

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2010

Bc. Barbora Klocová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Mapování genů kvantitativních znaků
u diploidní pšenice *T. monococcum* L.**

Diplomová práce

Bc. Barbora Klocová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: Mgr. Miroslav Valárik Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně podle metodických pokynů vedoucího práce a za použití uvedené literatury a informačních zdrojů.

V Olomouci 12. 5. 2010

Bc. Barbora Klocová

Chtěla bych poděkovat Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a pomoc při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem laborantkám z ÚEB v Olomouci, spolužačkám Bc. Monice Kladivové a Bc. Heleně Staňkové za pomoc při sázení a sběru dat. Také bych chtěla poděkovat společnosti SELGEN a. s. za poskytnutí lokality a spolupráci.

Souhrn

Pšenice je jednou z nejdůležitějších plodin světa podílejících se na výživě lidstva. V posledních letech její spotřeba převyšuje produkci a tak je nutné pěstovat výnosnější kultivary. Pšenice setá má relativně velký allohexaploidní genom, což z ní dělá nejkomplexnější kulturní plodinu. Využití diploidních předků pro mapování a studium genomu je jednou z hlavních cest efektivního studia genomu pšenice a identifikaci agronomicky důležitých genů. Pro účely mapování a studium výnosových prvků byla zkonstruována genetická mapa z mapovací populace rekombinatních inbredních linií (RILs) odvozených z křížení *Triticum monococcum* ssp. *monococcum* × *Triticum monococcum* ssp. *aegilopoides*. Mapa má celkovou délku 829 cM s 628 zamapovanými STS, IRAP, DArT markery pokrývajícími všech sedm chromozomů. Což jí řadí mezi nejhustější genetické mapy pšenice. Mapa byla použita k identifikaci QTL lokusů pro celkem sedm znaků, tři znaky pro výnos, tři agronomicky významné znaky a jeden morfologický znak, ve kterých se rodiče významně odlišovali. Znaky pro QTL analýzu byly sledovány jeden rok na dvou lokalitách ve dvou opakováních. Bylo identifikováno celkem 14 QTL lokusů na šesti chromozomech.

Summary

Wheat is one of the most important crops involved in human nutrition. In recent years, its consumption exceeds production, so it is necessary to breed cultivars with higher yield. Bread wheat is allohexaploid species and has a relatively large genome, which makes it one of the most complex crops. Use of diploid ancestors for genome mapping and studies is one of the main ways of effective study of the genome of wheat and the identification of agronomically important genes. At present time the most densest genetic map of the wheat A genome was constructed to study genetics of yield components. The map was constructed using 628 STS, IRAP, DART markers and 82 SSD F₈ lines derived from the cross of *Triticum monococcum* ssp *monococcum* × *Triticum monococcum* ssp *aegilopoides*. Total length of the map was 829 cM and linkage groups without gap were identified for all 7 chromosomes. Preliminary QTL analysis for seven yield and morphological traits on this mapping population yielded 14 QTLs on all chromosomes except chromosome 6. The constructed genetic map will be used to precise map yield components and other traits on this mapping population and test their usage in wheat breeding programs.

Obsah

1	Teoretický úvod	8
1.1	Genom pšenice.....	8
1.2	<i>T. monococcum</i> L., nástroj pro šlechtění hexaploidní pšenice.....	10
1.2.1	Původ a charakteristika <i>T. monococcum</i> L.	11
1.2.2	Rozšíření <i>T. monococcum</i> L.	12
1.2.3	Historie pěstování <i>T. monococcum</i> L.	13
1.3	Lokusy s kvantitativním znakem, QTL.....	14
1.3.1	Mapování QTL lokusů.....	15
1.3.1.1	Mapovací populace	15
1.3.1.2	Molekulární markery.....	16
1.3.1.3	Statistické metody	18
1.4	Výnos	19
2	Cíl práce	21
3	Materiál a metodika	22
3.1	Rostlinný materiál	22
3.1.1	Pěstování mapovací populace.....	22
3.2	Přístroje a zařízení.....	23
3.3	Použité chemikálie a roztoky	23
3.3.1	Roztoky pro vysokovýkonnou izolaci DNA.....	23
3.3.2	Roztoky pro preparativní izolaci rostlinné DNA.....	24
3.3.3	Chemikálie pro polymerázovou řetězovou reakci	25
3.3.4	Chemikálie pro nedenaturující polyakrylamidovou elektroforézu	26
3.4	Metodika	26
3.4.1	Vysokovýkonná izolace DNA	26
3.4.2	Preparativní izolace rostlinné DNA.....	27
3.4.3	Polymerázová řetězová reakce.....	28
3.4.4	Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza	33
3.4.5	Konstrukce genetické mapy.....	34
3.4.6	Hodnocení fenotypu.....	34
3.4.7	QTL analýza	35

3.5	Software	35
4	Výsledky	36
4.1	Molekulární markery.....	36
4.2	Genetická mapa.....	37
4.3	QTL analýza.....	47
5	Diskuse	49
5.2	QTL pro komponenty výnosu	50
6	Závěr.....	53
7	Použité zkratky.....	54
8	Literatura.....	56

1 Teoretický úvod

Pšenice je jednou z nejdůležitějších plodin světa. Poskytuje základní potravu pro 35 % obyvatel Země a 20 % veškeré kalorické výživy lidstva. Pšenice je pěstována v širokém rozmezí prostředí, hlavně mírného pásu, a její důležitost se může srovnávat asi jen s rýží. Rychle rostoucí lidská populace má stále větší nároky na produkci potravin a tedy i na pšenici. V posledních letech spotřeba pšenice převyšuje její produkci a zásoby rychle klesají. Protože osevní plochy není možné zvětšovat do nekonečna, řešením je pěstování výnosnějších a odolnějších kultivarů.

Pravidelné zvyšování výnosu pšenice je hlavní výzvou současných šlechtitelských programů. Avšak šlechtění naráží na problémy spojené s velkou komplexitou genomu pšenice (17 Gb) a nedostatkem polymorfních markerů s dostatečnou vazbou na sledovaný znak.

Pšenice setá *Triticum aestivum* L. je allohexaploidní druh ($2n=42$, AABBDD), který vznikl hybridizací tetraploidního *T. turgidum* L. s *Aegilops tauschii* Coss. před asi 10 tis. lety. *T. turgidum* L. vzniklo hybridizací *T. urartu* Thum. ex Gandil. s vyhynulým předkem příbuzným s *Ae. speltoides* Tausch. (Schéma 1).

Jedním z hlavních postupů zjednodušení mapování a identifikace markerů s maximální vazbou na sledovaný znak je použití diploidních nebo tetraploidních předků pšenice nebo jejich blízkých příbuzných a následná aplikace na genom hexaploidní pšenice. Dobrymi příklady takového postupu jsou projekty pozičního klonování genů ovlivňujících kvetení, rezistence k nemocem nebo kvalitu pšenice (Feuillet *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003; Yahiaoui *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2003, 2004, 2006; Uauy *et al.*, 2006; Kuraparthy *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009). V těchto projektech se nejčastěji využívá diploidní pšenice *Triticum monococcum* L.

1.1 Genom pšenice

Jak již bylo zmíněno hexaploidní pšenice *T. aestivum* L. má tři genomy, A, B a D. Za zdroj genomu A (hexaploidní i tetraploidní pšenice *T. turgidum* L.) je považována diploidní pšenice *T. urartu* Thum. ex Gandil. (AA) blízká příbuzná *T. monococcum* L. ($A^m A^m$). Právě *T. monococcum* L. bylo na základě prvních

cytogenetických studií považováno za donora genomu A (Sax, 1922). Ukázalo se, že v těchto studiích označení „Einkorn“ neplatí jen pro *T. monococcum* L., ale i pro *T. urartu* Thum. ex Gandil. Proto bylo nutné výsledky přezkoumat. Následující experimenty poukázaly, že donorem genomu A, hexaploidní i tetraploidní pšenice, je opravdu *T. urartu* Thum. ex Gandil. *T. monococcum* L. je donorem genomu A^m jen u pšenice *T. zhukovskyi* (AAA^mA^mGG), (Schéma 1), (Dvořák *et al.*, 1988; Dvořák *et al.*, 1993; González *et al.*, 1993).

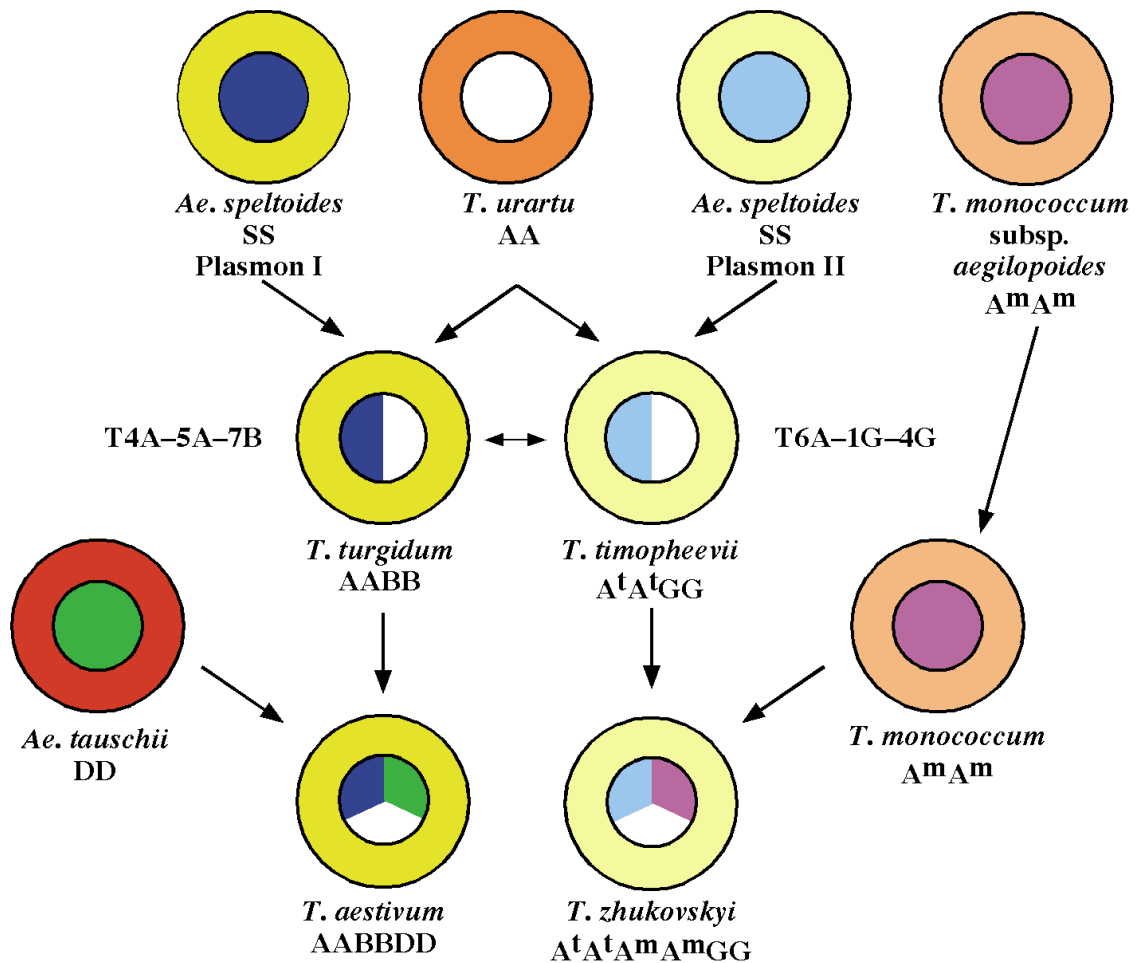


Schéma 1: Evoluce genomů pšenic

Na prvním řádku jsou znázorněny genomy diploidních předků pšenic, na druhém řádku tetraploidních pšenic, na posledním řádku hexaploidní pšenice. Modrá barva – genom B, bílá – genom A, světle modrá – genom G, fialová – genom A^m, zelená - genom D. Barevné kruhy představují různé plasmony (převzato z <http://www.k-state.edu/wgrc/Extras/evolve.html>).

1.2 *T. monococcum* L., nástroj pro šlechtění hexaploidní pšenice

T. monococcum L. je atraktivním diploidním modelem pro funkční genomiku pšenice hlavně díky tomu, že je diploidní a blízký příbuzný *T. urartu* Thum. ex Gandil. donoru genomu A hexaploidní pšenice. Má relativně hustou genetickou mapu (Dubcovsky *et al.*, 1996) a zachovalo si velkou genetickou diverzitu, jelikož zahrnuje kulturní i plané odrůdy a nebylo intenzivně šlechtěno. Geny mapované a klonované s pomocí *T. monococcum* L. byly úspěšně využity k identifikaci homologních genů u *T. aestivum* L.

Prvními takovými geny byly *VRN-1* a *VRN-2*. Tyto geny kontrolují nutnost jarovizace a rozdělují pšenici na ozimou a jarní. Ozimá pšenice potřebuje jarovizaci (vystavení chladu), aby „přepnula“ svůj vývoj z vegetativní fáze na reprodukční fázi. Věří se, že jarovizace je nejdůležitější adaptivní mechanismus dovolující ozimé pšenici synchronizovat vývoj rostliny s ročním obdobím a změnami počasí (Yan, 2009; Dubcovsky *et al.*, 1998; Kosová *et al.*, 2008).

Gen *VRN-1* byl prvním objeveným genem jarovizace. Je dominantní pro jarní hexaploidní pšenice. Ortologní gen *VRN-A^{m1}* byl zamapován na *T. monococcum* L. (Dubcovsky *et al.*, 1998) a následně byl úspěšně pozičně klonován (Yan *et al.*, 2003).

VRN-1 je hlavní gen jarovizace. U hexaploidní pšenice se nacházejí tři geny *VRN-1*. *Vrn-A1* (původně označován jako *Vrn1*) se nalézá na dlouhém raménku 5A chromozomu. *Vrn-A1* je ortologem genu *Vrn-D1* (původně *Vrn3*), který je lokalizován na dlouhém raménku 5D chromozomu a *Vrn-B1* (původně *Vrn4* a *Vrn2*) na chromozomu 5B. Bylo zjištěno, že tyto geny 5. skupiny jsou navzájem homeoalelické (Dubcovsky *et al.*, 1998; Yan, 2009).

Druhý gen jarovizace byl nalezen u *T. monococcum* L. a označuje se jako *VRN-A^{m2}*. Nachází se v distální oblasti chromozomu 5A^{mL} v segmentu, který byl translokován z chromozomu 4A^m. Tento gen se nachází v oblasti, která je ortologní s lokusem *VRN-H2* na chromozomu 4 u ječmene. Tento gen nebyl nikdy u hexaploidní pšenice mapován, avšak jeho exprese byla v *T. aestivum* L. potvrzena. Pravděpodobnou příčinou, proč nebyl *VRN-2* u hexaploidní pšenice mapován, je přítomnost tří funkčních homologních alel v hexaploidní pšenici a jejich dominantní charakter (Yan, 2009; Kosová *et al.*, 2008).

Dalšími geny, které byly identifikovány nebo klonovány z *T. monococcum* L. a úspěšně aplikovány na hexaploidní pšenici, byli lokus domestikace *Q* (Faris *et al.*, 2003) a gen *EPSA^m1* ovlivňující kvetení a počet obilek na klas (Valárik, osobní sdělení). Dále byla úspěšně využita BAC knihovna *T. monococcum* L. k identifikaci ortologních genů rezistence proti rzi listové (*Lr10*) a následnému pozičnímu klonování genu přímo z hexaploidní pšenice (Feullet *et al.*, 2003).

1. 2. 1 Původ a charakteristika *T. monococcum* L.

Pšenice jednozrnka (*T. monococcum* L.) je diploidní pluchatá pšenice ($2n = 2x = 14$) s relativně uniformním a charakteristicky křehkým klasem, obilkou a semenem. Klas je dvouřadý osinatý s lámavým větvenem. Většina kultivarů produkuje jedno semeno na obilku, odtud její jméno „Einkorn“ (jednozrnka), ale existují i kultivary s dvěma zrny na obilku a nelámavým větvenem (Obr. 1), (Hopf *et al.*, 2000).



Obr. 1: Klasy *T. monococcum* L.

Převzato z: <http://fotobank.ru/image/SF17-6300.html>

T. monococcum L. je úzce svázán se skupinou divokých a plevelných forem pšenice tradičně označovaných jako divoká jednozrnka nebo *T. boeoticum* Boiss. rozšířených po celém blízkém východě a přilehlých teritoriích. Divoká a kulturní jednozrnka jsou morfologicky stejné. Obě jsou diploidní a obsahují identické chromozomy. Hybridi mezi divokým *boeoticum* a kulturním *monococcum* jsou plně fertlní a chromozomové párování v meiose je normální. Hlavním rozlišujícím znakem

mezi divokou jednozrnkou a kulturní jednozrnkou je způsob rozptylu semen. Divoká jednozrnka má křehké klasy a jednotlivé obilky se při zralosti oddělují a rozptylují semena do okolí rostliny. U kulturní jednozrnky tento znak, důležitý pro přežití v přírodě, dále neexistuje. Zralé klasy zůstávají intaktní a rozdělují se na jednotlivé obilky jen působením tlaku. Přežití kulturní jednozrnky je plně závislé na člověku. Další znak indikující domestikaci je tvar zrna. Zrno kulturní formy je širší než zrno divoké formy (Hopf *et al.*, 2000).

Protože jsou si divoká jednozrnka a kulturní jednozrnka morfologicky i geneticky velmi blízké a naopak velmi rozdílné od dalších druhů skupiny *Triticum*, většina studií dnes zařazuje *boeoticum* a další divoké druhy jednozrnky (*T. aegilopoides* (Link) Bal., *T. thaouidar* Reuter.) jako poddruh *T. monococcum* L., a to hlavně protože se jedná o divoké předky dnes kulturní jednozrnky (*T. monococcum* ssp. *monococcum* L.), (Hopf *et al.*, 2000).

1. 2. 2 Rozšíření *T. monococcum* L.

Divoká jednozrnka je široce rozšířená v západní Asii a pronikla také na jižní Balkán. Její distribuční centrum leží na Blízkém Východě, a to severní Sýrie, jižní Turecko, severní Irák a Irán, a také části západní Anatólie (Obr. 2). V těchto oblastech je jednozrnka součástí stepních biotopů. Divoká jednozrnka na takovýchto primárních lokalitách roste jako plevel a kolonizuje sekundární lokality jako konce polí a okraje silnic. Někdy vniká i na pole kulturních obilovin. Pšenice *boeoticum* je distribuována skrz všechny ekologické a klimatické oblasti. Je adaptována na základní substráty jako vápenatý jílovec, jíl a vápenec. Daří se jí na suchých úpatích severní Evropy stejně jako v mírně chladné vyvýšené plošině centrální a východní Anatólie s jejími letními dešti (Hopf *et al.*, 2000).



Obr. 2: Rozšíření jednozrnky v Neolitu na Blízkém Východě.

Křížek – místo předpokládané první domestikace jednozrnky (převzato z Lev-Yadun *et al.*, 2000)

Můžeme rozeznat několik ekogeografických a morfologických typů mezi divokými jednozrnkami. Na severní a severozápadní části území jejího rozšíření rostou rostliny s malými, jedno-osinatými, jedno-semennými obilkami. Jsou často označovány jako *T. aegilopoides* (Link) Bal. V jižní suché a slunečné oblasti rostou více robustnější rostliny s dvěma semeny a dvěma osinami na obilku často patřící k *T. thaoudar* Reuter. Ale v centrální Anatólíi, Transylvánii a Iráku jsou formy něco mezi oběma. Ve skutečnosti mnoho anatolských populací vykazují vysokou variabilitu v morfologii obilky (Hopf *et al.*, 2000).

1. 2. 3 Historie pěstování *T. monococcum* L.

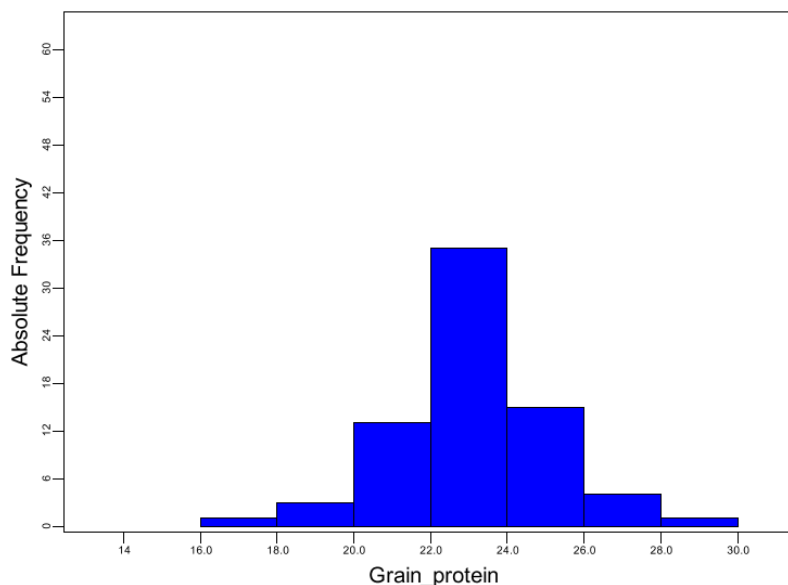
Zrna jednozrnky byla pravděpodobně sbírána ještě před zkulturněním této pšenice. Na nalezištích v severní Sýrii byla objevena v před-zemědělské vrstvě (9. a 8. milénium před Kristem) spálená úzká zrna dokonale totožná se semeny dnešních divokých forem jednozrnky (Hopf *et al.*, 2000).

V neolitu se jednozrnka stala hlavní plodinou pěstovanou na Blízkém východě. Objevuje se společně s *T. dicoccoides* Körn. („emmer wheat“) a ječmenem, ale preferuje hlavně oblasti s chladnějším klimatem. Má malý výskyt v teplejších oblastech a vůbec nebyla pěstována na místech jako Egypt a jižní Mezopotámie. Byla pěstována i v době bronzové a době železné, pak ale byla stejně jako *T. dicoccoides* Körn. nahrazena nahou pšenicí (free-threshing) s větším výnosem (Hopf *et al.*, 2000).

1.3 Lokusy s kvantitativním znakem, QTL

Většina fenotypových znaků jak u živočichů, tak u rostlin je podmíněná více, než jedním genem. Tyto geny nejčastěji přispívají k danému znaku různými způsoby a v různé míře. Například u obilovin jsou více geny ovlivňovány znaky jako výška rostliny, výnos a jeho složky, kvalita semene a mouky a různé formy rezistence. Znaky, které se vyznačují měřitelností (můžeme je kvantifikovat) označujeme jako kvantitativní.

Kvantitativní znaky, podmíněné více než jedním genem, mají často kontinuální proměnlivost (variabilitu) v populaci a při tom distribuce jedinců v populaci s různě intenzivním fenotypovým projevem odpovídá normálnímu rozložení četnosti na Gaussově křivce (Obr. 3). To znamená, že jeden fenotyp nepozorovaně přechází v další. Není zde žádná diskontinuita v distribuci četnosti jako bychom očekávali u majorgenu (1 : 2 : 1 štěpný poměr genotypu a fenotypu v F₂ generaci). Proto mapování pomocí klasických postupů jak je odvodil J. G. Mendel není možné. Velký boom ve vývoji molekulární biologie, molekulárních markerů a účinných statistických metod umožnil mapovat i lokusy přispívající ke kvantitativnímu znaku (Kearsey, 1998; Collard *et al.*, 2005). Takovéto lokusy, které ovlivňují kvantitativní znak, jsou označovány jako QTL (Quantitative Trait Loci, lokusy s kvantitativním znakem), (Gelderman, 1975). QTL lokus může být jeden gen nebo klastr genů ve vazbě.



Obr. 3: Gaussova křivka normálního rozložení četnosti
Pro znak obsah dusíku v sušině semene

Od 80. let, kdy byl zaznamenán pokrok v mapování QTL, bylo publikováno mnoho vědeckých prací. Většina se zaměřila na člověka a kvantitativně podmíněné nemoci (pro více informací viz review Mackay *et al.*, 2009). Důležité byly ovšem i práce na rostlinách a to především na obilovinách kvůli jejich důležitosti ve výživě člověka. U obilovin bylo mapováno mnoho agronomicky významných znaků jako výnos, rezistence ke škůdcům a kvalita semene (pro více informací viz review Asins, 2002), některé z těchto genů byly i pozičně klonovány (pro více informací viz review Price, 2006).

1. 3. 1 Mapování QTL lokusů

Hlavními cíly mapování QTL lokusů jsou identifikovat oblast genomu, která způsobuje daný znak a analyzovat efekt tohoto QTL lokusu na znak. Abychom byli schopni zamapovat takové lokusy, potřebujeme k tomu genetickou vazebnou mapu a statistické metody.

Genetická vazebná mapa představuje teoretické rozložení lokusů na chromozomech na základě frekvence rekombinace mezi těmito lokusy. Vzdálenosti jsou udávány v cM. Nepředstavuje tedy fyzickou vzdálenost. Pro konstrukci genetické vazebné mapy je potřeba dostatečně velká mapovací populace, jež se liší ve znaku, který budeme mapovat a dostatek molekulárních markerů.

1. 3. 1. 1 Mapovací populace

Důležitým nástrojem, pro mapování je mapovací populace. K vytvoření mapovací populace jsou potřeba rodičovské linie s dostatečnou variabilitou v sledovaném znaku. Čím je populace polymorfnější, tím snadněji bude sledovaný znak zamapován (Collard *et al.*, 2005; Schneider, 2005).

Pro vytvoření mapovací populace je důležité vědět, jak se rostliny rozmnožují. Nejjednodušeji se vytváří mapovací populace rostlin, které jsou samosprašné (self-fertilizing), (Collard *et al.*, 2005; Schneider, 2005). Nejčastější typy mapovacích populací pro samosprašné druhy jsou popsány níže.

- *F₂ populace* – vychází z mapování na liniích F₂ generace, které segregují ve znacích, ve kterých se liší rodiče. Nevýhodou je, že tuto mapovací populaci nelze přemnožovat a je nevhodná pro QTL mapování (Schneider, 2005).
- *Rekombinantní inbrední linie* (Recombinant Inbred Lines, RILs) jsou odvozené z F₂ generace samosprašením. V tomto procesu je jedno semínko každé linie zdroj další generace (Single-Seed Descent lines, SSD). Už v šesté generaci jsou linie téměř homozygotní. Tato mapovací populace má velkou výhodu v tom, že od F₆ generace skoro nedochází k segregaci ve sledovaném znaku a tato mapovací populace se může neomezeně přemnožovat (Schneider, 2005).
- *Populace zpětných kříženců* (Backcross populace, BC) – v této mapovací populaci je fragment DNA z jednoho rodiče například A převeden do genetického pozadí rodiče B, a to zpětným křížením F₁ potomků s rodičem B (Schneider, 2005).
- *Dihaploidní linie* (Doubled Haploid lines, DH) – obsahují dvě identické sady chromozomů v každé buňce. Jsou úplně homozygotní. Vznikají z haploidních linií. Jsou permanentním zdrojem pro mapování, avšak příprava DH linií není možná pro všechny druhy (Schneider, 2005).

1.3.1.2 Molekulární markery

Molekulární markery jsou v současnosti důležitým nástrojem genetického mapování. Pomáhají lokalizovat geny způsobující znak. Nemusí představovat geny jako takové, ale stačí, že se nacházejí v jejich blízkosti a jsou s nimi těsně svázány. Výjimkou jsou EST (Expressed Sequence Tag), které vznikají při sekvenování transkripčních produktů genů. Markery jsou něco jako vlajky nebo značky na vazebné mapě chromozomů (Collard *et al.*, 2005).

Genetické vazebné mapy pro mnoho rostlinných druhů byly vytvořeny pomocí molekulárních markerů, jako jsou RFLP, SSR, STS, IRAP, DArT, SNP, RAPD, AFLP, SCAR a mnoho dalších (Collard *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2005).

- *RFLP* (Restriction Fragment Length Polymorphism, délkový polymorfismus restrikčních fragmentů) jsou markery první generace. Využívá se přestaveb v genomu, které způsobují vznik nebo zánik restrikčního místa. Specifické restrikční enzymy štípou DNA za vzniku různě dlouhých fragmentů. Ty jsou pak hybridizovány se sondami a vizualizovány. RFLP markery jsou kodominantní, ale pracné. Mohou být převedeny na SCAR markery (Botstein *et al.*, 1980).
- *SSR* (Simple Sequence Repeat, opakování jednoduchých sekvencí) jsou založené na mikrosatelitech, které se nacházejí v celém genomu v nekódujících oblastech. Jsou to jednoduché markery detekovatelné pomocí PCR. Jsou vysoce polymorfní a kodominantní (Litt *et al.*, 1989).
- *STS* (Sequence-Tagged Sites) jsou markery založené na znalosti sekvence. Mohou být jednoduše detekovány pomocí PCR (Palazzolo *et al.*, 1991).
- *IRAP* (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism, amplifikovaný polymorfismus mezi retrotranspozóny) jsou markery založené na přítomnosti retrotranspozomů v genomu rostlin. Jsou vysoce polymorfní, z jedné PCR lze získat až 10 polymorfismů (Kalendar *et al.*, 1999).
- *DArT* (Diversity Arrays Technology) je vysokokapacitní micro-array technika získávání markerů, založená na hybridizaci bez znalosti sekvence (Jaccoud *et al.*, 2001).

1. 3. 1. 3 *Statistické metody*

Spolehlivá identifikace QTL lokusů vyžaduje pokročilé statistické metody, které umožňují kvantifikovat příspěvek jednotlivých lokusů k celkové detekované variabilitě, případně určit jestli je příspěvek genu aditivní nebo dominantní. K tomu je používáno několik přístupů, jako například: jedno-markerová analýza (Single-marker Analysis), jednoduché mapování pomocí intervalu (Simple Interval Mapping, SIM) a složené mapování pomocí intervalu (Composite Interval Mapping, CIM), vícenásobné mapování pomocí intervalu (Multiple Interval Mapping, MIM), testování signifikance (Significance testing), tvoření vícenásobných QTL modelů (Multiple-QTL model Building), QTL mapování vícenásobných znaků (Multiple-trait QTL Mapping), QTL mapování vícenásobných křížení (Multiple-cross QTL Mapping) a optimalizované výpočetní metody (Computational Optimization Methods), (Collard *et al.*, 2005, Nelson, 2005). Tři nejpoužívanější metody jsou popsány níže.

- *Jedno-markerová analýza* je jednoduchá metoda pro detekci kvantitativního znaku spojeného s jedním markerem. Statistické metody používané pro jedno-markerovou analýzu zahrnují *t*-test, analýzu variace (ANOVA) a lineární regresi. Tato metoda nevyžaduje kompletní vazebnou mapu. Tuto metodu využívají QGene a MapManagerQTX počítačové programy (Sax, 1923; Soller *et al.*, 1979).
- *Jednoduché mapování pomocí intervalu* využívá vazebných map. Analyzuje intervaly mezi sousedícími páry markerů ve vazbě po celém chromozomu současně. Použití markerů ve vazbě kompenzuje rekombinaci mezi markerem a QTL lokusem. Tuto analýzu využívají programy jako MapMaker/QTL a QGene (Lander *et Botstein*, 1989).
- *Složené mapování pomocí intervalu* v sobě kombinuje mapování pomocí intervalu a lineární regresi. Přidává další genetické markery na základě statistického modelu pro mapování pomocí intervalu. Těto analýzy využívají programy jako QTLCartographer, MapManagerQTX a PLABQTL (Jansen *et Stam*, 1994).

1.4 Výnos

Výnos je vedle kvality nejdůležitějším parametrem pro výběr kultivarů obilovin vhodných k pěstování. Většina šlechtitelských programů je zaměřená na udržení a zvyšování výnosu především u hexaploidní pšenice *T. aestivum* L.

Výnos je komplexní kvantitativní znak kontrolovaný velkým počtem genů a ovlivňovaný faktory prostředí (klimatické podmínky, kvalita půdy, biotické a abiotické stresové faktory, atd.). Výnos jako komplexní znak může být rozdělen na tři hlavní komponenty: počet klasů na m², váhu tisíce zrn, počet zrn na rostlinu. Počet zrn na rostlinu je dále možné rozdělit na počet klasů na rostlinu a počet zrn na klas. Počet zrn na klas je možné rozčlenit na počet obilek na klas a počet zrn na obilku (Quarrie *et al.*, 2006). Jednotlivé komponenty výnosu mají vyšší dědivost než výnos jako celek a i vliv prostředí na jednotlivé složky je menší (Cuthbert *et al.*, 2008).

Pšenice je hexaploidní druh s velkým genomem, což ji dělá nejkompexnější plodinou pro genetické mapování. Přesto je výnos u pšenice intenzivně studován. Bylo publikováno mnoho článků na toto téma jak u hexaploidní pšenice (Börner *et al.*, 2002; Groos *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Quarrie *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006; Marza *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Kirigwi *et al.*, 2007; Kuchel *et al.*, 2007a, 2007b; Ma *et al.*, 2007; Cuthbert *et al.*, 2008), tak tetraploidní pšenice (Peng *et al.*, 2003; Maccaferri *et al.*, 2008).

Výnos byl zamapován skoro na všech chromozomech pšenice (Börner *et al.*, 2002; Groos *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Quarrie *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006; Marza *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Kirigwi *et al.*, 2007; Kuchel *et al.*, 2007a, 2007b; Ma *et al.*, 2007; Cuthbert *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2003; Maccaferri *et al.*, 2008). Také výnosové prvky jsou distribuovány po celém genomu. QTL lokusy pro jeden ze tří hlavních komponentů výnosu s největší dědivostí, váha tisíce zrn, byly zamapovány skoro na všechny chromozomy kromě 1A, 3D, 4D a 6D (Peng *et al.*, 2003; Groos *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Cuthbert *et al.*, 2008). Pro další znak, počet obilek na klas, byly identifikovány QTL lokusy na chromozomech 1B, 2D, 5A, 5B, 7A a 7D (Ma *et al.*, 2007). QTL lokusy pro výšku rostliny, znak, který také ovlivňuje výnos, byly zamapovány na třinácti chromozomech (Börner *et al.*, 2002; Maccaferri *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2003; Marza *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2004).

Pro další znak, který také působí na výnos, délku klasu byly identifikovány QTL lokusy na chromozomech 1A, 1B,2B, 2D, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 7A, 7B a 7D (Börner *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2007; Marza *et al.*, 2006). Pro znak obsah proteinu v zrně byly zamapovány čtyři QTL lokusy na chromozomech 2A, 2D, 3A, 4D, 7A a 7D (Börner *et al.*, 2002; Groos *et al.*, 2003).

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo vytvořit genetickou mapu pro RILs mapovací populaci odvozenou z křížení *T. monococcum* ssp. *monococcum* DV92 × *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* G3116 jako základ pro QTL analýzu složek výnosu a dalších znaků.

3 Materiál a metodika

3.1 Rostlinný materiál

Pro konstrukci genetické mapy bylo požito 82 linií pšenice jednozrnky (*T. monococcum* L.) F₈ generace RILs (SSD) odvozené z F₂ mapovací populace z křížení DV92 × G3116.

Rodič DV92 je *T. monococcum* ssp. *monococcum* L. kulturní jednozrnka z Titogradu Montenegro v Itálii. Jeho alely jsou označovány písmenem A. Rodič G3116 je *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* divoká jednozrnka získaná sběrem v Libanonu. Jeho alely jsou označovány písmenem B. Semena linií mapovací populace F₈ generace a rodičů byli poskytnuty Prof. J. Dubcovským (University of California v Davis).

3.1.1 Pěstování mapovací populace

7. – 8. ledna 2009 bylo 18 semen každé linie F₉ generace sterilizováno 1 minutu v 5% Savu a následně omyta ve sterilizované vodě. Semena klíčila v Petriho miskách na buničité vatě, v chladicím boxu při 4 °C. 22. a 23. ledna byla naklíčená semena vysazena do jiffy květináčů (rašelinové květináčky) do pěstitelského substrátu s Agrisorbem (1%) a hnojivem (Hydrokomplex). Rostliny ve stádiu 2 - 3 listu byly jarovizovány 8 týdnů při teplotách 0 – 10 °C. Rostliny byly přihnojovány jednou týdně roztokem 1x Hoagland. 7. a 8. dubna byly rostliny přesazeny ven do připravených venkovních parcel v Olomouci a ve Stupicích. Rostliny byly vysazeny v náhodném rozestavení s použitím metody Latinských čtverců. V průběhu vegetace byly hodnoceny sledované fenotypové znaky a v srpnu byly rostliny sklizeny.

3. 2 *Přístroje a zařízení*

Magnetická destička, 96 direct Inject Magnet (Beckman Coulter, USA)

Stolní mixér, ERGO 7011 (ETA, Česká republika)

Homogenizační oscilační mlýn MM301 (Retsch, Německo)

Chlazená centrifuga Jouan CR4i (Thermo, USA)

Centrifuga Jouan GR2022 (Thermo, USA)

Thermocycler C-1000 (Bio-Rad, Kanada)

ELFO aparatura Dual adjustace Mega gel Kit C-DASG-400-50 (C. B. S. Scientific, USA)

Zdroj, MP-500V Power Supply (Major Science, USA)

Transluminátor Model GVM20 (Syngene chemi Bio Imaging systém, UK)

Dokumentační systém pro analýzu ELFO gelů (Syngene chemi Bio Imaging systém, UK)

Nicolet ANTARIS II FT (Thermo, USA)

Semimikro váhy, SBC 21 (Scaltec, Německo)

Oběhový vodní termostat s lázní, U15C (MLW)

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

3. 3 *Použité chemikálie a roztoky*

3. 3. 1 *Roztoky pro vysokovýkonnou izolaci DNA*

Basic Lysis Buffer (pH 7,2; 2000 ml):

200 ml 5 M	500 mM NaCl
200 ml 1 M	100 mM Thris-HCl
200 ml 0,5 M	50 mM EDTA

Lyzační pufr (na 100ml Basic Lysis B.):

0,5 g	Sodium bisulfite
0,1 g	Ascorbic acid
100 µl	Merkaptoethanol
100 µl (30 mg/ml)	RNAsa (0,03 mg/ml)

AGENCOURT® GENFIND™ v2 - Blood & Serum Genomic DNA Isolation Kit
(Berckman Coulter, USA)

3. 3. 2 Roztoky pro preparativní izolaci rostlinné DNA**10x homogenizační pufr (pH 9,4 – 9,5; 2000 ml):**

6,85 g	10 mM Spermine
5,09 g	10 mM Spermidine
400 ml 0,5M	100 mM EDTA
200 ml 1M	100 mM Tris Base
119,28 g	0,8 M KCl

1x homogenizační pufr (pro 24 vzorků):

400 ml	10x homogenizační pufr
684,6 g	sacharóza
doplnit dH ₂ O na 4000 ml	

H+20 (400 ml, před použitím zamíchat):

50 ml	10x homogenizační pufr
85,8 g	sacharóza
doplnit dH ₂ O na 400 ml	
100 ml	Triton X-100 míchat

Lyzační pufr pro jádra + 0,05% SDS:

400 ml	lyzační pufr pro jádra
20 ml	10% SDS

Lyzační pufr pro jádra (2000 ml):

40 ml 5 M	100 mM NaCl
400 ml 0,5 M	100 mM EDTA
100 ml 1 M	50 mM Tris Base

doplnit dH₂O na 2000 ml

TE (500 ml):

5 ml 1 M	10 mM Tris-HCl (pH 8)
1 ml 0,5 M	1 mM EDTA (pH 8)

doplnit dH₂O na 500ml

Proteináza K: (držíme na ledu, pro 24 vzorků, musí být čerstvě připravena)

25 ml	lyzační pufr pro jádra
0,056 g	proteináza K

3. 3. 3 Chemikálie pro polymerázovou řetězovou reakci**10x PCR pufr (40 ml)**

4 ml 1 M	100 mM Tris-HCl (pH 8,2)
20 ml 1 M	500 mM KCl
600 µl 1M	15 mM MgCl ₂
0,4 ml	1% Triton X-100

doplnit dH₂O na 40 ml

Nukleotidy (Fermentas, Kanada)

dTTP 100 mM
dATP 100 mM
dGTP 100 mM
dCTP 100 mM

Taq polymeráza

Primery (Invitrogen, USA)

3. 3. 4 Chemikálie pro nedenaturující polyakrylamidovou elektroforézu

5x TBE (na 1000 ml)

54 g	0,45 M Tris base
27,5 g	0,45 M kyselina boritá
20 ml 0,5 M	10 mM EDTA (pH 8)

6x Stop C (na 10 ml)

2 ml 0,5 M	100 mM EDTA (pH 8)
0,1 g 10 %	1 % SDS
5 mg	0,05 % bromfenolová modř
5 mg	0,05 % xylenecyanol
5 ml 0,85% glycerolu	42,5 % glycerol

40 % acrylamide : N, N' methylenebisacrylamide 19 : 1 (Fluka analytical, USA)

Tetramethylethylenediamine TEMED (Fluka BioChemika, USA)

Ammonium peroxodisulfate APS (Fluka BioChemika, USA)

10x Ethidium Bromide (Sigma Aldrich, USA)

Velikostní marker, Gene Ruler™ 100bp, DNA Ladder Plus (Fermentas, Kanada)

3. 4 Metodika

3. 4. 1 Vysokovýkonná izolace DNA

Byla použita rychlá vysokovýkonná metoda pro izolaci DNA z 96 vzorků najednou. Jedná se o upravený protokol pro kit AGENCOURT® GENFIND™ v2 - Blood & Serum Genomic DNA Isolation Kit (Berckman Coulter).

Na začátku je nutné odebrat 3 x 3 cm mladého listu do 96 jamkové misky a nechat je usušit v lyofilizátoru nebo dva dny při 37 °C. Po vysušení homogenizovat 4 min/27 Hz pomocí homogenizačního oscilačního mlýna se dvěma skleněnými

kuličkami (0,5 cm). K homogenizovanému vzorku přidat 1 ml lyzačního pufru a promíchat. Pak inkubovat 45 minut při 65 °C. Po inkubaci centrifugovat 3000 rpm, 10 minut, 4 °C v misce.

Po centrifugaci k 100 µl lyzátu přidat 5 µl magnetických kuliček a promíchat. Pak přidat 70 µl izopropanolu a znovu promíchat a nechat stát 5 minut při pokojové teplotě. Následně misku umístit na magnet na cca 5 minut do vyčeření roztoku. Pak odpipetovat a vyhodit supernatant. Poté mimo magnet přidat 100 µl Wash Buffer I a důkladně promíchat. Znovu misku umístit na magnet na cca 5 minut opět do vyčeření roztoku. Potom odpipetovat a vyhodit supernatant. Zopakovat kroky použití Wash Bufferu I. Pak pokračovat přidáním 100 µl Wash Buffer II mimo magnet a promícháním. Misku umístit na magnet na cca 5 minut do vyčeření. Následně odpipetovat a vyhodit všechny supernatant. Mimo magnet přidat 40 µl H₂O, důkladně rozsuspendovat, nechat stát 2 minuty. Je nutné, aby všechny kuličky byly v elučním roztoku. Nakonec umístit misku na magnet na 10 minut a pak odebrat 38 µl extrahované DNA do nové misky.

3. 4. 2 Preparativní izolace rostlinné DNA

Pro izolaci celkové DNA z linií mapovací populace byla použita metoda podle Dvořáka *et al.* (1988).

Nasbírat 10 g rostlinných vzorků a zabalit je do označených papírových ručníků a uchovat v ledu. Podle počtu vzorků připravit 200 ml centrifugační kyvety s 5 ml H+20 a umístit je na led.

Následující kroky je nutné dělat v digestoři. Pro 24 vzorků připravit 4000 ml 1x homogenizačního pufru, přidat 4 ml 2mercaptoethanolu, důkladně promíchat a udržovat na ledu. Nůžkami nastříhat rostlinný materiál na malé kousky a vložit do mixéru, přidat 150 ml 1x homogenizačního pufru s 2mercaptoethanolem. Nechat rozmixovat přibližně 1 minutu, mezitím si připravit filtrační aparaturu. Do nálevky dát vrstvu miraclothu a pod nálevku centrifugační 200 ml kyvetu s 5 ml H+20 a správným označením. Rozmixovaný vzorek pomocí skleněné tyčinky nalít do nálevky. Skleněnou tyčinkou zeškrábat všechno ze dna. Vymačkat přebytečnou tekutinu z miraclothu. Následně zazátkovat centrifugační kyvetu a jemně zamíchat. Položit zpátky

na led a nechat lyzovat aspoň 5 min. Opláchnout mixér, nachystat novou nálevku s vrstvou miraclouthu a novou centrifugační kyvetou. Tyto kroky opakovat dokud nebudou všechny vzorky hotové.

Lyzáty centrifugovat 20 minut při 4000 – 4500 rpm při 4 °C. Mezitím připravit lyzační pufr pro jádra + 0,05% SDS, které se umístí do 65 °C vodní lázně. Připravit proteinázu K – na ledě (viz kapitola 3. 3. 2). Po centrifugaci vylít supernatant do odpadu a postavit kyvety na papírový ručník dnem vzhůru. Dát centrifugovat další kyvety. Pelet rozsuspendovat jemně štětečkem v 1 ml proteinázy K. Přidat 15 ml lyzačního pufru pro jádra + SDS, který je ohřátý na 65 °C. Promíchat jemně dokud není směs viskózní a homogenní. Přelít směs do označených plastových zkumavek (50 ml), zazátkovat a dát na 30 minut do 65 °C vodní lázně. Všechny vzorky najednou. Nakonec v digestoři do všech vzorků přidat 8 ml fenolu a 8 ml chloroformu. Promíchat a nechat přes noc v ledničce.

Druhý den je provedena purifikace extrahované DNA. Do digestoře si připravit vzorky, plynový kahan, 50 ml centrifugační kyvety, 500 ml kádinku a jehlu. V rukavicích odzátkovat kyvetu. Nad kahanem nahřát jehlu a propíchnout jí dno kyvety. Do 500 ml kádinky nechat odtéct fenol a chloroform. Horní vrstvu přelít do čisté označené centrifugační kyvety (50 ml). Provést se všemi vzorky. Přidat do všech kyvet TE pufr až po okraj a vyvážit. Centrifugovat 30 minut při 10 000 rpm a teplotě 14 °C. Po centrifugaci slít supernatant do 250 ml erlenmayerovy baňky.

Purifikovanou DNA přesrážet přidáním 25 ml 3M NaOAc a 500 ml vychlazeného ethanolu. Jemně promíchat. Háčkem ze skleněné kapiláry vylovit vysráženou DNA. Háček s DNA ponořit na 1 minutu do 80 % ethanolu, vymáchat. Přemístit DNA do sterilních skleněných zkumavek s 2 – 3 ml TE. Zazátkovat a nechat přes noc opatrně míchat. Skladovat při - 20 °C.

3. 4. 3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce byla provedena ve 25 µl (1x PCR pufr, 200 µM dNTP, 1 µM primery, Taq polymerázy 0,5U). Markery (primery) byly vybrány pomocí databáze GrainGenes 2.0 a již zhotovené mapy pro *T. monococcum* L. (Dubcovsky *et al.*, 1996). Bylo vybráno 62 STS a 1 SSR tak, aby pokrývali celou délku

chromozomů a byly od sebe vzdáleny 10 cM. Některé vybrané markery byly zamapovány na více než jednom místě v genomu.

Podmínky PCR pro STS, SSR markery:

Zahřátí	95 °C – 5 min	} 40 cyklů
Denaturace	95 °C – 30s	
Přisedání	viz Tab. I	
Polymerace	72 °C – 30 s – 1 min	
Závěrečná polymerace	72 °C – 10 min	

Tab. I: Primery pro jednotlivé markery a jejich teplota přisedání

Marker	Primery		PCR
Chromozom 1A			Přisedání
x SMP	SMP F	GCA AGG GAA GAG AAA AGC AG	55 °C – 30s
	SMP R	TTT CTC AAT CTC ATG TTA TCC TTC A	
x abc 156	abc156 F	TTA CGG GAT CAA AGC TGA GGC	50 °C – 30 s
	abc156 R	GAC AAG CAA CAC CAA CCA AGC	
x ksu E18	ksuE18 F	TGA GCC GGT TGC TGT TCG TC	50 °C – 30 s
	ksuE18 R	AAG CAC CGA CAT GGT CAC CC	
x abg 500	abg500 F	GCT AGA ACT TGA CCA ATC TC	Nepřisedá
	abg500 R	AAG AAG AAC CCG GAG AAT CT	
x abg 452	abg452 F	TCT ACC TAG CTT CTT TCA AA	Nepřisedá
	abg452 R	AGC TGC CAC CAC CCC CAG TG	
x abg 387	abg387 F	GCA CTG GCA TAG TCT CAC AA	50 °C – 30 s
	abg387 R	CGA TGC TGG TTC GGT CAT AC	
x ksu E8	ksuE8 F	TAT GGG CCA GTG ATT TCC AC	50 °C – 30 s
	ksuE8 R	TGC TCG GTT CAA TTG ACT GC	
x ksu G34	ksuG34 R	GTC TCA GGA AGG TGA TGA TC	45 °C – 1 min 30 s
	ksuG34 L	GAG CAG TAG GGT AAA GTA AG	
x abc 261	abc261 F	AGG AAG CTC AAG AAG GTG AA	50 – 30 s
	abc261 R	AAA GTC AAG AGT TGC ATC AA	
x ksu E11	ksuE11 R	CTG TCA CTG CTT CCA TAA CT	Nepřisedá
	ksuE11 F	AAG AAA AGC CTT CAA GAC TT	
Chromozom 3A			Přisedání
x mwg 2021	mwg2021 F	GTT CCA CTG GAT GCA CCA CA	Nepřisedá
	mwg2021 R	CAT CAA GCC TCA CAA CAT CC	
x mwg 813	mwg813 F	TTG GAC AGG ATG TTG CCA	56 °C – 30 s
	mwg813 R	CAT TCA GTA ACA CCG CCA TG	
x abg 471	abg471 F	TGG ATT TGA TGG CGG AGA CC	50 °C – 30 s
	abg471 R	CAA GAC TGA CAA CAC AAG AC	
x ksu G59	ksuG59 R	TGC GTA TGT AAT GTA GGA CT	Nepřisedá
	ksuG59 L	GGA AAA TAT AAA AAT CAG AT	
x abg 4	abg 4 F	AGC ACC AAA GCA CCT GAA CC	50 °C – 30 s
	abg 4 R	CGG GAG GAG GGG AAG AGG AC	
x ksu G62	ksuG62 L	TTA GAA GCA GGC TAT GAC CA	50 °C – 30 s
	ksuG62 R	TAC CAT CAA GAC GCC AGA AG	
x abc 166	abc166 F	GTC CGA GGG CCG CCC TAC AC	50 °C – 30 s
	abc166 R	CCT GAA TCA ACA ACC AAA TA	

Marker	Primery		PCR
Chromozom 2A			Přisedání
x ksu D18	ksuD18 F	GGA CAC TAA ACT TTA GAG GC	Nepřisedá
	ksuD18 R	CCA CTG TTA GGA TTA GTG ATC C	
x ksu C2	ksuC2 F	TTT CGC TGT GGC ACT TGT AC	Nepřisedá
	ksuC2 R	ATG GAG AAG TCT TAC CTC AGC	
x abg 459	abg459 R	GCC ACC ACG CTC TCC ATT GT	50 °C – 30 s
	abg459 L	CCA CGC TCG CTT GCT GAC TC	
x abg 378	abg378 R	TTA GTC ATA GAA TCC CTG TT	50 °C – 30 s
	abg378 F	AAA ATT CGC CTG TGC TGT GT	
x mwg 503	mwg503 F	GTC GTC AGA GCC CAC GCC AC	50 °C – 30 s
	mwg503 R	TCC AAG CGG CAA CCA TCC CG	
x ksu D22	ksuD22 F	AGC AGG AAC AAA CAC ATC AT	50 °C – 30 s
	ksuD22 R	TCG CCG TCA CCC AAC TCA CC	
x abc 153	abc153 F	GCC TCT GCC GCT GGA ACT AC	50 °C – 30 s
	abc153 R	AAA CAC CTC CTG GCT CTC AG	
x ksu H16	ksuH16 R	CAC CTT CTT CTT CTT CTA CT	Nepřisedá
	ksuH16 F	ACA CTC TTC ATT GGC ATC TC	
x mwg 949	mwg949 F	CGG CTG GTA AAT GAA CTG AA	Nepřisedá
	mwg949 R	GGC TTC CGC TAC TAC GTC TT	

Chromozom 4A			Přisedání
x abg 460.1	abg460A F	TTG TGT GGT AAA AGT AAA AT	50 °C – 30 s
	abg460A R	TGG AGG AGA GCG GAA GAG AT	
x abg 55	abg55 R	ATC CGC AGC AGA TCG AGG AC	50 °C – 30 s
	abg55 F	CAG GCA AGA TTG ACG CAG TA	
x psr 922	psr922 F	CAT GTG GTC CCC ACC TTC	52 °C – 30 s
	psr922 R	AAG GCA AGG TTT GCT TCT CA	
x ksu H8	ksuH8 L	GAG ACC GTG CAT CTT CAT GT	60 °C – 30 s
	ksuH8 R	GCA TAG GTG TTC CCA TCT GA	
x wg 464	wg464 F	AGT CCA AAT GAT GTC ACA GG	50 °C – 30 s
	wg464 R	AGG ACT GTG AAG ATG CTA CT	
x ksu G10	ksuG10 R	TGT CCA GCT TCA GCG AGT AC	50 °C – 30 s
	ksuG10 L	GTG TTG ATG TCC TTG AGG CC	
x abg 390	abg390A F	AAC ACA ACC ACA ATA AAG AA	Nepřisedá
	abg390A R	TTT GAA CAG AAG AAA ACC TA	
x abg 463	abg463 R	CAA ATC CCC AAG ATA AAA TG	Nepřisedá
	abg463 F	ATG CCC CAC TCA AAT AGT TT	
x mwg 851	mwg851A R	GTG CAA TAC CAG CAA ACT CA	50 °C – 30 s
	mwg851A F	CAT AGC AGA ACG TCT CAA GT	
x wmc 283	wmc283 R	GAC CCG CGT GTA AGT GAT AGG A	60 °C – 30 s
	wmc283 F	CGT TGG CTG GGT TAT ATC ATC T	

Tab. I: Primery pro jednotlivé markery a jejich teplota přisedání (pokračování)

Marker	Primery		PCR
Chromozom 5A			Přisedání
x abg 497	abg497 F	GGA TGA GGA GAT ACA TGG AGC	Nepřisedá
	abg497 R	CAT TTG GTG GTC AAC AAG GC	
x mwg 920	mwg920 R	GTC ACC GCC CGT CAC GTT GCG CTT CA	50 °C – 30 s
	mwg920 F	GAG TAC CGC GAC CGT CGC GCT CGA GC	
x abg 395	abg395 F	TTA GGA AAG CGA TGG ACA CA	50 °C – 30 s
	abg395 R	TTA CAG GGC CAG GGT TAC TG	
x ksu H9	ksuH9 F	GTG TAT CAC AAG CTT GCT GT	50 °C – 30 s
	ksuH9 R	ATT GAC CAT TGC CCG GAG AA	
x wg 530	wg530 R	GAG ACC AAA GAT TCA ACA GC	52 °C – 30 s
	wg530 L	CAA TGC TCC AAA TCT CAC CA	
x mwg 820	mwg820 F	GGG GAG AAA ATG CAT GCA AT	50 °C – 30 s
	mwg820 R	CAG CGT CGT ATA AAT GTC TT	
x ksu G14	ksuG14 R	GGA GGC TAT GGG TGC GTC AAC	50 °C – 30 s
	ksuG14 F	AGC CCA ACC TGT AAA CAA CAC	
x ksu F1	ksuF1 R	CAG TGG TTC ACG ATA GTA GAT	Nepřisedá
	ksuF1 F	TTG GAT AAC TTC AGT CAG ATG	
x wg 114	wg114 R	GGC TCA ATA GAA TAG TAT CA	50 °C – 30 s
	wg114 L	ATC ACA ACA TTT CAG AGT TT	
x ksu H11	ksuH11 R	GTA GCC GCT AAT CTC GTC TGT	Nepřisedá
	ksuH11 F	CGA TCT CAT AGC GAA TAT GT	

Chromozom 7A			Přisedání
x abg 704	abg704 F	ATA TGC TCG ATG CTG ATT AG	Nepřisedá
	abg704 R	CCT TCT TCA GAT TCC TAC CA	
x mwg 530	mwg530 F	CGA TCT GGA CAT CGA AAG CC	Nepřisedá
	mwg530 R	GCT AGT GCT CTT GCC AAG TCG	
x ksu D9.1	ksuD9 R	GGT GAC GAC CCG AGC GTT GAT	52 °C – 30 s
	ksuD9 L	CAC CAG ATA TTG CTT GCC TCC	
x abc 152	abc152 R	TCC GCA AGT ACC AGA AGA GC	60 °C – 30 s
	abc152 F	GAC AAG GAA AGC CAA TCA AC	
x abc 465	abc465 F	GCT ACT GGG ACA AAA TCT CC	56 °C – 30 s
	abc465 R	CAC GAC AGA CGG ACC AAA TG	
x abc 310	abc310 F	TCC TGA TGG TCC TCT TAT GC	48 °C - 1 min
	abc310 R	ACA TAG TTC TCT TCC CAG TA	
x abc 305	abc305 F	GAC AAC GGC CAA CAA ATC TA	56 °C – 30 s
	abc305 R	AGC ATG TCA TTG AAC ACT TC	
x abg 461	abg461 R	TAG AAG TAG AAA AAG GAA CC	50 °C - 1 min
	abg461 F	GAA GAA CAA CCA ATA GAA TG	
x mwg 2062	mwg2062 F	TCT CGC TGG TAT TCA GGG TCC	50 °C – 30 s
	mwg2062 R	AAA CGA TAG CAA GAG GAA CCG	

Marker	Primery		PCR
Chromozom 6A			Přisedání
x abg 466	abg466 F	TGC ACG CGC TGT GGC ATC TC	50 °C – 30 s
	abg466 R	CCA AGC ATT CCA ACC TTA GC	
x mwg 573	mwg573 R	CTG CAC TCA TGT CAG CAA GA	Nepřisedá
	mwg573 F	GAC CAA CGG GAG ATG CTC GT	
x ksu G48	ksuG48 F	CGG TAG GGC TCG TGC TCA CC	50 °C – 30 s
	ksuG48 R	AGG GAG GCT CGC TGG TTT TT	
x abg 458	abg458 L	GAG AGC CGA TGA CGG TAT GT	Nepřisedá
	abg458 R	CTT GGA CAC ATG CCA TAT CC	
x abg 20	abg20 F	GGC AAC CGC AAG AAA GAA AG	Nepřisedá
	abg20 R	CCT CTC ATG TCA GAG CAT TT	
x Nar7	nar7 R	TCA CCG AGT TGA TGT TGA GC	50 °C – 30 s
	nar7 L	TTC GAC CTC TTC TCC TCC TC	
x abc 154	abc154 F	TTC ATT TCA TCG TTT TCA TA	Nepřisedá
	abc154 R	ATC AGG TTC AGC AGT GTT TA	
x mwg 2053	mwg2053 R	CCC CGG TAT CCT CAA ATG CA	50 °C – 30 s
	mwg2053 F	GTT TTC GCG ACG ATG TCC TT	

Tab. II: Primery pro IRAP markery

Marker	Primer	Marker	Primer	Marker	Primer
3157	ATT CCA CAC GTG CAT ATG GGT	3138	ACG CAA GAG CTG CCG CCC GAG AGA A	3118	CTC GAC AGT AAT TTG TTC ACC CAC C
3156	ATC CTC GCG GTT GGG AGG TTG T	3137	GCG GCA GCT CTT GCG TTA TCC	3117	TGA AAC CTA TGG CCC CCG GGT C
3155	CAA ACC TTG TAT GCA CTC TCC A	3136	CAT ACT AAT GGC GCA CCA CAC	3116	GTG TGA GTA GTT TAC CTC AGA CC
3154	TGT CGT GGT TCT AAG TCT GAC AGT A	3135	TGC CAC CGA TAG CCA TCC ATG A	3115	AGG AAC TGG CAC TTG GCA CTG AG
3153	TAC TGT CAG ACT TAG AAC CAC GAC A	3134	GGT CCA CGA AGA AGC AAC CT	3114	GAG TTG CAT ATT GAC GAA ACA CCA C
3152	TGA TGA AGC TAT GTA CCT AGG GTA GG	3133	CGT GGA TGT ACG ATA GCA CCA C	3113	AGC GTT GCT AGT TGC AGG TGA AGA
3151	GGT CCA TGA CCC TAC CCT AGG TAC A	3132	ACG TAA TCT CGG TGA GAC CG	3112	TCA CCT GCA ACT AGC AAC GCT
3150	TGT GGC AAT GAC AGG TCA TGC A	3131	CAC CTA GGG ATT AGT TGC ACT TTC A	3111	CAC ATA ACC GCG GGC ACG GCT TTC G
3149	CTT AGG ATC GGG GTC CCG ACA	3130	GCA TCA TGA AAT TGG TGA TGG AGG A	3110	ATA GCC GCA TCG AGG GCG TTA CA
3148	CTT AGG TTG GCC GGC ATG TGT CC	3128	CCT TTG TTT CGG TGC AAA TGG GT	3109	ATG CGG TTA TGC CTC TAA GTC GTG C
3147	GCT ACC TTT ACC AAA TCG TGT TCA C	3127	TTG CAC CGA AAC AAA GGG ACC T	3108	TTC CTA CGC ACA CGC AAG ATC
3146	GCA TGA CCT GTC ATT GCC ACA GT	3126	GGT TCC TGC TAA GGT GAT GTG GT	2107	AGC ATG ATG CAA AAT GGA CGT ATC A
3145	CTC GTG CGT TCG CCT CGA TCT GCT C	3125	GCA CAG GTT TTC TAT GTG AAG GAC A	2106	TAA TTT CTG CAA CGT TCC CCA ACA
3144	TCG AGT TCT GTT CAT AGG TTG TCA C	3124	GGA TGC AGT CAT TAG GGC ATG	692	GCG ATT GCT AAG GCG CAA CG
3143	CGA CTT TGA CGA TCC GAC TAC A	3123	CAG TCA CAC CAT TCT CTG CCT TCC A	679	GGG TCG CAT ATT GGG CGT GAC
3142	TCG TAG TTG CGG ATG CTT GC	3122	AGT TCG GGA CCC CCT ACC CGA GAT C	675	AGC GCG CGT GCT GGG CTG GG
3141	TTC TCC CTC TTC ATG TAA ACC TTG	3121	CCC TAA TCC AGG ACT CCC TCA	640	TCC CAT GCG ACG TTC CCC
3140	GCA TGA TGC AAA ATG GAC GTA TCA G	3120	GAC CGC TAT CCA GCA TGC ATC T	554	CCA ACT AGA GGC TTG CTA GGG AC
3139	GCA TGA TGC AAA ATG GAC GTA TCA C	3119	GCA TGC TGG ATA GCG GTC GAT G		

Pro zahuštění mapy bylo také použito 56 IRAP markerů (Tab. II), které poskytl Doc. R. Kalendar (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finsko), a 769 DArT markerů (<http://www.diversityarrays.com>).

Podmínky PCR pro IRAP markery:

Zahřátí	95 °C – 5 min	}	30 cyklů
Denaturace	95 °C – 30s		
Přisedání	60 °C – 1 min		
Polymerace	72 °C – 30s		
Závěrečná polymerace	72 °C – 10 min		

3. 4. 4 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza

Pro separaci vzorků po PCR byla použita nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza. Byla použita jak 4%, tak i 6% nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza (Tab. III), vždy v závislosti na délce očekávaného produktu.

Tab. III: Rozpis chemikálií na polyakrylamidový gel

Chemikálie	4% gel	6% gel
40% Akrylamide : N, N' – Methylenebisacrylamide 19 : 1	15 ml	22,5 ml
TEMED	110 µl	110 µl
10x APS	1 ml	1 ml
5x TBE	Doplnit do 150 ml	Doplnit do 150 ml

Připravit gel smícháním chemikálií v požadovaném poměru (Tab. III) a nechat ztuhnout asi 45 minut při pokojové teplotě. Po ztuhnutí vložit gel do vertikální elektroforetické aparatury. Naplnit horní i dolní vaničku aparatury 0,5 x TBE pufrem a do dolní vaničky přidat 8 µl ethidiumbromidu (10%). Před nanášením vzorků nechat gel 60 min při 350 V (prerun). Mezitím připravit vzorky s nanášecím pufrem (6 x Stop C) v poměru jeden díl nanášecího pufru a 9 dílů PCR produktu. Po prerunu odpojit aparaturu od zdroje a nanést 5 µl vzorku (pro IRAP markery je třeba nanášet 15 µl vzorku). Dělení PCR produktů provádět při 300 V 30 - 90 min dle délky separovaných fragmentů.

3. 4. 5 Konstrukce genetické mapy

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

3. 4. 6 Hodnocení fenotypu

Fenotypické pokusy byly prováděny ve dvou opakováních pro linie ze dvou lokalit (Olomouc a Stupice). Bylo sledováno celkem osm znaků, tři pro výnos (váha tisíce zrn, počet obilek na klas a délka klasu), tři agronomicky významné znaky (výška rostliny, rozpadavost klasu a obsah dusíku v sušině semen) a dva morfologické znaky, ve kterých se rodiče významně odlišovali (ochlupení listů a rozkladitost trsu). V Olomouci bylo sledováno všech osm znaků. Ve Stupicích byly sledovány 4 znaky (váha tisíce zrn, počet obilek na klas, výška rostliny, ochlupení listů).

- *Váha tisíce zrn* - z každé linie bylo vyloupano a očištěno od plev 100 zrn, které byly následně zváženy. Pro statistické zpracování byly hodnoty přepočítány na váhu jednoho zrna.
- *Počet obilek na klas* - u každé linie bylo vybráno pět nejstarších klasů, u kterých byl spočítán počet obilek. Pro následnou statistickou analýzu byly použity průměrné hodnoty pro rostlinu.
- *Délka klasu* – byla změřena délka klasů použitých pro stanovení počtu obilek na klas. Pro další statistickou analýzu byly hodnoty zprůměrovány.
- *Výška rostliny* – u jednotlivých rostlin byla změřena výška od půdy po poslední obilku nejvyššího klasu.

- *Rozpadavost klasu* – byla provedena ve dvou opakováních ve srovnání s rodičovskými liniemi. Rodič DV92 má nerozpadavý klas, označen jako 0. Rodič G3116 má klas rozpadavý, označen jako 1.
- *Obsah dusíku v sušině semen* – pomocí přístroje Nicolet ANTARIS II FT (Thermo Scientific, USA) byl změřen obsah dusíku v sušině pro každou linii.
- *Ochlupení listů* – byla hodnocena vizuálně dvěma pozorovateli. Rodič DV92 nemá na listech skoro žádné chlupy, označeno jako 0. Rodič G3116 má listy ochlupené výrazně, označeno jako 1.
- *Rozkladitost trsu* – byla hodnocena vizuálně dvěma pozorovateli podle pokynů Bareše *et al.* (1985).

3. 4. 7 QTL analýza

QTL analýza byla provedena za použití sesbíraných fenotypických dat za jeden rok za dvou lokalit (Olomouc, Stupice). Byla provedena pomocí programu R/Qtl (Broman *et al.*, 2003), který pro detekci QTL lokusů využívá jednoduché mapování pomocí intervalu.

3. 5 Software

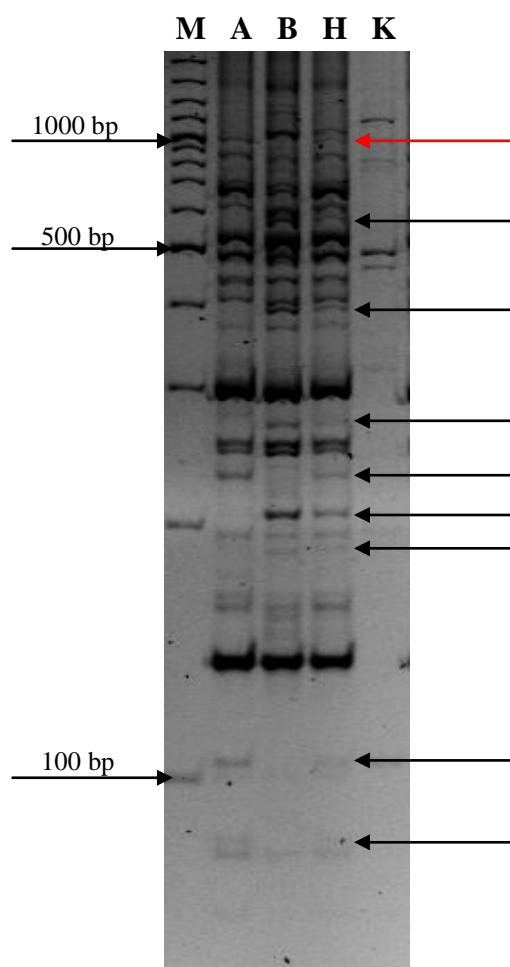
Pro zpracování výsledků, konstrukci genetické mapy a QTL analýzu byly použity tyto počítačové programy:

- *JoinMap 4* (Van Ooijen, 2006) – pro vytvoření mapy.
- *Microsoft Office Excel 2007* – jednoduché statistické metody a zpracování sesbíraných fenotypických dat.
- *R/Qtl* (Broman *et al.*, 2003) – pro detekci QTL pro změřené znaky.

4 Výsledky

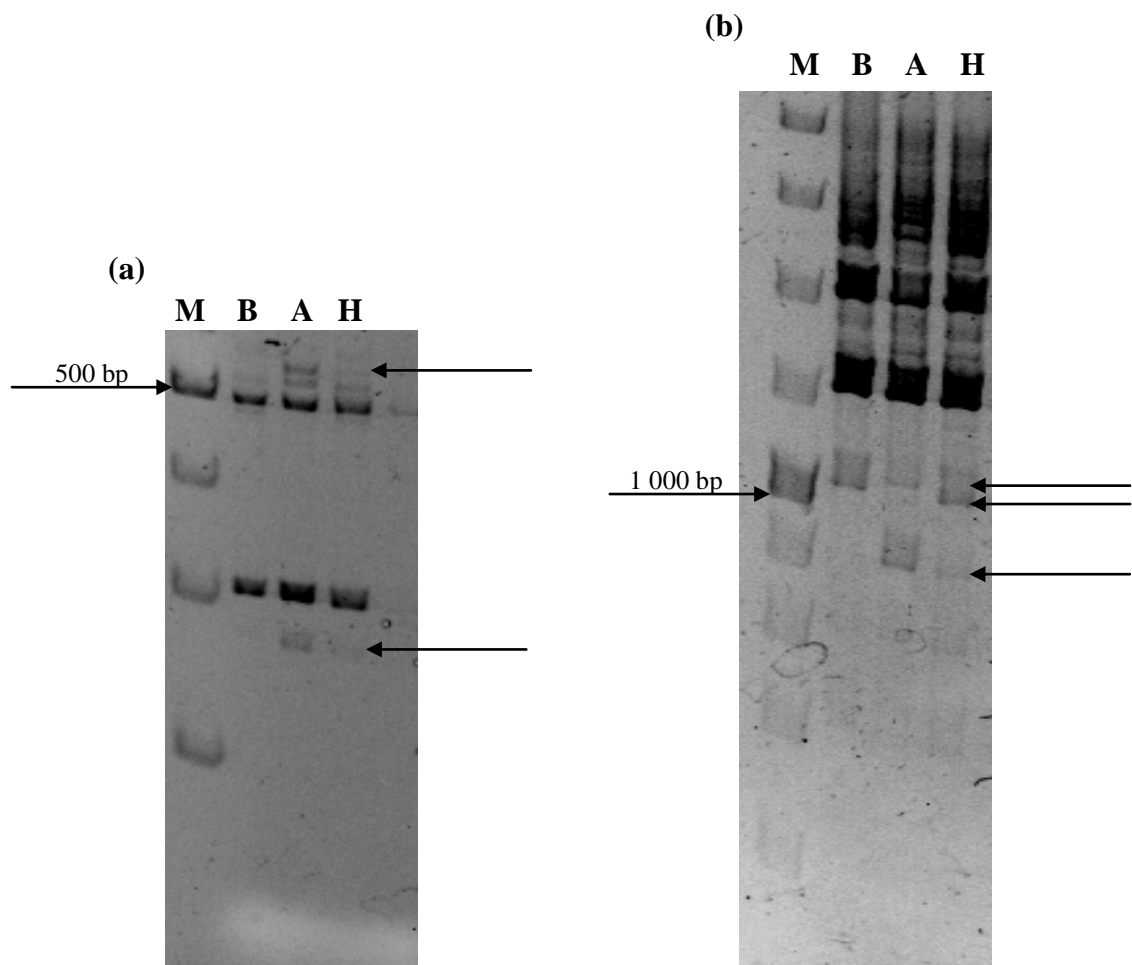
4.1 Molekulární markery

Bylo otestováno celkem 62 STS, 56 IRAP a 1 SSR marker. Z 62 testovaných STS markerů bylo 39 polymorfních, avšak některé markery poskytly až devět polymorfních fragmentů na jednu PCR (Obr. 4). Markery, které nebyly polymorfní a dávali jeden fragment pro celou mapovací populaci (monomorfní), mohou být osekvenovány a převedeny na SCAR nebo CAPS markery. Z 56 IRAP markerů bylo 9 polymorfních, ale i přesto dávaly až 5 polymorfismů na jednu PCR (Obr. 5). Ze 769 DArT marek polymorfních na naší mapovací populaci bylo 579 informativních. Ostatní byly vyřazené z důvodů chybějících nebo arteficiálních signálů na DNA rodičovských linií.



Obr. 4: Příklad STS markeru xabg 55

M - velikostní marker, A - rodič DV92, B - rodič G3116, H - heterozygot, K - negativní kontrola, šipky označují polymorfní fragmenty, červená - kodominantní fragmenty, černé - dominantní fragmenty



Obr. 5: Příklad IRAP marker IRAP 692

(a) gel po 20 minutách běhu, (b) gel po hodině běhu

M - velikostní marker, A - rodič DV92, B – rodič G3116, H – heterozygot, K – negativní kontrola, šipky označují polymorfní fragmenty, černé - dominantní fragmenty

4.2 Genetická mapa

Byla zkonstruována genetická mapa pomocí 39 STS, 1 SSR, 9 IRAP a 579 DArT markerů a za využití programu JoinMap 4 (Van Ooijen, 2006). Pro identifikaci jednotlivých vazebných skupin byla použita metoda regresního mapování a pro výpočet rekombinační frekvence mezi jednotlivými markery byla použita funkce Kosambi (Kosambi, 1943). Bylo identifikováno sedm vazebných skupin o celkové délce 829 cM. Jednotlivé vazebné skupiny byly přiřazeny k chromozomům *T. monococcum* L. pomocí DArT markerů, u kterých byla lokalizace poukázána již dříve.

Nemohli být využity STS markery vybrané z již zhotovené mapy (Dubcovsky *et al.*, 1996), protože některé markery byly zamapovány na více míst v genomu a jiné dávali více polymorfních fragmentů z jedné PCR.

Bylo tedy identifikováno všech sedm chromozomů *T. monococcum* L. (Tab. IV). Jednotlivé chromozomy jsou znázorněny na obr. 6. U chromozomů není zatím určena jejich orientace a centromery.

Tab. IV: Délka jednotlivých chromozomů a počet zamapovaných markerů

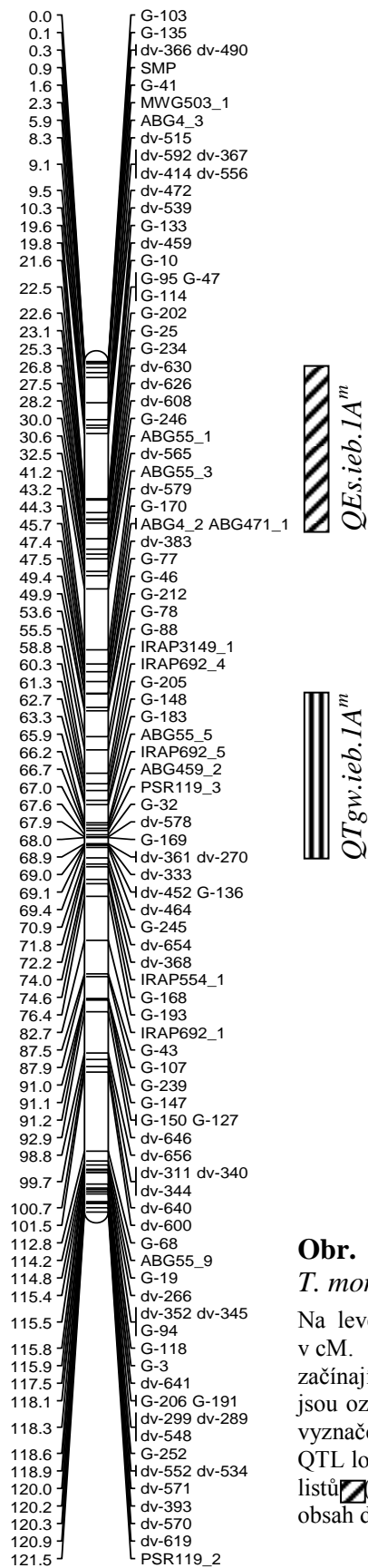
Dosažené výsledky			Dubcovsky <i>et al.</i> (1996)			Singh <i>et al.</i> (2007)			Quarrie <i>et al.</i> (2005)		
Chromozom	Délka [cM]	Počet markerů	Chromozom	Délka [cM]	počet markerů	Chromozom	Délka [cM]	počet markerů	Chromozom	Délka [cM]	počet markerů
1A ^m	121,526	102	1A ^m	157	51	1A ^m	171	28	5A	190	data nejsou dostupná
2A ^m	157,085	93	2A ^m	168	42	2A ^m	205	42	4A	179	
3A ^m	114,73	111	3A ^m	145	31	3A ^m	254	27	2A	170	
4A ^m	83,46	49	4A ^m	127	46	4A ^m	79	12	7A	167	
5A ^m	117,685	89	5A ^m	192	80	5A ^m	224	32	3A	158	
6A ^m	124,945	69	6A ^m	144	30	6A ^m	89	14	6A	151	
7A ^m	108,607	115	7A ^m	146	48	7A ^m	238	24	1A	131	
Σ	828,038	628	Σ	1067	328	Σ	1260	179	Σ	1146	224

Dubcovsky *et al.* (1996): mapovací populace 72 rostlin odvozené z křížení *T. monococcum* ssp. *monococcum* × *T. monococcum* ssp. *aegilopoides*

Singh *et al.* (2007): mapovací populace 121 rostlin odvozených z křížení *T. boeoticum* × *T. monococcum*

Quarrie *et al.* (2005): mapovací populace 95 rostlin hexaploidní pšenice odvozené z křížení Chinese Spring × SQ1

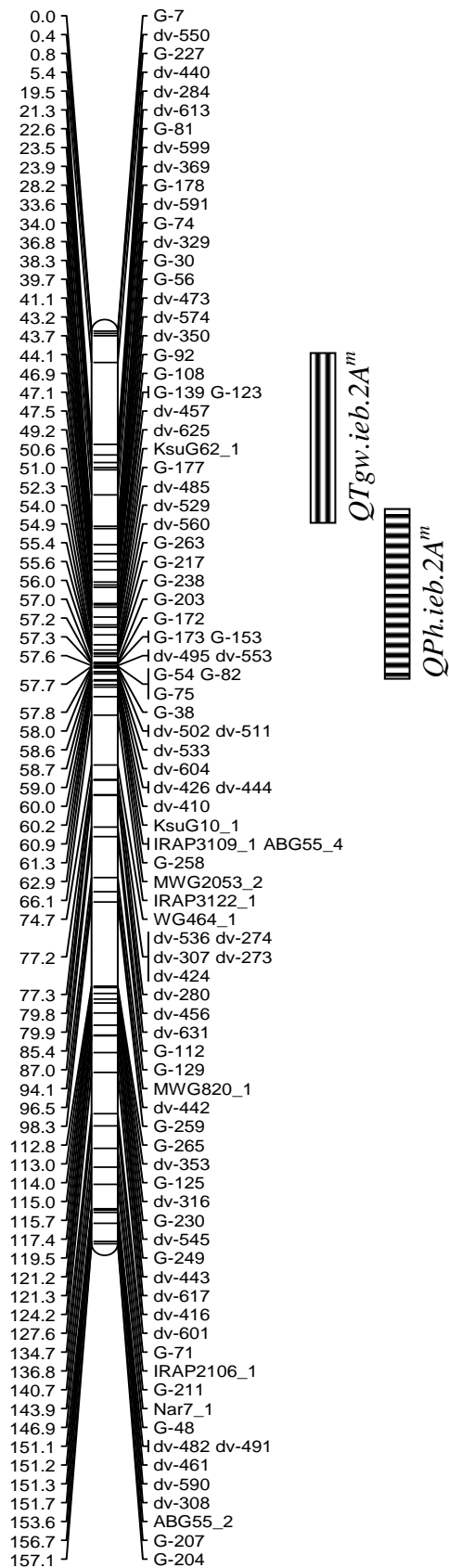
Chromozom IA^m



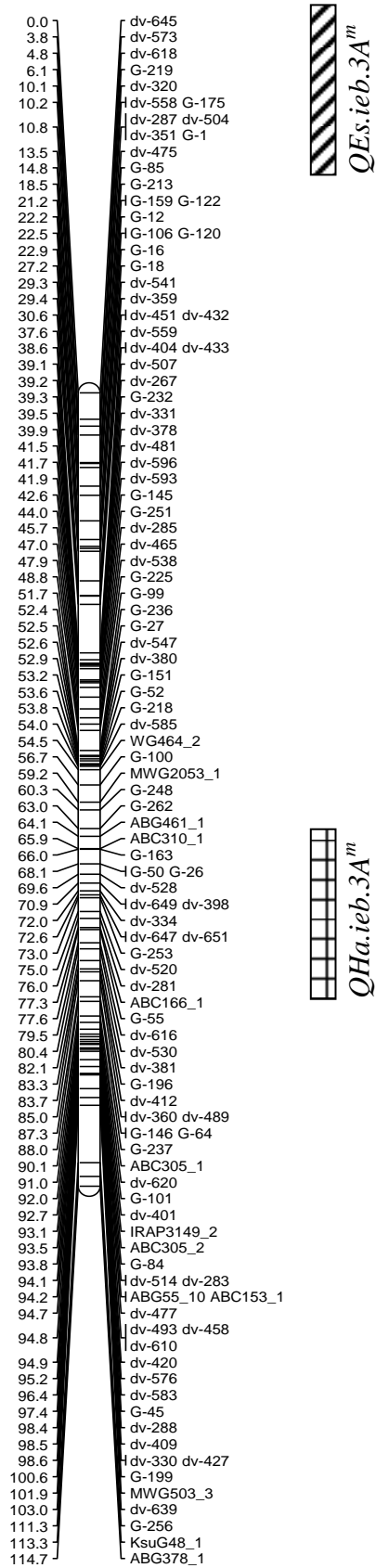
Obr. 6: Genetická mapa sedmi chromozomů *T. monococcum* L. s vyznačenými QTL lokusy

Na levé straně jsou uvedeny vzdálenosti jednotlivých markerů v cM. Na pravé straně jsou jednotlivé markery. Markery začínající písmeny G nebo dv jsou DARt markery, IRAP markery jsou označeny jako IRAP. Ostatní jsou STS markery. 14 QTL je vyznačeno na pravé straně chromozomu. Odbělník znázorňuje QTL lokus. Výška rostliny (Ph), chlupatost (Ha), ochlupení listů (Es), váha tisíce zrn (Tgw), počet obilok na klas (Gn), obsah dusíku v sušině semene (Gp), délka klasu (El).

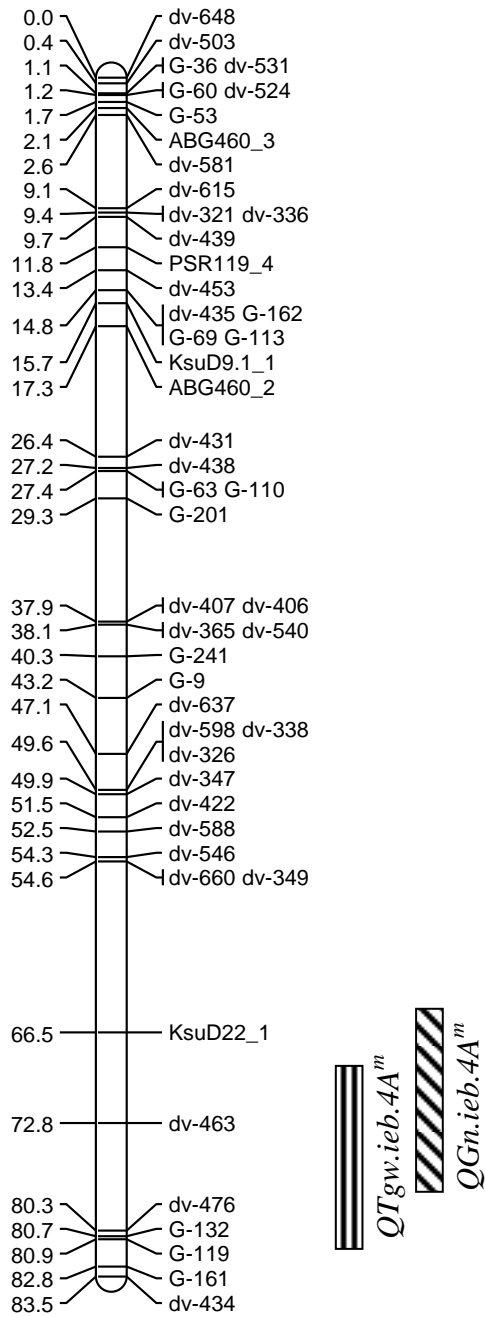
Obr. 6 (pokračování)
Chromozom 2A^m



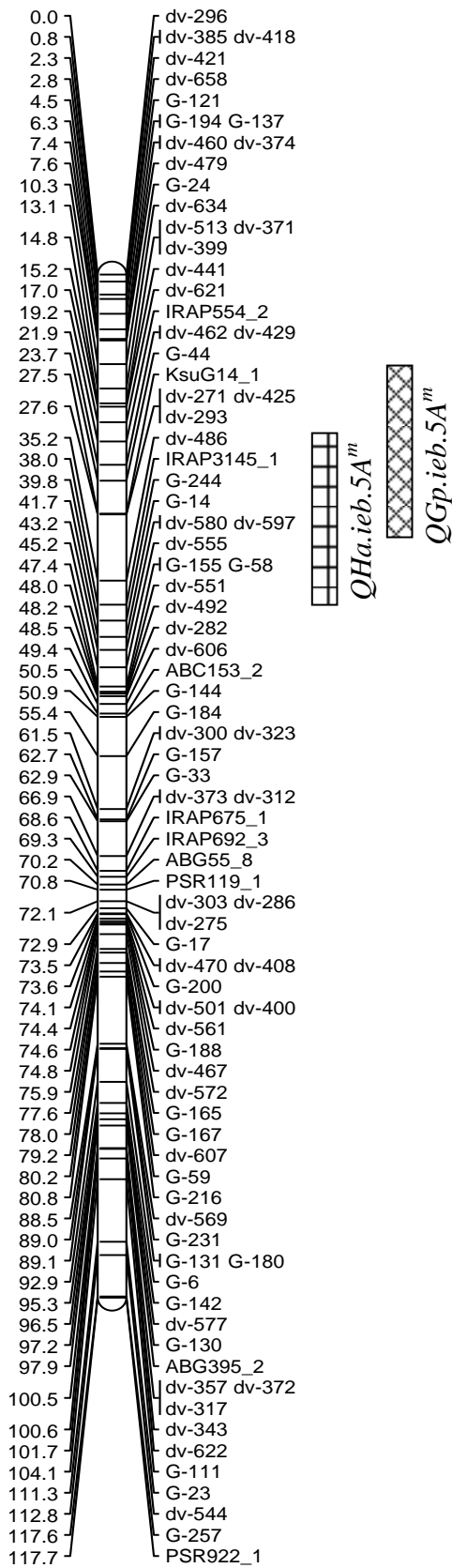
Obr. 6 (pokračování)
Chromozom 3A^m



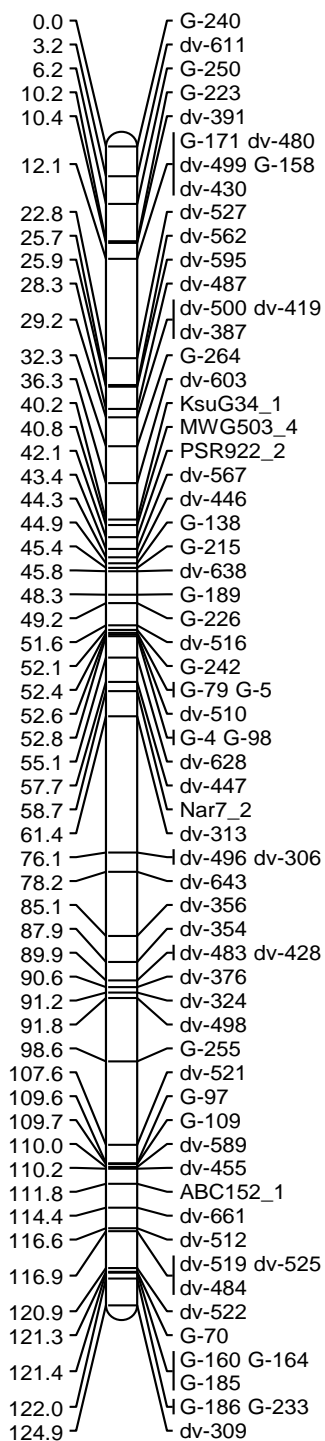
Obr. 6 (pokračování)
Chromozom 4A^m



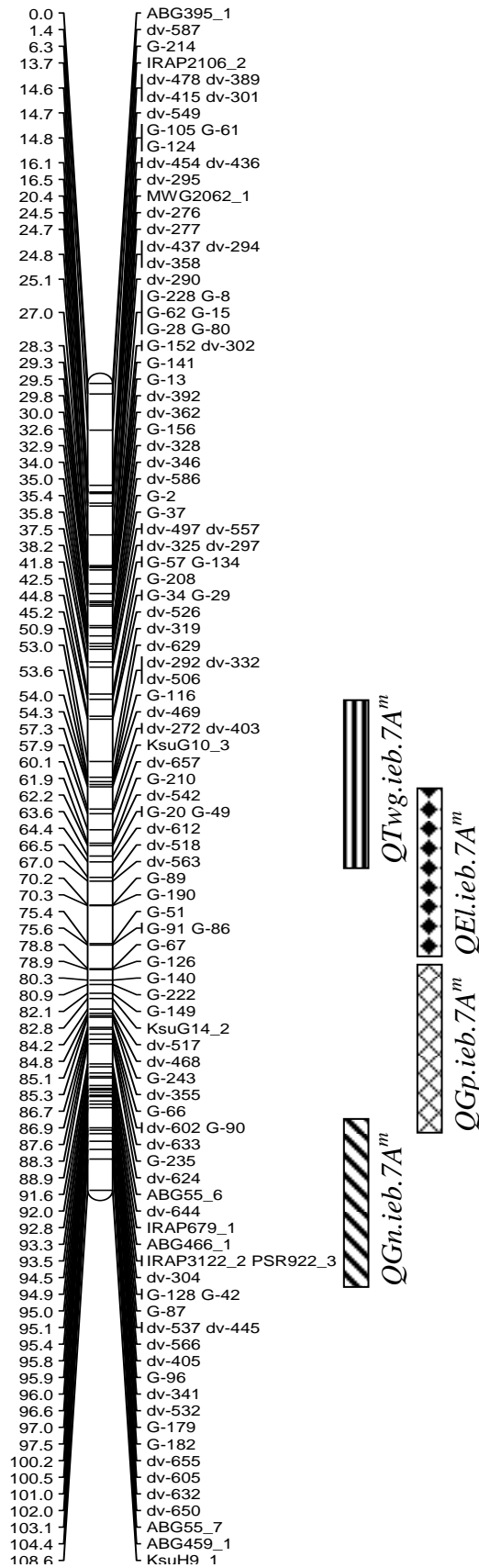
Obr. 6 (pokračování)
Chromozom 5A^m



Obr. 6 (pokračování)
Chromozom 6A^m



Obr. 6 (pokračování)
Chromozom 7A^m



4.3 QTL analýza

Ve fenotypických pokusech bylo sledováno celkem osm znaků – váha tisíce zrn, počet obilek na klas, délka klasu, výška rostliny, rozpadavost klasu, obsah dusíku v sušině semen, ochlupení listů a rozkladitost trsu. Všechna sesbíraná data ze dvou lokalit pro tyto znaky, byla podrobena QTL analýze pomocí programu R/Qtl (Broman *et al.*, 2003). U rozkladitosti trsu byla pozorována velká variabilita i v rámci jedné lokality, proto nebyl tento znak zahrnut do QTL analýzy.

Bylo identifikováno celkem 14 QTL lokusů (Tab. V). Na chromozomu 6A^m nebyl identifikováno žádné QTL lokus, naopak na chromozomu 7A^m byly nalezeny čtyři QTL lokusy. Pro váhu tisíce zrn bylo identifikováno nejvíce QTL lokusů, a to na chromozomech 2A^m, 4A^m, 7A^m a 1A^m. Pro ochlupení listů, rozpadavost klasu, počet obilek na klas a obsah dusíku v sušině semene bylo identifikováno po dvou QTL lokusech. Na chromozomu 2A^m byl nalezen QTL lokus pro výšku rostliny a také jeden QTL lokus byl nalezeno pro délku klasu a to na chromozomu 7A^m.

Všechny identifikované QTL lokusy jsou znázorněny na Obr. 6. QTL lokusy jsou pojmenovány podle používané nomenklatury.

Tab. V: QTL lokusy nalezeny u *T. monococcum* L.

Znak	QTL na <i>T. monococcum</i> L.	Publikované QTL na ostatních pšenících	Citace
Ochlupení listů	<i>QHa.ieb.5A^m</i> <i>QHa.ieb.3A^m</i>	4B, 4D	Dobrovolskaya <i>et al.</i> (2007)
Rozpadavost klasu	<i>QEs.ieb.3A^m</i> <i>QEs.ieb.1A^m</i>	Nebylo publikováno	
Výška rostliny	<i>QPh.ieb.2A^m</i>	1B, 2B, 3A, 3B, 7A 5A 1A, 2D, 4A, 6A 2B, 2D, 3B, 4B, 6A 1A, 1D, 3B, 4B, 5A, 6A, 6D, 7D	Maccaferri <i>et al.</i> (2008) Peng <i>et al.</i> (2003) Börner <i>et al.</i> (2002) Marza <i>et al.</i> (2006) Huang <i>et al.</i> (2004)
Váha tisíce zrn	<i>QTgw.ieb.2A^m</i> <i>QTgw.ieb.4A^m</i> <i>QTgw.ieb.7A^m</i> <i>QTgw.ieb.1A^m</i>	3A, 7D, 5D, 6A, 1D 1B, 2A, 4A, 5A, 5B, 6B, 7A, 7B 2B, 5B, 7A 1B, 2D, 4B, 6A, 7A, 7D 2D, 3B, 5A, 7A	Li <i>et al.</i> (2007) Peng <i>et al.</i> (2003) Groos <i>et al.</i> (2003) Huang <i>et al.</i> (2004) Cuthbert <i>et al.</i> (2008)
Počet obilek na klas	<i>QGn.ieb.7A^m</i> <i>QGn.ieb.4A^m</i>	5A, 5B, 7D, 2D, 1B, 7A	Ma <i>et al.</i> (2007)
Obsah dusíku v sušině semene	<i>QGp.ieb.7A^m</i> <i>QGp.ieb.5A^m</i>	2A, 3A, 4D, 7D 7A, 2D	Groos <i>et al.</i> (2003) Börner <i>et al.</i> (2002)
Délka klasu	<i>QEl.ieb.7A^m</i>	1B, 4A, 5A 1A, 2D, 5A, 7D 1A, 1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 7A, 7B	Börner <i>et al.</i> (2002) Ma <i>et al.</i> (2007) Marza <i>et al.</i> (2006)

5 Diskuse

Použitím 82 RILs linií mapovací populace odvozené z křížení *T. monococcum* ssp. *monococcum* DV92 × *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* G3116 a 628 markerů (579 DArT, 1 SSR, 9 IRAP a 39 STS markerů) byla získaná do této doby nejhustější genetická mapa genomu A pšenice o celkové délce 829 cM.

V porovnání s již publikovanými mapami genomu A se jedná překvapivě o nejkratší mapu. Pro srovnání např. genetická mapa pro 74 F₂ linií mapovací populace vycházející ze stejného křížení má celkovou délku 1 067 cM a 328 zamapovaných RFLP markerů (Dubcovsky *et al.*, 1996). Další mapa založená na 179 SSR a RFLP markerech a 93 RILs liniích mapovací populace z křížení *T. monococcum* × *T. boeoticum* (Singh *et al.*, 2007) má celkovou délkou 1 260 cM. Nebo mapa pro genom A hexaploidní pšenice pro mapovací populaci 96 DHLs linií měla celkovou délku 1 146 cM s 224 markery (Quarrie *et al.*, 2005). Pravděpodobným vysvětlením pro menší celkovou délku naší mapy v porovnání s ostatními mapami genomu A pšenice může být charakter DArT markerů. Protože DArT markery jsou dominantní a většina STS markerů přidanych do této mapy byla také dominantní. To znamená, že jedna čtvrtina až polovina možných rekombinací může být utajena. Zohledněním této skutečnosti by celková délka mapy byla asi 1 036 – 1 243cM, což koresponduje s délkami již zmiňovaných *T. monococcum* L. map (Dubcovsky *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2007)

V naší mapě je 4A^m chromozom nejkratší, s 49 zamapovanými markery. Ke stejnému výsledku dospěli i Dubcovsky *et al.* (1996) a Singh *et al.* (2007). Naopak chromozom 4A u hexaploidní pšenice je geneticky i fyzicky druhým nejdelším chromozomem (Quarrie *et al.*, 2005, Doležel *et al.*, 2009). Za relativně velkou délku vděčí chromozom 4A translokacím. První translokace nastala na úrovni diploidního předka, kdy došlo k translokaci 5AL chromozomu. Druhá translokace části chromozomu 7BS do chromozomu 4AL vznikla během evoluce u tetraploidního předka hexaploidní pšenice (Devos *et al.*, 2004). Malý počet zamapovaných markerů na chromozomu 4A^m může svědčit o malé sekvenční variabilitě tohoto chromozomu mezi liniemi, která je všeobecně připisována homogenizačnímu efektu rekombinací (Emrich *et al.*, 2007). Na druhou stranu může být malá genetická délka chromozomu 4A^m způsobena nízkou frekvencí rekombinací, což je v protikladu s předešlým předpokladem. Dalším vysvětlením může být malý počet markerů, které nejsou schopny

odhalit všechny rekombinační události. Jednoznačné odpovědi na tyto otázky vyžaduje další studium.

5.2 QTL pro komponenty výnosu

Dalším cílem diplomové práce bylo otestovat vhodnost konstruované genetické mapy pro QTL analýzu složek výnosu a dalších znaků. Byla provedena analýza QTL pro výnosové prvky (váha tisíce zrn, počet obilek na klas a délka klasu), tři agronomicky významné znaky (výška rostliny, rozpadavost klasu a obsah dusíku v sušině semen) a dva morfologické znaky, ve kterých se rodiče významně odlišovali (ochlupení listů a rozkladitost trsu). Tyto znaky byly sledovány jeden rok ve dvou lokalitách a ve dvou opakováních.

Bylo identifikováno celkem 14 QTL lokusů (Tab. V) v celém genomu. U hexaploidní pšenice bylo zamapováno až 64 QTL lokusů pro 11 prostředí (Börner *et al.*, 2002), což by bylo 21 QTL lokusů na jeden genom. V této studii byl QTL experiment opakován pouze jednou pro dvě lokality. Předpokládáme, že po více opakováních bude nalezeno více QTL lokusů. Nejvíce QTL lokusů bylo na chromozomu 7A^m, což by mohlo souviset s nejvíce zamapovanými markery na tomto chromozomu. Naopak na chromozomu 6A^m nebyl identifikován žádný. Pro některé znaky jsou na tomto chromozomu minoritní QTL lokusy (LOD skóre nižší než 2). Až výsledky z dalších lokalit a sezón ukážou, jestli se tyto QTL lokusy dostatečně projeví.

Nejvíce QTL lokusů, čtyři, bylo nalezeno pro váhu tisíce zrn, a to na chromozomech 2A^m, 4A^m, 7A^m a 1A^m. U hexaploidní pšenice je tento znak, také zamapován skoro na všech chromozomech genomu A, s výjimkou 1A chromozomu. QTL lokusy pro váhu tisíce zrn na chromozom 7A také identifikovali ve své práci Peng *et al.* (2003), Groos *et al.* (2003), Huang *et al.* (2004) a Cuthbert *et al.* (2008). Jen Peng *et al.* (2003) identifikovali QTL lokus pro váhu tisíce zrn také na chromozomech 2A a 4A. QTL lokus pro váhu tisíce zrn na 1A nebyl nikde identifikován, ale byly identifikovány QTL lokusy na 1B a 1D chromozomech (Peng *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007). Jestli se jedná o ortologní lokusy a nebo úplně nový lokus, vyžaduje další zkoumání.

Dva QTL lokusy byly identifikovány pro počet obilek na klas, a to na chromozomech 7A^m a 4A^m. U hexaploidní pšenice QTL pro počet obilek na klas byl zamapován zatím jen na 7A chromozomu (Ma *et al.*, 2007). Většina prací na hexaploidní pšenici se spíše zaměřuje na znak počet zrn na klas, který se skládá z počtu obilek na klas a počtu zrn na obilku. V budoucnu by mohlo být zajímavé se zaměřit na tyto znaky, protože rodiče naší mapovací populace se v těchto znacích výrazně odlišují. Rodičovská linie DV92 má jen jedno zrno na obilku, kdežto druhá rodičovská linie G3116 má většinou dvě zrna na obilku. Minoritní QTL lokus pro počet obilek na klas byl nalezen na 1A^m chromozomu. Nejspíše odpovídá lokusu *EP5A^m1*, který má pravděpodobně pleiotropní efekt, protože má vliv také na kvetení a je ovlivňován teplotou (Bullrich *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2008). V dalších sezónách se ukáže, jestli se tento lokus projeví výrazněji i v podmínkách našeho experimentu.

Pro další agronomicky významný znak, délku klasu byl identifikován jeden QTL lokus na chromozomu 7A^m. U hexaploidní pšenice byla délka klasu zamapována jak na 7A chromozomu (Marza *et al.*, 2006) tak i na chromozomu 7D (Ma *et al.*, 2007). Tyto výsledky naznačují, že pro oba tyto lokusy mapované na chromozomech 7, se pravděpodobně jedná o homologní geny. Ma *et al.* (2007) připustili, že QTL lokus na chromozomu 7D má největší vliv na délku klasu a působí jinak na délku klasu než jiné QTL lokusy které mapovaly 2D a 5A.

Pro znak rozpadavost klasu, v anglické literatuře označovaný jako „brittle rachis“, byl QTL lokus zamapován na dvou chromozomech 1A^m a 3A^m. Předpokládalo se, že tento znak je spojen s domestikacním lokusem *Q*, ale v poslední době se ukázalo, že tomu tak není. Byly identifikovány dva geny *Br1* a *Br2* jak u hexaploidní tak i tetraploidní pšenice. *Br1* byl mapován na 3AS chromozomu a *Br2* na 3DS chromozomu pšenice (Li *et Gill*, 2006). Právě gen *Br1* na 3AS chromozomu by mohl odpovídat našim zjištěním.

Pro výšku rostliny byl identifikován jen jeden QTL lokus na chromozomu 2A^m. U hexaploidní a tetraploidní pšenice byl QTL lokus pro výšku rostliny nalezen jen na chromozomech 2B a 2D (Börner *et al.*, 2002; Marza *et al.*, 2006; Maccaferri *et al.*, 2008). Pro znak obsah dusíku v sušině semene byly identifikovány dva QTL lokusy na chromozomech 7A^m a 5A^m. Pro chromozom 7A také identifikoval QTL lokus Börner *et al.* (2002). Rovněž byl tento znak mapován na chromozomu 7D (Groos *et al.*,

2003). Na chromozomu 5A specifický lokus pro obsah dusíku v sušině semene nebyl zatím u hexaploidní pšenice nalezen.

Pro poslední znak, který jsme sledovali a ve kterém se rodičovské linie výrazně lišili, ochlupení listů, byly identifikovány dva QTL lokusy na chromozomech 5A^m a 3A^m. Pro tento znak byly u hexaploidní pšenice mapovány dva QTL lokusy *Qhl.ipk-4B* a *QHl.ipk-4D* a gen *Hl2* na chromozomu 7BS (Dobrovolskaya *et al.*, 2007). QTL lokusy pro tento znak detekované u *T. monococcum* L. jsou s největší pravděpodobností nehomologní k lokusům identifikovaným u hexaploidní pšenice a pravděpodobně jsou výsledkem nezávislé domestikace *T. monococcum* L.

6 Závěr

Cílem diplomové práce bylo vytvořit genetickou mapu pro RILs mapovací populaci odvozenou z křížení *T. monococcum* ssp. *monococcum* DV92 × *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* G3116 jako základ pro QTL analýzu složek výnosu a dalších znaků.

Byla zkonstruována genetická mapa pro všech sedm chromozomu *T. monococcum* L. o celkové délce 829 cM a s 628 zamapovanými markery. Jedná se tedy o do této doby nejhustší mapu pro genom A pšenice.

Byly získány výsledky QTL analýzy pro celkem sedm znaků, tři znaky komponentů výnosu (váha tisíce zrn, počet obilek na klas a délka klasu), tři znaky významně se podílející na výnosu (výška rostliny, rozpadavost klasu a obsah dusíku v sušině semen) a jeden morfologický znak, ve kterém se rodičovské linie významně odlišovali (ochlupení listů). Tyto znaky byly sledovány jeden rok na dvou lokalitách. Bylo nalezeno celkem 14 QTL lokusů na šesti chromozomech. Bylo tedy ověřeno, že tato mapa je dostatečně kvalitní pro QTL analýzu sledovaných znaků. Mapování zmíněných agronomických znaků bude pokračovat v dalších sezónách a na dalších lokalitách aby byl omezen vliv prostředí na mapování daných znaků.

7 Použité zkratky

AFLP	- Amplified Fragment Length Polymorphism, polymorfismus amplifikovaných fragmentů
BAC	- Bacterial Artificial Chromosome, knihovna dlouhých fragmentů
BC	- Backcross populace, populace zpětných kříženců
bp	- páry bází
Br	- brittle rachis, gen podmiňující rozpadavost klasu
CAPS	- Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
CIM	- Composite Interval Mapping, složené mapování pomocí intervalu
cM	- centimorgan
DArT	- Diversity Arrays Technology
DH	- Doubled haploid lines, dihaploidní linie
El	- ear length, délka klasu
EPSA^{m1}	- Earlines <i>per se</i>
Es	- ears shuttering, rozpadavost klasu
EST	- Expressed Sequence Tag
Gn	- grain number, počet obilek na klas
Gp	- grain protein, obsah dusíku v sušině semene
Ha	- hairy leaf, ochlupení listů
IRAP	- Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism, amplifikovaný polymorfismus mezi retrotranspozóny
LOD	- Logarithm of the Odds (to the base 10), logaritmus pravděpodobnosti (o základu 10)
Lr10	- gen rezistence proti rzi listové (Leaf rust)
MIM	- Multiple Interval Mapping, vícenásobné mapování pomocí intervalu

Ph	- plant height, výška rostliny
QTL	- Quantitative Trait Loci, lokusy s kvantitativním znakem
RAPD	- Random Amplified Polymorphic DNA, náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA
RFLP	- Restriction fragment length polymorphism, délkový polymorfismus restrikčních fragmentů
RILs	- Recombinant Inbred Lines, rekombinantní inbrední linie
SCAR	- Sequence-Characterized Amplified Region, amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí
SIM	- Simple Interval Mapping, jednoduché mapování pomocí intervalu
SNP	- Single Nucleotide Polymorphism, polymorfismus v jednom nukleotidu
SSD	- Single-Seed Descent lines, jedno-semenové linie
SSR	- Simple Sequence Repeat, opakování jednoduchých sekvencí
STS	- Sequence-Tagged Sites
Tgw	- thousand grain weight, váha tisíce zrn
VRN	- geny jarovizace

8 Literatura

- ASINS, M. J. (2002): Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breeding* 121: 281 - 291
- BAREŠ, L., SEHNALOVÁ, J., VLASÁK, M., VLACH, M., KRYŠTOF, Z., AMLER, P., MALÝ, J., BERÁNEK, V. (1985): Klasifikátor genus *Triticum* L., Agrodat, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha – Ruzyně
- BÖRNER, A., SCHUMANN, E., FÜRSTE, A., CÖSTER, H., LEITHOLD, B., RÖDER, M. S., WEBER, W. E. (2002): Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105: 921 – 936
- BOTSTEIN, B., WHITE, R. L., SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314 - 331
- BROMAN, K. W., WU, H., SEN, S., CHURCHILL, G. A. (2003): R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889 – 890
- BULLRICH, L., APPENDINO, M. L., TRANQUILLI, G., LEWIS, S., DUBCOVSKY, J. (2002): Mapping of a thermo-sensitive earliness per se gene on *Triticum monococcum* chromosome 1A^m. *Theoretical and Applied Genetics* 105:585-593
- COLLARD, B. C. Y., JAHUFER, M. Z. Z., BROUWER, J. B., PANG, E. C. K. (2005): An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169 - 196
- CUTHBERT, J. L., SOMERS, D. J., BRULÉ-BABEL, A. L., BROWN, P. D., CROW, G. H. (2008): Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 117: 595 – 608
- DEVOS, K. M., DUBCOVSKY, J., DVOŘÁK, J., CHINOY, C. N., GALE, M. D. (2004): Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B and its impact on recombination. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 282-288
- DOBROVOLSKAYA, O., PSHENICHNIKOVA, T. A., ARBUZOVA, V. S., LOHWASSER, U., RÖDER, M. S., BÖRNER, A. (2007): Molecular mapping of genes determining hairy leaf character in common wheat with respect to other species of the Triticeae. *Euphytica* 155: 285 – 293
- DOLEŽEL, J., ŠIMKOVÁ, H., KUBALÁKOVÁ, M., ŠAFÁŘ, J., SUCHÁNKOVÁ, P., ČÍHALÍKOVÁ, J., BARTOŠ, J., VALÁRIK, M. (2009): Chromosome Genomics in the Triticeae. In: Feuillet, C., Muehlbauer, G. J. (eds.): *Genetics and Genomics of the Triticeae*, pp. 285 – 316, Springer, New York.

- DUBCOVSKY, J., LIJAVETZKY, D., APPENDINO, L., TRANQUILLI, G. (1998): Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 968 - 975
- DUBCOVSKY, J., LUO, M., ZHONG, G., BRANSTEITTE, R., DESAI, A., KILIAN, A., KLEINHOF, A., DVOŘÁK, J. (1996): Genetic Map of Diploid Wheat, *Triticum monococcum* L., and Its Comparison With Maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics* 143: 983 - 999
- DVOŘÁK, J., DI TERLIZZI, P., ZHANG, H., RESTA, P. (1993): The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21 – 31
- DVOŘÁK, J., MCGUIRE, P. E., CASSIDY, B. (1988): Apparent sources of the A genome of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome* 30: 680 – 689
- EMRICH, S. J., LI, L., WEN, T. J., YANDEAU-NELSON, M. D., FU, Y., GUO, L., CHOU, H. H., ALURU, S., ASHLOCK, D. A., P. S. SCHNABLE (2007): Nearly Identical Paralogs: Implications for Maize (*Zea mays* L.) Genome Evolution *Genetics*, 175: 429-439
- FARIS, J. D., FELLERS, J. P., BROOKS, S. A., GILL, B. S. (2003): A Bacterial Artificial Chromosome Contig Spanning the Major Domestication Locus *Q* in Wheat and Identification of a Candidate Gene. *Genetics* 164: 311 - 321
- FEUILLET, C., TRAVELLA, S., STEIN, N., ALBAR, L., NUBLAT, A., KELLER, B. (2003): Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *PNAS* 100 (25): 15253 - 15258
- GELDERMAN, H. (1975): Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theoretical and Applied Genetics* 46: 319 - 330
- GONZÁLEZ, J. M., BERNARD, S., BERNARD, M. (1993): Metaphase-I analysis of a *Triticum aestivum* × *T.monococcum* hybrid by the C-banding technique. *Euphytica* 68: 187 - 192
- GROOS, C., ROBERT, N., BERVAS, E., CHARMET, G.(2003): Genetic analysis of grain protein-content, grain yield and thousand-kernel weight in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1032 - 1040
- HE, X. Y., HE, Z. H., MORRIS, C. F., XIA, X. C. (2009): Cloning and phylogenetic analysis of polyphenol oxidase genes in common wheat and related species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 311 - 321
- HOPF, MARIA; ZOHARY, DANIEL (2000). Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley (3rd ed.). Oxford University Press, Oxford

- HUANG, L., BROOKS, S. A., LI, W. L., FELLERS, J. P., TRICK, H. N., GILL, B. S. (2003): Map-based cloning of leaf rust resistance gene Lr21 from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics* 164: 655 - 664
- HUANG, X. Q., KEMPF, H., GANAL, M. W., RÖDER, M. S. (2004): Advanced backcross QTL analysis in progenies derived from a cross between a German elite winter wheat variety and a synthetic wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theoretical and Applied Genetics* 109: 933 – 943
- JACCOUD, D., PENG, K., FEINSTEIN, D., KILIAN, A. (2001): Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids research* 29 (4): E25
- JANSEN, R. C., STAM, P. (1994): High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics*, 136: 1447 - 1455
- KALENDAR, R., GROB, T., REGINA, M., SUONIEMI, A., SCHULMAN, A. (1999): IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 704 - 711
- KEARSEY, M. J. (1998): The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany* 49(327): 1619 - 1623
- KIRIGWI, F. M., VAN GINKEL, M., BROWN-GUEDIRA, G., GILL, B. S., PAULSEN, G. M., FRITZ, A. K. (2007): Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. *Molecular Breeding* 20: 401 – 413
- KOSAMBI, D. D. (1943): The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics.* 12: 172 – 175
- KOSOVÁ, K., PRÁŠIL, I. T., VÍTÁMVÁS, P. (2008): The relationship between vernalization- and photoperiodically-regulated genes and the development of frost tolerance in wheat and barley. *Biologia Plantarum* 52 (4): 601 - 615
- KUCHEL, H., WILLIAMS, K. J., LANGRIDGE, P., EAGLES, H. A., JEFFERIES, S. P. (2007a): Genetic dissection of grain yield in bread wheat. I. QTL analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 1029 - 1041
- KUCHEL, H., WILLIAMS, K., LANGRIDGE, P., EAGLES, H. A., JEFFERIES, S. P. (2007b): Genetic dissection of grain yield in bread wheat. II. QTL-by-environment interaction. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 1015 - 1027
- KUMAR, N., KULWAL, P. L., GAUR, A., TYAGI, A. K., KHURANA, J. P., KHURANA, P., BALYAN, H. S., GUPTA, P. K. (2006): QTL analysis for grain weight in common wheat. *Euphytica* 151: 135 - 144
- KURAPARTHY, V., SOOD, S., GILL, B. S. (2008): Genomic targeting and mapping of tiller inhibition gene (*tin3*) of wheat using ESTs and synteny with rice. *Functional & Integrative Genomics* 8: 33 - 42

- LANDER, E. S., BOTSTEIN, B. (1989): Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185 - 199
- LEV-YADUN, S., GOPHER, A., ABBO, S. (2000): The Cradle of Agriculture. *Science* 288 (5471): 1602 – 1603
- LEWIS, S., FARICELLI, M. E., APPENDINO, M. L., VALÁRIK, M., DUBCOVSKY, J. (2008): 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* 59(13):3595 – 3607
- LI, S., JIA, J., WEI, X., ZHANG, X., LI, L., CHEN, H., FAN, Y., SUN, H., ZHAO, X., LEI, T., XU, Y., JIANG, F., WANG, H., LI, L. (2007): A intervarietal genetic map and QTL analysis for yield trans in wheat. *Molecular Breeding* 20: 167 – 178
- LI, W., GILL, B. S. (2006): Multiple genetic pathways for seed shattering in the grasses. *Integrated Genomics* 6: 300 - 309
- Litt, M., Luty, J. A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44: 397 - 401
- MA, Z., ZHAO, D., ZHANG, C., ZHANG, Z., XUE, S., LIN, F., KONG, Z., TIAN, D., LUO, Q. (2007): Molecular genetic analysis of five spike-related traits in wheat using RIL and immortalized F₂ populations. *Molecular Genetics Genomics* 277: 31 - 42
- MACCAFERRI, M., SANGUINETI, M. C., CORNETI, S., ORTEGA, J. L. A., SALEM, M. B., BORT, J., DEAMBROGIO, E., DEL MORAL, L. F. G., DEMONTIS, A., EL-AHMED, A., MAALOUF, F., MACHLAB, H., MARTOS, V., MORAGUES, M., MOTAWAJ, J., NACHIT, M., NSERALLAH, N., OUABBOU, H., ROYO, C., SLAMA, A., TUBEROSA, R. (2008): Quantitative Trait Loci for Grain Yield and Adaptation of Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Across a Wide Range of Water Availability. *Genetics* 178: 489 - 511
- MACKAY, T. F. C., STONE, E. A., AYROLES, J. F. (2009): The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nature Reviews, Genetics* 10: 565 - 577
- MARZA, F., BAI, G. H., CARVER, B. F., ZHOU, W. C. (2006): Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning7840 × Clark. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 688 - 698
- NELSON, J. C. (2005): Methods and Software for Genetic Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G., (ed): *The Handbook of Plant Genome Mapping*, pp. 53 – 74, WILEY – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- NGUYEN, H. T., WU, X. (2005): Molecular Marker Systems for Genetic Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G., (ed): *The Handbook of Plant Genome Mapping*, pp. 23 - 52, WILEY – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- PALAZZOLO, M. J., SAWYER, S. A., MARTIN, CH. H., SMOLLER, D. A., HARTL, D. L. (1991): Optimized strategies for sequence-tagged-site selection in genome mapping. *PNAS* 88: 8034 - 8038
- PENG, J., RONIN, Y., FAHIMA, T., RÖDER, M. S., LI, Y., NEVO, E., KOROL, A. (2003): Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat. *PNAS* 100: 2489 - 2494
- PRICE, A. H. (2006): Believe it or not, QTLs are accurate! *Trends in Plant Science* 11: 213 - 216
- QUARRIE, S. A., STEED, A., CALESTANI, C., SEMIKHODSKII, A., LEBRETON, C., CHINOY, C., STEELE, N., PLJEVLJAKUSIC, D., WATERMAN, E., WEYEN, J., SCHONDELMAIER, J., HABASH, D. Z., FARMER, P., SAKER, L., CLARKSON, D. T., ABUGALIEVA, A., YESSIMBEKOVA, M., TURUSPEKOV, Y., ABUGALIEVA, S., TUBEROSA, R., SANGUINETI, M. C., HOLLINGTON, P. A., ARAGUÉS, R., ROYO, A., DODIG, D. (2005): A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring × SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 865 - 880
- QUARRIE, S. A., QUARRIE, P. S., RADOSEVIC, R., RANCIC, D., KAMINSKA, A., BARNES, J. D., LEVERINGTON, M., CEOLONI, C., DODING, D. (2006): Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of environments: from the QTL to candidate genes. *Journal of Experimental Botany* 57 (11): 2627 – 2637
- SAX, K. (1922): Sterility in wheat hybrids. II. Chromosome behavior in partially sterile hybrids. *Genetics* 7: 513 – 552
- SAX, K. (1923): The association of size difference with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8: 552 – 560
- SCHNEIDER, K. (2005): Mapping Populations and Principles of Genetic Mapping. In: Meksem, K., Kahl, G., (ed): *The Handbook of Plant Genome Mapping*, pp. 3 - 22, WILEY – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- SINGH, K., GHAI, M., GARG, M., CHHUNEJA, P., KAUR, P., SCHNURBUSCH, T., KELLER, B., DHALIWAL, H. S. (2007): An integrated molecular linkage map of diploid wheat based on a *Triticum boeoticum* × *T. monococcum* RIL population. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 301 - 312
- SOLLER, M., BRODY, T., GENIZI, A. (1979): The expected distribution of markerlinked quantitative effects in crosses between inbred lines. *Heredity*, 43: 179 – 190
- UAUY, C., DISTELFELD, A., FAHIMA, T., BLECHL, A., DUBCOVSKY, J. (2006): A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* 314: 1298 - 1301
- VAN OOIJEN, J. W. (2006) JoinMap ® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands

- YAHIAOUI, N., SRICHUMPA, P., DUDLER, R., KELLER, B. (2004): Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *The Plant Journal* 37: 528 - 538
- YAN, L., FU, D., LI, C., BLENCHL, A., TRANQUILLI, G., BONAFEDE, M., SANCHEZ, A., VALARIK, M., YASUDA, S., DUBCOVSKY, J. (2006): The wheat and barley vernalization gene VRN-3 is an orthologue of FT. *PNAS* 103: 19581 - 19586
- YAN, L., LOUKOIANOV, A., TRANQUILLI, G., BLECHL, A., KHAN, I. A., RAMAKRISHNA, W., SAN MIGUEL, P., BENNETZEN, J. L., ECHNIQUE, V., LJAVETZKY, D., DUBCOVSKY, J. (2004): The wheat VRN-2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* 303: 1640 - 1644
- YAN, L., LOUKOIANOV, A., TRANQUILLI, G., HELGUERA, M., FAHIMA, T., DUBCOVSKY, J. (2003): Positional cloning of wheat vernalization gene VRN-1. *PNAS* 100: 6263 - 6268
- YAN, L. (2009): The Flowering Pathway in Whea. In: Carver B. F. (ed): *Wheat Science and Trade*, pp. 57 – 72, Willey - Blackwell