

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Alžbeta Holbová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Charakterizácia lokusu ovplyvňujúceho tvar
zrna u pšenice**

Bakalárska práca

Alžbeta Holbová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Alžbeta HOLBOVÁ
Osobní číslo: R19829
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Charakterizácia lokusu ovplyvňujúceho tvar zrna u pšenice
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Navrhnutie molekulárných markerov pre mendelizáciu lokusu pre veľkosť zrna na chromozóme 7Am.
2. Selekcía línií vhodných pre odvodenie rekombinantných línií.
3. Navrhnutie molekulárných markerov pre saturáciu oblasti.
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:

- Yu, K., Liu, D., Chen, Y., Wang, D., Yang, W., Yang, W., Yin, L., Zhang, C., Zhao, S., Sun, J., Liu, C., & Zhang, A. (2019). Unraveling the genetic architecture of grain size in einkorn wheat through linkage and homology mapping and transcriptomic profiling. *Journal of Experimental Botany*, 70(18), 4671–4688.
- Kumar, A., Mantovani, E. E., Seetan, R., Soltani, A., Echeverry-Solarte, M., Jain, S., Simsek, S., Doehlert, D., Alamri, M. S., Elias, E. M., Kianian, S. F., & Mergoum, M. (2016). Dissection of genetic factors underlying wheat kernel shape and size in an elite × nonadapted cross using a high density SNP linkage map. *The Plant Genome*, 9(1), plantgenome2015.09.0081.
- Tian, J., Deng, Z., Zhang, K., Yu, H., & Jiang, X. (2015). Genetic analyses of wheat and molecular marker-assisted breeding. (Vol. 1). Springer.

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Adam Lampar
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 18. dubna 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

L.S.



doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko	Alžbeta Holbová
Názov práce	Charakterizácia lokusu ovplyvňujúceho tvar zrna u pšenice
Typ práce	bakalárska
Pracovisko	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedúci práce	Mgr. Adam Lampar
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Genóm diploidnej pšenice jednozrnky (*T. monococcum*) je vysoko kolineárny s A^u genómom hexaploidnej pšenice siatej. Malý genóm pšenice jednozrnky a v prírode zachovaná genetická variabilita z nej robia dobrý model pre detekciu lokusov významných agronomických znakov, ktoré majú vplyv na výnos. Výnos je komplexný znak ovplyvnený jeho mnohými komponentami a vonkajším prostredím. Tvar zrna silne koreluje s jeho veľkosťou a ovplyvňuje výnos. Experimentálna časť tejto práce sa zamerala na mendelizáciu lokusu pre tvar zrna na chromozóme 7A^m. K tomuto boli navrhnuté markery ohraničujúce jednotlivé detegované lokusy na ostatných chromozómoch a následne bolo vybraných 21 línií vhodných pre mapovanie lokusu pre tvar zrna s vysokým rozlíšením. Oblasť lokusu na chromozóme 7A^m bola zároveň zahustená 15 kodominantnými markermi.

Kľúčové slová	pšenica, <i>Triticum monococcum</i> , tvar zrna, veľkosť zrna, QTL
Počet strán	viii + 36
Počet príloh	2
Jazyk	slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Alžbeta Holbová
Title	Characterization of a locus for grain shape of wheat
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Adam Lampar
The year of presentation	2022

Abstract

The genome of diploid einkorn wheat (*T. monococcum*) is highly collinear with the A^u genome of hexaploid common wheat. Einkorn's small genome and conserved genetic variability in nature make it a good model for detecting loci of significant agronomic traits that affect yield. Yield is a complex trait influenced by its many components and the external environment. Grain shape strongly correlates with grain size and affects the yield. The experimental part of this work focused on mendelization of the grain shape locus on chromosome 7A^m. For this, markers were designed to delimit the individual detected loci on other chromosomes, and then 21 lines suitable for high-resolution mapping of the grain shape locus were selected. The locus region on chromosome 7A^m was also saturated with 15 codominant markers.

Keywords	wheat, <i>Triticum monococcum</i> , grain shape, grain size, QTL
Number of pages	viii + 36
Number of appendices	2
Language	Slovak

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

V Olomouci dňa 6. 5. 2022

.....

Alžbeta Holbová

V prvom rade by som sa chcela poďakovať môjmu vedúcemu bakalárskej práce Mgr. Adamovi Lamparovi za jeho odborné vedenie, poznatky a čas, ktorý venoval môjmu vedeniu v laboratóriu počas experimentálnej časti. Ďalej by som chcela poďakovať Ing. Márii Seifertovej za pomoc pri sekvenovaní a všetkým ďalším laborantkám, ktoré mi pomohli pri laboratórnej práci. V neposlednom rade by som sa chcela poďakovať prof. Ing. Jaroslavovi Doleželovi, DrSc. za možnosť vypracovať bakalársku prácu na Ústave experimentálnej botaniky AV ČR v.v.i. v Olomouci.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 CIELE PRÁCE	2
3 LITERÁRNY PREHLAD.....	3
3.1. Význam kmeňa <i>Triticeae</i>	3
3.1.1. Charakterizácia rodu <i>Triticum</i>	3
3.1.2 <i>Triticum aestivum</i>	5
3.1.3 <i>Triticum monococcum</i>	6
3.2 Výnos ako agronomický znak	7
3.2.1 Komponenty výnosu	8
3.2.2 Vplyv domestikácie na vlastnosti zrna.....	9
3.3 Lokusy kvantitatívnych znakov	10
3.3.1 Mapovanie QTL.....	11
4 MATERIÁL A METÓDY	14
4.1 Biologický materiál:.....	14
4.2 Použité chemikálie, súpravy a roztoky.....	15
4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení	17
4.4. Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy.....	18
4.4.1 Návrh molekulárnych markerov.....	18
4.4.2 Izolácia genómovej DNA.....	18
4.4.3 Polymerázová reťazová reakcia	19
4.4.4 Restrikčné štiepenie	19
4.4.5 Horizontálna agarózová elektroforéza	20
4.4.6 Vertikálna polyakrylamidová elektroforéza.....	20
4.4.7 Sekvenovanie produktov PCR pomocou Sangerovej metódy.....	20
4.4.8 Genotypovanie	21
5 VÝSLEDKY	22
5.1 Navrhnutie molekulárnych markerov k mendelizácii lokusu pre veľkosť zrna na chromozóme 7A ^m	22
5.2 Mendelizácia lokusu na chromozóme 7A ^m	23
5.3 Saturácia lokusu na chromozóme 7A ^m markermi	25
6 DISKUSIA	26
7 ZÁVER	29
8 LITERATÚRA.....	30
9 PRÍLOHY	36

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

bp	bázový pár, <i>base pair</i>
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequence</i>
cM	centiMorgan
DArT	Diversity Arrays Technology
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FAO	Organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo, <i>Food and Agriculture Organization</i>
GBS	genotypovanie prostredníctvom sekvenovania, <i>genotyping by sequencing</i>
Gbp	miliarda bázových párov, <i>giga base pair</i>
F primer	<i>forward primer</i>
R primer	<i>reverse primer</i>
HRM	<i>high resolution melt</i>
IRAP	<i>inter retrotransposon amplified polymorphism</i>
ISBP	<i>insertion site-based polymorphism</i>
LOD	logaritmus pravdepodobnosti, <i>logarithm of the odds</i>
MIM	mnohonásobné intervalové mapovanie, <i>multiple interval mapping</i>
PCR	polymerázová reťazová reakcia, <i>polymerase chain reaction</i>
PEV	<i>percentage of explained variance</i>
QTL	lokus kvantitatívneho znaku, <i>quantitative trait locus</i>
RAD-Seq	<i>restriction-site associated DNA sequencing</i>
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus, <i>single nucleotide polymorphism</i>
P/A	polymorfizmus presence/absence
ssp.	poddruh, <i>subspecies</i>
SSR	<i>simple sequence repeat</i>
STS	<i>sequence-tagged sites</i>

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Oblasť domestikácie pšenice.....	3
Obrázok 2: Predikcia globálneho výnosu dôležitých obilnín v roku 2050	8
Obrázok 3: Domestikačný syndróm zväčšovania zrna u pšenice	10

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Klasifikácia rodu <i>Triticum</i>	4
Tabuľka 2: Podmienky touchdown PCR	19
Tabuľka 3: Podmienky sekvenačnej reakcie.....	21
Tabuľka 4: Genetická konštitúcia oblastí QTL na chromozómoch 1A ^m , 2A ^m , 3A ^m , 5A ^m a 7A ^m vybraných línií z F ₂ populácie DV92×113 pre mendelizácií QTL na chromozóme 7A ^m	24
Tabuľka 5: Genetická konštitúcia oblastí QTL na chromozómoch 1A ^m , 2A ^m , 3A ^m , 5A ^m a 7A ^m po mendelizácií vybraných línií z F ₂ populácie DV92×113 pre QTL na chromozóme 7A ^m	25

1 ÚVOD

Nakoľko je pšenica dôležitou hospodárskou obilninou, zvýšenie jej produkcie je kľúčové pre zaistenie dostatku potravy a spoločenskej stability vo svete. Aby výnos pšenice pokryl požiadavky, mal by sa do roku 2050 zdvojnásobiť.

Jednozrnka (*Triticum monococcum* L.) je diploidný druh pšenice z kmeňa *Triticeae* z čeľade lipnicovité (*Poaceae*). Hospodársky nepatrí medzi významné druhy obilnín, avšak jej malý genóm, kolinearita s A^u genómom pšenice siatej (*T. aestivum* L.) a existencia jej planého predka z nej robia dobrý modelový organizmus. Tvar zrna, ktorý je úzko prepojený s jeho veľkosťou, významne ovplyvňuje výnos pšenice. Detekcia a charakterizácia lokusu pre tvar zrna teda hrá významnú úlohu v navýšení produkcie pšenice prostredníctvom šľachtenia nových kultivarov.

2 CIELE PRÁCE

Cieľom teoretickej časti predloženej bakalárskej práce bolo vypracovanie literárnej rešerše na tému dôležitosti pšenice ako celosvetovej obilniny, charakterizácie pšenice jednozrnky (*T. monococcum* L.) a pšenice siatej (*T. aestivum* L.), popisu výnosu a mapovania kvantitatívnych znakov.

Praktická časť bakalárskej práce sa zameriava na selekciu vhodných línií *Triticum monoccocum* pomocou molekulárnych markerov s cieľom mendelizovať lokus pre veľkosť zrna na chromozóme 7A^m. Ďalším cieľom bolo navrhnutie molekulárnych markerov k saturácii oblasti QTL na chromozóme 7A^m.

3 LITERÁRNY PREHLAD

3.1. Význam kmeňa *Triticeae*

Kmeň *Triticeae* z podčeľade lipnicovité (*Poaceae*) v sebe zahŕňa pre ľudstvo významné obilniny, ktoré celosvetovo zastupujú viac ako 50 % príjmu potravy. Radia sa do neho mnohé hospodársky významné rody, ako napríklad pšenica (*Triticum* L.), kukurica (*Zea* L.) a ryža (*Oryza* L.) (Yen a Yang, 2020). Podľa údajov Organizácie pre výživu a poľnohospodárstvo (FAO) dosiahla v roku 2021 produkcia obilnín 2,8 miliardy ton, z čoho 780 miliónov ton pripadá na pšenicu (www.fao.org/faostat).

3.1.1. Charakterizácia rodu *Triticum*

Pšenica patrí medzi hospodársky najvýznamnejšie obilniny sveta, čo dokladá aj jej celosvetovo vysoká produkcia (www.fao.org/faostat). Pšenica tvorí dôležitú časť celkovej produkcie obilnín v podstate od neolitickej revolúcie, kedy boli približne pred 10 000 rokmi domestikované divoké odrody pšenice v oblasti úrodného polmesiaca (pozri Obr. 1) (Heun, 1997; Haldorsen et al., 2011). Dôsledkom domestikácie bolo pre ľudí ľahšie zaistenie potravy pomocou poľnohospodárstva ako lovom divokej zvery. Tento fakt zásadne zmenil životný štýl ľudí, ktorí začali žiť usadlejším spôsobom života.



Obrázok 1: Oblasť domestikácie pšenice

Vyznačená tmavozelená oblasť zvyrazňuje región úrodného polmesiaca (prevažne dnešný Izrael, Jordánsko, Turecko, Sýria, Irán a Irak), kde sa nachádzajú najstaršie archeologické nálezy jačmeňa a pšenice jednozrnky a dvojzrnky. Lokálna prírodná rozmanitosť u divokých príbuzných pšenice a analýza sekvencií DNA podporujú rôzne lokality úrodného polmesiaca (predovšetkým jeho severné okraje) ako lokality domestikácie rodu *Triticeae*. Upravený podľa Feuillet et al. (2008).

Prudký nárast ľudskej populácie, urbanizácia a spoločenský vývoj výrazne ovplyvnili využitie pšenice, ktorá sa tak stala neodlúčiteľnou súčasťou ľudstva (Allaby, 2010; Fuller et al., 2010). Pšeničné zrná sú bohaté nielen na škrob (zastúpenie sacharidov 60 - 80 %) ale aj na proteíny (8 - 14 %). Takisto je možné ich dobre uskladniť a tým si vytvoriť zásoby na dlhšie obdobie (Feuillet et al., 2008). Tieto aspekty taktiež výrazne podporili rozvoj poľnohospodárstva.

Poľnohospodársky najvýznamnejšie sú dva druhy pšenice, *T. aestivum* L. a *T. durum* L., ktorých spoločná produkcia predstavuje 95 % svetovej produkcie pšenice. Zvyšných 5 % produkcie tvoria rôzne druhy diploidných, tetraploidných a hexaploidných pšeníc (Monneveux, 2012). Moderná systematika kmeňu *Triticeae* sa zakladá na molekulárnych poznatkoch, pričom druhy pšeníc sa tradične radia do skupín podľa ich ploidiu (pozri Tab. 1).

Tabuľka 1: Klasifikácia rodu *Triticum* (upravená podľa Zohary et al., 2012)

Ploidia	Vybraní zástupcovia	Genóm
Diploidné	<i>T. monococcum</i> L. ssp. <i>boeoticum</i>	A ^b A ^b
	<i>T. monococcum</i> L. ssp. <i>monococcum</i>	A ^m A ^m
	<i>T. urartu</i> Tuman ex Gand.	A ^u A ^u
Tetraploidné	<i>T. turgidum</i> L. ssp. <i>dicoccoides</i>	BBA ^u A ^u
	<i>T. turgidum</i> L. ssp. <i>dicoccum</i>	BBA ^u A ^u
	<i>T. turgidum</i> L. ssp. <i>durum</i>	BBA ^u A ^u
	<i>T. turgidum</i> L. ssp. <i>turgidum</i>	BBA ^u A ^u
	<i>T. timopheevii</i> Zhuk. ssp. <i>armeniicum</i>	GGA ^u A ^u
	<i>T. timopheevii</i> Zhuk. ssp. <i>timopheevii</i>	GGA ^u A ^u
Hexaploidné	<i>T. aestivum</i> L. ssp. <i>spelta</i>	BBA ^u A ^u DD
	<i>T. aestivum</i> L. ssp. <i>macha</i>	BBA ^u A ^u DD
	<i>T. aestivum</i> L. ssp. <i>aestivum</i>	BBA ^u A ^u DD
	<i>T. zhukovskyi</i> Men. & Er.	GGA ^u A ^u A ^m A ^m

Pšenica je natoľko ekonomicky významnou plodinou, že v posledných dekádach podmienila jej prudko sa rozvíjajúci cytogenetický a genetický výskum, ktorý viedol k nahromadeniu dôležitých informácií a vývoju nových metód a techník. Tie umožnili vyšľachtenie nových kultivarov pšenice s vyšším výnosom a lepšími vlastnosťami (Carver, 2009).

Vplyvom domestikácie a polyploidizácie došlo k zmenám, ktoré ovplyvnili schopnosť adaptovať sa na podmienky prostredia v prospech hybridných druhov, čím sa zvýšila životaschopnosť a výnosový potenciál. Príkladom takéhoto hybridného druhu je poľnohospodársky najdôležitejšia pšenica siata (Dubcovsky a Dvořák, 2007).

3.1.2 *Triticum aestivum*

Celosvetovo najpestovanejšou pšenicou a teda aj hospodársky najvýznamnejšou je pšenica siata (*T. aestivum*). Rozoznávame mnoho kultivarov *T. aestivum* na základe vlastností zrna či prispôsobenia sa rôznym klimatickým podmienkam. *T. aestivum* sa pestuje v širokom geografickom rozhraní medzi 67° rovnobežkou na severe a 45° rovnobežkou na juhu (Kilian et al., 2009).

Pšenica siata je hexaploidný druh (BBA^uA^uDD, 2n = 6x = 42), pričom jej genóm je v porovnaní s genómami iných obilnín mnohonásobne väčší (1C = 15.5 Gbp) (IWGSC, 2018). Napríklad genóm ryže, najmenší spomedzi obilnín, má veľkosť 389 Mbp (Sasaki, 2005) a genóm kukurice má približnú veľkosť 2,4 Gbp (veľkosť genómu výrazne ovplyvňujú B-chromozómy a repetitívne sekvencie) (Haberer et al., 2005). Viac ako 80 % genómu pšenice je tvorených repetitívnymi sekvenciami (IWGSC, 2018), podobne to je aj u kukurice, kde genóm tvorí približne 85 % repetitívnych sekvencií (Schnable et al., 2009), kdežto u ryže je to len približne 40 % (Gill et al., 2010).

T. aestivum vznikla na základe viacerých medzidruhových hybridizácií. Prvá hybridizácia prebehla približne pred 0,5 miliónmi rokov medzi dvoma pôvodnými diploidnými druhmi, nositeľmi genómov A^u (*T. urartu*) a B (*Aegilops speltoides*) (Dvořák a Zhang, 1990; Dvořák et al., 1993; Dvořák a Akhunov, 2005). Výsledkom tejto hybridizácie bol vznik divokého tetraploidného (BBA^uA^u) druhu pšenice *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Táto pšenica bola pred viac ako 9 000 rokmi domestikovaná a následná kultivácia viedla k vzniku dvoch odlišných tetraploidných pšeníc, *T. turgidum* ssp. *dicoccum* a *T. turgidum* ssp. *durum* (Pont et al., 2019).

Druhá hybridizácia následne viedla k sformovaniu allohexaploidnej pšenice *T. aestivum*. K tejto hybridizácii došlo pred asi 8 000 rokmi medzi divoko rastúcim diploidným druhom *Aegilops tauschii* (donor genómu D) a domestikovaným tetraploidným druhom *T. turgidum* ssp. *durum* (donor genómov A^u a B) (Dvořák et al., 2012).

Domestikácia a intenzívne šľachtenie pšenice viedli k značnému zníženiu genetickej variability dnešných elitných kultivarov, a z tohto dôvodu šľachtitelia obracajú svoju pozornosť na príbuzné druhy (Feuillet et al., 2008). Medzi takéto druhy patrí napríklad žito, *Aegilops* alebo pšenica jednozrnka.

3.1.3 *Triticum monococcum*

Diploidná pšenica *T. monococcum* ($A^m A^m$, $2n = 2x = 14$) je taktiež nazývaná aj ako pšenica jednozrnka, čo je odvodené z jej typického znaku, ktorým je zväčša prítomnosť iba jedného zrna v klásku (Zohary et al., 2012).

Domestikované druhy pšenice sa od divokých odlišujú dôležitými znakmi, ktoré majú vplyv na výnos. Základný rozdiel medzi domestikovanou jednozrnkou a jej pôvodnou divokou formou *T. boeoticum* je v rozpadavosti klasu. Zatiaľ čo sa zrelé klasy divokej jednozrnky postupne rozpadajú od vrcholu smerom nadol, u domestikovanej jednozrnky sa klas nerozpadá a zostáva celý až do zberu (Zohary et al., 2012). Vďaka čomu sa následne zvýšil výnos, nakoľko časť kláskov neopadne na poli, ale takmer všetky sú využité pri mlatbe. Rozdiel môžeme pozorovať aj vo veľkosti a tvare zrna, divoká jednozrnka má v porovnaní s domestikovanou menšie a predĺženejšie zrná (Yu et al., 2019). Okrem tohto, zreteľnejšie morfológické rozdiely medzi divokou a domestikovanou jednozrnkou nie sú prítomné. Potomkovia, ktorí vznikli krížením, sú plne fertily a ich chromozómy sa v priebehu meiózy párujú normálne (Zohary et al., 2012).

V minulosti bola jednozrnka hojne využívaná ako jedna z prvých domestikovaných plodín, avšak v priebehu doby bronzovej jej pestovanie postupne začalo upadať (Heun, 1997).

Jednozrnka bola postupne vytláčaná z agrikultúry tzv. *free-threshing* tetraploidnými a hexaploidnými pšenícami. Tie majú nie len väčší výnos, ale taktiež semená jednoducho vylátiteľné z kláskov, a preto je ich pestovanie výhodnejšie. *T. monococcum* sa od neskoršej doby bronzovej pestuje hlavne v oblastiach s menej úrodnou pôdou, kde dokáže na rozdiel od iných druhov pšeníc rásť a plodiť (Zohary et al., 2012). Múka z jednozrnky je nutrične bohatá, avšak nie je vhodná na pečenie chleba kvôli zlým viskoelastickým vlastnostiam cesta. Preto ju naši predkovia konzumovali v podobe kaší alebo varili celé zrná. Od rímskych čias sa jednozrnka využíva hlavne ako kýmna surovina

pre dobytok (Schiemann, 1948; Harlan, 1981). V dnešnej dobe sa radí medzi reliktné poľnohospodárske plodiny a vo svete sa pestuje iba sporadicky, prevažne v horských oblastiach (Zaharieva a Monneveux, 2014).

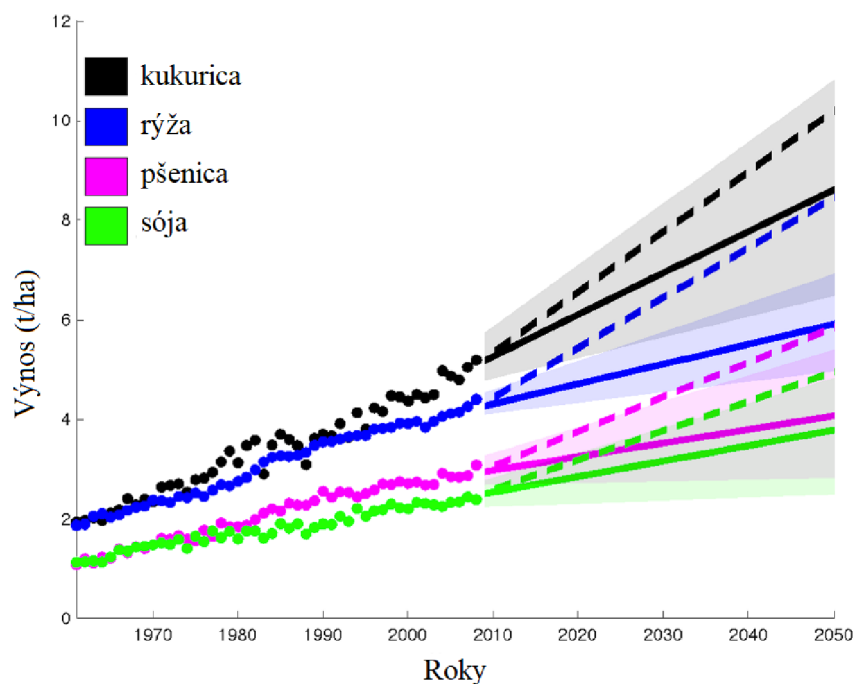
Existencia divokej a domestikovanej jednozrnky je dôvodom, pre ktorý má jednozrnka väčšiu genetickú variabilitu v porovnaní s pšenicom siatou (Kilian et al., 2007). Má tak potenciál stať sa zdrojom pre zlepšenie vlastností ovplyvňujúcich výnos prostredníctvom šľachtenia. Jednozrnka je blízkym príbuzným donoru genómu A^u pšenice siatej, *T. urartu* (Dvořák et al., 1993), a vykazuje vysokú kolinearitu s inými druhmi rodu *Triticum* (Dubcovsky et al., 1996; Marino et al., 2018). Je tak vhodným modelom pre mapovanie agronomicky významných znakov (Yu et al., 2019), klonovanie génov (Yan et al., 2003) a funkčnú validáciu génov (Loukoianov et al., 2005).

3.2 Výnos ako agronomický znak

Väčšina agronomicky významných znakov ako čas kvitnutia, výška rastliny, počet fertílých odnoží, dĺžka klasu, počet kláskov a zrn na klas, hmotnosť zrna, tvar zrna či obsah proteínov v zrne patrí medzi kvantitatívne znaky (Börner, 2002). Tieto znaky pritom ovplyvňujú výnos, ktorý je tak kontrolovaný veľkým počtom génov s nízkou dedičnosťou, pričom významný vplyv na výnos má prostredie (Cuthbert et al., 2008).

V posledných dekádach sa šľachtiteľské programy intenzívne zameriavajú na zlepšenie výnosu a produkcie pšenice. K zvýšeniu výnosu avšak došlo predovšetkým vďaka zlepšeniu agronomických techník (Gupta, 2016). V roku 1961 bol priemerný svetový výnos 1,09 tony na hektár, kdežto v roku 2018 bol výnos približne 3,42 tony na hektár (www.fao.org/faostat). Šľachtiteľské programy sa sústreďujú na zvýšenie výnosu bez negatívneho ovplyvnenia obsahu proteínov v zrne či času zrenia (Mergoum et al., 2009). Bola preukázaná spojitosť medzi veľkosťou zrna a vlastnosťami ovplyvňujúcimi kvalitu múky, a to prostredníctvom proteínového zloženia a hydrolytickej aktivity enzýmov. Tieto aspekty ovplyvňujú kvalitu múky pri pečení a aj trvanlivosť pekárenských výrobkov (Millar et al., 1997; Evers, 2000).

Potreba zvýšenie výnosu je podmienená jednak rastúcou populáciou, ale aj využitím obilnín pre tvorbu biopalív, či zmenou stravovacích návykov. Aby boli uspokojené všetky nároky, produkcia dôležitých obilnín by sa mala do roku 2050 zdvojnásobiť (pozri Obr. 2) (Ray et al., 2013).



Obrázok 2: Predikcia globálneho výnosu dôležitých obilnín v roku 2050

Pomocou bodov je zaznačený globálny plošne vážený priemer dôležitých hospodárskych plodín v období rokov 1961–2008. Plné čiary znázorňujú predikciu rastu výnosu u štyroch hospodársky významných plodín, ak by sa zvyšovala rovnakým tempom, ako sa zvyšovala do roku 2008. Prerušovaná čiara znázorňuje trend zlepšenia výnosu o 2,4 % ročne, čo by zodpovedalo vyžadovanému dvojnásobnému navýšeniu do roku 2050. Tieňovanie znázorňuje oblasť 90 % spoľahlivosti. Upravené podľa Ray et al. (2013).

3.2.1 Komponenty výnosu

Výnos je zložený z troch základných komponentov, a to počet klasov na m^2 , počet zrn na klas a hmotnosť 1000 zrn (Sayre et al., 1997). Výnos, ako celok komponentov, je výrazne ovplyvnený prostredím, to avšak neplatí o jeho komponentoch (napr. hmotnosť zrna), kde je vplyv prostredia menší (Cuthbert et al., 2008). Z tohto dôvodu sa šľachtitelia zameriavajú na jednotlivé komponenty.

Komponenty výnosu sú pritom voči sebe v určitých hierarchiách, pochopenie ich vzájomného postavenia môže viesť k efektívnejšiemu zvyšovaniu výnosu. Jednotlivé hierarchie zoraďujú jednotlivé znaky ovplyvňujúce výnos do poradia v akom dokážu ovplyvniť celkový výnos. Hierarchicky sú vyššie tie znaky, ktoré výraznejšie ovplyvňujú výnos. Z toho vyplýva, že významnejší znak môže ovplyvniť celkový výnos vo väčšej miere, ako znak s hierarchicky menším významom. Napríklad ‚Hierarchia 1‘ poukazuje na väčší dôraz na počet zrn na m^2 ako veľkosť jednotlivého zrna (Slafer et al., 2014).

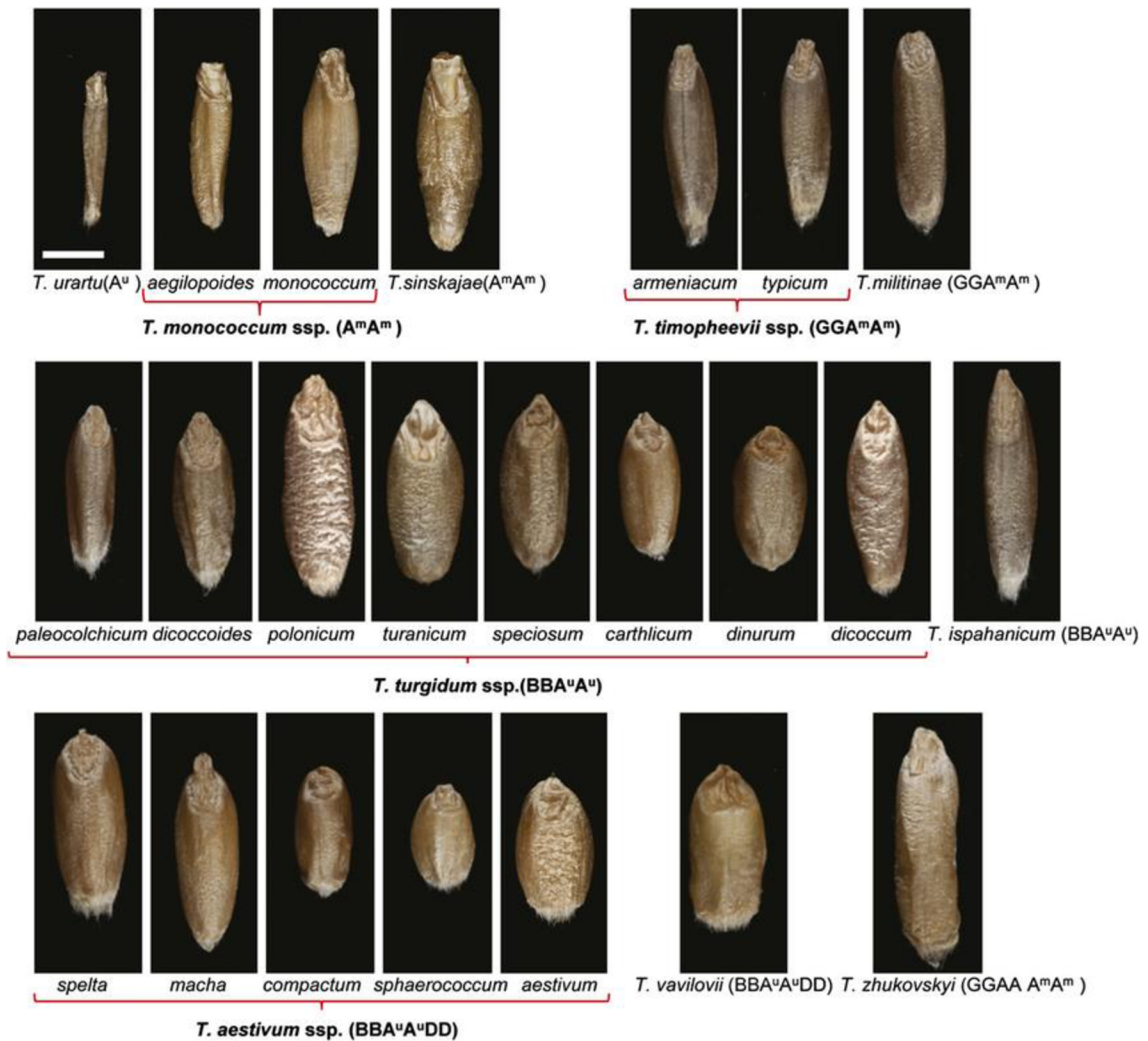
Počet klasov je u pšenice ovplyvnený počtom fertílých odnoží, ktorých zakladanie ovplyvňuje genotyp a vonkajšie prostredie. V prípade priaznivých podmienok sa priemerne vytvoria 2 až 3 fertílne odnože (Acquaah, 2012). Klas pozostáva približne z 20 až 25 kláskov, najväčšie zrno je zvyčajne odspodu druhé v poradí. Smerom zo spodnej časti klasu na vrchnú sa zrná zmenšujú. Celkovo sa môže na klase nachádzať 25 až 75 zrn podľa veľkosti klasu a fertility kláskov (Acquaah, 2012).

Jeden zo základných komponentov, hmotnosť 1000 zrn, je ovplyvnený veľkosťou zrna, ktorá závisí od dĺžky a šírky zrna a ich pomerov, a teda od celkového tvaru (Campbell et al., 1999; Dholakia et al., 2003). Hmotnosť zrna má spomedzi troch základných komponentov výnosu najväčšiu mieru dedičnosti (Alexander et al., 1984). Váha zrn je ovplyvnená ich množstvom, pričom s rastúcim počtom zrn v klasu je váha zrna redukovaná.

3.2.2 Vplyv domestikácie na vlastnosti zrna

Tvar zrna nepatrí medzi dôležité komponenty domestikačného syndrómu pšenice. Radí sa sem hlavne veľkosť a hmotnosť zrna. Tvar zrna teda nebol donedávna u pšenice zohľadňovaný ako u iných obilnín. Napríklad u ryže patril medzi dôležité komponenty domestikácie (Kovach et al., 2007). Tvar zrna významne ovplyvňuje mletie a kvalitu múky (Osborne a Anderssen, 2003). Teoretické modely naznačujú zvýšenie výnosu pri mletí múky na základe optimalizácie tvaru a veľkosti zrna. Optimálny tvar by mal byť veľký a sférický (Evers et al., 1990).

Veľkosť zrna koreluje s tvarom a váhou zrna (Cui et al., 2011), existuje však negatívna korelácia medzi veľkosťou a počtom zrn v klasu. Menšie semená sa v rastlinnej ríši vyskytujú vo väčšom počte ako veľké semená (Gupta et al., 2006). Avšak u poľnohospodársky významných druhov, kam patrí aj pšenica, môžeme pozorovať postupné zväčšovanie zrn (Feldman, 2001; Fuller, 2007). Nakoľko veľkosť zrna výrazne ovplyvňuje výnos, je zlepšenie tohto znaku dôležitým cieľom. Prvým krokom šľachtiteľský program pri zlepšení daného znaku je identifikácia lokusov, ktoré daný znak ovplyvňujú (Gegas et al., 2010).



Obrázok 3: Domestikačný syndróm zväčšovania zrna u pšenice

Reprezentatívne vzorky zrn 22 druhov a poddruhov rodu *Triticum* sú radené podľa polyploidie (od diploidných po hexaploidné druhy). Prevzaté od Gegas et al. (2010).

3.3 Lokusy kvantitatívnych znakov

Dnešné kultivary pšenice prevažne vykazujú nízku diverzitu pri génoch kontrolujúcich dôležité agronomické znaky (Feuillet et al., 2008). Mnoho agronomicky významných znakov je podmienených lokusmi kvantitatívnych znakov (*quantitative trait loci*, QTLs). Kvantitatívne znaky sú výrazne ovplyvnené taktiež prostredím, či už vonkajším (napr. teplota, slnečné žiarenie, vlhkosť) alebo vnútorným (genetické pozadie). Vykazujú častokrát kontinuálnu fenotypovú variabilitu, ktorú je možné vyjadriť pomocou Gaussovej krivky. Vplyv každého QTL na znak je rozdielny a udáva sa ako časť vysvetlenej fenotypovej variability (*percentage of explained variance*, PEV). Menej než 10 % celkovej variability vysvetľujú tzv. *minor* QTLs. *Major* QTLs vysvetľujú

viac než 10 % variability, čím sa stávajú ekonomicky zaujímavejšími. Detekcia QTLs je nevyhnutným krokom šľachtiteľských programov zameraných na výnos. QTLs môžeme na chromozómoch lokalizovať pomocou QTL mapovania (Rifkin, 2012).

3.3.1 Mapovanie QTL

QTL mapovanie je štatistická metóda kombinujúca väzbové mapovanie (využitie molekulárnych markerov) a kvantitatívnu genetiku (meranie vlastností). Hľadá merateľnú asociáciu medzi fenotypom a markermi a je teda založené na hypotetických genetických modeloch (Sehgal et al., 2016). Základný postup QTL analýzy je založený na pravdepodobnostnej štatistickej metóde, ktorá testuje dve hypotézy. Nulová hypotéza predpokladá neexistenciu QTL, voči ktorej je testovaná alternatívna hypotéza, ktorá predpokladá existenciu QTL a jeho asociáciu s markerom (Morton, 1955).

QTL mapovanie je možné zhrnúť v 6 krokoch. (1) Výber dvoch rodičovských línií s kontrastnými fenotypmi pre sledovaný znak a (2) vytvorenie mapovacej populácie krížením vybratých rodičovských línií. (3) Fenotypizácia sledovaného znaku u mapovacej populácie (morfologické vlastnosti, agronomické vlastnosti, rezistencia voči škodcom a chorobám, odolnosť voči suchu apod.). Prebieha minimálne v troch rôznych lokalitách alebo v troch rôznych sezónach, s cieľom znížiť vplyvy vonkajšieho prostredia. (4) Genotypizácia mapovacej populácie prebieha napr. metódami DArT-Seq (Kilian et al., 2012), RAD-Seq (Baird et al., 2008) alebo GBS (Elshire et al., 2011). (5) Nasleduje zostavenie väzbovej mapy a (6) detekcia molekulárnych markerov asociujúcich so sledovaným znakom (Sehgal et al., 2016).

K mapovaniu QTLs existujú špecializované programy, ako napr. MultiQTL (Korol et al., 2001), R/qtl (Broman et al., 2003), QTLCartographer (Wang et al., 2012) alebo IciMapping (Meng et al., 2015), pričom je možné využiť niektorú zo štatistických metód. Medzi ktoré sa radia jednomarkerová analýza, jednoduché intervalové mapovanie, zložené mapovanie pomocou intervalu a mnohonásobné intervalové mapovanie.

Základnou jednoduchou metódou je jednomarkerová analýza (*single-marker analysis*, SMA). SMA metóda porovnáva fenotypové a genotypové dáta a marker s najväčšou mierou asociácie je vybraný ako najbližšia pozíciu QTL. Metóda operuje so štatistickými analýzami ako *t*-test (Gosset, 1908), lineárna regresia (Kearsey a Hyne, 1994) alebo analýza rozptylu (*analysis of variance*, ANOVA) (Fisher, 1919). Výhodou je, že nie je

potrebná väzbová mapa, nakoľko sa s fenotypmi porovnávajú jednotlivé markery. Nevýhodou môže byť, že ak nie je marker dostatočne blízko QTL, vtedy nebude QTL detekované (Collard et al., 2005).

Jednoduché intervalové mapovanie QTL (*simple interval mapping*, SIM) spočíva v testovaní prítomnosti alebo neprítomnosti väzby medzi QTL a intervalom medzi párom hraničných (*flanking*) markerov pomocou metódy maximálnej vierohodnosti. Nevýhodou SIM je, že predpokladá prítomnosť len jedného QTL na väzbovú skupinu, čo nemusí odpovedať realite. Všetky ostatné QTL mimo toho najsignifikantnejšieho tak zostanú nedetegované. Variantom tejto metódy je jednoduché intervalové mapovanie pomocou regresie (Haley a Knott, 1992), ktoré bolo vytvorené pre zjednodušenie a urýchlenie výpočtov.

Zložené intervalové mapovanie (*composite interval mapping*, CIM) využíva jednoduché intervalové mapovanie (SIM) v kombinácii s mnohonásobnou regresiou (Jansen a Stam, 1994; Zeng, 1994). Týmto postupom zníži vplyv genetického pozadia pomocou náhodne volených kofaktorových markerov. Výhodou oproti SIM je teda mapovanie lokusov s vyššou presnosťou. Novšou verziou je *inclusive composite interval mapping* (ICIM), v rámci ktorého sú kofaktorové markery navolené postupnou regresiou namiesto náhodného výberu (Li et al., 2006).

Mnohonásobné intervalové mapovanie (*multiple interval mapping*, MIM) sa od všetkých predchádzajúcich metód líši tým, že predpokladá existenciu nie len jedného QTL pre sledovaný znak v rámci genómu. MIM najskôr vytvára CIM model a následne postupne pridáva a odoberá QTL sekvenčnou selekciou. Iteračný EM (*expectation–maximization*) algoritmus potom odhaduje pravdepodobnosť existencie QTLs a prípadné epistázie medzi nimi (Kao et al., 1999; Zeng et al., 1999).

Pravdepodobnosť prítomnosti QTL v danom bode alebo intervale na chromozóme je vyjadrená pomocou LOD (*logarithm of the odds*) skóre (Morton, 1995). Tradične je LOD skóre s väčšou hodnotou ako 3 považované za signifikantné (Lander a Botstein, 1989). Častejšie sa však signifikantnosť QTL určuje na základe prekročenia kritických hodnôt, ktoré sú určené pomocou permutačných testov (Churchill a Doerge, 1994).

QTLs sú väčšinou mapované do širokých intervalov, ktorých veľkosť môže byť až desiatky cM a môže teda zahŕňať veľké množstvo génov. Z tohto dôvodu je nutné

naviazať mapovaním s vysokým rozlíšením, s cieľom zmenšiť veľkosť intervalov na jednotky až desatiny cM. Tým sa zníži počet kandidátnych génov pre mapované QTLs. K tomuto postupu sú selektované línie rekombinujúce v QTL intervale, ktorý je ohraničený (*flanking*) markermi. Zároveň s tým sú ďalej do intervalu navrhované nové markery, ktorými sa v závislosti na fenotype zužuje QTL oblasť. Popríklad sa môžu stať novými *flanking* markermi pre nasledujúce kolo selekcie rekombinantných línií.

Mapovanie QTL s vysokým rozlíšením je aplikovateľné v šľachtení pomocou markerov asistovanej selekcie. Taktiež tvorí základ pre pozičné klonovanie, čiže identifikáciu génu ovplyvňujúceho skúmaný fenotyp, a jeho následné využitie v génovom inžinierstve. Kandidátny gén alebo gény je možné validovať metódami reverznej genetiky, ako sú napríklad RNA-interferencia, genetický *knock-out* alebo *knock-in*.

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál:

- Mapovacia populácia 81 F₁₂ rekombinantných inbredných línií pšenice jednozrnky (*Triticum monococcum* L.) pripravená z kríženia domestikovanej jednozrnky DV92 (Podgorica, Čierna Hora) a divokej jednozrnky G3116 (Libanon). Generácia F₈ DV92×G3116 bola sprostredkovaná prof. Jorge Dubcovskym, Ph.D. z University of California, USA (Dubcovsky et al., 1996). Generácie F₉₋₁₂ boli pripravené Monikou Škopovou, Barborou Balcárkovou (Klocová, 2010), Luciou Hluskovou (Gallová, 2011) a Hanou Vanžurovou (Vanžurová, 2013).
- Mapovacia populácia 102 F₂ línií pripravených z kríženia DV92 a línie 113 pochádzajúcej z populácie DV92×G3116. Táto populácia bola vytvorená Barborou Balcárkovou a Hanou Vanžurovou za účelom verifikácie lokusov kvantitatívnych znakov mapovaných v populácii DV92×G3116.
- Vázbová mapa populácie DV92×G3116 zostavená z DArT, SSR, STS, IRAP, CAPS, EST, ISBP a HRM markerov (Lampar, 2020).
- Vázbová mapa DV92×G3116 (47 línií spoločných s vyššie uvedenou väzbovou mapou) zostavená zo SNP markerov z 90K Infinium iSelect SNP čipu prof. Rudi Appelsom, Ph.D. z Murdoch University, Austrália (nepublikované).
- Sekvencie línie *T. monococcum* TA4342-96 poskytnuté prof. Bikram S. Gillem, Ph.D., Kansas State University, USA (nepublikované).
- Sekvenačné ready rodičov DV92 a G3116 namapované na A^u chromozómy referenčnej sekvencie pšenice IWGSC RefSeq v1.0 (IWGSC, 2018). Sekvenačné knižnice DV92 a G3116 boli pripravené NEBNext Ultra II DNA Library Prep súpravou (New England BioLabs) a sekvenované na NovaSeq 6000 (Illumina).

4.2 Použité chemikálie, sůpravy a roztoky

Použité chemikálie:

- 3-metacryloxypropyltrimetoxysilan (Serva, kat. č. 2873901)
- 40 % roztok akrylamid/bisakrylamid 19:1 (Serva, kat. č. 1067903)
- Agaróza I (VWR, kat. č. 97062-250)
- DNA oligonukleotidy (Integrated DNA Technologies)
- Etídium 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)
- N,N,N',N'-tetrametyletyléndiamín (TEMED; Serva, kat. č. 3593002)
- Nukleotidy, 100 mmol·l⁻¹ dATP, dCTP, dGTP, dTTP (VWR, kat. č. 733-1855)
- *o*-krezolová červeň (Sigma-Aldrich, kat. č. 1733-12-6)
- Peroxodisíran amónny (APS; Serva, kat. č. 13376.01)
- Redestilovaná voda
- Sacharóza (Lach-ner, kat. č. 57-50-1)
- *Taq* polymeráza (New England BioLabs, kat. č. M0273E)
- Tris BASE (Sigma-Aldrich, kat. č. 77-86-1)
- Tris-HCl (Roche, kat. č. 1185-53-1)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, kat. č. 9036-19-5)
- Restrikčný enzým *Taq*I (Thermo Fisher Scientific, kat. č. ER0671)
- Restrikčný enzým *Bsm*I (New England BioLabs, kat. č. 50-811-991)
- Restrikčný enzým *Hind*III (New England BioLabs, kat. č. 50-811-928)
- Restrikčný enzým *Dpn*II (New England BioLabs, kat. č. 50-812-217)
- Restrikčný enzým *Dde*I (New England BioLabs, kat. č. 50-812-089)

Použité sůpravy:

- Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter, kat. č. 000600v32)
- Agencourt GenFind v3 Kit (Beckman Coulter, kat. č. C34880)
- BigDye Terminator 5× Sequencing Buffer (Applied Biosystems, kat. č. SBUF-100)
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, kat. č. 4337458)
- ExoSAP (Applied Biosystems, kat. č. 78205.10.ML)
- NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, kat. č. 740770.250)

Použité roztoky:

- **5× TBE pufer** 450 mmol·l⁻¹ Tris
 450 mmol·l⁻¹ kyselina boritá
 10 mmol·l⁻¹ EDTA (pH 8,0)
- **10× PCR pufer:** 100 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,2)
 500 mmol·l⁻¹ chlorid draselný
 15 mmol·l⁻¹ hexahdrát chloridu horečnatého
 1 % Triton X-100
- **5× Cresol Red:** 0,01 % *o*-krezolová červeň
 1,5 % sacharóza

4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Aparatúra pre horizontálnu gélovú elektroforézu Owl A6 (Thermo Fisher Scientific)
- Aparatúra pre vertikálnu gélovú elektroforézu C-DASG-400-50 (C.B.S. Scientific)
- Centrifúga MiniStar Silverline (VWR)
- Centrifúga CR 4i (Jouan)
- Centrifúga PlateFuge MicroCentrifuge (Benchmark Scientific)
- Centrifúga Mega Star 600R (VWR)
- Homogenizátor Mixer Mill MM301 (Retsch)
- Laboratórna váha Vibra AJ-820CE (Shinko Denshi)
- Mikrovlnná trúba KOR-6C2B (DAEWOO)
- Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific)
- Robot Biomek NX^P (Beckman Coulter)
- Sekvenátor 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)
- Termocyklér C-1000 Touch (Bio-Rad)
- Trepáčka Reax Control (Heidolph Instruments)
- UV transiluminátor InGenius (Syngene)
- Vodná kúpeľ Jouan J18 (Jouan)
- Zdroje MP-300V a MP-500V (Major Science)

4.4. Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1 Návrh molekulárnych markerov

V prvom prípade boli na základe vybraných DArT markerov z väzbovej mapy DV92×G3116 navrhnuté vhodné kodominantné PCR markery. DArT markery sú založené na hybridizácii, pričom ich sekvencie nie sú známe. Genotypové dáta DArT markerov boli priradené na odpovedajúce miesta v SNP väzbovej mape (90K Infinium iSelect SNP mapa). Sekvencie susedných SNP markerov boli vyhľadane pomocou BLASTN v2.2.26 (Altschul et al., 1997) v databáze kontigov *T. monococcum* TA4342-96. U nájdených významných kontigov prebehla kontrola na neprítomnosť repetitívnych sekvencií pomocou databázy TREP (non-redundant TRansposable Elements Platform v16, wheat.pw.usda.gov/blast). Následne boli vo vybraných sekvenciách predikované gény s využitím FGENESH s parametrami špecifickými pre *T. aestivum* (softberry.com) (Solovyev et al., 2006). Markery boli navrhnuté pomocou štandardného nastavenia v programe Primer3 v0.4.0 (Untergasser et al., 2012) tak, aby produkty mali dĺžku približne 500 bp. Markery vykazujúce dĺžkový polymorfizmus boli rovno využité ku genotypovaniu. Ak markery poskytovali rovnako veľké PCR produkty u oboch rodičov, boli osekvenované a následne alignované algoritmom MUSCLE (Edgar, 2004). V prípade identifikácie SNP boli pomocou CAPS Designer (sgn.cornell.edu/tools/caps_designer/caps_input.pl) (Fernandez-Pozo et al., 2014) vyhľadane vhodné restričné endonukleázy a následne boli ako CAPS markery použité ku genotypovaniu.

Po získaní sekvencií rodičovských línií DV92 a G3116 boli markery v druhom prípade navrhnuté na základe polymorfizmov (indelov) medzi nimi. Sekvencie rodičov namapované na referenčnú sekvenciu pšenice IWGSC RefSeq v1.0 (IWGSC, 2018) boli zobrazené spolu s predikovanými génmi (*high-confidence* geny) (IWGSC, 2018) v IGV v2.12.0 (Robinson et al., 2011). Markery boli následne navrhnuté na polymorfizmy preferenčne v génových oblastiach pomocou Primer3 v0.4.0.

4.4.2 Izolácia genómovej DNA

DNA bola izolovaná súpravou Agencourt GenFind v3 alebo NucleoSpin Plant II. V oboch prípadoch boli odobraté časti rastlinného pletiva (tri ~3 cm kúsky listov) usušené a mechanicky homogenizované sklenenými guľôčkami (Mixer Mill MM301, 3 minúty, 27 Hz).

Vysokokapacitná izolácia DNA bola prevedená v 96-jamkových *deep-well* doštičkách súpravou Agencourt GenFind v3 robotom Biomek NX^P podľa Ivaničovej et al. (2016). Súprava NucleoSpin Plant II bola použitá podľa návodu dodaného výrobcom. Koncentrácia izolovanej genómovej DNA bola stanovená pomocou Nanodrop One a následne boli vzorky nariadené na 20 ng/μl.

4.4.3 Polymerázová reťazová reakcia

PCR boli prevedené v 96-jamkových PCR doštičkách (VWR), pričom objem reakcií bol 20 μl. Reakčná zmes obsahovala 2 μl 10× PCR pufru, 4 μl 5× Cresol Red, 0,4 μl 100 mmol·l⁻¹ dNTP, 2 μl 10 μmol·l⁻¹ forward (F) primer, 2 μl 10 μmol·l⁻¹ reverse (R) primer, 0,4 μl *Taq* polymerázy 2U·μl⁻¹, 8 μl redistilovanej vody a 1,2 μl genómovej DNA o koncentrácii 10-20 ng·μl⁻¹. PCR prebiehali podľa protokolu *touchdown* PCR, ktorý je uvedený v Tab. 2.

Tabuľka 2: Podmienky touchdown PCR

	Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
1	Počiatočná denaturácia	95	5 minút	1
2	Denaturácia	95	40 sekúnd	
3	Nasadanie	65 (-0,7/cyklus)	40 sekúnd	16
4	Extenzia	72	1 minúta	
5	Denaturácia	95	40 sekúnd	
6	Nasadanie	53	40 sekúnd	17
7	Extenzia	72	1 minút	
8	Záverečná extenzia	72	10 minút	1

4.4.4 Restričné štiepenie

PCR produkty CAPS markerov boli štiepené pomocou restričných endonukleáz. Reakčná zmes obsahovala vždy 1 μl 5× Cresol Red, 0,5 μl príslušného pufru (volený podľa restriktázy), 1 μl restričného enzýmu, 2,5 μl redistilovanej vody a 5 μl PCR produktu. Restričné štiepenie prebiehalo pri teplote vhodnej pre danou restriktázu po dobu 2 hodín.

4.4.5 Horizontálna agarózová elektroforéza

Produkty PCR (5 μ l) alebo produkty restrikčného štiepenia (9 μ l) boli separované na 1,5 % agarózovom géli (4,5 g agarózy, 300 ml 0,5 \times TBE) s markerom molekulovej hmotnosti pri konštantnom napätí 130 V po dobu 70 až 90 minút.

Následne boli separované produkty nafarbené v roztoku 0,05 % etídiu bromidu a vizualizované na UV transiluminátore.

4.4.6 Vertikálna polyakrylamidová elektroforéza

PCR produkty alebo produkty restrikčného štiepenia o malej molekulovej hmotnosti (menšej než 200 bp) boli separované v 4 % nedenaturujúcom polyakrylamidovom géli (4 % akrylamid/bisakrylamid 19:1, 0,07 % TEMED, 0,07 % APS, 0,5 \times TBE pufer, redistilovaná voda).

Elektroforéza prebiehala v 0,5 \times TBE puferi s 0,03 % etídiu bromidom pri konštantnom napätí 350 V po dobu približne 70 až 80 minút. Následne boli separované produkty vizualizované pomocou UV transiluminátoru.

4.4.7 Sekvenovanie produktov PCR pomocou Sangerovej metódy

Produkty PCR boli enzymaticky prečistené pomocou ExoSAP súpravy a následne sekvenované Sangerovou metódou.

Pred enzymatickým prečistením boli na agarózovom géli odhadnuté koncentrácie produktov PCR. K tomuto vizuálnemu hodnoteniu bol na porovnanie koncentrácií použitý GeneRuler 100 bp DNA molekulárny marker o koncentracii 50 ng/ μ l.

Reakčná zmes na enzymatické prečistenie sa skladala z 20-40 ng PCR produktu, 0,25 U enzýmu alkalická fosfatáza (fastAP), 0,05 U enzýmu exonukleáza I (Exo I) a 1 \times PCR pufru. Inkubácia prebiehala pri 37 °C po dobu 30 minút, po ktorej prebehla denaturácia pri 95 °C po dobu 5 minút.

Následne boli prečistené produkty PCR (5-20 ng) sekvenované za použitia súpravy BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Pričom každá sekvenačná reakcia v objeme 10 μl obsahovala okrem PCR produktu aj 1,5 μl 5 \times sekvenačného pufru, 0,5 μl BigDye, 1 μl 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ F alebo R primeru a objem vzorky bol doplnený redestilovanou vodou. Sekvenačné reakcie probiehali podľa Tab. 3 v 96-jamkovej doštičke.

Tabuľka 3: Podmienky sekvenačnej reakcie

Krok	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklov
1	98	5 minút	1
2	96	10 sekúnd	
3	50	5 sekúnd	60
4	60	4 minúty	

Ďalej boli produkty prečistené pomocou magnetických guľôčok CleanSEQ na robotovi Biomek NX^P a separované kapilárnou elektroforézou na prístroji ABI 3730xl.

4.4.8 Genotypovanie

Genotypovanie markerov prebiehalo na základe prítomnosti či neprítomnosti konkrétneho PCR produktu (*presence-absence* polymorfizmus) alebo rozdielnej dĺžky produktov PCR v porovnaní s rodičovskými líniami.

V prípade prítomnosti alely od rodiča DV92 bola alela jedinca značená ako A, v prípade alely od rodiča G3116 bola alela jedinca značená ako B. U heterozygótnych jedincov sa používalo značenie H. Výsledné genotypy boli zaznačené v tabuľke v Microsoft Excel.

5 VÝSLEDKY

Praktická časť bakalárskej práce nadväzuje na výsledky diplomových prác Hany Vanžurovej (Vanžurová, 2013) a Adama Lampara (Lampar, 2020) zameraných na mapovanie QTL pre agronomicky významné znaky, vrátane tvaru (plochy, respektíve veľkosti) zrna, u pšenice jednozrnky (*T. monococcum*). Pre veľkosť zrna zamapovali QTL na chromozómoch 1A^m, 2A^m, 3A^m, 5A^m a 7A^m. LOD skóre QTL na chromozóme 7A^m dosiahlo hodnoty 45 a PEV (*percentage of explained variance*) bola 16 %, čo z veľkej časti vysvetľovalo fenotypovú variabilitu pre tento znak. Preto bolo toto QTL vybrané pre mendelizáciu a saturáciu markermi.

5.1 Navrhnutie molekulárnych markerov k mendelizácii lokusu pre veľkosť zrna na chromozóme 7A^m

S využitím SNP väzbovej mapy poskytnutej prof. Rudi Appelsom boli navrhnuté molekulárne markery pre QTLs na chromozómoch 1A^m, 2A^m a 5A^m k následnej mendelizácii lokusu pre veľkosť zrna na chromozóme 7A^m. Celkovo bolo navrhnutých 36 markerov (pozri Príloha 1).

Kodominantný marker *Owm2169* vykazoval dĺžkový polymorfizmus medzi rodičmi DV92 a G3116. Markery *D861475-1*, *D861232-1*, *Owm2176*, *Owm2177*, *Owm2179*, *Owm2180*, *Owm2181*, *Owm2182*, *Owm2184*, *Owm2185* a *Owm2189* vykazovali *presence/absence* polymorfizmus. Jednalo sa teda o dominantné markery, a z tohto dôvodu boli vyradené ako nevhodné pre genotypovanie segregujúcich populácií. Markery *Owm2194* a *Owm2197* neamplifikovali úseky DNA ani jedného z rodičov DV92 a G3116.

U 12 markerov (*D861475-2*, *D861232-2*, *Owm2170*, *Owm2171*, *Owm2172*, *Owm2174*, *Owm2188*, *Owm2190*, *Owm2191*, *Owm2193*, *Owm2195* a *Owm2196*), ktorých PCR produkty sa u rodičovských línií nelíšili dĺžkou, boli produkty sekvenované pre detekciu SNP. Ďalších 9 markerov malo taktiež rovnaké dĺžky PCR produktov u oboch rodičov, ale ako redundantné už neboli sekvenované (*Owm2168*, *Owm2173*, *Owm2175*, *Owm2178*, *Owm2183*, *Owm2186*, *Owm2187*, *Owm2192* a *D2490*).

Alignment PCR produktov rodičov markera *D861232-2* poukázal na existenciu krátkeho 13 bp dlhého indelu. Okolo tohto indelu bol navrhnutý kodominantný marker *D861232-3* vhodný pre gélovú polyakrylamidovú elektroforézu.

Ďalších 6 markerov bolo prevedených na kodominantné CAPS markery (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) (Konieczny a Ausubel, 1993) (pozri Príloha 1).

Zo všetkých kodominantných markerov boli vybrané štyri k otestovaniu, či amplifikujú špecifické úseky. Išlo o markery *D861232-3*, *Owm2169*, *Owm2174* a *Owm2191*, ktorými bola genotypovaná mapovacia populácia 81 rekombinantných inbredných línií (RIL) F_{12} pochádzajúcej z kríženia domestikovanej jednozrnky DV92 a divokej jednozrnky G3116. Genotypy týchto markerov boli následne priradené do väzbovej mapy DV92×G3116, pričom pozície všetkých markerov odpovedali pozíciám, kam boli navrhnuté. Tieto štyri markery boli pridané k ostatným markerom, ktoré boli už k mendelizácií QTL na chromozóme $7A^m$ navrhnuté. Ostatné markery už neboli v rámci bakalárskej práce testované a použité.

5.2 Mendelizácia lokusu na chromozóme $7A^m$

F_2 mapovacia populácia vzniknutá z kríženia DV92 a línie 113 (pochádzajúcej z populácie DV92×G3116) bola genotypovaná markermi *D861232-3*, *Owm2169*, *Owm2174* a *Owm2191*. Populácia bola navyše genotypovaná už predtým navrhnutými markermi pre QTLs na chromozómoch $1A^m$, $3A^m$, $5A^m$ a $7A^m$: *D470347*, *Owm2157*, *Owm407*, *D376253*, *Owm2111_2* a *Owm2110_2* (Vanžurová, 2013; Lampar, 2020). Z mapovacej populácie DV92×113 boli následne vybrané vhodné línie k mendelizácii lokusu pre veľkosť zrna na chromozóme $7A^m$ (pozri Tab. 4). Línie boli vybrané primárne na základe heterozygotnej konštitúcie lokusu pre veľkosť zrna na chromozóme $7A^m$. Ďalej podľa homozygotnej konštitúcie ostatných QTLs pre veľkosť zrna na zvyšných chromozómoch. Línie 228, 231, 247 a 265 boli prevažne homozygotne pre lokusy zdedené od rodiča DV92 (A). Línie 284, 295, 299 a 307 boli prevažne homozygotne pre lokusy zdedené od rodiča G3116 (B). Pre marker *D861232-3* nebolo možné získať línie homozygotne pre oblasť QTL na chromozóme $1A^m$ od rodiča G3116, pretože v populácii nesegregovala. Línia 233 bola již plne mendelizovaná pre QTL na chromozóme $7A^m$. Zo všetkých línií bolo následne vysadených 473 jedincov. Všetci vysadení jedinci boli

genotypovaný pomocou markerov uvedených v Tab. 4, pokiaľ dané oblasti QTLs už neboli v homozygotnej konštitúcii.

Tabuľka 4: Genetická konštitúcia oblastí QTL na chromozómoch 1A^m, 2A^m, 3A^m, 5A^m a 7A^m vybraných línií z F₂ populácie DV92×113 pre mendelizáciu QTL na chromozóme 7A^m

Chr./ QTL	Marker	Polymorfismus	Línie z populácie DV92×113 k mendelizácii QTL na 7A ^m									
			228	231	247	265	233	284	295	299	307	
1	<i>D470347</i>	CAPS <i>TaqαI</i>	H	H	H	A	A	H	B	B	H	
	<i>D861232-3</i>	LP	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
2	<i>Owm2169</i>	LP	A	A	A	A	B	B	B	B	B	
	<i>Owm2174</i>	CAPS <i>DpnII</i>	A	A	A	A	B	B	B	B	B	
3	<i>Owm2157</i>	LP	A	A	A	A	A	B	B	B	B	
	<i>Owm407</i>	CAPS <i>DpnII</i>	A	A	H	A	A	B	H	B	B	
5	<i>D376253</i>	CAPS <i>HindIII</i>	H	A	A	H	A	H	B	H	B	
	<i>Owm2191</i>	CAPS <i>BsmI</i>	H	A	H	H	B	H	H	H	H	
7	<i>Owm2111_2</i>	CAPS <i>DpnII</i>	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
	<i>Owm2110_2</i>	CAPS <i>DdeI</i>	H	H	H	H	H	H	H	H	H	

Uvedené markery ohraničujú dané QTLs na daných chromozómoch. V rámci mendelizácie lokusu na chromozóme 7A^m boli línie 228, 231, 247 a 265 z F₂ populácie DV92×113 vybrané na základe homozygotných konštitúcií v oblastiach QTL zdedených od rodiča DV92 (A). Línie 284, 295, 299 a 307 boli vybrané na základe homozygotných konštitúcií v oblastiach QTL zdedených od rodiča G3116 (B). Hraničný marker *D861232-3* v tejto populácii nesegregoval. Línia 233 bola plne mendelizovaná.

Z 473 ogenotypovaných rastlín boli vybrané také, ktoré mali v heterozygotnom stave QTL na chromozóme 7A^m a ostatné QTL v homozygotnom stave, či už s alelami od rodiča DV92 alebo G3116. Celkom bolo vybraných 21 najvhodnejší línií k selekcii rekombinantných línií.

6 línií bolo mendelizovaných pre QTL na chromozóme 7A^m. Ďalších 15 línií nebolo úplne mendelizovaných pre QTL na chromozóme 7A^m, nakoľko niektoré QTL na iných chromozómoch (1A^m, 3A^m alebo 5A^m) zostali v heterozygotnom stave (výber línií v Tab. 5). U týchto línií je prípadne nutné mendelizáciu QTL na chromozóme 7A^m previesť v ďalšej generácii. Z dôvodu prítomnosti homozygotnej konštitúcie v oblasti lokusu na chromozóme 7A^m boli vyradené línie odvodené z línií 307 a 295.

Tabuľka 5: Genetická konštitúcia oblastí QTL na chromozómoch 1A^m, 2A^m, 3A^m, 5A^m a 7A^m po mendelizácii vybraných línii z F₂ populácie DV92×113 pre QTL na chromozóme 7A^m

Chr./ QTL	Marker	Línie z populácie DV92×113 mendelizované pre QTL na 7A ^m						
		228-95	231-1	247-194	265-285	233-427	284-161	299-334
1	<i>D470347</i>	A	A	A	A	A	B	B
	<i>D861232-3</i>	A	A	A	A	A	A	A
2	<i>Owm2169</i>	A	A	A	A	B	B	B
	<i>Owm2174</i>	A	A	A	A	B	B	B
3	<i>Owm2157</i>	A	A	A	A	A	B	B
	<i>Owm407</i>	A	A	A	A	A	B	B
5	<i>D376253</i>	A	A	A	A	A	B	B
	<i>Owm2191</i>	A	A	H	H	B	B	B
7	<i>Owm2111_2</i>	H	H	H	H	H	H	H
	<i>Owm2110_2</i>	H	H	H	H	H	H	H

Uvedené markery ohraničujú dané QTLs na daných chromozómech. Línie 228-95, 231-1, 233-427, 284-161 a 299-334 boli plne mendelizované, zatiaľ čo línie 247-194 a 265-285 neboli plne mendelizované vzhľadom k segregujúcemu markeru *Owm2191*.

5.3 Saturácia lokusu na chromozóme 7A^m markermi

Ďalšie navrhnuté markery boli určené na rovnomernú saturáciu oblasti lokusu pre veľkosť zrna na chromozóme 7A^m. S využitím sekvenčných readov rodičov DV92 a G3116 namapovaných na referenčnú sekvenciu pšenice bolo celkom navrhnutých 16 markerov v oblasti 118-202 Mbp na chromozóme 7A^m (pozri Príloha 2). Navrhnuté markery boli otestované na mapovacej populácii F₁₂ DV92×G3116. Z navrhnutých markerov vykazovalo 15 markerov dĺžkový polymorfizmus a len jeden marker, *Owm2228*, nebol funkčný.

6 DISKUSIA

Hlavným cieľom praktickej časti bakalárskej práce bolo pomocou mendelizácie lokusu pre tvar (plochu) zrna na chromozóme 7A^m u *T. monococcum* získať vhodné línie k mapovaniu tohto lokusu s vysokým rozlíšením. Tvar zrna koreluje s jeho veľkosťou a je tak agronomicky dôležitý. Cieľ práce reflektuje chabosť informácií o veľkosti zrna ako komplexného znaku u pšenice. Nakoľko je medzi A^m genómom *T. monococcum* a A^u genómom *T. urartu* (druh pšenice, ktorá je donorom genómu A^u *T. aestivum*) vysoký stupeň kolinearity, je diploidná jednozrnka vhodným genetickým modelom.

Oblasti pre navrhnutie molekulárnych markerov k mendelizácii lokusu pre veľkosť zrna na chromozóme 7A^m boli vybrané na základe predchádzajúcich výsledkov Hany Vanžurovej (Vanžurová, 2013) a Adama Lampara (Lampar, 2020), ktorí sa zameriavali na mapovanie QTL pre agronomicky významné znaky. Tieto analýzy vymedzili oblasti QTLs pre tvar, resp. veľkosť, zrna u *T. monococcum*. Na základe LOD skóre a PEV (variabilita vysvetlená QTL) pre jednotlivé QTLs bolo pre ďalšie štúdium vybrané QTL na chromozóme 7A^m (LOD 45), nakoľko značne prispieva k veľkosti zrna u *T. monococcum* (PEV 16 %).

Lampar (nepublikované) mapoval QTL pre veľkosť zrna taktiež na chromozómoch 1A^m, 2A^m, 3A^m, 5A^m a 7A^m. QTL na chromozómoch 1A^m, 3A^m a 5A^m boli mapované v rovnakých oblastiach ako QTL *QGa.igdb-1A.1*, *QGa.igdb-3A.1* a *QGa.igdb-5A.1*, ktoré detegovali v *T. monococcum* Yu et al. (2019). QTL na chromozómoch 2A^m a 7A^m zatiaľ mapované neboli.

QTL analýzou získaná oblasť pre QTL pre veľkosti zrna na chromozóme 7A^m je stále veľmi veľká (približne 80 Mbp). K zúženiu oblasti a získaniu menšieho počtu kandidátnych génov ovplyvňujúceho tento znak je nutné QTL mapovať s vysokým rozlíšením. Tento postup vyžaduje selekciu nových línií rekombinujúcich v oblasti sledovaného QTL a následne porovnanie ich genotypu a fenotypu. Pokiaľ by avšak segregovali aj iné QTL okrem QTL na chromozóme 7A^m, mali by rôzny vplyv na celkový fenotyp a skresľovali by tak konečnú pozíciu skúmaného QTL.

Aby bol vplyv ostatných QTL na veľkosť zrna u odvodených línií rovnaký, bolo potrebné chromozóm 7A^m mendelizovať. Mendelizácia mala za cieľ zachovať heterozygótny stav

pre QTL na chromozóme 7A^m ale zároveň získať homozygótny stav pre všetky ostatné QTL na ostatných chromozómoch (1A^m, 2A^m, 3A^m a 5A^m) ovplyvňujúcich tento znak. U mendelizovaných línií môžeme tak predpokladať, že na zmeny vo veľkosti zrna majú vplyv len alely QTL na chromozóme 7A^m.

Výsledky QTL analýzy poukazujú (Lampar, nepublikované), že alely rodiča DV92 veľkosť semien skôr zväčšujú, kdežto alely G3116 skôr znižujú. Línie boli mendelizované pre QTL na chromozóme 7A^m tak, aby mali oblasti QTLs na ostatných chromozómoch zdedené od rozdielnych rodičov (napr. línia 228-95 a 299-334 v Tab. 5). Mohlo by sa totižto neskôr ukázať, že nie je možné pre mapovanie s vysokým rozlíšením použiť napríklad tie línie, ktoré majú alely QTLs prevažne od rodiča DV92. Pretože vplyv QTL na chromozóme 7A^m na znak by nemusel byť s takým genetickým pozadím fenotypovateľný.

Markery boli navrhnuté tak, aby ohraničovali (*flanking*) oblasti jednotlivých QTL. Čo umožnilo vybrať jedincov vhodných pre mendelizáciu. Flanking markery pre QTL na chromozómoch 1A^m, 2A^m a 5A^m a 7A^m boli optimalizované a doplnené markery pre QTL na chromozómoch 1A^m, 2A^m a 5A^m. Markery boli otestované na populácii 81 rekombinantných inbredných línií F₁₂ pochádzajúcej z kríženia domestikovanej jednozrnky DV92 a divokej jednozrnky G3116.

Markermi bola následne genotypovaná F₂ mapovacia populácia vzniknutá z kríženia DV92 a línie 113 (pochádzajúcej z populácie DV92×G3116). Na základe genotypovania bolo vybraných 9 línií s QTL pre veľkosť zrna na chromozóme 7A^m v heterozygótnej konštitúcii a zároveň ostatnými QTL pre veľkosti zrna na chromozómoch 1A^m, 2A^m, 3A^m a 5A^m prednostne v homozygótnej konštitúcii. Avšak časť z nich bola aj naďalej v heterozygótnej konštitúcii. Z toho dôvodu boli z každej línie vysadený jedinci, z ktorých po genotypovaní boli vybraný tí jedinci, ktorí mali stále QTL na chromozóme 7A^m v heterozygótnej konštitúcii, ale zvyšné QTL na ostatných chromozómoch v homozygótnej konštitúcii. Celkovo bolo získaných 6 línií plne mendelizovaných pre QTL na chromozóme 7A^m.

Oblasť QTL pre veľkosť zrna na chromozóme 7A^m bola rovnomerne zahustená molekulárnymi markermi. Celkovo bolo navrhnutých a otestovaných 16 markerov pokrývajúcich oblasť od 118 do 202 Mbp a len jeden z nich nebol funkčný.

Získané línie a markery tvoria vhodný základ k vysoko rozlíšiteľnému mapovaniu QTL pre tvar (veľkosť) zrna na chromozóme 7A^m. Postupná selekcia rekombinantných línií pre sledované QTL a následná kontrola fenotypu spojená so zahusťovaním oblasti sledovaného QTL markermi môže viesť k zúženiu oblasti a zníženiu počtu kandidátnych génov. Po validácii kandidátneho génu by bolo možné jeho využitie v šľachtiteľstve, ktoré by bolo zamerané na zvyšovanie výnosu.

7 ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bolo vypracovanie literárnej rešerše na tému pšenice, výnos a priebeh QTL analýzy. Praktická časť bola zameraná na mendelizáciu lokusu pre tvar zrna na chromozóme 7A^m a zahustenie oblasti QTL na chromozóme 7A^m markermi. Tvar zrna koreluje s jeho veľkosťou a ovplyvňuje tak výnos. Na ten sa v posledných dekádach výrazne zamerali šľachtiteľské programy, keďže vzhľadom na rastúcu ľudskú populáciu je potrebné jeho navýšenie.

Detegované QTL pre tvar (resp., veľkosť) zrna na mapovacej populácii RIL F₁₂ pšenice jednozrnky DV92×G3116, ktoré boli mapované Hanou Vanžurovou (Vanžurová, 2013) a Adamom Lamparom (Lampar, 2020), poukazovali na významné QTL na chromozóme 7A^m. Pre mapovanie tohoto QTL s vysokým rozlíšením bolo potrebné získať mendelizované línie. To znamená línie, ktoré majú QTL pre veľkosť zrna na chromozóme 7A^m v heterozygotnej konštitúcii, ale všetky ďalšie QTLs pre tento znak na ostatných chromozómoch v homozygotnej konštitúcii. QTLs v homozygotnej konštitúcii totiž budú mať rovnocenný vplyv na fenotyp a za zmeny bude z najväčšej časti zodpovedné QTL na chromozóme 7A^m.

K mendelizácii tohto QTL boli navrhnuté markery ohraničujúce QTLs a bola ogenotypovaná F₂ mapovacia populácia pšenice jednozrnky DV92×113. Z tejto populácie bolo získaných 6 mendelizovaných línií, ktoré sú vhodné na selekciu línií rekombinujúcich v oblasti QTL na chromozóme 7A^m. Zároveň bola oblasť QTL na chromozóme 7A^m (odpovedajúca 118 - 202 Mbp na chromozóme 7A referenčnej sekvencie pšenice) zahustená 15 molekulárnymi markermi.

Získané línie a navrhnuté markery pre QTL na chromozóme 7A^m je možné využiť pre identifikáciu kandidátnych génov pre tvar zrna. Tie bude následne po validácii možné využiť v šľachtiteľstve pri šľachtení nových kultivarov s vyšším výnosom.

8 LITERATÚRA

- Acquaah, G. (2012). *Principles of plant genetics and breeding*. Wiley.
- Alexander, W. L., Smith, E. L., & Dhanasobhan, C. (1984). A comparison of yield and yield component selection in winter wheat. *Euphytica*, 33(3), 953–961. <https://doi.org/10.1007/bf00021926>
- Allaby, R. (2010). Integrating the processes in the evolutionary system of domestication. *Journal of Experimental Botany*, 61(4), 935–944. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp382>
- Altschul, S. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A., & Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3(10), e3376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- Börner, A., Schumann, E., Fürste, A., Cöster, H., Leithold, B., Röder, M., & Weber, W. (2002). Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105(6), 921–936. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0994-1>
- Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., & Churchill, G. A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19(7), 889–890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg112>
- Campbell, K. G., Bergman, C. J., Gualberto, D. G., Anderson, J. A., Giroux, M. J., Hareland, G., Fulcher, R. G., Sorrells, M. E., & Finney, P. L. (1999). Quantitative trait loci associated with kernel traits in a soft \times hard wheat cross. *Crop Science*, 39(4), 1184–1195. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183x003900040039x>
- Carver, B. F. (2009). *Wheat: Science and trade*. Wiley-Blackwell.
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142(1-2), 169–196. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>
- Cui, F., Ding, A., Li, J., Zhao, C., Li, X., Feng, D., Wang, X., Wang, L., Gao, J., & Wang, H. (2011). Wheat kernel dimensions: How do they contribute to kernel weight at an individual QTL level? *Journal of Genetics*, 90(3), 409–425. <https://doi.org/10.1007/s12041-011-0103-9>
- Cuthbert, J. L., Somers, D. J., Brûlé-Babel, A. L., Brown, P. D., & Crow, G. H. (2008). Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 117(4), 595–608. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0804-5>
- Dholakia, B. B., Ammiraju, J. S. S., Singh, H., Lagu, M. D., Röder, M. S., Rao, V. S., Dhaliwal, H. S., Ranjekar, P. K., Gupta, V. S., & Weber, W. E. (2003). Molecular marker analysis of kernel size and shape in bread wheat. *Plant Breeding*, 122(5), 392–395. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00896.x>
- Dubcovsky, J., & Dvořák, J. (2007). Genome plasticity: A key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316(5833), 1862–1866. <https://doi.org/10.1126/science.1143986>

- Dubcovsky, J., Luo, M.-C., Zhong, G.-Y., Bransteitter, R., Desai, A., Kilian, A., Kleinhofs, A., & Dvořák, J. (1996). Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L.. *Genetics*, *143*(2), 983–999. <https://doi.org/10.1093/genetics/143.2.983>
- Dvořák, J., & Akhunov, E. D. (2005). Tempos of gene locus deletions and duplications and their relationship to recombination rate during diploid and polyploid evolution in the *Aegilops-Triticum* alliance. *Genetics*, *171*(1), 323–332. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.041632>
- Dvořák, J., & Zhang, H. B. (1990). Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(24), 9640–9644. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9640>
- Dvořák, J., Deal, K. R., Luo, M.-C., You, F. M., von Borstel, K., & Dehghani, H. (2012). The origin of spelt and free-threshing hexaploid wheat. *Journal of Heredity*, *103*(3), 426–441. <https://doi.org/10.1093/jhered/esr152>
- Dvořák, J., Terlizzi, P. di, Zhang, H.-B., & Resta, P. (1993). The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*, *36*(1), 21–31. <https://doi.org/10.1139/g93-004>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
- Evers, A.D. (2000). Grain size and morphology: Implications for quality. In D. Schofield, (Ed) *Wheat Structure, Biochemistry and Functionality*, (London: Royal Society of Chemistry), pp. 19–24.
- Evers, A.D., Cox, R.I., Shaheedullah, M. Z., and Withey, R.P. (1990). Predicting milling extraction rate by image analysis of wheat grains. *Aspects of applied biology*. *25*: 417–426.
- Feldman, M. (2001). Origin of cultivated wheat. In A.P. Bonjean, (Ed) *The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding*, *Andover*, pp. 3–56.
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Teclé, I. Y., Strickler, S. R., Bombarely, A., Fisher-York, T., Pujar, A., Foerster, H., Yan, A., & Mueller, L. A. (2014). The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D1036–D1041. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1195>
- Feuillet, C., Langridge, P., & Waugh, R. (2008). Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in Genetics*, *24*(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.11.001>
- Fisher, R. A. (1919). XV.—The correlation between relatives on the supposition of mendelian inheritance. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, *52*(2), 399–433. <https://doi.org/10.1017/s0080456800012163>
- Fuller, D. Q. (2007). Contrasting patterns in crop domestication and domestication rates: Recent archaeobotanical insights from the Old World. *Annals of Botany*, *100*(5), 903–924. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm048>

- Fuller, D. Q., Allaby, R. G., & Stevens, C. (2010). Domestication as innovation: the entanglement of techniques, technology and chance in the domestication of cereal crops. *World Archaeology*, 42(1), 13–28. <https://doi.org/10.1080/00438240903429680>
- Gallová (Hlusková), L. (2011): *Mapovanie agronomicky dôležitých génov u pšenice*. Diplomová práca. Prírodovedecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Gegas, V. C., Nazari, A., Griffiths, S., Simmonds, J., Fish, L., Orford, S., Sayers, L., Doonan, J. H., & Snape, J. W. (2010). A genetic framework for grain size and shape variation in wheat. *The Plant Cell*, 22(4), 1046–1056. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074153>
- Gill, N., San Miguel, P., Dhillon, B. D. S., Abernathy, B., Kim, H., Stein, L., Ware, D., Wing, R., & Jackson, S. A. (2010). Dynamic *Oryza* genomes: Repetitive DNA sequences as genome modeling agents. *Rice*, 3(4), 251–269. <https://doi.org/10.1007/s12284-010-9054-7>
- Gupta, P. K. (2016). Use of alien genetic variation for wheat improvement. *Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement. Sustainable Development and Biodiversity, Vol 11.*, 1–30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27090-6_1
- Gupta, P. K., Rustgi, S., & Kumar, N. (2006). Genetic and molecular basis of grain size and grain number and its relevance to grain productivity in higher plants. *Genome*, 49(6), 565–571. <https://doi.org/10.1139/g06-063>
- Haberer, G., Young, S., Bharti, A. K., Gundlach, H., Raymond, C., Fuks, G., Butler, E., Wing, R. A., Rounsley, S., Birren, B., Nusbaum, C., Mayer, K. F. X., & Messing, J. (2005). Structure and architecture of the maize genome. *Plant Physiology*, 139(4), 1612–1624. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068718>
- Haldorsen, S., Akan, H., Çelik, B., & Heun, M. (2011). The climate of the Younger Dryas as a boundary for Einkorn domestication. *Vegetation History and Archaeobotany*. <https://doi.org/10.1007/s00334-011-0291-5>
- Haley, C. S., & Knott, S. A. (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, 69(4), 315–324. <https://doi.org/10.1038/hdy.1992.131>
- Harlan, J. R. (1981). The early history of wheat: earliest traces to the sack of Rome. In Evans, L. T. and Peacock, W. J. (Ed.) *Wheat science - today and tomorrow*. Cambridge University Press.
- Heun, M. (1997). Site of Einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science*, 278(5341), 1312–1314. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1312>
- Churchill, G. A., & Doerge, R. W. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138(3), 963–971. <https://doi.org/10.1093/genetics/138.3.963>
- Ivaničová, Z., Jakobson, I., Reis, D., Šafář, 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 Biotechnology*, 33(5), 718–727. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.008>
- IWGSC. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 361(6403), eaar7191. <https://doi.org/10.1126/science.aar7191>
- Jansen, R. C., & Stam, P. (1994). High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, 136(4), 1447–1455. <https://doi.org/10.1093/genetics/136.4.1447>

- Kao, C.-H., Zeng, Z.-B., & Teasdale, R. D. (1999). Multiple Interval Mapping for Quantitative Trait Loci. *Genetics*, *152*(3), 1203–1216. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.3.1203>
- Kearsey, M. J., & Hyne, V. (1994). QTL analysis: A simple “marker-regression” approach. *Theoretical and Applied Genetics*, *89*(6), 698–702. <https://doi.org/10.1007/bf00223708>
- Kilian, A., Wenzl, P., Huttner, E., Carling, J., Xia, L., Blois, H., Caig, V., Heller-Uszynska, 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. *Data Production and Analysis in Population Genomics*, 67–89. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-870-2_5
- Kilian, B., Özkan, H., Pozzi, C., & Salamini, F. (2009). Domestication of the *Triticeae* in the Fertile Crescent. *Genetics and Genomics of the Triticeae*, 81–119. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77489-3_3
- Kilian, B., Özkan, H., Walther, A., Kohl, J., Dagan, T., Salamini, F., & Martin, W. (2007). Molecular diversity at 18 loci in 321 wild and 92 domesticate lines reveal no reduction of nucleotide diversity during *Triticum monococcum* (Einkorn) domestication: Implications for the origin of agriculture. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(12), 2657–2668. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm192>
- Klocová (Balcárková), B. (2010): *Mapování genů kvantitativních znaků u diploidní pšenice T. monococcum L.* Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Konieczny, A., & Ausubel, F. M. (1993). A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, *4*(2), 403–410. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1993.04020403.x>
- Korol, A. B., Ronin, Y. I., Itskovich, A. M., Peng, J., & Nevo, E. (2001). Enhanced efficiency of quantitative trait loci mapping analysis based on multivariate complexes of quantitative traits. *Genetics*, *157*(4), 1789–1803. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.4.1789>
- Kovach, M. J., Sweeney, M. T., & McCouch, S. R. (2007). New insights into the history of rice domestication. *Trends in Genetics*, *23*(11), 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.08.012>
- Lampar, A. (2020): *Využití referenční genomové sekvence pšenice pro vysokohustotní mapování agronomicky důležitých znaků.* Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Lander, E. S., & Botstein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, *121*(1), 185–199. <https://doi.org/10.1093/genetics/121.1.185>
- Li, H., Ye, G., & Wang, J. (2006). A Modified Algorithm for the Improvement of Composite Interval Mapping. *Genetics*, *175*(1), 361–374. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.066811>
- Loukoianov, A., Yan, L., Blechl, A., Sanchez, A., & Dubcovsky, J. (2005). Regulation of *VRN-1* vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheat. *Plant Physiology*, *138*(4), 2364–2373. <https://doi.org/10.1104/pp.105.064287>
- Marino, R., Volante, A., Brandolini, A., & Heun, M. (2018). A high-resolution einkorn (*Triticum monococcum* L.) linkage map involving wild, domesticated and feral einkorn genotypes. *Plant Breeding*, *137*(5), 682–690. <https://doi.org/10.1111/pbr.12637>

- Meng, L., Li, H., Zhang, L., & Wang, J. (2015). QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *The Crop Journal*, 3(3), 269–283. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2015.01.001>
- Mergoum, M., Singh, P. K., Singh, R. P., Peña, R. J., Anderson, J. A., Ransom, J. K., & Xu, S. S. (2009). Spring Wheat Breeding. In M. J. Carena (Ed.), *Cereals*. Springer US.
- Millar, S.J., Whitworth, M.B., and Evers, A.D. (1997). Image analysis: The prediction and assessment of wheat quality and milling properties. In J.L. Steele and K.O. Chung, (Eds) *Proceedings of the International Wheat Quality Conference*, Grain Industry Alliance
- Monneveux, P., Jing, R., & Misra, S. C. (2012). Phenotyping for drought adaptation in wheat using physiological traits. *Frontiers in Physiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00429>
- Morton, N. E. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *American Journal of Human Genetics*, 7(3).
- Osborne, B. G., & Anderssen, R. S. (2003). Single-kernel characterization principles and applications. *Cereal Chemistry Journal*, 80(5), 613–622. <https://doi.org/10.1094/cchem.2003.80.5.613>
- Pont, C., Leroy, T., Seidel, M., Tondelli, A., Duchemin, W., Armisen, D., Lang, D., Bustos-Korts, D., Goué, N., Balfourier, F., Molnár-Láng, M., Lage, J., Kilian, B., Özkan, H., Waite, D., Dyer, S., Letellier, T., Alaux, M., Russell, J., & Keller, B. (2019). Tracing the ancestry of modern bread wheats. *Nature Genetics*, 51(5), 905–911. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0393-z>
- Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., & Foley, J. A. (2013). Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS ONE*, 8(6), e66428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066428>
- Rifkin, S. A. (Ed.). (2012). *Quantitative trait loci (QTL): Methods and protocols*. Humana Press.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, 29(1), 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Sasaki, T. (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436(7052), 793–800. <https://doi.org/10.1038/nature03895>
- Sayre, K. D., Rajaram, S., & Fischer, R. A. (1997). Yield potential progress in short bread wheats in Northwest Mexico. *Crop Science*, 37(1), 36–42. <https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183x003700010006x>
- Sehgal, D., Singh, R., & Rajpal, V. R. (2016). Quantitative trait loci mapping in plants: Concepts and approaches. *Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement*, 31–59. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27090-6_2
- Schiemann, E. (1948). *Weizen , roggen , gerste. Systematik, geschichte und verwendung*. Fischer.
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., Liang, C., Zhang, J., Fulton, L., Graves, T. A., Minx, P., Reily, A. D., Courtney, L., Kruchowski, S. S., Tomlinson, C., Strong, C., Delehaunty, K., Fronick, C., Courtney, B., & Rock, S. M. (2009). The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 326(5956), 1112–1115. <https://doi.org/10.1126/science.1178534>

- Slafer, G. A., Savin, R., & Sadras, V. O. (2014). Coarse and fine regulation of wheat yield components in response to genotype and environment. *Field Crops Research*, *157*, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.12.004>
- Solovyev, V., Kosarev, P., Seledsov, I., & Vorobyev, D. (2006). Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biology*, *7*, S10. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-s1-s10>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), e115–e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vanžurová, H. (2013): *Charakterizace diploidní pšenice Triticum monococcum jako zdroje nových genů pro šlechtění pšenice*. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Wang, S, Basten, C. J., & Zeng, Z. B. (2012). *Windows QTL Cartographer 2.5*. Department of Statistics, North Carolina State University.
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., & Dubcovsky, J. (2003). Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(10), 6263–6268. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937399100>
- Yen, C., & Yang, J. (2020). *Biosystematics of triticeae. Volume 1: Triticum-Aegilops complex*. Springer.
- Yu, K., Liu, D., Chen, Y., Wang, D., Yang, W., Yang, W., Yin, L., Zhang, C., Zhao, S., Sun, J., Liu, C., & Zhang, A. (2019). Unraveling the genetic architecture of grain size in Einkorn wheat through linkage and homology mapping and transcriptomic profiling. *Journal of Experimental Botany*, *70*(18), 4671–4688. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz247>
- Zaharieva, M., & Monneveux, P. (2014). Cultivated einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*): The long life of a founder crop of agriculture. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *61*(3), 677–706. <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0084-7>
- Zeng, Z. B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, *136*(4), 1457–1468. <https://doi.org/10.1093/genetics/136.4.1457>
- Zeng, Z. B., Kao, C. H., Basten, C. J. (1999). Estimating the genetic architecture of quantitative traits. *Genetical Research*, *74*(3), 279–289. <https://doi.org/10.1017/s0016672399004255>
- Zohary, D., Hopf, M., & Weiss, E. (2012). *Domestication of plants in the Old World: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley*. Oxford University Press.

9 PRÍLOHY

Príloha 1: Markery navrhnuté k mendelizácii lokusu pre veľkosť zrna na chromozóme 7A^m

Príloha 2: Markery navrhnuté k zahusteniu oblasti QTL pre veľkosti zrna na chromozóme 7A^m

Príloha 1: Markery navrhnuté k mendelizácii lokusu pre veľkosť zrna na chromozóme 7A^m

Marker	Sekvencia forward (F) a reverse (R) primerov (5' → 3')	Chromozóm
<i>D861475-1</i>	F: CAATTTTGTCCCGGTTGATTTCA R: GCCTTGTCTTTTGCTCCTC	1A ^m
* <i>D861475-2</i>	F: ACTGGAGGAGCAAAAGGACA R: TCCTTGCCTTCGTCTTGTCT	1A ^m
<i>D861232-1</i>	F: CCTCAACTCCCATTCCTCCAT R: TGTTACCAAGGAAGCCACT	1A ^m
* <i>D861232-2</i>	F: CTGTTGCTAGTTCGTCAGGC R: ACTCACCAAATCCCACCGAA	1A ^m
<i>D861232-3</i>	F: GTGTGTTGCTGTTTCAATTGCA R: TGTTTCCAAAGCACACACGC	1A ^m
<i>Owm2168</i>	F: CTAGGAGTACACGGCAGGAC R: ACCAGCAATCTACCACTCGT	2A ^m
<i>Owm2169</i>	F: TGCTACTGTCCTGATTTGGGT R: CAATCTCTGTTGGCGAGCC	2A ^m
* <i>Owm2170</i> (<i>Hpy99I</i>)	F: AGGATGGCTCGTGTGTTGTA R: ACGTGAAAGTAACAACCTTGCA	2A ^m
* <i>Owm2171</i>	F: ACTCATGTCCACCGTGT R: TCGAAAGCAGCCCTCCATAT	2A ^m
* <i>Owm2172</i>	F: TGGCAATAATAGGGCTGACAG R: GCCGAATGAAGACAAAGTTATGC	2A ^m
<i>Owm2173</i>	F: CCAAGCTAATTTTCAGTTGCC R: GAGGGCTGGTTGATAGTGCT	2A ^m
* <i>Owm2174</i> (<i>DpnII</i>)	F: ACATGTTTGGTAGGCCCTTAC R: CAGGCCCTTCATTGTCTTGCA	2A ^m
<i>Owm2175</i>	F: TCGATGCTCTCAAATTGGCG R: GATGGGAATGGGGAGGCATA	2A ^m
<i>Owm2176</i>	F: AACTGCCTTGCCACCTT R: TGTGTATAAGTTCTCGGAGCGT	2A ^m
<i>Owm2177</i>	F: ATCGGATCGGGGAAAGGC R: TCCACTCAGACTTGACCCAC	2A ^m
<i>Owm2178</i>	F: GCTTCTGGTGTGTACGTGTG R: GGGTTTGAGAGTCGTAACGC	2A ^m
<i>Owm2179</i>	F: TGATCGTAGCATTTCCTCCGA R: TGAAGGGGAACAAGGGAGAC	2A ^m
<i>Owm2180</i>	F: GGGCAATGGTGAATCTGAGC R: CCAGATCAGGCCAACGACA	2A ^m

Legenda: * - markery, pre ktoré boli sekvenované PCR produkty rodičov a v prípade prítomnosti SNP boli prevedené na CAPS markery (príslušný restriktívny enzým je uvedený pod názvom markeru)

Pokračovanie Prilohy 1

Marker	Sekvencia forward (F) a reverse (R) primerov (5' → 3')	Chromozóm
<i>Owm2181</i>	F: TCTCCTCGTCAACATGCACT R: AGAAGCGTAGGGAACACACA	2A ^m
<i>Owm2182</i>	F: CCAACTCCCTCATCACCAGG R: TTCGAGTGGTGCTATGCTCA	2A ^m
<i>Owm2183</i>	F: GTGTCAAGGCATCCGTTCTG R: TCAAAACGCCGATTTTCAGTCA	2A ^m
<i>Owm2184</i>	F: GATCCGTCACCACCGTCA R: ACGACATCTATTTTCAGGCTATGC	2A ^m
<i>Owm2185</i>	F: ATCAACTCCACCACCTCCTC R: GGACATGCAACATTCCCATATCA	5A ^m
<i>Owm2186</i>	F: TGTGGCTTGCACCTTTCTTC R: TCAGGAAGTTAATGCCGCAAG	5A ^m
<i>Owm2187</i>	F: GGGAGATTGGGGAAAGTGGT R: AGAACGAGCCGACTTGACA	5A ^m
* <i>Owm2188</i>	F: CCAACCCGGTTCAGACAATG R: CCGCTCTGCAAAGTCCAATT	5A ^m
<i>Owm2189</i>	F: GAGCCACCGTCGTTGTTG R: TGAGCTTTCTTCCCGACTG	5A ^m
* <i>Owm2190</i> (<i>Mnl</i> I)	F: ACACTGGATTGGAGGAGAGA R: CCTACTACTGAACAAGCGAGG	5A ^m
* <i>Owm2191</i> (<i>Bsm</i> I)	F: AGTCCACCTTCCCAGACAAA R: TGGCAAGCTTCAAGAAATACCA	5A ^m
<i>Owm2192</i>	F: CGGTTCAAGTGCTCCAAGTG R: CCTCATCCGCATTCCAATCTG	5A ^m
* <i>Owm2193</i>	F: ACAATCCCTACCTCGACACC R: GGCGTTTTTCATGTTCCAAGC	5A ^m
<i>Owm2194</i>	F: ATCCGAGGCTATTCTGCTCC R: TCTTGGACACATCACGACCA	5A ^m
* <i>Owm2195</i> (<i>Rsa</i> I)	F: TCTCCACAGCTCCAATCTCA R: CTCTGCATCCTCCTCGTTCA	5A ^m
* <i>Owm2196</i> (<i>Hind</i> III)	F: AGAATGCATGTCCGCCATTG R: ACCACACCGAAGCTGTAGAC	5A ^m
<i>Owm2197</i>	F: GAACAGTGGCCAAAACCTG R: TTTCAGGTGGCTTCAAAACAG	5A ^m
<i>D2490</i>	F: AGTGGACAAGAATGGGAGCT R: CCGTGACTTGAAACAACCTGC	5A ^m

Legenda: * - markery, pre ktoré boli sekvenované PCR produkty rodičov a v prípade prítomnosti SNP boli prevedené na CAPS markery (príslušný restriktčný enzým je uvedený pod názvom markeru)

Príloha 2: Markery navrhnuté k zahusteniu oblasti QTL pre veľkosti zrna na chromozóme 7A^m

Marker	Sekvencia forward (F) a reverse (R) primerov (5' → 3')	IWGSC RefSeq v1.0 (bp)
<i>Owm2217</i>	F: CAACACCATAGACTGGGCATT R: TTAAACTCTGGGCTGGCTTT	7A: 118 182 473
<i>Owm2218</i>	F: GCTGAGGAGGTCGAGGTC R: AGATGAACGTCTCCTCGCTC	7A: 124 069 896
<i>Owm2219</i>	F: TCTAACCTTGCGGAACCCAT R: CTCCGTTCTTGTGCAAAATCA	7A: 127 767 511
<i>Owm2220</i>	F: TGTTTGGTCCGACTTGCATC R: AAACCACCCTCAACTCCCAA	7A: 130 398 963
<i>Owm2221</i>	F: CGACTGCGTTCCTTTGAG R: CCACCCGATGCACAACCTTA	7A: 137 781 048
<i>Owm2222</i>	F: GGCTTGGCTGATCAAAAAGAGT R: AGAGCTTAGCAGAAACACCCT	7A: 146 469 422
<i>Owm2223</i>	F: AAATAAGCCATGCCCTGCG R: ACATACACTGGCCAGACACT	7A: 148 398 621
<i>Owm2224</i>	F: CCAAGAAGGTTCCGGAGTG R: CCGCTACTCACGTCCATGT	7A: 157 396 363
<i>Owm2225</i>	F: GCGTTCATTCTAGGTTTCGT R: CTTGTGAGTTCTGACCTGCTC	7A: 161 729 315
<i>Owm2226</i>	F: AGCACATATCGAAAAGCACACA R: ATTCGATGAACACTTTTCTGGTC	7A: 167 651 566
<i>Owm2227</i>	F: GGCAAGTATGGAACCGAACA R: GCCACCTTGAACAGACCAAT	7A: 173 062 923
<i>Owm2228</i>	F: TGAGCTCATATGTTCCCGCA R: CTGAAATTTTGACACGCGGTT	7A: 181 790 635
<i>Owm2229</i>	F: TGATGAGGAGTGTGGCGC R: GCCAAGAGATGATGCTGATGT	7A: 197 991 519
<i>Owm2230</i>	F: GGATTTGTTGTATGAGCGGACA R: AGTTCCGTTTGAGTAGGCCA	7A: 198 187 809
<i>Owm2231</i>	F: ATTGTTGCCCTCTTCCCTGA R: TCAGCACTTTCATGGACTCCT	7A: 200 026 590
<i>Owm2232</i>	F: ACAAGCTCCCTTTTCCCAAG R: TTCTCGCAGGACATAGGCAT	7A: 202 830 514