

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2011

Bc. Lucia Gallová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Mapovanie agronomicky dôležitých génov u
pšenice**

Diplomová práca

Bc. Lucia Gallová

Študijný program: Biologie

Študijný odbor: Molekulární a buněčná biologie

Forma štúdia: Prezenční

Olomouc 2011

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

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne v priebehu magisterského štúdia pod vedením Mgr. Miroslava Valárika, Ph.D. s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci, 2.8.2011

Bc. Lucia Gallová

Súhrn

Pšenica siata (*Triticum aestivum* L.) je jednou z najdôležitejších plodín na svete, preto je predmetom mnohých cytogenetických, genetických a šľachtiteľských štúdií. Jej allohexaploidný genóm ($2n = 6x = 42$, AABBDD) síce poskytuje veľkú mieru flexibility so schopnosťou prispôsobovať sa širokému rozsahu podmienok, no schopnosť homoeológnych chromozómov sa vzájomne kompenzovať komplikuje štúdium dedičnosti znakov a šľachtenia. Jednou z možností zníženia komplexity pšeničného genómu, v dôsledku relatívne dobre zachovanej synténie poradia génov, je využiť ako model príbuzný diploidný druh.

Pšenica jednozrnová (*Triticum monococcum* L.), blízky diploidný príbuzný donora A genómu kultivovaných pšeníc, je ideálnym modelom pre genetické mapovanie a klonovanie. Vzhľadom k tomu, že jej domestikácia prebiehala nezávisle od hexaploidnej pšenice, si pšenica jednozrnová zachovala genetickú diverzitu, ktorá môže byť v súčasnosti použitá na obohatenie genómu pšenice siatej.

Predložená práca sa skladá z teoretickej a praktickej časti. Prvá polovica teoretickej časti je zameraná na obilniny, najmä na pšenicu jednozrnovú, ako objekt môjho štúdia. V druhej polovici je predstretá podstata mapovania genómu s prehľadom a využitím molekulárnych markrov. Cieľom praktickej časti práce bolo zamapovaním ďalších DNA markov zahustiť existujúcu väzbovú mapu *T. monococcum* L. a na dopestovanej RIL mapovacej populácii *T. monococcum* L. generácie F_{10} previesť kontrolný genotyping a následne fenotypovanie vybratých agronomicky a morfologicky dôležitých znakov. Zozbierané a spracované dáta z roku 2010 boli použité na zamapovanie a následné overenie polohy lokusov detekovaných na základe fenotypovaných údajov z predchádzajúcej sezóny 2009. Údaje z oboch sezón potvrdili pozíciu dvoch lokusov, pre priemernú hmotnosť zrna na chromozóme $2A^m$ a pre chlpatosť listov na chromozóme $3A^m$. Taktiež bol rozšírený počet fenotypovaných znakov a identifikovaných lokusov na mape *T. monococcum* L. o hustotu klasu ($2A^m$) a počet odnoží u rastliny ($1A^m$, $4A^m$, $6A^m$), čím bolo celkovo zamapovaných 15 QTLs.

Summary

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important crops in the world, therefore it is a subject of many cytogenetic, genetic and breeding studies. Although its allohexaploid genome ($2n = 6x = 42$, AABBDD) provides enormous flexibility with ability to adapt to a wide range of conditions, competence of homoeologous chromosomes to compensate (make up) for each other complicates studying the heritability and breeding traits. One way of decreasing the complexity of wheat genome is the use of related diploid species as a model due to its relatively well-conserved synteny in sequence.

Einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.) is a close diploid relative to a donor of A genome for cultivated wheats. This wheat is an ideal model for genetic mapping and cloning. The domestication of einkorn wheat was independent from hexaploid wheat. In this matter the einkorn wheat could be used for enrichment of hexaploid genome due to its genetic diversity.

This thesis consists of theoretical and practical part. The first half of the theoretical section is focused on crops, mainly einkorn wheat that was the object of my study. Second part of the theoretical section includes the basis of genome mapping, an overview of molecular markers and their utilization. The aim of the practical part was to saturate existing linkage map of *T. monococcum* L. through mapping of additional DNA markers, and perform phenotyping of selected agronomic and morphological traits on the *T. monococcum* L. RIL mapping population. Collected and processed phenotypic data of 2010 season were used for mapping and validation of loci detection from phenotyped data of previous season 2009. Data from both seasons confirmed location of two loci, the thousand grain weight on chromosome $2A^m$ and the hairy leaf on chromosome $3A^m$. Also, number of phenotyped traits and identified loci was expanded to the spike density ($2A^m$) and the tiller number ($1A^m$, $4A^m$, $6A^m$) on the map *T. monococcum* L. Overall 15 QTLs were mapped.

Rada by som poďakovala Mgr. Miroslavovi Valárikovi, Ph.D. za jeho čas, trpezlivosť a odborné rady, ktoré mi poskytol pri spracovaní mojej diplomovej práce. Ďalej by som chcela poďakovať Ing. Tiborovi Sedláčkovi, za štatistické analýzy zo zozbieraných dát a kolektívu pracovníkov a študentom z ÚEB v Olomouci, najmä Mgr. Barbore Klocovej, za pomoc pri príprave poľného experimentu a fenotypizácií rastlín. Taktiež ďakujem Centru regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i. (projekt č.: CZ.1.05/2.1.00/01.0007) za poskytnutie podmienok k prevedeniu diplomovej práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. LITERÁRNY PREHĽAD	10
2.1 Obilniny	10
2.2 Pšenica (<i>Triticum</i> L.)	11
2.3 Pšenica jednozrnová (<i>Triticum monococcum</i> L.)	16
2.4 Mapovanie genómu, väzbová mapa	17
2.5 Mapovacie populácie pre väzbové mapovanie	18
2.6 Genetické markry	20
2.6.1 DArT markry (Diversity arrays technology)	21
2.6.2 SNP markry (Single Nucleotide Polymorphisms)	24
2.6.3 SSR markry (Simple Sequence Repeats)	25
2.6.4 CAPS markry (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)	25
2.6.5 STS markry (Sequence-Tagged Site)	26
2.6.6 IRAP markry (Inter-Retrotranspozon Amplified Polymorphism)	27
2.7 Využitie molekulárnych markrov	28
2.8 Lokusy ovplyvňujúce kvantitatívne znaky (Quantitative Trait Loci, QTLs)	29
2.9 Výnos pšenice	30
2.10 Ochlpenie listov pšenice (pubescence, hairy leaf)	31
3. CIELE PRÁCE	33
4. MATERIÁL A METODIKA	34
4.1 Biologický materiál	34
4.2 Chemikálie a roztoky	34
4.3 Prístrojové vybavenie	36
4.4 Metodika	36
4.4.1 Založenie poľného pokusu	36
4.4.2 Vysokovýkonná extrakcia DNA	37
4.4.3 Agarózová gélová elektroforéza a vizualizácia DNA	37
4.4.4 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	38
4.4.5 Nedenaturujúca polyakrylamidová gélová elektroforéza	38
4.4.6 Doplnenie genetickej mapy	39
4.4.7 Fenotypovanie	40
4.4.8 Analýza QTLs	44

4.4.9	Použité programy.....	44
5.	VÝSLEDKY.....	45
5.1	Analýza QTL.....	45
5.2	Molekulárne markry pre zahustenie <i>T. monococcum</i> L. mapy.....	56
5.3	Genetická väzbová mapa.....	57
6.	DISKUSIA.....	63
7.	ZÁVER.....	70
8.	LITERATÚRA.....	71
9.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV.....	81

1. ÚVOD

Pšenica patrí medzi významné poľnohospodárske plodiny. Vďaka vysokej výživovej hodnote, nenáročným podmienkam na pestovanie, jednoduchej skladovateľnosti a dlhej trvanlivosti zŕn, sa stala najrozšírenejšou obilninou na svete. Používa sa na kŕmenie zvierat, ako potravina z ktorej sa vyrába chlieb, pečivo, sušienky, cestoviny a v priemysle našla využitie napríklad pri výrobe liehu, škrobu, piva.

S rastúcou spotrebou tejto obilniny je potrebné buď zvýšiť rozlohu pestovania alebo jej výnos. Vzhľadom k obmedzenému množstvu osevných plôch, zvyšujúcemu sa zaťažaniu planéty a prítomnosti biotických i abiotických stresov, je jediným možným riešením znásobenie výnosu pšenice pomocou šľachtenia.

Pšenica siata (*Triticum aestivum*) je allohexaploidný druh s tromi homoeológnymi genómami (AABBDD). Veľkosť genómu (17 Gb) a jeho zloženie na jednej strane poskytujú schopnosť prispôbovať sa širokému rozpätiu podmienok, avšak komplexita genómu je hlavnou prekážkou jeho detailného štúdia. Preto sa pri šľachtení pšenice využívajú príbuzné diploidné druhy pšeníc s menším genómom, u ktorých je relatívne dobre zachovaná synténia poradia génov. Diploidná pšenica jednozrnová (*Triticum monococcum* L.) sa vďaka dostupnosti kultivovaných a divokých foriem, a s tým spojenou veľkou mierou diverzity, stala ideálnym modelom pre genetické mapovanie a klonovanie dôležitých génov.

2. LITERÁRNY PREHĽAD

2.1 Obilniny

Počiatok poľnohospodárstva sa datuje do obdobia pred vyše 10 000 rokmi, kedy sa jednou z hlavných zložiek potravy stali práve obilniny. Vďaka ich nutričnej hodnote, relatívne vysokým výnosom, bezproblémovému uskladňovaniu a preprave, bol zahájený proces domestikácie (Hopf *et* Zohary, 2000). Najstarší farmári sveta tak prispeli k rozšíreniu rozsiahlej botanickej skupiny *Triticeae* (Tabuľka č.1).

Tabuľka č.1: Zaradenie tribusu *Triticeae* do taxonomického systému a jeho vybraní zástupcovia (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi, Červenka *et al.*, 1978)

Taxonomické kategórie	
Ríša	Rastliny (<i>Plantae</i>)
Oddelenie	Krytosemenné rastliny (<i>Magnoliophyta</i>)
Trieda	Jednoklíčnolistové (<i>Liliopsida</i>)
Rad	Lipnicotvaré (<i>Poales</i>)
Čeľad'	Lipnicovité = trávy (<i>Poaceae</i> = <i>Gramineae</i>)
Tribus	<i>Triticeae</i>
Rod	jačmeň (<i>Hordeum</i> L.) kukurica (<i>Zea</i> L.) ovos (<i>Avena</i> L.) pšenica (<i>Triticum</i> L.) raž (<i>Secale</i> L.) ryža (<i>Oryza</i> L.) tritikale (<i>Triticosecale</i> Wittmack)

Tribus *Triticeae* je rôznorodou skupinou rastlín. Medzi najznámejších zástupcov patrí ryža, pšenica, kukurica, jačmeň, raž či ovos. Tieto plodiny sú zdrojom potravinovej produkcie pre väčšinu ľudskej populácie. Ich zrná obsahujú škrob, lepok, lipidy, proteíny a ďalšie nutričné látky s vysokou výživovou hodnotou. Sú dôležitým zdrojom potravy pre ľudí i zvieratá (Hopf *et* Zohary, 2000, Ware *et* Stein, 2003).

V súčasnosti sa zástupcovia spomínaného tribusu podieľajú vyše tretinovým podielom na svetovej produkcii obilnín (Feuillet *et al.*, 2007). V európskej spotrebe majú však najväčšie zastúpenie práve plodiny rodu *Triticum* L. Najvýznamnejším zástupcom je pšenica siata (*Triticum aestivum* L.), využívaná najmä pri výrobe chleba a sušienok, pšenica tvrdá (*Triticum durum* Desf.), vďaka nízkemu podielu lepku ideálna na výrobu cestovín a pšenice špaldová (*Triticum spelta* L.), používaná pre vysoký obsah proteínov a vlákniny v racionálnej a špeciálnej výžive.

Vzhľadom na poľnohospodársku dôležitosť rodu *Triticum* L., došlo v priebehu posledných 100 rokov k zintenzívneniu šľachtenia rastlín najmä v oblasti výnosu a kvality. Intenzívne šľachtenie je však spojené s redukciou genetickej diverzity v rámci genetických zdrojov rastlín. Vnášanie nových génov z geneticky vzdialených zdrojov má obyčajne za následok nežiaduci genetický drift. Pre intenzívne šľachtenie, s efektívnym využitím génového potenciálu obilnín a príbuzných druhov, je nevyhnutné detailne poznať štruktúru genómu obilnín. Šľachtitelia tak budú môcť použitím vhodných alel, génov alebo génových komplexov jednoduchšie vyvíjať odrody s vyšším výnosom a s lepšou schopnosťou prispôbiť sa zmenám prostredia (Keller *et* Feuillet, 2000, Ware *et* Stein, 2003, Feuillet *et al.*, 2007).

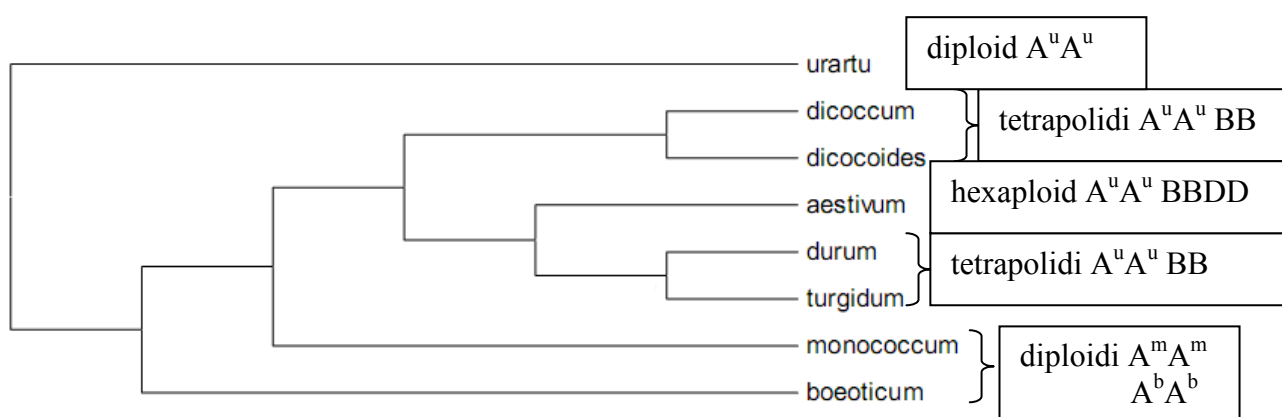
2.2 Pšenica (*Triticum* L.)

Pojem „pšenica“ je používaný na popísanie viacerých príbuzných obilnín. Diverzita medzi jednotlivými druhmi pšenice sa prejavuje nielen v stupni ploidity, ale aj v schopnosti prispôbiť sa rôznym typom pôd a klimatickým podmienkam. Tieto výhodné vlastnosti boli vytvorené vďaka anatómii rastlín, mechanizmu ich reprodukcie a genetickej variabilite (Keller *et* Feuillet, 2000, Feuillet *et al.*, 2007).

Rastlinný rod *Triticum* L. je zastúpený diploidnými, tetraploidnými aj hexaploidnými jedincami (Tabuľka č.2). Štúdium fylogenetickú príbuznosti pšenice medzi diploidnými a polyploidnými druhmi bolo zamerané na identifikáciu donorov čiastkových genómov a výskum ich druhovej špecifity (Golovnina *et al.*, 2009).

Každý druh z rodu *Triticum* L. môže byť, vo vzťahu ku kultivovaným druhom, začlenený do určitej skupiny. V závislosti od miery genetickej príbuznosti, sú genetické zdroje delené do 3 skupín: primárny, sekundárny a terciárny genetický zdroj (Feuillet *et al.*, 2007).

Bolo zistené, že primárnym genetickým zdrojom sú druhy divoké a skoršie domestikované, ktoré sú schopné hybridizovať priamo s kultivovanými typmi. Ich chromozómy sú homológne ku kultivovaným typom a obecné majú možnosť zúčastňovať sa homológnej rekombinácie. Tá môže byť využitá pri šľachtení a selekcii. Preto je primárny genetický zdroj najčastejšie využívaný na zlepšovanie vlastností plodín. K tomuto typu genetického zdroja sú priradené polyploidné druhy (napríklad *T. turgidum* L.) a diploidné donory A a D genómu (Feuillet *et al.*, 2007). Analýzy Brandoliniho *et al.* (2006) a Golovninu *et al.* (2009) potvrdili záver, že diploidné druhy *Triticum urartu* Tumanian ex Gandilyan boli darcom A genómu všetkým polyploidným druhom pšenice (Obrázok č.1).



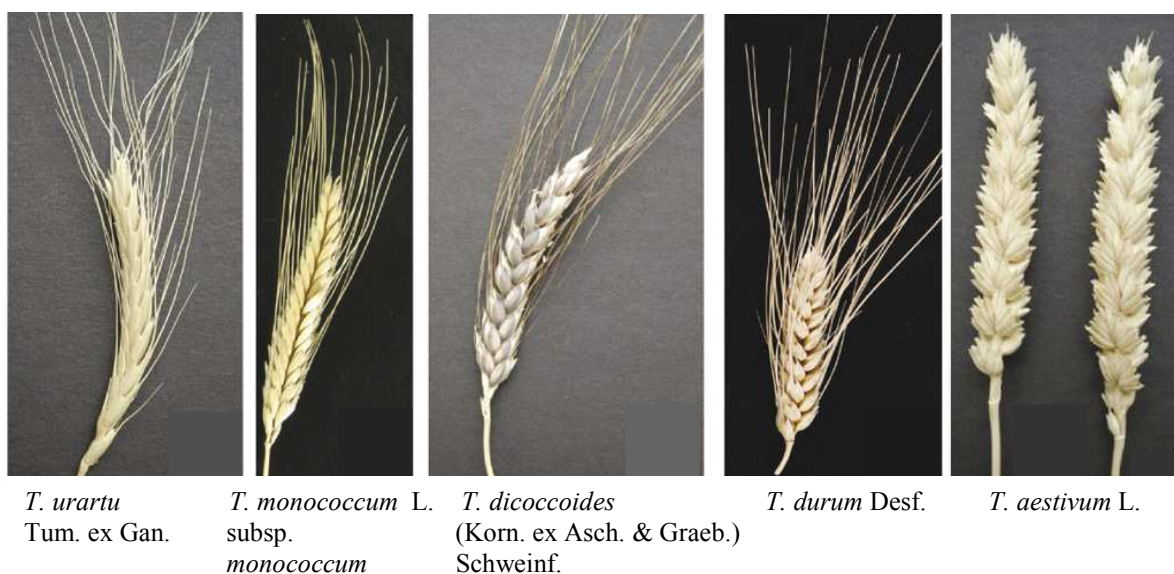
Obrázok č.1: Dendrogram založený na genetickej vzdialenosti ukazujúci príbuznosť medzi A genómami 8 druhov rodu *Triticum* (upravené podľa Ehtemam *et al.*, 2010)

Za sekundárny genetický zdroj sú považované pšenice, zdieľajúce najmenej jeden homológný genóm s kultivovanými typmi. Génový transfer z týchto druhov je možný prostredníctvom homológnej rekombinácie len vtedy, ak je cieľový gén lokalizovaný na homológnom genóme (Feuillet *et al.*, 2007).

Terciárny genetický zdroj je reprezentovaný vzdialene príbuznými diploidmi a polyploidmi, medzi ktorými nedochádza ku homológnej rekombinácii (Feuillet *et al.*, 2007).

Širokú variabilitu v ploidii a v zložení genómu jednotlivých zástupcov rodu *Triticum* L. je možné zreteľne pozorovať práve na klasoch (Obrázok č.2). Výskyt osín, počet kvetov v klásku, množstvo kláskov na klase, krehkosť klasového vretena, prítomnosť ochranných obalov u zrna a ďalšie charakteristiky vypovedajú o vlastnostiach a pôvode rastlín. Pre primitívnejšiu formu pšeníc (diploidná einkorn, tetraploidný emmer, hexaploidná spelta) je typická prítomnosť lámavého klasového vretena a zrno s plevou. Po vymlátení sa klas rozbije na jednotlivé klásky, ktoré musia byť ďalej spracované, aby došlo k uvoľneniu zrn od pliev. U vyspelejších kultivovaných pšeníc (tetraploidné typy *T. durum* Desf.

a hexaploidná pšenica) po vymlátení zostane klasové vreteno väčšinou vcelku, plevy sú z neho ľahko oddeliteľné a vypadnú holé zrná (Padulosi *et al.*, 1996, Hopf *et Zohary*, 2000).



Obrázok č.2: Vizuálne porovnanie klasov vybraných druhov rodu *Triticum* L. (upravené podľa: Feuillet *et al.*, 2007)

Aby sa zvýšil výnos a kvalita zŕn, je nevyhnutné získať schopnosť odolávať abiotickým aj biotickým stresom. Divo žijúce druhy rastlín majú často vysokú prispôsobivosť k zmenám vonkajších podmienok (odolnosť voči zime, rezistencia k suchu, tolerancia k zasoleniu či k nutričnému deficitu). Takéto vlastnosti by mohli byť využité v pestovateľskej praxi. Zmenou genotypu by sa zlepšila možnosť prispôbiť sa, a tým by sa zvýšila ich genetická diverzita (De Pace *et al.*, 2001).

Prítomnosť troch homoeológnych genómov u hexaploidnej pšenice, s celkovým rozsahom približne 17 Gb, poskytuje veľkú mieru flexibility genómu so schopnosťou prispôbovať sa širokému rozsahu podmienok. Vďaka tomu je pestovanie pšenice rozšírené takmer od rovníku až po polárny kruh. Na druhej strane, veľkosť a komplexita pšeničného genómu sú hlavnými obmedzeniami detailného štúdia pšeničného genómu a jeho využitia pri šľachtení pšenice. Jednou z možností zníženia komplexity pšeničného genómu, v dôsledku relatívne dobre zachovanej kolinearite poradia génov, je využitie príbuzného diploidného druhu ako modelu (Jing *et al.*, 2007, Kilian *et al.*, 2009). Takto boli vďaka *T. monococcum* L. klonované napríklad gény *Vrn1* a *Vrn2*, ktoré u hexaploidnej pšenice z dôvodu funkčnosti alelu génu zo všetkých troch homológnych genómov, nie možné ani zamapovať (Yan *et al.*, 2003, 2004).

Tabuľka č.2: Stručný prehľad vybraných divokých a domestikovaných zástupcov druhu *Triticum* L., počet chromozómov a stupeň ploidie.

Podľa Mangelsdorf, 1966, Dvořák *et al.*, 1990, 1993, Padulosi *et al.*, 1996, Heun *et al.*, 1997, Brandolini *et al.*, 2006, Feuillet *et al.*, 2007, Barkworth *et Bothmer*, 2009, Kilian *et al.*, 2009, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/splist.pl?12442>.

Počet chromozómov	Divoký predok	Domestikovaná forma
	Taxonomický názov <u>Obecný názov</u> Genóm	Taxonomický názov <u>Obecný názov</u> Genóm
2n = 2x = 14 diploid	<i>T. boeoticum</i> Boiss. = <i>T. monococcum</i> subsp. <i>aegilopoides</i> (Link) Thell. A^bA^b	<i>T. monococcum</i> L. = <i>T. monococcum</i> L. subsp. <i>monococcum</i> <u>pšenica jednozrnová, einkorn wheat</u> A^mA^m
	<i>T. urartu</i> Tumanian ex Gandilyan = <i>Crithodium urartu</i> (Tumanian ex Gandilyan) Á. Löve A^uA^u	-
	<i>Aegilops speltoides</i> var. <i>speltoides</i> = <i>T. speltoides</i> (Tausch) Gren. ex K. Richt. BB	-
	<i>Aegilops tauschii</i> Coss. = <i>T. tauschii</i> (Coss.) Schmalh. DD	-

Tabuľka č.2 (pokračovanie)

Počet chromozómov Stupeň ploidie	Divoký predok	Domestikovaná forma	
	Taxonomický názov <u>Obecný názov</u> Genóm	Taxonomický názov <u>Obecný názov</u> Genóm	
2n = 4x = 28 tetraploid	<p><i>T. dicoccoides</i> (Korn. ex Asch.& Graebner) Schweinf. = <i>T. turgidum</i> L. subsp. <i>dicoccoides</i> (Korn. ex Asch. & Graebner) Thell.</p> <p><u>wild emmer wheat</u></p> <p>A^uA^uBB</p>	<p><i>T. dicoccum</i> Schrank ex Schübler = <i>T. turgidum</i> L. subsp. <i>dicoccum</i> (Schrank ex Schübl.) Thell.</p> <p><u>emmer wheat</u></p> <p>A^uA^uBB</p>	<p><i>T. durum</i> Desf. = <i>T. turgidum</i> subsp. <i>durum</i> (Desf.) Husn. <u>pšenica tvrdá, macaroni (hard) wheat</u></p> <p>A^uA^uBB</p>
			<p><i>T. turgidum</i> L. = <i>T. turgidum</i> L. subsp. <i>turgidum</i> <u>pasta wheat</u></p> <p>A^uA^uBB</p>
2n = 6x = 42 hexaploid	<p><i>T. turgidum</i> L. A^uA^uBB x <i>Aegilops tauschii</i> Coss. DD</p>	<p><i>T. aestivum</i> L. = <i>T. aestivum</i> L. subsp. <i>aestivum</i> <u>pšenica siata, bread wheat</u></p> <p>A^uA^uBBDD</p>	
	<p>zatiaľ nejednoznačný pôvod</p>	<p><i>T. spelta</i> L. = <i>T. aestivum</i> subsp. <i>spelta</i> (L.) Thell. <u>pšenica špaldová, spelt wheat</u></p> <p>A^uA^uBBDD</p>	

2.3 Pšenica jednozrnová (*Triticum monococcum* L.)

Z výsledkov poľnohospodárskeho výskumu vyplynulo, že domestikácia starovekej diploidnej pšenice, prebiehala na Blízkom východe, v „Krajine úrodného polmesiaca“ pred viac ako 10 000 rokmi nezávisle na tetraploidnej a hexaploidnej pšenici (Heun *et al.*, 1997). Územie úrodného polmesiaca sa rozkladalo od údolia Nílu a Jordánu cez Sýriu, Turecko, iracké a iránske pohoria (Obrázok č.3, podľa Karagöz *et al.*, 2009). Hlavným prirodzeným prostredím výskytu divokej formy jednozrnky *T. boeoticum* Boiss. bola severná a východná časť úrodného polmesiaca (Padulosi *et al.*, 1996, Heun *et al.*, 1997, Barkworth *et Bothmer*, 2009). Pôsobením selekcie vznikol z tejto planej jednozrnky jej domestikovaný príbuzný *Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum* (Sharma *et Waines*, 1994, Heun *et al.*, 1997).

Vnútrodruhovým krížením domestikovanej a divokej formy pšenice jednozrnovej sú produkovaní fertílnej jednici (Hopf *et Zohary*, 2000). Avšak pri medzidruhovom krížení (*T. monococcum* L. x *T. urartu* Tumanian ex Gandilyan) vznikajú sterilní potomkovia vplyvom imunochemickej odlišnosti a separačnej sterilnej bariéry (Johnson *et Dhalival*, 1976, Hopf *et Zohary*, 2000, Feuillet *et al.*, 2007).



Obrázok č.3: Zelene zvýraznená oblasť na blízkom východe, označovaná ako „Krajina úrodného polmesiaca“, kde sa našli najstaršie archeologické pozostatky jačmeňa, einkorn a emmer (prevzaté od Feuillet *et al.*, 2007)

Jednotlivé poddruhy jednozrnky sú zlúčené do spoločného druhu pšenice jednozrnovej (*Triticum monococcum* L.) na základe obecných vlastností. *Triticum monococcum* L. je jednoročná žltozelená tráva dorastajúca do výšky 80-150 cm. Je charakterizovaná tenkými

pevnými stebkami s chlpatými kolienkami a úzkymi listami. Klas je splošený, hustý, pozostávajúci z dvojradového usporiadania krehkých kláskov. Typická je samoopelivosť ako charakteristická vlastnosť divokého predka. V závislosti od odrody sa tvorí väčšinou jedno zrnko na klások, pretože z dvoch kvetov je len jeden plodný. Semená sú okôrené (tesne obalené plevicou a plievočkou). Výnos je relatívne malý, ale pšenici jednozrnovej postačujú pôdy chudobné na živiny. Získaná múka je síce výživná, ale nevhodná na prípravu kysnutého pečiva. Preto bola táto pšenica primárne používaná na prípravu kaše alebo ku konzumácii celých varených zrn. V súčasnosti sa používa len sporadicky na kŕmenie zvierat (Hopf *et Zohary*, 2000, Feuillet *et al.*, 2007, <http://botany.cz/cs/triticum-monococcum/>).

Oveľa väčšie využitie má pšenica jednozrnová v genetike a genomike. Ako diploidný blízky príbuzný donora A genómu kultivovaných pšeníc je ideálnym modelom pre genetické mapovanie a klonovanie, ako už bolo vyššie spomenuté. Vzhľadom k tomu, že jej domestikácia prebiehala nezávisle od hexaploidnej pšenice, bola schopná si zachovať genetickú diverzitu, ktorá môže byť v súčasnosti použitá na obohatenie genómu pšenice sietej (Hopf *et Zohary*, 2000, Jing *et al.*, 2007, Klocová *et al.*, 2011). Na lepšie porozumenie evolúcie a využitie dostupnej diverzity, je potrebné kombinovať poznatky z cytogenetických analýz, evolučnej príbuznosti medzi druhmi a mapovania chromozómov (Kuspira *et al.*, 1989, Tanksley *et al.*, 1992, Duran *et al.*, 2009).

2.4 Mapovanie genómu, väzbová mapa

Najstarším spôsobom skúmania organizácie genómu je jeho mapovanie, pri ktorom sú za pomoci mapovacích populácií umiestňované na chromozómy rôzne typy markrov. Výsledkom procesu je mapa genómu. Dĺžka mapy a taktiež vzdialenosť medzi susednými markrami, prípadne génmi, závisí od templátu a spôsobu mapovania. Táto hodnota môže byť udávaná v centimorganoch (cM) pre väzbové mapy, v mikrometroch (μm) alebo percentách chromozómu pre cytogenetické mapy, v chromozomálnych intervaloch - binoch pre delečné mapy či v pároch bázii (bp) pre sekvenčné a fyzické mapy.

Väzbové mapy sú najstaršie a najčastejšie využívané mapy v rastlinnej i živočíšnej ríši. Slúžia na identifikáciu, analýzu a manipulovanie s génmi, ktoré sú predpokladom pre tvorbu jednoduchých i komplexných znakov organizmov, s kvantitatívnym aj kvalitatívnym účinkom (Tanksley *et al.*, 1992, Duran *et al.*, 2009). Pre efektívne využitie týchto znakov je potrebné dosiahnuť dostatočné rozlíšenie máp, ktoré závisí od množstva zamapovaných markrov a druhu i veľkosti mapovacej populácie (Duran *et al.*, 2009).

2.5 Mapovacie populácie pre väzbové mapovanie

Mapovacia populácia pre väzbové mapovanie je súbor línií jedincov pochádzajúcich z kontrolovaného kríženia kontrastných rodičovských jedincov. Jednotlivé línie a ich potomkovia sú samostatne analyzované, na základe čoho je možné stanoviť genetickú vzdialenosť mapovaných lokusov. Tá odpovedá pravdepodobnosti rekombinácie medzi dvomi porovnávanými lokusmi počas meiózy. Typ populácie je volený v závislosti od spôsobu rozmnožovania (Schneider, 2005, Hittalmani *et al.*, 2008). Vzhľadom k tomu, že pšenica je samoopelivá, je možné použiť nasledujúce 4 typy mapovacích populácií (Hopf *et Zohary*, 2000, Schneider, 2005): Najčastejšie sa používa F₂ mapovacia populácia, s jednoduchou prípravou najmä pre samosprašné rastliny. Pre špeciálne použité alebo imortalizáciu F₂ mapovacej populácie sa využívajú jej deriváty - populácia rekombinantných inbredných línií (RILs) alebo populácia dihaplodných línií (DH). Štvrtou možnosťou je použiť populácie línií, vzniknutých spätným krížením (BC) s jedným alebo oboma rodičovskými líniami.

F₂ populácie

Krížením rodičov s kontrastnými znakmi je vytvorená F₁ populácia. Jej jedinci sú samosprašeni za produkcie F₂ populácie, správajúcej sa podľa mendelovských pravidiel klasickej genetiky. F₂ populácia je výsledkom jednej meiózy, počas ktorej je genetický materiál zrekombinovaný a dochádza k segregácii protikladných rodičovských znakov (Schneider, 2005).

- výhody - časovo nenáročná príprava, segregácia všetkých možných kombinácií genotypu
- nevýhody - nemožnosť premnožovania, nemožnosť opakovania experimentu => nevhodné pre QTL mapovanie (každý F₂ jedinec geneticky unikátny), limitované použitie pre experimenty vysokohustotného mapovania (obmedzené množstvo DNA) (Hittalmani *et al.*, 2008)

Rekombinantné inbredné línie (Recombinant Inbred Lines = RILs)

RILs sú pripravené samosprašením jedincov z F₂ generácie. Samosprašenie sa prevádza aspoň do siedmej generácie, pokiaľ nie sú línie zafixované do homozygotnej mozaiky rodičovských genómov. Keďže zdrojom ďalšej generácie je práve jedno semienko z predchádzajúcej generácie, má táto metóda aj synonymný názov - „Single-Seed Descent lines“ (SSD, Schneider, 2005, Hittalmani *et al.*, 2008).

- výhody - finančne nenáročné, potreba genotypingu len raz pre každé RIL, možné opakovanie experimentu, možnosť neobmedzeného premnožovania, väčšie rozlíšenie pri mapovaní, vhodné pre štúdium QTL
- nevýhody - časová náročnosť, obtiažne získanie RIL populácie z kríženia druhov s vysokou inbrednou depresiou, podliehanie niektorých medzidruhových RI populácii náhodnej selekcii => tvorba skresleného segregáčného pomeru (Hittalmani *et al.*, 2008)

Populácie spätných krížencov (Backcross Populations = BC)

Mapovacia populácia je využívaná na skúmanie úsekov DNA odvodených z jedného rodiča (donor DNA fragmentu) na pozadí genómu druhého rodiča (recipient DNA fragmentu). Krížením oboch rodičov je vyprodukovaná F₁ hybridná rastlina, ktorá je následne krížená s rodičom-recipientom a v sledovanom lokuse sa selektuje na heterozygota. V spätnom krížení s recipientným rodičom sa pokračuje niekoľko generácií. Počas procesu dochádza k odseparovaniu fragmentov DNA z donorového organizmu, ktoré neboli vo väzbe na selekčné markery a súčasne ku skracovaniu selektovaného donorového fragmentu. Pri pokročilej redukcii počtu a veľkosti fragmentov z donora spätným krížením môže nastať situácia, kedy sú získané línie identické s recipientom, okrem jedného fragmentu z donora. Vtedy sú získané línie nazývané „takmer izogénne línie“ (Nearly Isogenic Lines, NILs) (Schneider, 2005).

- výhody - vnášanie jednotlivých znakov do kultivarov, bližšie priblíženie sa ku žiadanému génu, zníženie genetického driftu
- nevýhody - možnosť slabšej rekombinácie u hybridov vzniknutých medzidruhovým krížením, časová náročnosť, nutná prítomnosť detekovateľnej genetickej diverzity medzi recipientom a donorom (Schneider, 2005, Hittalmani *et al.*, 2008)

Dihaploidné línie (Doubled Haploid lines = DH)

Populácia dihaploidných línií je generovaná z haploidných línií a obsahuje v každej bunke dve rovnaké sady chromozómov. Vplyvom procesu haploidizácie a následného zdvojenia chromozómov sú produkované úplne homozygotné línie bez prítomnosti akejkoľvek heterozygotnosti (Schneider, 2005, Hittalmani *et al.*, 2008).

- výhody - rýchlo dosiahnutý fixovaný homozygotný stav, stále mapovacie populácie bez genotypických zmien, jednoduchšie skórovanie dát pomocou markrov, vhodné pre mapovanie QTLs
- nevýhody - nákladná príprava, často potreba tvorby pletivových kultúr, u niektorých rastlín problematické tvorba DH línií, nemožnosť sledovania účinku génov u špecifických QTLs vplyvom homozygotnosti (Schneider, 2005, Hittalmani *et al.*, 2008)

2.6 Genetické markry

Genetické markry sú jednoducho skórovateľné „značky“, ktoré sa dedia podľa mendelistických pravidiel. Týmito markrami sú polymorfizmy vo fenotype, v expresii a funkcii génových produktov či v molekule DNA. Podľa typu detekcie môžu byť genetické markry zadelené do troch kategórií: fenotypové (výskyt variability na fenotypovej hladine), biochemické (rôznorodosť génových produktov alebo ich aktivity) a DNA markry (rôzne varianty alel v DNA). Biochemické a DNA markry sú často spoločne nazývané molekulárnymi markrami. U rastlín sa obecné markry využívajú najmä na konštrukciu genetických máp ale i na šľachtenie, produkciu odrôd s lepšími vlastnosťami, ku charakterizácii a izolácii dôležitých génov, markrom-asistovanú introgresiu výhodných alel či na získanie informácií o genetickej rôznorodosti medzi populáciami (podľa Doveri *et al.*, 2008).

Počas posledných dvadsať rokov, vplyvom potreby zvýšenia svetovej produkcie potravín a s vývojom nových technológií, vzrástlo množstvo dostupných DNA markrov. Základom štúdia DNA sa stali techniky založené na hybridizácii DNA a technika Southern blottingu, ktoré umožnili detekciu dĺžkového polymorfizmu restričných fragmentov (RFLP) a zahájili tvorbu genetických väzbových máp. Nevýhodou metódy je však časová náročnosť procedúry a práca s rádioaktívnym materiálom. Ďalším „míľnikom“ v konštrukcii a zahusťovaní genetických máp sa stal vývoj metódy PCR, ktorý priniesol výhody oproti tradičným RFLP markrom v potrebe len malého množstva DNA a v jednoduchosti skórovania polymorfizmov (podľa Landjeva *et al.*, 2007). Rôzne derivácie vo využití polymerázovej reťazovej reakcie priniesli širokú paletu typov PCR markrov (napríklad AFLP, CAPS, IRAP, ISSR, RAPD, REMAP, SCAR, SNP, SSR, STS, Nguyen *et al.*, 2005). Ako bolo spomenuté, do tejto rozsiahlej skupiny patria aj markry detekujúce polymorfizmus v dĺžke amplifikovaných fragmentov (AFLP), CAPS markry využívajúce k objaveniu polymorfizmu

kombináciu PCR a detekcie mutácie v restriktívnom mieste (Konieczny *et al.*, 1993) či RAPD markry s náhodne amplifikovanou polymorfnou DNA. Ďalej je možné nájsť polymorfizmus v počte jednoduchých sekvenčných repetícií (Simple Sequence Repeats, SSR) či v oblastiach medzi retrotranspozónmi (IRAP, Kalendar *et al.*, 1999). Po spojení technológií molekulárnych markrov a sekvenovania DNA, sa najviac využívaným typom markru stal jednonukleotidový polymorfizmus (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP), vďaka jednoduchosti detekcie a častému výskytu (podľa Landjeva *et al.*, 2007). Problém však nastal pri objavovaní sekvenčného polymorfizmu u nemodelových organizmov s komplexnými polyploidnými genómami, medzi ktoré patria aj obilniny, zatiaľ s nedostupnou sekvenciou genómu. čiastočné riešenie tohto problému poskytuje vysokohustotná analýza genómu, Diversity Arrays Technology (DArT), založenej na hybridizácii genomických DNA reprezentácií k mikroarray s vopred vybranými polymorfnými markrami (Jaccoud *et al.*, 2001, Wenzl *et al.*, 2004)

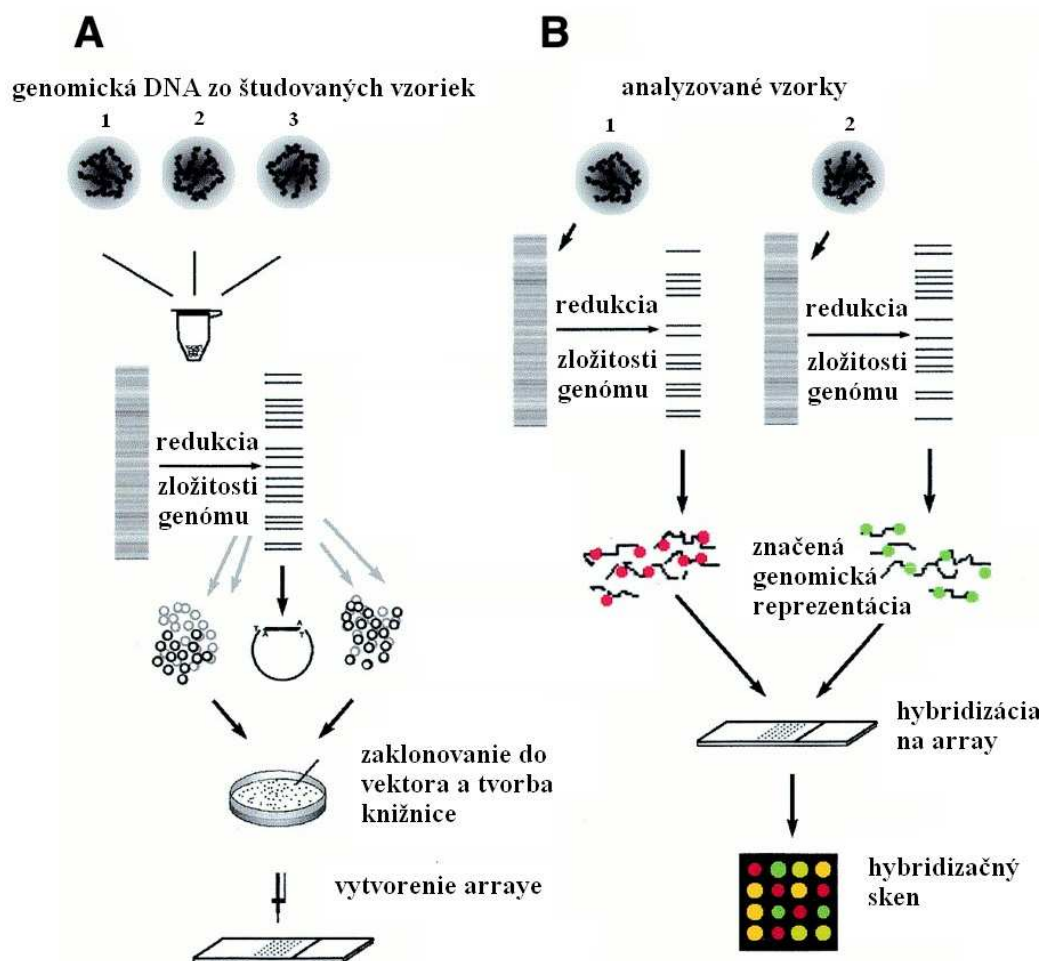
2.6.1 DArT markry (Diversity arrays technology)

DArT je sekvenčne nezávislá metóda založená na hybridizácii mikro-array markrového systému. Primárne bola vyvinutá pre výskum genómu ryže a diploidných obilnín s malým genómom do 430 Mb. Neskôr sa zistilo, že ani veľké genómy, ako má napríklad jačmeň (5 Gb) či hexaploidná pšenica (17 Gb), nepredstavujú problém, lebo metóda umožňuje zistiť rozdiely v DNA u niekoľko stoviek genomických lokusov súčasne (Wenzl *et al.*, 2004, Akbari *et al.*, 2006, Jing *et al.*, 2009). Pri jednom overení je tak možné určiť stovky až tisíce polymorfných lokusov. Výsledkom je reprodukovateľný sken genómu s nasledovným skórovaním prítomnosti či neprítomnosti fragmentov DNA vo vzorke DNA. Rýchla dostupnosť veľkého počtu markrov uľahčuje klonovanie a lokalizáciu dôležitých génov, štúdium organizácie genómu, porovnávacie mapovanie, umožňuje určovať stupeň diverzity génových zdrojov a napomáha objasňovať evolúciu genómu nie len medzi starovekými odrodami pšenice. Sken genómu je tiež použiteľný na markrom asistovanú selekciu v molekulárnom šľachtení či v ďalších aplikáciách genomiky (Akbari *et al.*, 2006, Jing *et al.*, 2009).

Ďalšou veľkou výhodou metódy je časová nenáročnosť. Príprava analýzy trvá maximálne tri dni. Pozostáva z prípravy DArT knižnice, DArT arraye a následného genotypovania vzoriek DNA pomocou hybridizácie. DArT array predstavuje genomickú reprezentáciu zmesi odrôd skúmanej rastliny. V prvom kroku tvorby arraye sa štiepi zmes DNA dvomi restriktívnymi endonukleázami (vzácné a často štiepiaci enzým). Nasleduje ligácia

adaptéru ku koncu fragmentu DNA naštiepeného vzáčne štiepiacim enzýmom a PCR amplifikácia časti DNA s primermi komplementárnymi k týmto adaptérom. Tým dôjde ku zníženiu komplexnosti (zložitosti) vzorky. Naamplifikované produkty sú zaklonované do kompetitívnych baktérií, čím sa vytvorí knižnica genomických reprezentácií. Následne sú klonované inzerty amplifikované použitím vektor-špecifických primerov, prečistené a otláčené na mikroskopické sklíčko. Po denaturácii je DArT array pripravená na hybridizáciu s cieľovou DNA (Obrázok č.4 A). Pre DArT analýzu sa pripravujú dva typy arrayí - objavná array, popísaná vyššie a následne array obohatená o polymorfne markry. Array obohatená o polymorfizmy je pripravovaná z kandidátnych polymorfnych klonov na sklíčku spolu s kontrolnými klonmi (Jaccoud *et al.*, 2001, Wenzl *et al.*, 2004, Akbari *et al.*, 2006).

Vzorky DNA, určené na detekciu, je potrebné taktiež špecificky upraviť, zmenšiť ich komplexnosť. Postup je zhodný s prípravou DArT knižnice, ale úseky DNA sú označené fluorescenčnou farbičkou (cy3 - zelená). Vzniknú tzv. cieľové fragmenty (targets). Prípadne druhou fluorescenčnou farbičkou (cy5 - červená) môže byť označená druhá vzorka genomickej DNA (Obrázok č.4 B). V ďalšom kroku nasleduje hybridizácia cieľových, prípadne referenčných fragmentov s arrayou a odmytie nenaviazaných častí. Detekcia a analýza nahybridizovaných úsekov DNA sa prevádza prostredníctvom konfokálneho laserového skenera a počítačového programu. Software porovnáva relatívnu intenzitu pomeru zeleného signálu k červenému pre každý individuálny klon naprieč mikroskopickým sklíčkom. Ak je intenzita červeného a zeleného signálu pre určitý klon rovnaká, na hybridizačnom skene je detekovaná žltá farba. Rozdiel v pomere zeleného a červeného signálu vypovedá o odlišnosti DNA fragmentov porovnávaných vzoriek. V závislosti od pravdepodobnosti výskytu polymorfizmu je klonom priradená v skórovacej tabuľke hodnota 0 alebo 1 (Jaccoud *et al.*, 2001, Wenzl *et al.*, 2004, Akbari *et al.*, 2006).



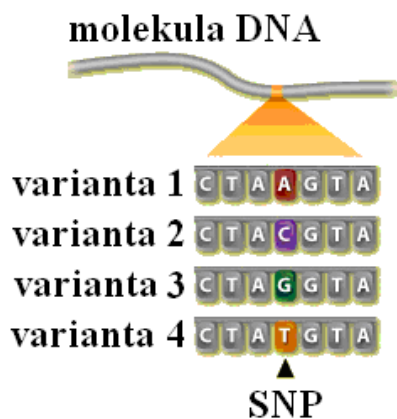
Obrázok č.4: Postup prípravy DArT arraye a analýza vzoriek (upravené podľa: Jaccoud *et al.*, 2001).

(A) Hromadná študovaná genomická DNA je naštípená restriktívnymi enzýmami. Pomocou naligovania adaptérov ku vzniknutým „vzácnym“ fragmentom a následnej PCR z adaptérov sa zníži komplexnosť genómu vzoriek. Amplifikované fragmenty sú zaklonované do vektora, čím sa vytvorí knižnica genomickej reprezentácie. Inzerty sú použitím vektor-špecifických primerov amplifikované, prečistené a nanesené na mikroskopické sklíčko

(B) Z porovnávaných vzoriek sú vytvorené genomické reprezentácie - postup ako v (A), značené červenou a zelenou fluorescenčnou farbičkou, zmišané a hybridizované na array. Pomer intenzity farbičiek (červená:zelená) vypovedá o odlišnosti DNA fragmentov porovnávaných vzoriek. Výskyt žltej farby na hybridizačnom skene je dôsledkom rovnakého pomeru intenzity červenej a zelenej farby, a teda aj zhodného množstva naviazaných fragmentov z oboch vzoriek.

2.6.2 SNP markry (Single Nucleotide Polymorphisms)

Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) sú najčastejšou genetickou variáciou v genóme. Odhaduje sa, že v genóme človeka je SNP každých 300-1000 bp čo znamená asi 10 mil. SNP na genóm (International Human Genome Sequencing Consortium 2004). SNP sú charakterizované jednobázovou zmenou na určitej pozícii v genóme medzi dvomi jedincami (Obrázok č.5), kde frekvencia výskytu tejto alely v populácii sa pohybuje od 1 % do 95 %. Podľa pôvodu vzniku sú delené do 3 skupín: transície, transverzie a malé inzercie/delécie (Brookers, 1999, Duran *et al.*, 2009). Pri detekcii sa môžu použiť techniky využívajúce hybridizáciu či ligáciu značených oligonukleotidov s variantami SNPs, schopnosť nukleázy štiepiť dvojvláknotú DNA v mieste sekvenčného nesúladu (mismatch), vzniknutého vplyvom hybridizácie dvoch fragmentov s výskytom polymorfizmu, ďalej predlžovanie fragmentu DNA v mieste výskytu SNP pomocou primeru, štiepením DNA restričnou endonukleázou v mieste výskytu SNP či priamym sekvenovaním tohto miesta (Gut, 2001). Výhodou jednonukleotidových polymorfizmov je dobrá evolučná stabilita a relatívny nadbytok naprieč genómom, čo zabezpečuje vysokú hustotu výskytu v okolí sledovaného lokusu (Syvänen, 2001). SNP markre sa využívajú na skúmanie vývoja organizmov, ich reakcie k prostrediu i na detekciu komplexných ľudských chorôb (Duran *et al.*, 2009).



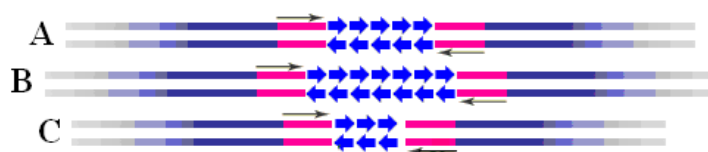
Obrázok č.5: Príklad jednobázovej zmeny v DNA medzi jedincami

Čierna šípka poukazuje na miesto výskytu štyroch variant jednonukleotidového polymorfizmu (SNP) na molekule DNA (upravené podľa <http://learn.genetics.utah.edu/content/health/pharma/snips/>).

2.6.3 SSR markry (Simple Sequence Repeats)

Po objave PCR sa mikrosatelitové alebo tiež SSR markry stali najrozšírenejšími molekulárnymi markrami. SSR dosahujú vysoký stupeň polymorfizmu, sú kodominantné, dobre reprodukovateľné s hojným výskytom v celom genóme. SSR markry sú odvodzované zo sekvencie DNA obsahujúcej krátke tandemové repetície mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexa-nukleotidov. Tieto repetitívne elementy sú úplne rozptýlené po celom genóme, no zvyčajne nepresahujú dĺžku 100 bp. Úseky SSR sú obyčajne lemované unikátnymi oblasťami DNA, čo umožňuje nájsť primery, špecificky amplifikujúce SSR lokusy. PCR technika tak priamo dovoľuje z genomickej DNA amplifikovať definované mnohonásobné SSR alely ako jeden lokus (Obrázok č.6, Tautz *et al.*, 1989, Schlötterer, 2000).

Jednoduché sekvenčné repetície sa vyskytujú u eukaryot, prokaryot aj eubaktérií. Využívajú sa na analýzu prítomnosti väzby medzi génmi, na mapovanie genómu, na populačné štúdie pri testovaní príbuznosti jedincov v rámci ale i medzi populáciami (Tautz *et al.*, 1989, Schlötterer, 2000).



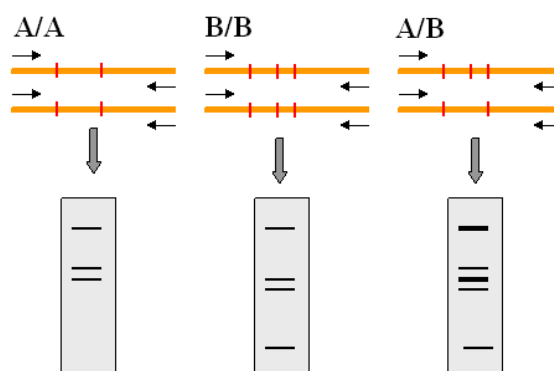
Obrázok č.6: Schématické znázornenie polymorfizmu v počte mikrosatelitovej DNA medzi jedincami a miesta na hybridizáciu SSR markrov

Modré šípky znázorňujú vyskytujúcu sa variabilitu v počte tandemových repetícií medzi jedincami A, B a C. Čierne šípky predstavujú navrhnuté PCR primery k oblastiam lemujuúcim mikrosatelitový región v DNA (ružovo zvýraznené úsečky, upravené podľa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechSTS.shtml>)

2.6.4 CAPS markry (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)

CAPS markry sú kodominantné molekulárne markry, ktoré amplifikujú krátku genomickú sekvenciu okolo polymorfného miesta, rozoznávajú DNA restričnou endonukleázou. Polymorfizmus v restričnom mieste môže vzniknúť alebo zaniknúť v dôsledku mutácie. Napríklad ako na obrázku č.7, kde pomocou unikátnych sekvencií primerov a PCR reakcie, dôjde k amplifikácii mapovanej DNA sekvencie u dvoch rôznych ekotypov (A/A, B/B) a heterozygota (A/B). Amplifikované fragmenty z jedincov A/A a B/B majú pre restričnú endonukleázu (RE) dve a tri rekogničné miesta. V prípade heterozygota A/B, sa získajú dva rôzne produkty, jeden zhodný s rodičom A/A - dvakrát štiepateľný RE a druhý produkt je získaný z rodičovského genómu B/B - trikrát štiepateľný RE. Pri delení

PCR produktov z jednotlivých rastlín, naštípených RE, sa na agarózovom alebo akrylamidovej géli detekujú jednoducho rozlíšiteľné schémy bandov (Konieczny *et al.*, 1993). V porovnaní s tradičnými RFLP markrami, pri PCR-generovaných markroch nie je na detekciu používaná rádioaktivita, je postačujúca malá vzorka DNA a výhodou je aj časová nenáročnosť či dostatok polymorfizmu (Nguyen *et al.*, 2005, Doveri *et al.*, 2008). Derivátom techniky CAPS sú markry nazývané dCAPS (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), ktoré sú navrhnuté pre alely neobsahujúce rekogničné miesto pre RE ale obsahujú aspoň jeden SNP. Pomocou kombinácie existujúceho SNP a špeciálne navrhnutých primerov, ktorých súčasťou je jeden alebo viac mismatchov, sa vytvorí restričné miesto špecifické pre jednu alelu mapovacej sekvencie. Po PCR amplifikácii sa polymorfizmus detekuje rovnakým spôsobom ako pri CAPS markroch (Neff *et al.*, 1998).



Obrázok č.7: Amplifikácia, štiepenie a gélová separácia CAPS markrov

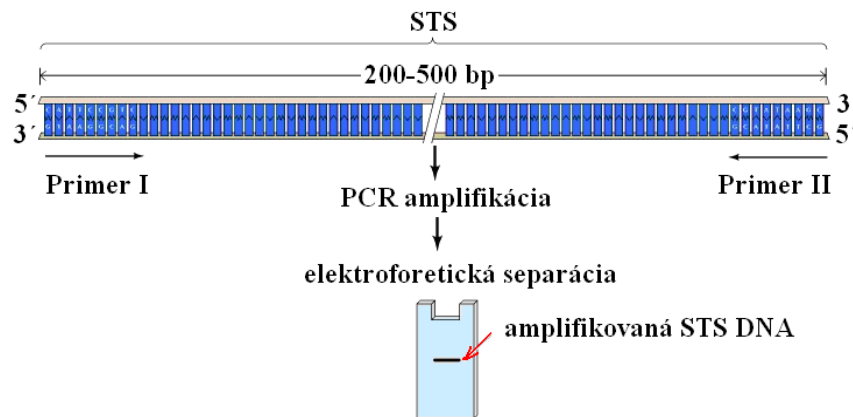
Unikátne sekvencie primerov (čierne šípky) sú použité na amplifikáciu a mapovanie DNA sekvencií z dvoch blízko príbuzných jedincov A/A, B/B a z heterozygota A/B. Červené vertikálne čiary v amplifikovaných fragmentoch znázorňujú restričné miesta (A/A - 2, B/B - 3). U heterozygota po štiepení restričnou endonukleázou (RE) jeden PCR produkt bude štiepený 2x a druhý 3x. Po gélovej separácii sa zviditeľní rozdiel v počte a dĺžke naštípených PCR fragmentov medzi rodičmi a heterozygotom. U heterozygota sú detekované fragmenty od oboch rodičov (kodominancia).

(Upravené podľa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechCAPS.shtml>).

2.6.5 STS markry (Sequence-Tagged Site)

Miesto so sekvenčnou adresou (STS) je krátka, unikátna sekvencia určujúca špecifický lokus. Každý STS je charakterizovaný párom alelovo-špecifických oligonukleotidov (primerov), ktoré sú navrhnuté osekvenovaním napríklad RFLP a RAPD prób, AFLP fragmentov či iných polymorfných markrov (podľa Gupta *et al.*, 1999). V kontraste s AFLP a SSR markrami, primer viažuce miesta pre STS markry odvodené z cDNA RFLP

klonov sú medzi druhmi konzervované. STS markry tak môžu poskytnúť spoľahlivý systém na mapovanie ortológnych lokusov medzi vzdialenými príbuznými druhmi, a tým umožniť porovnávanie genetických väzbových máp z odlišných druhov (Taylor *et al.*, 2001) Detekcia prítomnosti markrov sa prevádza pomocou PCR a amplifikované fragmenty sú následne elektroforeticky separované (Obrázok č.8, podľa Gupta *et al.*, 1999).



Obrázok č.8: Detekcia výskytu STS

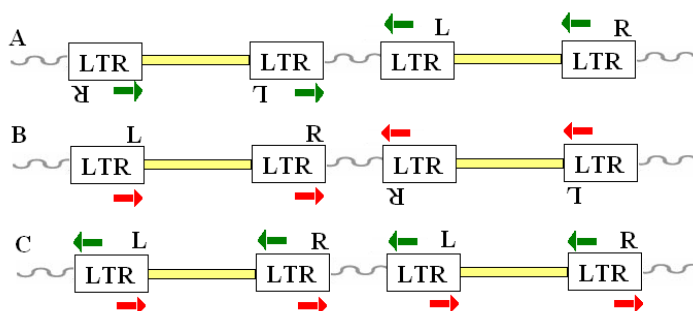
Miesto so sekvenčnou adresou je charakterizované zvyčajne 200-500 bp dlhou sekvenciou nukleotidov, ktorá sa v genóme vyskytuje len raz. Detekcia STS vo vzorke DNA pozostáva z amplifikácie krátkeho úseku pomocou špecifických primerov (čierné šípky), gélovej elektroforézy a vizualizácie amplifikovaného fragmentu na géli (červená šípka, upravené podľa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>).

2.6.6 IRAP markry (Inter-Retrotranspozon Amplified Polymorphism)

IRAP technika je založená na vytváraní PCR produktov medzi susednými retrotranspozónmi, ktoré sa v hojnom počte vyskytujú aj v genómoch tráv (Nguyen *et al.* Wu, 2005). Ich vysokú hustotu v genóme zabezpečuje proces retrotranspozície - transkripcia retrotranspozónovej DNA do RNA, reverzná transkripcia a inzeriou nových cDNA kópií späť do genóm. Vďaka hustému rozptýleniu retrotranspozónov naprieč jadrovému genómu a možnosti premiestňovať sa, sú dobrým zdrojom tvorby DNA markrov. IRAP primery sú navrhované k segmentom dlhých terminálnych repetícií (LTRs), ohraničujúcich z vonkajších strán mobilné elementy (Obrázok č.9). U každého retrotranspozónu sú LTRs rozlišované na ľavý (L, left) a pravý (R, right) segment. Vďaka tomu je možné určiť orientáciu retrotranspozónov začlenených do genomickej DNA a použitím jedného alebo oboch typov primerov súčasne amplifikovať úsek medzi susednými retrotranspozónmi v troch rôznych orientáciách (Obrázok č.9, Kalendar, 1999).

Výhodou retrotranspozónov je prítomnosť dlhých, konzervovaných sekvencií, ktoré môžu byť použité na tvorbu špecifických kodominantných markrov. Vďaka replikačne

aktívnym členom rodiny retrotranspozónov sú produkované nové inzercie v genóme, ktoré vedú k vytváraniu polymorfizmu medzi genómami (podľa Kalendar, 1999, Nguyen *et Wu*, 2005)



Obrázok č.9: Amplifikačná stratégia IRAP markrov

Retrotranspozóny sú z oboch strán ohraničené dlhými terminálnymi repetíciami (LTR), označenými L (left, ľavá) a R (right, pravá). Pomocou nich je stanovená orientácia retrotranspozónov vo vnútri kódujúcej DNA (vlnovky). Zelené šípky označujú PCR primery nasadajúce na 5'konce a červené šípky na 3'konce LTRs. Použitím jedného (A, B) alebo oboch typov primerov (C) súčasne umožňuje amplifikovať úsek medzi susednými retrotranspozónmi v troch rôznych orientáciách (vytvorené podľa Kalendar *et. al.*, 1999).

2.7 Využitie molekulárnych markrov

Molekulárne markre predstavujú jeden z významných nástrojov používaných k analýze genómu. Umožňujú porozumieť vzťahu medzi dedičnosťou fenotypových znakov a informácii o sekvencii (Duran *et al.*, 2009).

Využitie markrov je bohaté - od šľachtenia rastlín až k predpovedaniu rizika vzniku ľudských chorôb a ich diagnostike. Medzi hlavné výhody DNA markrov patrí spoľahlivá dedičnosť, jednoduchá analýza, žiadny vplyv okolitého prostredia, možnosť vysokohustotného genotypovania (high-throughput). Aplikácie možno nájsť aj pri šľachtení obilnín, kde je možné skúmať prítomnosť génov kontrolujúcich sledovaný znak prostredníctvom markrom asistovanej selekcie (MAS). Požadovaný znak je tak možno detekovať v ranom štádiu rastu, ešte pred fenotypový prejavom, čím sa urýchli proces šľachtenia. K ďalším prednostiam molekulárnych markrov patrí možnosť simultánne selektovať viac rôznych znakov a taktiež identifikovať gény rezistencie bez potreby vystavenia rastlín patogénom či škodcom (Duran *et al.*, 2009).

Dostupnosť markrov a nimi podmienená rozlišovacia schopnosť, genetického mapovania a tvorby vysokohustotných väzbových máp, má zásadný vplyv na využitie markrom asistovanej selekcie a evolučné štúdie. Taktiež umožňuje lepšie porozumieť genetickej architektúre kvantitatívnych znakov, dôležitých v poľnohospodárstve a pri šľachtení (Tanksley *et al.*, 1992, Mantovani *et al.*, 2008, Zeng *et al.*, 2008).

2.8 Lokusy ovplyvňujúce kvantitatívne znaky (Quantitative Trait Loci, QTLs)

Väčšina agronomicky dôležitých znakov u pšenice vykazuje kvantitatívnu dedičnosť (Börner *et al.*, 2002). Tá je výsledkom segregácie komplexných polygénnych znakov, ktorých expresia je modifikovaná účinkami prostredia. Prejavom kvantitatívne dedených znakov je kontinuálna variácia fenotypu (Paterson *et al.*, 1988, Lander *et Botstein*, 1989, Nelson, 2005).

Lokusy prispievajúce k variabilite kvantitatívnych znakov (QTLs) ovplyvňujú rezistenciu voči abiotickým i biotickým stresom, agronomické a morfológické vlastnosti rastlín. Detekcia QTLs je štatisticky náročná a môže prebiehať len v prípade, ak rodičia nesú rôzne varianty (alely) odlišujúce sa v kvantitatívnom znaku. (Lander *et Botstein*, 1989, Börner *et al.*, 2002). Prostredníctvom kríženia týchto rodičov sa získa relatívne veľký počet fenotypovo rôznych jedincov. Následne je v takto vzniknutej populácii, pomocou rovnomerne rozložených markrov v genóme, skórovaný výskyt lokusov podmieňujúcich skúmaný znak (Lander *et Botstein*, 1989, Nelson, 2005).

Štatistická analýza je prevádzaná pomocou počítačových programov, ktoré priradujú pravdepodobnosti prejavu fenotypového znaku vo väzbe k výskytu alely markru v určitom lokuse na väzbovej mape. Pravdepodobnosť ovplyvnenia fenotypu určitým lokusom je počítaná metódou maximálnej pravdepodobnosti (maximum likelihood) a jej výstupom sú tzv. LOD skóra (Limit Of Detection, Lander *et Botstein*, 1989). LOD skóre je v podstate dekadický logaritmus násobku pravdepodobnosti, že daný znak je lokusom ovplyvnený ako že nie je. Pôvodne bolo zaužívané, že ak je LOD skóre nižšie ako 3, je považované za menej významné.

Súčasnú štatistickú nástroje (napr. *R/Qtl*, Broman *et al.*, 2003) umožňujú vypočítať okrem LOD skóra aj vhodnú hodnotu LOD tresholdu. Hodnota LOD tresholdu je závislá na veľkosti genómu a rozostupe zamapovaných markrov. Na určenie LOD tresholdu slúži odhad pravdepodobnosti, že LOD skóre prekročí LOD treshold niekde v genóme, v prípade, ak nebude segregovať žiadny QTL. Z toho vyplýva, že ak LOD skóre prekročí predurčený LOD treshold, potvrdí sa v genóme výskyt lokusu s kvantitatívnym znakom. Ak LOD skóre prekročí LOD treshold = 0,05 je zaručená maximálne 5 % pravdepodobnosť výskytu falošných pozitív kdekoľvek v genóme (Lander *et Botstein*, 1989, Nelson, 2005).

Hlavnou úlohou mapovania QTLs je určiť ich umiestnenie v genóme a stanoviť mieru vplyvu na fenotyp (Zeng *et al.*, 2008). Pomocou týchto poznatkov je možné zefektívniť šľachtenie organizmov voči biotickým a abiotickým stresom, a taktiež zvýšiť produktivitu rastlín.

2.9 Výnos pšenice

Výnos je komplexný kvantitatívny znak kontrolovaný veľkým počtom génov, ktoré významne ovplyvňuje prostredie, a preto má tento znak malú dedivosť. Výnos ako celok je súčet komponentov ktoré ho ovplyvňujú. Hlavnými komponentmi výnosu sú: priemerná hmotnosť zrna, tiež uvádzaná ako hmotnosť tisícich zrn, počet zrn na klas a počet klasov na m². Jednotlivé komponenty výnosu naopak vykazujú veľmi dobrú dedivosť (Cuthbert *et al.*, 2008). Výnos ovplyvňujú aj ďalšie znaky vrátane výšky rastliny, rezistencií k biotickým a abiotickým stresom, účinnosti fotosyntézy alebo translokácie metabolitov z rastliny do semien a podobne.

Vplyv výšky rastliny na výnos má väčšinou nepriamy účinok. Zistilo sa, že polotrpasličie rastliny majú síce krátke stonky, ale silné, čím znižujú pravdepodobnosť políhania rastliny, a tým sa zvyšuje plocha asimilácie. Asimilanty sa ukladajú do zrn, výsledkom čoho je zvýšenie výnosu a úrody. Výška rastliny je kontrolovaná okrem mendelistických génov aj kvantitatívnymi a expresia génov má dynamický charakter počas vývoja rastliny (Wang *et al.*, 2010). Na hexaploidnej pšenici bol lokus pre výšku rastliny zamapovaný na takmer všetky chromozómy A, B aj D genómu (Araki *et al.*, 1999, Kato *et al.*, 1999, Huang *et al.*, 2004, Verma *et al.*, 2005, Sadeque *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010).

Klas je pokladaný za najviac variabilnú časť pšenice. Medzi druhmi je možné nájsť rozdiel v tvare, veľkosti (šírke i dĺžke) a „hustote“ klasu (podiel počtu kláskov ku dĺžke klasu). Odlišnosť medzi morfológiou klasu je najčastejšie používaným kritériom pre rozlišovanie druhov a je častým objektom skúmania. Zvýšením dĺžky klasu, by mohla byť zvýšená úrodnosť klasu a tiež výnos zrn (Sourdille *et al.*, 2000). QTL pre dĺžku klasu bol skúmaný v mnohých prácach. Lokus bol zamapovaný u *T. monococcum* L. na chromozómoch 3A^m a 4A^m (Hori *et al.*, 2007) u *T. aestivum* L. na 1BS, 2D, 4AL, 4AS, 4D, 5A (Kato *et al.*, 1999, Börner *et al.*, 2002, Verma *et al.*, 2005). Lokusu určujúci počet kláskov na klas bol mapovaný na chromozómoch 2B, 4A, 5A a 6A (Araki *et al.*, 1999, Kato *et al.*, 2000, Verma *et al.*, 2005). S klasmi súvisí aj veličina určujúca počet odnoží u rastlín. Keďže ovplyvňuje počet klasov na rastlinu, patrí taktiež medzi dôležité komponenty výnosu. V prácach výskumných skupín Arakiho (1999) a Kata (2000) bol lokus na *T. aestivum* L. umiestený na chromozómy 4A a 5A.

Ďalším komponentom výnosu je veličina stanovujúca priemernú hmotnosť zrna. Lokus pre tento znak bol zamapovaný u hexaploidnej pšenice na chromozómoch 1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 3D, 4B, 5A, 6A, 7A, 7D (Araki *et al.*, 1999, Kato *et al.*, 2000, Börner *et*

al., 2002, Huang *et al.*, 2004, Verma *et al.*, 2005, Kumar *et al.*, 2006, Cuthbert *et al.*, 2008) a u diploidnej pšenice *T. monococcum* L. na chromozóm 2A (Hori *et al.*, 2007).

Pri šľachtení pšenice je dôležitým cieľom zabezpečiť stabilnú expresiu génov riadiacich vysoký výnos zrn. Študovaním jednotlivých komponent výnosu a ďalších znakov vplývajúcich na úrodu zrn, kvantitatívne sa meniacich na rôznych genetických pozadiach, umožňuje objasňovať funkcie génov, ktoré s výnosom zrn priamo súvisia (Quarrie *et al.*, 2006).

2.10 Ochlpenie listov pšenice (pubescence, hairy leaf)

Na povrchu ratlinných orgánov možno často pozorovať výrastky epidermis, nazývané tiež chlpy alebo trichómy. Výskyt chlpor na listoch je považovaný za morfológický znak, zvyšujúci fitness rastliny (Roy *et al.*, 1999).

Trichómy na listoch rastlín sú fyziologicky aj ekologicky dôležité. Často sú schopné zabezpečiť ochranu rastliny pred abiotickými stresmi (napríklad tolerancia k suchu znížením prúdenia vzduchu v okolí rastliny, redukcia záťaže vplyvom tepelného a UV žiarenia, zbavovanie sa toxínov, tolerancia k chladu) ale tiež pred biotickými nástrahami (ochrana pred herbivormi, zníženie rozširovania patogénov zmenšením zmáčivosti listov, redukcia populácie byľomora obilného - *Mayetiola destructor* a ďalšie). Avšak výskyt chlpatosti na listoch neposkytuje ochranu voči všetkým nepriateľom (napríklad trichómy uľahčujú vstup patogénnej huby *Discula* sp. do listového tkaniva) (Roberts *et al.*, 1979, Brown *et al.*, 1994, Roy *et al.*, 1999, Taketa *et al.*, 2002, podľa Dobrovolskaya *et al.*, 2007).

Na výskyt trichómov nemajú vplyv len enviromentálne a genetické faktory, ale sú dôležité aj nepriame efekty dané spolupôsobením zmien v ďalších znakoch rastliny (napríklad zmena veľkosti listu vplýva na zmenu hustoty ochlpenia). Hustota ochlpenia na listoch je závislá od miesta výskytu rastliny, počtu založených chlpor na liste ale aj od vývojového štádia rastliny. Ochlpenie listov v jednotlivých štádiách rastu je kontrolované rôznymi génmi. Expresia týchto génov je ovplyvnená viacerými modifikáciami, čím dochádza k rozdielnej génovej expresii u semenáčika aj u dospelaj rastliny. Iniciácia ochlpenia listov vykazuje taktiež variabilitu, ktorá je z väčšej časti podmienená zložením genómu. Čo sa týka veľkosti listu, tento znak je primárne kontrolovaný vonkajším prostredím. Genetická variabilita pre hustotu chlpor na listoch je tak rôzna medzi rodmi aj v rámci druhov (Roberts *et al.*, 1979, Roy *et al.*, 1999, Taketa *et al.*, 2002, podľa Dobrovolskaya *et al.*, 2007).

Kuspira *et al.* (1989) popísali jeden hlavný génový lokus s mnohonásobnými alelickými sériami, ktorý určuje ochlpenie listov. Medzi lokusmi platí nasledujúci vzťah.

Špecifický lokus pre veľmi chlpaté listy (Hl^{VP}) je úplne dominantný k ďalším dvom lokusom pre chlpaté listy (Hl^P) a listy bez chlpatosti (hl). Lokus Hl^P je dominantný len ku lokusu hl . Kolektív vedcov predpokladal, že Hl lokus identifikovaný u *T. monococcum* L. na chromozóme 4A^m zodpovedá pozícii génu pre chlpatosť na chromozóme 4A u *T. aestivum*. Jing s kolektívom (2007) zamapovali gén pre chlpatosť u *T. monococcum* L. na chromozóm 5A^m. Analýza Hori *et al.* (2007) na mapovacej populácii vzniknutej krížením *T. monococcum* L. a *T. boeoticum* Boiss. taktiež potvrdila výskyt génu pre chlpatosť listov na chromozóme 5A.

U hexaploidnej pšenice boli zamapované na chromozómoch 4B ($Hl1$ gén) a 7BS ($Hl2^{Aesp}$) dva gény ovplyvňujúce prítomnosť ochlpenia listov (Taketa *et al.*, 2002, Dobrovolskaya *et al.*, 2007). K výskytu génu pre chlpatosť na chromozóme 7B mohlo dôjsť vplyvom druhovo špecifických štrukturálnych zmien medzi chromozómami 4A, 5A a 7B u hexaploidnej pšenice (Devos *et al.*, 1995).

3. CIELE PRÁCE

1. Dopestovanie mapovacej populácie a jej genotypovanie.
2. Navrhnutie pokusu pre QTL mapovanie v sezóne 2010
3. Zozbieranie dát a vyhodnotenie.
4. Zahustenie existujúcej genetickej mapy
5. Vypracovanie diplomovej práce.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

Semená generácie F₁₀ použité v tejto práci boli odvodené z 87 línií F₈ RIL mapovacej populácie poskytnutej Prof. J. Dubcovským (University of California, Davis, USA). Mapovacia populácia bolo odvodená z kríženia línií kultúrnej formy pšenice jednozrnovej cv. DV92 (*T. monococcum* L. subsp. *monococcum*, Titograd, Montenegro, Taliansko) a divokej formy pšenice jednozrnovej cv. G3116 (*T. monococcum* L. subsp. *aegilopoides*, Libanon).

4.2 Chemikálie a roztoky

4.2.1 Chemikálie a roztoky pre vysokovýkonnú extrakciu DNA

Základ lyzačného pufru (pH 7,2)

- 0,5M NaCl
- 100 mM Tris-HCl
- 50 mM EDTA

Lyzačný pufor

- 100 ml základu lyzačného pufru, pH 7,2
- 0,5 g hydrogénsiričitanu sodného
- 0,1g kyseliny askorbovej
- 0,1 ml merkptoetanolu

4.2.2 Chemikálie a roztoky pre agarózovú gélovú elektroforézu

0,5x TBE (pH 8,0)

- 45 mM Tris bázy
- 45 mM kyseliny boritej
- 1 mM EDTA

6x Stop C (pH 8,0)

- 100 mM EDTA
- 1% SDS
- 0,05 % bromfenolová modrá
- 0,05 % xylenecyanol
- 50 % glycerol

- agaróza (SERVA)
- deionizovaná voda (dH₂O)
- veľkostný marker, Gene Ruler™ 100bp, Plus DNA Ladder (Fermentas, Kanada)
- 10% etidium bromid (Sigma Aldrich, USA)

4.2.3 Chemikálie a roztoky pre polymerázovú reťazovú reakciu

10 x PCR pufor (pH 8,2)

- 500 mM KCl
- 100 mM Tris-HCl
- 1% Triton X-100
- 15 mM MgCl₂

5x Cresol Red

- 7,5% sacharóza
- 0,05% Cresol Red (Aldrich, USA)
- rozpustiť v dH₂O

Nukleotidy (Fermentas, Litva)

- dATP (100 mM)
- dGTP (100 mM)
- dCTP (100 mM)
- dTTP (100 mM)

- primery (Invitrogen, USA)
- Taq polymeráza (Fermentas, Litva)

4.2.4 Chemikálie a roztoky pre nedenuroujúcu polyakrylamidovú elektroforézu

5x TBE (pH 8,0)

- 450 mM Tris bázy
- 450 mM kyseliny boritej
- 10 mM EDTA

- peroxodisulfát amónny (APS, Fluka BioChemika, USA)
- deionizovaná voda (dH₂O)

- N, N, N', N'- tetrametylénetyléndiamín (TEMED, Fluka BioChemika, USA)
- veľkostný marker, Gene Ruler™ 100bp, Plus DNA Ladder (Fermentas, Kanada)
- 10% etidium bromid (Sigma Aldrich, USA)
- 40% akrylamid: N, N'- metylénbisakrylamid 19:1 (Fluka analytical, USA)

4.3 Prístrojové vybavenie

- binokulárna lupa (Carl Zeiss, Jena)
- centrifuga Jouan GR2022 (Thermo, USA)
- dokumentačný systém pre analýzu ELFO gélov ChemiGenius BioImaging System s transiluminátorom GVM20 (Syngene, GB)
- elektroforetický zdroj napätia, MP-500V Power Supply (Major Science, USA)
- homogenizačný oscilačný mlyn MM301 (Retsch, Nemecko)
- horizontálna elektroforetická komôrka Owl B2 (Thermo Scientific, USA)
- hybridizačný inkubátor, 1000 Hybridization Oven (Robbins Scientific, USA)
- chladená centrifuga Jouan CR4i (Thermo, USA)
- magnetická doštička, 96 direct Inject Magnet (Beckman Couter, USA)
- mikrovlnná rúra, Daewoo KOR 6C2B (Daewoo, ČR)
- semimikro váhy, SBC 21 (Scaltec, Nemecko)
- spektrometer Nicolet ANTARIS II FT (Thermo, USA)
- stereomikroskop, SZX16 Research Stereomicroscope (Olympus, USA)
- termostat BT 120M (Laboratórne prístroje Praha, ČR)
- termocyklér, C-1000™ Thermal Cyclor (Bio-Rad, Kanada)
- vertikálna elektroforetická aparátúra Dual Adjustable Mega-Gel Kit C-DASG-400-50 (C. B. S. Scientific, USA)

4.4 Metodika

4.4.1 Založenie poľného pokusu

Z každej línie mapovacej populácie bolo 5.2.2010 sterilizovaných 12-15 semien 5 % SAVO/1 minútu a po premytí vodou boli semená umiestnené na navlhčenú buničitú vatú do Petriho misiek. Misky so semenami boli najskôr inkubované 6 dní pri 4 °C a následne cez noc pri 25 °C. Naklíčené semená boli zasadené do rašelinových jiffy kvetináčov (5x5 cm), obsahujúcich pestovateľský substrát s hnojivom Cererit (Lovo Chemie a.s., ČR) 1:70

a 1 % Agrisorbu (Stockhausen GmbH & Co.KG, Nemecko). Jarovizácia prebiehala v skleníku za prirodzeného osvetlenia a teploty do 10 °C. 31. marca a 1. apríla bolo päť opakovaní mapovacej populácie vysadené do pripravených vonkajších parcel v areáli ÚEB Olomouc metódou latinských štvorcov. Znáhodnenie bolo generované použitím programu Scientific Randomizer (<http://randomizer.org/form.htm>). Počas rastu a dozrievania boli skórované sledované znaky. Tvar rastliny bol hodnotený po 30 a 50 dňoch výsadby do vonkajších parcel a ostatné znaky v období mliečnej zrelosti a po zbere.

4.4.2 Vysokovýkonná extrakcia DNA

Časti mladých listov (3 x 3 cm) z jednotlivých línii *T. monococcum* L. bolo zozbieraných do 96 jamkových misiek a sušených v termostate BT 120M (Laboratórne prístroje Praha, ČR) dva dni pri 37 °C. Následne bola prevedená homogenizácia v oscilačnom mylne MM301 (Retsch, Nemecko) 4 min/27 Hz s dvoma sklenenými guľčkami (0,5 cm) na jamku. Po pridaní 1 ml lyzačného pufru k homogenizátu boli vzorky za občasného pretrepania inkubované (1000 Hybridization Oven, Robbins Scientific, USA) 45 min pri 65 °C a lyzát bol scentrifugovaný pri 3000 rpm/10 min/4 °C (Jouan CR4i, Thermo, USA). Do novej 96 jamkovej PCR misky bolo napipetovaných 10 µl magnetických guľčiek (GeneFind 2.0, Immunotech), 1 µl RNázy (10 mg/ml), 100 µl supernatantu z lyzátu a 70 µl izopropanolu (Lachema, ČR). Aby sa DNA naviazala na magnetické guľčky, zmes bola inkubovaná 5 minút pri izbovej teplote. Guľčky s naviazanou DNA boli imobilizované inkubáciou 5 min na magnete a supernatant bol odpipetovaný do odpadu. Guľčky boli mimo magnet prepláchnuté 100 µl 70 % etanolu (Lachema, ČR). Miska bola znovu umiestená na magnet a po 5 minútach bol supernatant odstránený. Tento postup prečistenia DNA bol zopakovaný ešte dvakrát. Miska bola sušená 10 min pri izbovej teplote. Extrahovaná a purifikovaná DNA bola eluovaná do 40 µl vody a po inkubácii 2 min pri izbovej teplote bola miska na 10 min umiestnená na magnet a 38 µl roztoku purifikovanej DNA bolo prenesených do novej misky.

4.4.3 Agarózová gélová elektroforéza a vizualizácia DNA

Zmes 4,5g agarózy (SERVA) a 300 ml 0,5x TBE bola privedená do varu v mikrovlnnej rúre (Daewoo KOR 6C2B, ČR) a po ochladení na približne 60 °C vliata do pripravenej elektroforetickej komôrky s vloženými hrebienkami (Owl B2, Thermo

Scientific, USA). Po stuhnutí (približne 30 min) bola agaróza zaliata 0,5 % TBE pufrom. Do gélu boli nanášané vzorky vyzolovanej DNA s farbičkou (5 μ l DNA + 1 μ l 6xSTOP C) a 5 μ l markra (20 ng/ μ l, Gene Ruler, 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas). Elektroforetická separácia DNA prebiehala 30 min pri 150 V. Časť gélu so separovanou DNA bola umiestnená na 45 min do misky s roztokom 0,05 % etidium bromidu (Sigma-Aldrich, USA). Následne bola DNA na géli vizualizovaná pomocou dokumentačného zariadenia (GVM20, ChemiGenius Bioimaging System, Syngene, GB).

4.4.4 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Polymerázová reťazová reakcia prebiehala v objeme 20 μ l na jamku. Reakčná zmes pre PCR obsahovala 200 μ M každého nukleotidu, 1x PCR pufor, 1x Cresol Red, 1U *Taq* polymerázy, po 1 μ M z oboch primerov, 3 ng/ μ l DNA.

PCR reakcia bola prevedená v nasledujúcich krokoch (teplota a čas hybridizácie a extenzie pre jednotlivé primery, vybrané na základe databázy Grain.Genes 2.0, <http://wheat.pw.usda.gov/GG2>, sú uvedené v Tabuľke č.4):

- | | |
|---------------------------|---------------------|
| 1) denaturácia | 95 °C - 5 min |
| 2) 40 cyklov: denaturácia | 95 °C - 30 s |
| hybridizácia primerov | vid'. Tabuľka č.4 |
| extenzia | 72 °C - 30s - 1 min |
| 3) záverečná extenzia | 72 °C - 10 min |

4.4.5 Nedenaturujúca polyakrylamidová gélová elektroforéza

Príprava gélu (4%, 6%)

Gél bol pripravený zmiešaním 5x TBE pufra, 40 % akrylamidu s metylenbisakrylamidom v pomere 19:1, deionizovanej vody, TEMEDu a 10 % APS. Pomer jednotlivých zložiek závisel od hustoty gélu (Tabuľka č.3). Roztok bol naliaty medzi 2 sklá (500 x 220 mm) a po nasadení hrebienka tuhol gél hrúbky 1 mm 30-45 minút.

Prečistenie gélu a jeho nasýtenie etidium bromidom

Stuhnutý gél bol aj so sklami prenesený do vertikálnej elektroforetickej komôrky (Dual Adjustable Mega-Gel Kit C-DASG-400-50, C. B. S. Scientific, USA), naplnenej v katódovej aj anódovovej vaničke 0,5x TBE pufrom (cca 900 ml).

Následne bol z gélu odstránený hrebienok. V spodnej anódovej vaničke elektroforetickej komôrky bolo k pufru pridaných 10 μ l etidium bromidu (10 %, výsledná koncentrácia v roztoku 0,001 %), ktorý vplyvom elektrického napätia nasýtil gél. Prerun prebiehal 45 - 60 min pri 300 V.

Tabuľka č.3: Pomer jednotlivých zložiek na prípravu 4% a 6% gélu (150 ml)

Chemikálie a roztoky	Objem pre 4% gél	Objem pre 6% gél
40% akrylamid : N, N'- metylenbisakrylamid (19:1)	15 ml	22,5 ml
5x TBE pufor	15 ml	15 ml
TEMED	110 μ l	110 μ l
10% APS	1 ml	1 ml
dH ₂ O	doplniť do 150 ml	doplniť do 150 ml

Elektroforetická separácia a vizualizácia DNA

Do prvej a poslednej jamky bolo napipetované po 5 μ l markra (20 ng/ μ l, Gene Ruler, Fermentas) a do ostatných jamiek v objeme 1-8 μ l jednotlivé naamplifikované vzorky DNA. Elektroforéza prebiehala 0,5-2h pri napätí 350 V (v závislosti od dĺžky delených fragmentov DNA). Následne bol gél vyfotený v dokumentačnom zariadení ChemiGenius BioImaging System (Syngene, GB).

4.4.6 Doplnenie genetickej mapy

Genetická mapa poskladaná v diplomovej práci Mgr. Klocovej (2009) a bakalárskej práci Bc. Vanžurovej (2010) bola doplnená o ďalšie SSR a génové markry (Tabuľka 4). Genotypy línií mapovacej populácie pre jednotlivé markry boli porovnané s mapovacím matrixom jednotlivých chromozómov a predpokladaná pozícia markeru bola odhadnutá na základe minimálneho počtu možných rekombinácií. Získané pozície boli verifikované programom JoinMap 4 (Van Ooijen, 2006). Ak frekvencia rekombinácií bola menšia ako 0,4 a LOD skóre väčšie ako 1, bola potvrdená prítomnosť väzby medzi markrami. Prepočítanie veličín bolo prevedené po pridaní každého markra s ohľadom na tri priľahlé markre (ripple). S využitím funkcie *Kosambi* (Kosambi, 1943) bola medzi markrami odhadnutá genetická vzdialenosť a na identifikovanie väzbových skupín bola použitá metóda regresného mapovania.

Tabuľka č.4: Markry s primermi (Grain.Genes 2.0, <http://wheat.pw.usda.gov/GGG2>), podmienky PCR reakcie (teplota a čas nasadania)

Marker	Sekvencia primeru Forward (F), Reverse (R)	Teplota a čas nasadania primerov
Abc 156	F: TTA CGG GAT CAA AGC TGA GGC R: GAC AAG CAA CAC CAA CCA AGC	50°C - 30s
Abc 261	F: AGG AAG CTC AAG AAG GTG AA R: AAA GTC AAG AGT TGC ATC AA	45°C - 1,5 min
Abg 387.2	F: GCA CTG GCA TAG TCT CAC AA R: CGA TGC TGG TTC GGT CAT AC	50°C - 30s
Bcd 98.1	F: CCGTTTGGACAAAGCAACTT R: CTTGCTTCTTAGGCCTGGTG	50°C - 30s
Bcd 98.2	F: TCACCAAGACTTTCGCACAG R: GGCTTGCACAAAACTGC	50°C - 30s
Ksu D23	F: AGG CAG TGA AGA AGA AGA ACC R: TTG AAA TCG ACA GGA TTA GGA	50°C - 30s
Ksu E18	F: TGA GCC GGT TGC TGT TCG TC R: AAG CAC CGA CAT GGT CAC CC	50°C - 30s
Ksu G34	F: GTC TCA GGA AGG TGA TGA TC R: GAG CAG TAG GGT AAA GTA AG	45°C - 1,5 min
Mwg 584	F: GTA TTC TTG GAG GAG AGC GG R: CGA GGT TTA CCC TGG AGA CG	50°C - 30s
Rpg F1R3	F: GGC CAA AGA GGA GAA GAA GG R: GTC TAG AGA AAC CAA AAC CTC CAA	55°C - 30s
Rpg F1R4	F: GGC CAA AGA GGA GAA GAA GG R: TGC AAG ATT ATG ACA CCC AGA	55°C - 30s
Rpg F1R5	F: GGC CAA AGA GGA GAA GAA GG R: GGC TTC CTC GTT GCA TGT AT	55°C - 30s
Rpg F4R5	F: TGC CAC CAG AAT ACA TCA GTA AA R: GGC TTC CTC GTT GCA TGT AT	55°C - 30s
Rpg F5R5	F: GGG AGT GTT GGA CAA TGG AG R: GGC TTC CTC GTT GCA TGT AT	55°C - 30s

4.4.7 Fenotypovanie

Hodnotenie fenotypov bolo prevedené na 87 líniach generácie F₁₀ z mapovacej populácie RILs. Bolo sledovaných desať fenotypových znakov, funkčne zadelených do troch kategórií: agronomicky významné znaky (obsah proteínov v zrne, rozpadavosť klasu, výška rastliny), morfológické znaky (chlpatosť listov, rozkladitosť trsu), znaky pre výnos (dĺžka klasu, počet kláskov na dĺžku klasu, počet kláskov na klas, počet odnoží, priemerná hmotnosť zrna).

Agronomicky významné znaky

- a) **obsah proteínov v zrne** - pre každú líniu spektrometrické meranie obsahu dusíka v 1g sušiny semien prístrojom Nicolet ANTARIS II FT (Thermo Scientific, USA)

- b) rozpadavosť klasu** - zrelé klasy z každej rastliny boli najskôr zozbierané do papierových vreciek a sušené 1 týždeň pri izbovej teplote. Následne boli klasy prehlásené za rozpadavé alebo nerozpadavé, ak k oddeleniu kláskov od centrálného vretena klasu došlo buď samovoľne už počas zbierania alebo vplyvom slabého mechanického ťahu kláskov od vretena klasu.

Znaky pre výnos

- a) dĺžka klasu** - meranie od bázy klasu po posledný kvietok (bez ostí) u piatich najstarších klasov u každej rastliny s presnosťou na 5 mm
- b) hustota klasu** - podiel počtu kláskov a dĺžky klasu u jednotlivých línii
- c) počet kláskov na klas** - počítanie u piatich najstarších klasov pre každú rastlinu, namerané hodnoty boli pre jednotlivé línie spriemerované
- d) počet odnoží (klasov)** - stanovenie počtu stebiel vo výške 20-30 cm nad zemou
- e) priemerná hmotnosť zrna** - váženie 100 vylúpaných zrn zbavených pliev z každej línie s presnosťou na mg, bol stanovený podiel hmotnosti zrn k ich počtu, čiže priemerná hmotnosť jedného zrna z konkrétnej línie

Morfologické znaky

Z morfologických znakov bola podrobená fenotypizácii výška rastliny, rozkladitosť trsu a chlpatosť listov. Analýza pre jednotlivé hodnotené znaky je detailnejšie popísaná nižšie.

Výška rastliny - meranie v dobe mliečnej zrelosti od povrchu zeme po posledný kvietok najvyššieho klasu s presnosťou do 5 mm

Rozkladitosť trsu (tvar rastliny) - vizuálne hodnotenie trsov listov rastlín ešte pred vyrastením stebiel s klasmi - hodnotenie podľa päťstupňovej škály (Obrázok č.10):

- 1) kompaktný trs len so vzpriamenými listami a stebami (Obrázok č.10 A)
- 2) trs kompaktný len pri bázy rastliny, so zvyšujúcou sa vzdialenosťou od bázy rastliny kompaktnosť trsu klesá (tvar písmena V, Obrázok č.10 B)
- 3) málo kompaktný trs s viditeľným rozložením listov a stebiel rôzne v priestore (Obrázok č.10 C)
- 4) trs s väčšinou vodorovne ležiacich listov (Obrázok č.10 D)
- 5) plochý trs len s listami ležiacimi na zemi (Obrázok č.10 E)



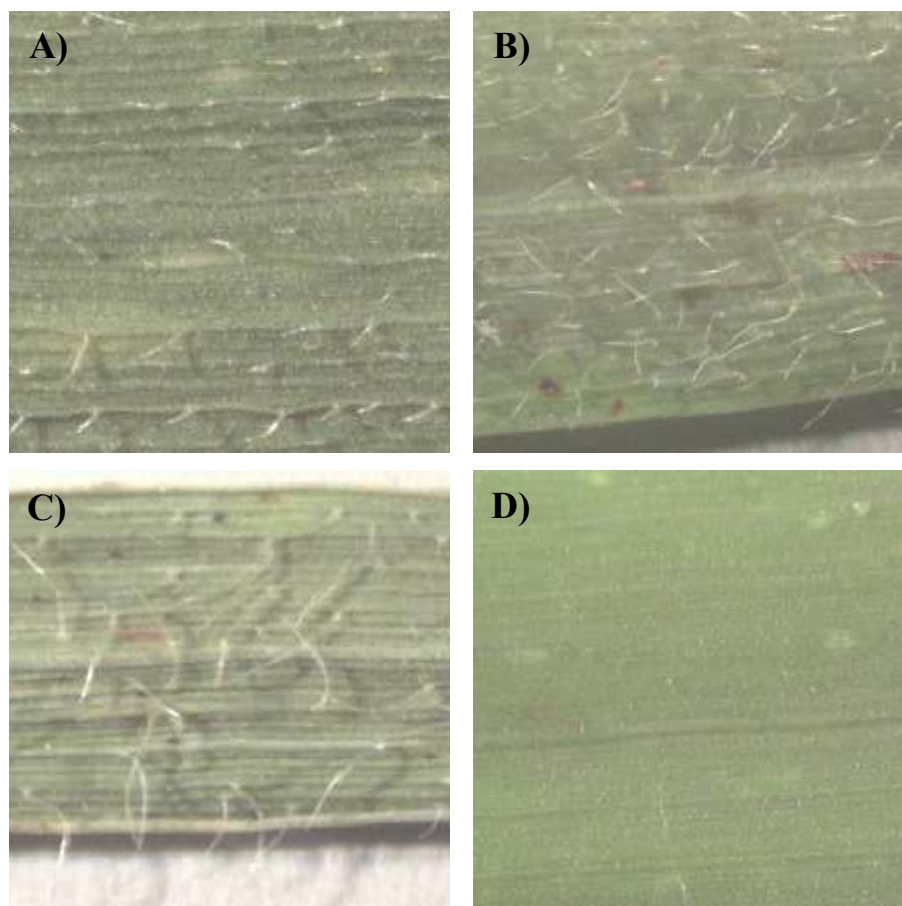
Obrázok č. 10: Porovnanie piatich typov rozkladitosti trsu vyskytujúcich sa u rastlín *T. monococcum* L.

A) Kompaktný trs len so vzpriamenými listami a stebkami, charakteristický pre *T. monococcum* L. subsp. *monococcum* cv. DV92 B) Trs kompaktný len pri bázy rastliny, so zvyšujúcou sa vzdialenosťou od bázy rastliny kompaktnosť trsu klesá (tvar písmena V) C) Málo kompaktný trs s viditeľným rozložením listov a stebiel rôzne v priestore D) Trs s väčšinou ležiacich listov E) Plochý trs len s listami ležiacimi na zemi, typický pre *T. monococcum* L. subsp. *aegilopoides* cv. G3116

Analýza ochlpenia listov pšenice

Z každej rastlinnej línie boli náhodne vzaté 3 posledné listy (flag leaves). Na každom liste z adaxiálnej strany boli počítané chlpy na 3 plochách, každá o rozlohe 8 mm x šírka listu. Oblasti na počítanie chlпов pozdĺž listu boli síce umiestňované náhodne, ale vždy do vzdialenosti 1/3 až 1/2 listu od jeho bázy. V týchto miestach sa šírka listu ešte nezačínala výrazne zužovať a dosahovala približne rovnakú veľkosť. Týmto systémom fenotypovania

sa zaručilo získanie dát z približne rovnakých plôch pre konkrétny list. Počet chlпов na jednotku plochy sa stanovoval pod lupou (Carl Zeiss, Jena) manuálnym počítaním. Aby sa predošlo skresleniu výsledkov do počítania neboli zahrnuté trichómy vyskytujúce sa na čepeli listu, pretože sú náchylnejšie k vylomeniu, v porovnaní s chlpmi vyskytujúcimi sa na ploche listu. Taktiež neboli započítané drobné chlčky tvoriace súvislý porast, vyskytujúci sa rovnako u oboch rodičov. Príklad rôznorodosti ochlpenia listov je ukázaný na Obrázku č.11.



Obrázok č.11: Porovnanie chlpatosti listov u vybraných línii *T. monococcum* L.

Listy sú fotené pri zväčšení 1x (stereomikroskop SZX16, Olympus, USA). **A)** Na výseku z listu RIL č. 113 sú viditeľné krátke husté chlpy. **B)** Husté ochlpenie s dlhými chlpmi sa vyskytuje napríklad u línie č. 180. **C)** Obrázok znázorňujúci dlhé chlpy s nízkou hustotou u rodičovskej rastliny *T. monococcum* L. subsp. *aegilopoides* cv. G3116. **D)** Pre *T. monococcum* L. subsp. *monococcum* cv. DV92 je charakteristická bezchlповosť.

4.4.8 Analýza QTLs

Údaje o fenotype rastlín *T. monococcum* L. boli zozbierané a prevedené do tabuliek v programe *Microsoft Office Excel 2007*, kde boli v prípade potreby počítané jednoduché matematické operácie, v závislosti od typu zozbieraných údajov. Následne boli dáta podrobené analýze, ktorú previedol Ing. Tibor Sedláček pomocou programu *R/Qtl* (Broman *et al.*, 2003). Na detekciu lokusov s kvantitatívnymi znakmi bolo použité jednoduché mapovanie pomocou intervalu.

4.4.9 Použité programy

Namerané a experimentálne získané údaje na vytvorenie genetickej väzbovej mapy a prevedenie QTL analýzy boli spracované s použitím nasledujúcich počítačových programov:

- tvorba genetickej väzbovej mapy - JoinMap 4 (Van Ooijen, 2006)
- spracovanie fenotypických údajov, jednoduché štatistické metódy - Microsoft Office Excel 2007
- detekcia výskytu lokusov s kvantitatívnymi znakmi - R/Qtl (Broman *et al.*, 2003)

5. VÝSLEDKY

S návaznosťou na diplomovú prácu Mgr. Klocovej (2010) boli pridané výsledky fenotypovania ďalšej sezóny, aby verifikovali identifikované lokusy ovplyvňujúce sledované kvantitatívne znaky na mapovacej populácii z kríženia kultivovanej formy *T. monococcum* L. subsp. *monococcum* cv. DV92 s divokou formou *T. monococcum* L. subsp. *aegilopoides* cv. G3116. Taktiež bola na tejto populácii optimalizovaná metodika hodnotenia chlpatosti na „flag“ listoch a rozšírené spektrum sledovaných znakov o počet odnoží na rastlinu a hustotu klasu.

5.1 Analýza QTL

Boli hodnotené 3 agronomicky (obsah proteínov v zrne, rozpadavosť klasu, výška rastliny), 2 morfológicky (chlpatosť listov, rozkladitosť trsu) významné znaky a 5 prvkov výnosu (dĺžka a hustota klasov, počet kláskov na klas, počet odnoží, priemerná hmotnosť zrna). Zozbierané dáta boli pre každý kvantitatívny znak samostatne spracované programom *R/Qtl* (Broman *et al.*, 2003). Výstupom z programu bol graf, určujúci hodnotu LOD skóra pre jednotlivé píky a ich umiestnenie na chromozómoch s tabuľkou troch markrov s najsilnejšou asociáciou k danému znaku. Následne boli na chromozómoch porovnané polohy píkov, so štatisticky významným LOD skóre, zo zberu dát medzi rokmi 2009 (Klocová, 2010) a 2010 pre jednotlivé QT lokusy. Celkovo bolo na 7 chromozómoch A genómu zamapovaných 15 QT lokusov, najviac na chromozóme 2A^m (4 QTLs). Umiestnenie jednotlivých mapovaných lokusov pre hodnotené kvantitatívne znaky je zakreslené v Obrázku č.21. Jedine fenotypovanie rozkladitosti trsu v oboch rokoch neprineslo údaje umožňujúce zamapovanie tohto znaku do genómu *T. monococcum* L.

Lokus ovplyvňujúci obsah proteínov v zrne (QGpc) bol na základe analýzy zo zozbieraných dát v roku 2010 (DArT markry 348882 a 469420) detekovaný približne v druhej tretine chromozómu 5A^m, v oblasti 66,7 - 68,7 cM (markry 348882 a 469420, Obrázok č.21). I keď v grafe z roku 2009 neboli dáta pre pík v tejto polohe na chromozóme 5A^m významné, v roku 2010 už boli štatisticky významné, len s 5% pravdepodobnosťou výskytu falošných pozitív (Obrázok č.12 B).

Rozpadavosť klasu (QSh), ako ďalší z agronomicky významných znakov, bola zamapovaná na chromozóm 3A^m a 7A^m v oblastiach 38-45,1 cM (DArT markry 861753, 470263) a 84,7 cM (DArT marker 469732, Obrázok č.21) len s 5 % pravdepodobnosťou výskytu falošných pozitív pre oba chromozómy (Obrázok č.13 B). Na základe údajov z roku

2009 píky v uvedených oblastiach na chromozóme 3A^m a 7A^m neprekročili hodnotu LOD thresholdu (Obrázok č.13 A).

Lokus vplývajúci na výšku rastliny (QHt) bol na základe signifikantných výsledkov z roku 2010 zamapovaný na chromozóm 2A^m v oblasti 52,3-56,0 cM (DArT markry 376273-861777, Obrázok č.21) a 3A^m v oblasti okolo 43,8 cM (DArT marker 377119, Obrázok č.21). Dáta získané v roku 2009 neurčili lokalizáciu QHt so štatistickou významnosťou v rovnakej časti chromozómu 2A^m ani 3A^m (Obrázok č.14, Obrázok č.21).

QTL pre dĺžku klasu (QEI) bol tiež zamapovaný na dva chromozómy, 2A^m (52,3-56,0 cM, DArT markry 376273-861777, Obrázok č.21) a 4A^m (38,4-38,9 cM, DArT markry 345359-861787, Obrázok č.21). V grafe pre rok 2010 dáta preukázali štatistickú významnosť prekročením LOD thresholdu (Obrázok č.15 B), čím bol potvrdený výskyt QTL pre dĺžku klasu na oboch chromozómoch. V grafe pre rok 2009 sa síce sledované píky vyskytovali len v podobnej oblasti chromozómu 4A^m, ale dáta neboli signifikantné (Obrázok č.15 A).

Na základe hodnotenia fenotypu z roku 2010 bol zamapovaný výskyt lokusu určujúceho počet kláskov na klas (QSpn) na chromozóm 1A^m v oblasti 115,6 cM (SSR marker Mwg503_180bp, Obrázok č.21). Sledovaný píky v grafe z roku 2009 na chromozóme 1A^m vykazoval rozdielnú polohu oproti grafu z roku 2010 (Obrázok č.16 A, B).

Ďalší kvantitatívny znak, ovplyvňujúci výnos, bol zamapovaný na dvoch chromozómoch - 2A^m a 5A^m. Lokus pre priemernú hmotnosť zrna (QTgw) bol na základe signifikantných dát z oboch rokov (Obrázok č.17 A, B) pre oblasť okolo 34 cM (DArT marker 470029, Obrázok č.21) zamapovaný na chromozóm 2A^m. Zozbierané fenotypové údaje naznačili v grafe pre rok 2009 výskyt píky na chromozóme 5A^m (Obrázok č.17 A), ale zamapovanie QTL pre priemernú hmotnosť zrna bolo potvrdené až na základe štatisticky významných dát z roku 2010 (Obrázok č.17 B , 114,4-114,5 cM, DArT markry 469467, 470190, Obrázok č.21) .

Počet odnoží u rastlín (QTn), ako jeden z významných znakov pre výnos v sledovanej mapovacej populácii, odpovedá počtu klasov na rastlinu. Odnože, ktoré by neprodukovali klas, neboli u pšenice jednozrnovej pozorované. Tento znak bol zatiaľ hodnotený len v roku 2010. U zozbieraných dát hodnota LOD skóre prekročila hodnotu LOD thresholdu na troch chromozómoch (Obrázok č.18 A). Lokus ovplyvňujúci počet odnoží bol tak mapovaný na chromozómy 1A^m (30,5-30,7 cM, DArT markry 348257, 372403, 372720, 377654, Obrázok č.21), 4A^m (začiatok chromozómu až 8,4 cM, DArT markry 120684, 470366, Obrázok č.21) a 6A^m (73,8 cM, DArT marker 862073, Obrázok č.21).

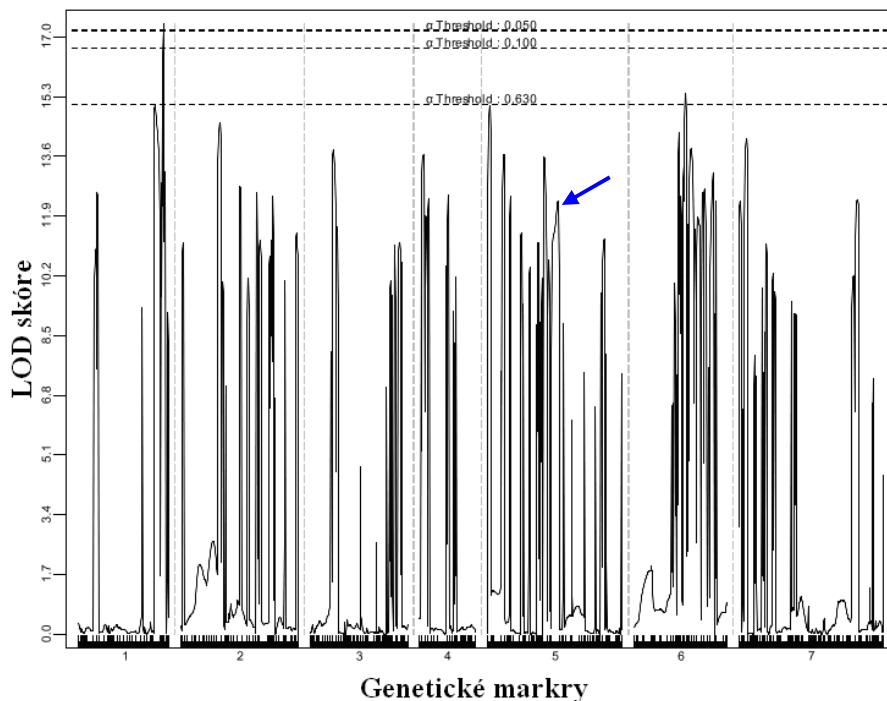
Podobne aj hustota klasu (QSd), bola hodnotená len pre rok 2010. Dáta boli štatisticky významné len pre chromozóm 2A^m, s pravdepodobnosťou výskytu chyby do 5 % (Obrázok č.18 B). Lokus pre hustotu klasu bol tak zamapovaný na chromozóme 2A^m v oblasti približne 40,1 - 43,7 cM (DArT markry 119873, 469293, Obrázok č.21).

Posledným detekovaným lokusom s kvantitatívnym znakom je lokus ovplyvňujúci chlpatosť listov (QHI). Vzhľadom z vytvoreniu novej metodiky fenotypovania je výsledok popísaný detailnejšie. V roku 2009 bol tento fenotyp hodnotený len na základe vizuálneho pozorovania a zaznamenávaná ako kvalitatívny znak = prítomnosť či neprítomnosť chlпов. Fenotypizácia v roku 2010 bola presnejšia a pozostávala z počítania jednotlivých chlпов v určených oblastiach listu. V grafe hodnotiacom zozbierané údaje z roku 2009 (Obrázok č.19 A) prekročilo LOD skóre LOD treshold len u dvoch chromozómov, 3A a 6A, s pravdepodobnosťou výskytu falošných pozitív v dátach do 63%. Na základe fenotypizácie z roku 2010 (Obrázok č.19, B) boli stanovené síce 4 píky prekračujúce LOD treshold, ale len poloha píku na chromozóme 3A sa zhodovala s umiestnením píku v grafe z roku 2009. Navyše údaje, umožňujúce vytvorenie tohto píku, sa preukázali ako štatisticky veľmi významné, s pravdepodobnosťou výskytu chyby maximálne 5%. Tým bol stanovený výskyt lokusu ovplyvňujúceho chlpatosť listov na chromozóme 3A^m v oblasti 53,3 cM (DArT markry 119686, 860851, Obrázok č.21).

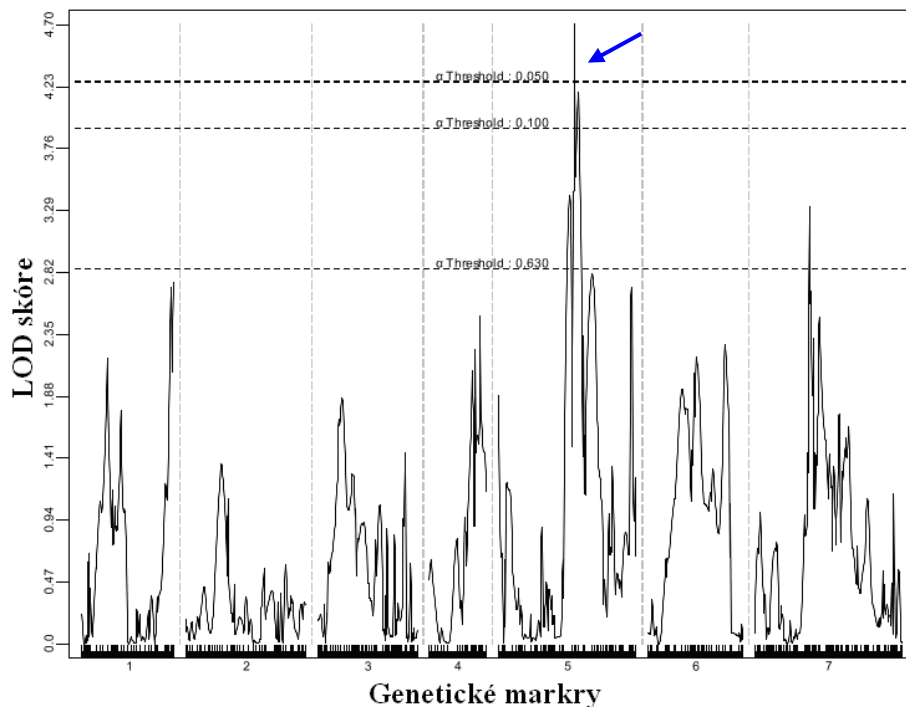
Obrázok č.12: Grafy (A, B) popisujúce hodnoty LOD skóra pre obsah proteínov v zrne prislúchajúce jednotlivým genetickým markrom na chromozómoch

Modré šípky poukazujú v oboch grafoch na píky s rovnakou polohou na chromozóme 5A^m. V grafe pre rok 2010 dáta preukázali štatistickú významnosť prekročením LOD tresholdu, čo naznačuje výskyt QTL pre obsah proteínov v zrne na chromozóme 5A^m.

A) Údaje z roku 2009 pre kvantitatívny znak - obsah proteínov v zrne.



B) Údaje z roku 2010 pre kvantitatívny znak - obsah proteínov v zrne.

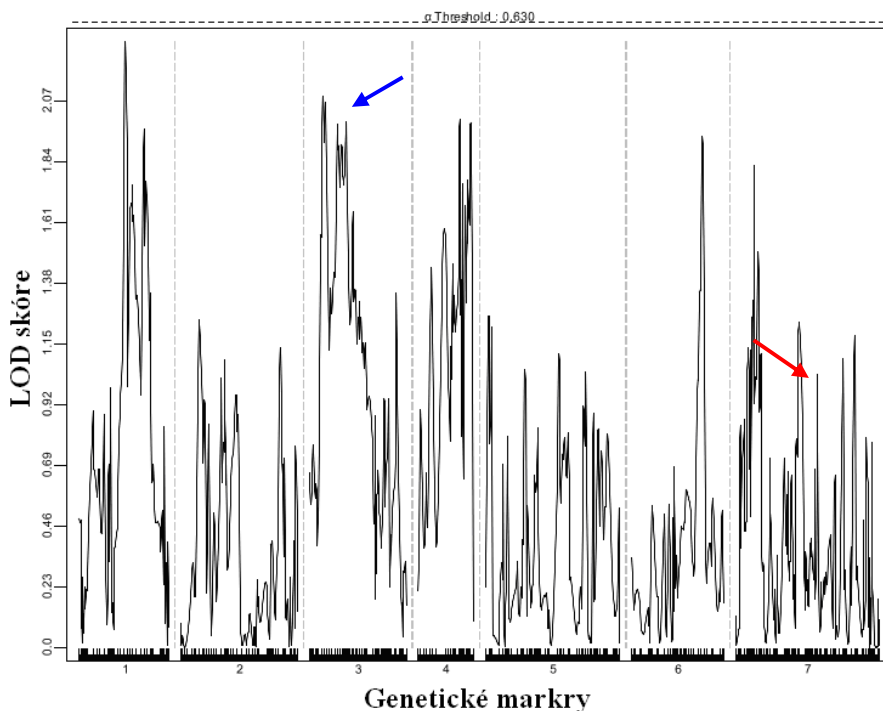


Obrázok č.13: Grafy (A, B) popisujúce hodnoty LOD skóra pre rozpadavosť klasu prislúchajúce jednotlivým genetickým markrom na chromozómoch

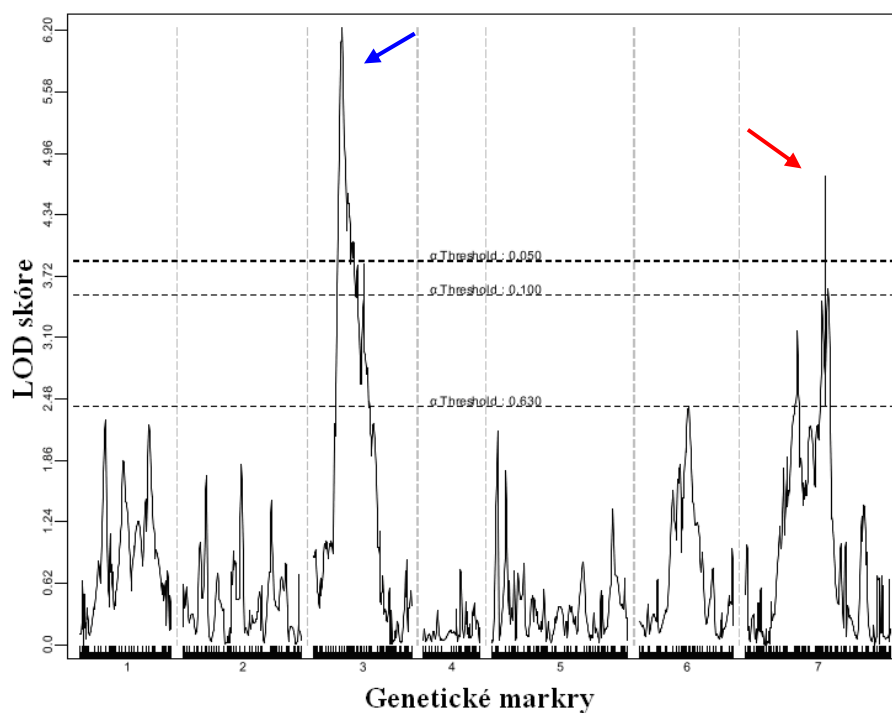
Modré šípky poukazujú v oboch grafoch na píky s rovnakou polohou na chromozóme 3A^m. V grafe pre rok 2010 dáta preukázali štatistickú významnosť prekročením LOD tresholdu, čo naznačuje výskyt QTL pre rozpadavosť klasu na chromozóme 3A^m.

Červené šípky ukazujú na píky, ktoré vďaka zhodnej lokalizácii na chromozóme 7A^m a aj prekročením LOD tresholdu v grafe pre rok 2010, čo naznačuje umiestnenie ďalšieho QT lokusu pre rozpadavosť klasu.

A) Údaje z roku 2009 pre kvantitatívny znak - rozpadavosť klasu.



B) Údaje z roku 2010 pre kvantitatívny znak - rozpadavosť klasu.

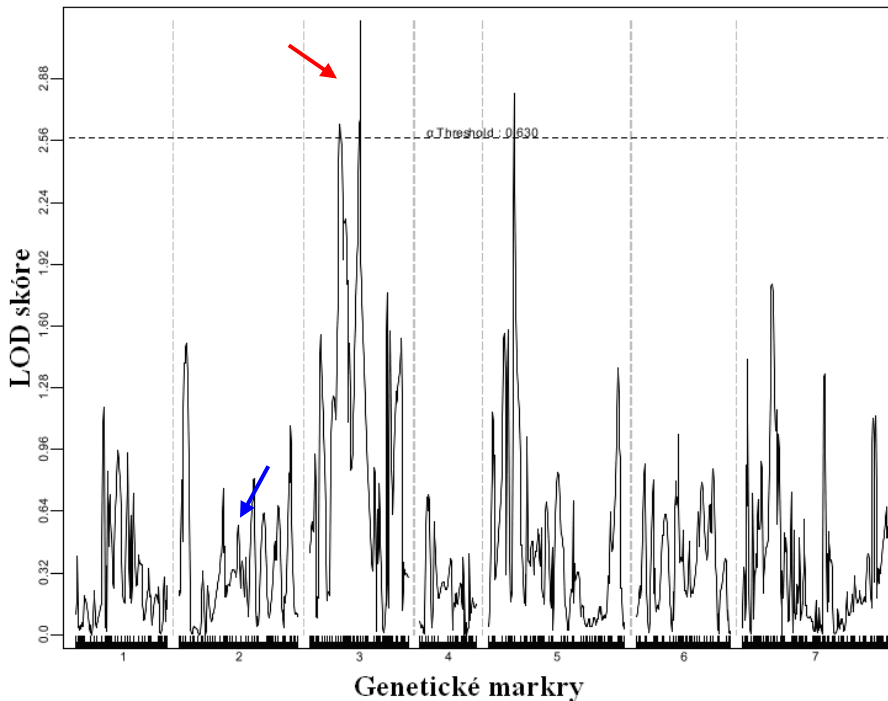


Obrázok č.14: Grafy (A, B) popisujúce hodnoty LOD skóra pre výšku rastliny prislúchajúce jednotlivým genetickým markrom na chromozómoch

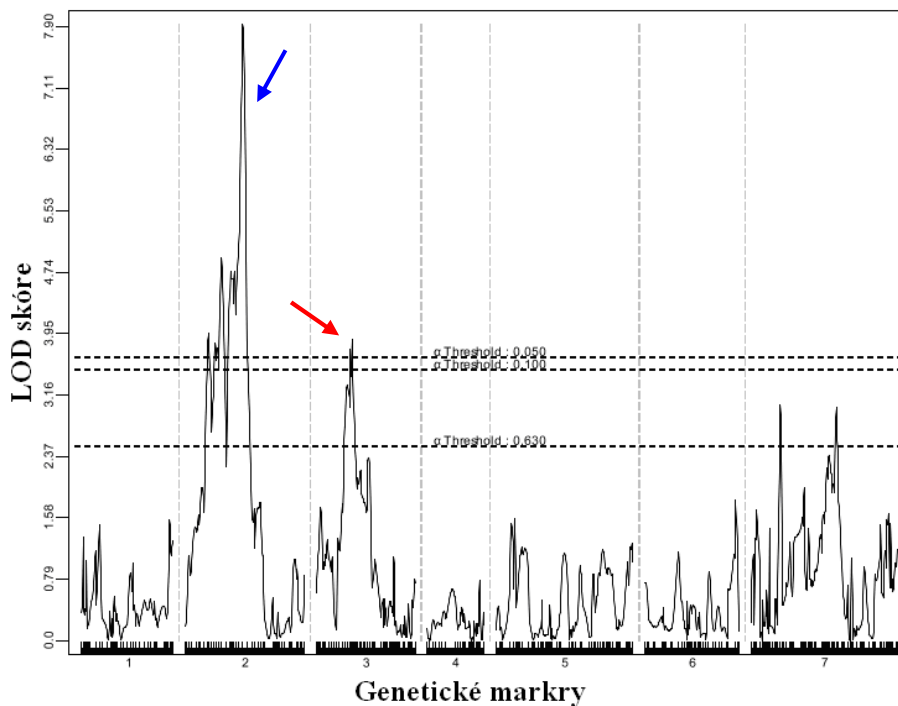
Modré šípky poukazujú v oboch grafoch na píky s rovnakou polohou na chromozóme 2A^m. Štatistická významnosť však bola preukázaná len u dát získaných v roku 2010 prekročením LOD tresholdu, čo naznačuje výskyt QTL pre výšku rastliny na chromozóme 2A^m.

Červená šípka v grafe pre rok 2010 ukazuje na pik, ktorý prekročením 0,05 LOD tresholdu stanovili s vysokou štatistickou významnosťou umiestnenie ďalšieho QT lokusu pre výšku rastliny na chromozóme 3A^m. V grafe pre rok 2009 na chromozóme 3A^m sa síce vyskytoval pik potvrdzujúci signifikantnosť dát (červená šípka), ale jeho lokalizácia nebola zhodná s polohou lokusu v grafe pre rok 2010.

A) Údaje z roku 2009 pre kvantitatívny znak - výška rastliny.



B) Údaje z roku 2010 pre kvantitatívny znak - výška rastliny.

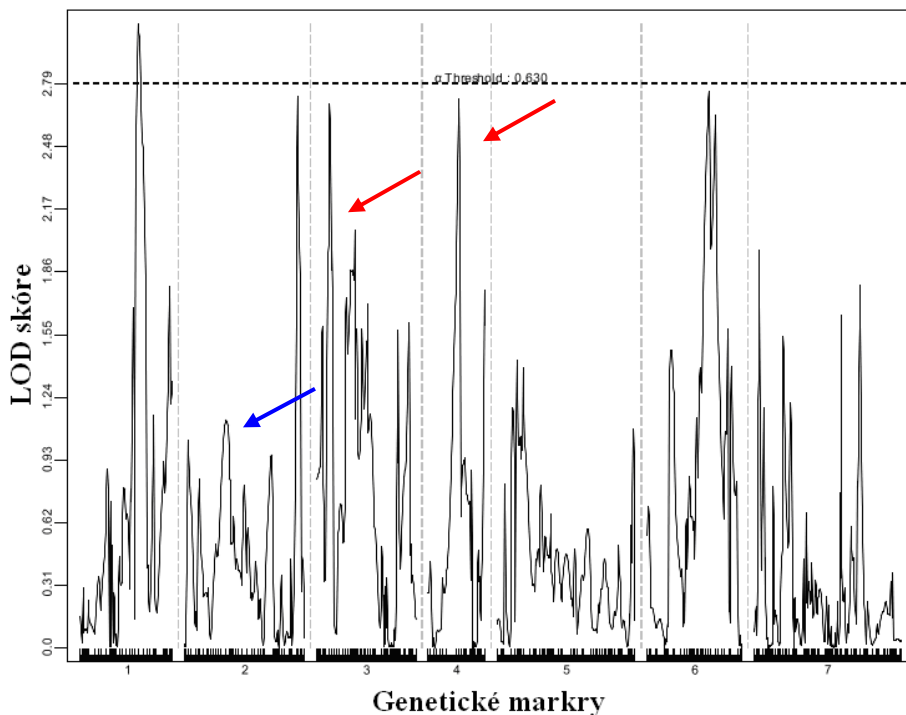


Obrázok č.15: Grafy (A, B) popisujúce hodnoty LOD skóra pre dĺžku klasu prislúchajúce jednotlivým genetickým markrom na chromozónoch

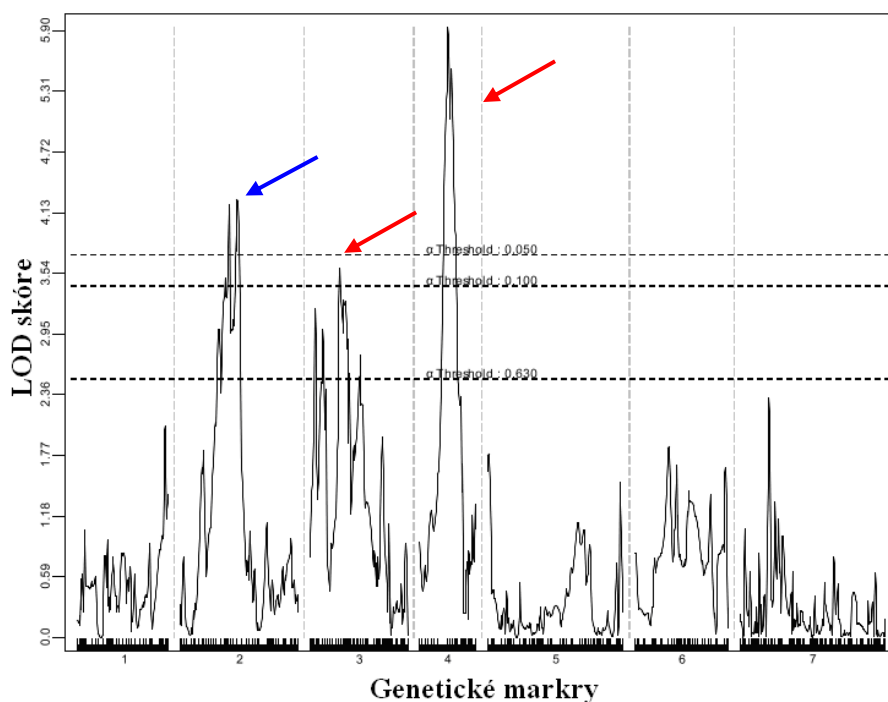
Modré šípky poukazujú v oboch grafoch na píky s rovnakou polohou na chromozóme 2A^m. V grafe pre rok 2010 dáta preukázali štatistickú významnosť prekročením LOD threshoudu, čo naznačuje výskyt QTL pre dĺžku klasu na chromozóme 2A^m.

Červené šípky ukazujú na píky, ktoré vďaka zhodnej lokalizácii na chromozóme 3 a 4 a prekročením LOD threshoudu v grafe pre rok 2010, naznačujú prítomnosť ďalších QT lokusov ovplyvňujúcich dĺžku klasu.

A) Údaje z roku 2009 pre kvantitatívny znak - dĺžka klasu.



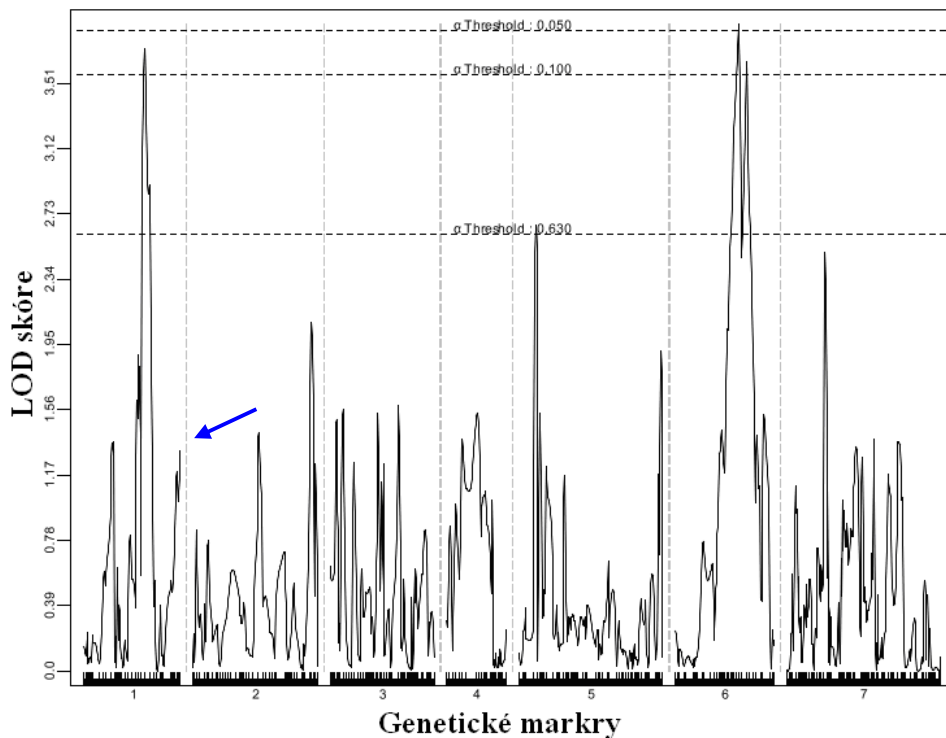
B) Údaje z roku 2010 pre kvantitatívny znak - dĺžka klasu.



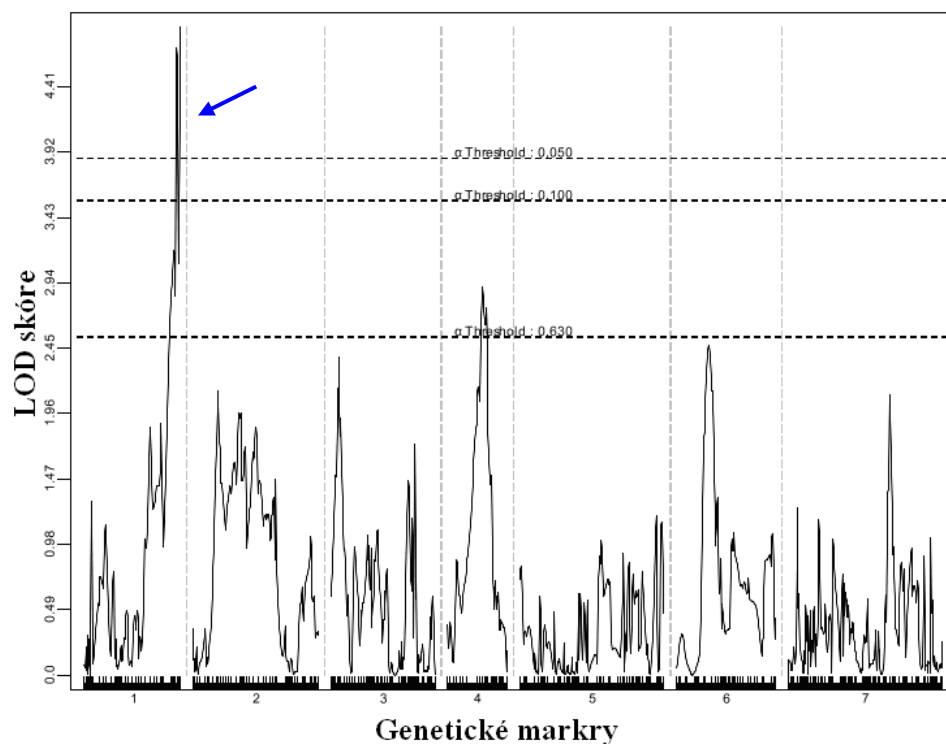
Obrázok č.16: Grafy (A, B) popisujúce hodnoty LOD skóra pre počet kláskov na klase prislúchajúce jednotlivým genetickým markrom na chromozómoch

Modré šípky poukazujú v oboch grafoch na píky s približne rovnakou polohou na chromozóme 1A^m. Štatistická významnosť bola preukázaná u dát získaných z roku 2010 prekročením LOD tresholdu, čo naznačuje výskyt QTL pre počet kláskov na klas na chromozóme 1A^m.

A) Údaje z roku 2009 pre kvantitatívny znak - počet kláskov na klas.



B) Údaje z roku 2010 pre kvantitatívny znak - počet kláskov na klas.

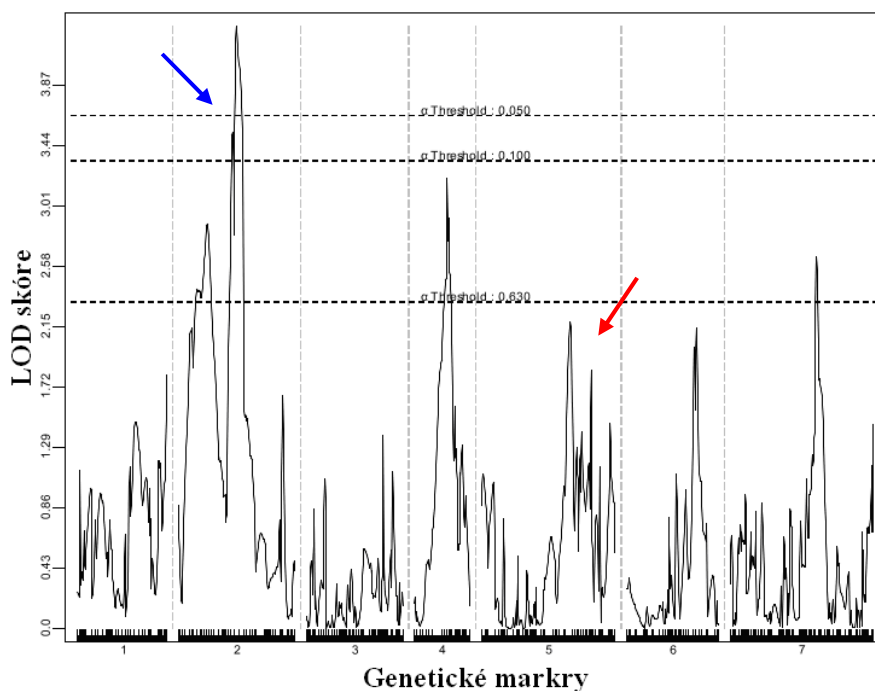


Obrázok č.17: Grafy (A, B) popisujúce hodnoty LOD skóra pre priemernú hmotnosť zrna prislúchajúce jednotlivým genetickým markrom na chromozómoch

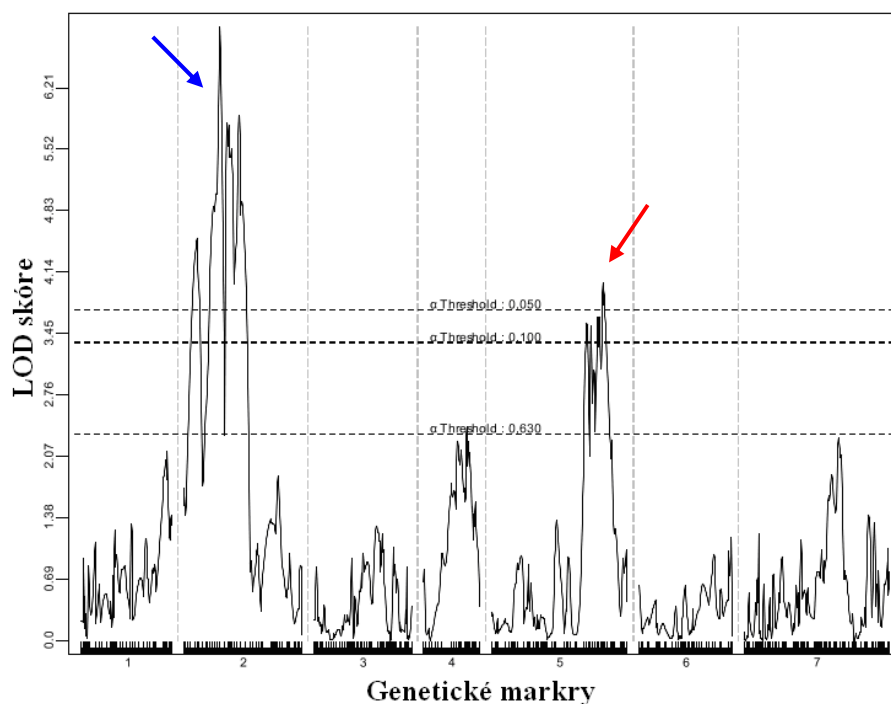
Modré šípky poukazujú v oboch grafoch na píky s rovnakou polohou na chromozóme 2A^m. V grafoch pre oba roky dáta preukázali štatistickú významnosť prekročením LOD tresholdu, čím bol potvrdený výskyt QTL pre priemernú hmotnosť zrna na chromozóme 2.

Červené šípky ukazujú na píky, ktoré vďaka zhodnej lokalizácii na chromozóme 5A^m a aj prekročením LOD tresholdu v grafe pre rok 2010, stanovili umiestnenie ďalšieho možného QT lokusu ovplyvňujúceho priemernú hmotnosť zrna.

A) Údaje z roku 2009 pre kvantitatívny znak - priemerná hmotnosť zrna



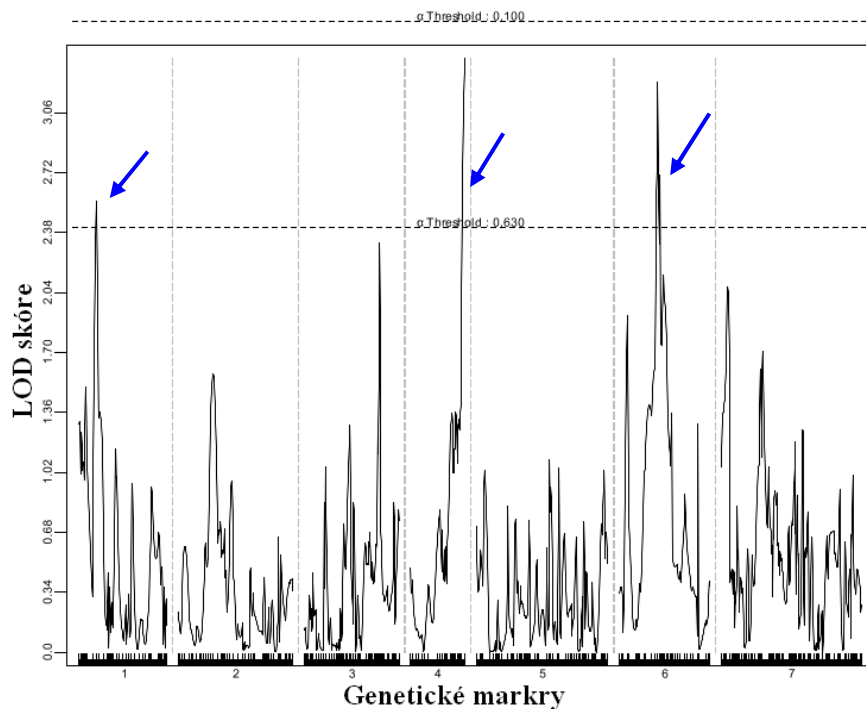
B) Údaje z roku 2010 pre kvantitatívny znak - priemerná hmotnosť zrna



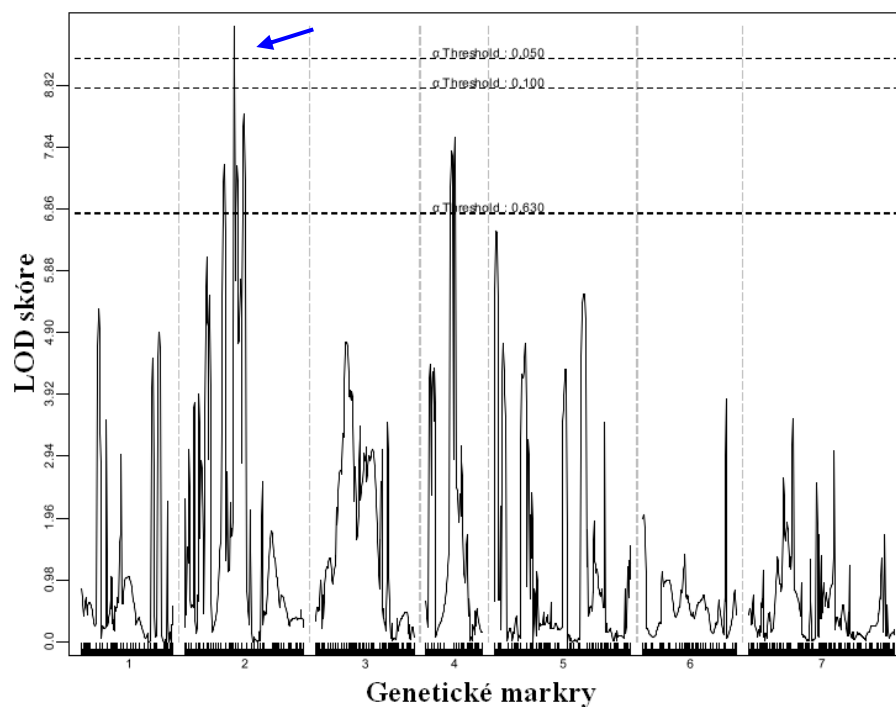
Obrázok č.18: Grafy (A, B) popisujúce hodnoty LOD skóra pre počet odnoží a hustotu klasu prislúchajúce jednotlivým genetickým markrom na chromozómoch

Modré šípky ukazujú v oboch grafoch na píky, na základe ktorých, vďaka významným dátam, bola stanovená poloha QT lokusov na chromozómoch 1A^m, 4A^m, 6A^m pre počet odnoží a na chromozóme 2A^m lokus ovplyvňujúci hustotu klasu.

A) Údaje z roku 2010 pre kvantitatívny znak - počet odnoží



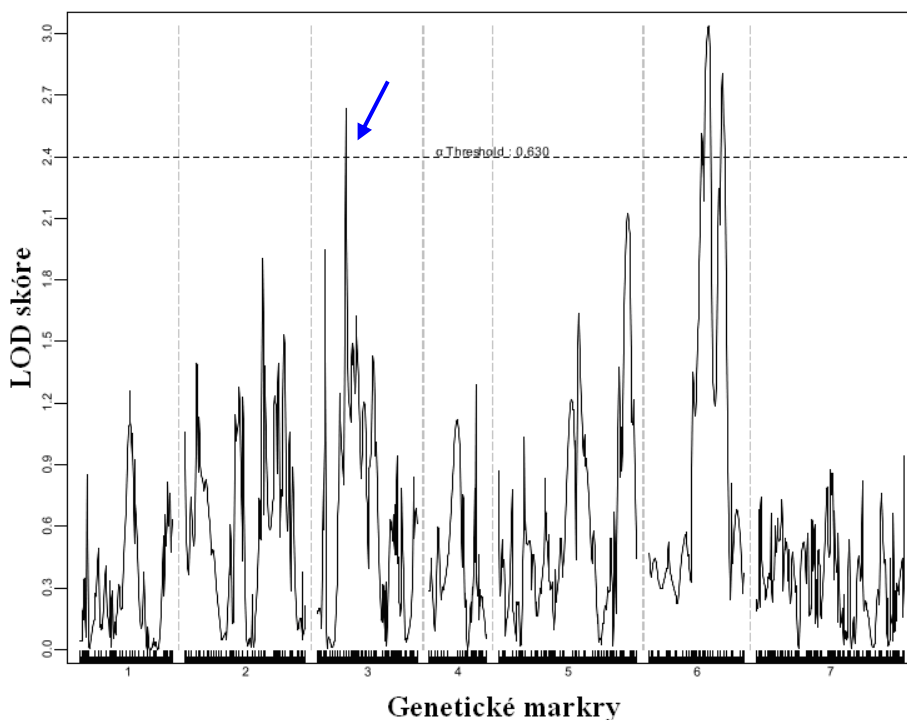
B) Údaje z roku 2010 pre kvantitatívny znak - hustota klasu



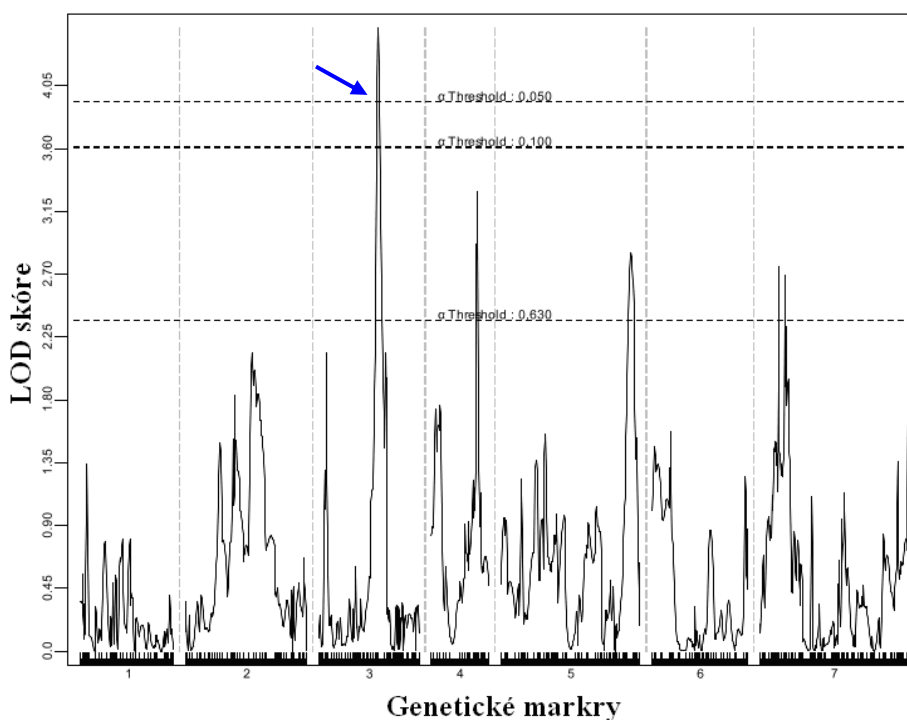
Obrázok č.19: Grafy (A, B) popisujúce hodnoty LOD skóra pre chlpatosť listov prislúchajúce jednotlivým genetickým markrom na chromozómoch

Modré šípky poukazujú v oboch grafoch na píky s približnou polohou na chromozóme 3A^m. Štatistická významnosť bola preukázaná u dát získaných z oboch rokov prekročením LOD tresholdu, čím bol potvrdený výskyt QTL pre chlpatosť listov na chromozóme 3A^m.

A) Údaje z roku 2009 pre kvantitatívny znak - chlpatosť listov.

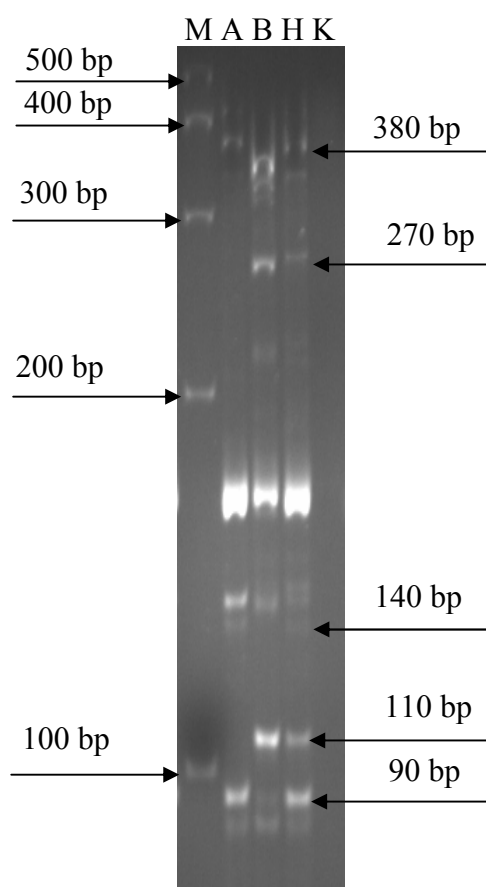


B) Údaje z roku 2010 pre kvantitatívny znak - chlpatosť listov.



5.2 Molekulárne markry pre zahustenie *T. monococcum* L. mapy

Na zahustenie genetickej mapy *T. monococcum* L. bolo použitých 28 STS markrov z toho 8 úspešne (Tabuľka č.5). Tieto zamapované markry vykazovali na 4% prípadne 6% polyakrylamidovom géli od jedného do päť polymorfných fragmentov (Obrázok č.20). Všetky detekované polymorfizmy boli dominantné. Zvyšných 10 markrov nebolo zamapovaných dôsledkom monomorfizmu alebo nejednoznačného polymorfizmu (výskyt artefaktov) medzi rodičovskými líniami.



Obrázok č.20: Príklad multilokusového polymorfizmu STS markra Mwg 584 na 6% polyakrylamidovom géli

M - veľkostný marker Gene Ruler™100bp, Plus DNA Ladder (Fermentas, Kanada), A - rodič Dv92, B - rodič G3116, H - heterozygot (vznik zmiešaním DNA z oboch rodičov), K - negatívna kontrola. Na pravej strane je šípkami označených 5 polymorfných dominantných fragmentov a ich veľkosť (bp). Šípky naľavo zvyrazňujú veľkostné fragmenty použitého markra.

5.3 Genetická väzbová mapa

Na vytvorenie genetickej mapy *T. monococcum* L. bolo k výsledkom z diplomovej práce Mgr. Klocovej (2010) a bakalárskej práce Bc. Vanžurovej (2011) doplnených ďalších 8 SSR markrov (Tabuľka č.6), po jednom na chromozómy 2A^m a 3A^m, dva na chromozóm 5A^m a štyri na chromozóm 7A^m. Multilokusový marker Rpg F1R5 mapoval na dvoch chromozómoch 5A^m a 7A^m, zvyšné markry boli zamapované vždy len na jednom chromozóme. Na usporiadanie markrov na chromozómy bol použitý program JoinMap 4 (Van Ooijen, 2006) s použitím vyššej presnosti na zamapovanie markrov oproti mape z roku 2010 (Klocová, 2010).

Celková dĺžka mapy *T. monococcum* L. na siedmych chromozómoch dosiahla hodnotu 841,7 cM (Tabuľka č.5). Celkovo bolo zamapovaných 648 markrov z toho 537 DArT, 56 STS, 16 SSR, 28 IRAP, 7 markrov odvodených z BAC koncových sekvencií a 4 gény zo pšenice (Br-A1, Vrn 1,2,3). Priemerná vzdialenosť medzi susednými markrami bola 1,3 cM (Tabuľka č.5). Najkratší chromozóm 4A^m bol z tohto priemerovania vyradený, z dôvodu prítomnosti medzery (Obrázok č.21). U ostatných 6 chromozómov boli určené väzbové skupiny bez medzier, no orientácia chromozómov a poloha centroméry nebola zatiaľ stanovená. Najdlhším chromozómom s najväčším počtom zamapovaných markrov (152) bol chromozóm 7A^m (Tabuľka č.5, Obrázok č.21).

Tabuľka č.5: Dĺžka chromozómov [cM], počet zamapovaných molekulárnych markrov a ich priemerná vzdialenosť na genetickej väzbovej mape *T. monococcum* L. (pridané výsledky z diplomovej práce Klocovej, 2010)

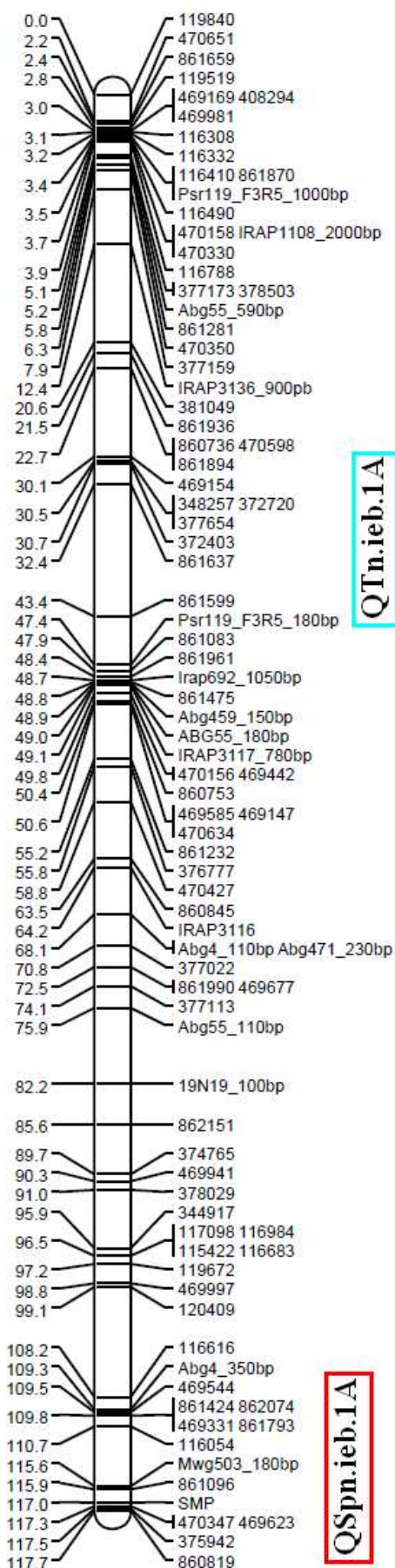
Chromozóm <i>T. monococcum</i>	Dĺžka [cM]		Počet zamapovaných markrov		Priemerná vzdialenosť medzi susednými markrami [cM]	
	Dosiahnuté výsledky	Klocová (2010)	Dosiahnuté výsledky	Klocová (2010)	Dosiahnuté výsledky	Klocová (2010)
1A ^m	117,7	121,526	90	102	1,3	1,2
2A ^m	130,3	157,085	79	93	1,7	1,7
3A ^m	123,6	114,73	99	111	1,3	1,0
4A ^m	65,9	83,46	56	49	-	1,7
5A ^m	158	117,685	98	89	1,6	1,3
6A ^m	80,5	124,945	74	69	1,1	1,8
7A ^m	165,7	108,607	152	115	1,1	0,9
Spolu	841,7	828,038	648	628	1,3	1,3

Tabuľka č.5: Markry, sekvencie primerov s podmienkami a časom nasadania, prípadná lokalizácia na chromozómoch *T. monococcum* L.

Zamapované markry majú v názve určenú aj veľkosť polymorfného fragmentu v bp (názov markru_ dĺžka polymorfného fragmentu), ostatné markry neboli zamapované na *T. monococcum* L. v dôsledku vyskytujúceho sa monomorfizmu alebo nejednoznačného polymorfizmu. Sekvencie primerov sú získané z Grain.Genes 2.0 (<http://wheat.pw.usda.gov/GGG2>).

Marker	Sekvencia primeru Forward (F), Reverse (R)	Teplota a čas nasadania primerov	Chromozóm
Ksu G34_350	F: GTC TCA GGA AGG TGA TGA TC R: GAG CAG TAG GGT AAA GTA AG	45°C - 1,5 min	2A ^m
Rpg F1R3_170	F: GGC CAA AGA GGA GAA GAA GG R: GTC TAG AGA AAC CAA AAC CTC CAA	55°C - 30s	3A ^m
Ksu E18_230	F: TGA GCC GGT TGC TGT TCG TC R: AAG CAC CGA CAT GGT CAC CC	50°C - 30s	5A ^m
Rpg F1R5_370	F: GGC CAA AGA GGA GAA GAA GG R: GGC TTC CTC GTT GCA TGT AT	55°C - 30s	
Mwg 584_140	F: GTA TTC TTG GAG GAG AGC GG R: CGA GGT TTA CCC TGG AGA CG	50°C - 30s	7A ^m
Rpg F1R5_550	F: GGC CAA AGA GGA GAA GAA GG R: GGC TTC CTC GTT GCA TGT AT	55°C - 30s	
Rpg F5R5_260	F: GGG AGT GTT GGA CAA TGG AG R: GGC TTC CTC GTT GCA TGT AT	55°C - 30s	
Rpg F4R5_1100	F: TGC CAC CAG AAT ACA TCA GTA AA R: GGC TTC CTC GTT GCA TGT AT	55°C - 30s	
Abc 156	F: TTA CGG GAT CAA AGC TGA GGC R: GAC AAG CAA CAC CAA CCA AGC	50°C - 30s	monomorfné alebo nereprodukované <i>T. monococcum</i> L.
Abc 261	F: AGG AAG CTC AAG AAG GTG AA R: AAA GTC AAG AGT TGC ATC AA	45°C - 1,5 min	
Abg 387.2	F: GCA CTG GCA TAG TCT CAC AA R: CGA TGC TGG TTC GGT CAT AC	50°C - 30s	
Bcd 98.1	F: CCGTTTGGACAAAGCAACTT R: CTTGCTTCTTAGGCCTGGTG	50°C - 30s	
Bcd 98.2	F: TCACCAAGACTTTCGCACAG R: GGCTTGCACAAAACTGC	50°C - 30s	
Ksu D23	F: AGG CAG TGA AGA AGA ACC R: TTG AAA TCG ACA GGA TTA GGA	50°C - 30s	
Ksu E18	F: TGA GCC GGT TGC TGT TCG TC R: AAG CAC CGA CAT GGT CAC CC	50°C - 30s	
Ksu G34	F: GTC TCA GGA AGG TGA TGA TC R: GAG CAG TAG GGT AAA GTA AG	45°C - 1,5 min	
Mwg 584	F: GTA TTC TTG GAG GAG AGC GG R: CGA GGT TTA CCC TGG AGA CG	50°C - 30s	
Rpg F1R3	F: GGC CAA AGA GGA GAA GAA GG R: GTC TAG AGA AAC CAA AAC CTC CAA	55°C - 30s	
Rpg F1R4	F: GGC CAA AGA GGA GAA GAA GG R: TGC AAG ATT ATG ACA CCC AGA	55°C - 30s	

Chromozóm 1A^m

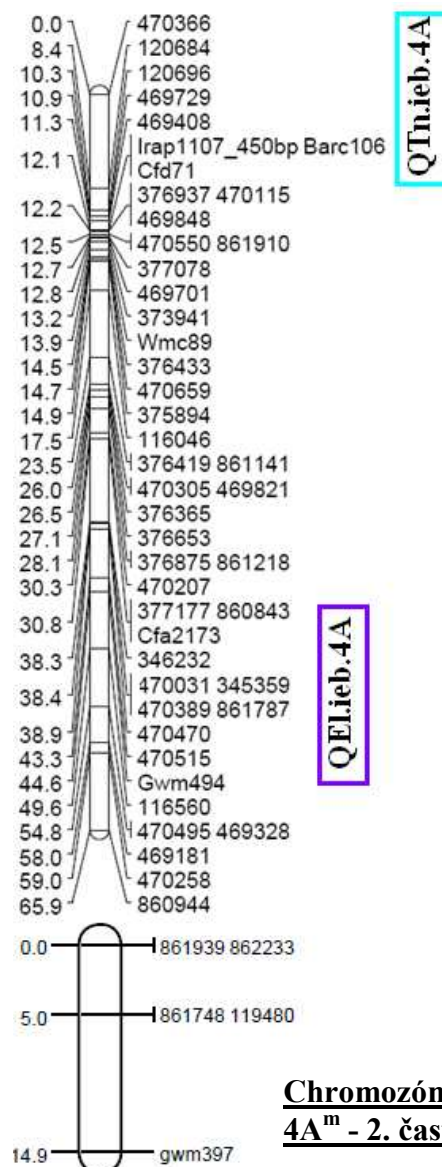


Obrázok č.21: Genetická väzbová mapa *T. monococcum* L.

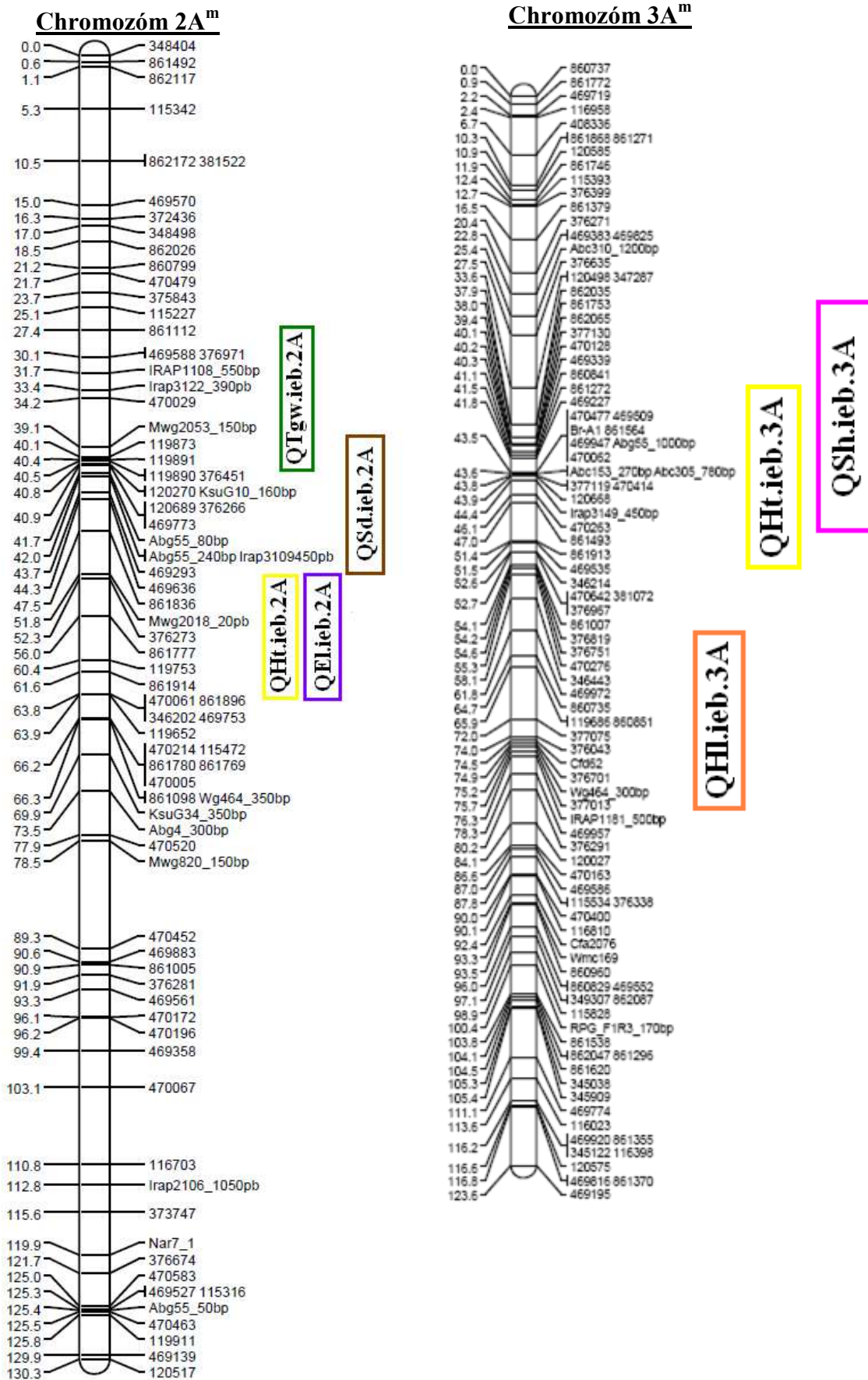
Mapa *T. monococcum* L. je tvorená 7 chromozómami, s celkovou dĺžkou 841,7 cM, so 648 zamapovanými markrami a 15 QTLs. Vzdialenosti medzi markrami (cM) sú zobrazené na ľavej strane a ich názvy na pravej strane každého chromozómu. Začiatok názvu markrov súvisí s ich pôvodom. IRAP markry sú označené IRAP (identifikačné číslo)_dĺžka polymorfného fragmentu, DArT markry značené šesťmiestnym identifikačným číslom a zvyšné zamapované lokusy sú SSR, STS a génové markry s veľkosťou polymorfného fragmentu. Na mape je po pravej strane chromozómov vyznačený rozsah 15 lokusov s nasledujúcimi kvantitatívnymi znakmi:

- počet odnoží (Tn)
- počet kláskov na klas (Spn)
- dĺžka klasu (El)
- hustota klasu (Sd)
- obsah proteínov (Gpc)
- rozpadavosť klasu (Sh)
- výška rastliny (Ht)
- chlpatosť listov (HI)
- priemerná hmotnosť zrna (Tgw)

Chromozóm 4A^m - 1. časť

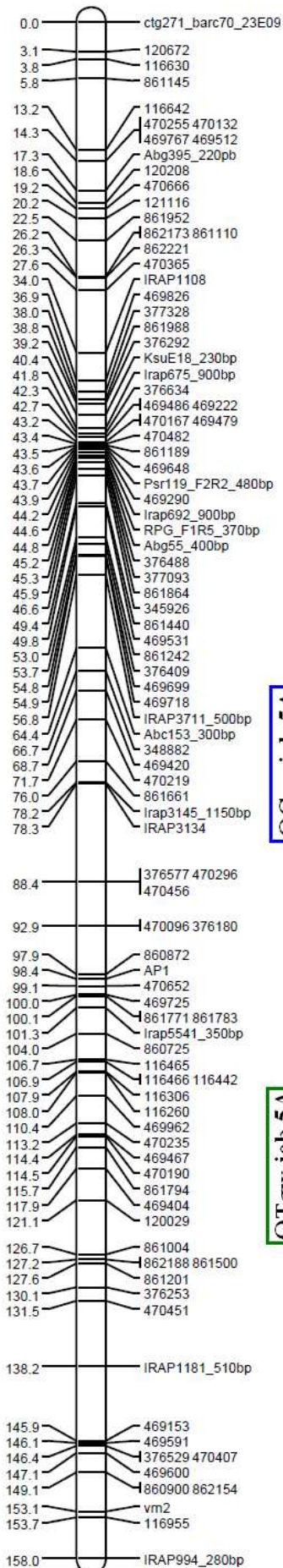


Obrázok č.21 (pokračovanie):



Obrázok č.21 (pokračovanie):

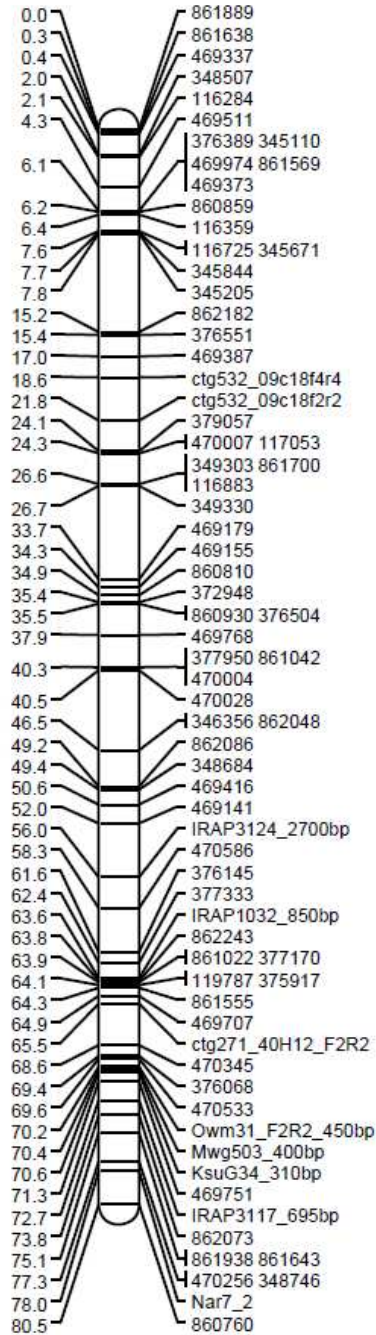
Chromozóm 5A^m



QGpc.ieb.5A

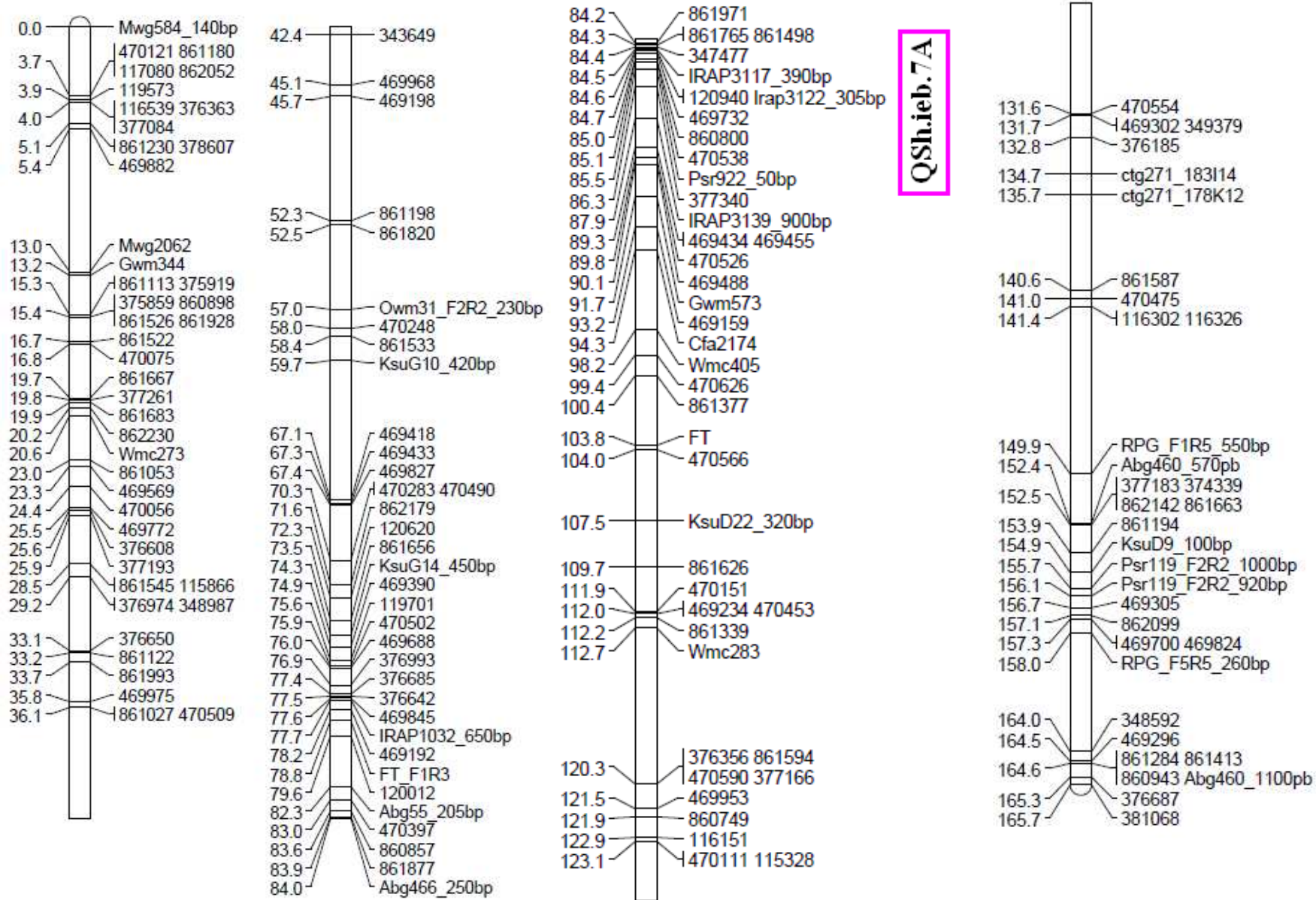
QTgw.ieb.5A

Chromozóm 6A^m



QTn.ieb.6A

Obrázok č.21 (pokračovanie): Chromozóm 7A^m



6. DISKUSIA

Použitím 96 F₁₀ RIL línií mapovacej populácie z kríženia kultúrnej a divokej formy pšenice jednozrnovej bolo v našej práci na 7 chromozómoch A^m genómu zamapovaných 15 QT lokusov pre 10 fenotypovaných znakov. Mapované QT lokusy sú výsledkom fenotypovacieho pokusu na jednej lokalite v dvoch sezónach a to 2009 (Klocová, 2010) a 2010. Obdobne, na podobnej populácii z F₁₀ RIL mapovacej populácie *T. monococcum* L (Hori *et al.* 2007) bolo po dvoch sezónach 2003 a 2004 na jednej lokalite identifikovaných 24 QT lokusov ovplyvňujúcich 10 fenotypovaných znakov. V týchto dvoch prácach bolo možné porovnať 4 znaky (priemerná hmotnosť zrna, dĺžka klasu, počet kláskov na klas a chlpatosť listov).

Výnos ako najdôležitejší agronomický znak bol mapovaný v mnohých štúdiách však jeho dedivosť malá a preto sa väčšina štúdií zameriava na jednotlivé komponenty výnosu s veľmi dobrou dedivosťou. Avšak nie všetky mapy sú konštruované použitím rovnakých markerov, zvlášť čo sa týka použitia moderných „highthroughput“ markerov, je počet štúdií použitím týchto markerov obmedzená. Aby bolo možné diskutovať a pôvod na základe pozície nami mapovaných QTLs v porovnaní s ostatnými štúdiami na *T. monococcum* použili sme percentá vzdialenosti lokusov od začiatku chromozómu. Pretože nie sú všetky chromozómy v našej štúdií orientované (2A^m a 6A^m), ako správne sme použili iba chromozómy u ktorých je orientácia ramien možná na základe prítomnosti iného markeru so známou polohou. Keďže nie je známa orientácia chromozómu 2A^m a 6A^m, v zátvorke je vždy udávaná alternatíva percentuálneho zamapovania lokusu, ku ktorej by došlo, ak by sa chromozóm otočil o 180°. Vzhľadom k duplikáciám a translokáciám, ku ktorým došlo počas rozrôznenia sa obilnín od ancestrálneho genómu tráv napr. chromozóm 4A (Devos *et al.*, 1995, Miftahudin *et al.*, 2004) sú pozície mapovaných znakov diskutované v rámci celých chromozómov.

Dôležitý komponent výnosu, priemerná hmotnosť zrna (QTgw), bol v tejto práci zamapovaný v úseku 72,5 % dĺžky chromozómu 5A^m a 26,3 % (73,7 %) od začiatku chromozómu 2A^m. Na základe fenotypizácie v roku 2009 bol lokus detekovaný 32,5% od začiatku chromozómu 2A^m, na chromozóme 4A^m v oblasti 96,2 % a taktiež na chromozómoch 1A^m a 7A^m. Z dát určujúcich percentuálne zamapovanie lokusu pre oba roky na chromozóm 2A^m vyplýva, že lokus bol detekovaný v približne rovnakých oblastiach. Navyše bol znak pre priemernú hmotnosť zrna asociovaný na 2A^m s rovnakým markerom v oboch prácach (DArT marker 470029, Obrázok č.21), čo je znakom relatívne veľkej spoľahlivosti mapovania tohto

lokusu. Hori *et al.* (2007) síce tiež našli lokus pre tento znak na chromozóme 2A^m, ale v oblasti približne 39-41 % chromozómu. Odchýlka v lokalizácii lokusu môže byť spôsobená vplyvom rôznorodých prírodných podmienok, pri ktorých rastie a dozrieva mapovacia populácia, chybou v niektorej z máp alebo na základe rôzneho pôvodu lokusu. V porovnaní s genómom *T. aestivum* L., lokusy vplývajúce na priemernú hmotnosť zrna boli zamapované v genóme A na všetkých chromozómoch okrem chromozómu 1A (2A-Huang *et al.*, 2004, Verma *et al.*, 2005, 5A-Kato *et al.*, 2000, Börner *et al.*, 2002, Cuthbert *et al.*, 2008, 3A-Shah *et al.*, 1999, Börner *et al.*, 2002, Huang *et al.*, 2004, 4A-Araki *et al.*, 1999, 6A a 7A-Huang *et al.*, 2004).

Ďalší komponent výnosu, počet kláskov na klas (QSpn), bol na základe výsledkov z roku 2010 zamapovaný na koniec chromozómu 1A^m (98,2 % dĺžky). Z dát získaných v roku 2009 bol však lokus detekovaný len na chromozómoch 4A^m (87 %) a 7A^m. Istá asociácia tohto znaku bola pozorovaná i na konci 1A^m pre sezónu 2009, avšak neprekročila štatistickú významnosť. Tento znak bol na tejto mapovacej populácii detekovaný na konci 1A^mL už predtým v práci (Bullrich *et al.*, 2002) a je predmetom pozičného klonovania (Valaárik *et al.*, 2006), a okrem počtu kláskov na klas ovplyvňuje aj dobu kvitnutia. Tieto zistenia poukazujú na vyššiu spoľahlivosť QTL analýzy zo sezóny 2010. Hori *et al.* (2007) mapovali tento lokus na chromozóm 4A^m v oblasti 57 % z celkovej dĺžky chromozómu a tiež na chromozóme 3A^m. Zo získaných výsledkov sa nedá usudzovať možnosť spoločného pôvodu týchto lokusov. U hexaploidnej pšenice bol zmieňovaný lokus detekovaný na chromozóme 4AS v blízkosti centroméry v práci Araki *et al.* (1999), výsledkom ostatných analýz bolo zamapovanie lokusu na chromozómy 2B, 5A a 6A (Araki *et al.*, 1999, Kato *et al.*, 2000, Verma *et al.*, 2005). Z výsledkov analýz nemožno usúdiť jednoznačné zamapovanie QSpn. I keď v troch prácach bol detekovaný na chromozóme 4, vždy bolo jeho zamapovanie v odlišných oblastiach chromozómu. Preto je potrebné prevádzať ďalšie mapovania či už na *T. monococcum* L. alebo hexaploidnej pšenici.

QTL pre výšku rastliny (QHt) bol na základe významných výsledkov z roku 2010 zamapovaný v oblasti okolo 35,4 % chromozómu 3A^m a na chromozóm 2A^m v oblasti 41 % (59 %) z celkovej dĺžky chromozómu. Lokus bol síce pre dáta z roku 2009 zamapovaný taktiež na 3A^m, ale v rozdielnej oblasti chromozómu (63,5 %). Posun umiestenia QHt mohlo byť spôsobené ovplyvnením fenotypovaných dát vonkajšími podmienkami počas rastu rastlín alebo ľudskou chybou pri fenotypovaní. U hexaploidnej pšenice popísali výskyt lokusu na konci dlhého ramena chromozómu 3A Shah *et al.* (1999), naopak Huang *et al.* (2004) na začiatku krátkeho ramena chromozómu 3A. Čo sa týka percentuálnej dĺžky chromozómu,

zamapovanie QHt by sa mohlo približne rovnať, rozdiel je len v umiestnení centroméry, čiže vo vyznačení krátkeho a dlhého ramena. Jedným z vysvetlení by mohlo byť nesprávne odlíšenie dlhého a krátkeho ramena alebo taktiež prítomnosť dvoch rozdielnych zamapovaných lokusov pre jeden znak na jednom chromozóme. Rozdielne zamapovanie QHt bolo popísané aj v práci Wanga s kolektívom (2010) na mapovacej populácii *T. aestivum* L. Pre A genóm bol lokus detekovaný na chromozóm 2, čo sa týka chromozómu 3, lokus bol zamapovaný len v D genóme. Börner s kolektívom (2002) prevádzali mapovania celkovo počas štyroch rokov na troch lokalitách, z toho najviac (päťkrát) bol pokus detekovaný na chromozóme 4A, no v menšej miere aj na chromozómy 3B, 5D a 6A. Vzhľadom k tomu, že počas evolúcie eukaryot dochádzalo k rozsiahlym duplikáciám a prestavbám medzi chromozómami, príkladom môže byť ryžový genóm (Guyot *et* Keller, 2004), je možné tento fakt predpokladať aj u pšenice. Tým by bolo možné vysvetliť zamapovanie lokusov aj na homoeológny chromozóm 3B či na ostatné chromozómy v genóme.

Ďalším zamapovaným lokusom na chromozóme 2A^m v oblasti 41 % (59 %) z jeho dĺžky, bol lokus ovplyvňujúci dĺžku klasu (QE1). Jeho výskyt bol taktiež detekovaný v 59 % dĺžky chromozómu 4A^m. Hori *et al.* (2007) zamapovali lokus tiež na chromozóme 4A^m v približne zhodnej oblasti chromozómu (55 % od jeho začiatku). Vplyvom zhodného zamapovania lokusov na rovnakom chromozóme je možné predpokladať spoločný pôvod tohto lokusu a spoľahlivosť mapovaných dát. Avšak okrem chromozómu 4A^m bol lokus zamapovaný aj na 3A^m (Hori *et al.*, 2007). V porovnaní s našimi dátami z roku 2009 však bol lokus QE1 detekovaný len na chromozóme 7A^m, čo nie je možné porovnať ani s jedným lokusom vo vyššie spomínaných prácach. Pri mapovaní populácie *T. aestivum* L. bol lokus zamapovaný tiež na chromozóme 4A v prácach do prvej tretiny chromozómu (Sourdille *et al.*, 2000) a približne v polovici chromozómu 4AS (Börner *et al.*, 2002). I keď v práci Sourdille *et al.* (2000) nie je zaznačené umiestnenie centroméry, je možné predpokladať spoločný pôvod týchto lokusov. Ďalšia detekcia QE1 pre A genóm bola na 1A (Sourdille *et al.*, 2000) i na chromozóme 5A (Kato *et al.*, 1999, Sourdille *et al.*, 2000, Börner *et al.*, 2002).

Podobne aj pre veličinu určujúcu hustotu klasu (Spike density, QSd), vzniknutú vydelením počtu kláskov a dĺžkou klasu pre každú líniu, bol lokus lokalizovaný v oblasti 32 % (68 %) chromozómu 2A^m. Zamapovanie tohto znaku nie je možné porovnať s dátami z roku 2009, pretože QSd nebolo fenotypované a ani v analýzach už spomínaných autorov nebol tento znak hodnotený. Len analýza Sourdille a kolektívu (2000) skúmala v genóme *T. aestivum* L. regióny, kontrolujúce hustotu klasu, no neboli schopní určiť polohu génu,

zároveň kontrolujúceho počet kláskov aj dĺžku klasu. Preto je tento kvantitatívny znak potrebné ďalej skúmať a pokúsiť sa potvrdiť alebo vyvrátiť zamapovanie QSd v tejto práci.

Výnosovo významný lokus, ovplyvňujúci obsah proteínov v zrne (QGpc), bol zamapovaný v oblasti 42 % na chromozóm 5A^m. Zamapovanie QGpc z výsledkov dát z roku 2009 bolo na chromozómoch 7A^m a tiež 5A^m (35,4% chromozómu). Detekcia lokusov z oboch rokov pre chromozóm 5A^m síce nebola zhodná, ale oba lokusy boli zamapované v druhej štvrtine chromozómu. Börner s kolektívom (2002) však toto QTL u *T. aestivum* L. zamapovali len ako minoritný lokus na krátke rameno chromozómu 7A a 2D. Na spresnenie detekcie QGpc bude potrebné previesť v nasledujúcich rokoch ďalšie mapovania.

Počet odnoží u rastlín (Tiller number, QTn), ďalší z významných komponentov výnosu, odpovedajúci v našej práci počtu klasov na rastlinu, bol zamapovaný na tri chromozómy - 1A^m v oblasti 26 % dĺžky chromozómu, 4A^m (od začiatku chromozómu do 12,8 % chromozómu) a na konci chromozómu 6A^m (91,7 %, v prípade obrátenia na začiatku chromozómu do 8,3 %). Vzhľadom k nehodnoteniu tohto znaku v roku 2009 ani v spomínaných prácach zameraných na mapovanie *T. monococcum* L., je detekcia QTn porovnávaná len s hexaploidnou pšenicou. Araki s kolektívom (1999) na hexaploidnej pšenici taktiež umiestnili QTn na začiatok chromozómu 4AS, no pre ich chromozóm bola stanovená poloha centroméry a tým aj orientácia krátkeho a dlhého ramena. Ale i tak je zamapovanie lokusov pre chromozóm 4A približne rovnaké. Kato *et al.* (2000) s využitím genetickej väzbovej mapy s homozygotnými rekombinantnými líniami zamapovali lokus na chromozóm 5AL. Síce počas domestikácie obilnín došlo k translokácii medzi dlhými ramenami chromozómov 5A a 4A (Devos *et al.*, 1995), čo by mohlo vysvetliť zamapovanie lokusu na 5A (Kato *et al.*, 2000), ale Araki *et al.* (1999) zamapovali spomínaný lokus na krátke rameno chromozómu 4A. Je však možné predpokladať detekciu viacerých lokusov na rôznych častiach jedného chromozómu. U hexaploidnej pšenice však nie vždy zodpovedá počet odnoží počtu klasov, a preto je potrebné túto veličinu porovnať i s veličinou stanovujúcou počet klasov na m². Huang *et al.* (2004) zamapovali lokusy na chromozómy 1B a 7A. Táto detekcia sa síce nezhoduje s vyššie uvedenými výsledkami, a preto je potrebné prevádzať ďalšie mapovania tohto lokusu u na diploidnej i tetraploidnej pšenici.

Rozpadavosť klasu (Ear shattering, QSh), jeden z hlavných domestikačných znakov, bola zamapovaná v intervale 33 % chromozómu 3A^m a v oblasti 51,5 % na 7A^m. Výsledkom fenotypizácie z roku 2009 síce bol lokus pre rozpadavosť klasu zamapovaný na 3A^m, ale v 95 % dĺžky chromozómu. Taktiež druhé zamapovanie lokusu na chromozóme 1A^m nepotvrdilo zhodnosť detekcie QSh pre oba roky. Chyba mohla nastať pri fenotypizácii dát alebo silným

vplyvom prostredia. Ani analýzy u tetraploidnej pšenice (Peng *et al.*, 2003) neobjasnili túto problematiku, pretože lokus pre rozpadavosť klasu bol mapovaný na chromozóm 2A. U hexaploidnej pšenice zatiaľ nebol tento znak hodnotený (Araki *et al.*, 1999, Kato *et al.*, 1999, Shah *et al.*, 1999, Sourdille *et al.*, 2000, Börner *et al.*, 2002, Huang *et al.*, 2004, Wanga *et al.*, 2010).

Lokus pre chlpatosť listov (QHI) bol na základe výsledkov z tejto práce lokalizovaný na chromozóme 3A^m v oblasti 53,3%. V porovnaní v fenotypovaní prevedeným v roku 2009 bol lokus mapovaný na chromozómoch 5A^m a 3A^m (37,2 %). Na chromozóme 3A^m bol zamapovaný výskyt lokusu na základe DArT markra (860735, Obrázok č.21), ktorý sa vyskytoval vo vzdialenosti 1,2 cM od markra pre lokus z roku 2010. Tým sa potvrdila pozícia lokusov pre chlpatosť listov u oboch rokov. Vzhľadom k použitiu detailnejšej metodiky v roku 2010 možno predpokladať, že na základe zozbieraných dát bolo zamapovanie QHI na chromozóme 3A^m presnejšie. Ďalšie analýzy z fenotypovania *T. monococcum* L. (Hori *et al.*, 2007) i hexaploidnej pšenice (Jing *et al.*, 2007) však nepriniesli zhodu a skúmaný znak bol zamapovaný v oboch prípadoch na chromozóm 5A. Štúdie Taketu s kolektívom (2002) však detailnejšie popísali hodnotenie chlpatosti listov a ich analýza priniesla tiež odlišné výsledky. Listy s chlpmi hodnotili ako holé, husto ochlpené a menej ochlpené, čím vytvorili tretiu kategóriu, nachádzajúcu sa „v strede“ medzi fenotypmi oboch kontrastných rodičov. Taktiež počítali všetky chlpy vo vnútri poľa okulára na dvoch náhodne vybratých miestach v strednej časti listu. Zistili, že bol veľký rozdiel v počte a dĺžke chlпов u stredne a veľmi chlpatých listov. Usúdili, že genetickej analýzy chlpatosti listov je náročná a pravdepodobne existuje variácia v hustote chlпов vo vnútri rastliny medzi rôznymi pozíciami a rastovými stupňami listov. Na základe analýzy umiestnili lokusy ovplyvňujúce počet chlпов na listoch u hexaploida na chromozómy 4B a 7B. Nami prevedené fenotypovanie nezahŕňalo hodnotenie hustoty chlпов. Samozrejme, taktiež hustota ochlpenia listov vykazovala variabilitu, ale nebolo možné jednoznačne určiť hranicu medzi druhou a treťou kategóriou hodnotenou v Taketu s kolektívom (2002). Takto získané dáta môžu byť nepresné a zavádzajúce. Taktiež naša analýza zahŕňala počítanie až troch oblastí pre tri listy z každej rastliny, čím sa predpokladá vyššia štatistická významnosť s minimalizovaním ľudskej chyby pri počítaní. V porovnaní s ostatnými analýzami bolo práve fenotypovanie Taketu *et al.* (2002) najpresnejšie a je možné, vzhľadom na chromozómové rekonštrukcie, ktoré v genóme pšenice prebiehali počas evolúcie a domestikácie predpokladať, že lokus pre chlpatosť listov sa bude vyskytovať okrem genómu A aj na genómoch B a D.

Porovnaním fenotypovaných dát v sezóne 2009 a 2010 bola potvrdená pozícia dvoch lokusov, pre priemernú hmotnosť zrna ($2A^m$) a chlpatosť listov ($3A^m$). U zvyšných porovnávaných znakov mohla byť rozdielna pozícia lokusov na chromozómoch spôsobená vplyvom vonkajších podmienok či ľudskou chybou pri fenotypizácii. Na potvrdenie polohy lokusov budú potrebné ďalšie fenotypizácie v nasledujúcich sezónach.

Jednotlivé QT lokusy boli v tejto práci zamapované do mapy *T. monococcum* L., ktorá vznikla z pôvodnej mapy *T. monococcum* L. od Klocovej (2010) po doplnení ďalších markrov. Celková dĺžka novej mapy dosiahla hodnotu 841,7 cM. s 648 zamapovanými markrami. V porovnaní s mapou z práce Klocovej (2010), bolo síce celkovo zamapovaných o 20 markrov viac, ale do mapy bolo vnesených nových 40 IRAP (Vanžurová, 2011) a 8 SSR markrov. Vplyvom nastavenia prísnejších podmienok na tvorbu mapy (JoinMap 4, Van Ooijen, 2006), došlo k vyradeniu nespoľahlivých markrov, čím sa skrátila dĺžka mapy takmer o 20 cM (Tabuľka č.5) a taktiež sa niektoré lokusy preusporiadali, čím možno túto novú mapu považovať za presnejšiu. Ukázalo sa, že IRAP markry nie sú najvhodnejšie pre mapovanie genómu, vzhľadom k nízkemu stupňu polymorfizmu, problémami s reprodukovateľnosťou a pracnou analýzou. Hori *et al.* (2007) zamapovali na mapovacej populácii *T. monococcum* L. 341 markrov, čo je asi o polovicu menej ako v našej mape. Išlo manoritne o markry založené na PCR odvodené z jačmenných ESTov, ale aj o RFLP či morfológické markry. Dĺžka mapy bola 1 038,1 cM, čo je v porovnaní s našou mapou o takmer 200 cM viac. Tatiež mapa *T. monococcum* L., vytvorená Singhom s kolektívom (2007) bola oveľa dlhšia od našej mapy (1262 cM) a len so 171 zamapovanými markrami. Variácia v dĺžke mapy môže byť spôsobená typom mapovacej populácie, i rozdielom v rekombinačnej frekvencii, ku ktorej dochádza počas jednotlivých crossing-overov (Hori *et al.*, 2007). Je možné však predpokladať, že vzhľadom k vyššiemu počtu zamapovaných markrov a kratšej vzdialenosti je naša mapa napresnejšia z vyššie uvedených máp. U našej mapy bola priemerná vzdialenosť medzi susednými markrami 1,3 cM, zhodná s mapou z práce Klocovej (2010), no oveľa väčšia bola priemerná vzdialenosť medzi susednými markrami u Horiho s kolektívom (2007), až 3,1 cM. Z porovania vyplýva, že naša mapa bola oveľa viac zahustená markrami, a tak je lepšie použiteľná pre ďalšie mapovania (napríklad QTLs, klonovanie génov, integrácia máp, štúdium kolinarít medzi pšeničnými genómami).

V tejto práci je geneticky najdlhším chromozómom, so 152 zamapovanými markrami a dĺžkou 165,7 cM chromozóm $7A^m$. V práci Hori s kolektívom (2007) bol geneticky najdlhší chromozóm $5A^m$ s veľkosťou 192,5 cM, podobne ako v práci Dubcovskeho s kolektívom (1996) s mapovacou populáciou z rovnakého križenia ako v našom prípade. Naopak,

geneticky najkratším chromozómom bol $4A^m$, podobne ako v práci Klocovej (2010) i v ďalších piatich prácach porovnávaných Singhom s kolektívom (2007). Fyzicky však chromozóm hexaploidnej pšenice 4A patrí v genóme medzi najdlhšie, vďaka dvom postupným translokáciám. Najskôr došlo k translokácii na úrovni diploida vnesením dlhého ramena chromozómu 5A a následne na úrovni tetraploida translokáciou 7BS (Devos *et al.*, 1995). Fakt, že bol na chromozóm $4A^m$ zamapovaný malý počet markrov, by mohlo byť spôsobené malou variabilitou v jeho sekvencii. Na druhej strane i po zamapovaní väčšieho množstva markrov môže byť dĺžka chromozómu malá, ak dochádza k malej alebo žiadnej rekombinácii medzi markrami. Každopádne je potrebné i naďalej skúmať pšeničný genóm, pretože jeho veľkosť a komplikovanosť poskytuje veľa stále nedoriešených otázok.

7. ZÁVER

Pšenica jednozrnová (*T. monococcum* L.), ako diploidný blízky príbuzný donora A genómu pre hexaploidné pšenice, sa stala vďaka genetickej diverzite ideálnym modelom na genetické mapovanie a klonovanie. Zostrojením genetickej mapy *T. monococcum* L. a následným určením lokalizácie QTLs je možné prehĺbiť informácie o umiestnení a príspevku každého génu ku konečnej expresii skúmaného znaku, a tak napomôcť šľachtiteľom ku zvýšeniu výnosu a odolnosti pšenice siatej.

Diplomová práca bola zameraná na mapovanie agronomicky a morfológicky dôležitých génov u diploidnej pšenice *T. monococcum* L. Na dopestovanej mapovacej populácii generácie F₁₀, pochádzajúcej z kríženia kultivovanej formy *T. monococcum* L. subsp. *monococcum* cv. DV92 s divokou formou *T. monococcum* L. subsp. *aegilopoides* cv. G3116 bola prevedená kontrolná genotypizácia s následnou fenotypizáciou desiatich agronomicky, morfológicky a výnosovo významných znakov (obsah proteínov v zrne, rozpadavosť klasu, výška rastliny, chlpatosť listov, rozkladitosť trsu, počet kláskov na klas, počet odnoží, priemerná hmotnosť zrna, dĺžka a hustota klasov). Na tejto populácii bola optimalizovaná aj metodika hodnotenia chlpatosti na „flag“ listoch. Po zozbieraní, spracovaní a porovnaní dát s údajmi získanými v roku 2009 z práce Mgr. Klocovej (2010), bola určená lokalizácia 15 lokusov ovplyvňujúcich kvantitatívny prejav deviatich znakov na 7 chromozómoch A genómu *T. monococcum* L. Lokus ovplyvňujúci rozkladitosť sa v tejto práci nepodarilo zamapovať. Analýzou dát pre obe sezóny sa potvrdila pozícia dvoch lokusov, a to pre priemernú hmotnosť zrna na chromozóme 2A^m a chlpatosť listov pre chromozóm 3A^m. Taktiež bol rozšírený počet fenotypovaných znakov a detekovaných lokusov pre hustotu klasu na chromozóme 2A^m a počet odnoží na chromozómoch 1A^m, 4A^m a 6A^m.

V práci bolo tiež zamapovaných 8 nových SSR markrov a spolu s údajmi z diplomovej práce Mgr. Klocovej (2010) a bakalárskej práce Bc. Vanžurovej (2011) bola vytvorená genetická mapa *T. monococcum* L., s celkovou dĺžkou 841,7 cM a so 648 zamapovanými DArT, STS, IRAP, markrami odvodenými z génov a SSR markrami. Pre mapovanie boli najvhodnejšie DArT markry, vďaka detekcii veľkého množstva polymorfizmov naraz a rovnomernému rozloženiu naprieč genómom.

8. LITERATÚRA

- Akbari, M.; Wenzl, P.; Caig, V. *et al.* (2006): Diversity arrays technology (Dart) for high-throughput profiling of hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetics* 113 (8): 1409-1420.
- Araki, E., Miura, H., Sawada, S. (1999): Identification of genetic loci affecting amylose content and agronomic traits on chromosome 4A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 977-984.
- Barkworth, M. E., Bothmer, R. (2009): Scientific Names in the *Triticeae*. In: Feuillet, C., Muehlbauer, G. J. (ed.): *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Springer Science+Business Media, New York, USA.
- 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* 10: 921-936.
- Brandolini, A., Vaccino, P., Boggini, G., Özkan, H., Kilian, B., Salamini, F. (2006): Quantification of genetic relationships among A genomes of wheats. *Genome* 49: 297-305.
- Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., Churchill, G. A. (2003): R/Qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889-890.
- Brown, D.A., Windham, M.T., Graham, E.T. (1994): The association of *Discula destructiva* (Red.) hyphae with *Cornus florida* (L.) trichomes. *Journal of Phytopathology* 140: 312-318.
- Brookers, A. J. (1999): The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186.

- 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.
- Cuthbert, J. L., Somers, D. J., Bru[^]le'-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.
- Červenka, M., Feráková, V., Háber, M., Kresánek, J., Pačlová, L., Peciar, V., Šomšák, L. (1978): *Z našej prírody*. Príroda, vydavateľstvo kníh a časopisov, n. p. v Bratislave
- De Pace, C., Snidaro, D., Ciaffi, M., Vittori, D., Ciofo, A., Cenci, A., Tanzarella, O. A., Qualset, C. O., Scarascia Mugnozza, G. T. (2001): Introgression of *Dasyphyrum villosum* chromatin into common wheat improves grain protein quality. *Euphytica* 117: 67-75.
- Devos, K. M., Dubcovsky, J., Dvořák, J., Chinoy, C. N., Gale, M. D. (1995): 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., Arbusova, 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.
- Doveri, S., Lee, D., Maheswaran, M., Powell, W. (2008): Molecular Markers - History, Features and Applications. In: Kole, Ch., et Abbott, A. G. (ed.): *Principles and Practices of Plant Genomics*, Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Dubcovsky, J., Luo, M.-Ch., Zhong, G.-Y., Bransteitter, R., Desai, A., Kilian, A., Kleinbartsch, 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.
- Duran, Ch., Edwards, D., Batley, J. (2009): Molecular Marker Discovery and Genetic Map Visualisation. *Bioinformatics: Tools and Applications*: 165-189.

- Dvořák, J., Zhang, H. B. (1990): Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9640-9644.
- Dvořák, J., Di Terlizzi, P., Zhang, H.B., Resta, P. (1993): The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21-31.
- Ehtemam, M. H., Rahiminejad, M. R., Saeidi, H., Tabatabaei, B. E. S., Krattinger, S. G., Keller, B. (2010): Relationships among the A Genomes of *Triticum* L. Species as Evidenced by SSR Markers, in Iran. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 4309-4325.
- Feuillet, C., Langridge, P., Waugh, R.(2007): Cereal breeding takes a walk on the wild side. *TRENDS in Genetics* 24 (1): 24-32.
- Golovnina, K. A., Kondratenko, E. Ya., Blinov, A. G., Goncharov, N. P. (2009): Phylogeny of the A Genomes of Wild and Cultivated Wheat Species. *Russian Journal of Genetics* 45 (11): 1360-1367.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C., Ramesh, B. (1999): Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118: 369-390.
- Gut, I. G. (2001): Automation in Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms. *Human Mutation* 17: 475-492.
- Guyot, R., Keller, B. (2004): Ancestral genome duplication in rice. *Genome* 47: 610-614.
- Heun, M., Schäfer-Pregl, R., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B., Salamini, F. (1997): Site of Einkorn Wheat Domestication Identified by DNA Fingerprinting. *Science* 278: 1312-1314.
- Hittalmani, S., Girish, T. N., Biradar, H., Maughan, J. (2008): Mapping Populations: Development, Descriptions and Deployment. In: Kole, Ch., et Abbott, A. G. (ed.): *Principles and Practices of Plant Genomics*, Science Publishers, Enfield, NH, USA.

- Hopf, M., Zohary, D. (2000): Domestication of plants in the old world – The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and Nile Valley (3rd ed.). Oxford University Press, Oxford, England.
- Hori, K., Takehara, S., Nankaku, N., Sato, K., Sasakuma, T., Takeda, K. (2007): Barley EST Markers Enhance Map Saturation and QTL Mapping in Diploid Wheat. *Breeding Science* 57: 39-45.
- Huang, X. Q., Kempf, H., Ganai, 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.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004): Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431 (7011): 931-945.
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., Kilian, A. (2001): Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acid Research* 29 (4): 1-7.
- Jing, H.-Ch., Korniyukhin, D., Kanyuka, K., Orford, S., Zlatska, A., Mitrofanova, O. P., Koebner, R., Hammond-Kosack, K. (2007): Identification of variation in adaptively important traits and genome-wide analysis of trait-marker associations in *Triticum monococcum*. *Journal of Experimental Botany* 58 (13): 3749-3764.
- Jing, H.-Ch., Bayon, C., Kanyuka, K., Berry, S., Wenzl, P., Huttner, E., Kilian, A., Hammond-Kosack, K. (2009): DArT markers: diversity analyses, genomes comparison, mapping and integration with SSR markers in *Triticum monococcum*. *BioMed Central Genomics* 10 (458): 1-17.
- Johnson, B. L., and Dhaliwal, H. S. (1976): Reproductive isolation of *Triticum boeoticum* and *Triticum urartu* and the origin of the tetraploid wheats. *American Journal of Botany* 63 (8): 1088-1094.

- 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.
- Karagöz, A., Arcaç, Ç., Güçdemir, İ. H. (2009): Relationship Between *in situ* Conserved Wild Wheat Species, Associated Plants and Soil Characteristics. *Tarım Bilimleri Dergisi* 15 (2): 134-141.
- Kato, K., Miura, H., Sawada, S. (1999): QTL mapping of genes controlling ear emergence time and plant height on chromosome 5A of wheat *Theoretical and Applied Genetics* 98: 472-477.
- Kato, K., Miura, H., Sawada, S. (2000): Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1114-1121.
- Keller, B., Feuillet, C. (2000): Colinearity and gene density in grass genomes. *Trends Plant Science* 5 (6): 246-251.
- Kilian, B., Özkan, H., Pozzi, C., Salamini, F. (2009): Domestication of the *Triticeae* in the Fertile Crescent. In: Feuillet, C., Muehlbauer, G. J. (ed.): *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Springer Science+Business Media, New York, USA.
- Klocová, B. (2010): Mapování genů kvantitativních znaků u diploidní pšenice *T. monococcum* L. Ústav Experimentální botaniky Akademie věd ČR, Olomouc.
- Klocová, B., Sedláček, T., Gallová, L., Valárik, M., Doležel, J. (2011): Construction of genetic linkage map of *Triticum monococcum* L. and mapping of quantitative traits. In: Olomouc Biotech 2011, *Plant Biotechnology: Green for Good*, Olomouc, Czech Republic.
- Konieczny, A., Ausubel, F. M. (1993): A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* 4 (2): 403-410.

- Kosambi, D. D. (1943): The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics*. 12: 172-175.
- 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.
- Kuspira, J., Maclagan, J., Bhambhani, R. N. (1989): Genetic and cytogenetic analyses of the A genome of *Triticum monococcum* L. V. Inheritance and linkage relationships of genes determining the expression of 12 qualitative characters. *Genome* 32: 869-881.
- Lander, E. S., Botstein, D. (1989): Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using RFLP Linkage Maps. *Genetics* 129: 185-199.
- Landjeva, S., Korzun, V., Börner, A. (2007): Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica* 156: 271-296.
- Mangelsdorf, P. C. (1966): Genetic potentials for increasing yields of food crops and animals. N.A.S.Symposium: Prospects of World Food Supply 56: 370-375.
- Mantovani, P., Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., Tubeosa, R., Catizone, I., Wenzl, P., Thomson, B., Carling, J., Huttner, E., DeAmbrogio, E., Kilian, A. (2008): An integrated DArT-SSR linkage map of durum wheat. *Molecular Breeding* 22: 629-648.
- Miftahudin, Ross, K., Ma, X.-F., Mahmoud, A. A., Layton, J., Rodriguez Milla, M. A., Chikmawati, T., Ramalingam, J., Feril, O., Pathan, M. S., Surlan Momirovic, G., Kim, S., Chema, K., Fang, P., Haule, L., Struxness, H., Birkes, J., Yaghoubian, C., Skinner, R., McAllister, J., Nguyen, V., Qi, L. L., Echalié, B., Gill, B. S., Linkiewicz, A. M., Dubcovsky, J., Akhunov, E. D., Dvořák, J., Dilbirligi, M., Gill, K. S., Peng, J. H., Lapitan, N. L. V., Bermudes-Kandianis, S. F., Lazo, G. R., Chao, S., Anderson, O. D., Gonzalez-Hernandez, J., Conley, E. J., Anderson, J. A., Choi, D.-W., Fenton, R. D., Close, E. J., McGuire, P. E., Qualset, C. O., Nguyen, H. T., Gustafson, J. P. (2004): Analysis of Expressed Sequence Tag Loci on Wheat Chromosome Group 4. *Genetics* 168: 651-663.

- Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J., Pepper, A. E. (1998): dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics.
- Nelson, J. C. (2005): Methods and Software for Genetic Mapping. In: Meksem, K. et Kahl, G. (ed): The Handbook of Plant Genome Mapping: Genetic and Physical Mapping. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, Germany.
- Nguyen, H. T., Wu, X. (2005): Molecular Marker Systems for Genetic Mapping. In: Meksem, K. et Kahl, G. (ed): The Handbook of Plant Genome Mapping: Genetic and Physical Mapping. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, Germany.
- Padulosi, S., Hammer, K., Heller, J. (1996): Hulled wheat. Promoting the conservation and use of underutilised and neglected crops 4. Proceedings of First International Workshop on hulled wheats. IPGRI, Rome.
- Paterson, A. H., Lander, E. S., Hewitt, J. D., Peterson, S., Lincoln, S. E., Tanksley, S. D. (1988): Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335, 721 - 726.
- 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 (5): 2489-2494.
- 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.
- Roberts, J. J., Gallun, R. L., Patterson, F. L., Foster, J. E. (1979): Effects of Wheat Leaf Pubescence on the Hessian Fly. *Journal of Economic Entomology* 72: 211-214.

- Roy, B. A., Stanton, M. L., Eppley, S. M. (1999): Effects of environmental stress on leaf hair density and consequences for selection. *Journal of Evolutionary Biology* 12 (6): 1089-1103.
- Sadeque, A., Turner, M. A. (2010): QTL Analysis of Plant Height in Hexaploid Wheat Doubled Haploid Population. *Thai Journal of Agricultural Science* 43 (2): 91-96.
- Shah, M. M., Gill, K. S., Baenziger, P. S., Yen, Y., Kaeppler, S. M., Ariyaratne, H. M. (1999): Molecular Mapping of Loci for Agronomic Traits on Chromosome 3A of Bread Wheat. *Crop Science* 39: 1728-1732.
- Sharma, H. C., Waines, J. G. (1994): Inheritance of Leaf Pubescence in Diploid Wheat. *The Journal of Heredity* 85 (4): 286 – 288.
- Schlötterer, C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Nucleic Acid Research* 20: 211-215.
- Schneider, K. (2005): Mapping Populations and Principles of Genetic Mapping. In: Meksem, K. et Kahl, G. (ed): *The Handbook of Plant Genome Mapping: Genetic and Physical Mapping*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, Germany.
- 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.
- Sourdille, P., Tixier, M. H., Charmet, G., Gay, G., Cadalen, T., Bernard, S., Bernard, M. (2000): Location of genes involved in ear compactness in wheat (*Triticum aestivum*) by means of molecular markers. *Molecular Breeding* 6: 247-255.
- Syvänen, A.-Ch. (2001): Accessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews, Genetics* 2: 930-942.

- Taketa, S., Chang, C.L., Ishii, M., Takeda, K. (2002): Chromosome arm location of the gee controlling leaf pubescence of a Chinese local wheat cultivar „Hong-mang-mai“. *Euphytica* 125: 141-147
- Tanksley, S.D., Ganal, M.W., Prince, J.P., Devicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, G.B., Messeguer, R., Miller, J.C., Miller, L., Paterson, A.H., Pineda, O., Roder, M.S., Wing, R.A., Wu, W., Young, N.D. (1992). *Genetics* 132 (4): 1141-1160.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research* 17 (16): 6463-6471.
- Taylor, C., Madsen, K., Borg, S., Møller, M. G., Boelt, B., Holm, P. B. (2001): The development of sequence-tagged sites (STSs) in *Lolium perenne* L.: the application of primer sets derived from other genera. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 648-658.
- Valarik, M., Linkiewicz, A., Dubcovsky, J. (2006): A microcolinearity study at the earliness per se gene *Eps-Am1* region reveals an ancient duplication that preceded the wheat-rice divergence. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 945-957.
- Van Ooijen, J. W. (2006) JoinMap ® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands.
- Vanžurová, H. (2011): Zavedení nových typů markerů do mapy *Triticum monococcum* L. pro mapování výnosu a prvků výnosu. Ústav Experimentální botaniky Akademie věd ČR, Olomouc.
- Verma, V., Worland, A. J., Sayers, E. J., Fish, L., Caligari, P. D. S., Snape, J. W. (2005): Identification and characterization of quantitative trait loci related to lodging resistance and associated traits in bread wheat. *Plant Breeding* 124: 234-241.

- Wang, Z., Wu, X., Ren, Q., Chang, X., Li, R., Jing, R. (2010): QTL mapping for developmental behavior of plant height in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 174: 447-458.
- Ware, D., Stein, L. (2003): Comparison of genes among cereals. *Current Opinious in Plant Biology* 6: 121-127.
- Wenzl, P., Carling, J., Kudrna, D., Jaccoud, D., Huttner, E., Kleinhofs, A., Kilian, A. (2004): Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 101(26): 9915-9920.
- Yan, L., Loukolanov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahlma, T., Dubcovsky, J. (2003): Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN 1. *PNAS* 100: 6263-6268.
- Yan, L., Loukolanov, A., Tranquilli, G., Blechl, A., Khan, I. A., Ramakrishna, W., San Miguel, P., Bennetzen, J. L., Echnique, V., Lijavetzky, D., Dubcovsky, J. (2004): The wheat VRN 2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* 303: 1640-1644
- Zeng, Y., Li, J., Wang, Ch., Chang, M. M., Yang, R., Wu, R. (2008): Genetic Mapping of Quantitative Trait Loci. In: Kole, Ch., et Abbott, A. G. (ed.): *Principles and Practices of Plant Genomics*, Science Publishers, Enfield, NH, USA.

<http://botany.cz/cs/triticum-monococcum/>
<http://learn.genetics.utah.edu/content/health/pharma/snips/>
<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/splist.pl?12442>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechCAPS.shtml>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechSTS.shtml>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

9. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

- AFLP - polymorfizmus amplifikovaných fragmentov (Amplified Fragment Length Polymorphism)
- APS - peroxodisíran amónny
- BAC - umelý bakteriálny chromozóm (Bacterial Artificial Chromosome)
- BC - populácie spätných krížencov (Backcross Population)
- bp - páry bází (base pairs)
- CAPS - našiepené amplifikované polymorfné sekvencie (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
- cDNA - komplementárna DNA (complementary DNA)
- cM - centiMorgan, jednotka vzdialenosti na genetickej väzbovej mape
- cy3, cy5 - cyanín3, cyanín5 (fluorescenčné farbivá)
- dATP - deoxyadenozíntrifosfát
- DArT - Diversity Arrays Technology
- dCAPS - vytvorená štiepiteľná amplifikovaná polymorfná sekvencia (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)
- dCTP - deoxycytozíntrifosfát
- dGTP - deoxyguanozíntrifosfát
- DH - dihaploidné línie (Double Haploid lines)
- DNA - deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
- dTTP - deoxytimidíntrifosfát
- EDTA - etyléndiamíntetraoctová kyselina
- F₁(2,3,8,10) - prvá filiálna generácia (druhá, tretia, ôsma, desiata)
- F primer - forward primer
- Gb - gigabázy (Giga base)
- *hl* - lokus pre listy bez chlpcov
- *Hl*^P - lokus pre chlpaté listy (Hairy leaf, Pubescence)
- *Hl*^{VP} - lokus pre veľmi chlpaté listy (Hairy leaf, Very Pubescence)
- *Hl1* - gén pre výskyt ochlpenia na listoch (Hairy leaf 1)
- *Hl2*^{Aesp} - gén pre chlpatosť listov (Hairy leaf 2, *Aegilops speltoides*)
- IRAP - medziretrozómový amplifikovaný polymorfizmus (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism)
- KCl - chlorid draselný

- LOD - limit detekcie (Limit Of Detection)
- LTR - long terminal repeat, dlhá terminálna repetícia
- m² - štvorcový meter
- MAS - markrom asistovaná selekcia (Marker Assisted Selection)
- Mb - megabázy (Mega base)
- mg - miligram
- MgCl₂ - chlorid horečnatý
- n, 2n - haploidný počet chromozómov, diploidný počet chromozómov
- NaCl - chlorid sodný
- NIL - takmer izogénne línie (Nearly Isogenic Lines)
- PCR - polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction)
- QTL - lokus s kvantitatívnym znakom (Quantitative Trait Loci)
- RAPD - náhodne amplifikovaná polymorfna DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)
- RE - restričná endonukleáza
- RFLP - dĺžkový polymorfismus restričných fragmentov (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- RIL - rekombinantné inbredné línie (Recombinant Inbred Lines)
- R primer - reverse primer
- SDS - dodecylsírán sodný
- SNP - jednonukleotidový polymorfizmus (Single Nucleotide Polymorphisms)
- SSD - jedno-semenné línie (Single-Seed Descent lines)
- SSR - jednoduché opakujúce sa sekvencie (Simple Sequence Repeats)
- STS - miesto so sekvenčnou adresou (Sequence-Tagged Site)
- *Taq* - *Thermus aquaticus*
- TEMED - N, N, N', N' - tetraetylénmetyléndiamín
- Tris-HCl - tris(hydroxymetyl)aminometán hydrochlorid
- UV - ultrafialové žiarenie