

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

2124001

**IDENTIFIKÁCIA A DIFERENCIÁCIA GENOTYPOV
JAČMEŇA POMOCOУ DNA ANALÝZ**

2011

Zuzana Cseriová, Bc.

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

**IDENTIFIKÁCIA A DIFERENCIÁCIA GENOTYPOV
JAČMEŇA POMOCOУ DNA ANALÝZ**

Diplomová práca

Študijný program:	Biotechnológie
Študijný odbor:	2908800 Biotechnológie
Školiace pracovisko:	Katedra biochémie a biotechnológie
Školiteľ:	Ing. Milan Chňapek, PhD.

Nitra 2011

Zuzana Cseriová, Bc.

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Zuzana Cseriová vyhlasujem, že som diplomovú prácu na tému "Identifikácia a diferenciacia genotypov jačmeňa pomocou DNA analýz" vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak hore uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 11. apríla 2011

Pod'akovanie

Touto cestou sa chcem poďakovať vedúcemu diplomovej práce Ing. Milanovi Chňapekovi, PhD. za odborné vedenie pri laboratórnych analýzach a poskytnuté rady pri vypracovaní diplomovej práce.

Abstrakt

Cieľom práce bolo identifikovať súbor 24 genotypov jačmeňa siateho s využitím mikrosatelitných markerov a určiť genetické vzťahy medzi nimi. Na zistenie genetickej diverzity a vzájomné odlišenie genotypov jačmeňa bolo použitých päť mikrosatelitných markerov. Päť párov primerov amplifikovalo celkovo 37 rozdielnych alel s priemerným počtom 7,4 alel na lokus. Počet alel sa pohyboval v rozmedzí 3 až 11 alel na lokus. Pomerne vysoký polymorfizmus bol stanovený výpočtom indexu diverzity a polymorfického informačného obsahu. Hodnoty indexu diverzity sa pohybovali v rozmedzí od 0,538 do 0,885 s priemernou hodnotou 0,754. Polymorfický informačný obsah bol v rozmedzí od 0,483 do 0,883 s priemernou hodnotou 0,738. Pravdepodobnosť identity mala hodnoty od 0,006 do 0,266 s priemernou hodnotou 0,076. Najvyššia hodnota polymorfického informačného obsahu (0,883) bola zistená v lokuse *Bmac0040* a najnižšia hodnota (0,483) bola sledovaná v lokuse *Bmag0211*. Na základe veľkostí mikrosatelitných alel bol pomocou UPGMA algoritmu výpočtom Diceovho koeficientu podobnosti zostrojený dendrogram, v ktorom sú naznačené genetické vzťahy medzi genotypmi. Klastrovou analýzou bolo 24 genotypov jačmeňa zoskupených do troch hlavných klastrov ďalej rozdelených do menších skupín. Zhlukovou analýzou bolo možné odlíšiť 14 z 24 genotypov jačmeňa. Päť dvojíc genotypov sa nám nepodarilo odlíšiť, čo mohlo byť spôsobené nízkym počtom použitých mikrosatelitných markerov. Na dostatočné odlišenie všetkých genotypov je potrebné použiť väčší počet mikrosatelitných markerov.

Kľúčové slová: *Hordeum vulgare* L., mikrosatelity, polymorfizmus, genetická diverzita

Abstract

The aim of study was to identify a set of 24 barley genotypes using microsatellite markers and determine the genetic relationships between them. There were used five microsatellite markers to detect the genetic diversity and differentiation of barley genotypes. Five pairs of primers amplified a total of 37 different alleles with an average of 7.4 alleles per locus. Number of alleles ranged from 3 to 11 alleles per locus. A relatively high polymorphism was determined by calculating the index of diversity and polymorphic information content. Diversity index values ranged from 0.538 to 0.885 with a mean value of 0.754. Polymorphic information content ranged from 0.483 to 0.883 with an average value of 0.738. Probability of identity value was 0.006 to 0.266 with an average of 0.076. The highest value of polymorphic information content (0.883) was found in locus *Bmac0040* and the lowest value (0.483) has been investigated in the locus *Bmag0211*. On the basis of microsatellite allele sizes a dendrogram was constructed using the UPGMA algorithm with calculation of Dice's coefficient of similarity, which is indicated genetic relationships between genotypes. Twentyfour barley genotypes were grouped by cluster analysis into three main clusters which are subdivided into smaller groups. Cluster analysis allowed to distinguish 14 of 24 barley genotypes. Five pairs of genotypes we could not been distinguish what might have been caused by the low number of microsatellite markers. It is necessary to use a larger number of microsatellite markers to distinguish all genotypes.

Key words: *Hordeum vulgare* L., microsatellites, polymorphism, genetic diversity

Obsah

Obsah	6
Zoznam skratiek a značiek	7
Úvod	9
1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky	10
1.1 Jačmeň siaty (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	10
1.1.1 Genetická charakteristika jačmeňa	10
1.1.2 Botanická charakteristika jačmeňa	10
1.1.3 História pestovania jačmeňa	11
1.1.4 Využitie jačmeňa	12
1.2 Genetické markery	12
1.3 DNA ako molekulárny marker	14
1.4 Amplifikačné techniky detekcie DNA polymorfizmu	18
1.4.1 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	18
1.4.2 STMS technika	21
1.5 Mikrosatelitné analýzy pri jačmeni	23
2 Cieľ práce	35
3 Materiál a metódy	36
3.1 Použitý biologický materiál	36
3.2 Izolácia a prečistenie DNA jačmeňa	37
3.3 Amplifikácia DNA pomocou lokus-špecifických mikrosatelitných primerov.....	38
3.4 Elektroforetické delenie a vizualizácia DNA fragmentov v polyakrylamidovom géli.....	40
3.5 Hodnotenie polymorfizmu	41
3.6 Hodnotenie genetickej diverzity klastrovou analýzou	42
4 Výsledky a diskusia	43
4.1 STMS technika ako markerovací systém.....	52
4.2 Genetická rôznorodosť odrôd jačmeňa	544
Záver	57
Zoznam použitej literatúry	58

Zoznam skratiek a značiek

AFLP	- Amplified fragment length polymorphism - dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov
bp	- bázoové páry
cDNA-SSR	- mikrosatelity z kópiovej DNA
cM	- centimorgan
DI	- index diverzity
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
dNTP	- deoxyribonukleozidtrifosfát
EDTA	- kyselina etyléndiaminotetraoctová
EMBL databáza	- databáza európskeho molekulárno-biologického laboratória
EST-SSR	- Expressed Sequence Tag-SSR - mikrosatelity z kódujúcej sekvencie DNA
PCR	- Polymerase Chain Reaction - polymerázová reťazová reakcia
pH	- záporný dekadický logaritmus koncentrácie vodíkových iónov
PI	- pravdepodobnosť identity
PIC	- Polymorphic Information Content - polymorfický informačný obsah
QTL	- Quantitative Trait Loci - lokus kvantitatívnych znakov
RAPD	- Random Amplified Polymorphic DNA – polymorfizmus náhodne zmnoženej DNA
RFLP	- Restriction Fragment Length Polymorphism – dĺžkový polymorfizmus restričných fragmentov
SDS	- dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	- polyakrylamidová gélová elektroforéza v prostredí SDS
SNP	- Single Nucleotide Polymorphism – jednonukleotidový polymorfizmus
SSR	- Simple Sequence Repeat - jednoduché opakované sekvencie
STR	- Short Tandem Repeat – krátke tandemové opakovanie
STMS	- Sequence Tagged Microsatellite Sites – označené sekvencie mikrosatelitných miest
Taq DNA polymeráza	- termostabilný enzým potrebný k syntéze DNA pri PCR reakcii získaný z termofilnej baktérie <i>Thermus aquaticus</i>

TBE	- tlmivý roztok (Tris-HCl, kyselina boritá, EDTA)
TE	- tlmivý roztok (Tris-HCl, EDTA)
TEMED	- tetrametyletyléndiamín
Tris	- tlmivý roztok tris-(hydroxymetyl)-aminometán
Tris-HCl	- Tris-(hydroxymetyl)-aminometán-(2-amino-2-hydroxymetyl propán-1,3-diol) okyslený kyselinou chlorovodíkovou
UPGMA	- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean – metóda aritmetického priemeru nevážených párových skupín

Úvod

Vo väčšine krajín sveta sú obilniny považované za základnú potravinu vyznačujúcu sa výbornou výživovou hodnotou, značným zastúpením vlákniny, vitamínov a minerálnych látok nevyhnutných pre ľudský organizmus. Jačmeň je obilnina zastupujúca štvrté miesto v celosvetovej produkcii obilnín, ktorá v poslednom období popri krmovinárskom využití nachádza uplatnenie ako potravina vo výžive ľudí. Ďalej je významnou surovinou na výrobu jačmenného sladu a pre ďalšie pivovarské spracovanie.

Doposiaľ aplikované metódy diferenciacie genotypov jačmeňa založené na morfológických a neskôr bielkovinových markeroch sa ukázali ako nepostačujúce, preto sa do popredia dostali DNA analýzy. Na identifikáciu a vzájomné odlišenie genotypov rastlín, nielen medzi druhmi, ale aj vnútri toho istého druhu, sú najvhodnejšími markermi molekulárne markery sledujúce polymorfizmus na úrovni DNA. Tieto markery (DNA markery) vyznačujúce sa nezávislosťou od podmienok pestovateľského prostredia a vývojového štádia rastliny sú využiteľné v štúdiách genetickej rôznorodosti a pri mapovaní genómu.

Je potrebné, aby metódy založené na DNA markeroch preukázali schopnosť dobrého odlišenia genotypov a aby boli analýzy jednoznačné, rýchle a dostupné. Týmto požiadavkám v prípade jačmeňa najviac vyhovujú mikrosatelitné markery, pomocou ktorých sú v STMS technike sledované jednoduché opakujúce sa sekvencie.

Uvedené mikrosatelitné markery sú vďaka mnohým vlastnostiam ideálneho markera najčastejšie využívané na identifikáciu a diferenciaciu genotypov obilnín vrátane jačmeňa, ale aj iných rastlinných druhov. Uplatnia sa pri hodnotení genetickej diverzity rastlín, pri výbere genetických zdrojov pre šľachtenie nových genotypov s vylepšenými vlastnosťami, ako aj pri určovaní odlišnosti a stálosti registrovaných odrôd.

1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky

1.1 Jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* L.)

1.1.1 Genetická charakteristika jačmeňa

Všetky jačmene disponujú 7 párami chromozómov ($2n = 2x = 14$ chromozómov), vrátane kultúrnych aj divých druhov. Spomedzi 7 relatívne veľkých a dobre rozlíšiteľných párov chromozómov dva páry majú satelity s rozličnou veľkosťou a tretí chromozómový pár sa vyznačuje slučkovaním. Pri niektorých druhoch boli pozorované aj skupiny s haploidným a triploidným počtom chromozómov. V špičkách koreňov druhu *Hordeum vulgare* bol zistený haploidný počet chromozómov vo veľkom percentuálnom zastúpení. Ojedinele sa vyskytujú aj haploidné rastliny, ako aj triploidné a tetraploidné jačmene. V porovnaní s diploidnými jačmeňmi sú haploidné jedince menšie, majú užšie listy a sú sterilné. Tetraploidné jačmene majú kratšie a silnejšie steblo, dlhšie listy s väčšími prieduchmi, silnejšie korene a väčšie zrná ako diploidy, ale nižší počet zrn v klase, preto vykazujú nižšiu úrodnosť (Hraška et al., 1989).

Veľkosť genómu jačmeňa (*Hordeum vulgare* L.) je približne $5,3 \times 10^9$ bp (Li et al., 2003).

Pri jačmeni a pšenici ako u príbuzných druhov bola zistená kolinearita génových lokusov na siedmich chromozómoch, preto sú ich chromozómy označované rovnako. Pre chromozómy jačmeňa sa používa označenie 1H až 7H, krátke rameno sa označuje písmenom S (short) a dlhé L (long) (Chloupek, 2000).

1.1.2 Botanická charakteristika jačmeňa

Z botanického hľadiska patrí jačmeň (*Hordeum*) medzi jednoklíčnolistové - *Liliopsida* a do čeľade lipnicovitých - *Poaceae*. (Molnárová et al., 2007).

Jačmeň (*Hordeum*) je jednoročnou rastlinou a významnou samoopelivou obilninou mierneho klimatického pásma. (Molnárová et al., 2007; Chloupek, 2000).

Rod *Hordeum* zahŕňa kultivované a divé druhy, z ktorých má pre šľachtenie najväčší význam jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* L.) vyskytujúci sa v dvoch formách – jarnej a ozimnej. Podľa počtu plodných kláskov možno jačmeň siaty rozdeliť na tri poddruhy (Hraška et al., 1989):

Hordeum vulgare L. subsp. *vulgare* – jačmeň siaty pravý, ktorý má všetky tri klásky rodivé, vytvára šesťradové (subsp. *hexastichon*) alebo štvorradové (subsp. *tetrastichon*) jačmene,

Hordeum distichon L. – jačmeň dvojradový majúci len jeden klások rodivý, oba krajné sú nerodivé,

Hordeum intermedium – má vyvinuté 1-3 rodivé klásky.

Podľa Terzi et al. (2001) bol rod *Hordeum* na základe krížiteľnosti rozdelený do troch genofondov. Do primárneho genofondu boli zaradené moderné variety kultivovaného jačmeňa, *H. vulgare* ssp. *vulgare* a *H. vulgare* ssp. *spontaneum*. Dobrú krížiteľnosť týchto rastlín dokazuje šľachtenie na prenos rezistencie na choroby z divokého jačmeňa na vyšľachtený jačmeň. Sekundárny genofond je tvorený druhom *H. bulbosum* a do terciárneho genofondu patria všetky ostatné druhy *Hordeum* nekrížiteľné s *H. vulgare*.

1.1.3 História pestovania jačmeňa

Jačmeň je najstaršiou obilninou pestovanou na potravinárske účely už 16 tisíc rokov pred Kristom v Egypte. Za predchodcu dnešných odrôd rodu *Hordeum* je považovaný dvojradový divý jačmeň, *H. spontaneum* (Chloupek, 2000).

Jačmeň sa do Európy dostal z prednej Ázie a prvá zmienka o jeho pestovaní na našom dnešnom území je z roku 1227. So šľachtením jačmeňa sa začalo v 70. rokoch 19. storočia (Molnárová et al., 2007).

Hlavným cieľom šľachtenia jačmeňa je dosiahnutie vyššej kvality pri sladovníckych odrodách a zvýšenie adaptability, ktorá sa prejavuje odolnosťou k poliehaniu, k vypadávaniu zŕn a k chorobám. Veľký význam má šľachtenie na odolnosť proti listovým chorobám, ako sú hrdza jačmeňová, múčnatka trávová, prúžkovitosť, hnedá škvrnitosť a prašná sneť jačmeňa (Hraška et al., 1989; Chloupek, 2000).

Významnou odrodou vyznačujúcou sa vyššou odolnosťou k chorobám, poliehaniu a lámavosti stebľa, s vyšším počtom klasov a kratším stebľom je odroda Diamant, ktorá bola v roku 1965 vyšľachtená mutagenézou (Chloupek, 2000).

1.1.4 Využitie jačmeňa

Z hľadiska svetovej produkcie je jačmeň na 4. mieste za pšenicom, ryžou a kukuricou, kým na Slovensku je po pšenici najpestovanejšou obilninou.

Jačmeň sa v krajinách svojho pôvodu využíval k výžive ľudí a ako liečivá rastlina pre svoje antiseptické a protizápalové účinky. Zrno jačmeňa sa aj dnes využíva v ľudskej výžive, ale hlavné využitie má ako krmivo a značné množstvo je aj surovinou pre výrobu sladu. Na potravinárske účely sú najvhodnejšie bezplevnaté formy jačmeňa na produkciu cereálnych výrobkov, ktoré vplývajú na zníženie hladiny cholesterolu v krvi vďaka vysokému obsahu beta glukánov (Candráková et al., 2000).

Jačmeň ako zdroj vitamínov skupiny B, minerálnych látok (železa), bielkovín a enzýmov (peptidáz) má využitie vo farmaceutickom priemysle. Využitelný je tiež pri výrobe škrobu ako náhrady celulózy v papierenskom a textilnom priemysle a je vhodný na výrobu etanolu (Candráková et al., 2000).

1.2 Genetické markery

Genetický marker je gén alebo úsek na chromozóme, ktorého umiestnenie na chromozóme je známe a používa sa ako orientačný bod v mapovaní nových mutácií, na identifikáciu a dôkaz genotypov rastlín, odhaľuje genóm rastliny (Rosypal et al., 2001). Gén použitý ako marker sa výrazne prejavuje vo fenotype a používa sa ako sonda na značenie jadra, chromozómu alebo lokusu (Semagn et al., 2006).

Genetický marker musí vykazovať polymorfizmus, ktorý je podľa Kumara et al. (2009) definovaný ako paralelný výskyt znaku v rovnakej populácii dvoch alebo viacerých odlišných genotypov.

Polymorfizmus genetických markerov je možné detegovať na troch úrovniach (Chavla, 2004; Semagn et al., 2006):

- a) na fenotypovej úrovni na základe vizuálne hodnotiteľných znakov (morfologické markery),
- b) na základe odlišnosti proteínov ako génových produktov (biochemické markery),
- c) na základe rozdielov v nukleotidovej sekvencii DNA (molekulárne markery).

Podľa Gregáňovej (2005) možno rozdeliť genetické markery na:

- kvalitatívne genetické markery – diskkrétne, mendelisticky dedené,
- kvantitatívne genetické markery (QTL) – markerujú znaky kódované väčším počtom génov.

Andersen a Lübberstedt (2003) uvádzajú, že genetické markery boli spočiatku používané v genetickom mapovaní na určenie poradia génov na chromozómoch. Od roku 1913, kedy bola skonštruovaná prvá genetická mapa Alfredom H. Sturtevantom, sa postupne vyvinuli genetické markery – morfológické, bielkovinové a následne DNA markery. V súčasnosti sa genetické markery uplatňujú pri charakteristike genómu, pri izolácii génov, pri zabudovaní priaznivých alel a pri ochrane odrôd.

Morfologické markery predstavujú vizuálne hodnotiteľné kvalitatívne znaky, ktoré sú silne ovplyvnené prostredím (Chavla, 2004). Ich nevýhodou je obmedzenosť v počte a možnosť ovplyvnenia iných morfológických markerov alebo znakov (Andersen a Lübberstedt, 2003).

Morfologické markery nie sú vhodné na porovnávanie genotypov získaných v odlišných rokoch alebo z rôznych miest v dôsledku rôzneho stupňa interakcie genotypu s prostredím (Chavla, 2004).

Ideálny molekulárny marker by mal vyhovovať nasledujúcim požiadavkám (Chavla, 2004; Agarwal et al., 2008; Kumar et al., 2009):

- vysoký stupeň polymorfizmu,
- kodominantná dedičnosť,
- častý výskyt v genóme a rovnomerné rozloženie po celom genóme,
- poskytovať dostatočné rozlíšenie genetických rozdielov,
- možnosť sledovania vo všetkých fázach rastu,
- stabilita v rôznych vonkajších podmienkach,
- vyžadovať malé množstvo vzorky DNA,
- jednoznačnosť a presnosť stanovenia,
- vysoká reprodukovateľnosť,
- ľahká, rýchla dostupnosť,
- cenovo nenáročné stanovenie.

1.3 DNA ako molekulárny marker

Molekulárne markery sú nukleotidové sekvencie považované za významné body v genóme, aj keď obyčajne nemajú žiadny biologický efekt. Sú to ľahko detegovateľné DNA sekvencie, ktoré sa nachádzajú na špecifických miestach genómu a sú prenášané mendelovskými pravidlami dedičnosti z jednej generácie do ďalšej (Semagn et al., 2006).

Molekulárne markery môžu ale nemusia súvisieť s fenotypovou expresiou znakov (Agarwal et al., 2008).

Na rozdiel od bielkovinových markerov (zásobné bielkoviny, izoenzýmy) závislých len na expresii kódujúcich sekvencií genómu, molekulárne markery odhaľujúce polymorfizmus v sekvencii DNA sledujú polymorfizmus aj na kódujúcich sekvenciách - exónoch, aj na nekódujúcich sekvenciách DNA - intrónoch (Gregáňová, 2005).

Výhodou DNA markerov oproti finančne nenáročným a ľahko aplikovateľným morfológickým markerom (Collard et al., 2005) aj oproti niektorým izoenzýmovým markerom je, že sú prítomné v genóme v takmer neobmedzenom množstve, nie sú ovplyvnené agronomicko-ekologickými podmienkami pestovateľského prostredia a sú nezávislé aj od vývinového štádia rastliny. DNA markery umožňujú identifikovať genotyp rastlín už vo veľmi skorom vývinovom štádiu rastliny, pričom na DNA analýzy je potrebné pomerne malé množstvo DNA (Gregáňová, 2005).

Spomedzi genetických markerov majú DNA markery najširšie využitie. Tieto markery sú zvyčajne uložené v nekódujúcej časti DNA a používajú sa na identifikáciu genotypov rastlín, v šľachtení rastlín na stanovenie genetickej rôznorodosti medzi genotypmi a na konštrukciu genetických máp rôznych druhov plodín (Collard et al., 2005).

Tandemovo sa opakujúce DNA sekvencie sú všadeprítomné v genóme vyšších rastlín. Chambers a MacAvoy (2000) uvádzajú podľa dĺžky opakujúcich sa jednotiek nasledovné rozdelenie tandemových repetícií:

- *satelity* – mnohokrát opakované úseky pozostávajúce zo 100 až 300 opakovaných nukleotidov, dlhé 10^3 až 10^7 nukleotidov,
- *minisatelity* – stredne opakované úseky zložené z 10 až 100 opakujúcich sa nukleotidov, s dĺžkou zoskupení 10^2 až 10^5 nukleotidov,

- *mikrosatelite* – krátke úseky 2 až 10 opakujúcich sa nukleotidov, ktoré majú dĺžku 10^2 nukleotidov,
- *mononukleotidy* – sekvencie jednonukleotidových opakovaní ľubovoľnej dĺžky.

Mikrosatelity sú známe aj ako krátke tandemové opakovania (Short Tandem Repeats, STRs), jednoduché opakujúce sa sekvencie (Simple Sequence repeats, SSRs) alebo jednoduchá sekvencia v štruktúre mikrosatelitu (Semagn et al., 2006). Predstavujú monotónne opakovania veľmi krátkych nukleotidových motívov s dĺžkou len niekoľko bázových párov (1 - 5 bp) (Agarwal et al., 2008). Repetitívny motív je najčastejšie tvorený dvoma tandemovo sa opakujúcimi nukleotidmi, ale často sa vyskytujú aj tri- alebo tetranukleotidové opakovania (Semagn et al., 2006).

Mikrosatelity je možné podľa Webera (1990) rozdeliť na dokonalé (perfect), nedokonalé (imperfect) a zložené (compound) mikrosatelity. Dokonalé mikrosatelity predstavujú jeden súvislý opakovaný motív, napr. $(AC)_{20}$, zatiaľ čo pri nedokonalých mikrosatelitoch je základný motív prerušený niekoľkými nukleotidmi, napr. $(CT)_{14}GA(AC)_8$. Zložené mikrosatelity sú tvorené niekoľkými sekvenčnými motívmi, napr. $(AT)_{12}(AC)_{18}$. Chambers a MacAvoy (2000) neskôr rozšírili rozdelenie mikrosatelitov na šesť tried (Tab. 1) (Gregáňová, 2005).

Tab. 1
Šesť tried mikrosatelitov (Chambers a MacAvoy, 2000)

Trieda	Class	Sekvencia
Dokonalý	<i>Pure</i>	$-(AC)_{20}-$
Prerušovaný dokonalý	<i>Interrupted pure</i>	$-(TA)-(CA)_4-TA-(CA)_6-$
Zložený	<i>Compound</i>	$-(AT)_{12}-(AC)_8-$
Prerušovaný zložený	<i>Interrupted compound</i>	$-(AC)_{14}-AG-AA-(AG)_{12}-$
Komplexný	<i>Complex</i>	$-(TTTC)_{3-4}-(T)_6-(CT)_{0-1}-$ $(CYKY)_n-CTCC-(TTCC)_{2-4}$
Prerušovaný komplexný	<i>Interrupted complex</i>	Alela s prerušením vo vnútri repetitívnej jednotky

Polymorfizmus na úrovni DNA je možné deliť na dve skupiny:

1. bodový polymorfizmus - najčastejšie je spôsobený mutáciou nukleotidu v sekvencii DNA, t. j. substitúciou alebo deléciou nukleotidu počas štiepenia restriktívnymi

endonukleázami, ktorá je pozorovaná v RFLP technike pri štúdiu dĺžkového polymorfizmu restričných fragmentov,

2. polymorfizmus v počte tandemových repetícií (VNTR – Variable Number of Tandem Repeats) – polymorfne sekvencie sú rozdelené do viacerých skupín podľa počtu kópií a dĺžky repetitívneho motívu (Gregáňová, 2005).

Typy molekulárnych markerov, využívané pri hodnotení DNA polymorfizmu, sa podľa spôsobu analýzy delia na hybridizačné markery a markery založené na polymerázovej reťazovej reakcii. V prvom prípade sú DNA profily vizualizované hybridizáciou enzýmom štiepenej DNA so značenou próbou, ktorou je úsek DNA známej sekvencie. Markery založené na PCR reakcii vyžadujú *in vitro* amplifikáciu vybranej DNA sekvencie alebo lokusu pomocou špecifických alebo náhodných primerov za prítomnosti termostabilnej DNA polymerázy (Kumar et al., 2009). Amplifikačné techniky využívajú náhodné primery, polonáhodné primery, špecifické primery alebo viacero druhov primerov kombinovane (Tab. 2).

Tab. 2

Prehľad techník detekcie DNA polymorfizmu (Gregáňová, 2005)

Techniky detekcie DNA polymorfizmu	
1. hybridizačné – založené na princípe hybridizácie DNA	RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
2. amplifikačné - založené na princípe PCR reakcie	
a, náhodné primery	RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
b, polonáhodné primery	AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)
c, špecifické primery	STS (Sequence Tagged Sites) EST-SSR (Expressed Sequence Tag-SSR) STMS (Sequence Tagged Microsatellite Sites)
d, kombinácia rôznych primerov	SAMPL (Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci)
3. amplifikačno-hybridizačné – kombinácia dvoch predošlých techník	RAMPO (Random Amplified Microsatellite Polymorphism)

Analýzy na úrovni DNA sú najefektívnejšími metódami na identifikáciu genotypov rastlín, ktoré umožňujú verifikáciu semien, právnu ochranu šľachtiteľov a rozlíšenie genotypov. Najčastejšie využívanými metódami pri DNA analýzach rastlín sú techniky RFLP, AFLP, RAPD a SSR (Poláková et al., 2001). Technika RFLP bola ako prvá z DNA techník použitá na štúdium genetickej diverzity jačmeňa na úrovni DNA. Táto technika bola nahradená metódou RAPD a neskôr sa objavila AFLP technika, pomocou ktorej je možná detekcia 100 až 200 fragmentov súčasne a vykazuje vysoký potenciál pre automatizáciu (Graner et al., 2003; Agarwal et al., 2008).

Genetickú diverzitu jačmeňa je možné zistiť pomocou množstva molekulárnych markerov, z ktorých na analýzy genetickej diverzity sú najčastejšie používané mikrosatelity (odvodené od genómovej DNA) alebo jednoduché opakované sekvencie (SSRs) (Guasmi et al., 2008). Mikrosatelitné markery predstavujú vysoký stupeň inter- a intrašpecifického polymorfizmu, preto poskytujú dobré rozlíšenie jednotlivých genotypov rastlín (Semagn et al., 2006).

V tabuľke 3 sú uvedené najdôležitejšie charakteristiky DNA markerových systémov, ich výhody a nevýhody v porovnaní s bielkovinovými markermi.

Tab. 3

Vybrané znaky najčastejšie používaných markerových systémov v štúdiách genetickej diverzity jačmeňa (Graner et al., 2003)

	hordeíny	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
počet lokusov	2-3	>1000	veľmi vysoký	veľmi vysoký	>500
polymorfizmus	veľmi vysoký	obmedzený	obmedzený	vysoký	veľmi vysoký
prejav génov	kodominantný	kodominantný	dominantný	dominantný	kodominantný
pokrytie genómu	veľmi obmedzené	vysoké	veľmi vysoké	veľmi vysoké	vysoké
počet lokusov potrebných na rozbor	2-3	1 až niekoľko	1-10	50-100	1 až niekoľko
reprodukovateľnosť	vysoká	vysoká	nízka	priemerná	vysoká
detekcia vysokého výkonu	nie	nie	nie	áno	áno

Amplifikačné techniky založené na PCR v porovnaní s hybridizačnými metódami majú tieto výhody:

- potreba malého množstva DNA templátu,
- schopnosť namnoženia DNA sekvencie zo skladovaných pletív,
- možnosť detekcie kvalitatívnych aj kvantitatívnych znakov,
- vysoký stupeň polymorfizmu, čo umožňuje vytvoriť veľké množstvo genetických markerov za krátky čas,
- eliminácia rádioizotopov pri väčšine techník (Li et al., 2003; Semagn et al., 2006).

1.4 Amplifikačné techniky detekcie DNA polymorfizmu

1.4.1 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

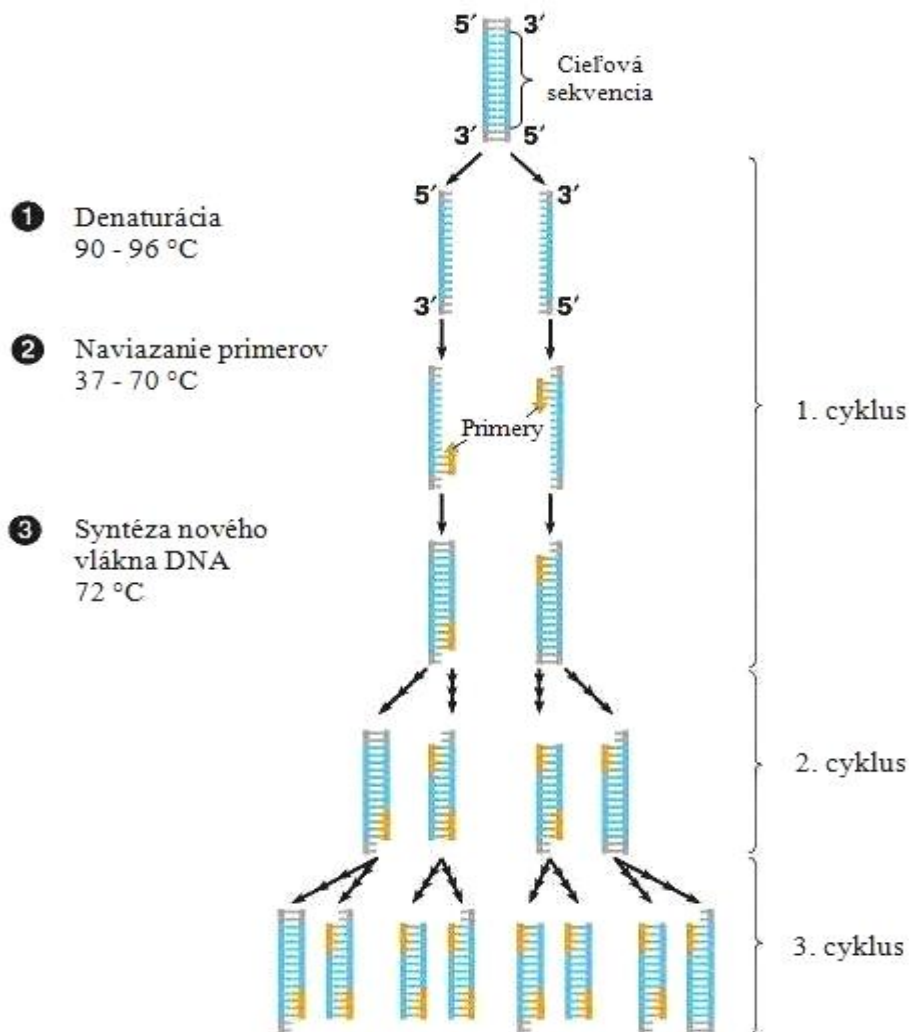
Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction) je metóda slúžiaca na veľmi účinné zmnoženie vybraného úseku DNA za podmienok in vitro, pričom využíva špecifickú termostabilnú DNA polymerázu a ďalšie zložky, ktoré sú nevyhnutné pre priebeh reakcie (Turňa et al., 2004).

Metóda PCR bola vyvinutá vedcom Karym Mullisom a ďalšími výskumníkmi zo spoločnosti Cetus Corporation v USA v rokoch 1985-1986 po objavení termostabilného enzýmu Taq DNA polymerázy (Chavla, 2004) a od toho obdobia začal rozvoj amplifikačných techník.

Polymerázová reťazová reakcia sa uskutočňuje v troch cyklicky sa opakujúcich krokoch, ktorými sú denaturácia, anelácia a polymerizácia. Primery po rozpletení DNA vlákien sa naviažu na komplementárne miesta na cieľovej sekvencii DNA. Primery predstavujú sekvencie nukleotidov určené ku známym sekvenciám DNA, ale môžu to byť aj náhodne nasyntetizované krátke úseky DNA. Samotná syntéza druhého vlákna vybraného úseku DNA sa uskutočňuje predlžovaním primerov prostredníctvom naviazania príslušných deoxynukleozidtrifosfátov na primery (Turňa et al., 2004; Gregáňová, 2005). V každom nasledujúcom cykle slúži novosyntetizované vlákno DNA ako templát pre ďalšiu syntézu DNA vlákna (Walker a Rapley, 2000). Celý amplifikačný proces prebieha v termocykleri, ktorý je schopný rýchlo meniť prednastavené teploty za veľmi krátky časový interval (Gregáňová, 2005).

Zmnoženie DNA metódou PCR (Obr. 1) zahŕňa tri základné kroky (Ferenčík et al., 2000; Chavla, 2004) :

1. denaturácia - rozdelenie dvojvláknového DNA templátu na jednotlivé vlákna zohriatím na 90 - 96 °C,
2. anelácia - naviazanie oligonukleotidových primerov na oddelené vlákna templátovej DNA pri teplote 36 - 70 °C,
3. polymerizácia - syntéza nového vlákna DNA pri teplote 72 °C.



Obr. 1

Polymerázová reťazová reakcia

(<http://www.pseudomonas-syringae.org/images/PCR.gif>)

Uvedené tri kroky sa cyklicky opakujú 25 až 40 krát. Každým amplifikačným cyklom je teoreticky zdvojnásobené množstvo cieľových úsekov DNA molekúl,

výsledkom čoho je exponenciálny nárast PCR produktu (Chavla, 2004). Výsledný počet kópií vybraného úseku DNA je preto 2^n , pričom n značí počet cyklov (Gregáňová, 2005). Efektivita zrnženia je však prakticky nižšia ako 100 % v dôsledku zoslabenej aktivity DNA polymerázy, slabého naviazania primerov a nedokonalnej denaturácie DNA templátov v pokročilých cykloch reakcie (Chavla, 2004).

Takto zrnžená DNA sa elektroforeticky delí v agarózovom géli a následne sa deteguje pod UV lampou alebo autorádiograficky podľa použitého značenia primerov (fluorescenčné alebo rádioaktívne značenie). V prípade elektroforetického delenia v polyakrylamidových géloch (PAGE) sú fragmenty DNA detegované po farbení striebrom (Turňa et al., 2004; Gregáňová, 2005).

Pre uskutočnenie PCR reakcie sú potrebné (Turňa et al., 2004):

- templátová DNA,
- 1-2 oligonukleotidové primery,
- voľné nukleotidy dNTP,
- termostabilná *Taq* DNA polymeráza,
- tlmivý roztok,
- Mg^{2+} ióny, deionizovaná voda.

Je potrebná znalosť koncových úsekov cieľovej sekvencie DNA na navrhnutie oligonukleotidových primerov špecifických k týmto koncovým úsekom sekvencie DNA. Primery, ktorými je ohraničený fragment DNA, musia spĺňať niekoľko požiadaviek (Chavla, 2004):

- a) optimálna dĺžka primerov je 16-24 nukleotidov, ktorá zachováva špecifitu primeru k vybranej sekvencii DNA a zabezpečí vhodné párovanie báz pre tvorbu stabilného duplexu,
- b) primery s podobnou anelačnou teplotou, ktorú je možné empiricky určiť z celkového obsahu G+C primerov (najčastejšie 45-55 %),
- c) vzájomná nekomplementarita primerových párov.

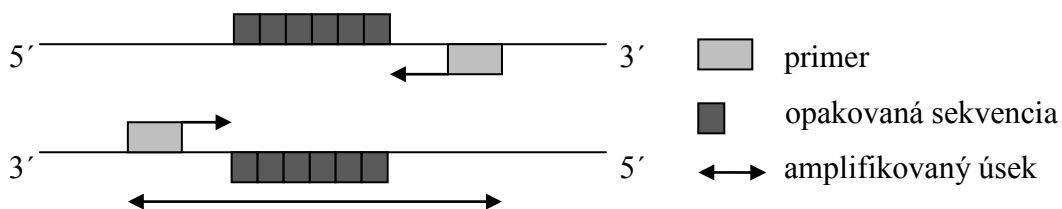
Chavla (2004) uvádza nevyhnutnosť prítomnosti Mg^{2+} katiónov na zachovanie pH, keďže inkubáciou pri teplote 72°C dochádza k poklesu pH reakcie. Walker a Rapley (2000) tiež označujú Mg^{2+} ióny ako kritickú zložku PCR reakcie, pretože ovplyvňujú enzým a tým aj naviazanie primeru na DNA templát a efektívne zabudovanie dNTP do nového vlákna DNA.

1.4.2 STMS technika

STMS technika (Sequence-tagged microsatellite sites) bola prvýkrát popísaná Beckmannom a Sollerom (1990) ako technika využívajúca mikrosatelity na zistenie DNA polymorfizmu. Detekcia DNA polymorfizmu sa uskutočňuje pomocou PCR reakcie v jednotlivých lokusoch, počas ktorej sú mikrosatelity ohraničené lokus-špecifickými primermi z oboch strán.

STMS markery sú opakované oblasti pozostávajúce z 2 až 4 alebo aj viacerých opakujúcich sa nukleotidových sekvencií. Polymorfizmus týchto markerov je následkom zmeny počtu opakujúcej sa jednotky (Archana a Jawali, 2007).

Pomocou rozdielnych STMS markerov je možné získať v špecifických individuálnych lokusoch mikrosatelity rôznej dĺžky (Obr. 2).



Obr. 2

Princíp STMS techniky (Gregáňová, 2005)

Dĺžkový polymorfizmus detekovateľný gélovou elektroforézou je výsledkom variácií v počte opakovaných jednotiek mikrosatelitov. Za hlavný dôvod toho je považovaný posun polymerázy počas replikácie DNA a nesprávne párovanie posunutého vlákna (Kumar et al., 2009).

Vytvorenie STMS markerov je jedným z prvých krokov STMS techniky, čo je finančne aj laboratórne náročné, pretože vyžaduje klonovanie a sekvenovanie. Keď sú už lokus-špecifické primery vytvorené, technika je prístupná a efektívna (Gupta a Varshney, 2000). Rozdiely v dĺžke amplifikovaných fragmentov bez použitia rádioizotopov je možné detegovať v polyakrylamidovom géli farbenom striebrom, pomocou fluorescenčne značených primerov alebo automatickým DNA sekvenátorom s laserovou detekciou (Agarwal et al., 2008).

Mikrosatelity sú široko využívané molekulárne markery, keďže majú veľa žiaducich vlastností markera: vysoký stupeň polymorfizmu, častý výskyt v genóme eukaryotov a rovnomerné rozšírenie po celom genóme, vysoká lokus-špecifita,

kodominancia, jednoznačné stanovenie alel a vysoká reprodukovateľnosť (Archana a Jawali, 2007).

SSR (Simple sequence repeat) markery vďaka svojej multialelickej a kodominantnej povahe umožňujú dobré rozlíšenie genotypov rastlín. Jednotlivé SSR markery môžu byť z hľadiska ich kvality pre genetické štúdie odlišné, pričom sa môžu líšiť amplifikáciou jednotlivého alebo hromadného lokusu, kvalitou amplifikovaného produktu a môžu mať nižší informačný obsah (Varshney et al., 2008).

V dôsledku vysokého stupňa polymorfizmu sú mikrosatelity veľmi informatívne markery, využiteľné pre populačno-genetické štúdie na úrovni jedinca a príbuzných druhov. Kvôli vysokému stupňu mutácií sú ale nevhodné pre štúdie na vyšších taxonomických úrovniach (Kumar et al., 2009).

Kraic (2005) považuje mikrosatelity za optimálne markery, ktoré nájdu uplatnenie pri rozlišovaní genotypov a v populačných štúdiách, ďalej pri lokalizácii génov, určovaní genetických väzieb a pri fyzikálnom mapovaní.

Jednoduché opakované sekvencie aj Chavla (2004) označuje ako vhodné DNA markery pre genetické mapovanie a populačné štúdie, keďže sú vo veľkom množstve zastúpené v genóme eukaryotov. Toto poukazuje na vysoký stupeň genetickej rôznorodosti založenej na rozdielnom počte tandemovo sa opakujúcich jednotiek v lokuse.

Mikrosatelitné markery odvodené od genómových knižníc môžu patriť buď k prepisovaným úsekom alebo k netranskribovaným úsekom genómu a málokedy poskytujú informáciu o ich funkcii. Mikrosatelitné sekvencie sú zvlášť vhodné na rozlíšenie veľmi blízkych genotypov (Kumar et al., 2009).

Podľa Varshneya et al. (2005) sú génovo založené mikrosatelity (EST-SSR) menej účinné pre rozlíšenie blízkych príbuzných genotypov, pretože v porovnaní s genómovými SSRs vykazujú nižší stupeň polymorfizmu. Na druhej strane EST-SSR prítomné v exprimovaných úsekoch genómu sú rýchlo získané elektronickým triedením a sú prenosné na vzdialené príbuzné druhy.

1.5 Mikrosatelitné analýzy pri jačmeni

Autori prehľadali databázu 228 DNA sekvencií jačmeňa za účelom zistenia, ktorý mikrosatelitný motív prevláda pri jačmeni. Bolo nájdených spolu 115 mikrosatelitov a boli objavené skoro všetky typy SSR. Mononukleotidové opakovania $(A)_n$ a $(T)_n$ sa v genóme jačmeňa vyskytovali častejšie ako mikrosatelity $(C)_n$ a $(G)_n$ pre $n \geq 10$, kým spomedzi dinukleotidových sekvencií sa $(CG)_n$ vyskytovali najzriedkavejšie. Trinukleotidové opakovania sa nevyskytovali vo väčšom počte opakovaní ako sedem. Použitím 15 rôznych mikrosatelitov sa pri 11 genotypoch jačmeňa získalo 2 až 6 alel, pričom ich priemerný počet bol 2,1 alely na mikrosatelit. Nezistil sa štatisticky významný vzťah medzi počtom repetícií a mierou polymorfizmu (Becker a Heun, 1995).

Na odlišenie 24 genotypov jačmeňa bolo použitých 11 mikrosatelitných markerov. Bola dokázaná schopnosť mikrosatelitov odlišiť všetky sledované genotypy jačmeňa už pomocou 4 mikrosatelitných markerov, pričom genotypy jačmeňa mali rovnaký rodokmeň a pravdepodobnosť identických genotypov bola menšia ako 1/1000 (Russell et al., 1997).

Pillen et al. (2000) vytvorili 39 nových mikrosatelitných markerov jačmeňa použitím EMBL DNA sekvenčných databáz. Novovytvorené EMBL mikrosatelity boli lokalizované na chromozómoch jačmeňa použitím PCR skríningu zo pšeničných a jačmenných línií. Analýzy dokázali náhodnú distribúciu mikrosatelitov v genóme jačmeňa. Použitím 22 EMBL mikrosatelitov bola určená genetická podobnosť 28 nemeckých genotypov jačmeňa a dvoch divých genotypov jačmeňa. Jednotlivé genotypy jačmeňa jarnej a ozimnej formy boli rozdelené do klastrov pomocou UPGMA algoritmu. Skupina jarných jačmeňov sa javila ako homológna, kým ozimné genotypy jačmeňa boli rozdelené do 3 podskupín. Priemerná hodnota polymorfického informačného obsahu vypočítaná pre 30 genotypov jačmeňa bola 0,38.

Macaulay et al. (2001) vytvorili a následne otestovali 48 mikrosatelitných markerov pre štúdium genetickej diverzity jačmeňa. Markery boli vytvorené s ohľadom na viaceré kritériá, ako je vysoký polymorfický informačný obsah, detekcia na jednom lokuse, produkty amplifikácie vysokej kvality a distribúcia po celom genóme.

Poláková et al. (2001) pomocou 14 mikrosatelitných markerov detegovali genetický polymorfizmus v 22 genotypoch jačmeňa, ktoré boli pestované v Českej republike. Index diverzity mal pri jednotlivých markeroch hodnotu od 0,368 do 2,413.

Najviac polymorfických produktov bolo amplifikovaných pomocou markera HVM40, ktorý identifikoval 11 rozdielnych alel. Tento mikrosatelitný marker bol schopný rozlíšiť všetky analyzované genotypy, ako aj 2 jarné sladovnícke genotypy jačmeňa s rovnakým genetickým pozadím. Zistený mikrosatelitný polymorfizmus je vhodný na diferenciaciu genotypov. Pomocou mikrosatelitných analýz sa oddelili jarné genotypy jačmeňa od ozimných genotypov jačmeňa, pričom najstarší jarný sladovnícky genotyp - Proskovcuv Hanácký, vyšľachtený na konci 19. storočia, bol úplne separovaný od nových genotypov sladovníckeho jačmeňa.

Holton et al. (2002) skúmali prítomnosť a zastúpenie dinukleotidových a trinukleotidových mikrosatelitných markerov (SSR) v medzinárodnej databáze. Analýzou 24 344 EST sekvencií identifikovali 388 dinukleotidových repetícií a 978 trinukleotidových repetícií v ESTs sekvenciách, ktoré predstavovali 1,6 % dinukleotidových repetícií a 4,0 % trinukleotidových repetícií z celkového počtu ESTs. Štyridsaťjeden jačmenných SSR markerov bolo navrhnutých na testovanie efektívnosti využitia a schopnosti prenosu EST-SSR markerov medzi jednotlivými druhmi rastlín. Týmito jačmennými SSR markermi bolo testovaných 11 genotypov jačmeňa a 15 genotypov pšenice, pričom šesťnásť jačmenných SSR markerov vykazovalo polymorfizmus pre jačmeň a päť bolo polymorfických pre pšenicu. Tieto výsledky poukazujú na relatívne vysoký stupeň schopnosti prenosu SSR markerov medzi jačmeňom a pšenicou, čo má dôležitú úlohu pre vývoj nových markerov a porovnávacie mapovanie jačmeňa, pšenice a ostatných obilnín. V niektorých genotypoch jačmeňa a pšenice bolo taktiež testovaných 56 SSRs markerov zo pšeničných ESTs, z ktorých štyri pšeničné EST-SSR markery boli polymorfické pre pšenicu a jeden pre genotyp jačmeňa.

Cieľom štúdie Baeka et al. (2003) bolo zistiť ekologicko-genetickú diverzitu mikrosatelitných markerov v divokých genotypoch jačmeňa (*Hordeum spontaneum*). Pomocou 18 mikrosatelitných markerov analyzovali 306 genotypov jačmeňa, ktoré pochádzali zo 16 populácií pestovaných v Jordánsku a v Izraeli. Celkovo bolo získaných 249 alel, pričom počet alel na lokus bol od 3 do 29 s priemerom 13,8 alel na lokus. Preukázal sa pomerne vysoký pomer polymorfizmu lokusu na populáciu, ktorý mal hodnoty od 0,83 do 1,00, s priemerom 0,91. Genetická diverzita mala hodnoty od 0,38 do 0,651 s priemerom 0,512. Spomedzi 280 detegovaných alel bolo 138 alel (49,3 %) unikátnych. V Jordánsku bolo až 43,0 % alel unikátnych, kým v Izraeli len 17,9 % alel, čo potvrdilo, že Jordánsko je dôležitým centrom diverzity

jačmeňa divého. Bola zistená vyššia genetická diverzita v populáciách pochádzajúcich z Golanských výšin v porovnaní s populáciami pochádzajúcimi zo severného Shuni, južného Shuni a Jarashu, kde bola genetická diverzita nižšia. Tridsaťjeden percent mikrosatelitných variácií bolo pozorovaných medzi populáciami a 69 % vo vnútri populácie. Bola zistená spojitosť medzi ekogeografickou hodnotou a genetickou diverzitou len pre 8 mikrosatelitných markerov.

Pre analýzu genotypov jačmeňa (*Hordeum vulgare* L.) Li et al. (2003) vytvorili nový súbor mikrosatelitných markerov s cieľom zvýšiť hustotu markerov na genetickej mape jačmeňa. Z 254 testovaných párov primerov bolo funkčných 167 párov primerov a z týchto 167 párov primerov 127 párov primerov bolo mapovaných a lokalizovaných na chromozómoch. Hodnoty polymorfického informačného obsahu (PIC) sa pohybovali od 0,05 do 0,94 s priemernou hodnotou 0,60. Priemerný počet alel na lokus bol 3,9, pričom sa počet alel na lokus pohyboval od 1 do 9. Novovytvorené mikrosatelity boli umiestnené na všetkých siedmich chromozómoch so štyrmi významnými zoskupeniami v oblasti centroméry 2H, 3H, 6H a 7H. Tieto výsledky dávajú predpoklad lepšieho využitia mikrosatelitov v genetických štúdiách a na šľachtenie nových genotypov jačmeňa, keďže vytvorením nových mikrosatelitných markerov sa zvýšila hustota existujúcej genetickej mapy jačmeňa.

Štúdiom duplicity jarných jačmeňov uchovávaných v 12 génových bankách sa zaoberali Lund et al. (2003). Pomocou 35 mikrosatelitných párov primerov, ktoré pokrývali celý genóm jačmeňa, bolo detegovaných od 1 do 17 rôznych alel na lokus s priemernou hodnotou 7,1 alel na lokus. Celkovo 174 genotypov jačmeňa bolo rozdelených do 36 potenciálne duplicitných skupín, v ktorých hodnota genetickej vzdialenosti bola nižšia ako maximálna odporúčaná hranica medzi homogénnymi skupinami 0,14. Jedna skupina obsahovala 36 nepříbuzných alebo jedinečných genotypov.

Softvérovou analýzou EST databázy, ktorá obsahovala 24 595 EST sekvencií, identifikovali autori mikrosatelitné markery pre jačmeň (*Hordeum vulgare* L.). Celkovo bolo identifikovaných 1 856 SSR sekvencií, z ktorých 76 EST-SSR markerov bolo použitých na vytvorenie genetickej mapy jačmeňa. Najčastejšie sa vyskytovali trinukleotidové mikrosatelitné repetície. Podskupina zahrňujúca 311 párov SSR primerov bola použitá na určenie genetickej diverzity 6 genotypov jačmeňa, ktoré pochádzali z 3 mapovaných populácií. U dimérických mikrosatelitov bola vyššia korelácia medzi počtom repetícií a polymorfizmom ako u tetramérických SSR.

Polymorfický informačný obsah (PIC) mal hodnotu 0,45 +/- 0,03. Takmer 80 % mikrosatelitných markerov amplifikovalo DNA fragmenty v *Hordeum bulbosum*, ďalej nasledovala pšenica (60 %), raž (60 %) a ryža (40 %). Ďalšia podskupina 38 EST-SSR markerov, ktorá zahŕňala 114 alel, bola použitá na detekciu polymorfizmu medzi 54 genotypmi jačmeňa. Použitím softvéru bolo možné z EST databázy vytvoriť cDNA-SSRs a dokázalo sa, že EST-SSRs sú menej polymorfické ako SSRs odvodené z genómových oblastí. Autori odporučili vysoké percento nových SSRs na analýzy príbuzných druhov (Thiel et al., 2003).

Použitím 17 mikrosatelitných markerov (SSR) bolo analyzovaných 26 genotypov jačmeňa (*Hordeum vulgare* L.), ktoré pochádzali z rôznych geografických oblastí Tuniska. Autori využitím 15 polymorfických SSR markerov získali priemerný počet alel na lokus 3,6 a priemerný polymorfický informačný obsah 0,45. Genotypy boli rozlíšené na základe ich typu, počtu radov v klase a konečného využitia klastrovou analýzou, ktorá bola založená na SSR dátach a morfológických údajoch. Výsledky štúdie poukázali na vysoký stupeň genetickej diverzity medzi analyzovanými tuniskými genotypmi jačmeňa, ako aj na spojitosť genetickej diverzity s adaptačnými podmienkami (Hamza et al., 2004).

Na rozlíšenie genotypov jačmeňa použil Kraic (2005) genómové aj génovo-založené mikrosatelitné markery. Pomocou týchto dvoch typov mikrosatelitných markerov bol testovaný súbor 62 genotypov jačmeňa jarného a ozimného. Trinásť genómových mikrosatelitných markerov detegovalo 61 rozličných alel a 11 génovo-založených markerov amplifikovalo 35 polymorfických alel. Výsledky poukazujú na vyšší polymorfizmus u genómových mikrosatelitných lokusov v porovnaní s génovo-založenými lokusmi. Genetická podobnosť u genómových SSR lokusoch bola 0,133 - 0,958 a u génovo-založených lokusoch sa pohybovala od 0,048 do 1,0. Boli zistené alely špecifické pre jednotlivé genotypy ako aj jedinečné alely. Odlišnosti na analyzovaných lokusoch poukázali na ich vzťah so spôsobom rastu ozimných a jarných genotypov jačmeňa.

Todorovska et al. (2005) študovali genetickú diverzitu v súbore 61 genotypov jačmeňa, ktoré pochádzali z rôznych agro-geografických oblastí Bulharska a Cypru. Na analýzy použili 14 mikrosatelitných markerov, z toho 11 bolo genómových SSR lokusov a 3 EST-SSR lokusy. Spolu bolo identifikovaných 91 alel, s priemerom 6,43 alel na lokus a genetická diverzita sa pohybovala od 0,00 do 0,955 s priemernou hodnotou 0,601. Autori detegovali jedinečné alely vo viacerých odlišných lokusoch,

čo dáva predpoklad na využitie týchto genotypov jačmeňa na rozšírenie diverzity alel a na zlepšenie vlastností genotypov jačmeňa.

Feng et al. (2006a) skúmali genetickú diverzitu, geografické odlišenie a evolučné vzťahy medzi 65 genotypmi šesťradového nahého jačmeňa (*Hordeum vulgare* ssp. *hexastichon* var. *nudum*). Analyzované genotypy jačmeňa boli čínske krajové odrody a zo 65 genotypov 25 zdrojov pochádzalo z Tibetu, 20 z oblasti Qinghai a 20 z provincie Ganzi. Pomocou 35 SSR markerov získali spolu 248 alel, z toho 119 (47,98 %) bolo bežných alel. Medzi tibetskými jačmeňmi bolo 47 jedinečných alel, kým jačmene z oblasti Qinghai mali 31 a jačmene z Ganzi vykazovali len 9 jedinečných alel. Jačmene z Tibetu vykazovali vyššiu genetickú diverzitu ako ďalšie dva skúmané zdroje jačmeňa. Podľa týchto výsledkov je možné predpokladať, že centrom genetickej diverzity šesťradového nahého jačmeňa bol Tibet a odtiaľ sa rozšíril do ďalších dvoch sledovaných oblastí.

Autori pomocou 30 mikrosatelitných markerov, ktoré zastupovali všetkých sedem chromozómov jačmeňa, analyzovali súbor 106 genotypov jačmeňa pochádzajúcich z Tibetu. Skúmaný súbor jačmeňov pozostával z troch skupín (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*, *Hordeum vulgare* ssp. *agriocrithon* a *Hordeum vulgare* ssp. *agriocrithon* var. *lagunculiforme*), medzi ktorými bola skúmaná genetická rôznorodosť. Ďalej boli zisťované evolučné vzťahy medzi tibetskými divými druhmi a jačmeňmi pestovanými v Číne. Pomocou 30 SSR lokusov bolo detegovaných 229 alel. Genetická diverzita medzi jednotlivými skupinami bola oveľa vyššia ako vo vnútri skupín. Na základe týchto výsledkov a predchádzajúcich štúdií možno predpokladať, že jačmene vyšľachtené v Číne majú pôvod v tibetských divých druhoch (Feng et al., 2006b).

Na analýzu genetickej diverzity genotypov jačmeňa siateho, ktorá bola prevedená Khlestkinou et al. (2006) na vzorkách získaných počas 40-50 rokov v Rakúsku, Albánsku a Indii, bolo použitých 28 genómových SSR a 13 EST-SSR markerov rovnomerne rozložených po celom genóme jačmeňa. Analýzy nedokázali významný rozdiel v počte alel na lokus ani v hodnotách polymorfického informačného obsahu medzi austrálskymi a indickými genotypmi, pričom medzi albánskymi genotypmi bola zaznamenaná nižšia genetická diverzita. Génovo-založené mikrosatelitné markery mali nižší počet alel na lokus a nižšiu hodnotu polymorfického informačného obsahu (PIC) v porovnaní s genómovými SSR markermi. Genetická diverzita bola vyššia pri genómových SSR markeroch ako v prípade EST-SSR markerov.

Malysheva et al. (2006) použili 48 SSR markerov na analýzu 953 genotypov jačmeňa, ktoré pochádzali zo všetkých kontinentov s výnimkou Austrálie. Molekulárnu diverzitu vyhodnotili na základe počtu alel, genetickej diverzity, frekvencie alel, heterozygotnosti a unikátnych alel. Klastrovou analýzou boli jednotlivé genotypy zoskupené na základe geografického pôvodu a agronomických znakov, pričom boli dobre odlišené európske jačmene od ostatných genotypov, taktiež šesťradové od dvojradových a jarné od ozimných genotypov jačmeňa.

Použitím 44 mikrosatelitných markerov (SSR) bol analyzovaný súbor 107 genotypov jačmeňa (*Hordeum vulgare L. subsp. vulgare*), pochádzajúcich z pohorí Annapurna, Nepal a Himaláji. V analyzovaných genotypoch jačmeňa bol preukázaný vysoký stupeň genetickej diverzity (DI = 0,536) a pomocou genetickej podobnosti založenej na UPGMA algoritme bola odhalená komplexná genetická štruktúra analyzovaných genotypov. Autori identifikovali 8 populácií jačmeňa, ktoré sa navzájom od seba líšili a analýzou populácií bolo potvrdené, že tieto rozdiely sú nezávislé na geografickej vzdialenosti (Pandey et al., 2006).

Varshney et al. (2006) získali 2 823 mikrosatelitov prehľadom súboru 111 090 EST sekvencií jačmeňa. Bolo navrhnutých 754 párov primerov, z ktorých 525 dávalo naamplifikovaný produkt. Genetická mapa jačmeňa bola následne rozšírená o 185 EST-SSR. Polymorfický informačný obsah mal hodnoty od 0,24 do 0,78 s priemerom 0,48.

Cieľom štúdie Brantestama et al. (2007) bolo zhodnotiť 197 škandinávskych a baltických genotypov jačmeňa siateho formy jarnej pomocou 21 jačmenných SSR markerov. Spolu detegovali 191 alel v 22 lokusoch, pričom počet alel na lokus sa pohyboval od 2 do 23 s priemernou hodnotou 8,63 alel na lokus. Medzi genotypmi bola len jedna alela často sa vyskytujúca v genóme a 107 jedinečných alel. Priemerná genetická diverzita bola 0,623 a genetická diverzita medzi lokusmi škandinávskych a baltických genotypov mala hodnoty 0,033 až 0,891. Pomocou mikrosatelitov boli rozlíšené dvojradové a šesťradové odrody jačmeňa. Nebol zaznamenaný významný pokles priemernej genetickej diverzity v závislosti od času.

Genetická mapa dihaploidného jačmeňa vzniknutého krížením kultivovaného jačmeňa (*Hordeum vulgare*) s poddruhom *H. vulgare ssp. spontaneum*, ktorú vypracovali Hearnden et al. (2007), obsahovala 1000 lokusov amplifikovaných použitím 536 SSR markerov (558 lokusov). Z mikrosatelitov 149 markerov (153 lokusov) bolo navrhnutých z jačmenných EST a 7 zo pšeničných EST.

Bol preukázaný vysoký stupeň polymorfizmu (70 %), čo uľahčilo mapovanie 197 SSR markerov, pre ktoré ešte neboli publikované genetické štúdie.

Leišová et al. (2007) zisťovali genetickú diverzitu rôznych genotypov jačmeňa a ovsa. Použitím 26 mikrosatelitných markerov, ktoré pokrývali 6 chromozómov, analyzovali 176 genotypov jačmeňa a detegovali 328 alel, s priemerným počtom 12,6 alel na lokus. Taktiež 26 mikrosatelitných lokusov použili na analýzu 330 genotypov ovsa, pričom spolu detegovali 353 alel s priemerným počtom 13,6 alel na lokus. Priemerná hodnota indexu diverzity (DI) bola pre jačmeň 0,11 a 0,09 pre ovos. Zostrojením dendrogramu boli odlišené genotypy podľa miesta pôvodu, veku odrody a pôvodu v jednotlivých klastroch. Výskum poukázal na negatívny účinok šľachtiteľského procesu na úroveň genetickej diverzity, preto je potrebné uchovávanie genetického materiálu jačmeňa i ovsa.

Varshney et al. (2007) spojením 6 nezávislých genetických máp získali mapu zhody mikrosatelitných markerov jačmeňa. Zjednotená genetická mapa zahŕňala 775 jedinečných mikrosatelitných lokusov a 688 párov primerov, ktorých priemerný počet bol 111 markerov na väzbovú skupinu. Genómové mikrosatelitné markery vykazovali vyšší polymorfický informačný obsah (v priemere 0,61) v porovnaní s EST-SSR makermi (s priemerom 0,48). Genetická mapa pokrývala 1 068 cM s priemernou hustotou jedného SSR markera 1,38 cM.

Autori zisťovali genetickú diverzitu medzi jačmeňmi pozbieranými v Tunisku a určovali fylogenetické vzťahy medzi nimi. Pomocou 3 SSR markerov bolo získaných spolu 9 PCR produktov v 7 polymorfických lokusoch. Hodnoty polymorfizmu sa pohybovali od 14,28 do 42,85 %. Klastrová analýza rozdelila sledované jačmene na 3 skupiny, ktoré boli nezávislé od geografického pôvodu (Guasmi et al., 2008).

Jilal et al. (2008) použili kombináciu 20 génových a genómových mikrosatelitných markerov na štúdium genetickej diverzity a rozlíšenie geografického pôvodu jačmeňov pochádzajúcich z 29 krajín sveta. Analyzovaný súbor jačmeňov ICARDA obsahoval 304 odrôd, medzi ktorými 19 lokusov bolo vysoko polymorfných. Polymorfický informačný obsah mal hodnoty v rozmedzí 0,39 - 0,92, pričom priemer týchto hodnôt bol 0,78. Pomocou 20 mikrosatelitov detegovali spolu 403 alel, s priemerom 20,2 alel na lokus, pričom počet alel sa pohyboval od 37 do 5. Na základe UPGMA klastrovej analýzy sa genotypy jačmeňov zoskupili podľa regiónov do troch skupín. Prvá skupina jačmeňov pochádzala z Východnej Afriky a z Južnej Ameriky, druhú skupinu tvorili odrody z oblasti Kaukazu a tretia skupina zahŕňala genotypy z Blízkeho Východu,

zo Strednej a Východnej Ázie a zo Severnej Afriky. Genetická rôznorodosť poddruhov umožnila rozdelenie jačmeňov na vyšľachtené jačmene (dvojradowé a šesťradové), divý typ *Hordeum spontaneum* a poddruh *H. agriocrithon*.

Štúdium genetickej rôznorodosti bolo prevedené na 64 genotypoch nahých jačmeňov pestovaných v oblasti Qinghai-Tibet v Číne. Analýzy boli uskutočnené pomocou 30 mikrosatelitov a v 22 polymorfných SSR lokusoch bolo detegovaných spolu 132 alel. Počet alel na lokus sa pohyboval od 2 do 15, hodnota polymorfického informačného obsahu (PIC) bola od 0,16 do 0,91 s priemerom 0,65. Aplikáciou UPGMA klastrovej analýzy boli genotypy rozdelené do 5 hlavných skupín a navzájom od seba odlišené. Výsledky poukazujú na vysoký stupeň polymorfizmu medzi nahými jačmeňmi z oblasti Qinghai-Tibet v Číne, ktoré môžu byť považované za významný genetický zdroj pre šľachtenie nahých jačmeňov (Pan et al., 2008).

Backes et al. (2009) sledovali genetickú rôznorodosť medzi 240 genotypmi jačmeňa, ktoré boli pestované v 24 oblastiach v Eritrei. Použitím 39 mikrosatelitných markerov zaznamenali významnú genetickú rôznorodosť medzi jednotlivými oblasťami s pestovaným jačmeňom. V 36 mikrosatelitných lokusoch detegovali spolu 274 rôznych alel, pričom počet alel na lokus sa pohyboval od 3 do 17 s priemerom 7,6 alel na lokus. Genetická diverzita medzi sledovanými eritrejskými jačmeňmi mala hodnotu 97,3 %.

Gong et al. (2009) použili 52 mikrosatelitných markerov na zhodnotenie genetickej diverzity 90 genotypov jačmeňa. Z analyzovaného súboru jačmeňov pochádzalo 33 divých genotypov z oblasti Qinghai-Tibet, 56 odrôd z iných oblastí Číny a jeden divý typ z Izraela. V 52 mikrosatelitných lokusoch bolo detegovaných spolu 206 alel v rámci 90 genotypov, z ktorých 111 bolo bežných alel. Počet alel na lokus sa pohyboval od 1 do 9, s priemernou hodnotou 4,0. Hodnota polymorfického informačného obsahu (PIC) varíovala od 0 do 0,856 medzi všetkými markermi, s priemerom 0,547. Hodnota PIC divých jačmeňov pozbieraných z oblasti Qinghai-Tibet sa pohybovala od 0 do 0,813 s priemernou hodnotou 0,543, kým pri čínskych odrodách sa táto hodnota pohybovala od 0 do 0,790 s priemerom 0,490. Mikrosatelitné markery jasne odlišili divé typy jačmení z oblasti Qinghai-Tibet od čínskych kultivovaných odrôd. Medzi divými genotypmi z oblasti Qinghai-Tibet bolo pozorovaných 24 jedinečných alel. Frekvencia výskytu jedinečných alel v súbore jačmeňa z oblasti Qinghai-Tibet bola v priemere 2,1 násobne vyššia ako v prípade pestovaných čínskych odrôd. Päť zo siedmich chromozómov obsahovalo viac jedinečných alel v divých jačmeňoch z oblasti Qinghai-Tibet, ale chromozóm 2H

mal viac jedinečných alel v pestovaných odrodách. Prítomnosť vysokého počtu jedinečných alel môže odrážať adaptáciu týchto genotypov jačmeňa na odlišné prostredie a produkčné systémy.

V štúdií prevedenej Chaabane et al. (2009) bolo použitých 18 vybraných markerov jednoduchých opakujúcich sa sekvencií (SSRs) na charakterizáciu súboru tuniských jačmeňov. Analyzovaný súbor vzoriek obsahoval 6 tuniských vyšľachtených odrôd jačmeňa a 6 krajových odrôd z rôznych oblastí Tuniska. Amplifikáciou SSR lokusov získali 17 primerových párov, z ktorých len 11 prejavilo dostatočne vysoký polymorfizmus. Jedenásť primerových párov produkovalo spolu 31 alel, pričom počet alel na lokus sa pohyboval od 1 do 5 s priemerom 2,81 alely na lokus. Použitím UPGMA klastrovej analýzy podobnosti bolo 12 študovaných genotypov jačmeňa rozdelených do dvoch skupín, a to do skupiny dvojradoých a šesťradoých jačmeňov.

Orabi et al. (2009) študovali vzťahy medzi 185 genotypmi divých jačmeňov (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) a vyšľachtených jačmeňov (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) pochádzajúcich z piatich oblastí regiónu Západnej Ázie a Severnej Afriky (WANA). Na analýzy použili 36 mikrosatelitných markerov, pomocou ktorých detegovali 617 alel s priemerom 17,14 alel na lokus. Jednotlivé genotypy boli následne rozdelené do skupín podľa poddruhu a pôvodu. Divé typy jačmeňov z oblasti WANA ako aj vyšľachtené odrody z Blízkeho Východu vykazovali vysokú genetickú diverzitu.

Wang et al. (2009) skúmali genetickú diverzitu 90 vzoriek jačmeňa použitím ISSR a SSR markerov. Súbor vyšetovaných vzoriek obsahoval 45 príbuzných divých genotypov jačmeňa z Tibetu a 45 divých genotypov z rôznych oblastí Stredného Východu. Výsledky poukázali na vyššiu genetickú diverzitu tibetských príbuzných divých genotypov jačmeňa v porovnaní s jačmeňmi zo Stredného Východu. Pri tibetských genotypoch 10 ISSR primerov amplifikovalo 91 alelických variant, z ktorých 79 bolo polymorfných (86,81 %) a pri genotypoch zo Stredného Východu 82 alelických variant, z ktorých 66 bolo polymorfných (80,49 %). Jedenásť primerových párov SSR markerov amplifikovalo 100 alelických variant medzi tibetskými genotypmi so 100 polymorfnými prúžkami (100%). Medzi genotypmi zo Stredného Východu bolo pomocou SSR markerov produkovaných 78 alelických variant obsahujúcich 77 polymorfných prúžkov (98,72%). Hodnota celkovej génovej diverzity (HT) tibetských jačmeňov (0,227 pre ISSRs a 0,126 pre SSRs) bola vyššia ako pri jačmeňoch zo Stredného Východu (0,212 pre ISSRs a 0,102 pre SSRs). Klastrová analýza ISSR a SSR ako výsledok UPGMA metódy odhalila dve odlišné

skupiny korelujúce s geografickým pôvodom vzoriek. Výsledky poskytujú dôkaz na teóriu pôvodu jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.).

Autori v štúdiu popísali genetickú a fenotypovú charakteristiku súboru 224 vzoriek jarných jačmeňov (*Hordeum vulgare* L.), ktoré boli získané z IPK génovej banky v Nemecku a pochádzali z Európy, z Ameriky, z Východnej Ázie, zo Západnej Ázie a Severnej Afriky. Analýza genetickej štruktúry bola založená na využití 45 EST-SSR markerov, pomocou ktorých bolo získaných spolu 228 alel, s počtom 2 až 14 alel na SSR marker. Hodnota polymorfického informačného obsahu sa pohybovala od 0,04 do 0,81 s priemernou hodnotou 0,54. Viac ako 65 % mikrosatelitných markerov malo PIC hodnotu v rozmedzí 0,40 a 0,80. Zostrojením UPGMA dendrogramu bol súbor jačmeňov rozdelený na dve hlavné skupiny, zahŕňajúce dvojradové a šesťradové jačmene. Medzi týmito skupinami jačmeňa a medzi jačmeňmi z rôznych kontinentov bola dokázaná vysoká fenotypová variabilita vo všetkých znakoch (čas kvitnutia, výška rastliny, hmotnosť 1000 zrn, obsah bielkovín a obsah škrobu) (Haseneyer et al., 2010).

Chen et al. (2010) pomocou mikrosatelitných markerov študovali genetickú diverzitu 116 genotypov jačmeňa, ktoré reprezentovali päť rôznych ekologicko-geografických oblastí Číny. Dvadsaťjeden SSR lokusov odhalilo 128 alel, s priemerom 6,1 alel na lokus. Najvyšší počet alel na lokus bol detegovaný pri jačmeňoch z oblasti Qinghai-Tibet, ktoré vykazovali tiež najvyšší počet jedinečných alel (7). Bola dokázaná súvislosť medzi SSR a ekologicko-geografickými podmienkami pre 11 mikrosatelitných markerov. Pomocou štyroch až šiestich SSR markerov boli dostatočne rozlíšiteľné jednotlivé skupiny jačmeňov podľa ich ekologicko-geografického pôvodu.

Kandemir et al. (2010) študovali stupeň genetickej odlišnosti pri 3 genotypoch jačmeňa pochádzajúcich z Turecka. Z troch použitých genotypov jačmeňa jeden bol krajovou odrodou (PI 470281), druhý bol čistou líniou (CIHO 10093) a tretím genotypom bola významná turecká odroda (Tokak 157/37) považovaná za krajovú odrodu. Na detekciu úrovne polymorfizmu vo vnútri genotypov a medzi týmito genotypmi bolo použitých 30 SSR markerov. Takisto bolo sledovaných aj niekoľko morfológických markerov. Desať rastlín línie CIHO 10093 pri 30 SSR markeroch nevykazovalo žiadny polymorfizmus. Už 5 SSR markerov potvrdilo polymorfizmus vo vnútri súboru 60 rastlín odrody Tokak 157/37, v ktorom sa detegovali len 2 odlišné genotypy so zastúpením 58 a 2 rastlín. Toto poukazuje na stratu genetickej diverzity a na fakt, že odrodu Tokak 157/37 nemožno naďalej považovať za krajovú odrodu. Dvadsaťtri z 30 SSR markerov bolo polymorfných pre 52 rastlín krajovej odrody

PI 470281, pričom 30 SSR lokusov dávalo 70 alel. Medzi 52 analyzovanými rastlinami bolo detegovaných 46 odlišných genotypov, ktoré poukazujú na vysoký stupeň polymorfizmu. Pre morfológické markery nebol zistený žiadny polymorfizmus. Genetická diverzita pozorovaná na úrovni DNA, ale nie na morfológickej úrovni, môže poukazovať na to, že turecká krajová odroda PI 470281 mohla obsahovať nové alely v lokusoch, ktoré majú vplyv na významné agronomické znaky.

Genetická variabilita a vzťahy medzi 12 tuniskými ozimnými jačmeňmi a 2 vyšľachtenými odrodami boli hodnotené pomocou RAPD a SSR markerov. Bol zistený vysoký stupeň polymorfizmu pomocou RAPD aj SSR markerov a priemerná hodnota polymorfického informačného obsahu bola 0,477 pre RAPD a 0,533 pre SSR markery. Pri RAPD analýzach z 93 bandov 69 (74 %) bolo polymorfných. Počet alel sa pohyboval od 4 do 10 na primer s priemernou hodnotou 6,2 alel na primer. Genetická odlišnosť založená na RAPD (RAPD-GD) sa pohybovala od 0,114 do 0,933 s priemerom 0,523. Mikrosatelitnými analýzami bolo detegovaných spolu 43 alel, z ktorých 39 alel (90,7 %) bolo polymorfných. Počet alel na primer sa pohyboval od 2 do 4 s priemerom 2,87 alel na SSR primer. Genetická odlišnosť odvodená od mikrosatelitov (SSR-GD) bola v rozmedzí 0,423 a 0,910 s priemerom 0,665. V porovnaní s RAPD metódou sa mikrosatelity javili ako lepšie markery na detekciu genetickej rôznorodosti medzi jačmeňmi (Karim et al., 2010).

Salem et al. (2010) skúmali genetickú diverzitu v súbore 27 genotypov jačmeňa, ktoré pochádzali z Egypta. Na analýzy použili 23 mikrosatelitných markerov odvodených od EST sekvencií, ktoré zastupovali všetkých sedem väzbových skupín jačmeňa. Z použitých 23 EST-SSRs 22 vykazovalo polymorfizmus a jeden bol monomorfný. Spolu bolo detegovaných 95 alel. Počet alel na lokus sa pohyboval od 2 do 12 s priemerom 4,318 alely na lokus. Najnižší a najvyšší počet alel na lokus bol identifikovaný na chromozóme 5H a 4H s hodnotami 3,00 a 6,33. Polymorfický informačný obsah 22 EST-SSR lokusov sa pohyboval od 0,137 do 0,896 s priemernou hodnotou 0,563. Genetická diverzita sa zvyšovala s narastajúcim počtom alel a korelačný koeficient medzi týmito znakmi bol vysoký ($r=0,741$). Využitím UPGMA klastrovej analýzy a zostrojením dendrogramu boli genotypy jačmeňov rozdelené do štyroch skupín.

Varshney et al. (2010) analyzovali súbor genotypov jačmeňa ICARDA zložený zo 185 vyšľachtených a 38 divých genotypov pozbieraných z 30 krajín štyroch kontinentov. Na analýzu použili 68 SNP markerov a 45 mikrosatelitných markerov

získaných z génov (EST-SSRs). Sedemdesiatjeden SNP markerov dávalo 143 alel. Počet mikrosatelitných alel na lokus sa pohyboval od 3 do 22 s priemernou hodnotou 7,9 alel na marker. Priemerná hodnota polymorfického informačného obsahu zaznamenaná pre SSR markery bola 0,63 a pre SNP markery 0,38. Heterogénnosť dosahovala v SNP lokusoch v priemere 5,72 % vzoriek a v SSR lokusoch 12,42 % vzoriek. Klastrová analýza bola založená na SSR a SNP markeroch, pri ktorej väčšina klastrov obsahovala genotypy rovnakého geografického pôvodu. Genotypy pochádzajúce zo Stredovýchodnej a Severovýchodnej Ázie vykazovali vyššiu diverzitu v porovnaní s genotypmi z iných geografických oblastí. Divoko rastúce genotypy oproti šľachteným genotypom vykazovali vyšší celkový počet alel, vyšší počet alel na lokus, vyššiu rôznorodosť alel a vyšší počet jedinečných alel. Skúmaný súbor genotypov ICARDA vykazoval významné genetické rozdiely, čo dáva predpoklad na využitie týchto genotypov v šľachtení jačmeňa na toleranciu voči suchu a teplu.

Na analýzu genetickej diverzity medzi 40 vybranými genotypmi jačmeňa Wang et al. (2010) použili 35 mikrosatelitných párov primerov, pomocou ktorých získali 85 alel. Počet alel na lokus bol od 1 do 5 s priemernou hodnotou 2,4 alely na lokus. Klastrová analýza založená na koeficiente genetickej podobnosti rozdelila analyzovaný súbor jačmeňov na dve skupiny. Genetická diverzita medzi čínskymi sladovníckymi jačmeňmi vo vnútri podskupiny bola nižšia ako medzi ostatnými genotypmi. Toto dáva predpoklad na využitie vybraných genotypov jačmeňa rôzneho pôvodu v šľachtení na sladovnícke účely.

Pomocou mikrosatelitných markerov Sun et al. (2011) charakterizovali spolu 175 genotypov jačmeňa, z ktorých 40 genotypov pochádzalo z Tibetu, 10 zo Sýrie, 72 zo Severnej Ameriky, 36 z Európy, 9 z Južnej Ameriky a 8 genotypov bolo austrálskych. Štyridsaťdva mikrosatelitných párov primerov amplifikovalo 278 alel s priemerom 6,62 alel na pár primerov. Priemerná hodnota genetickej diverzity pre všetky populácie bola 0,3387. Klastrová analýza dokázala, že európske a severoamerické genotypy boli zoskupené a tibetské divé jačmene boli úplne oddelené od ostatných 5 populácií jačmeňov. Bola zaznamenaná súvislosť medzi mikrosatelitnými markermi a 14 kvantitatívnymi znakmi, a to pre lokusy 18 SSR markerov. Autori štúdie poukázali na potenciálne využitie týchto markerov pre ďalšie QTL mapovanie kvantitatívnych znakov a pre markermi podporovanú selekciu.

2 Cieľ práce

Molekulárne markery odhaľujúce polymorfizmus na úrovni DNA majú široké využitie pri identifikácii a vzájomnom odlíšení genotypov rastlín, najmä obilnín. Mikrosatelitné markery sú vďaka svojmu vysokému polymorfizmu najúčinnjšími DNA markermi pri genetických štúdiách jačmeňa. Cieľom diplomovej práce bolo pomocou STMS metódy analyzovať súbor 24 genotypov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare*) aplikáciou 5 vybraných mikrosatelitných markerov, ktoré sú genómovo špecifické pre jačmeň.

Stanovili sme si nasledovné ciele práce:

1. analýza polymorfizmu DNA založená na variabilite v mikrosatelitných sekvenciách genómu vybraných genotypov jačmeňa,
2. identifikácia a vzájomné rozlíšenie sledovaných genotypov jačmeňa siateho využitím mikrosatelitných analýz (STMS),
3. určenie podobnosti a vzájomných genetických vzťahov medzi analyzovanými genotypmi jačmeňa siateho.

3 Materiál a metódy

3.1 Použitý biologický materiál

Na genetické analýzy pomocou mikrosatelitných markerov sme použili súbor 24 genotypov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.), pričom všetky genotypy boli dvojradového typu a jarnej formy (Tab. 4).

Tab. 4

Zoznam analyzovaných genotypov jačmeňa siateho a ich rodokmeň

(http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/asp2/default_c.htm)

Číslo	Genotyp	Rodokmeň
1.	Dregeruv Imperiál	S- Bestehornuv cisársky
2.	Hanácky exportný	Jarni VIII x Hanácky VIII
3.	Horický	S- LV Horice
4.	Janovický	Ratborský Hanácky x Heils Frankengerste
5.	Jindrichovický K 64	Opavský Kneifl x Dewersdorfský
6.	Krajová St. Hrozenkov	LV Starý Hrozenkov
7.	Krajová z Orlove	LV Orlova
8.	Kvasický	S- Old Hanna Landvariety
9.	Moravský nepolehavý IGB	neznámy
10.	Moravský nepolehavý R III/12	neznámy
11.	Olešenský	S- LV Staročeský
12.	Pisarecký	S- LV Kurovice
13.	Semčický hospodársky	Dobrovický Staročeský x Maya
14.	Semčický pivovar	neznámy
15.	Stupický Hanácky	S- LV Hanácky
16.	Stupický plnozrnný	Starnovský Kneifl x Stupický Hanácky
17.	Víglašský polojemný	RA 800 x Hanácky
18.	Zborovický Kargyn	Proskovcuv Hana Pedigree x LV M.A. Kargyn
19.	Židlochovický Glória	Pamers Vollkorn x Vacenovice XII
20.	Expres	SK-3455 x Akcent
21.	Kompakt	Galan x KM-A-10
22.	Jubilant	SK-1952-7 x Dera
23.	Nitran	Kompakt x Forum
24.	Malz	Famin x Scarlet

3.2 Izolácia a prečistenie DNA jačmeňa

Celkovú DNA sme izolovali z mladých rastlín, zo 7-10 dňových listov jačmeňa. Čerstvý rastlinný materiál sme homogenizovali v trecej miske po pridaní tekutého dusíka. Samotnú izoláciu DNA jačmeňa sme previedli podľa postupu vytvoreného kombináciou dvoch izolačných postupov - podľa Dellaportu et al. (1983) a Granera et al. (1990):

- mechanicky sme homogenizovali 0,1 – 1 g listového pletiva v tekutom dusíku,
- do kyvety (50 ml) sme pridali redestilovanú vodu v ml v objeme = 2 – hmotnosť pletiva [g],
- homogenizované pletivo sme preniesli do pripravených kyviet a pridali 4 ml extrakčného roztoku (150 mol.dm^{-3} Tris, pH 8,0; 75 mmol.dm^{-3} EDTA, pH 8,0; 2 mol.dm^{-3} NaCl), jemne sme zamiešali,
- pridali sme 10 μl 2-merkaptoetanolu,
- pridali sme 400 μl 20% SDS a jemne sme zamiešali,
- inkubovali sme 10 minút pri 65°C ,
- pridali sme 2 ml 5 mol.dm^{-3} octanu draselného a jemne sme premiešali prevrátením tuby,
- inkubovali sme 30 minút pri 0°C ,
- odstredovali sme 10 minút pri 10 000 ot/min,
- supernatant sme preniesli do novej kyvety a pridali rovnaký objem vychladeného izopropanolu,
- nukleové kyseliny sme nechali vyzrážať izopropanolom 30 minút resp. cez noc pri laboratórnej teplote,
- precipitovanú DNA sme vybrali háčikom alebo namotali na sklenenú tyčinku (prípadne odstredili 5 minút pri 10 000 ot/min., ak nebola v jednom celku), premyli sme ju v 70% a 96% etanole a nechali vysušiť,
- DNA sme rozpustili v 250 μl redestilovanej vody,
- pridali sme 2 μl prevarenej (10 min pri 100°C) RNázy A (10 mg. cm^{-3}) a inkubovali 30 minút pri 37°C ,
- pridali sme 50 μl 3 mol.dm^{-3} octanu sodného, premiešali a nechali stáť 10 minút pri laboratórnej teplote,

- pridali sme 400 – 500 μ l vychladeného izopropanolu a nechali zrážať DNA 10 minút pri laboratórnej teplote,
- precipitovanú DNA sme vybrali háčikom alebo zrazeninu odstredili pri nízkych otáčkach, premyli postupne 70% a 96% etanolom, vysušili a opatrne rozpustili v minimálnom objeme tlmivého roztoku TE (10 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ Tris-HCl, pH 8,0; 1 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ EDTA) alebo v redestilovanej vode.

Kvalitu izolovanej DNA jačmeňa sme sledovali a jej kvantitu stanovili elektroforetickou analýzou v 1% agarózovom géli. Ako štandardy kvality sme použili DNA z λ -fágu so spektrofotometricky stanovenou koncentráciou.

3.3 Amplifikácia DNA pomocou lokus-špecifických mikrosatelitných primerov

Jednotlivé mikrosatelitné analýzy jačmeňa sme uskutočnili v objeme 20 μ l. Na analýzy sme použili 5 mikrosatelitných párov primerov so špecifickou sekvenciou, ktoré popísali Becker a Heun (1995) a Macaulay et al. (2001) (Tab. 5). Podmienky amplifikácie pre mikrosatelitné markery sme aplikovali tiež podľa Beckera a Heuna (1995) a Macaulaya et al. (2001) (Tab. 6).

Tab. 5

Použitie SSR markery jačmeňa, ich umiestnenie na chromozóme, sekvencie párov primerov a repetícia mikrosatelitu (Becker a Heun, 1995; Macaulay et al., 2001)

SSR marker	Lokus na chromozóme	Sekvence primerov 5' → 3'	Repetícia mikrosatelitu
Bmac0040	6H	AGCCCGATCAGATTTACG TTCTCCCTTTGGTCCTTG	(AC) ₂₀
Bmag0173	6H	CATTTTTGTTGGTGACGG ATAATGGCGGGAGAGACA	(CT) ₂₉
Bmag0211	1H	ATTCATCGATCTTGTATTAGTCC ACATCATGTTCGATCAAAGC	(CT) ₁₆
Bmag0225	3H	AACACACCAAAAATATTACATCA CGAGTAGTTCATGTGAC	(AG) ₂₆
HVGNIRE	3H	GAGTTGCAACAACAACAGGGTA GTCATGCACATCATCGAGATCT	(AC) ₆ G ₁₄

Tab. 6**Zloženie reakčnej zmesi a podmienky PCR pre použité SSR markery
(Becker a Heun, 1995; Macaulay et al., 2001)**

SSR marker	Zloženie 20 µl reakčnej zmesi	Podmienky PCR	Anelačná teplota
Bmac0040	Macaulay et al., 2001	A program	58 °C
Bmag0173	Macaulay et al., 2001	A program	58 °C
Bmag0211	Macaulay et al., 2001	A program	58 °C
Bmag0225	Macaulay et al., 2001	A program	58 °C
HVGNIRE	Becker a Heun, 1995	B program	60 °C

Zloženie 20 µl reakčnej zmesi (Macaulay et al., 2001) (Tab. 6):

- 1x PCR tlmivý roztok
- 300 µmol.dm⁻³ každého dNTP
- 20 ng primer 1
- 20 ng primer 2
- 0,6 U Taq DNA polymerázy
- 25 ng DNA

Zloženie 20 µl reakčnej zmesi (Becker a Heun, 1995) (Tab. 6):

- 1x PCR tlmivý roztok
- 100 µmol.dm⁻³ každého dNTP
- 20 ng primer 1
- 20 ng primer 2
- 0,6 U Taq DNA polymerázy
- 25 ng DNA

Podmienky polymerázovej reťazovej reakcie (Tab. 6):

1. A program:

- 1 cyklus: 3 minúty 94°C, 1 minúta 58°C, 1 minúta 72°C
- 30 cyklov: 30 sekúnd 94°C, 30 sekúnd 58°C, 30 sekúnd 72°C
- záverečný krok: 5 minút 72°C

2. B program:

- úvodná denaturácia: 5 minút 95°C
- 42 cyklov: 92°C, 1 minúta; 60°C, 1 minúta; 72°C, 1 minúta
- záverečný krok: 10 minút 72°C

3.4 Elektroforetické delenie a vizualizácia DNA fragmentov v polyakrylamidovom géli

Amplifikované alely sme separovali v 6% polyakrylamidovom géli (35 cm x 45 cm x 0,4 mm) denaturovanom močovinou.

Príprava gélového roztoku:

- 11 ml 40% akrylamid/bis (19 : 1)
- 3 ml 10x TBE (107,8 g Tris- bázy, 7,44 g EDTA a 55 g kyseliny boritej v 1 dm⁻³ roztoku, pH 8,3)
- 12 ml redestilovanej vody
- doplnili sme horúcim roztokom 10 M močoviny na objem 60 ml
- pridali sme 100 µl TEMED-u a 500 µl 10% persíranu amónneho

Príprava vzoriek DNA:

- k 5 µl PCR vzorky sme pridali v pomere 1 : 0,8 tlmivý farbiaci roztok (4,8 g močoviny, 10 ml vody, 0,05 g brómfenolovej modrej, 10 µl 10 mol.dm⁻³ hydroxidu sodného),
- tesne pred nanesením do gélu sme vzorky denaturovali zahriatím na 100°C po dobu 2 minút a ihneď sme ich preniesli do ľadu.

Do gélu sme naniesli pripravené vzorky v objeme 4,5 µl, pričom do jednej línie každého gélu sme naniesli 4,5 µl STR 3 X roztoku (marker) so zložením 10 mmol.dm⁻³ NaOH, 95 % formamidu, 0,05 % brómfenolovej modrej a 0,05 % xylén cyanol FF. Delenie amplifikovaných alel prebiehalo v elektroforetickej aparátúre OWL pri 70 W v tlmivom roztoku 1x TBE počas 3-4 hodín, v závislosti od predpokladanej veľkosti fragmentov. Po ukončení elektroforetického delenia a oddelení sklenených platní sme farbili géľ fixovaný na malej sklenej platni.

Farbenie DNA striebrom podľa Bassama et al. (1991):

- sklenú platňu s gélom sme na 20 minút ponorili do vychladeného fixačného roztoku 10% kyseliny octovej a intenzívne premývali pri laboratórnej teplote,
- následne sme platňu premývali vo vychladenej redestilovanej vode dvakrát po 5 minút,

- sklo s gélom sme ponorili do čerstvo pripraveného farbiaceho roztoku (2 g dusičnanu strieborného, 3 ml 37% formaldehydu a 2000 ml redestilovanej vody) a počas 30 minút sme intenzívne premiešavali,
- v tmavej miestnosti sme gél ponorili do vody a maximálne 10-15 sekúnd sme intenzívne vymývali,
- gél sme preniesli do nádoby s vychladenou vývojkou [50 g uhličitanu sodného, 3 ml 37% formaldehydu, 400 µl tiosíranu sodného (zásobný roztok 10 mg.cm⁻³), 2000 ml redestilovanej vody] a po 3 až 5 minútach premývania sa objavili mikrosatelitné frakcie,
- gél sme vložili do fixačného roztoku na 30 minút a následne nechali vysušiť pri laboratórnej teplote.

Dĺžku mikrosatelitných alel sme určili porovnávaním najsilnejšieho prúžku so štandardom, 10 bp dĺžkovým markerom (ladder).

3.5 Hodnotenie polymorfizmu

Rôznorodosť medzi genotypmi jačmeňa a využiteľnosť mikrosatelitných analýz v praxi sme hodnotili pomocou indexu diverzity (DI), polymorfického informačného obsahu (PIC) a pravdepodobnosti identity (PI).

Z frekvencie jednotlivých alel detegovaných pre každý mikrosatelitný marker sme vypočítali:

a) index diverzity (DI) (Weir, 1990),

$$DI = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

b) polymorfický informačný obsah (PIC) (Weber, 1990),

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

c) pravdepodobnosť identity (PI) (Paetkau et al., 1995),

$$PI = \sum p_i^4 + \sum_{i=1}^{i=n-1} \sum_{j=i+1}^n (2 p_i p_j)^2$$

kde p_i a p_j znamenajú frekvenciu i -tej a j -tej alely v danej populácii.

3.6 Hodnotenie genetickej diverzity klastrovou analýzou

V DNA profiloch sme hodnotili polymorfické markery jačmeňa ako prítomné (1) alebo neprítomné (0) a vytvorili sme tabuľku, ktorú sme použili na výpočet Diceovho koeficientu genetickej podobnosti pre všetky párové kombinácie v programe DARwin5. Na základe získaných hodnôt sme v uvedenom programe vytvorili dendrogram využitím hierarchickej klastrovej analýzy metódou UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages). Genetická diverzita bola v dendrograme graficky vyjadrená vytvorenými skupinami genotypov s podobným alebo blízkym genetickým základom.

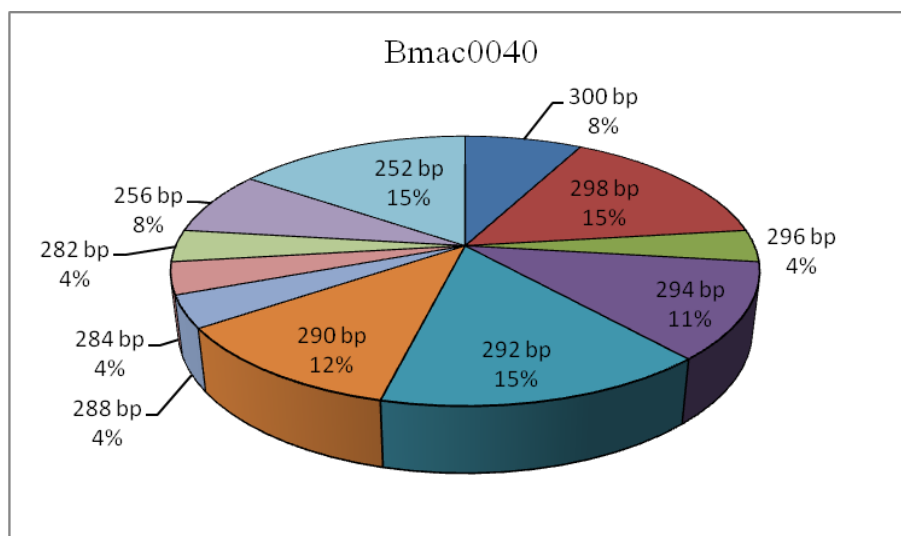
4 Výsledky a diskusia

Na odlišenie 24 genotypov jačmeňa sme použili 5 mikrosatelitných markerov, z ktorých 4 boli publikované Macaulayom et al. (2001) a jeden popísali Becker a Heun (1995). Z použitých mikrosatelitných markerov 4 boli dokonalé a jeden zložený.

Bmac0040

Mikrosatelitný marker *Bmac0040* lokalizovaný na chromozóme 6H amplifikoval dokonalý mikrosatelit s motívom repetície (AC)₂₀. Na tomto lokuse bolo detegovaných jedenásť rôznych alel. Najčastejšie sa vyskytujúcimi alelami boli alely s veľkosťami 252 bp, 292 bp a 298 bp, ktoré mali frekvenciu výskytu 15 % a boli prítomné v štyroch odrodách. Ďalšie najčastejšie alely sa vyskytli pri troch genotypoch s 12% zastúpením a mali veľkosti 290 bp a 294 bp. Menšie zastúpenie (8 %) mali alely s veľkosťami 256 bp a 300 bp, ktoré boli dokázané v dvoch odrodách. Najmenej frekventované alely so 4% zastúpením boli alely s dĺžkami 282 bp, 284 bp, 288 bp a 296 bp a každá z nich sa nachádzala len v jednom genotype (Obr. 3).

Na hodnotenom lokuse sme pozorovali prítomnosť dvoch alel v prípade dvoch odrôd z analyzovaného súboru jačmeňa, Vígľašský polojemný a Židlochovický Glória, čo svedčí o heterozygotnom stave týchto odrôd. Všetky ostatné genotypy obsahovali len jednu alelu, boli v homozygotnom stave (Tab. 7, Obr. 4).



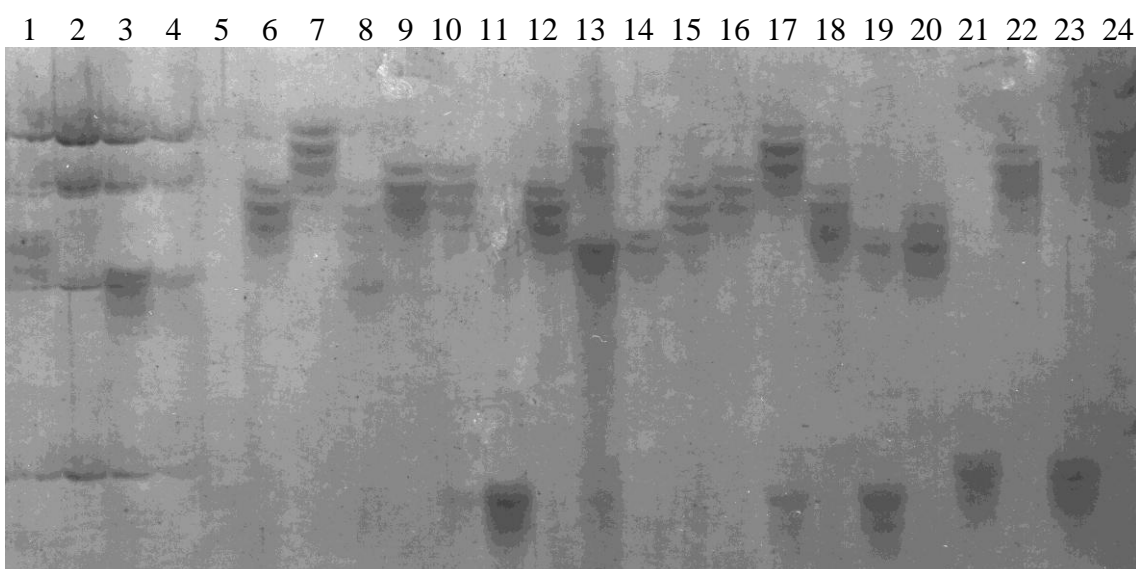
Obr. 3

Frekvencia výskytu mikrosatelitných alel na lokuse *Bmac0040*

Tab. 7

Detegované alely na lokuse *Bmac0040*

	<i>Genotyp</i>	<i>Alela (bp)</i>		<i>Genotyp</i>	<i>Alela (bp)</i>
1	Dregeruv Imperiál	290	13	Semčický hospodársky	300
2	Hanácky exportný	298	14	Semčický pivovar	290
3	Horický	282	15	Stupický Hanácky	292
4	Janovický	298	16	Stupický plnozrnný	294
5	Jindrichovický K 64	252	17	Vígl'ašský polojemný	298+252
6	Krajová St. Hrozenkov	292	18	Zborovický Kargyn	292
7	Krajová z Orlove	298	19	Židlochovický Glória	290+252
8	Kvasický	288	20	Expres	284
9	Moravský nepol. IGB	294	21	Kompakt	256
10	Moravský nepol. R III/12	294	22	Jubilant	296
11	Olešenský	252	23	Nitran	256
12	Pisarecký	292	24	Malz	300



Obr. 4

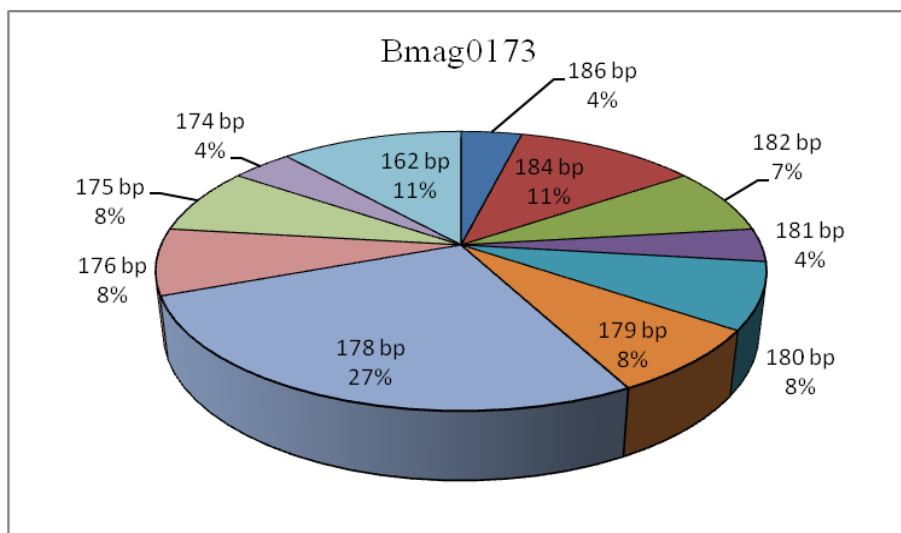
Elektroforeogram mikrosatelitných alel lokusu *Bmac0040*

Bmag0173

Použitý mikrosatelitný marker *Bmag0173*, ktorý sa nachádza na chromozóme 6H, amplifikoval dokonalý mikrosatelit s opakujúcou sa sekvenciou (CT)₂₉. Na sledovanom lokuse sme zistili jedenásť alel. Najfrekvencovanejšou alelou bola alela s veľkosťou 178 bp, ktorá bola prítomná v siedmich genotypoch, čo predstavuje 27 % všetkých genotypov. Nasledovali alely s dĺžkami 162 bp a 184 bp, ktoré zastupovali 12 % všetkých genotypov. Päť alel bolo nájdených v dvoch genotypoch s frekvenciou

výskytu 8 %. Najzriedkavejší výskyt (4 %) bol preukázaný u troch alel s veľkosťami 174 bp, 181 bp a 186 bp, ktoré sa vyskytli v sledovanom súbore len raz (Obr. 5).

Analýzou 24 genotypov jačmeňa sme v dvoch genotypoch, Kvasický a Stupický plnozrnný, detegovali na danom lokuse dve rôzne alely, čo potvrdzuje heterozygotný stav. Ostatných 22 genotypov pri hodnotení tohto lokusu vykazovalo homozygotný stav (Tab. 8, Obr. 6).



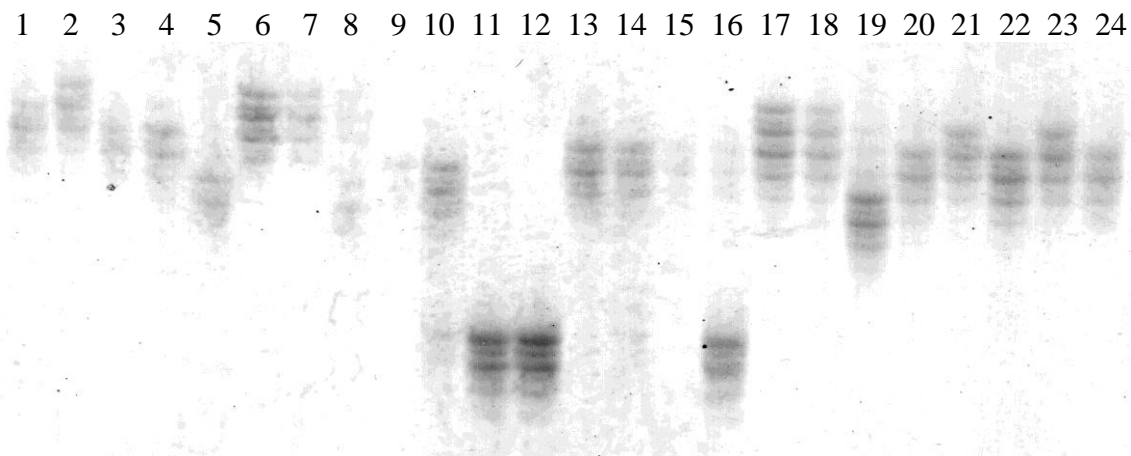
Obr. 5

Frekvencia výskytu mikrosatelitných alel na lokuse *Bmag0173*

Tab. 8

Detegované alely na lokuse *Bmag0173*

	<i>Genotyp</i>	<i>Alela (bp)</i>		<i>Genotyp</i>	<i>Alela (bp)</i>
1	Dregeruv Imperiál	181	13	Semčický hospodársky	178
2	Hanácky exportný	186	14	Semčický pivovar	178
3	Horický	179	15	Stupický Hanácky	178
4	Janovický	179	16	Stupický plnozrnný	178+162
5	Jindrichovický K 64	175	17	Vígľašský polojemný	182
6	Krajová St. Hrozenkov	184	18	Zborovický Kargyn	182
7	Krajová z Orlove	184	19	Židlochovický Glória	174
8	Kvasický	184+175	20	Expres	178
9	Moravský nepol. IGB	176	21	Kompakt	180
10	Moravský nepol. R III/12	176	22	Jubilant	178
11	Olešenský	162	23	Nítran	180
12	Pisarecký	162	24	Malz	178

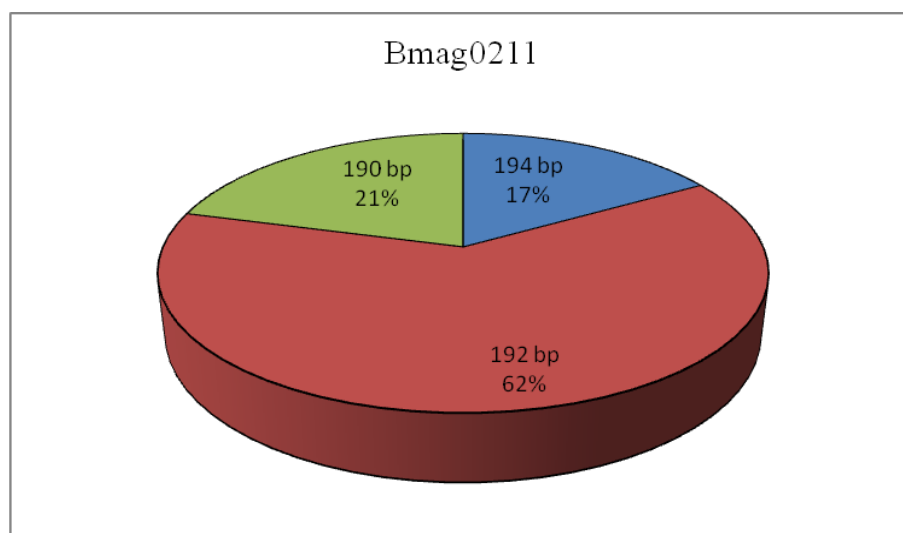


Obr. 6

Elektroforeogram mikrosatelitných alel lokusu *Bmag0173*

Bmag0211

Ďalší mikrosatelitný marker *Bmag0211*, ktorý je prítomný na 1H chromozóme, amplifikoval dokonalý mikrosatelit s repetitívnym motívom (CT)₁₆. Na sledovanom lokuse sa vyskytli tri alely s rôznou frekvenciou. Najvyššie zastúpenie mala alela s veľkosťou 192 bp, ktorá sa vyskytla v pätnástich genotypoch a tvorila až 63 % detegovaných alel na danom lokuse. Druhá najčastejšia alela (190 bp) s 21% zastúpením bola prítomná v piatich genotypoch. Najnižšia frekvencia výskytu na úrovni 17% bola zistená pre alelu s dĺžkou 194 bp, ktorú sme našli v štyroch genotypoch (Obr. 7).



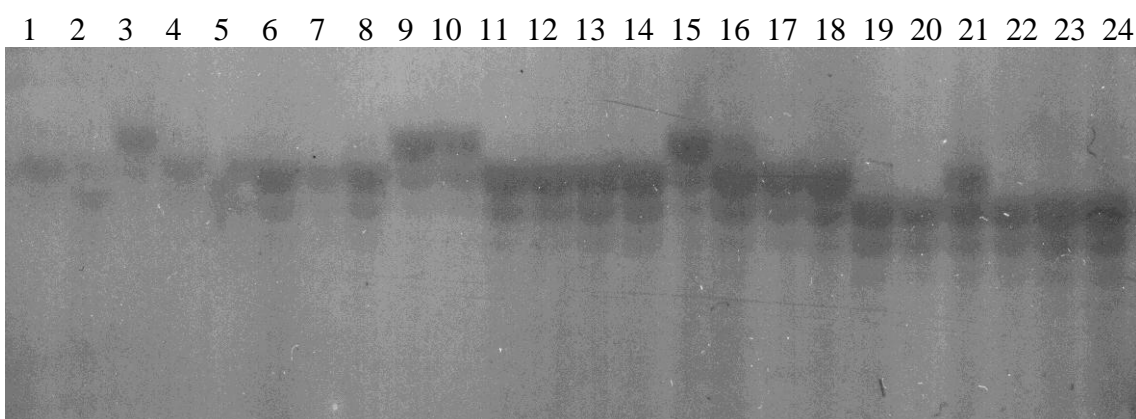
Obr. 7

Frekvencia výskytu mikrosatelitných alel na lokuse *Bmag0211*

Na sledovanom lokuse sme zistili pri každom genotype len jednu alelu, čo poukazuje na homozygotný stav analyzovaných jačmeňov (Tab. 9, Obr. 8).

Tab. 9
Detegované alely na lokuse *Bmag0211*

	<i>Genotyp</i>	<i>Alela (bp)</i>		<i>Genotyp</i>	<i>Alela (bp)</i>
1	Dregeruv Imperiál	192	13	Semčický hospodársky	192
2	Hanácky exportný	192	14	Semčický pivovar	192
3	Horický	194	15	Stupický Hanácky	194
4	Janovický	192	16	Stupický plnozrnný	192
5	Jindrichovický K 64	192	17	Víglašský polojemný	192
6	Krajová St. Hrozenkov	192	18	Zborovický Kargyn	192
7	Krajová z Orlove	192	19	Židlochovický Glória	190
8	Kvasický	192	20	Expres	190
9	Moravský nepol. IGB	194	21	Kompakt	192
10	Moravský nepol. R III/12	194	22	Jubilant	190
11	Olešenský	192	23	Nitran	190
12	Pisarecký	192	24	Malz	190



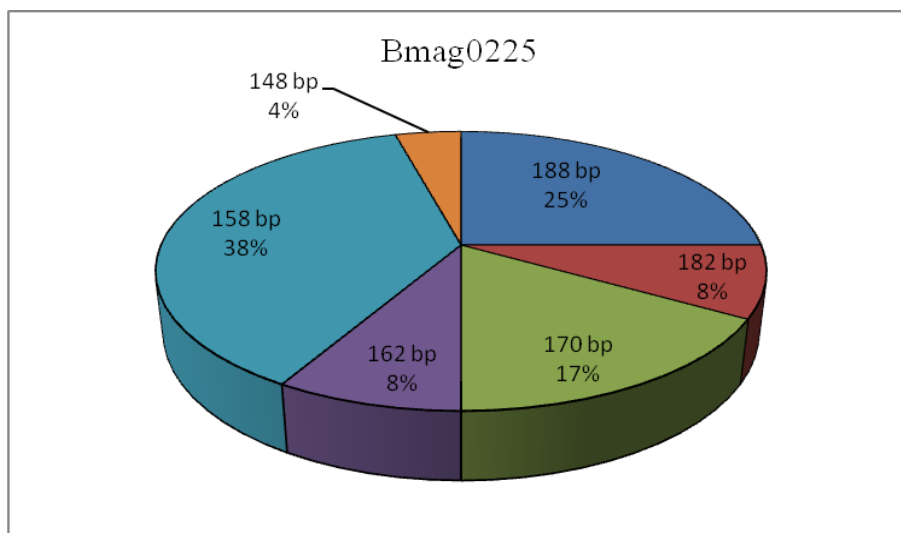
Obr. 8
Elektroforeogram mikrosatelitných alel lokusu *Bmag0211*

Bmag0225

Mikrosatelitným markerom *Bmag0225* umiestneným na 3H chromozóme bol naamplifikovaný dokonalý mikrosatelit s dinukleotidovým opakovaním (AG)₂₆. Na hodnotenom lokuse sme identifikovali šesť alel, pričom najfrekventovanejšia bola alela s veľkosťou 158 bp prítomná v deviatich genotypoch s 38% podielom z celkového počtu vzoriek. Druhá najpočetnejšia alela s dĺžkou 188 bp sa vyskytovala v šiestich genotypoch (25 %), po ktorej nasledovala alela veľkosti 170 bp so 17% zastúpením

(v štyroch genotypoch). Ďalšie dve alely veľkostí 162 bp a 182 bp mali nízku frekvenciu výskytu (len 8 %), pričom boli detegované v dvoch genotypoch. Alela s najmenšou početnosťou na tomto lokuse (4 %) bola alela s dĺžkou 148 bp, ktorá bola prítomná len pri odrode Pisarecký (Obr. 9).

Detekcia jednej alely v každom genotype na sledovanom lokuse potvrdila homozygotný stav týchto genotypov (Tab. 10, Obr. 10).



Obr. 9

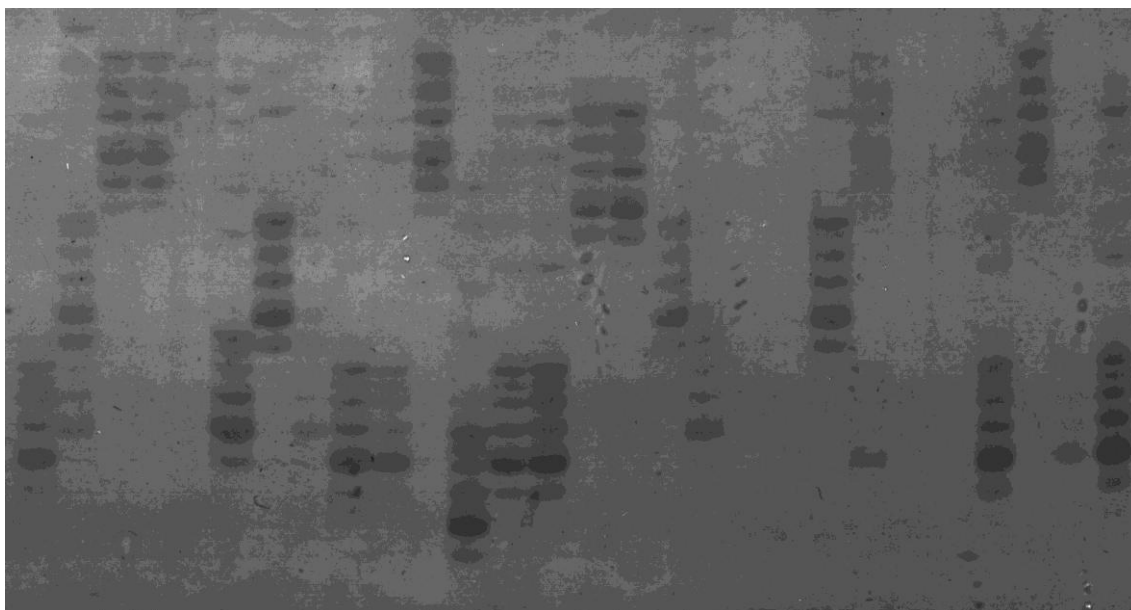
Frekvencia výskytu mikrosatelitných alel na lokuse *Bmag0225*

Tab. 10

Detegované alely na lokuse *Bmag0225*

	<i>Genotyp</i>	<i>Alela (bp)</i>		<i>Genotyp</i>	<i>Alela (bp)</i>
1	Dregeruv Imperiál	158	13	Semčický hospodársky	158
2	Hanácky exportný	170	14	Semčický pivovar	158
3	Horický	188	15	Stupický Hanácky	182
4	Janovický	188	16	Stupický plnozrnný	182
5	Jindrichovický K 64	188	17	Víglašský polojemný	170
6	Krajová St. Hrozenkov	162	18	Zborovický Kargyn	162
7	Krajová z Orlove	170	19	Židlochovický Glória	170
8	Kvasický	158	20	Expres	188
9	Moravský nepol. IGB	158	21	Kompakt	158
10	Moravský nepol. R III/12	158	22	Jubilant	188
11	Olešenský	188	23	Nítran	158
12	Pisarecký	148	24	Malz	158

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



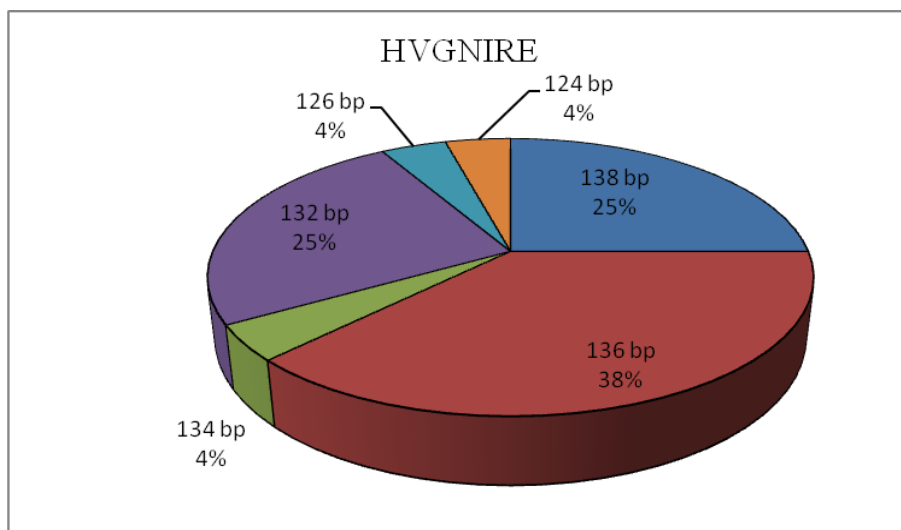
Obr. 10

Elektroforeogram mikrosatelitných alel lokusu *Bmag0225*

HVGNIRE

Mikrosatelitný marker *HVGNIRE* je lokalizovaný na 3H chromozóme jačmeňa, ktorý amplifikoval zložený mikrosatelit s opakovaným motívom (AC)₆G₁₄. V súbore analyzovaných genotypov bolo na tomto lokuse detegovaných šesť alel. Najčastejší výskyt vykazovala alela s dĺžkou 136 bp, ktorá bola detegovaná v deviatich odrodách, pričom predstavovala 38 % genotypov. Nižšia frekvencia alel s dĺžkami 132 bp a 138 bp bola zaznamenaná pri šiestich genotypoch (25 %). Alely s veľkosťami 124 bp, 126 bp a 134 bp sa detegovali len v jednom genotype, to znamená, že mali najnižšie zastúpenie s frekvenciou výskytu 4 % (Obr. 11).

Na lokuse *HVGNIRE* bol vo všetkých analyzovaných genotypoch jačmeňa detegovaný homozygotný stav (Tab. 11, Obr. 12).



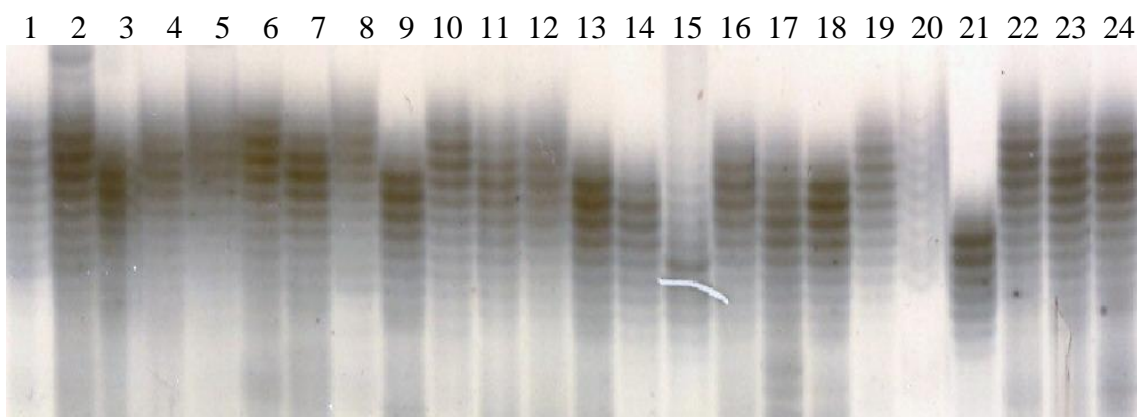
Obr. 11

Frekvencia výskytu mikrosatelitných alel na lokuse *HVGNIRE*

Tab. 11

Detegované alely na lokuse *HVGNIRE*

	<i>Genotyp</i>	<i>Alela (bp)</i>		<i>Genotyp</i>	<i>Alela (bp)</i>
1	Dregeruv Imperiál	136	13	Semčický hospodársky	132
2	Hanácky exportný	136	14	Semčický pivovar	132
3	Horický	132	15	Stupický Hanácky	124
4	Janovický	136	16	Stupický plnozrnný	134
5	Jindrichovický K 64	136	17	Vígľašský polojemný	132
6	Krajová St. Hrozenkov	138	18	Zborovický Kargyn	132
7	Krajová z Orlove	136	19	Židlochovický Glória	138
8	Kvasický	138	20	Expres	138
9	Moravský nepol. IGB	132	21	Kompakt	126
10	Moravský nepol. R III/12	138	22	Jubilant	138
11	Olešenský	136	23	Nitran	136
12	Pisarecký	136	24	Malz	136



Obr. 12

Elektroforeogram mikrosatelitných alel lokusu *HVGNIRE*

V 24 genotypoch jačmeňa sme na piatich sledovaných lokusoch detegovali spolu 37 alel s priemerom 7,4 alel na lokus. Najvyšší počet alel sme zistili na lokusoch *Bmag0040* a *Bmag0173*, ktoré dávali jedenásť alel. Naopak, najnižší počet alel bol sledovaný na lokuse *Bmag0211*, pri ktorom sme detegovali 3 alely. Z detegovaného počtu rôznych alel na jednotlivých lokusoch možno hodnotiť použité mikrosatelitné markery ako markery s pomerne vysokým stupňom polymorfizmu.

Viacerí autori publikovali podobné výsledky ako bol priemerný počet alel na lokus (7,4) získaný našimi analýzami (Feng et al., 2006b; Backes et al., 2009; Haseneyer et al., 2010; Varshney et al., 2010; Sun et al., 2011). Feng et al. (2006b) pomocou 30 mikrosatelitných markerov detegovali v analyzovanom súbore 106 genotypov tibetského jačmeňa v priemere 7,63 alel na lokus. Výsledky našej štúdie sa takmer zhodujú s počtom alel na lokus (7,6), ktorý získali Backes et al. (2009) pri genetickej analýze 240 genotypov jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare*) využitím 39 mikrosatelitných markerov. Haseneyer et al. (2010) pomocou 45 mikrosatelitných markerov z prepisovaných sekvencií získali v 224 genotypoch jarných jačmeňov celkovo 228 alel s priemerným počtom 6,4 alel na lokus. O niečo vyšší priemerný počet alel na lokus (7,9) zistili Varshney et al. (2010) mikrosatelitnou analýzou súboru 223 genotypov jačmeňa ICARDA. Sun et al. (2011) použitím 42 SSR markerov charakterizovali 175 genotypov jačmeňa, pričom detegovali v priemere 6,62 alel na lokus.

Značne nižšie priemerné počty alel na lokus zistili Pan et al. (2008), Chaabane et al. (2009), Karim et al. (2010) a Wang et al. (2010). Pan et al. (2008) v kolekcii

64 genotypov čínskych nahých jačmeňov zistili v 22 polymorfných SSR lokusoch priemerný počet alel na lokus 4,4, pričom počet alel na lokus sa pohyboval od 2 do 15. Chaabane et al. (2009) našli pri analýze súboru tuniských jačmeňov 1 až 5 alel na lokus s priemernou hodnotou 2,81 alely na lokus. Karim et al. (2010) sledovaním 12 odrôd tuniských jačmeňov zaznamenali len 2 až 4 alely na lokus s priemerom 2,87 alel na lokus. Wang et al. (2010) pomocou 35 mikrosatelitných párov primerov detegovali v 40 genotypoch jačmeňa priemerne 2,4 alely na lokus, pričom počet alel na lokus sa pohyboval od 1 do 5. Dôvodom týchto nízkych priemerných počtov alel na lokus podľa predpokladu je nízka genetická diverzita analyzovaných genotypov, ktorá vznikla v dôsledku vzájomného kríženia genotypov.

Boli publikované aj práce, v ktorých autori zistili podstatne vyšší priemerný počet alel v porovnaní s našimi výsledkami (Malysheva et al., 2006; Leišová et al., 2007; Jilal et al., 2008; Orabi et al., 2009). Malysheva et al. (2006) pomocou 48 SSR markerov hodnotili genetickú diverzitu 953 genotypov jačmeňa pôvodom z rôznych krajín sveta a zistili priemerný počet alel na lokus 16,65. Leišová et al. (2007) pri analýze 176 genotypov jačmeňa 26 mikrosatelitnými markermi detegovali v priemere 12,6 alel na lokus. Vysoký priemerný počet alel na lokus (20,2) zistili Jilal et al. (2008), ktorí pomocou 20 mikrosatelitných markerov skúmali genetickú rôznorodosť a geografické rozdiely v súbore 304 genotypov jačmeňa pochádzajúcich z 29 štátov sveta. Orabi et al. (2009) použili 36 mikrosatelitných markerov na genetické štúdie 185 genotypov divých (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) a kultivovaných jačmeňov (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) pochádzajúcich z regiónu Západnej Ázie a Severnej Afriky, pričom sledovali priemerný počet alel na lokus 17,14. Tieto vysoké priemerné počty alel sú spôsobené vysokou variabilitou analyzovaných odrôd.

4.1 STMS technika ako markerovací systém

Úroveň genetickej rôznorodosti medzi sledovanými genotypmi jačmeňa sme vyjadrili pomocou indexu diverzity (ID), polymorfického informačného obsahu (PIC) a pravdepodobnosti identity (PI), ktoré sme vypočítali na základe frekvencie alel jednotlivých markerov (Tab. 12).

Hodnoty indexu diverzity, ktoré vyjadrujú rôznorodosť alel v určitom lokuse, sme stanovili v rozmedzí od 0,538 (*Bmag0211*) do 0,885 (*Bmac0040*) s priemernou hodnotou 0,754.

Polymorfický informačný obsah vyjadrujúci informatívnosť DNA markera s ohľadom na frekvenciu alel sa pohyboval v rozmedzí od 0,483 (*Bmag0211*) do 0,883 (*Bmac0040*), pričom jeho priemerná hodnota bola 0,738.

Pravdepodobnosť identity vyjadrujúca s akou pravdepodobnosťou sú dva porovnávané genotypy identické bola v rozmedzí od 0,006 (*Bmac0040*) do 0,266 (*Bmag0211*) s priemernou hodnotou 0,076.

Tab. 12

Prehľad počtu získaných mikrosatelitných alel a vypočítané hodnoty DI, PIC a PI

SSR marker	Lokus na chromozóme	Počet alel	DI	PIC	PI
Bmac0040	6H	11	0,885	0,883	0,006
Bmag0173	6H	11	0,867	0,865	0,010
Bmag0211	1H	3	0,538	0,483	0,266
Bmag0225	3H	6	0,753	0,749	0,033
HVGNIRE	3H	6	0,729	0,711	0,065
priemer		7,4	0,754	0,738	0,076

DI - index diverzity

PIC - polymorfický informačný obsah

PI - pravdepodobnosť identity

Pandey et al. (2006) v 44 lokusoch 107 genotypov čínskeho jačmeňa zistili vysokú hodnotu indexu diverzity 0,536, ktorá je porovnateľná s priemernou hodnotou indexu diverzity získanou našimi analýzami (0,754).

Naším výsledkom veľmi blízke hodnoty polymorfického informačného obsahu (0,65) identifikovali Pan et al. (2008) na 30 lokusoch v 64 genotypoch jačmeňa, ako aj Varshney et al. (2010) s priemernou hodnotou PIC=0,63. Ešte vyššiu hodnotu PIC získali Jilal et al. (2008), ktorí použili 20 mikrosatelitných markerov na odlíšenie 304 odrôd jačmeňa.

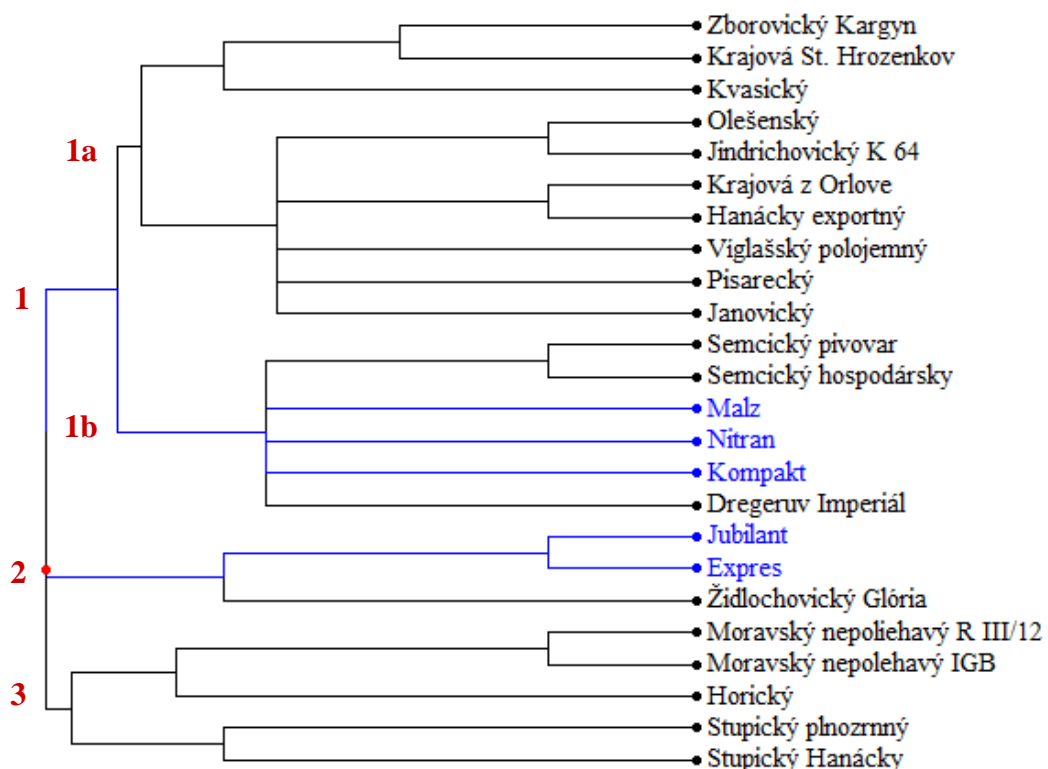
Vysoké hodnoty polymorfického informačného obsahu (PIC) ako aj indexu diverzity (DI) poukazujú na vysoký stupeň polymorfizmu genotypov jačmeňa v jednotlivých sledovaných mikrosatelitných lokusoch. Z vysokých hodnôt DI

a PIC získaných z našich analýz je možné skonštatovať, že použité mikrosatelitné markery sú vhodnými markermi na odlišenie genotypov jačmeňa.

4.2 Genetická rôznorodosť odrôd jačmeňa

Na základe zistených veľkostí mikrosatelitných alel na piatich lokusoch bolo možné pomocou UPGMA metódy skonštruovať dendrogram (Obr. 13), ktorý poukazuje na genetické vzťahy medzi sledovanými genotypmi jačmeňa. Dvadsaťštyri analyzovaných genotypov jačmeňa bolo hierarchickou klastrovou analýzou rozdelených do troch hlavných klastrov.

V prvom klastri je zoskupených šesť genotypov jačmeňa, ktoré boli rozčlenené do dvoch podskupín. Podskupina *1a* zahrňuje desať genotypov bola rozdelená na dve menšie skupiny. V jednej z nich sú obsiahnuté dve dvojice genotypov (Jindrichovický K 64 a Olešenský, Krajová z Orlove a Hanácky exportný) spolu s ďalšími tromi odrodami (Víglašský polojemný, Pisarecký a Janovecký), pokým druhá skupina pozostáva z troch genotypov (Zborovický Kargyn, Krajová St. Hrozenkov a Kvasický).



Obr. 13

Dendrogram 24 genotypov jačmeňa siateho s využitím 5 mikrosatelitných markerov

Novšie sladovnícke odrody jačmeňa Kompakt a Nitran boli zoskupené do podskupiny *1b* pravdepodobne na základe rovnakého genetického pôvodu, keďže odroda Nitran bola vyšľachtená z odrody Kompakt. Do tejto podskupiny bola zaradená taktiež novšia sladovnícka odroda Malz, genotyp Dregeruv Imperiál a ďalšie dva navzájom blízke genotypy Semčický hospodársky a Semčický pivovar pochádzajúce z rovnakej geografickej oblasti.

Druhý klaster zahŕňa tri genotypy jačmeňa, z ktorých dvojica genotypov Expres a Jubilant sú novšie sladovnícke odrody, pričom k týmto odrodám je zaradený genotyp Židlochovický Glória. V dôsledku zoskupenia uvedených genotypov v klastroch *1a* a *2* s novšími odrodami dobrej sladovníckej kvality je predpoklad vhodnej sladovníckej kvality aj týchto genotypov jačmeňa.

Tretí klaster obsahujúci päť genotypov pozostáva z dvoch dvojíc genotypov a jednej samostatnej odrody Horický. V prípade dvojice genotypov Stupický Hanácky a Stupický plnozrný bol klastrovou analýzou potvrdený rovnaký pôvod, pretože odroda Stupický plnozrný vznikla krížením odrody Starnovský Kneifl so Stupickým Hanáckym. Ďalšia dvojica genotypov zoskupená v tomto klasteri, Moravský nepolehavý IGB a Moravský nepolehavý R III/12, má pravdepodobne rovnaký pôvod, o čom svedčí aj pomenovanie týchto odrôd.

Použitím piatich mikrosatelitných markerov bolo možné pomocou klastrovej analýzy odlíšiť 14 z 24 analyzovaných genotypov jačmeňa. Päť dvojíc genotypov (Olešenský a Jindrichovický K 64, Krajová z Orlove a Hanácky exportný, Semčický hospodársky a Semčický pivovar, Jubilant a Expres, Moravský nepolehavý R III/12 a Moravský nepolehavý IGB) sa nám touto metódou nepodarilo dostatočne odlíšiť. Preto možno predpokladať, že uvedené dvojice genotypov majú rovnaký genetický základ alebo aj rovnaké miesto vyšľachtenia. Nedostatočné rozlíšenie ale mohlo byť spôsobené nízkou frekvenciou výskytu niektorých mikrosatelitných alel na jednotlivých lokusoch aj napriek vysokému polymorfizmu markerov. Na dostatočné odlíšenie všetkých genotypov je preto potrebné použiť väčší počet mikrosatelitných markerov.

Leišová et al. (2007) použitím 26 mikrosatelitných markerov analyzovali 176 genotypov jačmeňa a 330 genotypov ovsa. Zo získaných výsledkov zostrojili dendrogram, ktorý umožnil odlíšenie genotypov podľa miesta pôvodu a veku odrody. Výskum poukázal na negatívny účinok šľachtiteľského procesu na úroveň genetickej diverzity.

Jilal et al. (2008) analyzovali súbor 304 genotypov jačmeňa pomocou 20 mikrosatelitných markerov. Na základe UPGMA klastrovej analýzy boli jačmene zoskupené podľa regiónov do troch skupín. Ďalej boli genotypy jačmeňov rozdelené podľa genetickej rôznorodosti poddruhov na kultivované jačmene (dvojradowé a šesťradové), divý typ *Hordeum spontaneum* a poddruh *H. agriocrithon*.

Pan et al. (2008) previedli mikrosatelitnú analýzu na 64 genotypoch tibetských nahých jačmeňov. UPGMA klastrová analýza využitím 30 mikrosatelitných markerov rozdelila jednotlivé genotypy do 5 hlavných skupín a navzájom od seba odlišila, čím bol dokázaný vysoký polymorfizmus medzi tibetskými nahými jačmeňmi.

Chaabane et al. (2009) analyzovali 12 genotypov tuniských jačmeňov, ktoré pomocou 18 mikrosatelitných markerov na základe UPGMA klastrovej analýzy boli rozdelené do skupiny dvojradowých a šesťradových jačmeňov. V štúdiu Haseneyera et al. (2010) bol UPGMA klastrovou analýzou rozdelený súbor genotypov jačmeňa na dve skupiny taktiež podľa typu klasov.

Záver

Na analýzu súboru 24 genotypov jačmeňa siateho sme použili STMS metódu založenú na mikrosatelitných markeroch, ktorá odhaľuje polymorfizmus v opakovaných sekvenciách DNA využitím polymerázovej reťazovej reakcie.

Zo získaných výsledkov práce možno vo vzťahu k stanoveným cieľom vyvodit' nasledovné závery:

- Celkovo bolo na piatich mikrosatelitných lokusoch špecifických pre genóm jačmeňa detegovaných 37 alel, pričom priemerný počet alel na lokus bol 7,4. Najpolymorfickejšie boli markery *Bmac0040* a *Bmag0173* s počtom alel 11 a najnižší počet alel (3) bol detegovaný markerom *Bmag0211*.
- Pre jednotlivé mikrosatelitné markery bol vypočítaný index diverzity (DI), ktorého priemerná hodnota bola 0,754, polymorfický informačný obsah (PIC) s priemerom hodnotou 0,738 a pravdepodobnosť identity s priemerom 0,076. Získané hodnoty poukazujú na vysoký stupeň polymorfizmu hodnotených mikrosatelitných markerov.
- Na základe zistených veľkostí mikrosatelitných alel bol pomocou UPGMA algoritmu zostrojený dendrogram naznačujúci vzájomné vzťahy medzi analyzovanými genotypmi jačmeňa. Pomocou 5 mikrosatelitných markerov sme hierarchickou klastrovou analýzou odlišili 14 z 24 genotypov jačmeňa. Celý sledovaný súbor jačmeňa bol rozdelený na tri hlavné klastre ďalej sa deliace na menšie skupiny, pričom novšie sladovnícke odrody boli separované v dvoch skupinách.

Kombinácia použitých piatich mikrosatelitných markerov aj napriek ich vysokému polymorfizmu sa javila ako nedostačujúca na odlíšenie všetkých genotypov v sledovanom súbore jačmeňa, pretože päť dvojíc odrôd sa nám klastrovou analýzou nepodarilo dobre odlíšiť. Dôvodom toho je pravdepodobne strata genetickej diverzity daných odrôd počas šľachtiteľského procesu, čiže odrody sú geneticky veľmi blízke. Na spoľahlivé odlíšenie aj spomínaných blízkyh genotypov je potrebné použiť vyšší počet mikrosatelitných markerov.

Zoznam použitej literatúry

- AGARWAL, M. – SHRIVASTAVA, N. – PADH, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. In *Plant Cell Reports*, vol. 27, 2008, no. 4, p. 617-631.
- ANDERSEN, J. R. – LÜBBERSTEDT, T. 2003. Functional markers in plants. In *Trends in Plant Science*, vol. 8, 2003, no. 11, p. 554-560.
- ARCHANA, V. – JAWALI, N. 2007. Genetic variation and relatedness in *Vigna unguiculata* revealed by microsatellites. In *BARC Newsletter, Founder's Day Special issue* [online]. 2007, no. 285 [cit. 2011-3-21] p. 190-197. Dostupné na internete: <<http://www.barc.gov.in/publications/nl/2007/200710-28.pdf>>.
- BACKES, G. – ORABI, J. – WOLDAY, A. et al. 2009. High genetic diversity revealed in barley (*Hordeum vulgare*) collected from small-scale farmer's fields in Eritrea. In *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 56, 2009, no. 1, p. 85-97.
- BAEK, H. J. – BEHARAV, A. – NEVO, E. 2003. Ecological-genomic diversity of microsatellites in wild barley, *Hordeum spontaneum*, populations in Jordan. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 106, 2003, no. 3, p. 397-410.
- BASSAM, B. J. – CAETANO-ANOLLÉS, G. – GRESSHOFF, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. In *Analytical Biochemistry*, vol. 196, 1991, no. 1, p. 80 – 83.
- BECKER, J. – HEUN, M. 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. In *Plant Molecular Biology*, vol. 27, 1995, no. 4, p. 835-845.
- BECKMANN, J. S. – SOLLER, M. 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. In *Nature Biotechnology*, vol. 8, 1990, p. 930-932.
- BRANTESTAM, A. K. – VON BOTHMER, R. – DAYTEG, C. et al. 2007. Genetic diversity changes and relationships in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm of Nordic and Baltic areas as shown by SSR markers. In *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 54, 2007, no. 4, p. 749-758.

CANDRÁKOVÁ, E. – KULÍK, D. – BAKUĽA, J. 2000. Využitie jačmeňa na potravinárske účely. In *Jačmeň - výroba a zhodnotenie*. Nitra: SPU, 2000, s. 100-104.

COLLARD, B. C. Y. – JAHUFER, M. Z. Z. – BROUWER, J. B. et al. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. In *Euphytica*, vol. 142, 2005, no. 1-2, p. 169-196.

DELLAPORTA, S. L. - WOOD, J. - HICKS, J. B. 1983. A Plant DNA Minipreparation: Version II. In *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 1, 1983, no. 4, p. 19-21.

Evidence genetických zdrojů rostlin v ČR. 2010 [online] Praha : VÚRV, aktualizované 2010. [cit. 2011-03-14]. Dostupné na: <http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/asp2/default_c.htm>.

FENG, Z. Y. – ZHANG, L. L. – ZHANG, Y. Z. – LING, H. Q. 2006a. Genetic diversity and geographical differentiation of cultivated six-rowed naked barley landraces from the Qinghai-Tibet plateau of China detected by SSR analysis. In *Genetics and Molecular Biology*, vol. 29, 2006, no. 2, p. 330-338.

FENG, Z. Y. – LIU, X. J. – ZHANG, Y. Z. et al. 2006b. Genetic diversity analysis of tibetan wild barley using SSR markers. In *Acta Genetica Sinica*, vol. 33, 2006, no. 10, p. 917-928.

FERENČÍK, M. – ŠKÁRKA, B. – NOVÁK, M. – TURECKÝ, L. 2000. Biochémia. Bratislava : Slovak Academic Press, 2000. 924 s. ISBN 80-88908-57-4.

GONG, X. - WESTCOTT, S. – LI, C. D. et al. 2009. Comparative analysis of genetic diversity between Qinghai-Tibetan wild and Chinese landrace barley. In *Genome*, vol. 52, 2009, no. 10, p. 849-861.

GRANER, A. - SIEDLER, H. - JAHLOOR, A. et al. 1990. Assessment of the degree and the type of restriction fragment length polymorphism in barley (*Hordeum vulgare*). In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 80, 1990, no. 6, p. 826-832.

GRANER, A. - BJØRNSTAD, Å. – KONISHI, T. – ORDON, F. 2003. Molecular diversity of the barley genome. In *Diversity in barley (Hordeum vulgare)*. Amsterdam : Elsevier Science B. V., 2003, p. 121-141.

GREGÁŇOVÁ, Ž. 2005. *Molekulárne markery v identifikovaní a charakteristike pšenice letnej* : dizertačná práca. Nitra: SPU, 2005. 142 s.

GUASMI, F. – TOUIL, L. – FÈRES, W. et al. 2008. Genetic Diversity of Tunisian Barley Accessions Based on Microsatellite Markers. In *Biotechnology*, vol. 7, 2008, no. 4, p. 781-786.

GUPTA, P. K. – VARSHNEY, R. K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. In *Euphytica*, vol. 113, 2000, p. 163-185.

HAMZA, S. – HAMIDA, B. W. – REBAI, A. – HARRABI, M. 2004. SSR-based genetic diversity assessment among Tunisian winter barley and relationship with morphological traits. In *Euphytica*, vol. 135, 2004, no. 1, p. 107-118.

HASENEYER, G. – STRACKE, S. – PAUL, C. et al. 2010. Population structure and phenotypic variation of a spring barley world collection set up for association studies. In *Plant Breeding*, vol. 129, 2010, no. 3, p. 271-279.

HEARNDEN, P. R. – ECKERMANN, P. J. – MCMICHAEL, G. L. et al. 2007. A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 115, 2007, no. 3, p. 383-391.

HOLTON, T. A. – CHRISTOPHER, J. T. – MCCLURE, L. et al. 2002. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. In *Molecular Breeding*, vol. 9, 2002, no. 2, p. 63-71.

HRAŠKA, Š. – BARTOŠ, P. – MARŠÁLEK, L. 1989. Špeciálna genetika poľnohospodárskych rastlín. Bratislava: Príroda. 1989. 211 s. ISBN 80-07-00022-4.

CHAABANE, R. – FELAH, M. E. – SALAH, H. B. et al. 2009. Molecular Characterization of Tunisian Barley (*Hordeum Vulgare* L.) Genotypes using

Microsatellites (SSRs) Markers. In *European Journal of Scientific Research*, vol. 36, 2009, no. 1, p. 6-15.

CHAMBERS, G. K. – MACAVOY, E. S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, vol. 126, 2000, p. 455-476.

CHAVLA, H. S. 2004. Introduction to Plant Biotechnology. Second edition. New Hampshire: Science Publishers Inc., 2004. 538 p. ISBN 1-57808-228-5.

CHEN, F. – CHEN, D. – VALLES, M. P. et al. 2010. Analysis of Diversity in Chinese Cultivated Barley with Simple Sequence Repeats: Differences Between Eco-Geographic Populations. In *Biochemical Genetics*, vol. 48, 2010, no. 1-2, p. 44-56.

CHLOUPEK, O. 2000. Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. 2. upravené a rozšířené vyd., Praha: Academia, 2000. 311 s. ISBN 80-200-0779-2.

JILAL, A. – GRANDO, S. – HENRY, R. J. et al. 2008. Genetic diversity of ICARDA's worldwide barley landrace collection. In *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 55, 2008, no. 8, p. 1221-1230.

KANDEMIR, N. – YILDIRIM, A. – GUNDUZ, R. 2010. Determining the levels of genetic variation using SSR markers in three Turkish barley materials known as Tokak. In *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, vol. 34, 2010, no. 1, p. 17-23.

KARIM, K. – RAWDA, A. – HATEM, C. M. et al. 2010. Analysis of Genetic diversity and relationships in local Tunisian barley by RAPD and SSR analysis. In *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, 2010, no. 44, p. 7429-7436.

KHLESTKINA, E. K. – VARSHNEY, R. K. – RÖDER, M. S. et al. 2006. A comparative assessment of genetic diversity in cultivated barley collected in different decades of the last century in Austria, Albania and India by using genomic and genic simple sequence repeat (SSR) markers. In *Plant Genetic Resources*, vol. 4, 2006, p. 125-133.

KRAIC, J. 2005. Relevancy of genomic and gene-based variation in distinguishing of elite barleys. In *Biologia*, vol. 60, 2005, no. 6, p. 675-680.

KUMAR, P. – GUPTA, V. K. – MISRA, A. K. et al. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. In *Plant Omics Journal*, vol. 2, 2009, no. 4, p. 141-162.

LEIŠOVÁ, L. – KUČERA, L. – DOTLAČIL, L. 2007. Genetic Resources of Barley and Oat Characterised by Microsatellites. In *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, vol. 43, 2007, no. 3, p. 97-104.

LI, J. Z. – SJAKSTE, T. G. – RÖDER, M. S. – GANAL, M. W. 2003. Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 107, 2003, no. 6, p. 1021-1027.

LUND, B. – ORTIZ, R. – SKOVGAARD, I. M. et al. 2003. Analysis of potential duplicates in barley gene bank collections using re-sampling of microsatellite data. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 106, 2003, p. 1129-1138.

MACAULAY, M. – RAMSAY, L. – POWELL, W. – WAUGH, R. 2001. A representative, highly informative 'genotyping set' of barley SSRs. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 102, 2001, no. 6-7, p. 801-809.

MALYSHEVA, O. L. V. – GANAL, M. W. – RÖDER, M. S. 2006. Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germplasm (*Hordeum vulgare* L.). In *BMC GENETICS*, vol. 7, 2006, no. 6, p. 213-225.

MOLNÁROVÁ, J. – ILLÉŠ, L. – ŽEMBERY, J. 2007. Rastlinná výroba I. Nitra: SPU, 2007. 184 s. ISBN 978-80-8069-896-6.

Obrázok PCR [cit. 2011-03-14]. Dostupné na: <<http://www.pseudomonas-syringae.org/images/PCR.gif>>.

ORABI, J. – JAHOOR, A. – BACKES, G. 2009. Genetic diversity and population structure of wild and cultivated barley from West Asia and North Africa. In *Plant Breeding*, vol. 128, 2009, no. 6, p. 606-614.

- PAETKAU, D. – CALVERT, W. – STIRLING, I. – STROBECK, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. In *Molecular Ecology*, vol. 4, 1995, no. 3, p. 347-354.
- PAN, Z. – DENG, G. – ZHAI, X. et al. 2008. Molecular analysis of cultivated naked barley (*Hordeum vulgare* L.) from Qinghai-Tibet Plateau in China using SSR markers. In *Frontiers of Agriculture in China*, vol. 2, 2008, no. 4, p. 372-379.
- PANDEY, M. – WAGNER, C. – FRIEDT, W. - ORDON, F. 2006. Genetic relatedness and population differentiation of Himalayan hulless barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces inferred with SSRs. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 113, 2006, p. 715-729.
- PILLEN, K. – BINDER, A. – KREUZKAM, B. et al. 2000. Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 101, 2000, no. 4, p. 652-660.
- POLÁKOVÁ, K. – OVESNÁ, J. – LEIŠOVÁ, L. 2001. Identification of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars using Microsatellite Analyses. In *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, vol. 46, 2001, no. 1, p. 23-28.
- ROSYPAL, S. – DOŠKÁR, J. – PANTUČEK, R. et al. 2001. Terminologie molekulární biologie. První vydání. Brno, 2001. 281 s. ISBN 80-902562-3-6.
- RUSSELL, J. – FULLER, J. – YOUNG, G. et al. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. In *Genome*, vol. 40, 1997, p. 442-450.
- SALEM, K. F. M. – VARSHNEY, R. K. – RÖDER, M. S. – BÖRNER, A. 2010. EST-SSR based estimates on functional genetic variation in a barley (*Hordeum vulgare* L.) collection from Egypt. In *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 57, 2010, no. 4, p. 515-521.
- SEMAGN, K. – BJØRNSTAD, Å. – NDJIONDJOP, M. N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. In *African Journal of Biotechnology*, vol. 5, 2006, no. 25, p. 2540-2568.

SUN, D. – REN, W. – SUN, G. – PENG, J. 2011. Molecular diversity and association mapping of quantitative traits in Tibetan wild and worldwide originated barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm. In *Euphytica*, vol. 178, 2011, no. 1, p. 31-43.

TERZI, V. – PECCHIONI, N. – FACCIOLI, P. et al. 2001. Phyletic relationships within the genus *Hordeum* using PCR-based markers. In *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 48, 2001, no. 5, p. 1-12.

THIEL, T. – MICHALEK, W. – VARSHNEY, R. K. – GRANER, A. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 106, 2003, no. 3, p. 411-422.

TODOROVSKA, E. – ABUMHADI, N. – KAMENAROVA, K. et al. 2005. Biotechnological approaches for cereal crops improvement, part II: Use of molecular markers in cereal breeding. In *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Special issue, vol. 19, 2005, p. 91-104.

TURŇA, J. – STUHLÍK, S. – DRAHOVSKÁ, H. et al. 2004. Techniky rekombinantných DNA. Bratislava: Veda. 2004. 152 s. ISBN 80-224-0835-2.

VARSHNEY, R. K. – GRANER, A. – SORRELLS, M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. In *Trends in Biotechnology*, vol. 23, 2005, no. 1, p. 48-55.

VARSHNEY, R. K. – GROSSE, I. – HÄHNEL, U. et al. 2006. Genetic mapping and BAC assignment of EST-derived SSR markers shows non-uniform distribution of genes in the barley genome. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 113, 2006, no. 2, p. 239-250.

VARSHNEY, R. K. – MARCEL, T. C. – RAMSAY, L. et al. 2007. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 114, 2007, no. 6, p. 1091-1103.

VARSHNEY, R. K. – THIEL, T. – SRETENOVIC-RAJICIC, T. et al. 2008. Identification and validation of a core set of informative genic SSR and SNP markers

for assaying functional diversity in barley. In *Molecular breeding*, vol. 22, 2008, no. 1, p. 1-13.

VARSHNEY, R. K. – BAUM, M. – GUO, P. et al. 2010. Features of SNP and SSR diversity in a set of ICARDA barley germplasm collection. In *Molecular Breeding*, vol. 26, 2010, no. 2, p. 229-242.

WALKER, J. M. – RAPLEY, R. 2000. *Molecular Biology and Biochemistry*. Fourth edition. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000. 563 p. ISBN 0-85404-606-2.

WANG, A. – YU, Z. – DING, Y. 2009. Genetic diversity analysis of wild close relatives of barley from Tibet and the Middle East by ISSR and SSR markers. In *Comptes Rendus Biologies*, vol. 332, 2009, no. 4, p. 393-403.

WANG, J. M. – YANG, J. M. – ZHU, J. H. et al. 2010. Assessment of genetic diversity by simple sequence repeat markers among forty elite varieties in the germplasm for malting barley breeding. In *Journal of Zhejiang University – Science B*, vol. 11, 2010, no. 10, p. 792-800.

WEBER, J. L. 1990. Informativeness of human $(dC-dA)_n$ x $(dG-dT)_n$ polymorphism. In *Genomics*, vol. 7, 1990, no. 4, p. 524-530.

WEIR, B. S. 1990. *Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1990. 377 p. ISBN 0-87893-872-9.