

DNA POLYMORPHISM OF DOUBLE - HAPLOID LINES PARENTS INTENDED FOR GENETICAL MAPPING

POLYMORFIZMUS DNA RODIČŮ DIHAPLOIDNÍCH LINIÍ PLÁNOVANÝCH PRO GENETICKÉ MAPOVÁNÍ

¹Ullmannová K., ²Řepková J., ¹Holková L., ¹Chloupek O.

¹ Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

² Department of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 61137, Brno, Czech Republic

E-mail: xullman0@node.mendelu.cz, repkova@sci.muni.cz, holkova@node.mendelu.cz, chloupek@mendelu.cz

ABSTRACT

Study of molecular polymorphism between Derkado and B83-12/21/5 was aim of our study since their segregating progeny (double - haploid lines, DHs) will be used for genetic mapping of loci responsible for seed vigour in barley. Till yet was not identified a locus for this trait in cereals. This population enabled mapping of some traits, including root system size, yield and resistance to diseases. Eighteen SSR (Simple Sequence Repeats) markers were polymorph in comparison of the parents on chromosomes 1H, 5H and 7H. Polymorphism in segregating four CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) markers was identified by restriction enzymes on 7H chromosome. SSR and CAPS markers were selected using published QTL maps of the population. Markers were detected by agarose gel electrophoresis. We will continue on polyacrylamid-gel which could identity new polymorphism. It is a presumption for genetic mapping, if sufficient variability in the seed vigour of the DHs will be found.

Key words: polymorphism, SSR, CAPS, barley

Acknowledgments: The research was supported by grant IG280061 in cooperation with Department of Genetics and Molecular Biology, Masaryk University, Brno, and by grant VC 1M0570.

ÚVOD

Vitalita klíčivých semen je definována jako potenciál semene pro rychlé a uniformní vzejití a pro vývoj normálního semenáčku za širokého spektra polních podmínek. Hodnotíme ji jako klíčivost za fyziologického sucha -2 bary (bod trvalého vadnutí) a chladu (10 °C). Bylo prokázáno (Chloupek et al. 2003), že vliv odrůdy byl větší v nepříznivých letech, kdy vitalita obiliek činila jen 61 až 86 % než v letech příznivých, kdy přesáhla 94 %. Vitalita nebyla jednoznačně korelována s klíčivostí, ale souvisela s rychlostí vzházení na poli ($r = 0,50$ až $0,54$).

U *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány lokusy kvantitativních genů (QTL - quantitative trait loci) pro klíčivost (Malmberg et al. 2005) i vitalitu (Clerkx et al. 2004) a byl popsán společný lokus pro klíčivost a počáteční růst (Argyris et al. 2005). U obilovin QTL pro vitalitu zatím identifikovány nebyly. Dá se očekávat, že výskyt polymorfizmu spojený s odlišnými alelami odpovídajících genů, by mohl být ve vztahu s geny případně QTL odpovědnými za odolnost vůči abiotickým stresům, jmenovitě vůči chladu a suchu (Chloupek et al. 2003). Doposud známé QTL odpovědné za rezistenci vůči chladu a suchu se u ječmene nacházejí převážně na chromozomech 1H, 5H, 6H, 7H (Cattivelli et al. 2002).

Obecně se při identifikaci kvalitativních genů i polygenů, determinujících šlechtitelsky významné znaky s výhodou využívá genetické mapování prostřednictvím DNA markerů. Lokalizace genů do genetické mapy umožňuje určit, zda byly detekovány nové geny/lokusy, identifikovat markery v různě silné vazbě se studovanými geny a určit, s jakými dalšími geny jsou tyto geneticky vázány. Využití DNA markerů je založeno na polymorfizmu, tedy variabilitě v sekvencích DNA. Na DNA markery lze pohlížet jako na mendelistické znaky, a proto je výhodou použití kodominantních DNA markerů umožňujících odlišení heterozygotů od dominantních homozygotů. DNA markery musí mít častý a rovnoměrný výskyt v genomu, aby mohly být nalezeny markery v co nejtěsnější vazbě se sledovaným genem. Podle cíle a rozsahu studované problematiky je potřeba zvolit vždy ten nejvhodnější typ DNA markerů. Markery založené na PCR (Polymerase Chain Reaction) jsou RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), STS (Sequence Tagged Site), SNAP (Single-Nucleotide Amplified Polymorphism) a další (Joshi et al 1999). U rostlin se využívají jako nástroje použitelné k tvorbě genetických map, lokalizaci jednotlivých genů a k selekci při šlechtění nových odrůd hospodářských a okrasných plodin.

Z markerů založených na PCR nabyli na důležitosti především markery SSR. Bylo identifikováno a zmapováno 45 markerů SSR na sedmi chromozomech ječmene s využitím dihaploidních linií (Liu et al., 1996). Markery SSR ječmene rozšířil Ramsay et al (2000). Přes sto nových mikrosatelitních markerů bylo zmapovaných v roce 2003 (Li et al. 2003). Byla zkonstruována mapa markerů SSR z šesti genetických map ječmene obsahující 774 lokusů (Varshney et al. 2007).

Pro oblasti genomu s nedostatkem polymorfních repetitivních sekvencí se využívají markery CAPS, které vycházejí z jednonukleotidových polymorfismu detekovatelných štěpením DNA restrikčními enzymy.

SSR

SSR či STR (Short Tandem Repeats) neboli mikrosatelity jsou krátké dva až šest nukleotidů dlouhé motivy, které se tandemově opakují v počtu až 60 repetitivních (Powell et al. 1996). Polymorfismus mikrosatelitní DNA je tak způsoben rozdílným počtem opakování základního motivu. Nejčtenějším motivem genomu ječmene je $(GA)_n$ a $(GT)_n$ (Liu aj., 1996). Je zřejmě způsoben nesprávnou funkcí DNA polymerázy při replikaci repetitivních oblastí. Větší rozdíly jsou způsobeny např. nerovnoměrným crossing-overem. Rozložení některých mikrosatelitů v genomech je konzervativní, což svědčí o jejich funkční významnosti. Primery pro detekci SSR jsou navrženy tak, aby byly komplementární k úsekům hraničícím s daným mikrosatelitem, takže při PCR se amplifikuje krátký úsek DNA zahrnující polymorfní sekvenci. Polymorfismus je pak odhalen na základě rozdílné pozice fragmentů určité velikosti v gelu. Kodominantní charakter markerů SSR umožňuje rozlišit homozygoty od heterozygotů. K dalším výhodám markerů SSR patří nízká výchozí koncentrace DNA a vysoká spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků. Jedinou nevýhodou této techniky je požadavek na počáteční znalost sekvence nezbytné k navržení specifických primerů pro PCR. Markery SSR se úspěšně využívají při identifikaci genů rezistence u zemědělských plodin či u modelových organismů pro hlubší pochopení genetiky rostlin i pro rozsáhlé populační studie a mapování genomů.

CAPS

Technika markerů CAPS spojuje výhody analýz PCR a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Za účasti specifických primerů se amplifikuje konkrétní úsek DNA, který je následně štěpen restrikčními endonukleázami pro odhalení polymorfismu v sekvencích DNA. První CAPS markery byly vytvořeny s využitím sekvenčních dat genů na jednom z deseti ramen chromozomů u *Arabidopsis thaliana* (Konieczny a Ausubel, 1993).

Cílem práce bylo vyhodnocení polymorfismu dvou rodičovských linií Derkado a B83-12/21/5 použitých pro dihaploidní linie. Polymorfismus byl sledován u vybraných markerů SSR na chromozomu 1H, 5H a 7H. Po štěpení amplifikovaných produktu restrikčními enzymy byl polymorfismus mezi rodičovskými liniemi sledován u markerů CAPS na chromozomu 7H.

MATERIÁL A METODIKA

Rostlinný materiál

Pro detekci polymorfismu DNA markerů byla izolována DNA z linií jarního ječmene Derkado a B83-12/21/5, které byly využity jako rodičovské komponenty pro vytvoření 156 dihaploidních linií (DH linií).

Izolace DNA

Semena byla vyseta do vlhkého substrátu perlitu s pravidelnou zálivkou. DNA byla izolována z rostlin ve fázi 2. nebo 3. pravého listu. Rostlinný materiál byl nejprve homogenizován ručním mikrohomogenizátorem v tekutém dusíku. Pro vlastní izolaci DNA ječmene byl použit komerční kit Qiagen podle doporučeného protokolu.

DNA markery

Pro detekci polymorfizmu mezi sledovanými rodičovskými liniemi byly použity markery SSR a CAPS, poskytnuté pracovištěm Masarykovy univerzity (MU), Přírodovědecké fakulty, Ústav experimentální biologie, Oddělení genetiky a molekulární biologie a dále markery vybrané na základě předešlých publikací s mapováním DH linií sledovaných rodičů (Chloupek et al. 2006; *obr. 1*). Polymorfizmus markerů SSR byl detekován po PCR s využitím příslušných primerů na horizontální agarózové elektroforéze, na základě rozdílné polohy produktů PCR rodičů. Pro detekci polymorfizmu markerů CAPS bylo potřeba po PCR provést štěpení amplifikovaných produktů restričními enzymy.

Polymerázová řetězová reakce

PCR produkty byly amplifikovány v termocykleru Biometra T Gradient v laboratoři MU a následně některé cykly byly optimalizovány pro termocykler Biometra UNO – Termoblock (laboratoř MZLU). PCR reakční směs o objemu 10 µl byla tvořena komponenty: 1) Go Tag Polymeráza, Promega (5 U/µl), 2) 10 x Green Go Tag TM Reaction Buffer, Promega, 3) Deoxynucleotide Mix, Sigma (200µM), 4) Primery syntetizované zakázkově (50pM/µl), 5) Genomová DNA (0,5 – 5 ng), 6) Sterilní destilovaná voda.

Restriční štěpení CAPS markerů

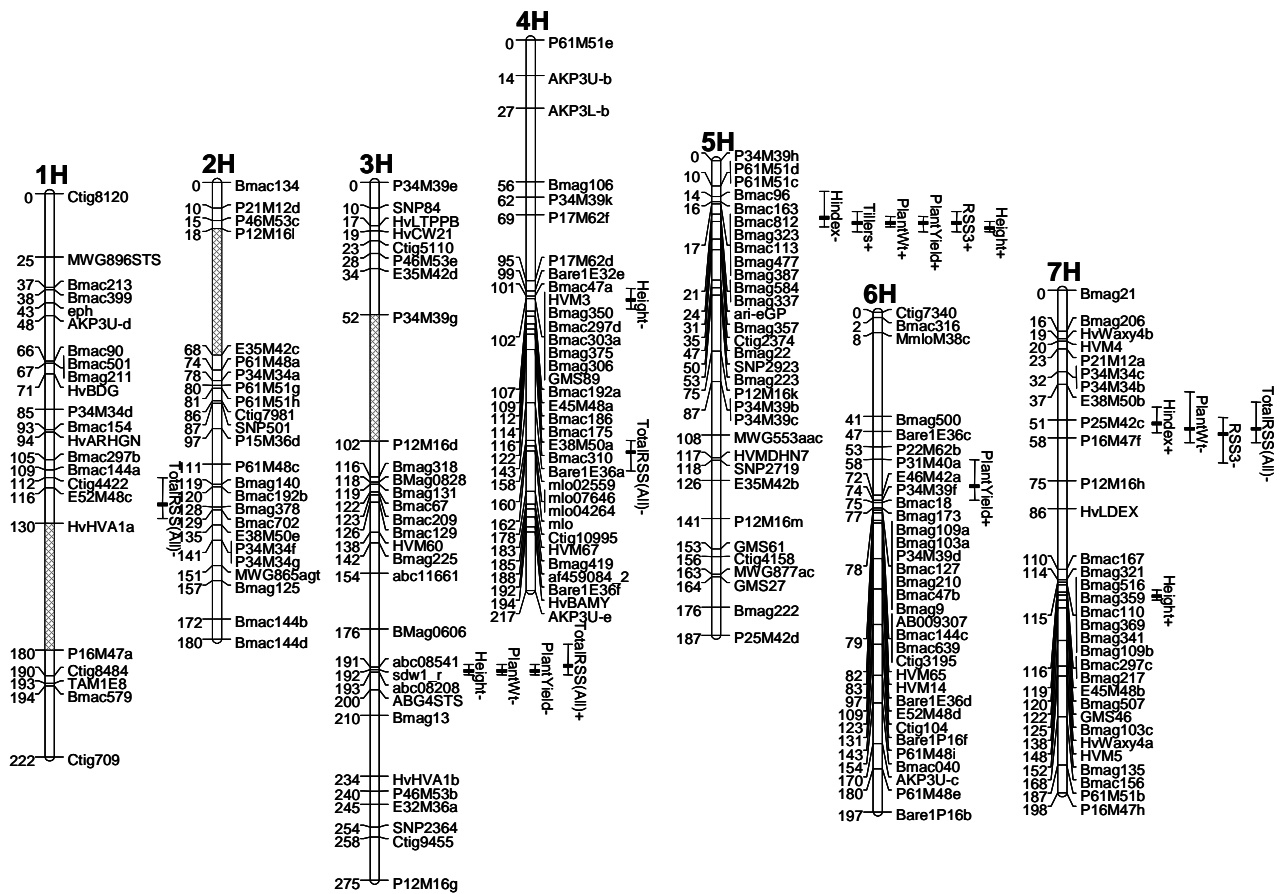
Štěpení produktů PCR pro 6 markerů uvedených v *Tab. 4* bylo provedeno za použití 26 restričních enzymů uvedených v *Tab. 4*. Štěpení probíhalo po dobu tří hodin v Thermobloku Biometra při teplotě 37 °C, vyjma enzymu Bcl I (50 °C) a Taq I (65 °C). Elektroforéza v agarózovém gelu

Pro detekci produktu PCR a restričního štěpení byla používán 2 % nebo 3 % agarózová (Agaróza I , Ampresco nebo Agaróza, Serva) gelová elektroforéza v prostředí 1x TAE pufru. Pro zviditelnění produktů byl do elektroforetického gelu přidán ethidium bromid. Elektroforéza probíhala při napětí 50 až 90 V po dobu asi jedné a půl hodiny. Gel po elektroforéze byl prosvícen UV transluminátorem a zdokumentován digitálním fotoaparátem Kodak a Olympus. Snímky byly upraveny a popsány v programu Adobe Photoshop 7.0 CE.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Polymorfizmus SSR

Polymorfizmus markerů SSR byl detekován na základě rozdílné pozice produktů PCR mezi sledovanými rodičovskými liniemi (Obr. 2). Pro detekci polymorfizmu mezi odrůdou Derkado a linií B83-12/21/5 na třech chromozomech ječmene bylo použito celkem 92 markerů, na chromozomu 1H bylo sledováno 33 markerů (Tab. 1), na chromozomu 5H 17 markerů (Tab. 2) a nejvíce vysycen byl chromozom 7H s 42 markery (Tab. 3). Celkem bylo polymorfních 18 markerů SSR. Pět markerů na 1H, tři na 5H a 10 na chromozomu 7H. Tab. 5 ukazuje, že na chromozomu 1H bylo polymorfních 15,2 % z celkového počtu markerů sledovaných na tomto chromozomu, na 5H byl detekován polymorfizmus u 17,6 % sledovaných markerů a sledované markery na 7H chromozomu byly z 23,9 % polymorfní. Na chromozomu 1H byly polymorfní markery Bmac0154, WMC1E8, AWBMS80, RGH1a11b, MGB402. Na 5H chromozomu byl prokázán polymorfizmus mezi rodičovskými liniemi u markerů GMS027, Bmag0223 a na chromozomu 7H Bmag0120, Bmac0162, AF022725A, HVM49, Bmac0156, Bmag0135, Bmag0007, EBmag0794, GBM1326, Bmag0206.



Obr. 1: QTL mapa Derkado x B83-12/21/5 populace (Chloupek, Forster, Thomas 2006)

Tab. 1: Seznam analyzovaných markerů SSR na chromozomu 1H ječmene s vyhodnocením polymorfizmu mezi rodiči Derkado x B83-12/21/5.

Marker	Polymorfizmus	Marker	Polymorfizmus
Bmac0090	/	Bmag0504	0
Bmag0211	0	RGH1aI1a	0
Bmag0345	0	RGH1aI1b	1
Bmac0154	1	RGH1aE2I2	0
EBmac0656	0	RGH1aE2a	0
Bmac0063	0	RGH1aE2b	0
WMC1E8	1	RGH1aE2c	0
Bmag0579	0	RGH1aE1	0
HvHA1	0	MGB402	1
EBmac0783	0	UMB505	0
EBmac0501	0	GBM1451	0
Bmag0382	0	GBM1007	0
AWBMS80	1	GBM1042	0
Bmac0032	0	GBM1311	0
Bmac0213	0	UMB502	0
GMS021	0	UMB503	0
Bmac0399	0		

1 – polymorfní, 0 – bez projevu polymorfizmu, / – bez produktu

Tab. 2: Seznam analyzovaných markerů SSR na chromozomu 5H ječmene s vyhodnocením polymorfizmu mezi rodiči Derkado a B83-12/21/5.

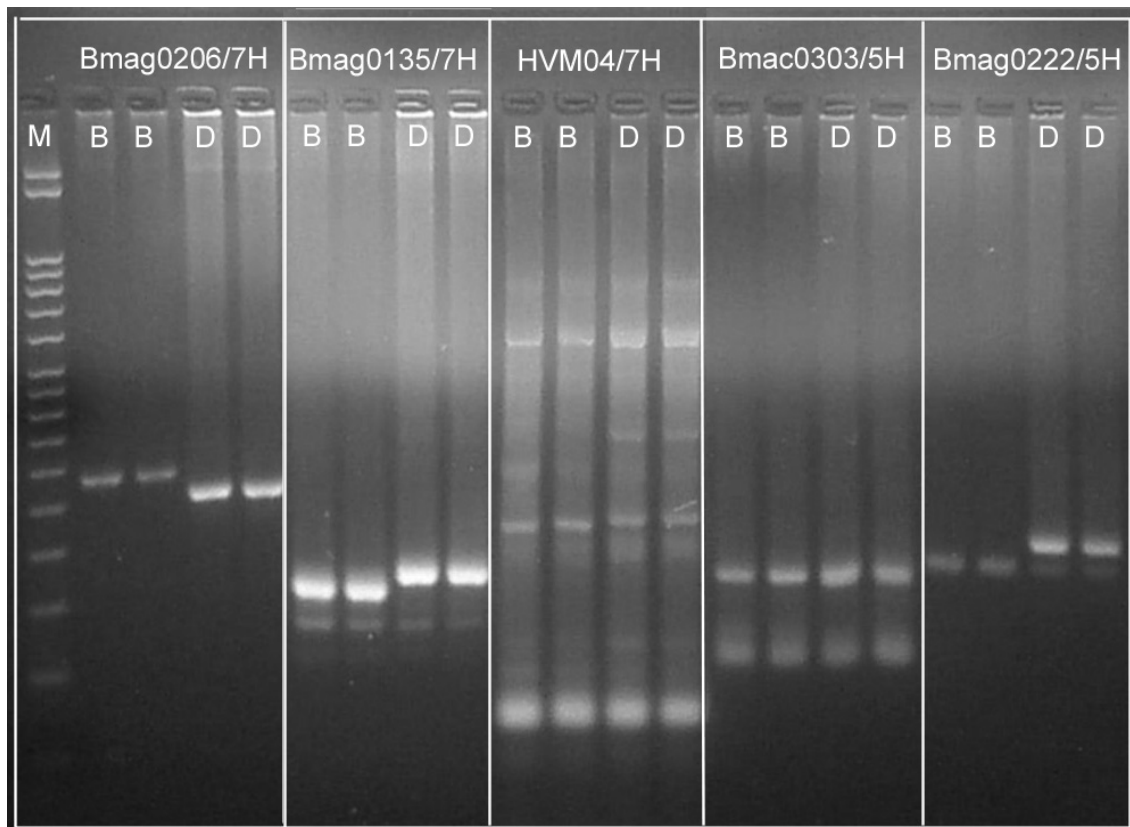
Marker	Polymorfizmus	Marker	Polymorfizmus
Bmac0163	0	Bmac0303	0
EBmac0684	0	Bmag0222	1
Bmag0357	0	GBM1176	0
HvLOX	0	GBM1231	0
HVM30	0	GBM1164	0
EBmac0824	0	EBmatc0003	0
GMS061	0	Bmag0223	1
GMS027	1	Bmac0096	0
GMS001	0		

1 – polymorfní, 0 – bez projevu polymorfizmu, / – bez produktu

Tab. 3 : Seznam analyzovaných markerů SSR na chromozomu 7H ječmene s vyhodnocením polymorfizmu mezi rodiči Derkado x B83-12/21/5.

Marker	Polymorfizmus	Marker	Polymorfizmus
EBmac0603	0	Bmac0582	0
Bmag0120	1	HVPRP1B	0
Bmac0187	0	Bmac0156	1
Bmag0011	0	EBmag0757	0
Bmag0321	0	EBmac0785	0
Bmac0162	1	EBmac0764	0
Bmag0385	0	Bmag0021	/
AF022725A	1	Bmag0507	0
Bmag0341	0	HVM04	0
EBmac0755	0	Bmag0135	1
AWBMS37	0	HvSS1	0
Bmac0224	0	Bmag0007	1
EBmac0827	0	HVPLASC1B	0
Bmag0109	0	EBmag0794	1
Bmag0189	0	UMB108	0
Bmag0217	0	MWG599	0
Bmag0516	0	GBM1326	1
Bmac0064	0	GBM1126	0
Bmac0035	0	GBM1060	0
HVM49	1	Bmag0767	0
HVCMA	0	Bmag0206	1

1 – polymorfní, 0 – bez projevu polymorfizmu, / – bez produktu



Obr. 2: Hodnocení polymorfizmu markerů SSR u rodičů Derkada a B83-12/21/5 na chromozomech 7H a 5H. Agarózový elektroforetický gel zachycující pět SSR markerů. Markery Bmag0206, Bmag0135, Bmag0222 jsou polymorní. U markerů HVM04 a Bmac0303 nebyl u našich sledovaných rodičů zjištěn polymorfizmus. M – velikostní marker, B - B83-12/21/5, D – Derkado.

Polymorfizmus markerů CAPS

Polymorfizmus markerů CAPS byl detekován na základě rozdílné pozice produktu restričního štěpení genotypů Derkado a B83-12/21/5. Bylo analyzováno šest markerů CAPS s využitím 26 restričních enzymů pro každý marker. Ze šesti sledovaných CAPS markerů byly čtyři markery po štěpení restričními enzymy polymorní mezi sledovanými rodiči. Ze 156 restričních štěpení PCR produktů na 7H chromozomu bylo 14 reakcí polymorních. Polymorní štěpení je shrnuto v Tab. 6. U markerů MWG807, MWG2018 nebyl polymorfizmus prokázán po štěpení s žádným z 26 restričních enzymů. Marker CAPS MWG599 byl polymorní při štěpení s pěti enzymy Ava II, Nla III, ScrFI, Taq I, Xho I. Polymorfizmus byl detekován u markeru ABG704 v reakci s enzymem Alu I, BamHI, Hinf I, Nla III, Mbo I. U markeru MWG2062 byl polymorfizmus identifikován po štěpení s enzymy Hpa II, Msp I a marker MWG539 byl štěpen restričními enzymy Msp I a ScrFI. Výsledky těchto reakcí jsou uvedeny v Tab. 4 a ukázka štěpení produktů PCR je znázorněna na Obr. 4. Agarózový gel neštěpených produktů PCR sledovaných markerů CAPS je uveden na Obr. 3.

Tab. 4: Vyhodnocení produktů šesti markerů CAPS po štěpení různými restričními enzymy.

RE/Marker	MWG2062	MWG807	MWG539	MWG599	MWG2018	ABG704
Alu I	0	0	0	0	0	1
Apa I	0	0	0	0	0	0
Ava II	0	0	0	1	0	0
BamHI	0	0	0	0	0	1
Bcl I	0	0	0	0	/	0
Bgl I	0	0	0	0	0	0
Cla I	0	0	0	0	0	0
Dde I	0	0	0	0	0	0
Dpn I	0	0	0	0	0	0
Dra I	0	0	0	0	0	0
EcoRI	/	0	0	0	0	0
EcoRV	0	0	0	0	0	0
Hind III	0	0	0	0	0	0
Hinf I	0	0	0	0	0	1
Hpa II	1	0	0	0	0	0
Mbo I	0	0	/	0	0	1
Mse I	0	0	0	0	0	0
Msp I	1	0	1	0	/	0
Nla III	0	0	0	1	0	1
Pvu II	0	0	0	0	0	0
Rsa I	/	0	0	0	0	0
Sac I	0	0	0	0	0	0
ScrFI	0	0	1	1	0	0
Taq I	0	/	0	1	0	0
Xba I	0	0	0	0	0	0
Xho I	0	0	0	1	0	0

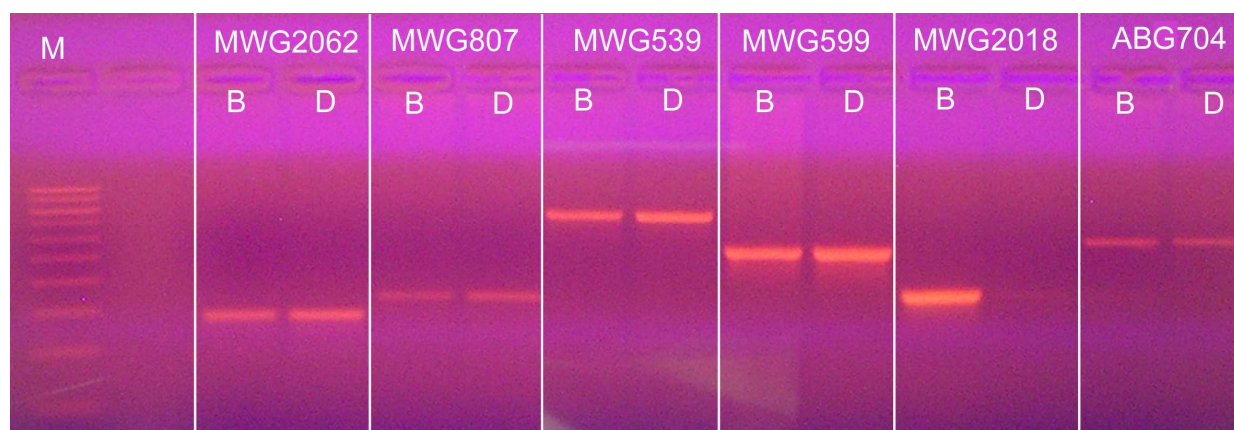
1 – polymorfismus mezi testovanými rodiči, 0 – bez projevu polymorfismu mezi testovanými rodiči, / – nevyhodnotitelný polymorfismus mezi testovanými rodiči

Tab. 5: Shrnutí vyhodnocení polymorfismu pro markery SSR a CAPS u testovaných rodičů.

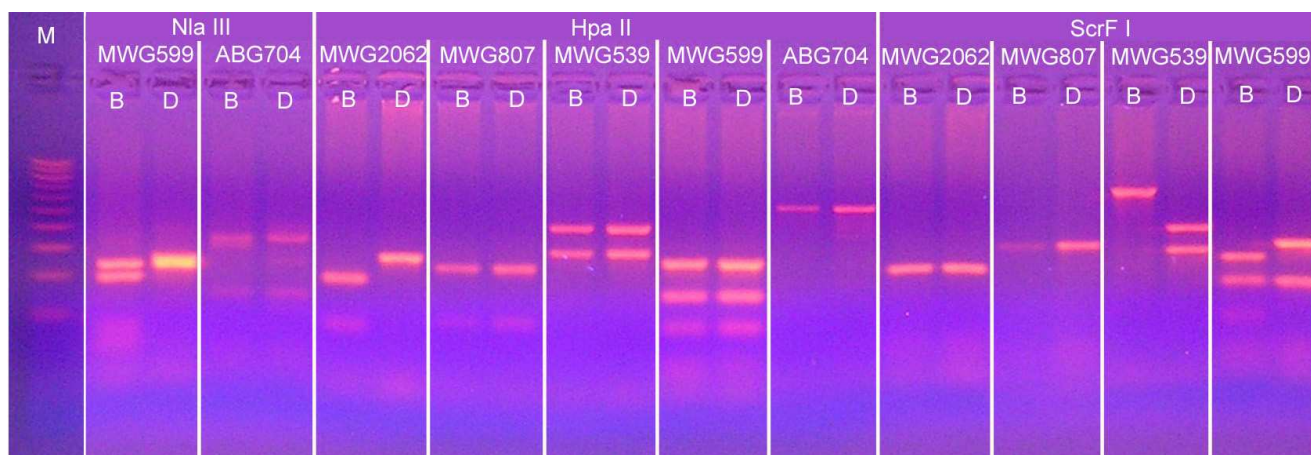
Druh markeru	Chromozom	Počet markerů				
		Polymorfních	Nepolymorfních	Bez produktu	Celkem	% polymorfních
SSR	1H	5	27	1	33	15,16
	5H	3	14	0	17	17,64
	7H	10	31	1	42	23,89
	Celkem	18	72	2	92	
CAPS	7H	4	2	-	6	66,7

Tab. 6: Vyhodnocení detekce polymorfizmu po štěpení restričními enzymy u markerů CAPS na chromozomu 7H.

Marker	Počet štěpení				
	Polymorfních	Nepolymorfních	Bez produktu	Celkem	% polymorfních
MWG2062	2	22	2	26	7,69
MWG807	0	25	1	26	0
MWG539	2	23	1	26	7,69
MWG599	5	21	0	26	19,23
MWG2018	0	24	2	26	0
ABG704	5	21	0	26	19,23
Celkem	14	136	6	156	8,98



Obr. 3: Neštěpené produkty amplifikace šesti markerů CAPS na chromozomu 7H. M - velikostní marker, B - B83-12/21/5, D - Derkado



Obr. 4: Produkty amplifikace štěpení restričními enzymy u markerů CAPS na chromozomu 7H. Polymorfismus po štěpení u sledovaných rodičovských linií byl identifikován u CAPS markeru MWG599 enzymem *Nla III* a *ScrF I*, u markeru MWG2062 enzymem *Hpa II*, markeru MWG539 enzymem *ScrFI*, u markeru ABG704 byl detekován rovněž polymorfismus s enzymem *Nla III* (na tomto gelu však špatně rozpoznatelný). M - velikostní marker, B - B83-12/21/5, D – Derkado.

Mikrosatelitní markery jsou často používanou metodou ke genetickým studiím a metodám selekce. Důvodem je jejich častý a rovnoměrný výskyt v genomu rostlin, kodominantní charakter, vysoká míra polymorfismu a snadné laboratorní použití. Markery SSR byly vybrány dle spolupráce s MU Oddělení genetiky a molekulární biologie a podle QTL mapy Derkado x B83-12/21/5 (Chloupek, 2006 et al.). Procento polymorfních markerů SSR u sledovaných rodičovských linií Derkado a B83-12/21/5 na chromozomu 1H bylo 15,2 %, na chromozomu 5H 17,6 % a na chromozomu 7H 23,9 %. Podíl polymorfních markerů z celkového počtu testovaných markerů je nižší než údaje z literatury, kde se průměrný polymorfismus těchto markerů pohybuje v rozmezí od 30 % do 60 % (Liu a kol., 1996, Manninem, 2000, Řepková et al. 2006). Mezi blízkými genotypy je polymorfismus nižší. Při hodnocení polymorfismu dvou různých poddruhů je úroveň polymorfismu vyšší (Řepková et al., 2006). Jedním z důvodů může být, že analýza byla prováděna zatím jen na agarózovém gelu, kde polymorfismus mezi rodiči lišícími se v několika opakováních motivu v genomu ječmene není možno detekovat. Je proto nutné provést analýzu na polyakrylamidovém gelu, který je v tomto ohledu citlivější.

Polymorfismus štěpení u markerů CAPS mezi sledovanými rodiči na chromozomu 7H bylo úspěšné. Ze šesti analyzovaných markerů CAPS byly čtyři markery po štěpení restričními enzymy polymorfní mezi liniemi Derkado a B83-12/21/5. Markery CAPS MWG599 a ABG704 byly polymorfní mezi rodiči při štěpení s 19,2 % analyzovaných restričních enzymů. Polymorfismus po štěpení s enzymy byl detekován u markerů MWG2062 a MWG539 v 7,7 % štěpení. U markerů MWG807 a MWG2018 nebyl polymorfismus prokázán po štěpení s žádným z 26 restričních enzymů.

Zkoumání polymorfizmu by mohlo být rozšířeno o markery SNP (Single Nucleotide Polymorphism), kdy je u dvou alel genu rozdíl jen v jednom nukleotidu. Využívá se AS-PCR (Allele-Specific PCR). Markery SNP jsou u ječmene využívány i při genetických analýzách související se abiotickým stresem (Rostoks et al. 2005).

Podarilo se získat první polymorfní markery u sledovaných rodičů (Derkado a B83-12/21/5) DH linií, které budou po rozšíření použity pro mapování genů spojených s vyšší vitalitou obilek ječmene. U obilovin QTL pro vitalitu zatím identifikovány nebyly. Dá se očekávat, že výskyt polymorfizmu spojený s odlišnými alelami odpovídajících genů by mohl být ve vztahu s geny případně QTL odpovědnými za odolnost vůči abiotickým stresům, jmenovitě vůči chladu a suchu (Chloupek et al. 2003). Doposud známé QTL odpovědné za rezistenci vůči chladu a suchu se u ječmene nacházejí převážně na chromozomech 1H, 5H, 6H, 7H (Cattivelli et al. 2002).

ZÁVĚR

Byly získány první poznatky o úrovni polymorfizmů ve vybraných lokusech mezi rodičovskými liniemi ječmene Derkado x B83-12/21/5. Pro detekci polymorfizmu mezi odrůdou na třech chromozomech ječmene bylo použito celkem 92 markerů SSR. Celkem bylo polymorfních 18 markerů SSR. Pět markerů na chromozomu 1H, tři na 5H a 10 na chromozomu 7H. Ze šesti sledovaných markerů CAPS na chromozomu 7H byly čtyři markery po štěpení restrikcími enzymy polymorfní mezi sledovanými rodičovskými liniemi. Markery, u kterých byl prokázán polymorfizmus, budou po rozšíření dalšími polymorfními markery použity pro mapování genů řídících vitalitu obilek ječmene u dihaploidních linií vzešlých z křížení Derkado x B83-12/21/5. K tomuto účelu jsme v roce 2008 sklídili na dvou lokalitách po 156 DH liniích. Tato populace DH linií již dříve umožnila mapování mnoha znaků, včetně velikosti kořenového systému rostlin, výnosu, rezistence k chorobám (Chloupek et al. 2006). Genetické mapy umožní cílené využití znalostí o lokalizaci QTL pro vitalitu jako významné kritérium ve šlechtění ječmene, pokud bude prokázána postačující proměnlivost vitality u uvedených DH linií těchto rodičů.

LITERATURA

- Argyris J., et al. (2005): Quantitative trait loci associated with seed and seedling traits in *Lactuca*. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1365- 1376.
- Cattivelli L. et al. (2002): Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticeae*. *Plant Mol. Biol.* 48: 649- 665.
- Clerkx et al. (2004): Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed germination and seed longevity traits between the accessions *Landsberg erecta* and *Shakdara*, using a new recombinant inbred line population. *Plant Physiol.* 135: 432- 443.
- Chloupek O., Hrstková P., Jurecka D. (2003): Tolerance of barley seed germination to cold- and drought-stress expressed as seed vigour. *Plant Breed.* 122: 199- 203.
- Chloupek O. et al. (2006): The effect of semi – dwarf genes on root system size in field – grown barley. *Theor. Appl. Genet.* 112: 779-786.
- Joshi, S. P; Ranjekar, P. K; Gupta, V. S. (1999): Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science* 77 (2): 230- 240.
- Konieczny A., Ausubel F. M. (1993): A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR based markers. *Plant J.* 4: 403-410.
- Liu, Z. W., Biyashev R. M., Maroof M. A. S. (1996): Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theoretic and Applied Genetics* 93: 869-876.
- Malmberg RL et al. (2005): Epistasis for fitness-related quantitative traits in *Arabidopsis thaliana* grown in the field and in the greenhouse. *Genetics* 171: 2013-2027.
- Manninen O. (2000): Genetic mapping of traits important in barley breeding. Academic Disertation. University of Helsinki, Department of Biosciences.
- Powell W, Macharay GC, Provan J. (1996): Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1: 215-222.
- Ramsay, L; Macaulay, M; Ivanissevich, (2000): A simple sequence repeat-based map of barley. *Genetics* 156: 1997-2005.
- Řepková J., Dreiseitl A., Lízal P., Kyjovská Z., Teturová K., Psočková R., Jahoor A. (2006): Identification of resistance genes against powdery mildew in four accessions of *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*. *Euphytica* 151: 23- 30.
- Řepková J., Relichová J. (2001): *Genetika rostlin*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita Brno, 3489/Př-12/01-17/30: 269.
- Varshney, R. K, Marcel, T. C, Ramsay, et al (2007): A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theoretical Applied Genetics* 114: 1091-1103.