

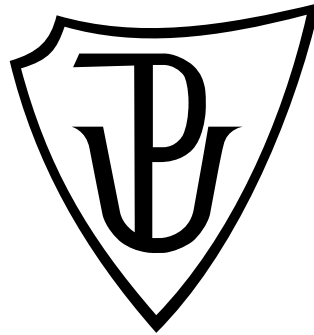
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Adam Lampar

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Mapování a charakterizace lokusů
ovlivňujících důležité agronomické znaky
pšenice**

Bakalářská práce

Adam Lampar

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

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

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Miroslava Valárika, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci 26. 4. 2018

Adam Lampar

Souhrn

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednou ze zemědělsky nejdůležitějších plodin. V současnosti je zdrojem přibližně 20 % kalorií přijímaných lidmi po celém světě. Zvyšování její produkce je podstatné pro zajištění dostatku potravy a společenské stability. Zelená revoluce v 60. letech minulého století znamenala výrazný nárůst v produkci pšenice s využitím úspěšných šlechtitelských programů, avšak produkce by se vzhledem k nárůstu počtu lidí měla do roku 2050 zdvojnásobit. Zvýšení výnosového potenciálu je klíčové k dosažení tohoto cíle.

Studium pšenice je komplikováno jejím velkým hexaploidním genomem. Proto se jako model genomu A často používá diploidní pšenice jednozrnka (*T. monococcum* L.), která může také posloužit jako zdroj genů ke zlepšení vlastností pšenice seté.

Předkládaná bakalářská práce se skládá z teoretické a praktické části. Teoretická část je zaměřena na metody zkoumání pšenice. Cílem praktické části bylo genotypování verifikačních mapovacích populací F_2 *T. monococcum* L. a verifikace lokusů kvantitativních znaků mapovaných na F_{8-12} mapovací populaci vzniklé křížením *T. monococcum* L. DV92 a *T. boeoticum* Boiss. G3116.

Jednomarkerovou regresí a jednofaktorovou analýzou rozptylu bylo detekováno 30 lokusů kvantitativních znaků. 13 z těchto lokusů bylo verifikováno, a to 5 lokusů pro rozkladitost trsu na chromozómech $2A^m$ a $5A^m$, 3 lokusy pro chlupatost listů na $3A^m$ a $5A^m$, 2 lokusy pro dobu kvetení na $1A^m$, 1 lokus pro výšku rostliny na $2A^m$, 1 lokus pro délku klasu na $4A^m$ a 1 lokus pro hustotu klasu na $4A^m$.

Summary

Common wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important agronomic crops. It is a source of approximately 20 % of calories consumed by humans all around the world. Production growth is essential to ensuring food supply and social stability. The Green Revolution in the 1960s meant a significant increase in grain production driven by successful breeding management. However, the production should be doubled by 2050 to meet the demands from the rising human population. Improvement in the yield potential is crucial to fulfil this challenge.

Wheat's large hexaploid genome complicates the research; therefore, diploid Einkorn wheat (*T. monococcum* L.) is often applied as a model of genome A and also can be used as a source of genes to enrich the gene pool of common wheat.

This Bachelor's thesis consists of a theoretical and a practical part. The theoretical part is focused on methods of wheat research. The aim of the practical part was to genotype the F₂ verification mapping populations of *T. monococcum* L. and to verify quantitative trait loci mapped on the F₈₋₁₂ mapping population generated from a cross between *T. monococcum* L. DV92 and *T. boeoticum* Boiss. G3116.

30 quantitative trait loci were detected by single-marker regression and one-factor analysis of variance. 13 of them were verified: 5 loci for tuft shape on chromosomes 2A^m and 5A^m, 3 loci for leaf hairiness on 3A^m and 5A^m, 2 loci for flowering time on 1A^m, 1 loci for plant height on 2A^m, 1 loci for spike length on 4A^m and 1 loci for spike density on 4A^m.

Poděkování

Chtěl bych poděkovat Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, rady, připomínky a čas při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Haně Vanžurové a Mgr. Zuzaně Ivaničové, Ph.D. za pomoc při provádění experimentů. Také děkuji Ing. Marii Seifertové a všem dalším laborantkám za výborné laboratorní zázemí a pomoc při práci. A v neposlední řadě děkuji prof. Ing. Jaroslavu Doleželovi, DrSc. za možnost vypracovat bakalářskou práci na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v.v.i. v Olomouci.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Obiloviny	3
3.1.1 Rod pšenice.....	4
3.1.2 <i>Triticum aestivum</i> L.	6
3.1.3 <i>Triticum monococcum</i> L.	7
3.2 Agronomicky významné znaky.....	9
3.2.1 Výnos.....	9
3.2.2 Výška rostliny	10
3.2.3 Chlupatost	11
3.2.4 Kvetení.....	11
3.2.5 Velikost a tvar zrna.....	12
3.2.6 Kvalita zrna.....	12
3.3 Genetické mapy.....	13
3.3.1 Vazebné mapování.....	13
3.3.2 Mapovací populace.....	15
3.3.3 Genetické markery	17
3.4 Lokusy kvantitativních znaků	20
4 Materiál a metody	23
4.1 Biologický materiál.....	23
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	25
4.2.1 Použité chemikálie	25
4.2.2 Použité soupravy.....	25
4.2.3 Použité roztoky	26
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	26

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	27
4.4.1 Polymerázová řetězová reakce.....	27
4.4.2 Elektroforéza na agarózovém gelu.....	27
4.4.3 Sekvenování produktů PCR Sangerovou metodou.....	28
4.4.4 Genotypování.....	28
4.4.5 Verifikace lokusů kvantitativních znaků	29
5 Výsledky	30
5.1 Optimalizace markerů a genotypování.....	30
5.2 Verifikace lokusů kvantitativních znaků.....	35
6 Diskuse.....	38
7 Závěr	39
8 Literatura.....	41

Seznam symbolů a zkratek

BC	zpětné křížení, <i>backcross</i>
bp	páry bází, <i>base pair</i>
cDNA	komplementární DNA, <i>complementary DNA</i>
CIM	složené mapování pomocí intervalu, <i>composite interval mapping</i>
cM	centiMorgan
DH	dihaploidní genotyp, <i>double haploid</i>
DP	délkový polymorfismus
F primer	<i>forward primer</i>
F _n	<i>n</i> -tá filiální generace
Gbp	miliarda párů bází, <i>giga base pair</i>
LOD	logaritmus pravděpodobnosti, <i>logarithm of the odds</i>
M	Morgan
MAS	markery asistovaná selekce, <i>marker assisted selection</i>
n	haploidní počet chromozómů
NIL	téměř isogenní linie, <i>nearly isogenic lines</i>
P/A	polymorfismus presence/absence
PCR	polymerázová řetězová reakce, <i>polymerase chain reaction</i>
QTL	lokusy kvantitativních znaků, <i>quantitative trait loci</i>
R primer	<i>reverse primer</i>
RIL	rekombinantní inbrední linie, <i>recombinant inbred lines</i>
SNP	jednonukleotidový polymorfismus, <i>single nucleotide polymorphism</i>
SSD	původ z jednoho semene, <i>single-seed descent</i>
x	základní chromozómové číslo

1 Úvod

Pšenice je hlavní pěstovanou plodinou v zemích mírného podnebného pásu. Může za to nejen její schopnost adaptovat se, vysoký výnosový potenciál a jednoduché uskladnění, ale také lepek, jež je obsažen v pšeničných zrnech, který umožňuje zpracovat těsto na pečivo, nudle, těstoviny a další potravinářské výrobky. Pšenice je také dobrým zdrojem například esenciálních aminokyselin, vitamínů, minerálů a vlákniny.

Elitní kultivary pšenice seté však vykazují omezenou genetickou diverzitu, což vyvolává obavy, zda půjde navýšit nebo dokonce jen udržet výnos a kvalitu zrna s ohledem na choroby, škůdce a měnící se podmínky prostředí. Navíc rostoucí lidská populace spotřebovává stále více pšenice. Vzhledem k tomu, že není možné neustále rozšiřovat osevné plochy, je nutné se zaměřit na pěstování odrůd s vyšším výnosovým potenciálem a odolnějším vůči biotickým a abiotickým faktorům. Jednou z možností je použití příbuzných a stále divoce rostoucích druhů pšenice, základem čehož je studium genů a možností jejich využití. Studium ztěžuje velikost a složitost genomu hexaploidní pšenice. Proto se ke zjednodušení používají příbuzné druhy s nižším stupněm ploidie. Mezi ně patří například pšenice jednozrnka, která našla užití jako genetický model ke studiu a mapování znaků.

Předkládaná bakalářská práce se zabývá studiem zemědělsky významných znaků pšenice.

2 Cíle práce

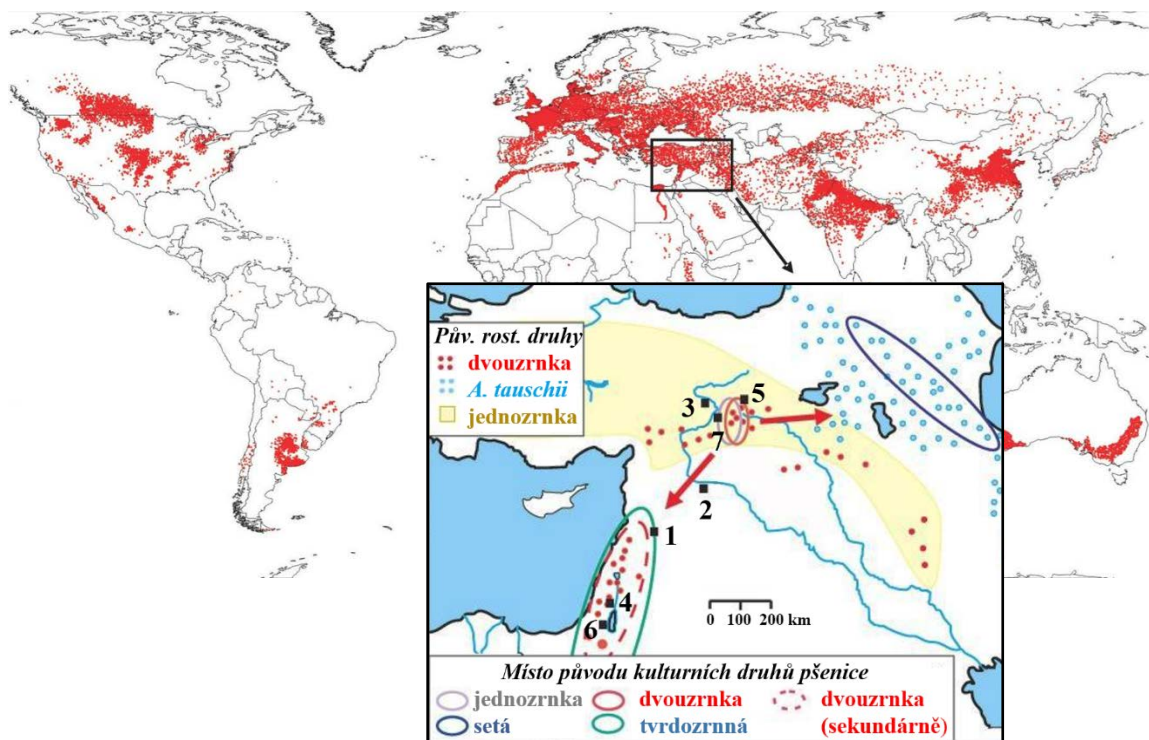
Předkládaná bakalářská práce sestává z teoretické a praktické části. Cílem teoretické části bylo vypracování literární rešerše na téma pšenice jako důležitý zdroj potravy a metody zkoumání pšenice. Cílem praktické části bylo genotypování verifikačních mapovacích populací F₂ *Triticum monococcum* L. a verifikace lokusů kvantitativních znaků identifikovaných na F₈₋₁₂ mapovací populaci vzniklé křížením *T. monococcum* DV92 a *T. boeoticum* Boiss. G3116.

3 Literární přehled

3.1 Obiloviny

Obiloviny patří mezi nejdůležitější hospodářské plodiny, neboť celosvětově tvoří přibližně 50 % kalorií přijímanými lidmi (Alexandratos a Bruinsma, 2012). Náleží do čeledi jednoděložných rostlin lipnicovité (*Poaceae* Barnhart), řádu lipnicotvaré (*Poales* Small). Mezi zemědělsky významné obiloviny se řadí například rody pšenice (*Triticum* L.), žito (*Secale* L.), ječmen (*Hordeum* L.), oves (*Avena* L.), kukuřice (*Zea* L.) a rýže (*Oryza* L.).

Zejména rod pšenice je pro člověka důležitý jako jeden z hlavních zdrojů potravy už po tisíce let. Spolu s rýží a kukuřicí patří k obilovinám s největší celosvětovou produkcí dosahující celkově 2,5 miliardy tun ročně (www.fao.org/faostat, údaje za rok 2016), avšak oproti těmto dvěma plodinám se pšenice pěstuje na větším areálu, sahajícím od Ruska a Norska až po Argentinu (Smarrt a Simmonds, 1995; Shewry, 2009), viz Obr. 1.



Obr. 1: Oblast pěstování pšenice v roce 2002 a oblast původu dnes pěstovaných druhů pšenice. Jeden červený bod odpovídá produkci 20 000 tun pšenice ročně. Čísla 1–7 odpovídají archeologickým lokalitám, kde byly nalezeny vzorky domestikovaných obilovin starší než 9000 let: 1. Tell Aswad; 2. Abu Hureyra; 3. Cafer Höyük; 4. Jericho; 5. Çayönü; 6. Nahal Hemar; 7. Nevali Çori. Upraveno podle Lantican a kol. (2005) a Dubcovsky a Dvořák (2007).

3.1.1 Rod pšenice

Do zemědělsky významného rodu pšenice (*Triticum*) se řadí druhy diploidní, tetraploidní a hexaploidní (Dorofeev a kol., 1979). Vybrané druhy pšenice jsou uvedeny v Tab. 1. V tabulce jsou uvedeny i vybrané druhy mnohoštětu (*Aegilops* L.). Tento blízký příbuzný rod někteří autoři (Bowden, 1959; Yamane a Kawahara, 2005) řadí do společného rodu *Triticum-Aegilops*.

Tab. 1: Přehled vybraných zástupců rodů *Triticum* a *Aegilops* (podle Bowden, 1959; Dorofeev a kol., 1979; Kimber a Tsunewaki, 1988; Dvořák a kol., 1993; Goncharov, 2002; Yamane a Kawahara, 2005; Goncharov a kol., 2009).

Ploidie	Vybraní zástupci rodů <i>Triticum</i> a <i>Aegilops</i>	Genom
Diploidní druhy	<i>T. urartu</i> Thum. ex Gandil.	A ^u A ^u
	<i>T. boeoticum</i> Boiss.	A ^m A ^m
	<i>T. monococcum</i> L.	A ^m A ^m
	<i>T. sinskajae</i> A. Filat. et Kurk.	A ^m A ^m
	<i>Ae. speltoides</i> Tausch	SS
	<i>Ae. tauschii</i> Coss.	DD
Tetraploidní druhy	<i>T. dicoccoides</i> (Körn. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf.	BBA ^u A ^u
	<i>T. dicoccum</i> (Schrank) Schuebl.	BBA ^u A ^u
	<i>T. turgidum</i> L.	BBA ^u A ^u
	<i>T. durum</i> Desf.	BBA ^u A ^u
	<i>T. polonicum</i> L.	BBA ^u A ^u
	<i>T. militinae</i> Zhuk. et Migusch.	BBA ^u A ^u
	<i>T. timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk.	GGA ^u A ^u
Hexaploidní druhy	<i>T. aestivum</i> L.	BBA ^u A ^u DD
	<i>T. spelta</i> L.	BBA ^u A ^u DD
	<i>T. compactum</i> Host	BBA ^u A ^u DD
	<i>T. sphaerococcum</i> Perciv.	BBA ^u A ^u DD
	<i>T. zhukovskyi</i> Menabde et Erizjan	GGA ^u A ^u A ^m A ^m

Pšenice je lidmi pěstována pro obživu po více než 10 000 let. Počátky sahají k neolitické revoluci, která znamenala přechod od lovu a sběru potravy k cílené domestikaci rostlin a živočichů (Shewry, 2009). Výhodami, kvůli kterým se rozšířilo pěstování pšenice, byly nejen dobrý výnos a nutriční hodnota, ale také snadné skladování a transport (Feuillet a kol., 2008).

Studium genetických vztahů mezi divokými a domestikovanými formami diploidní pšenice jednozrnky a tetraploidní dvouzrnky naznačuje, že tyto druhy byly domestikovány v oblasti označované jako úrodný půlměsíc, přesněji na území současného jihovýchodního Turecka (Heun, 1997; Dubcovsky a Dvořák, 2007). Na archeologických lokalitách v této oblasti byly nalezeny ohořelé klásky a zrna domestikované pšenice jednozrnky ve vrstvách o stáří přibližně 10 tisíc let (Haldorsen a kol., 2011).

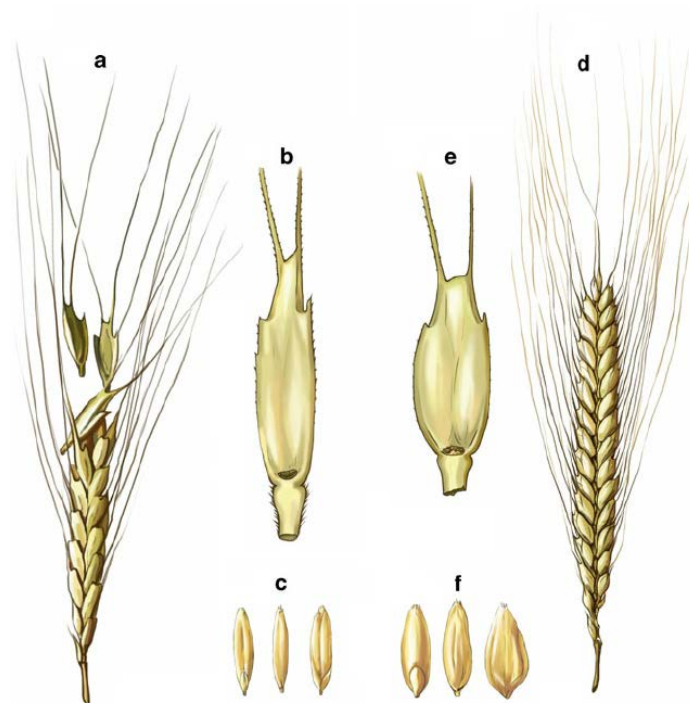
Klasy planých pšenic se po dozrání rozpadají na jednotlivé klásky, kdežto klasy domestikovaných pšenic se nerozpadají a klásky se zrna se uvolňují až výmlatem. Klasy

různých druhů pšenice, viz Obr. 2, se liší například počtem klásků a květů v kláscích, množstvím a tvarem osin, rozpadavostí klasu, velikostí zrn a obaly na zrnech.



Obr. 2: Klasy vybraných druhů pšenice a mnohoštetu: (i) *T. urartu*; (ii) *Ae. speltoides*; (iii) *Ae. tauschii*; (iv) *T. monococcum*; (v) *T. dicoccoides*; (vi) *T. durum*; (vii) *T. aestivum*. Upraveno podle Feuillet a kol. (2008).

Klásky planých a domestikovaných druhů se liší jizvami po odlomení větve klasu (viz Obr. 3). Právě ztráta rozpadavosti klasu byla zásadní genetickou změnou, ke které domestikací došlo, a je přímo spojena se začátky zemědělství a usedlého způsobu života. U pšenice dvouzrnky (*T. dicoccum*) se gen zodpovědný za rozpadavost klasu, *Br* (*brittle rachis*), nachází na chromozómu 3A^u a 3B (Nalam a kol., 2006; Tanno a Willcox, 2006).



Obr. 3: Rozdíl mezi rozpadavými klasy plané pšenice *T. boeoticum* a nerozpadavými klasy domestikované *T. monococcum*: a) klas *T. boeoticum*; b) klásek *T. boeoticum* s hladkou jizvou; c) zrna *T. boeoticum*; d) klas *T. monococcum*; e) klásek *T. monococcum* se zubatým zlomem; f) zrna *T. monococcum*. Upraveno podle Kilian a kol. (2010).

Dalšími důležitými znaky domestikace pšenice jsou ztráta tuhých obalů, která vedla od pluchaté k nahé pšenici, zvětšení velikosti zrn, snížení úrovně odnožování, vzpřímený růst rostliny a redukováná dormance semen (Dubcovsky a Dvořák, 2007). Pro proces domestikace je důležitý lokus Q. Domestikované druhy pšenice s alelou Q se vyznačují nelámavým vřetenem klasu, tzv. *free-threshing* pluchami (loupání je snazší oproti *non-free-threshing*) a tzv. *square-headed* klasem (nese více klásků). Gen Q byl u *T. aestivum* mapován na dlouhém rameni chromozómu 5A^u (Faris a Gill, 2002).

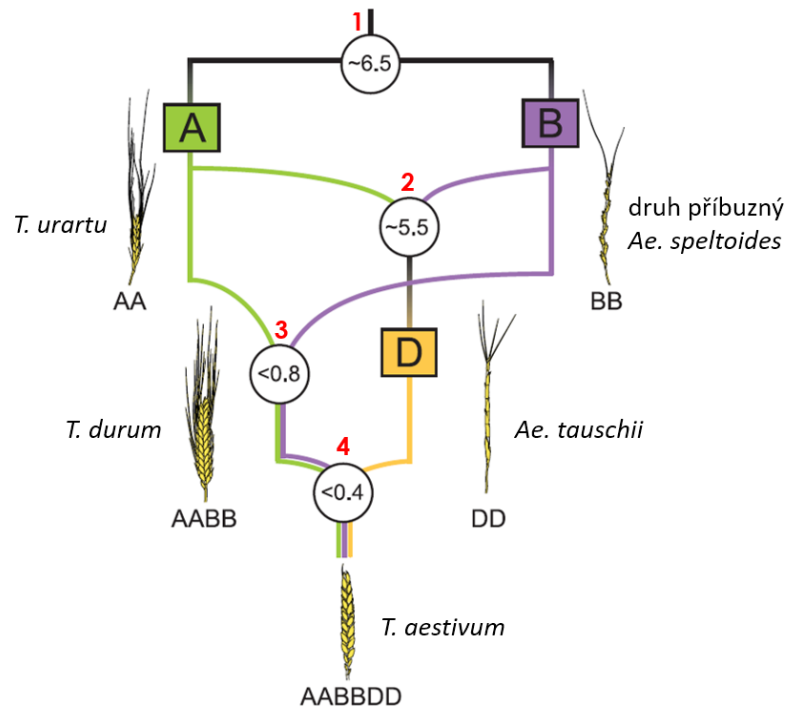
V současnosti pšenice poskytuje přibližně 20 % kalorií konzumovaných člověkem a její roční celosvětová produkce dosahuje přibližně 750 milionů tun (www.fao.org/faostat, údaje za rok 2016). Z toho 95 % je pšenice setá používaná zejména pro přípravu pečiva a 5 % je pšenice tvrdá (*T. durum*), z níž se vyrábí těstoviny. Jednozrnka (*T. monococcum*), dvouzrnka (*T. dicoccum*) a pšenice špalda (*T. spelta*) jsou ekonomicky méně významné (Shewry, 2009).

3.1.2 *Triticum aestivum* L.

V dnešní době je zemědělsky nejdůležitější pšenice setá (*T. aestivum*). Má hexaploidní genom ($2n = 6x = 42$; Sakamura, 1918) o celkové velikosti přibližně 16,95 Gbp (Bennett, 1991), který se skládá ze tří subgenomů A^u, B a D.

Pšenice setá vnikla hybridizací mezi různými druhy. Tato allopolyploidie vedla ke spojení genomů rostlin adaptovaných na jiné prostředí, a tudíž ke vzniku nového druhu potenciálně adaptovaného na větší areál kombinující různé přírodní podmínky (Dubcovsky a Dvořák, 2007). Genom A^u pochází od diploidního druhu *T. urartu*, genom B pak od dosud nezjištěného druhu ze sekce *Sitopsis*, příbuzného s druhem *Aegilops speltoides* (Dvořák a kol., 1988; Dvořák a Zhang, 1990; Dvořák a kol., 1993). Hybridizací těchto dvou druhů před asi půl milionem let vznikl tetraploidní druh *T. dicoccoides*, ze kterého byl domestikován například dnes stále pěstovaný druh *T. durum* (pšenice tvrdá). Tetraploidní druhy pšenice jsou oproti pšenicím diploidním více adaptované na měnící se podmínky prostředí, jsou více životaschopnější a mají vyšší výnosový potenciál (Dubcovsky a Dvořák, 2007).

Domestikovaná tetraploidní *T. durum* se před přibližně 10 000 lety zkrížila s divoce rostoucím diploidním druhem *Ae. tauschii*, který je donorem genomu D, a výsledkem byl hexaploidní druh *T. aestivum* (viz Obr. 4). Ten se poprvé začal pěstovat přibližně před 7000 lety.



Obr. 4: Fylogenetický vývoj druhu *Triticum aestivum*. Přibližná doba divergence a hybridizace uvedena v milionech let: **1** ... divergence vedoucí ke vzniku rodů *Triticum* (A) a *Aegilops* (B); **2** ... hybridizace mezi liniemi A B za vzniku genomu D; **3** ... hybridizace mezi druhem (BB) příbuzným s *Aegilops speltoides* a *T. urartu* (A^uA^u) vedoucí ke vzniku druhu *T. dicoccoides* (BBA^uA^u); **4** ... hybridizace mezi *T. durum* (BBA^uA^u) a *Ae. tauschii* (DD) za vzniku *T. aestivum* (BBA^uA^uDD). Upraveno podle Marcussen a kol. (2014).

Oproti tetraploidní pšenici je hexaploidní pšenice lépe adaptovaná na kontinentální klima centrální Asie a na různou fotoperiodu a podmínky jarovizace. Je více tolerantní k solím, nízkému pH, hliníku v půdě a mrazu. Má zvýšenou odolnost k některým škůdcům a chorobám. Genom D také kóduje proteiny, jež ovlivňují měkkost endospermu zrn a zadržují CO_2 během kynutí těsta, a proto je mouka vyráběná ze zrn pšenice seté obzvláště vhodná pro pekárenský průmysl. Právě díky zmíněným faktorům je v současnosti pšenice setá tak rozšířeným druhem. Jako modelový organismus ke studiu pšenice seté se používá diploidní pšenice jednozrnka, která také může sloužit jako zdroj vhodných genů (Dubcovsky a Dvořák, 2007; Feuillet a kol., 2008; Zohary a kol., 2013).

3.1.3 *Triticum monococcum* L.

Diploidní druh pšenice *T. monococcum* L. ($2n = 2x = 14$; Sakamura, 1918) tvoří obvykle jedno zrnko na klásek, a proto se také nazývá pšenice jednozrnka. V minulosti měla jednozrnka velký význam jako zdroj potravy, neboť výnos je sice poměrně nízký, ale je schopna růst v půdách chudých na živiny, je odolná vůči mrazu a různým škůdcům. Jednozrnka byla jednou z prvních domestikovaných plodin. V neolitu byla hlavní pěstovanou obilovinou, ale její důležitost se

od doby bronzové začala zmenšovat kvůli výhodnější *free-threshing T. aestivum* a *T. durum*. V nynější době se pěstuje ke krmení zvířat v hornatých částech Turecka, Itálie a Španělska. Divoce roste na pohořích obklopujících oblast úrodného půlměsíce. Právě zde byla před přibližně 10 000 lety domestikována z plané pšenice *T. boeoticum*. Domestikovaná a planá jednozrnka je morfologicky stejná, obě jsou diploidní a mají totožné chromozómy. Liší se však zejména způsobem šíření semen. Zralé klásky plané jednozrnky se od vrcholu oddělují a padají na zem. Oproti tomu klas domestikované jednozrnky zůstává vcelku a na klásky se rozpadá až mlácením (Heun, 1997; Zohary a kol., 2013).

Jednozrnka je blíže příbuzná s *T. urartu*, která je donorem subgenomu Aⁿ *T. aestivum*. Pro *T. aestivum* je jednozrnka dobrým modelovým organismem (Dubcovsky a kol., 1996). Oproti kulturním pšenicím je jednozrnka více geneticky variabilní. Nebyla intenzivně šlechtěna a stále existuje její planý předek *T. boeoticum*. Jednozrnka tedy může posloužit ke zlepšení kvality šlechtěných pšenic jakožto zdroj vhodných genů (Dubcovsky a kol., 1996; Feuillet a kol., 2008; Zohary a kol., 2013). Křížení mezi *T. monococcum* a *T. aestivum* může zajistit dobrý přenos žádaných alel z chromozómů divoce rostoucích druhů do homeologních chromozómů kultivovaných druhů bez významného snížení fitness vlivem *linkage drag*. *T. monococcum* může být kříženo s *T. aestivum* přímo s následnými jeden až dvěma zpětnými kříženími k obnově fertility. Jiným způsobem je přenos přes triploidní hybridy (tzv. *triploid bridge*) buď využitím *T. durum* nebo křížením autotetraploidní formy *T. monococcum* s *T. durum* (Singh a kol., 2008; Fedak, 2015).

Jednozrnka je cenným zdrojem genů rezistence proti rzi travní (*Puccinia graminis* Pers.), rzi pšeničné (*Puccinia triticina* Erikss.), sněti indické (*Tilletia indica* Mitra), rzi plevové (*Puccinia striiformis* Westend.), padlí travnímu (*Blumeria graminis* (DC.) Speer), fuzarióze klasu (způsobené různými druhy *Fusarium*) a některým virům (virová čárkovitá mozaika pšenice a další). Také je například zdrojem genů odolnosti vůči mrazu *Fr* a ovlivňujících tvrdost zrna *Pina* a *Pinb* (Fedak, 2015). Jednozrnka nalezla uplatnění jako genetický model ke studiu a mapování zemědělsky významných znaků pšenice.

3.2 Agronomicky významné znaky

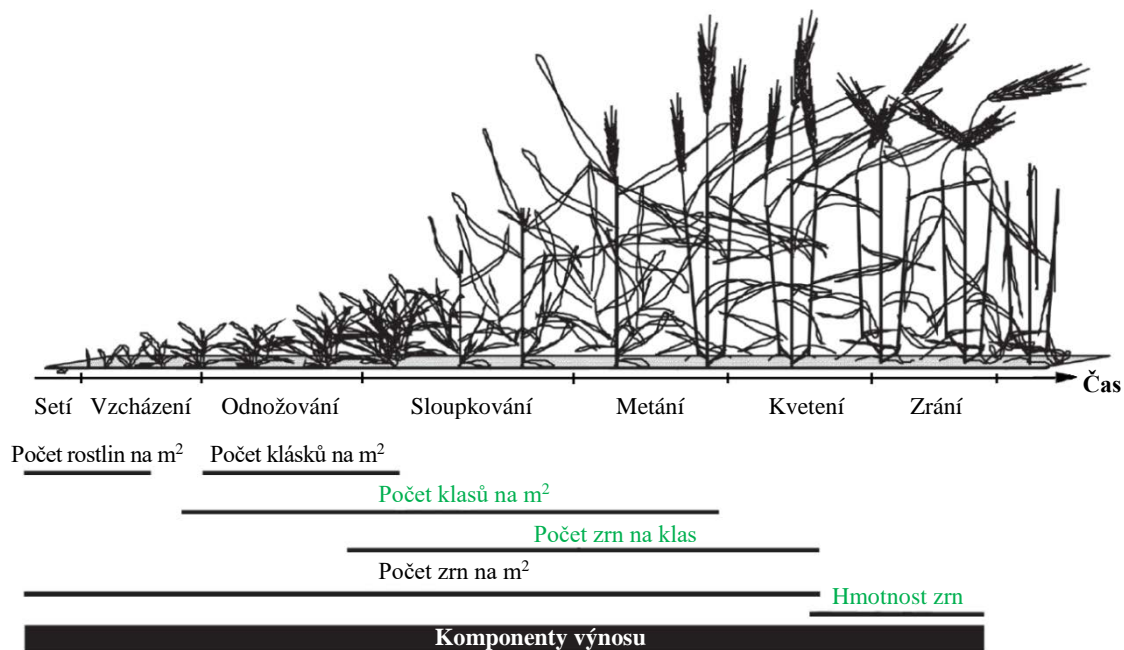
Agronomicky nejdůležitějším znakem je výnos. Mezi další důležité znaky patří výška rostliny, chlupatost, čas kvetení, velikost zrna, tvar zrna a obsah proteinů v zrnech. U pšenice je většina agronomicky významných znaků kvantitativních (Börner a kol., 2002).

3.2.1 Výnos

Zvýšení výnosu pšenice, významného agronomického znaku, je cílem šlechtitelských programů už po desetiletí. Jedná se o kvantitativní znak s nízkou heritabilitou, jež je podmíněn více geny a je značně ovlivněn prostředím (Cuthbert a kol., 2008). Vysoký výnos je obvykle spojen s nižším obsahem proteinů v zru a zpožděným zráním. Šlechtitelské programy se tak snaží zvýšit výnos pšenice bez nežádoucího snížení kvality zrna. Vyššího výnosu není dosahováno jen zvýšením výnosového potenciálu jako takového, ale často i zlepšením odolnosti vůči biotickému a abiotickému stresu, který jinak může výnosový potenciál limitovat (Mergoum a kol., 2009).

Výnos má tři hlavní komponenty (Acevedo a kol., 2002), viz schéma na Obr. 5:

1. Počet klasů na m^2
2. Počet zrn na klas
3. Hmotnost zrn



Obr. 5: Schéma růstu pšenice. Úsečky znázorňují časová období, kdy se vytváří jednotlivé komponenty výnosu. Upraveno podle Slafer a Rawson (1994).

Počet klasů na m²

Prvním komponentem výnosu je počet klasů vytvářených rostlinou. Je závislý na hustotě výsevu semen a na počtu plodných odnoží. Odnože se u pšenice vytvářejí v úžlabí hlavního stonku v odnožovacím uzlu. Počet odnoží nesených rostlinou je závislý na genotypu, prostředí a výsevku. Zimní pšenice má odnoží více než jarní. Jen část odnoží vytváří klasy, ty se označují jako plodné odnože. Sterilní odnože klasy netvoří (Acevedo a kol., 2002). Za vhodných podmínek se na pšenici vytváří dvě až tři plodné odnože (Acquaah, 2012).

Počet zrn na klas

Další komponent výnosu, počet zrn na klas, je závislý na počtu klásků vytvářených na klasu, respektive na počtu fertálních kvítků založených v klásku. Klásků se na klasu tvoří 10–25 a každý klásek nese 1–5 kvítků. Jen 2–3 kvítky jsou však obvykle fertální. *T. aestivum* vytváří v závislosti na odrůdě a vnějším prostředí přibližně 35–75 zrn na klas (Hobbs a Sayre, 2001; Acquaah, 2012).

Hmotnost zrn

Třetím komponentem je hmotnost zrna (*kernel weight*). Běžněji se udává jako hmotnost tisíce zrn (*thousand kernel weight*, TKW). Jeden tisíc zrn váží 20–50 g, přičemž záleží na konkrétní odrůdě a prostředí. Velikost zrn na klasu se liší. Největší zrno je druhé odspodu, směrem k vrcholu se pak zrna zmenšují. Váha jednotlivých zrn je také závislá na jejich celkovém vyprodukovaném množství. Čím více zrn jedna rostlina produkuje, tím jsou menší. (Hobbs a Sayre, 2001).

3.2.2 Výška rostliny

Jedním z důležitých znaků je výška rostliny. Kratší rostliny jsou méně náchylné na nevyhovující povětrnostní podmínky. Jejich stonky nepoléhají a mohou nést těžší klasy. Navíc do růstu investují méně energie, kterou tak mohou využít na tvorbu zrn. Odrůdy pšenice s modifikovanými geny *Rht* (*reduced height*; například *Rht-1* nebo *Rht-2*) mají oproti normálním rostlinám menší vzrůst, neboť mají sníženou citlivost na rostlinný hormon kyselinu gibberelovou (Appleford a kol., 2007). Optimální výška rostliny pro největší potenciální výnos je 70–100 cm (Fischer, 2001). Zavedení pěstování krátkostébelných odrůd pšenice vedlo k tzv. zelené revoluci, při které došlo k výraznému nárůstu v zemědělské produkci.

Gonjiró Inazuka v roce 1935 křížením japonských a amerických odrůd pšenice získal krátkostébelnou odrůdu pšenice nazvanou Norin 10. Orville Vogel pomocí této odrůdy vyšlechtil vysoce výnosové (*high-yielding variety*, HYV) krátkostébelné odrůdy ozimé pšenice. V roce 1952 těchto odrůd dále využil Norman Borlaug ke křížení s mexickými odrůdami.

Výslední kříženci, HYV odolné k poléhání, se začali v 60. letech 20. století pěstovat v Mexiku, Indii a Pákistánu. Produkce pšenice se v těchto zemích zdvojnásobila. Borlaug v roce 1970 obdržel Nobelovu cenu míru, neboť, jak komise odůvodnila, se tehdy více než kdokoliv jiný zasadil o poskytnutí potravy hladovému světu, čímž přispěl k zachování míru ve světě (Borlaug, 1981; Swaminathan, 2009; Lumpkin, 2015).

3.2.3 Chlupatost

Dalším významnějším znakem je chlupatost, jež je spojena s odolností rostlin. Chlupy (neboli trichomy), vyrůstající na listech či stoncích, zajišťují zvýšenou ochranu rostliny vůči faktorům biotickým (například různý hmyz a býložravci) i abiotickým (sucho či chlad). Chlupatost je řízena více geny, jejichž exprese se liší i vnitrodruhově v závislosti na prostředí. Trichomy *T. aestivum* jsou jednobuněčné, nevětvené a jejich množství a délka je pro jednotlivé odrůdy charakteristická (Doroshkov a kol., 2011).

3.2.4 Kvetení

Vhodná doba kvetení je klíčová pro přežití pšenice a dobrý výnos. Je ovlivněna více geny a vlivy vnějšího prostředí, zejména teplotou a délkou dne. V případě, že by kvetení v mírném podnebném pásu začalo příliš brzy na jaře, je zvýšeno riziko zmrznutí kvítků. Naopak zpožděné kvetení není výhodné kvůli vyšší teplotě, a tedy snížené půdní vlhkosti. Za většinu variability kvetení odpovídají tři skupiny genů s velkým účinkem. Geny vernalizační (*Vrn*), fotoperiodické (*Ppd*) a ranosti *per se* (*Eps*).

Vystavení rostliny nízkým teplotám, aby mohla na jaře vykvést, se nazývá vernalizace (také jarovizace, podle latinského *vernal* – jarní). Vernalizace zabezpečuje, že rostlina nevykvetne v nesprávnou dobu (ještě před začátkem zimy). Podle vlivu vernalizace se odrůdy pšenice dělí na ozimy, jařiny a přesívky. Ozimá pšenice se vysévá na podzim, vyklíčí a vůči mrazu odolné rostliny s přizemními listy přečkají ve vegetativní fázi do jara. S nástupem vyšších teplot a delších dní poté přechází do fáze reprodukční, k čemuž předtím potřebuje prodělat několikadenní vernalizaci. Oproti tomu jařiny se vysévají na jaře, ke kvetení vernalizaci nevyžadují a vůči mrazu jsou jen málo odolné. V současnosti méně pěstované přesívky snášejí výsev na podzim i na jaře (Flood a Halloran, 1986; Zhang a kol., 2009).

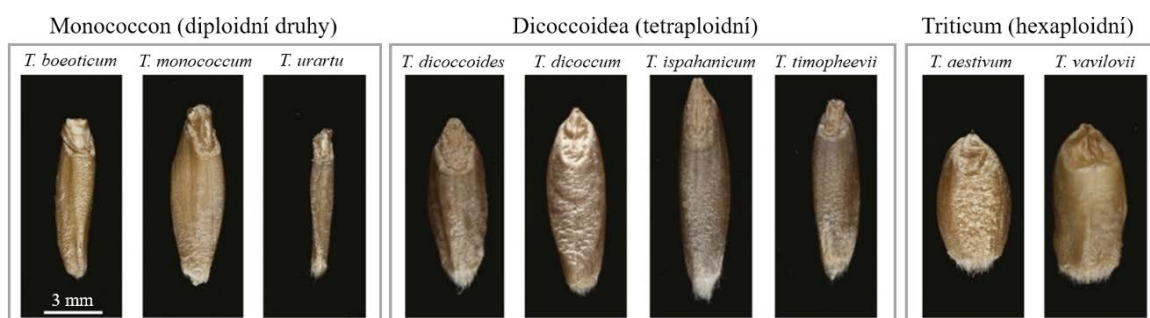
Fotoperioda je časový úsek, po který je rostlina vystavena slunečnímu záření v cyklu 24 hodin. Rostliny citlivé na fotoperiodu nepřechází do reprodukční fáze dříve, než nastane hraniční délka dne. Dělí se na rostliny dlouhodobní (indukce kvetení dlouhými dny) a krátkodobní (nevyžadují indukci kvetení délkou dne). Existují odrůdy pšenice jak krátkodobní, tak dlouhodobní. V naší zeměpisné šířce se pěstují odrůdy dlouhodobní. Rostliny necitlivé

naopak mohou na jaře kvést hned po zvýšení teploty. U některých kultivarů ozimé pšenice může být vernalizace nahrazena krátkými dny (Evans, 1987).

Geny ranosti pak mohou být definovány jako všechny geny ovlivňující čas kvetení mimo ty, jenž jsou zapojeny do vernalizační nebo fotoperiodické dráhy. Slouží k jemnému doladění doby kvetení (Lewis a kol., 2008).

3.2.5 Velikost a tvar zrna

Hmotnost zrna, důležitý komponent výnosu, je ovlivněna rozměry zrna (*kernel dimensions*, KD), respektive délkou (*kernel length*, KL) a šířkou zrna (*kernel width*, KW; Cui a kol., 2011). Velikost a tvar zrna jsou znaky na sobě nezávislé. Domestikace vedla od dlouhých a úzkých zrn k zrnům kratším a tlustším (viz Obr. 6). Proces domestikace však spíše vedl k selekci větších zrn než k nějakému jejich specifickému tvaru. Ten se stal důležitým až v poslední době, neboť ovlivňuje mletí, a tedy výnos a kvalitu mouky (Gegas a kol., 2010).



Obr. 6: Rozdílné velikosti a tvary zrn u vybraných druhů pšenice. Délka úsečky rovna 3 mm. Upraveno podle Gegas a kol. (2010).

3.2.6 Kvalita zrna

Růst počtu obyvatel na Zemi je spojen s potřebou větší produkce potravin. K ochraně životního prostředí je nicméně nutné navýšit výnosový potenciál pšenice a kvalitu zrn namísto dalšího přetváření krajiny na zemědělskou půdu. Kritéria, podle kterých se posuzuje kvalita zrna, se liší podle využití. Například potravinářský průmysl vyžaduje vysoký obsah proteinů, naopak výrobci bioetanolu vyšší podíl škrobu. Kvalita zrn je obecně posuzována podle váhy, tvrdosti, barvy, vlhkosti, poškození, čistoty, obsahu proteinů a aktivity α -amylázy. Poslední dvě kritéria jsou zvláště důležitá, pokud je zrno určeno k potravinářské výrobě.

Hlavním komponentem zrna je škrob, který je v sušině zastoupen ze 70–75 %. Škrob je látka složená ze dvou polysacharidů, amylozy a amylopektinu, vody a v menším množství z proteinů a lipidů. Škrobová zrna jako taková mají jen malý vliv na funkční vlastnosti mouky. Avšak mletím poškozená škrobová zrna snadněji podléhají enzymatické hydrolyze na dextriny a jednodušší cukry (zejména maltózu) účinkem α - a β -amyláz. Disacharid maltóza slouží jako

substrát při kvašení těsta kvasinkami nebo bakteriemi. Proto je pro přípravu kynutého pečiva preferována jemně rozemletá mouka, která obsahuje více mechanicky poškozených škrobových zrn (Morris a Rose, 1996; Peña, 2002). Druhým významným komponentem zrna jsou proteiny, kterých je obsaženo 8–17 %. Přibližně 78–85 % zaujímá protein lepek. Lepek ovlivňuje viskoelasticitu těsta, a tedy typickou strukturu různých druhů pečiva. Je tvořen z ve vodě málo rozpuštěných proteinů gliadinů a gluteninů (MacRitchie, 1994). Obsah lepku v mouce přímo úměrně určuje tzv. sílu mouky. Těsto ze silné mouky zadržuje velký objem oxidu uhličitého uvolňovaného při kvašení (kynutí) a z takového těsta se peče žádané kypré pečivo. Dalšími komponenty zrna jsou lipidy, minerální látky (například fosfor, draslík, síra, hořčík, vápník, zinek, železo, mangan, měď, bór, molybden a selen), vitamíny (zejména ze skupiny B a E) a voda (Bushuk, 1998; Hussain a kol., 2010).

3.3 Genetické mapy

Ke studiu znaků, včetně výše zmíněných zemědělsky důležitých znaků, je potřeba znát geny, které je ovlivňují a jejich pořadí na chromozómech. Genetické mapy jsou nepostradatelným nástrojem při analýze genomů. Mapování je proces určování umístění markerů na chromozómech. DNA markery mohou být jak kódující (geny), tak nekódující sekvence DNA (například v blízkosti genů). Existují dva typy genetických map. **Vazebné mapy** jsou založeny na pravděpodobnosti rekombinace mezi dvěma markery, vzdálenost mezi nimi je tedy jen relativní. Na druhou stranu **fyzické mapy** udávají reálnou vzdálenost mezi markery, jež je v případě map restričních, kontigových, delečních a sekvenčních vyjádřena v párech bází. V cytogenetických mapách je vzdálenost udávána v mikrometrech či procentech délky chromozómu.

Porovnáním genomových map odlišných druhů je možné zjistit míru konzervativnosti pořadí genů na chromozómech (tzv. syntenie), díky čemuž se dá studovat evoluce genomů. Je možné využít znalosti umístění genů u jednoho druhu k určení pozice podobných nebo stejných genů u druhu jiného. Mapování genů podmiňujících agronomicky důležité znaky je využito ke šlechtění nových odrůd. Mapy pomáhají při sestavování kompletní genomové sekvence z mnoha kratších sekvencí získaných sekvenováním. Základem mapování jsou mapovací populace (Dear, 1997).

3.3.1 Vazebné mapování

Vazebné mapy jsou sestavovány na základě frekvence meiotických *crossing-overů* mezi dvěma markery. U organismů rozmnožujících se pohlavním způsobem se během pozdní profáze I. meiotického dělení rekombinují úseky nesesterských chromatid procesem *crossing-overu* a dceřiné chromozómy náhodně segregují do gamet. Pokud jsou dva markery na chromozómu

umístěny fyzicky blízko sebe, je pravděpodobnost, že mezi nimi dojde ke *crossing-overu*, velmi malá. Kosegregují společně do stejných gamet a jen vzácně rekombinují. Jsou tzv. ve vazbě. Naopak pokud jsou dva markery na chromozómu dále od sebe, je vyšší pravděpodobnost, že k rekombinaci dojde a budou segregovat odděleně. Jsou tedy v tzv. vazbě neúplné. V posledním případě jsou markery na odlišných chromozómech a nejsou ve vazbě.

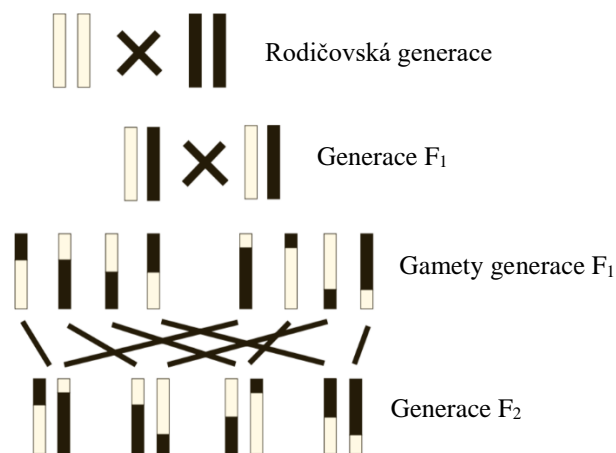
Vazba markerů je tedy vyjádřena pravděpodobností, s jakou mezi nimi dojde k rekombinaci. Čím blíže jsou markery u sebe, tím je vazba silnější. Míra rekombinace se vyjadřuje rekombinačním zlomkem, což je podíl počtu rekombinovaných gamet k celkovému počtu sledovaných gamet. Jednotkou vzdálenosti dvou markerů je 1 Morgan (M), častěji používaný je 1 centiMorgan (cM; 1 M = 100 cM), jež vychází z rekombinačních frekvencí. 1 cM odpovídá 1% pravděpodobnosti, že dojde k rekombinaci mezi dvěma markery. Mapu lze sestavit na základě znalosti síly vazby mezi všemi možnými kombinacemi markerů (Morgan, 1915). Aby bylo možné zjistit, zda dochází k rekombinaci mezi markery, je třeba použít polymorfní markery. Tj. markery, které dokáží odhalit rozdíly mezi rodiči. Jako rodiče je vhodné vybrat jedince homozygotní a vůči sobě kontrastní. Nicméně záleží na studovaném rostlinném druhu. U pšenice je možné vytvořit čisté linie samosprašením, naopak u druhů cizosprašných, jako například lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.), se silně projevuje inbrední deprese. Což znamená, že potomstvo má sníženou vitalitu účinkem vzácných škodlivých recesivních alel (Saraswathy a Ramalingam, 2011)

Pokud v mapovací populaci segreguje větší množství markerů, nejprve se na základě rekombinačních frekvencí rozdělí do vazbových skupin, jejichž počet by měl být ideálně roven základnímu chromozomálnímu číslu daného druhu. Markery, jež jsou ve vazbě, patří do stejné vazbové skupiny. Přítomnost vazby se statisticky testuje. Porovnává se alternativní hypotéza (mezi markery existuje vazba) s hypotézou nulovou (vazba neexistuje). Dekadický logaritmus poměru pravděpodobnosti těchto hypotéz se nazývá LOD skóre (*logarithm of odds*; Morton, 1955). LOD skóre větší než 3 představuje tisíckrát větší pravděpodobnost, že vazba existuje, oproti možnosti, že neexistuje. Ve vazbové skupině se markery dále seřazují. Markery se po jednom přidávají na mapu tak, aby byla vazebná informace v souladu s markery již umístěnými (Xu, 2013). K tomu slouží počítačové programy, například dříve populární MapMaker (Lander a kol., 1987) nebo JoinMap (Stam, 1993), v současnosti se používá JoinMap 4 (Van Ooijen, 2006) a jiné. Rekombinační frekvence se převádí na vzdálenost v Morganech pomocí Haldanovy (Haldane, 1919), nebo častěji Kosambiho mapovací funkce (Kosambi, 1943). Kosambiho funkce oproti Haldanově funkci bere v úvahu interferenci. Interference je negativní ovlivnění vzniku *crossing-overu* jiným *crossing-overem* v jeho blízkosti.

3.3.2 Mapovací populace

Nezbytným prostředkem k mapování genomu jsou mapovací populace. Sestávají z jedinců, jejichž rodiče jsou polymorfni pro studované znaky. U samosprašných rostlin se používají populace F_2 a rekombinantní inbrední linie (*recombinant inbred lines*, RIL), oproti tomu u cizosprašných rostlin se většinou používají populace F_1 a *sibling-mating* populace. U obou typů lze pak použít populací připravených zpětným křížením (*backcross*; BC) a dihaploidní linie (*doubled haploid*, DH; Schneider, 2005).

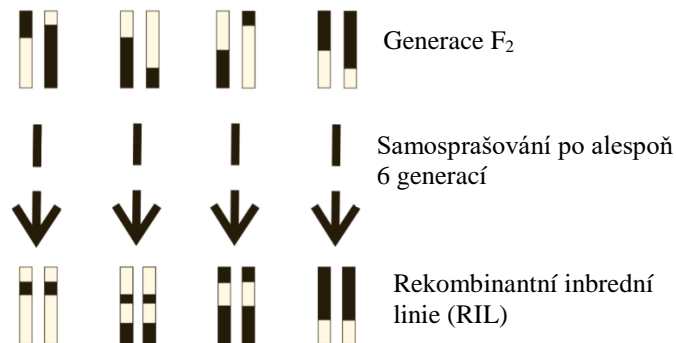
F_2 populace jsou nejjednodušším typem mapovacích populací. Vznikají křížením dvou homozygotních rodičovských linií. Rodiče by se měli ideálně lišit ve všech znacích. V případě, že rodiče budou homozygoti, jejich F_1 potomstvo bude podle prvního Mendelova zákona, o uniformitě hybridů F_1 generace, identické genotypově a velmi podobné fenotypově. Jednotlivé F_1 rostliny jsou poté samosprášeny. Jedinci F_2 populace jsou pak výsledkem rekombinace genetické informace během meiózy (viz Obr. 7). Rekombinace je nicméně u F_2 populací omezená tím, že meióza probíhá jen jednou. Většinou není možné populaci přemnožovat. Na mapování recesivních genů a lokusů kvantitativních znaků (*quantitative trait loci*, QTL) jsou spíše vhodné RIL (F_{6-10}) nebo DH mapovací populace, které vychází ze stejných F_2 jedinců a téměř všechny geny mají fixované (Acquaah, 2012).



Obr. 7: Princip vytvoření F_2 populace. Dva chromozómy zde reprezentují oba homozygotní rodiče. F_1 generace je heterozygotní. Samosprášením generace F_1 vzniká rekombinovaná generace F_2 . Upraveno podle Schneider (2005).

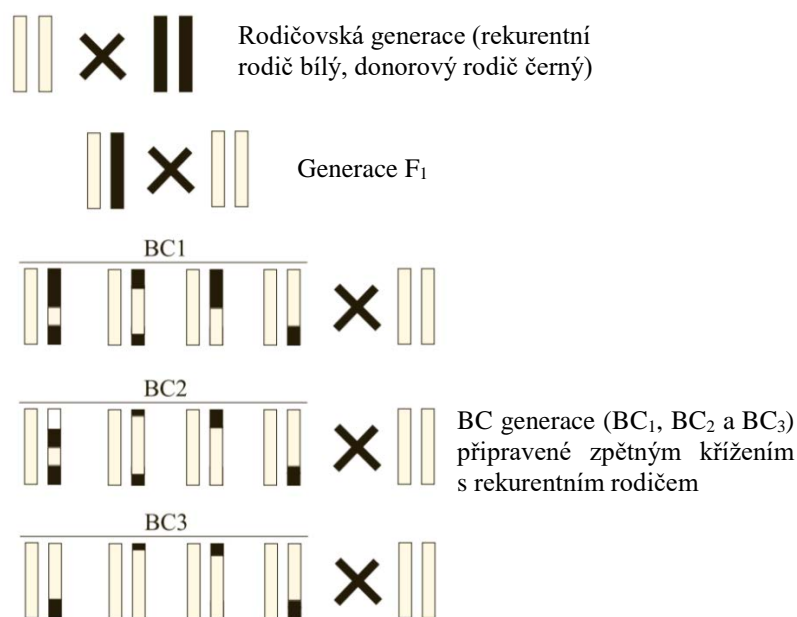
Rekombinantní inbrední linie se běžně získávají metodou SSD (*single-seed descent*), tedy opakovaným samosprášením jedinců z F_2 populace. Opakované samosprášení navyšuje množství proběhlých rekombinací, takže je možné rozlišit i markery, mezi kterými je silnější vazba. Během šesti generací je dosaženo skoro úplné homozygotnosti (viz Obr. 8). Dalším množením už nedochází k segregaci znaků a je tedy možné zachovat tyto homozygotní jedince

po neomezenou dobu přemnožování, díky čemuž jsou RIL vhodné pro mapování QTL. Oproti F_2 populacím je možné využít RIL ke konstrukci map s vyšším rozlišením. Nevýhodou je nicméně časová náročnost (Schneider, 2005; Acquaah, 2012).



Obr. 8: Princip SSD metody – opakované samosprašování jedinců F_2 generace – k vytvoření RIL. Upraveno podle Schneider (2005).

Populace získané **zpětným křížením** slouží k analýze fragmentů DNA odvozených z rodiče donorového (na Obr. 9 znázorněný černě) na pozadí rodiče rekurentního (také označován jako recipient), s nímž se populace F_1 zpětně kříží. Během meiózy se donorové fragmenty DNA, jež nejsou ve vazbě, separují segregací, a donorové fragmenty DNA, jež jsou ve vazbě, se rekombinují a jejich zastoupení se tedy snižuje. Každým dalším zpětným křížením se snižuje počet a velikost donorových fragmentů, až se potomci mohou od rekurentního rodiče lišit jen jedním fragmentem DNA. Takovéto téměř isogenní linie se nazývají **NIL** (*nearly isogenic lines*). Příprava NIL zahrnuje zpětné křížení po několik generací spolu se selekcí za pomoci markerů a kontrolou fenotypu. K zafixování donorových segmentů a sledování projevu recesivně podmíněných znaků je po procesu zpětného křížení zapotřebí několik samosprašení. Výhodou NIL je, že je lze přemnožovat, dále už totiž nedochází k segregaci znaků a genom je zafixovaný. Jsou tedy vhodné ke QTL analýzám. NILs jsou užitečné ke studiu jednotlivých genů, ale nehodí se k vazebnému mapování, protože celý genom, až na selektovaný fragment, je zafixovaný. Zpětné křížení je také možné použít například k introgresi genu rezistence vůči chorobám do jinak už zavedených elitních kultivarů (Schneider, 2005; Acquaah, 2012).



Obr. 9: Princip získání mapovací populace zpětným křížením jedinců F₁ generace s rekurentním rodičem. Upraveno podle Schneider (2005).

Jedinci **dihaploidní linie** mají v jádře dvě identické sady chromozómů a jsou tedy ve všech genech homozygotní. Dihaploidní linie mohou být vytvořeny z haploidních linií. Haploidní linie mohou vzniknout spontánně (například v případě kukuřice; Chase, 1969) nebo jsou vytvářeny uměle. Haploidie se dá dosáhnout například kultivací nezralých prašníků *in vitro* s následnou regenerací rostlin z haploidních buněk gametofytu. Jinou možností je mezidruhové křížení a následná eliminace otcovské sady chromozómů. Například po opylení ječmene setého (*Hordeum vulgare* L.) pylem planého *Hordeum bulbosum* L. jsou během prvního buněčného dělení eliminovány chromozómy *H. bulbosum*. Výsledkem je tedy haploidní rostlina se sadou chromozómů pocházejících ze samičí gamety (Kasha a Kao, 1970). Haploidní jedinci jsou často menší, méně vitální a téměř sterilní. Občas se haploidní sada chromozómů spontánně zdvojuje, což vede ke vzniku DH jedinců. Toho se dá dosáhnout i aplikací kolchicinu, který brání vzniku dělicího vřeténka v mitóze a vznikají DH buňky. Z nich se dají somatickou embryogenezí získat DH linie. DH linie se používají nejen k přípravě mapovacích populací, ale i ke šlechtění, které je použitím DH linií méně časově náročné (Acquaah, 2012). Stejně jako RIL a NIL se mohou jedinci DH linií libovolně přemnožovat. Nevýhodou může být vyšší cena přípravy a nižší rozlišení konstruovaných map oproti těm, jež jsou připraveny pomocí RIL.

3.3.3 Genetické markery

Genetické značky, markery, jsou snadno rozlišitelné genetické znaky, úseky DNA, nebo produkty genů používané k odlišení genomů. Mohou se rozdělit do tří základních skupin – na markery fenotypové (morfologické), markery biochemické a molekulární (nebo také DNA)

markery. Dostupnost markerů je spojena s existencí genetického polymorfismu. Polymorfismem se myslí výskyt více alternativních sekvencí DNA (alel) v jednom lokusu v dané populaci, přičemž frekvence výskytu alely je větší než 1 %. Polymorfismus vzniká řadou mutací, a to nejčastěji mutacemi bodovými. Markery se využívají například ke konstrukci genetických map, analýze genů nebo šlechtění. Markery by obecně měly být polymorfní, v genomu zastoupené náhodně a s vysokou frekvencí, selekčně neutrální, kodominantní (umožňují odlišit jedince v daném lokusu heterozygotní od homozygotních), reprodukovatelné a v neposlední řadě cenově dostupné (Acquaah, 2012).

První používané markery byly variabilní fenotypové znaky hodnotitelné vizuálně, například velikost, tvar a barva. V tehdejší době to byla jediná možnost, jak popsat jinak nedetekovatelný polymorfismus. Dnes se stále v menší míře používají. Nevýhodou je, že jich není mnoho a jsou ovlivněny prostředím.

Dalším typem používaných markerů byly markery biochemické. Nejčastěji se využívaly isoenzymy, což jsou izoformy proteinů, které se liší aminokyselinovým složením a nábojem a mohou být rozlišeny elektroforetickými metodami. Dnes se příliš nepoužívají, neboť jen málo proteinů tvoří izoformy a také jsou ovlivněny prostředím a stářím rostliny.

Posledních 20 let se nejčastěji používají molekulární markery. Mohou být definovány jako sekvence DNA, jejichž poloha na chromozómu je známa. První takové markery byly tzv. **RFLP** (*restriction fragment length polymorphism*, polymorfismus délky restrikčních fragmentů), které využívají cílových míst v genomu k vazbě specifických restrikčních endonukleáz. Sekvence cílových míst se kvůli jednonukleotidovým mutacím liší i u blízce příbuzných genotypů. Restrikční endonukleázy naštěpí genomovou DNA. Fragменты jsou elektroforeticky separovány na gelu a *Southern blottingem* přeneseny na hybridizační membránu. Fragменты jsou hybridizovány se značenými próbami (například fragmenty DNA, cDNA, nebo *expressed sequence tag*, EST) a vizualizovány. Zjišťuje se přítomnost signálu, a to u rodičů a jedinců mapovací populace. RFLP markery jsou výhodné pro svojí kodominantní dědičnost, specificitu a reprodukovatelnost pokusů (Botstein a kol., 1980; Saraswathy a Ramalingam, 2011).

Kvůli časové a laboratorní náročnosti *Southern blottingu* se zavedly PCR-RFLP techniky. Spojení PCR (*polymerase chain reaction*, polymerázová řetězová reakce) a RFLP je využito systémy markerů **CAPS** (*cleaved amplified polymorphic sequence*) a **AFLP** (*amplified fragment length polymorphism*). CAPS využívá restrikčního štěpení amplifikovaných úseků DNA a AFLP je založen na amplifikaci restrikčních fragmentů generovaných specifickými restrikčními enzymy a adaptérech komplementárních ke koncům těchto fragmentů. Vzhledem ke značnému množství různých restrikčních endonukleáz a odpovídajících kombinací primerů, nachází AFLP velké uplatnění například v analýzách genetické diverzity, struktury populací,

fylogenetických vztahů a ve vazebném i fyzickém mapování. Nevýhodou je dominantní charakter AFLP markerů (Vos a kol., 1995; Neff a kol., 1998).

Metoda **RAPD** (*random amplification of polymorphic DNA*) byla jednou z prvních, jež využila metody PCR. Výhodou je, že není zapotřebí znát sekvenci amplifikovaného úseku DNA. Jako primery se používají přibližně 10 bází dlouhé náhodné oligonukleotidy. PCR produkty jsou nejčastěji separovány elektroforézou na agarózovém gelu a barveny ethidium bromidem. Jediný náhodný primer dokáže ve většině případů poskytnout jeden až tři vizualizovatelné produkty PCR, které se mohou mezi rodiči mapovací populace lišit. RAPD se však v mapování uplatňuje méně, jelikož většinou má dominantní charakter a je obtížné ji reprodukovat kvůli citlivosti PCR na podmínky reakce (Williams a kol., 1990).

Dalším typem DNA markerů jsou tzv. **SSR** (*simple sequence repeat*). Jejich základem jsou mikrosatelity, což jsou tandemové repetice několikanukleotidových motivů. Běžně se nacházejí v genomu eukaryot, a to většinou v nekódujících oblastech. V mikrosatelitových oblastech dochází k mutacím častěji, což vede ke značnému polymorfismu v počtu opakování motivu. Tento polymorfismus se také označuje jako SSLP (*simple sequence length polymorphism*). Analýza polymorfismu mikrosatelitových lokusů je založena na PCR. Sekvence DNA, ohraničující mikrosatelity, jsou většinou konzervované a mohou se do nich tedy navrhovat primery. Podobně jako RFLP jsou SSR kodominantní, ale navíc výhodnější pro větší přesnost a polymorfismus. SSR markery nachází využití například v genetickém mapování, DNA fingerprintingu, markery asistované selekci (*marker-assisted selection*, MAS), ve studiu genetické diverzity a populační genetiky (Litt a Luty, 1989; Hearne a kol., 1992; Zietkiewicz a kol., 1994; Collard a Mackill, 2008). **ISSR** (*inter-simple sequence repeat*) podobně jako RAPD nevyžadují předchozí znalost sekvence. Metoda spočívá v amplifikaci úseků DNA mezi mikrosatelitovými lokusy. Nevýhodou ISSR markerů je, že jsou dominantní (Godwin a kol., 1997).

REMAP (*retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism*) a **IRAP** (*inter-retrotransposon amplified polymorphism*) markery jsou založeny na existenci LTR retrotranspozónů, což jsou transponovatelné elementy, jež mají na koncích dlouhé repetitivní úseky (*long terminal repeats*). PCR se amplifikuje oblast DNA mezi retrotranspozóny a SSR nebo mezi dvěma retrotranspozóny. PCR produkty jsou poté děleny gelovou elektroforézou (Kalendar a kol., 1999).

SNP (*single nucleotide polymorphism*, jednonukleotidový polymorfismus) jsou v genomech organismů zastoupeny nejčastěji, jejich množství je variabilní nejen mezidruhově, ale i vnitrodruhově. Jedná se o změny sekvence v jediném nukleotidu, přičemž většinou se v mapovací populaci v jednom lokusu nachází jeden ze dvou různých nukleotidů. Příčinou vzniku SNP jsou bodové mutace, respektive transverze a tranzice. Více se vyskytují v nekódujících oblastech genomu. U pšenice seté odpovídá 1 SNP přibližně 540 bp (Somers

a kol., 2003). SNP je možné detekovat hybridizací se značenými sondami, PCR, při níž nasedá či nenasedá primer v SNP místech, štěpením nukleázami v tzv. *mismatch* místech, štěpením restričními endonukleázami v SNP místech nebo například sekvenováním. Oproti mikrosatelitům SNP mutují daleko méně a vzhledem k hustotě výskytu v genomech jsou vhodné například ke konstrukci vysokohustotních genetických map. SNP jsou markery kodominantní a jsou snadno přístupné automatizaci (Acquaah, 2012). V Tab. 2 jsou shrnuty výše uvedené markery.

Tab. 2: Shrnutí základních vlastností v textu zmíněných molekulárních markerů (podle Nguyen a Wu, 2005).

Marker/ technika	Založeno na PCR	Polymorfismus	Dominance	Reproduko- vatelnost	Automatizace	Cena
RFLP	Ne	Nízký/střední	Kodominantní	Vysoká	Nízká	Vysoká
CAPS	Ano	Vysoký	Kodominantní	Vysoká	Střední	Střední
AFLP	Ano	Vysoký	Dominantní	Vysoká	Střední/vysoká	Střední
RAPD	Ano	Střední/vysoký	Dominantní	Nízká	Střední	Nízká
SSR	Ano	Vysoký	Kodominantní	Vysoká	Střední/vysoká	Nízká
ISSR	Ano	Vysoký	Dominantní	Vysoká	Střední/vysoká	Nízká
IRAP/REMAP	Ano	Vysoký	Kodominantní	Vysoká	Střední/vysoká	Nízká
SNP	Ano	Velmi vysoký	Kodominantní /dominantní	Vysoká	Vysoká	Nízká

Všechny vazebné mapy jsou unikátní, protože se pro jejich konstrukci používají jiné mapovací populace a markery. Při použití stejných markerů totiž není zaručeno, že budou polymorfni u různých populací. K porovnání map slouží kotvící markery. Jedná se zpravidla o RFLP nebo SSR markery. Spojením map konstruovaných na základě různých genotypů pomocí kotvících markerů se vytváří konsenzuální genetické mapy, které jsou využívány k dalšímu studiu genomů. Mohou být užitečné pro efektivní konstrukci nových map nebo cílené (lokalizované) mapování. Například mohou indikovat, které markery jsou lokalizovány ve specifické oblasti zahrnující QTL, a tedy identifikovat silněji vázané markery (Collard a kol., 2005).

3.4 Lokusy kvantitativních znaků

U rostlin je většina zemědělsky významných znaků podmíněna kvantitativně, tj. více geny s různým příspěvkem k variabilitě znaku. Studium těchto kvantitativních znaků je přínosem pro šlechtitelské programy a má značný význam pro výživu lidstva. Může pomoci vyšlechtit rostliny s vyšším výnosovým potenciálem či odolnější vůči stresu.

Kvantitativní znaky nevykazují mendelistickou dědičnost a často jsou ovlivněny prostředím. Variabilita kvantitativních znaků v populaci kontinuálně přechází z jednoho extrému do druhého. Lokusy kvantitativních znaků (*quantitative trait loci*, QTL) jsou úseky DNA, které zaujmají geny podmiňující kvantitativní znaky. Cílem QTL mapování je zjistit, kolik QTL podmiňuje daný znak, kde se v genomu nachází a jak velký mají vliv na fenotyp. Mezi agronomicky významné kvantitativní znaky patří například výnos, kvalita zrna a odolnost proti různým chorobám a škůdcům (Börner a kol., 2002; Cuthbert a kol., 2008; Grotewold a kol., 2015).

K mapování QTL se často volí RIL mapovací populace o 100–200 jedincích. Čím více jedinců se použije, tím přesnější bude mapování a může umožnit detekci QTL malého efektu. Nejprve se v populaci fenotypují vybrané znaky. Dále se zvolí vhodné polymorfní DNA markery, pomocí kterých se populace genotypuje a rozřazuje do genotypových skupin (Semagn a kol., 2010).

Pomocí statistických programů, například MapMaker/QTL (Lincoln a kol., 1993), Map Manager QTX (Manly a kol., 2001), QTLCartographer (Wang a kol., 2012), nebo QGene (Joehanes a Nelson, 2008), se posuzuje rozdíl v průměrné hodnotě fenotypového znaku mezi skupinami. Testují se dvě hypotézy. Nulová hypotéza, tedy neexistence QTL nebo QTL existuje, ale není asociované s markery, a hypotéza alternativní, která předpokládá přítomnost QTL a asociaci s markerem. Mezi tři běžně používané statistické metody detekce QTL patří jednomarkerová analýza (*single-marker analysis* nebo také *single-point analysis*), jednoduché mapování pomocí intervalu (*simple interval mapping*, SIM) a složené mapování pomocí intervalu (*composite interval mapping*, CIM).

Jednomarkerová analýza je nejjednodušší metoda detekce QTL asociovaného s jedním markerem. Používané statistické metody pro jednomarkerovou analýzu jsou například *t*-test (Gosset, 1908), analýza rozptylu (*analysis of variance*, ANOVA; Fisher, 1918) nebo lineární regrese (Kearsey a Hyne, 1994). Výhodou této analýzy je, že není zapotřebí kompletní genetické mapy. Naopak nevýhodou je, že čím dále se marker nachází od QTL, tím menší je šance, že bude QTL detekován (Collard a kol., 2005).

Jednoduché mapování pomocí intervalu používá pár markerů ve vazbě k detekci QTL umístěného na chromozómu v intervalu mezi nimi. QTL mimo interval mohou však negativně ovlivnit nalezení QTL v rámci intervalu. Pokud jsou na zkoumaný interval vázané jiné QTL, může dojít k nalezení falešně pozitivního QTL v intervalu. SIM tedy bere v potaz jen jeden QTL a ignoruje ostatní možné QTL. Stejně jako CIM vyžaduje genetickou mapu (Lander a Botstein, 1989).

Složené mapování pomocí intervalu kombinuje SIM s několikanásobnou statistickou analýzou lineární regrese. Na rozdíl od SIM berou v potaz i ostatní interagující QTL. Používají

se další markery, tzv. kofaktory, které zvyšují citlivost analýzy a pomáhají odlišit jiné vázané QTL (Jansen, 1993).

Před tím, než je znalosti o QTL využito ke šlechtění (MAS) nebo identifikaci genů, se testuje (verifikuje) spolehlivost markerů asociovaných s QTL. Opakovaně se detekují stejné markery na nově vytvořené segregující populaci, která byla připravena křížením buď stejných rodičovských linií, nebo blízkce příbuzných genotypů. Případně se ověřují i na kultivarech nebo jiných důležitých genotypech. Verifikace QTL je nutná k potvrzení vztahu mezi markerem a znakem (Lander a Kruglyak, 1995).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Vzorky DNA o koncentraci $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ izolované z 92 linií mapovací populace F_{12} *Triticum monococcum* L. a z 407 linií verifikačních mapovacích populací F_2 *T. monococcum*.

Mapovací populace F_{8-12} , připravena křížením jedinců *T. monococcum* kultivar DV92 (Titograd, Montenegro, ITA) a *T. boeoticum* Boiss. G3116 (LBN), byla poskytnuta Jorge Dubcovským (University of California, Davis, USA; Dubcovsky a kol., 1996) a dopěstována na F_{12} (Vanžurová, 2013).

Verifikační mapovací populace F_2 byly připraveny Hanou Vanžurovou křížením *T. monococcum* kultivar DV92 s jedinci mapovací populace F_{12} 113 a 165 a křížením jedinců mapovací populace F_{12} 144 a 246. Ze 407 linií bylo 203 linií připraveno křížením jedinců 144 a 246, 102 linií bylo připraveno křížením DV92 a 113 a dalších 102 linií bylo připraveno křížením DV92 a 165. Verifikační mapovací populace byly připraveny tak, aby jednotlivé lokusy kvantitativních znaků byly co nejvíce mendelizovány. V Tab. 3 jsou uvedeny verifikační mapovací populace s odpovídajícími znaky a příslušnými markery, pro které byly vytvořeny. Z důvodu úspory místa jsou v tabulce pouze ty markery, jež se nakonec použily pro genotypování a verifikaci QTL (viz kapitola 5).

Tab. 3: Verifikační mapovací populace F_2 se znaky, pro které byly vytvořeny.

Chromozóm	Marker	Polymorfní pro znak	Verifikační mapovací populace
1A	wPt-470347	metání	DV×113, DV×165
	wPt-470427	metání	144×246 a 246×144, DV×113
	wPt-861232	metání	144×246 a 246×144
2A	wPt-1602	výška rostliny	144×246 a 246×144
		hmotnost zrn 1v1	
		délka obilky	
	wPt-469636	výška rostliny	144×246 a 246×144
		rozkladitost trsu	
		hmotnost zrn	
		plocha obilky	
		šířka obilky	
		délka obilky	
		tvár obilky 2	
wPt-470029	výška rostliny	144×246 a 246×144	

Pokračování Tab. 3.

Chromozóm	Marker	Polymorfní pro znak	Verifikační mapovací populace
2A	wPt-861836	výška rostliny	144×246 a 246×144
		rozkladitost trsu	
		hmotnost zrn 1v1	
		hmotnost zrn 2v1	
		hmotnost zrn – nerozlišeno	
		tvár obilky 2	
		tvár obilky 3	
		plocha obilky	
		délka obilky	
		šířka obilky	
3A	wPt-0418	procentuální zastoupení semínek 1v1 (2v1)	DV×113, DV×165
	wPt-376043	chlupatost listů	144×246 a 246×144, DV×113, DV×165
		chlupatost listů	
	wPt-470276	poměr počtu semínek 1v1 a 2v1	DV×113, DV×165
		procentuální zastoupení semínek 1v1 (2v1)	
4A	wPt-470207	hmotnost zrn 2v1	144×246 a 246×144, DV×113
	wPt-470470	délka klasu	144×246 a 246×144, DV×113, DV×165
		hustota klasu	
wPt-376253		chlupatost listů	144×246 a 246×144, DV×113, DV×165
		plocha obilky	
		šířka obilky	
		tvár obilky	
		hmotnost zrn	
		tvár obilky 1	
		hmotnost zrn 1v1	
5A	wPt-469404	hmotnost zrn 2v1	DV×113, DV×165
		rozkladitost trsu	
		plocha obilky	
		tvár obilky 2	
		šířka obilky	
wPt-469467		hmotnost zrn 2v1	DV×113
		plocha obilky	
		rozkladitost trsu	
		šířka obilky	
		tvár obilky 2	

Pokračování **Tab. 3.**

Chromozóm	Marker	Polymorfní pro znak	Verifikační mapovací populace
5A	wPt-861794	hmotnost zrn 1v1	DV x 113
		hmotnost zrn 2v1	
		plocha obilky	
		rozkladitost trsu	
		šířka obilky	
	wPt-862154	tvár obilky 2	144×246 a 246×144
		tvár obilky 2	
		hmotnost zrn	
		šířka obilky	
		chlupatost listů	
		délka klasu	

Pozn.: 144×246 a 246×144 ... verifikační mapovací populace připravená křížením linií označených 144 a 246; DV×113 ... populace připravená křížením linií označených DV92 a 113; DV×165 ... populace připravená křížením linií označených DV92 a 165, 1v1/2v1 ... 1 nebo 2 zrna v jedné obilce.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- 2 U·μl⁻¹ *Taq* polymeráza (BioLabs; Ipswich, USA)
- agaróza (VWR; Radnor, USA)
- chlorid hořečnatý hexahydrát (Lach-Ner; Neratovice, ČR)
- destilovaná voda
- ethidium bromid (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
- nukleotidy, 100 mmol·l⁻¹ dATP, dCTP, dGTP, dTTP (VWR; Radnor, USA)
- primery (Eurofins Genomics; Lucemburk, LUX)

4.2.2 Použité soupravy

- Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter; Brea, USA)
- BDX64 Big Dye Enhancing Buffer (MCLAB; San Francisco, USA)
- BigDye Terminator 5× sekvenční pufr (Applied Biosystems; Foster City, USA)
- BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems; Foster City, USA)
- ExoSAP (Applied Biosystems; Foster City, USA)

4.2.3 Použité roztoky

- **5× TBE pufr:**
 - 450 mmol·l⁻¹ Tris (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 450 mmol·l⁻¹ kyselina boritá (Lach-Ner; Neratovice, ČR)
 - 10 mmol·l⁻¹ EDTA, pH = 8,0 (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
- **10× PCR pufr (bez MgCl₂):**
 - 100 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH = 8,2 (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 500 mmol·l⁻¹ chlorid draselný (Lach-Ner; Neratovice, ČR)
 - 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
- **marker molekulové hmotnosti (520 µl roztoku):**
 - 20 µl Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA)
 - 200 µl 6× STOP C:
 - 100 mmol·l⁻¹ EDTA (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 1% SDS (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 0,05% bromfenolová modř (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 0,05% xylen kyanol (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 42,5% glycerol (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 300 µl destilovaná voda
- **pracovní roztok cresol red:**
 - 0,01% *o*-kresolová červeň (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
 - 1,5% sacharóza (Lach-Ner; Neratovice, ČR)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Aparatura pro horizontální gelovou elektroforézu, Owl A6 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA)
- Centrifuga, MiniStar Silverline (VWR; Radnor, USA)
- Centrifuga, PlateFuge MicroCentrifuge (Benchmark Scientific; Edison, USA)
- Digitální předvážky, Vibra AJ-820CE (Shinko Denshi; Tokio, JAP)
- Mikrovlnná trouba, KOR-6C2B (DAEWOO; Soul, KOR)
- Robot, Biomek NX^P (Beckman Coulter; Brea, USA)
- Sekvenátor, 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems; Foster City, USA)
- Termocyklér, C-1000 Touch (Bio-Rad; Hercules, USA)
- Třepačka, Reax Control (Heidolph Instruments; Schwabach, DEU)
- UV transiluminátor, InGenius (Syngene; Bengalúru, IND)
- Zdroj, MP-300V (Major Science; Saratoga, USA)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR byla provedena v objemu 10 μl v 384-jamkových PCR destičkách (VWR; Radnor, USA) nebo v objemu 20 μl v 96-jamkových PCR destičkách (VWR; Radnor, USA). Reakční směs obsahovala složky uvedené v Tab. 4.

Tab. 4: Složení PCR reakční směsi.

Složka PCR reakční směsi	Objem [μl]	
10 \times PCR pufr (bez MgCl_2)	1	2
25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2	0,8	1,6
cresol red	2	4
10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dNTP	0,2	0,4
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ forward (F) primer	0,5	1
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ reverse (R) primer	0,5	1
~ 2 U/ μl <i>Taq</i> polymeráza	0,2	0,4
destilovaná voda	3,6	8,1
10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ DNA	1,2	1,5
Celkem	10	20

Touchdown PCR protokol je uveden v Tab. 5.

Tab. 5: Podmínky PCR.

Krok	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů celkem
1 počáteční denaturace	95	5 minut	1
2 denaturace	95	40 sekund	
3 nasedání	65 (-0,7/cyklus)	40 sekund	16
4 extense	72	1 minuta	
5 denaturace	95	40 sekund	
6 nasedání	53	40 sekund	17
7 extense	72	1 minuta	
8 závěrečná extense	72	10 minut	1

4.4.2 Elektroforéza na agarózovém gelu

Produkty PCR byly separovány elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu (4,5 g agarózy a 300 ml 0,5 \times TBE pufru). Na gel byly nanášeny produkty PCR po 5 μl a marker molekulových hmotností po 4 μl . Elektroforéza probíhala po dobu 80, nebo 110 minut při napětí 120 V.

Separované produkty PCR byly barveny 0,05% ethidium bromidem po dobu přibližně 20 minut, následně byly vizualizovány v UV transiluminátoru.

4.4.3 Sekvenování produktů PCR Sangerovou metodou

Produkty PCR získané amplifikací úseků DNA byly enzymaticky přečištěny s použitím soupravy ExoSAP. Reakční směs obsahovala 4 μl produktu PCR, 0,5 μl enzymu alkalická fosfatáza (0,5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ FastAP), 0,05 μl enzymu exonukleáza I (1 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ Exo I) a 2,45 μl 1 \times PCR pufru. Směs byla inkubována při 37 °C po dobu 30 minut a poté denaturována při 95 °C po dobu 5 minut.

Přečištěné produkty PCR byly použity pro sekvenační reakci pomocí soupravy BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit v 96-jamkových *semi-skirted* PCR destičkách (Gel Company; San Francisco, USA). Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 6.

Tab. 6: Složení reakční směsi pro sekvenační reakci.

Složka směsi pro sekvenační reakci	Objem [μl]
5 \times sekvenační pufr	1,5
Big Dye	0,125
BDX64 Enhancing buffer	0,875
destilovaná voda	3,5
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ primer F nebo R	1
enzymaticky přečištěný produkt PCR	3
Celkem	10

Podmínky sekvenační reakce jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7: Podmínky sekvenační reakce.

Krok	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů celkem
1	98	5 minut	1
2	96	10 sekund	
3	50	5 sekund	60
4	60	4 minuty	

Produkty sekvenační reakce byly přečištěny s použitím magnetických kuliček soupravou Agencourt CleanSEQ robotem Biomek NX^P a sekvenovány přístrojem 3730xl DNA Analyzer.

4.4.4 Genotypování

Pokud byly markery určeny ke genotypování na základě elektroforetického profilu produktů PCR (presence/absence, nebo délkový polymorfismus), byli jedinci genotypování porovnáním jejich elektroforetických profilů s elektroforetickými profily jejich rodičů.

Pokud byly markery určeny ke genotypování na základě osekvenovaných produktů PCR (SNP), byli jedinci genotypováni porovnáním chromatogramů jejich PCR produktů s chromatogramy PCR produktů jejich rodičů. Sekvence PCR produktů byly přiřazeny algoritmem MUSCLE (Edgar, 2004) v programu *Geneious 6.1.8* (Biomatters; Kears e a kol., 2012).

Genotypy byly zaznamenány do tabulky v programu Microsoft Excel 365 (Microsoft Corporation). Jedinci nesoucí alelu rodičovské linie DV92, nebo 144 byli označeni A, jedinci s alelou rodičovské linie 113, 165, nebo 246 byli označeni B. Heterozygotní jedinci byli označeni H. Pokud byly o genotypu pochybnosti, byl označen malým písmenem a, b, nebo h. V případě, že nebylo možné genotypovat (z důvodu slabé či žádné amplifikace), bylo příslušné pole ponecháno prázdné.

4.4.5 Verifikace lokusů kvantitativních znaků

Analýza lokusů kvantitativních znaků (QTL) byla provedena v programu QGene 4.4 (Joehanes a Nelson, 2008) a Microsoft Excel 365 (Microsoft Corporation). Genotypová data verifikačních mapovacích populací F_2 byla asociována s fenotypovými daty (zpracované Barborou Balcárkovou, Evou Janákovou, Hanou Vanžurovou a Zuzanou Ivaničovou) pomocí jednomarkerové regresní analýzy (Kearsey a Hyne, 1994) a jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA; Fisher, 1918). Výstupem jednomarkerové regresní analýzy byly LOD skóre (Morton, 1955) pro každý analyzovaný marker a fenotypový znak. Za signifikantní bylo považováno LOD skóre > 3 (předpokládá se, že je $1000\times$ vyšší pravděpodobnost že znak přispívá k variabilitě, než nepřispívá). Jednofaktorová analýza rozptylu byla provedena porovnáním populace homozygotů pro znak A a pro znak B. Byly získány p -hodnoty (Pearson, 1900). Nulová hypotéza (marker a QTL nejsou ve vazbě) byla zamítnuta na hladině významnosti $\alpha < 0,05$ a byla přijata alternativní hypotéza (marker a QTL jsou ve vazbě).

Identifikované QTL byly porovnány s QTL identifikovanými Klocovou (2010), Gallovou (2011) a Vanžurovou (2013) na mapovací populaci F_{8-12} *Triticum monococcum* L. QTL byl verifikován, pokud byl mapován na mapovací populaci F_{8-12} a na verifikačních mapovacích populacích F_2 s LOD skóre větší než 3 nebo p -hodnotou menší než 0,05. V opačném případě zůstal QTL neverifikován. QTL verifikované oběma metodami byly považovány za velmi signifikantní.

5 Výsledky

Praktická část byla vypracována na Ústavu experimentální botaniky AV ČR v.v.i. v Olomouci.

5.1 Optimalizace markerů a genotypování

55 párů primerů navržených Hanou Vanžurovou na základě DArT (*diversity array technology*; Jaccoud, 2001) markerů (Tab. 8) bylo optimalizováno na mapovací populaci F₁₂ *T. monococcum* a na rodičovských liniích (DV92 a G3116). Z celého setu bylo vyřazeno 34 neamplifikujících se nebo nepolymorfních markerů. Zbylé markery (Tab. 9) vykazovaly polymorfismus presence/absence (Obr. 10), délkový polymorfismus (Obr. 11), nebo jednonukleotidový polymorfismus (Obr. 12).

Tab. 8: Seznam testovaných markerů a příslušných primerů. Teplota nasedání primerů byla dle *touchdown* protokolu PCR (Tab. 4) 54,5 až 65 °C.

Marker	Primer	Sekvence forward (F) a reverse (R) primerů (5' → 3')	Polymorfismus	Délka amplikonu [bp]
wPt-0418	D0418	F: GCCCTGCTATCGGATCAAAT R: CTTCTCTTCATCCACCATG	SNP (C/T; 656)	~1050
wPt-1602	D1602	F: TGCACACACACACAAACACA R: TTGCACCGGTATATCCTCCC	DP	~1050–1150
wPt-2128	D2128	F: GCTAGAGAGGCAAAGATAGTTCA R: ACCCACC AAAAGAAGGAGAAAAG		
wPt-2490	D2490	F: GAACAGAATTGCCAAGACATCA R: GTCATTCTGTGGACAAGAGCT		
wPt-376043	D376043	F: CGCAGGATGAAGTTACGAGG R: AAACAGAAGAGGTCCAGAGC	SNP (C/T; 211)	~950
wPt-376185	D376185	F: TCCTTCGATCCTCCACCTTG R: AGTACCCAACTCCCAATGG		
wPt-376253	D376253	F: CACGTTGGGCACAGAACTTA R: TGGGCTTCCTGGTGTGATG	SNP (C/T; 489)	~1000
wPt-376273	D376273	F: AGGCATTAAGGGGTGTTTGT R: AAACAAGCTTTTCGGGAGGG		
wPt-376291	D376291	F: ACACCTTTGAATAATGCCACCT R: ATTGTACAGGCAAAGTTCCC		
wPt-376529	D376529	F: TGGAGATACTCGGGAGGTGA R: TATCACCTACCCTGGCTTG		
wPt-376701	D376701	F: ACGCCCCATTACATGACTCA R: GACGCGATATTTACCCAGGT		

Pokračování Tab. 8.

Marker	Primer	Sekvence forward (F) a reverse (R) primerů (5' → 3')	Polymorfismus	Délka ampliconu [bp]
wPt-376971	D376971	F: AGAACGGGATGAAGTTTGCC R: TGCCGATTGTCAGAATGGAAC		
wPt-377177	D377177	F: TACACGAACCTGCACTACCA R: TCTTCATGAACTGCCCTGT		
wPt-469153	D469153	F: AGCAGATACAGGGCTCACTC R: GACGAAACCGAGCAAGAGTT		~1100
wPt-469159	D469159	F: CCATAGTGGCAGATGAGTCCT R: ATCCCTTCAACAAGCAGC		
wPt-469328	D469328	F: CGCCCTCCATCGTTCCCTTAT R: CACCATCTAGATCCCCTTGCT		
wPt-469404	D469404	F: CTTAGAGGGCCCATGTCTGC R: ACTCGATCAGAATTTCCATGCAG	P/A	~900
wPt-469467	D469467	F: TAGATCGCAGGCAAGGCTT R: ATTTTGACAGGCACGACAGG	P/A	~1100
wPt-469544	D469544	F: GATAGCTCACGTTCCCTCCC R: GTTTCAGTGTATCATGCCCGG		
wPt-469570	D469570	F: AAGGATGTGGTGAGCGCAAT R: GGTAACACGTCCTTGGCTG		
wPt-469588	D469588	F: GTCTTCCCCATCTCCACCTT R: TGGACTACATACGGAGCAAAA		
wPt-469600	D469600	F: CACATGCACCAGGTTTCA R: ACAGTCGGTAACAACAGTCG		
wPt-469623	D469623	F: AGATAAACCGTGGTGCTCA R: CACCTCCTCCTTACCTTCA		
wPt-469636	D469636	F: TCTTGCCTCTGTTTCGGGAA R: GCTGGTGTGTATCGATGGG	DP	~850–1050
wPt-469957	D469957	F: AATGCAGCACCAGAGGAAAG R: GTAAAGGCTTGCCGTGTACA		
wPt-469972	D469972	F: CATATGCACAGTCGTCGGTT R: CGCGTTGCAGTGGGAATTTA		
wPt-470029	D470029	F: AGGAGAGAGAACCCGTTTGA R: TGTGGTTGGATTGAACAGAGG	SNP (A/G; 528)	~950
wPt-470031	D470031	F: TCTTGTGCGATACCAGGGTT R: GCGCATTGTCACTGGTTGA		
wPt-470156	D470156	F: AAAGTGCATGCATGAAGTGGT R: CTGGAATTCGCCCTTGATGG		
wPt-470207	D470207	F: GGCACAACTCTAGACGCTT R: CTAAAGCCCCGCTTTCAAA	P/A	~1050
wPt-470235	D470235	F: GAACCAACTTGAAGCTCGGG R: AAGTTTCGACCTTGTTCGGC		

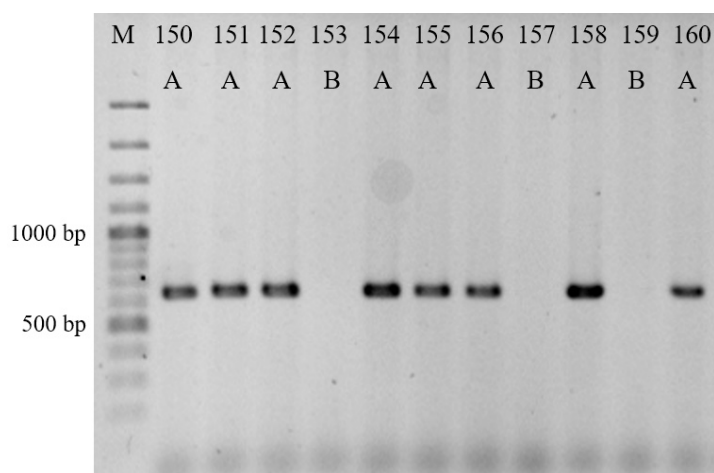
Pokračování Tab. 8.

Marker	Primer	Sekvence forward (F) a reverse (R) primerů (5' → 3')	Polymorfismus	Délka ampliconu [bp]
wPt-470258	D470258	F: TGAAGCTGAGGATCATTGAACA R: CACTCTACTCGGCTCGGTAA		
wPt-470276	D470276	F: TTCCTACCAGCGCAGACATA R: TATCGTCTTCTTGGAGGTGAGG	P/A	~950
wPt-470347	D470347	F: CAGGTTAGAAATGGCCGCAT R: CTTCCGACCAACACAACCAA	SNP (C/T; 168)	~950
wPt-470389	D470389	F: AACGAACTGGAGTCCTTGCT R: GAAACTAGTTGATTCCCCGCG		
wPt-470427	D470427	F: ATTACATGTTGCCTGCTCCC R: TCGTGGTGGTTATGATCCCT	SNP (A/T; 267)	~1050
wPt-470451	D470451	F: CTGCTGCGCCAATAATCAGA R: CATTGATGGATGGAGGACTGG		
wPt-470470	D470470	F: ACGTGGATAGAGGAAGCACT R: TTTGGCCGGTGAACCTTGTG	P/A	~650
wPt-470475	D470475	F: AACTTGAGCGACACACACAC R: CCAACATCGAGGCCCTGA		
wPt-470479	D470479	F: TCCCGAAGAACTGTGGA R: ATCCCAGCCACACTCTACAA		
wPt-470566	D470566	F: GTTTTTCAGTATACGGACACACTG R: CTGGAATTCGCCCTTGATGG		
wPt-470626	D470626	F: GAAGCGCGGACTTTATAGAC R: ATCTGCAGAATTTCGCCCTTG		
wPt-861112	D861112	F: TCCATCATCCCAAAGTTGCG R: CCAGGTGTGTTGATTTGAACCT		
wPt-861201	D861201	F: AATGTCTCCTCGTAGTTGCG R: CATGCACACAACCTTGCTCAC		
wPt-861232	D861232	F: TACCCCTCAACTCCCATTCC R: ATTTACCAGCCACAGTCAGC	P/A	~1050
wPt-861424	D861424	F: GTGACACAACGGGCAAATTG R: GGGAGGGAACGTGAGCTATC		
wPt-861475	D861475	F: ACATGCTTTGAAGAGGACCC R: TCTGCTGTCTTCTCCCTG		
wPt-861500	D861500	F: CACACACACCGGAACAAAAC R: ATATGTATGTGGTGAACGGCC		
wPt-861587	D861587	F: CGTATTACTCCCTCCGTTGC R: GTCCTCACACCTCACACAAA		~1100
wPt-861777	D861777	F: AGGACATGCACTTCAGTAGC R: CACATGCGTTCCTGTCCTT		
wPt-861793	D861793	F: TAGAGAATCGCACGAGGAGA R: CCAAGATAAGAGCGTTGCGT		

Pokračování **Tab. 8.**

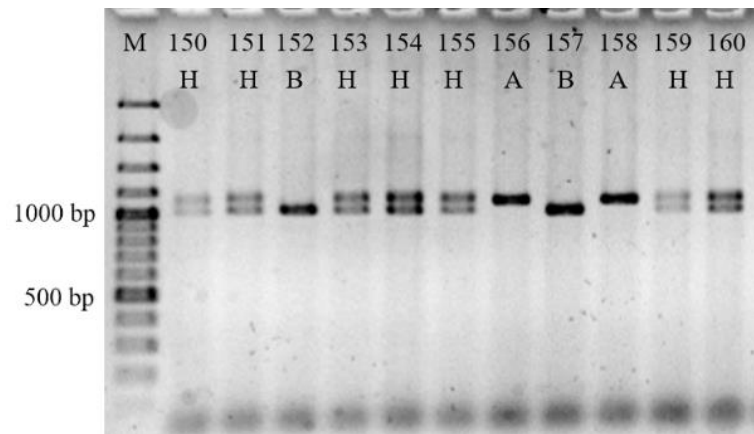
Marker	Primer	Sekvence forward (F) a reverse (R) primerů (5' → 3')	Polymorfismus	Délka ampliconu [bp]
wPt-861794	D861794	F: GCCAAGGCGTACAAGAAAGT R: AGGAGGCGGAGATCTTCAAG	DP	~1050–1150
wPt-861836	D861836	F: TCGGTTGAACAGTACATATCG R: TTTCCAGATCAACGGCTCCT	P/A	~950
wPt-861914	D861914	F: CATCGACGTTGTTGCTGAAGA R: TGTCCCATGCCATACTCCAA		
wPt-862154	D862154	F: AAGAAACAGGGGAGTACTTTT R: ACTGAACCGGGACTAATGGG	SNP (G/T; 642)	~950

Pozn.: P/A ... polymorfismus presence/absence; DP ... délkový polymorfismus; SNP ... jednonukleotidový polymorfismus. U SNP je uvedena konkrétní záměna bází a její poloha počítaná od začátku F primeru. Markery, u nichž není uvedena délka ampliconu nebo typ polymorfismu, se neamplifikovaly, amplifikovaly nespecificky nebo nebyly polymorfní.



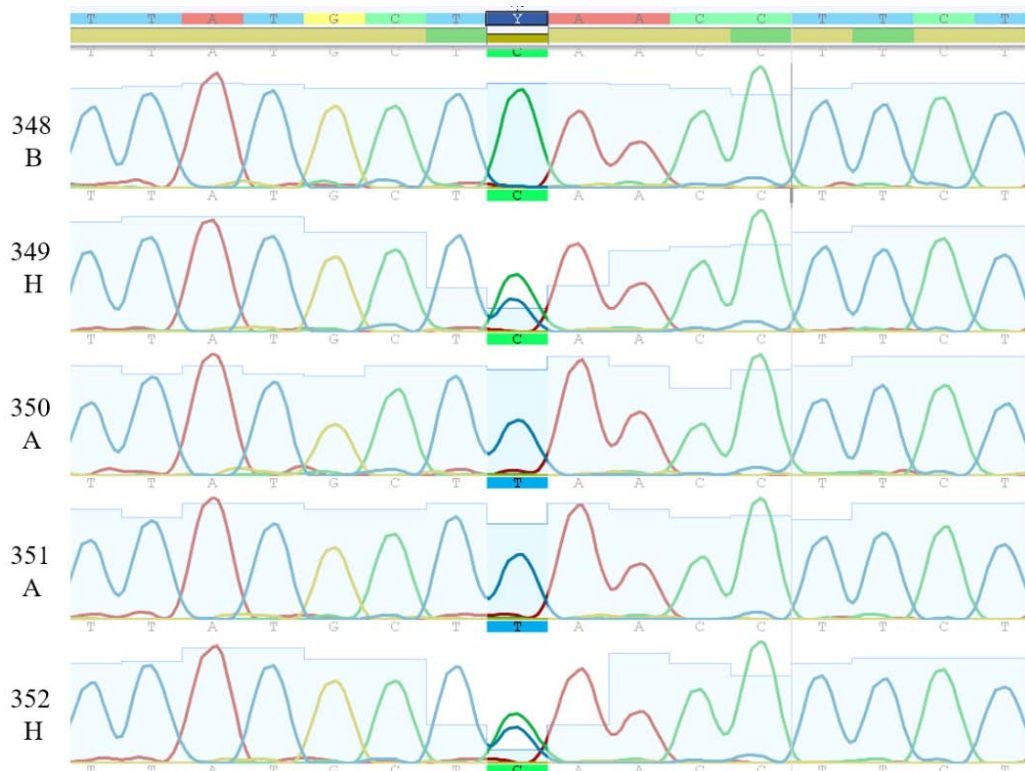
Obr. 10: Příklad elektroforetického profilu presence/absence polymorfismu markeru wPt-470470 na části verifikační mapovací populace F₂ *T. monococcum*.

Pozn.: Produkty PCR byly separovány elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu. M ... velikostní marker; 150–160 ... jednotlivé linie části verifikační mapovací populace F₂; A ... genotyp rodiče 144; B ... genotyp rodiče 246.



Obr. 11: Příklad elektroforetického profilu délkového polymorfismu markeru wPt-1602 na části verifikační mapovací populace F_2 *T. monococcum*.

Pozn.: Produkty PCR byly separovány elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu. M ... velikostní marker; 150–160 ... jednotlivé linie části verifikační mapovací populace F_2 ; A ... genotyp rodiče 144; B ... genotyp rodiče 246; H ... heterozygot.



Obr. 12: Příklad SNP markeru wPt-0418 na části verifikační mapovací populace F_2 *T. monococcum*.

Pozn.: 348–352 ... jednotlivé linie části verifikační mapovací populace F_2 ; A ... genotyp rodiče DV92; B ... genotyp rodiče 165; H ... heterozygot.

Amplifikující se polymorfní markery byly použity ke genotypování verifikačních mapovacích populací F₂ (viz Tab. 9).

Tab. 9: Shrnutí genotypování verifikačních mapovacích populací F₂ *Triticum monococcum* L.

Marker	Polymorfismus	Verifikační mapovací populace F ₂	Genotypované linie/ negenotypované linie	Počet homozygotů		Počet heterozygotů
				pro alelu A	pro alelu B	
wPt-0418	SNP	DV×113, DV×165	201/3	60	50	91
wPt-1602	DP	144×246 a 246×144	192/11	79	17	96
wPt-376043	SNP	144×246 a 246×144, DV×113, DV×165	386/21	107	88	191
wPt-376253	SNP	144×246 a 246×144, DV×113, DV×165	401/6	94	107	200
wPt-469404	P/A	DV×113, DV×165	204/0	150	54	0*
wPt-469467	P/A	DV×113	102/0	28	74	0*
wPt-469636	DP	144×246 a 246×144	144/59	57	17	70
wPt-470029	SNP	144×246 a 246×144	197/6	72	25	100
wPt-470207	P/A	144×246 a 246×144	201/2	142	59	0*
wPt-470276	P/A	DV×113, DV×165	203/1	162	41	0*
wPt-470347	SNP	DV×113, DV×165	196/7	50	37	109
wPt-470427	SNP	144×246 a 246×144, DV×113	279/26	56	82	141
wPt-470470	P/A	144×246 a 246×144, DV×113, DV×165	404/3	300	104	0*
wPt-861232	P/A	144×246 a 246×144	203/0	157	46	0*
wPt-861794	DP	DV×113	101/1	30	23	48
wPt-861836	P/A	144×246 a 246×144	202/1	175	27	0*
wPt-862154	SNP	144×246 a 246×144	195/8	42	52	101

Pozn.: P/A ... polymorfismus presence/absence; DP ... délkový polymorfismus; SNP ... jednonukleotidový polymorfismus; 144×246 a 246×144 ... verifikační mapovací populace připravená křížením linií označených 144 a 246; DV×113 ... populace připravená křížením linií označených DV92 a 113; DV×165 ... populace připravená křížením linií označených DV92 a 165; *dominantní markery neumožňují odlišit jedince v daném lokusu heterozygotní od homozygotních.

5.2 Verifikace lokusů kvantitativních znaků

Jednomarkerovou regresní analýzou (Kearsey a Hyne, 1994) a jednofaktorovou analýzou rozptylu (Fisher, 1918) byly identifikovány lokusy kvantitativních znaků (QTL) pro dobu kvetení, výšku rostliny, délku klasu, hustotu klasu, chlupatost listů a rozkladitost trsu. Pro znaky – hmotnost zrn 1v1 (1 zrno v 1 obilce) a 2v1 (2 zrna v 1 obilce), tvar obilky 1, 2 a 3, plocha obilky, délka obilky, šířka obilky, procentuální zastoupení semínek 1v1 (2v1) a poměr počtu semínek 1v1 a 2v1 – nebyla do této doby fenotypová data zpracována, a proto nebyly do analýzy QTL zahrnuty.

QTL s LOD > 3, nebo p -hodnotou < 0,05 (Tab. 10) byly považovány za verifikované. QTL verifikované oběma statistickými metodami byly považovány za velmi signifikantní.

Tab. 10: QTL testované na verifikačních mapovacích populacích F₂ se získanými LOD skóre a p -hodnotami.

Marker	Chr.	Pozice [cM]	QTL	LOD	p -hodnota	Verifikován
wPt-470347	1A ^m	0,5	doba kvetení*	4,44	1,77·10 ⁻⁶	ano [#]
			doba kvetení*	0,94	0,029	ano
wPt-861232	1A ^m	70,9	délka klasu○	5,08	0,216	
			rozkladitost trsu○	22,9	0,257	
			chlupatost listů○	1	0,031	
wPt-470427	1A ^m	72,2	doba kvetení○	0,74	0,035	
			hustota klasu○	1,16	0,018	
wPt-470029	2A ^m	33,1	rozkladitost trsu○	3,28	0,776	
			výška rostliny*	0,1	0,616	ne
wPt-469636	2A ^m	37,3	rozkladitost trsu*	4,01	0,684	ano
			výška rostliny*	0,42	0,027	ano
wPt-1602	2A ^m	40,3	rozkladitost trsu○	6,24	0,514	
			výška rostliny*	0,35	0,135	ne
wPt-861836	2A ^m	45,7	délka klasu○	6,74	0,238	
			rozkladitost trsu*	40,2	0,951	ano
			výška rostliny*	0,83	0,308	ne
			chlupatost listů*	4,29	0,011	ano [#]
wPt-470276	3A ^m	53,7	délka klasu○	5	0,668	
			rozkladitost trsu○	29,9	0,958	
wPt-376043	3A ^m	67,9	chlupatost listů*	13,2	2,07·10 ⁻¹¹	ano [#]
wPt-0418	3A ^m	76,8	chlupatost listů○	6,4	0,008	
wPt-470470	4A ^m	25,1	délka klasu*	2,37	0,003	ano
			hustota klasu*	1,59	0,007	ano
			délka klasu○	8,38	0,007	
wPt-470207	4A ^m	32,7	rozkladitost trsu○	38,6	0,022	
			hustota klasu○	2,22	0,019	
wPt-469467	5A ^m	110	délka klasu○	3,43	0,150	
			rozkladitost trsu*	33,1	0,141	ano
wPt-861794	5A ^m	111,2	rozkladitost trsu*	10,2	0,324	ano
			délka klasu○	3,96	0,197	
wPt-469404	5A ^m	113,7	rozkladitost trsu*	32,5	0,183	ano
			výška rostliny○	0,94	0,041	
wPt-376253	5A ^m	125,6	chlupatost listů*	0,7	0,942	ne
wPt-862154	5A ^m	141,4	chlupatost listů*	1,19	0,001	ano
			délka klasu*	0,31	0,956	ne

Pozn.: pozice markerů na chromozómech dle vazebné mapy Balcárkové (Klocová, 2010), Gallové (2011) a Vanžurové (2011; 2013).; * ... QTL mapovaný na mapovací populaci F₈₋₁₂, # ... velmi signifikantní verifikovaný QTL, ○ ... QTL specifický pro verifikační mapovací populace F₂.

Alespoň jednou ze statistických metod bylo identifikováno 30 QTL (Tab. 10). Z těchto 30 QTL bylo 13 QTL mapováno Klocovou (2010), Gallovou (2011) a Vanžurovou (2013) na mapovací populaci F_{8-12} *T. monococcum* L. Jedná se o 2 QTL pro chlupatost listů na chromozómu 3A^m a 1 QTL pro chlupatost listů na chromozómu 5A^m, 2 QTL pro rozkladitost trsu na chromozómu 2A^m a 3 QTL pro rozkladitost trsu na chromozómu 5A^m, 2 QTL pro dobu kvetení na chromozómu 1A^m, 1 QTL pro výšku rostliny na chromozómu 2A^m, 1 QTL pro délku klasu na chromozómu 4A^m a 1 QTL pro hustotu klasu na chromozómu 4A^m.

Ze zmíněných 13 QTL byly 3 verifikovány (Tab. 10) jako velmi signifikantní (2 pro chlupatost listů na chromozómu 3A^m a 1 pro dobu kvetení na chromozómu 1A^m), neboť jejich LOD skóre bylo větší než 3 a zároveň *p*-hodnota menší než 0,05.

Dalších 10 verifikovaných QTL bylo detekováno jen jednou z metod. Jednofaktorovou analýzou rozptylu bylo identifikováno 5 QTL, a to 1 QTL pro dobu kvetení na chromozómu 1A^m, 1 QTL pro výšku rostliny na chromozómu 2A^m, 1 QTL pro délku klasu na chromozómu 4A^m, 1 QTL pro hustotu klasu na chromozómu 4A^m a 1 QTL pro chlupatost listů na chromozómu 5A^m. Jednomarkerovou regresní analýzou byly identifikovány 2 QTL pro rozkladitost trsu na chromozómu 2A^m a 3 QTL pro rozkladitost trsu na chromozómu 5A^m.

5 QTL mapovaných na mapovací populaci F_{8-12} nebylo na verifikačních mapovacích populacích F_2 detekováno ani jednou z metod a nebyly tedy verifikovány. A to 3 QTL pro výšku rostliny na chromozómu 2A^m (33,1, 40,3 a 45,7 cM), 1 QTL pro chlupatost listů na chromozómu 5A^m (125,6 cM) a 1 QTL pro délku klasu na chromozómu 5A^m (141,4 cM).

Mimo verifikované a neverifikované QTL byly alespoň jednou z metod odhaleny i další QTL specifické pro verifikační mapovací populace F_2 , které by však vyžadovaly další verifikaci. Mezi velmi signifikantní QTL, detekované oběma statistickými metodami, patří lokus pro chlupatost listů na chromozómu 3A^m (76,8 cM) a lokusy pro délku klasu a rozkladitost trsu na chromozómu 4A^m (32,7 cM).

6 Diskuse

Vybrané QTL pro důležité agronomické znaky, identifikované na F_{8-12} mapovací populaci z křížení *T. monococcum* kultivar DV92 a plané linie *T. boeoticum* G3116, byly verifikovány pomocí F_2 mapovacích populací. Tyto verifikační mapovací populace byly konstruovány z linií mapovací populace nebo rodičovských linií vybraných tak, aby jednotlivé kvantitativní lokusy byly maximálně mendelizovány.

Statistickými metodami, jednofaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA; Fisher, 1918) a jednomarkerovou regresní analýzou (Kearsey a Hyne, 1994), bylo zjištěno, zda existoval signifikantní rozdíl mezi fenotypy linií s alelou A a linií s alelou B. Za signifikantní se považovalo LOD skóre > 3 (neboli $1000\times$ vyšší pravděpodobnost, že znak přispívá k variabilitě, než nepřispívá; Morton, 1955) a p -hodnota $< 0,05$ (Pearson, 1900). Při LOD skóre > 3 anebo p -hodnotě $< 0,05$ se tedy předpokládala existence QTL asociovaného s daným markerem. Kombinace jednofaktorové ANOVA (Fisher, 1918) a jednomarkerové regresní analýzy (Kearsey a Hyne, 1994) je postup doporučený pro verifikaci QTL (Lander a Kruglyak, 1995), aby se odfiltrovaly artefakty, které se objevily vlivem prostředí nebo genetického pozadí (Collard a kol., 2005).

Výsledky použitých statistických metod se se doplňují, avšak jen 3 ze 13 verifikovaných QTL bylo detekováno oběma metodami. Jednofaktorová ANOVA (Fisher, 1918) je jednodušší a spíše orientační metoda, počítá pouze s genotypy homozygotů a v našem případě je limitována malou velikostí populace. Oproti tomu jednomarkerová regrese (Kearsey a Hyne, 1994) v programu QGene 4.4 (Joehanes a Nelson, 2008) pracuje i s genotypy heterozygotů a způsobem přípravy mapovací populace a umožňuje přesnější identifikaci asociace znaku s markerem a potažmo lokusem.

Lokusy pro chlupatost listů byly verifikovány na chromozómu $3A^m$ (53,7 a 67,9 cM, resp. $\sim 54\%$ a $\sim 68\%$ chromozómu) a $5A^m$ (141,4 cM; $\sim 88\%$ chromozómu). Doposud tento znak na chromozómu $3A^m$ nebyl mapován. Locus pro chlupatost listů byl dříve v práci Hori a kol. (2007) mapován na chromozómu *T. monococcum* $5A^m$ ($\sim 95\%$ chromozómu). Pozice v 95% chromozómu přibližně odpovídá detekovanému QTL v 88% chromozómu a pravděpodobně se jedná o stejný QTL. Rozdíly ve výsledcích pravděpodobně způsobilo použití jiné mapovací populace, jiný způsob mapování znaku anebo malý příspěvek těchto lokusů k variabilitě znaku, případně jejich velká závislost na dalších lokusech nebo vnějších podmínkách. Taketa a kol. (2002) lokalizoval locus pro chlupatost listů na chromozómu $7B$ hexaploidní pšenice. Na mapovací populaci F_{8-12} byl lokalizován locus pro chlupatost pšenice také na chromozómu $7A^m$, ale pro tento locus nebyly získány vhodné markery pro verifikační mapovací populace F_2 . Na $7B$ i na $7A^m$ byl locus pro chlupatost listů identifikován přibližně v polovině krátkého ramene a pravděpodobně se jedná o syntenní lokusy. To však musí být ověřeno jinými markery.

Dalšími verifikovanými QTL byly lokusy pro dobu kvetení, které se nacházely na opačných koncích chromozómu 1A^m (0,5 cM a 70,9 cM, resp. ~1 % a ~98 % chromozómu). Bullrich a kol. (2002) taktéž lokalizovala a verifikovala lokus (gen ranosti *per se Eps-A^m 1*) ovlivňující dobu kvetení *T. monococcum* v distální části dlouhého ramene chromozómu 1A^m. QTL ovlivňující dobu kvetení byly lokalizovány v distální části dlouhého ramene chromozómů 1A^u, 1B a 1D hexaploidní pšenice (Kuchel a kol., 2006; Griffiths a kol., 2009; Bennett a kol., 2012) i na krátkém rameni chromozómu 1B (Zikhali a kol., 2017). Je možné, že QTL v 1 % chromozómu 1A^m je homeologní ke QTL na krátkém rameni chromozómu 1B. Na mapovací populaci F₈₋₁₂ byly mapovány QTL pro dobu kvetení i na chromozómu 5A^m (~21 %) a 7A^m (~29 %; Vanžurová, 2013), avšak pro ně nebyly získány markery pro verifikační populace. Yu a kol. (2017) nicméně také mapoval QTL pro dobu kvetení v podobné pozici na 5A^m (~35 %) a 7A^m (~33 %) a předpokládá, že se jedná o geny *VrnA^m1* (Dubcovsky a kol., 1998; Yan a kol., 2003) a *FT1-Vrn3* (Yan a kol., 2006).

Další QTL, jež byly verifikovány, jsou lokusy pro rozkladitost (tvar) trsu na chromozómu 2A^m (37,3 a 45,7 cM) a 5A^m (110, 111,2 a 113,7 cM). Tyto údaje nebylo možné porovnat s jinými pracemi, neboť mapováním QTL pro rozkladitost trsu se žádné nezabývaly.

Dále bylo verifikováno QTL pro výšku rostliny na chromozómu 2A^m (37,3 cM; ~39 % chromozómu). Hori a kol. (2007) mapoval lokus pro délku stonku v ~35 % chromozómu 2A^m *T. monococcum*. Yu a kol. (2017) mapoval lokus pro výšku rostliny ve ~40 % chromozómu 2A^m, přičemž se domnívá, že se jedná o lokus homeologní s *Rht-8* hexaploidní pšenice (Korzun a kol., 1998). Ve stejné pozici (~40 %) byl QTL pro výšku rostliny mapován na chromozómu 2B hexaploidní pšenice (Gao a kol., 2015). Jedná se pravděpodobně o homeologní lokusy. Vanžurovou (2013) byly lokusy pro výšku rostliny mapovány na mapovací populaci F₈₋₁₂ i na chromozómech 3A^m (~36 %) a 7A^m (~98 %), pro které však nebyly získány markery.

Dalším verifikovaným QTL byl lokus pro délku klasu na chromozómu 4A^m (25,1 cM; ~44 % chromozómu). Hori a kol. (2007) mapoval QTL pro délku klasu také na chromozómu 4A^m, a to v pozici ~55 %. Börner a kol. (2002) u hexaploidní pšenice mapoval, pravděpodobně homeologní, lokus pro délku klasu na chromozómu 4A^u, a to v oblasti ~45 % chromozómu. Vanžurová (2013) mapovala QTL pro délku klasu i na chromozómech 2A^m (~41 %), 3A^m (každou sezónu jiná pozice) a 6A^m (~45 %), pro které nebyly získány markery.

QTL pro hustotu klasu (poměr počtu klásků na klas a délkou klasu) byl verifikován na chromozómu 4A^m (25,1 cM; ~44 % chromozómu). Hori a kol. (2007) mapoval lokus pro hustotu klasu na dlouhém rameni chromozómu 4A^m (~60 %) a Yu a kol. (2017) v ~44 %, ~56 % a ~63 % 4A^m. Börner a kol. (2002), Ma a kol. (2006) a Kumar a kol. (2007) mapovali lokusy ovlivňující hustotu klasu na dlouhém rameni chromozómu 4A^u hexaploidní pšenice. Odchylna může být způsobena jinými vnějšími podmínkami nebo chybami fenotypování či genotypování, avšak také se může jednat o rozdílné QTL.

7 Závěr

Cílem bakalářské práce byla verifikace lokusů kvantitativních znaků detekovaných na mapovací populaci F₈₋₁₂ *Triticum monococcum* L. (Vanžurová, 2013) z křížení linií DV92 a G3116 (Dubcovsky a kol., 1996).

Pro verifikaci identifikovaných QTL byly konstruovány F₂ verifikační mapovací populace *Triticum monococcum* L. použitím linií DV92 a 113, DV92 a 165, 144 a 246. 17 DArT markerů z vybraných lokusů bylo převedeno na PCR markery. Jejich asociace s daným fenotypem ve verifikačních mapovacích populacích F₂ byla analyzována jednomarkerovou regresí (Kearsey a Hyne, 1994) a jednofaktorovou analýzou rozptylu (Fisher, 1918). Bylo identifikováno 30 lokusů kvantitativních znaků na chromozómech 1A^m, 2A^m, 3A^m, 4A^m a 5A^m.

Z těchto 30 lokusů bylo 13 lokusů verifikováno. Verifikováno bylo 5 lokusů pro rozkladitost trsu na chromozómech 2A^m a 5A^m, 3 lokusy pro chlupatost listů na 3A^m a 5A^m, 2 lokusy pro dobu kvetení na 1A^m, 1 lokus pro výšku rostliny na 2A^m, 1 lokus pro délku klasu na 4A^m a 1 lokus pro hustotu klasu na 4A^m. Z verifikovaných lokusů byly 2 lokusy pro chlupatost listů na chromozómu 3A^m a 1 lokus pro dobu kvetení na 1A^m velmi signifikantní.

8 Literatura

- ACEVEDO E., P. SILVA a H. SILVA. Wheat growth and physiology. In: CURTIS, B. C., S. RAJARAM a H. G. MACPHERSON, ed. *Bread wheat: improvement and production*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002. FAO plant production and protection series, no. 30. ISBN 92-510-4809-6.
- ACQUA AH, G. *Principles of plant genetics and breeding*. 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2012. ISBN 978-0-470-66476-6.
- ALEXANDRATOS, N. a J. BRUINSMA. *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*. ESA Working paper No. 12-03. Rome, Italy: ESA, 2012.
- APPLEFORD, N. E. J., M. D. WILKINSON, Q. MA, D. J. EVANS, M. C. STONE, S. P. PEARCE, S. J. POWERS, S. G. THOMAS, H. D. JONES, A. L. PHILLIPS, P. HEDDEN a J. R. LENTON. Decreased shoot stature and grain α -amylase activity following ectopic expression of a gibberellin 2-oxidase gene in transgenic wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2007, **58**(12), 3213–3226.
- BENNETT, D., A. IZANLOO, J. EDWARDS, H. KUCHEL, K. CHALMERS, M. TESTER, M. REYNOLDS, T. SCHNURBUSCH a P. LANGRIDGE. Identification of novel quantitative trait loci for days to ear emergence and flag leaf glaucousness in a bread wheat (*Triticum aestivum* L.) population adapted to southern Australian conditions. *Theoretical and Applied Genetics*. 2012, **124**(4), 697–711.
- BENNETT, M. D. a J. B. SMITH. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1991, **334**(1271), 309–345.
- BORLAUG, N. *Breeding methods employed and the contributions of Norin 10 derivatives to the development of the high yielding broadly adapted Mexican wheat varieties*. El Batan, Mexico: The International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), 1981.
- BÖRNER, A., E. SCHUMANN, A. FÜRSTE, H. CÖSTER, B. LEITHOLD, M. RÖDER a W. WEBER. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2002, **105**(6-7), 921–936.
- BOTSTEIN, D., R. L. WHITE, M. SKOLNICK a R. W. DAVIS. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980, **32**(3), 314–331.
- BOWDEN, W. M. The taxonomy and nomenclature of the wheats, barleys, and ryes and their wild relatives. *Canadian Journal of Botany*. 1959, **37**(4), 657–684.
- BULLRICH, L., M. APPENDINO, G. TRANQUILLI, S. LEWIS a J. DUBCOVSKY. Mapping of a thermo-sensitive earliness *per se* gene on *Triticum monococcum* chromosome 1A^m. *Theoretical and Applied Genetics*. 2002, **105**(4), 585–593.
- BUSHUK, W. Wheat breeding for end-product use. *Euphytica*. 1998, **100**(1/3), 137–145.
- CHASE, S. S. Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Review*. 1969, **35**(2), 117–168.

- COLLARD, B. C. Y. a D. J. MACKILL. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2008, **363**(1491), 557–572.
- COLLARD, B. C. Y., M. Z. Z. JAHUFER, J. B. BROUWER a E. C. K. PANG. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 2005, **142**(1-2), 169–196.
- CUI, F., A. DING, J. LI, C. ZHAO, X. LI, D. FENG, X. WANG, L. WANG, J. GAO a H. WANG. Wheat kernel dimensions: how do they contribute to kernel weight at an individual QTL level? *Journal of Genetics*. 2011, **90**(3), 409–425.
- CUTHBERT, J. L., D. J. SOMERS, A. L. BRÛLÉ-BABEL, P. D. BROWN a G. H. CROW. Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2008, **117**(4), 595–608.
- DEAR, P. H. *Genome mapping: a practical approach*. New York: IRL Press, 1997. ISBN 978-0199636303.
- DOROFEEV, V. F., A. A. FILATENKO, E. F. MIGUSHOVA, R. A. UDACHIN a M. M. JAKUBTSINER. Wheat. In: DOROFEEV, V. F. a O. N. KOROVINA, ed. *Cultivated flora of the USSR: vol. 1*. Leningrad: Kolos, 1979.
- DOROSHKOV, A. V., T. A. PSHENICHNIKOVA a D. A. AFONNIKOV. Morphological characterization and inheritance of leaf hairiness in wheat (*Triticum aestivum* L.) as analyzed by computer-aided phenotyping. *Russian Journal of Genetics*. 2011, **47**(6), 739–743.
- DUBCOVSKY, J., D. LIJAVETZKY, L. APPENDINO a G. TRANQUILLI. Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theoretical and Applied Genetics*. 1998, **97**(5-6), 968–975.
- DUBCOVSKY, J. a J. DVOŘÁK. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*. 2007, (316), 1862–1866.
- DUBCOVSKY, J., M. C. LUO, G. Y. ZHONG, R. BRANSTEITTER, A. DESAI, A. KILIAN, A. KLEINHOFES a J. DVOŘÁK. Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics*. 1996, (143), 983–999.
- DVOŘÁK, J., P. E. MCGUIRE a B. CASSIDY. Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome*. 1988, **30**(5), 680–689.
- DVOŘÁK, J., P. DI TERLIZZI, H. B. ZHANG a P. RESTA. The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*. 1993, **36**, 21–31.
- DVOŘÁK, J. a H. B. ZHANG. Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990, **87**(24), 9640–9644.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004, **32**(5), 1792–1797.
- EVANS, L. T. Short day induction of inflorescence initiation in some winter wheat varieties. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1987, **14**(3), 277–286.

- FARIS, J. D. a B. S. GILL. Genomic targeting and high-resolution mapping of the domestication gene Q in wheat. *Genome*. 2002, **45**(4), 706–718.
- FEDAK, G. Alien introgressions from wild *Triticum* species, *T. monococcum*, *T. urartu*, *T. turgidum*, *T. dicoccum*, *T. dicoccoides*, *T. carthlicum*, *T. araraticum*, *T. timopheevii*, and *T. miguschovae*. In: MOLNÁR-LÁNG, M., C. CEOLONI a J. DOLEŽEL, ed. *Alien introgression in wheat*. Cham: Springer International Publishing, 2015, 191–219. ISBN 978-3-319-23493-9.
- FEUILLET, C., P. LANGRIDGE a R. WAUGH. Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in Genetics*. 2008, **24**(1), 24–32.
- FISCHER, R. A. Selection Traits for Improving Yield Potential. In: REYNOLDS, M. P., J. I. ORTIZ-MONASTERIO a A. MCNAB, ed. *Application of physiology in wheat breeding*. Mexico: CIMMYT, 2001, s. 48–58. ISBN 97-064-8077-3.
- FISHER, R. A. The Correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Edinburgh*. 1918, **52**, 399–433.
- FLOOD, R. G. a G. M. HALLORAN. Genetics and physiology of vernalization response in wheat. *Advances in Agronomy*. 1986, 2000, **39**, 87–125.
- GALLOVÁ, L. *Mapovanie agronomicky dôležitých génov u pšenice*. Olomouc, 2011. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého.
- GAO, F., W. WEN, J. LIU, A. RASHEED, G. YIN, X. XIA, X. WU a Z. HE. Genome-wide linkage mapping of QTL for yield components, plant height and yield-related physiological traits in the Chinese wheat cross Zhou 8425B/Chinese Spring. *Frontiers in Plant Science*. 2015, 6:1099.
- GEGAS, V. C., A. NAZARI, S. GRIFFITHS, J. SIMMONDS, L. FISH, S. ORFORD, L. SAYERS, J. H. DOONAN a J. W. SNAPE. A genetic framework for grain size and shape variation in wheat. *The Plant Cell*. 2010, **22**(4), 1046–1056.
- GODWIN, I. D., E. A. B. AITKEN a L. W. SMITH. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*. 1997, **18**(9), 1524–1528.
- GONCHAROV, N. P. *Comparative genetics of wheats and their related species*. Novosibirsk: Siberian Branch Press, 2002.
- GONCHAROV, N. P., K. A. GOLOVNINA a E. Y. KONDRATENKO. Taxonomy and molecular phylogeny of natural and artificial wheat species. *Breeding Science*. 2009, **59**(5), 492–498.
- GOSSET, W. S. The Probable error of a mean. *Biometrika*. 1908, **6**(1), 1–25.
- GRIFFITHS, S., J. SIMMONDS, M. LEVERINGTON, Y. WANG, L. FISH, L. SAYERS, L. ALIBERT, S. ORFORD, L. WINGEN, L. HERRY, S. FAURE, D. LAURIE, L. BILHAM a J. SNAPE. Meta-QTL analysis of the genetic control of ear emergence in elite European winter wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*. 2009, **119**(3), 383–395.
- GROTEWOLD, E., J. CHAPPELL a E. A. KELLOGG. *Plant genes, genomes, and genetics*. Hoboken, NJ, USA: Wiley Blackwell, 2015. ISBN 978-1-119-99888-4.
- HALDANE, J. B. S. The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *Journal of Genetics*, 1919, (8), 299–309.
- HALDORSEN, S., H. AKAN, B. ÇELIK a M. HEUN. The climate of the Younger Dryas as a boundary for Einkorn domestication. *Vegetation History and Archaeobotany*. 2011, **20**(35).

- HEARNE, C. M., S. GHOSH a J. A. TODD. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends in Genetics*. 1992, **8**(8), 288–294.
- HEUN, M. Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science*. 1997, **278**(5341), 1312–1314.
- HOBBS, P. R. a K. D. SAYRE. Managing Experimental Breeding Trials. In: REYNOLDS, M. P., J. I. ORTIZ-MONASTERIO a A. MCNAB, ed. *Application of physiology in wheat breeding*. Mexico: CIMMYT, 2001, s. 48–58. ISBN 97-064-8077-3.
- HORI, K., S. TAKEHARA, N. NANKAKU, K. SATO, T. SASAKUMA a K. TAKEDA. Barley EST markers enhance map saturation and QTL mapping in diploid wheat. *Breeding Science*. 2007, **57**(1), 39–45.
- HUSSAIN, A., H. LARSSON, R. KUKTAITE a E. JOHANSSON. Mineral composition of organically grown wheat genotypes: contribution to daily minerals intake. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2010, **7**(9), 3442–3456.
- JACCOUD, D., K. PENG, D. FEINSTEIN a A. KILIAN. Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*. 2001, **29**(4 e25), e25.
- JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics*. 1993, **135**(1), 205–211.
- JOEHANES, R. a J. C. NELSON. QGene 4.0: an extensible Java QTL-analysis platform. *Bioinformatics*. 2008, **24**(23), 2788–2789.
- KALENDAR, R., T. GROB, M. REGINA, A. SUONIEMI a A. SCHULMAN. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999, **98**(5), 704–711.
- KASHA, K. J. a K. N. KAO. High Frequency Haploid Production in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*. 1970, **225**(5235), 874–876.
- KEARSE, M., R. MOIR, A. WILSON, S. STONES-HAVAS, M. CHEUNG, S. STURROCK, S. BUXTON, A COOPER, S. MARKOWITZ, C. DURAN, T. THIERER, B. ASHTON, P. MEINTJES a A. DRUMMOND. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012, **28**(12), 1647–1649.
- KEARSEY, M. J. a V. HYNE. QTL analysis: a simple 'marker-regression' approach. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994, **89**(6), 698–702.
- KILIAN, B., W. MARTIN a F. SALAMINI. Genetic diversity, evolution and domestication of wheat and barley in the fertile crescent. In: *Evolution in Action: Case studies in Adaptive Radiation, Speciation and the Origin of Biodiversity*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2010, 137–166. ISBN 978-3-642-12424-2.
- KIMBER, G. a K. TSUNEWAKI. Genome symbols and plasma types in the wheat group. In: MILLER, T. E. a R. M. D. KOEBNER, ed. *Proceedings of the VII International Wheat Genetics symposium*. Cambridge: Institute of Plant Science Research, 1988, 1209–1210. ISBN 0708404839.
- KLOCOVÁ (BALCÁRKOVÁ), B. *Mapování genů kvantitativních znaků u diploidní pšenice T. monococcum L.* Olomouc, 2010. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého.

- KORZUN, V., M. S. RÖDER, M. W. GANAL, A. J. WORLAND a C. N. LAW. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht-8*) in wheat: Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 1998, **96**(8), 1104-1109.
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Human Genetics*. 1943, **12**(1), 172–175.
- KUCHEL, H., G. HOLLAMBY, P. LANGRIDGE, K. WILLIAMS a S. P. JEFFERIES. Identification of genetic loci associated with ear-emergence in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006, **113**(6), 1103–1112.
- KUMAR, N., P. L. KULWAL, H. S. BALLYAN a P. K. GUPTA. QTL mapping for yield and yield contributing traits in two mapping populations of bread wheat. *Molecular Breeding*. 2007, **19**(2), 163-177.
- LANDER, E. S. a D. BOTSTEIN. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*. 1989, **121**(1), 185–199.
- LANDER, E. S. a L. KRUGLYAK. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics*. 1995, **11**(3), 241–247.
- LANDER, E. S., P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M. J. DALY, S. E. LINCOLN a L. NEWBURG. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*. 1987, **1**(2), 174–181.
- LANTICAN, M. A., H. J. DUBIN, M. L. MORRIS a P. W. HEISEY. *Impacts of international wheat breeding research in the developing world, 1988-2002*. Mexico, D.F.: CIMMYT, 2005. ISBN 97-064-8129-X.
- LEWIS, S., M. E. FARICELLI, M. L. APPENDINO, M. VALÁRIK a J. DUBCOVSKY. The chromosome region including the earliness *per se* locus *Eps-A^m1* affects the duration of early developmental phases and spikelet number in diploid wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2008, **59**(13), 3595–3607.
- LINCOLN, S. E., M. J. DALY a E. S. LANDER. *Mapping genes controlling quantitative traits Using MAPMAKER/QTL Version 1.1: A tutorial and reference manual*. 2nd ed. Cambridge, MA: A Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report, 1993.
- LITT, M. a L. A. LUTY. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*. 1989, **44**(3), 397–401.
- LUMPKIN, T. A. How a gene from Japan revolutionized the world of wheat: CIMMYT's quest for combining genes to mitigate threats to global food security. In: OGIHARA, Y., S. TAKUMI a H. HANDA, ed. *Advances in wheat genetics: from genome to field*. Tokyo: Springer Japan, 2015, 13–20. ISBN 978-4-431-55674-9.
- MA, Z., D. ZHAO, C. ZHANG, Z. ZHANG, S. XUE, F. LIN, Z. KONG, D. TIAN a Q. LUO. Molecular genetic analysis of five spike-related traits in wheat using RIL and immortalized F₂ populations. *Molecular Genetics and Genomics*. 2006, **277**(1), 31-42.

- MACRITCHIE, F. Role of polymeric proteins in flour functionality. In: *Wheat kernel proteins: molecular and functional aspects*. Bitervo, Italy: Universita degli studi della Tuscia, 1994, s. 145–150.
- MANLY, K. F., R. H. CUDMORE a J. M. MEER. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome*. 2001, **12**(12), 930–932.
- MARCUSSEN, T., S. R. SANDVE, L. HEIER, M. SPANNAGL, M. PFEIFER, K. S. JAKOBSEN, B. B. H. WULFF, B. STEUERNAGEL, K. F. X. MAYER, O.-A. OLSEN a THE INTERNATIONAL WHEAT GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science*. 2014, **345**(6194), 1250092(1-4).
- MERGOUM, M., P. K. SINGH, J. A. ANDERSON, R. J. PEÑA, R. P. SINGH, S. S. XU a J. K. RANSOM. Spring Wheat Breeding. In: CARENA, M. J., ed. *Cereals*. New York, NY: Springer USA, 2009, 127–156. ISBN 978-0-387-72294-8.
- MORGAN, T. H. Localization of the hereditary material in the germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1915, **1**(7), 420–429.
- MORRIS, C. F. a S. P. ROSE. Wheat. In: HENRY, R. J. a P. S. KETTLEWELL, ed. *Cereal grain quality*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1996, 3–54. ISBN 978-94-010-7177-2.
- MORTON, N. E. Sequential tests for the detection of linkage. *American Journal of Human Genetics*. 1955, **7**(3), 277–318.
- NALAM, V. J., M. I. VALES, C. J. W. WATSON, S. F. KIANIAN a O. RIERA-LIZARAZU. Map-based analysis of genes affecting the brittle rachis character in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2006, **112**(2), 373–381.
- NEFF, M. M., J. D. NEFF, J. CHORY a A. E. PEPPER. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *The Plant Journal*. 1998, **14**(3), 387–392.
- NGUYEN, H. T. a X. WU. Molecular marker systems for genetic mapping. In: MEKSEM, K. a G. KAHL, ed. *The handbook of plant genome mapping: genetic and physical mapping*. Weinheim: WILEY-VCH, 2005. ISBN 978-352-7311-163.
- PEARSON, K. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philosophical Magazine*. 1900, **50**(302), 157–175.
- PEÑA, R. J. Wheat for bread and other foods. In: CURTIS, B. C., S. RAJARAM a H. G. MACPHERSON, ed. *Bread wheat: improvement and production*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002. FAO plant production and protection series, no. 30. ISBN 92-510-4809-6.
- SAKAMURA, T. Kurze mitteilung uber die chromosomenzahlen und die verwandtschaftsverhaltnisse der *Triticum* arten. *Shokubutsugaku Zasshi*. 1918, **32**(379), 150–153.
- SARASWATHY, N. a P. RAMALINGAM. *Concepts and techniques in genomics and proteomics*. New York: Biohealthcare Pub., 2011. ISBN 978-190-7568-107.

- SCHNEIDER, K. Mapping populations and principles of genetic mapping. In: MEKSEM, K. a G. KAHL, ed. *The handbook of plant genome mapping: genetic and physical mapping*. Weinheim: WILEY-VCH, 2005. ISBN 978-352-7311-163.
- SEMAGN, K., Å. BJØRNSTAD a Y. XU. The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2010, **13**(5).
- SHEWRY, P. R. Wheat. *Journal of Experimental Botany*. 2009, **60**(6), 1537–1553.
- SINGH, K., P. CHHUNEJA, S. KAUR, T. GARG, V. K. TIWARI, N. RAWAT, N. S. BAINS, H. S. DHALIWAL a B. KELLER. *Triticum monococcum*: a source of novel genes for improving several traits in hexaploid wheat. In: APPELS, R., R. EASTWOOD, E. LAGUDAH, P. LANGRIDGE, M. MACKAY, M. MCINTYRE a P. SHARP, ed. *11th International Wheat Genetics Symposium: Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium, 24-29 August 2008, Brisbane, QLD, Australia, Volume 1*. Sydney: Sydney University Press, 2008, 295-297. ISBN 978-1-920899-08-0.
- SLAFER, G. A. a H. M. RAWSON. Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: a re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1994, **21**(4), 393–426.
- SMARTT, J. a J. SIMMONDS. *Evolution of crop plants*. 2. ed. Harlow: Longman Scientific & Technical, 1995. ISBN 9780582086432.
- SOMERS, D. J., R. KIRKPATRICK, M. MONIWA a A. WALSH. Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome*. 2003, **46**(3), 431–437.
- STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. *The Plant Journal*. 1993, **3**(5), 739–744.
- SWAMINATHAN, M. S. Norman E. Borlaug (1914–2009). *Nature*. 2009, **461**(7266), 894–894.
- TAKETA, S., C. L. CHANG, M. ISHII a K. TAKEDA. Chromosome arm location of the gene controlling leaf pubescence of a Chinese local wheat cultivar 'Hong-mang-mai'. *Euphytica*. 2002, **125**(2), 141–147.
- TANNO, K. a G. WILLCOX. How fast was wild wheat domesticated? *Science*. 2006, **311**(5769), 1886–1886.
- VAN OOIJEN, J. *JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations*. Kyazma BV, Wageningen, Netherlands, 2006.
- VANŽUROVÁ, H. *Charakterizace diploidní pšenice Triticum monococcum jako zdroje nových genů pro šlechtění pšenice*. Olomouc, 2013. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého.
- VANŽUROVÁ, H. *Zavedení nových typů markerů do mapy Triticum monococcum L. pro mapování výnosu a prvků výnosu*. Olomouc, 2011. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER a M. ZABEAU. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995, **23**(21), 4407–4414.

- WANG, S., C. J. BASTEN a Z. B. ZENG. *Windows QTL Cartographer 2.5*. Raleigh, NC: North Carolina State University, Department of Statistics, 2012.
- WILLIAMS, J. G., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI a S. V. TINGEY. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 1990, **18**(22), 6531–6535.
- XU, S. *Principles of statistical genomics*. New York, NY: Springer, 2013. ISBN 978-0-387-70806-5.
- YAMANE, K. a T. KAWAHARA. Intra- and interspecific phylogenetic relationships among diploid *Triticum-Aegilops* species (Poaceae) based on base-pair substitutions, indels, and microsatellites in chloroplast noncoding sequences. *American Journal of Botany*. 2005, **92**(11), 1887–1898.
- YAN, L., A. LOUKOIANOV, G. TRANQUILLI, M. HELGUERA, T. FAHIMA a J. DUBCOVSKY. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003, **100**(10), 6263-6268.
- YAN, L., D. FU, C. LI, A. BLECHL, G. TRANQUILLI, M. BONAFEDE, A. SANCHEZ, M. VALÁRIK, S. YASUDA a J. DUBCOVSKY. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, **103**(51), 19581-19586.
- YU, K., D. LIU, W. WU, W. YANG, J. SUN, X. LI, K. ZHAN, D. CUI, H. LING, CH. LIU a A. ZHANG. Development of an integrated linkage map of einkorn wheat and its application for QTL mapping and genome sequence anchoring. *Theoretical and Applied Genetics*. 2017, **130**(1), 53-70.
- ZHANG, K., J. TIAN, L. ZHAO, B. LIU a G. CHEN. Detection of quantitative trait loci for heading date based on the doubled haploid progeny of two elite Chinese wheat cultivars. *Genetica*. 2009, **135**(3), 257–265.
- ZIETKIEWICZ, E., A. RAFALSKI a D. LABUDA. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994, **20**(2), 176–183.
- ZIKHALI, M., L. U. WINGEN, M. LEVERINGTON-WAITE, S. SPECCEL a S. GRIFFITHS. The identification of new candidate genes *Triticum aestivum* *FLOWERING LOCUS T3-B1* (*TaFT3-B1*) and *TARGET OF EAT1* (*TaTOE1-B1*) controlling the short-day photoperiod response in bread wheat. *Plant, Cell & Environment*. 2017, **40**(11), 2678-2690.
- ZOHARY, D., M. HOPF a E. WEISS. *Domestication of plants in the old world: the origin and spread of domesticated plants in south-west Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2013. ISBN 978-0-19-954906-1.