

Pielikums atskaitei par LZP projekta 07.2055 „Latvijas miežu šķirņu un selekcijas līniju ģenētiskās daudzveidības un selekcijas potenciāla izvērtējums izmantojot augstas caurlaidspējas punktveida mutāciju genotipēšanu" realizāciju 2007. – 2008. gadā

Mūsdienu lauksaimniecībai tiek izvirzīta prasība nodrošināt augošo pasaules populāciju ar pietiekamu pārtikas daudzumu, taču tradicionālā selekcija, kas pamatojas uz jaunu šķirņu empīrisku, fenotipisku izvērtēšanu, ir lēns process, bieži vien ar neparedzamiem rezultātiem. Mūsdienu sasniegumi augu ģenētikā un genomikā ļauj paātrināt tradicionālo selekciju un mērķtiecīgi radīt jaunas šķirnes ar precīzi definētām īpašībām. Fundamentālie pētījumi ir ļāvuši identificēt gēnus, kas atbildīgi par daudzām lauksaimniecībā nozīmīgām pazīmēm. Lielākie sasniegumi līdz šim ir bijuši vienkārši iedzimstošu pazīmju raksturošanā, piemēram, biotiskā un abiotiskā stresa izturībā un atsevišķos morfoloģiskos parametrus, bet vairums lauksaimniecībā nozīmīgu pazīmju, tādu kā produkcijas kvalitāte un ražība, ir raksturīga kompleksa, no daudziem gēniem atkarīga iedzimtība. Katram atsevišķam gēnam (alēlei) ir relatīvi neliela ietekme uz pazīmi, turklāt šo alēļu ietekme uz fenotipu ir atkarīga no citiem ģenētiskiem faktoriem un organisma mijiedarbībām ar apkārtējo vidi.

Kompleksu pazīmju pētīšanai un izmantošanai selekcijā ir nepieciešamas efektīvas marķiersistēmas, kas atļauj kartēt pazīmes, raksturot selekcijas materiāla ģenētisko daudzveidību un veicināt vēlamo pazīmju pārnesei jaunās šķirnēs. Genomikas sasniegumi un informācija DNS datu bāzēs ļauj izveidot efektīvas, uz gēnu sekvencēm balstītas marķiersistēmas. Īpašu ievērtību pelna punktveida mutāciju (*single nucleotide polymorphism* jeb SNP) marķieri. SNP ir visbiežāk sastopamā ģenētiskā variācija visos līdz šim pētītajos organismos, tie ir piemēroti izmantošanai kā DNS marķieri (Kruglyak 1997) un to genotipēšanai ir izstrādātas dažāda mēroga platformas (Syvanen 2005). Modeļorganismos ar zināmu genoma sekvenci un standartizētiem SNP katalogiem, SNP variāciju ir izdevīgi pētīt izmantojot DNS čipus, piemēram, Affymetrix. Savukārt lauksaimniecības augu gadījumā, kuru genomi vēl ir salīdzinoši slikti izpētīti, ir izdevīgi izmantot atvērtas genotipēšanas platformas, piemēram, Illumina GoldenGate sistēmu (Fan et al. 2003; Oliphant et al. 2002).

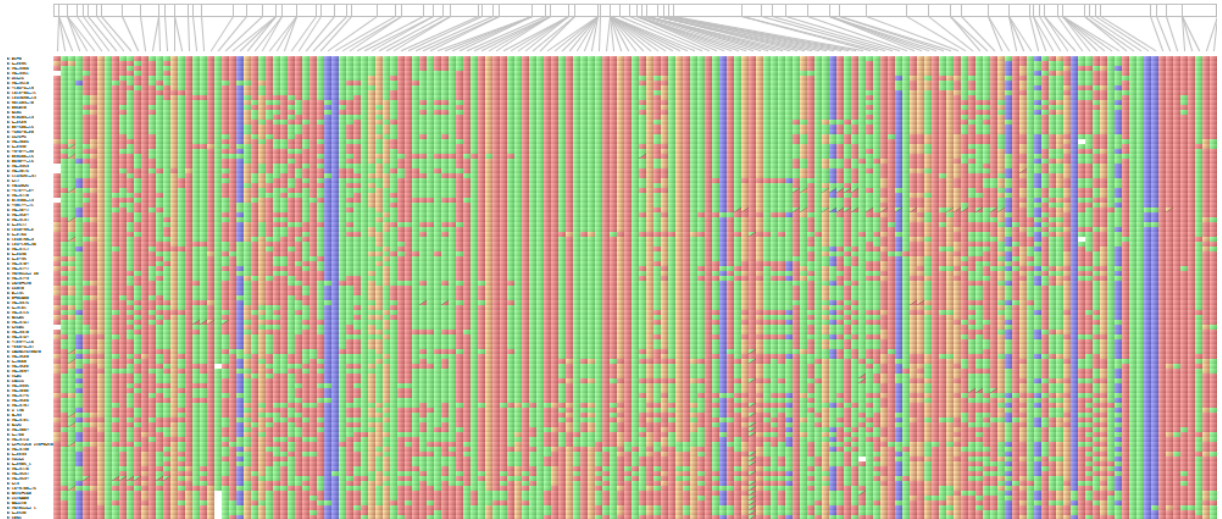
Mieži ir viena no nozīmīgākajām lauksaimniecības kultūrām visā pasaulē, tie tradicionāli tiek lietoti gan cilvēku uzturā, gan arī kā lopbarība. Lai arī miežu genoms ir 5.2 miljardi bp (Bennett and Leitch 1995), tomēr tie ir ģenētiski samērā vienkārši diploīdi, pašapputes augi, kurus iespējams izmantot kā modeli heksaploīdo kviešu pētījumiem. Lai veicinātu miežu molekulārās ģenētikas pētījumus un sekmētu to pielietojumu jaunu šķirņu veidošanā, pēdējos gados ir izveidoti vairāki jauni miežu genomikas resursi, piemēram, Affymetrix Barley1 DNS čips (Close et al. 2004; Druka et al. 2006), miežu mutantu populācija (Caldwell et al. 2004), konsensus ģenētiskās kartes ar SNP marķieriem (Rostoks et al. 2005; Stein et al. 2007; Varshney et al. 2007; Wenzl et al. 2006), kā arī uz Illumina GoldenGate tehnoloģijas balstīta miežu SNP genotipēšanas platforma ar 3072 SNP (Rostoks et al. 2006). Miežu SNP genotipēšanas iespējas asociāciju ģenētikā ir demonstrētas pētījumā, kura ietvaros tika genotipētas 91 Eiropas miežu šķirne (Rostoks et al. 2006).

LZP finansētajā pētījumā tika izmantota minētā SNP genotipēšanas platforma, lai analizētu ģenētisko daudzveidību, populāciju struktūru un nelīdzsvarotās saistības (*linkage disequilibrium*, LD) bloku izmērus un izvietojumu 95 Latvijas miežu šķirnēs un selekcijas līnijās.

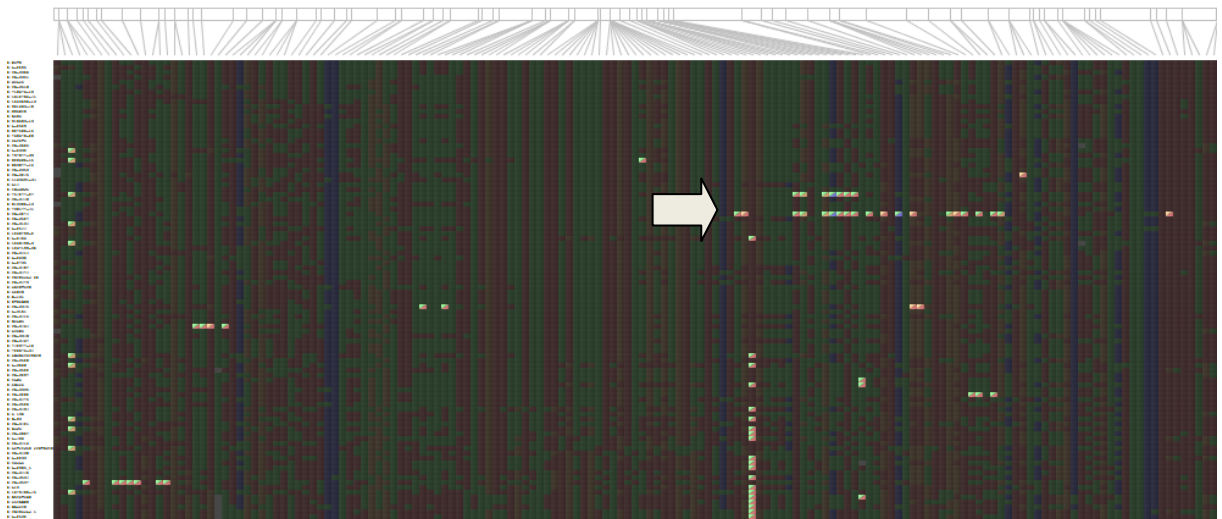
Pētījuma rezultātā iegūti vairāk nekā 140 000 SNP genotipi (piemēru skat. 1. attēlā). No analizētajiem 1536 lokusiem, 1083 ir kartēti vienā vai vairākās miežu kartēšanas populācijās, tādējādi zināma to atrašanās vieta miežu genomā. Sākotnējā datu kvalitātes kontrole tika veikta, lai identificētu zemas kvalitātes SNP lokusus, kā arī heterozigotiskus lokusus. Piemēram, 1B. attēlā parādīti heterozigotiski SNP lokusi. Mieži ir pašapputes augi, tādējādi to genomam atšķirībā no cilvēku genoma vajadzētu būt pilnībā homozigotiskam.

Taču ņemot vērā, ka genotipētais materiāls ietver selekcijas līnijas, kas radītas krustošanas ceļā, var sagaidīt skaldīšanos atsevišķos genoma rajonos. Tas labi redzams ar bultiņu norādītajos rajonos, kur vairāki blakus atrodošies lokusi ir heterozigotiski.

A

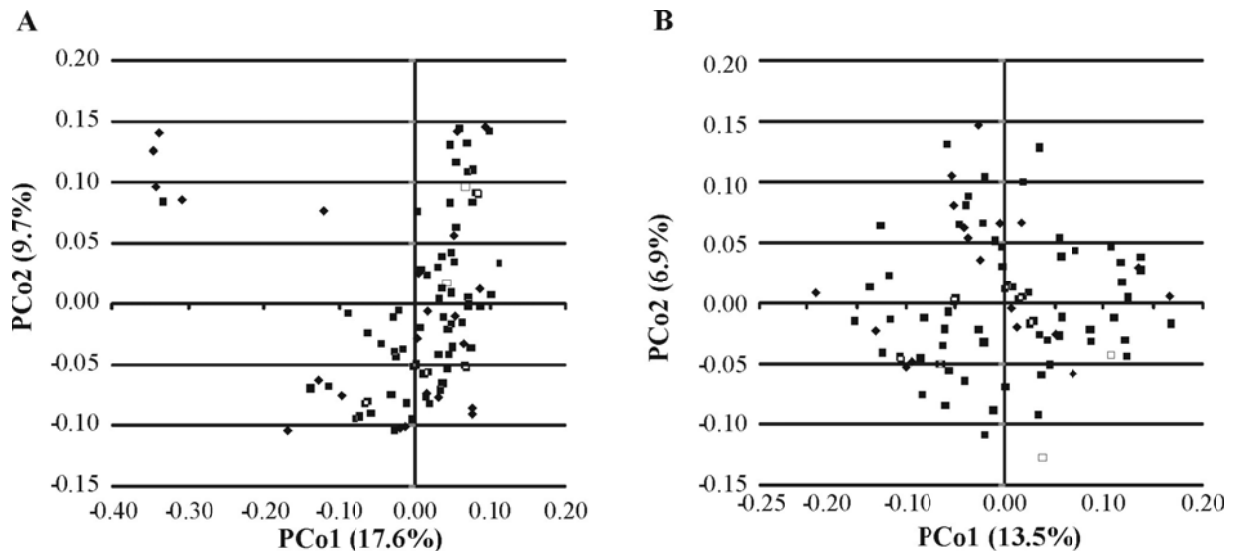


B



1. attēls. Deviņdesmit piecu miežu līniju 7H hromosomas grafiskais genotips, kas balstās uz 168 SNP lokusiem, iegūts ar programmu Flapjack (<http://www.scri.ac.uk>). Katrai miežu līnijai atbilst viena rinda, katram SNP lokusam atbilst viena kolonna. Lokusu relatīvais novietojums uz miežu ģenētiskās kartes norādīts attēla augšdaļā. A – parādīti SNP genotipi (A – zaļš, C – oranžs, G – sarkans, T – zils). B – parādīti heterozigotiski lokusi.

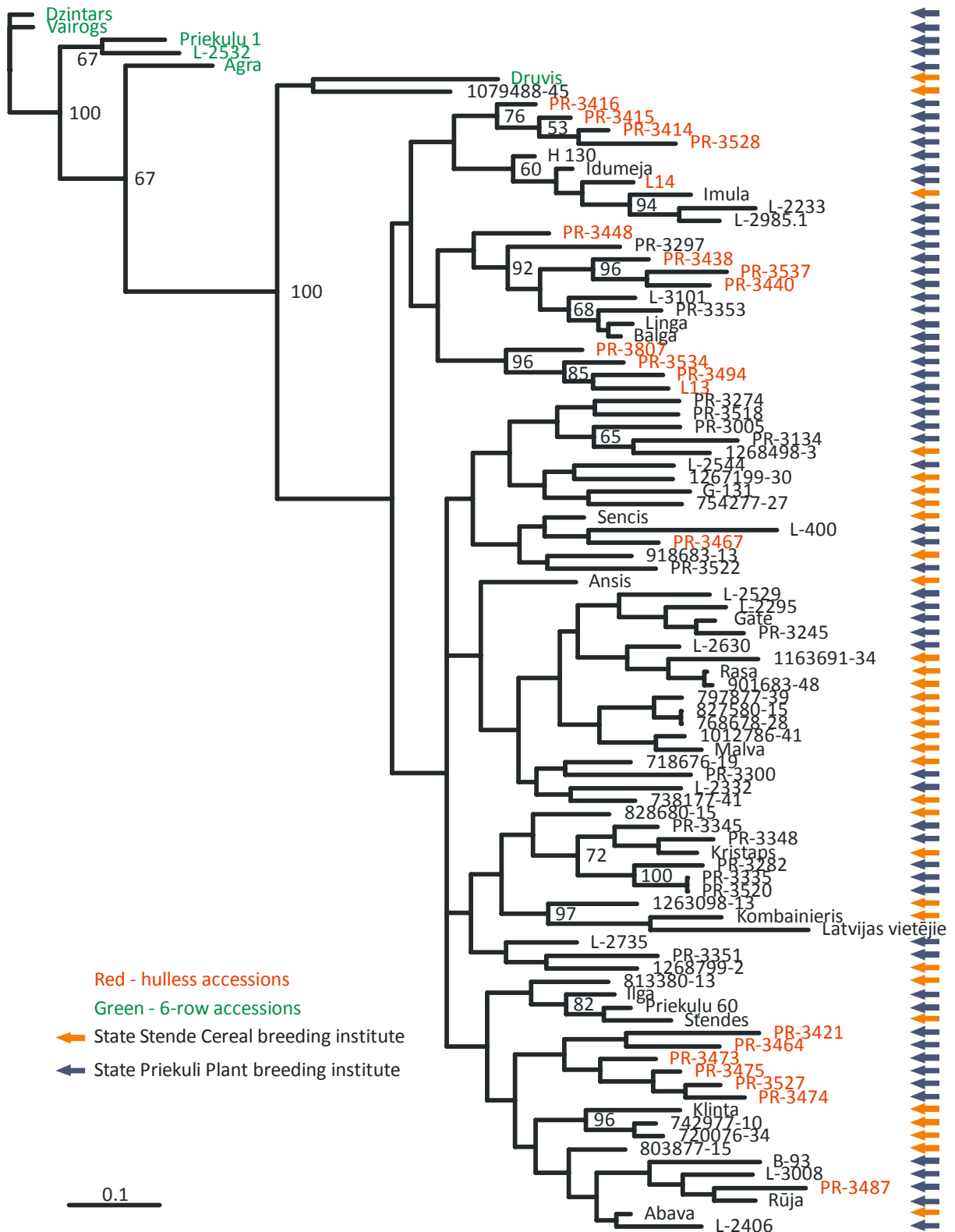
Balstoties uz genotipa datiem tika pētīts Latvijas miežu šķirņu un selekcijas līniju sadalījums izmantojot galveno koordināšu analīzi (2. attēls). Analizējot visas 95 līnijas tika novērots, ka vairākas šķirnes ir samērā atšķirīgas no pārējām (2A. attēls). Tās visas bija daudzkanšu miežu šķirnes, par kurām zināms, ka tām nereti ir no divkanšu miežu šķirnēm atšķirīga izcelsme (Fischbeck 1992). Izslēdzot daudzkanšu miežu līnijas no analīzes, atlikušās līnijas veidoja samērā kompakto grupu (2B. attēls), kas norāda uz zemu populācijas stratifikācijas līmeni.



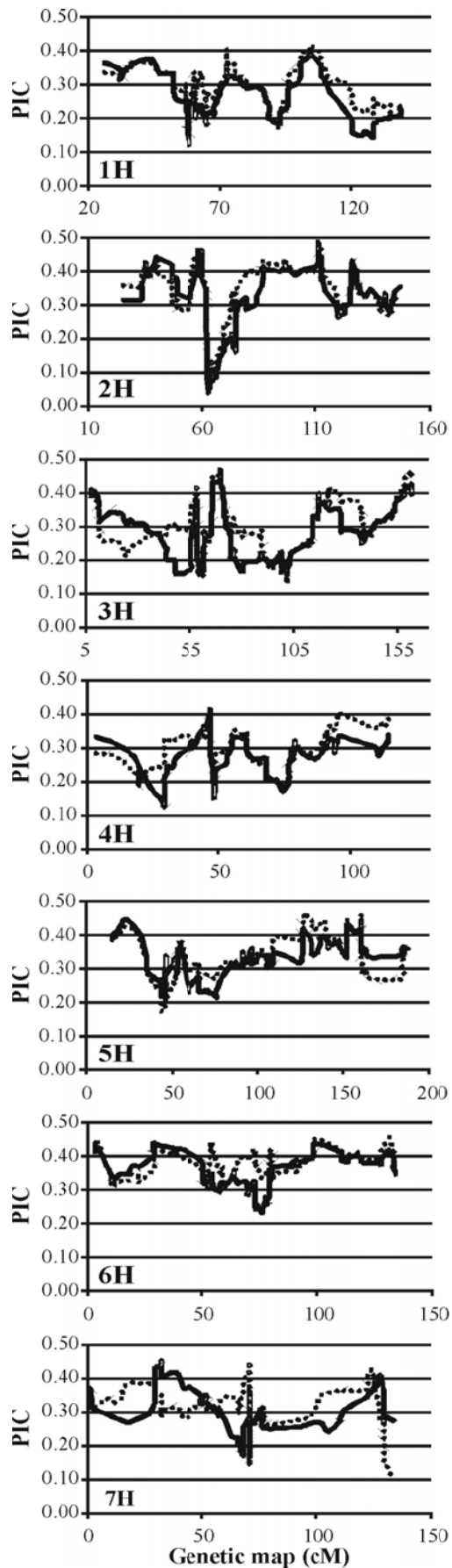
2. attēls. Genotipēšanas datu galveno koordināšu analīze. A – visu 95 līniju galveno koordināšu analīze. B – divkanšu līniju (n=89) galveno koordināšu analīze. Ar kvadrātiem apzīmētas selekcijas līnijas, bet ar rombiem šķirnes.

Turpmākajā darba gaitā tika veikta 95 miežu līniju filoģenētiskā analīze. Ar maksimālās parsimonijas metodi veidotā dendrogramma uzskatāmi parāda daudzkanšu miežu līniju attālo radniecību ar divkanšu miežu līnijām (3. attēls). Latvijā ar miežu selekciju nodarbojas galvenokārt Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūts un Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūts, taču dendrogramma neparāda selekcijas materiāla sadalījumu pēc šīm institūcijām, ko iespējams izskaidrot ar materiāla apmaiņu selekcijas mērķiem. VPLSI uzsākta kailgraudu miežu selekcijas programma, kurā tiek izmantotas kailgraudu miežu šķirnes no Ziemeļamerikas (informācija no Dr. agron. L. Legzdīņas), taču dendrogrammā kailgraudu miežu līnijas neparādās kā atsevišķa grupa, tādējādi jādoma, ka notiek sekmīga kailgraudu fenotipu nosakošā *nud* lokusa introgresija Latvijas apstākļiem adaptētā selekcijas materiālā.

Illumina miežu genotipēšanas platforma ir tikusi pielietota arī vairāku kartēšanas populāciju ('Steptoe' x 'Morex', 'OWB D' x 'OWB R', 'Barke' x 'Morex') analīzei un konsensus ģenētiskās kartes izveidošanai (Waugh, Close, Graner, nepublicēti rezultāti). Ņemot vērā ciešo sadarbību, kas izveidojusies ar Illumina miežu genotipēšanas platformas veidošanā iesaistītajām laboratorijām, līdz šim nepublicētā ģenētiskā karte ir pieejama arī LZP projekta realizētājiem. Tādējādi bija iespējams pētīt ne tikai vispārējo Latvijas miežu šķirņu ģenētisko daudzveidību, bet arī ģenētiskās daudzveidības (izteiktas kā polimorfisma informācijas saturs, *polymorphism information content*, PIC) sadalījumu dažādos genoma rajonos. Piemēram, 4. attēlā redzams, ka 3H hromosomas subtelomēriskais rajons parāda zemākas PIC vērtības 23 Latvijas miežu šķirnēs salīdzinot ar visu paraugkopu. No tā var secināt, ka selekcionāru darbs selekcijas līniju veidošanā ir veicinājis ģenētiskās daudzveidības palielināšanu šajā genoma rajonā. Analizēto šķirņu un līniju paraugkopa ietvēra 21 kailgraudu miežu līniju, kuras satur *nud* gēnu, kas introgresēts no Ziemeļamerikas un Eiropas miežiem, piemēram, Dawn, McGwire, Merlin un SW-1291. Pilnajā paraugkopā, salīdzinot ar 23 Latvijas miežu šķirnēm (visas plēkšņainas), uz 7H hromosomas 100 – 110 cM rajonā novērojama PIC vērtību samazināšanās. Šajā rajonā atrodas nesen klonētais un raksturotais *nud* gēns (Costa et al. 2001; Taketa et al. 2008). Tādējādi genotipēšanas dati apstiprina selekcionāru veikto atlasīšanu pēc kailgraudu fenotipa, kuras rezultātā šajā genoma rajonā samazinājusies ģenētiskā daudzveidība.

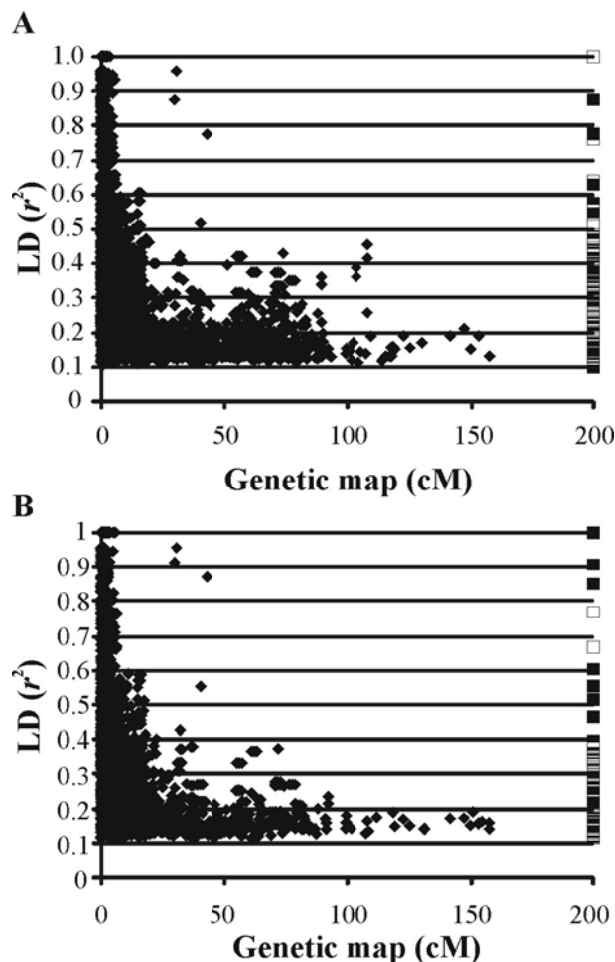


3. attēls. Ar maksimālās parsimonijas metodi rekonstruēta konsensus dendrogramma, kas balstīta uz 100 *bootstrap* atkārtojumiem. Ar zaļu krāsu norādītas daudzkanšu miežu līnijas, ar sarkanu krāsu norādītas kailgraudu miežu līnijas. Skaitļi dendrogrammas zaru žāklēs norāda *bootstrap* vērtības. Ar oranžām bultām norādītas Valsts Stendes graudaugu selekcijas institūta un Latvijas Lauksaimniecības universitātes, bet ar zilām bultām Valsts Priekulu laukaugu selekcijas institūta veidotās šķirnes un selekcijas līnijas.



4. attēls. Polimorfisma informācijas satura (*polymorphism information content*, PIC) sadalījums Latvijas miežu šķirņu un selekcijas līniju genomā. Katrs grafiks parāda PIC sadalījumu vienā no septiņām miežu hromosomām, kuras apzīmētas 1H – 7H. Ar nepārtrauktu līniju parādīts PIC visās 95 līnijās, ar pārtrauktu līniju parādīts PIC tikai 23 Latvijas miežu šķirnēs. Uz X ass norādīts marķieru novietojums hromosomā (cM). PIC aprēķināts nevis katram lokusam atsevišķi, bet ar kustīgo logu vidēji katriem 11 lokusiem.

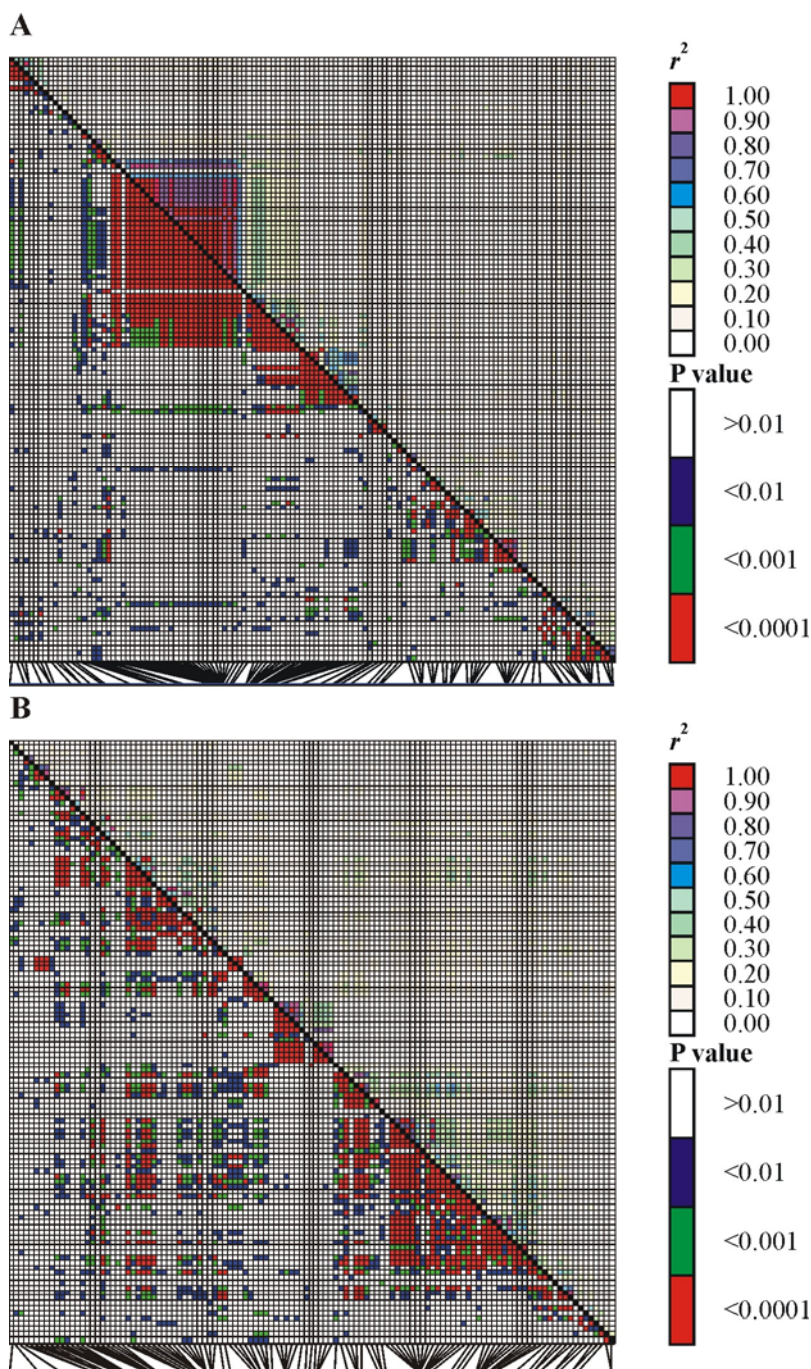
Nelīdzsvarotā saistība (*linkage disequilibrium*, LD) novērtē novirzes no divu dažādu gēnu alēļu nejaušas asociācijas (Slatkin 2008). Atšķirībā no saistības starp gēniem uz vienas hromosomas, LD var būt novērojama arī starp gēnu alēlēm, kas atrodas uz dažādām hromosomām. LD bloku izmērs atkarīgs no rekombinācijas un tas ietekmē asociāciju (LD) kartēšanas izšķirtspēju – jo mazāks LD bloku izmērs, jo augstāka kartēšanas izšķirtspēja, taču vienlaicīgi kartēšanai nepieciešams lielāks marķieru skaits. Cilvēku populācijās LD bloku izmērs vidēji ir 20 kbp, taču tas var mainīties gan atkarībā no pētītās populācijas, izmantotā marķieru veida un blīvuma, gan arī no rekombinācijas biežuma konkrētajā genoma rajonā (Wall and Pritchard 2003). Svešapputes augiem, piemēram, kukurūzai, dabiskās populācijās LD saglabājas tikai gēnu ietvaros un caurmērā LD izzūd ($r^2 < 0.1$) 1500 bp robežās (Remington et al. 2001), taču LD attālums atkarīgs no pētītās populācijas. Pašapputes modeļorganisma *Arabidopsis thaliana* pasaules kolekcijā LD novērojams pat starp lokusiem 1 cM vai 250 kb attālumā, taču tas var sasniegt pat 50 cM lokālās populācijās (Nordborg et al. 2002). Arī pašapputes kultūraugiem, piemēram, miežiem, LD attālums ir atkarīgs no pētītās populācijas. Tā piemēram, savvaļas miežu populācijās līdzīgi kā svešapputes augos LD saglabājas tikai gēnu robežās (Caldwell et al. 2006). Savukārt vietējās šķirnēs (*landrace*) un mūsdienu šķirnēs statistiski nozīmīgs LD bija novērojams starp lokusiem attiecīgi 83 kbp un 212 kbp attālumā.



5. attēls. LD (r^2) starp SNP lokusu pāriem ($P < 0.001$) atkarībā no ģenētiskā attāluma starp lokusiem (cM). Starphromosomālais LD parādīts fiksētā attālumā 200 cM. A – LD pilnā miežu līnijas paraugkopā. B – LD 89 divkanšu miežu līnijās.

Mūsdienu kultūraugu šķirnes ir īpašs gadījums no populāciju ģenētikas viedokļa (Ball 2007). Modernā miežu selekcija tika uzsākta 20 gs. sākumā, kad no vietējo šķirņu materiāla atlasītās līnijas tika izmantotas krustojumos jaunu šķirņu veidošanai (Fischbeck 1992). Tādējādi no vienas puses jāņem vērā, ka Eiropas miežu šķirņu pamatā samērā daudzveidīgs

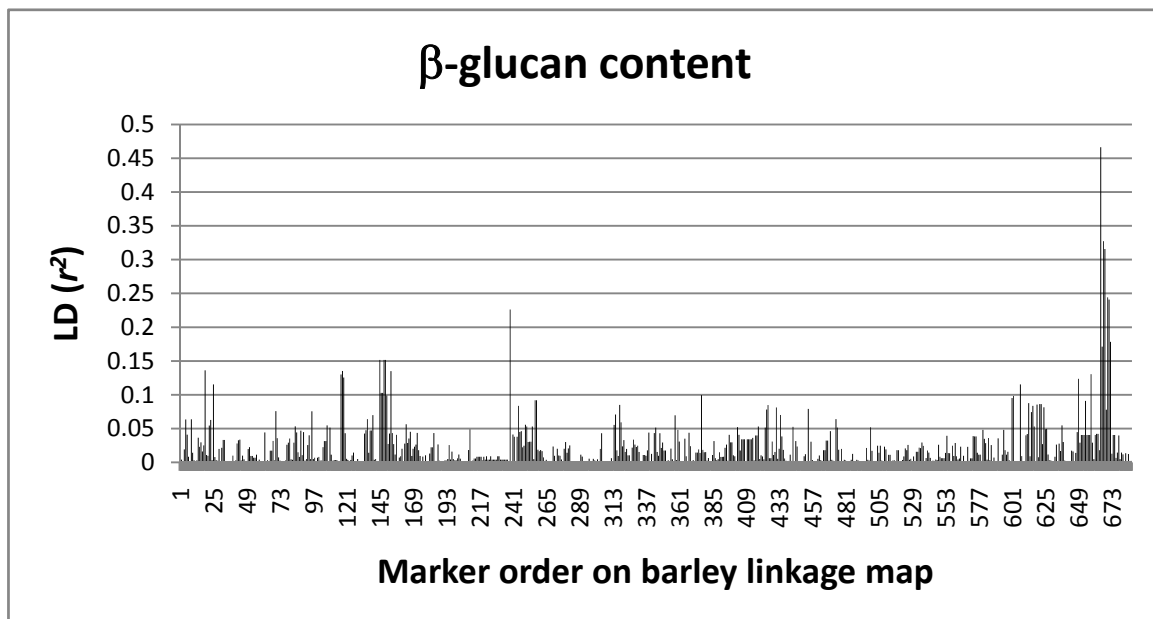
materiāls no Vācijas, Morāvijas, Lielbritānijas un Skandināvijas vietējām šķirnēm, taču vienlaikus mūsdienu šķirnes no 20 gs. sākumā radītajām šķir ne vairāk kā daži krustojumi (mežozes). Šāds materiāls satur augstu alēlisko daudzveidību, taču arī ārkārtīgi augstu LD līmeni. Sākotnēja Eiropas vasaras miežu šķirņu genoma analīze ar Illumina SNP genotipēšanas platformu parādīja, ka statistiski nozīmīgs LD novērojams starp lokusiem vidēji 1.53 cM attālumā (Rostoks et al. 2006). Šādas atšķirības LD bloku izmēros starp modernajām šķirnēm un savvaļas populācijām norāda uz iespēju veikt sākotnēju visa genoma asociāciju kartēšanu mūsdienu miežu šķirnēs, kur LD bloki ir pat vairākas centimorganīdas lieli, izmantojot vien dažus tūkstošus SNP. Savukārt detalizēta kartēšana un kandidātģēnu identifikācija būtu iespējama koncentrējoties jau uz noteiktu genoma rajonu analīzi vietējās šķirnēs un savvaļas miežu populācijās (Caldwell et al. 2006).



Projekta gaitā tika pētīts LD bloku izmērs Latvijas miežu šķirnēs. Izmantojot ~600 ģenētiski kartētos SNP ar minimālo alēles frekvenci >0.1 noskaidrojās, ka 95 Latvijas miežu šķirnēs un selekcijas līnijās vidējais attālums starp lokusiem ar statistiski nozīmīgu ($P < 0.001$) LD ($r^2 > 0.5$) ir 1.5 cM (mediānas attālums 0.3 cM) (skat. 5A. attēlu). Izslēdzot sešas daudzkanšu miežu līnijas, attālums starp lokusiem ar statistiski nozīmīgu LD samazinājās nedaudz līdz 1.4 cM (mediānas attālums 0.3 cM) (skat. 5B. attēlu). Dotie rezultāti norāda uz Latvijas miežu šķirņu un selekcijas līniju līdzību ar Rietumeiropas miežu šķirnēm LD ziņā un piemērotību asociāciju kartēšanai.

SNP genotipēšanas rezultāti ($MAF > 0.1$) par katru hromosomu tika izmantoti arī LD bloku izmēru un izvietojuma genomā analīzei (6. attēls). Iegūtie rezultāti uzskatāmi parādīja atšķirīgus LD bloku izmērus un novietojumu starp dažādām hromosomām. Šie rezultāti ir nozīmīgi, jo norāda, ka asociāciju kartēšanas izšķirtspēja būs atkarīga no konkrētā analizētā genoma rajona.

Izmantojot LZP projekta realizācijas gaitā iegūtos genotipēšanas datus un datus par Latvijas miežu šķirņu un selekcijas līniju graudu β -glikānu saturu, kas iegūti 2007. gada lauka izmēģinājuma sezonā Valsts pētījumu programmas agrobiotehnoloģijā ietvaros, tika veikts asociāciju kartēšanas izmēģinājums, izmantojot vispārējo lineāro modeli programmā TASSEL. Sākotnējie rezultāti liecina, ka pat izmantojot vienkāršotu statistisko modeli un vienas sezonas fenotipa datus, kā arī neņemot vērā potenciālo populāciju struktūras ietekmi iespējams kartēt kvantitatīvās pazīmes nosakošos lokusus (7. attēls). Attēlā redzamais statistiski būtiskais QTL uz miežu 7H hromosomas sakrīt ar iepriekš literatūrā ziņoto β -glikānu QTL, kas kartēts 'Beka' x 'Logan' populācijā (Molina-Cano et al. 2007).



7. attēls. Graudu β -glikānu satura asociāciju kartēšana. β -glukānu saturs noteikts ar Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd.) izstrādātu enzimatisku metodi Valsts pētījumu programmas agrobiotehnoloģijā ietvaros. SNP marķieri ($MAF > 0.1$) sakārtoti pēc to atrašanās vietas uz miežu ģenētiskās kartes. Asociāciju kartēšana veikta ar programmu TASSEL (Bradbury et al. 2007) izmantojot vispārējo lineāro modeli.

Noslēgumā jāatzīmē, ka LZP projekta mērķis ir sasniegts, pirmoreiz iegūstot augstas caurlaidspējas SNP genotipēšanas datus par 95 Latvijas miežu šķirnēm un selekcijas līnijām. Jau patlaban ir iegūti nozīmīgi rezultāti par Latvijas miežu selekcijas materiāla ģenētisko

daudzveidību, populāciju struktūru un nelīdzsvarotās saistības bloku izmēriem un izvietojumu genomā. Papildus šiem datiem 2008. gadā ir iegūti SNP haplotipu dati par vairākiem kandidātģēnu lokusiem b-glikānu un lizīna saturam, kuri kopā ar augstas caurlaidspējas genotipēšanas datiem varētu kalpot par pamatu asociāciju kartēšanai Latvijas miežu selekcijas materiālā. Turpmākajā darba gaitā nepieciešams paplašināt SNP marķieru daudzumu, ko iespējams varēs veikt sadarbībā ar VPLSI un Lielbritānijas partneriem ESF projekta ietvaros. Asociāciju kartēšanai nepieciešamie fenotipa dati tiek uzkrāti Valsts pētījumu programmas agrobiotehnoģijā realizētajā projektā. Tādējādi projektā iegūtie rezultāti būs izmantojami ilgākā laika posmā asociāciju ģenētikā, pakāpeniski uzkrājot fenotipa datus vairāku gadu garumā. Iegūto rezultātu pilns potenciāls tiks realizēts turpmākā darba rezultātā gan konkrētas pazīmes nosakošu genoma rajonu un kandidātģēnu identifikācijā, gan arī selekcijā pielietojamu molekulāro marķieru izstrādē.

Literatūras saraksts

- Ball RD (2007) Statistical analysis and experimental design. In: Oraguzie NC, Rikkerink EHA, Gardiner S, De Silva HN (eds) Association mapping in plants. Springer, pp 133-196.
- Bennett M, Leitch I (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany London* 76:113-176.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23:2633-2635.
- Caldwell DG, McCallum N, Shaw P, Muehlbauer GJ, Marshall DF, Waugh R (2004) A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J* 40:143-150.
- Caldwell KS, Russell JR, Langridge P, Powell W (2006) Extreme population dependent linkage disequilibrium detected in an inbreeding plant species, *Hordeum vulgare*. *Genetics* 172:557-567.
- Close TJ, Wanamaker SI, Caldo RA, Turner SM, Ashlock DA, Dickerson JA, Wing RA, Muehlbauer GJ, Kleinhofs A, Wise RP (2004) A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. *Plant Phys* 134:960-968.
- Costa JM, Corey A, Hayes PM, Jobet C, Kleinhofs A, Kopisch Obusch A, Kramer SF, Kudrna D, Li M, Riera Lizarazu O, Sato K, Szucs P, Toojinda T, Vales MI, Wolfe RI (2001) Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: a phenotypically polymorphic doubled-haploid population. *Theor Appl Genet* 103:415-424.
- Druka A, Muehlbauer G, Druka I, Caldo R, Baumann U, Rostoks N, Schreiber A, Wise R, Close T, Kleinhofs A, Graner A, Schulman A, Langridge P, Sato K, Hayes P, McNicol J, Marshall D, Waugh R (2006) An atlas of gene expression from seed to seed through barley development. *Funct Integr Genomics* 6:202-211.
- Fan JB, Oliphant A, Shen R, Kermani BG, Garcia F, Gunderson KL, Hansen M, Steemers F, Butler SL, Deloukas P, Galver L, Hunt S, McBride C, Bibikova M, Rubano T, Chen J, Wickham E, Doucet D, Chang W, Campbell D, Zhang B, Kruglyak S, Bentley D, Haas J, Rigault P, Zhou L, Stuelpnagel J, Chee MS (2003) Highly parallel SNP genotyping. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68:69-78.
- Fischbeck G (1992) Barley cultivar development in Europe - success in the past and possible changes in the future. In: Munck L (ed) *Barley Genetics VI. Proceedings of the 6th International Barley Genetics Symposium*. Munksgaard International Publishers, Helsinborg, pp 885-901
- Kruglyak L (1997) The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet* 17:21-24.

- Molina-Cano L, Moralejo M, Elia M, Munoz P, Russell JR, Perez-Vendrell AM, Ciudad F, Swanston JS (2007) QTL analysis of a cross between European and North American malting barleys reveals a putative candidate gene for b-glucan content on chromosome 1H. *Mol Breeding* 19:275-284.
- Nordborg M, Borevitz JO, Bergelson J, Berry CC, Chory J, Hagenblad J, Kreitman M, Maloof JN, Noyes T, Oefner PJ, Stahl EA, Weigel D (2002) The extent of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 30:190-193.
- Oliphant A, Barker DL, Stuelpnagel JR, Chee MS (2002) BeadArray technology: enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping. *Biotechniques Suppl.*:56-61.
- Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, Wilson LM, Whitt SR, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES, IV (2001) Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11479-11484.
- Rostoks N, Mudie S, Cardle L, Russell J, Ramsay L, Booth A, Svensson JT, Wanamaker SI, Walia H, Rodriguez EM, Hedley PE, Liu H, Morris J, Close TJ, Marshall DF, Waugh R (2005) Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol Genet Genomics* 274:515-527.
- Rostoks N, Ramsay L, MacKenzie K, Cardle L, Bhat PR, Roose ML, Svensson JT, Stein N, Varshney RK, Marshall DF, Graner A, Close TJ, Waugh R (2006) Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18656-18661.
- Slatkin M (2008) Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet* 9:477-485.
- Stein N, Prasad M, Scholz U, Thiel T, Zhang H, Wolf M, Kota R, Varshney R, Perovic D, Grosse I, Graner A (2007) A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor Appl Genet* 114:823-839.
- Syvanen AC (2005) Toward genome-wide SNP genotyping. *Nat Genet* 37 Suppl:S5-10.
- Taketa S, Amano S, Tsujino Y, Sato T, Saisho D, Kakeda K, Nomura M, Suzuki T, Matsumoto T, Sato K, Kanamori H, Kawasaki S, Takeda K (2008) Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4062-4067.
- Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Roder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Niks RE, Graner A (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet*.
- Wall JD, Pritchard JK (2003) Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 4:587-597.
- Wenzl P, Li H, Carling J, Zhou M, Raman H, Edie E, Hearnden P, Maier C, Xia L, Caig V, Ovesna J, Cakir M, Poulsen D, Wang J, Raman R, Smith KP, Muehlbauer GJ, Chalmers KJ, Kleinhofs A, Huttner E, Kilian A (2006) A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BMC Genomics* 7:206.