterizáciu alebo manipuláciu. Jednou zo základných metód, ktoré umožňujú izoláciu génu, ktorého sekvencia nie je vopred známa, je pozičné klonovanie. Pomocou pozičného klonovania je možné izolovať nielen gény veľkého účinku, ale aj gény kvantitatívnych znakov. Dôležitým krokom a tiež predstupňom samotnej izolácie génu je genetické mapovanie.

Genetické mapovanie umožňuje identifikáciu polohy špecifického génu do určitej oblasti na danom chromozóme. Prvá fáza genetického mapovania predstavuje hneď niekoľko krokov, ktoré sú od seba vzájomne závislé: (1) tvorbu vhodnej mapovacej populácie, ktorá je následne genotypovaná molekulárnymi markermi a fenotypovaná pre daný znak; (2) konštrukciu genetickej mapy pomocou molekulárných markerov; a (3) identifikáciu pozície génu pomocou QTL analýzy. Druhá fáza zahŕňa saturáciu identifikovanej oblasti, ktorá upresní pozíciu študovaného génu. K tomu je potrebné odvodzovanie dostatočného množstva molekulárných markerov a získanie čo najviac jedincov, u ktorých došlo v danej oblasti k rekombinácii. Týmto spôsobom je možné určiť čo najpresnejšiu pozíciu študovaného génu na chromozóme, ktorá je vymedzená dvomi hraničnými markermi s čo najtesnejšou väzbou k danému génu (Krattinger *et al.*, 2009).

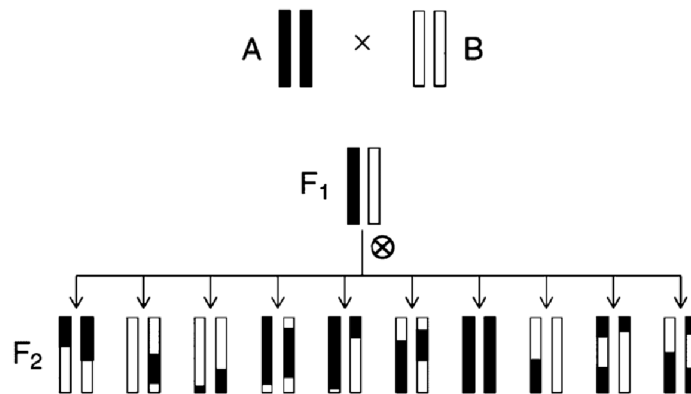
Posledným krokom pozičného klonovania je sekvenovanie študovaného génu a následne jeho charakterizácia a funkčná validácia. To zahŕňa anotáciu génu na sekvenčnej a proteínovej úrovni, čo sa prevádza porovnaním sekvencií s už predtým charakterizovanými sekvenciami z rôznych databáz. K overeniu funkcie sú využívané metódy génového inžinierstva (Čermák *et al.*, 2017).

### 3.3.1 Mapovacie populácie

Nevyhnutnou súčasťou genetického mapovania sú mapovacie populácie. Pri vytvorení mapovacej populácie je podstatný výber rodičov, ktorí sú fenotypovo odlišní (kontrastní) a v ideálnom prípade homozygotní pre sledovaný znak. U samoopelivých druhov sú najčastejšie využívané F<sub>2</sub> mapovacie populácie, rekombinantné inbredné línie (RIL), populácie dihaploidných línií (DH) alebo populácie spätných krížencov (BC) (Burr *et al.*, 1988; He *et al.*, 2001; Doerge, 2002).



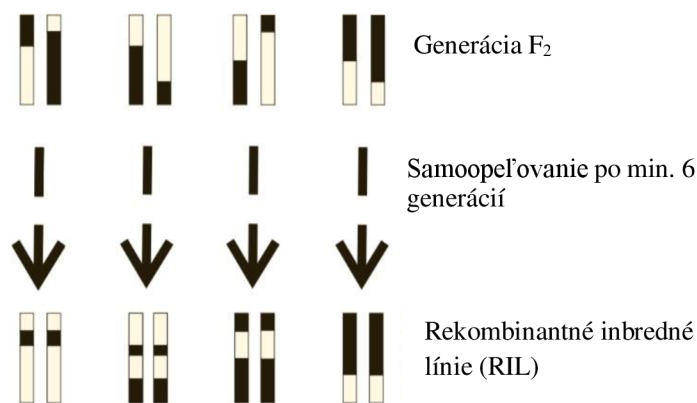
Najjednoduchším typom mapovacích populácií je populácia  $F_2$  v závislosti na jej jednoduchej konštrukcii a krátkom čase produkcie.  **$F_2$  populácie** sa vyvíjajú samoopelením hybridov  $F_1$ , ktorí sú odvodení krížením dvoch homozygotných rodičov. Potomstvo  $F_1$  generácie je tak genotypovo uniformné – heterozygotné. Potomkovia  $F_2$  generácie sú výsledkom meiózy, počas ktorej dochádza k rekombinácii genetickej informácie (Obr. 6). Z populácie  $F_2$  sa pomocou systému kodominantných markerov (možné rozlíšenie homozygotného a heterozygotného jedinca) získajú maximálne genetické informácie.



**Obr. 6: Princíp konštrukcie  $F_2$  populácie.** Krížením dvoch homozygotných rodičov (A a B), ktorí sa líšia v sledovanom znaku, vzniká heterozygotné  $F_1$  potomstvo. Nasleduje samoopelenie  $F_1$  generácie, ktorého výsledkom sú rekombinovaní jedinci  $F_2$  generácie. (Upravené podľa Zhang, 2012).

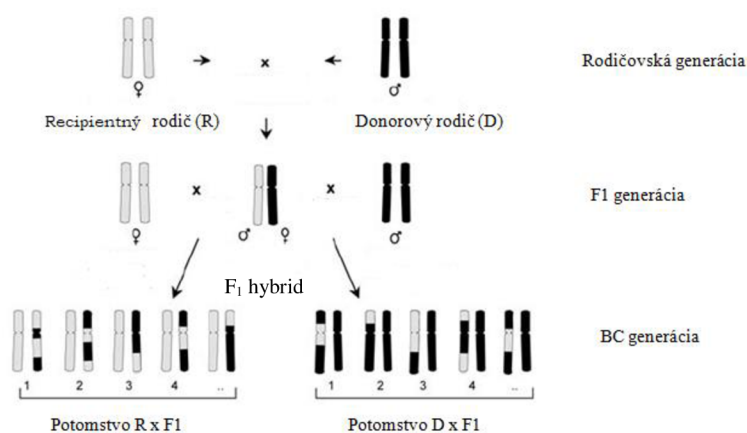
**Rekombinantné inbredné línie** (Recombinant Inbred Lines, RIL; Obr. 7) sú homozygotnými potomkami, ktorí vznikli niekoľkonásobným samoopelením jedincov z  $F_2$  generácie. Tieto línie sú často označované ako single-seed descent lines, pretože jedno semeno každej línie je základom pre ďalšiu generáciu. K tvorbe RIL populácie je nutných šesť až osem generácií ( $F_6$ – $F_8$ ). Opakovaným samoopelením dochádza k zvýšeniu množstva rekombinácií, a tak k rozlíšeniu markerov spojených silnejšou väzbou (Velmurugan *et al.*, 2018).

K vytvoreniu **populácie DH** dochádza zdvojnásobením chromozómov gamét z  $F_1$  rastlín. Výhodou DH populácie je získanie úplne homozygotných línií odvodených z hybridov a to v jednej generácii. Táto možnosť je výhodná u samoopelivých druhov pre zvýšenie efektivity produkcie kultivarov (Velmurugan *et al.*, 2018).



**Obr. 7: Princíp konštrukcie rekombinantnej inbrednej línie (RIL).** Výsledkom rekombinačných udalostí v meióze  $F_1$  sú jedinci  $F_2$  generácie. Následne prebieha samoopelovanie vybraných  $F_2$  línií, čo vedie k vytvoreniu populácie  $F_3$ . Opakovaním tohto procesu vzniká genóm s väčšinou alel fixovaných (Upravené podľa Wilson, 2000).

**Populácia spätných krížencov** (Backcross Populations, BC; Obr. 8) vzniká spätným krížením  $F_1$  generácie a využíva sa pre analýzu špecifického DNA fragmentu nachádzajúceho sa u jedného z rodičov (donor) na genetickom pozadí druhého rodiča (recipient). Heterozygotný jedinec  $F_1$  generácie je niekoľkokrát spätne krížený s recipientným rodičom. Spätne kríženie s recipientným rodičom znižuje podiel genómu donorového rodiča (Schneider, 2005). Ak dochádza k opakovanej selekcii spätným krížením po dobu šiestich generácií, viac ako 99 % genómu a vyššie bude odvodených z recipientného rodiča (Babu *et al.*, 2004). Takéto línie sa nazývajú **takmer izogénne línie** (Near Isogenic Lines, NILs) a sú často generované šľachtiteľmi rastlín ( Tanksley *et al.*, 1995).



**Obr. 8: Princíp konštrukcie BC populácie.** Spätne kríženie  $F_1$  generácie s rekurentným a donorovým rodičom. (Upravené podľa Sederoff, 2003).

Výhodou populácií RIL, NIL a DH je ich trvalosť, nakoľko sa jedná o homozygotné línie reprodukovateľné bez genetických zmien a sú výkonnými nástrojmi na detekciu QTL (Haley a Andersson, 1997). Naopak populácie F<sub>2</sub> sú dočasné, pretože nie je možné ich neobmedzené množenie v dôsledku vysokej heterozygotnosti.

### 3.3.2. Markery pre genetické mapovanie

Pre mapovanie znakov a konštrukciu genetickej mapy je potrebná genotypizácia všetkých jedincov mapovacej populácie. Najpoužívanejšími markermi sú markery detekujúce polymorfizmus na úrovni DNA, kde dochádza napr. k inzercii alebo delícii, prípadne k mutáciám, ktoré vedú k tvorbe alebo zániku restričných miest. Podstatou genotypovania je porovnanie sekvencií DNA a detekcia rozdielov, ktoré sú dôsledkom týchto genetických zmien. Genotypovaním sa získajú genetické markery potrebné ku konštrukcii genetickej mapy, ktorá sa spolu s údajmi z fenotypovania používa na mapovanie požadovaného znaku.

V súčasnej dobe sa ku genotypovaniu využívajú vysokokapacitné markerové systémy, ktoré umožňujú analýzu niekoľko stoviek tisíc polymorfných lokusov, pokrývajúce rovnomerne celý genóm, v jednej analýze. Sú založené na sekvenovaní novej generácie (next generation sequencing, NGS), kedy najbežnejším typom polymorfizmu je jednonukleotidový polymorfizmus (single-nucleotide polymorphism, SNP). Jednonukleotidový polymorfizmus predstavuje zmenu v jedinom nukleotide, ktorá sa vyskytuje v špecifickej pozícii v genóme medzi jednotlivcami. Medzi najpoužívanejšie vysokokapacitné technológie patria napr. RAD-seq (Miller *et al.*, 2007), DArTseq (Kilian *et al.*, 2012) alebo GBS (Elshire *et al.*, 2011). Všetky tieto genotypovacie platformy umožňujú genotypovanie všetkých jedincov mapovacej populácie na veľké množstvo markerov a sú preto využívané v prvej fáze genetického mapovania pre konštrukciu genetickej mapy.

K saturácii detegovanej oblasti sa využívajú najčastejšie markery založené na PCR. Ich odvodzovanie je závislé na individuálnom prístupe. Patrí sem napr. **SSR** (simple sequence repeat) markery, ktorých základom sú tandemové repetície niekoľkonukleotidových motívov (Chin *et al.*, 1996); **CAPS** (cleaved amplified polymorphic sequence) markery založené na restričnom štiepení amplifikovaných úsekov (Shavrukov, 2016); alebo markery, ktoré využívajú dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov spôsobený inzerciou alebo deléciou (Jain *et al.*, 2019).

### 3.3.3. Genetické mapy a ich konštrukcia

**Genetické mapy** udávajú poradie markerov na chromozóme. Ich vzdialenosť je vyjadrená v centiMorganoch (cM) a odráža frekvenciu rekombinácie medzi týmito markermi, kedy pravdepodobnosť 1% výskytu rekombinácií medzi dvoma markermi v potomstve odpovedá 1 cM. Genetická mapa udáva len relatívnu vzdialenosť medzi markermi na chromozóme a ich vzdialenosti nezodpovedajú skutočným vzdialenostiam vyjadrených v pároch báz (base pair, bp), ktoré udávajú **fyzické mapy**.

Pravdepodobnosť, či dôjde k rekombinácii medzi dvoma úsekmi na chromozóme, všeobecne závisí na ich fyzickej vzdialenosti. Ak sa dva markery na chromozóme nachádzajú v blízkej vzdialenosti, pravdepodobnosť vzniku rekombinácií medzi nimi je veľmi nízka. Takéto markery kosegregujú spolu do rovnakých gamét. Naopak so zvyšujúcou sa vzdialenosťou medzi markermi sa pravdepodobnosť vzniku vzájomných rekombinácií zvyšuje, a tým aj ich oddelenie po prechode meiotickým delením.

Výpočet vzdialenosti medzi dvoma markermi je určený ich vzájomnou rekombinačnou frekvenciou prostredníctvom údajov z mapovacích populácií. Analýza sa prevádza štatisticky za použitia pravdepodobnostných rovníc (Morton, 1955). Na prevod rekombinačnej frekvencie do vzdialenosti v cM sa používajú funkcie genetického mapovania, ako Haldanova funkcia (Haldane, 1919) alebo funkcia podľa Kosambiho (Kosambi, 1943).

V súčasnosti sa na mapovanie genetických väzieb používajú počítačové programy ako JoinMap (Stam, 1993a), GMENDEL (Echt *et al.*, 1992), LINKAGE (Suiter *et al.*, 1983) alebo MultiPoint (Ronin *et al.*, 2017).

# 4 MATERIÁL A METÓDY

## 4.1 Materiál

### 4.1.1 Biologický materiál

#### 4.1.1.1. Rastlinný materiál

Dve F<sub>2</sub> mapovacie populácie pripravené Mgr. Evou Janákovou, Ph. D. krížením kontrastných rodičov pre rezistenciu k múčnatke trávovej. Rezistentná línia GZ1 (*T. turgidum* subsp. *dicoccum*) bola krížená s citlivou líniou EBL (*T. turgidum* subsp. *dicoccum*). Výsledná mapovacia populácia s označením GZ1xEBL pozostávala zo 125 jedincov. Verifikačná mapovacia populácia, obsahujúca 151 jedincov, bola pripravená krížením línie GZ1 a DIM25 (*T. turgidum* subsp. *dicoccum*).

Jarná rezistentná línia pšenice dvojzrnovej GZ1 bola zozbieraná v Sobotišti na Myjave v Slovenskej republike a poskytnutá Ing. Štefanom Masárom. Zimná línia EBL (Eichenbarlebener) bola získaná z Inštitútu pre šľachtenie a aklimatizáciu rastlín (IHAR, Radzików, Poľsko) a jarná línia DIM25 (PI94633) z Ministerstva poľnohospodárstva Spojených štátov amerických (Beltsville, MD, USA). Špecifiká použitého rastlinného materiálu znázorňuje Tab. 1.

**Tab. 1:** Rastlinný materiál použitý pre genetické mapovanie.

Materiál	GB kód	Taxonómia	Typ
GZ1	DIM140	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>dicoccum</i>	jarný
EBL	Eichenbarlebener	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>dicoccum</i>	zimný
DIM25	PI 94633	<i>T. turgidum</i> subsp. <i>dicoccum</i>	jarný

#### 4.1.1.2. Materiál *Blumeria graminis*

Pre fenotypovanie boli použité izoláty **A17**, **A24** a **A3ab** *Blumeria graminis* (DC) E.O. Speer f. sp. *tritici* (*Bgt*). Tieto izoláty boli vybrané na základe ich infekčnej agresivity, t.j. od najkratšieho času inokulácie spórami rastlinného materiálu po tvorbu konidiofór. Všetky izoláty pochádzajú zo zbierky *Bgt* Výskumného ústavu rastlinnej výroby v Piešťanoch.

## 4.1.2 Chemikálie, súpravy

### 4.1.2.1 Chemikálie

- 2 U· $\mu$ l<sup>-1</sup> Taq polymeráza (New England BioLabs, kat. č. M0273E)
- 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva, kat. č. 2873901)
- 40% roztok akrylamid/bisakrylamid 19:1 (Serva, kat. č. 1067903)
- agar (HiMedia, kat. č. 9002-18-0)
- benzimidazol (Sigma-Aldrich, kat. č. 821956)
- ethidium bromid (Serva, kat. č. 2125101)
- etyléndiamíntetraoctan sodný dihydrát (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134)
- GeneRuler 100 bp+ DNA molekulárny marker (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM0242)
- chlorid draselný (Lach-ner, kat. č. 7447-40-7)
- chlorid horečnatý hexahydrát (Lach-Ner, kat. č. 30080-AP0-G1000-1)
- kyselina boritá (Lach-ner, kat. č. 10043-35-3)
- MgCl<sub>2</sub> (Lach-Ner, kat. č. 30080-AP0-G1000-1)
- N,N,N',N'-tetrametyletyléndiamín (TEMED; Serva, kat. č. 3593002)
- nukleotidy, 100 mmol·l<sup>-1</sup> dATP, dCTP, dGTP, dTTP (VWR, kat. č. 733-1855)
- primery (Eurofins Genomics)
- redestilovaná voda
- restriekčné enzýmy (New England BioLabs)
- Tris-HCl, pH = 8,2 (Roche, kat. č. 1185-53-1)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, kat. č. 9036-19-5)

### 4.1.2.2 Kity

- Agencourt Gen Find v3 (Beckman Coulter, kat. č. C34880)
- NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, kat. č. 740770.250)

### 4.1.2.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Aparatúra pre vertikálnu gélovú elektroforézu, C-DASG-400-50 (C.B.S. Scientific, USA)
- Centrifúga Mega Star 600R (VWR)
- Centrifúga, MiniStar Silverline (VWR; Radnor, USA)

- Centrifúga, Plate Fuge Micro Centrifuge (Benchmark Scientific; Edison, USA)
- Digitálne predvážky, Vibra AJ-820CE (Shinko Denshi; Tokio, JAP)
- NanoDrop (ND1000 spectrophotometer, Thermo Scientific, USA)
- Robot, Biomek NXP (Beckman Coulter; Brea, USA)
- Termocyklér, C-1000 Touch (Bio-Rad; Hercules, USA)
- Trepačka, Reax Control (Heidolph Instruments; Schwabach, DEU)
- UV transiluminátor, InGenius (Syngene; Bengalúru, IND)
- Vodný kúpeľ (J 18 BAIN UNIV, Thermo Electron Industries SAS)
- Zdroj MP-300V (Major Science; Saratoga, USA)

### 4.1.3 Použité roztoky

- **10x PCR pufoer s MgCl<sub>2</sub>**
  - 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH = 8,2 (Roche, kat. č. 1185-53-1)
  - 500 mmol·l<sup>-1</sup> chlorid draselný (Lach-ner, kat. č. 7447-40-7)
  - 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, kat. č. 9036-19-5)
  - 15 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> (Lach-Ner, kat. č. 30080-AP0-G1000-1)
- **5x Cresol Red**
  - 0,01 % *o*-kresolová červeň (Sigma-Aldrich; kat. č. 1733-12-6)
  - 1,5% sacharóza (Lach-ner, kat. č. 57-50-1)

#### Polyakrylamidový 3,5% gél

- **3,5% akrylamid: bisakrylamid**
- **0,073% (v/v) TEMED**
- **0,066% (w/v) APS**
- **0,5x TBE pufoer**
  - 5x TBE pufoer:
    - 450 mmol·l<sup>-1</sup> Tris
    - 450 mmol·l<sup>-1</sup> kyselina boritá
    - 450 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA, pH = 8,0
  - 0,5x TBE pufoer:
    - 45 mmol·l<sup>-1</sup> Tris
    - 45 mmol·l<sup>-1</sup> kyselina boritá
    - 1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA, pH = 8,0

## 4.2. Použité metódy

### 4.2.1 Mendelizácia znaku a rozšírenie mapovacej populácie

Zameraním tejto bakalárskej práce bolo zúženie oblasti lokusu *QPm.GZI-2A*. Nutnosťou je získanie čo najväčšieho počtu línii s rekombináciami v danej oblasti. Nakoľko je znak podmienený dvomi lokusmi, bola prevedená „mendelizácia“ lokusu *QPm.GZI-2A*. Cieľom mendelizácie bolo získať línie, ktorých rezistencia bola podmienená len lokusom *QPm.GZI-2A*. Na základe toho boli vysadené F<sub>2</sub> rekombinantné alebo heterozygotné línie lokusu *QPm.GZI-2A*, ktoré boli zároveň homozygotne recesívne v lokuse *QPm.GZI-7A*. Pokiaľ boli rekombinantné línie heterozygotné pre *QPm.GZI-7A* lokus, boli v následnej generácii vybrané línie homozygotne recesívne. Pre výber týchto línii boli v oblasti lokusu *QPm.GZI-7A* navrhnuté molekulárne markery.

### 4.2.2 Izolácia DNA

DNA bola izolovaná z listových segmentov odoberaných z približne 3 týždne starých rastlín vysušených pri teplote 37 °C po dobu najmenej 24 hodín. Vysušené listové segmenty boli homogenizované s dvomi sklenenými guľičkami (5 mm) pri 27 Hz po dobu 4 minút. DNA izolácia všetkých jedincov bola prevedená kitom Agencourt GenFind v3 v 96-jamkových doštičkách podľa Ivaničovej *et al.* (2016) pomocou robota Biomek NXP. DNA izolácia selektovaných línii bola prevedená pomocou kitu NucleoSpin® Plant II (Macherey Nagel, Düren, Nemecko) podľa priloženého originálneho pracovného návodu. DNA koncentrácia bola stanovená spektrofotometrom NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

### 4.2.3 Vývoj molekulárnych markerov

Vývoj molekulárnych markerov bol uľahčený vďaka sekvenovaniu chromozómu 2A a 7A rodičovských línii. Triedenie chromozómov, sekvenovanie a spracovanie dát bolo prevedené laboratóriom Centra štruktúrnej a funkčnej genomiky Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR. Získané sekvencie vo forme scaffoldov boli využité pre odvodzovanie nových DNA markerov.



K navrhovaniu markerov bola využitá pozícia anotovaných génov referenčnej sekvencie cv. Zavitan (Avni *et al.*, 2017), kedy bola sekvencia vybraného génu porovnaná so sekvenciami rodičovských línií pomocou softwaru blastn (Altschul *et al.*, 1990) a identifikované scaffolds boli porovnané medzi sebou. Pri navrhovaní markerov bol uprednostňovaný dĺžkový polymorfizmus, v prípade jeho neprítomnosti boli navrhnuté CAPS markery. Po určení sekvencie s dĺžkovým polymorfizmom alebo s vhodným štiepnym miestom boli v časti sekvencie navrhnuté primery pomocou programu Primer3 Input (<https://primer3.ut.ee/>). V prípade CAPS markerov boli pomocou programu CAPS designer ([https://sgn.cornell.edu/tools/caps\\_designer/caps\\_input.pl](https://sgn.cornell.edu/tools/caps_designer/caps_input.pl)) navrhnuté vhodné restriktčné enzýmy, ktoré štiepia sekvenciu v konkrétnom mieste. Markery boli navrhnuté vždy tak, aby boli polymorfné v oboch populáciách.

#### 4.2.4 Polymerázová reťazová reakcia a restriktčné štiepenie

PCR reakcia bola prevedená v objeme 20  $\mu\text{l}$  v 96-jamkových doštičkách (VWR; Radnor, USA). Zložky reakcie znázorňuje Tab. 2. Teplotný program PCR reakcie je znázornený v Tab. 3.

**Tab. 2:** Zloženie PCR reakčnej zmesi.

Zložka PCR reakčnej zmesi	Koncentrácia v reakcii	Objem na 1 reakciu [ $\mu\text{l}$ ]
5x Cresol red	1x	4
10x PCR pufoer (s $\text{MgCl}_2$ )	1x	2
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ forward (F)primer	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	2
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ reverse (R)primer	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	2
100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dNTPs	200 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,4
~2 U/ $\mu\text{l}$ <i>Taq</i> polymeráza	0,8 U	0,4
destilovaná voda	-	-
DNA	10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	-
Celkový objem		20

**Tab. 3:** Teplotný priebeh PCR reakcie.

	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas	Počet cyklov
<b>Denaturácia</b>	95	5 min	1
<b>Amplifikácia</b>	<b>Denaturácia</b>	30 s	40
	<b>Nasadanie primerov</b>	60	
	<b>Elongácia</b>	72	
<b>Záverečná elongácia</b>	72	10 min	1

Markery navrhnuté ako CAPS boli amplifikované PCR metódou pomocou špecifických primerov a následne štiepené restričnou endonukleázou za vhodných podmienok podľa výrobcu. PCR produkty alebo produkty štiepenia boli následne separované elektroforézou.

#### 4.2.5 Elektroforetická separácia produktov

Elektroforetická separácia PCR produktov a produktov restričného štiepenia bola prevedená v 3,5% polyakrylamidovom géle s hrúbkou 1 mm s použitím vertikálnej aparatúry (C.B.S. Scientific, USA). Jedno zo skiel bolo pred zostavovaním aparatúry silanizované 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octovej v 96% ethanole s 3  $\mu\text{l/ml}$  3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu, vďaka čomu PAA gél priľnul na silanizované sklo.

Polyakrylamidový gél bol pripravený zmiešaním látok uvedených v kapitole 4.1.3. Medzi sklá bola naliata zmes, nasledovalo nasadenie hrebenka k vytvoreniu jamiek v géle. Gél bol polymerizovaný po dobu 45 min, potom bol odstránený hrebenok a sklá boli vložené do aparatúry. Priestory katódy a anódy v aparatúre boli naplnené 0,5x koncentrovaným roztokom pufru TBE. Do pufru bolo v priestore anódy pridaných 50  $\mu\text{l}$  10% roztoku ethidium bromidu. Následne došlo k nasýteniu gélu ethidium bromidom prostredníctvom spustenia tzv. *prerunu* po dobu 1 hodinu pri napätí 300 V. *Pre run* je tiež dôležitý pre odstránenie iónov, ktoré zostali v géle z kroku polymerizácie a pre zníženie zahrievania gélov.

Do jednotlivých jamiek na géle bolo nanesených 5  $\mu\text{l}$  vzoriek DNA PCR produktov, v prípade vzoriek DNA štiepných produktov bolo pipetovaných 8  $\mu\text{l}$ . Do prvej jamky bol nanesený veľkostný marker 100bp Plus DNA Ladder o objeme 5  $\mu\text{l}$ . Separácia produktov prebiehala pri napätí 350 V, pričom časové trvanie separácie záviselo od veľkosti produktov konkrétneho markeru. Vizualizácia produktov bola uskutočnená pomocou UV transluminátoru a gél bol vyfotografovaný.

## 4.2.6 Fenotypovanie

Fenotypovanie bolo prevedené na Prírodovedeckej fakulte Univerzity Komenského v Bratislave v spolupráci s p. doc. RNDr. Švecom, CSc. Izoláty A17, A23 a A3ab *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* tu sú p. doc. RNDr. Švecom, CSc. udržiavané za vhodných podmienok pre účely fenotypovania.

Pre analýzu rezistencie k *Bgt* izolátom, ktoré spôsobujú ochorenie múčnatku, bolo v laboratórnych podmienkach v plastových kvetináčoch plnených rašelinou pestovaných cca 20 jedincov z každej línie. Po 10 dňoch boli primárne lístky nasekané na segmenty o dĺžke 2,5 cm a uložené do Petriho misiek naplnených 0,5% agarovým médiom obsahujúce 862 mg·l<sup>-1</sup> benzimidazolu. Následne boli spóry izolátov A17, A23 a A3ab vyfúknuté pomocou injekčnej striekačky s gumenou hadicou do očkovacej veže, v ktorej sa nachádzala Petriho miska s listovými segmentmi jednej línie. Tieto segmenty boli inkubované v rastovej komore po dobu 13 dní za neustáleho svetla 800 luxov pri teplote 18 – 20 °C. Potom nasledovalo vyhodnotenie reakcie rastliny na múčnatku.

Ak boli v rámci jedného pozorovania všetky rastliny pokryté múčnatkou, fenotyp bol hodnotený ako náchylný. Naopak, fenotyp bol hodnotený ako rezistentný vtedy, ak všetky rastliny v rámci jedného pozorovania neboli infikované múčnatkou. Rastliny, u ktorých nebol fenotyp jednoznačne detekovateľný, neboli hodnotené.

## 4.2.7 Identifikácia kandidátnych génov

Identifikácia kandidátnych génov bola uskutočnená fyzickým ukotvením zúženej oblasti na referenčnú sekvenciu cv. *Zavitan* (Avni *et al.*, 2017) pomocou softwaru *blastn* (Altschul *et al.*, 1990). Pre ukotvenie boli použité sekvencie hraničných markerov *owm2016* a *owm2028* danej oblasti (Tab. 4).

**Tab. 4:** Hraničné markery použité pre ukotvenie oblasti rezistentného lokusu *QPm.GZ1-2A* k referenčnej sekvencii cv. *Zavitan*.

Marker	Sekvencia
<b>owm2016</b>	CACATCCGATTTGTCGTCAGGTGTGCTCTGTCAGGGGTATGTGTTGAGTGCCTACACGTTGAAT CATTCTGTTGTGTATGAGTGATGGAGTGTACTTGCAGAATTAGTGG
<b>owm2028</b>	AAGAGGTAGCACACGGATGGGGTAGATCATGGACGAACAGGTGATCAATCCAATCGTGCGTGA GATCAGAGAGACCGCTTGGTGATGAAGGGGCCGAGACACGGAGGCTCCGCCGAACAAACGCA TGCATG

# 5 VÝSLEDKY

## 5.1 Mendelizácia znaku a rozšírenie mapovacej populácie

Bolo vysadených 16 rekombinantných a 368 heterozygotných F<sub>2</sub> línií v lokuse *QPm.GZ1-2A*. Línie boli genotypované hraničnými markermi *owm2016* a *owm2037* (Tab. 6). Pre výber homozygotne recesívnych línií v lokuse *QPm.GZ1-7A* boli použité markery *owm2041* a *owm2045* (Tab. 5). Z 16 rekombinantných línií bolo získaných 8 línií v mendelizovanom stave. Tieto línie boli následne fenotypované pre rezistenciu. Mapovacia populácia bolo zväčšená o 368 heterozygotných línií, z ktorých bolo získaných 49 rekombinantov.

**Tab. 5:** Markery navrhnuté do oblasti *QPm.GZ1-7A* pre mendelizáciu znaku.

Marker	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Ta (°C)	Type <sup>1</sup>
<i>owm2041</i>	CTCGTCTTAAAGTGCGCTCC	TTCCACCGTATCTCTCGCTC	60	CAPS (NsiI)
<i>owm2045</i>	GCGTTACTCCCACCCTTTTC	TTCTTGCCACAACACCTTCG	60	CAPS (BsiII)

## 5.2 Molekulárne markery lokusu *QPm.GZ1-2A*

Pre zahustenie lokusu *QPm.GZ1-2A* bolo navrhnutých 47 markerov založených na PCR. Z tohto počtu bolo 33 markerov vyradených, pretože dochádzalo k tvorbe nešpecifických produktov alebo neboli polymorfné. Zvyšných 14 markerov vykazovalo buď dĺžkový polymorfizmus alebo jednonukleotidový polymorfizmus. Podrobné špecifikácie primerov daných markerov sú uvedené v Tab. 6.

**Tab. 6:** Špecifikácia primerov jednotlivých markerov navrhnutých do oblasti lokusu *QPm.GZI-2A*.

Marker	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Ta (°C)	Type <sup>1</sup>
<i>owm2005</i>	TGACTCATGGCATGGCACACGT	AAAAGTCATTACCATCAACTG	60	CAPS (MluI, BstUI)
<i>owm2016<sup>2</sup></i>	CACATCCGATTTGTCTCAG	CCACTAATTCTGCAAGTACTCC	60	CAPS(BsmI)
<i>owm2023</i>	GACCTCTCGACGGTGGATAA	TTTTAAAAATCATGCAAGAAATAAGAG	60	CAPS (HaeIII)
<i>owm2026</i>	CCCTGAAGGGAGGGAACCT	ATCGAAGGGACCCTCTGTCT	60	CAPS(BsmAI)
<i>owm2027</i>	ACATTGGTGAAGCATGCAGA	TGAGGCTGTCAGATGGTGTC	60	CAPS (AluI)
<i>owm2028</i>	AAGAGGTAGCACACGGATGG	CATGCATGCGTTTGTTCG	60	CAPS (HhaI)
<i>owm2033</i>	CGTCTGCTGGATTTAGCATT	GAGCAAACATGCCGAACAC	60	CAPS (NlaIII)
<i>owm2034</i>	ATCTGATGGAGTCCGTGGG	TGGCCGGCTAAAGAAAGTTG	60	CAPS (RsaI)
<i>owm2037<sup>2</sup></i>	CAGCCTCCATTGTTGCAAGA	ACGGGGACTATGGCTTGTA	60	CAPS(AluI)
<i>owm2063</i>	CATGAGTCGACAGTGCCTG	TCTGGGTGAGTAGATTTCTGC	60	INDEL(4 bp)
<i>owm2066</i>	TGCCGCACATTTTATAGACACC	ACCTCCAATGGCATCGAGAA	60	CAPS (SacII)
<i>owm2067</i>	TGGAGATGCACTGGGACTTT	TGAAGGGTTGGGAGTGGAAA	60	CAPS (RsaI)
<i>owm2077</i>	GGATGAAGAAGGCGCTCAAG	GAATGACAGCGTGTGGGATC	60	INDEL (14 bp)
<i>owm2079</i>	CACATGGAAGGGAACACTGC	GCACATTTTCAGTTTGCCACC	60	CAPS(BstNI)

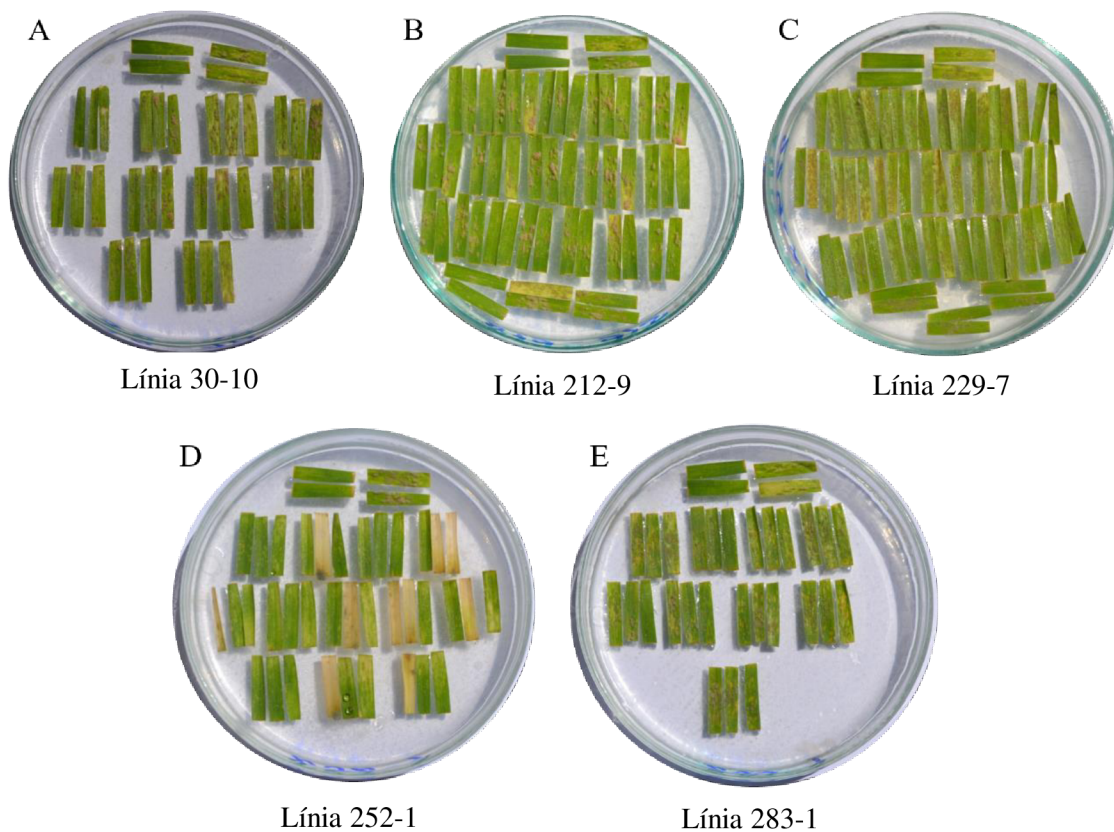
1-Restrikčné enzýmy použité pre detekciu polymorfizmu sú uvedené v zátvorke

2- Hraničné markery použité ku genotypovaniu

## 5.3 Fenotypovanie rekombinantných líní

V oblasti lokusu *QPm.GZI-2A* bolo identifikovaných 8 rekombinantných líní v mendelizovanom stave. Pre účely fenotypovania boli tieto línie prevedené do homozygotného stavu a inokulované izolátmi *Blumeria graminis* A17, A23 a A3ab.

U líní 30-10, 212-9, 229-7 a 283-1 došlo k tvorbe kolónií a boli vyhodnotené ako náchylné (Obr. 9). Línia 252-1 bola rezistentná, nakoľko nedošlo k tvorbe kolónií (Obr. 9). V prípade líní 211-3, 219-3 a 258-8 došlo pravdepodobne ku kontaminácii hubou *Aspergillus* a fenotyp tak nebolo možné hodnotiť.



**Obr. 9: Fenotypová reakcia rekombinantných línií na izoláty múčnatky A17, A23 a A3ab.** Na každom obrázku prvá rada (horizontálna) predstavuje dva segmenty náchylnej línie DIM25 a dva segmenty odolnej línie GZ1. Nasledujúci segmenty predstavujú 10 jedincov F<sub>4</sub> generácie rodičovskej línie 30-10 (A), 20 jedincov F<sub>4</sub> generácie rodičovskej línie 212-9 (B), 23 jedincov F<sub>4</sub> generácie rodičovskej línie 229-7 (C), 12 jedincov F<sub>4</sub> generácie rodičovskej línie 252-1 (D) a 9 jedincov F<sub>4</sub> generácie rodičovskej línie 283-1 (E). Každý jedinec jednotlivých línií je reprezentovaný 2 – 3 segmentmi listov. Fenotyp s kolóniami múčnatky vykazovali línie 30-10, 212-9, 229-7 a 283-1, ktoré boli vyhodnotené ako náchylné. Kolónie neboli prítomné u línie 252-1, ktorá bola vyhodnotená ako rezistentná.

## 5.4 Saturácia *Q<sub>Pm</sub>.GZ12-A* a identifikácia kandidátnych génov

Lokus *Q<sub>Pm</sub>.GZ12-A* bol saturovaný 14 markermi a spoločne s fenotypmi rekombinantných línií bolo miesto rezistencie vymedzené medzi markermi *owm2016* a *owm2028* (Tab. 7) a rekombináciami línií 30-10 a 229-7 a 283-1 (Tab. 7). Tieto markery v referenčnej sekvencii cv. Zavitan vymedzujú oblasť 5,08 Mb (697 583 175 – 702 660 930) ktorá obsahuje 60 anotovaných génov. Tri z týchto génov majú známy vzťah k rezistencii.

**Tab. 7:** Saturácia lokusu *QPm.GZ1-2A* novými markermi u rekombinantných línií

Marker	Pozícia v 2A cv. Zavitanu	Rekombinantné línie GZ1xDIM25					<i>QPm.GZ1-2A</i> veľkosť lokusu v cv. Zavitan (Mb)
		30-10	212-9	229-7	252-1	283-1	
owm2016	697 583 175	B	B	A	A	A	5,08
owm2077	698 517 294	B	B	B	A	B	
owm2079	698 521 598	B	B	B	A	B	
owm2063	698 545 240	B	B	B	A	B	
owm2066	699 073 021	B	B	B	A	B	
<i>QPm.GZ1-2A</i>		B	B	B	A	B	
owm2067	699 330 661	B	B	B	A	B	
owm2005	699 777 984	B	B	B	A	B	
owm2028	702 660 930	A	B	B	A	B	
owm2027	703 331 111	A	B	B	A	B	
owm2033	704 275 286	A	B	B	A	B	
owm2026	707 348 654	A	A	B	A	B	
owm2023	710 057 337	A	A	B	B	B	
owm2034	710 234 085	A	A	B	B	B	
owm2037	711 885 472	A	A	B	B	B	

A – GZ1 alela; B – DIM25 alela

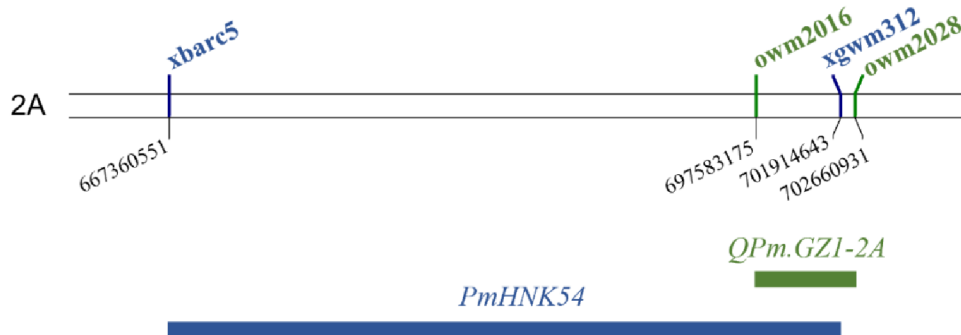
## 6 DISKUSIA

V tetraploidnej línii GZ1 (*Triticum turgidum* subsp. *dicoccum*) bol identifikovaný lokus *Q<sub>Pm</sub>.GZ1-2A* s úplnou a rasovo nešpecifickou rezistenciou k *Blumeria graminis* (DC) E.O. Speer f. sp. *tritici* v homozygotne recesívnom usporiadaní. Takýto typ rezistencie je veľmi vzácny, pretože väčšina génov rezistencie je kódovaná dominantnými R-génmi, ktoré sa riadia podľa konceptu gén-proti-génu (Flor, 1971) a poskytujú tak rezistenciu voči jednej alebo niekoľko rasám (rasovo špecifická rezistencia). Rasovo nešpecifická rezistencia, účinná proti širokému spektru rás, je väčšinou podmienená niekoľkými génmi (Vanderplank, 1963). Môže byť však poskytovaná tiež major génmi, ako je tomu v prípade jačmenného génu *Mlo* (Büschges *et al.*, 1997). Bolo preukázané, že strata funkcie oboch alel génu *Mlo* má za následok homozygotne recesívnu rasovo nešpecifickú rezistenciu vo všetkých vývojových štádiách (Jorgensen, 1992). Podobná reakcia voči múčnatke bola pozorovaná aj v prípade tetraploidných hybridov GZ1, čo by mohlo znamenať, že sa jedná o rovnaký gén. Avšak gén *Mlo* bol mapovaný na chromozóme 4H (Simons *et al.*, 1997), ktorý nie je synténny s *Q<sub>Pm</sub>.GZ1-2A* lokusom. Homológy jačmenného génu *Mlo* boli v hexaploidnej pšenici *T. aestivum* identifikované na chromozómoch 5AL, 4BL a 4DL (Elliott *et al.*, 2002), kedy je navyše pre dosiahnutie rezistencie nutný knock-out všetkých alel naraz (Wang *et al.*, 2014). To je veľký rozdiel od GZ1, kde je rezistencia výsledkom recesívnej mutácie jedného génu. *Mlo* rezistenciu okrem iného charakterizuje spontánna smrť mezofylových buniek, čo môže niekedy viesť k nekróze listov a k strate výnosu (Bayles *et al.*, 1990, Peterhänsel *et al.*, 1997; Piffanelli *et al.*, 2002; Makepeace *et al.*, 2007). V prípade GZ1 neboli pozorované nekrotické škvrny na listoch, čo naznačuje iný mechanizmus rezistencie.

Lokus *Q<sub>Pm</sub>.GZ1-2A* bol saturovaný 14 markermi a spoločne s fenotypmi ôsmich homozygotných rekombinantných línii bol lokus vymedzený medzi markermi *owm2016* a *owm2028* (Tab. 6). Týmto bol lokus *Q<sub>Pm</sub>.GZ1-2A* s pôvodnou dĺžkou 22,7 Mb zúžený na 5,08 Mb. Na chromozóme 2AL bolo doteraz identifikovaných osem génov spôsobujúcich odolnosť voči múčnatke. Radia sa sem gény *PmPS5A* (Zhu *et al.*, 2005), *PmLK906* (Niu *et al.*, 2008), *PmYm66* (Hu *et al.*, 2008), *Pm50* (Mohler *et al.*, 2013), *PmHnk54* (Xu *et al.*, 2011), *pmX* (Fu *et al.*, 2013) a *PmHo* (Komáromi *et al.*, 2016); a multialelický *Pm4*, ktorý pozostáva zo štyroch alel rezistencie *Pm4a*, *Pm4b*, *Pm4c* a *Pm4d* (The *et al.*, 1979; Hao *et al.*, 2008; Schmolke *et al.*, 2011). Analýzou genómových pozícií všetkých týchto génov s pozíciou *Q<sub>Pm</sub>.GZ1-2A* sa zistilo, že iba gén *PmHnk54* (Xu *et al.*, 2011)



mapoval do rovnakej oblasti (Obr. 10). *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A* je však od tohto génu odlišný, nakoľko rezistencia podmienená *PmHnk54* génom je kódovaná dominantne (Xu *et al.*, 2011) a rezistencia podmienená *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A* je kódovaná recesívne.



**Obr. 10: Pozície génu *PmHnk54* a *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A* lokusov.** Pozície lokusov sú odvodené z referenčnej sekvencie cv. Zavitan (Avni *et al.*, 2017). Lokus *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A* (zelený pruh) je ohraničený markermi *owm2016* a *owm2028* (zelené) a čiastočne sa prekrýva s lokusom *PmHnk54*. Lokus *PmHnk54* (modrý pruh) je ohraničený markermi *xbarc5* a *xgwm312* (modré; Xu *et al.*, 2011). Lokus *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A* a *PmHnk54* zdieľajú približne 5,08 Mb z celkovej 31 Mb oblasti *PmHnk54*. Avšak *PmHnk54* podmieňuje rezistenciu dominantne, čím sa líši od recesívneho *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A*.

V oblasti lokusu *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A* (5,08 Mb) bolo identifikovaných 60 kandidátnych génov. Tri z týchto génov kódujú proteíny s LRR (leucin-rich repeats) doménami. Domény LRR sú bežné proteínové domény typické pre R-gény, ktoré slúžia ako receptory. Tieto receptory sú najčastejšie zapojené do rozpoznávania patogéna a následnej signalizácie k vyvolaniu obrannej reakcie rastliny. Nakoľko sa v prípade génov rezistencie zapojených do signálnych dráh väčšinou jedná o dominantné R-gény (Kourelis a van der Hoorn, 2018), pravdepodobnosť, že *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A* je jedným z nich, je malá.

Oblasť *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A* obsahuje stále veľa kandidátnych génov na to, aby mohlo dôjsť k identifikácii konkrétneho génu. Preto je potrebné identifikovať nové rekombinácie v oblasti *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A* a lokus *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A* saturovať väčším množstvom markerov. Mapovacia populácia bola preto rozšírená o 368 líní, ktoré poskytli 49 nových rekombinantov využiteľných pre presnejšie mapovanie *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A* lokusu. Tieto výsledky poskytujú ideálnu základňu pre identifikáciu génu rezistencie v lokuse *Q<sub>Pm</sub>.GZI-2A*.

# 7 ZÁVER

Predkladaná bakalárska práca predstavuje vysoko-hustotné mapovanie lokusu *QPm.GZI-2A*, ktorý podmieňuje rasovo-nešpecifickú rezistenciu voči *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* v homozygotne-recesívnom usporiadaní. Práca bola zameraná na zúženie oblasti lokusu *QPm.GZI-2A* a identifikáciu kandidátnych génov.

Lokus *QPm.GZI-2A* bol saturovaný 14 markermi a spoločne s fenotypmi ôsmich homozygotných rekombinantných línií bol lokus vymedzený medzi markermi *owm2016* a *owm2028*. Lokus *QPm.GZI-2A* s pôvodnou dĺžkou 22,7 Mb bol tak zúžený na 5,08 Mb. V tejto oblasti bolo identifikovaných 60 kandidátnych génov. Tri z týchto génov majú vzťah k rezistencii, pretože kódujú proteíny s LRR doménami. Tieto domény sú charakteristické pre dominantné R-gény a je teda malá pravdepodobnosť, že by sa jednalo o nami skúmaný gén, ktorý je podmienený recesívne.

Nakoľko je 60 kandidátnych génov stále veľa na to, aby mohlo dôjsť k identifikácii konkrétneho génu, bola  $F_2$  mapovacia populácia zväčšená o 368 heterozygotných línií. Z týchto línií bolo získaných 49 rekombinantov. Tieto rekombinantné línie budú využité pre ďalšie zúženie lokusu *QPm.GZI-2A*. Doposiaľ identifikované markery však poskytujú výbornú základňu pre ich využitie v šľachtiteľstve k tvorbe odolných kultivarov voči múčnatke.

# 8 LITERATÚRA

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular biology* 215 (3): 403 – 410.

Arora, S., Steuernagel, B., Gaurav, K., Chandramohan, S., Long, Y., Matny, O., Johnson, R., Enk, J., Periyannan, S., Singh, N., Asyraf Md Hatta, M., Athiyannan, N., Cheema, J., Yu, G., Kangara, N., Ghosh, S., Szabo, L.J., Poland, J., Bariana, H. a Jones, J.D.G. (2019). Resistance gene cloning from a wild crop relative by sequence capture and association genetics. *Nature Biotechnology*, 37 (2): 139 – 143.

Avni, R., Nave, M., Barad, O., Baruch, K., Twardziok, S.O., Gundlach, H., Hale, I., Mascher, M., Spannagl, M., Wiebe, K., Jordan, K.W., Golan, G., Deek, J., Ben-Zvi, B., Ben-Zvi, G., Himmelbach, A., MacLachlan, R.P., Sharpe, A.G., Fritz, A. and Ben-David, R. (2017). Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. *Science*, 357 (6346): .93 – 97.

Babu, R., Nair, S.K., Prasanna, B.M., Gupta, H.S. (2004): Integrating marker assisted selection in crop breeding – Prospects and challenges, *Curr. Sci.* 87: 607 – 619.

Bayles, C.J., Ghemawat, M.S., Aist, J.R. (1990): Inhibition by 2-deoxy-D-glucose of callose formation, papilla deposition, and resistance to powdery mildew in an *ml-o* barley mutant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36 (1): 63 – 72.

Braun, U., Cook, R. T. A. (2012): Taxonomic Manual of The Erysiphales (Powdery Mildew). *CBS Biodiversity Series* 11: 1 – 707.

Burdon, J.J. (1993): The Structure of Pathogen Populations in Natural Plant Communities. *Annual Review of Phytopathology*, 31 (1): 305 – 323.

Burr, B., Burr, F.A., Thompson, K.H., Albertson, M.C., Stuber, C.W. (1988): Gene mapping with recombinant inbreds in maize, *Genetics* 118: 519 – 526.

Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F., Schulze-Lefert, P. (1997): The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88 (5): 695 – 705.

Chin, E. C. L., Lee, M., Senior, M. L., Smith, J. S. C., Stuber, C. W. (1996): Simple Sequence Repeat Markers Developed from Maize Sequences Found in the GENBANK Database: Map Construction. *Crop Science* 36: 1676 – 1683.

Crute, I.R. and Pink, D.A.C. (1996): Genetics and Utilization of Pathogen Resistance in Plants. *The Plant Cell*, 8 (10): 1747 – 1755.

Čermák, Tomáš, Curtin, Shaun J., Gil-Humanes, Javier, Čegan, Radim, Kono, Thomas J.Y., Konečná, Eva, Joseph J. Belanto, Starker, Colby G., Mathre, Jade W., Greenstein, Rebecca L., Voytas Daniel F. (2017): A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants, *The Plant Cell* 29 (6): 1196 – 1217.

Doebley, J.F., Gaut, B.S. and Smith, B.D. (2006): The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell*, 127 (7): 1309 – 1321.

Doerge, R. (2002): Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations, *Nature Rev.* 3: 43 – 52.

Draz, I.S., Esmail, S.M., Abou-Zeid, M.A.E.-H. and Essa, T.A.E.-M. (2019): Powdery mildew susceptibility of spring wheat cultivars as a major constraint on grain yield. *Annals of Agricultural Sciences*, 64 (1): 39 – 45.

Dreiseitl, A. (2003): Adaptation of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* to barley resistance genes in the Czech Republic in 1971-2000. *Plant Soil Environment* 49 (6): 241 – 248.

Dubkovsky, J., Dvořák, J. (2007): Genome plasticity a key factor in the success of polyploidy wheat under domestication. *Science* 316: 1862 – 1866.

Dvořák, J., McGuire, P.E. and Cassidy, B. (1988): Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome*, 30 (5): 680 – 689.

Dvořák, J.P., Terlizzi, D.I., Zhang, H.B. and Resta, P. (1993). The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21–31.

Echt, C., Knapp, S., Liu, B.H. (1992): Genome mapping with non-inbred crosses using Gmendel 2.0. *Maize Genet. Coop. Newslett* 66: 27 – 29.

Elliott, C., Zhou, F., Spielmeyer, W., Panstruga, R. and Schulze-Lefert, P. (2002): Functional Conservation of Wheat and Rice Mlo Orthologs in Defense Modulation to the Powdery Mildew Fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (10): 1069 – 1077.

Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., Mitchell, S. E. (2011): A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. *Plos one* 6 (5): e19379.

Feldman, M. (1995): Wheats pp. 185–192. In: Smartt J., editor; , Simmonds N. W., editor. , eds. Evolution of crop plants. Longman Scientific and Technical, Harlow, UK. Feldman, M. (2001): Origin of Cultivated Wheat. In: A. P. Bonjean and W. J. Angus, Ed., The World Wheat Book : A History of Wheat Breeding, *Intercept Ltd.*, London: 3 – 56.

Feldman, M. and Levy, A.A. (2005): Allopolyploidy--a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic and Genome Research* 109 (1-3): 250–258.

Feuillet, C., Langridge, P. and Waugh, R. (2008): Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in Genetics* 24 (1): 24 – 32.

Flor, H.H. (1971): Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9 (1): 275 – 296.

Francis, S.A., Dewey, F.M. and Gurr, S.J. (1996): The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49 (3): 201 – 211.

Fu B., Chen Y., Li N., Ma H., Kong Z., Zhang L., Jia H., Ma Z. (2013): *pmX*: a recessive powdery mildew resistance gene at the *Pm4* locus identified in wheat landrace Xiaohongpi. *Theoretical and Applied Genetics* 126 (4): 913 – 921.

Fukuoka, S., Saka, N., Mizukami, Y., Koga, H., Yamanouchi, U., Yoshioka, Y., Hayashi, N., Ebana, K., Mizobuchi, R. and Yano, M. (2015): Gene pyramiding enhances durable blast disease resistance in rice. *Scientific Reports* 5 (1).

Glawe, D.A. (2008): The Powdery Mildews: A Review of the World's Most Familiar (Yet Poorly Known) Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 46 (1): 27 – 51.

Gornicki, P., Zhu, H., Wang, J., Challa, G.S., Zhang, Z., Gill, B.S. and Li, W. (2014): The chloroplast view of the evolution of polyploid wheat. *The New Phytologist* 204 (3): 704 – 714.

Haldane, J.B.S. (1919): The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *Journal of Genetics* 8: 299 – 309.

Haley C.S., Andersson L. (1997): Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals, In: Dear P.H. (ed), Genome mapping: a practical approach. *Oxford University Press*, New York: 49 – 71.

Hao Y., Liu A., Wang Y., Feng D., Gao J., Li X., Liu S., Wang H. (2008): *Pm23*: a new allele of *Pm4* located on chromosome 2AL in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 117 (8): 1205 – 1212.

Hedden, P. (2003): The genes of the Green Revolution. *Trends in Genetics* 19 (1): 5

He, P., Li, J.Z., Zheng, X.W., Shen, L.S., Lu, C.F., Chen, Y. and Zhu, L.H. (2001): Comparison of Molecular Linkage Maps and Agronomic Trait Loci between DH and RIL Populations Derived from the Same Rice Cross. *Crop Science*, 41 (4): 1240 – 1246.

Huang B.E., George A.W., Forrest K.L., Kilian, A., Hayden M.J., Morell M.K. et al. (2012): A multiparent advanced generation inter-cross population for genetic analysis in wheat. *Plant Biotechnol* 10: 826 – 839 .

Hu, T., Li, H., Liu, Z., Xie, C., Zhou, Y., Duan, X., Jia, X., Mingshan, Y., Yang, Z., Sun, Q., Liu, Z. (2008): Identification and molecular mapping of the powdery mildew resistance gene in wheat cultivar Yumai 66. *Acta Agronomica Sinica* 34 (4): 545 – 550.

Ivaničová Z., Jakobson I., Reis D., Šafař J., Milec Z., Abrouk M., Doležel J., Järve K., Valárik M. (2016): Characterization of new allele influencing flowering time in bread wheat introgressed from *Triticum militinae*. *New Biotechnol* 33: 718 – 727.

Jain, A., Roorkiwal, M., Kale, S., Garg, V., Yadala, R. and Varshney, R.K. (2019): InDel markers: An extended marker resource for molecular breeding in chickpea. *Plos one*, 14 (3), p.e0213999. .

Jantasuriyarat C., Vales M.I., Watson C.J.W., Riera-Lizarazu O. (2004): Identification and mapping of genetic loci affecting the freethreshing habit and spike compactness in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 108: 261 – 273.

Jones, J.D.G. (2001): Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Current Opinion in Plant Biology*, 4 (4): 281 – 287.

Jorgensen, I.H. (1992): Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, 63 (1-2): 141 – 152.

Jørgensen, J.H. (1994): Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13 (1): 97 – 119.

Kilian, A., Wenzl, P., Huttner, E., Carling, J., Xia, L., Blois, H., Caig, V., HellerUszynska, K., Jaccoud, D., Hopper, C., Aschenbrenner-Kilian, M., Evers, M., Peng, K., Cayla, C., Hok, P., Uszynski, G. (2012): Diversity Arrays Technology: A Generic Genome Profiling Technology on Open Platforms. In: Pompanon F., Bonin A. (eds) *Data Production and Analysis in Population Genomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 888. Humana Press, Totowa, NJ

Kilian, B., Ozkan, H., Deusch, O., Effgen, S., Brandolini, A., Kohl, J., Martin, W. and Salamini, F. (2007): Independent wheat B and G genome origins in outcrossing *Aegilops* progenitor haplotypes. *Molecular Biology and Evolution* 24: 217 – 227.

Kilian, B., Özkan, H., Pozzi, C. and Salamini, F. (2009): Domestication of the Triticeae in the Fertile Crescent. *Genetics and Genomics of the Triticeae* 7: 81 – 119.

Kilian, B., William, M. and Salamini, F. (2010): *Genetic Diversity, Evolution and Domestication of Wheat and Barley in the Fertile Crescent*.

Komáromi, J., Jankovics, T., Fábrián, A., Puskás, K., Zhang, Z., Zhang M., Li H., Jäger K., Láng L., Vida G. (2016): Powdery mildew resistance in wheat cultivar Mv Hombár is conferred by a new gene, *PmHo*. *Phytopathology* 106 (11): 1326 – 1334.

Kosambi, D. D. (1943): The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Human Genetics* 12 (1): 172 – 175.

Kou, Y. and Wang, S. (2010): Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 13 (2): 181 – 185.

Kourelis, J., a van der Hoorn, R. (2018): Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *The Plant cell* 30 (2): 285–299.

Krattinger, S., Wicker, T., Keller, B. (2009): Map-Based Cloning of Genes in *Triticeae* (Wheat and Barley), In: Muehlbauer, G., Feuillet, C. (eds) *Genetics and Genomics of the Triticeae, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, vol 7. Springer, New York, NY.

Li, H. H., Dong, Z. J., Ma, C., Xia, Q., Tian, X. B., Sunish, S., Koo, D-H., Friebe, B., Ma, P., Liu, W. (2020). A spontaneous wheat- *Aegilops longissima* translocation carrying *Pm66* confers resistance to powdery mildew. *Theoretical and Applied Genetics* 133: 1149-1159

Lu, X., Kracher, B., Saur, I.M.L., Bauer, S., Ellwood, S.R., Wise, R., Yaeno, T., Maekawa, T. and Schulze-Lefert, P. (2016): Allelic barley MLA immune receptors recognize sequence-unrelated avirulence effectors of the powdery mildew pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (42): 6486 – 6495.

Makepeace, J.C., Oxley, S.J.P., Havis, N.D., Hackett, R., Burke, J.I., Brown, J.K.M. (2007): Associations between fungal and abiotic leaf spotting and the presence of *mlo* alleles in barley. *Plant Pathology* 56 (6): 934 – 942.

Adamo, Nasrat a Al-Ansari, Nadhir. (2018): *Climate Change Impacts: The Middle East and Iraq in Focus*.

McIntosh, R. A., Dubcovsky, J., Rogers, W. J., Morris, C. (2017): Catalogue of gene symbols for wheat. *Supplement. Ann. Wheat Newsl* 53: 107 – 128.

Miller, M. R., Dunham, J. P., Amores, A., Cresko, W. A., Johnosn, E. A. (2007): Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research* 17 (2): 240 – 248.

Mohler, V., Bauer, C., Schweizer, G., Kempf, H., Hartl, L. (2013): *Pm50*: a new powdery mildew resistance gene in common wheat derived from cultivated emmer. *Journal of Applied Genetics* 54 (3): 259 – 263.

Morton, N. E. (1955): Sequential tests for the detection of linkage. *American Journal of Human Genetics* 7 (3): 277 – 318.

Myburg, A., Griffin, A., Sederoff, R. a Whetten, R. (2003): Comparative genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus globulus* and their F1 hybrid based on a double pseudo-backcross mapping approach. *Theoretical and applied genetics* 107 (6): 1028 – 1042 .

Nalam, V.J., Vales, M.I., Watson, C.J.W., Kianian, S.F. and Riera-Lizarazu, O. (2005): Map-based analysis of genes affecting the brittle rachis character in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 112 (2): 373 – 381.

Niu, J.S., Wang, B.Q., Wang, Y.H., Cao, A.Z., Qi, Z.J., Shen, T.M. (2008): Chromosome location and microsatellite markers linked to a powdery mildew resistance gene in wheat line Lankao 90 (6). *Plant Breeding* 127 (4): 346 – 349.

Özkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R. and Salamini, F. (2002): AFLP Analysis of a Collection of Tetraploid Wheats Indicates the Origin of Emmer and Hard Wheat Domestication in Southeast Turkey. *Molecular Biology and Evolution*, 19 (10): 1797 – 1801.

Peterhänsel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R., Schulze-Lefert, P. (1997): Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *The Plant Cell* 9 (8): 1397 – 1409.

Piffanelli, P., Zhou, F., Casais, C., Orme, J., Jarosch, B., Schaffrath, U., Collins, N.C., Panstruga, R., Schulze-Lefert, P. (2002): The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiology* 129 (3): 1076 – 1085.

Pourkheirandish, M., Dai, F., Sakuma, S., Kanamori, H., Distelfeld, A., Willcox, G., Kawahara, T., Matsumoto, T., Kilian, B. and Komatsuda, T. (2018): On the Origin of the Non-brittle Rachis Trait of Domesticated Einkorn Wheat. *Frontiers in Plant Science* 8.

Pryce Jones, E., Carver, T. and Gurr, S.J. (1999): The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55 (3): 175 – 182.

Ronin, I.Y., Mester, D. Minkov, D.G., Korol, A.B. (2017): Building Ultra-High-Density Linkage Maps Based on Efficient Filtering of Trustable Markers, *Genetics* 206: 1285 – 1295.



Roser, M., Ortiz-Ospina, E. and Ritchie, H. (2019): World Population Growth. *Our World in Data*.

Salgado, J.D. and Pierce, A.P. (2016): Powdery Mildew of Wheat. *Department of Plant Pathology*.

Schmolke M., Mohler V., Hartl L., Zeller F.J., Hsam S.L.K. (2011): A new powdery mildew resistance allele at the *Pm4* wheat locus transferred from einkorn (*Triticum monococcum*). *Molecular Breeding* 29 (2): 449 – 456.

Schneider, K. (2005): Mapping populations and principles of genetic mapping. In: Meksem, K. and Kahl, G., ed. The handbook of plant genome mapping: genetic and physical mapping. Weinheim: WILEY-VCH, 2005

Shavrukov Y.N. (2016): CAPS markers in plant biology, Russ J., *Genet Appl Res* 6: 279 – 287.

Shewry, P.R. (2009): Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60 (6): 1537 – 1553.

Simons, G., van der Lee T., Diergaarde, P., van Daelen, R., Groenendijk, J., Frijters, A., Büschges, R., Hollricher, K., Töpsch, S., Schulze-Lefert, P., Salamini, F., Zabeau, M., Vos, P. (1997): AFLP-based fine mapping of the *Mlo* gene to a 30-kb DNA segment of the barley genome. *Genomics* 44 (1) : 61 – 70.

Simons, K.J., Fellers, J.P., Trick, H.N., Zhang, Z., Tai, Y.-S., Gill, B.S., Faris, J.D. (2006): Molecular characterization of the major wheat domestication gene Q. *Genetics* 172: 547 – 555.

Stam, P. (1993a): Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package, *JoinMap*. *Plant* 3: 739 – 744.

Suiter, K.A., Wendel, J.F., Case, J.S. (1983): Linkage-I: A pascal computer program for the detection and analysis of genetic linkage, *Hered.* 74: 203 – 204.

Tanksley, S.D., Ganal, M.W., Martin, G.B. (1995): Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet.* 11: 63 – 68.

The, T., McIntosh, R., Bennett, F. (1979): Cytogenetical studies in wheat. IX. Monosomic analyses, telocentric mapping and linkage relationships of genes *Sr21*, *Pm4* and *Mle*. *Australian Journal of Biological Sciences* 32 (1): 115 – 125.

Tilman, D., Balzer, C., Hill, J. and Befort, B.L. (2011): Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (50): 20260 – 20264.

Torres, M.A. (2010): ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* 138 (4): 414 – 429.

Vanderplank, J. E. (1963): Plant disease: Epidemics and control. Academic Press New York: 349.

Velmurugan, J., Milbourne, D., Connolly, V., Heslop-Harrison, J.S., Anhalt, U.C.M., Lynch, M.B. and Barth, S. (2018): An Immortalized Genetic Mapping Population for Perennial Ryegrass: A Resource for Phenotyping and Complex Trait Mapping. *Frontiers in Plant Science* 9.

Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., Qiu, J.-L. (2014): Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* 32 (9): 947 – 951.

Watanabe, N., Sugiyama, K., Yamagishi, Y. and Sakata, Y. (2002): Comparative telosomic mapping of homoeologous genes for brittle rachis in tetraploid and hexaploid wheats. *Hereditas* 137 (3): 180 – 185.

Wilson, Z.A. (2000): Arabidopsis: A Practical Approach, New York, *Oxford University Press*, ISBN-13: 978-0199635658

Wolfe, M. S., McDermott, J. M. (1994): Population genetics of plant pathogen interactions: The example of the Erysiphe graminis-Hordeum vulgare pathosystem. *Annual Review of Phytopathology* 32: 89 – 113.

Xu, W., Li, C., Hu, L., Wang, H., Dong, H., Zhang, J., Zan, X. (2011): Identification and molecular mapping of *PmHnk54*: a novel powdery mildew resistance gene in common wheat. *Plant Breeding* 130 (6): 603 – 607.

Yarwood, C.E. (1957): Powdery mildew. *Botanical review* 23 (4): 235 – 301.

Zhang, Yuan-Ming. (2012): F2 designs for QTL analysis. *Methods in molecular biology* 871: 17 – 29.

Zhang, Z., Henderson, C., Perfect, E., Carver, T.L.W., Thomas, B.J., Skaminioti, P. and Gurr, S.J. (2005): Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. *Molecular Plant Pathology* 6 (5): 561 – 575.

Zhu, Mo. (2020): Germination and differentiation of *Blumeria graminis* ascospores and effects of UV-C and white light irradiation on *B. graminis* conidial prepenetration.

Zhu Z., Zhou R., Kong X., Dong Y., Jia J. (2005): Microsatellite markers linked to 2 powdery mildew resistance genes introgressed from *Triticum carthlicum* accession PS5 into common wheat. *Genome* 48 (4): 585 – 590.