

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2014**

**Václav Svoboda**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Charakterizace rekombinantní mapovací populace  
pro mapování genu/genů rezistence k padlí travnímu  
u pšenice *T. monococcum* L.**

**Bakalářská práce**

**Václav Svoboda**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2014**

**Vedoucí práce: Mgr. Barbora Klocová**

Prohlašuji, že bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pod vedením  
Mgr. Barbory Klocové a za použití citované literatury a elektronických zdrojů.

V Olomouci 5. 8. 2014

Václav Svoboda

# Souhrn

Pšenice setá *Triticum aestivum* L. se řadí mezi celosvětově nejdůležitější zemědělské plodiny. Podobně jako jiné zemědělské plodiny je napadána škálou chorob, které způsobují značné ztráty na úrodě. Mezi nejvýznamnější choroby patří padlí travní způsobené obligátně biotrofní parazitickou houbou *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *tritici*, ztráty na výnosu způsobené tímto parazitem mohou dosahovat až 30 %, proto je nutné šlechtit rezistentní odrůdy.

Šlechtitelské úsilí značně komplikuje velikost a struktura genomu *T. aestivum* L. Proto se využívá blízce příbuzných druhů s nižším stupněm ploidie. Jedním z využívaných druhů pro subgenom A je pšenice jednozrnka *T. monococcum* L. Jednozrnka nebyla v minulosti intenzivně šlechtěna a stále vykazuje vysoký stupeň polymorfismu a jedná se tak o vhodný zdroj nových genů a alel, které mohou být vneseny do pšenice seté.

Tématem teoretické části práce je pohled na *T. monococcum* L. jako na předmět zkoumání, na padlí travní, geny rezistence pšenice proti tomuto škůdci, přehled používaných markerových technik v genetickém mapování pšenice a konstrukce mapovacích populací. Experimentální část práce se zabývá lokalizací oblasti zodpovědné za rezistenci k padlí travnímu.

# Summary

Bread wheat *Triticum aestivum* L. is one of the most important crops in the world. Like every crop, bread wheat is attacked by a range of pathogens which cause significant yield loss. One of the most devastating pathogen is Powdery Mildew which is caused by obligatory biotrophic fungus *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *tritici*, yield losses may reach up to 30 %. There is a need for breeding resistant cultivars.

Breeding efforts are complicated by size and complexity of *T. aestivum* L. genome. This is a reason why close related species with a lower level of ploidy are used. One of the species used for A subgenome is Einkorn wheat *T. monococcum* L. Einkorn has never been intensively bred and it still keeps high level of polymorphism. So it is a sufficient source of new gene and alleles for the bread wheat.

Theoretical part of this work is focused on *T. monococcum* L. as an object of interest, powdery mildew, resistance genes in wheat, an overview of marker techniques used in wheat genome mapping and construction of mapping populations. Experimental part of the work focused on localization of the region responsible to powdery mildew resistance.

Děkuji Mgr. Barboře Klocové za pomoc při vedení bakalářské práce. Mé poděkování patří též laborantkám ÚEB v Olomouci za spolupráci při získávání údajů pro výzkumnou část práce, dále prof. Ing. Jaroslavu Doleželovi, DrSc. za vytvoření příjemného prostředí pro vypracování bakalářské práce.

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České Republiky a Evropským fondem pro regionální rozvoj (Operační program pro Výzkum a Vývoj pro Inovace No. ED0007/01/01, Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České Republiky, grant No. LG12021)

# Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíle práce.....	9
3	Současný stav řešené problematiky.....	10
3.1	Pšenice.....	10
3.1.1	Zástupci rodu <i>Triticum</i> L., evoluce polyploidních druhů, domestikace.....	10
3.1.2	Původ <i>T. monococcum</i> L. a charakteristika.....	12
3.1.3	Význam <i>T. monococcum</i> L. v moderním šlechtění pšenice.....	14
3.2	Padlí.....	14
3.2.1	Padlí travní.....	15
3.2.2	Příznaky.....	16
3.2.3	Životní cyklus.....	17
3.3	Geny rezistence.....	18
3.3.1	Geny rezistence proti padlí travnímu u pšenice.....	19
3.4	Mapování genů rezistence.....	22
3.4.1	Genetické markery.....	22
3.4.1.1	Molekulární markery.....	22
3.4.1.1.1	DNA markery.....	22
3.4.2	Mapovací populace.....	27
3.4.3	F <sub>2</sub> populace (F <sub>2</sub> Populations).....	28
3.4.4	Rekombinantní inbrední linie (Recombinant Inbred Lines, RILs).....	29
3.4.5	Populace vzniklé zpětným křížením (Backcross population, BC).....	30
3.4.6	Dihaploidní linie (Doubled Haploid Lines, DH).....	31
4	Materiál a metodika.....	32
4.1	Biologický materiál.....	32
4.1.1	Mapovací populace.....	32
4.1.2	Vzorek padlí sloužící k inokulaci.....	32
4.2	Přístrojové vybavení.....	32
4.3	Chemikálie a roztoky.....	33

4.3.1	Hodnocení fenotypu.....	33
4.3.2	Izolace DNA z lyofilizovaného materiálu .....	33
4.3.3	Agarózová elektroforéza.....	33
4.3.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	34
4.3.5	Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza (PAGE) .....	35
4.4	Metodika .....	35
4.4.1	Pěstování mapovací populace.....	35
4.4.2	Inokulace a hodnocení fenotypu .....	35
4.4.3	Izolace DNA z lyofilizovaného materiálu .....	36
4.4.4	Agarózová elektroforéza.....	36
4.4.5	Polymerázová řetězová reakce .....	37
4.4.6	Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza .....	39
4.4.7	Konstrukce genetické mapy.....	40
4.4.8	Software.....	40
5	Výsledky.....	41
5.1	Molekulární markery .....	41
5.2	Genetická mapa .....	42
5.3	Fenotyp .....	42
6	Diskuse.....	43
7	Závěr.....	44
8	Seznam zkratk .....	45
9	Literatura .....	47



# 1 Úvod

Hexaploidní pšenice setá *Triticum aestivum* L. patří celosvětově mezi nejvýznamnější zemědělské plodiny a poptávka po ní rok od roku stoupá společně s neustále se zvětšující lidskou populací. Obrovský genom, který se skládá přibližně z 80 % z repetitivní DNA a tři subgenomů (A, B, D) značně komplikuje šlechtění. Pozornost se tedy obrací na blízkce příbuzné druhy s nižší ploidií, ty představují zdroje variability pro získávání odolnějších odrůd. Jedním z využívaných druhů je pšenice jednozrnka *Triticum monococcum* L., blízkce příbuzná donoru subgenomu A *Triticum urartu* Tum. Jednozrnka je jediný kulturní diploidní druh pšenice a vzhledem k tomu, že nebyl během posledních 10 000 let intenzivně šlechtěn, si stále zachovává vysoký stupeň polymorfismu a je tak vhodný genetický rezervoár pro agronomicky významné znaky.

Padlí travní, choroba způsobená obligátně biotrofní parazitickou houbou *Blumeria graminis* patří mezi nejvýznamnější patogeny napadající obiloviny. Padlí napadá všechny nadzemní části rostlin a může způsobovat značné ztráty na úrodě. Efektivní strategií boje proti padlí je pěstování odolných odrůd a/nebo aplikace fungicidů. Šlechtění odrůd s jednogenovou rezistencí však nepřináší dlouhodobé výsledky, houba je schopna ji překonat. Zvýšená aplikace fungicidů je pak kontraproduktivní a ve výsledku má na houbu stejný efekt, také má neblahý vliv na zdraví lidí i životní prostředí.

Cílem šlechtitelských programů je identifikovat geny odpovědné za rezistenci a vnést je do pšenice seté pro zlepšení jejích vlastností. Nezměrný přínos mají moderní metody molekulární biologie.

## 2 Cíle práce

1. Zpracování literární rešerše o *T. monococcum* L. jako objektu zkoumání.
  - a. Genetické mapování u pšenice  
příprava mapovacích populací, nejčastěji používané DNA markery, principy genetického mapování.
  - b. Padlí travní a geny rezistence u pšenice.
2. Konstrukce genetické mapy nové mapovací populace *T. monococcum* L. za použití STS a SSR markerů
3. Lokalizace oblasti odpovědné za rezistenci k padlí travnímu u nové mapovací populace *T. monococcum* L.

# 3 Současný stav řešení problematiky

## 3.1 Pšenice

Semena obilovin obecně jsou hlavním energetickým zdrojem lidstva. Pšenice je nejrozšířenější pěstovanou plodinou světa, představuje hlavní zdroj výživy, krmiva a materiálu pro následné průmyslové využití. Pšeničná semena vykazují vysokou energetickou i nutriční hodnotu, zásobní látkou je škrob a obsahují i nezanedbatelné množství bílkovin. Další výhodou je jejich jednoduchá a možná dlouhodobá skladovatelnost.

Historie domestikace započala před více než 10 000 lety a patří tak k prvním domestikovaným plodinám vůbec. Kolébka zemědělství se nachází ve východním Turecku v historické oblasti Úrodného půlměsíce (Harlan *et* Zohary, 1966). Místo se bezesporu může spojovat se zrodem moderního lidstva. Právě v této oblasti první lidé změnilí svůj způsob života lovců a sběračů na usedlý život zemědělců (Diamond, 2004; Heun *et al.*, 1997).

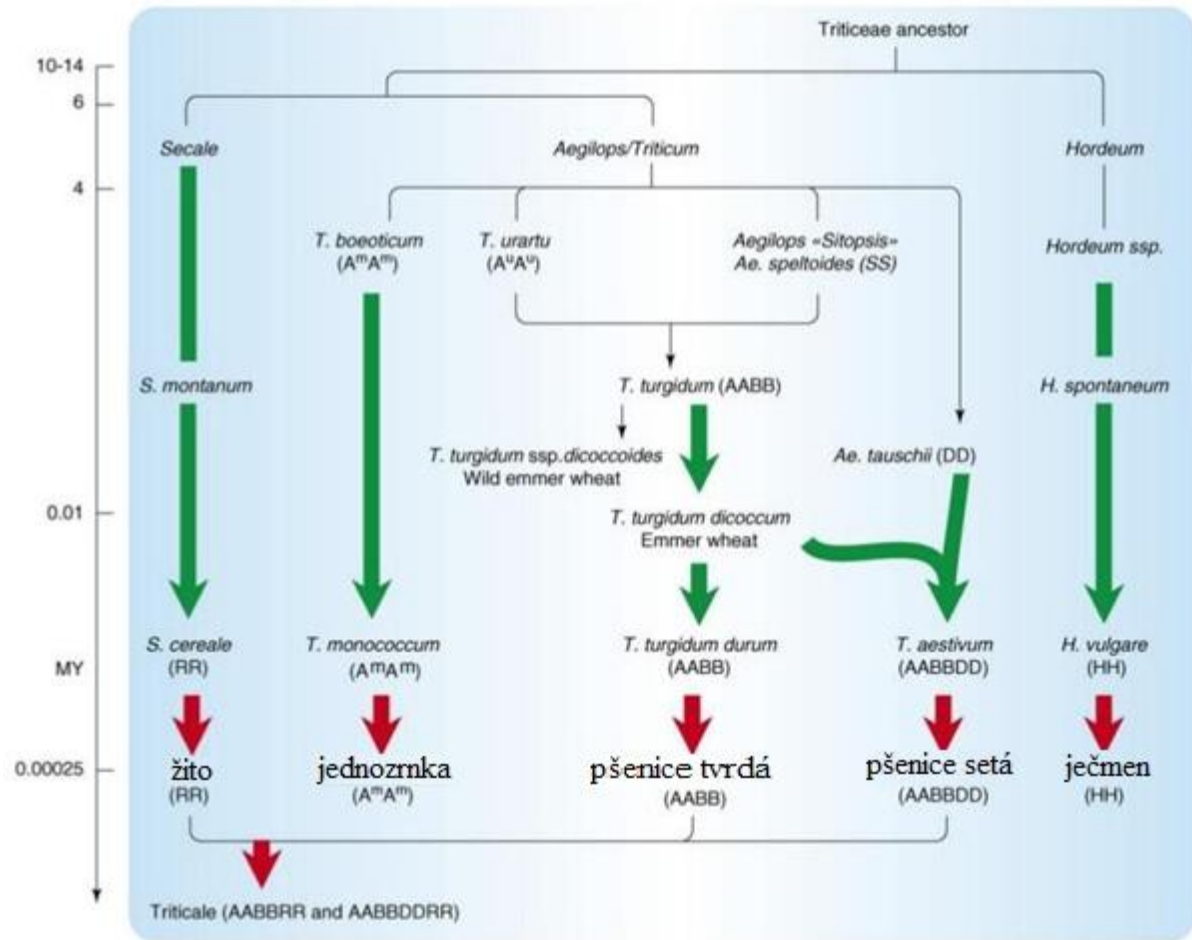
Pšenice patří k obilovinám spolu s dalšími zemědělsky významnými plodinami, jako je kukuřice, rýže, ječmen, žito a další. Taxonomicky *T. aestivum* L. řadíme do tribu *Triticeae*, kde patří další významné rody jako *Hordeum* (ječmen), *Aegilops* a *Secale* (žito). Pšenice setá a další hexaploidní, tetraploidní a diploidní pšenice patří do rodu *Triticum* L. (Goncharov, 2011; Matsuoka, 2011).

### 3.1.1 Zástupci rodu *Triticum* L., evoluce polyploidních druhů, domestikace

Do rodu *Triticum* L. řadíme plané, kulturní, diploidní, tetraploidní i hexaploidní druhy. Z diploidních ( $2n = 2x = 14$ ) jsou nejvýznamnější *T. monococcum* L., *T. boeoticum* Boiss., *T. urartu* Thun. Z tetraploidních ( $2n = 4x = 28$ ) pak například *T. durum* Desf. a *T. turgidum* L. Z hexaploidních ( $2n = 6x = 42$ ) je to *T. spelta* L. a *T. aestivum* L. (Percival, 1921).

Prvním zemědělsky využívaným druhem se před asi 10 000 lety stala pšenice jednozrnka *T. monococcum* L. ( $2n = 2x = 14$ ,  $A^m A^m$ ) a dodnes je jediným kulturním diploidním druhem pšenice na světě, dnes je však pěstována jen pro krmení dobytka (Percival, 1921). Do stejné oblasti a přibližně i stejného období se datuje domestikace přirozeně se vyskytující tetraploidní pšenice *T. durum* Desf. ( $2n = 4x = 28$ ,  $A^u A^u BB$ ), ta vznikla hybridizací *T. urartu* Tum. ( $2n = 2x = 14$ ,  $A^u A^u$ ) s donorem subgenomu B, před 0,5 – 3 miliony let (Dvořák *et al.*, 1988; Dvořák *et al.*, 1993). Tento donor je blízké příbuzný sekci *Sitopsis* a druhu *Aegilops speltoides* Tausch. ( $2n = 2x = 14$ ; SS), (Alnaddaf *et al.*, 2013). Následná hybridizace tetraploidní *T. durum* Desf s diploidní *Ae. tauschii* Coss. ( $2n = 2x = 14$ , DD) před 8000 – 10 000 lety dala vzniknout allohexaploidní pšenici seté *T. aestivum* L. ( $2n = 6x = 42$ ,  $A^u A^u BBDD$ ), která se záhy rozšířila z oblasti Kavkazu do dalších částí světa (Charmet, 2011). Její genom sestává ze tří subgenomů: A, B, D, které mají původ v relativně blízké příbuzných druzích. Díky tomu je zachována částečná homologie (homeologní chromozomy) a rostliny jsou fertillní (Devos *et Gale*, 1997). *T. aestivum* L. je dnes zdaleka nejrozšířenější a nejvýnosnější druh pšenice.

Uvedené polyploidizační události velmi usnadnily domestikaci pšenice (viz obr. 1). Negativním důsledkem každé domestikace je však ztráta velkého množství potenciálně užitečných genů a alel. Tato ztráta je způsobená šlechtěním pro úzkou škálu požadovaných vlastností (Charmet, 2011).



**Obr. 1: Evoluce genomů pšenice, ječmene a žita.**

Zelené šipky představují domestikaci události, červené představují selekce, důsledkem kterých existují dnes známé odrůdy žita, pšenice a ječmene. (Upraveno podle Feuillet *et al.*, 2008)

### 3.1.2 Původ *T. monococcum* L. a charakteristika

Místo domestikace *T. monococcum* L. se nachází v severní části historické oblasti Úrodného půlměsíce na jihovýchodě Turecka v pohoří Karacadag. Zdejší druhy vykazují největší genetickou příbuznost s domestikovanou diploidní pšenicí i znaky divokých druhů (Heun *et al.*, 1997).

Pšenice jednozrnka ( $2n = 2x = 14$ ), je nápadná svou výškou, může dorůstat

až 200 cm. Klas je dvouřadý, ačkoli by se dle názvu mělo vyskytovat pouze jedno semeno na obilku, v menší míře se setkáváme i s dvousemennými odrůdami (Hopf *et* Zohary, 2000). Obecně je jednozrnka poměrně homogenní druh a morfologická diverzita mezi jednotlivými odrůdami je malá (Percival, 1921).

Planým (nejbližším) příbuzným jednozrnky je *T. boeoticum* Boiss (viz obr. 2.). Mezi druhy nejsou morfologické rozdíly. Dokonce i struktura chromozomů je stejná, hybridy mezi těmito druhy nevykazují sníženou fertilitu či jiné známky outbredního efektu. Rozdíly jsou však patrné ve strategii při šíření potenciálního potomstva, semen. Plané druhy mají rozpadavé, křehké klasy. Ty usnadňují šíření semen, které je ve volné přírodě zásadní pro přežití druhu. Naopak pro člověka by tato strategie žádné výhody neměla. Lidé si vybírali mutanty, kteří nevykazují tuto vlastnost a proto klasy *T. monococcum* L. uvolňují obilky až za působení tlaku (Hopf *et* Zohary, 2000).

Plané a starobylé kulturní druhy jako je *T. monococcum* L. díky své vysoké úrovni polymorfismu představují rezervoár genetické diverzity, který může být využit v moderních šlechtitelských programech pro zlepšení vlastností nejhojněji pěstované pšenice seté *T. aestivum* L. (Singh *et al.*, 2007).



**Obr. 2: Klasy *T. boeoticum* L. a *T. monococcum* L.**

Rozpadavé klasy *T. boeoticum* G3116 (vlevo) nerozpadavé klasy *T. monococcum* DV92 (vpravo)

### 3.1.3 Význam *T. monococcum* L. v moderním šlechtění pšenice

*T. monococcum* L. je ve šlechtitelských programech zabývajících se zlepšením genomu pšenice seté velmi nápomocno díky své blízké příbuznosti s jiným diploidním druhem *T. urartu* Tum., které přispělo A genomem do genomu allohexaploidní pšenice seté. Dále pak díky vysokému stupni polymorfismu, který je úzce spjat s faktem, že druh nebyl nikdy intenzivně šlechtěn. Nakonec také proto, že jde o jediný kulturní diploidní druh pšenice. Díky tomu, že má oproti pšenici seté jen jeden genom, jsou techniky molekulární biologie jako sekvenování a mapování genů snadněji proveditelné.

*Monococcum* má i další významné vlastnosti, pro které je ceněno. Vykazuje vysokou odolnost vůči mrazům. Není náročné na půdu, dokáže vyrůst v drsných podmínkách písčitých, kamenitých a vápencových oblastí, kde by jiné druhy pšenice nemohly vegetovat (Percival, 1921). Všechny tyto vlastnosti z něj činí vynikající nástroj pro šlechtění odolnějších odrůd pšenice (Singh *et al.*, 2007). V dnešní době je však zorné pole zaměřeno spíše na rezistence vůči rozličným chorobám: rzi (*Puccinia triticina* Erikss), sněti, paličkovice nachová (*Claviceps purpurea* Fr.), nebo hlístice (*Heterodera* spp.) a především padlí travní (*Blumeria graminis* DC.).

## 3.2 Padlí

Padlí (eng. Powdery Mildew) patří mezi nejrozšířenější houbové patogeny napadající všechny nadzemní části téměř 10 000 známých druhů jednoděložných i dvouděložných krytosemenných rostlin (Braun *et al.*, 2002). Na základě anatomie, morfologie věcek a škály hostitelů rozeznáváme přibližně 650 druhů (Braun *et al.*, 2002). K ekonomicky významným hostitelům patří: obiloviny, réva vinná, ovocné stromy, chmel, okrasné druhy rostlin. Při vhodných podmínkách padlí způsobuje značné ztráty na úrodě (Glawe, 2008). Ochrany úrody může být dosaženo, užíváním fungicidů a/nebo pěstováním resistantních odrůd. Samotné fungicidy se nejeví jako vhodný nástroj boje proti padlí, jsou finančně náročné, rezidua představují možnou hrozbu pro lidi, zvířata i životní prostředí. Navíc aplikace fungicidů způsobuje indukci rezistence patogenu (Zhang *et al.*, 2005).

V dnešní době silně intenzivního zemědělství má padlí velký význam (Häni *et al.*, 1993). Způsobené ztráty na výnosu mohou být značné, 13 – 34 % (Griffey *et al.*, 1993; Leath *et Bowen*, 1989). Napadány jsou všechny druhy obilí s výjimkou kukuřice, přičemž největší ztráty činí na pšenici a ječmenu. Žito a oves jsou padlím infikovány jen zřídka (Häni *et al.*, 1993).

Kromě škod, které způsobuje padlí samotné, vytváří jeho přítomnost vstupní bránu pro další patogeny, jakými jsou například: paluška travní (*Typhula incarnata*), braničnatka plevová (*Leptosphaeria nodorum*), fuzariózy listů (*Fusarium* spp.) a mnoho dalších (Häni *et al.*, 1993).

### 3.2.1 Padlí travní

Padlí travní je choroba způsobená obligátně biotrofní ektoparazitickou houbou *Blumeria graminis* (Syn. *Erysiphe graminis*), kterou řadíme do třídy *Leotiomycetes*, řádu *Erysiphales*. Patří tedy mezi patogenní houby s úzce vymezenou specializací a napadá pouze obiloviny (Marchal, 1902). Striktní specializace dala základ systému pro biologickou klasifikaci *B. graminis* (*Bg*), která rozlišuje osm forem (*formae speciales*, f.sp.) (Oku *et al.*, 1985):

- *B. graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) napadající ječmen
- f.sp. *tritici* (*Bgt*) napadající pšenici
- f.sp. *secalis* (žito)
- f.sp. *avenae* (oves)
- a další čtyři formy napadající nekulturní druhy trav

Studie však ukázaly, že rozsah hostitelských rostlin může být mnohem širší než jen obiloviny (Eshed *et Wahl*, 1970; Hardison, 1944; Hirata, 1966; Sheng *et al.*, 1995).



### 3.2.2 Příznaky

Příznaky napadení padlím se na rostlině začínají projevovat na přelomu jara a léta kdy probíhá šíření haploidních konidií a s nimi spojené infekce (Zhang *et al.*, 2005). Padlí je na napadené rostlině okem rozpoznatelné (viz obr. 3), tvoří vatovité polštářky (kupky) převážně na horní straně listu, jejichž barva je zpočátku bílá a postupně přechází v šedou až hnědou (Häni *et al.*, 1993). Později se vytváří povlaky šedohnědé barvy nesoucí černá kulovitá kleistothecia o velikosti 0,15 – 0,30 mm v průměru (Ellis *et al.*, 1997). Pokud je list napaden silně, dochází ke žloutnutí a předčasně umírá (Häni *et al.*, 1993).

Náchylnost pšenice je nejsilnější od počátku odnožování až do mléčné zralosti, mladé listy vykazují větší náchylnost než listy starší. Oproti ječmeni je pšenice mnohem tolerantnější k časnému napadení. Naopak je citlivější k napadení praporcových listů a pluch. Při napadení klasů je často snížena hmotnost tisíce zrn (Häni *et al.*, 1993).

Silné napadení padlím se dá očekávat po mírné zimě a při teplém a relativně suchém jarním počasí. Faktory, které podporují silnou produkci větrem šířených spor. Vysoká vzdušná vlhkost, nikoli déšť, střídání teplých a vlhkých dnů podporuje napadení. Vhodné jsou teploty mezi 18 – 22 °C. Při 20 °C trvá inkubační doba jen 3 – 4 dny, tato teplota je optimální pro šíření infekce. Při 5 °C se inkubační doba může protáhnout až na 14 dní. Vyšší teploty (kolem 25 °C) nepodporují šíření a na listech vznikají jen žluté až hnědé skvrny, podobně jako u rezistentních odrůd. Napadení může mít explozivní charakter, pro počátek epidemie postačí dvě generace spor, asi týden při optimálních podmínkách (Häni *et al.*, 1993).



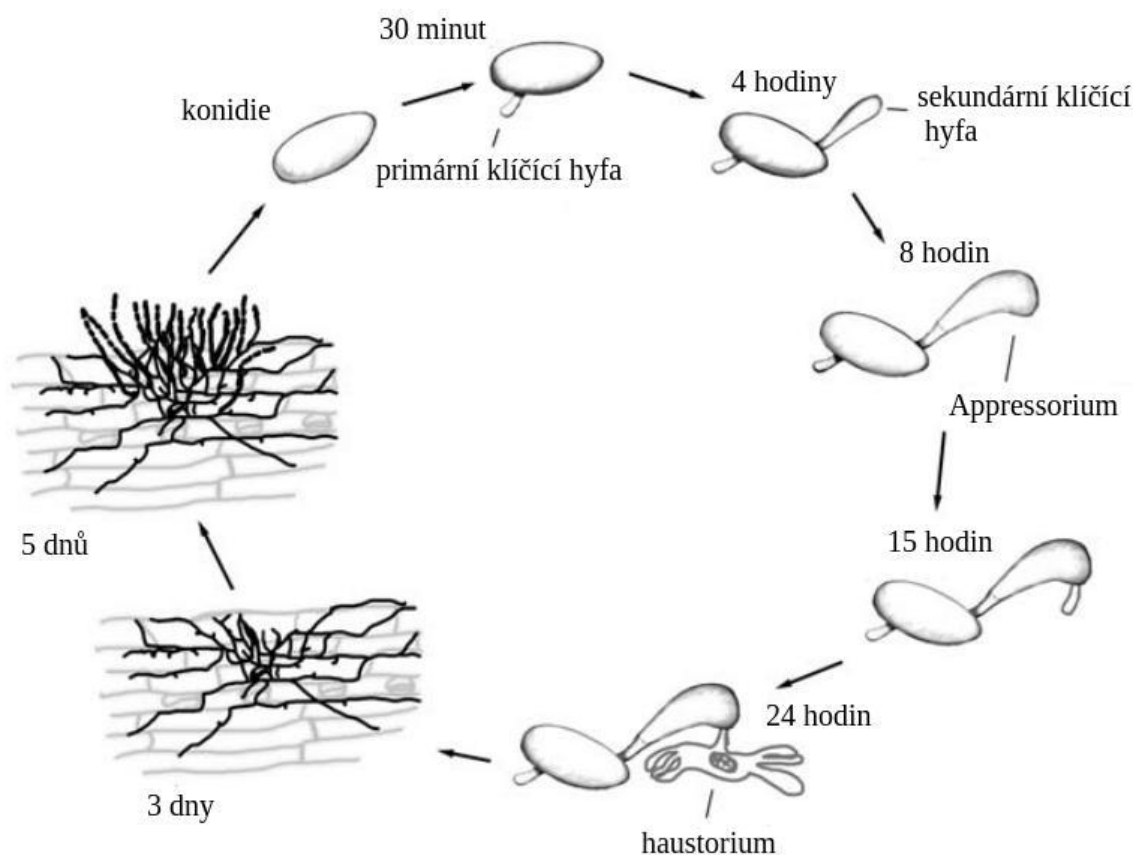
**Obr. 3: Příznaky napadení na pšenici (*T. monococcum* L.)**

### 3.2.3 Životní cyklus

Životní strategie *B. graminis* nutně vyžaduje synchronizaci celého cyklu s životním cyklem hostitelské rostliny (Jarvis *et al.*, 2002), což značně omezuje kultivaci na médiích. I v případě, že je tato kultivace možná, průběh životního cyklu se v některých aspektech odlišuje od průběhu na přirozeném hostiteli (Both *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005).

Podobně jako jiné parazitické houby i *B. graminis* vykazuje složitý a variabilní životní cyklus. Může zahrnovat fázi pohlavní i nepohlavní nebo jen pohlavní, případně jen nepohlavní (Glawe, 2008). *B. graminis* je pleomorfní druh, produkuje morfologicky odlišné spory v závislosti na fázi životního cyklu, jde o jednu z prvních hub, kde byla pleomorfie prokázána (de Bary, 1863; Tulasne *et* Tulasne, 1861).

Nepohlavní cyklus (anamorfa) zahrnuje tvorbu konidioforů (viz obr. 4) a na nich větrem roznášených konidií způsobujících šíření epidemie (Zhang *et al.*, 2005) i na kilometry vzdálená místa (Both *et al.*, 2005).



**Obr. 4:** Nepohlavní cyklus *B. graminis* (upraveno podle Both *et al.*, 2005)

Během pohlavního cyklu (teleomorfa) se na starších listech tvoří uzavřené plodnice kleistothecia, které produkují pohlavní spory (askospory). Kleistothecium nese 10 až 20 vřecek, v každém se nachází 8 askospor (Ellis *et al.*, 1997). Pohlavním cyklem *B. graminis* přečkává nepříznivé podmínky prostředí: přezimování nebo vysoké teploty, období sucha kdy hostitel přežívá v podobě semen (Zhang *et al.*, 2005).

### 3.3 Geny rezistence

Šlechtění odrůd nesoucích geny rezistence se ukázalo jako nejefektivnější nástroj boje proti virovým, bakteriálním, houbovým i živočišným patogenům.

Existují dva typy rezistence k padlí. První je jednogenová (vertikální) nebo rasově specifická rezistence (race specific resistance), která je sice efektivní, ale ne na všechny izoláty. Ve většině případů se projevuje jako hypersenzitivní reakce (hypersensitive response, HR) za kterou jsou odpovědné major *R* geny nazývané *Pm* (powdery mildew) geny a představují gene-for-gene interakci (Bennett, 1984; Chen *et al.*, 1999; Hsam *et al.*, 2002). Geny vertikální rezistence jsou exprimovány v semenáčcích a během vegetativního cyklu pšenice. Vertikální rezistence byla silně využívána ve šlechtitelských programech, avšak selekční tlak působící na padlí měl ve výsledku negativní efekt, kdy byla rezistence brzy překonána posílením virulentních genů (Alam *et al.*, 2011). Po překonání vertikální rezistence *Pm* geny často přispívají do oligogenních a kvantitativních typů rezistence (Paillard *et al.*, 2000). Vzhledem k riziku překonání rezistence je nutná efektivní strategie pro náhradu těch odrůd, které se již nejeví jako efektivní (Wolf, 1984; Leath *et al.*, 1990).

Druhý typ rezistence je nazýván jako rezistence dospělých rostlin (Adult Plant Resistance, APR) a projevuje se pouze u dospělých rostlin, nikoli semenáčků. Může být identifikována u rostlin, kde došlo k překonání vertikální rezistence nebo tam kde nejsou známy *Pm* geny. APR je mnohem odolnější/trvanlivější než první zmíněná (Alam *et al.*, 2011). Například odrůda pšenice Knox byl efektivní proti padlí během 20 let pěstování (Shaner, 1973), jiná odrůda pšenice Massey uvedla na trh firma Virginia Tech v roce 1981 a stále je efektivní (Starling *et al.*, 1984).

### 3.3.1 Geny rezistence proti padlí travnímu u pšenice

V pšenici seté a příbuzných druzích bylo k roku 2013 na různých chromozomech identifikováno 45 lokusů 72 geny/alelami rezistence k padlí (viz tab. 1), (Ma *et al.*, 2011; McIntosh *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Hua *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2013). Lokalizace *Pm* genů v genomu není nahodilá, formují klastry v genově bohatých oblastech genomu (gene-rich regions), (Gill *et al.*, 1996).

**Tab. 1: Powdery mildew geny**

Gen	Synonyma	Původ	Chromozom	Citace
<i>Pm1</i>		<i>T. monococcum</i>	7AL	Hsam <i>et al.</i> , 1998
<i>Pm2</i>		<i>T. aestivum/Ae. Tauschii</i>	5DS	McIntosh <i>et Baker</i> , 1970
<i>Pm3</i>		<i>T. aestivum</i>	1AS	Briggle, 1966
<i>Pm4</i>		<i>T. dicoccum</i>	2AL	The <i>et al.</i> , 1979
<i>Pm5</i>		<i>T. dicoccum</i>	7BL	Law <i>et Wolfe</i> , 1966
<i>Pm6</i>		<i>T. timopheevii</i>	2BL	Jørgensen, 1973
<i>Pm7</i>		<i>S. cereale</i>	4BS.4BL-2RL	Friebe <i>et al.</i> , 1994
<i>Pm8</i>		<i>S. cereale</i>	1RS.1BL	Hsam <i>et Zeller</i> , 1997
<i>Pm9</i>		<i>T. aestivum</i>	7AL	Hsam <i>et al.</i> , 1998
<i>Pm10</i>		<i>T. aestivum</i>	1D	Tosa <i>et al.</i> , 1987
<i>Pm11</i>		<i>T. aestivum</i>	6BS	Tosa <i>et al.</i> , 1988
<i>Pm12</i>		<i>Ae. speltoides</i>	6BS-6SS.6SL	Jia <i>et al.</i> , 1996
<i>Pm13</i>		<i>Ae. longissima</i>	3BL.3SS-3S 3DL.3SS-3S	Ceoloni <i>et al.</i> , 1992
<i>Pm14</i>		<i>T. aestivum</i>	6BS	Tosa <i>et Sakai</i> , 1990
<i>Pm15</i>		<i>T. aestivum</i>	7DS	Tosa <i>et Sakai</i> , 1990
<i>Pm16</i>		<i>T. dicoccoides</i>	4A	Reader <i>et Miller</i> , 1991
<i>Pm17</i>		<i>S. cereale</i>	1RS. 1AL	Heun <i>et al.</i> , 1990
<i>Pm18</i>	<i>Pm1c</i>	<i>T. monococcum</i>	1A	Hsam <i>et al.</i> , 1998
<i>Pm19</i>		<i>Ae. tauschii</i>	7D	Lutz <i>et al.</i> , 1995
<i>Pm20</i>		<i>S. cereale</i>	6BS.6RL	Friebe <i>et al.</i> , 1994
<i>Pm21</i>		<i>Haynaldia villosa</i>	6VS. 6AL	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>Pm22</i>	<i>Pm1e</i>	<i>T. aestivum</i>	7AL	Singrun <i>et al.</i> , 2003
<i>Pm23</i>	<i>Pm4c</i>	<i>T. aestivum</i>	2AL	McIntosh <i>et al.</i> , 1998
<i>Pm24</i>		<i>T. aestivum</i>	1DS	Huang <i>et al.</i> , 2000
<i>Pm25</i>		<i>T. boeoticum</i>	1A	Shi <i>et al.</i> , 1998
<i>Pm26</i>		<i>T. dicoccoides</i>	2BS	Rong <i>et al.</i> , 2000
<i>Pm27</i>		<i>T. timopheevii</i>	6B-6G	Jarve <i>et al.</i> , 2000
<i>Pm28</i>		<i>T. aestivum</i>	1B	Peusha <i>et al.</i> , 2000
<i>Pm29</i>		<i>A. ovata</i>	7DL	Zeller <i>et al.</i> , 2002
<i>Pm30</i>		<i>T. dicoccoides</i>	5BS	Liu <i>et al.</i> , 2002
<i>Pm31</i>		<i>T. dicoccoides</i>	6AL	Xie <i>et al.</i> , 2003
<i>Pm32</i>		<i>Ae. Speltoides</i>	1BL. 1SS	Hsam <i>et al.</i> , 2003

**Tab. 1 pokračování**

<i>Pm33</i>		<i>T. carthlicum</i>	2BL	Zhu <i>et al.</i> , 2005
<i>Pm34</i>		<i>Ae. Tauschii</i>	5DL	Miranda <i>et al.</i> , 2006
<i>Pm35</i>		<i>Ae. Tauschii</i>	5DL	Miranda <i>et al.</i> , 2006
<i>Pm36</i>		<i>T. dicoccoides</i>	5BL	Blanco <i>et al.</i> , 2008
<i>Pm37</i>		<i>T. timopheevii</i>	7AL	Perugini <i>et al.</i> , 2008
<i>Pm38</i>		<i>T. aestivum</i>	7DS	Spielmeier <i>et al.</i> , 2005
<i>Pm39</i>		<i>T. aestivum</i>	1BL	Spielmeier <i>et al.</i> , 2005
<i>Pm40</i>		<i>Elytrigia intermedium</i>	7BS	Luo <i>et al.</i> , 2009
<i>Pm41</i>		<i>T. dicoccoides</i>	3BL	Li <i>et al.</i> , 2009
<i>Pm42</i>		<i>T. dicoccoides</i>	2BS	Hua <i>et al.</i> , 2009
<i>Pm43</i>		<i>Thinopyrum intermedium</i>	2DL	He <i>et al.</i> , 2009
<i>Pm44</i>		<i>T. aestivum</i>	3AS	Chen <i>et al.</i> , 2011
<i>Pm45</i>		<i>T. aestivum</i>	6DS	Ma <i>et al.</i> , 2011

Mnoho *Pm* genů bylo do *T. aestivum* L. vneseno ancestrálními a jinými planými druhy ke kterým patří *T. monococcum* L. (AA), *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl (AABB), *T. timopheevi* Zhuk. (AAGG) a další. Toto zjištění před více než 80 lety (Mains, 1933) odstartovalo hledání nových zdrojů *Pm* genů (Hsam *et al.*, 2002). *T. monococcum* L. s jistotou přispělo geny *Pm1* na 7A chromozomu, *Pm4* na 2A chromozomu, *Pm25* na 1A chromozomu a recesivní gen *Pm2026* na chromozomu 5A (Xu *et al.*, 2008). Gen *Pm25* se podařilo úspěšně vnést do genomu *T. aestivum* L. (Shi *et al.*, 1998).

Subgenom A v *T. aestivum* L. nese celkem 15*Pm* genů (viz tab. 1). Nedávno bylo také identifikováno v *T. aestivum* L. 7 *Mlo* genů, pojmenovaných *TaMlo-1 – 7*, *Mlo* jsou dobře známy z ječmene, výsledkem jejich exprese je hypersenzitivní reakce při napadení (Konishi *et al.*, 2010).

K hledání nových genů rezistence nám slouží moderní metody molekulární biologie, jako jsou genetické markery, mapovací populace a genetické vazebné mapy.

### 3.4 Mapování genů rezistence

Předpokladem pro mapování genů rezistence, ať už se jedná o jakéhokoliv patogena, je vyvinutí markeru, který bude v jeho těsné blízkosti, tedy v co nejsilnější vazbě. Takový marker pak může sloužit při selekci za pomoci markeru (MAS, Marker assisted selection) a tím značně usnadnit a urychlit šlechtění nových, odolnějších odrůd.

K mapování genů rezistence potřebujeme genetickou vazebnou mapu. Tu sestojíme díky genetickým markerům a mapovací populaci.

#### 3.4.1 Genetické markery

Značky neboli markery jsou specifická místa na chromozomu, která slouží jako nástroje pro genomové analýzy. S jejich pomocí můžeme sledovat variabilitu jedinců jak v rámci populace, tak mezi populacemi nebo variabilitu mezidruhovou. Prvními markery v době klasické genetiky byly morfologické znaky popisující vnější projevy genu/ů (Kole *et* Abbott, 2008). Dnes s rozvojem metod molekulární biologie či metod biochemických se morfologické markery neuplatňují v takové míře jako dříve. Nejvíce užívanými markery jsou molekulární, poskytují informace o polymorfismu přímo v molekule DNA nebo v proteinech které DNA kóduje.

##### 3.4.1.1 Molekulární markery

Molekulární markery poskytují informace o variabilitě organismu na úrovni molekul, nejčastěji DNA a různých druhů proteinů. Tyto markery nejsou ovlivněny prostředím a umožňují rozpoznat od sebe jednotlivé alely. S jejich pomocí je studium živých organismů mnohem přesnější a důkladnější. Mezi molekulární markery patří biochemické a DNA markery (Kole *et* Abbott, 2008).

##### 3.4.1.1.1 DNA markery

Genetické analýzy jsou v dnešní době běžnými nástroji k identifikaci genů, které kódují významné agronomické vlastnosti a především geny rezistencí k patogenům.

Pro pochopení genetiky a organizace rostlinných genomů byl příspěvek DNA markerů zásadní. K nejvýznamnějším přístupům pro získání významných informací o genomu patří techniky genetického mapování. Zjednodušeně se takto dá identifikovat gen kódující určitou vlastnost (Nguyen *et* Wu, 2005).

Základem přirozeného polymorfismu organismů je jejich variabilita na úrovni DNA sekvencí vzniklá v průběhu evoluce. Molekulární DNA markery této přirozené variability využívají. Rozvoj těchto metod však nebyl možný až do 50. let minulého století, kdy byla rozluštěna primární struktura dvoušroubovice DNA (Watson *et* Crick, 1953). Od té doby bylo vyvinuto množství typů DNA markerů ke stanovení variability v DNA sekvencích. Zavedení DNA metod vedlo k revoluci ve šlechtění rostlin, k rozvoji selekci za pomoci markeru (marker-assisted selection, MAS), která umožňuje cílené šlechtění (Nguyen *et* Wu, 2005).

Předpokladem pro vývoj DNA markeru je polymorfismus v sekvenci nukleotidů v rámci jednoho lokusu. Ke konstrukci genetických map se užívá různých markerových systémů. Podle přístupu jakým se polymorfismus detekuje, se DNA markery rozdělují do dvou kategorií (Kole *et* Abbott, 2008):

- **Techniky založené na hybridizaci**
- **Techniky založené na PCR**

- **Techniky založené na hybridizaci**

Techniky založené na hybridizaci využívají schopnosti denaturovaných jednovláknových DNA molekul vázat se na komplementární sekvence nukleotidů v jiném vlákně. Výsledkem je tvorba duplexů DNA – DNA případně DNA – RNA. K nejvýznamnějším patří: polymorfismus restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism, RFLP), (Botstein *et al.*, 1980), hybridizace *in situ* (Gall *et* Pardue, 1969), DNA čipy (DNA microarrays) a DArT markery (Kilian *et al.*, 2003).



### ***DNA čipy (DNA microarrays)***

Významným technologickým pokrokem se stalo zavedení DNA čipů začátkem devadesátých let minulého století. Ukázaly značný potenciál využitelný na mnoha polích molekulární biologie. DNA čipy umožňují monitorovat aktivitu až desítek tisíc genů současně a detekovat tak obrovské množství DNA sekvencí během jednoho experimentu. Ze začátku byly DNA čipy prováděny na sklíčku, dnes se používají i jiné materiály jako je nylonová membrána, nitrocelulóza, zlato nebo křemíková destička.

Metoda spočívá v hybridizaci, nejčastěji fluorescenčně značené cDNA, genomických DNA fragmentů, PCR produktů, oligonukleotidů o délce 15 – 80 bp s DNA fragmenty navázanými na čipu v daném pořadí. Hybridní molekuly jsou detekovány laserovou excitací, vyhodnocení provádí počítač na základě intenzity signálu (Weising *et al.*, 2005).

DNA čipy mají značný přínos pro naše chápání toho, jak probíhá genová exprese v buňce v reálném čase. Analýza genové exprese desítek tisíc DNA sekvencí souběžně reflektuje celý soubor buněčných transkriptů a má tak revoluční význam v pochopení buněčného transkriptomu (Ruan *et al.*, 1998)

### ***Diversity Array technology, DArT***

Diversity Array Technology je vysokokapacitní markerový systém pro genomové analýzy za využití technologie DNA čipů. Přístup poskytuje cenné informace o genomu studovaného organismu bez jakékoli předešlé znalosti DNA sekvence, navíc při potřebě minimálního množství DNA. Poprvé byla DArT použita na genomu rýže pro analýzu polymorfismu mezi vybranými odrůdami (Jaccoud *et al.*, 2001). DArT markery pro *T. monococcum* L. a genetické mapy pomocí nich konstruované usnadňují lokalizaci genů, komparativní mapování, studium organizace genomu a evoluce mezi *T.monococcum* L. a dalšími obilovinami, především pak *T. aestivum* L. (Jing *et al.*, 2009).

- **Techniky založené na PCR**

Zavedení polymerázové řetězové reakce (Mullis *et al.*, 1986) mělo zásadní vliv na vývoj metod v molekulární biologii. PCR techniky překlenuly mnoho nedostatků RFLP a umožnily vývoj široké škály molekulárních markerů, které také nazýváme molekulární markery druhé generace. Technika umožňuje *in vitro* amplifikaci jakékoli DNA sekvence v obrovském počtu kopií.

### ***Mikrosatelitové markery (Simple Sequence Repeats, SSR)***

„Simple sequence repeats“ neboli mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice, které se nachází roztroušeny v genomech všech eukaryot (Tautz *et Renz*, 1984). Jde o významný PCR markerový systém široce užívaný v genetickém mapování, populační genetice, studiích genetické diverzity a v selekci za pomoci markeru (MAS), (Hearne *et al.*, 1992; Zietkiewicz *et al.*, 1994). Jejich množství v genomu, vysoký polymorfismus, kodominantní charakter a možnost rozlišení jednotlivých alel díky rozdílnému počtu opakování motivu z nich činí účinný nástroj molekulární biologie (Li *et al.* 2002).

Mikrosatelitní tandemové repetice jsou krátké nukleotidové motivy o délce 1 – 6 bp. Často pak dinukleotidové (AT)<sub>n</sub>, (GC)<sub>n</sub> nebo trinukleotidové (ATT)<sub>n</sub> repetice nacházející se převážně v nekódujících oblastech po celém genomu. Velikost zřídka přesahuje 70 opakování (Dibet *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 1996; Li *et al.* 2002). Polymorfismus v počtu tandemových opakování je v převážné míře způsoben sklouzáváním DNA polymerázy během replikace, k opětovnému nasednutí pak nemusí dojít přesně ve stejném místě, výsledkem je větší či menší počet opakování (Schlotterer *et Tautz*, 1992).

PCR amplifikace SSR markerů probíhá z celkové genomické DNA. Dva specifické primery (17 – 22 nukleotidů) nasedají na hraniční sekvence v těsné blízkosti tandemové repetice. Ideální velikost produktu je 100 – 250 bp (Kole *et Abbott*, 2008). V případě, že primery nejsou nijak značeny, je provedena analýza buď na agarózovém gelu o koncentraci < 3%, kde je rozlišovací schopnost asi 10 bp nebo gelu polyakrylamidovém,

ten má rozlišovací schopnost vyšší, až 1 bp (Wang *et al.*, 2003). V obou případech se provádí barvení stříbrem nebo ethidium bromidem. V případě použití fluorescenčně značených primerů se provádí analýza produktu laserovou excitací na DNA sekvenátoru (Nguyen *et Wu*, 2005).

Díky zmíněným vlastnostem jsou mikrosatelity velmi populární markerový systém. Vysoká reprodukovatelnost umožňuje jejich užití v různých laboratořích a provádění analýz s konzistentními výsledky (Saghai Maroof *et al.*, 1994).

### ***Místo se sekvenční adresou (Sequence Tagged Site, STS)***

Místa se sekvenční adresou jsou krátké, jedinečné regiony o známé sekvenci jednoduše detekovatelné polymerázovou řetězovou reakcí (Saiki *et al.*, 1988). Hlavní výhodou STS markerů je možnost jejich distribuce mezi laboratořemi v podobě DNA databází což eliminuje nutnost transportu a uchovávání biologického materiálu (Williams *et al.*, 1992). STS může být využito např. pro detekci genů, ukotvování kontigů fyzických map (Palazzolo *et al.*, 1991). STS markery kombinují jednoduchou proveditelnost RAPD (random amplified polymorphic DNA, náhodně amplifikovaná polymorfni DNA) markerů a specifitu SSR markerů, mohou mít dominantní, ale i kodominantní charakter (Perry *et Bousquet*, 1998).

### ***Jednonukleotidové polymorfismy (Single nucleotide polymorphism, SNP)***

Jako markery třetí generace jsou nazývány jednonukleotidové polymorfismy. Hojná přítomnost v celém genomu z nich činí vysoce efektivní přístup genetického mapování (Nguyen *et Wu*, 2005).

Jednonukleotidové polymorfismy, změny v sekvenci DNA v jednom nukleotidu, zkráceně SNP reprezentují nejvýznamnější zdroj polymorfismu v genomech živých organismů, ačkoli jejich počty jsou v různých druzích (ale i jedincích jednoho druhu) značně variabilní (Agarwal *et al.*, 2008). Stejně tak se různí i zastoupení v jednotlivých částech genomu (Weising *et al.*, 2005).

Na molekulární úrovni SNP vznikají důsledkem tranzic a transverzí jednotlivých typů nukleotidů. Z definice mohou tedy SNP vykazovat jedno, dvou, tři a čtyřalelický polymorfismus. Nicméně tři a čtyřalelické se téměř nevyskytují a tak se někdy o SNP hovoří jako o bialelických markerech. S přihlédnutím k jejich počtu mohou být SNP markery detekovány pro každý gen nebo v jeho těsné blízkosti, nejvíce jsou však zastoupeny v nekódujících oblastech. V oblastech kódujících může mít SNP synonymní charakter nemá tak vliv na sekvenci aminokyselin, ale může ovlivňovat sestřih pre-mRNA ústící ve fenotypové změny (Richard *et Beckman*, 1995) nebo charakter nesynonymní vedoucí ke změně v sekvenci aminokyselin kódovaného proteinu (Sunyaev *et al.*, 1999). Značný potenciál tedy SNP skrývají v možnosti detekování alelické formy genu a projevem fenotypu (Rafalski, 2002). Tyto tzv. diagnostické SNP mohou být asociovány s určitými agronomickými vlastnostmi rostlin. Detekce diagnostických SNP je hlavní snahou mnoha projektů zabývajících se SNP markery.

Zjištěná frekvence pšenici seté činí 1 SNP na 540 bp (Somers *et al.*, 2003) v kukuřici činí 1 SNP na 60 – 120 bp (Ching *et al.*, 2002), v lidském genomu je frekvence výskytu o něco nižší na 1 SNP připadá 1000 bp (Sachidanandam *et al.*, 2001).

Pro detekování SNP bylo zavedeno mnoho technik, některé jsou relativně jednoduše proveditelné a levné, zatímco jiné jsou laboratorně velmi náročné a tím i nákladné. Žádný z přístupů není aplikovatelný pro všechny potřeby, hlavní přístupy můžeme zahrnout do pěti skupin: (1) přímé sekvencování, (2) enzymatická restrikce, (3) alelově specifická PCR, (4) alelově specifická oligonukleotidová hybridizace a (5) alelově specifická oligonukleotidová ligace. Výběr dané techniky záleží na počtu SNP, počtu vzorků a také na náročnosti (Weising *et al.*, 2005).

### **3.4.2 Mapovací populace**

Mapovací populace slouží ke studiu genů či lokusů ovlivňujících fenotyp a k determinaci rekombinačních vzdáleností mezi nimi. Ve většině případů mapovací populace sestávají z jedinců jednoho druhu, kteří vznikli křížením rodičovských linií rozdílných v požadovaných znacích. Při výběru rodičovských linií je třeba přihlídnout

k povaze experimentu. Je požadována co největší rozdílnost sledovaných znaků, to umožňuje popsat více genetických faktorů, které znak ovlivňují, což usnadňuje identifikaci (Kole *et* Abbott, 2008; Meksem *et* Kahl, 2005).

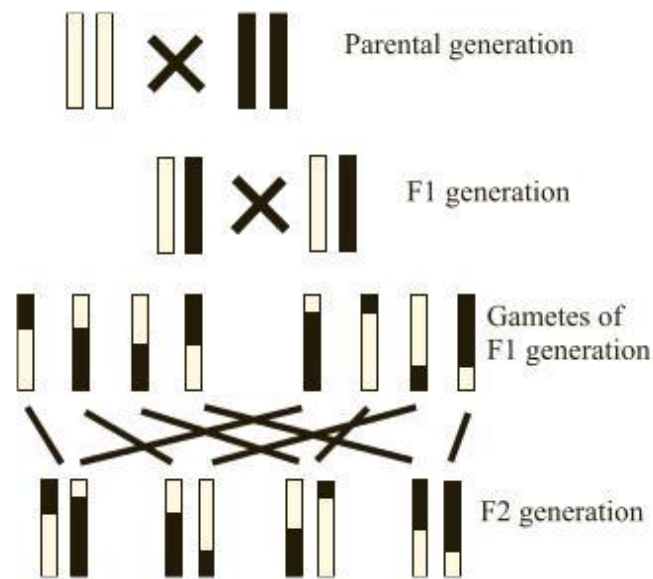
V jedincích jednoho druhu jsou genové lokusy pevně fixovány na dané místo chromozomu, ale mohou se vyskytovat v různých alelových formách (polymorfismus). Vazba mezi geny na chromozomu se stanovuje na základě počtu rekombinací mezi různými genovými lokusy. Vazebné vztahy na všech chromozomech dávají genetickou mapu organismu. Způsob jakým se dané alely distribuují do potomstva, pomáhají detekovat molekulární markery, které také odhalí jejich genetickou vzdálenost od genů vykazujících znak ve fenotypu (Meksem *et* Kahl, 2005).

Reprodukční strategie je základním kritériem při výběru vhodného typu mapovací populace. V nejširším slova smyslu je můžeme rozdělit na samosprašné a cizosprašné. Vzhledem k tomu, že pšenice patří mezi rostliny samosprašné, bude se tato kapitola věnovat mapovacím populacím, které jsou vhodné pro samosprašné rostliny (Meksem *et* Kahl, 2005). Jsou to  $F_2$  populace, rekombinantní inbrední linie (RIL), populace vzniklé zpětným křížením (backcross) a dihaploidní linie (DH).

### **3.4.3 $F_2$ populace ( $F_2$ Populations)**

Jedná se o nejjednodušší typ mapovací populace, která je schematicky znázorněna na Obr. 5. Základem jsou rodiče (parentální linie), kteří by v ideálním případě měli být rozdílní ve všech sledovaných znacích. Vzniklá  $F_2$  populace segreguje ve sledovaných znacích v příslušných poměrech. Dominantní znaky v poměru 3:1, kodominantní znaky v poměru 1:2:1 (Kole *et* Abbott, 2008).  $F_2$  jedinci jsou vlastně výsledkem jedné meiozy během které se rekombinuje genetický materiál rodičů. Pro plodiny s vysokým podílem homozygotů jsou geneticky vzdálení kříženci efektivní způsob jak zvýšit podíl heterozygotů v populaci. (Meksem *et* Kahl, 2005).

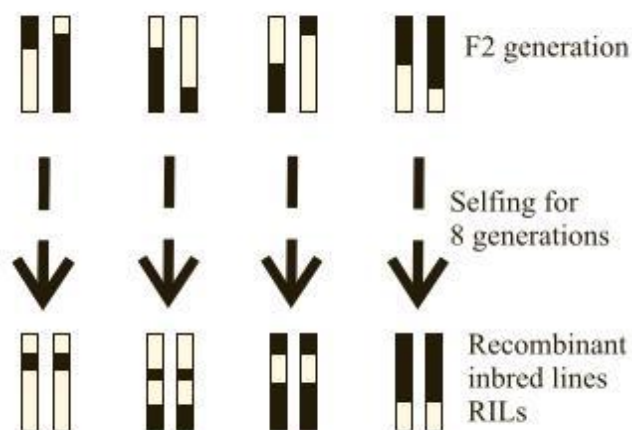
Velkou nevýhodou  $F_2$  populací je nemožnost materiál přemnožit. Následná  $F_3$  generace není geneticky identická (Meksem *et* Kahl, 2005). Mapovací populaci můžeme jen rozšiřovat o další  $F_2$  jedince.



**Obr. 5** Schéma přípravy F<sub>2</sub> mapovací populace (Meksem *et* Kahl, 2005)

#### 3.4.4 Rekombinantní inbrední linie (Recombinant Inbred Lines, RILs)

Rekombinantní inbrední linie (viz obr. 6) jsou homozygotní populace vzniklé samosprášením F<sub>2</sub> jedinců. Výhodou je relativně malý počet generací potřebných ke generování RILs. Šest generací stačí pro dosažení téměř úplné homozygotnosti. Mapovací populace je v podstatě nesmrtelná. Rekombinací pak nevznikají žádné další změny v genetickém materiálu a nedochází k segregaci v potomstvu. Tyto linie tak mohou sloužit jako stálý nástroj pro mapování i v rámci různých výzkumných skupin. V porovnání s F<sub>2</sub> populacemi je také vyšší procento rekombinantů, zatímco v F<sub>2</sub> populaci došlo jen k jedné meióze, v případě RILs jich proběhlo několik, dokud nebylo dosaženo homozygotnosti (Burr *et* Burr, 1991).



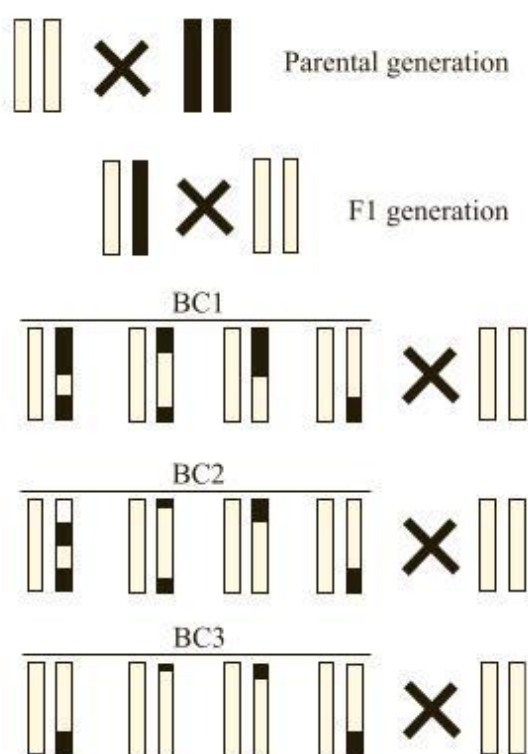
**Obr. 6** Schéma přípravy rekombinantních inbredních linií (Meksem *et* Kahl, 2005)

### 3.4.5 Populace vzniklé zpětným křížením (Backcross population, BC)

Tyto mapovací populace vznikají křížením rodiče A a rodiče B, kdy je  $F_1$  generace zpětně křížena s jedním z rodičů, např. s rodičem B. Za takové situace je rodič A donorem specifického DNA fragmentu do genomu B, protože v každé generaci se zastoupení genetické informace z rodiče A snižuje o polovinu (viz obr. 7). Sekvence A genomu ve vazbě se konzervují v recipientním genomu B, zatímco sekvence, které ve vazbě nejsou, se eliminují. Tento proces se opakuje po několik generací a výrazně jej zkracuje analýza pomocí molekulárních markerů. (Young *et* Tanksley, 1989).

V případě, že generované linie se liší jen jedním či několika lokusy nazývají se *nearly isogenic lines* (NILs). K získání NILs je třeba několikanásobného zpětného křížení společně s markerovou selekcí. Pokud BC linie vznikají křížením vzdáleně příbuzných druhů, nazývají se introgresní linie, naopak pokud byly použity linie blízce příbuzné, třeba dvě různé odrůdy jednoho druhu, jedná se o intervarietové substituční linie.

Pokud je požadována jedna určitá vlastnost, jako třeba rezistence k chorobě do odrůdy, který už nese jiné požadované znaky, je zpětné křížení vhodnou strategií. Jediným požadavkem je produkce fertilního potomstva (Meksem *et* Kahl, 2005).



**Obr. 7** Schéma přípravy populace zpětného křížení (Meksem *et* Kahl, 2005)

### 3.4.6 Dihaploidní linie (Doubled Haploid Lines, DH)

Dihaploidní linie nesou v jádrech svých buněk dvě identické haploidní sady chromozomů a jsou tím pádem zcela homozygotní, kdy pro každý gen je v genomu jen jedna alela. Pro generaci dihaploidů se využívají haploidní linie (haploidní rostliny jsou malé, málo vitální a téměř sterilní), které mohou vznikat spontánně (kukuřice, řepka) nebo uměle indukovaně. Pro indukovaný vznik DH může být použito kolchicinu, který brání tvorbě dělicího vřetenka během mitózy, následně nedojde k rozdělení buňky a vzniká dihaploid (Meksem *et* Kahl, 2005).

Linie dihaploidů představují stálý zdroj pro mapování, zároveň jsou ideálními kandidáty pro křížení vzhledem k absenci jakékoli heterogenosti. V případě obilovin se využívají dihaploidní linie pro pšenici, ječmen a rýži (Chao *et al.*, 1989; Heun *et al.*, 1991; McCouch *et al.*, 1988).



# 4 Materiál a metodika

## 4.1 Biologický materiál

### 4.1.1 Mapovací populace

Mapovací populace *T. monococcum* L. se skládá ze 400 rostlin F<sub>2</sub> generace odvozené z křížení rodičovských linií DV92 a 258. Pro konstrukci genetické mapy bylo použito 184 linií této mapovací populace.

Rodič DV92 je *T. monococcum* ssp. *monococcum* L. kulturní jednozrnka z Titogradu Montenegro v Itálii. Jeho alely jsou označovány písmenem A. Rodičovská linie 258 pochází z mapovací populace požívané v diplomových pracích Klocová, Gallová a Vanžurová. Její alely jsou označovány písmenem B. Semena rodičovských linií byla poskytnuta Prof. J. Dubcovským (Univerzity of California in Davis). Mapovací populace byla vytvořena na Ústavu experimentální botaniky (Olomouc, ČR).

### 4.1.2 Vzorek padlí sloužící k inokulaci

Směsný vzorek padlí travního (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) původně odebraný z vnímavé rodičovské linie 258. Tento vzorek je uchován v Zemědělském výzkumném Ústavu v Kroměříži, kde byla provedena inokulace rostlin.

## 4.2 Přístrojové vybavení

Vodní lázeň Jouan J18 (Bain univ, Francie)

Oscilační mlýn MM301 (Retsch, Německo)

Centrifuga Heraeus Fresco 17 (Thermo Scientific, USA)

Termostat, BT 120M (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)

Aparatura pro agarózovou elektroforézu Owl (Thermo Scientific, USA)

Zdroj stejnosměrného napětí MS 300 V (Major Science, USA)  
Transluminátor In genius (Syngene chemi Bio Imaging, UK)  
Dokumentační systém pro analýzu ELFO gelů (Syngene chemi Bio Imaging, UK)  
váhy AJ (Vibra, Japonsko)  
mikrovlnná trouba KOR-6C2B (Daewoo, Jižní Korea)  
Aparatura pro polyakrylamidovou ELFO C-DASH-400-50 Dual Adjustable Mega-Gel Kit (C.B.S. Scientific, USA)  
Zdroj stejnosměrného napětí MP 500 V (Major Science, USA)  
PCR Plate Spinner (VWR, USA)  
C1000 Touch Thermal cycler (BioRad, USA)

### **4.3 Chemikálie a roztoky**

#### **4.3.1 Hodnocení fenotypu**

Agarózový gel připravený z 8 g agaru a 1000 ml destilované vody s antibiotikem benzimidazolem (40 ppm) v petriho miskách

#### **4.3.2 Izolace DNA z lyofilizovaného materiálu**

Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex, Německo)

#### **4.3.3 Agarózová elektroforéza**

##### Pufř 5x TBE (1000 ml)

54 g	Tris base (Sigma-Aldrich, USA)
27,5 g	kyselina boritá (lach:ner, Česká Republika)
20 ml	0,5 mol/l EDTA (pH 8) (Fluka Analytical, Německo)

doplnit destilovanou vodou na 1 000 ml

0,5x TBE (ředění 5x TBE)

##### 6x STOP C (10 ml)

2 ml	100 mM EDTA (pH 8)
0,1 g	SDS
5 mg	0,05% (w/v) bromfenolová modř
5 mg	0,05% (w/v) xylene cyanol
4,3 ml	99% glycerol
ředit 1 : 5	

Velikostní marker

24 µl	Gene Ruller 100bp Plus (Thermo Scientific USA)
100 µl	6x STOP C
476 µl	destilovaná voda

Agar pro DNA elektroforézu (Serva, Německo)

Vyizolovaná DNA mapovací populace

**4.3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

10x PCR pufr (40 ml)

4 ml	100 mmol/l Tris-HCl (pH 8,2)
20 ml	500 mmol/l KCl
600 µl	15 mmol/l MgCl <sub>2</sub>
0,4 ml	1% Triton X-100
doplnit destilovanou vodou na 40 ml	

Nukleotidy (Fermentas, Litva)

100 mmol/l dTTP
100 mmol/l dATP
100 mmol/l dGTP
100 mmol/l dCTP

Cresol red (Sigma-Aldrich, UK)

Taq polymeráza (Finzyme, Finsko)

Primery (Invitrogen, USA)

#### 4.3.5 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza (PAGE)

##### Pufr 5x TBE (2000 ml)

108g Tris Base

55g kyselina boritá

7,44G Na<sub>2</sub>EDTA . 2 H<sub>2</sub>O

Doplnit destilovanou vodou na 2000 ml

10% APS – ammonium persulfate (Sigma Life Science, USA)

40% směs akrylamid : N, N'-metylenbisakrylamid 19 : 1 (Bio-Rad, USA)

10% ethidium bromid (Sigma Aldrich, USA)

TEMED - tetrametyletylendiamin (Bio-Rad, USA)

Silane – 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane (Serva, Německo)

99,8% kyselina octová (lach:ner, Česká Republika)

96% ethanol (lach:ner, Česká Republika)

#### 4.4 Metodika

##### 4.4.1 Pěstování mapovací populace

7. září 2012 bylo 400 semínek z křížení DV92 x 258 a 258 x DV92 umístěno do Petriho misek s buničitou vatou navlhčenou pitnou vodou, kde po dobu jednoho týdne klíčily. 14. září byla klíčící semena zasazena do jiffy květináčů (5 x 5 cm) se zahradním substrátem, hnojivem (Osmocote exact) a Agrisorbem (1%). 12. října byly rostliny vysazeny do venkovních parcel v areálu ÚEB Olomouc - Holice.

##### 4.4.2 Inokulace a hodnocení fenotypu

Rostliny mapovací populace byly ve stádiu třetího listu převezeny do Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž na fenotypizaci (Doc. Ing. Antonín Dreiseitl, CSc.). Z každé rostliny byl odebrán první list, z kterého byly udělány listové segmenty. Ty byly přeneseny na agarózový gel s benzimidazolem a inokulovány směsným vzorkem padlí (viz obr. 8). Síla

napadení padlím byla hodnocena po měsíci hodnoticí škálou 0 - 4 (kde 0 byla rezistentní a 4 silně napadená).



**Obr. 8 Inokulované listy *T. monococcum* L. na agarovém gelu s benzimidazolem**

#### **4.4.3 Izolace DNA z lyofilizovaného materiálu**

Izolace DNA byla provedena pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek, Německo). Z každé rostliny ve stádiu třetího listu byl odebrán list (asi 2 cm) do mikrozkušavky. Byly přidány dvě skleněné kuličky a dále bylo postupováno podle pokynů přiložených u kitu na izolaci DNA.

#### **4.4.4 Agarózová elektroforéza**

Pro kontrolu čistoty vyizolované DNA byla použita 1,2% agarózový gel. Gel byl připraven rozvařením 1,8 g agarózy v 150 ml 0,5x TBE pufru. Rozvaření bylo provedeno v mikrovlnné troubě. Agaróza je připraven ve chvíli, kdy je roztok čirý bez jakýchkoli

pevných částic. Před vlastním nalitím do vany je nutné roztok lehce ochladit pod proudem vody. Do vany pro agarózový gel s vloženými hřebínky byl nalit zchlazený roztok. Gel ztuhne přibližně za 20 minut. Po ztuhnutí byly odstraněny hřebínky a gel zalit 0,5x TBE pufrem. Do jamek byly pipetovány vzorky smíchané s 6x STOP C v poměru 1:5.

Po uzavření aparatury a připojení na zdroj elektrického napětí byly vzorky separovány při napětí 2V na 1 cm po dobu přibližně jedné hodiny. Po ukončení byl gel vyříznut a vložen do vany s ethidium bromidem (0,5 mg/ml) na 10 – 20 min. Po vytažení byl gel přemístěn do transiluminátoru, následovalo focení v UV spektru při expozičním čase 3s.

#### 4.4.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce byla provedena v objemu 20 µl. Reakční směs obsahovala 1x PCR pufr, 0,01% Cresol red, 200 µmol/l jednotlivých dNTP, 1 µmol/l primeru, 0,5U Taq polymerázy a 10 ng DNA. Polymorfnní markery (primery) byly vybrány z genetické mapy mapovací populace DV92 x G3119 (diplomová práce Vanžurová). Celkem bylo vybráno 40 SSR markerů a 2 STS.

#### Podmínky PCR pro SSR primery

Zahřátí	95 °C – 5 min	} 40 cyklů
Denaturace	95 °C – 30 s	
Přisedání	1 – 30 s (viz tab. 2)	
Polymerace	72 °C 30 s	
Závěrečná polymerace	72 °C 10 min	

**Tab. 2 Použité primery SSR a STS markerů**

Chromozom 1A <sup>m</sup>		
Marker	Primery	Ta
<b>SMP</b>	F GCA AGG GAA GAG AAA AGC AG R TTT CTC AAT CTC ATG TTA TCC TTC A	55 °C
Chromozom 2A <sup>m</sup>		
Marker	Primery	Ta
<b>wmc602</b>	F TAC TCC GCT TTG ATA TCC GTC C R GTT TGT TGT TGC CAT CAC ATT C	61 °C

Tab. 2 pokračování

<b>wmc522</b>	<b>F</b> AAA AAT CTC ACG AGT CGG GC <b>R</b> CCC GAG CAG GAG CTA CAA AT	61 °C
<b>wmc296</b>	<b>F</b> GAA TCT CAT CTT CCC TTG CCA C <b>R</b> ATG GAG GGG TAT AAA GAC AGC G	61 °C
<b>wmc453</b>	<b>F</b> ACT TGT GTC CAT AAC CGA CCT T <b>R</b> ATC TTT TGA GGT TAC AAC CCG A	61 °C
<b>gwm122</b>	<b>F</b> GGG TGG GAG AAA GGA GAT G <b>R</b> AAA CCA TCC TCC ATC CTG G	60 °C
<b>wmc474</b>	<b>F</b> ATG CTA TTA AAC TAG CAT GTG TCG <b>R</b> AGT GGA AAC ATC ATT CCT GGT A	61 °C
<b>owm301</b>	<b>F</b> AGT TTT GTG CAT GGG AAT GA <b>R</b> GCG ATT GTT CTG CAA ATT CA	55 °C
<b>gwm515</b>	<b>F</b> AAC ACA ATG GCA AAT GCA GA <b>R</b> CCT TCC TAG TAA GTG TGC CTC A	60 °C
<b>gwm249</b>	<b>F</b> CAA ATG GAT CGA GAA AGG GA <b>R</b> CTG CCA TTT TTC TGG ATC TAC C	55 °C
<b>wmc420</b>	<b>F</b> ATC GTC AAC AAA ATC TGA AGT G <b>R</b> TTA CTT TTG CTG AGA AAA CCC T	51 °C
<b>gwm71</b>	<b>F</b> GGC AGA GCA GCG AGA CTC <b>R</b> CAA GTG GAG CAT TAG GTA CAC G	60 °C
<b>gwm382</b>	<b>F</b> GTC AGA TAA CGC CGT CCA AT <b>R</b> CTA CGT GCA CCA CCA TTT TG	60 °C
<b>barc122</b>	<b>F</b> CCC GTG TAT ATC CAG GAG TG <b>R</b> CAG CCC TTG TGA TGT GAT G	52 °C
<b>wmc407</b>	<b>F</b> GGT AAT TCT AGG CTG ACA TAT GCT C <b>R</b> CAT ATT TCC AAA TCC CCA ACT C	61 °C
<b>Chromozom 4A<sup>m</sup></b>		
<b>Marker</b>	<b>Primery</b>	<b>Ta</b>
<b>wmc161</b>	<b>F</b> ACC TTC TTT GGG ATG GAA GTA A <b>R</b> GTA CTG AAC CAC TTG TAA CGC A	61 °C
<b>gwm494</b>	<b>F</b> ATT GAA CAG GAA GAC ATC AGG G <b>R</b> TTC CTG GAG CTG TCT GGC	60 °C
<b>cfa2173</b>	<b>F</b> GAC ATA CTC CGG CGT TGA AT <b>R</b> TTC CCA GGA CAT CCT TCT TG	60 °C
<b>wmc89</b>	<b>F</b> ATG TCC ACG TGC TAG GGA GGT A <b>R</b> TTG CCT CCC AAG ACG AAA TAA C	61 °C
<b>bcd1738</b>	<b>F</b> TGA GCA CTA ACC CTG CCT TA <b>R</b> TGA TGC ACA CCT CAA GCA AT	50 °C
<b>barc106</b>	<b>F</b> GCC CTC AAA TAA TTA CGC CAA TCC CTA TG <b>R</b> GCG TCA AGA TCA GAA GGC ATC CTA TTA TTG	50 °C
<b>cfd71</b>	<b>F</b> CAA TAA GTA GGC CGG GAC AA <b>R</b> TGT GCC AGT TGA GTT TGC TC	60 °C
<b>gwm397</b>	<b>F</b> TGT CAT GGA TTA TTT GGT CGG <b>R</b> CTG CAC TCT CGG TAT ACC AGC	55 °C
<b>Chromozom 5A<sup>m</sup></b>		
<b>Marker</b>	<b>Primery</b>	<b>Ta</b>
<b>gwm6</b>	<b>F</b> CGT ATC ACC TCC TAG CTA AAC TAG <b>R</b> AGC CTT ATC ATG ACC CTA CCT T	55 °C
<b>wmc371</b>	<b>F</b> GGA AAC CAA GGC AGC AGT CA <b>R</b> CCA GGG CTA CTT CAG CCA GG	61 °C
<b>barc303</b>	<b>F</b> GCG AGC TAT GAT CTG ATG AGG AG <b>R</b> GCG TGT CCT ACT AAT CCA ACT TG	50 °C
<b>barc117</b>	<b>F</b> TCA TGC GTG CTA AGT GCT AA <b>R</b> GAG GGC AGG AAA AAG TGA CT	52 °C

**Tab. 2 pokračování**

<b>wmc805</b>	<b>F</b> GAT GCT GCT GCA CCA AAC TC <b>R</b> GCC TTT TCC ATG CCA CAC T	61 °C
<b>gwm639</b>	<b>F</b> CTC TCT CCA TTC GGT TTT CC <b>R</b> CAT GCC CCC CTT TTC TG	55 °C
<b>gwm126</b>	<b>F</b> CAC ACG CTC CAC CAT GAC <b>R</b> GTT GAG TTG ATG CGG GAG G	60 °C
<b>cf47</b>	<b>F</b> TGA CCA TGT CAT GTT TTA TAC CAC T <b>R</b> TGG ACT ACA TGT CAA GCA CAA A	60 °C
<b>cfa2149</b>	<b>F</b> CTT GGA GCT CGG GTA GTA GC <b>R</b> AAG GCA GCT CAA TCG GA GTA	60 °C
<b>Chromozom 6A<sup>m</sup></b>		
<b>Marker</b>	<b>Primery</b>	<b>Ta</b>
<b>wmc417</b>	<b>F</b> GTT CTT TTA GTT GCG ACT GAG G <b>R</b> CGA TGT ATG CCG TAT GAA TGT T	51 °C
<b>gwm570</b>	<b>F</b> TCG CCT TTT ACA GTC GGC <b>R</b> ATG GGT AGC TGA GAG CCA AA	60 °C
<b>Chromozom 7A<sup>m</sup></b>		
<b>Marker</b>	<b>Primery</b>	<b>Ta</b>
<b>cfa2174</b>	<b>F</b> ACG GCA TCA CAG GTT AAA GG <b>R</b> GGT CTT TGC ACT GCT AGC CT	60°C
<b>wmc405</b>	<b>F</b> GTG CGG AAA GAG ACG AGG TT <b>R</b> TAT GTC CAC GTT GGC AGA GG	61 °C
<b>Neurčená pozice</b>		
<b>Marker</b>	<b>Primery</b>	<b>Ta</b>
<b>cf4223</b>	<b>F</b> AAG AGC TAC AAT GAC CAG CAG A <b>R</b> GCA GTG TAT GTC AGG AGA AGC A	60°C
<b>wmc179</b>	<b>F</b> CAT GGT GGC CATG AGT GGA GGT <b>R</b> CAT GAT CTT GCG TGT GCG TAG G	61 °C
<b>gwm636</b>	<b>F</b> CGG TAG TTT TTA GCA AAG AG <b>R</b> CCT TAC AGT TCT TGG CAG AA	50°C

#### 4.4.6 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza

Separace amplifikovaných vzorků DNA z PCR byla provedena pomocí nedenaturující polyakrylamidové elektroforézy v6% gelu o tloušťce 1 mm. Gel byl připraven smícháním 15 ml 5x TBE, 22,5 ml 40% směsi N, N'-metylenbisakrylamidu 19 : 1, 110 µl TEMEDu, 1 ml 10% APS a doplněn vodou do 150 ml. Polymerace probíhala asi 40 minut při pokojové teplotě. Ztuhlý gel byl upevněn do elektroforetické aparatury a obě vany (anodová i katodová) byly naplněny 0,5x TBE pufrem. Do spodní, anodové, vany bylo přidáno 10 µl 10% ethidium bromidu. Pro nasycení gelu ethidium bromidem byla aparatura spuštěna na tzv. prerun, asi 1 hodina při 300 V. Poté bylo nanášeno 5 µl velikostního markeru a 5 µl amplifikovaného vzorku DNA. Separace probíhala 40 – 60 minut při 350 V. Separovaná DNA byla vizualizována a dokumentována systémem Syngene.



#### 4.4.7 Konstrukce genetické mapy

Genetická vazebná mapa byla konstruována za použití programu JoinMap 4 (Van Ooijen, 2006) analýzou rekombinační frekvence mezi všemi polymorfními markery. Genetická vzdálenost mezi jednotlivými markery byla vypočítána pomocí Kosambi funkce (Kosambi, 1943). Pro identifikaci vazebných skupin byla použita metoda regresního mapování. K identifikaci vazby markerů byly využity pouze kombinace markerů s rekombinační frekvencí menší než 0,4 a LOD skóre větším než 1. Po přidání každého markeru bylo provedeno přepočítání s ohledem na přilehlé tři markery (triple).

#### 4.4.8 Software

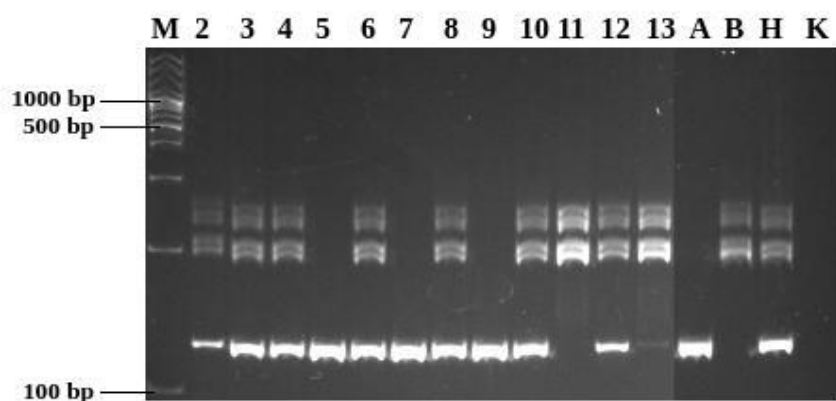
Pro zpracování výsledků a konstrukci genetické mapy byl použit následující software:

- *JoinMap 4* (Van Ooijen, 2006) – vytvoření mapy.
- *Microsoft Office Excel 2007* – jednoduché statistické metody a zpracování sesbíraných fenotypických dat.

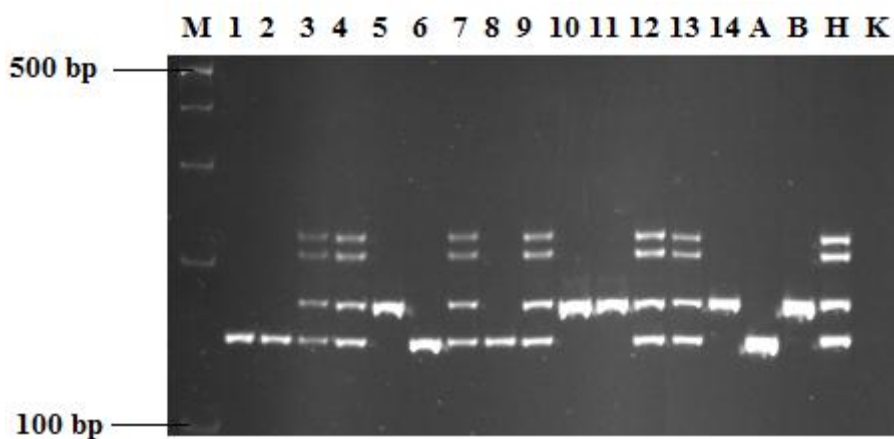
# 5 Výsledky

## 5.1 Molekulární markery

Polymerázová řetězová reakce byla provedena na 184 liniích F<sub>2</sub> mapovací populace s 40 SSR a 2 STS markery, u kterých byl předpokládán polymorfismus na základě genetické mapy DV92 x G3116 z diplomové práce Mgr. Vanžurové. Všechny vybrané markery vykazovaly jednobodový polymorfismus v nové mapovací populaci (viz obr. 13 a 14).



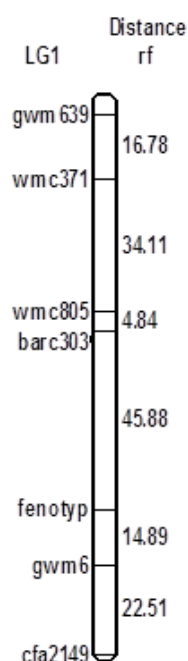
**Obr. 9: Polymorfismus SSR markeru wmc453 v polyakrylamidovém gelu.** M – velikostní marker, A – rodič DV92, B – 258, H – heterozygot, K – negativní kontrola, 2 – 13 – mapovací populace



**Obr. 10: Polymorfismus STS markeru owm301 v polyakrylamidovém gelu.** M – velikostní marker, A – rodič DV92, B – 258, H – heterozygot, K – negativní kontrola, 2 – 14 – mapovací populace

## 5.2 Genetická mapa

Genetická mapa byla zkonstruována pomocí použitých 40 SSR a 2 STS markerů za použití programu JoinMap 4. Pro identifikaci jednotlivých vazebných skupin byla použita metoda regresního mapování a pro výpočet rekombinační frekvence mezi jednotlivými markery byla použita funkce Kosambi (Kosambi, 1943). Ačkoli vybrané markery nepokrývaly rovnoměrně všech 7 chromozomů mapovací populace, byl identifikován marker ve vazbě s fenotypem. Fenotyp se nachází na dlouhém rameni 5A<sup>m</sup> chromozomu a je ve vazbě s markerem *gwm6* (viz obr. 11).



**Obr. 11:** Vazebná mapa 5A<sup>m</sup> chromozomu *T. monococcum* L. Levá strana – použité markery, pravá strana – frekvence rekombinací.

## 5.3 Fenotyp

Z celkového počtu 184 linií, na kterých byla provedena polymerázová řetězová reakce s 40 SSR a 2 STS markery, vykazovalo 54 (29,4 %) linií rezistenci k padlí travnímu. Hodnoty odpovídají recesivnímu genu rezistence. To potvrdil i test dobré shody ( $\chi^2$ ) při 5% hladině významnosti.

## 6 Diskuse

Padlí travní *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *tritici* patří mezi nejvýznamnější škůdce na pšenici. Ztráty na výnosu způsobené touto houbou mohou dosahovat až 30 %, je proto nutné šlechtit nové odolné kultivary. Velikost a struktura genomu pšenice seté *T. aestivum* L. komplikuje tyto snahy, proto se využívá druhů s nižší ploidií, jakým je vysoce polymorfní pšenice jednozrnka *T. monococcum* L., která je blízké příbuzná donoru subgenomu A pšenice seté.

Celkem bylo testováno 40 SSR a 2 STS markery na 184 liniích nové F<sub>2</sub> mapovací populace vzniklé křížením rodičů rezistentní linie DV92 a vnímavé linie 258. Všechny vybrané markery vykazovaly jednobodový polymorfismus. Rostliny byly inokulovány směsným vzorkem padlí travního původně odebraným z rodičovské linie 258. Distribuce fenotypů odpovídala jednogenové rezistenci v recesivní konstituci. Ve vazbě s fenotypem byl identifikován SSR marker *gwm6*, který se nachází na dlouhém rameni 5A<sup>m</sup> chromozomu (Vanžurová, 2013).

Zatím jako jediný recesivní gen rezistence na 5A<sup>m</sup> chromozomu byl identifikován gen *pm2026*, který se nachází na dlouhém rameni. *Pm2026* byl úspěšně vnesen do tetraploidní pšenice, která slouží jako donor pro vnesení genu do pšenice seté (Xu *et al.*, 2008).

Vzhledem k faktu, že zatím nejsou známy jiné geny rezistence na 5A<sup>m</sup> v recesivní konstituci, s velkou pravděpodobností se jedná právě o gen *pm2026*. K potvrzení či vyvrácení této hypotézy bude třeba provést další experimenty, především zopakování experimentu s použitím primerů z citované práce. V případě potvrzení bude nutné zahustit vazebnou mapu dalšími markery. Z důvodu nízkého polymorfismu mezi liniemi DV92 a 258 bylo jejich rozložení v rámci všech sedmi chromozomů *T. monococcum* L. nerovnoměrné.

## 7 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše na *T. monococcum* L., padlí travní, geny rezistence k padlí v pšenici, genetické markery a konstrukce mapovacích populací. Praktická část měla za cíl konstrukci genetické mapy F<sub>2</sub> mapovací populace *T. monococcum* L. za použití STS a SSR markerů a lokalizaci oblasti odpovědné za rezistenci k padlí travnímu.

Experiment byl proveden na 184 liniích nové F<sub>2</sub> mapovací populace vzniklé křížením rodičů DV92 a 258. Použité linie byly inokulovány ve stádiu třetího listu a fenotyp byl hodnocen měsíc po inokulaci. Distribuce fenotypu odpovídala *Pm* genu v recesivní konstituci. Na všech 184 liniích byla provedena polymerázová řetězová s 40 SSR a 2 STS markery. Podařilo se identifikovat marker (*gwm6*) ve vazbě s fenotypem na dlouhém rameni 5A<sup>m</sup> chromozomu. Identifikovaná oblast odpovídá svojí polohou i recesivní konstitucí genu *pm2026* (Xu *et al.*, 2008).

## 8 Seznam zkratek

<b>A</b>	Adenin
<b>AGT</b>	Appressional Germ Tube (sekundární klíčící hyfa)
<b>APR</b>	Adult Plant Resistance (rezistence dospělých rostlin)
<b>Bg</b>	<i>Blumeria graminis</i>
<b>Bgh</b>	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>
<b>Bgt</b>	<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>
<b>bp</b>	Párů bází (base pair)
<b>C</b>	Cytozin
<b>cDNA</b>	Komplementární DNA
<b>DNA</b>	Deoxynukleová kyselina
<b>ECM</b>	Extracellular Matrix (extracelulární tektina)
<b>G</b>	Guanin
<b>HR</b>	Hypersensitive Response (hypersenzitivní reakce)
<b>ISH</b>	<i>In situ</i> hybridization ( <i>in situ</i> hybridizace)
<b>MAS</b>	Marker Assisted Selection (selekce za pomoci markeru)
<b>PCR</b>	Polymerázová řetězová reakce
<b>PGT</b>	Primary Germ Tube (primární klíčící hyfa)
<b>Pm</b>	Powdery mildew resistance gene (gene rezistence proti padlí)
<b>PP</b>	Penetration Peg

<b>R gen</b>	Resistance gene (gen rezistence)
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA (náhodně amplifikovaná polymorfni DNA)
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism (délkový polymorfismus restrikčních fragmentů)
<b>RNA</b>	Ribonukleová kyselina
<b>SNP</b>	Single-Nucleotide Polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)
<b>SSR</b>	Simple Sequence Repeats (mikrosatelitové repetice)
<b>STS</b>	Sequence-Tagged Sites (místo se sekvenční adresou)
<b>T</b>	Thymin
<b>TE</b>	Transponovatelný element

## 9 Literatura

- AGARWAL, M., SHRIVASTAVA, N., PADH, H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617 – 631.
- ALAM A., XUE, F., WANG, CH., JI, W. (2011): Powdery Mildew Resistance Genes in Wheat: Identification and Genetic Analysis. *Journal of Molecular Biology Research* 1: 20 – 39.
- ALNADDAF, L. M., MOUALLA, M. Y., HAIDER, N. (2013): Genetic Relationships among *Aegilops* L. and *Triticum* L. Species based on the Internal Transcribed Spacer Sequences of nrDNA (ITS). *Asian Journal of Agricultural Sciences*, 5: 108 – 117.
- BENNETT, F. G. A. (1984): Resistance to powdery mildew in wheat: A review of its use in agriculture and breeding programmes. *Plant Pathology* 33: 279 – 300.
- BLANCO, A., GADALETA, A., CENCI, A., CARLUCCIO, A. V., ABDELBACKI, A. M. M., SIMEONE, R. (2008): Molecular mapping of the novel powdery mildew resistance gene Pm36 introgressed from *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 135 – 142.
- BOTH, M., CSUKAI, M., STUMPF, M.P.H., SPANU, P.D. (2005): Gene Expression Profiles of *Blumeria graminis* Indicate Dynamic Changes to Primary Metabolism during Development of an Obligate Biotrophic Pathogen. *The Plant Cell* 17: 2107 – 2122.
- BOTSTEIN, B., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314 – 331.
- BRAUN, U., COOK, R.T.A., INMAN, A.J., SHIN, H-D. (2002): The taxonomy of powdery mildew fungi. st. 13–55. Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., and Carver, T.L.W. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. APS Press. St. Paul.



- BRIGGLE, L. W. (1966): Three loci in wheat involving resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Crop Science* 6: 461 – 465.
- BURR, B., BURR, F. A. (1991): Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. *Trends in Genetics* 7: 55 – 60.
- CEOLONI, C., SIGNORE, G. D., ERCOLI, L., DONINI, P. (1992): Locating the alien chromatin segment in common wheat-*Aegilops longissima* mildew resistant transfers. *Hereditas* 116: 239 – 245.
- CHAO, S., SHARP, P.J., WORLAND, A.J., WARHAM, E.J., KOEBNER, R.M.D., GALE, M.D. (1989): RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 495 – 504.
- CHARMET, G. (2011): Wheat domestication: Lessons for the future. *C. R. Biologies* 334: 212 – 220.
- CHEN, P. D., QI, L. L., ZHOU, B., ZHANG, S. Z., LIU, D. J. (1995): Development and molecular cytogenetic analysis of wheat-*Haynaldia villosa* 6VS/6AL translocation lines specifying resistance to powdery mildew. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1125 – 1128.
- CHEN, Y., CHELKOWSKI, J. (1999): Genes for resistance to wheat powdery mildew. *Journal of Applied Genetics* 40: 317 – 334.
- CHEN, Y., ZHANG, Z. Y., LI, H. J., LIU, Z. Y., VEISZ, O., VIDA, G. (2011): Pm44, a new gene for powdery mildew resistance on the short arm of wheat chromosome 3A. (Draft manuscript)
- CHING, A.D.A., CALDWELL, K.S., JUNG, M., DOLAN, M., SMITH, O.S., TINGEY, S., MORGANTE, M., RAFALSKI, A. (2002): SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics* 3: 19.
- DE BARY, A. (1863): *Über die Fruchtkörperentwicklung der Ascomyceten*. Leipzig: W. Englemann.
- DEVOS, K.M., GALE, M.D. (1997): Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol. Biol.*

- DIAMOND, J. (2004): Třetí šimpanz. Nakladatelství Paseka, Praha.
- DIB, C., FAURE, S., FIZAMES, C., SAMSON, D., DROUOT, N., VIGNAL, A., MILLASSEAU, P., MARC, S., HAZAN, J., SEBOUN, E., LATHROP, M., GYAPAY, G., MORISETTE, J., WEISSENBACH, J. (1996): A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellite. *Nature* 380: 152-154.
- DIETRICH, W.F., MILLER, J., STEEN, R., MERCHANT, M.A., DAMRON-BOLES, D., HUSAIN, Z., DREDGE, R., DALY, M.J., INGALLS, K.A., O'CONNOR, T.J. (1996): A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* 380: 149-152.
- DVOŘÁK, J., MCGUIRE, P.E., 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: 680 – 689.
- DVOŘÁK, J., TERLIZZI, P., ZHANG, H.B., RESTA, P. (1993): The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21 – 31.
- ELLIS, M.B., ELLIS, J.P. (1997): *Microfungi on Land Plants*. New Enlarged Edition. The Richmond Publishing Company Ltd. Slough – England.
- ESHED, N., WAHL, I. (1970): Host ranges and interrelations of *Erysiphe graminis hordei*, *Erysiphe graminis tritici*, and *Erysiphe graminis avenae*. *Phytopathology* 60: 628 – 634.
- FEUILLET, C., LANGRIDGE, P., WAUGH, R. (2008): Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in Genetics* 24: 24 – 31.
- FRIEBE, B., HEUN, M., TULEEN, N., ZELLER, F. J., GILL, B. S. (1994): Cytogenetically monitored transfer of powdery mildew resistance from rye into wheat. *Crop Science* 34: 621 – 625.
- 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: 913 – 921.
- GALL, J.G., PARDUE, M.L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid

molecules in cytological preparations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.2: 378–83.

GALLOVÁ, L. (2011): Mapovanie agronomicky dôležitých génov u pšenice. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého , Olomouc.

GILL, K.S.GILL, B.S. ENDO, T.R., BOYKO, E.V. (1996): Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 5 of wheat. Genetics, 143: 1001 – 1012.

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

GONCHAROV, N.P. (2011): Genus *Triticum* L. taxonomy: the present and the future. Plant Systematics and Evolution 295: 1 – 11.

GRIFFEY, C.A., DAS, M.K., STROMBERG E.L. (1993): Effectiveness of adult-plant resistance in reducing grain yield loss to powdery mildew in winter wheat. Plant Dis, 77: 618 – 622.

HÄNI, F., REINHARD, H., SCHWARZ, A., TANNER, K., VORLET, M. (1993): Obrazový atlas chorob a škůdců polních plodin. Scientia, Praha.

HARDISON, J.R. (1944): Specialization of pathogenicity in *Erysiphe graminis* on wild and cultivated grasses. Phytopathology, 34, 1– 20.

HARLAN, J., R., ZOHARY, D. (1966): Distribution of Wild Wheats and Barley. Science 153: 1074 – 1080.

HE, R. CHANG, Z. YANG, Z. YUAN, Z. ZHAN, H. ZHANG, X. LIU, J. (2009): Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. Theor. Appl. Genet, 118: 1173 – 1180.

HEARNE, C.M., GHOSH, S., TODD, J.A. (1992): Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. Trends in Genetics 8: 288–294.

- HELMSJØ RGENSEN, J., JENSEN, C. J. (1973): Gene Pm6 for resistance to powdery mildew in wheat. *Euphytica* 22: 423 – 423.
- HEUN, M., FRIEBE, B., BUSHUK, W. (1990): Chromosomal location of the powdery mildew resistance gene of Amigo wheat. *Phytopathology* 80: 1129 – 1133.
- HEUN, M., KENNEDY, A.E., ANDERSON, J.A., LAPITAN, N.L.V., SORRELLS, M.E., TANKSLEY (1991): Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 34: 437 – 447.
- HEUN, M., SCHÄFER-PREGL, R., KLAWAN, D., CASTAGNA, R., ACCERBI, M., BORGHI, B., SLAMINI, F. (1997): Site of Einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* 278: 1312 – 1314.
- HIRATA, K. (1966): *Host Range and the Geographical Distribution of the Powdery Mildews*. Japan: Nigata University.
- HOPF, M., ZOHARY, D. (2000): *Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley* (3rd ed.). Oxford University Press, Oxford.
- HSAM, S. L. K., HUANG, X. Q., ERNST, F., HARTL, L., ZELLER, F. J. (1998): Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). 5. Alleles at the Pm1 locus. *Theoretical and applied genetics* 96: 1129 - 1134.
- HSAM, S. L. K., LAPOCHKINA, I. F., ZELLER, F. J. (2003): Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). 8. Gene Pm32 in a wheat-*Aegilops speltoides* translocation line. *Euphytica* 133: 367 – 370.
- HSAM, S. L. K., ZELLER, F. J. (1997): Evidence of allelism between genes Pm8 and Pm17 and chromosomal location of powdery mildew and leaf rust resistance genes in the common wheat cultivar 'Amigo'. *Plant Breeding* 116: 119 – 122.
- HSAM, S.L.K., LAPOCHKINA, I.F., ZELLER, F.J. (2003): Chromosomal location of genes

for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) 8. Gene *Pm32* in a wheat *Aegilops speltoides* translocation line *Euphytica*. 133: 367 – 370.

HUA, W. LIU, Z. ZHU, J. XIE, C. YANG, T. ZHOU, Y. DUAN, X. SUN, Q., LIU, Z. (2009): Identification and genetic mapping of *Pm42*, a new recessive wheat powdery mildew resistance gene derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*). *Theor. Appl. Genet.*, 119: 223 – 230.

JÄRVE, K., PEUSHA, H. O., TSYMBALOVA, J., TAMM, S., DEVOS, K. M., ENNO, T. M. (2000): Chromosomal location of a *Triticum timopheevii*-derived powdery mildew resistance gene transferred to common wheat. *Genome*, 43: 377 – 381.

JARVIS, W.R., GUBLER, W.G., AND GROVE, G.G. (2002): Epidemiology of powdery mildews in agricultural pathosystems. St. 169-199 Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., and Carver, T.L.W. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. APS Press. St. Paul.

JIA, J., DEVOS, K. M., CHAO, S., MILLER, T. E., READER, S. M., GALE, M. D. (1996): RFLP-based maps of the homoeologous group-6 chromosomes of wheat and their application in the tagging of *Pm12*, a powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops speltoides* to wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 559 – 565.

JING, H., BAYON, C., KANYUKA, K., BERRY, S., WENZL, P., HUTTER, E., KILIAN, A., HAMMOND-KOSACK, K. (2009): DArT markers: diversity analyses, genomes comparison, mapping and integration with SSR markers in *Triticum monococcum*. *BMC genomics* 10: 458 – 474.

KLOCOVÁ, B. (2010): Mapování genů kvantitativních znaků u diploidní pšenice *T. monococcum* L. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého , Olomouc.

KOLE, CH., ABBOTT, A.G. (2008): *Principles and Practises of Plant Genomics Vol. 1: Genome mapping*. Science Publishers, New Hampshire, USA.

KONISHI, S., SASAKUMA, T., SASANUMA, T. (2010): Identification of novel *Mlo* family members in wheat and their genetic characterization. *Genes Genet. Syst.* 85: 167 –

175.

- KOSAMBI, D. D. (1943): The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics* 12: 172 – 175.
- LAW, C. N., WOLFE M. S. (1966): Location for genetic factors for mildew resistance and ear emergence time on chromosome 7B of wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 8: 462 – 470.
- LEATH, S., BOWEN, K.L. (1989): Effects of powdery mildew, triadimenol seed treatment, and triadimefon foliar sprays on yield of winter wheat in North Carolina. *Phytopathology* 79: 152 – 155.
- LEATH, S., HEUN, M. (1990): Identification of powdery mildew resistance genes in cultivars of soft red winter wheat. *Plant Dis*, 74: 747 – 752.
- LI, G. FANG, T. ZHANG, H. (2009): Molecular identification of a new powdery mildew resistance gene *Pm41* on chromosome 3BL derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*). *Theor. Appl. Genet*, 119: 531 – 539.
- LIU, Z., SUN, Q., NI, Z., NEVO, E., YANG, T. (2002): Molecular characterization of a novel powdery mildew resistance gene *Pm30* in wheat originating from wild emmer. *Euphytica* 123: 21 – 29.
- LUO, P.G., LUO, H.Y. CHANG, Z.J. ZHANG, H.Y. ZHANG, M., REN, Z.L. (2009): Characterization and chromosomal location of *Pm40* in common wheat: a new gene for resistance to powdery mildew derived from *Elytrigia intermedium*. *Theor Appl. Genet*, 18: 1059 – 1064.
- LUTZ, J., HSAM, S. L. K., LIMPERT, E., ZELLER, F. J. (1995): Chromosomal location of powdery mildew resistance genes in *Triticum aestivum* L.(common wheat). 2. Genes *Pm2* and *Pm19* from *Aegilops squarrosa* L. *Heredity*74: 152 – 156.
- MA, H. KONG, Z. FU, B. LI, N. ZHANG, L. JIA, H., MA, Z. (2011): Identification and mapping of a new powdery mildew resistance gene on chromosome 6D of common wheat. *Theor. Appl. Genet*.

- MAINS, E. B. (1933): Host specialization of *Erysiphe graminis tritici*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 19: 49 – 53.
- MARCHAL, E. (1902): De la specialisation du paritisme chez *l'Erysiphe graminis*. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 135: 210 – 212.
- MATSUOKA, Y. (2011): Evolution of Polyploid *Triticum* Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. Plant and Cell physiology 52: 750 – 764.
- MCCOUCH, S.R., KOCHERT, G., YU, Z.H., WANG, Z.Y., KHUSH, G.S., COFFMAN, W.R., TANKSLEY, S.D. (1988): Molecular mapping of rice chromosomes. Theoretical and Applied Genetics 76: 815 – 829.
- MCINTOSH, R. A., BAKER, E. P. (1970): Cytogenetical studies in wheat iv. Chromosome location and linkage studies involving the PM2 locus for powdery mildew resistance. Euphytica 19: 71 – 77.
- MCINTOSH, R.A., YAMAZAKI, Y. DUBCOVSKY, J. (2008): Catalogue of Gene Symbols for Wheat.
- MEKSEM, K., KAHL, G. (2005): The handbook of plant genome mapping. Strauss Offsetdruck, Gesellschaft mit beschränkter Haftung, Mörlenbach.
- MIRANDA, L. M., MURPHY, J. P., MARSHALL, D., COWGER, C., LEATH, S. (2007): Chromosomal location of Pm35, a novel *Aegilops tauschii* derived powdery mildew resistance gene introgressed into common wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics 114: 1451 – 1456.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology 51: 263-273.
- OKU, T., YAMASHITA, S., DOI, Y., NISHIHARA, N. (1985): Host range and forma specialis of cocksfoot powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* DC) found in Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 51: 613 – 615.

- ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T., HAYASHI, K. (1989): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 4: 874 – 879.
- PAILLARD, S., GOLDRINGER, I., ENJALBERT, J., DOUSSINAULT, G., DE VALLAVIELLE-POPE, C., BRABANT, P. (2000): Evolution of resistance against powdery mildew in winter wheat populations conducted under dynamic management. Is specific seedling resistance selected? *Theoretical and Applied Genetics* 101: 449 – 456.
- PALAZZOLO, M.J., SAWYER, S.A., MARTIN, C.H., SMOLLER, D.A., HARTL, D.L. (1991): Optimized strategies for sequence-tagged-site selection in genome mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 8034–8.
- PERCIVAL, J. (1921): *The wheat plant; a monograph*. London: Duckworth and co.
- PERUGINI, L. D., MURPHY, J. P., MARSHALL, D., BROWN-GUEDIRA, G. (2008): Pm37, a new broadly effective powdery mildew resistance gene from *Triticum timopheevii*. *Theoretical and Applied Genetics*: 116: 417 – 425.
- PEUSHA, H., ENNO, T., PRIILINN, O. (2000): Chromosomal location of powdery mildew resistance genes and cytogenetic analysis of meiosis in common wheat cultivar Meri. *Hereditas* 132: 29 – 34.
- RAFALSKI, A. (2002): Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 94-100.
- READER, S. M., MILLER, T. E. (1991): The introduction into bread wheat of a major gene for resistance to powdery mildew from wild emmer wheat. *Euphytica* 53: 57 – 60.
- RICHARD, I., BECKMAN, J.S. (1995): How neutral are synonymous codon mutations? *Nature Genetics* 10: 259.
- RONG, J. K., MILLET, E., MANISTERSKI, J., FELDMAN, M. (2000): A new powdery mildew resistance gene: introgression from wild emmer into common wheat and RFLP-based mapping. *Euphytica* 115: 121 – 126.



- SACHIDANANDAM, R., WEISSMAN, D., SCHMIDT, S.C., KAKOL, J.M., STEIN, L.D., MARTH, G., SHERRY, S., MULLIKIN, J.C., MORTIMORE, B.J., WILLEY, D.L. (2001): A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928–933.
- SAGHAI MAROOF, M.A., BIYASHEV, R.M., YANG, G.P., ZHANG, Q., ALLARD, R.W. (1994): Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 5466 – 70.
- SCHLOTTERER, C., TAUTZ, D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20: 2011–15.
- SHANER, G. (1973): Evaluation of slow-mildewing resistance of Knox wheat in the field. *Phytopathology*, 63: 867 – 872.
- SHENG, B., DUAN, X., XIANG, Q. AND ZHOU, Y. (1995): The study on the host range of wheat powdery mildew in the northern 11 provinces (regions and cities). *Scientia Agric. Sinica*, 28, 52 – 57.
- SHI, A.N., LEATH, S., MURPHY, J.P. (1998): A Major Gene for Powdery Mildew Resistance Transferred to Common Wheat from Wild Einkorn Wheat. *Phytopathology* 88: 144 – 147.
- SINGH, K., GHAI, M., GARG, M., CHHUNEJA, P., KAUR, P., SCHNURBUSCH, T., KELLER, B., DHALIWAL, H. S. (2007): An integrated molecular linkage map of diploid wheat based on a *Triticum boeoticum* × *T. monococcum* RIL population. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 301 – 312.
- SINGRÜN, C. H., HSAM, S. L. K., HARTL, L., ZELLER, F. J., MOHLER, V. (2003): Powdery mildew resistance gene Pm22 in cultivar Virest is a member of the complex Pm1 locus in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1420 – 1424.
- SOMERS D.J., KIRKPATRICK R., MONIWA M., WALSH A. (2003): Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome* 49: 431–437.

- SPIELMEYER, W., MCINTOSH, R. A., KOLMER, J., LAGUDAH, E. S. (2005): Powdery mildew resistance and Lr34/Yr18 genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*: 111: 731 – 735.
- SRNIC, G., MURPHY, J.P., LYERLY, J.H., LEATH, S., MARSHALL, D.S. (2005): Inheritance and chromosomal assignment of powdery mildew resistance genes in two winter wheat germplasm lines. *Crop Science* 45:1578–1586.
- STARLING, T.M. ROANE, C.W., CAMPER, H.M. (1984): Registration of Massey wheat. *Crop Science* 24: 1000.
- SUNYAEV, S., HANKE, J., AYDIN, A., WIRKNER, U., ZASTROW, I., REICH, J., BORK, P. (1999): Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human disease-associated genes. *Journal of Molecular Medicine* 77: 754 – 760.
- T.L.W. (2002b): Influences of substrata and interface geometry on the release of extracellular material by *Blumeria graminis* conidia. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 163 –178.
- TAUTZ, D., RENZ, M. (1984): Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127 – 4138.
- THE, I., MCINTOSH, R. A., BENNETT, F. G. (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: 115 – 126.
- TOSA, Y., SAKAI, K. (1990): The genetics of resistance of hexaploid wheat to the wheatgrass powdery mildew fungus. *Genome* 33: 225 – 230.
- TOSA, Y., TOKUNAGA, H., OGURA, H. (1988): Identification of a gene for resistance to wheatgrass powdery mildew fungus in the common wheat cultivar Chinese Spring. *Genome* 30: 612 – 614.
- TOSA, Y., TSUJIMOTO, H., OGURA, H. (1987): A gene involved in the resistance of wheat to wheatgrass powdery mildew fungus. *Genome* 29: 850 – 852.

- TULASNE, L.R., TULASNE, C.C. (1861): *Selecta Fungorum carpologia I*. Paris: Imperial. Typograph.
- VAN OOIJEN, J. W. (2006) JoinMap ® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands.
- VANŽUROVÁ, H. (2013): Charakterizace diploidní pšenice *Triticum monococcum* jako zdroje nových genů pro šlechtění pšenice. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- WANG, D., SHI, J., CARLSON, S. R., CREGAN, P. B., WARD, R. W., DIERS, B. W. (2003): A Low-Cost, High-Throughput Polyacrylamide Gel Electrophoresis System for Genotyping with Microsatellite DNA Markers. *Crop Science* 43: 1828 – 1832.
- WATSON, J.D., CRICK, F.H.C. (1953): Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature*. 737 – 738.
- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K., KAHL, G. (2005): DNA fingerprinting in plants - Principles, methods, and applications. CRC Press, USA.
- WILLIAMS, M.N.V., PANDE, N., NAIR, S., MOHAN, M., BENNETT, J. (1991): Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 489–498.
- WOLF, M.S. (1984): Trying to understand and control powdery mildew. *Plant Pathology* 33: 451 – 466.
- XIE, C., SUN, Q., NI, Z., YANG, T., NEVO, E., FAHIMA, T. (2003): Chromosomal location of a *Triticum dicoccoides*-derived powdery mildew resistance gene in common wheat by using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 341 – 345.
- XU, H., YAO, G., XIONG, L., YANG, L., JIANG, Y., FU, B., ZHAO, W., ZHANG, Z., ZHANG, C., MA, Z. (2008): Identification and mapping of pm2026: a recessive powdery mildew resistance gene in an einkorn (*Triticum monococcum* L.) accession. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 471 – 477.

- YOUNG, N.D., TANKSLEY, S.D. (1989): RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during backcross breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 353 – 359.
- ZELLER, F. J., KONG, L., HARTL, L., MOHLER, V., HSAM, S. L. K. (2002): Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) 7. Gene Pm29 in line Pova. *Euphytica* 123: 187 – 194.
- ZHANG Z, HENDERSON C, PERFECT E, CARVER TL, THOMAS BJ, SKAMNIOTI, P., GURR, S.J. (2005): Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. *Molecular Plant Pathology* 6: 561–75.
- 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: 585 – 590.
- ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D. (1994): Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.