

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2013**

**Alena Ryšavá**

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



**Genetické a radiační hybridní  
mapování u pšenice**

**Bakalářská práce**

**Alena Ryšavá**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2013**

**Vedoucí práce: Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením  
Mgr. Miroslava Valárika, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 26. 4. 2013

.....

Alena Ryšavá

## SOUHRN

Houbový patogen *Blumeria graminis* je původcem onemocnění zvaného padlí travní. Padlí travní je považováno za jednu z celosvětově nejzávažnějších onemocnění pšenice seté *Triticum aestivum* způsobující ekonomické ztráty na výnosu a kvalitě. Nedávno byl na dlouhém rameni chromozómu 4A identifikován gen *QPm.tut-4A* zodpovědný za rezistenci k padlí travnímu. Tento gen zvyšuje rezistenci jak klíčících, tak i dospělých rostlin a byl mapován v 10cM regionu mezi markery *wmc232* a *gwm160*. Cílem předložené práce bylo zvětšení rozlišovací schopnosti mapovací populace navýšením počtu testovaných linií a použitím radiačního mapovacího panelu. Původní rekombinantní mapovací populace, (1350 linií) z křížení kultivaru Chinese Spring a introgresní linie 8/1 nesoucí 4AL *Triticum militinae* introgresi, byla zvětšena o 256 rostlin rekombinantní F<sub>5</sub> linií 88. Na těchto 256 rostlinách byly genotypovány tři markery *gwm832*, *gwm160* a *Mag2931* z oblasti genu *QPm.tut-4A*. Marker *gwm160* byl verifikační a jevil se pouze v genotypu kultivaru Chinese Spring. Markery *gwm832* a *Mag2931* v blízkosti genu *QPm.tut-4A* segregovaly do tří různých genotypů rodičů *Triticum aestivum* kultivar Chinese Spring, *Triticum militinae* a heterozygotního genotypu. Mezi markery *gwm832* a *Mag2931* bylo zjištěno 17 potencionálních rekombinací. Druhou možností, jak zvětšit rozlišení v lokusu *QPm.tut-4A*, je konstrukce radiační hybridní mapy. 155 linií radiačního hybridního panelu pro chromozóm 4A bylo genotypováno markery *gwm832*, *gwm855*, *Mag2931* a *Mag974*. Těchto 155 linií radiačního hybridního panelu umožnilo identifikovat přibližně stejný počet přestaveb chromozómu mezi testovanými markery jako použitá rekombinační mapovací populace. Toto zjištění potvrdilo přibližně desetinásobně větší rozlišovací schopnost radiační mapovací populace oproti rekombinantní v lokusu *QPm.tut-4A*.

## SUMMARY

Disease powdery mildew is caused by fungal pathogen *Blumeria graminis* and is considered one of the most severe crop diseases of wheat worldwide. Powdery mildew causes considerable economic losses on yield and quality. Recently, a powdery mildew resistance gene *QPm.tut-4A* was mapped on the long arm of chromosome 4A in a 10cM region on 4AL chromosome between markers *wmc232* and *gwm160*. The main aim of this work was increasing of mapping resolution using recombination map enlargement and employment of radiation hybrid panel. The original recombination mapping population (1350 lines) from cross of susceptible cultivar Chinese Spring and introgression line 8/1 was enlarged of line 88 *Triticum aestivum* cultivar Chinese Spring crossed with introgression line 8/1 carrying 4AL *Triticum militinae* introgression was increased by 256 plants using recombinant F<sub>5</sub> progeny of line 88 from this mapping population. The 256 lines were genotyped by markers *gwm832*, *gwm160* and *Mag2931* of the *QPm.tut-4A* gene region. Marker *gwm160* was used for line identity verification and showed Chinese Spring genotype only. Markers *gwm832* and *Mag2931* segregated into three different genotypes of parents *Triticum aestivum* cultivar Chinese Spring, *Triticum militinae* and heterozygous genotype. 17 potential recombination events between markers *gwm832* and *Mag2931* were identified. Additional way how to enlarge resolution in the *QPm.tut-4A* locus is construction of radiation hybrid map. A 155 lines of the 4AL radiation hybrid panel were genotyped by markers *gwm832*, *gwm855*, *Mag2931* and *Mag974*. These 155 lines allowed identification of about the same number of chromosome rearrangements in the *QPm.tut-4A* locus as the recombination map. This proved about 10 fold higher resolution of the radiation map compared to the recombination map in the *QPm.tut-4A* locus.

## CÍLE PRÁCE

Předložená bakalářská práce se skládá z teoretické a praktické části. Cílem teoretické části je sepsat literární rešerši zaměřenou na téma genetické a radiační hybridní mapování u pšenice. Cílem praktické části je rozšíření rekombinantní mapovací populace a založení radiační hybridní mapy lokusu klonovaného genu *QPm.tut-4A* u pšenice seté:

- 1) rozšířit rekombinantní mapovací populaci použitím F<sub>5</sub> linie 88 genotypováním hraničních markerů a selekcí rekombinantních linií v oblasti genu *QPm.tut-4A* zodpovědného za rezistenci k padlí travnímu,
- 2) genotypování radiačního hybridního panelu pro 4AL chromozóm s vybranými markery lokusu genu *QPm.tut-4A*.

Ráda bych poděkovala především svému školiteli Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, trpělivost a cenné rady a připomínky, které mi laskavě věnoval při zpracování této předložené bakalářské práce. Můj dík patří i celému kolektivu laboratoře Molekulární cytogenetiky a cytometrie Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Olomouci za vytvoření příjemného pracovního prostředí a pomoc při práci.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	- 10 -
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	- 11 -
2.1	Pšenice setá.....	- 11 -
2.1.1	Patogeny a škůdci .....	- 12 -
2.1.2	Popis pšenice .....	- 12 -
2.1.3	Taxonomické zařazení a vznik kulturní pšenice .....	- 13 -
2.1.4	Velikost genomu .....	- 16 -
2.2	Genetické mapování .....	- 17 -
2.2.1	Genetické a fyzické mapy .....	- 17 -
2.2.2	Druhy genetických markerů .....	- 19 -
2.2.3	Mapovací populace .....	- 24 -
2.2.4	Princip genetického mapování .....	- 30 -
2.2.5	Rekombinační frekvence kolem centromery.....	- 31 -
2.3	Radiační hybridní mapování.....	- 31 -
2.3.1	Radiační mapa .....	- 33 -
2.3.2	Princip radiačního hybridního mapování .....	- 34 -
2.3.3	Radiační hybridní panel .....	- 35 -
2.3.4	Aneuploidní a deleční mapovací populace.....	- 36 -
2.3.5	Opravy zlomů .....	- 37 -
2.4	Poziční klonování genů .....	- 38 -
2.5	Genetické a RH mapování genu <i>QPm.tut-4A</i> – úvod k praktické části.....	- 38 -
3	MATERIÁL A METODIKA .....	- 42 -
3.1	Biologický materiál .....	- 42 -
3.2	Klíčení <i>in vitro</i> a sázení .....	- 42 -
3.3	Extrakce DNA .....	- 42 -
3.4	Polymerázová řetězová reakce .....	- 44 -
3.5	Polyakrylamidová elektroforéza.....	- 45 -
3.6	Štěpení PCR produktu .....	- 46 -
3.7	Genotypování mapovacích populací .....	- 46 -
4	VÝSLEDKY .....	- 47 -
4.1	Rozšiřování rekombinantní mapovací populace Chinese Spring × 8/1.....	- 47 -



4.2	Konstrukce radiační hybridní mapy lokusu <i>QPm.tut-4A</i> .....	- 50 -
5	DISKUZE.....	- 55 -
5.1	Rozšiřování rekombinantní mapovací populace Chinese Spring × 8/1.....	- 55 -
5.2	Konstrukce radiační hybridní mapy lokusu <i>QPm.tut-4A</i> .....	- 55 -
6	ZÁVĚR .....	- 58 -
7	LITERATURA.....	- 59 -
8	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	- 65 -

## 1 ÚVOD

Pšenice setá, *Triticum aestivum*, je kulturní plodina zaujímající podstatné místo ve výživě lidstva. Pěstování pšenice je výrazně ovlivňováno biotickými a abiotickými stresy, které snižují výnos a kvalitu pšenice. Jeden z nejzávažnějších celosvětově rozšířených patogenů, jenž se vyskytuje se na pšenici, je *Blumeria graminis*, který způsobuje onemocnění padlí travní. V boji proti tomuto patogenu se využívají fungicidy a odolné kultivary. Padlí travní je díky svému rychlému vývoji schopno překonávat rezistenci hostitele a stává se necitlivým i vůči používaným fungicidům. Účinná ochrana rostlin šlechtěním odolnějších odrůd vůči tomuto patogenu je hlavní výzvou modernímu šlechtitelství. Za tímto účelem se studují geny rezistence k padlí travnímu. Využití rezistentních genů se stává účinnou zbraní nejen proti patogenu, ale může být i šetrnější k životnímu prostředí. Aby bylo možné studovat interakci tohoto patogenu a hostitele, je potřeba znát geny, které se této interakce účastní. Díky pozičnímu klonování genu je získána sekvence rezistentního genu zodpovědného za určitý fenotyp ve studované populaci. Následné rozšíření mapovací populace umožní přesnou lokalizaci rezistentního genu na genetické mapě díky využití vazby fenotypu a markerů.

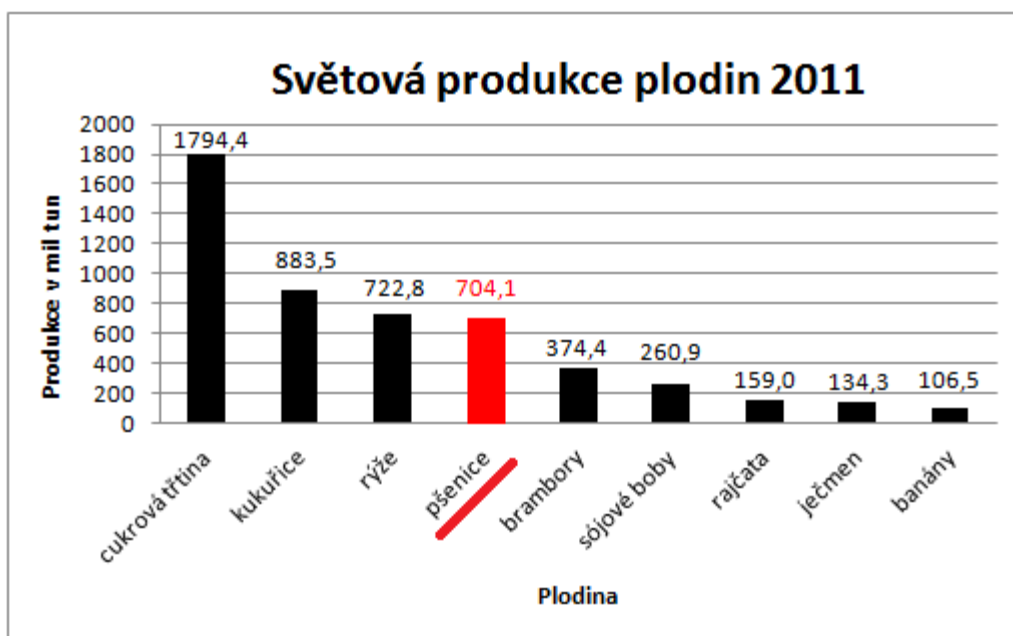
Teoretická část bakalářské práce je věnována hlavně genetickému a radiačnímu hybridnímu mapování. V kapitole „Současný stav řešené problematiky“ se setkáme s obecnými poznatky o pšenici seté, s vyvětlením toho, co jsou DNA markery. Následuje pojednání o přípravě mapovací populace nebo o principu genetického a radiačního hybridního mapování, které bylo využito v rámci praktické části bakalářské práce. Praktická část bakalářské práce se zabývá rozšiřováním rekombinantní mapovací populace s použitím rekombinantní linie 88 mapovací populace zkřížení cv. Chinese Spring s introgresní linií 8/1 nesoucí 4AL *Triticum militinae* introgresi. Tato introgrese nese gen *Q<sub>Pm.tut-4A</sub>* odpovědný za zvýšenou odolnost rostlin k padlí travnímu v stádiu klíčících i dospělých rostlin. Dalším tématem v praktické části bakalářské práce je konstrukce radiační hybridní mapy pro lokus *Q<sub>Pm.tut-4A</sub>* genu na 4AL chromozómu a genotypování radiačního hybridního panelu odvozeného z rezistentní dihaploidní linie DH400 pouze 4AL *Triticum militinae*.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Pšenice setá

Pšenice setá *Triticum aestivum* je jedna z nejdůležitějších plodin světa. Je to obilovina, z jejíchž zrn se vyrábí potraviny, jako je pečivo, cereálie, těstoviny a krupice nebo alkoholické nápoje. Její konzumace pokrývá 19 % kalorií spotřebovaných lidskou populací a je základní potravinou pro 40% lidské populace (<http://www.fao.org>). V průmyslovém odvětví se pšenice využívá jako surovina pro výrobu škrobu a lihu, v hospodářství jako krmivo pro zvířata. Zpracovává se nejen zrno, ale i stéblo. Zelené rostliny se používají jako krmivo pro zvířata a sláma jako podestýlka pro zvířata, v energetice jako tuhé biopalivo, v alternativním stavebnictví jako izolační materiál a v domácnosti slouží k výrobě dekorací. Toto široké spektrum využití pšenice vyžaduje velmi rozlehlou osevní plochu. Podle údajů FAOSTAT z roku 2011 měla pšenice celosvětově největší osevní plochu s 220 mil. Ha. Z hlediska celosvětové produkce byla pšenice v roce 2011 na čtvrtém místě mezi plodinami, jako je rýže, kukuřice a cukrová třtina (Graf 1).

**Graf 1:** Porovnání světové produkce mezi jednotlivými vybranými plodinami v roce 2011 podle údajů z <http://faostat.fao.org>



V České republice je pšenici oséváno přibližně 0,86 mil. Ha. Podle IRIWI (International Research Initiative for Wheat Improvement) stoupne poptávka pšenice do roku 2050 minimálně o 70 %. Na pokrytí této poptávky by měla světová sklizeň růst o 1,7 % ročně, ale v současnosti je to pouhé 1 %. To by měly vyřešit nové výnosnější odrůdy s vysokou výživovou hodnotou, které budou odolné vůči suchu a patogenům, jako je např. houbový patogen *Blumeria graminis* znehodnocující složení pšeničné mouky až o 50 % (<http://www.avcr.cz>, <http://www.bayercropscience.cz>, <http://selgen.cz>, <http://www.fao.org>, <http://www.uzei.cz>, Johnson a kol., 1979; Chen a Chelkowski, 1999).

### 2.1.1 Patogeny a škůdci

Patogeny a škůdci se podílejí na signifikantních ztrátách výnosu kvality pšenice. Některé produkují sekundární metabolity tzv. mykotoxiny, např. trichotheceny typu B – nivalenol a deoxynivalenol, které mohou u člověka vyvolat zažívací potíže při konzumaci kontaminované potravy. Ochranou před nežádoucími škůdci a patogeny jsou fungicidní a insekticidní přípravky, mořidla osiva a rezistentní odrůdy pšenice.

Choroby pšenice můžou být houbového, virového nebo bakteriálního původu. Mezi nejzávažnější choroby pšenice patří padlí travní, rez pšeničná a fuzáriové infekce. Pšenici postihují i další minoritní choroby, jako jsou např. sněti a braničnatka. Původcem padlí travního je houbový patogen *Blumeria graminis*, který napadá listové čepele, pochvy, stéblo i klasy. Při napadení se objeví bělavé povlaky na rostlině. Původce rzi pšeničné je houbový patogen *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, který vytváří oranžovohnědé kupky letních výtrusů na listech. Fuzáriové infekce zapříčiněné houbovým patogenem *Fusarium graminearum* způsobují bílý a oranžový vzhled obilky pšenice. Snížení výnosu pšenice může být způsobeno i parazitickými škůdci, jako je např. křísek *Psammotettix alienus* nebo kyjatka obilní *Sitobion fragariae*. Škůdci mohou parazitovat na klasech, listech a stéblech pšenice (<http://www.bayercropscience.cz>, <http://www.agromanual.cz>, Both a kol., 2005; Jansen a kol., 2007; Kolmer, 2005).

### 2.1.2 Popis pšenice

Pšenice je jednodomá rostlina, má duté stéblo s kolínky a může vyrůst 60 až 150 cm (<http://www.plantprotection.hu>). Výchozím materiálem pro genetické mapování jsou listy a obilky. Listy jsou jednoduché, střídavé, přisedlé s listovými pochvami. Čepel listu je celokrajná a čárkovitá se souběžnou žilnatinou. Na rozhraní čepele a pochvy se nachází krátký jazýček. Květy jsou uspořádané do květenství, které tvoří tzv. lichoklas. Jde o staženou

latu umístěnou na konci stopky blízko posledního listu (Obr. 1). V lichoklasu se nacházejí plevy (*gluma*), které jsou nežádoucí při výrobě potravin z pšenice, plušky (*palea superior*) a pluchy (*palea inferior*). Plodem je obilka, ve zralé formě nahá s výraznou podélnou rýhou.



**Obr. 1:** Kvetoucí lichoklasy pšenice seté

### 2.1.3 Taxonomické zařazení a vznik kulturní pšenice

V rostlinné taxonomii je pšenice setá zařazena mezi jednoděložné rostliny podle rostlinných znaků, jako je např. jedna děloha nebo souběžná žilnatina. Podle Kellogg a kol., 2001 patří pšenice setá do čeledi lipnicovité (*Poaceae*, Tab. 1).

**Tab. 1:** Zařazení pšenice seté *Triticum aestivum* ssp. *aestivum* L. podle Kellogg a kol., 2001

Jednoděložné rostliny	<i>Liliopsida</i>
Lipnicotvaré rostliny	<i>Poales</i>
Lipnicovité rostliny	<i>Poaceae</i>
BEP klada	
Podčeleď	<i>Pooideae</i>
Kmen	<i>Triticeae</i>
Rod	<i>Triticum</i>
Druh	<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>aestivum</i> L.

Rod *Triticum* je podle Slagerena 1994 rozdělen do tří skupin (Tab. 2). První skupinou jsou diploidní pšenice se 14 chromozómy, kam patří pšenice planá jednozrnka *Triticum boeoticum* Boiss. s genomem A, kulturní jednozrnka *Triticum monococcum* L. s genomem A<sup>m</sup>, *Triticum urartu* T. ex G. s genomem A<sup>u</sup>, *Aegilops speltoides* s genomem B a *Aegilops tauschii* s genomem D. Druhou skupinou jsou tetraploidní pšenice s 28 chromozómy, kam se řadí

pšenice planá dvouzrnka Emmer wheat (*Triticum dicoccoides* Körn. nebo také *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* Thell.) a její kultivovaná forma *Triticum dicoccum* Schrank. Předpokládá se, že *Triticum dicoccum* Schrank je předchůdcem téměř všech kulturních pšenic. Dále do této skupiny patří kulturní pšenice tvrdá *Triticum durum* Desf. s genomem AB, pšenice Timofejevova *Triticum timopheevii* Zhuk. s genomem AG a pšenice příbuzná k pšenici Timofejevove *Triticum militinae* s genomem AG<sup>t</sup>. *T. timopheevii* linie má omezenou distribuci a její kultivary jsou endemické pro Zakavkazsko Třetí skupinou jsou hexaploidní pšenice se 42 chromozómy, mezi něž je zařazena pšenice špalda *Triticum spelta* L. s genomem ABD, *Triticum zhukovskyi* M. et E. s genomem AAG a častokrát zmíněná pšenice setá *Triticum aestivum* L. s genomem ABD (Tab. 2).

*T. aestivum*, *T. spelta* a *T. zhukovskyi* existují pouze jako kulturní druhy. *T. turgidum* a *T. timopheevii* mají jak plané, tak i domestikované formy. *T. urartu*, *Ae. speltooides* a *Ae. tauschii* existují pouze v plané formě. (Matsuoka, 2011).

**Tab. 2:** Rozdělení rodu *Triticum* do tří skupin podle Slagerena 1994

Diploidní 2n = 14	Tetraploidní 2n = 28	Hexaploidní 2n = 42
<i>Triticum boeoticum</i> Boiss. pšenice planá jednozrnka (A)	<i>Triticum dicoccoides</i> Körn. pšenice planá dvouzrnka (AB)	<i>Triticum spelta</i> L. pšenice špalda (ABD)
<i>Triticum monococcum</i> L. pšenice kulturní jednozrnka (A <sup>m</sup> )	<i>Triticum dicoccum</i> Schrank pšenice kulturní dvouzrnka (AB)	<i>Triticum aestivum</i> L. pšenice setá (ABD)
<i>Triticum urartu</i> T. ex G. (A <sup>u</sup> )	<i>Triticum timopheevii</i> Zhuk. pšenice Timofejevova (AG)	<i>Triticum zhukovskyi</i> M. et E. (AAG)
<i>Aegilops speltooides</i> (B)	<i>Triticum durum</i> Desf. pšenice tvrdá (AB)	
<i>Aegilops tauschii</i> (D)	<i>Triticum turgidum</i> L. pšenice naduřelá (AB)	
	<i>Triticum militinae</i> (AG <sup>t</sup> )	

Domestikace pšenice nastala přibližně 10 000 let před naším letopočtem v jihozápadní Asii (Dubcovsky a Dvořak, 2007). Genetické vztahy mezi planými a kulturními pšenicemi *T. boeoticum*, *T. monococcum* a *T. turgidum* naznačují jako první místo domestikace oblast Diyarbakiru (Obr. 2) v tzv. Úrodném půlměsíci, který dnes zahrnuje Irák, Sýrii, Libanon, Jordánsko, Izrael, Egypt a Turecko (Heun a kol., 1997; Ozkan a kol., 2005; Luo a kol., 2007).

Na území České republiky se pšenice setá *Triticum aestivum* začala pěstovat s příchodem Slovanů v 6. století n. l., do té doby byla významnou plodinou kulturní pšenice *T. turgidum* (<http://www.agroweb.cz>).



**Obr. 2:** Mapa Západní Asie

V červeném kroužku je naznačena oblast Diyarbakiru.

Komplexita a flexibilita pšeničného genomu umožnila rozšíření pšenice do celého světa. Pšenice roste od Norska a Ruska 65° s.š. po Argentinu 45° j.š. V tropických a subtropických oblastech je však výskyt pšenice omezen pouze do vyšších nadmořských výšek (Lantican a kol., 2005; Dubcovsky a Dvořak, 2007). Travniny, kam patří i pšenice, se podílejí na urbanizaci krajiny. Pokrývají 20 % zemského povrchu především v mírném pásmu (Shantz, 1954). Přibližně 10 000 druhů travin je klasifikováno do 600 až 700 rodů. (Clayton a Renvoize, 1986; Watson a Dallwitz, 1999). Některé traviny byly domestikovány - např. ječmen setý *Hordeum vulgare*, žito seté *Secale cereale*, oves setý *Avena sativa*, kukuřice setá *Zea mays* L., cukrová třtina *Saccharum officinarum* a pšenice setá *Triticum aestivum*.

#### 2.1.4 Velikost genomu

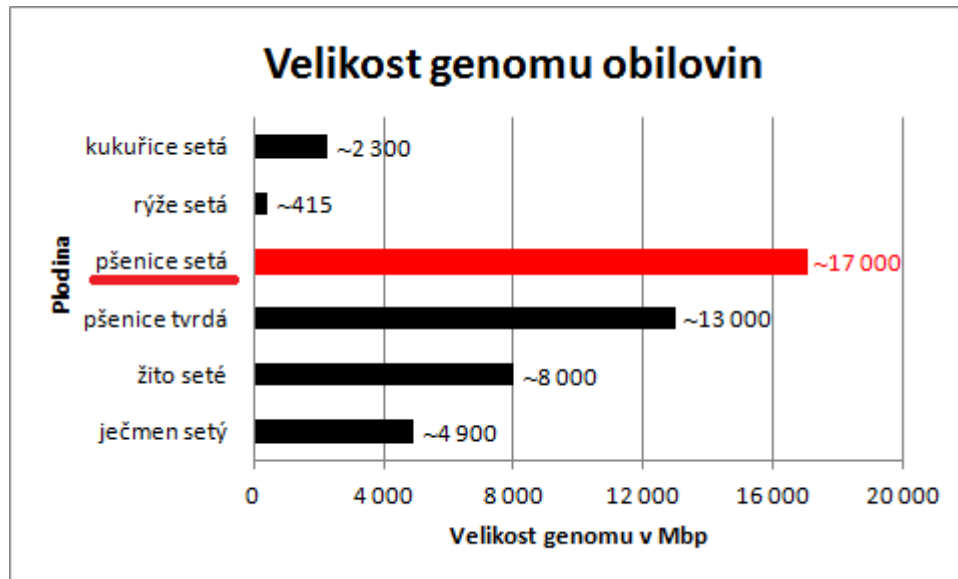
Genom je soubor úplné genetické informace zahrnující všechny geny a nekódující sekvence, které jsou charakteristické pro určitý organismus. Velikost haploidního jaderného genomu pšenice představuje ~17 tisíc Mbp, což odpovídá 17,3 pg DNA (Bennett a Smith, 1976). Ve srovnání s genomem rýže je genom pšenice čtyřicetkrát větší (Graf 2). V genomu pšenice se objevuje nadbytek vysoce repetitivních elementů DNA až 83 %, které značně komplikují analýzu pšeničného genomu (Flavell a kol., 1974; Moore a kol., 1995).

Během evoluce došlo k chromozómovým přestavbám v genomu pšenice např. k reciproké translokaci chromozómu 4A s chromozómy 5A a 7B (Devos a kol., 2009; Hernandez a kol., 2012). Naopak při cílené mezidruhové hybridizaci část žita *Secale cereale* přešla spontánně do genomu pšenice. Došlo k translokaci krátkého ramene chromozómu 1R žita. Žito tak poskytuje pšenici rezistentní geny k patogenům např. *Lr26*, ale na druhou stranu snižuje pekařskou kvalitu pšenice (Graybosch, 2001).

U pšenice je identifikováno 94 000 až 96 000 genů (Brenchley a kol., 2012) z předpokládaných 120 tisíc genů (<http://www.vesmir.cz>), ale pouze minimum je izolováno z důvodu složitosti pšeničného genomu. Mezi izolované geny patří gen *Q*, který ovlivňuje uvolňování zrn z klasů (Faris a kol., 2003), tři geny *VRN-1*, *VRN-2* a *VRN-3* odpovědné za vernalizaci (Yan a kol., 2003, 2004, 2006), gen *Ph1* kontrolující homeologní párování chromozómů (Griffiths a kol., 2006), gen *Nac* ovlivňující senescenci a obsah Zn a Fe v pšenici (Uauy a kol., 2006), gen *Nax1* regulující toleranci k salinitě (Huang a kol., 2006), gen *Rht1* redukující výšku pšenice (Peng a kol., 1999; Hedden, 2003), gen *Ppd-D1* mající vliv na fotoperiodu (Beales a kol., 2007), tři geny rezistence ke rzi pšeničné *Lr1*, *Lr10* a *Lr21* (Cloutier a kol., 2007; Feuillet a kol., 2003; Huang a kol., 2003) a gen rezistence k padlí travnímu *Pm3* (Yahiaoui a kol., 2004). Geny rezistence *Pm* k padlí travnímu jsou intenzivně studovány genetickým mapováním.



**Graf 2:** Porovnání velikosti genomu u vybraných druhů obilovin podle Arumuganathan a Earle, 1991; Bennett a Smith, 1976; <http://www.gramene.org>



## 2.2 Genetické mapování

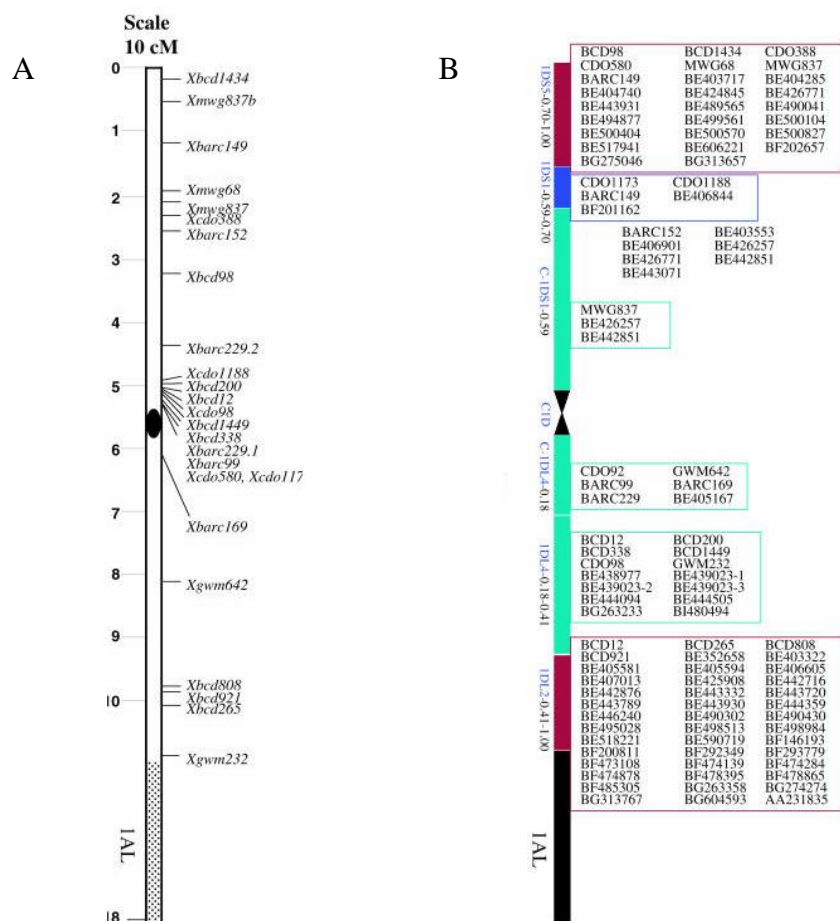
Základem genetického mapování je rekombinace mezi lokusy, které zahrnují reakci mezi homologními sekvencemi DNA v meiotické profázi. Podle Szostak a kol., 1983 je uznáván reparační model dvouvláknových zlomů vysvětlující meiotickou reciprokovou rekombinací. Na 5' koncích nesesterských chromatid vzniknou zlomy ve stejných místech. Nesesterské chromatidy se překříží a vytvoří tzv. chiasma. Neporušené homologní části chromatid jsou vyměněny na základě komplementarity. Jde o tzv. jednoduchý crossing over umožňující nové kombinace existujících alel genů na chromozómu. Chromatidy se mohou překřížit vícekrát, pak vzniká vícenásobný crossing over. U chromatid bez homologní výměny může dojít k nereciproké genové konverzi, která je problémem pro genetické mapování (Büsches a kol., 1997). V genetickém mapování se využívají genetické DNA markery různé povahy. Genetická rekombinace, která nastává mezi genetickými DNA markery, umožňuje následně lokalizaci zajímavého genu na genetické mapě.

### 2.2.1 Genetické a fyzické mapy

Pro přehledné uspořádání genetických DNA markerů se využívají genetické a fyzické mapy (Obr. 3). Genetická mapa ukazuje uspořádání genů a genetických DNA markerů podél chromozomů na základě vazebné frekvence. Vazebné vztahy podél všech chromozomů poskytují genetickou mapu. Genetické mapy jsou teoretické. Vzdálenost genů nebo markerů

na genetické mapě je vyjádřena jako procentuální odhad meiotické rekombinace mezi alelami různých lokusů. Vzdálenost na genetické mapě není rovnocenná fyzické vzdálenosti. Jednotkou vazebné frekvence na chromozómu je centiMorgan [cM], který je definován jako 1 % rekombinace mezi dvěma libovolnými genovými lokusy.

Fyzická mapa je reprezentována chromozómy, na kterých jsou geny a markery poskytující fyzickou vzdálenost měřenou v nukleotidových párech bází popřípadě v  $\mu\text{m}$ . Kompletní fyzickou mapu má pouze pět rostlinných druhů – huseníček rolní *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), rýže setá *Oryza sativa* (Yu a kol., 2004; Goff a kol., 2004), topol chlupatoplodý *Populus trichocarpa* (Tuscan a kol., 2006), réva vinná *Vitis vinifera* (Velasco a kol., 2007) a papája *Carica papaya* (Ming a kol., 2008). Fyzické mapy lze rozdělit do tří obecných typů: chromozomální nebo cytogenetické mapy, sekvenční mapy a radiační hybridní (RH) mapy. Jak genetické, tak i fyzické mapy mohou znázorňovat jen část genomu (NCBI; Kole a Abbott, 2008; Schneider cit. Meksem a Kahl, 2005; Suda, 2009).



**Obr. 3:** Srovnání genetické a fyzické mapy chromozómu 1D u pšenice

Na obrázku A je znázorněna genetická mapa chromozómu 1D pšenice. Na obrázku B je fyzická mapa chromozómu 1D, kdy v rámečcích jsou vyobrazeny sekvence označující specifický region chromozómu 1D. Převzato od Kalavacharla a kol., 2006.

## 2.2.2 Druhy genetických markerů

Genetické markery se podle zdroje dají rozdělit na fenotypové a molekulární. Molekulární markery se dále dělí na biochemické a DNA markery. Prvními genetickými markery v biologii byly fenotypové vlastnosti, např. barva a struktura povrchu osiva. V roce 1948 Lamprecht popsal první genetickou mapu s 37 markery distribuovanými do 7 vazebných skupin (shrnuto v Swiecicki a kol., 2000).

### Morfologické markery

Morfologické markery mají nejjednodušší využití v porovnání s ostatními třídami markerů. Jejich použití je velmi staré, stejně jako samotné šlechtění a výběr. Mezi tyto markery patří např. pigmentace rostlin, vernalizace nebo odpověď na patogena. Morfologické

markery se používají pro posuzování odrůd na základě zřetelného, jednotného a stabilního testování (Ardley a Hoptroff, 1969). Hlavní nevýhodou morfologických markerů je jejich nedostatek a častá závislost na vnějším prostředí. Nevýhody byly částečně překonány molekulárními markery.

#### *Biochemické markery*

Biochemické markery jsou založeny na přítomnosti/nepřítomnosti sekundárního metabolitu, proteinu nebo funkčnosti enzymu. Nejčastější jsou proteinové markery založeny na elektroforetickém proteinovém polymorfismu izoenzymů (Frei a kol., 1986, Stuber a kol., 1972). Díky malému počtu izoform proteinů, je počet izoenzymů omezen. Nevýhodou biochemických markerů je malý počet genových lokusů, které mohou být testovány na populaci; tedy technická složitost zahrnující požadavek vlastního elektroforetického a barvicího protokolu pro každý protein zvláště a problém se specifícností pletiva a fyziologického stáří rostliny. Výhodou biochemických markerů je nižší cena oproti molekulárním markerům.

#### *DNA molekulární markery*

Genetické DNA markery umožňují diagnostiku DNA sekvence mezi druhy a varetami v základním rostlinném výzkumu, jako je šlechtění rostlin zahrnující charakterizaci, genovou izolaci, markerem asistovanou introgresi alel za účelem vylepšení rostlinných odrůd (Henry, 2001). Molekulární markerové systémy mají tedy schopnost rozlišení malých změn v DNA sekvenci. Manipulace s molekulárními markery je založena na přirozeném polymorfismu nukleotidových sekvencí na jednom lokusu. DNA molekulární markery poskytují jednoduchou genotypizaci. Jde o revoluci v rostlinném šlechtění pomocí MAS tzv. markerem asistovaný výběr. Výhodou molekulárních markerů je rychlá identifikace šlechtěné linie, hybridů, kultivarů a druhů s genetickou rozmanitostí (Nguyen a Wu cit. Meksem a Kahl, 2005). Molekulární markery jsou využívány např. při odvozování fylogenetických vztahů s větší přesností než morfologické a biochemické markery.

V molekulární biologii bylo potřeba široké spektrum technologií pro stanovení genetické situace na úrovni DNA. Nejčastěji využívanými technikami pro genetickou vazebnou analýzu u rostlin jsou: jako první DNA popsán polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP, Botstein a kol., 1980) a další generace markerů založená na PCR, kam spadá náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD, Williams a kol., 1990; Welsh a McClelland, 1990) a polymorfismus amplifikované délky fragmentu (AFLP, Vos a kol., 1995). V poslední době byly vyvinuty techniky pro detekci jednonukleotidového

polymorfismu (shrnuto v Rafalski, 2002). Tyto techniky mají vysoký potenciál automatizace, jež umožňuje vysoké zahuštění genetických map molekulárními DNA markery.

#### *SNP (Single Nucleotide Polymorphism)*

Jednoduchý nukleotidový polymorfismus detekuje bodové mutace v genomu. Příčinou bodových mutací je tranzice a transverze, při nichž jde o substituci purinových a pyrimidinových bází. SNP popisuje jednotlivé pozice v bp v genomu dvou a více jedinců, tudíž mohou být zjištěny rozdíly mezi dvěma sekvencemi. SNP může být buď di, tri nebo tetra alelický. U lidí Kwok a kol., 1996 zjistili v průměru jeden SNP na jednu kb. SNP se liší mezi jednotlivými druhy. U rostlin je výzkum SNP v počátcích, ovšem kromě plodin. Např. u pšenice SNP hustota je dva SNP na jednu kb, ale může být mnohem vyšší v genech kódující enzymy např. škrob (Bhatramakki a Rafalski, 2001).

#### *SSR (Simple Sequence Repeat)*

Jednoduché opakující se sekvence, neboli mikrosatelity, jsou jednou z nejdůležitějších kategorií molekulárních markerů. SSR je technika založená na PCR a je široce používána pro DNA fingerprinting, genetické mapování, MAS, studium genetické rozmanitosti a v populační genetice (Hearne a kol., 1992; Zietkiewicz a kol., 1994). Mikrosatelitních markerů je nespočetné množství, jsou vysoce polymorfní a kodominantní. Pomocí SSR je možné rozlišit více alel najednou díky změně v počtu opakujících se jednotek složených ze 2 - 6 bp krátkých DNA sekvencí, jako je např. dinukleotid  $(AT)_n$  nebo  $(CT)_n$  či trinukleotid  $(ATT)_n$ . SSR jsou relativně rovnoměrně rozptýlené v oblastech mezi geny a nekódujícími oblastmi v celém genomu, což je jejich další výhodou (Li a kol., 2002).

#### *STS (Sequence Tagged Site)*

STS je krátká jedinečná sekvence v genomu. Tato jedinečná sekvence je specificky amplifikována pomocí PCR. Vzniklé PCR amplikony představují namnoženou DNA mezi STS. STS koncept byl navržen Olson a kol., 1989 pro genetické a fyzické mapování genů na chromozómech. Technika STS může být využita např. při studiu variability v oblasti intronů (Lem a Lallemand, 2003) STS markery jsou jak dominantní, tak i kodominantní a vytvářejí reprodukovatelný vzor na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Jako STS sekvence se využívají sekvence odvozené z klonů cDNA, které se dají dohledávat v databázi pro STS (Tsumura a kol., 1997).

### *CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)*

CAPS je technika, která spojuje výhody RFLP a PCR. Díky specifickým primerům se amplifikuje požadovaný úsek DNA. Tento konkrétní úsek je následně štěpen restriktivními endonukleázami za účelem odhalení polymorfismu. CAPS technika se převážně používá pro genotypizaci v pozičním nebo mapou asistovaném klonování genů.

### *Přehled nejčastěji používaných DNA markerů*

V tabulce 3 uvádím srovnání nejpoužívanějších molekulárních markerových technik, co se týče provozních nákladů, reprodukovatelnosti, automatizace a polymorfismu. V tabulce 3 jsou uvedeny i techniky, které nebyly výše zmíněny : *RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)* polymorfismus restriktivní délky fragmentu, *RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA)* náhodná amplifikace polymorfni DNA, *AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)* polymorfismus amplifikované délky fragmentu, *ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)* vnitřní jednoduché opakující se sekvence, *EST-SSR (Expressed Sequence Tag-derived SSR)* mikrosatelity odvozené od EST sekvence, *REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism)* a *IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism)* techniky založené na transpozónech, *SRAP (Sequence-related Amplified Polymorphism)* a *SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)* (Nguyen a Wu cit. Meksem a Kahl, 2005; Kahl a kol. cit. Meksem a Kahl, 2005; Doveri a kol. cit. Kole a Abbott, 2008).

**Tab. 3:** Srovnání nejpoužívanějších molekulárních markerových technik podle Nguyen a Wu cit. Meksem a Kahl, 2005

Markerová technika	Založeno na PCR	Polymorfismus	Dominance	Reprodukovatelnost	Automatizace	Provozní náklady
RFLP	Ne	Nízký a střední	Kodominantní	Vysoká	Nízká	Vysoké
RAPD	Ano	Střední a vysoký	Dominantní	Nízká	Střední	Nízké
AFLP	Ano	Vysoký	Dominantní	Vysoká	Střední a vysoká	Střední
SSR	Ano	Vysoký	Kodominantní	Vysoká	Střední a vysoká	Nízké
ISSR	Ano	Vysoký	Dominantní	Vysoká	Střední a vysoká	Nízké
EST-SSR	Ano	Střední	Kodominantní	Vysoká	Střední	Nízké
SNP	Ano	Extrémně vysoký	Kodominantní a dominantní	Vysoká	Vysoká	Nízké
REMAP	Ano	Vysoký	Kodominantní	Vysoká	Střední a vysoká	Nízké
IRAP	Ano	Vysoký	Kodominantní	Vysoká	Střední a vysoká	Nízké
SRAP	Ano	Střední	Kodominantní	Vysoká	Střední	Nízké
SCAR	Ano	Vysoký	Kodominantní	Vysoká	Střední	Střední
CAPS	Ano	Vysoký	Kodominantní	Vysoká	Střední	Střední

### 2.2.3 Mapovací populace

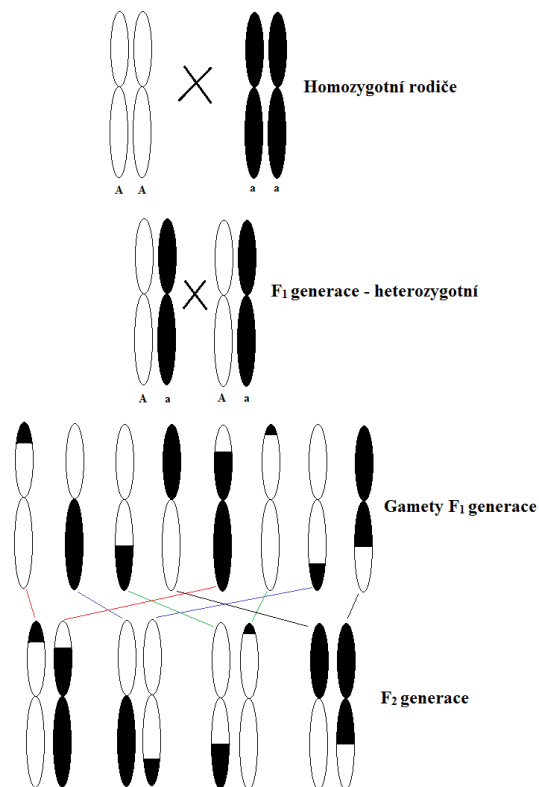
Za účelem konstrukce rekombinantních genetických map s genetickými DNA markery jsou využívány mapovací populace. Mapovací populace musí pocházet z kontrolovaného křížení mezi rodiči. Rodiče mapovací populace se musí geneticky lišit ve fenotypových znacích i v genetických markerech. Očekává se, že čím víc se bude rodičovská linie lišit, tím jednodušší bude identifikace znaků. Při konstruování mapovací populace je potřeba vzít v úvahu reprodukční cyklus rostliny. Můžeme se setkat se dvěma základními typy reprodukce: přirozená (lilek rajče, sója) nebo umělá (cukrová řepa, kukuřice); na druhé straně jsou inbredně citlivé rostliny - tzv. inkompatibilní - např. lilek brambor.

Inbredně citlivé rostliny vykazují vysokou genetickou heterozygotnost, pro takovéto druhy je proto nemožné vyrobit čisté homozygotní linie díky inbrední depresi. Pouze kompatibilní rostliny umožňují generaci linií s maximální homozygotností. Mezidruhová hybridní mohou vykazovat odchýlené chromozomové párování a potlačenou rekombinaci, což vede ke snížení vazebných vzdáleností na mapě. Proto je potřeba čisté homozygotní linie. Populace získané z homozygotních rodičů, které se využívají pro vazebné mapování, jsou:  $F_2$  populace,  $F_2$ -odvozená  $F_3$  populace, populace zpětných kříženců, dihaploidní populace, rekombinantní inbrední linie a téměř izogenní linie (Hittalmani a kol. cit. Kole a Abbott, 2008; Paran a Levin cit. Kole a Abbott 2008; Schneider cit. Meksem a Kahl, 2005).

#### *$F_2$ populace*

$F_2$  populace je nejjednodušší formou mapovací populace. Byla základem pro Mendelovy zákony. Dvě čisté homozygotní linie, které jsou výsledkem přirozeného nebo umělého inbredu, jsou vybrány jako rodiče. Jde o rodiče  $P_1$  a  $P_2$ , kteří by se měli lišit ve všech studovaných znacích. Potomstvo takového křížení se nazývá  $F_1$  generace. Pokud rodičovské linie budou pravými homozygoty, pak všichni jedinci v  $F_1$  generaci budou mít stejný fenotyp po dominantním rodiči. Jednotlivé rostliny z  $F_1$  generace po zkřížení budou produkovat  $F_2$  generaci, která bude segregovat do znaků odlišných od rodičů.  $F_2$  populace je výsledkem jediné meiózy, během které je genetický materiál rekombinovaný (Obr. 4). Nevýhodou  $F_2$  populace je, že nemůže být zachována, protože  $F_2$  rostliny mají omezenou délku života.  $F_3$  rostliny, které jsou výsledkem křížení  $F_2$  generace, jsou geneticky neidentické. Výhodou  $F_2$  populace je snadný vývoj rostlin netrpících efektem inbrední deprese.  $F_2$  populace se vyvíjí ve dvou generacích, což umožňuje segregaci všech možných genotypových kombinací.





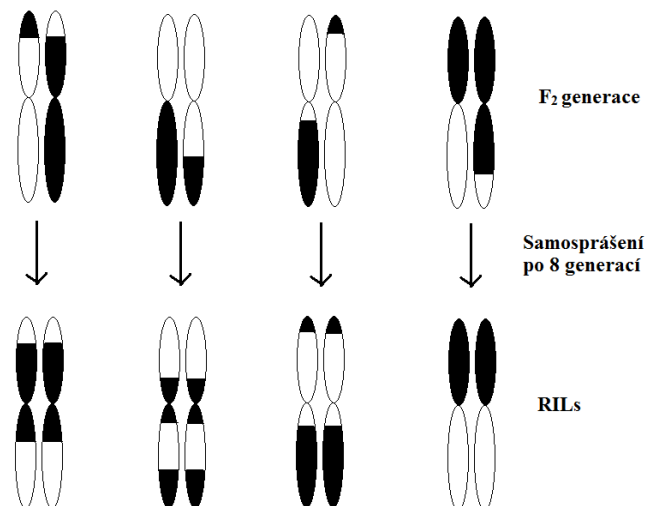
**Obr. 4:** F<sub>2</sub> populace

Na obrázku jsou znázorněny chromozómy. Bílá barva představuje dominantní znak a černá barva recesivní znak. Při zkřížení dominantně homozygotního rodiče s recesivně homozygotním rodičem vznikne F<sub>1</sub> heterozygotní populace. Genetický materiál F<sub>1</sub> gamet podstoupí meiotickou rekombinaci. Při zkřížení F<sub>1</sub> heterozygotních jedinců vzniknou jedinci s různou variantou genetické konstituce tzv. F<sub>2</sub> generace. Podle Schneider cit. Meksem a Kahl, (2005).

### *Rekombinantní inbrední linie*

RIL je rekombinantní inbrední linie u rostlin odvozená z F<sub>2</sub> populace opakovaným homozygotním samosprášením nebo od inbredního potomstva jedinců z F<sub>2</sub> populace (Obr.5). Jedno semeno každé linie je zdrojem další generace u rostlin. Jde o tzv. jednosemenný původ linie. Díky samosprášení je do šesté generace dosaženo takřka kompletní homozygotnosti. To může být hlavní výhodou trvalého zdroje, který lze přemnožovat na neurčito bez genetické změny. RIL jsou ideální pro *QTL* studie se segregacním poměrem genetických markerů 1 : 1. Výhodou RIL je vyšší pravděpodobnost fixace rekombinantního genotypu než u F<sub>2</sub> populace (Burr a Burr, 1991). RIL je nástroj pro získávání rekombinantů s požadovanými vlastnostmi od obou rodičů. Pokud se zkříží RIL s F<sub>1</sub> populací, vzniknou všechny možné genotypové

kombinace včetně heterozygotů očekávaných v F<sub>2</sub> generaci, z nichž RIL byla odvozena. RIL je udržována samosprášením a může být vyrobena novými hybridizacemi. RI linie jsou velmi levné. Nevýhodou RIL je obtížný vývoj druhů s vysokou inbrední depresí. Při mezidruhové RI populaci může dojít k neúmyslnému výběru alel od nepřízpusobeného genofondu. Nevýhodou také může být zkreslení segregančního poměru markerových nebo genových lokusů.



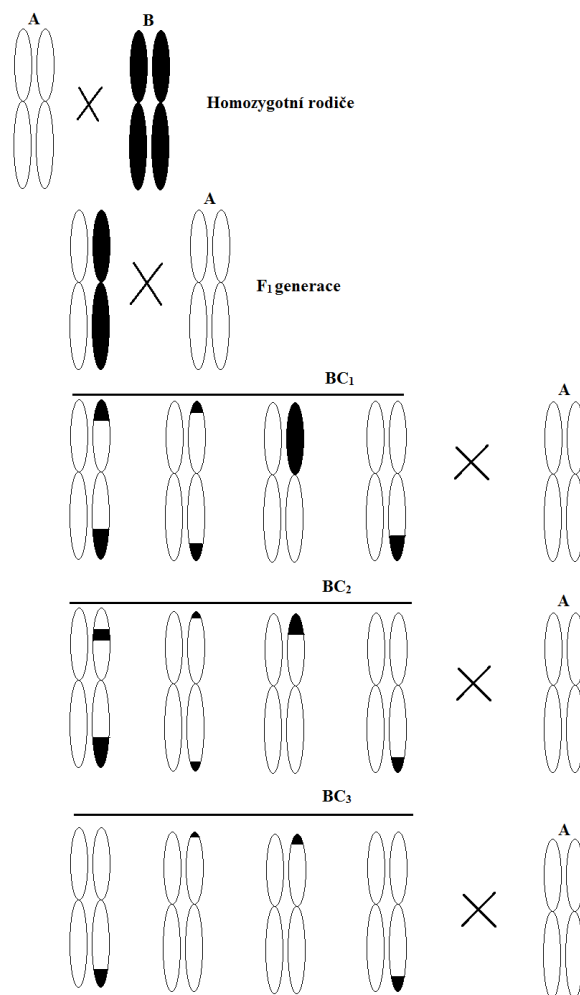
### Obr. 5: Rekombinantní inbrední linie

Rekombinantní inbrední linie je odvozena z F<sub>2</sub> generace samosprášením. V každé generaci meiotická událost vede k rekombinaci a redukcí heterozygotnosti až RILs budou mít kompletně homozygotní fragmenty. Na obrázku je šipkou znázorněno osm generací. Podle Schneider cit. Meksem a Kahl, 2005.

### Populace zpětných kříženců

Populace zpětných kříženců vzniká zpětným křížením rodiče např. B s rostlinným F<sub>1</sub> hybridem. To umožňuje analýzu specifického fragmentu DNA odvozeného od rodiče A v genetickém pozadí rodiče B. Rodič A bude dárce DNA fragmentu a rodič B bude příjemce DNA fragmentu. Během procesu zpětného křížení může dojít k separaci nevázebného donorového fragmentu pomocí segregace díky rekombinaci. Zpětné křížení se opakuje, aby byl redukován počet a velikost donorového fragmentu; jde o tzv. pokročilé zpětné křížení linií (Obr. 6). Každým krokem zpětného křížení dochází k redukcí podílu donorového fragmentu o 50 %. Zafixovaný donorový fragment je příčinou recesivních genů. Na zakončení procesu zpětného křížení je potřeba dvou kol samosprášení. Linie, která bude mít zabudovaný fragment DNA od vzdáleně příbuzných druhů, se bude nazývat introgresní,

kdežto linie se zainkorporovaným genetickým materiálem z jiné odrůdy bude označena jako meziodrůdová substituční linie. Kodominantní a dominantní molekulární markery s dominantním rodičem budou segregovat v poměru 1 : 0 a 1 : 1 (dominantní : recesivní) a s recesivním rodičem v poměru 1 : 1. Problémem mohou být dominantní markery při vazebné analýze. Pokud je alela odvozená od recipientního hybridního rodiče, budou jakékoli rekombinantní gamety zamaskované. To může být využito pro introgresní exotický genofond planě příbuzných druhů. Výhodou zpětného křížení je dvoukrokový proces. Pokročilé zpětné křížení vyžaduje jednu nebo dvě generace navíc. Skórování markerových dat je jednodušší, protože existují pouze dvě genotypové třídy. Nevýhodou zpětného křížení je časová omezenost, která je dána délkou života rostliny.

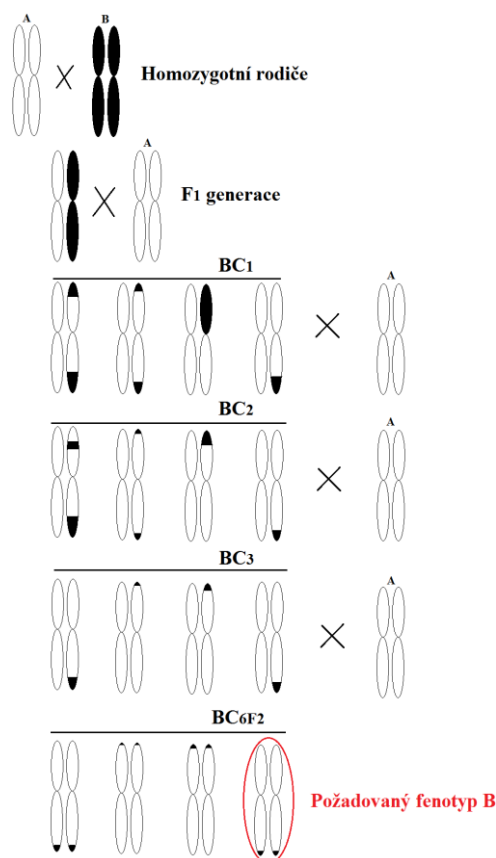


**Obr. 6:** Populace zpětných kříženců

Pokročilá populace zpětných kříženců má původ v F<sub>1</sub> generaci. F<sub>1</sub> generace je zpětně zkřížena s recipientním rodičem, který je znázorněn bílou barvou. V každém kole zpětného křížení je počet a velikost genomických fragmentů DNA redukován až na jednoduchý fragment, který pochází od donorového rodiče znázorněného černou barvou. Jednoduchý fragment je následně rozlišen zpětně zkříženou linií recipientního rodiče. Podle Schneider cit. Meksem a Kahl, 2005.

### Téměř izogenní linie

Cílem vývoje téměř izogenní linie (Nearly isogenic line, NIL) je obnovení téměř identického recipientního rodiče s požadovaným genem od donorového rodiče. Většina NIL je produkována zpětným opakovaným křížením hybridního potomstva do jednoho z původních rodičů. Rodič pak přispěje svým znakem nebo genem (Obr. 7). Když je dosaženo požadované úrovně izogenicity mezi recipientním rodičem a NIL, pak NIL je samosprášena a následně homozygotní linie jsou vyselektovány. Recipientní rodič a jeho NIL jsou totožné ve všech lokusech. Druhou metodou produkce NIL je jednosemenný původ linie SSD, kdy výběr je udržován pomocí heterozygotnosti. Po sedmou až desátou generaci SSD jsou heterozygotní linie samosprášeny a následně homozygotní sesterské linie jsou vyselektovány. Výhodou NIL je, že usnadňuje pevné mapování požadovaného genu. Za nevýhodu NIL lze považovat, že proces vyžaduje velký počet potomstva vzniklého zpětným křížením. Mezi recipientním a donorovým rodičem musí existovat genetická rozmanitost. Příprava NIL je časově náročná a pracná. NIL jsou vhodné pouze pro molekulární značení genu.

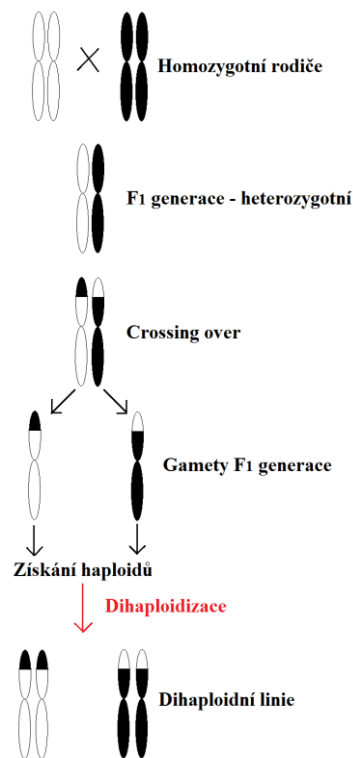


**Obr. 7:** Téměř izogenní linie

Opakované zpětné křížení hybridního potomstva do původního recipientního rodiče vede k vývoji téměř izogenní linie. Na obrázku je znázorněna  $BC_{6F2}$  linie, ve které je určitá úroveň izogenicity pro požadovaný fenotyp B. Podle Paran a Levin cit. Kole a Abbott, 2008.

### *Dihaploidní linie*

Dihaploidní (DH) linie obsahuje dvě identické sady chromozómů v každé buňce. DH linie je zcela homozygotní. DH linie je produkována z haploidní linie a vzniká spontánně, nebo je uměle indukována (Obr. 8). Haploidní rostliny jsou menší, téměř sterilní a méně vitální než diploidní rostliny. Indukce haploidů je vyvolána buď kultivováním prašníků, nebo mikrospor na speciálním médiu. Následně je dihaploidní linie generována z haploidních buněk gametofytu. U haploidních rostlin se občas chromozómové číslo zdvojnásobí spontánně, což vede k dvojnásobné haploidní linii tzv. dihaploidní linii. To může být i zapříčiněno kolchicinem. Kolchicin zabrání tvorbě dělicího vřeténka během mitózy, čímž dojde k inhibici rozchodu chromozómů. Dihaploidní linie jsou trvalým zdrojem pro mapování. Dihaploidní linie nemají zbytkovou heterozygotnost. Využívají se pro mapování pšenice, ječmene a rýže (Chao a kol., 1989; Heun a kol., 1991; McCouch a kol., 1988). Výhodou dihaploidní linie se stává pevný homozygotní stav, který je dosažen v několika generacích. Mapovací populace dihaploidů je nesmrtelná; může být udržována bez genotypové změny. Skórování markerových dat je jednoduché, protože existují pouze dvě homozygotní genotypové třídy. Nevýhodou dihaploidní linie je, že rekombinace se odhaduje pouze na základě rodičů, z kterých dihaploidi byli vyvinuti.

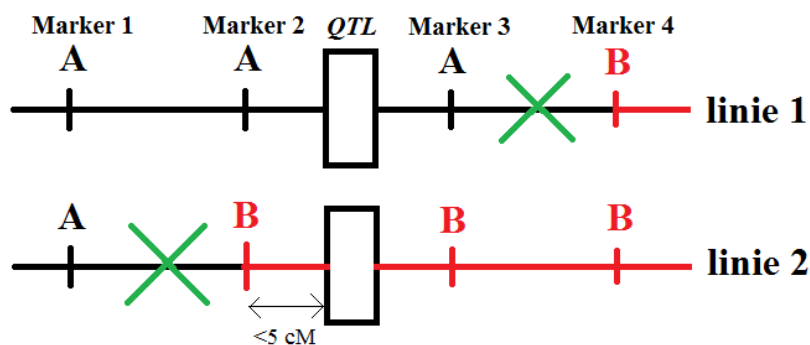


**Obr. 8:** Dihaploidní linie

Díky crossing overu vznikají rekombinované gamety F<sub>1</sub> generace, ze kterých se získají haploidní jedinci. Dihaploidní linie s fixovaným homozygotním stavem vzniká díky spontánní nebo umělé dihaploidizaci z haploidních jedinců. Podle Schneider cit. Meksem a Kahl, 2005.

## 2.2.4 Princip genetického mapování

Genetické mapování si klade za cíl identifikovat markery zodpovědné za konkrétní fenotyp na studované populaci pomocí změn v DNA. Za tímto účelem se využívá vazebné neboli rekombinační mapování. Mapování umožňuje nalezení pozice, seskupování, uspořádání a odhad vzdálenosti genů a markerů na genetické mapě. Rekombinační studie se tedy zabývá genetickou rekombinací, která zahrnuje distribuci DNA podél chromozómu, a mírou genetické vzdálenosti mezi dvojicí lokusů ve vazebné interakci. Vazba mezi dvěma lokusy je pravděpodobností každého crossingu overu během jedné meiózy. Pro genetické mapování se používají molekulární genetické DNA markery. Umístění genetických markerů ve vazbě s geny na genetické mapě má následně význam struktury, funkce a regulace studovaného genu (Obr. 9). K determinaci relativní vzdálenosti mezi genetickými markery je použita rekombinační frekvence. Rekombinace může nastat mezi kterýmikoli dvěma lokusy nebo markery na chromozómu. Pokud nedochází ke crossing overu, vznikají rodičovské gamety. Pokud ke crossing overu dojde, gamety budou rekombinované. Lokusy, které jsou umístěné na chromozómu blízko sebe, podstupují menší pravděpodobnost crossing overu a počet nerekombinujících gamet bude přesahovat rekombinované gamety. Jestliže dva lokusy budou daleko od sebe na chromozómu, rekombinace bude pravděpodobná při každém párování chromozómů (Zeng a kol. cit. Kole a Abbott, 2008; Mihovilovich a kol. cit. Kole a Abbott, 2008; Nelson cit. Meksem a Kahl, 2005).



**Obr. 9:** Schéma principu genetického rekombinačního mapování mezi markery a genem

Na obrázku jsou znázorněny dvě linie populace. U každé linie byly použity čtyři stejné markery. V linii 1 mezi markerem 3 a 4 došlo k rekombinaci (zelený křížek) a v linii 2 byla rekombinace mezi markerem 1 a 2. Díky těmto dvěma rekombinacím dojde k oddělení sledovaného genu *QTL* (Quantitative Trait Loci) od ostatních markerů. To umožňuje zjistit, kde studovaný gen leží na genetické mapě.

### **2.2.5 Rekombinační frekvence kolem centromery**

Crossing over je často potlačený v blízkosti centromery (Tanksley a kol., 1992). To umožňuje zvýšení počtu párů bází na 1cM. Vysoká hustota seskupení markerů v centromerické oblasti ukazuje nízkou úroveň meiotické rekombinace, protože tyto oblasti jsou spojeny s heterochromatinem. Heterochromatin je kondenzovaný v meióze během crossing overu. Jde o tichou neaktivní část genomu (Roberts, 1965). Čím vyšší hustota markerů v centromerické oblasti bude, tím může být nižší úroveň meiotické rekombinace. Centromerické oblasti se vyznačují velmi nízkou frekvencí rekombinace ve srovnání s telomerami (Paran a Levin cit. Kole a Abbott, 2008). Inverze a jiné chromozomální odchylky odlišující druh způsobují meiotické rekombinace, a tedy shlukování markerů na mapě (Burnham, 1962). Náhodná distribuce markerů a nízká úroveň meiotické rekombinace způsobí, že markery budou fyzicky separovány do tzv. clusteru na vazebné mapě. Negativní efekt na crossing over má flanking chromozomální sekvence, jde o tzv. centromerní efekt nebo-li efekt vlákna (Beadle, 1932). Častější rekombinace v distální části chromozómu od centromery byla navržena na základě studie (Tanksley a kol. 1992) vazebné analýzy C bandů pšenice (Curtis a Lukaszewski, 1991) a delečního mapování pšenice (Werner a kol., 1992).

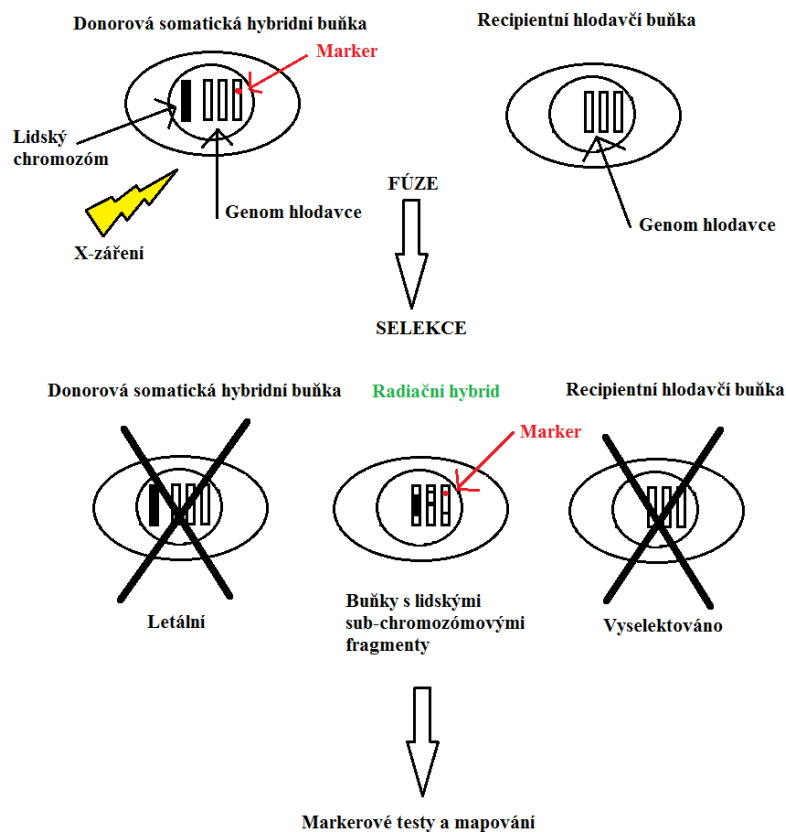
### **2.3 Radiační hybridní mapování**

Radiační hybridní mapování (RH) usnadňuje genetické mapování. RH mapování není závislé na meiotické rekombinaci. Meiotická rekombinace je v případě radiačního hybridního mapování nahrazena zlomy na chromozómech. Zlomy jsou na chromozómech vyvolané např. X-zářením. RH mapování je rychlejší v porovnání s genetickým mapováním. RH mapování nevyžaduje velký počet testovaných jedinců.

Radiační hybridní mapování je tedy nástrojem pro mapování specifické oblasti chromozómu. Používá radiačně hybridní buňky somatických linií. Podle Cox a kol. 1990 byly hybridní buňky připraveny pro konstrukci map za účelem vyššího rozlišení v savčích systémech - např. mezi hlodavcem a člověkem. X-zářením zlomí chromozóm v donorové buňce v požadovaném fragmentu, který je následně přemístěn fúzí do recipientní buňky jiného druhu. Ozářené chromozómy jsou studovány na pozadí recipientních buněk tzv. radiačních hybridů (Obr. 10). Daný fragment je pak analyzován pro přítomnost nebo absenci specifických DNA markerů poskytujících odhad frekvence zlomů nebo vzdálenost mezi dvěma markery. Metoda radiačního hybridního mapování je podobná tradičnímu genetickému mapování (Hass-Jacobus a Jackson cit. Meksem a Kahl, 2005).

RH mapování bylo poprvé popsáno Goss a Harris 1975 a 1977 a následně Benham a kol., 1989 a Cox a kol., 1990. Zářením indukované zlomy na chromozómech umožňují přestavbu molekulárních markerů na chromozómu. Markery, které jsou fyzicky blízko sebe na chromozómu, během ozáření podstupují méně chromozomových zlomů a budou mít tendenci seskupovat se pohromadě na stejném fragmentu než vzdáleně umístěné markery od sebe (Cox a kol, 1990). Fyzická vzdálenost je spočítána na základě koretenčních frekvencí mezi vzniklými chromozómovými fragmenty a molekulárními markery.

RH mapování slouží k integraci genetické a fyzické mapy. RH mapování bylo zkoumáno na kukuřici (Kynast a kol., 2002; Riera-Lizarazu a kol., 2000), ječmeni (Wardrop a kol., 2002; 2004), bavlně (Gao a kol., 2004) a pšenici pro mapování specifického genu *scs<sup>ae</sup>* (Hossain a kol., 2004c) a pro vyšší rozlišení v určité chromozómové oblasti u tvrdé pšenice *Triticum turgidum* (Kalavacharla a kol., 2006). První pokus zavést RH mapování u rostlin byl popsán Riera-Lizarazu a kol., 2000. Šlo o využití monosomického kukuřičného chromozómu 9 v linii ovsa.



**Obr. 10:** Produkce chromozómově specifických radiačních hybridů

Donorová somatická hybridní buňka je vystavena X-záření. Ozářená buňka je zřuzována s neozářenou recipientní hlodavčí buňkou např. z myši. Zřuzované buňky jsou následně kultivovány na médiu, kde přežijí pouze radiačně hybridní buňky, na obrázku s lidskými sub-chromozómovými fragmenty. RH panel je testován markery za účelem konstrukce chromozómově specifických map. Podle Walter a Goodfellow 1993.

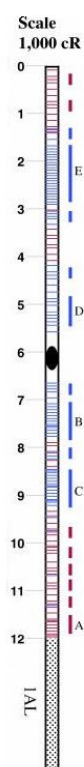


### 2.3.1 Radiační mapa

RH mapování je alternativou pro rozvoj fyzické mapy. RH mapy jsou vytvořeny na základě radiačně indukovaných zlomů na chromozómu a následné rekonstrukci pořadí markerů na chromozómu pomocí koretenční analýzy (Obr. 11). RH mapování je statistická metoda. Nejlepší mapa použitím této metody nemusí nutně odrážet aktuální pořadí markerů na chromozómu. RH mapa je odvozena od známého chromozómu (Hass-Jacobus a Jackson cit. Meksem a Kahl, 2005).

Genetické mapy mají omezené rozlišení. Genetickým mapováním není možné získat menší rozlišení než 1Mb u eukaryot (Kalavacharla a kol., 2009), protože závisí na počtu crossing overů. Genetické mapy mají omezenou přesnost mapování v oblastech snížených na rekombinaci. Proto se využívá RH mapování o různých dávkách záření, které slouží k vytvoření map s různou hodnotou rozlišení. Díky RH mapování může být rozlišeno až 100 kb na RH mapě (Schuler a kol., 1996; Stewart a kol., 1997) i v oblastech s malou pravděpodobností rekombinace. Rekombinační události nejsou rovnoměrné po celé délce chromozómu. Hot-spot se střídá s cold-spot u druhů s velkými genomy, jako je pšenice, ječmen, kukuřice. Rekombinační frekvence kolem centromery se snižuje a je blízká nule.  $\frac{1}{4}$  genomu z  $\sim 17$  Gbp pšenice představuje méně než 1 % z celkové rekombinace (Dolezel a kol., 2009).

DNA markery využívané pro RH mapování nemusí být polymorfní. Jednotky RH mapy se udávají v centiRay cR (Boehnke a kol., 1991).



**Obr. 11:** Radiační hybridní mapa chromozómu 1D pšenice

Na obrázku je znázorněna radiační hybridní mapa chromozómu 1D pšenice. Odhadnutá vzdálenost na mapě je 11 737 cR<sub>35 000</sub> s pokrytím 378 AFLP, RFLP a EST markerů. Písmena A – E značí hlavní vazebné skupiny markerů na RH mapě. Převzato od Kalavacharla a kol., 2006.

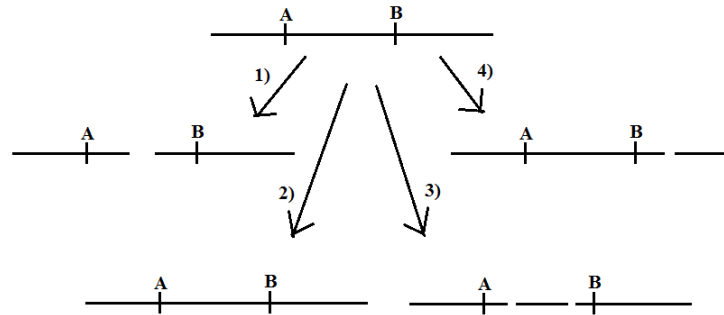
### 2.3.2 Princip radiačního hybridního mapování

Základním předpokladem RH mapování je uzavření dvou lokusů na chromozómu. U takových lokusů je pak menší pravděpodobnost zlomu indukovaného zářením. Pro RH mapování se využívá metoda momentů pro odhadnutí vzdálenosti mezi dvěma lokusy z předpokladu retence fragmentů a náhodného zlomu podél chromozómu (Cox a kol., 1990). Tzn. že pravděpodobnost zlomu pro daný interval může být převedena na  $D$  (aditivní vzdálenost)  $D = -\log(1 - \theta)$  jako analogie k Haldane funkci 1919 bez interference. Výsledné jednotky vzdálenosti pro  $D$  se nazývají Ray (Cox a kol., 1990; Boehnke a kol., 1991).

Díky zlomení fragmentu je možné určit pořadí molekulárních markerů a frekvenci zlomu jako u rekombinačního mapování. Hybrid se dvěma markery  $A$  a  $B$  může být výsledkem ze zlomu mezi  $A$  a  $B$  s retencí markerů na dvou oddělených fragmentech nebo bez zlomu mezi  $A$  a  $B$ , kdy oba markery zůstávají na jednom fragmentu. Hybrid, který přišel o oba markery, může být výsledkem buď ze zlomení mezi  $A$  a  $B$  se ztrátou dvou chromozomových fragmentů, nebo bez zlomení mezi  $A$  a  $B$  se ztrátou jednoho fragmentu obsahujícího  $A$  a  $B$  (Obr. 12). Pak se dá definovat frekvence zlomu mezi dvěma markery díky pozorovanému markeru při segregaci hybridů. Předpokládá se nezávislé zlomení mezi dvěma markery a uchováním může být odhadnuta frekvence zlomu  $\theta$ .

$$\theta = [(A^+B^-) + (A^-B^+)] / [T(R_A + R_B - 2R_AR_B)]$$

Kde  $A^+B^-$  je počet pozorovaných hybridních zlomů s markerem  $A$ .  $A^-B^+$  je počet pozorovaných hybridních zlomů s markerem  $B$ .  $T$  je celkový počet hybridů,  $R_A$  je frakce všech hybridů pro  $A$  a  $R_B$  je frakce všech hybridů pro  $B$ .  $\theta$  je analogem rekombinační frekvence v genetickém mapování. Pokud se  $\theta$  hodnota rovná 0, říká, že nedošlo ke zlomu tzv. retence. Pokud ale  $\theta$  bude mít hodnotu 1, ke zlomu došlo mezi dvěma markery tzv. delece.  $D$  zahrnuje informaci i o dávce X-záření. Např. vzdálenost 1 cR<sub>8 000</sub> mezi dvěma markery odpovídá 1 % frekvenci zlomu po vystavení na 8 000 rad X-záření (Cox a kol., 1990).



**Obr. 12:** Umístění molekulárních markerů na chromozómu po vystavení na X-záření

Na obrázku jsou vyobrazeny fragmenty s různou možností umístění dvou blízkých markerů na chromozómu po vystavení záření. Z výchozího fragmentu s markery A a B mohou vznikat po zlomení: 1) dva fragmenty a na každém fragmentu bude jeden marker, 2) ke zlomení nedojde, 3) díky dvou zlomům mezi markery A a B vzniknou tři fragmenty, z nichž jeden je bez markeru, 4) zlomením za jedním markerem vzniknou dva fragmenty, z nichž jeden nenesé žádný marker.

### 2.3.3 Radiační hybridní panel

Testovaný dárcovský genom je náhodně nafragmentován na požadované rozlišení a zřizován s recipientní buňkou do konstruktů RH mapovacího panelu. RH mapovací panel se analyzuje obvykle na PCR-založených molekulárních markerech. Markery, které chybí nebo jsou přítomny, jsou zaznamenány. Výsledný soubor dat je použit k určení pořadí a rozmístění markerů podél určitého chromozómu s větší hustotou zamapování než při genetickém mapování (Boehnke a kol., 1991; Cox a kol., 1990).

RH panely mapují všechny chromozómy určitého druhu. RH panel bude nepraktický, když počet všech chromozómů v daném druhu bude velký, nebo když nebudou k dispozici jednotlivé chromozómy. Je potřeba, aby panely byly co nejmenší a uchovávaly donorový fragment. Všechny RH panely nejsou rovnocenné díky výraznému odlišnému množství zachování DNA z dárcovské buňky (Jones, 1996). Výhodou RH panelu je využití relativně menšího počtu linií ~100 (Green, 2001; Meyers a kol., 2004) v porovnání s rekombinační mapovací metodou (Kalavacharla a kol., 2009).

### 2.3.4 Aneuploidní a deleční mapovací populace

Geny a markery jsou zamapovány na chromozómech, chromozómových ramenech a chromozómových segmentech (neboli binech) u pšenice použitím aneuploidů např. nullisomiků – chybí celý homologní pár chromozómů, monosomiků – chybí jeden chromozóm v homologním páru, trisomiků – jeden chromozóm se vyskytuje třikrát, ditelosomiků – jedno rameno chybí u obou homologních chromozómů a na sbírce delečních linií - chybí část chromozómu a substitučních linií – celý chromozóm nebo jeho část je nahrazena chromozómem nebo částí chromozómu z jiného druhu (Endo, 1990; Qi a Gill, 2001). Deleční linie jsou široce používané pro lokalizaci velkého počtu genů na různých chromozómových binech u pšenice (Hossain a kol., 2004a).

U nullitetrasomika *T. aestivum* cv. Chinese Spring byl jeden chromozóm ze subgenomu přemístěn a přidán k homolognímu protějšku chromozómu jiného subgenomu. Zkřížením *T. aestivum* cv. Chinese Spring nullitetrasomika s tetraploidní tvrdou pšenicí *T. turgidum*, a následně zpětným křížením došlo k selekci disomické substituční linie pšenice tvrdé *T. turgidum* (Joppa a Williams, 1988).

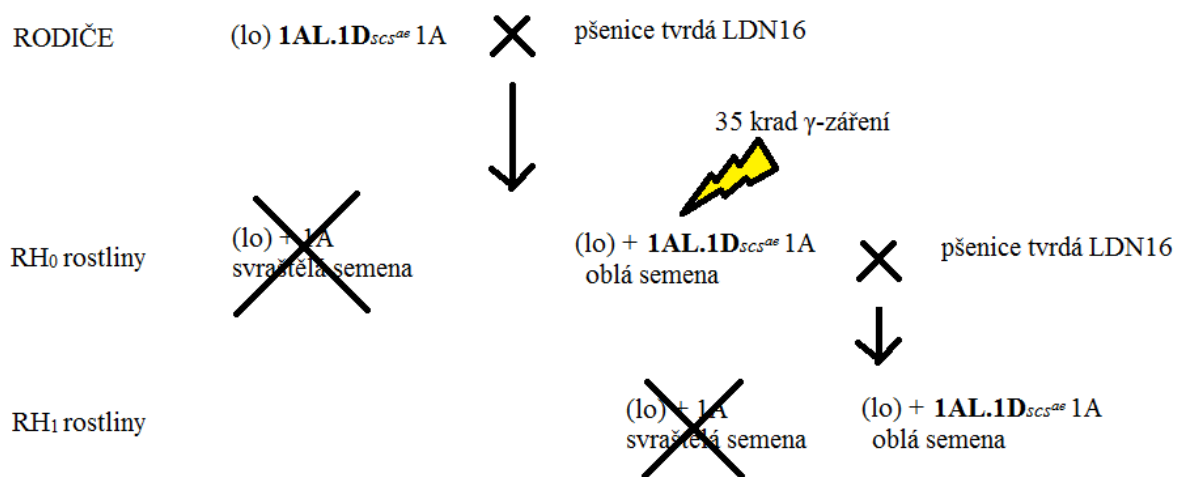
Delece vznikají díky ozáření. Dávka záření, která je použita pro RH mapování, potřebuje být vyvážená tak, aby co největší počet rostlin s delecí byl životaschopný. Pšenice je jednoznačně vhodná pro RH mapování, protože má velkou cytogenetickou zásobu. Příkladem může být 1D chromozóm s analýzou a identifikací genu *SCS* (Hossain a kol., 2004b), který je zodpovědný za kompatibilitu mezi jádrem a cytoplazmou.

Aloplasmická pšenice tvrdá obsahuje jádro z kulturní pšenice tvrdé a cytoplazmu z *Aegilops longissimum*, která přinesla 1D chromozóm. D genomový fragment je studovaný v pozadí AB genomu. Hossain a kol., 2004c použili tuto linii a demonstrovali proveditelnost RH mapování pomocí ozáření semen. Samičí sterilní hemizygotní (lo) *scs<sup>ae</sup>* linie byla zkřížena s tvrdou pšenicí linií LDN16. Vzniklá semena pak byla buď svráštělá, nebo oblá. Oblá semena obsahující gen *scs<sup>ae</sup>* byla ozářena 35 krad  $\gamma$ -zářením a poté byla ponechána k naklíčení a růstu. RH<sub>0</sub> rostliny odvozené z tohoto osiva byly zkříženy znovu do euplasmické pšenice tvrdé linie LDN16, aby byla získána RH<sub>1</sub> semena. Oblá semena z tohoto křížení byla vybrána a RH<sub>1</sub> rostliny byly pěstovány ve skleníku a použity pro extrakci DNA a analýzu použitím molekulárních markerů (Obr. 13). RH linie přinesly delece v 1D chromozómu. Byl tak vytvořen RH panel chromozómu 1D tvrdé pšenice tzv. DWRH – 1D panel (Durum Wheat Radiation Hybrid). Tento RH panel umožnil lokalizaci genu *scs<sup>ae</sup>* a slouží jako model pro budoucí a další geny pšenice, které bude potřeba lokalizovat RH mapováním (Kalavacharla a kol., 2009).

Dalším příkladem radiačního hybridního panelu může být DGRH<sub>0</sub> generace *T. aestivum* cv. Chinese Spring ozářený 35 krad. Vypěstované rostliny byly následně zkříženy se samičí linií Altar 84 *T. turgidum*. Vznikl pentaploid – radiační hybrid DGRH<sub>1</sub> generace (Riera-Lizarazu a kol., 2010).

Nebo RH panel pro chromozóm 3B pšenice, kdy byla ozářena pšenice tvrdá 350 Gray. Vzniklé rostliny byly zkříženy do aneuploidní linie, která postrádala chromozóm 3D (Kumar a kol., 2012).

V práci Zhou a kol. 2012 byly protoplasty *T. aestivum* ozářeny UV světlem a  $\gamma$ -zářením. Následně byly zfúzovány protoplasty do *Buplerum scorzonifolium* Willd. jako příjemce. Vznikly RHPWI a RHPWII panely.



**Obr. 13:** Vývoj radiační hybridní populace: DWRH – 1D panel

Na obrázku je znázorněn vývoj radiační hybridní populace pro chromozóm 1D pšenice. 1AL.1D<sub>scs<sup>ae</sup></sub> 1A je chromozómová kombinace z hemizygotní (lo) *scs<sup>ae</sup>* linie z *Aegilops longissimum* poskytující D chromozóm. Rodič 1AL.1D<sub>scs<sup>ae</sup></sub> 1A je zkřížen s pšenicí tvrdou. Vzniknou svraštělá a oblá semena představující RH<sub>0</sub> generaci. Oblá semena pšenice obsahující gen *scs<sup>ae</sup>* jsou vyselektována a ozářena 35 krad  $\gamma$ -zářením. Ozářená semena jsou následně zkřížena s pšenicí tvrdou. Vzniknou RH<sub>1</sub> rostliny. Podle Hossain a kol., 2004c.

### 2.3.5 Opravy zlomů

Vysoké dávky záření způsobí dvouvláknové zlomy v genomu. Tyto zlomy jsou opraveny reparačním mechanismem HR – homology directed repair nebo HNEJ – non-homologous end-joining tzv. nelegitimní rekombinací. Méně dvouvláknové zlomů

vzniká v heterochromatinové oblasti (Liu a kol., 2009). Zlomy v mitóze jsou častější v porovnání s crossing overem v meióze. To mohou vysvětlovat regiony kompaktního chromatinu, který může být odolnější vůči radiaci. Méně kondenzovaný chromatin tzv. euchromatin je nezbytný pro reparaci, aby mechanismus správně fungoval (Kumar a kol., 2012).

## **2.4 Poziční klonování genů**

Poziční klonování představuje experimentální postup vedoucí k izolaci sekvence DNA. Vyizolovaná sekvence DNA je zodpovědná za určitý fenotyp neznámého genu. První úspěšné klonování genů *Q* a *VRN-1* u pšenice bylo v roce 2003 (Faris a kol., 2003; Yan a kol., 2003). Pro detekci spolehlivého fenotypu se musí nejdříve odvodit mapovací populace zkřížením dvou fenotypově odlišných rodičů. Taková populace umožní lokalizaci genu na genetické mapě díky využití vazby markerů (Schneider cit. Meksem a Kahl, 2005). Lokus, ve kterém byl hledaný gen zamapován, je potřeba saturovat novými markery tak, aby hledaný gen byl co nejméně ohraničený.

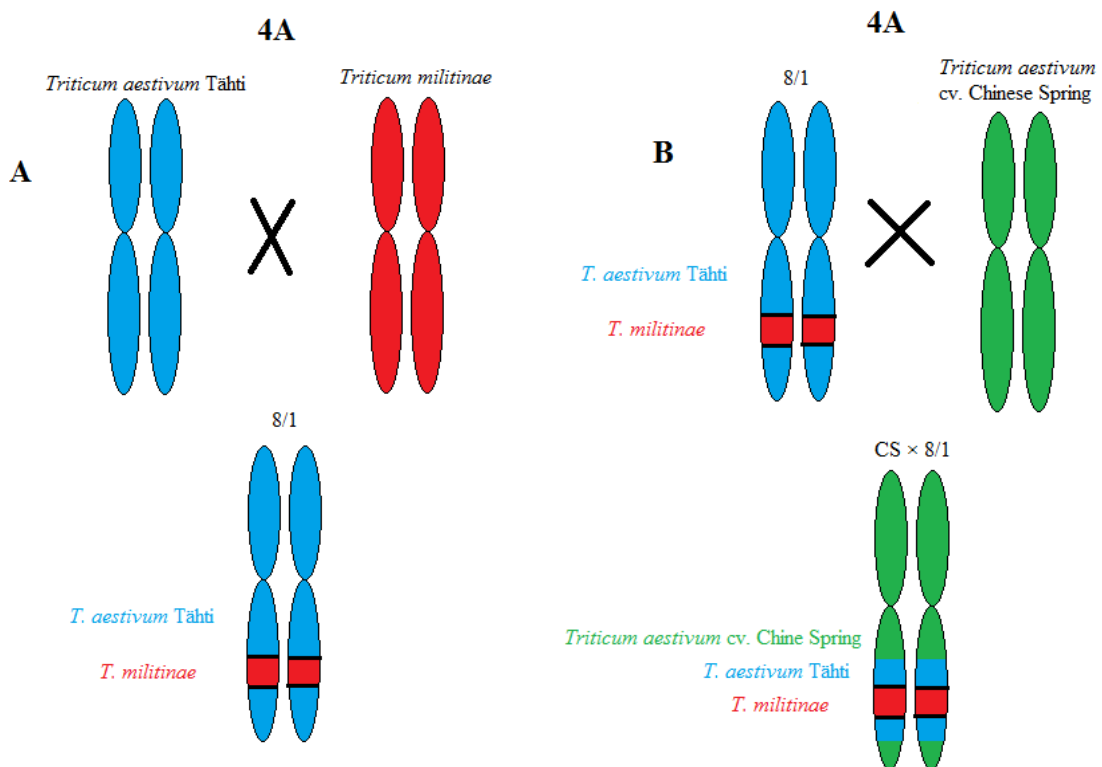
Nové markery se získají kolinearitou s příbuznými geny čeledi *Poaceae*, protože pořadí genů zůstalo během evoluce velmi konzervováno např. *Oryza sativa* L. s 430 Mb pro *T. aestivum* L. (Xu a kol., 2005; Sorrells a kol., 2003). Screening knihovny dlouhých inzertů umožní identifikovat markery v těsné vazbě s hledaným genem. Knihovny založené na bakteriálních chromozómech tzv. BAC usnadní redukci velkého genomu u hexaploidní pšenice díky cytometricky vytríděným chromozómům nebo chromozómových ramen efektivněji, než při využití druhů s nižší ploidií (Devos a kol., 2009).

Pozitivní BAC klony a jejich konce jsou osekvenovány. Získané sekvence mohou být zdrojem nových markerů. Screeningem knihovny koncovou sekvencí BAC klonu je nalezen sousední klon. Tomu se říká tzv. chromosome walking (Gresshoff 2005; Doškář, 2005). Cílem je sestavit lokální kontig a vybrat BAC klon s kandidátním genem, který je osekvenován. To umožní určit a předpovědět funkci a strukturu genu (Gresshoff, 2005; Zhang cit. Kole a Abbott, 2008). Na konci pozičního klonování se musí ověřit kandidátní gen z hlediska funkce a struktury křížením rostlin, transformací nebo RNA interferencí (Yahiaou a kol., 2004; Huang a kol., 2003).

## **2.5 Genetické a RH mapování oblasti genu *QPm.tut-4A* – úvod k praktické části**

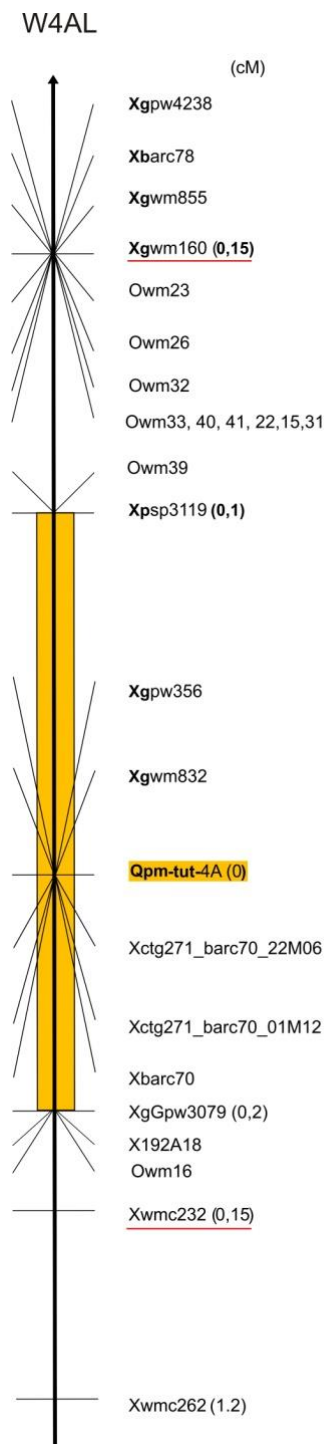
Hybridizací kultivaru *Triticum aestivum* Tähti s tetraploidní pšenicí *Triticum militinae* vznikla hybridní linie, která je rezistentní k padlí travnímu (Obr. 14). Křížením *T. aestivum*

Tähti s *T. militinae* došlo k zanesení trvalé rezistence k padlí travnímu v úseku 8/1 na chromozómu 4A. Tato vzniklá linie byla odvozena od F<sub>2:3</sub> populace, v níž byl identifikován lokus *Q<sub>Pm.tut-4A</sub>* zodpovědný za rezistenci k padlí travnímu na dlouhém rameni 4A chromozómu mezi markery *gwm160* a *wmc232* (Obr. 15). Rezistentní rostliny nesou v této oblasti mezi markery *gwm160* a *wmc232* translokovaný úsek 8/1 z *T. militinae*. Další *QTL* pro rezistenci k padlí travnímu byl detekován na 5A chromozómu pšenice (Jakobson a kol., 2006).



**Obr. 14:** Rezistentní linie k padlí travnímu

Na obrázku A je znázorněna translokace úseku 8/1 z *Triticum militinae* do chromozómu 4A *Triticum aestivum* Tähti. Tento úsek 8/1 je zodpovědný za rezistenci k padlí travnímu. Na obrázku B je znázorněna hybridizace chromozómu 4A nesoucí translokovaný úsek 8/1 s chromozómem 4A *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring. Vzniklý chromozóm je označen CS x 8/1. Populace nesoucí tyto chromozómy CS x 8/1 je využívána v rámci praktické části předložené práce.



**Obr. 15:** Genetická mapa 4AL chromozómu

Na obrázku je genetická mapa dlouhého ramene chromozómu 4A s vymezenou oblastí od *wmc232* do *gwm160*, kde leží gen *QPm.tut-4A*, který je zodpovědný za rezistenci k padlí travnímu.





### 3 MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 Biologický materiál

##### Rostlinný materiál pro genetické mapování

F5 semena mapovací populace z křížení introgresní linie 8/1 a *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring heterozygotní v oblasti genu *QPm.tut-4A*.

##### Rostlinný materiál pro radiační hybridní mapování

Nullitetrasomické linie NT4A4B a NT4A4D, rezistentní linie DH400 odvozené z introgresní linie 8/1 a nesoucí pouze 4AL *T. militinae* introgresi. Line radiačního panelu z křížení NT4A4B a NT4A4D s ozářenou linií DH400.

#### 3.2 Klíčení *in vitro* a sázení

Semena pšenice na navlhčené buničité vatě v Petriho misce byla přemístěna do chladicího boxu se 4°C na 1 den pro zahájení klíčení. Na druhý den následovalo přemístění semen v Petriho misce do termostatu BT 120M (Laboratorní přístroje Praha, ČR) se 25°C na dva dny. Po třech dnech byla klíčící semena sázena do travního substrátu - Agro speciální písčité - smíchaného s perlitem a pevným hnojivem Cererit Hortus v bedýnce s mřížkou 12 × 8 jamek. Dospělé rostliny byly hnojeny tekutým hnojivem Cererit Hobby 7,5 ml/2L a ošetřovány Confidorem WG 70 0,5g/5L proti parazitům.

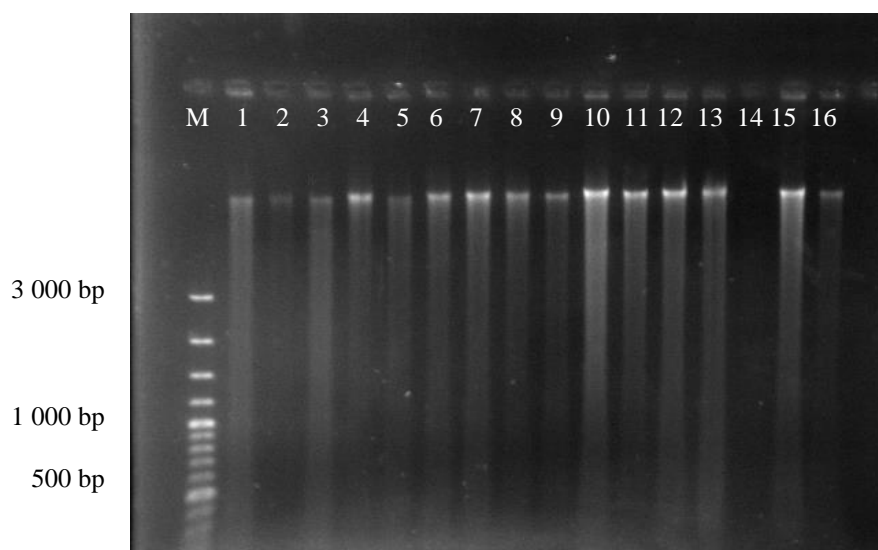
#### 3.3 Extrakce DNA

Pro extrakci DNA byly použity mladé listy pšenice. Byly odebrány tři segmenty o délce tři cm z každé rostliny do 96 ti jamkové misky s 2ml jamkami. Miska s odebranými listy byla přemístěna do termostatu BT 120M (Laboratorní přístroje Praha, ČR) se 37 °C na dva dny. Usušené listy se dvěma skleněnými kuličkami o průměru 5 mm byly homogenizovány 4 min při 27 Hz na kulovém mlýnu MM301 (Retsch, Německo). Následně ke každému vzorku byl přidán 1 ml Lysis Buffer, který byl připravený ze 100 ml Basic Lysis Buffer, 0,5 g hydrogensířičitanu sodného, 0,1 g kyseliny L-askorbové, a 1 ml 2-merkapt ethanolu. Vzorky byly lyzovány 45 min při 65 °C ve vodní lázni Grant SUB (Grant Instruments SUB, UK). Po lyzi následovala centrifugace 4 000 rpm, 10 min při 4 °C na centrifuze Juan CR4i rotor QG2,5 max 5 200 rpm (Thermo, USA).

K purifikaci DNA byl využit kit Agencourt® Genfind™ v2 Blood Binding Buffer (Beckman Coulter, USA). 100 µl lyzátu bylo smícháno s 5 µl magnetických kuliček, RNA-

sou (Invitrogen, USA) do výsledné koncentrace 0,1  $\mu\text{M}$  a 70  $\mu\text{l}$  izopropanolu. Po 5 min inkubaci při pokojové teplotě byla miska umístěna na magnetickou destičku 96 direct Inject Magnet (Beckman Coulter, USA) na 5 min. Po vyčiření byl supernatant odpipetován a magnetické kuličky byly dvakrát promyty 100  $\mu\text{l}$  70% ethanolem.

Nakonec byla DNA eluována ve 40  $\mu\text{l}$  sterilní vody mimo magnetickou destičku. Po 2 min byla miska umístěna zpět na magnetickou destičku. Po 10 min bylo přeneseno 35  $\mu\text{l}$  roztoku DNA do nové PCR misky. Úspěšnost extrakce a koncentrace DNA byla odhadnutá pomocí agarózové elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu (Obr. 17).



**Obr. 17:** Elektroforetogram 0,8% agarózového gelu z UV transluminátoru SynGene

0,8 % AGSA/TBE, barveno roztokem EtBr

Dráhy: **1 – 16** vzorky extrahované DNA (3  $\mu\text{l}$ ), **M**: 100 bp standard molekulových hmotností DNA (Gene Ruler, Fermentas) 100 ng/jamka – standard molekulové hmotnosti, Napětí: 4 V/cm

#### Chemikálie a roztoky

Basic Lysis Buffer (pH 7,2; 2L)

200 ml 5M NaCl

200 ml 1M Thris-HCl

200 ml 0,5M EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)

doplnit destilovanou vodou na 2L

Lysis Buffer (na 100 ml Basic Lysis B.)

100 ml Basic Lysis Buffer

0,5 g hydrogensířičitan sodný (Sigma-Aldrich, USA)

0,1 g kyselina L-askorbová (Sigma-Aldrich, USA)

1 ml 2% 2-merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)

#### Přístroje a zařízení

Laboratorní váha Scaltec SPO 51 (Scaltec, Německo)

Digestoř MERCI s.r.o. (MERCİ s.r.o., ČR)

### 3.4 Polymerázová řetězová reakce

V této práci byla polymerázová řetězová reakce využita pro amplifikaci požadovaných fragmentů z extrahované DNA a následnému genotypování. PCR reakční směs obsahovala 0,6 U Taq polymerázy (Finzyme, Finsko), 50mM KCl, 0,1% Triton X100, 10 mM Tris-HCl pH 8,2, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM každého dNTP, 1 μM primery (Invitrogen, USA), 0,01% o-cresolsulfonephthaleinu (Sigma-Aldrich, UK) a 1,5% sacharóza.

PCR reakce byly prováděny v 15 μl a 20 μl na vzorek podle potřeby. V každé sadě reakcí byly použity pozitivní kontroly DNA (5 ng/μl) *T. aestivum* Tähti, *T. militinae*, *T. aestivum* cv. Chinese Spring. Negativní kontrola obsahovala pouze reakční směs bez templátové DNA, která byla nahrazena sterilní vodou.

PCR reakce probíhaly v thermocyclerech PTC – 200 (MJ Research, USA) a C1000™ (Bio-Rad, USA) za následujících podmínek: počáteční denaturace 95°C 5 min, 40 cyklů: denaturace 95°C 30 s, nasedání primerů 50 – 60°C 30s, polymerace 72°C 20 – 60 s (jednotlivé teploty nasedání primerů a doba polymerace pro vybrané primery je uvedena v Tab. 4 a Tab. 5), a závěrečná polymerace 72°C 10 min.

**Tab. 4:** Použité markery a jejich podmínky PCR reakce

Marker	Primery	Teplota pro nasednutí [°C]	Doba polymerace [s]
<b>Gwm832</b>	F_TGGGTTTCTGACCATGTTTG R_GCAGAGTTGCTCATACTCAA	55	30
<b>Gwm855</b>	F_ACCTTGAGGACATACAGAAT R_AAAGGATATCTAACTCCCAC	50	20
<b>Gwm160</b>	F_TTCAATTCAGTCTTGCTTGG R_CTGCAGGAAAAAAGTACACCC	60	20
<b>Mag2931</b>	F3_GGGGGCAGAACTTGTATGAA R4_TCTTGAGGGACGTGAGGAAC	55	30
<b>Mag974</b>	F_AGCAGCAGGAGAGAGCCGACCA R_GCACAACAACCTCGTGAAAACAC	60	45

**Tab. 5:** Použité interní standardy a jejich podmínky PCR reakce

Interní standard	Primery	Teplota pro nasednutí [°C]	Doba polymerace [s]
<i>Wmm1002</i>	F_CCAGCTAGGTGGCAAGAAAC R_GGTCTGACGCTACGGCTAAG	50	20
<i>Owm23</i>	F2_CATGGTGTCCCTCGTCAAG R3_GAAGGTGGCCGTGGTGTA	55; 60	30; 45
<i>Owm16</i>	F2_CACTGCCACTTTGAGTGCAT R3_GCTTACCAAAAACGCCACAA	50; 55; 60	20; 30; 45

### Přístroje a zařízení

Flow box Gelaire HF48 (Flow Laboratories Gelaire, Austrálie)

Centrifuga Juan CRI3 multifunction rotor T20 max 4 100 rpm (Thermo, USA)

### **3.5 Polyakrylamidová elektroforéza**

Pro větší rozlišení PCR produktů byla použita nedenuaturující polyakrylamidová gelová elektroforéza v 3,5% gelu.

Polyakrylamidový gel byl připraven z 15 ml 5× TBE pufru, 15 ml směsi 40% akrylamid : N, N'-metylenbisakrylamid 19:1, 110 µl N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu a doplněné destilovanou H<sub>2</sub>O do objemu 150 ml. Pro zahájení polymerace byl ke směsi přidán 1 ml 10× peroxidisíranu amonného (APS, Promega Corporation, USA). Vzniklá směs byla ihned nalita mezi dvě skla oddělená spacerem (1 mm). Do prostoru v horní části byl vložen sto jamkový hřebínek. Polymerace gelu probíhala 40 min při pokojové teplotě. Poté byl vyndán hřebínek. Gel se skly byl přemístěn do vertikální elektroforetické aparatury C-DASG-400-50 (C.B.S. Scientific Company, Inc., USA) mezi dvě oddělené elektrodové komory pro 0,5× TBE pufr. Do anodového 0,5× TBE pufru byl přidáno ethidium bromid (Sigma Aldrich, USA) o výsledné koncentraci 0,0001%. Za účelem nasycení gelu ethidium bromidem byl spuštěn „prerun“ 300 V, 1 hod. Následně bylo do první jamky nanášeno 100 ng standardu molekulových hmotností (Gene Ruler, Fermentas) a do dalších jamek 5 µl nebo 10 µl PCR produktu. Elektroforetická separace PCR produktů probíhala 30 min při 350 V. Rozdělené DNA fragmenty podle molekulové hmotnosti byly vizualizovány pomocí dokumentačního systému Genescan (SynGene, Velká Británie).

### Chemikálie a roztoky

Polyakrylamidový gel 3,5% (150 ml)

15 ml 5× TBE pufr

15 ml směsi 40% akrylamid : N, N'- methylenbisakrylamid 19 : 1 (Bio-Rad, USA)

110 µl N, N, N', N' - tetramethylethyldiamin (TEMED, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

1 ml 10× peroxidisíran amonný

doplnit na 150 ml destilovanou vodou

### Přístroje a zařízení

Zdroj MS Major Science MP-500V (Major Science, USA)

Zdroj Biometra Standard Power Pack P25 (Biometra, Německo)

UV transluminátor Chemi Genius Bioimaging Systems (Trigon, ČR)

Elektronická multikanálová pipeta 30 µl MATRIX (Thermo Scientific, USA)

### **3.6 Štěpení PCR produktu**

Primery *Mag2931* a *Mag974* nevykazovaly mezi rodiči polymorfismus v délce fragmentu. Proto byly převedeny na CAPS markery, kdy PCR produkt byl štěpen konkrétní endonukleázou s jedním SNP. Pro primer *Mag2931* 10 000 U/ml endonukleáza DdeI C'TNAG (BioLabs, Inc., UK) a pro *Mag974* 10 000 U/ml endonukleáza HaeIII GG'CC (BioLabs, Inc., UK).

Pro každý vzorek obsahovala reakční směs 5 µl 1× PCR pufru s 1 U konkrétního enzymu a 10 µl PCR produktu. Reakční směs byla inkubována v termostatu BT 120M (Laboratorní přístroje Praha, ČR) při 37°C po 1,5 hod. Výsledné DNA fragmenty byly separovány a vizualizovány jak je popsáno v kapitole 3.5.

### **3.7 Genotypování mapovacích populací**

Rekombinantní mapovací populace F<sub>5</sub> linie 88 z křížení introgresní linie 8/1 a *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring heterozygotní v oblasti genu *QPm.tut-4A* byla standardně genotypována pomocí PCR metody viz kapitola 3.4.

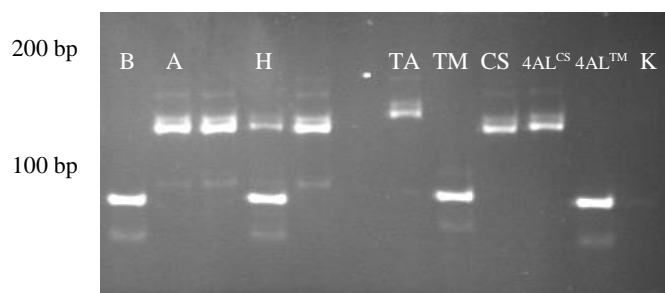
Radiační hybridní panely RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D byly genotypovány stejnou metodou, pouze navíc byly použity interní standardy (Invitrogen, USA) o koncentraci 1µM (Tab. 5). Interní standardy byly použity za účelem zajištění identifikace delecí vzniklých na chromozómech po ozáření v PCR produktech (viz kap. 3.4).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Rozšiřování rekombinantní mapovací populace Chinese Spring × 8/1

Za účelem zvýšení rozlišovací schopnosti byla rekombinantní mapovací populace dále rozšiřována použitím F<sub>5</sub> linie 88 z křížení introgresní linie 8/1 a *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring heterozygotní v oblasti genu *QPm.tut-4A*. 256 jedinců F<sub>5</sub> linie 88 heterozygotní pro oblast genu *QPm.tut-4A* zodpovědného za rezistenci k padlí travnímu byla genotypována hraničními markery. Genotypování hraničními markery v oblasti genu *QPm.tut-4A* bylo prováděno pomocí polymerázové řetězové reakce (kap. 3.4) a následně pomocí separační metody polyakrylamidové elektroforézy (kap. 3.5).

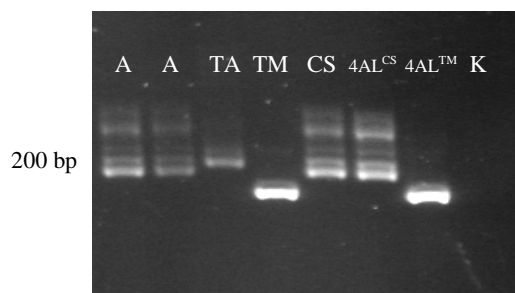
Na F<sub>5</sub> linii 88 byly testovány čtyři markery *gwm832*, *gwm160*, *Mag2931* a *Mag974* pro oblast genu *QPm.tut-4A*. V každé testovací sadě byly použity pozitivní kontroly DNA rodičů pro srovnání s testovanými vzorky a negativní kontrola. Prvním testovaným markerem byl kodominantní SSR marker *gwm832* (Tab. 4, Obr. 18).



**Obr. 18:** Elektroforetogram 3,5% polyakrylamidového gelu pro kodominantní marker *gwm832* testovaného na F<sub>5</sub> linii 88 CS × 8/1

TA – citlivý rodič cv. Tähti, TM – rezistentní rodič *T. militinae*, CS – citlivý rodič cv. Chinese Spring, DNA 4AL<sup>CS</sup> – tříděného chromozómu 4AL pro *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>TM</sup> – tříděný chromozóm 4AL s translokací *T. militinae*, K – negativní kontrola, A – rodič *T. aestivum* cv. Chinese Spring, B – rodič *T. militinae*, H – heterozygot

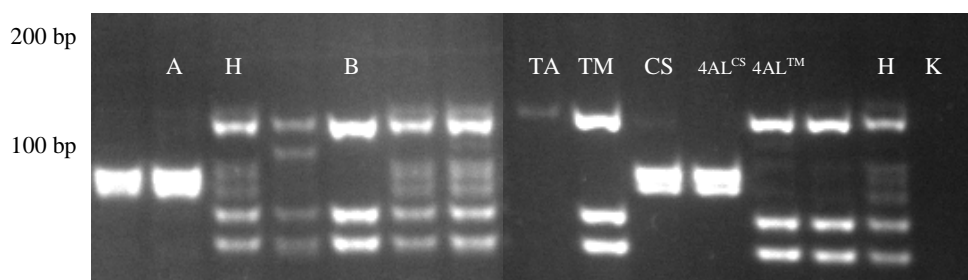
Dalším testovaným hraničním markerem byl kodominantní SSR marker *gwm160* (Tab. 4, Obr. 19), který v F<sub>5</sub> linii 88 segregoval pouze do jednoho genotypu rodiče A – *T. aestivum* cv. Chinese Spring.



**Obr. 19:** Elektroforetogram 3,5% polyakrylamidového gelu pro kodominantní marker *gwm160* testovaného na F<sub>5</sub> linii 88 CS × 8/1

TA – citlivý rodič *T. aestivum* Tähti, TM – rezistentní rodič *T. militinae*, CS – citlivý rodič *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>CS</sup> – tříděného chromozómu 4AL pro *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>TM</sup> – tříděný chromozóm 4AL s translokací *T. militinae*, K – negativní kontrola, A – rodič *T. aestivum* cv. Chinese Spring

Třetím testovaným markerem byl STS marker *Mag2931*, který nevykazoval žádný polymorfismus v délce DNA fragmentu F<sub>5</sub> linie 88. Proto byl STS marker *Mag2931* převeden na kodominantní CAPS marker (Tab. 4). Vzniklé PCR produkty byly štěpeny pomocí restriční endonukleázy DdeI (Obr. 20).

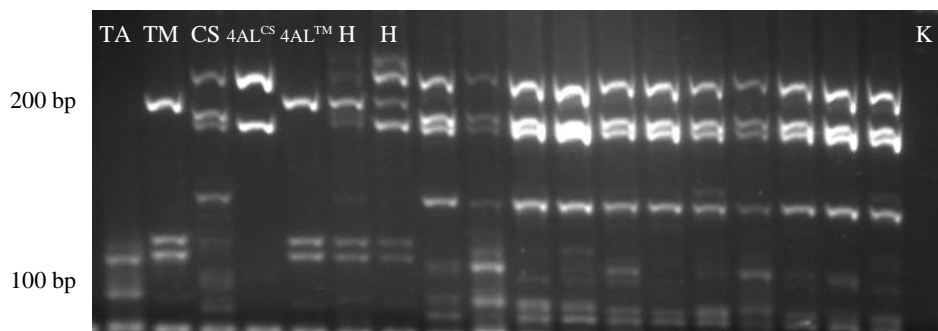


**Obr. 20:** Elektroforetogram 3,5% polyakrylamidového gelu pro kodominantní marker *Mag2931* testovaného na F<sub>5</sub> linii 88 CS × 8/1 po štěpení endonukleázou DdeI

TA – citlivý rodič *T. aestivum* Tähti, TM – rezistentní rodič *T. militinae*, CS – citlivý rodič *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>CS</sup> – tříděného chromozómu 4AL pro *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>TM</sup> – tříděný chromozóm 4AL s translokací *T. militinae*, H – heterozygot, K – negativní kontrola, A – rodič *T. aestivum* cv. Chinese Spring, B – rodič *T. militinae*

Čtvrtým testovaným markerem byl STS marker *Mag974*, který také nevykazoval polymorfismus v délce DNA fragmentu. Proto byl *Mag974* převeden na kodominantní CAPS marker (Tab. 4). Vzniklé PCR produkty byly štěpeny pomocí restriční endonukleázy HaeIII (Obr. 21). Bohužel marker se ukázal jako nespolehlivý a nedal se spolehlivě hodnotit na F<sub>5</sub> linii 88.





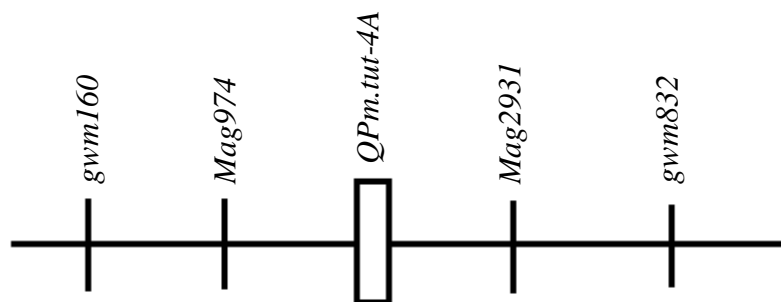
**Obr. 21:** Elektroforetogram 3,5% polyakrylamidového gelu pro kodominantní marker *Mag974* testovaného na F<sub>5</sub> linii 88 CS × 8/1 po štěpení endonukleázou HaeIII

TA – citlivý rodič *T. aestivum* Tähti, TM – rezistentní rodič *T. militinae*, CS – citlivý rodič *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>CS</sup> – tříděného chromozómu 4AL pro *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>TM</sup> – tříděný chromozóm 4AL s translokací *T. militinae*, H – heterozygot, K – negativní kontrola

**Tab. 6:** Počet rekombinací mezi markery *gwm832* a *Mag2931*

Markery	Počet rekombinací	Počet linií	Počet původních rekombinací	Počet původních linií
<i>Gwm832 – Mag2931</i>	17	256	2	1 350

Počet původní rekombinantní mapovací linie 88 CS × 8/1 tvořený z 1 350 rostlin byl navýšen o 256 rostlin. Mezi testovanými markery *gwm832* a *Mag2931* na F<sub>5</sub> linii 88 CS × 8/1 s 256 rostlinami bylo zjištěno 17 rekombinací mezi markery *gwm832* a *Mag2931* pro oblast genu *Qpm.tut-4A* (Tab. 6, Obr. 22).



**Obr. 22:** Genetická mapa lokusu genu *QPm.tut-4A* pro testované markery *gwm832*, *Mag2931* a *gwm160* na F<sub>5</sub> linii 88 CS × 8/1.

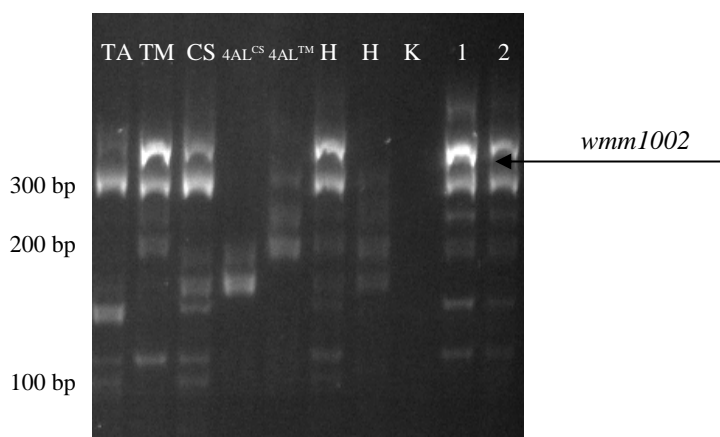
Pozice markerů *gwm832*, *gwm160*, a *Mag2931* zjištěných v této práci a pozice genu *QPm.tut-4A* a markeru *Mag974* v předpokládané pozici podle mapování na původní mapovací populaci (nepublikovaná data).

## 4.2 Konstrukce radiační hybridní mapy lokusu *QPm.tut-4A*

Za účelem založení radiační hybridní mapy lokusu *QPm.tut-4A* u pšenice seté byl genotypován radiační hybridní panel pro 4AL chromozóm. Ke genotypování byla použita rezistentní linie DH400 odvozená z introgresní linie 8/1 nesoucí pouze 4AL *T. militinae* introgresi. Tato rezistentní linie DH400 byla zkřížena do nullitetrasomické linie NT4A4B a NT4A4D. Radiační hybridní panely RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D obsahovaly vybrané citlivé a méně citlivé rostliny k padlí travnímu v počtu 155 rostlin. Radiační hybridní panely byly genotypovány vybranými markery v oblasti genu *QPm.tut-4A* zodpovědného za rezistenci k padlí travnímu. Genotypování vybranými markery v oblasti genu *QPm.tut-4A* bylo prováděno pomocí polymerázové řetězové reakce s interními standardy (kap. 3.4, 3.7) a následně pomocí separační metody polyakrylamidové elektroforézy (kap. 3.5).

Na R<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a R<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D byly testovány čtyři vybrané markery *gwm832*, *gwm855*, *Mag2931* a *Mag974* se třemi interními standardy *Wmm1002*, *Owm16* a *Owm23* pro oblast genu *QPm.tut-4A*.

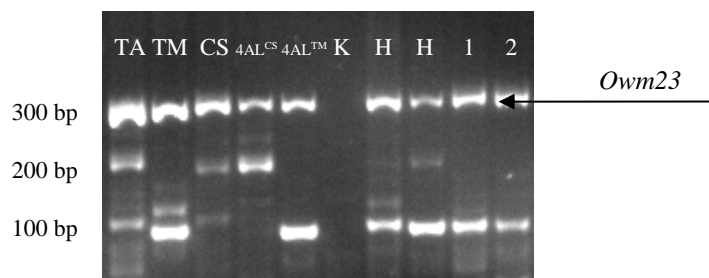
Prvním testovaným markerem na radiačních hybridních panelech RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D byl kodominantní SSR marker *gwm855* (Tab. 4) s interním standardem *wmm1002* (Tab. 5) o velikosti 300 bp (Obr. 23).



**Obr. 23:** Elektroforetogram 3,5% polyakrylamidového gelu pro kodominantní marker *gwm855* a interní standard *wmm1002* testovaného na RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D

TA – citlivý rodič *T. aestivum* Tähti, TM – rezistentní rodič *T. militinae*, CS – citlivý rodič *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>CS</sup> – tříděného chromozómu 4AL pro *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>TM</sup> – tříděný chromozóm 4AL s translokací *T. militinae*, H – heterozygot, K – negativní kontrola, 1 a 2 vzorky separované DNA z RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D

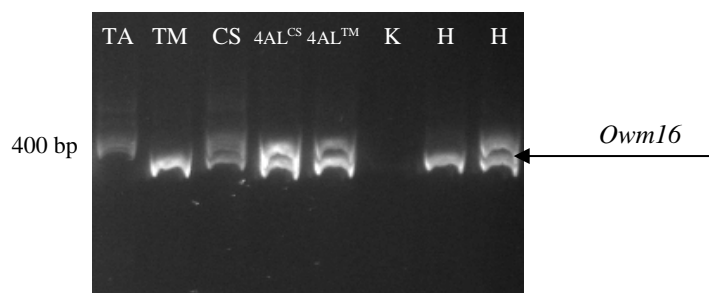
Dalším testovaným markerem na radiačních hybridních panelech RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D byl kodominantní SSR marker *gwm832* (Tab. 4) nejprve s interním standardem *Owm16* (Tab. 5) o velikosti 400 bp, který se ale neamplifikoval při PCR reakci. Proto byl použit interní standard *Owm23* (Tab. 5) o velikosti 300 bp (Obr. 24).



**Obr. 24:** Elektroforetogram 3,5% polyakrylamidového gelu pro kodominantní marker *gwm832* a interní standard *Owm23* testovaného na RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D

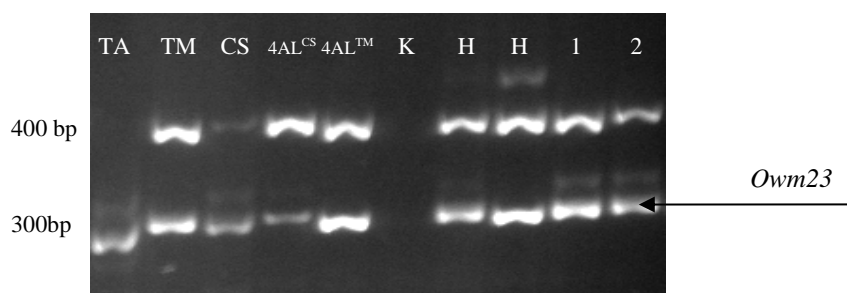
TA – citlivý rodič *T. aestivum* Tähti, TM – rezistentní rodič *T. militinae*, CS – citlivý rodič *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>CS</sup> – tříděného chromozómu 4AL pro *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>TM</sup> – tříděný chromozóm 4AL s translokací *T. militinae*, K – negativní kontrola, H – heterozygot, 1 a 2 vzorky separované DNA z RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D

Třetím a čtvrtým testovaným markerem na radiačních hybridních panelech RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D byly kodominantní STS markery *Mag2931* a *Mag974* (Tab. 4). Nejprve byly testovány markery *Mag2931* a *Mag974* s interním standardem *Owm16* (Tab. 5, Obr. 25). Interní standard *Owm16* o velikosti 400 bp nebyl vhodný pro testování s markery *Mag2931* a *Mag974* na radiačních hybridních panelech. Protože naamplifikované DNA fragmenty vzorků bez vykazujícího polymorfismu měly velikost 400 bp, tudíž u obou markerů *Mag2931* a *Mag974* se částečně DNA fragmenty překrývaly s interním standardem *Owm16* o velikosti 400 bp. Pro testování *Mag* markerů byl poté použit interní standard *Owm23* (Tab. 5) o velikosti 300 bp (Obr. 26, Obr. 27).



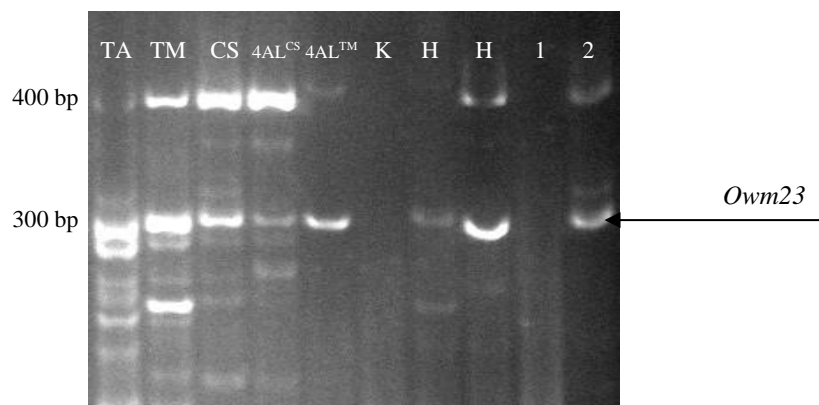
**Obr. 25:** Elektroforetogram 3,5% polyakrylamidového gelu pro kodominantní marker *Mag2931* a interní standard *Owm16* testovaného na RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D

TA – citlivý rodič *T. aestivum* Tähti, TM – rezistentní rodič *T. militinae*, CS – citlivý rodič *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>CS</sup> – tříděného chromozómu 4AL pro *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>TM</sup> – tříděný chromozóm 4AL s translokací *T. militinae*, K – negativní kontrola, H – heterozygot



**Obr. 26:** Elektroforetogram 3,5% polyakrylamidového gelu pro kodominantní marker *Mag2931* a interní standard *Owm23* testovaného na RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D

TA – citlivý rodič *T. aestivum* Tähti, TM – rezistentní rodič *T. militinae*, CS – citlivý rodič *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>CS</sup> – tříděného chromozómu 4AL pro *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>TM</sup> – tříděný chromozóm 4AL s translokací *T. militinae*, K – negativní kontrola, H – heterozygot, 1 a 2 vzorky separované DNA z RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D



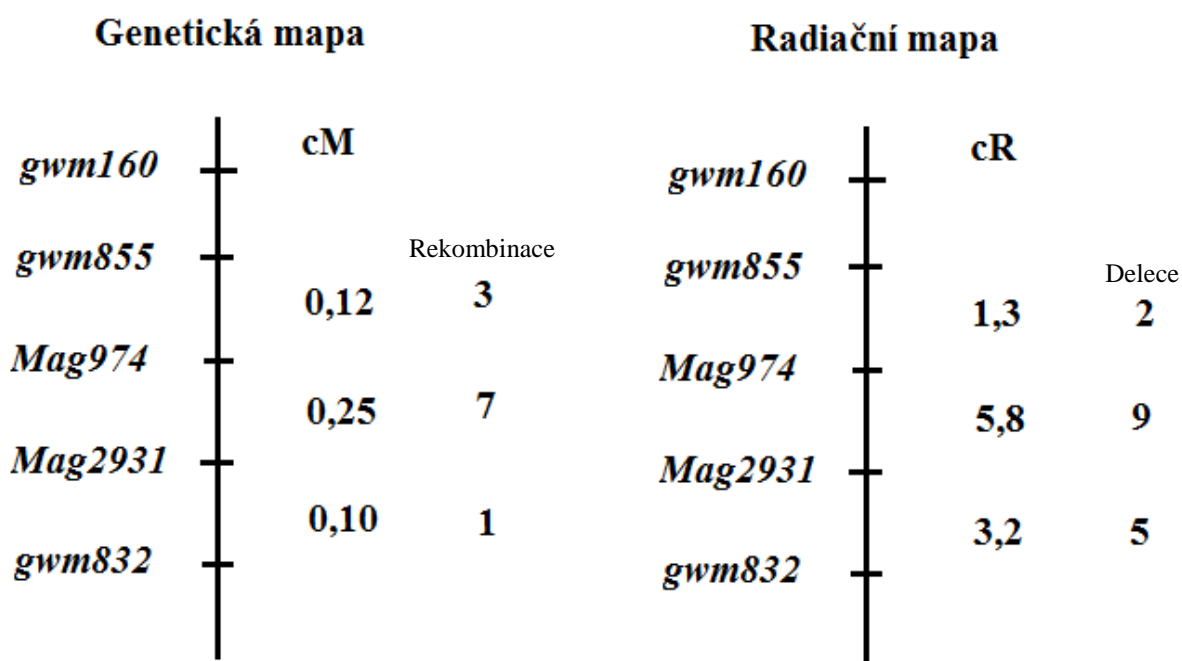
**Obr. 27:** Elektroforetogram 3,5% polyakrylamidového gelu pro kodominantní marker *Mag974* a interní standard *Owm23* testovaného na RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D

TA – citlivý rodič *T. aestivum* Tähti, TM – rezistentní rodič *T. militinae*, CS – citlivý rodič *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>CS</sup> – tříděného chromozómu 4AL pro *T. aestivum* cv. Chinese Spring, 4AL<sup>TM</sup> – tříděný chromozóm 4AL s translokací *T. militinae*, K – negativní kontrola, H – heterozygot, 1 a 2 vzorky separované DNA z RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D

**Tab. 7:** Výčet zlomů mezi markery *gwm832*, *gwm855*, *Mag2931* a *Mag974* pro RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D na 155 rostlin

Marker-marker	Počet zlomů NT4A4B	Počet zlomů NT4A4D	Počet zlomů celkem	cR
<i>Gwm855-Mag974</i>	1	1	2	1,3
<i>Mag974-Mag2931</i>	6	3	9	5,8
<i>Mag2931-gwm832</i>	4	1	5	3,2

Mezi testovaným marker *gwm855* a *Mag974* byly zjištěny 2 zlomy, mezi *Mag974* a *Mag2931* bylo zjištěno 9 zlomů a mezi *Mag2931* a *gwm832* bylo zjištěno 5 zlomů celkem na 155 rostlinách. Radiační hybridní panely RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D přispěly k rozlišení mezi markery *gwm855* a *Mag974* 1,3 cR, mezi markery *Mag974* a *Mag2931* 5,8 cR a mezi *Mag2931* a *gwm832* 3,2 cR na radiační hybridní mapě 4AL chromozómu pro oblast genu *QPm.tut-4A* (Tab. 7, Obr. 28).



**Obr. 28:** Srovnání genetické a radiační mapy pro 4AL chromozóm mezi markery *gwm855*, *Mag974*, *Mag2931* a *gwm832* v lokusu *QPm.tut-4A* zodpovědného za rezistenci k padlí travnímu

Na genetické mapě 4AL chromozómu byly u původní rekombinantní mapovací populace 3 rekombinace mezi markery *gwm855* a *Mag974* se vzdáleností 0,12 cM, 7 rekombinací mezi markery *Mag974* a *Mag2931* se vzdáleností 0,25 cM a 1 rekombinace mezi markery *Mag2931* a *gwm832* se vzdáleností 0,10 cM (nepublikovaná data). V této předložené práci byla konstruována radiační mapa 4AL chromozómu na radiačních hybridních panelech RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D. Mezi markery *gwm855* a *Mag974* byly zjištěny 2 delece se vzdáleností 1,3 cR, mezi markery *Mag974* a *Mag2931* 9 delecí se vzdáleností 5,8 cR a mezi markery *Mag2931* a *gwm832* 5 delecí se vzdáleností 3,2 cR. Rozlišovací schopnost radiační mapovací populace je přibližně desetkrát větší oproti rekombinantní mapovací populaci v lokusu *QPm.tut-4A*.

## 5 DISKUZE

### 5.1 Rozšiřování rekombinantní mapovací populace Chinese Spring × 8/1

*Gen QPm.tut-4A* zodpovědný za rezistenci k padlí travnímu *Blumeria graminis* DC. f sp. *tritici* pro klíčící a dospělé rostliny byl zamapován v distální části dlouhého ramene chromozómu 4A mezi hraniční markery *wmc232* a *gwm160* (Jakobson a kol., 2006).

V této práci byl použit hraniční marker *gwm160* na F<sub>5</sub> linii 88 mapovací populace z křížení cv. Chinese Spring × 8/1 k ověření identity použité linie, která v tomto markeru nese segregovala a měla genotyp rodiče A - cv. Chinese Spring. Dále byly testovány dva další markery *gwm832* a *Mag2931* z blízkosti genu *QPm.tut-4A*. Oba testované markery *gwm832* a *Mag2931* segregovaly do tří genotypů: A - *T. aestivum* cv. Chinese Spring, B - *T. militinae* a H - heterozygot. Všechny tři markery *gwm160*, *gwm832* a *Mag2931* byly testovány na 256 rostlinách F<sub>5</sub> linie 88 CS × 8/1 rozšiřující původní rekombinantní mapovací populaci mezi markery *gwm832* a *Mag2931* linie 88 CS × 8/1 s 1 350 rostlinami. Původní počet linií mapovací populace byl navýšen o 19 % rostlinami F<sub>5</sub> linie 88 CS × 8/1. Mezi markery *gwm832* a *Mag2931* bylo zjištěno 17 potencionálních rekombinantních jedinců z 256 rostlin. Z porovnání s jedním rekombinantem na 1 350 rostlin původní linie 88 CS × 8/1 vyplynulo, že bude potřeba těchto 17 rekombinantů ověřit v další práci, zda jsou skutečně rekombinantní. U třetího testovaného hraničního kodominantního markeru *Mag974* v blízkosti genu *QPm.tut-4A* byl pozorován nereprodukovatelný výskyt amplikonů s posunem v segregaci k rodiči A. Tato pozorování naznačují výskyt duplicitní alely, anebo nedostatečnou specifickost použitého páru primerů. Proto byl tento marker z testování vyloučen a bude podroben další optimalizaci.

### 5.2 Konstrukce radiační hybridní mapy lokusu *QPm.tut-4A*

Radiační hybridní mapování usnadňuje genetické mapování díky náhodně vzniklým zlomům na chromozómu po vystavení  $\gamma$ -záření. Na rozdíl od genetického mapování není RH mapování závislé na meiotickém crossing overu, který je však nahrazen náhodně vzniklými zlomy v chromozómu. Testované markery na radiačním panelu nemusí vykazovat polymorfismus, protože jsou testovány pouze na presenci či absenci. Pro spolehlivé určení absence je nutné do testování zařadit interní standard. Ke genotypování formou přítomnosti a chybění zlomů postačí malý počet testovaných delečních linií. Radiační hybridní mapa je mutací genetické mapy, která přispívá k požadovanému rozlišení mezi markery

kolem studovaného genu *QPm.tut-4A*. Díky frekvenci zlomů ve fragmentech DNA lze následně určit pořadí molekulárních markerů.

V této práci byla konstruována radiační hybridní mapa lokusu *QPm.tut-4A* na 155 RH liniích a bylo dosaženo přibližně stejného rozlišení jako s 10 × větší rekombinantní mapovací populací. Ke konstrukci RH mapy byly využity rostliny ze semen rezistentní linie DH400 odvozená z introgresní linie 8/1 nesoucí pouze 4AL *T. militinae* introgresi ozářená dávkou 25 krad  $\gamma$ -zářením a křížená do nullitetrasomické linie NT4A4B a NT4A4D. Z radiačních hybridních panelů RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D bylo náhodně vybráno 75 rostlin z křížení s NT4A4D a 80 rostlin z křížení s NT4A4B. Mezi 4 testovanými markery bylo zjištěno 16 chromozómových zlomů.

Pro srovnání Hossain a kol., 2004c studovali gen *scs<sup>ae</sup>*, který je zodpovědný za kompatibilitu jádra s cytoplasmou u pšenice na radiačním panelu RH<sub>1</sub> (lo) 1AL.1D*scs<sup>ae</sup>* pro chromozóm 1D s 87 jedinci. Hossain a kol., 2004c testovali 39 molekulárních markerů, mezi kterými zjistili 88 radiačně vyvolaných zlomů 35 krad  $\gamma$ -zářením. Dosáhli 10× větší rozlišení než předešlé studie zabývající se tímto *scs<sup>ae</sup>* genem. Kalavacharla a kol., 2006 dosáhli až 27× vyššího rozlišení při mapování na chromozómu 1D u tetraploidní pšenice *T. turgidum* L. Kavalacharla a kol., 2006 použili radiační panel DWRH-1D (viz kap. 2.3.4) s 87 liniemi. Kalavacharla a kol., 2006 testovali 378 molekulárních markerů a detekovali 2 312 chromozómových zlomů vyvolaných 35 krad  $\gamma$ -zářením. Toto zjištění je potvrzením velkého potenciálu v použití radiačních hybridních map k mapování s vysokou hustotou a rozlišením.

Pro konstrukci radiační hybridní mapy 4AL chromozómu byly vybrány markery *gwm832*, *gwm855*, *Mag2931* a *Mag974*, které byly nejdříve optimalizovány s interními standardy *Owm16*, *wmm1002* a *Owm23*. Testování markerů s interními standardy bylo problematické. Došlo ke zjištění, že interní standard *Owm16* nebyl vhodný pro žádný z testovaných markerů z důvodu nedostatečné amplifikace při PCR reakci nebo překrývání separovaných fragmentů DNA v polyakrylamidovém gelu. Příčinou nedostatečné amplifikace může být nevhodně zvolená teplota nasednutí primerů nebo doba polymerace. Druhý interní standard *wmm1002* se amplifikoval jen v přítomnosti markeru *gwm855*. Nejvhodnějším interním standardem pro markery *gwm832*, *Mag2931* a *Mag974* byl interní standard *Owm23* o velikosti 300 bp, který ale nebyl vhodný pro marker *gwm855*. Již výše zmíněná nedostatečná specifita primerů markeru *Mag974* (kap. 5.1) neovlivnila genotypování, protože nebyl zapotřebí polymorfismus alel. Rozlišení mezi testovanými markery kolem studovaného genu *QPm.tut-4A* bylo spočítáno podle Cox a kol. (1990). Frekvence zlomů byla přijatelná na delečních liniích radiačních hybridních panelů RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 ×



NT4A4D. Protože radiační hybridní mapa chromozómu 4AL v oblasti genu *Q<sub>Pm.tut-4A</sub>* je v počátcích, bude potřeba zahustit radiační hybridní mapu 4AL chromozómu dalšími markery, které přispějí k většímu rozlišení a následnému usnadnění klonování genu *Q<sub>Pm.tut-4A</sub>* zodpovědného za rezistenci k padlí travnímu u pšenice seté.

## 6 ZÁVĚR

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo sepsat literární rešerši na téma genetické a radiační hybridní mapování u pšenice. Teoretická část se zabývá nejčastěji využívanými DNA markery, přípravou mapovacích populací a principem jak genetického, tak i radiačního hybridního mapování. Cílem praktické části bakalářské práce bylo rozšíření rekombinantní mapovací populace a konstrukce radiační hybridní mapy lokusu *QPm.tut-4A* zodpovědného za rezistenci k padlí travnímu u pšenice seté.

Původní rekombinantní mapovací populace linie 88 CS × 8/1 s 1 350 rostlinami byla rozšířena o 256 rostlin použitím rekombinantní F<sub>5</sub> linie 88 z mapovací populace CS × 8/1. Těchto 256 rostlin bylo genotypováno pomocí dvou SSR (*gwm832*, *gwm160*) a jednoho STS markeru (*Mag2931*) ohraničujících gen *QPm.tut-4A*. Genotypování markerem *gwm160* byla ověřena identita použité linie. Mezi testovanými markery *gwm832* a *Mag2931* bylo vyselektováno 17 rekombinantních jedinců, které bude potřeba ověřit v navazující práci za účelem následně dalšího rozšíření rekombinantní mapovací populace

Pro zvýšení rozlišovací schopnosti mapovací populace v *QPm.tut-4A* lokusu byla konstruována radiační hybridní mapa. Pro konstrukci radiační mapy bylo vybráno 75 RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D linií a 80 linií RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B. Tyto vybrané rostliny byly genotypovány pomocí markerů *gwm832*, *gwm855*, *Mag2931* a *Mag974* se dvěma interními standardy *wmm1002* a *Owm23*. Na radiačních hybridních panelech RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4B a RH<sub>1</sub> DH400 × NT4A4D byl zjištěn přibližně stejný počet chromozomálních přestaveb jako u 10 krát větší rekombinantní mapovací populace. Radiační hybridní mapa lokusu *QPm.tut-4A* 4AL chromozómu je teprve v počátcích. Za účelem usnadnění genetického mapování v oblasti genu *QPm.tut-4A* bude potřeba v navazující práci zahustit radiační mapu 4AL chromozómu dalšími markery a přidat větší počet linií pro zvětšení rozlišení.

## 7 LITERATURA

- Ardley, J., Hoptroff, C.G.M. (1996): Protecting plant 'invention': The role of plant variety rights and patents. *Trends in Biotechnology* 14(3): 67-69.
- Arumuganathan, K., Earle, E. (1991): "Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species." *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 208-218.
- Arabidopsis Genome Initiative. (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature (London)* 408: 796-815.
- Beadle, W., (1932): A possible influence of the spindle fibre on crossing-over in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 18: 160-165.
- Beales, J., Turner, A., GriYths, S., Snape, J.W., Laurie, D.A. (2007): A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the fotoperiod insensitive *Ppd-D1* a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theoretical Applied Genetics* 115: 721-733.
- Benham, F., Hart, K., Crolla, J., Bobrow, M., Francavilla, M., Goodfellow, P. (1989): A method for generating hybrids containuig nonseleted fragments of human chromosomes. *Genomics* 4: 509-517.
- Bennett, M.D., Smith, J.N. (1976): Nuclear - DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* 274: 227-274.
- Bhatramakki, D., Rafalski, A. (2001): Discovery and application of single nucleotide polymorphism markers in plants. In: Henry, R.J. (ed.): *Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of Plants*. pp. 179-192. CAB International.
- Boehnke, M., Lange, K.D., Cox, R. (1991): Statistical Methods for Multipoint Radiation Hybrid Mapping., *The American Society of Human Genetics* 49: 1174-1188.
- 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 patogen. *The Plant Cell* 17: 2107-2122.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The Americian Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Brenchley, R., Spannagl, M., Pfeifer, M., Barker, G.L., D'Amore, R., Allen, A.M., McKenzie, N., Kramer, M., Kerhornou, A., Bolser, D., Kay, S., Waite, D., Trick, M., Bancroft, I., Gu, Y., Huo, N., Luo, M.C., Sehgal, S., Gill, B., Kianian, S., Anderson, O., Kersey, P., Dvorak, J., McCombie, W.R., Hall, A., Mayer, K.F., Edwards, K.J., Bevan, M.W., Hall, N. (2012) Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491(7426): 705-10.
- Burnham, C.R., (1962): *Discussion in Cytogenetics*. CR Burnham Press, St. Paul
- Burr, B., Burr, F.A. (1991): Recombinant inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. *Trends in Genetics* 7: 55-60.
- Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijter, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Topsch, S. f Vos P., Salamini, F., Schilze-Lefert, P. (1997): The barley *Mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705.
- Clayton, W.D., Renvoize, S.A. (1986): *Genera Graminum*. Her Majesty's Stationery Office, London.
- Cloutier, S., McCallum, B.D., Loutre, C., Banks, T.W., Wicker, T., Feuillet, C., Keller, B., Jordan, M.C. (2007): Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family. *Plant Molecular Biology* 65: 93-106.
- Cox, D.R., Burmeister, M., Price, E.R., Kim, S., Myers, R.M. (1990): Radiation Hybrid Mapping: A Somatic Cell Genetic Method for Constructing High-Resolution Map of Mammalian Chromosomes. *Science* 250: 245-250.
- Curtis, C.A., Lukaszewski, A.J. (1991): Genetic linkage between C-bands and storage protein genes in chromosome 1B of tetraploid wheat. *Theoretical Applied Genetics* 81: 245-252.
- Devos, K.M., Doležel, J., Feuillet, C. (2009): Genome organization and komparative genomics. In: Carver, B.F. (ed.): *Wheat – Science and Trade*, pp. 327 – 367, Wiley-Blackwell, Iowa.
- Dolezel, J., Simkova, H., Kubalaková, M., Safar, J., Suchankova, P., Cihalikova, J., Bartos, J., Valarik, M. (2009): Chromosome genomics in the *Triticeae*. In *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Edited by Feuillet, C., Muehlbauer, G.J., New York: Springer, pp. 285-316.
- Doškař, J. (2005): Klonování DNA. In: Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. (ed.): *Metody molekulární biologie*, pp. 29 – 44, MU Brno.
- Doveri, S., Lee, D., Maheswaran, M., Powell, W. (2008): Molecular markers – history, features and applications. In: Cole, C., Abbott, A. G. (eds): *Principles and practices of plant genomics*, Vol 1: Genome mapping. pp. 23 - 68. Science Publishers, Enfield.
- Dubcovsky, J., Dvorak, J. (2007): Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* 316: 1862-1866.

- Endo, T.R. (1990): Gametocidal chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat. *Japanes Journal of Genetics* 65: 135-152.
- Faris, J.D., Fellers, J.P., Brooks, S.A., Gill, B.S. (2003): A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus *Q* in wheat and identification of a candidate gene. *Genetics* 164: 311-321.
- Feuillet, C., Travella, S., Stein, N., Albar, L., Nublat, A., Keller, B. (2003): Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15253-15258.
- Flavell, R.B., Bennett, M.D., Smith, J.B., Smith, D.B (1974). Genome size and proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochemical Genetics* 12: 257-269.
- Frei, O.M., Stuber, C.W., Goodman, M.M. (1986): Use of allozymes as genetic markers for predicting performance in maize single cross hybrids. *Crop Science* 26: 37-42.
- Gao, W., Chen, Z., Yu, J., Raska, D., Kohel, R., Womack, J., Stelly, D. (2004): Widecross whole genome radiation hybrid mapping of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genetics* 167: 1317-1329.
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., *et al.* (2002): A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Goss, S. J., Harris, H. (1975): New method for mapping genes in human chromosomes. *Nature* 255: 680-684.
- Goss, S., Harris, H. (1977): Gene transfer by means of cell fusion. The mapping of 8 loci oil chromosome 1 by statistical analysis of gene assortment in somatic cell hybrids. *Journal of Cell Science* 25: 17-20.
- Graybosch, R.A. (2001): Quality Effects of Rye Chromatin Transfers to Wheat. *Journal of Cereal Science* 33: 3-16, Uneasy Unions.
- Green, D.E. (2001): Strategies for the systematic sequencing of complex genomics. *Nature Reviews. Genetics* 2: 573-583.
- Gresshoff, P.M. (2005): Positional Cloning of Plant Developmental Genes. In: Meksem, K., Kahl, G. (ed.): *The Handbook of Plant Genome Mapping, Genetic and Physical Mapping*, pp. 3 – 22, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T.N., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., Colas, I., Moore, G. (2006): Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* 439: 749-752.
- Haldane, J.B.S. (1919): The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *Journal of Genetics* 8: 299-309.
- Hass-Jacobus, B., Jackson, S.A. (2005): Physical Mapping of Plant Chromosomes. In: Meksem, K., Kahl, G. (eds): *The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping*, pp. 131 - 146, Wiley-WCH, Weinheim.
- Hearne, C.M., Ghosh, S., Todd, J.A. (1992): Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genetics* 8: 288-294.
- Hedden, P. (2003): The genes of the Green Revolution, *TRENDS in Genetics* 19: 1.
- Henry, R.J. (2001): *Plant Genotyping. The DNA Fingerprinting of Plants.* (ed) CABI Publ, Wallingford, UK.
- Hernandez, P., Martis, M., Dorado, G., Pfeifer, M., Gálvez, S., Schaaf, S., Jouve, N., Šimková, H., Valárik, M., Doležel, J., Mayer, K.F.X. (2012): Next-generation sequencing and syntenic integration of flow-sorted arms of wheat chromosome 4A exposes the chromosome structure and gene content. *Plant of Journal* 69: 377-386.
- Heun, M., Kennedy, A.E., Anderson, J.A., Lapitan, N.L.V., Sorrells M.E., Tanksley S.D. (1991): Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 34: 437-447.
- Heun, M., SchaferPregl, R., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B., Salamini, F. (1997): Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* 278(5341): 1312-1314.
- Hittalmani, S., Girish, T.N., Biradar, H. Maughan, P.J. (2008): Mapping populations: Development, descriptions and deployment. In: Cole, C., Abbott, A. G. (eds): *Principles and practices of plant genomics, Vol 1: Genome mapping.* pp. 69 - 92. Science Publishers, Enfield.
- Hossain, K.C., Kalavacharla, V., Lazo, G.R., Hegstad, J., Wentz, M J., Kianian, P.M., Simons, K., Gehihar. S., Rust, J.L., Syaniala. R. ft., Ohcori, K., Bhaniidimarri, S. (2004a): A chromosome bin of 2148 expressed sequence tag loci of wheat homocologous group 7. *Genetics* 168: 687-699.
- Hossain, K.C., Riera-Lizarazu, O., Kalavacharla, V., Vales, M.I., Rust, J.L., Maan, S.S., Kianian, S.F. (2004b): Molecular cytogenetic characterization of all durum wheat line with a portion of chromosome 1D of *Triticum aestivum* carrying the *scs<sup>(ae)</sup>* gene. *Genetics* 47: 206-214.
- Hossain, K.G., Riera-Lizarazu, O., Kalavacharla, V., Vales, M.I., Maan, S.S., Kianian, S.F. (2004c): Radiation Hybrid Mapping of the Species Cytoplasm-Specific (*scs<sup>(ae)</sup>*) Gene in Wheat. *Genetics* 168: 415-423.

- Huang, L., Brooks, S.A., Li, W.L., Fellers, J.P., Trick, H.N., Gill, B.S. (2003): Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics* 164: 655-664.
- Huang, S.B., Spielmeier, W., Lagudah, E.S., James, R.A., Platten, J.D., Dennis, E.S., Munns, R. (2006): A Sodium Transporter (HKT7) Is a Candidate for *Nax1*, a Gene for Salt Tolerance in Durum Wheat. *Plant Physiology* 142(4): 1718-1727.
- 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 Applied Genetics* 78: 495-504.
- Chen, Y., Chelkowski, J. (1999): Genes for resistance to wheat powdery mildew. *Journal of Applied Genetics* 40(4): 317-334.
- Jakobson, I., Peusha, H., Timofejeva, L., Järve, K. (2006): Adult plant and seedling resistance to powdery mildew in a *Triticum aestivum* x *Triticum militinae* hybrid line. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 760-769.
- Jansen, C., Wettstein, von D., Schäfer, W., Kogel, K.H., Felk, A., Maier, F.J. (2005): Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceeding of the National Academy of Science* 102:46.
- Johnson, J.W., Baenziger, P.S., Yamazaki, W.T., Smith, R.T. (1979): Effects of powdery mildew on yield and quality of isogenic lines of 'Chancellor' wheat. *Crop Science* 19: 349-352.
- Jones, H.B. (1996): Hybrid selection as a method of increasing mapping power for radiation hybrids. *Genome Research* 6: 761-769.
- Joppa, L.R., Williams, N.D. (1988): Langdon durum disomic substitution lines and aneuploid analysis in tetraploid wheat. *Genome* 30: 222-228.
- Kahl, G., Mast, A., Tooke, N., Shen, R., van den Boom, D. (2005): Single nucleotide Polymorphisms: Detection Techniques and Their Potential for Genotyping and Genome Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G. (eds): *The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping*, pp. 75 - 95, Wiley-WCH, Weinheim.
- Kalavacharla, V., Hossain, K., Riera-Lizarazu, Gu, Y., Maan, S.S., Kianian, S.F. (2009): Radiation Hybrid Mapping in Crop Plants. In Sparks, editor: *Advances in Agronomy*, Burlington: Academic Press, Vol. 102, pp. 201-222.
- Kalavacharla, V., Hossain, K.G., Gu, Y., Riera-Lizarazu, O., Vales, M.I., Bhamidimarri, S., Gonzalez-Hernandez, J.L., Maan, S.S., Kianian, S.F. (2006): High-Resolution Radiation Hybrid Map of Wheat Chromosome 1D. *Genetics* 173: 1089-1099.
- Kellogg, E.A. (2001): Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiol* 125:1198-1205.
- Kole, C., Abbott, A. G. (2008): Fundamentals of plant genome mapping. In: Cole, C., Abbott, A. G. (eds): *Principles and practices of plant genomics*, Vol 1: *Genome mapping*. pp. 1 – 22. Science Publishers, Enfield.
- Kolmer, J.A., (2005): Tracking wheat rust on a continentalscale. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 441-449.
- Kumar, A., Bassi, F.M., Paux, E., Al-Azzam, O., Michalak de Jimenez, M., Denton, A.M., Gu, Y.Q., Huttner, E., Kilian, A., Kumar, S., Goyal, A., Iqbal, M.J., Tiwari, V.K., Dogramaci, M., Balyan, H.S., Dhaliwal, H.S., Gupta, P.K., Randhawa, G.S., Feuillet, C., Pawlowski, W.P., Kianian, S.F. (2012): DNA repair and crossing over favor simle chromosome regions as discovered in radiation hybrid of *Triticum*. *Genomics* 13: 339
- Kwok, P.Y., Deng, Q., Zakeri, H., Nickerson, D.A., (1996): Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in mapped STSs. *Genomics* 31: 123-126.
- Kynast, R.C., Riera-Lizarazu, O., Rines, H., Phillips, R. (2002): Maize individualized chromosome and derived radiation hybrid lines and their use in functional genomics. *Functional & Integrative Genomics* 2: 60-69.
- Lantican, M.A., Dubin, H.J., Morris, M.L. (2005): "Impacts of international wheat breeding research in the developing world, 1988-2002." *Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT)*.
- Lem, P., Lallemand, J. (2003): Grass consensus STS markers: an efficient approach for detecting polymorphism in *Lolium*. *Theoretical Applied Genetics* 107: 1113-1122.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-65.
- Liu, S., Yeh, C.-T., Ji, T., Ying, K., Wu, H., Tang, H.M., Fu, Y., Nettleton, D., Schnable, P.S. (2009): Mu transposon insertion sites and meiotic recombination events colocalize with epigenetic marks for open chromatin across the maize genome. *Plos Genetics* 5: 11.
- Luo, M.C., Yang, Z.L., You, F.M., Kawahara, T., Waines, J.G., Dvorak, J. (2007): The structure of wild and domesticated emmer wheat population, gene flow between them, and the site of emmer domesticaion. *Theoretical and Applied Genetics* 114(6): 947-959.

- Matsuoka, Y. (2011): Evolution of Polyploid *Triticum* Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. *Plant Cell Physiology* 52(5): 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 Applied Genetics* 76: 815-829.
- Meyers, B.C., Scalabrin, S., Morgante, M. (2004): Mapping and sequencing complex genomes: Let's get physical! *Nature Reviews Genetics* 5: 578-588.
- Mihovilovich, E., Simon, R., Bonierbale, M. (2008): Construction of genetic linkage maps. In: Cole, C., Abbott, A. G. (eds): *Principles and practices of plant genomics, Vol 1: Genome mapping*. pp. 93 – 138. Science Publishers, Enfield
- Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, J.H., Senin, P., Wang, W., Ly, B.V., Lewis, K.L., Salzberg, S.L, Feng, L., Jones, M.R., Skelton, R.L., Murray, J.E., Chen, C., Qian, W., Shen, J., Du, P., Eustice, M., Tong, E., Tang, H., Lyons, E., Paull, R.E., Michael, T.P., Wall, K., Rice, D., Albert, H., Wang, M.L., Zhu, Y.J., Schatz, M., Nagarajan, N., Agbayani, R., Guan, P., Blas, A., Wai, C.M., Ackerman, C.M., Ren, Y., Liu, C., Wang, J., Wang, J., Na, J.K., Shakirov, E.V., Haas, B., Thimmapuram, J., Nelson, D., Wang, X., Bowers, J.E., Gschwend, A.R., Delcher, A.L., Singh, R., Suzuki, J.Y., Tripathi, S., Neupane, K., Wei, H., Irikura, B., Paidi, M., Jiang, N., Zhang, W., Presting, G., Windsor, A., Navajas-Pérez, R., Torres, M.J., Feltus, A.F., Porter, B., Li, Y., Burroughs, A.M., Luo, M.C., Liu, L., Christopher, D.A., Mount, S.M., Moore, P.H., Sugimura, T., Jiang, J., Schuler, M.A., Friedman, V., Mitchell-Olds, T., Shippen, D.E., dePamphilis, C.W., Palmer, J.D., Freeling, M., Paterson, A.H., Gonsalves, D., Wang, L., Alam, M. (2008): The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* L.). *Nature* 452:991-996.
- Moore, G., Devos, K.M., Wang, Z., Gale, M.D. (1995): Cereal genome evolution – grasses, line up and form a circle. *Current Biology* 5: 737-739.
- Nelson, J.C. (2005): Methods and Software for Genetic Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G. (eds): *The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping*, pp. 53 - 70, Wiley-WCH, Weinheim.
- Nguyen, H.T., Wu, X. (2005): Molecular Marker Systems for Genetic Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G. (eds): *The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping*, pp. 23 - 52, Wiley-WCH, Weinheim.
- Olson, M., Hood, L., Cantor, C.C., Botstein, D. (1989): A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434-1435.
- Ozkan, H., Brandolini, A., Pozzi, C., Effgen, S., Wunder, J., Salamini, F. (2005): A reconsideration of the domestication geography of tetraploid wheats. *Theoretical and Applied Genetics* 110(6): 1052-1060.
- Paran, I., Levin, I. (2008): Mapping and Tagging of Genes Controlling Simple-inherited Traits. In: Cole, C., Abbott, A. G. (eds): *Principles and practices of plant genomics, Vol 1: Genome mapping*. pp. 139 - 174. Science Publishers, Enfield.
- Peng, J.R., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., Sudhakar, D, Christou, P., Snape, J.W., Gale, M.D., Harberd, N.P. (1999): Green revolution genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400: 256-261.
- Qi, L.L., Gill, B.S. (2001): High-density physical maps reveal that the dominant malesterile gene *Ms3* is located in a genomic region of low recombination in wheat and is not amenable to map-based cloning. *Theoretical Applied Genetics* 103: 998-1006.
- Rafalski, A. (2002): Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 94-100.
- Riera-Lizarazu, O., Leonard, J.M., Tiwari, V.K., Kianian, S.F., (2010): A Method to Produce Radiation Hybrids for the D-Genome Chromosomes of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cytogenetic and Genome Research* 129: 234-240.
- Riera-Lizarazu, O., Vales, M.I., Ananiev, E., Rines, H.W., Phillips, R.L. (2000): Production and characterization of maize chromosome 9 radiation hybrids derived from an oat-maize addition line. *Genetics* 156: 327-339.
- Roberts, P.A. (1965): Difference in the behavior of eu- and heterochromatin: crossing over. *Nature* 205: 725-726.
- Shantz, H.L. (1954): The place of grasslands in the earth's cover of vegetation. *Ecology* 35: 143-145.
- Schneider, K. (2005): Mapping Populations and Principles of Genetic Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G. (eds): *The handbook of plant genome mapping. Genetic and physical mapping*, pp. 3 - 22, Wiley-WCH, Weinheim.
- Schuler, G.D., Boguski, M.S., Stewart, E.A., Stein, L.D., Gyapay, G., Rice, K., White, R.E., Rodriguez-Tome, P., Aggarwal, A., Bajorek, E., Bentolila, S., Birren, B.B. (1996): A gene map of the human genome. *Science* 274: 340-346.



- Slageren, M.W. van, (1994): Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (*Poaceae*). Wageningen Agriculture University Papers 7: 513 pp.
- Sorrells, M.E., La Rota, M., Bermudez-Kandianis, C.E., Greene, R.A., Kantety, R., Munkvold, J.D., Miftahudin, Mahmoud, A., Ma, X.F., Gustafson, P.J., Qi, L.L., Echaliier, B., Gill, B.S., Matthews, D.E., Lazo, G.R., Chao, S.M., Anderson, O.D., Edwards, H., Linkiewicz, A.M., Dubcovsky, J., Akhunov, E.D., Dvorak, J., Zhang, D.S., Nguyen, H.T., Peng, J.H., Lapitan, N.L.V., Gonzalez-Hernandez, J.L., Anderson, J.A., Hossain, K., Kalavacharla, V., Kianian, S.F., Choi, D.W., Close, T.J., Dilbirligi, M., Gill, K.S., Steber, C., Walker-Simmons, M.K., McGuire, P.E., Qualset, C.O. (2003): Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome Research* 13: 1818-1827.
- Stewart, E.A., McKusick, K.B., Aggarwal, A., Bajorek, E., Brady, S., Chu, A., Fang, N., Hadley, D., Harris, M., Hussain, S., Lee, R., Maratukulam, A. (1997): An STS based radiation hybrid map of the human genome. *Genome Research* 7: 422-433.
- Stuber, C.W., Goodman, M.M., Moll, R.H. (1972): Improvement of yield and ear number resulting from selection of allozyme loci in a maize population. *Crop Science* 22: 737-740.
- Suda, J. (2009): Darwinova „odporná záhada“ po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin? *Živa* 5: 204-208.
- Swiecicki, W.K., Wolko, B., Weeden, N.F. (2000): Mendel's genetics, the *Pisum* genome and pea breeding. *Votr. Pflanzenzüchtg* 48: 65-76.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., Stahl, F.W. (1983): The Double-Strand-Break Repair Model for Recombination. *Cell* 33: 25-35.
- Tanksley, S.D., Ganai, M.W., Prince, J.P., de Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Messeguer, R., Miller, J.C., Miller, L., Paterson, A.H., Pineda, O., Roder, M.S., Wing, R.A., Wu, W., Young, N.D. (1992): High density molecular linkage map of the potato and tomatogenomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S. *et al.* (2006): The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr & Gray). *Science* 313: 1596-1604.
- Tsumura, Y., Suyama, Y., Yoshimura, K., Shirato, N., Mukai, Y. (1997): Sequence-tagged-sites (STSs) of cDNA clones in *Cryptomeria Japonica* and their evaluation as molecular markers in conifers. *Theoretical Applied Genetics* 94: 764-772.
- Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., Dubcovsky, J. (2006): A *NAC* gene regulating senescence improves grain protein zinc, and iron content in wheat. *Science* 314: 1298-1301.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., Fitzgerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T., Facci, M., Mitchell, J.T., Perazzolli, M., Eldredge, G., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N., Stefanini, M., Chen, Y., Segala, C., Davenport, C., Dematte, L., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., Tao, Q., Si-Ammour, A., Harkins, T., Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B., Stella, A., Solovyev, V., Fawcett, J.A., Sterck, L., Vandepoele, K., Grandi, S.M., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, S.K., Fontana, P., Gutin, A., Peer, Y., Salamini, F., Viola, R. (2007): A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *Plos One* 2(12): 1326.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van der Lee, T., Fornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Walter, M.A., Goodfellow, P.N. (1993): Radiation hybrids: irradiation and fusion gene transfer. *Trends Genetics* 9: 352-356.
- Wardrop, J., Fuller, J., Powell, W., Machray, C.C. (2004): Exploiting plant static radiation hybrids for physical mapping of expressed sequence tags. *Theoretical Applied Genetics* 108: 343-348.
- Wardrop, J., Sape, J., Powel, W., Macbray, C.C. (2002): Constructing plant radiation hybrids panel. *Plant* 31: 223-228.
- Watson, L., Dallwitz, M.J. (1999): Grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval, including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references. <http://biodiversityunoedu/delta/Version>
- Welsh, J., McClelland, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
- Werner, J.E., Endo, T.R., Gill, B.S., (1992): Toward a cytogenetically based physical map of the wheat genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 11307-11311.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

- Xu, Y.B., McCouch, S.R., Zhang, Q.F. (2005): How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome? *Plant Molecular Biology* 59: 7 – 26,
- Yahiaoui, N., Srichumpa, P., Dudler, R., Keller, B. (2004): Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *Plant Journal* 37: 528-538.
- Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S., Dubcovsky, J. (2006): The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT. *The National Academy of Sciences of the USA* 103(51): 19581–19586.
- Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., SanMiguel, P., Bennetzen, J.L., Echenique, V., Dubcovsky, J. (2004): The Wheat *VRN2* Gene Is a Flowering Repressor Down-Regulated by Vernalization, *Science* 303(5664): 1640-1644.
- 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 of the United States of America* 100: 6263-6268.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G.K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., *et al.* (2002): A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 296: 79-92.
- Zeng, Y., Li, J., Wang, C., Chang, M.M., Yang, R., Wu, R. (2008): Genetic Mapping of Quantitative Trait Loci. In: Cole, C., Abbott, A. G. (eds): *Principles and practices of plant genomics*, Vol 1: Genome mapping, pp. 175 – 204. Science Publishers, Enfield.
- Zhang, H.-B. (2008): Map-based Cloning of Genes and Quantitative Trait Loci. In: Kole, Ch., Abbott, A.G. (ed.): *Principles and Practices of Plant Genomics*, Genome mapping, pp. 229 - 268, Science Publishers.
- Zhou, Ch., Dong, W., Han, L., Wei, J., Jia, L., Tan, Y., Zhi, D., Wang, Z.-Y., Xia, G. (2012): Construction of Whole Genome Radiation Hybrid Panels and Map of Chromosome 5A of Wheat Using Asymmetric Somatic Hybridization., *PlosOne* 7: 7
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., (1994): Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.



## 8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

4AL	dlouhé rameno pšeničného chromozómu 4 z genomu A
8/1	hybridní rezistentní linie z křížení <i>Triticum aestivum</i> kultivaru Tähti a <i>Triticum militinae</i>
8/1 × CS	mapovací populace z křížení hybridní rezistentní linie 8/1 a <i>Triticum aestivum</i> cv. Chinese Spring
A	rodič <i>T. aestivum</i> cv. Chinese Spring
Ae.	<i>Aegilops</i>
AFLP	polymorfismus amplifikované délky fragmentu ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )
APS	peroxodisíranu amonný
B	rodič <i>T. militinae</i>
BAC	umělý bakteriální chromozóm ( <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> )
BC	populace zpětných kříženců ( <i>Backcross Population</i> )
BEP	podčeledi ( <i>Bambusoideae, Ehrhartoideae a Pooideae</i> )
bp	počet párů bází ( <i>base pairs</i> )
CAPS	štěpené amplifikované polymorfni sekvence ( <i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequences</i> )
cDNA	komplementární DNA ( <i>complementary DNA</i> )
cM	centimorgan, jednotka genetické vzdálenosti na genetické mapě
cR	centiray, jednotka genetické vzdálenosti na radiační mapě
CS	<i>Triticum aestivum</i> cv. Chinese Spring
cv.	kultivar
D	aditivní vzdálenost zlomů
DdeI	restrikční endonukleáza z bakterie <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
DGRH	<i>D-genome Radiation Hybrid panel of wheat</i>
DH	dihaploidní linie ( <i>Dihaploid line</i> )
DNA	deoxyribonukleová kyselina ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	deoxyribonukleotidový trifosfát ( <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> )
DWRH-1D	<i>Durum Wheat Radiation Hybrid panel of chromosome 1D</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EST	úsek exprimované sekvence, odvozený od mRNA ( <i>Expressed Sequence Tags</i> )
EST-SSR	mikrosatelity odvozené od EST sekvence ( <i>Expressed Sequence Tag-derived SSR</i> )
EtBr	<i>ethidium bromide</i>
F primer	forvard
f. sp.	<i>forma specialis</i>
F <sub>1</sub>	první filiální generace
F <sub>2</sub>	druhá filiální generace
F <sub>2,3</sub>	mapovací populace linií druhé a třetí filiální generace
F <sub>5</sub>	pátá filiální generace
FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
Gbp	giga báze ( <i>giga base</i> )

H	heterozygotní genotyp
HaeIII	restrikční endonukleáza z bakterie <i>Haemophilus aegyptius</i>
HNEJ	<i>non-homologus end-joining</i>
HR	<i>homology directed repair</i>
IRAP	<i>(Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism)</i>
IRWI	<i>International Research Initiative for Wheat Improvement</i>
ISSR	vnitřní jednoduché opakující se sekvence ( <i>Inter Simple Sequence Repeat</i> )
K	negativní kontrola
kb	kilo báze ( <i>kilo base</i> )
KCl	chlorid draselný ( <i>potassium chloride</i> )
krad	jednotka $\gamma$ -záření
LDN16	<i>Langdon durum line of wheat</i>
<i>Lr1, Lr10, Lr21, Lr26</i>	geny rezistence ke rzi pšeničné
MAS	selektce zprostředkovaná markerem ( <i>Marker Assisted Selection</i> )
Mb	mega báze ( <i>mega base</i> )
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý ( <i>magnesium chloride</i> )
n	haploidní počet chromozómů
NaCl	chlorid sodný ( <i>sodium chloride</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIL	téměř izogenní linie ( <i>Nearly Isogenic Line</i> )
NT	nullitetrasomická linie
P	parentální generace
PAA	polyakrylamid
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<i>Ph1</i>	gen kontrolující homeologní párování chromozómů u pšenice
<i>Pm3</i>	gen rezistence k padlí travnímu u pšenice
<i>Ppd-D1</i>	gen mající vliv na fotoperiodu
<i>Q</i>	gen pšenice ovlivňující uvolňování zrn z klasů
<i>QPm.tut-4A</i>	gen zodpovědný za rezistenci k padlí travnímu na 4A chromozómu pšenice
<i>QTL</i>	lokus kvantitativního znaku ( <i>Quantitative Trait Locus</i> )
R primer	reverse
RAPD	náhodná amplifikace polymorfnní DNA ( <i>Random Amplification Polymorphic DNA</i> )
REMAP	Polymorfizmus merzí sekvencí retrotransposonu a SSR ( <i>Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism</i> )
RFLP	polymorfizmus délky restrikčních fragmentů ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
RH	radiační hybridní
RHPW	<i>Radiation Hybrid Panel of Wheat</i>
<i>Rht1</i>	gen redukující výšku pšenice
RIL	rekombinantní inbrední linie ( <i>Recombinant Inbred Line</i> )
RNA	ribonukleová kyselina ( <i>ribonucleic acid</i> )

SCAR	<i>(Sequence Characterized Amplified Region)</i>
<i>scs<sup>ae</sup></i>	gen zodpovědný za kompatibilitu jádra s cytoplazmou u pšenice
SNP	jednonukleotidový polymorfismus ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
SRAP	<i>(Sequence-related Amplified Polymorphism)</i>
ssp.	<i>subspecies</i>
SSR	mikrosatelit ( <i>Simple Sequence Repeat</i> )
STS	krátká jedinečná sekvence ( <i>Sequence Tagged Site</i> )
TA	<i>Triticum aestivum</i> Tähti
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Thris/Borate/EDTA pufr
TEMED	N,N,N',N'- <i>tetra</i> -methyl-ethylendiamin
Thris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
TM	<i>Triticum militinae</i>
UV	ultrafialové záření
VRN	geny pšenice odpovědné za vernalizaci
θ	rekombinační frekvence nebo frekvence zlomů