

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

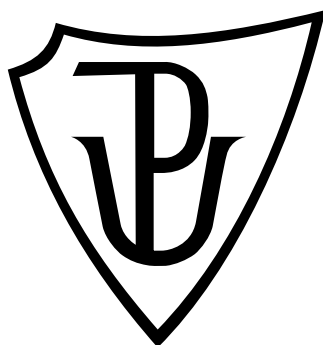
Olomouc 2021

Romana Nesnadná

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Analýza génov vernalizácie u jačmeňa siateho

Romana Nesnadná

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: RNDr. Jan Šafář, Ph.D.

Podklad pro zadání DIPLOMOVÉ práce studenta

Jméno a příjmení: Bc. Romana NESNADNÁ
Osobní číslo: R190065
Adresa: Na kopánce 38, Šaštín – Stráže, 90841 Šaštín – Stráže, Slovenská republika
Téma práce: Analýza génů vernalizace u jačmeňa siateho
Téma práce anglicky: Analysis of vernalization genes in *Hordeum vulgare*
Vedoucí práce: RNDr. Jan Šafář, Ph.D.
Laboratoř růstových regulátorů

Zásady pro vypracování:

Študentka vypracuje literárnu rešerš zameranú na súčasné trendy prípravy molekulárných konštruktov a kaziet pre transformáciu rastlín so zameraním na rôzne typy klonovacích technik a editáciu génomu technológiou CRISPR/Cas9. Súčasne bude prezentovaný prehľad génov ovplyvňujúcich kvitnutie u obilnín, predovšetkým u pšenice sietej (*Triticum aestivum*) a jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare*) s dôrazom na gény vernalizačných dráh. V praktickej časti sa študentka bude venovať príprave vhodných konštruktov pre štúdium molekulárných mechanizmov vernalizácie u jačmeňa siateho, konkrétne pre gén *VRN-H1*. Súčasťou práce bude taktiež genetický skrining ENU (*N-ethyl-N-nitrosourea*) M_2 mutovanej populácie ozimného kultivaru jačmeňa siateho Antonella s cieľom identifikovať kandidátne gény regulujúce gén *VRN-H1*. Práca bude zahŕňať radu molekulárne biologických metód, predovšetkým izoláciu DNA, PCR a molekulárne klonovanie. V prípade nájdania vhodných kandidátov v mutovanej populácii budú kandidáti overení molekulárnymi metódami a bude prevedené hybridizačné a komplementačné kríženie. U vybraného súboru sekvenovaných kultivarov jačmeňa siateho bude prevedená fylogenetická analýza *VRN-H1* génu.

Seznam doporučené literatury:

- Čermák, T., Curtin, S.J., Gil-Humanes, J., Čegan, R., Kono, T.J.Y., Konečná, E., Belanto, J.J., Starker, C.G., Mathre, J.W., Greenstein, R.L., Voytas, D.F., 2017. A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. *The Plant Cell* 29, 1196?1217. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922>
- Fu, D., Szűcs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J.S., von Zitzewitz, J., Hayes, P.M., Dubcovsky, J., 2005. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol Genet Genomics* 273, 54?65. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1095-4>
- Milec, Z., Valárik, M., Bartoš, J., Šafář, J., 2014. Can a late bloomer become an early bird? Tools for flowering time adjustment. *Biotechnology Advances, Plant Biotechnology* 2013: ?Green for Good II?. 32, 200?214. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.008>
- Procházká, Fyziologie rostlin
- Trevaskis, B., Bagnall, D.J., Ellis, M.H., Peacock, W.J., Dennis, E.S., 2003. MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *PNAS* 100, 13099?13104. <https://doi.org/10.1073/pnas.1635053100>
- Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherman, J., Dubcovsky, J., 2004. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *Theor Appl Genet* 109, 1677?1686. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1796-4>

Podpis vedoucího práce:

Datum:

18.3.2021

Podpis vedoucího pracoviště:

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUČI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLÓGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 986 998, Praha – Podílbaš univf@univf.cz, nescenfo, 15. března 2021 10:48

Datum:

22.03.2021

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc. et Ph.D.

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora:	Romana Nesnadná
Názov práce:	Analýza génov vernalizácie u jačmeňa siateho
Typ práce:	Diplomová
Pracovisko:	Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR, Olomouc
Vedúci práce:	RNDr. Jan Šafář, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2021

Abstrakt:

Kvitnutie je kritickým krokom v živote rastliny a jeho správne načasovanie má vplyv na úrodu a kvalitu zrna. Porozumenie mechanizmu účinku génov zapojených v kaskáde kvitnutia je dôležitým krokom v príprave nových kultivarov prispôbených oblastiam, kde sú pestované. Expresia génu *VRN-H1* je indukovaná po dlhodobom pôsobení chladu, vernalizácii, ktorá umožňuje kvitnutie u ozimných kultivarov jačmeňa. V rámci mojej diplomovej práce boli pripravené dva konštrukty pre štúdium mechanizmov riadiacich expresiu génu *VRN-H1*. Konkrétne bol promotor z kultivaru Morex a kódujúca sekvencia *VRN-H1* fúzované s reportérovým génom β -glukuronidázou. Okrem toho bol zahájený genetický skrín mutovanej populácie ozimného kultivaru Antonella za cieľom identifikácie prípadne nových génov regulujúcich expresiu *VRN-H1*. Kvitnutie bez dlhodobého chladového pôsobenia bolo zaznamenané u 34 kandidátnych rastlín bez mutácie kľúčových génov *VRN-H1* a *VRN-H2*. Identifikácia génu zodpovedného za skoré kvitnutie týchto kandidátov je predmetom ďalšieho štúdia. Posledná časť mojej diplomovej práce sa venuje sekvenčnej analýze génu *VRN-H1* u 22 kultivarov jačmeňa s cieľom identifikácie špecifických motívov a polymorfizmov, ktoré by mohli ovplyvniť rastový zvyk. Taktiež sa uskutočnila fylogenetická analýza opísaných aliel génu *VRN-H1*.

Kľúčové slová:	<i>Hordeum vulgare</i> , vernalizácia, <i>VRN-H1</i> , klonovanie, genotypovanie, fylogenetika, sekvenovanie
Počet strán:	xi + 87
Počet príloh:	5
Jazyk:	Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Romana Nesnadná
Title: Analysis of vernalization genes in *Hordeum vulgare*
Type of thesis: Master
Department: Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Olomouc
Supervisor: RNDr. Jan Šafář, Ph.D.
The year of presentation: 2021

Abstract:

Flowering is a critical step in plant life and its proper timing has an impact on seed and grain cereal quality. Understanding molecular mechanisms regulating flowering cascade is an important step towards preparing new cultivars better adapted to changing conditions of growing areas. Expression of the *VRN-H1* gene is induced by prolonged cold (vernalization) to trigger flowering of winter barley cultivars. Within the framework of my Master thesis, two constructs of *VRN-H1* were prepared to investigate the mechanisms controlling the induction of this gene. Specifically, the endogenous promoter of cultivar Morex and coding sequence of *VRN-H1* were fused to reporter gene β -glucuronidase. Moreover, the genetic screen of mutated population of winter cultivar Antonella was initiated with an aim to identify possible new genes regulating *VRN-H1*. In total 34 candidates with suppressed vernalization requirements were identified. Genotyping revealed an absence of mutations in the key flowering genes *VRN-H1* and *VRN-H2*. The identification of the main casual gene will be the subject of further study. The last part of my Master thesis focused on the sequence analysis of the gene *VRN-H1* in 22 genetically diverse barley cultivars with aim to detect specific motifs and polymorphisms that could affect growth habit. Phylogenetic analysis of described *VRN-H1* alleles was carried out.

Keywords: *Hordeum vulgare*, vernalization, *VRN-H1*, cloning, genotyping, phylogenetics, sequencing

Number of pages: xi + 87

Number of appendices: 5

Language: Slovak

Prehlásenie

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením RNDr. Jana Šafáře, Ph.D. a za použitia citovanej literatúry

V Olomouci dňa:

.....

Romana Nesnádná

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som rada poďakovala môjmu vedúcemu RNDr. Janu Šafářovi, Ph.D. a Mgr. habil. Aleši Pečinkovi, Ph.D. za ich odborné vedenie, poznatky, pripomienky a čas venovaný spracovaniu diplomovej práce. Taktiež by som sa chcela poďakovať Mgr. Beáte Strejčkové a Mgr. Kateřine Lahnerové za pomoc v rámci experimentálnej časti diplomovej práce a za ich ochotu vždy poradiť. Ďalej ďakujem Ing. Vojtěchovi Hudzieczekovi, Ph.D. a kolektívu na Biofyzikálním ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i., v Brne za praktické vysvetlenie klonovacích techník. Veľké poďakovanie patrí celému kolektívu Centra strukturní a funkční genomiky rostlin, Ústavu experimentální botaniky, AV ČR v.v.i., v Olomouci za vytvorenie priateľského prostredia.

OBSAH

1 Úvod.....	1
2 Ciele práce.....	2
3 Literárny prehľad.....	3
3.1 Kvitnutie.....	3
3.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
3.2.1 Vernalizačná dráha.....	4
3.2.2 Fotoperiodická dráha.....	5
3.3 Jačmeň siaty (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....	7
3.3.1 Vernalizačná dráha u pšenice a jačmeňa.....	7
3.3.2 Fotoperiodická dráha u pšenice a jačmeňa.....	12
3.3.3 Cirkadiálne hodiny.....	15
3.4 Funkčná genomika.....	16
3.4.1 Klasická mutagenéza.....	17
3.4.2 Cílená mutagenéza s využitím špecifických endonukleáz.....	18
3.4.3 Vybrané metódy klonovania.....	22
3.4.4 Príprava vektorov pre transformáciu.....	26
3.5 Transformácia jačmeňa.....	28
3.5.1 Biolistická metóda.....	28
3.5.2 Transformácia jačmeňa prostredníctvom <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
3.6 Transgénne plodiny s výhodnejšími vlastnosťami.....	31
4 Materiál a metódy.....	33
4.1 Biologický materiál.....	33
4.2 Použité chemikálie, súbavy a roztoky.....	33
4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení.....	35
4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovanie postupy.....	36
4.4.1 Klonovanie génu <i>VRN-H1</i> z kultivaru Igri.....	36
4.4.2 Skrining mapovacej populácie jačmeňa siateho.....	44
4.4.3 Analýza sekvenčných motívov a konštrukcia fylogenetick ^{ej} príbuznosti <i>VRN-H1</i> génov.....	47
5 Výsledky.....	49
5.1 Klonovanie génu <i>VRN-H1</i> z kultivaru Igri.....	49
5.2 Skrining mapovacej populácie jačmeňa siateho.....	56
5.3 Analýza sekvenčných motívov a konštrukcia fylogenetick ^{ej} príbuznosti <i>VRN-H1</i> génov.....	63
6 Diskusia.....	68
7 Záver.....	75
8 Literatúra.....	76
9 Prílohy.....	87

Zoznam symbolov a skratiek

AGL24	AGAMOUS LIKE24
ALS	Acetolaktátsyntáza
AP1	APETALA1
BBM5	BABY BOOM 5
Cas9	CRISPR-associated protein 9
CBF	C-repeat binding factor
CCA1	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1
CDF	CYCLING DOF FACTOR
cDNA	Komplementárna DNA
CDS	Kódujúca sekvencia (<i>angl.</i> coding sequence)
CNV	Copy number variation
CO	CONSTANS
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindrom
crRNA	CRISPR RNA
CRT/DRE	C-repeat/dehydration-responsive element
Cry2	Cryptochróm 2
DREBs	Drought-responsive element binding proteins
DSB	Dvojláknový zlom (<i>angl.</i> Double-Strand break)
dsRNA	Dvojláknová RNA (<i>angl.</i> Double-Stranded RNA)
EAM10	EARLY MATURITY10
EAM8	EARLY MATURITY8
EDTA	Kyselina etyléndiamíntetraoctová
ELF3	EARLY FLOWERING 3
ELF4	EARLY FLOWERING 4
EMS	Etylmetán sulfonát
ENU	Etylnitróso močovina
FD	FLOWERING LOCUS D
FDL2	FLOWERING LOCUS-D LIKE 2
FKF1	FLAVIN KELCH F BOX 1
FLC	FLOWERING LOCUS C
FRI	FRIGIDA
FT	FLOWERING LOCUS T
FTIP1	FT-INTERACTING PROTEIN1
FUL	FRUITFULL
GFP	Zelený fluorescenčný proteín (<i>angl.</i> Green fluorescent protein)
Ghd7	Grain number, plant height et heading date 7
GI	GIGANTEA
GIF1	GRF-INTERACTING FACTOR 1
GMO	Geneticky modifikovaný organizmus
GRF4	GROWTH-REGULATING FACTOR 4
GRP2	GLYCINE RICH RNA-BINDING PROTEIN 2
GUS	β -glukuronidáza
H3K27me3	Trimetylácia lyzínu 27 na históne 3
H3K4me3	Trimetylácia lyzínu 4 na históne 3
H3K9me2/3	Di/trimetylácia lyzínu 9 na históne 3
HA	Hemaglutitín
HAP	HEME ACTIVATOR PROTEIN
HIV	Vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (<i>angl.</i> Human Immunodeficiency Virus)
HOS1	HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE 1
HR	Homológná rekombinácia (<i>angl.</i> Homologous recombination)
CHE	CCA1-HIKING EXPEDITION

ICE1	INDUCER OF CBF1
InDel	Inzercia–delécia
JMJC	Jumonji C-type
LB	Luria Bertani
LEC1	LEAFY COTYLEDON 1
LEC2	LEAFY COTYLEDON 2
LFY	LEAFY
LHY	LATE ELONGATED HYPOCOTYL
LTR	Long terminal repeat
LUX	LUX ARRHYTHMO
MAS	Marker-assisted selection
MITE	Miniature inverted-repeat transposable element
NF-Y	Nukleárny faktor-Y (ang. Nuclear factor-Y)
NHEJ	Nehomológne spájanie koncov (<i>angl.</i> nonhomologous end-joining)
NIR	Ferredoxín-nitrit reduktáza
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PhyA	Fytochróm A
PhyC	Fytochróm C
PPD	Fotoperiodický gén
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PRR	Pseudo-response-regulator
QTL	Quantitative trait locus
RIP3	RNA Immune Precipitation fragment 3
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interferencia
RVD	Repetitívne vaRiabilné di-reziduá (<i>angl.</i> Repeat Variable Di-Residues)
S/MAR	ScaVold/matrix attachment region
sgRNA	Single synthetic guide RNA
siRNA	Malá interferečná RNA (<i>angl.</i> small interfering RNA)
SNP	Jednonukleotidový polymorfizmus (<i>angl.</i> single nucleotide polymorphisms)
SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1
SPA1	SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A
SPL	SQUAMOSA BINDING PROTEIN LIKE
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TALE	Transkričné aktivátory podobné efektorom (<i>angl.</i> Transcription activator-like effector)
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
TFL1	TERMINAL FLOWER1
Ti	Tumor indukujúci plazmid
TILLING	Targeting Induced Local Lesions IN Genomes
TOC1/PRR1	TIMING OF CAB EXPRESSION1
tracrRNA	Transaktivačná crRNA
uORF	Upstream čítací rámec (<i>angl.</i> upstream open reading frame)
VIN3	VERNALIZATION INSENSITIVE 3
VRN	Vernalizačný gén
VRS1	SIX-ROWED SPIKE 1
VRT2	VEGETATIVE TO REPRODUCTIVE TRANSITION GENE 2
WUS	WUSCHEL
YDV	Vírus žltej zakrpatenosti (<i>angl.</i> yellow dwarf virus)
ZFN	Nukleáza zinkového prstu (<i>angl.</i> zinc finger nuclease)
ZmUbi	Ubikvitínový promotor z kukurice (<i>Zea Mays</i>)

Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Potlačenie transkripcie hlavného represora kvitnutia u <i>A. thaliana</i> , génu <i>FLC</i> , pomocou nekódujúcich RNA (COLDAIR a COOLAIR) počas vernalizácie.....	5
Obrázok 2: Schematické znázornenie funkcie génov vernalizačnej dráhy u ozimného typu jačmeňa	9
Obrázok 3: Schematické znázornenie recesívnej alely <i>vrn-H1</i> u ozimných kultivarov a dominantnej <i>VRN-H1</i> u jarných kultivarov s deléciou v rámci prvého intrónu.	10
Obrázok 4: Schematické znázornenie prvého intrónu u 11 aliel génu <i>VRN-H1</i>	11
Obrázok 5: Schematické porovnanie kľúčových génov v rámci fotoperiodickej a vernalizačnej dráhy u <i>A. thaliana</i> a jačmeňa.....	14
Obrázok 6: Hlavné metódy editácie genómu prostredníctvom miestne špecifických endonukleáz, konkrétne ZFN, TALEN a CRISPR/Cas9	19
Obrázok 7: Schéma Golden Gate klonovania.....	24
Obrázok 8: Schéma Gibson Assembly.....	25
Obrázok 9: Schéma Gateway klonovania.....	26
Obrázok 10: Schéma klonovacích vektorov pre editáciu rastlinných genómov navrhnutá Čermák <i>et al.</i> (2017).....	27
Obrázok 11: Schematicky znázornené pozície jednotlivých primerov, pomocou ktorých sú amplifikované jednotlivé časti génu <i>VRN-H1</i> u kultivaru Igri.	37
Obrázok 12: Schematicky znázornený princíp zloženia finálneho konštruktu <i>ProVRN-H1::CDS:GUS</i>	43
Obrázok 13: Schematicky znázornený princíp zloženia finálneho konštruktu <i>ZmUbi::CDS:GUS</i>	44
Obrázok 14: Detekcia produktov kontrolnej PCR plazmidov izolovaných z kolónií <i>E.coli</i> MAX Efficiency Stbl2 transformovaných vektorom pJET1.2_ <i>CDS</i>	50
Obrázok 15: Sekvenčný alignment <i>CDS VRN-H1</i> s referenčnou sekvenciou (AY758235.1)...	50
Obrázok 16: Detekcia produktov kontrolnej PCR plazmidov izolovaných z kolónií <i>E.coli</i> MAX Efficiency Stbl2 transformovaných vektorom pJET1.2_ <i>ProVRN-H1</i>	51
Obrázok 17: Sekvenčný alignment promotorovej oblasti <i>VRN-H1</i> s referenčnou sekvenciou <i>VRN-H1</i> kultivaru Igri (extrahovaná z Jayakodi <i>et al.</i> , 2020).....	51
Obrázok 18: Elektroforetogram produktov kontrolnej PCR plazmidov izolovaných z kolónií <i>E.coli</i> MAX Efficiency Stbl2 transformovaných vektorom pJET1.2_ 1.časť <i>VRN-H1</i>	52
Obrázok 19: Sekvenčný alignment prvej časti génu <i>VRN-H1</i> s referenčnou sekvenciou <i>VRN-H1</i> kultivaru Igri (extrahovaná z Jayakodi <i>et al.</i> , 2020).	52
Obrázok 20: Elektroforetogram produktov kontrolnej PCR plazmidov izolovaných z kolónií <i>E.coli</i> MAX Efficiency Stbl2, transformovaných vektorom pJET1.2_ 2.časť <i>VRN-H1</i>	53

Obrázok 21: Sekvenčný alignment druhej časti génu <i>VRN-H1</i> s referenčnou sekvenciou <i>VRN-H1</i> kultivaru Igri (extrahovaná z Jayakodi <i>et al.</i> , 2020).....	53
Obrázok 22: Elektroforetogram pripravených fragmentov s komplementárnymi presahmi za účelom prípravy konštruktov <i>ProVRN-H1::CDS:GUS</i> a <i>ZmUbi::CDS:GUS</i> pomocou metódy Gibson Assembly.....	54
Obrázok 23: Elektroforetogram restričného štiepenia vektoru pVO120 pomocou dvojice restričných enzýmov.	55
Obrázok 24: Restričné štiepenie izolovaných plazmidov <i>ProVRN-H1::CDS:GUS</i> a <i>ZmUbi::CDS:GUS</i> pripravených pomocou Gibson Assembly.....	56
Obrázok 25: Identifikácia jarnej a ozimnej alely génu <i>VRN-H1</i> u 34 kandidátov, Antonelly a Morexu pomocou 1. páru primerov.....	58
Obrázok 26: Identifikácia prítomnosti MITE elementu v rámci 1. intrónu alely <i>HvVRN1</i> , ktorej nositeľom je kultivar Antonella a Igri pomocou 3. páru primerov.	59
Obrázok 27: Amplifikácia 620 bp veľkej oblasti génu <i>Ppd-H1</i> , ktorej súčasťou je SNP15 (C/T) pomocou páru primerov Jones5-F+R u 34 kandidátov a kultivarov Antonella, Igri a Morex.....	60
Obrázok 28: Restričné štiepenie PCR produktu o veľkosti 620 bp pomocou <i>MspI</i> u 34 kandidátov a kultivarov Antonella, Igri a Morex.....	61
Obrázok 29: Amplifikácia <i>ZCCT-Ha</i> , <i>ZCCT-Hb</i> , <i>ZCCT-Hc</i>	62
Obrázok 30: Fylogenetická analýza génu <i>VRN-H1</i> génu. Fylogenetický strom bol skonštruovaný pomocou metódy Maximum Likelihood a Tamura-Nei modelu (Tamura <i>et Nei</i> , 1993) v programe MEGA X (Kumar <i>et al.</i> , 2018).	67

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Prehľad použitých kultivarov s ich rastovým typom	33
Tabuľka 2: Zloženie reakčnej zmesi pre prepis RNA do cDNA pri procese RT-PCR.	37
Tabuľka 3: Sekvencia použitých primerov pri amplifikácii <i>VRN-H1</i> génu a <i>CDS VRN-H1</i> za účelom klonovania.....	37
Tabuľka 4: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre amplifikáciu promotorovej oblasti génu <i>VRN-H1</i> pomocou primerov HvBM5.027 a HvBM5.006 a Q5 High-Fidelity DNA Polymerase.....	38
Tabuľka 5: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu promotorovej oblasti génu <i>VRN-H1</i> pomocou Q5 High-Fidelity DNA Polymerase.....	38
Tabuľka 6: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre amplifikáciu 1. časti génu <i>VRN-H1</i> pomocou primerov VRN-H1_1.cast_F1 a VRN-H1_1.cast_R1, a 2. časti génu <i>VRN-H1</i> pomocou primerov VRN-H1_F6 a VRN-H1_R6 a prostredníctvom PrimeSTAR GXL DNA Polymerase.....	38
Tabuľka 7: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu 1.časti génu <i>VRN-H1</i> pomocou PrimeSTAR GXL DNA Polymerase.	38
Tabuľka 8: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu 2.časti génu <i>VRN-H1</i> pomocou PrimeSTAR GXL DNA Polymerase.	39
Tabuľka 9: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre amplifikáciu <i>CDS VRN-H1</i> pomocou primerov VRN-H1_CDS_F2 a VRN-H1_CDS_R3 a HOT FIREPol DNA Polymerase.....	39
Tabuľka 10: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu <i>CDS VRN-H1</i> pomocou HOT FIREPol DNA Polymerase.	39
Tabuľka 11: Reakčná zmes pro ligáciu purifikovaného PCR produktu a linearizovaného vektoru pjet1.2/blunt.	40
Tabuľka 12: Parametre enzymatického štiepenia vektoru pVO120 pomocou restričných endonukleáz.	42
Tabuľka 13: Sekvencia použitých primerov za účelom vytvorenia komplementárnych presahov na jednotlivých fragmentoch, ktoré boli amplifikované z príslušných konštruktov pomocou Q5 High-Fidelity DNA Polymerase za účelom klonovania.....	42
Tabuľka 14: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre amplifikáciu jednotlivých fragmentov s komplementárnymi presahmi za účelom klonovania pomocou Q5 High-Fidelity DNA Polymerase.....	42
Tabuľka 15: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu jednotlivých fragmentov s komplementárnymi presahmi za účelom klonovania pomocou Q5 High-Fidelity DNA Polymerase.....	43
Tabuľka 16: Zloženie jednotlivých komponentov reakcie Gibson Assembly s uvedenou koncentráciou použitých fragmentov a vektoru.....	43

Tabuľka 17: Zoznam a sekvencia primerov publikovaných pre analýzu génov <i>VRN-H1</i> , <i>VRN-H2</i> a <i>Ppd-H1</i> .	46
Tabuľka 18: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre amplifikáciu špecifických oblastí génov <i>VRN-H1</i> , <i>VRN-H2</i> , <i>Ppd-H1</i> pomocou <i>Taq</i> DNA polymerázy.	46
Tabuľka 19: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu špecifických oblastí génov <i>VRN-H1</i> , <i>VRN-H2</i> , <i>Ppd-H1</i> pomocou <i>Taq</i> DNA polymerázy.	46
Tabuľka 20: Parametre enzymatickej reakcie pri použití restričkej endonukleázy <i>MspI</i> pre štiepenie amplifikovaného fragmentu génu <i>Ppd-H1</i> pomocou primerov Jones5F + R.	47
Tabuľka 21: Zoznam mien jednotlivých kultivarov vrátane rastového typu a zdroja sekvencie, ktoré boli použité v rámci sekvenčnej analýzy génu <i>VRN-H1</i> .	48
Tabuľka 22: Zoznam pripravených modulov za účelom ich spájania pomocou metódy Gibson Assembly.	53
Tabuľka 23: Identifikácia a fenotypovanie vybraných znakov u jednotlivých kandidátov mutagenizovanej populácie jačmenného kultivaru Antonelly.	57
Tabuľka 24: Stručný zoznam analyzovaných kultivarov a významných polymorfizmov v rámci promotorovej oblasti génu <i>VRN-H1</i> .	64
Tabuľka 25: Stručný zoznam analyzovaných kultivarov a významnejších polymorfizmov v rámci oblasti prvého intrónu génu <i>VRN-H1</i> .	66

1 Úvod

Jačmeň siaty predstavuje z hľadiska celosvetovej produkcie štvrtú najdôležitejšiu poľnohospodársku plodinu hneď po pšenici, ryži a kukurici. Existujú rôzne druhy jačmeňa, pričom každý má svoje charakteristické využitie. Jačmeň je dôležitou zložkou ľudskej potravy, ďalej pivovarnického a liehovarského priemyslu, a zároveň sa využíva v živočíšnej výrobe ako krmivo. Jačmeň je taktiež využívaný v rámci výskumu ako dôležitý modelový organizmus pre štúdium obilnín.

V roku 2050 sa predpokladá nárast svetovej populácie na viac ako 10 miliárd obyvateľov s čím sa zvyšujú nároky na výnos a kvalitu zrna u obilnín všeobecne. Samotný výnos je však ovplyvňovaný rôznymi biotickými a abiotickými faktormi. Preto aktuálny výskum viacerých vedeckých tímov smeruje k vylepšeniu vlastností súčasných, či príprave nových kultivarov, ktoré budú lepšie prispôbené klimatickým podmienkam v oblasti ich pestovania.

Správne načasovanie kvitnutia stojí za reprodukčným úspechom rastliny. Tento proces je kontrolovaný veľkým množstvom génov, ktoré spolu vzájomne interagujú. Identifikácia týchto génov, ich alelických variant a samotných interakcií v rámci biochemických dráh zodpovedných za správne načasovanie kvitnutia je veľmi komplikovaný, ale zároveň nevyhnutný proces v príprave nových kultivarov. Kvitnutie je pomerne detailne popísané u modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana*. Každopádne nie je možné všeobecne aplikovať všetky poznatky na obilniny, pretože pri diverzifikácii jednoklíčnolistových a dvojklíčnolistových rastlín došlo k zásadným zmenám. Vďaka neustálemu technickému pokroku a vývoju molekulárnych metód je však možné pochopiť tento komplikovaný a dôležitý proces aj u pšenice či jačmeňa, a následne tieto poznatky využiť v šľachtiteľstve.

2 Ciele práce

Predložená diplomová práca sa skladá z teoretickej a praktickej časti. V rámci teoretickej časti je vypracovaný literárny prehľad zameraný na gény ovplyvňujúce kvitnutie u *Arabidopsis thaliana* a obilnín, predovšetkým pšenice siatej (*Triticum aestivum* L.) a jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.). V literárnom prehľade je taktiež pojednávané o editácii genómu, príprave molekulárnych konštruktov a metódach transformácie obilnín.

Cieľom praktickej časti je príprava vhodných konštruktov pre štúdium molekulárnych mechanizmov vernalizácie u jačmeňa siateho pre gén *VRN-H1*. Súčasťou práce je taktiež genetický skríň M_2 mutovanej populácie (ENU) ozimného kultivaru jačmeňa siateho Antonelly s cieľom identifikovať kandidátne gény, ktoré môžu zohrávať úlohu v regulácii génu *VRN-H1*. V neposlednom rade bude prevedená fylogenetická analýza *VRN-H1* génu u vybraného súboru sekvenovaných kultivarov jačmeňa siateho.

3 Literárny prehľad

3.1 Kvitnutie

Kvitnutie je kritickým krokom v živote rastliny a preto je dôležité jeho správne načasovanie. Na iniciáciu kvitnutia majú vplyv podmienky vonkajšieho prostredia (dĺžka dňa, teplota), ale dôležitú úlohu zohráva aj fyziologický stav rastliny. Tento proces a jeho načasovanie má vplyv na reprodukčný úspech. Príprava nových kultivarov kultúrnych plodín prispôbených k podmienkam vonkajšieho prostredia v danej oblasti je jedna z možností zvýšenia výnosu. Výskum v oblasti kvitnutia prechádza z modelových rastlín na významné hospodárske plodiny ako sú napríklad pšenica, jačmeň či ryža.

Na procese kvitnutia sa podieľajú viaceré gény, ktoré spolu navzájom interagujú, a preto je dôležité štúdium týchto génov na molekulárnej úrovni vrátane ich regulácie. Hlavnými dráhami za kvitnutie u obilnín je vernalizačná dráha, ktorá je tvorená vernalizačnými génmi (*VRN*) a fotoperiodická dráha tvorená fotoperiodickými génmi (*Ppd*). Boli definované aj gény rannosti (*earliness per se*), ktoré sú dôležité na jemné doladenie času kvitnutia po splnení vernalizačného a fotoperiodického nároku. V neposlednom rade sa na iniciácii kvitnutia podieľajú rastlinné hormóny, konkrétne kyselina giberlínová, a tzv. clock gény v rámci cirkadiálneho cyklu. Kvitnutie je intenzívne študované na modelovej dvojkľúčnolistovej rastline *Arabidopsis thaliana* a tieto výsledky sú aplikované aj na iné rastlinné druhy. V posledných rokoch je tento dôležitý proces študovaný na ryži, ktorá patrí medzi jednokľúčnolistové rastliny rovnako ako pšenica a jačmeň. V samotnej stratégii kvitnutia sú však odlišné. Ryža je krátkodenná rastlina bez potreby vernalizácie, zatiaľ čo pšenica a jačmeň (rovnako aj *A. thaliana*) sú dlhodenné rastliny, u ktorých je kvitnutie regulované aj vernalizáciou. Napriek týmto rozdielom je celá rada ortológnych génov zapojených do rovnakých dráh kvitnutia u *A. thaliana*, ryže, kukurice, jačmeňa a pšenice (Kikuchi *et* Handa, 2009).

Neustále sú identifikované nové gény, ktoré ovplyvňujú dôležité agronomické a morfológické znaky, a taktiež znaky pre výnos. Vzhľadom k meniacim sa klimatickým podmienkam v miernom pásme je potrebné štúdium týchto génov, identifikácia alieli a príprava nových kultivarov, ktoré budú týmto podmienkam prispôbené a nebude tak ohrozený ich výnos. S vyvíjajúcimi sa technológiami, ako je napríklad vývoj molekulárnych markerov (marker-assisted selection, MAS), charakterizácia kvantitatívnych znakov (quantitative trait locus, QTL), editácia génov a viac dostupné sekvenovanie celých genómov, sa šľachtiteľský proces urýchľuje a zjednodušuje.

3.2 *Arabidopsis thaliana*

Vplyv rôznych genetických, epigenetických a environmentálnych faktorov na prechod z vegetatívnej do reprodukčnej fázy je intenzívne študovaný na modelovej rastline *A. thaliana*. Za modelový organizmus bola vybraná najmä vďaka jej krátkemu životnému cyklu a malému genómu, ktorý je osekvenovaný a anotovaný. *A. thaliana* je kozmopolitná rastlina, ktorá sa radí do čeľade kapustovité (*Brassicaceae*). Genóm *A.thaliana* (157 Mb) s nízkym počtom repetitívnych sekvencií

je rozdelený do piatich chromozómov a kóduje 27 000 génov (Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Cheng *et al.*, 2017).

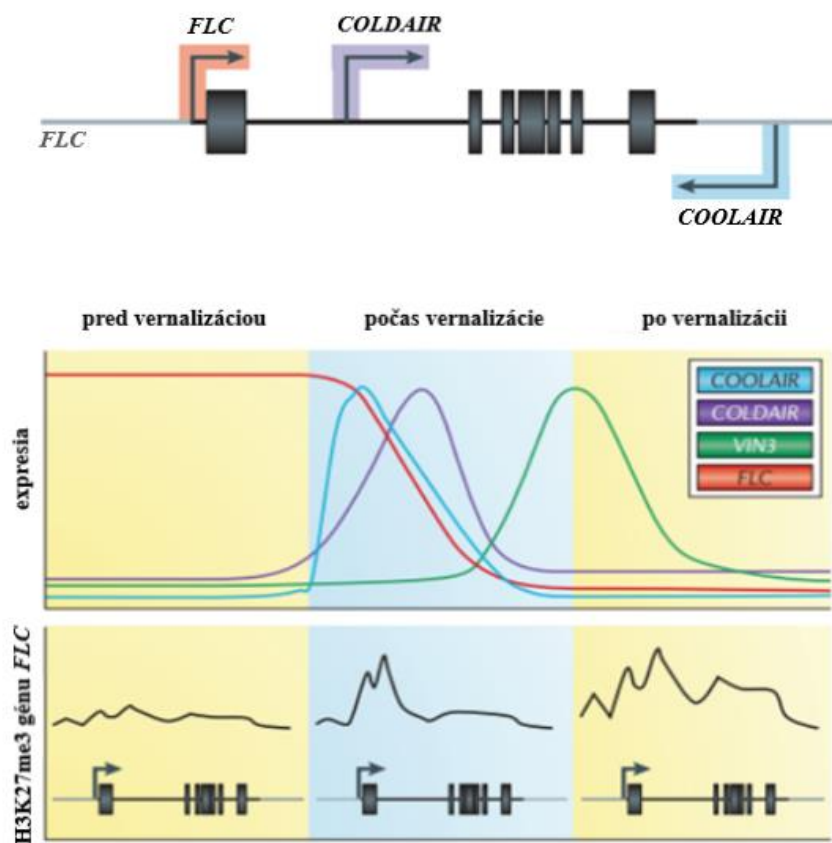
3.2.1 Vernalizačná dráha

Vernalizácia je proces dlhodobého vystavenia rastliny nízkym teplotám, vďaka ktorému prechádza rastlina z vegetatívnej do reprodukčnej fázy. Je to veľmi dôležitý proces pre adaptáciu niektorých rastlín na nepriaznivé podmienky. Kľúčové gény, ktoré zabraňujú vykvitnutiu pred pôsobením nepriaznivého obdobia u *A. thaliana* sú *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Michaels *et Amasino*, 1999) a *FRIGIDA (FRI)*. Naopak medzi hlavné aktivátory kvitnutia patria *FLOWERING LOCUS T (FT)* a *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*; Searle *et al.*, 2006).

Gén *FRI* je lokalizovaný na štvrtom chromozóme a kóduje proteín, ktorý obsahuje dve tzv. coiled-coil domény, vďaka ktorým pravdepodobne interaguje so štruktúrou chromatinu génu *FLC* a aktivuje jeho expresiu (Johanson *et al.*, 2000). Bolo zistené, že dominantná alela oddiaľuje kvitnutie a stojí za vernalizačným nárokom, zatiaľ čo prítomnosť recesívnej alely vedie ku skoršiemu kvitnutiu. V prípade recesívnej alely *fri* došlo k zámene báz a predčasnemu zaradeniu stop kodónu, čo má za následok vznik nefunkčného proteínu (Gazzani *et al.*, 2003).

Gén *FLC* je lokalizovaný na piatom chromozóme a kóduje MADS-box transkripčný faktor. *FLC* je považovaný za hlavný represor kvitnutia, keďže mutantné rastliny (*flc*) kvitnú oveľa skôr (Michaels *et Amasino*, 1999). Kóduje proteín, ktorý sa viaže priamo do regulačnej oblasti génov *FT* a *SOC1*, a zabraňuje ich expresii (Searle *et al.*, 2006). Expresia génu *FLC* sa znižuje pôsobením chladu v procese vernalizácie. Z toho vyplýva, že gén *FLC* je pozitívne regulovaný *FRI* a negatívne vernalizáciou (Lee *et al.*, 1994). Alelické varianty *FLC* majú vplyv na potrebnú dĺžku expozície voči nízkym teplotám (Shindo *et al.*, 2006). Napríklad Gazzani *et al.* (2003) identifikovali viacero jednonukleotidových polymorfizmov (SNP), inzerciu o veľkosti 30 bp a prítomnosť neautonómneho transponovateľného elementu *Mutator*-like v prvom intróne génu *FLC*.

Počas vernalizačného procesu je expresia *FLC* potlačená prostredníctvom nekódujúcej RNA nazvanej COOLAIR a COOLDAIR. Počiatok ich transkripcie je lokalizovaný priamo v géne *FLC*, pričom COOLAIR je transkribovaná z promotora na konci génu *FLC* a COOLDAIR z prvého intrónu. Represia tohto génu je taktiež spojená so zmenami na úrovni chromatinu (epigenetická regulácia). Pôvodný metylačný stav sa obnovuje počas rannej embryogenézy, a preto je vernalizácia nutná v každej generácii. Pred pôsobením chladu je gén *FLC* exprimovaný vo vysokej miere, čo je spojené s aktívnym stavom chromatinu, konkrétne je lyzín 4 na históne 3 trimetylovaný (H3K4me3). Pôsobením chladu je *FLC* reprimovaný, čo súvisí s trimetyláciou lyzínu 27 na históne 3 (H3K27me3) prostredníctvom Polycomb repressive complex 2 (PRC2; Heo *et Sung*, 2011). Počas vernalizácie dochádza k expresii génu *VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3)*, ktorý interaguje s PRC2. Na konci chladného obdobia sa expresia *VIN3* znova znižuje (Obrázok 1; Sung *et Amasino*, 2004).



Obrázok 1: Potlačenie transkripce hlavného represora kvitnutia u *A. thaliana*, génu *FLC*, pomocou nekódujúcich RNA (COLDAIR a COOLAIR) počas vernalizácie. Pred začiatkom vernalizácie je gén *FLC* transkribovaný. Na začiatku vernalizácie je aktivovaná transkripcia antisense COOLAIR nekódujúcej RNA z promotora na konci génu *FLC*. Dosiahnutie vrcholu expresie COOLAIR koreluje so znížením hladiny transkriptov *FLC*. Následne dochádza k transkripcii sense COLDAIR nekódujúcej RNA z oblasti prvého intrónu génu *FLC*, ktorá udržuje nízku hladinu *FLC* po vernalizácii. Transkripcia *FLC* je taktiež potlačená pomocou PRC2, ktorý spôsobuje H3K27me3 najskôr oblasti promotora a prvého exónu. Počas vernalizácie dochádza postupne k H3K27me3 prvého intrónu a po vernalizácii celého génu. Postupnou akumuláciou COLDAIR sa zvyšuje expresia *VIN3*. Na konci chladného obdobia sa expresia *VIN3* znižuje. Prevzaté a upravené podľa Andrés *et Coupland*, 2012.

3.2.2 Fotoperiodická dráha

Rôzne zemepisné šírky a nadmorské výšky sú charakteristické odlišnou dĺžkou dňa (fotoperiódou), ktorá sa mení počas celého roka a je dôležitá aj pre správne načasovanie kvitnutia a reprodukcie. *A. thaliana*, ktorá patrí medzi dlhodenné rastliny.

Hlavnú úlohu vo fotoperiodickej dráhe zohrávajú u *A. thaliana* gény *GIGANTEA (GI)*, *FLAVIN KELCH F BOX 1 (FKF1)*, *CONSTANS (CO)* a *FT*. Tieto gény sú exprimované v listoch a signál do vrcholového meristému je prenášaný cez floém mobilným proteínom, ktorý je kódovaný *FT* a dostal prívlastok florigén. Vďaka tomu je prenesený fotoperiodický signál z listov do miesta tvorby kvetov (Turck *et al.*, 2008). K tomuto prenosu je potrebná interakcia medzi *FT* a membránovým proteínom endoplazmatického retikula *FT-INTERACTING PROTEIN1 (FTIP1)*; Liu *et al.*, 2012). Expresia *FT* je závislá na prítomnosti *CO*, ktorý kóduje transkripčný regulátor zinkového prstu s dvomi tandemovými B boxami na N-konci a konzervovanou CTT doménou na C-konci. *CO* pravdepodobne aktivuje transkripciu *FT* priamo, prostredníctvom interakcie s promotorom (Robson *et al.*, 2001). Vďaka

transkripčnej a posttranslačnej regulácii expresie *CO* je zabezpečené, že expresia *FT* môže byť aktivovaná len pri dlhom dni.

Na transkripčnej úrovni je *CO* regulovaný svetlom a cirkadiánnymi hodinami. Cirkadiánne hodiny predstavujú endogénny mechanizmus, ktorý meria trvanie dĺžky dňa a noci a reguluje transkripciu viacerých rastlinných génov, vďaka čomu sa môžu adaptovať na denné a sezónne zmeny vonkajšieho prostredia (Müller *et al.*, 2014). Medzi komponenty cirkadiánnych hodín patrí *GI* a ubikvitín ligáza *FKF1*, ktorá vníma svetlo prostredníctvom chromoforu pri dlhom dni. *GI* a *FKF1* spolu navzájom interagujú a následne aktivujú transkripciu *CO* prostredníctvom degradácie transkripčných represorov, tzv. *CYCLING DOF FACTORS* (*CDFs*) (Sawa *et al.*, 2007).

Regulácia expresie *CO* na posttranslačnej úrovni je sprostredkovaná ubikvitín ligázovým komplexom, ktorý pozostáva z *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1* (*COP1*) a *SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A* (*SPA1*). Ubikvitinylovaný *CO* je degradovaný 26S proteázom počas tmy, pretože spomínaný komplex je inhibovaný svetlom (Jang *et al.*, 2008; Laubinger *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008). Na inhibícii katalytickej aktivity komplexu *COP1-SPA1* sa podieľajú fotoreceptory Fytochróm A (*PhyA*; receptor pre vnímanie červeného svetla) a Cryptochróm 2 (*Cry2*; receptor pre vnímanie modrého svetla). Aktivovaný *Cry2* vytvára komplex s *SPA1* a následne sa tento komplex pripája na *COP1*, čím je inhibovaný (Briggs *et Olney*, 2001; Zuo *et al.*, 2011). V tme, keď nie sú fotoreceptory aktívne, je *CO* degradovaný prostredníctvom *COP1-SPA1*. Ráno je proteín *CO* degradovaný ďalšou ubikvitín ligázou *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE 1* (*HOS1*) a poobede je stabilizovaný prostredníctvom *FKF1*, ktorý vníma modré svetlo prostredníctvom chromoforu (Lazaro *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012). Z toho vyplýva, že maximum *CO* mRNA, ktoré sa nahromadilo v prítomnosti svetla vďaka degradácii represoru *CDF* prostredníctvom *GI-FKF1*, je na konci dlhého dňa a vedie k akumulácii proteínu *CO*.

FT následne prenáša signál z listov do apikálneho meristému, kde interaguje s transkripčným faktorom *FLOWERING LOCUS D* (*FD*; Corbesier *et al.*, 2007). Tento proteín-proteínový komplex (*FT-FD*) následne aktivuje expresiu *SQUAMOSA BINDING PROTEIN LIKE* (*SPL*), ktorý kóduje transkripčné faktory hrajúce dôležitú úlohu v rozvoji kvetu (Wang *et al.*, 2009). Zvýšená hladina *SPL* následne umožňuje expresiu MADS-box transkripčných faktorov *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*), *FRUITFULL* (*FUL*), a *APETALA1* (*API*; Lee *et al.*, 2008). Inaktiváciou *SOC1* a *FUL* bolo potlačené skoršie vykvitnutie, ktoré bolo iniciované nadmernou expresiou *FT* z heterológnych promotorov. Z toho vyplýva, že *SOC1* a *FUL* sú nevyhnutné pre indukciu kvitnutia sprostredkovanú cez *FT* (Torti *et al.*, 2012). *SOC1* potom interaguje s *AGAMOUS LIKE24* (*AGL24*), ktorý taktiež patrí do rodiny MADS-box transkripčných faktorov a spoločne kontrolujú expresiu *LEAFY* (*LFY*; Lee *et al.*, 2008). Tento gén je taktiež zapojený do procesu iniciácie kvitnutia. Dôležitou súčasťou tejto kaskády je taktiež *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*), ktorý antagonizuje účinok *API* a *LFY*, a tým preventívne zabraňuje ich ektopickej expresii vo vrcholovom meristeme (Hanano *et Goto*, 2011).

3.3 Jačmeň siaty (*Hordeum vulgare* L.)

Do čeľade lipnicovitých (*Poaceae*) patrí veľké množstvo poľnohospodársky významných druhov, ako pšenica (*Triticum aestivum* L.), ryža (*Oryza sativa* L.) či kukurica (*Zea mays* L.). Domestikovaný jačmeň (*Hordeum vulgare* L.) je taktiež klasifikovaný do tejto čeľade a predstavuje štvrtú najdôležitejšiu obilninu s celosvetovou produkciou viac ako 140 miliónov ton ročne (FAO statistics).

Z miesta pôvodu, oblasti Úrodného polmesiaca na Blízkom Východe, sa jačmeň rozšíril do celého sveta. Za týmto rozšírením stojí pravdepodobne jeho vysoká genetická variabilita, ktorá viedla k vzniku rôznych kultivarov odolnejších voči chladu, suchu, salinite či zásaditosti pôdy.

Jačmeň je veľmi dôležitou súčasťou našej potravy. Taktiež je nenahraditeľnou zložkou pivovarníckeho a liehovarského priemyslu a v živočíšnej výrobe slúži ako krmivo. Obsahuje látky, ktoré majú priaznivý vplyv na ľudské zdravie, ako napríklad β -glukány, ktoré znižujú hladinu cholesterolu v krvi a glykemický index (Behall *et al.*, 2004). Okrem toho je zdrojom tokoferolov a tokotrienolov, ktoré majú antioxidantný účinok, a taktiež znižujú hladinu LDL cholesterolu (Qureshi *et al.*, 1991). Endosperm zrna je dôležitým prirodzeným úložiskom proteínov, a preto sa nedávno začal využívať ako bioreaktor pre výrobu ľudských terapeutických proteínov alebo vakcín pre zvieratá. Takýmto spôsobom bola pripravená monoklonálna protilátka 2G12 proti vírusu ľudskej imunitnej nedostatočnosti (Human Immunodeficiency Virus, HIV; Hensel *et al.*, 2015) alebo rekombinantný kompletný kolagén typu I alfa1 (Eskelin *et al.*, 2009). V endosperme jačmenných zŕn sa na Islande pri kontrolovaných podmienkach vyrábajú rekombinantné proteíny pre kozmetický priemysel (Erlendsson *et al.*, 2010).

Genóm jačmeňa je v diploidnom stave tvorený 14 chromozómami. Veľkosť genómu v haploidnom stave je 5,1 Gb a kóduje približne 26 000 génov. Mobilné elementy a iné repetitívne sekvencie tvoria až 84 % genómu jačmeňa (International Barley Genome Sequencing Consortium *et al.*, 2012). Znalosť úplnej genómovej sekvencie je nevyhnutná pre pochopenie prirodzenej genetickej variability a umožňuje vývoj moderných stratégií pre šľachtiteľské programy (Langridge *et al.*, 2012).

3.3.1 Vernalizačná dráha u pšenice a jačmeňa

Odrody, ktoré sú pestované v severných oblastiach alebo vyšších nadmorských výškach, musia odolávať dlhým chladným obdobiam, a naopak odrody pestované v južných oblastiach sú vystavené horúcemu a suchému počasiu. Vďaka vernalizácii sú citlivé kvetné meristémy chránené voči pôsobeniu nízkych teplôt počas zimy. Na základe požiadaviek na vernalizáciu rozdeľujeme odrody pšenice a jačmeňa na jarný (jarina), fakultatívny a ozimný (ozimina) typ. Jarný typ nie je odolný voči pôsobeniu nízkych teplôt, nie je citlivý na fotoperiódou a nemá vernalizačný nárok. Ozimný typ je odolný voči pôsobeniu nízkych teplôt, je citlivý na fotoperiódou a má vernalizačný nárok. Oziminy sú vysádzané na jeseň a v zime u nich pôsobením nízkych teplôt prebehne vernalizačný proces, ktorý je potrebný k tomu, aby rastlina vykvitla. Jariny je možné vysádzať na jar, rovnako tak na jeseň (platí pre oblasti

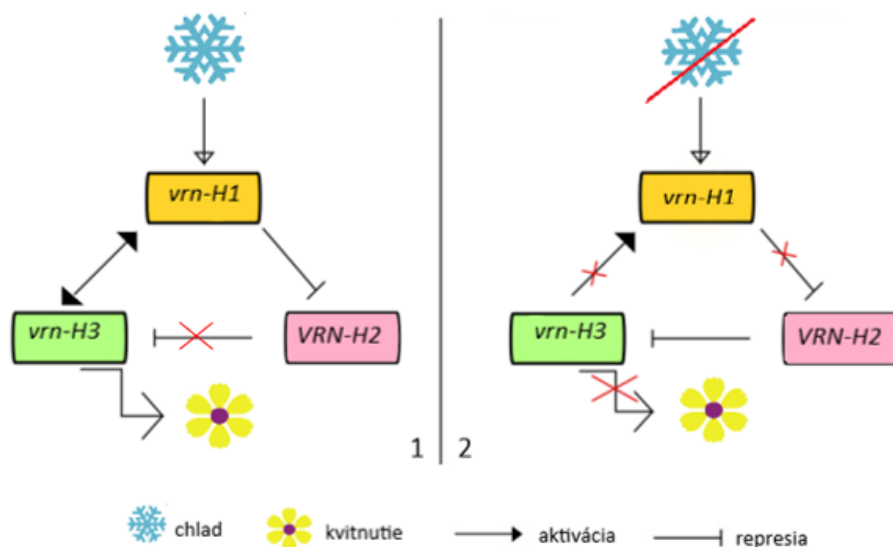
s miernymi zimami) a v ten istý rok žať. Fakultatívny typ je podobný ozimnému typu. Fakultatívne kultivary sú taktiež odolné voči pôsobeniu nízkych teplôt ako v prípade ozimného typu, ale nemajú vernalizačný nárok.

Proces vernalizácie je dobre popísaný na modelovej rastline *A. thaliana* (Henderson *et al.*, 2003), na rozdiel od *Triticeae*, do ktorého patria dôležité hospodárske plodiny, ako jačmeň či pšenica. Kmeň *Triticeae* predstavuje homogénny genetický systém s vysokým stupňom synténie. Tým pádom je možné aplikovať poznatky o génoch zapojených do procesu vernalizácie získané štúdiom jedného druhu na iné druhy v rámci tohto kmeňa (Dubcovsky *et al.*, 1998).

Vernalizačný proces je u obilnín regulovaný tromi hlavnými génmi *VRN1*, *VRN2* a *VRN3*. Na základe ortolológie pšeničných a jačmenných génov sa používa nomenklatúra s „*H*“, ktorá odkazuje na rod *Hordeum*: *Sh2* = *VRN-H1*; *Sh* = *VRN-H2* a *Sh3* = *VRN-H3*. Jarňý typ je charakterizovaný dominantnými génmi *VRN-H1* a *VRN-H3*, a recesívnym *vrn-H2*. Naopak zimný typ je charakterizovaný alelickou konštitúciou *vrn-H1*, *vrn-H3* a *VRN-H2*. Alelické varianty génu *VRN-H3* boli popísané len u exotických odrôd jačmeňa (Takahashi *et al.*, 1971, Yan *et al.*, 2006). Tým pádom je vernalizačný proces vo všeobecnosti regulovaný najmä alelickými variantmi v génoch *VRN-H1* a *VRN-H2* (Obrázok 2).

V rámci *VRN2/VRN1* epistatickej interakcie u obilnín kóduje *VRN2* dominantný represor kvitnutia (expresia je potlačená vernalizáciou), ktorý potláča expresiu *vrn1*. Mutácie v géne *VRN2* spôsobujú vznik nefunkčného represoru. Platí teda, že kultivary, ktoré obsahujú recesívnu alelu *vrn-2* bez ohľadu na alelickú konštitúciu génu *VRN1*, nie sú citlivé voči vernalizácii. Kultivary, ktoré obsahujú dominantné gény *VRN2* a *VRN1* sú spojené s minimálnym vernalizačným nárokom (absencia väzbového miesta pre represor v promotorovej oblasti alebo v prvom intróne). Tento model je podporený rozsiahlymi fenotypickými štúdiami získanými z kríženia ozimného typu (vernalizačný nárok) s jarňým alebo fakultatívnym typom (bez vernalizačného nároku). Klonovanie troch hlavných génov vernalizačného procesu, *VRN1* (Danyluk *et al.*, 2003; Trevaskis *et al.*, 2003), *VRN2* (Liuling Yan *et al.*, 2004) a *VRN3* (Yan *et al.*, 2006) a charakterizácia ich prirodzene sa vyskytujúcich alelických variant predstavuje veľmi dôležitý prvý krok k pochopeniu vernalizácie u *Triticeae*. Zmena v expresii niektorého z génov vernalizačnej dráhy má za následok moduláciu transkripčného profilu ostatných génov, čo sa prejaví v zmene doby kvitnutia.

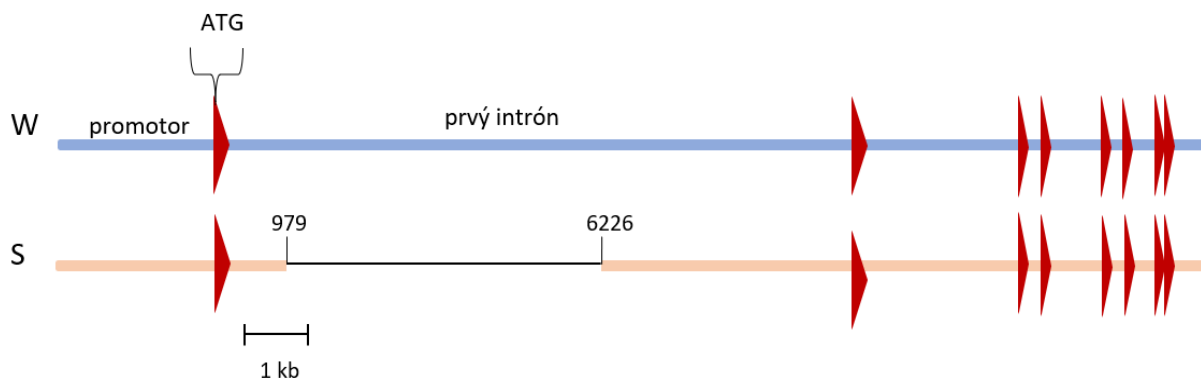
Genotypy pšenice s vernalizačným nárokom vyžadujú vystavenie nízkym teplotám (4–6 °C) po dobu 4–6 týždňov a nevykvitnú pokiaľ u nich vernalizácia neprebehne kompletne, zatiaľ čo nevernalizovaný jačmeň s vernalizačným nárokom môže vykvetnúť v nepriaznivých podmienkach, čo nemusí byť výhodné z agronomického hľadiska (Cockram *et al.*, 2007).



Obrázok 2: Schematické znázornenie funkcie génov vernalizačnej dráhy u ozimného typu jačmeňa. (1) Pôsobením chladu počas zimy (vernalizácia) je indukovaná expresia génu *vrn-H1*, ktorý znižuje expresiu *VRN-H2*. Vďaka tomu je exprimovaný gén *vrn-H3*, ktorý kóduje tzv. florigén, ktorý prenáša signál do apexu a podporuje expresiu génu *vrn-H1*. Vďaka tomu je splnený vernalizačný nárok a dochádza k vykvitnutiu. (2) Pred pôsobením chladu nie je exprimovaný *vrn-H1*. Tým pádom vysoká hladina *VRN-H2* blokuje expresiu *vrn-H3* a nedochádza k vykvitnutiu pred zimou.

Gén *VRN1*

Kľúčovým génom, ktorý reguluje dobu kvitnutia u *Triticeae* je gén *VRN1*. Klonovanie *VRN-A^{m1}* (Yan *et al.*, 2003) a *VRN-A^{m2}* (Liuling Yan *et al.*, 2004) v diploidnej pšenici *Triticum monococcum* L. umožnilo charakterizovať kandidátne gény *VRN-H1* a *VRN-H2* u jačmeňa. Gén *VRN1* kóduje u pšenice aj jačmeňa MADS-box transkripčný faktor. Jedná sa o homológny gén s génmi *API*, *FUL* a *CAULIFLOWER (CAL)* u *A. thaliana*. U pšenice sa gény *VRN1* nachádzajú na dlhých ramenách chromozómu 5A (*VRN-A1*), 5B (*VRN-B1*) a 5D (*VRN-D1*). U jačmeňa je ortológ tohto génu taktiež lokalizovaný v rámci rovnakého regiónu na chromozóme 5H (Dubcovsky *et al.*, 1998; Laurie *et al.*, 1995). Vysoká expresia génu *VRN1* je nevyhnutná pre prechod z vegetatívnej do reprodukčnej fázy, a preto je tento gén označovaný aj ako iniciátor kvitnutia. Dominantná forma *VRN1* je spojená s jarným rastovým typom, úroveň jeho expresie je vysoká, a preto nie je potrebné pôsobenie chladu. Naopak, u ozimných kultivarov, ktoré majú recesívnu alelu *vrn1*, je jeho expresia indukovaná až pôsobením chladu. Bolo zistené, že recesívna alela *vrn1* je pôvodná, intaktná. Každopádne variabilita vo vernalizačnom nároku nie je spôsobená rozdielmi v kódujúcich oblastiach. Nedochádza k žiadnym posunom v rámci čítacieho rámca, predčasnému zaradeniu stop kodónov či nesynonymným mutáciám, a to ani u jačmeňa, ani u pšenice (von Zitzewitz *et al.*, 2005). Naopak, mutácie v promotorovej oblasti či v oblasti prvého intrónu génu *VRN1*, sú zodpovedné za vznik dominantného *VRN1*, a tým pádom stratu vernalizačného nároku (Obrázok 3; Danyluk *et al.*, 2003; von Zitzewitz *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2003).

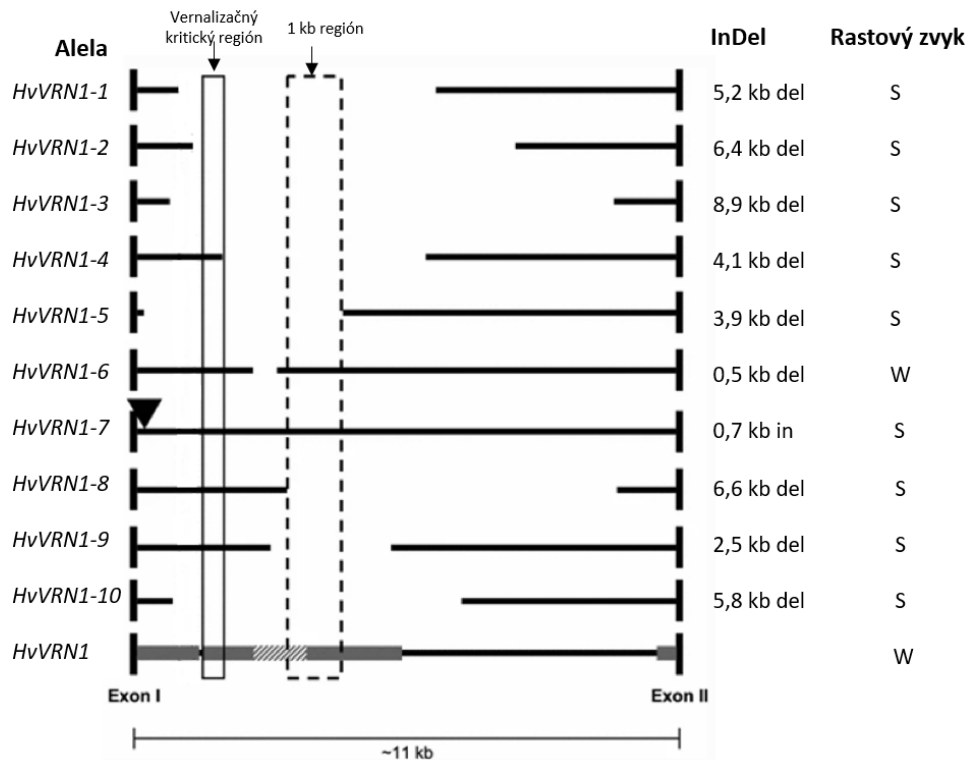


Obrázok 3: Schematické znázornenie recesívnej alely *vrn-H1* u ozimných kultivarov a dominantnej *VRN-H1* u jarných kultivarov s deléciou v rámci prvého intrónu. Gén *VRN-H1* je u ozimných kultivarov dlhý približne 17 kb, má 8 exónov a prvý intrón je dlhý približne 11 kb. Schéma bolo vytvorené na základe alignmentu génu *VRN-H1* ozimného kultiveru Strider (AY750993.1) a jarného kultivaru Morex (AY750995.1) Jarné kultivary majú deléciu v rámci prvého intrónu, pričom u kultivaru Morex má táto delécia veľkosť približne 5 kb. Exóny sú znázornené ako červené šípky, medzi nimi sa nachádzajú intróny, promotor je pred prvým exónom, delécia v rámci prvého intrónu u dominantnej jarnej alely je zobrazená ako čierna čiara. W – ozimina, S – jarina, ATG – štart kodón.

Skúmanie zárodočnej plazmy jačmeňa viedlo k charakterizácii jedenástich alieli génu *VRN-H1* (Obrázok 4). Konkrétne sa jedná o alely: *HvVRN1*, *HvVRN1-1*, *HvVRN1-2*, *HvVRN1-3*, *HvVRN1-4*, *HvVRN1-5*, *HvVRN1-6*, *HvVRN1-7*, *HvVRN1-8*, *HvVRN1-9*, *HvVRN1-10* (Cockram *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2005; Hemming *et al.*, 2009; Szűcs *et al.*, 2007, p. 1; von Zitzewitz *et al.*, 2005). Oziminy sú nositeľmi buď alely *HvVRN1* alebo *HvVRN1-6* a zvyšné alely sú spojené s jarným fenotypom. Ozimné alely sa medzi sebou líšia deléciou o veľkosti 486 bp, ktorá sa nachádza v mieste výskytu retrotranspozónu *Lolaog*. Nositeľom tejto delécie je alela *HvVRN1-6* (Cockram *et al.*, 2009).

Porovnaním sekvencie viacerých kultivarov pšenice a jačmeňa bola determinovaná 2,8 kb veľká oblasť v rámci prvého intrónu, ktorá sa nachádza u všetkých ozimných kultivarov. Z tejto oblasti je prvých 440 bp u pšenice a 436 bp u jačmeňa najviac konzervovaných medzi všetkými kultivarmi. Jedná sa o tzv. vernalizačný kritický región, ktorý je typický pre ozimné kultivary, zatiaľ čo jariny majú v tomto mieste deléciu (Fu *et al.*, 2005; von Zitzewitz *et al.*, 2005).

V rámci tejto 2,8 kb oblasti sa nachádza 1 kb región, ktorý je deletovaný vo všetkých jarných kultivároch. Táto oblasť ale nezahŕňa vernalizačný kritický región. Predpokladá sa, že oblasť zodpovedná za vernalizačný nárok u obilnín je oveľa väčšia a nie je reprezentovaná vernalizačným kritickým regiónom. V rámci tejto 1kb oblasti sa vyskytuje veľké množstvo domnelých regulačných motívov spojených s represiou *VRN-H1*, a taktiež krátkych oblastí bohatých na AT, tzv. *scaVold*/matrix attachment region (*S/MAR*). *S/MAR* zohrávajú úlohu v štruktúre chromatinu, a tým pádom aj v regulácii transkripcie prostredníctvom chromatinovej slučky (Hemming *et al.*, 2009). U *A. thaliana* znižujú oblasti *S/MAR* transkripciu viacerých génov (napríklad *FUL*), ktorých sú súčasťou, a preto môžu zohrávať rovnakú úlohu aj v prípade regulácie transkripcie *VRN-H1* u ozimných kultivarov (Hemming *et al.*, 2009; Rudd *et al.*, 2004; Tetko *et al.*, 2006).



Obrázok 4: Schematické znázornenie prvého intrónu u 11 aleli génu *VRN-H1*. Medzery predstavujú deletované oblasti intrónu vzhľadom k referenčnej sekvencii kultivaru Strider (AY750993.1). Veľkosť delécie u jednotlivých aleli je uvedená na pravej strane schémy rovnako ako rastový typ ktorý daná alela reprezentuje. Trojuholník predstavuje inzerciu v alele *HvVRN1-7*. Obdĺžnik s prerušovanou čiarou zobrazuje región o veľkosti 1 kb, ktorý je deletovaný u jarných kultivarov a je spojený s kvitnutím bez vernalizácie. Obdĺžnik s plnou čiarou vyznačuje oblasť o veľkosti 436 bp, ktorá reprezentuje tzv. vernalizačný kritický región. Konzervovaná oblasť (identita 79–91%) o veľkosti 2,8 kb medzi pšenicom a jačmeňom je vyznačená sivou farbou na alele *HvVRN1* a šrafovaná oblasť predstavuje retrotranspozón *Lolaog* o veľkosti 1,051 kb. S = jarina; W = ozimina; InDel = inzercia–delécia. Prevzaté a upravené podľa Hemming *et al.* (2009).

Gén *VRN2*

Gén *VRN2* je hlavným represorom kvitnutia a zohráva veľmi dôležitú úlohu vo vernalizačnej dráhe obilnín. Tento gén zatiaľ nemá jasný ortológ u *A.thaliana*, ale funkčne sa zhoduje s génom *FLC* (Yan *et al.*, 2004). Represorom kvitnutia u ryže je gén *Grain number, plant height et heading date 7 (Ghd7)*, ktorý je najbližším ortológom génu *VRN2* (Xue *et al.*, 2008). Gény *VRN2* sú u tetraploidnej pšenice lokalizované na chromozóme 5A a 5B (*VRN-A2* a *VRN-B2*) a u jačmeň na chromozóme 4H (Distelfeld *et al.*, 2009; Laurie *et al.*, 1995; Takahashi *et Yasuda*, 1971).

Jarný typ je spojený s nefunkčnou, recesívnou alelou *vrn2*. *VRN2* kóduje proteín, ktorý obsahuje na N-konci doménu zinkového prstu a CCT doménu (*CO*, *CO-like*, *TOC1*) na C-konci, ktorá je konzervovaná medzi rôznymi druhmi rastlín (Yan *et al.*, 2004). U jačmeňa existujú tri pevne viazané *ZCCT* gény vo *VRN-H2* lokuse (*ZCCT-Ha*, *ZCCT-Hb* a *ZCCT-Hc*) a dva u diploidnej pšenice (*ZCCT-1* a *ZCCT-2*). Alelické varianty tohto lokusu sú spojené s kompletnou deléciou a mutáciami, ktoré vedú k strate funkcie génu *VRN2* (Yan *et al.*, 2004). Bolo zistené, že u pšenice nesú jariny mutáciu v konzervovanej CCT doméne. V prípade jačmeňa dochádza u jarného typu k delícii všetkých troch *ZCCT-H* génov (*Ha*, *Hb* a *Hc*; Distelfeld *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2004). Expresia génu *VRN2* je potlačená

vernalizáciou a krátkym dňom u obilnín senzitívnych na fotoperiódou. Bolo zistené, že expresia *VRN2* je potlačená krátkym dňom (v prípade nízkych aj vyšších teplôt), ale zvýšenie expresie *VRN1* bolo zaznamenané až po niekoľkých týždňoch. Z toho vyplýva, že existuje ešte minimálne jeden ďalší represor *VRN1* (Dubcovsky *et al.*, 2006; Trevaskis *et al.*, 2006). Doména CCT vykazuje určitú podobnosť s HEME ACTIVATOR PROTEIN2 (HAP2) podjednotky u kvasiniek. Táto podjednotka je súčasťou komplexu HAP2/HAP3/HAP5 a viaže sa do oblasti CCAAT boxov v promotorovej oblasti mnohých eukaryotických génov a reguluje tak ich expresiu (Wenkel *et al.*, 2006).

Gén *VRN3*

Gén *VRN3* je prostredníkom medzi fotoperiodickou a vernalizačnou dráhou. Kóduje mobilný element (tzv. florigén), ktorý je z listov transportovaný floémom do apexu, kde aktivuje expresiu génu *VRN1*, a tým pádom sa podieľa na indukcii kvitnutia. Gén *FT* u *A.thaliana* je homológom ku génu *VRN3* (Li *et al.*, 2011, p. 2). Gény *VRN3* sú u pšenice lokalizované na chromozómoch 7A (*VRN-A3*), 7B (*VRN-B3*) a 7D (*VRN-D3*) a patria medzi RAF kinázové inhibítory (Bonnin *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2006). U jačmeňa je gén *VRN-H3* lokalizovaný na chromozóme 7H. Alely s vysokou hladinou expresie sú spojované s dominantným jarným typom (Yan *et al.*, 2006).

U pšenice aj jačmeňa sa *VRN3* viaže na promotor génu *VRN1*, a tak zvyšuje jeho expresiu. Pred vernalizáciou je expresia génu *VRN3* potlačená pôsobením *VRN2*. Tým je zabránené vykvitnutiu ozimín na jeseň a následnému poškodeniu rastlinných meristémov cez zimu. Pôsobením nízkych teplôt cez zimu dochádza k zvýšeniu expresie *VRN1* v listoch a potlačeniu expresie génu *VRN2*. Keďže produkty génu *VRN2* inhibujú transkripciu génu *VRN3*, tak ich potlačením môže byť gén *VRN3* exprimovaný. Produkt génu *VRN3* je transportovaný floémom do apexu, kde interaguje s FLOWERING LOCUS-D LIKE 2 (FDL2; Li *et Dubcovsky*, 2008). Tento proteínový komplex sa potom viaže do promotora génu *VRN1* a podporuje jeho expresiu, pokiaľ sa nezvýši nad kritickú hodnotu, ktorá je nevyhnutná k prechodu z vegetatívnej do reprodukčnej fázy (Chen *et Dubcovsky*, 2012; Dubcovsky *et al.*, 2006).

3.3.2 Fotoperiodická dráha u pšenice a jačmeňa

Fotoperiódou ovplyvňuje celý rad fyziologických procesov, ako sú kvitnutie, dormancia, klíčenie semien, opadanie listov či tuberizáciu. Na základe požiadaviek na fotoperiódou môžeme rastliny rozdeliť na rastliny citlivé a rastliny necitlivé na fotoperiódou. Rastliny necitlivé na fotoperiódou prechádzajú do reprodukčnej fázy v momente, ako príde na jar k otepleniu. Kvitnutie u nich nezávisí na dĺžke dňa, a patria sem napríklad zemiaky, či rajčiak. V prípade rastlín citlivých na fotoperiódou máme dlhodobé a krátkodobé rastliny. Dlhodobé rastliny potrebujú na indukciu kvitnutia dlhší čas, zvyčajne viac ako 12 hodín a fotoperiódou sa u nich označuje ako kritická dĺžka dňa. Medzi dlhodobé rastliny patrí napríklad modelová rastlina *A.thaliana* a obilniny – jačmeň a pšenica. Naopak, krátkodobé rastliny ako ryža či tabak kvitnú počas krátkeho dňa, ktorý je charakteristický pravidelným striedaním svetla

a tmy, pričom tmavá fáza musí byť dostatočne dlhá a neprerušovaná. Schopnosť rastlín reagovať na zmeny v dĺžke slnečného svitu sa nazýva fotoperiodizmus. Doba, počas ktorej sú rastliny vystavené ziareniu rámci 24 hodinového cyklu, sa označuje ako fotoperiód. Keďže sa jedná o dôležitý proces, tak je u rastlín precízne regulovaný celou sieťou génov, ktoré spolu navzájom interagujú a v konečnom kroku je signál prenášaný do vernalizačnej kaskády (Kikuchi *et al.*, 2009).

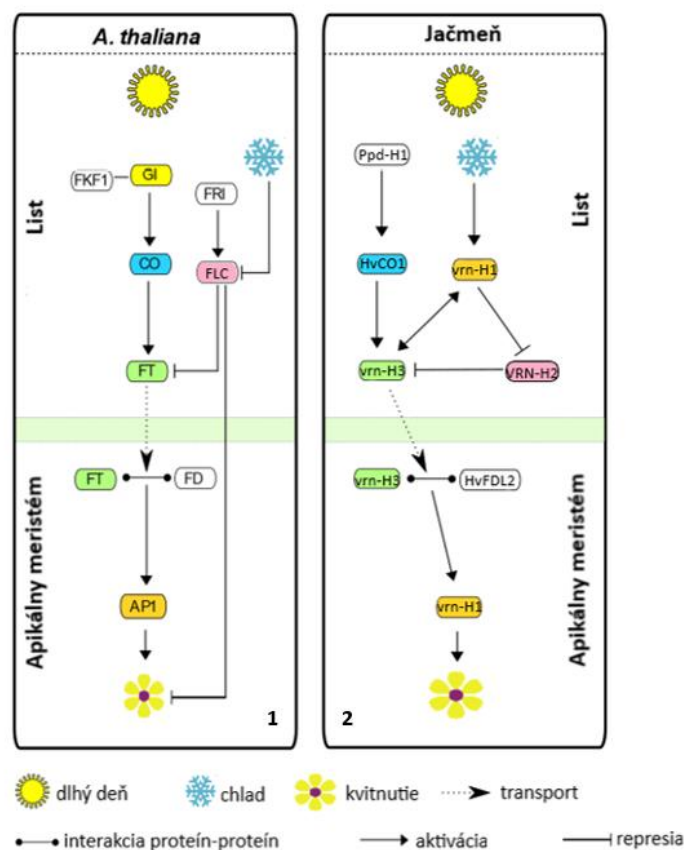
Dôležité gény, ktoré sú zapojené vo fotoperiodickej dráhe u *A.thaliana*, sú *CO*, *GI* a *FT* a homológy týchto génov je možné nájsť u pšenice a rovnako tak aj u jačmeňa (Obrázok 5; Nemoto *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2005). Gény *Ppd1* sa u pšenice nachádzajú na krátkom ramienku druhého chromozómu a sú prítomné vo všetkých troch subgenómoch a označené ako *Ppd-A1*, *Ppd-B1*, a *Ppd-D1*. U jačmeňa je gén *Ppd-H1* lokalizovaný taktiež na chromozóme 2H (Beales *et al.*, 2007; Turner *et al.*, 2005). Gén *TaCO1* je lokalizovaný na 7 chromozóme v subgenómoch B a D (*TaCO-B1*, *TaCO-D1*). V subgenóme A nebol zatiaľ *TaCO1* identifikovaný (Shaw *et al.*, 2012; Shimada *et al.*, 2009). Homológ *GI* bol identifikovaný u jačmeňa aj pšenice. *HvGI* je lokalizovaný na krátkom ramienku chromozómu 3H, ale podľa všetkého zohráva len minoritnú úlohu v správnom načasovaní kvitnutia na rozdiel od *A.thaliana* (Dunford *et al.*, 2005). Gény *Ppd* patria do pseudo-response-regulator (*PRR*) génovej rodiny a obsahujú taktiež CTT doménu, ktorá je zodpovedná za proteín-proteínové interakcie, napríklad s jednotlivými komponentami cirkadiálnych hodín. Gény *Ppd1* nemajú úlohu v mechanizme cirkadiálnych hodín, ale sú nimi regulované (Turner *et al.*, 2005). Taktiež boli popísané gény *Ppd-B2* na krátkom ramienku chromozómu 7 v subgenóme B a *Ppd-H2* u jačmeňa chromozóme 1H. *Ppd-H2* je exprimovaný v podmienkach krátkeho dňa (Faure *et al.*, 2007; Khlestkina *et al.*, 2009).

U jačmeňa je dominantná alela *Ppd-H1* senzitívna voči fotoperiód a stojí za skorším kvitnutím pri dlhom dni. Recessívna alela *ppd-H1* nie je citlivá voči fotoperiód a tieto rastliny budú kvitnúť v rovnakom čase, či sú pestované pri dlhom alebo krátkom dni. (Laurie *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 2005).

Fotoperiodická necitlivosť u pšenice je spôsobená výskytom indelov v promotorovej oblasti, ktoré narušujú väzobné miesto pre transkripčné faktory. Alela *Ppd-D1a* nesie 2089 bp veľkú deléciu v promotorovej oblasti (Beales *et al.*, 2007). Delécie o veľkosti 1027, 1117 a 1085 bp boli identifikované u alely *Ppd-A1a* u tetraploidnej aj hexaploidnej pšenice. Naopak, alela *Ppd-B1a.1* nesie 308 bp inzerciu (Nishida *et al.*, 2013b). Tieto štruktúrne zmeny sa nachádzajú v regióne o veľkosti 886 bp. V tejto oblasti bola popísaná prítomnosť *CCA1-HIKING EXPEDITION (CHE)* elementu, ktorý je spomínanými indelmi narušený. Efekt *CHE* ako represoru bol popísaný u *A.thaliana*, a preto sa predpokladá, že tento región zohráva dôležitú úlohu aj v represii *Ppd1* (Nishida *et al.*, 2013b; Pruneda-Paz *et al.*, 2009).

TaCO1 vykazuje homológiu s génom *CO* u *A. thaliana* a vykazuje rovnaký expresný profil u pšenice s maximom expresie približne 16 hodín po úsvite pri dlhom aj krátkom dni (Shaw *et al.*, 2012; Shimada *et al.*, 2009). Proteín *Ppd1* ovplyvňuje expresiu *VRN3* prostredníctvom stabilizácie proteínu *TaCO*. *Ppd* má teda opačný efekt na expresiu *VRN3* ako *VRN2*. CCT domény *Ppd1* a *VRN2* interagujú s komplexom nukleárneho faktoru-Y (NF-Y). Pred vernalizáciou je *VRN2* exprimovaný a tvorí komplex

s NF-Y. Tým pádom je CO degradovaný, *VRN3* nie je exprimovaný a rastlina tak nekvitne. Počas zimy sa expresia *VRN1* zvyšuje a potláča expresiu *VRN2*. Pri dostatočnej dĺžke dňa *Ppd1* stabilizuje proteín CO tvorbou komplexu CO-NF-Y. CO potom následne pozitívne ovplyvňuje expresiu *VRN3* a podieľa sa na indukcii kvitnutia pri podmienkach dlhého dňa (Chen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011). Expresia *Ppd1* je regulovaná taktiež pomocou cirkadiálneho komplexu. U *A.thaliana* tvorí *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)*, *LUX ARRHYTHMO (LUX)* a *EARLY FLOWERING 4 (ELF4)* tzv. nočný komplex, ktorý bráni expresii viacerých génov počas noci (Helfer *et al.*, 2011). Bolo zistené, že *EARLY MATURITY8 (EAM8)* je ortológom génu *ELF3* (Faure *et al.*, 2012) a *EARLY MATURITY10* je ortológom génu *LUX* u jačmeňa (Campoli *et al.*, 2013). Mutácie v týchto dvoch génoch vedú k nadmernej expresii *Ppd1* a rastliny sa tak stávajú necitlivé voči fotoperióde.



Obrázok 5: Schematické porovnanie kľúčových génov v rámci fotoperiodickej a vernalizačnej dráhy u *A. thaliana* a jačmeňa. U jačmeňa a *A.thaliana* je kvitnutie indukované v podmienkach dlhého dňa a pôsobením chladu (vernalizácia). Interakcie medzi jednotlivými génmi sú znázornené na obrázku. (1) U *A. thaliana* je indukovaná expresia *CO* pomocou *GI* a *FKF1*, ktoré spolu interagujú. *CO* následne aktivuje expresiu *FT* a proteín FT, tzv. florigén prenáša signál z listov do apikálneho meristému, kde interaguje s proteínom *FD*. Tento proteínový komplex iniciuje expresiu génu *API*, ktorý je hlavným aktivátorom kvitnutia. Represorom kvitnutia pred chladovým pôsobením je gén *FLC*, ktorého expresia je pravdepodobne aktivovaná *FRI*. Vernalizácia následne potláča expresiu *FLC* a tým pádom môžeme byť *FT* exprimovaný. (2) U ozimných kultivarov jačmeňa je dĺžka dňa meraná pomocou *Ppd-H1*. Pred zimou je kvitnutie potlačené vysokou úrovňou expresie *VRN-H2*, ktorý potláča expresiu *vrn-H3*. Vernalizáciou je aktivovaná expresia *vrn-H1*, ktorá následne reprimuje *VRN-H2*. Po vernalizácii a v podmienkach dlhého dňa je indukovaná expresia *HvCO1* a *vrn-H3*, ktorý prenáša signál do apikálneho meristému, kde interaguje s proteínom *HvFDL2* a aktivuje expresiu *vrn-H1*. Prevzaté a upravené podľa Milec *et al.*, 2014.

Dôležitú úlohu vo vývoji, morfológii a fyziológii rastlín zohráva svetlo, ktoré je vnímané prostredníctvom špecializovaných proteínov, tzv. fotoreceptorov. Medzi fotoreceptory patria už spomínané fytochrómy a kryptochrómy, ktoré obsahujú chromofory. Prostredníctvom chromoforov sú schopné vnímať svetlo a taktiež reagovať na špecifické vlnové dĺžky. Rastlina tak dokáže detekovať a reagovať na rôzne svetelné zmeny (intenzita, kvalita a dĺžka pôsobenia; Christie *et al.*, 2015).

U obilnín pôsobí červené svetlo prostredníctvom Fytochrómu C (PhyC) na reguláciu aktivity *Ppd1* a *VRN3*, a tým pádom aj kvitnutia. Prechod do reprodukčnej fázy je spojený so zvýšenou expresiou *Ppd1*, ktorý sa podieľa na aktivácii expresie *VRN3* v závislosti od svetla počas dlhého dňa vo vernalizovaných rastlinách jačmeňa či pšenice, a taktiež v kultivaroch, ktoré nevyžadujú vernalizáciu. Bolo dokázané, že v prípade nefunkčného PhyC u pšenice dochádza zmene expresie génov, ktoré sú súčasťou cirkadiánnych hodín a fotoperiodickej dráhy. To spôsobuje výrazné oneskorenie kvitnutia počas dlhých dní (Chen *et al.*, 2014). Dôležitá úloha PhyC bola taktiež popísaná u jačmeňa a *Brachypodium distachyon* (Nishida *et al.*, 2013a; Woods *et al.*, 2014).

3.3.3 Cirkadiánne hodiny

Cirkadiánne hodiny kontrolujú u *A. thaliana* procesy ako sú metabolizmus, rast, fotosyntéza a samotné načasovanie kvitnutia (Greenham *et McClung*, 2015). Ako už bolo spomínané, tak sa jedná o endogénny komplex regulujúci expresiu génov na základe striedania dňa a noci (Fogelmark *et Troein*, 2014). V prípade výnosu obilnín zohráva dôležitú úlohu teplota a fotoperiód. Vysoká teplota počas dlhého dňa znižuje samotný výnos a v prípade krátkych dní inhibuje reprodukčný vývoj obilnín. Kvôli predpokladaným globálnym zmenám, ktoré negatívne vplyvajú na výnos, je dôležité identifikovať gény zapojené v mechanizme kontroly kvitnutia v závislosti od teploty. Kandidátmi sú práve gény cirkadiánnych hodín, ktoré vnímajú a reagujú na teplotné signály reguláciou expresie génov (Hemming *et al.*, 2012).

Myb transkripčné faktory, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1)* a *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, ráno inhibujú expresiu *TIMING OF CAB EXPRESSION1 (TOC1/PRR1)*, ktoré zase naopak zabraňujú expresii *CCA1* a *LHY* počas noci u *A. thaliana* (Alabadí *et al.*, 2001). *CCA1* a *LHY* aktivujú expresiu *PRR7* a *PRR9*, ktoré spätnoväzobne znižujú ich expresiu (Nakamichi *et al.*, 2010). Súčasťou tejto regulácie je aj tzv. nočný komplex zahŕňajúci *ELF3*, *ELF4* a *LUX*. Gény nočného komplexu sú exprimované vďaka zníženiu hladiny *CCA* a *LHY* (Helfer *et al.*, 2011). Ďalšia podobná spätnoväzobná regulácia je popísaná u *GI* a *TOC1*, konkrétne *GI* aktivuje večer expresiu *TOC1*, ktorý naopak expresiu *GI* inhibuje (Pokhilko *et al.*, 2012). Cirkadiánne hodiny umožňujú expresiu *CO* počas dlhého dňa, reprimujú *CDF*, a tým pádom umožňujú kvitnutie prostredníctvom expresie samotného *FT* (Baudry *et al.*, 2010).

U obilnín je tento mechanizmus zatiaľ len slabo popísaný. Na základe homológie génov medzi *A. thaliana* však boli niektoré gény tejto kaskády u jačmeňa identifikované. Aj napriek nezávislým

duplikáciám génov, ktoré vznikli pri diverzifikácii jednoklíčnolistových a dvojklíčnolistových rastlín, je ich štruktúra a samotný mechanizmus regulácie veľmi podobný (Campoli *et al.*, 2012). Hlavný gén fotoperiodickej dráhy *Ppd-H1* je najbližším ortológom *PRR7* u *A. thaliana* (Turner *et al.*, 2005). U *A. thaliana* nebol pozorovaný výrazný efekt na samotné načasovanie kvitnutia spôsobený variáciami v génoch *PRR* (Ehrenreich *et al.*, 2009). U jačmeňa boli popísané mutácie spôsobujúce výrazne skoré kvitnutie nezávislé od dĺžky dňa prostredníctvom aktivácie expresie *VRN-H3*. Jedná sa o mutáciu *eam8* a *eam10* (Campoli *et al.*, 2013; Faure *et al.*, 2012; Zakhrabekova *et al.*, 2012). Spontánne a indukované mutácie *eam8* umožňujú adaptáciu obilnín na krátke vegetačné obdobie, ako v príde krajín Škandinávského polostrova a ich samotné rozšírenie (Lundqvist, 2009).

3.4 Funkčná genomika

Funkčná genomika je časť genomiky, ktorá sa venuje charakterizácii funkcie génov a ich vzájomných interakcií. Snaží sa vysvetliť súvislosť medzi DNA konkrétneho organizmu a hladinou určitých génov, transkriptov a ich proteínových produktov. Poskytuje tak komplexnejší obraz o jednotlivých biologických procesoch, ktoré prebiehajú na úrovni bunky, tkaniva a celého organizmu v súvislosti s molekulou DNA v rámci genómu daného organizmu. Hlavným cieľom je teda pochopenie vzájomného vzťahu medzi genómom určitého organizmu a jeho výsledným fenotypom. Existuje veľké množstvo techník a prístupov k odhaleniu funkcie génov. V rámci funkčnej genomiky rozlišujeme priamy (forward) a reverzný genetický prístup (Holtorf *et al.*, 2002)

Metódami priamej (forward) genetiky je možné skúmať nové gény a ich funkciu. Cieľom je odhaliť gény, ktoré sú zodpovedné za odlišný, väčšinou mutantný fenotyp v kontraste s fenotypom kontrolných rastlín. Na počiatku tohto prístupu stojí mutagenizovaná populácia či línia, ktorá vykazuje určitú fenotypovú variabilitu (Jankowicz-Cieslak *et al.*, 2015). V prípade zaujímavého fenotypu je potrebné zistiť, u ktorého génu došlo k mutácii a to následne potvrdiť metódami reverznej genetiky (Parinov *et al.*, 2000).

V rámci reverzného genetického prístupu neprebiehajú rozsiahle fenotypové testy, ale vychádza sa zo znalosti kandidátnej génovej sekvencie k získaniu a hodnoteniu mutácie v konkrétnom géne. Táto metóda neslúži k hľadaniu nových génov, ktoré podmieňujú daný fenotyp (Jankowicz-Cieslak *et al.*, 2015). Medzi metódy reverznej genetiky patrí napríklad RNA interferencia (RNAi) (Fire *et al.*, 1998), či technológia CRISPR/Cas9 (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindrom, Cas9, CRISPR-associated protein 9; Doudna *et al.*, 2014).

Funkčná genomika nachádza uplatnenie aj v rámci šľachtiteľského procesu. Lepšie pochopenie funkcie a regulácie jednotlivých génov v rámci procesu kvitnutia pomáha k získaniu nových kultivarov, ktoré sú lepšie prispôbené vonkajším podmienkam v oblasti, kde sú pestované, čo má dopad na samotný výnos. V rámci klasického šľachtenia rastlín dochádza ku kríženiu rôznych kultivarov a selekcii vybraných znakov. Dnes sa uplatňuje aj šľachtenie rastlín prostredníctvom indukcie mutácií

v genóme daného organizmu. Genetická zmena je znásobená homológnu rekombináciou v meióze. Mutácie podliehajú prirodzenej selekcii a predstavujú hnaciu silu evolúcie. Spontánne mutácie sú zriedkavé a náhodné. Preto sa pri šľachtení nových odrôd využíva mutagenéza, a to buď klasická alebo cielená (Oladosu *et al.*, 2016).

3.4.1 Klasická mutagenéza

Mutagenéza je proces tvorby dedičných zmien v genetickej informácii organizmu, ktorá nie je zapríčinená segregáciou alebo rekombináciou, ale je indukovaná prostredníctvom chemických, fyzikálnych alebo biologických činidiel (Roychowdhury *et Tah*, 2013).

Medzi fyzikálne mutagény patria rôzne typy žiarenia, ako napríklad röntgenové, ionizačné, či gama žiarenie. Spôsobujú väčšie chromozomálne aberácie (inzercie, delécie, inverzie, translokácie) a vyžadujú špeciálne vybavenie. V rámci mutagenézy sú menej používané ako chemické mutagény, keďže spôsobujú rozsiahle poškodenia a znižujú životnosť organizmu (Wu *et al.*, 2005).

Chemické mutagény nevyžadujú použitie špeciálneho vybavenia a poskytujú vysokú frekvenciu mutácií. Spôsobujú bodové mutácie typu transverzie či tranzície v kódujúcich i nekódujúcich oblastiach. Do tejto skupiny patrí napríklad etylmetán sulfonát (EMS) či etylnitróso močovina (ENU). EMS spôsobuje etyláciu guanínu za vzniku O⁶-etylguanínu, ktorý sa namiesto cytozínu páruje s tymínom. Tým pádom dochádza počas replikácie k tranzícii G:C za A:T (Greene *et al.*, 2003). ENU primárne spôsobuje transveziu A:T na T:A (44 %) a tranzíciu (38 %) A:T na G:C (Justice *et al.*, 1999). Samotnú účinnosť mutagenézy ovplyvňuje koncentrácia mutagénu, dĺžka pôsobenia a teplota, pri ktorej mutagenéza prebieha.

TILLING

Priamy genetický prístup sa využíval v šľachtení v spojení s mutagenézou určitej rastlinnej populácie. Neskôr bola vyvinutá metóda Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING), ktorá kombinuje chemickú mutagenézu s vysokokapacitným skríningom bodových mutácií v génoch záujmu. Jedná sa o metódu v rámci reverznej genetiky (McCallum *et al.*, 2000). Vďaka metóde TILLING môže byť získané široké spektrum alelických mutácií vhodných pre genetickú analýzu. Výsledkom týchto mutácií môže byť strata funkcie (loss of function), zisk nových vlastností (gain of function), či zníženie aktivity. Týmto prístupom sú získané stabilné mutácie. Niektoré mutácie nemuseli byť identifikované pomocou metód priamej genetiky, ale vďaka metóde TILLING je ich možné detekovať, keďže sa tento prístup zameriava na konkrétny gén. Táto metóda nie je obmedzená veľkosťou genómu ani úrovňou ploídie. Nevyžaduje genetickú transformáciu na rozdiel od inzerčnej mutagenézy, transpozónov, retrotranspozónov či RNAi. To predstavuje veľkú výhodu pre druhy, ktoré nie sú alebo sú len v malej miere transformovateľné. V tomto prípade sa taktiež nejedná o geneticky modifikovaný organizmus (GMO), a tým pádom odpadajú legislatívne bariéry pre využitie tejto technológie v šľachtení rastlín (Alonso *et Ecker*, 2006; Tadele *et al.*, 2009).

Táto metóda bola využitá v rámci dôležitých projektov na modelových organizmoch *A. thaliana* (*Arabidopsis* TILLING Project; Till *et al.*, 2003) a *Drosophila melanogaster* (Fly-TILL; Till *et al.*, 2003; Winkler *et al.*, 2005). Následne bola táto technológia aplikovaná na ostatné plodiny, ako pšenica, jačmeň, kukurica, ryža, ovos, hrach či sója. TILLING predstavuje sofistikovaný postup pre výskumníkov, ale aj šľachtiteľov pre vývoj nových odrôd. Identifikácia mutácií v konkrétnom géne je výrazne zjednodušená vďaka pokroku v rámci sekvenovania novej generácie a efektívnejšej detekcie heteroduplexov DNA (Burkart-Waco *et al.*, 2017; Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2017). Vďaka spätnému kríženiu s využitím DNA markerov môže byť konkrétna mutácia jednoduchšie prenesená do elitného kultivaru (Hasan *et al.*, 2015).

Detekcia bodových mutácií v géne záujmu v nemutovanej populácii (prirodzenej populácie) sa nazýva EcoTILLING. Pracuje na rovnakom princípe ako metóda TILLING. EcoTILLING nachádza uplatnenie v rámci detekcie vzácnych SNP, ktoré by mohli stať za vznikom rakoviny u ľudí (Till *et al.*, 2006).

RNA interferencia

RNAi je proces, pri ktorom dochádza k cieľnému umlčaniu špecifickej génovej sekvencie prostredníctvom dvojvláknovej RNA (double-stranded RNA, dsRNA). Táto dsRNA sprostredkováva štiepenie konkrétnej mRNA alebo blokuje jej expresiu. Jedná sa o prirodzený mechanizmus, ktorý prebieha v cytoplazme buniek ako reakcia na prítomnosť vírov alebo transpozónov (Fire *et al.*, 1998). Prvým krokom procese RNAi je prítomnosť dsRNA, ktorá je vyhodnotená ako cudzorodá, a preto má bunka tendenciu ju odstrániť. Pomocou enzýmu Dicer je dsRNA štiepená za vzniku dvojvláknových malých interferenčných RNA (small interfering RNA, siRNA) o veľkosti 21–23 nukleotidov (Elbashir *et al.*, 2001; Zamore *et al.*, 2000). V cytoplazme sú siRNA rozvolnené a antisense reťazec je inkorporovaný do komplexu RNA-induced silencing complex (RISC), zatiaľ čo druhé, sense, vlákno je degradované v cytoplazme. Komplex RISC je pomocou antisense vlákna vedený ku komplementárnej sekvencii na mRNA, s ktorou sa páruje. Táto mRNA je potom endolyticky štiepená pomocou proteínu Agronaut, ktorý predstavuje katalytickú zložku komplexu RISC (Zamore *et al.*, 2000).

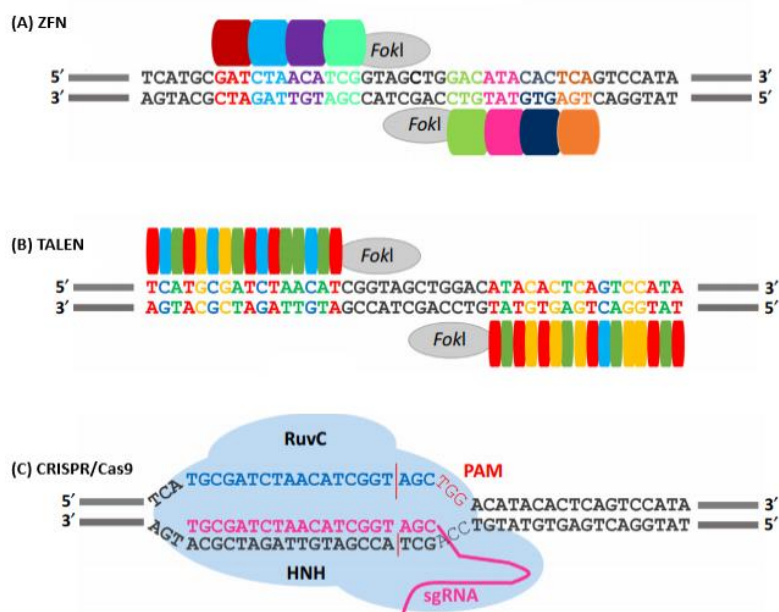
3.4.2 Cielená mutagenéza s využitím špecifických endonukleáz

Rastlinné genómy boli najskôr modifikované selektívnym šľachtením, neskôr mutagenézou a v posledných rokoch aj cieľnou úpravou genómu (Weeks *et al.*, 2016). Cielená úprava genómu spočíva v modifikácii špecifickej sekvencie DNA bez zásahu do ostatných častí DNA prostredníctvom špecifických nukleáz. Jedná sa najmä o nukleázu zinkového prstu (zinc finger nuclease, ZFN), Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) a CRISPR (Obrázok 6).

Prostredníctvom spomínaných miestne špecifických nukleáz sú vytvorené dvojvláknové zlomy (double-strand breaks, DSB) v presne definovanom mieste v genóme. Tieto DSB musia byť následne opravené kvôli zachovaniu stability genómu, plodnosti a genetickej diverzity. DSB môžu byť opravené

bud' nehomológnym spájaním koncov (nonhomologous end-joining, NHEJ) alebo homológnou rekombináciou (homologous recombination, HR). Oprava DSB prostredníctvom NHEJ môže spôsobiť v genóme nepredvídateľné zmeny typu malých delécií či substitúcií, ktoré môžu mať za následok vyradenie určitého génu z funkcie. Oprava HR ponúka širšie spektrum modifikácií genómu, ako napríklad substitúcie jedného nukleotidu až po integráciu viacerých transgénov do cieľového miesta. Pomocou HR môže byť DSB opravený prepisom donorovej sekvencie do rozbitej oblasti DNA, a tým pádom je tento donorový templát stabilne integrovaný do genómu, čím je dosiahnutá požadovaná modifikácia DNA. Dominantnou opravou DSB u rastlín je však NHEJ (Waterworth *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2014).

V súčasnosti sa využívajú najmä TALEN a CRISPR/Cas9. Dosiahnuť HR je oveľa náročnejšie v porovnaní s NHEJ, pretože vyžaduje prítomnosť expresnej kazety miestne špecifickej nukleázy (TALEN, CRISPR/Cas9) a exogénne dodaného donorového templátu. Neustále sú vyvíjané nové stratégie na zvýšenie účinnosti HR. Napríklad Fauser *et al* (2012) zabezpečili, že každá bunka bude mať minimálne jednu kópiu donorového templátu získanú z jej chromozómu. Baltés *et al* (2014) zase zvýšili množstvo donorového templátu replikáciou prostredníctvom geminivírusu.



Obrázok 6: Hlavné metódy editácie genómu prostredníctvom miestne špecifických endonukleáz, konkrétne ZFN, TALEN a CRISPR/Cas9. (A) ZFN funguje ako dimér, pričom monoméry sa skladajú zo špecifickej DNA väzobnej domény z tandemovo usporiadaných zinkových prstov, pričom jeden rozpoznáva 3 bp sekvenciu a podjednotky restriktívnej endonukleázy *FokI*. Monoméry sa viažu antiparalelne na vlákna DNA, podjednotky *FokI* dimerizujú a indukujú DSB. (B) TALEN pracuje na podobnom princípe ako ZFN (dimér a restriktívna endonukleáza *FokI*). V tomto prípade rozpoznáva jedna aminokyselinová doména jeden nukleotid. (C) CRISPR/Cas9 funguje na rozdiel od ZFN a TALEN ako monomér a väzobná špecificita je určená pomocou single synthetic guide RNA (sgRNA). Cas9 je restriktívna endonukleáza, ktorá sa skladá z dvoch nukleázových domén: HNH štiepiacej na komplementárnom reťazci a RuvC domény, ktorá štiepi na nekomplementárnom reťazci. CRISPR/Cas9 sa môže viazať na akékoľvek miesto na DNA obsahujúce motív PAM a indukuje DSB 3 nukleotídy pred PAM. Prevzaté a upravené podľa Zhu *et al.*, 2017.

ZFN

Nukleáza zinkového prstu je pripravená fúzovaním DNA väzobnej domény a domény nešpecifickej restriktívnej endonukleázy *FokI*. DNA väzobná doména sa skladá z dvoch sad tandemovo usporiadaných ZF, pričom každá sa skladá z 3–4 ZF a rozpoznáva sekvenciu o veľkosti 9–12 bp. Čiže jeden ZF rozpoznáva 3 bp dlhú sekvenciu DNA. Restriktívna endonukleáza *FokI* štiepi molekulu DNA a je aktívna len ako dimér. Jedna sada zinkových prstov je fúzovaná s jedným monomérom a druhá zase s druhým monomérom *FokI*. Viazu sa na špecifickú sekvenciu DNA (18–24 bp), pričom monoméry sa viažu na opačné vlákno molekuly DNA vo vzdialenosti 5–7 bp od seba. Tento medzerník (spacer) umožňuje dvom nukleázovým doménam *FokI* dimerizovať, čím sa stáva aktívna a následne indukuje v tomto mieste DSB (Porteus *et al.*, 2005).

Existujú programy pre navrhovanie špecifických ZFN na konkrétnu sekvenciu DNA v danom géne a ZFN sú aj komerčne dostupné (Osborn *et al.*, 2011).

TALEN

Princíp TALEN je veľmi podobný tomu ako fungujú ZFN. Skladá sa taktiež zo špecifickej DNA väzobnej domény a nešpecifickej nukleázy. Transkripčné aktivátory podobné efektorom (transcription activator-like effector, TALE) sú prirodzene sa vyskytujúce efektorové proteíny fytopatogénnych baktérií rodu *Xanthomonas*. Fungujú ako aktivátory transkripcie génov v jadre hostiteľskej bunky. Viazu sa do promotorov určitých génov a preprogramujú transkriptóm hostiteľa v prospech patogéna (Kay *et al.*, 2007).

TALE obsahujú unikátnu centrálnu DNA väzobnú doménu, ktorá sa skladá z 13–28 tandemovo sa opakujúcich vysoko konzervovaných subdomén (repetíc) o veľkosti 34 aminokyselín. Platí, že jedna subdoména rozpoznáva jeden nukleotid. DNA väzobná špecifita je daná tzv. repetitívnymi variabilnými di-reziduami (Repeat Variable Di-Residues, RVD) v pozíciách 12 a 13 v rámci každej aminokyselínovej repetície, pričom zvyšné aminokyseliny sú vysoko konzervované. Aminokyselina na pozícii 12. je zodpovedná za stabilizáciu štruktúry a aminokyselina na 13. pozícii sprostredkováva špecifickú interakciu s jednou bázou na reťazci DNA. Oblasť tandemových repetíc na C-konci proteínu končí tzv. polovičnou repetíciou, ktorá obsahuje prvých 20 rezíduí vrátane RVD. Taktiež platí, že TALE vždy rozpoznáva bázu T na 5' konci cieľovej sekvencie (Miller *et al.*, 2011).

DNA väzobná doména je fúzovaná s katalytickou doménou restriktívnej endonukleázy *FokI* podobne ako ZFN. Výsledkom je špecificky riadená a programovateľná nukleáza, TALEN. TALEN funguje taktiež v páre, pričom monoméry sa viažu antiparalelne na väzobné miesta na molekule DNA, ktoré sú oddelené medzerníkom. Domény *FokI* interagujú nad medzerníkom a v tomto mieste indukujú DSB (Christian *et al.*, 2010).

Samotný návrh a konštrukcia diméru TALEN je komplikovaný proces z hľadiska požiadaviek pre úspešné rozpoznanie cieľovej sekvencie na molekule DNA. Na zostrojenie funkčného TALEN sa používa Golden Gate klonovacia metóda (Cermak *et al.*, 2011), klonovanie nezávislé od ligácie

(Schmid-Burgk *et al.*, 2013) či vysoko-kapacitná produkcia na pevnom nosiči (Briggs *et al.*, 2012; Reyon *et al.*, 2012). Schmid-Burgk *et al.* (2013) sú toho názoru, že jednotlivé repetície je možné kombinovať tak, aby rozpoznali akúkoľvek presne definovanú sekvenciu. Jedným z príkladov je súbor TALENov rozpoznávajúcich 18 740 génov kódujúcich ľudské proteíny (Kim *et al.*, 2013).

CRISPR/Cas9

Príchod technológie CRISPR/Cas9 spôsobil revolúciu v genómovom inžinierstve. Editácia genómu prostredníctvom CRISPR je jednoduchšia ako s použitím metód ZFN či TALEN. V roku 2020 bola udelená Nobelová cena za chémiu Emmanuelle Charpentier a Jennifer A. Doudna za objav metódy editácie genómu CRISPR/Cas9 (Doudna *et al.*, 2014). CRISPR predstavuje adaptívny imunitný systém baktérií a archeí voči infekcii vírusmi a plazmidmi využívajúcich malé RNA. Tieto RNA rozpoznávajú a umlčujú cudzorodú nukleovú kyselinu. CRISPR lokus je tvorený jedinečnými sekvenciami (photospacermi, 20–30 bp), ktoré sú oddelené krátkymi palindromickými repetíciami približne rovnakej dĺžky. Photospacery predstavujú cudzorodú nukleovú kyselinu vírusov alebo plazmidov. Súčasťou CRISPR lokusu sú gény, ktoré kódujú Cas proteíny (Jiang *et al.*, 2017).

Existujú tri typy bakteriálnych systémov CRISPR/Cas (I, II a III), pričom systém II je najlepšie popísaný a jeho podstata sa využíva pri cielej editácii genómu. CRISPR lokus je transkribovaný za vzniku pre-crRNA. Úprava pre-crRNA na CRISPR RNA (crRNA) vyžaduje prítomnosť transaktivačnej crRNA (tracrRNA), ktorá obsahuje komplementárnu oblasť k repetitívnej sekvencii v CRISPR lokuse. TracrRNA sa viaže na túto oblasť na pre-crRNA za vzniku dvojvláknovej RNA, ktorá je enzymaticky štiepená RNázou III na jednotlivé crRNAs. Cas9 v komplexe s tracrRNA a crRNA interferujú s dvojvláknovou DNA na základe komplementarity medzi crRNA a cieľovou DNA, pričom sa viažu pred tzv. Protospacer Adjacent Motif (PAM). Tento motív je rozpoznávaný prostredníctvom PAM-viažucej domény, ktorá je súčasťou proteínu Cas9. Následne dochádza k rozvoľneniu vlákien a štiepeniu cieľovej sekvencie pred PAM prostredníctvom nukleázovej aktivity Cas9 za vzniku DSB (Jiang *et al.*, 2017).

Typ II CRISPR/Cas9 systém študovaný na *Streptococcus pyrogens* bol adaptovaný na ciele editáciu genómu u širokého spektra organizmov. Tento systém bol upravený tak, že 3' koniec crRNA spojili s 5' koncom tracrRNA do jedného polyribonukleotidu sgRNA, ktorá je spojená s endonukleázou Cas9 (Jinek *et al.*, 2012). Molekula sgRNA v prírode neexistuje. Môže byť vytvorená chemickou syntézou *in vitro* alebo prepisom DNA z plazmidu, ktorý obsahuje sekvenciu kódujúcu sgRNA. Gény pre špecifickú sgRNA je možné si pripraviť týmto spôsobom jednoducho v laboratóriu (Hu *et al.*, 2019). Zložka crRNA v molekule sgRNA je navrhnutá na oblasť záujmu v genóme organizmu. Táto špecifická sekvencia je dlhá približne 20 nukleotidov. Naopak, tracrRNA, ktorá je dlhá približne 76 nukleotidov, môže byť fúzovaná s rôznymi crRNA. Nukleáza Cas9 sa skladá z dvoch domén, konkrétne z domény podobnej RuvC a domény HNH. Každá doména rozpoznáva jeden reťazec DNA. Jedným z obmedzení pri návrhu sgRNA je prítomnosť esenciálneho motívu PAM, ktorý sa musí nachádzať za miestom

záujmu. V prípade použitia Cas9 zo *S.pyrogens* sa jedná o sekvenciu 5'-NGG-3'. PAM je nevyhnutný pre správne naviazanie sgRNA a samotné štiepenie prostredníctvom Cas9, ktoré bez prítomnosti PAM nie je možné. Bodové mutácie v mieste PAM, či blízko miesta štiepenia znemožňujú fungovanie celého systému (Jinek *et al.*, 2012).

Jedno z hlavných obmedzení využitia CRISPR/Cas9 systému v genómovom inžinierstve je off-target aktivita. Jedná sa o nešpecifické zlomy mimo cieľového miesta v genóme organizmu, čo výrazne znižuje špecifitu celého systému. Zníženie off-target aktivity je možné dôsledným návrhom samotného photospaceru, ktorý by mal mať v genóme čo najmenej potencionálnych miest pre nešpecifické štiepenie a neobsahoval PAM sekvenciu (Hsu *et al.*, 2013).

Oproti technikám ZFN a TALEN funguje CRISPR/Cas9 ako monomér (Kim *et al.*, 2014). Medzi hlavné výhody patrí jednoduchosť samotného návrhu. V prípade metód využívajúcich ZFN a TALEN sa jedná o komplikovaný návrh proteínov, ktoré rozpoznávajú cieľovú nukleotidovú sekvenciu. V prípade CRISPR/Cas9 metódy je Cas9 rovnaký a navrhuje sa len nová špecifická sgRNA (Cho *et al.*, 2013).

Technológia CRISPR/Cas9 ponúka možnosť multiplexovej úpravy génov prostredníctvom expresie viacerých sgRNA zostavených do niekoľkých expresných kaziet, pričom každá je transkribovaná zo samostatného promotora RNA polymerázou III (Ma *et al.*, 2015). Ďalšou alternatívou je využitie polycistronickej mRNA, ktorá je pomocou špeciálnych enzýmov posttranskripčne spracovaná na jednotlivé sgRNA. Konkrétne sa jedná sa o CRISPR asociovanú RNA endoribonukleázu Csy4 z *Pseudomonas aeruginosa*, ribozýmy či prirodzene sa vyskytujúce enzýmy v hostiteľských bunkách, ktoré spracúvajú tRNA (Xie *et al.*, 2015). Je možné taktiež využívať párové nickázy k tvorbe dvoch jednoreťazových zlomov na molekule DNA podobne ako v prípade ZFN a TALEN. Nickázy sú varianty proteínu Cas9, ktoré vznikli mutáciou určitej aminokyseliny v jednej z podjednotiek. K nickáze sú pridané dve sgRNA komplementárne k opačným reťazcom cieľového miesta a následným štiepením v dostatočnej blízkosti vznikajú DSB. Aj vďaka tomu je možné znížiť off-target aktivitu a zvýšiť špecifitu tejto metódy (Cong *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013). Okrem použitia párových nickáz, môže byť špecifita zvýšená pomocou dimérnych CRISPR/Cas9 nukleáz alebo skrátených sgRNA (Fu *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2014).

3.4.3 Vybrané metódy klonovania

Jednou z výziev molekulárnej biológie je príprava organizmov s požadovaným fenotypom užitočných na poli medicíny, poľnohospodárstva či priemyslu. To je možné aj pomocou klonovacích metód, ktoré umožňujú presné spájanie fragmentov DNA do jedného celku ako sú Golden Gate, Gibson Assembly či Gateway klonovanie (Ellis *et al.*, 2011).

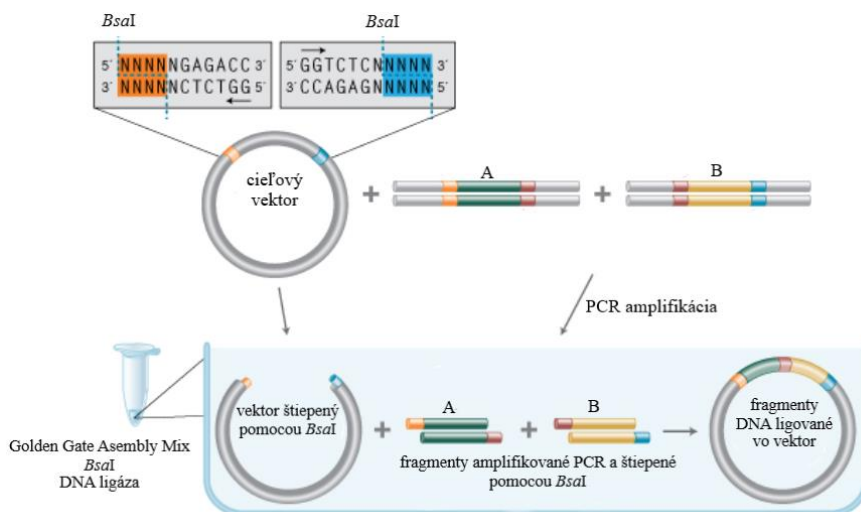
Metóda Golden Gate

Metóda Golden Gate pracuje princípe štiepenia fragmentov DNA pomocou restričných endonukleáz typu IIS, ktoré štiepia mimo svojho rozpoznávacieho miesta. Tým pádom vznikajú na štiepených fragmentoch kompatibilné konce o veľkosti 3–4 bp, vďaka čomu môžu byť efektívne ligované v presnom poradí a v jednej reakcii. Dôležité je, že ligované fragmenty už potom neobsahujú dané rekogničné miesto, a preto nebudú znova štiepené a ligované, pričom zvyšné fragmenty budú. To umožňuje presné spájanie viacerých fragmentov DNA až po získanie požadovaného produktu (Engler *et al.*, 2009).

Na začiatku samotného klonovania je dôležité si definovať miesta fúzovania jednotlivých fragmentov DNA. Tie sa väčšinou skladajú z 3 alebo 4 nukleotidov a predstavujú miesto štiepenia vybranej restriktívnej endonukleázy a samotnej ligácie. Dôležité je, aby sa jednotlivé komplementárne miesta fúzovania od seba líšili, aby nedošlo k spájaniu jednotlivých fragmentov v nesprávnom poradí. Taktiež by tieto miesta nemali predstavovať palindromické sekvencie a vykazovať podobnosť. Počet, veľkosť a pozícia jednotlivých miest fúzovania je odlišná v závislosti samotného experimentu. Platí však, že účinnosť restriktívneho štiepenia a následnej ligácie klesá so zvyšujúcim sa počtom fragmentov. Napríklad vysoká efektivita bola pozorovaná pri spájaní 9 fragmentov (8 komplementárnych fúzných miest). Weber *et al.* (2011) vo svojej práci spájali až 17 fragmentov DNA, ale s podstatne nižšou účinnosťou. Odporúča sa preto pri ligácii viac ako 9 fragmentov ich rozdelenie do dvoch klonovacích krokov. Jednotlivé fragmenty DNA, ktoré chceme spájať pomocou metódy Golden Gate, by mali byť ideálne zaklonované vo vektore. S nižšou účinnosťou je možné taktiež spájať fragmenty amplifikované pomocou PCR. Jednotlivé fragmenty je možné si nechať syntetizovať komerčnou firmou (Engler *et Marillonnet*, 2013).

Ďalším krokom je PCR amplifikácia fragmentov DNA pomocou primerov s prevismi. Tieto primery obsahujú rekogničné miesto pre vybranú IIS restriktívnu endonukleázu, miesto fúzovania (3–4 bp) a úsek komplementárny k fragmentu DNA (16–20 bp). Tým pádom dôjde k zabudovaniu dôležitých miest, ktoré umožňujú štiepenie a samotné spájanie fragmentov na základe komplementarity. Dôležité je, aby jednotlivé fragmenty neobsahovali rekogničné miesto vybranej restriktívnej endonukleázy, ktoré je každopádne možné odstrániť zavedením tichej mutácie. Tieto PCR produkty, ktoré boli amplifikované ideálne vysokošpecifickou DNA polymerázou zanechávajúcou tupé konce, sú následne klonované do príslušného vstupného vektoru (modulu). Týmto spôsobom bude vytvorená knižnica modulov obsahujúcich jednotlivé fragmenty, ktoré budú spojené v cieľom vektore v požadovanom poradí a v jednej reakcii. Moduly by nemali obsahovať rekogničné miesto pre IIS restriktívnu endonukleázu, ktorá bude použitá. Cieľový vektor by mal taktiež spĺňať určité kritéria. Mal by obsahovať len dve rekogničné miesta pre vybranú restriktívnu endonukleázu typu IIS, ktorej jedno štepne miesto bude kompatibilné so sekvenciou na začiatku prvého modulu a druhé s koncom posledného modulu v rámci vytvoreného setu. Cieľový vektor by nemal obsahovať ďalšie rekogničné miesta pre použitú endonukleázu, ale naopak môže obsahovať rekogničné miesta pre inú IIS restriktívnu

endonukleázu pre prípadné subklonovanie. Následne prebieha samotná reakcia, v ktorej dochádza k štiepeniu jednotlivých modulov príslušnou endonukleázou za vzniku lepiých kompatibilných koncov. Tie sú následne spojené podľa poradia do cieľového vektora, ktorým sú transformované kompetentné baktérie. Dôležité v tomto prípade je ideálne nastavenie molárnych množstiev fragmentov DNA v moduloch a cieľového vektora (Engler *et al.*, 2013). Schematické znázornenie klonovacej metódy Golden Gate je na Obrázku 7.



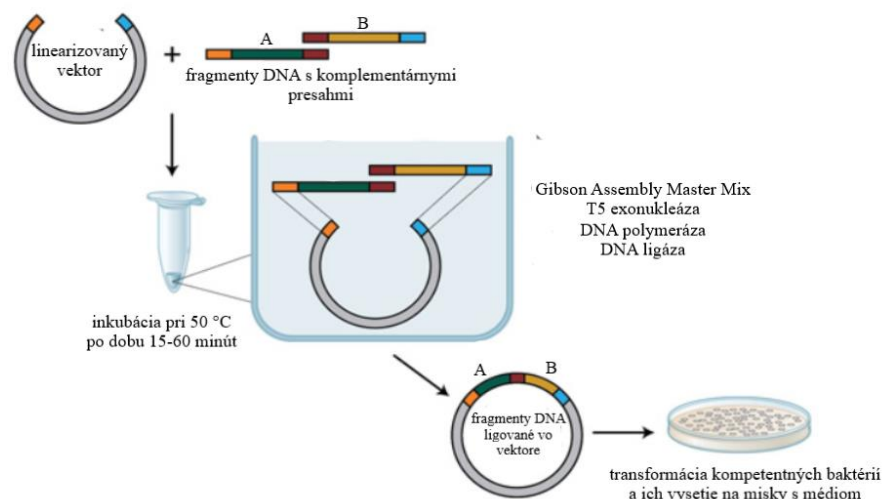
Obrázok 7: Schéma Golden Gate klonovania. Pomocou restriktívnej endonukleázy *BsaI* je linearizovaný cieľový vektor a vytvorené presahy o veľkosti 4 bp na fragmentoch DNA amplifikovaných PCR. Jednotlivé fragmenty sú následne na základe komplementarity spojené a cirkularizované vo vektore. Prevzaté a upravené z <https://www.neb.ca/detail.php?id=e1600> dňa 4.1.2021.

Metóda Gibson Assembly

Ďalšou rozšírenou a populárnou metódou klonovania je metóda Gibson Assembly, ktorá nesie meno po svojom zakladateľovi Danielovi G. Gibsonovi. Táto metóda umožňuje spájanie viacerých fragmentov DNA len na základe komplementárnych koncových sekvencií v jednej izotermickej reakcii pomocou troch enzýmov. V reakcii sa využíva T5 exonukleáza, ktorá štiepi 5' koniec dvojlákových fragmentov DNA a necháva tak previs na 3' konci. Previsy na jednotlivých fragmentoch sa spájajú na základe komplementarity báz. Medzery sú následne vyplnené aktivitou DNA polymerázy a zárezy sú k sebe spojené pomocou termostabilnej DNA ligázy. Týmto spôsobom môže byť spojených až 15 fragmentov DNA do finálneho produktu, ktorý môže byť lineárny alebo cirkularizovaný v podobe vektora (Gibson *et al.*, 2009).

Gibson Assembly sa využíva napríklad pre zisk produktov, ktoré kvôli svojej veľkosti nie je možné alebo je príliš komplikované amplifikovať pomocou jednej PCR. V tomto prípade je produkt rozdelený na niekoľko častí, ktoré sú amplifikované zvlášť. Následne sú vytvorené na jednotlivých PCR produktoch a vektore komplementárne presahy (20–80 bp, v závislosti od dĺžky fragmentov) pomocou primerov. Výhodnejšie je však mať jednotlivé fragmenty zaklonované vo vektore (Gibson *et al.*, 2009). Spájanie 5 fragmentov je možné v jednej reakcii, v ktorej sú jednotlivé komponenty inkubované pri 50 °C približne jednu hodinu a následne transformované do kompetentných

baktérií. Jednotlivé kroky Gibson Assembly sú schematicky znázornené na Obrázku 8. V prípade spájania viacerých fragmentov (až 15) alebo pre fragmenty, ktoré sú veľkostne výrazne odlišné (100 bp až 100 kb) sa odporúča dvojkrokový postup alebo použitie tzv. The Gibson Assembly® Ultra cloning kitu (Chen *et al.*, 2015). Gibson Assembly sa využíva taktiež pri generovaní špecifických mutácií, ako sú inzercie, delécie a bodové mutácie v rámci tzv. site directed mutagenesis (Thomas *et al.*, 2015). V porovnaní s Golden Gate klonovaním sa jedná o lacnejšiu a rýchlejšiu metódu. Hlavnou výhodou však je, že nie je závislá na prítomnosti rekogničných miest a restričných enzýmov (Gibson *et al.*, 2009; Santos-Moreno *et al.*, 2019).



Obrázok 8: Schéma Gibson Assembly. Pomocou metódy Gibson Assembly sú jednotlivé fragmenty DNA s komplementárnymi presahmi spojené a cirkularizované vo vektore v presnom poradí v jednej reakcii za účasti troch enzýmov pri 50 °C po dobu 15–60 minút. Prevzaté a upravené z <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/gibson-assembly> dňa 4.1.2021.

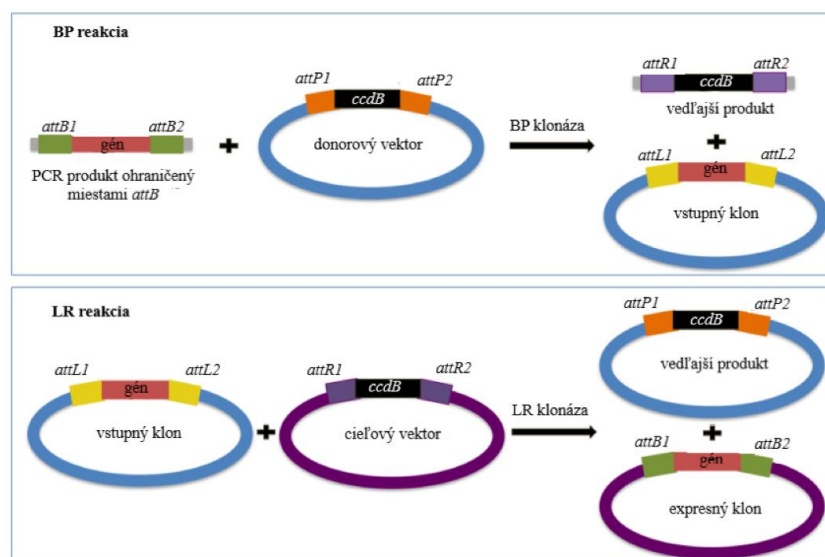
Gateway klonovanie

Gateway klonovacia technika pracuje na princípe miestne špecifickej rekombinácie medzi špecifickou oblasťou v rámci DNA bakteriofága lambda a genómom baktérie *Escherichie coli*. Táto technológia ponúka rýchle klonovanie, kombinovanie a prenos fragmentov DNA zo vstupných vektorov do rôznych cieľových vektorov v dvoch reverzibilných krokoch. Selečným markerom je gén *ccdB*, ktorého produkt interaguje s bakteriálnym enzýmom gyrázou zohrávajúcim dôležitú úlohu pri replikácii DNA. Tento gén zabezpečuje, že bakteriálne kolónie nesúce prázdny vektor neprežijú, keďže nie sú schopné replikácie. Taktiež je dôležité, že zostáva zachovaná orientácia čítacieho rámca klonovaného fragmentu DNA (Hartley *et al.*, 2000).

V prvom kroku je pripravený vstupný klon pomocou tzv. BP reakcie. V tejto reakcii dochádza k prenosu fragmentu DNA, väčšinou PCR produktu, ohraničeného *attB* sekvenciami do donorového vektoru, ktorý nesie *attP* sekvenciu ohraničujúcu *ccdB* gén za vzniku vstupného klonu. Vstupný klon nesie fragment DNA ohraničený *aattL* sekvenciami, pričom vedľajším produktom je *ccdB* gén ohraničený *attR* sekvenciami. K prenosu dochádza pomocou rekombinácie medzi *attB* a *attP* miestami

pomocou BP klonázy. Miesto *aatB* sa skladá z 21 nukleotidov, a tým pádom nie je problém ho pomocou primerov pridať k fragmentu záujmu. Samotný vstupný vektor je kompatibilný so širokým spektrom cieľových vektorov, vďaka čomu môže byť zdieľaný v rámci rôznych laboratórií. V druhom klonovacom kroku prebieha tzv. LR reakcia, v ktorej je pripravený finálny expresný vektor. Do reakcie vstupuje produkt BP reakcie (vstupný vektor, fragment DNA ohraničený *attL* miestami) a cieľový vektor (*ccdB* gén ohraničený *attR* miestami). Vďaka miestne špecifickej rekombinácii medzi *attL* a *attR* miestami pomocou LR klonázy vzniká expresný vektor s fragmentom DNA ohraničeným *attB* miestami, ktorý nahradil *ccdB* gén (Hartley *et al.*, 2000). Postup Gateway klonovania je schematicky znázornený Obrázku 9.

Metóda Gateway klonovania umožňuje aj spájanie viacerých fragmentov DNA do jedného vektora pomocou tzv. MultiSite Gateway klonovania. Táto technika pracuje taktiež na princípe mieste špecifickej rekombinácie medzi *att* miestami v BP a LR reakcii (Sasaki *et al.*, 2004).



Obrázok 9: Schéma Gateway klonovania. Gateway klonovací systém pracuje na princípe miestne špecifickej rekombinácie medzi špecifickými sekvenciami a skladá sa z dvoch reakcií. V prvej, BP reakcii je pripravený vstupný klon a následne je pomocou LR reakcie pripravený expresný klon nesúci komponenty nevyhnutné pre správnu génovú expresiu. Prevzaté a upravené z <https://blog.addgene.org/plasmids-101-gateway-cloning> dňa 4.1.2021.

3.4.4 Príprava vektorov pre transformáciu

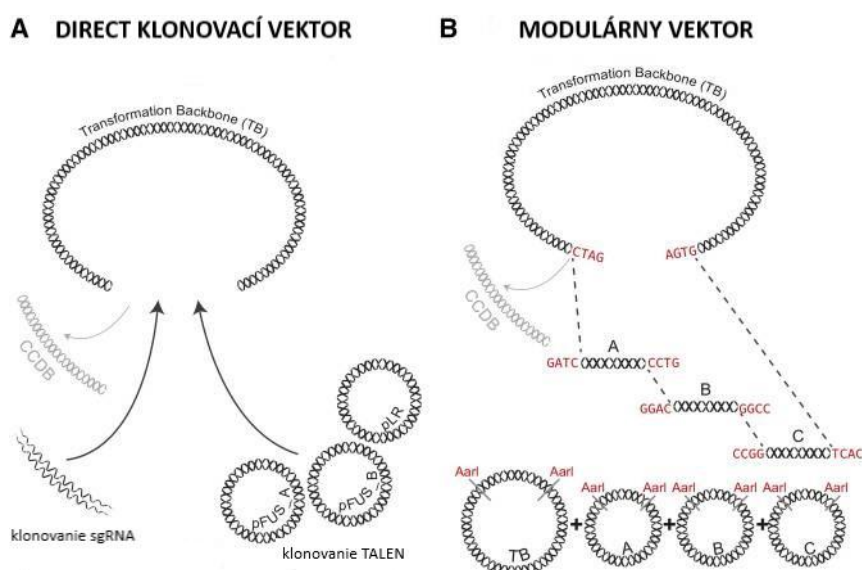
Genómové inžinierstvo je vedná disciplína, ktorá vyvíja stratégie a metódy na cieleňú modifikáciu DNA v živých bunkách. V prípade editácie rastlinného genómu bolo dostupné len obmedzené množstvo nástrojov, ktoré pracovali na princípe CRISPR/Cas9. V počiatkoch bola sgRNA exprimovaná z promotora pre RNA polymerázu III a táto technika umožňovala väčšinou len umlčanie génov.

Čermák *et al.* (2017) predstavili komplexný modulárny systém pre cieleňú editáciu genómov jednoklíčnolistových aj dvojklíčnolistových rastlín prostredníctvom TALEN aj CRISPR/Cas9. Podľa návrhu funkčného modulu môže byť umožnené umlčanie génov, výmeny, zmeny regulácie transkripcie,

či multiplexové modifikácie konkrétneho miesta v rastlinnom genóme. Táto platforma ponúka flexibilitu pri tvorbe funkčných modulov a pracuje na princípe Golden Gate klonovania, ktoré umožňuje spojiť niekoľko rôznych fragmentov DNA v presne definovanom poradí do jedného recipientného plazmidu (Engler *et al.*, 2009).

Nástroj, ktorý navrhli Čermák *et al.* (2017) ponúka dva základné typy vektorov: direct klonovací vektor a modulárny vektor (Obrázok 10). Direct klonovací vektor umožňuje rýchle zostavenie jednotlivých častí do finálnej expresnej kazety. Kostra vektoru, tzv. transformation backbone, obsahuje selekčný marker a miestne špecifickú nukleázu. Jediné, čo neobsahuje, je špecifická sekvencia určujúca miesto editácie v genóme, ktoré môže byť definované sgRNA alebo dimérom TALEN.

Modulárny vektor je zhotovený pomocou Golden Gate klonovania a ponúka širšie spektrum aplikácií, ako direct klonovací vektor, ktorý umožňuje len umlčanie konkrétneho génu v genóme. Finálny modulárny vektor je výsledkom spojenia troch modulov, ktoré sú označené ako modul A, B a C. Modul A môže obsahovať prvý TALEN monomér, nukleázu Cas9 alebo zabezpečuje expresiu green fluorescent protein (GFP). Pomocou modulu B je determinované miesto editácie vďaka sgRNA, či druhým monomérom TALEN. Moduly s jednotlivými TALEN monomérmi sú skonštruované pomocou postupu podľa Cermak *et al.* (2011). Vďaka modulu C môžu byť pridané ďalšie sgRNA, GFP, Csy4, či exonukleáza Trex2, ktorá zvyšuje frekvenciu mutácií. Tento modul nie je nevyhnutný, ale býva súčasťou reakcie ako prázdny modul. Jednotlivé moduly sú štiepené rovnakou restriktívnou endonukleázou *AarI* a vložené do finálneho modulárneho vektora pomocou spomínaného dvojkrokového Golden Gate klonovania v priebehu 5 dní. Modulárny vektor poskytujúci TALEN technológiu pri editácii genómu vyžaduje ešte jeden klonovací krok. Obidva vektory obsahujú v rámci transformation backbone gén *ccdB*, ktorý sa podieľa na selekcii pozitívnych klonov. Pri príprave samotného vektora, je gén *ccdB* vyštiepený klonovanou sekvenciou (Čermák *et al.*, 2017).



Obrázok 10: Schéma klonovacích vektorov pre editáciu rastlinných genómov navrhnutá Čermák *et al.* (2017). Princíp je popísaný v kapitole 3.4.4 Príprava vektorov pre transformáciu.

3.5 Transformácia jačmeňa

Jačmeň patrí v poradí medzi štvrtú agronomicky najvýznamnejšiu plodinu. Úsilie v rámci genetického inžinierstva sa zmeriava na zlepšenie kvalitu sladu a rezistencie voči chorobám, ale taktiež je dôležité z hľadiska štúdia funkcie génov. Transformácia predstavuje vnesenie cudzorodej DNA do jadra buniek a jej následnú integráciu do genómu. Transformácia nielen jačmeňa, ale vo všeobecnosti obilnín, predstavuje dôležitý krok pre zlepšenie agronomicky významných vlastností, ako je výnos, či odolnosť voči biotickým aj abiotickým stresom (Dahleen *et* Manoharan, 2007).

Metódy transformácie jačmeňa sú pomerne efektívne, ale sú stále závislé od genotypu, čo predstavuje jednu z hlavných nevýhod. V rámci štúdia génov môže byť použitý jačmeň ako diploidný modelový organizmus pre hexaploidnú pšenicu, najmä kvôli účinnejšej transformácii a menšiemu genómu s nižšou komplexitou. Transformačné systémy by mali byť vo všeobecnosti vysoko efektívne, jednoduché na prevedenie, finančne nenáročné a nezávislé na genotype (Harwood, 2012). Taktiež by malo prísť k vloženiu génu do genómu organizmu len v jednej kópii, bez nadbytočných častí vektoru a tento gén by mal byť stabilne exprimovaný aj v nasledujúcich generáciách (Hu *et al.*, 2003). Účinnosť transformácie ovplyvňuje reprodukovateľnosť a efektivita samotnej metódy transformácie, výber explantátu, regenerácia po transformácii a selektívna metóda pre výber transformantov. Expresia génu je ovplyvnená mnohými faktormi, ako je výber vhodného promotora, prítomnosť netranslatovaných regulačných domén a signálnych peptidov. Transgénná expresia génu môže byť zvýšená pridaním intrónových sekvencií (Harwood, 2012). Taktiež bolo zistené, že pre expresiu génu u jačmeňa a pšenice je vhodné použitie ubiquitínového promotora z kukurice (*ZmUbi*; Himmelbach *et al.*, 2007).

Jačmeň môže byť transformovaný prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens* (Tingay *et al.*, 1997), biolisticky (Wan *et* Lemaux, 1994), mikroinjekčne (Holm *et al.*, 2000), či priamou transformáciou protoplastov (Funatsuki *et al.*, 1995). V súčasnosti sa používa najmä transformácia pomocou *A. tumefaciens* a biolistická metóda.

3.5.1 Biolistická metóda

Biolistická metóda, nazývaná aj bombardovanie mikročasticami, sa používa najmä pre transformáciu obilnín. Jedná sa o priamy fyzický transfer príslušného vektoru vyzrážaného na inertných kovových časticách do rastlinných buniek. Používajú sa častice z volfrámu alebo zlata s priemerom 1–2 μm . Kompetentné rastlinné bunky sú umiestnené vo vákuovej komore a následne sú bombardované časticami urýchlenými prúdom stlačeného hélia alebo elektrickým výbojom. Vďaka tomu prejdú tieto častice cez silnú bunkovú stenu do jadra a prídu k zabudovaniu príslušného génu do rastlinného genómu. Nasleduje selekcia a regenerácia transformantov (Danilova, 2007).

Táto metóda transformácie obilnín je vhodná pre každý typ pletiva a nie závislá na genotype. Nezrelé embryá sú v prípade jačmeňa považované za najvhodnejší materiál pre biolistickú transformáciu (Harwood *et al.*, 2000). Pre efektívnu transformáciu je dôležitá samotná príprava rastlinného materiálu.

Ten je kultivovaný v osmotickom médiu pred aj po bombardovaní mikročasticami, za účelom minimalizácie negatívneho poškodenia buniek (Kemper *et al.*, 1996). Samotnú transformáciu však ovplyvňuje rada ďalších faktorov, ako vzdialenosť medzi akcelerátorom a explantátom, množstvo použitých častíc či optimálna rýchlosť urýchlenej častice (Birch *et Franks*, 1991).

Hlavnou nevýhodou tejto metódy je prípadná viacnásobná integrácia transgénu, ktorá môže viesť k umlčaniu či zmene expresie génu záujmu (Travella *et al.*, 2005). Ďalšou nevýhodou je poškodenie pletiva a buniek samotnými mikročasticami či veľkosť samotného vektoru. V prípade veľkých vektorov môže dôjsť k priľnutiu vektoru na kovové častice, či k jeho nerušeniu v samotnom procese bombardovania (Tang *et al.*, 2000).

3.5.2 Transformácia jačmeňa prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je gramnegatívna baktéria a parazit dvojkličnolistových rastlín spôsobujúci vznik nádorov v rastlinných pletivách. Binns *et Thomashow* (1988) zistili, že prostredníctvom *A. tumefaciens* môže byť prenesený konkrétny segment DNA (T-DNA) v rámci tumor indukujúceho plazmidu (Ti) do jadra infikovaných buniek a následne náhodne integrovaný do genómu. To viedlo k myšlienke využitia *A. tumefaciens* pre transformáciu rastlín. Najskôr slúžilo pre transformáciu dvojkličnolistových rastlín a až neskôr bolo použité ako nástroj pre transformáciu jednokličnolistových rastlín, vrátane obilnín. Tingay *et al.* (1997) ako prvý úspešne transformovali nezrelé embryá jačmeňa prostredníctvom infekčného kmeňa *A. tumefaciens* AGL1. V nasledujúcich rokoch bolo spracovaných a optimalizovaných viacero protokolov pre transformáciu jačmeňa prostredníctvom *A. tumefaciens* (Bartlett *et al.*, 2008; Hensel *et al.*, 2009, 2008). Medzi hlavné faktory dôležité pre efektívnu transformáciu patrí genotyp rastliny, výber explantátu, bakteriálny kmeň, zloženie kultivačného média a doba kultivácie, taktiež zloženie média na indukciu a regeneráciu kalusu. V neposlednom rade má taktiež vplyv poškodenie pletiva či buniek zo samotnej bakteriálnej infekcie alebo manipulácie počas transformácie (Cheng *et al.*, 2004). Úspešnosť transformácie *A. tumefaciens* závisí od použitého kultivaru. Pre každý kultivar musia byť jednotlivé postupy najskôr optimalizované na rozdiel od biolistickej metódy transformácie. Hlavnými výhodami transformácie *A. tumefaciens* je nižšia integrácia kópií transgénu, vyššia efektivita a stabilita (Travella *et al.*, 2005).

V prípade jačmeňa je najpoužívanejším kultivárom pre transformáciu Golden Promise (Bartlett *et al.*, 2008). Jarný kultivar Golden Promise nie je dôležitý z poľnohospodárskeho hľadiska. V porovnaní s elitnými kultivarmi má nízky výnos, a taktiež je viac náchylný voči chorobám, najmä plesňového typu (Douchkov *et al.*, 2014). Golden Promise vznikol gama-žiarením indukovanou mutagenézou kultivaru Maythorpe (Forster, 2001). Predpokladá sa možný vznik mutácií, ktoré korespondujú s vysokou mierou transformácie. Zatiaľ nie je známy gén alebo gény zodpovedné za efektívnu transformáciu Golden Promise. Predpokladá sa, že by sa malo jednať o viac lokusovú záležitosť, čo predstavuje sťaženie prenosu týchto oblastí do iných kultivarov. Zvýšenie transformovateľnosti viacerých kultivarov je dôležité z poľnohospodárskeho aj vedeckého hľadiska.

Kandidátnymi lokusmi sú *TRAI* na chromozóme 3H, *TRA2* a *TRA3* na chromozóme 2H (Hisano *et al.*, 2017; Hisano *et Sato*, 2016). Orman-Ligeza *et al.* (2020) zistili, že lokus *TRAI* je zodpovedný za transformovateľnosť u jačmeňa prostredníctvom *A. tumefaciens* a zvyšné lokusy zohrávajú len minoritnú úlohu. V rámci tohto lokusu sa však nachádza 225 génov a viacero z nich je zapojených do procesu interakcie rastliny s patogénom. Každopádne bola publikovaná metóda transformácie jačmeňa prostredníctvom *A. tumefaciens* nezávislá od genotypu, ktorá využíva *in vitro* kultivované vajíčka (Ib *et al.*, 2008).

Ako už bolo spomínané, tak najvhodnejším materiálom pre transformáciu jačmeňa prostredníctvom *A. tumefaciens* sú nezrelé embryá kvôli ich vysokej regeneračnej schopnosti (Hu *et al.*, 2003). Celý proces vývoja transgéennej rastliny je časovo náročný. Dôležitý je zisk stabilnej homozygotnej línie. Samotný proces identifikácie transgénnych homozygotných rastlín vyžaduje časovo náročný skrining veľkého množstva rastlín v T1 a T2 generácii (Massiah *et al.*, 2001). Alternatívnym materiálom použitým pre transformáciu jačmeňa pomocou *A. tumefaciens* môžu byť rastlinné vajíčka a peľ (Holme *et al.*, 2006; Kumlehn *et al.*, 2006). Keďže sa jedná o bunky s haploidným genómom, tak umožňujú zisk transgéennej homozygotnej línie v krátkom časovom období. Ich prevod do diploidného homozygotného stavu je možný buď chemicky, používa sa mitotický jed kolchicín, alebo spontánne. Nevýhodou je hrubá bunková stena peľových zŕn, ktorá predstavuje fyzickú bariéru pre transformáciu, čo je spojené so značnou úrovňou stresu. Kumlehn *et al.* (2006) vyvinuli metódu transformácie peľových kultúr jačmeňa prostredníctvom *A. tumefaciens* na zimnom kultivare Igrí.

Účinnosť transformácie je možné zvýšiť na viacerých úrovniach. Pozitívny vplyv na transformáciu má zvýšenie citlivosti explantátu. V prípade jačmeňa sa používa vákuová infiltrácia a ultrazvuk, u ruže a kukurice zase odstredenie a tepelné upravenie nezrelých embryí (Shrawat *et al.*, 2007). Taktiež bolo zistené, že u *A. thaliana* došlo k zvýšeniu účinnosti transformácie zvýšenou expresiou génov pre histónové proteíny, ktoré sa podieľajú na ochrane transgénu (Tenea *et al.*, 2009). Každopádne je potrebné identifikovať a popísať funkciu génov zapojených do procesu regenerácie transformovaných rastlín, či zvýšeniu transformácie, a na základe toho prispôbiť proces transformácie danému kultivaru. Samotnou úpravou média je možné zlepšiť účinnosť regenerácie transformovanej rastliny, ale len u niektorých kultivarov. Bolo zistené, že prídavok pikloramu do média má lepší vplyv na regeneráciu obilnín ako používaná 2,4-dichlórphenoxyoctovákyselina (Barro *et al.*, 1999). Počet regenerujúcich rastlín je možné zvýšiť prídavkom tidiazurónu alebo kyseliny lipoitovej (antioxidant) (Dan *et al.*, 2009). Taktiež bolo zistené, že prídavok medi vedie k zdvojnásobeniu rýchlosti regenerácie (Bartlett *et al.*, 2008). Boli identifikované gény, ktoré ovplyvňujú regeneráciu rastlín *in vitro*, napríklad *ferredoxín-nitrit reduktáza (NIR)*, či gény zapojené do biosyntézy etylénu. Pridaním prekursoru etylénu, kyseliny 1-aminocyklopropánu karboxylovej, bola zvýšená regenerácia u kultivaru Morex, nie však u Golden Promise (Jha *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2005).

Ďalej bolo zistené, že nadmerná expresia génov *LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1)*, *LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2)*, *WUSCHEL (WUS)* a *BABY BOOM 5 (BBM5)* je spojená s výrazne lepšou

regeneráciou tkanivových kultúr vďaka vyššej tvorbe somatických embryí a regenerácii výhonkov. Taktiež bol popísaný efekt chimérneho proteínu GROWTH-REGULATING FACTOR 4 (GRF4) s kofaktorom GRF-INTERACTING FACTOR 1 (GIF1). Transkripčné faktory *GRF* kódujú proteín s konzervovanými doménami QLQ a WRC, ktoré sprostredkovávajú interakciu proteín-proteín a proteín-DNA. Proteín GRF interaguje s kofaktormi GIF (Kim *et al.*, 2003). Zvýšenie expresie *GRF4* a *GIF1* u *A. thaliana* sa prejavilo zväčšením plochy listov len vtedy, keď boli tieto dva gény exprimované spoločne, nie individuálne. Z toho vyplýva, že tieto dva proteíny spolu interagujú a táto interakcia pozitívne vplyva na veľkosť rastlinných orgánov (Debernardi *et al.*, 2014). Z týchto zistení vychádzali Debernardi *et al.* (2020) pri príprave konštruktu, v ktorom bol fúzny proteín GRF4-GIF1 exprimovaný zo spoločného ubikvitinového promotora. Pozorovali, že expresia fúzneho proteínu GRF4-GIF1 zvyšuje účinnosť a rýchlosť regenerácie transformovaných rastlín u pšenice, tritikále a ryže bez pridania cytokinínov do média (podpora embryogenézy). Kultivary pšenice Hahn a Cadenza, a u tritikále UC3190 nie sú za normálnych okolností schopné generovať transformované rastliny. Expresiou chimérneho GRF4-GIF1 bola zvýšená regenerácia transformovaných rastlín, vďaka čomu je možné využitie týchto kultivarov v rámci rôznych funkčných analýz, čo doposiaľ nebolo možné.

3.6 Transgénne plodiny s výhodnejšími vlastnosťami

Pokrok v oblasti technológií a genetického inžinierstva je významný aj pre potravinársky priemysel a poľnohospodárstvo. V tejto sfére bola vďaka cieľným úpravám genómu dôležitých hospodárskych plodín zaznamenaná zvýšená tolerancia voči abiotickým stresom, herbicídum, patogénom a taktiež bola zvýšená ich nutričná kvalita a výnos.

Zvýšená expresia génov, ktoré sú aktivované počas odpovede rastliny voči abiotickým stresom by mohlo zabezpečiť ich toleranciu voči klimatickým zmenám. Jedným z nich sú transkripčné faktory z rodiny drought-responsive element binding proteins (DREBs) / C-repeat binding factors (CBFs). Zvýšením ich expresie bola pozorovaná lepšia tolerancia voči stresom v mnohých plodinách, konkrétne v ryži (Oh *et al.*, 2007), sóji (Chen *et al.*, 2007), trávach (Zhao *et al.*, 2007, p. 1) a taktiež v jačmeni a pšenici (Morran *et al.*, 2011).

Kvôli plesňovým ochoreniam sú každý rok zaznamenávané výrazné straty vo výnose jednotlivých plodín. Problémom je rezistencia patogénov voči herbicídum, ktorá vedie k ich zvýšenému používaniu v poľnohospodárstve. Nadmerné používanie agrochemikálií má negatívny vplyv na životné prostredie a zdravie ľudí. Jedným z rastlinných patogénov je múčnatka (*Blumeria graminis*), ktorá počas interakcie so svojím hostiteľom spúšťa špecifickú odpoveď. Modifikáciou expresie génov zapojených v tomto procese by mohlo zvýšiť rezistenciu plodín voči múčnatke. Jedným z komponentov interakcie múčnatky s rastlinou je transmembránový proteín MLO. Bolo zistené, že absencia funkčného proteínu MLO znižuje prístupnosť patogénu k rastlinným bunkám (Consonni *et al.*, 2006). Predbežné výsledky u pšenice s umlčaným MLO proteínom viedli k zvýšeniu rezistencie voči múčnatke. Tento prístup

by tým pádom mohol byť aplikovaný aj u jačmeňa (Várallyay *et al.*, 2012). Medzi ďalším častým patogénom obilnín je vírus žltej zakrpatenosti (yellow dwarf virus, YDV). K zvýšeniu rezistencie sa používajú štandardné transgénne prístupy založené na umlčaní vírusovej RNA či nadprodukcii obalového proteínu účinné na jačmeni a ovse (Wang *et al.*, 2000). Pri používaní herbicídov na ničenie buriny môže dôjsť k poškodeniu samotnej plodiny kvôli jej nízkej rezistencii voči danému herbicídu. Gény pre acetolaktátsyntázu (*ALS1* a *ALS2*) predstavujú cieľ mnohých používaných herbicídov ako napríklad chlórsulfurónu. Preto bola pomocou CRISPR/Cas9 technológie generovaná mutácia v génoch *ALS1* a *ALS2*, ktorá zvýšila rezistenciu rastlín voči týmto herbicídum v prípade kukurice (Svitashev *et al.*, 2015), ryže (Sun *et al.*, 2016), sóje (Li *et al.*, 2015).

Zvýšenie kvality a úrody plodín predstavuje taktiež jeden z cieľov genetického inžinierstva v posledných rokoch. Štúdie sú zamerané na zmenu pomeru jednotlivých zložiek zrna ako napríklad škrobu, ktorý sa skladá z amyulózy a amylopektínu. Škrob sa u väčšiny kultivarov jačmeňa skladá z 20–30% amyulózy a 70–80% amylopektínu. Bolo zistené, že podiel amyulózy v škrobe koreluje s obsahom rezistentného škrobu (Shrestha *et al.*, 2010). Tento škrob je rezistentný voči enzymatickej hydrolýze a preto je namiesto degradácie v žalúdku fermentovaný až v hrubom čreve anaeróbnymi baktériami. Rezistentný škrob pomáha zvyšovať citlivosť buniek na inzulín, znižovať hladinu cukru v krvi, zlepšovať metabolizmus a celkovo disponuje priaznivými účinkami na ľudské zdravie. Kvôli týmto dôvodom je snaha zvyšovať obsah rezistentného škrobu v zrne. V prípade pšenice došlo umlčaním enzýmov podieľajúcich sa na rozvetvení škrobu k zvýšeniu obsahu amyulózy v škrobe (Sestili *et al.*, 2010). U ryže boli gény *SBE1* a *SBE1b* v ryži mutované pomocou CRISPR/Cas9, pričom výsledná rastlina disponovala zvýšeným podielom amyulózy (Sun *et al.*, 2017, p.). Metódy genetického inžinierstva, predovšetkým CRISPR našiel široké využitie v oblasti poľnohospodárstva a potravinárskeho priemyslu. Pomocou tejto technológie je pokrok rýchlejší, jednoduchší, presnejší a pravdepodobne aj menej nákladný ako pomocou tradičných metód.

4 Materiál a metódy

4.1 Biologický materiál

- *Hordeum vulgare*: kultivary Igri, Antonella, Morex a Golden Promise. Mutagenizované semená kultivaru Antonella (M₂ populácia) boli poskytnuté Prof. Dr. Marii von Korff (Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Kolín nad Rýnom, Nemecko). Tieto semená boli mutagenizované mutagénom ENU v dvoch rôznych dávkach (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).
- *Escherichia coli* MAX Efficiency Stbl2 (Chemically Competent; Invitrogen kat. č.10268019)

Tabuľka 1: Prehľad použitých kultivarov s ich rastovým typom

Názov kultivaru	Rastový typ
Igri	Ozimina
Antonella	Ozimina
Morex	Jarina
Golden Promise	Jarina

4.2 Použité chemikálie, súpravy a roztoky

Použité chemikálie

- 6× DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, kat.č. R0611)
- Agaróza (Top-Bio, kat. č. P045)
- AgeI-HF (New England Biolabs, kat. č. R3552S)
- AscI (New England Biolabs, kat. č. R0558S)
- Cut Smart (New England Biolabs, kat. č. B7204S)
- Diluent A (New England Biolabs, kat. č. B8001S)
- EDTA (kyselina ehylendiamintetraoctová) (Sigma-Aldrich, kat.č. E5134)
- Hydroxid sodný perly p.a. (Lach-ner, kat.č. 10006-AP2)
- Karbenicilín (Duchefa Biochemie kat. č. C0109.0025)
- Marker molekulovej hmotnosti GeneRuler 1 kb+ (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM1333)
- *MspI* (New England Biolabs, kat. č. R0106L)
- Ethidium bromid (Top-Bio, kat.č. P047)
- *SbfI*-HF (New England Biolabs, kat. č. R0642L)
- Sterilná voda
- Tris (Sigma-Aldrich, kat.č. T1503)

Použité komerčné kity

- CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, kat. č. K1232)
- HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis Biodne, kat. č. 01-02-00500)
- NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs, kat. č. E2621L)
- NucleoSpin® Plant II kit (Macherey-Nagel, kat. č. 740770)
- PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara, kat. č. R050A)
- Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, kat. č. M0491S)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, kat. č. 27104)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, kat. č. 28704)
- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K1632)
- *Taq* DNA polymeráza (Top-Bio, kat.č. T032)

Použité primery

Primery boli dodávané v lyofilizovanej podobe firmou Integrated DNA Technologies, Inc. (USA). Primery boli najskôr stočené na stolnej centrifúge a následnej boli rozpustené v uvedenom množstve nuclease-free vody pre získanie zásobnej koncentrácie $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následne boli v novej 1,5ml mikroskúmavke zriedené na pracovnú koncentráciu $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (riedenie 10×). Konkrétne sekvencie primerov použitých v rámci diplomovej práce sú uvedené v kapitole 4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovanie postupy.

Použité vektory

Mapy vektorov sú súčasťou príloh.

- pvo120
- pjet1.2/blunt
- pKGWFS7,0

Zoznam použitých programov a databázy

- Geneious 8.1.9 - <https://www.geneious.com/>
- SnapGene - <https://www.snapgene.com/>
- BioEdit - <https://bioedit.software.informer.com/>
- MEGA X - <https://www.megasoftware.net/>

Zoznam použitých roztokov:

Roztoky používané pre agarózovú gélovú elektroforézu:

50× TAE (Tris-Acetat-EDTA) pufor (1 liter):

242 g Tris rozpustiť v 800 ml destilovanej vode, potom pridať 57,1 ml 99% kyseliny octovej, 100 ml 0,5 mol·l⁻¹ EDTA (pH 8) a doplniť destilovanou vodou do 1000 ml.

0,5 mol mol·l⁻¹ EDTA (pH 8, 1 liter):

186,1 g EDTA rozpustiť v 800 ml destilovanej vody, pH upraviť na hodnotu 8 prídavkom NaOH. Destilovanou vodou následne doplniť objemu 1000 ml a sterilizovať filtráciou.

1× TAE pufor (1 liter):

naliať 20 ml 50x TAE pufru do nádoby a doplniť destilovanou vodou do objemu 1000 ml.

1% (w/v) agarózový gél pre elektroforézu (100 ml):

navážiť 1 g agarózy a zmiešať so 100 ml 1× TAE pufru. Roztok rozvrieť v mikrovlnnej rúre, nechať vychladnúť, pridať 1 µl ethidium bromidu, dôkladne premiešať a naliať do elektroforetickej komôrky. Vložiť elektroforetický hrebienok a nechať stuhnúť.

Roztoky a média používané pre prácu s baktériami:

Luria Bertani (LB) médium (pH 7):

zmiešať 10 g peptónu, 5 g kvasničného autolyzátu a 15 g NaCl. Následne rozpustiť v 800 ml destilovanej vody a pH upraviť na požadovanú hodnotu (pH 7) prídavkom KOH. Destilovanou vodou doplniť do objemu 1000 ml a sterilizovať autoklávaním. Pre prípravu tuhého média s konečnou koncentráciou 1,5% sa pridáva 15 g agaru na 1000 ml média.

Karbenicilín (100 mg·ml⁻¹):

navážiť 100 mg karbenicilínu a rozpustiť v 1 ml sterilnej destilovanej vody.

4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Analytické váhy A200S (Sartorius)
- Automatické pipety (Nichipet EX Plus)
- Centrifúga Jouan BR4i, úhlový rotor AM 50C.13 (Thermo Fisher Scientific)
- Centrifúga MiniStar Silverline (VWR)
- Digitálne predvážky (Shinko Denshi)
- Elektroforetická komora so zdrojom napätia (Bio-Tech)
- Homogenizátor MM301 (Retsch)

- Illumina iseq system (Illumina)
- Laminárny box MSC 1.2 Advantage (Thermo Fisher Scientific)
- Mikrovlnná rúra EMN (Zanussi 2015)
- NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, program ND-1000 V3.8.1 (Thermo Fisher Scientific)
- Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)
- Súprava pre horizontálnu gélovú elektroforézu (Bio-Rad)
- Termostat BT 120M
- Termostatová trepačka (Thermo Fisher Scientific)
- Thermocycler C1000 Touch™ (Bio-Rad, USA)
- Thermoshaker, Cooling Thermal Shake Touch (VWR)
- Transiluminátor InGenius LHR (Syngene), program GeneSnap (Syngene)
- Vodná kúpeľ (Julabo, TW8)
- Sekvenátor 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovanie postupy

4.4.1 Klonovanie génu *VRN-H1* z kultivaru Igrí

4.4.1.1 Izolácia celkovej genomickej DNA

Celková genomická DNA bola izolovaná z kultivaru Igrí. DNA bola izolovaná z približne 2 cm dlhých mladých listov. Rastlinný materiál bol vždy umiestnený do 2ml mikroskúmavky s tromi sklenenými guľčkami s priemerom 2 mm. Skúmavky boli následne zmrazené pomocou tekutého dusíka. Rastlinný materiál bol následne homogenizovaný v homogenizátore MM301 (Retsch, Nemecko) pri 27 Hz po dobu 3 min. Následná izolácia a purifikácia DNA prebiehala pomocou komerčnej súpravy NucleoSpin® Plant II kit (Macherey-Nagel) podľa návodu výrobcu. Koncentrácia izolovanej DNA bola následne stanovená pomocou spektrofotometra NanoDrop One Microvolume UV-Vis. Izolovaná DNA bola skladovaná v mraziaku pri -20 °C.

4.4.1.2 Reverzná transkripcia

Komplementárna DNA (cDNA) bola prepísaná pomocou metódy reverznej transkripcie (RT-PCR) z RNA ($1,7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) izolovanej a prečistenej Mgr. Katarínou Lahnerovou. Pre syntézu cDNA bol použitý kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit, pričom zloženie reakcie je uvedené v Tabuľke 2. Reakcia 1 bola napipetovaná do 0,2ml mikroskúmavky a následne inkubovaná pri 65 °C po dobu 5 min. Po uplynutí doby inkubácie bola mikroskúmavka premiestnená do ľadovej triešte, kde k nej boli pridané jednotlivé komponenty reakcie 2. Syntéza cDNA prebiehala pri 42 °C po dobu 1 hod.

Tabuľka 2: Zloženie reakčnej zmesi pre prepis RNA do cDNA pri procese RT-PCR.

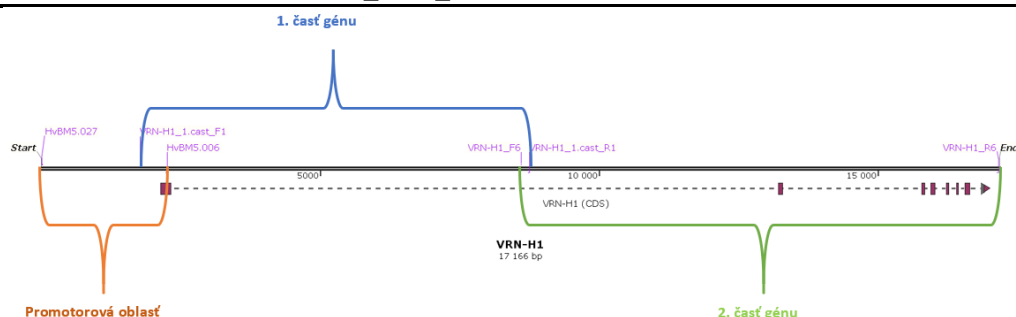
	Látka	Výsledná koncentrácia	Objem v 1 reakcii [μl]
Reakcia 1 (12 μl)	Izolovaná RNA, 1,7 μg·l ⁻¹	-	3
	Oligo (dT) ₁₈ primer, 100 μmol·l ⁻¹	5 μmol·l ⁻¹	1
	Nuclease-free water	-	8
Reakcia 2 (8 μl)	Reaction Buffer, 5×	1×	4
	RiboLock RNase Inhibitor, 20 U·l ⁻¹	1 U·l ⁻¹	1
	dNTP Mix, 10 mmol·l ⁻¹	1 mmol·l ⁻¹	2
	RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, 200 U·l ⁻¹	10 U·l ⁻¹	1
Celkový objem			20

4.4.1.3 Príprava fragmentov pomocou polymerázovej reťazovej reakcie

Gén *VRN-H1* má u ozimných kultivarov veľkosť cez 17 kb. Kvôli veľkosti bol gén *VRN-H1* amplifikovaný pomocou 3 párov primerov, pričom amplikony sa navzájom prekrývali. Gén *VRN-H1* bol rozdelený na promotorovú oblasť, prvú a druhú časť génu. Sekvencia primerov, pomocou ktorých prebiehala amplifikácia jednotlivých častí génu *VRN-H1*, taktiež kódujúcej sekvencie (coding sequence, *CDS*) *VRN-H1* génu a podmienky reakcie sú uvedené v tabuľkách 3–10. Pozície primerov na géne *VRN-H1* sú schematicky zobrazené na Obrázku 11.

Tabuľka 3: Sekvencia použitých primerov pri amplifikácii *VRN-H1* génu a *CDS VRN-H1* za účelom klonovania.

Oblasť <i>VRN-H1</i> génu	Názov primeru	Sekvencia (5' → 3')
Promotor	HvBM5.027	AGGCCTATTCGTTTGCAATGC
	HvBM5.006	ATCTCGTGCGCCTTCTTGAG
1. Časť génu	VRN-H1_1.cast_F1	GATTTGGGGAAAGCAATATGGG
	VRN-H1_1.cast_R1	GAACAGAGATGTGGTTTTTCACG
2. Časť génu	VRN-H1_F6	ATGCTGAGTGATACGAAGTGTGTA
	VRN-H1_R6	GCAGCTTGCTACTTTACTCTGATTT
<i>CDS</i>	VRN-H1_CDS_F2	ATGGGGCGCGGGAAGGTGCAG
	VRN-H1_CDS_R3	TCAGCCGTTGATGTGGCTCACCATC



Obrázok 11: Schematicky znázornené pozície jednotlivých primerov, pomocou ktorých sú amplifikované jednotlivé časti génu *VRN-H1* u kultivaru Igrí. Pomocou páru primerov HvBM5.027 a HvBM5.006 je amplifikovaná promotorová oblasť. Párom primerov VRN-H1_1.cast_F1 a VRN-H1_1.cast_R1 je amplifikovaná 1. časť génu a 2. časť génu *VRN-H1* je amplifikovaná pomocou VRN-H1_F6 a VRN-H1_R6. Jednotlivé časti sa navzájom prekrývajú za účelom skladania sekvencie zo sekvenovania a ich spájania (metóda Gibson Assembly).

Tabuľka 4: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre amplifikáciu promotorovej oblasti génu *VRN-H1* pomocou primerov HvBM5.027 a HvBM5.006 a Q5 High-Fidelity DNA Polymerase.

Látka	Výsledná koncentrácia	Objem v 1reakcii [μl]
Q5 Reaction Buffer 5×	1×	5
dNTPs, 10 mmol·l ⁻¹	200 μmol·l ⁻¹	0,5
Forward primer, 10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	1,25
Reverse primer 10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	1,25
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, 2U·μl ⁻¹	0,02 U·μl ⁻¹	0,25
Templát (BAC 631P8)	10 ng·μl ⁻¹	1
Sterilná destilovaná voda	-	15,75
Celkový objem		25

Tabuľka 5: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu promotorovej oblasti génu *VRN-H1* pomocou Q5 High-Fidelity DNA Polymerase.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	98	30 s	1×
Denaturácia	98	10 s	
Annealing	67	30 s	35×
Elongácia	72	2:30 min	
Záverečná elongácia	72	2 min	1×

Tabuľka 6: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre amplifikáciu 1. časti génu *VRN-H1* pomocou primerov VRN-H1_1.cast_F1 a VRN-H1_1.cast_R1, a 2. časti génu *VRN-H1* pomocou primerov VRN-H1_F6 a VRN-H1_R6 a prostredníctvom PrimeSTAR GXL DNA Polymerase.

Látka	Výsledná koncentrácia	Objem v 1 reakcii [μl]
Prime STAR GXL Buffer, 5×	1×	10
dNTPs, 2 mmol·l ⁻¹	160 μmol·l ⁻¹	4
Forward primer, 10 μmol·l ⁻¹	0,2 μmol·l ⁻¹	1
Reverse primer 10 μmol·l ⁻¹	0,2 μmol·l ⁻¹	1
PrimeSTAR GXL DNA polymerase, 1,25 U·μl ⁻¹	0,025 U·μl ⁻¹	1
Templát (genomická DNA)	50 ng·μl ⁻¹	-
Sterilná destilovaná voda	-	-
Celkový objem		50

Tabuľka 7: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu 1.časti génu *VRN-H1* pomocou PrimeSTAR GXL DNA Polymerase.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Denaturácia	98	10 s	
Annealing	55	15 s	35 ×
Elongácia	68	7:15 min	

Tabuľka 8: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu 2.časti génu *VRN-H1* pomocou PrimeSTAR GXL DNA Polymerase.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Denaturácia	98	10 s	35 ×
Annealing a elongácia	68	10 min	

Tabuľka 9: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre amplifikáciu *CDS VRN-H1* pomocou primerov VRN-H1_CDS_F2 a VRN-H1_CDS_R3 a HOT FIREPol DNA Polymerase.

Látka	Výsledná koncentrácia	Objem v 10 reakciách[μl]
Buffer B1, 5×	1×	15
MgCl ₂ , 25 mmol·l ⁻¹	2,6 mmol·l ⁻¹	10,5
dNTPs, 2 mmol·l ⁻¹	300 μmol·l ⁻¹	15
Forward primer, 10 μmol·l ⁻¹	0,4 μmol·l ⁻¹	4
Reverse primer 10 μmol·l ⁻¹	0,4 μmol·l ⁻¹	4
HOT FIREPol, 5 U·μl ⁻¹	0,03 U·μl ⁻¹	1
Templát (cDNA)	10 ng·μl ⁻¹	-
Sterilná destilovaná voda	-	-
Celkový objem		150

Tabuľka 10: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu *CDS VRN-H1* pomocou HOT FIREPol DNA Polymerase.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	95	15 min	1×
Denaturácia	95	10 s	35×
Annealing	60	40 s	
Elongácia	72	1 min	1×
Záverečná elongácia	72	10 min	

4.4.1.4 Kontinuálna horizontálna elektroforetická separácia v agarózovom géle

Agarózová elektroforéza bola použitá pre overenie prítomnosti očakávaného PCR produktu. V prípade detekcie promotorovej oblasti génu *VRN-H1* a *CDS* bol použitý 1,2% (w/v) agarózový gél a v prípade 1. a 2. časti génu bol použitý 0,8% (w/v) agarózový gél. Pre stanovenie veľkosti separovaných fragmentov DNA bol použitý GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Jednotlivé vzorky boli zmiešané s adekvátnym množstvom 6× DNA Loading Dye. Elektroforéza prebiehala pri izbovej teplote pri 5 V/cm po dobu 1 hod v 1×TAE pufre. Pomocou UV transiluminátoru InGenius LHR (Syngene) boli separované fragmenty vizualizované a vyfotené.

4.4.1.5 Extrakcia amplifikovanej DNA z gélu

Po elektroforetickej separácii boli fragmenty DNA extrahované z gélu za účelom získania koncentrovaného a purifikovaného produktu bez nešpecifických fragmentov. Z gélu bol pod UV svetlom pomocou sterilného skalpela vyrezaný agarózový bloček s PCR produktom. Bloček bol umiestnený do zväženej 2ml mikroskúmavky. Následná extrakcia prebiehala podľa manuálu

komerčne dodávaného QIAquick Gel Extraction Kit. Koncentrácia DNA extrahovanej z gélu bola stanovená fluorimetricky pomocou Qubit 3.0 Fluorometer.

4.4.1.6 Ligácia fragmentov DNA

Gén *VRN-H1* bol rozdelený na promotor, prvú a druhú časť, a taktiež bola syntetizovaná cDNA *VRN-H1* z RNA za účelom klonovania. Jednotlivé časti boli amplifikované pomocou vysokošpecifických DNA polymeráz zanechávajúce tupé konce. Jednotlivé PCR produkty boli extrahované z gélu a následne boli ligované do vektoru pJET1.2/blunt. Tento vektor je dodávaný už linearizovaný, takže nie je potrebné jeho štiepenie pomocou restikčnej endonukleázy. Pre zvýšenie úspešnosti ligácie bol použitý molárny pomer purifikovaného PCR produktu a vektoru 5:1. Reakčná zmes bola pripravená podľa Tabuľky 11. Ligácia prebiehala cez noc pri 16 °C.

Tabuľka 11: Reakčná zmes pro ligáciu purifikovaného PCR produktu a linearizovaného vektoru pjet1.2/blunt.

Látka	Množstvo	Objem v 1 reakcii [μl]
Reaction Buffer, 2×	1×	10
Purifikovaný PCR produkt	0,25 pmol	-
pJET1.2/blunt, 50 ng·μl ⁻¹	0,05 pmol	1
Nuclease-free voda	-	-
T4 DNA ligáza, 5 U·μl ⁻¹	5 U	1
Celkový objem		20

4.4.1.7 Transformácia baktérií *Escherichia coli* metódou teplotného šoku

Chemokompetentné bunky *E. coli*, MAX Efficiency Stbl2 sú uchovávané v 1,5ml mikroskúmavke po 100 μl v mraziaku pri -80 °C. Baktérie boli vybrané z mraziaku, umiestnené na ľad, kde pomaly rozmrzali. K baktériám bolo následné pridané príslušné množstvo ligačnej zmesi (10 μl). Táto zmes bola inkubovaná 30 min na ľade. Po uplynutí doby inkubácie boli mikroskúmavky umiestnené do termobloku (42 °C) na 45 s a následne premiestnené na 2 min späť na ľad. K zmesi bolo pridaných 800 μl tekutého LB média a následne boli premiestnené na stolnú trepačku, kde prebiehala inkubácia pri 37 °C minimálne 1 hod pri 300 rpm.

Medzitým boli pripravené v laminárnom boxe Petriho misky s LB médiom a antibiotikom karbenicilínom. Antibiotikum sa pridáva do dostatočne vychladnutého média tak, aby jeho výsledná koncentrácia v médiu bola 100 μg·ml⁻¹. Takto pripravené médium bolo v laminárnom boxe rozliate na Petriho misky (približne 25 ml na Petriho misku).

Baktérie boli po skončení inkubácie centrifugované pri 6000 rpm 3 min. V laminárnom boxe bol odpipetovaný supernatant a baktérie boli resuspendované v 100 μl tekutého LB média. Baktérie boli napipetované na pripravené Petriho misky s LB médiom obsahujúcim príslušné antibiotikum a rozotreté pomocou sterilnej hokejky. Petriho misky boli následne inkubované cez noc v termostate pri 37 °C.

Úspešnosť ligácie a transformácia bola overená pomocou tzv. colony PCR a *Taq* DNA polymerázy s použitím primerov špecifických pre klonovanú oblasť.

4.4.1.8 Príprava glycerolových bakteriálnych zásobných kultúr a izolácia plazmidovej DNA

Pozitívne bakteriálne kolónie boli následne umiestnené do skúmavky s 5 ml tekutého LB média so selekčným antibiotikom (karbenicilín, koncentrácia $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Skúmavky s baktériami v tekutom médiu boli následne umiestnené na trepačku, kde boli kultivované cez noc pri 37°C a 220 rpm. Na ďalší deň prebiehala izolácia plazmidu a príprava glycerolových bakteriálnych zásobných kultúr. Najskôr bolo z každej bakteriálnej kultúry odobraných 750 μl do novej 1,5ml mikroskúmavky so zátkom. K bakteriálnej kultúre bolo následne pridaných 750 μl 30% glycerolu a mikroskúmavka bola niekoľkokrát prevrátená. Takto pripravené bakteriálne kultúry s glycerolom boli následne zamrazené pomocou tekutého dusíku a skladované v mraziaku pri -80°C .

Zo zvyšku bakteriálnej kultúry bol izolovaný plazmid pomocou QIAprep Spin Miniprep Kit a príslušného manuálu výrobcu. Koncentrácia izolovaných plazmidov bola stanovená spektrofotometricky pomocou NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer.

Úspešnosť ligácie a transformácie bola overená pomocou kontrolnej PCR s použitím špecifických pJET1.2 forward a reverse sequencing primerov. Sekvencia týchto primerov je: forward 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3', reverse 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'. Zloženie PCR reakčnej zmesi a podmienky reakcie sú rovnaké ako pri amplifikácii jednotlivých fragmentov.

Pripravené konštrukty boli sekvenované na platforme Illumina technickou pracovníčkou na pracovisku Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci. Získané sekvencie boli následne overené a analyzované pomocou programu Geneious 8.1.9.

4.4.1.8 Gibson Assembly

Pomocou metódy Gibson Assembly boli pripravené konštrukty s reportérovým génom kódujúcim enzým β -glukuronidázu (GUS). Konkrétne boli pripravené dva konštrukty: *ProVRN-H1::CDS:GUS* a *ZmUbi::CDS:GUS*.

Štiepenie vektoru pVO120

Za účelom prípravy konštruktu *ProVRN-H1::CDS:GUS* bol vektor pVO120 štiepený pomocou restriktívnych enzýmov *AgeI* a *AscI*. V prípade konštruktu *ZmUbi::CDS:GUS* bol vektor pVO120 štiepený pomocou *AgeI* a *SbfI*. Počas reakcie došlo k vyštiepeniu určitej časti vektoru a jeho linearizácii. Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v Tabuľke 12. V oboch prípadoch prebiehalo štiepenie 1 hod pri 37°C . Štiepenie bolo overené pomocou gélovej elektroforézy a naštiepený vektor bol následne extrahovaný z gélu podľa postupu uvedenom v kapitole 4.4.1.5 Extrakcia amplifikovanej DNA z gélu.

Tabuľka 12: Parametre enzymatického štiepenia vektoru pVO120 pomocou restričných endonukleáz.

Látka	Množstvo	Objem v 1 reakcii [μl]
pVO120	500 ng	-
Cut Smart, 10×	1×	2,5
Nuclease-free voda	-	-
Restričný enzým	10 U	1
Celkový objem		25

Príprava fragmentov s presahmi pomocou polymerázovej reťazovej reakcie

Za účelom prípravy konštruktov *ProVRN-H1::CDS:GUS* a *ZmUbi::CDS:GUS* boli jednotlivé fragmenty amplifikované pomocou Q5 High-Fidelity DNA Polymerase a príslušných primerov, vďaka ktorým boli vytvorené komplementárne presahy. Ako templát pre amplifikáciu jednotlivých fragmentov slúžili konštrukty pripravené v rámci diplomovej práce. Sekvencie príslušných primerov, zloženie reakčných zmesí a podmienky reakcií sú uvedené v Tabuľkách 13–15. Po prebehnutí PCR reakcie boli jednotlivé fragmenty extrahované z gélu podľa postupu uvedenom v kapitole 4.4.1.5 Extrakcia amplifikovanej DNA z gélu.

Tabuľka 13: Sekvencia použitých primerov za účelom vytvorenia komplementárnych presahov na jednotlivých fragmentoch, ktoré boli amplifikované z príslušných konštruktov pomocou Q5 High-Fidelity DNA Polymerase za účelom klonovania.

Fragment	Názov primeru	Sekvencia (5' → 3')
<i>ProVRN-H1</i>	GA_prom_fw	GCCCACCTGCTCATGATCGGAGGCCTATTCGTTTGCAATGC
(pJET1.2_ <i>ProVRN-H1</i>)	GApromCDSR1	CAGCTGCACCTTCCCGCGCCCCATCTCCGCTCGAGG
	GApromCDSF1	ATGGGGCGCGGGAAGGTGCAGCTGAAGCG
<i>CDS</i>	VRN-H1_CDS_R4_dl	GCCGTTGATGTGGCTCACCATCCACAGTGGGAAGC
(pJET1.2_ <i>CDS</i>)	GA_CDS_F1*	GTTGTTTGGTGTACTTCCTGCAATGGGGCGCGGGAAGGTGCAG
<i>GUS</i>	GA_CDS_F2	GATGGTGAGCCACATCAACGGCATGTTACGTCTGTAGAAACC
(pKGWFS7,0)	GA_CDS_R3	TCTCGAGGGAGACCACCGGTCATTGTTGCCTCCCTGCTGC

*použitý pre amplifikáciu *CDS* spoločne s VRN-H1_CDS_R4_dl v prípade prípravy konštruktov *ZmUbi::CDS:GUS*

Tabuľka 14: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre amplifikáciu jednotlivých fragmentov s komplementárnymi presahmi za účelom klonovania pomocou Q5 High-Fidelity DNA Polymerase.

Látka	Výsledná koncentrácia	Objem v 10 reakciách [μl]
Q5 Reaction Buffer 5×	1×	5
dNTPs, 10 mmol·l ⁻¹	200 μmol·l ⁻¹	0,5
Forward primer, 10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	1,25
Reverse primer 10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	1,25
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, 2 U·μl ⁻¹	0,02 U·μl ⁻¹	0,25
Templát	10 ng·μl ⁻¹	1
Q5 High GC Enhancer 5×	1×	5
Sterilná destilovaná voda	-	10,75
Celkový objem		25

Tabuľka 15: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu jednotlivých fragmentov s komplementárnymi presahmi za účelom klonovania pomocou Q5 High-Fidelity DNA Polymerase.

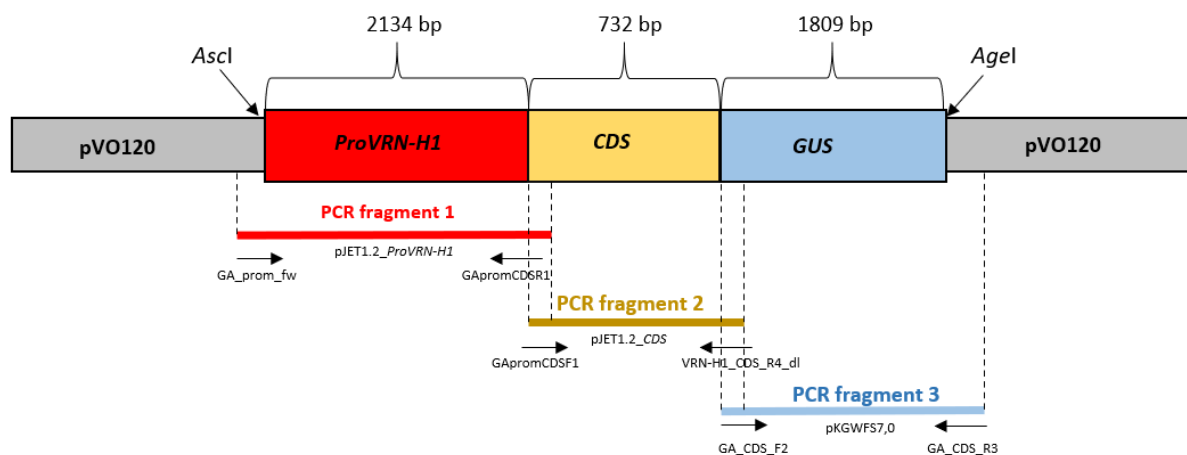
Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	98	30 s	1×
Denaturácia	98	10 s	
Annealing	67	30 s	35×
Elongácia	72	1 min/ kb	
Záverečná elongácia	72	2 min	1×

Gibson Assembly

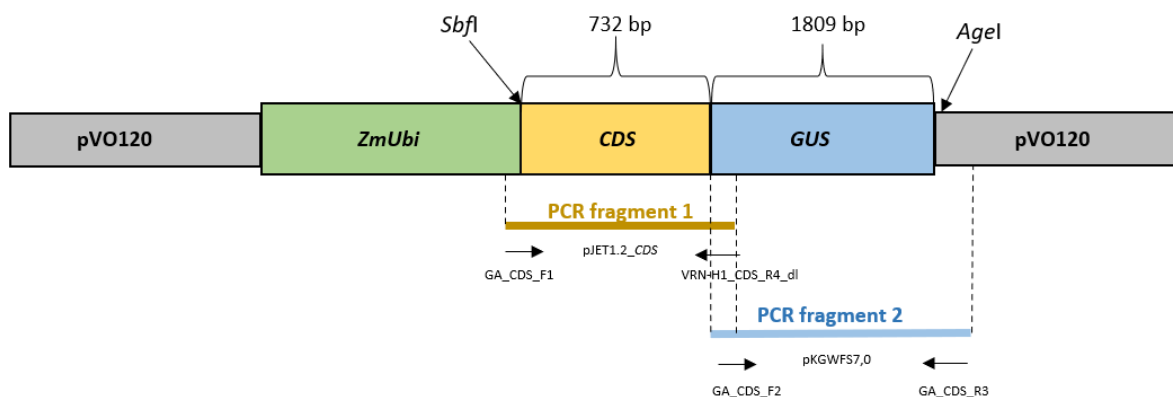
Pomocou metódy Gibson Assembly boli pripravené konštrukty *ProVRN-H1::CDS:GUS* a *ZmUbi::CDS:GUS* nasledovným spôsobom. Najskôr bola pripravená reakčná zmes, v ktorej boli jednotlivé fragmenty s komplementárnymi presahmi spojené so štiepeným vektorom pVO120 v presne definovanom poradí pomocou NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix. Jednotlivé purifikované fragmenty boli v molárnom nadbytku vzhľadom k vektoru (pomer 3:1). Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v Tabuľke 16. Reakcia prebiehala pri 50 °C 2 hod. Výsledné konštrukty a ich príprava je schematicky znázornená na Obrázku 12 a 13.

Tabuľka 16: Zloženie jednotlivých komponentov reakcie Gibson Assembly s uvedenou koncentráciou použitých fragmentov a vektoru.

Látka	<i>ProVRN-H1::CDS:GUS</i>				<i>ZmUbi::CDS:GUS</i>		
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix [μ l]	10				10		
Fragmenty	Vektor	Promotor	<i>CDS</i>	<i>GUS</i>	Vektor	<i>CDS</i>	<i>GUS</i>
Objem [μ l]	3	1	0,7	0,5	2,2	0,5	0,5
Koncentrácia [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	25	108	70	260	43	100	260
Nuclease-free voda [μ l]	4,8				6,8		
Celkový objem [μ l]	20				20		



Obrázok 12: Schematicky znázornený princíp zloženia finálneho konštruktu *ProVRN-H1::CDS:GUS*.



Obrázok 13: Schematicky znázomený princíp zloženia finálneho konštrukt *ZmUbi::CDS:GUS*.

Pripravenou reakčnou zmesou boli následne transformované kompetentné baktérie *E. coli*, MAX Efficiency Stbl2 podľa postupu uvedenom v 4.4.1.7 Transformácia baktérií *Escherichia coli* metódou teplotného šoku. Bakteriálne kolónie boli následne overené pomocou tzv. colony PCR. Z pozitívnych bakteriálnych kolónii bol následne vyizolovaný plazmid a pripravené glycerolové zásobné kultúry podľa postupu uvedenom v 4.4.1.8 Príprava glycerolových bakteriálnych zásobných kultúr a izolácia plazmidovej DNA. Pripravené konštrukty boli sekvenované na platforme Illumina technickou pracovníčkou na pracovisku Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci. Získané sekvencie boli následne overené a analyzované pomocou programu Geneious 8.1.9.

4.4.2 Skrining mapovacej populácie jačmeňa siateho

4.4.2.1 Zisk a skrining mutovanej M_2 generácie

Na založenie mapovacej populácie boli použité chemicky mutagenizované semienka (ENU) 6 radového kultivaru Antonella. Celkovo bolo pomocou ENU mutagenizovaných 40 000 semien (M_0), pričom približne polovica bola mutagenizovaná dávkou mutagénu $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a druhá polovica dávkou $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Mutagenizáciou M_0 semien boli získaná generácia M_1 . Tieto semienka boli vysadené do pôdy. Počas ich generatívnej fázy boli samosprašované a z každej rastliny bolo odobrané jedno semienko za zisku M_2 generácie. Semená boli zozbierané po skupinách (batches), pričom celkom bolo zozbieraných 23 batches semien mutagenizovaných dávkou $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ENU a 17 batches dávkou $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Táto časť práce bola sprostredkovaná Prof. Dr. Mariou von Korff.

V rámci diplomovej práce boli všetky mutagenizované semienka (M_2) vysadené na jar za dlhého dňa na pole spoločne s nemutovanou kontrolou Antonelly (1.4.2020). Keďže sa jedná o ozimný kultivar jačmeňa, tak k tomu aby došlo ku kvitnutiu je potrebné pôsobenie chladu, ku ktorému už v tomto období nedochádzalo. Kandidátne rastliny boli potom tie, u ktorých bolo zaznamenané extrémne skoré kvitnutie bez vernalizácie. U týchto rastlín sa predpokladá mutácia niektorého z génov regulujúcich expresiu génu *VRN-H1*. Kandidátne rastliny boli označené (ATL_A a poradové číslo) a bol zaznamenaný dátum

metania. Metanie predstavuje proces rastu posledného stebelného článku nesúceho na svojom vrchole klas. Fenotypicky je identifikované ako vyčnievanie polovice klasu z pošvy praporcového listu. Taktiež bol určený počet dní od prvej manipulácie so semenami (vysadenia populácie) po metanie do tabuľky. Do tabuľky bol taktiež zaznamenaný pozorovaný počet radov a odnoží. Z kandidátnych rastlín boli zozbierané všetky semenka zvlášť z jednotlivých klasov (M_3), a taktiež listy na izoláciu DNA.

4.4.2.2 Overenie kandidátov na úrovni genotypu (genotypovanie vybraných génov kvitnutia)

Zo všetkých kandidátnych rastlín bola izolovaná genomická DNA podľa postupu uvedenom v kapitole 4.4.1.1 Izolácia celkovej genomickej DNA. Koncentrácia extrahovanej DNA bola stanovená spektrofotometricky pomocou NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer a DNA bola skladovaná v mraziaku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pomocou metódy PCR bolo overené, či nedošlo ku kontamináciám jarnými kultivarmi Morex a Golden Promise, ktoré boli v predchádzajúcej sezóne pestované na rovnakom mieste. Taktiež bolo overené, či nedošlo v priebehu mutagenézy k narušeniu niektorého z hlavných génov zapojených v procese kvitnutia. Konkrétne sa jednalo o gény vernalizačnej dráhy, *VRN-H1* a *VRN-H2* (jednotlivo testované *ZCCT-Ha*, *ZCCT-Hb* a *ZCTT-Hc*), a hlavný gén fotoperiodickej dráhy, *Ppd-H1*. Sekvencia primerov a podmienky reakcie sú uvedené v Tabuľkách 17–19. Po PCR amplifikácia fragmentu génu *Ppd-H1* nasledovalo jeho enzymatické štiepenie pomocou restriktívnej endonukleázy *MspI* za nižšie uvedeníých podmienok (vid' Tabuľka 20, cez noc, pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Produkty PCR amplifikácie boli vizualizované, po prebehnutí elektroforetickej separácie v 1,5% (w/v) agarózovom géle s prídavkom EtBr v $1\times\text{TAE}$ pufre pri 5 V/cm po dobu 1 hod, pomocou UV transiluminátoru InGenius LHR (Syngene). V prípade amplifikácie *VRN-H1* pomocou 3. páru primerov a restriktívnom štiepení fragmentov *Ppd-H1* prebehla elektroforetická separácia v 2% (w/v) agarózovom géle s prídavkom EtBr v $1\times\text{TAE}$ pufre pri 5 V/cm, 2 hod.

Tabuľka 17: Zoznam a sekvencia primerov publikovaných pre analýzu génov *VRN-H1*, *VRN-H2* a *Ppd-H1*.

Gén	Názov primeru	Sekvencia primeru (5' → 3')	Teplota annealingu primerov [°C]	Zdroj
<i>VRN-H1</i>				
1. pár	HvBM5A-intronI-F3b	CTTGCATGTGTTGTCGGTCT	60	Cockram <i>et al.</i> , 2009
	HvBM5A-intronI-R3b	GCTGGGACAAGACTCTACGG		
3. pár	HvBM5A-exon2-F1	TCCCAAGAAAACCTGAACAACACCAG	60	Cockram <i>et al.</i> , 2009
	HvBM5Aexon2-R1	ATTAGGTTACATCATTTCGACCA		
<i>Ppd-H1</i>	Jones5F	GATGGATTCAAAGGCAAGGA	60	Jones <i>et al.</i> , 2008
	Jones5R	CGTTAGAGCCCTGCTTCATC		
<i>VRN-H2</i>				
<i>ZCCT-Ha</i>	ZCCTH.14F	CAAGGAATATCAAGTACATATCTGC	53	Szűcs <i>et al.</i> , 2007
	ZCCTH.19R	CCGTATTTATTGAGTTGGTGGTG		
<i>ZCCT-Hb</i>	ZCCTb.8F	GCATCAATGCACCCTACCTCTT	53	Szűcs <i>et al.</i> , 2007
	ZCCTb.11R	GGAAAACAATGGTGAGAGTAGTACAG		
<i>ZCCT-Hc</i>	ZCCT.HcF	CACCATCGCATGATGCAC	64	Yan <i>et al.</i> , 2006
	ZCCT.HcR	TCATATGGCGAAGCTGGAG		
<i>HvSNF2</i>	HvSNF2.01F	CCTGAAGCGAGTATCCATATGC	53, 64	von Zitzewitz <i>et al.</i> , 2005
	HvSNF2.04R	GCTGCATTATAGAGAAACAACAACG		

HvSNF2 – pozitívna kontrola

Tabuľka 18: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre amplifikáciu špecifických oblastí génov *VRN-H1*, *VRN-H2*, *Ppd-H1* pomocou *Taq* DNA polymerázy.

Látka	Výsledná koncentrácia	Objem v 1 reakcii [µl]
Reakčný pufo, 10× s obsahom MgCl ₂ , 15 nmol·l ⁻¹	1×	2
dNTPs, 10 mmol·l ⁻¹	200 µmol·l ⁻¹	0,4
Forward primer, 10 µmol·l ⁻¹	0,5 µmol·l ⁻¹	1
Reverse primer 10 µmol·l ⁻¹	0,5 µmol·l ⁻¹	1
<i>Taq</i> DNA polymeráza 5 U·l ⁻¹	0,125 U·l ⁻¹	0,5
Templát (genomická DNA)	50 ng·µl ⁻¹	-
Sterilná destilovaná voda	-	-
Celkový objem		20

Tabuľka 19: Teplotný program PCR cycleru pre amplifikáciu špecifických oblastí génov *VRN-H1*, *VRN-H2*, *Ppd-H1* pomocou *Taq* DNA polymerázy.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	94	5 min	1×
Denaturácia	94	30 s	
Annealing	-*	45 s	35×
Elongácia	72	1 min	
Záverečná elongácia	72	10 min	1×

* teplota annealingu pre jednotlivé páry primerov je uvedená v Tabuľke 17.

Tabuľka 20: Parametre enzymatickej reakcie pri použití restričkej endonukleázy *MspI* pre štiepenie amplifikovaného fragmentu génu *Ppd-HI* pomocou primerov Jones5F + R.

Látka	Výsledná koncentrácia	Objem v 1 reakcii [μ l]
DNA*	100 ng	-
Cut Smart, 10 \times	1 \times	1
Nuclease-free voda	-	-
<i>MspI</i> , 2 U $\cdot\mu$ l	2 U	1
Celkový objem		10

*Koncentrácia PCR produktov bola stanovená spektrofotometricky NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer

4.4.3 Analýza sekvenčných motívov a konštrukcia fylogenetickej príbuznosti *VRN-HI* génov

V prípade sekvenčnej analýzy génu *VRN-HI* sa pracovalo s celogenómovými nukleotidovými sekvenciami 20 kultivarov jačmeňa osekvenovaných v rámci projektu Pan-Genome (Jayakodi *et al.*, 2020). Anotovaná sekvencia kultivaru Strider (AY750993.1) bola stiahnutá internetovej databáze GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a predstavovala v rámci analýzy referenčnú sekvenciu. V rámci diplomovej práce bol sekvenovaný gén *VRN-HI* kultivaru Antonella (okrem promotora), ktorý bol taktiež analyzovaný. Ďalej boli stiahnuté súbory s celogenómovými sekvenciami v podobe pseudomolekúl vo formáte fasta (Jayakodi *et al.*, 2020). Zo pseudomolekuly, ktorá reprezentovala chromozóm 5H bola extrahovaná sekvencia génu *VRN-HI* u jednotlivých kultivarov na základe identifikácie prvého a posledného (ôsmeho exónu) pomocou anotovanej sekvencie kultivaru Strider. Sekvencia génu *VRN-HI* vrátane promotrovej oblasti bola u 20 kultivarov vyextrahovaná a ďalej sa pracovalo len s touto oblasťou. Zoznam mien kultivarov spoločne s rastovým typom je uvedený v Tabuľke 21. Sekvencie génov *VRN-HI* 21 kultivarov boli porovnané s referenčnou sekvenciou kultivaru Strider pomocou MAFFT multiple aligner (verzia 1.3.3) v softvéri Geneious 8.1.9 (<https://www.geneious.com>) podľa predvoleného nastavenia. Po zhotovení alignmentu genómovej sekvencie bola extrahovaná *CDS* génu *VRN-HI*. Následne bol zhotovený alignment rovnako ako v prípade genómovej sekvencie génu *VRN-HI*. Extrahovaná sekvencia *CDS* bola následne preložená do proteínovej sekvencie. Alignment proteínovej sekvencie bol zhotovený vyššie popísaným spôsobom. V rámci sekvenčnej analýzy boli identifikované konzervované motívy a popísané polymorfizmy medzi jednotlivými kultivarmi. Za účelom fylogenetickej analýzy bol zhotovený alignment génu *VRN-HI* (vrátane promotora) z 22 kultivarov v programe MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) pomocou Clustal W. Fylogenetický strom bol skonštruovaný pomocou metódy Maximum Likelihood a Tamura-Nei modelu (Tamura *et Nei*, 1993) v programe MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Tabuľka 21: Zoznam mien jednotlivých kultivarov vrátane rastového typu a zdroja sekvencie, ktoré boli použité v rámci sekvenčnej analýzy génu *VRN-H1*.

Názov kultivaru	Rastový typ	Zdroj	Názov	Rastový typ	Zdroj
Antonella	Ozimný		Akashinriki	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020
Strider	Ozimný	AY750993.1	Barke	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020
Igri	Ozimný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020	Golden Promise	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020
HOR3081	Ozimný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020	Hockett	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020
HOR3365	Ozimný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020	HOR7552	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020
HOR21599	Ozimný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020	HOR8148	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020
ZDM02064	Ozimný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020	HOR9043	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020
OUN333	Fakultatívny	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020	HOR10350	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020
B1K-04-12	Ozimný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020	HOR13942	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020
HOR13821	Ozimný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020	RGT_Planet	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020
Morex	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020	ZDM01467	Jarný	Jayakodi <i>et al.</i> , 2020

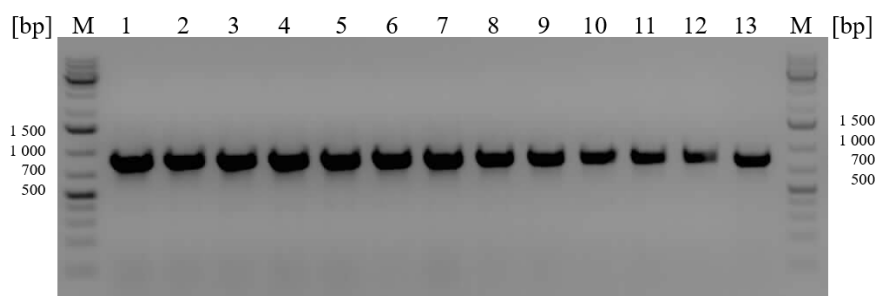
5 Výsledky

5.1 Klonovanie génu *VRN-H1* z kultivaru Igri

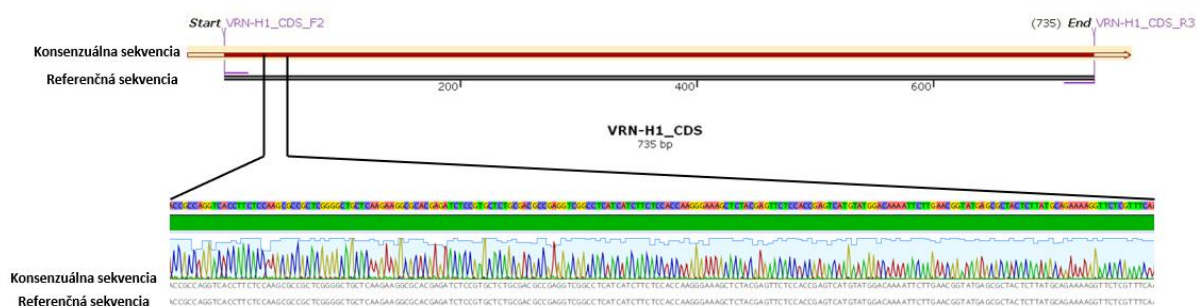
Jedným z cieľov diplomovej práce je amplifikácia a následné klonovanie génu *VRN-H1*. Postup pri klonovaní jednotlivých fragmentov bol nasledovný. Najskôr boli fragmenty amplifikované pomocou primerov a vysokošpecifickej DNA polymerázy. Produkt PCR reakcie bol separovaný pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a extrahovaný z gélu pomocou QIAquick Gel Extraction Kit. Koncentrácia extrahovanej DNA bola stanovená fluorimetricky pomocou Qubit 3.0 Fluorometer. Následne bola pripravená ligačná zmes s vektorom pJET1.2/blunt. Po ligácii boli takto pripraveným vektorom transformované baktérie *E.coli* MAX Efficiency Stbl2 metódou teplotného šoku. Na ďalší deň boli bakteriálne kolónie overené pomocou tzv. colony PCR. Pozitívne baktérie boli zaočkované do tekutého LB média. Z takto pripravených kultúr boli na ďalší deň pripravené glycerolové zásobné kultúry a izolované plazmidy pomocou QIAprep Spin Miniprep Kit. Koncentrácia izolovaných plazmidov bola stanovená spektrofotometricky pomocou NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer. Správna veľkosť inzertu bola overená pomocou kontrolnej PCR so špecifickými pJET1.2 forward a reverse sequencing primerami. Po kontrolnej PCR boli overené plazmidy sekvenované v závislosti od dĺžky klonovaného fragmentu buď Sangerovým sekvenovaním alebo na platforme Illumina technikou pracovníčkou na pracovisku Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci. Získané sekvencie boli následne overené a analyzované pomocou programu Geneious 8.1.9. Zoznam pripravených modulov je sumarizovaný v Tabuľke 22.

Klonovanie *CDS VRN-H1* génu

Za účelom klonovania kódujúcej sekvencie génu *VRN-H1* bola najskôr izolovaná RNA prepísaná do cDNA. Následne bola cDNA génu *VRN-H1* amplifikovaná primerami VRN-H1_CDS_F2 a VRN-H1_CDS_R3, a pomocou HOT FIREPol DNA Polymerase. Produkty PCR (735 bp) boli separované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a extrahované z gélu. Koncentrácia extrahovanej DNA bola $153 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Ďalej sa pokračovalo podľa jednotlivých krokov uvedených v úvode kapitoly 5.1 Klonovanie génu *VRN-H1* kultivaru Igri. Produkty kontrolnej PCR (782 bp) boli separované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a vizualizované (Obrázok 14). V tomto prípade bola správnosť klonovanej *CDS* overená Sangerovým sekvenovaním (Obrázok 15) za použitia špecifických pJET1.2 forward a reverse sequencing primerov.



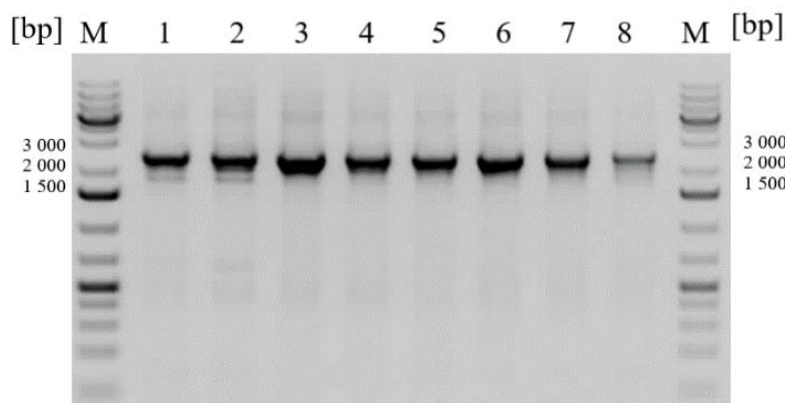
Obrázok 14: Detekcia produktov kontrolnej PCR plazmidov izolovaných z kolónií *E.coli* MAX Efficiency Stb12 transformovaných vektorom pJET1.2_CDS. Očakávaná veľkosť produktu je 782 bp. M – štandard molekulej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1 až 13 – dráhy amplicónov z plazmidov amplifikovaných zo špecifických primerov pJET1.2 forward a reverse sequencing primerov.



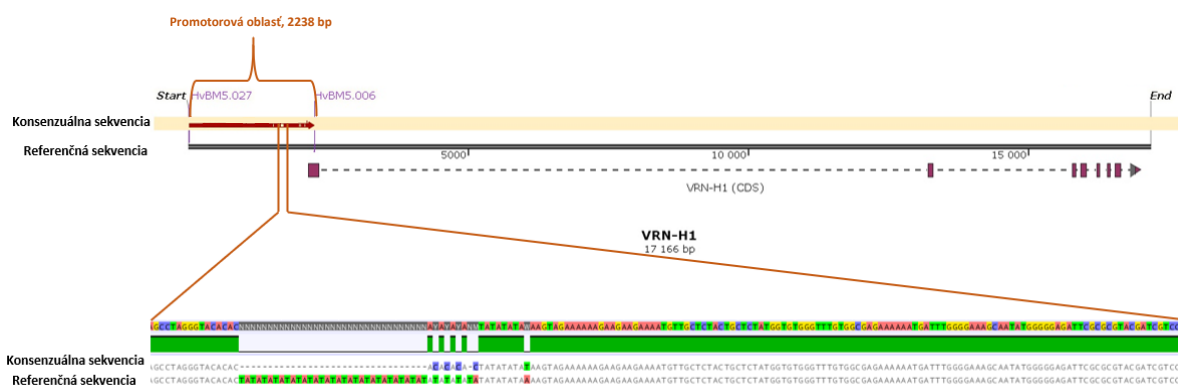
Obrázok 15: Sekvenčný alignment *CDS VRN-H1* s referenčnou sekvenciou (AY758235.1). Červená šípka zobrazuje *CDS VRN-H1* overenú Sangerovým sekvenovaním (konsenzuálna sekvencia). Biele miesta na koncoch sekvencie predstavujú oblasti, kde sa sekvencia nezhoduje. V tomto prípade sa jednalo o pJET1.2 forward a reverse sequencing primery. Referenčná sekvencia so zobrazenou pozíciou primerov (VRN-H1_CDS_F2 + VRN-H1_CDS_R3), ktorými bola *CDS VRN-H1* amplifikovaná za účelom klonovania je zobrazená ako čierny obdĺžnik. Toto porovnanie bolo vytvorené v programe SnapGene. Výsek sekvenčného alignmentu vytvorený v programe Geneious 8.1.9., v ktorom bol overený výsledok sekvenovania sa nachádza v dolnej časti schémy.

Klonovanie promotorovej oblasti *VRN-H1* génu

Promotorová oblasť bol amplifikovaná pomocou primerov HvBM5.027 + HvBM5.006 a Q5 High-Fidelity DNA Polymerase. Ako templát pre amplifikáciu promotoru z jarného kultivaru Morex slúžil BAC klon 631P8 z knižnice HVVMRXALLhA z génovej banky INRA-CNRGV v Toulouse. Promotorová oblasť bola najskôr amplifikovaná z genomického DNA ozimného kultivaru Igrí a jarného kultivaru Morex. Z dôvodu výskytu veľkého množstva nešpecifických produktov, ktoré nevyriešilo ani testovanie viacerých špecifických primerov, optimalizácia reakcie či reamplifikácia z produktu očakávanej veľkosti extrahovaného z gélu, bol práve ako templát pre amplifikáciu promotorovej oblasti zvolený BAC klon. Produkt očakávanej veľkosti (2238 bp) bol separovaný pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a extrahovaný z gélu ($173 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Ďalej sa pokračovalo podľa jednotlivých krokov uvedených v úvode kapitoly 5.1 Klonovanie génu *VRN-H1* kultivaru Igrí. Produkty kontrolnej PCR (2357 bp) boli separované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a vizualizované (Obrázok 16). Po kontrolnej PCR boli plazmidy sekvenované na platforme Illumina technickou pracovníčkou na pracovisku Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci (Obrázok 17).



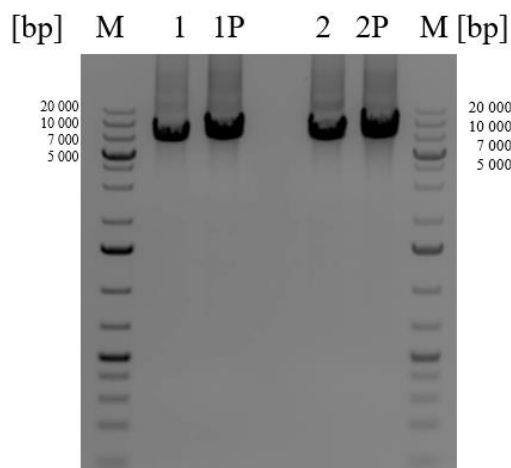
Obrázok 16: Detekcia produktov kontrolnej PCR plazmidov izolovaných z kolónií *E.coli* MAX Efficiency Stb12 transformovaných vektorom pJET1.2_*ProVRN-HI*. Očakávaná veľkosť produktu je 2357 bp. M – štandard molekulej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1 až 8 – dráhy amplifikónov z plazmidov amplifikovaných zo špecifických primerov pJET1.2 forward a reverse sequencing primerov.



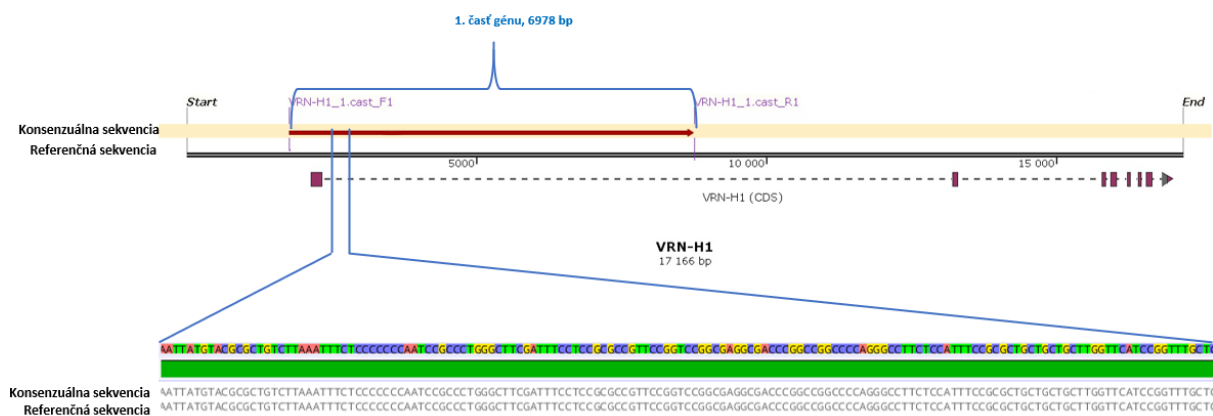
Obrázok 17: Sekvenčný alignment promotorovej oblasti *VRN-H1* s referenčnou sekvenciou *VRN-H1* kultivaru Igrí (extrahovaná z Jayakodi *et al.*, 2020). Červená šípka zobrazuje promotorovú oblasť *VRN-H1* overenú sekvenovaním na platforme Illumina (konsenzuálna sekvencia). Biele miesta predstavujú oblasti, kde sa sekvencia nezhoduje, v tomto prípade sa jednalo o SNP a taktiež oblasť mikrosatelitu, kde pravdepodobne došlo ku chybe čítania v rámci sekvenovania. Referenčná sekvencia so zobrazenou pozíciou primerov (HvBM5.027 + HvBM5.006), ktorými bola promotorová oblasť *VRN-H1* amplifikovaná za účelom klonovania je zobrazená ako čierny obdĺžnik. Toto porovnanie bolo vytvorené v programe SnapGene. Výšek sekvenčného alignmentu vytvorený v programe Geneious 8.1.9., v ktorom bol overený výsledok sekvenovania sa nachádza v dolnej časti schémy.

Klonovanie celého intaktného génu *VRN-H1*

Ako templát pre amplifikáciu jednotlivých častí *VRN-H1* slúžila genomická DNA izolovaná z kultivaru Igrí ($189,3 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$; čistota 260/280 1,87). Prvá časť *VRN-H1* génu bola amplifikovaná pomocou primerov VRN-H1_1.cast_F1 + VRN-H1_1.cast_R1 a PrimeSTAR GXL DNA Polymerase. Pomocou elektroforetickej separácie bola potvrdená amplifikácia 1. časti génu *VRN-H1* a produkt očakávanej veľkosti (6978 bp) bol následne extrahovaný z gélu ($332 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Ďalej sa pokračovalo podľa jednotlivých krokov uvedených v úvode kapitoly 5.1 Klonovanie génu *VRN-H1* kultivaru Igrí. Produkty kontrolnej PCR (7099 bp) boli separované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a vizualizované (Obrázok 18). Overené plazmidy boli sekvenované na platforme Illumina technickou pracovníčkou na pracovisku Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci (Obrázok 19).

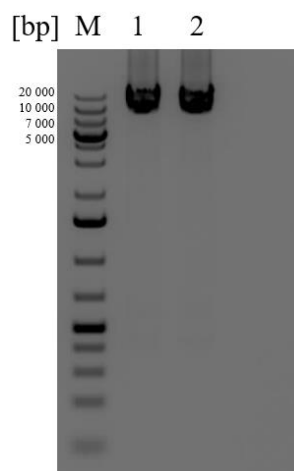


Obrázok 18: Elektroforetogram produktov kontrolnej PCR plazmidov izolovaných z kolónií *E.coli* MAX Efficiency Stb12 transformovaných vektorom pJET1.2_1.časťVRN-HI. Očakávaná veľkosť produktu v dráhach 1 a 2 je 6978 bp, a v dráhach 1P a 2P je 7099 bp. M – štandard molekulovej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1 a 2 – dráhy amplikónov z plazmidov amplifikovaných z primerov VRN-H1_1.cast_F1 + VRN-H1_1.cast_R1; 1P a 2P – dráhy amplikónov z plazmidov amplifikovaných zo špecifických primerov pJET1.2 forward a reverse sequencing primerov.

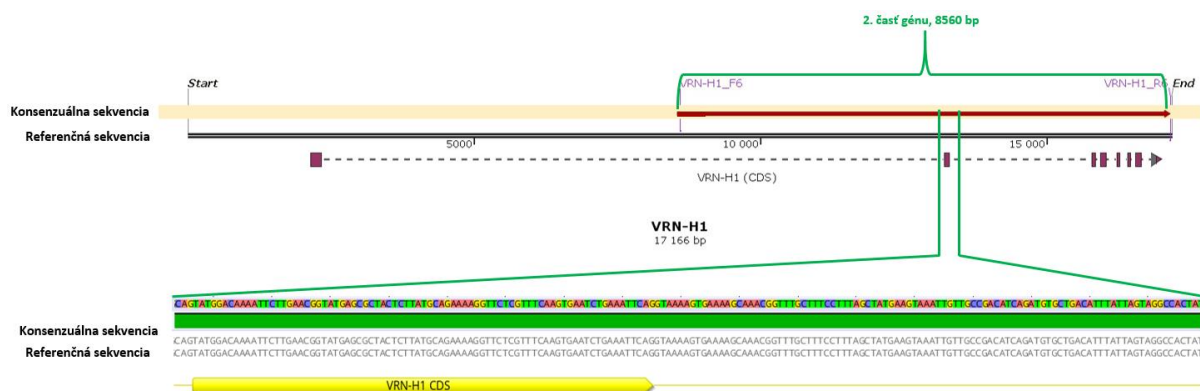


Obrázok 19: Sekvenčný alignment prvej časti génu *VRN-H1* s referenčnou sekvenciou *VRN-H1* kultivaru Igri (extrahovaná z Jayakodi *et al.*, 2020). Červená šípka zobrazuje prvú časť *VRN-H1* overenú sekvenovaním na platforme Illumina (konsenzuálna sekvencia). Referenčná sekvencia so zobrazenou pozíciou primerov (VRN-H1_1.cast_F1 + VRN-H1_1.cast_R1), ktorými bola táto časť *VRN-H1* amplifikovaná za účelom klonovania je zobrazená ako čierny obdĺžnik. Toto porovnanie bolo vytvorené v programe SnapGene. Výsek sekvenčného alignmentu vytvorený v programe Geneious 8.1.9., v ktorom bol overený výsledok sekvenovania sa nachádza v dolnej časti schémy.

Druhá časť génu *VRN-H1* bola amplifikovaná pomocou VRN-H1_F6 + VRN-H_R6 primerov a PrimeSTAR GXL DNA Polymerase. Amplifikácia tejto oblasti o veľkosti 8560 bp bola pomerne problematická. Po optimalizácii podmienok a reamplifikácii (rovnaké podmienky) sa nakoniec podarilo amplifikovať túto oblasť v dostatočnom množstve. Produkt očakávanej veľkosti (8560 bp) bol extrahovaný z gélu (102 ng·μl⁻¹). Ďalej sa pokračovalo podľa jednotlivých krokov uvedených v úvode kapitoly 5.1 Klonovanie génu *VRN-H1* kultivaru Igri. Produkty kontrolnej PCR (8679 bp) boli separované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a vizualizované (Obrázok 20). Overené plazmidy boli sekvenované na platforme Illumina technickou pracovníčkou na pracovisku Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci (Obrázok 21).



Obrázok 20: Elektroforetogram produktov kontrolnej PCR plazmidov izolovaných z kolónií *E.coli* MAX Efficiency Stb12, transformovaných vektorom pJET1.2_2.časťVRN-HI. Očakávaná veľkosť produktu je 8679 bp. M – štandard molekulej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1 a 2 – dráhy amplifikónov z plazmidov amplifikovaných zo špecifických primerov pJET1.2 forward a reverse sequencing primerov



Obrázok 21: Sekvenčný alignment druhej časti génu *VRN-H1* s referenčnou sekvenciou *VRN-H1* kultivaru Igrí (extrahovaná z Jayakodi *et al.*, 2020). Červená šípka zobrazuje druhú časť *VRN-H1* overenú sekvenovaním na platforme Illumina (konsenzuálna sekvencia). Referenčná sekvencia so zobrazenou pozíciou primerov (VRN-H1_F6 + VRN-H1_R6), ktorými bola táto časť *VRN-H1* amplifikovaná za účelom klonovania je zobrazená ako čierny obdĺžnik. Toto porovnanie bolo vytvorené v programe SnapGene. Výsek sekvenčného alignmentu vytvorený v programe Geneious 8.1.9., v ktorom bol overený výsledok sekvenovania sa nachádza v dolnej časti schémy.

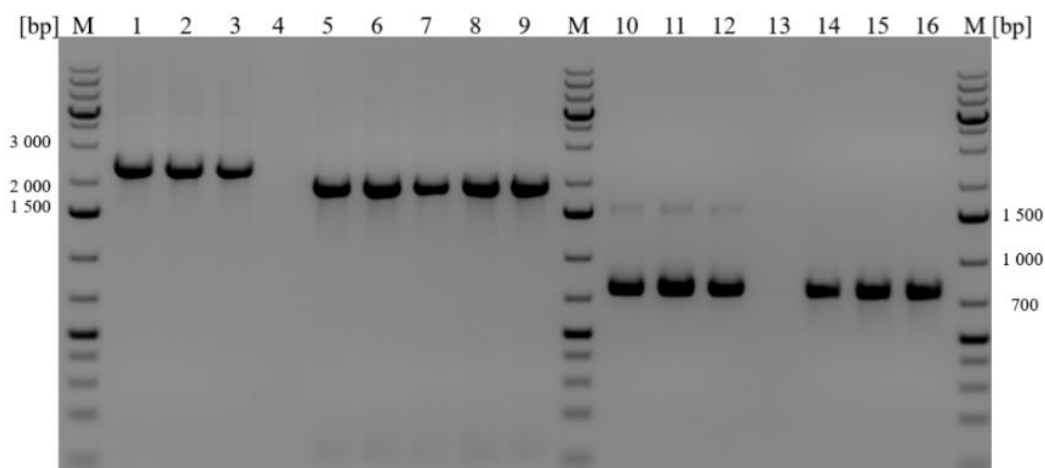
Tabuľka 22: Zoznam pripravených modulov za účelom ich spájania pomocou metódy Gibson Assembly.

Modul
pJET1.2_ProVRN-HI (jarný typ)
pJET1.2_CDS
pJET1.2 1.časťVRN-HI
pJET1.2 2.časťVRN-HI

Gibson Assembly

Pre prípravu konštruktov *ProVRN-HI::CDS:GUS* a *ZmUbi::CDS:GUS* bola v rámci diplomovej práce využitá metóda Gibson Assembly, ktorá pracuje na princípe spájania fragmentov v presne definovanom poradí na základe komplementarity v jednej izotermickej reakcii. Prvým krokom je príprava samotných fragmentov pomocou primerov, ktorými sú vytvorené komplementárne presahy medzi jednotlivými fragmentami a vektorom o dĺžke minimálne 20 bp. Fragmenty boli amplifikované

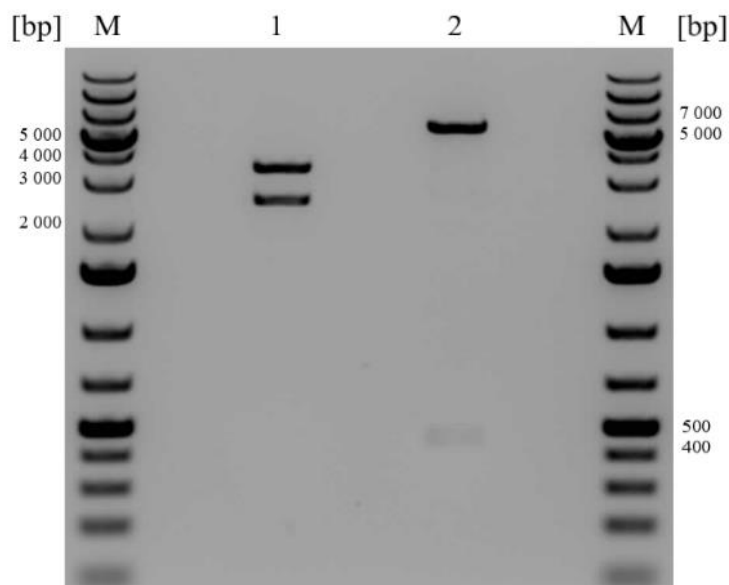
pomocou Q5 High-Fidelity DNA Polymerase. Po PCR amplifikácii boli jednotlivé fragmenty separované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a vizualizované (Obrázok 22). Pripravené fragmenty boli izolované z gélu pomocou QIAquick Gel Extraction Kit. Koncentrácia extrahovanej DNA bola stanovená fluorimetricky pomocou Qubit 3.0 Fluorometer. V prípade konštruktu *ProVRN-H1::CDS:GUS* bol promotor amplifikovaný z konštruktu pJET1.2_*ProVRN-H1* (jarný typ) pomocou primerov GA_prom_fw a GApromCDSR1 (2178 bp). Koncentrácia extrahovanej DNA z gélu bola 108 ng·µl⁻¹. *CDS VRN-H1* génu bola amplifikovaná z pJET1.2_*CDS* pomocou primerov GApromCDSF1 a VRN-H1_CDS_R4_dl (732 bp). Koncentrácia extrahovanej DNA z gélu bola 70 ng·µl⁻¹. Gén *GUS* bol amplifikovaný z vektoru pKGWFS7,0 pomocou primerov GA_CDS_F2 a GA_CDS_R3 (1850 bp). Koncentrácia extrahovanej DNA z gélu bola 260 ng·µl⁻¹. V prípade konštruktu *ZmUbi::CDS:GUS* bola *CDS VRN-H1* génu amplifikovaná pomocou primerov GA_CDS_F1 a VRN-H1_CDS_R4_dl z pJET1.2_*CDS* (755 bp). Koncentrácia extrahovanej DNA z gélu bola 100 ng·µl⁻¹. Výsledné konštrukty a ich príprava je schematicky znázornená na Obrázku 12 a 13 v podkapitole 4.4.1.8 Gibson Assembly.



Obrázok 22: Elektroforetogram pripravených fragmentov s komplementárnymi presahmi za účelom prípravy konštruktov *ProVRN-H1::CDS:GUS* a *ZmUbi::CDS:GUS* pomocou metódy Gibson Assembly. M – štandard molekulovej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1 až 3 – dráhy amplikónov pripravených z pJET1.2_*ProVRN-H1* (jarný typ) pomocou primerov GA_prom_fw a GApromCDSR1. Očakávaná veľkosť produktu je 2178 bp; 5 až 9 – dráhy amplikónov pripravených z pKGWFS7,0 pomocou primerov GA_CDS_F2 a GA_CDS_R3. Očakávaná veľkosť produktu je 1850 bp; 10 až 12 – dráhy amplikónov pripravených z pJET1.2_*CDS* pomocou primerov GA_CDS_F1 a VRN-H1_CDS_R4_dl. Očakávaná veľkosť produktu je 755 bp; 14 až 16 – dráhy amplikónov pripravených z pJET1.2_*CDS* pomocou primerov GApromCDSF1 a VRN-H1_CDS_R4_dl. Očakávaná veľkosť produktu je 732 bp; 4, 13 – prázdne dráhy.

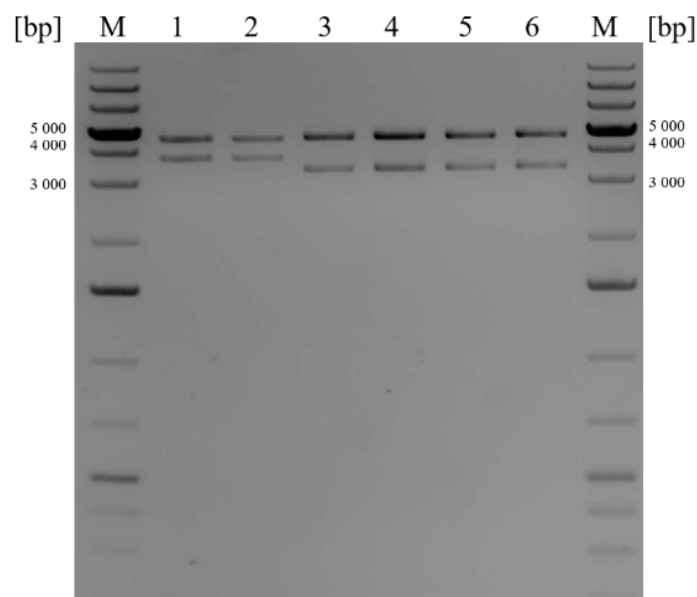
Nasledovala príprava a linearizácia vektoru. V prípade prípravy konštruktu *ProVRN-H1::CDS:GUS* bol vektor pVO120 štiepený pomocou restriktčných enzýmov *AgeI* a *AscI*. Pomocou týchto restriktčných enzýmov došlo k vystrihnutiu oblasti o veľkosti 2446 bp obsahujúcej promotor *ZmUbi* a gén pre *lacZ*. Následne bol tento linearizovaný vektor o veľkosti 3298 extrahovaný z gélu (25 ng·µl⁻¹). V prípade prípravy konštruktu *ZmUbi::CDS:GUS* bol vektor pVO120 štiepený pomocou *AgeI* a *SbfI*. V tomto prípade bola vystrihnutá oblasť o veľkosti 444 reprezentujúca gén

pre *lacZ*. Linearizovaný vektor o veľkosti 5300 bp bol extrahovaný z gélu ($42 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Restriktčné štiepené vektoru pVO120 je zobrazené na Obrázku 23.



Obrázok 23: Elektroforetogram restriktčného štiepenia vektoru pVO120 pomocou dvojice restriktčných enzýmov. M – štandard molekulovej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1 – vektor pVO120 štiepený pomocou *AgeI* a *AscI* (3298 bp a 2446 bp); 2 – vektor pVO120 štiepený pomocou *AgeI* a *SbfI* (5300 bp a 444 bp).

Následne bola pripravená reakčná zmes, v ktorej došlo k spojeniu jednotlivých fragmentov v presne definovanom poradí spoločne s vektorom ako je schematicky zobrazené na Obrázkoch 12 a 13 v podkapitole 4.4.1.8 Gibson Assembly. Jednotlivé fragmenty boli v molárnom nadbytku voči vektoru (pomer 3:1). Následne boli takto pripraveným vektorom transformované baktérie *E.coli* MAX Efficiency Stbl2 metódou teplotného šoku. Na ďalší deň boli bakteriálne kolónie overené pomocou tzv. colony PCR. Pozitívne baktérie boli zaočkované do tekutého LB média. Z takto pripravených kultúr boli na ďalší deň pripravené glycerolové zásobné kultúry a izolované plazmidy pomocou QIAprep Spin Miniprep Kit. Koncentrácia izolovaných plazmidov bola stanovená spektrofotometricky pomocou NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer. Pripravené konštrukty boli overené restriktčným štiepením (Obrázok 24). Konštrukt *ProVRN-H1::CDS:GUS* bol štiepený pomocou restriktčnej endonukleázy *AgeI* (4346 bp a 3627 bp) a konštrukt *ZmUbi::CDS:GUS* pomocou *AgeI* a *AscI* (4542 bp a 3298 bp). Úspešnosť metódy Gibson Assembly bola potvrdená sekvenovaním týchto konštruktov na platforme Illumina technickou pracovníčkou na pracovisku Ústavu experimentálnej botaniky AV ČR v Olomouci.



Obrázok 24: Restriktčné štiepenie izolovaných plazmidov *ProVRN-H1::CDS:GUS* a *ZmUbi::CDS:GUS* pripravených pomocou Gibson Assembly. M – štandard molekulej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1 a 2 – *ProVRN-H1::CDS:GUS* štiepený pomocou *AgeI* (4346 bp a 3627 bp); 4 až 6 – *ZmUbi::CDS:GUS* štiepený pomocou *AgeI* a *AscI* (4542 bp a 3298 bp).

Jednotlivé moduly pripravené v rámci diplomovej práce a konštrukty *ProVRN-H1::CDS:GUS* a *ZmUbi::CDS:GUS* sú uskladnené v mraziaku pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vo forme glycerolových zásobných kultúr. Tieto moduly budú použité pre prípravu plánovaných konštruktov a tie následne pre prípravu stabilných reportérových línií za účelom bližšieho štúdia mechanizmu vernalizácie.

5.2 Skrining mapovacej populácie jačmeňa siateho

Skrining mutovanej M₂ populácie jačmeňa siateho kultivaru Antonella

V rámci diplomovej práce bol v septembri v roku 2019 zvolený postup skriningu mutovanej M₂ populácie v kontrolovaných podmienkach. Celkovo bolo v skleníku vysadených 2 000 mutagenizovaných semien spoločne s nemutovanou kontrolou kultivaru Antonella. Tento postup bol však neefektívny z časového aj priestorového hľadiska a z tohto množstva vysadených rastlín bola identifikovaná len jedna kandidátna rastlina, ktorá vykvitla skôr ako kontrola. Táto kandidátna rastlina bola označená ako ATL_A41 a boli z nej odobrané len semená pre ďalšiu analýzu. Následne bol zvolený postup vysadenia zvyšných mutagenizovaných semien (40 000) spoločne s nemutovanou kontrolou kultivaru Antonella na pole pomocou agrotechniky na jar 1.4.2020. Jedná sa o ozimný kultivar, ktorý k iniciácii kvitnutia potrebuje dostatočne dlhé pôsobenie chladu. Počas tohto obdobia nebolo zaznamenané výrazne pôsobenie nízkych teplôt, ktoré by mohlo túto populáciu čiastočne vernalizovať. Ozimný kultivar Antonella je nositeľom recesívnej alely *vrn-H1*, dominantnej *VRN-H2* a recesívnej alely *ppd-H1* génu. Celkovo bolo zaznamenané skoré kvitnutie, resp. kvitnutie bez vernalizácie u 34 kandidátnych rastlín, pričom prví kandidáti začali kvitnúť už po 58 dňoch (vid' Tabuľka 23). U všetkých skorých kandidátov bol taktiež zaznamenaný počet odnoží. Kultivar Antonella má 6 radový klas, pričom u 3 troch kandidátov (ATL_A1, ATL_A2 a ATL_A3) bol pozorovaný 2 radový klas. Zo všetkých

kandidátov boli odobrané listy na izoláciu DNA zo stebľa s prvým klasom. Následne boli taktiež zozbierané jednotlivé klasy a z nich vylúpané semenka za účelom premnoženia a overenia fenotypu v kontrolovaných podmienkach.

Tabuľka 23: Identifikácia a fenotypovanie vybraných znakov u jednotlivých kandidátov mutagenizovanej populácie jačmenného kultivaru Antonelly. V tabuľke je u týchto kandidátov zaznamenaný dátum začiatku metania, počet dní, počet odnoží a radov.

Označenie kandidáta	Začiatok metania	Počet dní	Počet odnoží	Počet radov
ATL_A1	29.05.2020	58	2	2
ATL_A2	29.05.2020	58	1	2
ATL_A3	29.05.2020	58	1	2
ATL_A4	13.06.2020	73	2	6
ATL_A5	16.06.2020	76	1	6
ATL_A6	16.06.2020	76	1	6
ATL_A7	18.06.2020	78	2	6
ATL_A8	22.06.2020	82	4	6
ATL_A9	19.06.2020	79	_*	6
ATL_A10	19.06.2020	79	1	6
ATL_A12	19.06.2020	79	1	6
ATL_A13	19.06.2020	79	1	6
ATL_A14	19.06.2020	79	1	6
ATL_A15	19.06.2020	79	3	6
ATL_A16	19.06.2020	79	1	6
ATL_A17	19.06.2020	79	3	6
ATL_A18	19.06.2020	79	2	6
ATL_A19	26.06.2020	86	2	6
ATL_A20	26.06.2020	86	4	6
ATL_A21	26.06.2020	86	2	6
ATL_A22	26.06.2020	86	2	6
ATL_A23	26.06.2020	86	1	6
ATL_A24	26.06.2020	86	1	6
ATL_A25	26.06.2020	86	7	6
ATL_A26	26.06.2020	86	13	6
ATL_A27	26.06.2020	86	2	6
ATL_A28	27.06.2020	87	3	6
ATL_A28!	27.06.2020	87	3	6
ATL_A29	27.06.2020	87	2	6
ATL_A30	27.06.2020	87	1	6
ATL_A31	28.06.2020	88	1	6
ATL_A32	28.06.2020	88	4	6
ATL_A33	29.06.2020	89	1	6
ATL_A34	29.06.2020	89	2	6

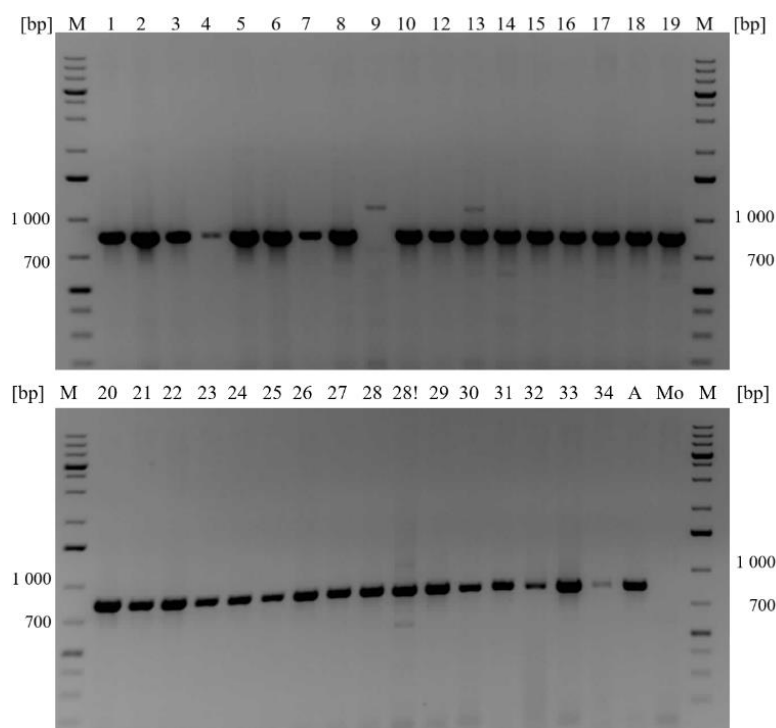
*klasy boli zničené

Overenie kandidátov na úrovni genotypu (genotypovanie vybraných génov kvitnutia)

Zo všetkých 34 kandidátov bola izolovaná DNA a koncentrácia izolovanej DNA bola stanovená spektrofotometricky pomocou NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer. Pomocou špecifických primerov boli testované hlavné gény zapojené do mechanizmu kvitnutia, konkrétne *VRN-H1*, *VRN-H2* a *Ppd-H1*. Bolo dôležité zistiť, či nedošlo ku kontaminácii jarnými kultivarmi Golden Promise a Morex, ktoré boli pestované na tom istom mieste v predchádzajúcej sezóne. Týmto spôsobom bolo taktiež overené, či nedošlo počas mutagenézy ENU k narušeniu niektorého z týchto génov, čo by mohlo byť dôvodom skorého kvitnutia. DNA izolovaná z jarných kultivarov Golden Promise a Morex, a ozimných Antonella a Igri bola použitá ako kontrolná DNA v jednotlivých reakciách.

Gén *VRN-H1*

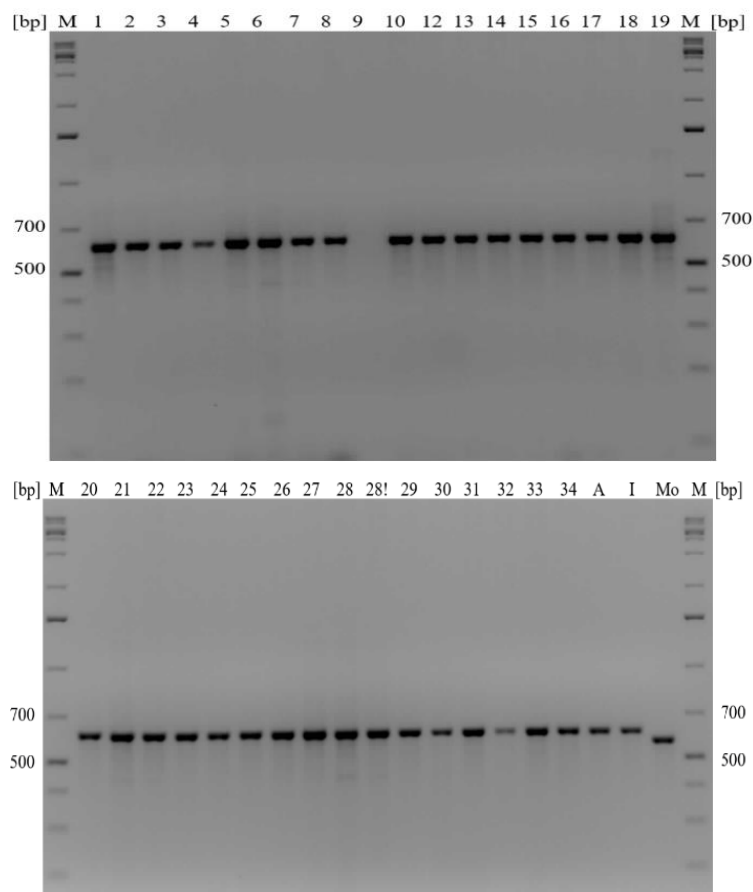
Na rozlíšenie dominantnej a recesívnej alely génu *VRN-H1* boli použité dva páry primerov (Cockram *et al.*, 2009). 1. pár primerov amplifikuje oblasť v rámci 1. intrónu, ktorá chýba u jarín a preto nie je na géle pozorovaný žiaden produkt a taktiež odlišuje dve ozimné alely *HvVRN1* (veľkosť PCR produktu 830 bp) a *HvVRN1-6* (344 bp). Bolo zistené, že 33 kandidátov je nositeľom recesívnej alely *vrn-H1* (Obrázok 25). Na základe veľkosti PCR produktu (830 bp) sa predpokladá, že Antonella je nositeľom alely *HvVRN1*. V prípade kandidáta ATL_A9 nebol detekovaný žiaden produkt, čo pravdepodobne v tomto prípade nenaznačovalo mutáciu v miestach *VRN-H1*, ale súvislo to s kvalitou izolovanej DNA.



Obrázok 25: Identifikácia jarnej a ozimnej alely génu *VRN-H1* u 34 kandidátov, Antonelly a Morexu pomocou 1. páru primerov. M – štandard molekulevej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1–34 – označenie kandidátnych rastlín; A – Antonella; Mo – Morex.

Tento pár primerov amplifikuje taktiež oblasť v rámci jarnej alely *HvVRNI-7* (830 bp), ktorá neobsahuje deléciu v 1. intróne ako zvyšné jarne alely, na ktoré cieľi 1. pár primerov. Pomocou špecifických primerov, ktoré amplifikujú transponovateľný element (488 bp) typický pre túto alelu by mohlo byť definitívne potvrdené, že kandidáti nie sú nositeľmi jarnej alely (absencia produktu). Za týmto účelom prebehla PCR analýza, pričom nebol detekovaný žiaden PCR produkt (výsledky nie sú uvedené). Tým pádom sa došlo k záveru, že nedošlo ku kontaminácii týmto kultivárom a kandidáti sú nositeľmi ozimnej alely *HvVRNI* (830 bp).

Gén *VRN-HI* bol overený pomocou 3. páru primerov. Tento pár primerov amplifikuje oblasť o veľkosti 616 bp, ktorá odpovedá prítomnosti MITE u alely *HvVRNI* (oziminy), a *HvVRNI-7* (jariny). U ozimnej alely *HvVRNI-6* nie je prítomný v tejto oblasti MITE a preto je veľkosť PCR produktu v tomto prípade 574 bp. Pomocou 3. páru primerov došlo u všetkých kandidátov (okrem ATL_A9), u kultivaru Antonella a Igrí (alela *HvVRNI*) k amplifikácii PCR produktu o veľkosti 616 bp. Jarň kultivar Morex nemá na tomto mieste MITE a preto bol detekovaný PCR produkt o veľkosti 574 bp (alela *HvVRNI-1*). Výsledok PCR amplifikácie je zobrazený na Obrázku 26.



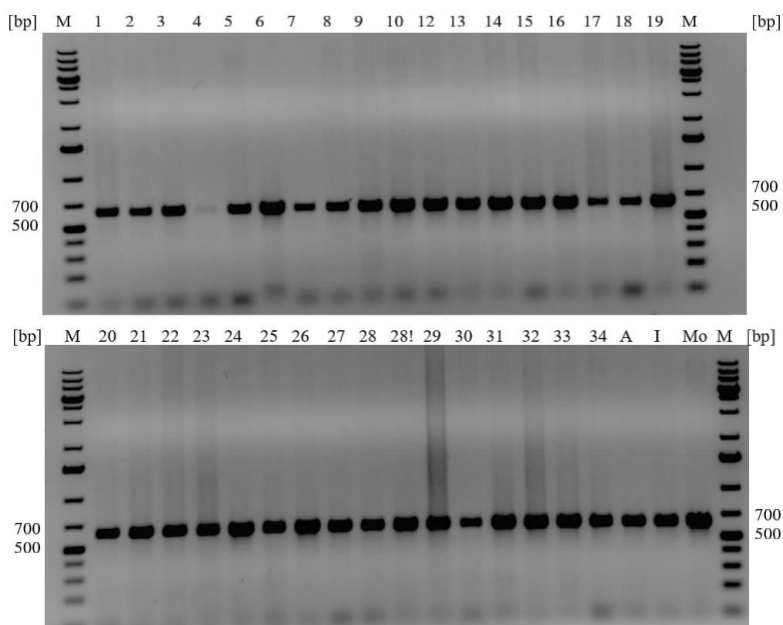
Obrázok 26: Identifikácia prítomnosti MITE elementu v rámci 1. intrónu alely *HvVRNI*, ktorej nositeľom je kultivar Antonella a Igrí pomocou 3. páru primerov. M – štandard molekulovej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1–34 – označenie kandidátnych rastlín; A – Antonella; I – Igrí; Mo – Morex.

Pomocou 1. a 3. páru primerov bolo zistené, že všetci kandidáti (okrem ATL_A9) sú nositeľmi alely *HvVRNI* a nedošlo ku kontaminácii jarňými kultivarmi Golden Promise a Morex.

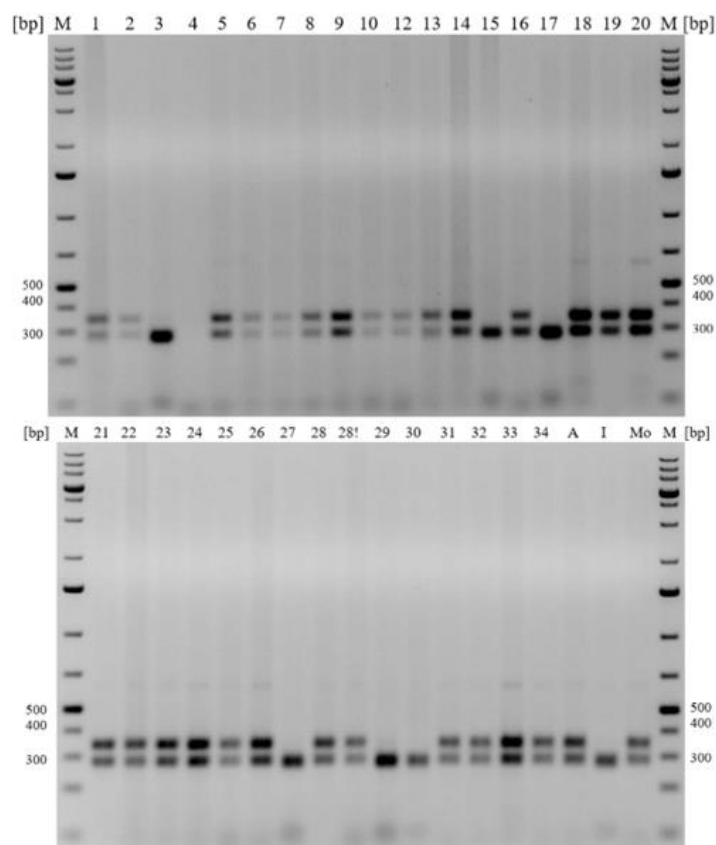
Gén *Ppd-H1*

Produkt génu *Ppd-H1* ovplyvňuje expresiu génu *VRN-H3*. U jačmeňa je dominantná alela *Ppd-H1* zodpovedná za skoré kvitnutie pri dlhom dni (citlivá voči dĺžke dňa) a naopak recesívna alela *ppd-H1* je zodpovedná za neskoré kvitnutie pri podmienkach dlhého dňa (necitlivá voči dĺžke dňa). Rastliny nesúce *ppd-H1* však vykvitnú aj pri podmienkach krátkeho dňa na rozdiel od tých, čo nesú dominantnú *Ppd-H1*.

Pomocou páru primerov Jones5-F a Jones5-R bol amplifikovaný fragment génu *Ppd-H1* o veľkosti 620 bp (Jones *et al.*, 2008). Tento úsek obsahuje SNP15 (C/T), ktorý spôsobuje zmenu aminokyseliny, kde namiesto prolínu (dominantný *Ppd-H1*, C) sa u recesívnej alely (T) vyskytuje serín. Taktiež dochádza u recesívnej alely k strate rekogničného miesta pre restriktívnu endonukleázu *MspI*. Po amplifikácii a následnom restriktívnom štiepení sú získané v prípade dominantnej alely 3 fragmenty o veľkosti 276, 269 a 70 bp. Restriktívnym štiepením recesívnej alely sú detekované dva fragmenty o veľkosti 276 a 339 bp. Oblasť o veľkosti 620 bp bola amplifikovaná u všetkých 34 kandidátov a kultivarov Antonella, Igri a Morex (Obrázok 27). Po restriktívnom štiepení tohto fragmentu pomocou *MspI* bolo zistené, že Antonella je nositeľom recesívnej alely *ppd-H1* a je teda necitlivá k dĺžke dňa. V prípade 6 kandidátov bola detekovaná dominantná alela *Ppd-H1* (ATL_A3, ATL_A15, ATL_A17, ATL_A27, ATL_A29 a ATL_A30). Igri je nositeľom dominantnej alely a Morex recesívnej alely. V prípade kandidáta ATL_4 nie sú detekované fragmenty po restriktívnom štiepení, čo pravdepodobne súvisí s kvalitou DNA (Obrázok 28).



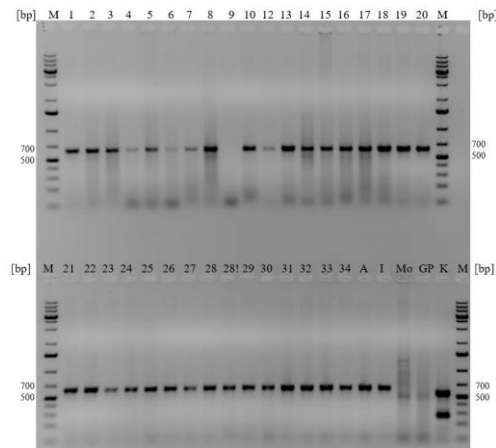
Obrázok 27: Amplifikácia 620 bp veľkej oblasti génu *Ppd-H1*, ktorej súčasťou je SNP15 (C/T) pomocou páru primerov Jones5-F+R u 34 kandidátov a kultivarov Antonella, Igri a Morex. M – štandard molekulevej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1–34 – označenie kandidátnych rastlín; A – Antonella; I – Igri; Mo – Morex.



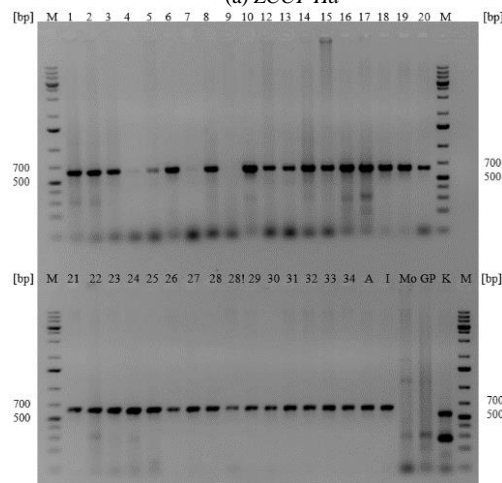
Obrázok 28: Restriktčné štiepenie PCR produktu o veľkosti 620 bp pomocou *MspI* u 34 kandidátov a kultivarov Antonella, Igri a Morex. M – štandard molekulovej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1–34 – označenie kandidátnych rastlín; A – Antonella; I – Igri; Mo – Morex.

Gén *VRN-H2*

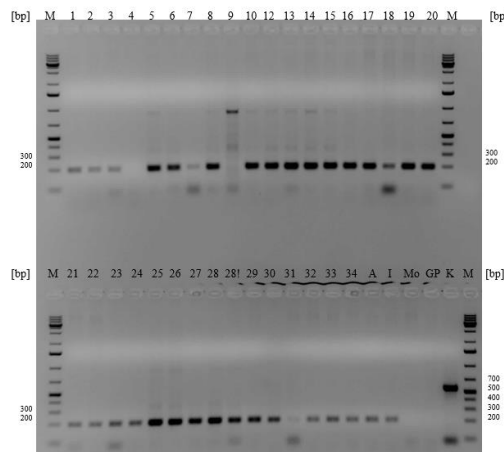
U kultivarov zimného typu boli identifikované 3 gény v rámci *VRN-H2* lokusu na chromozóme 4H u jačmeňa. Jedná sa o *ZCCT-Ha*, *ZCCT-Hb* a *ZCTT-Hc*, na ktoré boli navrhnuté špecifické páry primerov (Szűcs *et al.*, 2007, Yan *et al.*, 2006). Jariny sú nositeľmi recesívnej alely *vrn-H2*, kvôli deléciám vo všetkých 3 génoch *ZCCT-H* (*Ha*, *Hb* a *Hc*). Tým pádom nie je u jarného typu detekovaný PCR produkt. U všetkých 34 kandidátov, ozimných kultivarov Antonella a Igri boli detekované PCR produkty reprezentujúce jednotlivé gény *ZCCT-H* (*Ha*, *Hb* a *Hc*). U jarných kultivarov neboli detekované PCR produkty. Funkciu pozitívnej kontroly zohrával gén *HvSNF2*, ktorý leží blízko lokusu *VRN-H2* (veľkosť PCR produktu sa pohybovala medzi 500 a 700 bp, von Zitzewitz *et al.*, 2005). U 33 kandidátov bol identifikovaný dominantný, funkčný gén *VRN-H2*. Po PCR amplifikácii boli detekované produkty o veľkosti 600 bp reprezentujúce *ZCCT-Ha* a *ZCCT-Hb*, a produkty o veľkosti 200 bp pre *ZCTT-Hc* u 33 kandidátov (Obrázok 29). Z toho vyplýva, že nedošlo k mutácii a vyradeniu z funkcie hlavného represora kvitnutia *VRN-H2*, čo by mohlo stáť za skorým kvitnutím u týchto kandidátov. V prípade kandidáta ATL_A9 nebol pozorovaný ani v jednom prípade PCR produkt, čo pravdepodobne súvisí s kvalitou izolovanej DNA. Slabé PCR produkty jednotlivých génov boli detekované najmä u kandidáta ATL_4, čo je taktiež pravdepodobne spôsobené kvalitou templátu.



(a) *ZCCT-Ha*



(b) *ZCCT-Hb*



(c) *ZCCT-Hc*

Obrázok 29: Amplifikácia *ZCCT-Ha*, *ZCCT-Hb*, *ZCCT-Hc*. (a) Amplifikácia 600 bp PCR produktu pomocou primerov ZCCTH.14F a ZCCTH.19R, ktorým bola potvrdená prítomnosť *ZCCT-Ha* u všetkých kandidátov (okrem ATL_A9) a ozimných kultivarov Antonella a Igri. V prípade jarných kultivarov (Morex a Golden Promise) nie je detekovaný PCR produkt. (b) Amplifikácia 600 bp PCR produktu pomocou primerov ZCCTb.8F a ZCCTb.11R, ktorým bola potvrdená prítomnosť *ZCCT-Hb* u všetkých kandidátov (okrem ATL_A9) a ozimných kultivarov Antonella a Igri. V prípade jarných kultivarov (Morex a Golden Promise) nie je detekovaný PCR produkt. (c) Amplifikácia 200 bp PCR produktu pomocou primerov ZCCT.HcF a ZCCT.HcR, ktorým bola potvrdená prítomnosť *ZCCT-Hc* u všetkých kandidátov (okrem ATL_A9) a ozimných kultivarov Antonella a Igri. V prípade jarných kultivarov (Morex a Golden Promise) nie je detekovaný PCR produkt. M – štandard molekulovej hmotnosti, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder; 1–34 – označenie kandidátnych rastlín; A – Antonella; I – Igri; Mo – Morex; GP – Golden Promise; K- pozitívna kontrola (gén *HvSNF2*).

V rámci genetického skrínu mutovanej populácie ozimného kultivaru jačmeňa siateho Antonelly bolo identifikovaných 34 kandidátnych línií, u ktorých bolo zaznamenané skoré kvitnutie bez predchádzajúceho chladového pôsobenia, pričom ani u jedného nedošlo k mutácii génu *VRN-H1* a hlavného represora kvitnutia *VRN-H2*. U 6 kandidátov došlo v prípade génu *Ppd-H1* k zmene alelickej konštitúcie z recesívnej alely na dominantnú. Výsledky analýzy jednotlivých génov sú zhrnuté v prehľadnej tabuľke v prílohách. Identifikácia mutovaného génu, prípadne génov bude predmetom ďalšieho štúdia.

5.3 Analýza sekvenčných motívov a konštrukcia fylogenetickej príbuznosti *VRN-H1* génov

Pomocou sekvenčnej analýzy genómovej sekvencie *VRN-H1*, *CDS* a proteínovej sekvencie boli identifikované jednotlivé polymorfizmy u 22 kultivarov jačmeňa. V rámci analýzy *CDS* bolo zistené, že kultivar ZDM02064 nesie dva SNP v rámci 1. exónu (na pozícii 9 C/A a na pozícii 173 A/C) a kultivary HOR9043, HOR10350 a RGT_Planet sa odlišovali pomocou SNP vo 4. exóne (na pozícii 7303 G/A). Proteínová sekvencia bola u všetkých kultivarov identická, takže sa jedná o synonymné SNP. Zdrojom variability, ktorá stojí za vernalizačným nárokom sú nekódujúce oblasti *VRN-H1* génu, konkrétne promotorová oblasť a oblasť prvého intrónu (von Zitzewitz *et al.*, 2005).

Analýza sekvenčných motívov v rámci promotorovej oblasti génu *VRN-H1*

Promotorová oblasť bola analyzovaná u 21 kultivarov za účelom identifikácie sekvenčných motívov spojených s rastovým typom. Nebola analyzovaná promotorová oblasť kultivaru Antonelly, kvôli tomu, že sa ju v rámci diplomovej práce nepodarilo osekvenovať a jej sekvencia nie je dostupná v databáze GeneBank. Promotorová oblasť predstavovala úsek o veľkosti približne 2,5 kb pred štart kodónom (ATG) *VRN-H1* génu. V rámci tejto oblasti bolo identifikovaných 55 polymorfných pozícií pozostávajúcich zo 40 SNP a 15 InDel. Významné polymorfizmy u jednotlivých kultivarov sú zaznamenané v Tabuľke 24. Taktiež bol identifikovaný mikrosatelit pozostávajúci z AT repetitívnych jednotiek. Ďalej boli identifikované konzervované regulačné motívy ako CArG a CRT/DRE. Ozimné kultivary Strider, Igri a HOR3081 a jarný kultivar ZDM01467 nesú 2 bp deléciu v jednom zo štyroch identifikovaných CRT/DRE motívov. Jarné kultivary HOR10350 a RGT Planet majú SNP v jednom z troch CArG motívov pred štart kodónom *VRN-H1* génu. Ozimné kultivary Igri, Strider, HOR3081, HOR3365, HOR13821, ZDM02064, fakultatívny kultivar OUN333 a jarné kultivary Akashinriki, HOR7552 a ZDM01467 nesú v rámci promotorovej oblasti sekvenčné motívy, ktoré sú charakteristické pre kultivary so zimným rastovým typom. Jedná sa napríklad o inzerciu TCCTT na pozícii -2039 až -2034, ďalej deléciu na pozícii -1951 až -1948 (jarné kultivary majú v tejto oblasti sekvenciu CTA) a SNP na pozícii -1673. Kultivary Igri, Strider a HOR3081 sa odlišujú od zvyšných analyzovaných kultivarov inzerciou TCGCG na pozícii -1685 až -1681. Kultivary Akashinriki, HOR7552 a ZDM01467 sa od zvyšných kultivarov líšia viacerými SNP, konkrétne na pozíciách -2667

(C/T), -2572 (T/C), -2468 (A/G), -1933 (T/A) a -915 (C/T). Fakultatívny kultivar OUN333 sa odlišuje taktiež prostredníctvom SNP. Ozimný kultivar, divý B1K-04-12 (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*) je charakterizovaný sekvenčnými motívmi typickými pre oziminy, ale na pozícii -1673 nesie C zdieľaný s jarnými kultivarmi. Od ostatných kultivarov sa odlišuje viacerými polymorfizmami zahŕňajúcich SNP na pozíciách -2312 (C/T) -735 (C/T) a -400 (A/G), a viaceré delécie o veľkosti 1 bp. Kultivary HOR10350, RGT Planet, HOR9043, HOR8148, Golden Promise, Hockett, HOR13942, Morex, Barke a ozimný kultivar HOR21599 majú v rámci promotora sekvenčné motívy charakteristické pre jarný rastový typ. Kultivary HOR9043, HOR10350 a RGT Planet, ktoré sa od zvyšných kultivarov odlišujú inzerciou GCCC na pozícii -1621 až -1618. Kultivary HOR10350 a RGT Planet majú SNP v CArG boxe. Pre kultivary B1K-04-12, HOR21599, HOR8148, Golden Promise, Hockett, Morex a HOR13942 je spoločná inzercia CGCT na pozícii -52 až -49 a viacero SNP ako napríklad na pozícii -173 (A/G), -146 (T/C), -70 (G/C). Jarný kultivar Barke je charakterizovaný polymorfizmami, ktoré sa nenachádzajú u zvyšných 20 kultivarov. Konkrétne sa jedná o 3 InDel a 6 SNP.

Tabuľka 24: Stručný zoznam analyzovaných kultivarov a významných polymorfizmov v rámci promotorevej oblasti génu *VRN-H1*.

Názov kultivaru	Rastový typ	-2039 až -2034	-1951 až -1948 (W/S)	-1735 až -1731	-1732 až -1727 (W/S)	-1673 (W/S)	-1577	-173	-157 až -147	-70	-52 až -48
Strider	Ozim	TCCTT	-	-	-	T	C	G	CArG	C	-
Igri	Ozim	TCCTT	-	-	-	T	C	G	CArG	C	-
HOR3081	Ozim	TCCTT	-	-	ACCCA	T	C	G	CArG	C	-
HOR3365	Ozim	TCCTT	-	CRT/DREB	ACCCA	T	C	G	CArG	C	-
HOR21599	Ozim	-	TAC	CRT/DREB	ACCCA	C	G	A	CArG	G	CGCT
ZDM02064	Ozim	TCCTT	-	CRT/DREB	ACCCA	T	C	G	CArG	C	-
OUN333	Fakultatívny	TCCTT	-	CRT/DREB	ACCCA	C	C	G	CArG	C	-
B1K-04-12	Ozim	TCCTT	-	CRT/DREB	ACCCA	C	G	A	CArG	G	CGCT
HOR13821	Ozim	TCCTT	-	CRT/DREB	ACCCA	T	C	G	CArG	C	-
Morex	Jariny	-	TAC	CRT/DREB	ACCCA	C	G	A	CArG	G	CGCT
Akashinriki	Jariny	TCCTT	-	CRT/DREB	ACC	T	C	G	CArG	C	-
Barke	Jarina	-	TAC	CRT/DREB	ACCCA	C	G	G	CArG	C	-
Golden Promise	Jarina	-	TAC	CRT/DREB	ACCCA	C	G	A	CArG	G	CGCT
Hockett	Jarina	-	TAC	CRT/DREB	ACCCA	C	G	A	CArG	G	CGCT
HOR7552	Jarina	TCCTT	-	CRT/DREB	ACC	T	C	G	CArG	C	-
HOR8148	Jarina	-	TAC	CRT/DREB	ACCCA	C	G	A	CArG	G	CGCT
HOR9043	Jarina	-	TAC	CRT/DREB	ACCCA	C	G	G	CArG	C	-
HOR10350	Jarina	-	TAC	CRT/DREB	ACCCA	C	G	G	SNP A/C	C	-
HOR13942	Jarina	-	TAC	CRT/DREB	ACCCA	C	G	A	CArG	G	CGCT
RGT Planet	Jarina	-	TAC	CRT/DREB	ACCCA	C	G	G	SNP A/C	C	-
ZDM01467	Jarina	TCCTT	-	-	-	T	C	G	CArG	C	-

W/S - diagnostické regióny určené podľa von Zitzewitz *et al.* (2005)

Analýza sekvenčných motívov v rámci prvého intrónu génu *VRN-H1*

V rámci oblasti prvého intrónu *VRN-H1* génu bolo u 22 kultivarov jačmeňa identifikovaných 198 polymorfnych pozícií, z toho bolo 177 SNP a 21 InDel. Pre lepšiu orientáciu sú významné polymorfizmy a alely uvedené v Tabuľke 25. Dominantná alela *VRN-H1* u jarných kultivarov obsahuje deléciu v prvom intróne. Jarné kultivary sa medzi sebou líšili vo veľkosti delécie, ktorá sa pohybovala v rozmedzí 4,3–6,6 kb. Výnimkou bol jarný kultivar Barke s deléciou o veľkosti až 9 kb. Kultivary

HOR10350, HOR9043 a RGT Planet obsahovali v rámci tejto delécie o veľkosti 6691 bp inzerciu 26 bp. Fakultatívny kultivar OUN333 má v tejto oblasti deléciu o veľkosti 2,6 kb. V rámci prvého intrónu bol u niektorých kultivarov identifikovaný element MITE 5' aj 3'konci. Taktiež bol identifikovaný restrotranspozón Lolaog o veľkosti 1054 bp ohraničený ACCTAT priamym opakovaním. Na základe porovnania delécie v rámci prvého intrónu *VRNI* génu u pšenice a jačmeňa bola identifikovaný spoločný región o veľkosti 2,8 kb u ozimných kultivarov. Prvých 440 bp u pšenice a 436 u jačmeňa z tejto oblasti je označených ako tzv. vernalizačný kritický región a vykazuje najvyššiu sekvenčnú podobnosť. Predpokladá sa, že tento región je zodpovedný za vernalizačný nárok u *Triticeae* (von Zitzewitz *et al.*, 2005). Vernalizačný kritický región bol v rámci diplomovej práce identifikovaný u 14 kultivarov, z toho u 4 jarín, konkrétne u Akashinriki, HOR7552, HOR13942 a ZDM0167. Ďalej bolo v rámci prvého intrónu identifikovaných viacero *cis* regulačných motívov zahŕňajúce motívy s hormonálnou či svetelnou reguláciou ako napríklad I-box like, C-box like, RY motif, ABRE/G-box like, CRT/DRE motívy, väzobné miesta pre proteín Dof či väzobné miesto pre MYB transkripčný faktor. Na základe sekvenčnej analýzy v kombinácii s literatúrou boli u jednotlivých kultivarov identifikované alely génu *VRN-H1* (Cockram *et al.*, 2009; Hemming *et al.*, 2009). Kultivary ozimného rastového typu Antonella, Strider, Igri, HOR3081, HOR3365, ZDM02064, BIK-04-12, HOR13821 sú nositeľmi alely *HvVRN1*, kultivar HOR21599 alely *HvVRN1-6*. Fakultatívny kultivar OUN333 má alelu *HvVRN1-9*. Jarné kultivary Morex, Golden Promise, Hockett, HOR8148 sú nositeľmi alely *HvVRN1-1*. Jarné kultivary Akashinriki, HOR7552, ZDM01467 majú *HvVRN1-8* alelu. Ďalej jarné kultivary HOR9043, HOR10350, RGT Planet majú alelu *HvVRN1-2*. Jarný kultivar Barke má alelu *HvVRN1-3* a kultivar HOR13942 alelu *HvVRN1-4*. 22 kultivarov jačmeňa sa od seba odlišovalo predovšetkým na základe prítomnosti či neprítomnosti delécie v prvom intróme. Kultivary nesúce recesívnu alelu *vrn-H1* majú vernalizačný nárok a intaktný vernalizačný kritický región. Jedná o ozimné kultivary HOR3081, Strider, Antonella, Igri, ZDM02064, HOR13821, HOR3365, BIK-04-12, HOR21599, OUN333. Fakultatívny kultivar OUN333 má v rámci prvého intrónu deléciu, ale intaktný vernalizačný kritický región. Taktiež sa vyznačuje ďalšími polymorfizmami, konkrétne deléciou (3 bp) a 8 SNP. Všetky ozimné kultivary nesú restrotranspozón Lolaog. Kultivar HOR21599 má v tomto elemente deléciu o veľkosti približne 500 bp. Fakultatívny kultivar OUN333 nesie len časť o veľkosti 500 bp. U ozimného kultivaru HOR21599 bolo identifikovaných 21 SNP, ktorými sa odlišoval od zvyšných ozimných kultivarov a naopak ich zdieľal s jarnými kultivarmi, konkrétne s Morexom, Golden Promise, Hockett, HOR8148 a HOR13942. Kultivary Antonella, Igri, Strider a HOR3081 sa odlišujú od zvyšných kultivarov prostredníctvom 6 SNP. Oziminy HOR3365, HOR13821 a ZDM02064 zdieľajú spoločné polymorfizmy, konkrétne 4 SNP, pričom u kultivaru ZDM02064 bolo identifikovaných ďalších unikátnych 9 SNP. BIK-04-12 sa odlišoval od zvyšných kultivarov 66 polymorfnými pozíciami, ktoré zahŕňali 59 SNP a 6 InDel o veľkosti 1 až 21 bp. Tento kultivar taktiež niesol inzerciu o veľkosti 3520 bp, ktorá sa nenachádza u žiadneho z analyzovaných kultivarov. U ozimov bol identifikovaný región bohatý na AT-opakovania a identifikovaný ako S/MAR. Jarné

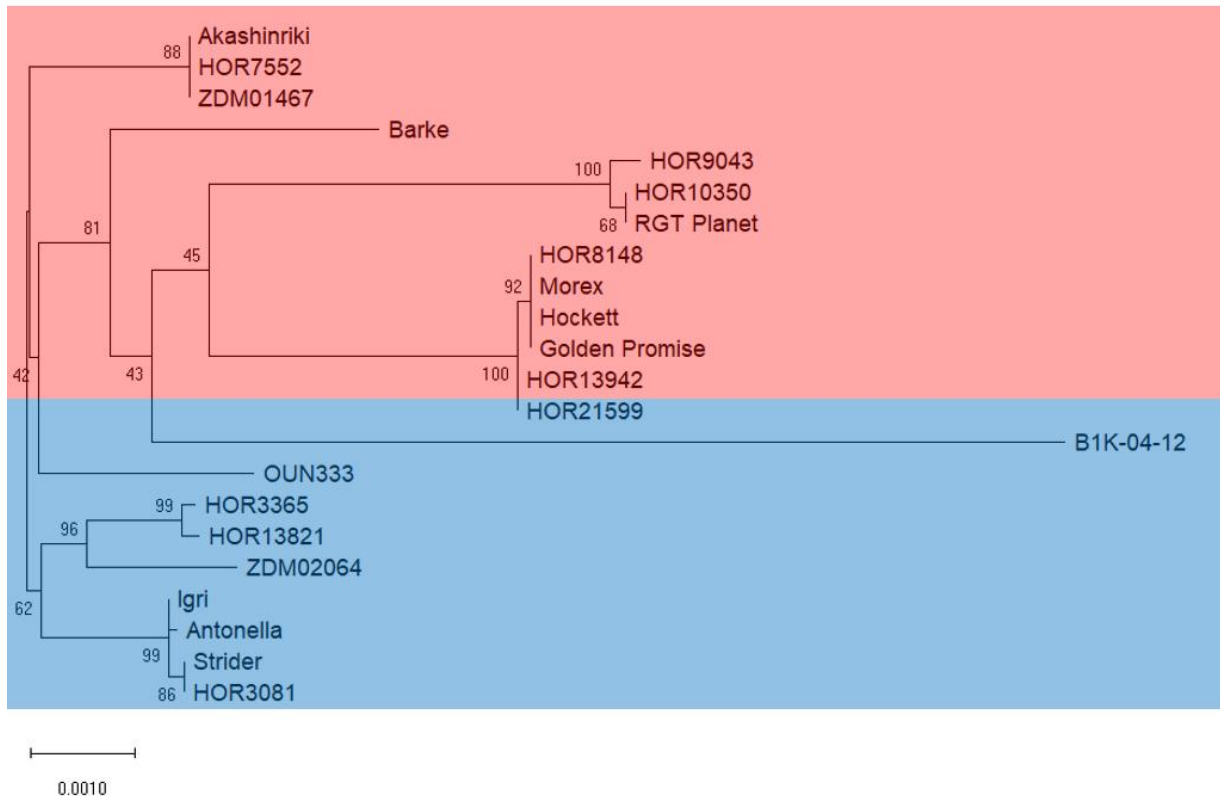
kultivary mali v tejto oblasti deléciu (Hemming *et al.*, 2009). Kultivary jarného typu majú dominantnú alelu *VRN-H1* a deléciu v rámci prvého intrónu. Jarné kultivary Akashinriki, HOR7552 a ZDM01467 majú intaktný kritický vernalizačný región, časť restrotranspozónu Lolaog a unikátne 4 SNP. Jarné Kultivary HOR9043, HOR10350 a RGT PLANET sa odlišujú od zvyšných kultivarov pomocou 11 spoločných SNP. Ďalej kultivary Golden Promise, Hockett, Morex, HOR8148 a HOR13942 zdieľajú rovnaké SNP a taktiež majú rovnakú veľkosť delécie. Ako už bolo spomínané tak tieto kultivary nesú spoločné SNP s ozimným kultivarom HOR21599. V rámci sekvenčnej analýzy bolo zistené, že ozimný kultivar HOR21599 a jarné kultivary Morex, Barke, Golden Promise, Hockett, HOR8148, HOR9043, HOR10350, HOR13942, RGT Planet majú v rámci druhého intrónu deléciu o veľkosti 17 bp oproti jarinám Akashinriki, HOR7552, ZDM01467 a ďalším ozimným kultivarom.

Tabuľka 25: Stručný zoznam analyzovaných kultivarov a významnejších polymorfizmov v rámci oblasti prvého intrónu génu *VRN-H1*.

Názov kultivaru	Rastový typ	Alela *	Veľkosť delécie	Vernalizačný kritický región	MITE 5'	Lolaog	MITE 3'	InDel 17 bp (2. intrón)
Antonella	Ozimný	<i>HvVRN1</i>	-	Áno	Áno	Áno	Áno	In
Strider	Ozimný	<i>HvVRN1</i>	-	Áno	Áno	Áno	Áno	In
Igri	Ozimný	<i>HvVRN1</i>	-	Áno	Áno	Áno	Áno	In
HOR3081	Ozimný	<i>HvVRN1</i>	-	Áno	Áno	Áno	Áno	In
HOR3365	Ozimný	<i>HvVRN1</i>	-	Áno	Áno	Áno	Áno	In
HOR21599	Ozimný	<i>HvVRN1-6</i>	-	Áno	Áno	Delécia – 500 bp	Nie	Del
ZDM02064	Ozimný	<i>HvVRN1</i>	-	Áno	Áno	Áno	Áno	In
OUN333	Fakultatívny	<i>HvVRN1-9</i>	2610	Áno	Áno	Len časť – 500 bp	Áno	In
B1K-04-12	Ozimný	<i>HvVRN1</i>	-	Áno	Áno	Áno	Áno	In
HOR13821	Ozimný	<i>HvVRN1</i>	-	Áno	Áno	Áno	Áno	In
Morex	Jarný	<i>HvVRN1-1</i>	5462	Nie	Nie	Nie	Nie	Del
Akashinriki	Jarný	<i>HvVRN1-8</i>	6544	Áno	Áno	Len časť – 807 bp	Áno	In
Barke	Jarný	<i>HvVRN1-3</i>	9017	Nie	Nie	Nie	Nie	Del
Golden Promise	Jarný	<i>HvVRN1-1</i>	5462	Nie	Nie	Nie	Nie	Del
Hockett	Jarný	<i>HvVRN1-1</i>	5462	Nie	Nie	Nie	Nie	Del
HOR7552	Jarný	<i>HvVRN1-8</i>	6544	Áno	Áno	Len časť – 807 bp	Áno	In
HOR8148	Jarný	<i>HvVRN1-1</i>	5462	Nie	Nie	Nie	Nie	Del
HOR9043	Jarný	<i>HvVRN1-2</i>	6691 + inzercia 26	Nie	Nie	Nie	Nie	Del
HOR10350	Jarný	<i>HvVRN1-2</i>	6691 + inzercia 26	Nie	Nie	Nie	Nie	Del
HOR13942	Jarný	<i>HvVRN1-4</i>	4295	Áno	Áno	Nie	Nie	Del
RGT Planet	Jarný	<i>HvVRN1-2</i>	6691 + inzercia 26	Nie	Nie	Nie	Nie	Del
ZDM01467	Jarný	<i>HvVRN1-8</i>	6544	Áno	Áno	Len časť – 807 bp	Áno	In

*určené na základe sekvenčnej analýzy v spojení s literatúrou (Cockram *et al.*, 2009; Hemming *et al.*, 2009)

V rámci diplomovej práce bola v programe MEGA X uskutočnená fylogenetická analýza, ktorá odráža vyššie popísané skutočnosti u 22 analyzovaných kultivarov jačmeňa. Tento strom zobrazuje odlišnosti medzi jednotlivými kultivarmi spôsobené polymorfizmami v rámci promotorovej oblasti a v oblasti prvého intrónu. V týchto oblastiach sa nachádzajú dôležité sekvenčné motívy zodpovedné za variabilitu vo vernalizačnom nároku. Každopádne analýza naznačuje, že oblasť promotora a prvého intrónu *VRN-H1* génu až na drobné odchýlky koreluje s rastovým typom (Obrázok 30).



Obrázok 30: Fylogenetická analýza génu *VRN-H1* génu. Fylogenetický strom bol skonštruovaný pomocou metódy Maximum Likelihood a Tamura-Nei modelu (Tamura *et* Nei, 1993) v programe MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). V rámci červeného obdĺžnika sa nachádzajú kultivary jarného rastového typu s dominantnou alelou *VRN-H1* a v modrom kultivary zimného rastového typu s recesívnou alelou *vrn-H1*.

6 Diskusia

Predložená diplomová práca sa venuje bližšej charakterizácii génov zapojených v procese vernalizácie u jačmeňa siateho. Gén *VRN-H1* kóduje MADS-box transkripčný faktor a je kľúčovým génom vo vernalizačnom procese. U ozimných kultivarov je tento gén exprimovaný až po dlhodobom vystavení nízkym teplotám. Naopak u jarných kultivarov sú dominantné alely génu *VRN-H1* exprimované bez vernalizácie. Tieto alely sú nositeľmi mutácii v promotorovej oblasti alebo v oblasti prvého intrónu (Trevaskis *et al.*, 2003). Mechanizmy, ktoré aktivujú expresiu *VRN-H1* po dlhodobom pôsobení nízkych teplôt však nie sú stále jasné. Gén *VRN-H2* síce funguje ako represor *VRN-H1* v nevernalizovaných rastlinách a oddiaľuje tak kvitnutie pred zimou, ale samotná expresia *VRN-H1* po chladovom pôsobení nie je závislá na expresii *VRN-H2* (Trevaskis *et al.*, 2006).

Klonovanie génu *VRN-H1* z kultivaru Igrí

Za účelom bližšej funkčnej charakterizácie génu *VRN-H1* a prípravy reportérových línií boli pripravené moduly s jednotlivými časťami *VRN-H1* génu. Tieto moduly je možné následne spájať pomocou metódy Gibson Assembly, ktorá umožňuje efektívne spájanie viacerých fragmentov v presne definovanom poradí nezávisle od restričných miest. Hlavná nevýhoda spočíva vo viacnásobných PCR amplifikáciách, čím sa zvyšuje riziko chýb spôsobených DNA polymerázou (Lu, 2005). Oproti metóde Gateway však nie je závislá od špecifických vektorov a tým pádom je oveľa dostupnejšia a flexibilnejšia. Oproti Golden Gate klonovaniu nie je závislá od restričných endonukleáz.

Jednotlivé časti génu *VRN-H1* boli amplifikované vysokošpecifickými DNA polymerázami s nízkou chybovosťou. Moduly boli pripravené ligáciou cez tupé konce s linearizovaným vektorom pJET1.2/blunt. Fragменты boli v molárnom nadbytku vzhľadom k vektoru (5:1) za účelom zvýšenia úspešnosti samotnej ligácie. Klasickým klonovaním na princípe restričného štiepenia a ligácie môžu zostávať v klonovacom mieste medzery či časti restričných miest, čo nakoniec vedie k zmene štruktúry a aktivity produktu. Ligácia cez tupé konce bola zvolená aj kvôli tomu, že sa jednalo o pomerne veľké fragmenty, čo znižovalo pravdepodobnosť nájdenia unikátneho restričného enzýmu kompatibilného s vektorom. Jednotlivé fragmenty boli spojené v presne definovanom poradí na základe komplementárnych presahov vytvorených primerov o približnej veľkosti 40 bp. V tomto prípade bola reakčná zmes pripravená tak, aby boli jednotlivé fragmenty v molárnom nadbytku k vektoru (3:1). Samotná reakcia Gibson Assembly prebiehala približne 2 hod pri 50 °C. Týmto spôsobom boli pripravené konštrukty *ProVRN-H1::CDS:GUS* a *ZmUbi::CDS:GUS*. Pomocou konštruktu *ProVRN-H1::CDS:GUS* bude pripravená reportérová línia, ktorá bude odrážať vplyv promotorovej oblasti a intrónu na fenotyp, pričom sa predpokladá rýchle kvitnutie bez vernalizácie. U reportérových línií exprimujúcich konštrukt *ZmUbi::CDS:GUS* sa predpokladá extrémne rýchle kvitnutie spojené s prípadne zaujímavými fenotypmi.

Deng *et al.* (2015) vo svojej práci pripravili konštrukt, kde bol gén *VRN-H1* bez podstatnej časti prvého intrónu fúzovaný s hemaglutitínovou (HA) značkou a exprimovaný z endogénneho promotora. Po transformácii jarného kultivaru Golden Promise týmto konštruktom bolo pozorované oveľa skoršie kvitnutie v porovnaní s kontrolou. V týchto transgénnych rastlinách boli detekované celkovo vyššie hladiny transkriptov *VRN-H1* a došlo k zmene expresie viacerých génov spojených s toleranciou voči mrazu či metabolizmom hormónov. Alonso-Peral *et al.* (2011) pripravili dva konštrukty, pomocou ktorých následne transformovali jarný kultivar. Výsledky nasvedčujú tomu, že promotorová oblasť génu *VRN-H1* predstavuje kritické miesto v regulácii expresie génu *VRN-H1* počas vernalizácie. Konštrukty, ktoré pripravili Alonso-Peral *et al.* (2011) a Deng *et al.* (2015) neobsahovali celý prvý intrón *VRN-H1* a taktiež bol týmito konštruktmami transformovaný jarný kultivar.

Zaujímavé bude sledovať expresiu natívneho *VRN-H1* v rôznych štádiách vernalizácie a v rôznych pletivách na pozadí ozimného kultivaru. To by bolo možné pomocou konštruktov *ProVRN-H1::VRN-H1::GFP*, *ProVRN-H1::VRN-H1::GUS*, či *ProVRN-H1::CDS::GUS*. V týchto konštruktoch by sa nachádzal promotor z ozimného kultivaru Igri, ktorý sa v rámci diplomovej práce nepodarilo pripraviť. Hlavnými dôvodmi bola jeho komplikovaná amplifikácia, kvôli prítomnosti veľkého množstva nešpecifických produktov. Tento problém nevyriešil ani návrh a testovanie viacerých primerov, optimalizácia reakcie či reamplifikácia z fragmentu očakávanej veľkosti extrahovaného z gélu. Promotor z jarného kultivaru Morex bol amplifikovaný z BAC 631P8, vďaka čomu bol vyriešený problém s výskytom nešpecifickým produktov. Tak isto by mohol byť vyriešený problém v prípade amplifikácie promotora z ozimného kultivaru. Ďalším riešením by mohlo byť zníženie komplexity genómu pomocou vytriedenia chromozómu 5H prietokovým cytometrom.

Hlavným dôvodom prípravy týchto konštruktov a následnej transformácie jačmeňa je popísanie vplyvu promotora a oblasti prvého intrónu na expresiu *VRN-H1* pri dlhodobom pôsobení chladu. Vďaka následnej príprave reportérových línií by mohli byť popísané ďalšie gény zapojené v kaskáde kvitnutia a adaptácii rastliny voči nepriaznivým podmienkam vonkajšieho prostredia. To je možné napríklad pomocou sekvenovania transkriptómu (RNA-seq) a metódou chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq). Pomocou týchto metód je možné identifikovať väzbové miesta proteínu *VRN-H1* a tým pádom gény, ktorých expresiu reguluje.

Viacere štúdie nasvedčujú tomu, že oblasť prvého intrónu génu *VRN-H1* je dôležitá z hľadiska udržania nízkej hladiny *VRN-H1* pred chladovým pôsobením, ale nezávislá od mechanizmov, ktoré sprostredkovávajú expresiu *VRN-H1* počas vernalizácie (Hemming *et al.*, 2009; Oliver *et al.*, 2009; Szűcs *et al.*, 2007). Promotor génu *VRN-H1* je popísaný pomerne detailne, čo sa týka *cis* regulačných motívov oproti prvému intrónu *VRN-H1* génu. Taktiež pri príprave konštruktov sa Alonso-Peral *et al.* (2011) a Deng *et al.* (2015) zamerali predovšetkým na popísanie vplyvu promotora na expresiu *VRN-H1* v procese vernalizácie. Jednotlivé kultivary zimného rastového typu sa však odlišujú v dĺžke chladového pôsobenia potrebného k naplneniu vernalizačného nároku. U pšenice bolo zistené, že predovšetkým prvý intrón génu *VRN-A1* je zodpovedný za variabilitu vo vernalizačnom nároku. Kippes

et al. (2015) popísal SNP vo väzbovom mieste proteínu GLYCINE RICH RNA-BINDING PROTEIN 2 (GRP2) v rámci prvého intrónu *VRN-A1* génu. Tento región je označený ako RNA Immune Precipitation fragment 3 (RIP3). V nadväznosti na to Kippes *et al.* (2018) zistili, že polymorfizmy v regióne RIP3 sú asociované s variabilitou vo vernalizačnom nároku medzi jednotlivými kultivarmi pšenice rozdielneho geografického pôvodu. Polymorfizmus v RIP3 by mohol byť využitý v šľachtiteľstve k príprave nových kultivarov prispôbených oblastiam s odlišnou dĺžkou a intenzitou chladového pôsobenia. Práve regióny zodpovedné za variabilitu vo vernalizačnom nároku by mohli byť lokalizované u jačmeňa taktiež rámci prvého intrónu a preto je štúdium tejto oblasti dôležité.

Skríning mapovacej populácie jačmeňa siateho

Charakterizácia génov zodpovedných za agronomicky dôležité vlastnosti ako je napríklad výnos vyžaduje identifikáciu a pochopenie mechanizmu účinku génov, ktoré sa podieľajú na výslednom fenotype. Jedným z hlavných postupov pri identifikácii nových génov je mutagenéza s následnou analýzou fenotypu.

V rámci diplomovej práce bola analyzovaná mutovaná M_2 populácia ozimného kultivaru jačmeňa siateho Antonelly s cieľom identifikovať nové gény v kaskáde kvitnutia. Táto generácia bola vysadená na pole na jar, konkrétne 1.4.2020 (dlhý deň). Od tohto obdobia neboli zaznamenané žiadne výrazne výkyvy teplôt, ktoré by mohli túto populáciu čiastočne vernalizovať. Celkovo bolo identifikovaných 34 kandidátov, ktorí vykvetli bez prechádzajúceho chladového pôsobenia v rozmedzí 58–89 dní. Predpokladá sa, že za skoré kvitnutie bez vernalizácie je zodpovedný gén, ktorý reguluje expresiu hlavného aktivátora kvitnutia, génu *VRN-H1*, u ktorého došlo pôsobením ENU k mutácii.

U troch kandidátov, ktorí vykvetli ako prví (58 dní) bola pozorovaná zmena zo 6 radového klasu na 2 radový klas. Títo kandidáti boli taktiež nízkeho vzrastu. Čo sa týka evolučného hľadiska, tak divé jačmene majú 2 radový klas a až u domestikovaného jačmeňa sa objavuje 6 radový klas. Za tento prechod z 2 radového klasu na 6 radový klas je zodpovedná mutácia v géne *SIX-ROWED SPIKE 1* (*VRS1*). Táto mutácia spôsobuje inaktiváciu génu *VRS*, ktorý za normálnych okolností reprimuje expresiu génov zodpovedných laterálnu fertilitu (Komatsuda *et al.*, 2007). Bolo identifikovaných ďalších 11 *VRS* génov (Lundqvist *et al.*, 1988), pričom 5 z nich je zodpovedných za zmenu z 2 radového jačmeňa na 6 radový. Väčšina z týchto génov sú transkripčné faktory, napríklad gén *VRS3* kóduje Jumonji C-type (JMJC) H3K9me2/3 demetylázu, ktorá reguluje expresiu ďalších génov *VRS*, metabolizmus hormónov a stresovú signalizáciu (Esse *et al.*, 2017). Deng *et al.* (2015) analyzovali väzbové miesta transgénu *VRN1-HA*, medzi ktoré patrilo práve aj gén *VRS1*. U prvých troch kultivarov mohlo dôjsť k zvýšeniu expresie *VRN-H1* naviazaním transkripčného faktora, ktorého aktivita bola zmenená pôsobením ENU do promotovej oblasti, čo sa prejavilo extrémne rýchlym kvitnutím bez vernalizácie. Keďže sa *VRN-H1* viaže do promotora *VRS1*, tak zvýšená hladina transkriptov *VRN-H1* mohla mať vplyv na indukciu expresie *VRS1* a tým pádom zmenu architektúry klasu. Zvyšných 31 kandidátov však malo 6 radový klas a prvý z nich kvitol až po ďalších 14 dňoch. U všetkých kandidátov

bola pozorovaná redukcia počtu odnoží, kratší klas a nižší počet zrn v klase. Tento popísaný fenotyp je spôsobený rýchlym vývojom kvetenstva a bol pozorovaný predovšetkým u najrýchlejšie kvitnúcich kandidátov. Väčšina kandidátov mala maximálne 2 odnože a len 7 kandidátov malo 3–4 odnože. Výnimkou boli dvaja kandidáti, ATL_A25 so 7 odnožami a ATL_A26 s 13 odnožami.

Kandidáti boli najskôr popísaní na úrovni fenotypu, ale bolo potrebné taktiež zistiť, či nedošlo ku kontaminácii jarnými kultivarmi Golden Promise (2 radový klas) a Morex (6 radový klas), ktoré boli vysadené na tomto mieste v predchádzajúcej sezóne. Taktiež bolo potrebné zistiť, či nedošlo k mutácii niektorého z hlavných génov vernalizačnej (*VRN-H1*, *VRN-H2*) a fotoperiodickej dráhy (*Ppd-H1*). Alelická konštitúcia týchto génov bola zistená pomocou PCR so špecifickými primerami, ktoré identifikujú polymorfizmy odlišujúce recesívnu a dominantnú alelu. Tieto primery boli použité vo viacerých štúdiách k identifikácii alelickej konštitúcie a rastového typu rôznych kultivarov jačmeňa (Cockram *et al.*, 2009, Jones *et al.*, 2008; Szűcs *et al.*, 2007). Antonella je ozimný kultivar s recesívnym *vrn-H1*, dominantným *VRN-H2* a recesívnym *ppd-H1*. Bolo zistené, že všetci kandidáti (okrem ATL_A9) majú *vrn-H1* a *VRN-H2*. V prípade génu *Ppd-H1* bola u 6 kandidátov detekovaná dominantná alela *Ppd-H1*. Prítomnosť dominantnej alely (senzitívna) umožňuje kvitnutie až pri podmienkach dlhého dňa. Recesívna alela nie je senzitívna voči dĺžke dňa. Expresia génu *Ppd-H1* je počas noci inhibovaná tzv. nočným komplexom, ktorý zahŕňa gény *HvELF3*, *HvLUX1*, *PhyC*. Mutácia niektorého z génov nočného komplexu v rámci cirkadiálnych hodín vedie k zvýšenej expresii *HvFT1* (*VRN-H3*) a skoršiemu kvitnutiu. Faure *et al.* (2012) zistili, že mutáciou génu *HvELF3* (*eam8*) dochádza ku skorému kvitnutiu prostredníctvom indukcie expresie *HvFT1* (*VRN-H3*) nezávisle na alelickej konštitúcii génu *Ppd-H1*. Spontánne a indukované mutácie tohto génu sa využívajú u kultivarov pestovaných v lokalitách s krátkym vegetačným obdobím (Lundqvist, 2009). Rodina FT-like génov je charakteristická rôznymi duplikáciami a ich následnou diverzifikáciou. Napríklad gén *HvFT1* (*VRN-H3*) je nositeľom polymorfizmov v rámci promotoru, prvého intrónu a taktiež bola u tohto génu popísaná tzv. copy number variation (CNV). Bolo zistené, že viac kópií tohto génu je spojených s jeho vyššou expresiou a skorším kvitnutím, pričom stále prevláda splnenie vernalizačného nároku (Nitcher *et al.*, 2013). U jačmeňa bolo charakterizovaných 12 *HvFT* génov, pričom funkcia väčšiny z nich nie je stále známa. Pieper *et al.* (2020, p. 4) nedávno popísali funkciu *HvFT4*, pričom zistili, že jeho nadmerná expresia u jarného kultivaru Golden Promise stojí za neskorým kvitnutím, znížením počtu klasov a zrn v rámci klasu. Taktiež bolo pozorované zníženie expresie génov, ktoré sú dôležité v iniciácii kvitnutia. *HvFT4* bol identifikovaný ako represor kvitnutia u jačmeňa. V prípade jeho mutácie by však došlo k opačnému efektu a skoršiemu kvitnutiu. Je však možné, že došlo k mutácii ďalšieho génu z FT-like rodiny. Každopádne popísanie funkcie ďalších génov tejto rodiny je dôležité aj zo šľachtiteľského hľadiska kvôli vplyvu na morfológiu klasu a samotného výnosu.

Nízka úroveň expresie génu *VRN-H1* u ozimných kultivarov pred chladovým pôsobením je spojená s H3K27me3 a neaktívnym stavom chromatinu na rozdiel od jarných kultivarov (Oliver *et al.*, 2009). V rámci mutagenézy mohlo dôjsť k strate funkcie *PRC2*, ktorý je pravdepodobne zodpovedný

za tento metylačný stav a tým pádom ku skorému kvitnutiu. Okolité teplota má veľký vplyv na reprodukčný vývoj a úrodu u obilnín mierneho pásma. Ejaz *et von Korff* (2017) poukazujú na to, že gény fotoperiodickej a vernalizačnej dráhy majú vplyv na dobu kvitnutia a výnos v závislosti na teplote. Zvýšenie teploty počas vernalizácie dokonca reaktivuje hlavných represorov kvitnutia v prípade *VRN2* v závislosti od fotoperiód a *ODDSOC2* nezávisle od fotoperiód (Dixon *et al.*, 2019). Náš pokus bol uskutočnený na poli a tak mohlo dôjsť k regulácii expresie génov abiotickými faktormi ako sú teplota, či sucho. Preto je potrebné kandidátne rastliny verifikovať v kontrolovaných podmienkach a tieto vplyvy vylúčiť. Identifikácia génu respektíve génov, ktoré boli mutované v rámci mutagenézy ENU bude predmetom ďalšieho štúdia.

Analýza sekvenčných motívov a konštrukcia fylogenetickkej príbuznosti *VRN-H1* génov

Pomocou sekvenčnej analýzy *VRN-H1* génu u 22 kultivarov boli popísané motívy v rámci promotora a prvého intrónu, ktoré by mohli súvisieť s vernalizačným nárokom, či toleranciou voči chladu.

V rámci prvého intrónu je popísaný tzv. kritický vernalizačný región o veľkosti 436 bp v 2,8 kb oblasti. Tento región je sekvenčne konzervovaný medzi pšenicou a jačmeňom, a predpokladá sa, že obsahuje motív zodpovedný za vernalizačný nárok u ozimných kultivarov, keďže sa nenachádza u jarných kultivarov (Fu *et al.*, 2005; von Zitzewitz *et al.*, 2005). V sekvenčnej analýze bol kritický vernalizačný región identifikovaný u všetkých ozimných kultivarov vrátane divého *H. vulgare ssp. spontaneum* (B1K-04-12), ktorý mal v tomto mieste SNP. Kritický vernalizačný región bol identifikovaný aj u 3 jarných kultivarov (Akashinriki, HOR7552, ZDM01467). Hemming *et al.* (2009) tvrdia, že kritický vernalizačný región nie je zodpovedný za represiu *VRN-H1* pred vernalizáciou, pretože bol identifikovaný u dvoch novo popísaných aliel exprimovaných bez vernalizácie. Na základe veľkosti delécie porovnanej s alelami popísanými Hemming *et al.* (2009) nesú Akashinriki, HOR7552, ZDM01467 práve novo popísanú alelu *HvVRN1-8*. Hemming *et al.* (2009) popísali 1 kb región v rámci 2,8 kb oblasti v rámci prvého intrónu, ktorý nezahŕňa kritický vernalizačný región. Tento 1 kb bol v rámci sekvenčnej analýzy identifikovaný len u ozimných kultivarov a fakultatívny kultivar OUN33 mal v tejto oblasti deléciu. V rámci tejto oblasti boli u ozimných kultivarov popísané motívy bohaté na AT opakovania identifikované ako S/MAR, ktoré sú zapojené do štruktúry chromatinu a kontroly transkripcie spojené so zníženou expresiou (Rudd *et al.*, 2004).

Pred vernalizáciou je expresia génu *VRN-H1* potlačená a bolo zistené, že by to mohlo súvisieť s metylačným stavom chromatinu. Pred vernalizáciou bola detekovaná vysoká hladina H3K27me3, ktorá je spojená s neaktívnym chromatinom. Delécia v prvom intróne *VRN-H1* je spojená s jeho vysokou bazálnou expresiou, skorým kvitnutím a nízkou hladinou H3K27me3. V oblasti prvého intrónu sa pravdepodobne nachádza väzbové miesto pre PRC2, čo vedie k nižším hladinám H3K27me3 u jarných kultivarov (Oliver *et al.*, 2009).

V rámci prvého intrónu boli identifikované taktiež transponovateľné elementy, konkrétne Lolaog a MITE. Transponovateľné elementy zohrávajú úlohu vo veľkosti, štruktúre, polymorfizme a vývoji genómu, a taktiež v regulácii génovej expície. MITE sa líši od klasických DNA transpozónov svojou malou veľkosťou a vysokým počtom kópií. Vďaka svojej veľkosti sa často vyskytuje v rámci promotorov, neprekladaných oblastí a intrónov génov (Oki *et al.*, 2008). U pšenice bol identifikovaný MITE v rámci prvého intrónu u *T. timopheevii* u dominantnej *VRN-A1* alely. Predpokladá sa, že táto mutácia je zodpovedná za vznik jarného typu a bola ukotvená počas domestikácie pšenice (Shcherban *et al.*, 2016). Podobná duplikácia bola identifikovaná v TATA-boxe v rámci promotoru dominantnej *VRN-A1* alely *T. aestivum*. Táto mutácia môže byť zodpovedná za vznik alternatívneho promotoru, či regulačného miesta s následnou moduláciou transkripcie a vernalizačného nároku (Yan *et al.*, 2004). Prítomnosť elementu MITE nie je u jačmeňa spojená s rastovým zvykom, keďže sa nachádza u jarných aj ozimných kultivarov. Cockram *et al.* (2009) identifikovali element MITE na 5'konci intrónu *VRN-H1* u jarných aliel *HvVRN1-4* a *HvVRN1-7* a ozimnej alely *HvVRN1-6*. U zvyšných jarných aliel a ozimnej alely *HvVRN1* chýbal. Element MITE na 3'konci prvého intrónu zase nebol popísaný u alely *HvVRN1-6*, ale nachádzal sa u *HvVRN1* a aliel *HvVRN1-5* a *HvVRN1-7*. To sa zhoduje s výsledkami sekvenčnej analýzy, v ktorej bolo taktiež zistené, že alela *HvVRN1-8* má na 5' aj 3'konci intrónu MITE. Taktiež bolo zistené, že fakultatívny kultivar OUN333 je nositeľom alely *HvVRN1-9*, čo by vysvetľovalo variabilitu v rýchlosti kvitnutia popísanú Hemming *et al.* (2009). Alela *HvVRN1-9* taktiež nesie na oboch koncoch prvého intrónu element MITE. Retroelement Lolaog patrí medzi long terminal repeat (LTR) retrotranspozóny do skupiny *Gypsy*. Retrotranspozóny *Gypsy* sa nachádzajú prevažne v heterochromatíne, kde sa podieľajú na udržaní stability a znížení expície. Naopak LTR retrotranspozóny *Copia* sú typické pre euchromatínové oblasti. V rámci intrónu bol identifikovaný Lolaog u všetkých ozimných kultivarov, pričom kultivar HOR21599 nesie v tomto mieste deléciu o veľkosti 500 bp, z čoho vyplýva, že je nositeľom ozimnej alely *HvVRN1-6*. Fakultatívny kultivar OUN333 obsahuje len 500 bp z retrotranspozónu Lolaog. Intaktný Lolaog v rámci prvého intrónu *VRN-H1* génu má veľkosť 1,051 kb. Jarné kultivary Akashinriki, HOR7552 a ZDM0147 nesú 807 bp z Lolaog, čo odpovedá alele *HvVRN1-8* (Hemming *et al.*, 2009). Kultivary HOR9043, HOR10350 a RGT Planet majú v rámci delécie v prvom intróne o veľkosti približne 6691 kb inzerciu 26 bp na začiatku tejto delécie (162 nukleotidov). V literatúre táto alela nie je popísaná, každopádne sa môže jednať o chybu v rámci sekvenovania a jedná sa pravdepodobne o alelu *HvVRN1-2*.

Predpokladá sa, že oblasť prvého intrónu je spojená s represiou *VRN-H1* pred vernalizáciou. Naopak sekvenčné motívy v rámci promotoru by mohli zohrávať úlohu v aktivácii transkripcie *VRN-H1* pôsobením chladu (Alonso-Peral *et al.*, 2011). Pomocou sekvenčnej analýzy boli v rámci promotorovej oblasti *VRN-H1* identifikované viaceré *cis* regulačné motívy. Boli identifikované väzbové miesta CRT/DRE pre *CBF* a INDUCER OF *CBF1* (*ICE1*). Nízke teploty môžu indukovať expíciu *CBF* v rastlinách a zvyšovať tak ich odolnosť voči mrazu (Thomashow, 2010). Pred začiatkom transkripcie bol identifikovaný malý upstream čítací rámec (upstream open reading frame; uORF) kódujúcich 13

aminokyselín na 5'konci cDNA *VRN-H1*. Tieto uORF sú konzervované medzi ortológmi *VRN1* v obilninách mierneho pásma. Malé uORF pravdepodobne znižujú transláciu z hlavného ORF znížením iniciačnej rýchlosti, či schopnosti ribozómu rozpoznať začiatok translácie a taktiež majú vplyv na stabilitu mRNA (Hood *et al.*, 2009) Alonso-Peral *et al.* (2011) zistili, že uORF nie sú dôležité pre zahájenie transkripcie v procese vernalizácie. Každopádne by však mohli mať vplyv na posttranskripcnú reguláciu *VRN1*.

V rámci promotorovej oblasti boli u všetkých analyzovaných kultivarov identifikované 3 CArG-boxy. Jeden sa nachádza 157 bp pred začiatkom transkripcie a práve v tomto CArG-boxe bol u dvoch jarných kultivarov identifikovaný SNP. CArG-box predstavuje typické väzbové miesto pre MADS-box transkripcčné faktory, napríklad aj pre *VEGETATIVE TO REPRODUCTIVE TRANSITION GENE 2* (*VRT2*; Kane *et al.*, 2007). Predpokladalo sa, že tento gén má funkciu represora v procese vernalizácie, ale ďalšie analýzy ukázali, že jeho hladina sa pôsobením chladu zvyšuje rovnako ako *VRN1* (Trevaskis *et al.*, 2007). Delécie v rámci CArG-boxu boli identifikované predovšetkým u dominantných aliel *VRN1*. Preto sa predpokladalo, že tento región je dôležitý v regulácii expresie *VRN1* pri chladovom pôsobení. Každopádne táto hypotéza bola vyvrátená (Pidal *et al.*, 2009).

Von Zitzewitz *et al.* (2005) identifikovali v rámci promotorovej oblasti 3 diagnostické regióny, ktorými sa od seba odlišujú jarné a ozimné kultivary. Výsledky sekvenčnej analýzy sa nezhodovali s von Zitzewitz *et al.* (2005) a všetky regióny popísané ako diagnostické sa nachádzali u kultivarov nezávisle od ich rastového typu. Jedná sa napríklad o región, v ktorom majú všetky jarné kultivary inzerciu CTA a ozimné naopak deléciu. V tomto mieste bola identifikovaná delécia u jarných kultivarov Akashinriky, HOR7552 a ZDM01467, ktoré sú nositeľmi alely *HvVRN1-8*. Naopak ozimný kultivar HOR21599 (alela *HvVRN1-6*) mal v tomto mieste inzerciu TAC. To pravdepodobne súvisí s tým, že práve kultivary, ktoré sa nezhodovali boli objavené až Hemming *et al.* (2009). V prípade ďalšieho diagnostického regiónu by sa mohlo jednať o chybu v sekvenovaní. Inzercia ACCCA je typická pre jarné kultivary. Každopádne deléciu v tejto oblasti mali len 4 ozimné kultivary, konkrétne Antonella, Igri, Strider, HOR3081 (alela *HvVRN1*) a jarný kultivar ZDM01467 (alela *HvVRN1-8*). Jarné kultivary Akashinriki a HOR7552 (alela *HvVRN1-8*) mali len ACC. Ďalším diagnostickým regiónom je oblasť, kde sa nachádza SNP (C/T), pričom C je typické pre kultivary s jarným rastovým typom a T pre kultivary zimného rastového typu. Každopádne jariny s alelou *HvVRN1-8* mali v tomto mieste T, a ozimy HOR21599 (alela *HvVRN1-6*), B1K-04-12 (alela *HvVRN1*) a fakultatívny kultivar OUN333 (alela *HvVRN1-9*) mali C.

Skutočný vplyv jednotlivých sekvenčných motívov v rámci promotoru a prvého intrónu nie je stále dostatočne popísaný.

7 Záver

Gén *VRN-H1* je hlavným integrátorom signálov z vernalizačnej dráhy u ozimných kultivarov, ktorej výsledkom je samotné kvitnutie. K iniciácii kvitnutia u ozimných kultivarov predchádza dlhodobé pôsobenie chladu. Mechanizmy, ktoré aktivujú expresiu *VRN-H1* v procese vernalizácie však nie sú stále dostatočne popísané. Predpokladá sa, že prvý intrón génu *VRN-H1* zohráva úlohu v jeho represii pred vernalizáciou a promotor na ňu reaguje iniciáciou expresie *VRN-H1*. Za účelom bližšej charakterizácie vplyvu promotora a oblasti prvého intrónu boli v rámci diplomovej práce pripravené dva konštrukty, v ktorých bol promotor a *CDS VRN-H1* fúzované s reportérovým génom *GUS* pomocou metódy Gibson Assembly. Pomocou následnej prípravy reportérových línií je možné sa priblížiť k pochopeniu mechanizmu vernalizácie na molekulárnej úrovni či sledovať expresiu *VRN-H1* v rôznych štádiách vernalizácie a v rôznych pletivách.

V rámci genetického skrínu mutovanej populácie ozimného kultivaru jačmeňa siateho Antonelly bolo identifikovaných 34 kandidátnych línií, u ktorých bolo zaznamenané skoré kvitnutie bez predchádzajúceho chladového pôsobenia, pričom ani u jedného nedošlo k mutácii génu *VRN-H1* a hlavného represora kvitnutia *VRN-H2*. Identifikácia mutovaného génu, prípadne génov bude predmetom ďalšieho štúdia.

V neposlednom rade bola prevedená sekvenčná analýza génu *VRN-H1* u 22 kultivarov jačmeňa siateho za cieľom identifikovať polymorfizmy spojené s výsledným fenotypom. V rámci tejto analýzy boli bližšie popísané alely *HvVRN1-8* a *HvVRN-9*, ale neboli objavené nové motívy zodpovedné za rastový typ u analyzovaných kultivarov. Pomocou fylogenetickej analýzy boli popísané vzťahy medzi jednotlivými alelami génu *VRN-H1*. Identifikácia motívov spojených s rastovým typom v rámci promotora a prvého intrónu je dôležitá z hľadiska variability vo vernalizačnom nároku a v samotnej dobe kvitnutia, čo vedie k bližšiemu pochopeniu tohto komplikovaného procesu, ktorý je regulovaný nielen na genetickej ale aj na epigenetickej úrovni.

8 Literatura

- Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Más, P., Kay, S.A., 2001. Reciprocal Regulation Between TOC1 and LHY/CCA1 Within the Arabidopsis Circadian Clock. *Science* 293, 880–883.
- Alonso, J.M., Ecker, J.R., 2006. Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in Arabidopsis. *Nat Rev Genet* 7, 524–536.
- Alonso-Peral, M.M., Oliver, S.N., Casao, M.C., Greenup, A.A., Trevaskis, B., 2011. The Promoter of the Cereal VERNALIZATION1 Gene Is Sufficient for Transcriptional Induction by Prolonged Cold. *PLOS ONE* 6, e29456.
- Andrés, F., Coupland, G., 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics* 13, 627–639.
- Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408, 796–815.
- Baltes, N.J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P.A., Voytas, D.F., 2014. DNA Replicons for Plant Genome Engineering. *Plant Cell* 26, 151–163.
- Barro, F., Martin, A., Lazzeri, P.A., Barceló, P., 1999. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica* 108, 161–167.
- Bartlett, J.G., Alves, S.C., Smedley, M., Snape, J.W., Harwood, W.A., 2008. High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. *Plant Methods* 4, 22.
- Baudry, A., Ito, S., Song, Y.H., Strait, A.A., Kiba, T., Lu, S., Henriques, R., Pruneda-Paz, J.L., Chua, N.-H., Tobin, E.M., Kay, S.A., Imaizumi, T., 2010. F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control Arabidopsis clock progression. *Plant Cell* 22, 606–622.
- Beales, J., Turner, A., Griffiths, S., Snape, J.W., Laurie, D.A., 2007. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 115, 721–733.
- Behall, K.M., Scholfield, D.J., Hallfrisch, J., 2004. Diets containing barley significantly reduce lipids in mildly hypercholesterolemic men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1185–1193.
- Binns, A.N., Thomashow, M.F., 1988. Cell Biology of Agrobacterium Infection and Transformation of Plants. *Annual Review of Microbiology* 42, 575–606.
- Birch, R.G., Franks, T., 1991. Development and Optimisation of Microprojectile Systems for Plant Genetic Transformation. *Functional Plant Biol.* 18, 453–469.
- Bonnin, I., Rousset, M., Madur, D., Sourdille, P., Dupuits, C., Brunel, D., Goldringer, I., 2008. FT genome A and D polymorphisms are associated with the variation of earliness components in hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 116, 383–394.
- Briggs, A.W., Rios, X., Chari, R., Yang, L., Zhang, F., Mali, P., Church, G.M., 2012. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. *Nucleic Acids Res* 40, e117.
- Briggs, W.R., Olney, M.A., 2001. Photoreceptors in Plant Photomorphogenesis to Date. Five Phytochromes, Two Cryptochromes, One Phototropin, and One Superchrome. *Plant Physiology* 125, 85–88.
- Burkart-Waco, D., Tsai, H., Ngo, K., Henry, I.M., Comai, L., Tai, T.H., 2017. Next-Generation Sequencing for Targeted Discovery of Rare Mutations in Rice, in: Jankowicz-Cieslak, J., Tai, T.H., Kumlehn, J., Till, B.J. (Eds.), *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols*. Springer International Publishing, Cham, pp. 323–340.
- Campoli, C., Pankin, A., Drosse, B., Casao, C.M., Davis, S.J., Korff, M. von, 2013. HvLUX1 is a candidate gene underlying the early maturity 10 locus in barley: phylogeny, diversity, and interactions with the circadian clock and photoperiodic pathways. *New Phytologist* 199, 1045–1059.
- Campoli, C., Shtaya, M., Davis, S.J., von Korff, M., 2012. Expression conservation within the circadian clock of a monocot: natural variation at barley Ppd-H1 affects circadian expression of flowering time genes, but not clock orthologs. *BMC Plant Biol* 12, 97.
- Čermák, T., Curtin, S.J., Gil-Humanes, J., Čegan, R., Kono, T.J.Y., Konečná, E., Belanto, J.J., Starker, C.G., Mathre, J.W., Greenstein, R.L., Voytas, D.F., 2017. A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. *The Plant Cell* 29, 1196–1217.
- Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J., Voytas, D.F., 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 39, e82.
- Chen, A., Dubcovsky, J., 2012. Wheat TILLING Mutants Show That the Vernalization Gene VRN1 Down-Regulates the Flowering Repressor VRN2 in Leaves but Is Not Essential for Flowering. *PLOS Genetics* 8, e1003134.

- Chen, A., Li, C., Hu, W., Lau, M.Y., Lin, H., Rockwell, N.C., Martin, S.S., Jernstedt, J.A., Lagarias, J.C., Dubcovsky, J., 2014. Phytochrome C plays a major role in the acceleration of wheat flowering under long-day photoperiod. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 10037–10044.
- Chen, C., Thomas, S., Maynard, N., 2015. Next-Gen Shotgun Cloning Using Gibson Assembly® Method. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 35, 22–23.
- Chen, M., Wang, Q.-Y., Cheng, X.-G., Xu, Z.-S., Li, L.-C., Ye, X.-G., Xia, L.-Q., Ma, Y.-Z., 2007. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 299–305.
- Cheng, C.-Y., Krishnakumar, V., Chan, A.P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., Town, C.D., 2017. Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *Plant J.* 89, 789–804.
- Cheng, M., Lowe, B.A., Spencer, T.M., Ye, X., Armstrong, C.L., 2004. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40, 31–45.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., Kim, J.-S., 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31, 230–232.
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., Voytas, D.F., 2010. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* 186, 757–761.
- Christie, J.M., Blackwood, L., Petersen, J., Sullivan, S., 2015. Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology* 56, 401–413.
- Cockram, J., Chiapparino, E., Taylor, S.A., Stamati, K., Donini, P., Laurie, D.A., O’Sullivan, D.M., 2007. Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel VRN-H1 alleles and a predominant winter VRN-H1/VRN-H2 multi-locus haplotype. *Theor Appl Genet* 115, 993–1001.
- Cockram, J., Norris, C., O’Sullivan, D.M., 2009. PCR-Based Markers Diagnostic for Spring and Winter Seasonal Growth Habit in Barley. *Crop Science* 49, 403–410.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.
- Consonni, C., Humphry, M.E., Hartmann, H.A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., Vogel, J., Lipka, V., Kemmerling, B., Schulze-Lefert, P., Somerville, S.C., Panstruga, R., 2006. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat Genet* 38, 716–720.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., Coupland, G., 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316, 1030–1033.
- Dahleen, L.S., Manoharan, M., 2007. Recent advances in barley transformation. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 43, 493–506.
- Dan, Y., Armstrong, C.L., Dong, J., Feng, X., Fry, J.E., Keithly, G.E., Martinell, B.J., Roberts, G.A., Smith, L.A., Tan, L.J., 2009. Lipoic acid—an unique plant transformation enhancer. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 45, 630.
- Danilova, S.A., 2007. The technologies for genetic transformation of cereals. *Russ J Plant Physiol* 54, 569–581.
- Danyluk, J., Kane, N.A., Breton, G., Limin, A.E., Fowler, D.B., Sarhan, F., 2003. TaVRT-1, a Putative Transcription Factor Associated with Vegetative to Reproductive Transition in Cereals. *Plant Physiology* 132, 1849–1860.
- de Montaigu, A., Tóth, R., Coupland, G., 2010. Plant development goes like clockwork. *Trends Genet* 26, 296–306.
- Debernardi, J.M., Mecchia, M.A., Vercruyssen, L., Smaczniak, C., Kaufmann, K., Inze, D., Rodriguez, R.E., Palatnik, J.F., 2014. Post-transcriptional control of GRF transcription factors by microRNA miR396 and GIF co-activator affects leaf size and longevity. *Plant J* 79, 413–426.
- Debernardi, J.M., Tricoli, D.M., Ercoli, M.F., Hayta, S., Ronald, P., Palatnik, J.F., Dubcovsky, J., 2020. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nat Biotechnol* 38, 1274–1279.
- Deng, W., Casao, M.C., Wang, P., Sato, K., Hayes, P.M., Finnegan, E.J., Trevaskis, B., 2015. Direct links between the vernalization response and other key traits of cereal crops. *Nature Communications* 6, 5882.
- Distelfeld, A., Tranquilli, G., Li, C., Yan, L., Dubcovsky, J., 2009. Genetic and molecular characterization of the VRN2 loci in tetraploid wheat. *Plant Physiol.* 149, 245–257.
- Dixon, L.E., Karsai, I., Kiss, T., Adamski, N.M., Liu, Z., Ding, Y., Allard, V., Boden, S.A., Griffiths, S., 2019. VERNALIZATION1 controls developmental responses of winter wheat under high ambient temperatures. *Development* 146.
- Douchkov, D., Lück, S., Johrde, A., Nowara, D., Himmelbach, A., Rajaraman, J., Stein, N., Sharma, R., Kilian, B., Schweizer, P., 2014. Discovery of genes affecting resistance of barley to adapted and non-adapted powdery mildew fungi. *Genome Biology* 15, 518.
- Doudna, J.A., Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346.
- Dubcovsky, J., Lijavetzky, D., Appendino, L., Tranquilli, G., 1998. Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theor Appl Genet* 97, 968–975.

- Dubcovsky, J., Loukoianov, A., Fu, D., Valarik, M., Sanchez, A., Yan, L., 2006. Effect of Photoperiod on the Regulation of Wheat Vernalization Genes VRN1 and VRN2. *Plant Mol Biol* 60, 469–480.
- Dunford, R.P., Griffiths, S., Christodoulou, V., Laurie, D.A., 2005. Characterisation of a barley (*Hordeum vulgare* L.) homologue of the Arabidopsis flowering time regulator GIGANTEA. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 925–931.
- Ehrenreich, I.M., Hanzawa, Y., Chou, L., Roe, J.L., Kover, P.X., Purugganan, M.D., 2009. Candidate Gene Association Mapping of Arabidopsis Flowering Time. *Genetics* 183, 325–335.
- Ejaz, M., von Korff, M., 2017. The Genetic Control of Reproductive Development under High Ambient Temperature1. *Plant Physiol* 173, 294–306.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20, 6877–6888.
- Ellis, T., Adie, T., Baldwin, G.S., 2011. DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. *Integr Biol (Camb)* 3, 109–118.
- Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., Marillonnet, S., 2009. Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type II Restriction Enzymes. *PLOS ONE* 4, e5553.
- Engler, C., Marillonnet, S., 2013. Combinatorial DNA assembly using Golden Gate cloning. *Methods Mol Biol* 1073, 141–156.
- Erlendsson, L.S., Muench, M.O., Hellman, U., Hrafnkelsdóttir, S.M., Jonsson, A., Balmer, Y., Mäntylä, E., Orvar, B.L., 2010. Barley as a green factory for the production of functional Flt3 ligand. *Biotechnol J* 5, 163–171.
- Eskelin, K., Ritala, A., Suntio, T., Blumer, S., Holkeri, H., Wahlström, E.H., Baez, J., Mäkinen, K., Maria, N.A., 2009. Production of a recombinant full-length collagen type I alpha-1 and of a 45-kDa collagen type I alpha-1 fragment in barley seeds. *Plant Biotechnol. J.* 7, 657–672.
- Esse, G.W. van, Walla, A., Finke, A., Koornneef, M., Pecinka, A., Korff, M. von, 2017. Six-Rowed Spike3 (VRS3) Is a Histone Demethylase That Controls Lateral Spikelet Development in Barley. *Plant Physiology* 174, 2397–2408.
- Faure, S., Higgins, J., Turner, A., Laurie, D.A., 2007. The FLOWERING LOCUS T-Like Gene Family in Barley (*Hordeum vulgare*). *Genetics* 176, 599–609.
- Faure, S., Turner, A.S., Gruszka, D., Christodoulou, V., Davis, S.J., von Korff, M., Laurie, D.A., 2012. Mutation at the circadian clock gene EARLY MATURITY 8 adapts domesticated barley (*Hordeum vulgare*) to short growing seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 8328–8333.
- Fausser, F., Roth, N., Pacher, M., Ilg, G., Sánchez-Fernández, R., Biesgen, C., Puchta, H., 2012. In planta gene targeting. *PNAS* 109, 7535–7540.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Fogelmark, K., Troein, C., 2014. Rethinking Transcriptional Activation in the Arabidopsis Circadian Clock. *PLOS Computational Biology* 10, e1003705.
- Forster, B.P., 2001. Mutation genetics of salt tolerance in barley: An assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants. *Euphytica* 120, 317–328.
- Fu, D., Szűcs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J.S., Zitzewitz, J. von, Hayes, P.M., Dubcovsky, J., 2005. Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol Genet Genomics* 274, 442–443.
- Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M., Joung, J.K., 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 32, 279–284.
- Funatsuki, H., Kuroda, H., Kihara, M., Lazzeri, P.A., Müller, E., Lörz, H., Kishinami, I., 1995. Fertile transgenic barley generated by direct DNA transfer to protoplasts. *Theoret. Appl. Genetics* 91, 707–712.
- Gao, Y., Zhao, Y., 2014. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *J Integr Plant Biol* 56, 343–349.
- Gazzani, S., Gendall, A.R., Lister, C., Dean, C., 2003. Analysis of the Molecular Basis of Flowering Time Variation in Arabidopsis Accessions. *Plant Physiology* 132, 1107–1114.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* 6, 343–345.
- Greene, E.A., Codomo, C.A., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Till, B.J., Reynolds, S.H., Enns, L.C., Burtner, C., Johnson, J.E., Odden, A.R., Comai, L., Henikoff, S., 2003. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. *Genetics* 164, 731–740.
- Greenham, K., McClung, C.R., 2015. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature Reviews Genetics* 16, 598–610.
- Hanano, S., Goto, K., 2011. Arabidopsis TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *Plant Cell* 23, 3172–3184.

- Hartley, J.L., Temple, G.F., Brasch, M.A., 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10, 1788–1795.
- Harwood, W.A., 2012. Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat. *J Exp Bot* 63, 1791–1798.
- Harwood, W.A., Ross, S.M., Cilento, P., Snape, J.W., 2000. The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica* 111, 67–76.
- Hasan, M.M., Rafii, M.Y., Ismail, M.R., Mahmood, M., Rahim, H.A., Alam, M.A., Ashkani, S., Malek, M.A., Latif, M.A., 2015. Marker-assisted backcrossing: a useful method for rice improvement. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29, 237–254.
- Helfer, A., Nusinow, D.A., Chow, B.Y., Gehrke, A.R., Bulyk, M.L., Kay, S.A., 2011. LUX ARRHYTHMO Encodes a Nighttime Repressor of Circadian Gene Expression in the Arabidopsis Core Clock. *Current Biology* 21, 126–133.
- Hemming, M.N., Fieg, S., James Peacock, W., Dennis, E.S., Trevaskis, B., 2009. Regions associated with repression of the barley (*Hordeum vulgare*) VERNALIZATION1 gene are not required for cold induction. *Mol Genet Genomics* 282, 107–117.
- Hemming, M.N., Walford, S.A., Fieg, S., Dennis, E.S., Trevaskis, B., 2012. Identification of High-Temperature-Responsive Genes in Cereals. *Plant Physiology* 158, 1439–1450.
- Henderson, I.R., Shindo, C., Dean, C., 2003. The Need for Winter in the Switch to Flowering. *Annual Review of Genetics* 37, 371–392.
- Hensel, G., Floss, D.M., Arcalis, E., Sack, M., Melnik, S., Altmann, F., Rutten, T., Kumlehn, J., Stoger, E., Conrad, U., 2015. Transgenic Production of an Anti HIV Antibody in the Barley Endosperm. *PLoS ONE* 10, e0140476.
- Hensel, G., Kastner, C., Oleszczuk, S., Riechen, J., Kumlehn, J., 2009. Agrobacterium-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. *Int J Plant Genomics* 2009, 835608.
- Hensel, G., Valkov, V., Middlefell-Williams, J., Kumlehn, J., 2008. Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions. *J Plant Physiol* 165, 71–82.
- Heo, J.B., Sung, S., 2011. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* 331, 76–79.
- Hiei, Y., Ishida, Y., Kasaoka, K., Komari, T., 2006. Improved frequency of transformation in rice and maize by treatment of immature embryos with centrifugation and heat prior to infection with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant cell, tissue and organ culture* 87, 233–243.
- Himmelbach, A., Zierold, U., Hensel, G., Riechen, J., Douchkov, D., Schweizer, P., Kumlehn, J., 2007. A Set of Modular Binary Vectors for Transformation of Cereals. *Plant Physiology* 145, 1192–1200.
- Hisano, H., Meints, B., Moscou, M.J., Cistue, L., Echávarri, B., Sato, K., Hayes, P.M., 2017. Selection of transformation-efficient barley genotypes based on TFA (transformation amenability) haplotype and higher resolution mapping of the TFA loci. *Plant cell reports* 36, 611–620.
- Hisano, H., Sato, K., 2016. Genomic regions responsible for amenability to *Agrobacterium*-mediated transformation in barley. *Scientific reports* 6, 1–11.
- Holm, P.B., Olsen, O., Schnorf, M., Brinch-Pedersen, H., Knudsen, S., 2000. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Res* 9, 21–32.
- Holme, I.B., Brinch-Pedersen, H., Lange, M., Holm, P.B., 2006. Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. *Plant Cell Rep* 25, 1325–1335.
- Holtorf, H., Guitton, M.-C., Reski, R., 2002. Plant functional genomics. *Naturwissenschaften* 89, 235–249.
- Hood, H.M., Neafsey, D.E., Galagan, J., Sachs, M.S., 2009. Evolutionary roles of upstream open reading frames in mediating gene regulation in fungi. *Annu Rev Microbiol* 63, 385–409.
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G., Zhang, F., 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31, 827–832.
- Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H.P., Biest, N., Chen, G., Cheng, M., Feng, X., Radionenko, M., Lu, F., Fry, J., 2003. *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Rep* 21, 1010–1019.
- Hu, Z., Wang, L., Shi, Z., Jiang, J., Li, X., Chen, Y., Li, K., Luo, D., 2019. Customized one-step preparation of sgRNA transcription templates via overlapping PCR Using short primers and its application in vitro and in vivo gene editing. *Cell & Bioscience* 9, 87.
- Ib, H., H, B.-P., M, L., Pb, H., 2008. Transformation of different barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. *Plant Cell Rep* 27, 1833–1840.
- International Barley Genome Sequencing Consortium, Mayer, K.F.X., Waugh, R., Brown, J.W.S., Schulman, A., Langridge, P., Platzer, M., Fincher, G.B., Muehlbauer, G.J., Sato, K., Close, T.J., Wise, R.P., Stein, N., 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491, 711–716.

- Jang, S., Marchal, V., Panigrahi, K.C.S., Wenkel, S., Soppe, W., Deng, X.-W., Valverde, F., Coupland, G., 2008. Arabidopsis COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *The EMBO Journal* 27, 1277–1288.
- Jankowicz-Cieslak, J., Till, B.J., 2015. Forward and Reverse Genetics in Crop Breeding, in: Al-Khayri, J.M., Jain, S.M., Johnson, D.V. (Eds.), *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools*. Springer International Publishing, Cham, pp. 215–240.
- Jayakodi, M., Padmarasu, S., Haberer, G., Bonthala, V.S., Gundlach, H., Monat, C., Lux, T., Kamal, N., Lang, D., Himmelbach, A., Ens, J., Zhang, X.-Q., Angessa, T.T., Zhou, G., Tan, C., Hill, C., Wang, P., Schreiber, M., Boston, L.B., Plott, C., Jenkins, J., Guo, Y., Fiebig, A., Budak, H., Xu, D., Zhang, J., Wang, C., Grimwood, J., Schmutz, J., Guo, G., Zhang, G., Mochida, K., Hirayama, T., Sato, K., Chalmers, K.J., Langridge, P., Waugh, R., Pozniak, C.J., Scholz, U., Mayer, K.F.X., Spannagl, M., Li, C., Mascher, M., Stein, N., 2020. The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding. *Nature* 588, 284–289.
- Jha, A.K., Dahleen, L.S., Suttle, J.C., 2007. Ethylene influences green plant regeneration from barley callus. *Plant Cell Reports* 26, 285–290.
- Jiang, F., Doudna, J.A., 2017. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics* 46, 505–529.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R., Dean, C., 2000. Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* 290, 344–347.
- Jones, H., Leigh, F.J., Mackay, I., Bower, M.A., Smith, L.M.J., Charles, M.P., Jones, G., Jones, M.K., Brown, T.A., Powell, W., 2008. Population-Based Resequencing Reveals That the Flowering Time Adaptation of Cultivated Barley Originated East of the Fertile Crescent. *Mol Biol Evol* 25, 2211–2219.
- Justice, M.J., Noveroske, J.K., Weber, J.S., Zheng, B., Bradley, A., 1999. Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet* 8, 1955–1963.
- Kane, N.A., Agharbaoui, Z., Diallo, A.O., Adam, H., Tominaga, Y., Ouellet, F., Sarhan, F., 2007. TaVRT2 represses transcription of the wheat vernalization gene TaVRN1. *The Plant Journal* 51, 670–680.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., Bonas, U., 2007. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 318, 648–651.
- Kemper, E.L., Joséda Silva, M., Arruda, P., 1996. Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. *Plant Science* 121, 85–93.
- Khlestkina, E.K., Giura, A., Röder, M.S., Börner, A., 2009. A new gene controlling the flowering response to photoperiod in wheat. *Euphytica* 165, 579–585.
- Kikuchi, R., Handa, H., 2009. Photoperiodic control of flowering in barley. *Breeding Science (Japan)*.
- Kim, H., Kim, J.-S., 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics* 15, 321–334.
- Kim, J.H., Choi, D., Kende, H., 2003. The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis. *Plant J* 36, 94–104.
- Kim, Y., Kweon, J., Kim, A., Chon, J.K., Yoo, J.Y., Kim, H.J., Kim, Sojung, Lee, C., Jeong, E., Chung, E., Kim, D., Lee, M.S., Go, E.M., Song, H.J., Kim, H., Cho, N., Bang, D., Kim, Seokjoong, Kim, J.-S., 2013. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol* 31, 251–258.
- Kippes, N., Debernardi, J.M., Vasquez-Gross, H.A., Akpinar, B.A., Budak, H., Kato, K., Chao, S., Akhunov, E., Dubcovsky, J., 2015. Identification of the VERNALIZATION 4 gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia. *PNAS* 112, E5401–E5410.
- Kippes, N., Guedira, M., Lin, L., Alvarez, M.A., Brown-Guedira, G.L., Dubcovsky, J., 2018. Single nucleotide polymorphisms in a regulatory site of VRN-A1 first intron are associated with differences in vernalization requirement in winter wheat. *Mol Genet Genomics* 293, 1231–1243.
- Komatsuda, T., Pourkheirandish, M., He, C., Azhaguvel, P., Kanamori, H., Perovic, D., Stein, N., Graner, A., Wicker, T., Tagiri, A., Lundqvist, U., Fujimura, T., Matsuoka, M., Matsumoto, T., Yano, M., 2007. Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *PNAS* 104, 1424–1429.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nkayaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35, 1547–1549.
- Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D., Loerz, H., 2006. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol J* 4, 251–261.
- Langridge, P., Shi, B., Fincher, G., 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome.
- Laubinger, S., Marchal, V., Le Gourrierec, J., Gentilhomme, J., Wenkel, S., Adrian, J., Jang, S., Kulajta, C., Braun, H., Coupland, G., Hoecker, U., 2006. Arabidopsis SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development* 133, 3213–3222.

- Laurie, D.A., Pratchett, N., Snape, J.W., Bezant, J.H., 1995. RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter \times spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. *Genome* 38, 575–585.
- Lazaro, A., Valverde, F., Piñeiro, M., Jarillo, J.A., 2012. The Arabidopsis E3 Ubiquitin Ligase HOS1 Negatively Regulates CONSTANS Abundance in the Photoperiodic Control of Flowering. *The Plant Cell* 24, 982–999.
- Lee, I., Aukerman, M.J., Gore, S.L., Lohman, K.N., Michaels, S.D., Weaver, L.M., John, M.C., Feldmann, K.A., Amasino, R.M., 1994. Isolation of LUMINIDEPENDENS: a gene involved in the control of flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell* 6, 75–83.
- Lee, J., Oh, M., Park, H., Lee, I., 2008. SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates leafy. *Plant J* 55, 832–843.
- Li, C., Distelfeld, A., Comis, A., Dubcovsky, J., 2011. Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. *Plant J* 67, 763–773.
- Li, C., Dubcovsky, J., 2008. Wheat FT protein regulates VRN1 transcription through interactions with FDL2. *Plant J* 55, 543–554.
- Li, Z., Liu, Z.-B., Xing, A., Moon, B.P., Koellhoffer, J.P., Huang, L., Ward, R.T., Clifton, E., Falco, S.C., Cigan, A.M., 2015. Cas9-Guide RNA Directed Genome Editing in Soybean. *Plant Physiology* 169, 960–970.
- Liu, L., Liu, C., Hou, X., Xi, W., Shen, L., Tao, Z., Wang, Y., Yu, H., 2012. FTIP1 Is an Essential Regulator Required for Florigen Transport. *PLOS Biology* 10, e1001313.
- Liu, L.-J., Zhang, Y.-C., Li, Q.-H., Sang, Y., Mao, J., Lian, H.-L., Wang, L., Yang, H.-Q., 2008. COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 292–306.
- Lu, Q., 2005. Seamless cloning and gene fusion. *Trends Biotechnol* 23, 199–207.
- Lundqvist, U., 2009. Eighty Years of Scandinavian Barley Mutation Genetics and Breeding. Induced plant mutations in the genomics era.
- Lundqvist, U., Lundqvist, A., 1988. Induced intermedium mutants in barley: origin, morphology and inheritance. *Hereditas* 108, 13–26.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Yan, Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y., Xie, Y., Shen, R., Chen, S., Wang, Z., Chen, Yuanling, Guo, J., Chen, L., Zhao, X., Dong, Z., Liu, Y.-G., 2015. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Mol Plant* 8, 1274–1284.
- Massiah, A., Rong, H.L., Brown, S., Laurie, S., 2001. Accelerated production and identification of fertile, homozygous transgenic wheat lines by anther culture. *Molecular Breeding* 7, 163–173.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., Henikoff, S., 2000. Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for Plant Functional Genomics. *Plant Physiol* 123, 439–442.
- Michaels, S.D., Amasino, R.M., 1999. FLOWERING LOCUS C Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering. *The Plant Cell* 11, 949–956.
- Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., Dulay, G.P., Hua, K.L., Ankoudinova, I., Cost, G.J., Urnov, F.D., Zhang, H.S., Holmes, M.C., Zhang, L., Gregory, P.D., Rebar, E.J., 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* 29, 143–148.
- Morran, S., Eini, O., Pyvovarenko, T., Parent, B., Singh, R., Ismagul, A., Eliby, S., Shirley, N., Langridge, P., Lopato, S., 2011. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnol J* 9, 230–249.
- Müller, L.M., von Korff, M., Davis, S.J., 2014. Connections between circadian clocks and carbon metabolism reveal species-specific effects on growth control. *J Exp Bot* 65, 2915–2923.
- Nakamichi, N., Kiba, T., Henriques, R., Mizuno, T., Chua, N.-H., Sakakibara, H., 2010. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 Are Transcriptional Repressors in the Arabidopsis Circadian Clock. *The Plant Cell* 22, 594–605.
- Nemoto, Y., Kisaka, M., Fuse, T., Yano, M., Ogihara, Y., 2003. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the CONSTANS flowering time gene in transgenic rice. *The Plant Journal* 36, 82–93.
- Nishida, H., Ishihara, D., Ishii, M., Kaneko, T., Kawahigashi, H., Akashi, Y., Saisho, D., Tanaka, K., Handa, H., Takeda, K., Kato, K., 2013a. Phytochrome C Is A Key Factor Controlling Long-Day Flowering in Barley. *Plant Physiology* 163, 804–814.
- Nishida, H., Yoshida, T., Kawakami, K., Fujita, M., Long, B., Akashi, Y., Laurie, D.A., Kato, K., 2013b. Structural variation in the 5' upstream region of photoperiod-insensitive alleles Ppd-A1a and Ppd-B1a identified in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.), and their effect on heading time. *Mol Breeding* 31, 27–37.
- Nishimura, A., Ashikari, M., Lin, S., Takashi, T., Angeles, E.R., Yamamoto, T., Matsuoka, M., 2005. Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 11940–11944.
- Nitcher, R., Distelfeld, A., Tan, C., Yan, L., Dubcovsky, J., 2013. Increased copy number at the HvFT1 locus is associated with accelerated flowering time in barley. *Mol Genet Genomics* 288, 261–275.

- Oh, S.-J., Kwon, C.-W., Choi, D.-W., Song, S.I., Kim, J.-K., 2007. Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 5, 646–656.
- Oki, N., Yano, K., Okumoto, Y., Tsukiyama, T., Teraishi, M., Tanisaka, T., 2008. A genome-wide view of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in rice, *Oryza sativa* ssp. *japonica*. *Genes & Genetic Systems* 83, 321–329.
- Oladosu, Y., Rafii, M.Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H.A., Miah, G., Usman, M., 2016. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 30, 1–16.
- Oliver, S.N., Finnegan, E.J., Dennis, E.S., Peacock, W.J., Trevaskis, B., 2009. Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the VERNALIZATION1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8386–8391.
- Orman-Ligeza, B., Harwood, W., Hedley, P.E., Hinchcliffe, A., Macaulay, M., Uauy, C., Trafford, K., 2020. TRAI: A Locus Responsible for Controlling Agrobacterium-Mediated Transformability in Barley. *Front. Plant Sci.* 11.
- Osborn, M.J., Defeo, A.P., Blazar, B.R., Tolar, J., 2011. Synthetic zinc finger nuclease design and rapid assembly. *Human gene therapy* 22, 1155–1165.
- Parinov, S., Sundaresan, V., 2000. Functional genomics in Arabidopsis: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr Opin Biotechnol* 11, 157–161.
- Pidal, B., Yan, L., Fu, D., Zhang, F., Tranquilli, G., Dubcovsky, J., 2009. The CARG-Box Located Upstream from the Transcriptional Start of Wheat Vernalization Gene VRN1 Is Not Necessary for the Vernalization Response. *Journal of Heredity* 100, 355–364.
- Pieper, R., Tomé, F., Korff, M. von, 2020. FLOWERING LOCUS T4 (HvFT4) delays flowering and decreases floret fertility in barley. *bioRxiv* 2020.03.26.010033.
- Pokhilko, A., Fernández, A.P., Edwards, K.D., Southern, M.M., Halliday, K.J., Millar, A.J., 2012. The clock gene circuit in Arabidopsis includes a repressilator with additional feedback loops. *Molecular Systems Biology* 8, 574.
- Porteus, M.H., Carroll, D., 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol* 23, 967–973.
- Pruneda-Paz, J.L., Breton, G., Para, A., Kay, S.A., 2009. A functional genomics approach reveals CHE as a component of the Arabidopsis circadian clock. *Science* 323, 1481–1485.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., Coupland, G., 1995. The CONSTANS gene of arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80, 847–857.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., Zhang, F., 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154, 1380–1389.
- Reyon, D., Tsai, S.Q., Khayter, C., Foden, J.A., Sander, J.D., Joung, J.K., 2012. FLASH Assembly of TALENs Enables High-Throughput Genome Editing. *Nat Biotechnol* 30, 460–465.
- Robson, F., Costa, M.M.R., Hepworth, S.R., Vizir, I., Pinheiro, M., Reeves, P.H., Putterill, J., Coupland, G., 2001. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene CONSTANS demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *The Plant Journal* 28, 619–631.
- Roychowdhury, R., Tah, J., 2013. Mutagenesis—A Potential Approach for Crop Improvement, in: Hakeem, K.R., Ahmad, P., Ozturk, M. (Eds.), *Crop Improvement: New Approaches and Modern Techniques*. Springer US, Boston, MA, pp. 149–187.
- Rudd, S., Frisch, M., Grote, K., Meyers, B.C., Mayer, K., Werner, T., 2004. Genome-Wide in Silico Mapping of Scaffold/Matrix Attachment Regions in Arabidopsis Suggests Correlation of Intragenic Scaffold/Matrix Attachment Regions with Gene Expression. *Plant Physiology* 135, 715–722.
- Santos-Moreno, J., Schaerli, Y., 2019. A Framework for the Modular and Combinatorial Assembly of Synthetic Gene Circuits. *ACS Synth. Biol.* 8, 1691–1697.
- Sasaki, Y., Sone, T., Yoshida, S., Yahata, K., Hotta, J., Chesnut, J.D., Honda, T., Imamoto, F., 2004. Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *J Biotechnol* 107, 233–243.
- Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A., Imaizumi, T., 2007. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science* 318, 261–265.
- Schmid-Burgk, J.L., Schmidt, T., Kaiser, V., Höning, K., Hornung, V., 2013. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol* 31, 76–81.
- Schulze, J., 2007. Improvements in cereal tissue culture by thidiazuron: a review. *Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology* 1, 64–79.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R.A., Coupland, G., 2006. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. *Genes Dev.* 20, 898–912.
- Sestili, F., Janni, M., Doherty, A., Botticella, E., D'Ovidio, R., Masci, S., Jones, H.D., Lafiandra, D., 2010. Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the SBEII genes. *BMC Plant Biol* 10, 144.

- Shaw, L.M., Turner, A.S., Laurie, D.A., 2012. The impact of photoperiod insensitive Ppd-1a mutations on the photoperiod pathway across the three genomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *The Plant Journal* 71, 71–84.
- Shcherban, A.B., Schichkina, A.A., Salina, E.A., 2016. The occurrence of spring forms in tetraploid Timopheevi wheat is associated with variation in the first intron of the VRN-A1 gene. *BMC Plant Biology* 16, 236.
- Shimada, S., Ogawa, T., Kitagawa, S., Suzuki, T., Ikari, C., Shitsukawa, N., Abe, T., Kawahigashi, H., Kikuchi, R., Handa, H., 2009. A genetic network of flowering-time genes in wheat leaves, in which an APETALA1/FRUITFULL-like gene, VRN1, is upstream of FLOWERING LOCUS T. *The Plant Journal* 58, 668–681.
- Shindo, C., Lister, C., Crevillen, P., Nordborg, M., Dean, C., 2006. Variation in the epigenetic silencing of FLC contributes to natural variation in Arabidopsis vernalization response. *Genes Dev* 20, 3079–3083.
- Shrawat, A.K., Becker, D., Lörz, H., 2007. Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science* 172, 281–290.
- Shrestha, A.K., Ng, C.S., Lopez-Rubio, A., Blazek, J., Gilbert, E.P., Gidley, M.J., 2010. Enzyme resistance and structural organization in extruded high amylose maize starch. *Carbohydrate Polymers* 80, 699–710.
- Song, Y.H., Smith, R.W., To, B.J., Millar, A.J., Imaizumi, T., 2012. FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. *Science* 336, 1045–1049.
- Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X., Du, W., Du, J., Francis, F., Zhao, Y., Xia, L., 2017. Generation of High-Amylose Rice through CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of Starch Branching Enzymes. *Front. Plant Sci.* 8.
- Sun, Y., Zhang, X., Wu, C., He, Y., Ma, Y., Hou, H., Guo, X., Du, W., Zhao, Y., Xia, L., 2016. Engineering Herbicide-Resistant Rice Plants through CRISPR/Cas9-Mediated Homologous Recombination of Acetolactate Synthase. *Mol Plant* 9, 628–631.
- Sung, S., Amasino, R.M., 2004. Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* 427, 159–164.
- Svitashev, S., Young, J.K., Schwartz, C., Gao, H., Falco, S.C., Cigan, A.M., 2015. Targeted Mutagenesis, Precise Gene Editing, and Site-Specific Gene Insertion in Maize Using Cas9 and Guide RNA. *Plant Physiol* 169, 931–945.
- Szücs, P., Skinner, J.S., Karsai, I., Cuesta-Marcos, A., Haggard, K.G., Corey, A.E., Chen, T.H.H., Hayes, P.M., 2007. Validation of the VRN-H2/VRN-H1 epistatic model in barley reveals that intron length variation in VRN-H1 may account for a continuum of vernalization sensitivity. *Mol Genet Genomics* 277, 249–261.
- Szurman-Zubrzycka, M., Chmielewska, B., Gajewska, P., Szarejko, I., 2017. Mutation Detection by Analysis of DNA Heteroduplexes in TILLING Populations of Diploid Species, in: Jankowicz-Cieslak, J., Tai, T.H., Kumlehn, J., Till, B.J. (Eds.), *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols*. Springer International Publishing, Cham, pp. 281–303.
- Tadele, Z., MBA, C., Till, B.J., 2009. TILLING for Mutations in Model Plants and Crops, in: Jain, S.M., Brar, D.S. (Eds.), *Molecular Techniques in Crop Improvement: 2nd Edition*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 307–332.
- Takahashi R, Yasuda S (1971) Genetics of earliness and growth habit in barley. *In* RA Nilan, ed, *Barley Genetics II. Proceedings of the Second International Barley Genetics Symposium*. Washington State University Press, Pullman, WA, pp 388–408.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10, 512–526.
- Tang, K., Wu, A., Yao, J., Qi, H., Lu, X., 2000. Development of transgenic rice pure lines by particle bombardment-mediated transformation and genetic analysis-based selection. *Acta Biotechnologica* 20, 175–183.
- Tenea, G.N., Spantzel, J., Lee, L.-Y., Zhu, Y., Lin, K., Johnson, S.J., Gelvin, S.B., 2009. Overexpression of several Arabidopsis histone genes increases Agrobacterium-mediated transformation and transgene expression in plants. *The Plant Cell* 21, 3350–3367.
- Tetko, I.V., Haberer, G., Rudd, S., Meyers, B., Mewes, H.-W., Mayer, K.F.X., 2006. Spatiotemporal Expression Control Correlates with Intragenic Scaffold Matrix Attachment Regions (S/MARs) in Arabidopsis thaliana. *PLOS Computational Biology* 2, e21.
- Thomas, S., Maynard, N.D., Gill, J., 2015. DNA library construction using Gibson Assembly®. *Nature Methods* 12, i–ii.
- Thomashow, M.F., 2010. Molecular Basis of Plant Cold Acclimation: Insights Gained from Studying the CBF Cold Response Pathway. *Plant Physiology* 154, 571–577.
- Till, B.J., Reynolds, S.H., Greene, E.A., Codomo, C.A., Enns, L.C., Johnson, J.E., Burtner, C., Odden, A.R., Young, K., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Comai, L., Henikoff, S., 2003. Large-Scale Discovery of Induced Point Mutations With High-Throughput TILLING. *Genome Res* 13, 524–530.
- Till, B.J., Zerr, T., Bowers, E., Greene, E.A., Comai, L., Henikoff, S., 2006. High-throughput discovery of rare human nucleotide polymorphisms by Ecotilling. *Nucleic Acids Res* 34, e99.
- Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thornton, S., Brettell, R., 1997. Agrobacterium tumefaciens-mediated barley transformation. *Plant Journal* 11, 1369–1376.

- Torti, S., Fornara, F., Vincent, C., Andrés, F., Nordström, K., Göbel, U., Knoll, D., Schoof, H., Coupland, G., 2012. Analysis of the Arabidopsis Shoot Meristem Transcriptome during Floral Transition Identifies Distinct Regulatory Patterns and a Leucine-Rich Repeat Protein That Promotes Flowering. *The Plant Cell* 24, 444–462.
- Travella, S., Ross, S.M., Harden, J., Everett, C., Snape, J.W., Harwood, W.A., 2005. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and Agrobacterium-mediated techniques. *Plant Cell Rep* 23, 780–789.
- Trevaskis, B., Bagnall, D.J., Ellis, M.H., Peacock, W.J., Dennis, E.S., 2003. MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13099–13104.
- Trevaskis, B., Hemming, M.N., Peacock, W.J., Dennis, E.S., 2006. HvVRN2 Responds to Daylength, whereas HvVRN1 Is Regulated by Vernalization and Developmental Status. *Plant Physiol* 140, 1397–1405.
- Trevaskis, B., Tadege, M., Hemming, M.N., Peacock, W.J., Dennis, E.S., Sheldon, C., 2007. Short Vegetative Phase-Like MADS-Box Genes Inhibit Floral Meristem Identity in Barley. *Plant Physiology* 143, 225–235.
- Tsai, S.Q., Wyvekens, N., Khayter, C., Foden, J.A., Thapar, V., Reyon, D., Goodwin, M.J., Aryee, M.J., Joung, J.K., 2014. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* 32, 569–576.
- Turck, F., Fornara, F., Coupland, G., 2008. Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu Rev Plant Biol* 59, 573–594.
- Turner, A., Beales, J., Faure, S., Dunford, R.P., Laurie, D.A., 2005. The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310, 1031–1034.
- Várallyay, E., Giczey, G., Burgyán, J., 2012. Virus-induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. *Arch Virol* 157, 1345–1350.
- von Zitzewitz, J., Szűcs, P., Dubcovsky, J., Yan, L., Francia, E., Pecchioni, N., Casas, A., Chen, T.H.H., Hayes, P.M., Skinner, J.S., 2005. Molecular and Structural Characterization of Barley Vernalization Genes. *Plant Mol Biol* 59, 449–467.
- Wan, Y., Lemaux, P.G., 1994. Generation of Large Numbers of Independently Transformed Fertile Barley Plants. *Plant Physiol* 104, 37–48.
- Wang, J.-W., Czech, B., Weigel, D., 2009. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138, 738–749.
- Wang, M.B., Abbott, D.C., Waterhouse, P.M., 2000. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Mol Plant Pathol* 1, 347–356.
- Waterworth, W.M., Drury, G.E., Bray, C.M., West, C.E., 2011. Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *New Phytol* 192, 805–822.
- Weber, E., Gruetznier, R., Werner, S., Engler, C., Marillonnet, S., 2011. Assembly of Designer TAL Effectors by Golden Gate Cloning. *PLOS ONE* 6, e19722.
- Weeks, D.P., Spalding, M.H., Yang, B., 2016. Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnology Journal* 14, 483–495.
- Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Gourrierc, J.L., Samach, A., Coupland, G., 2006. CONSTANS and the CCAAT Box Binding Complex Share a Functionally Important Domain and Interact to Regulate Flowering of Arabidopsis. *The Plant Cell* 18, 2971–2984.
- Winkler, S., Schwabedissen, A., Backasch, D., Bökel, C., Seidel, C., Bönisch, S., Fürthauer, M., Kuhrs, A., Cobreros, L., Brand, M., González-Gaitán, M., 2005. Target-selected mutant screen by TILLING in *Drosophila*. *Genome Res.* 15, 718–723.
- Woods, D.P., Ream, T.S., Minevich, G., Hobert, O., Amasino, R.M., 2014. PHYTOCHROME C is an essential light receptor for photoperiodic flowering in the temperate grass, *Brachypodium distachyon*. *Genetics* 198, 397–408.
- Wu, J.-L., Wu, C., Lei, C., Baraoidan, M., Bordeos, A., Madamba, M.R.S., Ramos-Pamplona, M., Mauleon, R., Portugal, A., Ulat, V.J., Bruskiwich, R., Wang, G., Leach, J., Khush, G., Leung, H., 2005. Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Mol Biol* 59, 85–97.
- Xie, K., Minkenberg, B., Yang, Y., 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *PNAS* 112, 3570–3575.
- Xue, W., Xing, Y., Weng, X., Zhao, Y., Tang, W., Wang, L., Zhou, H., Yu, S., Xu, C., Li, X., Zhang, Q., 2008. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nat. Genet.* 40, 761–767.
- Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S., Dubcovsky, J., 2006. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT. *PNAS* 103, 19581–19586.
- Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherman, J., Dubcovsky, J., 2004. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *Theor Appl Genet* 109, 1677–1686.
- Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., SanMiguel, P., Bennetzen, J.L., Echenique, V., Dubcovsky, J., 2004. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* 303, 1640–1644.
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., Dubcovsky, J., 2003. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *PNAS* 100, 6263–6268.

- Zakhrabekova, S., Gough, S.P., Braumann, I., Müller, A.H., Lundqvist, J., Ahmann, K., Dockter, C., Matyszczyk, I., Kurowska, M., Druka, A., Waugh, R., Graner, A., Stein, N., Steuernagel, B., Lundqvist, U., Hansson, M., 2012. Induced mutations in circadian clock regulator *Mat-a* facilitated short-season adaptation and range extension in cultivated barley. *PNAS* 109, 4326–4331.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33.
- Zhao, J., Ren, W., Zhi, D., Wang, L., Xia, G., 2007. Arabidopsis DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. *Plant Cell Rep* 26, 1521–1528.
- Zhao, X.Y., Liu, M.S., Li, J.R., Guan, C.M., Zhang, X.S., 2005. The wheat *TaGI1*, involved in photoperiodic flowering, encodes an Arabidopsis *GI* ortholog. *Plant molecular biology* 58, 53–64.
- Zhu, C., Bortesi, L., Baysal, C., Twyman, R.M., Fischer, R., Capell, T., Schillberg, S., Christou, P., 2017. Characteristics of Genome Editing Mutations in Cereal Crops. *Trends Plant Sci* 22, 38–52.
- Zuo, Z., Liu, H., Liu, B., Liu, X., Lin, C., 2011. Blue Light-Dependent Interaction of *CRY2* with *SPA1* Regulates *COP1* activity and Floral Initiation in Arabidopsis. *Curr Biol* 21, 841–847.

Internetové zdroje:

Addgene Blog. [online] [navštívené 4.1.2021]. Dostupné z <https://blog.addgene.org/plasmids-101-gateway-cloning>.

FAO statistics. [online] [navštívené 15.11.2020]. Dostupné z <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

New England Biolabs. [online] [navštívené 4.1.2021]. Dostupné z <https://www.neb.ca/detail.php?id=e1600>.

New England Biolabs. [online] [navštívené 4.1.2021]. Dostupné z <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/gibson-assembly>.

9 Prílohy

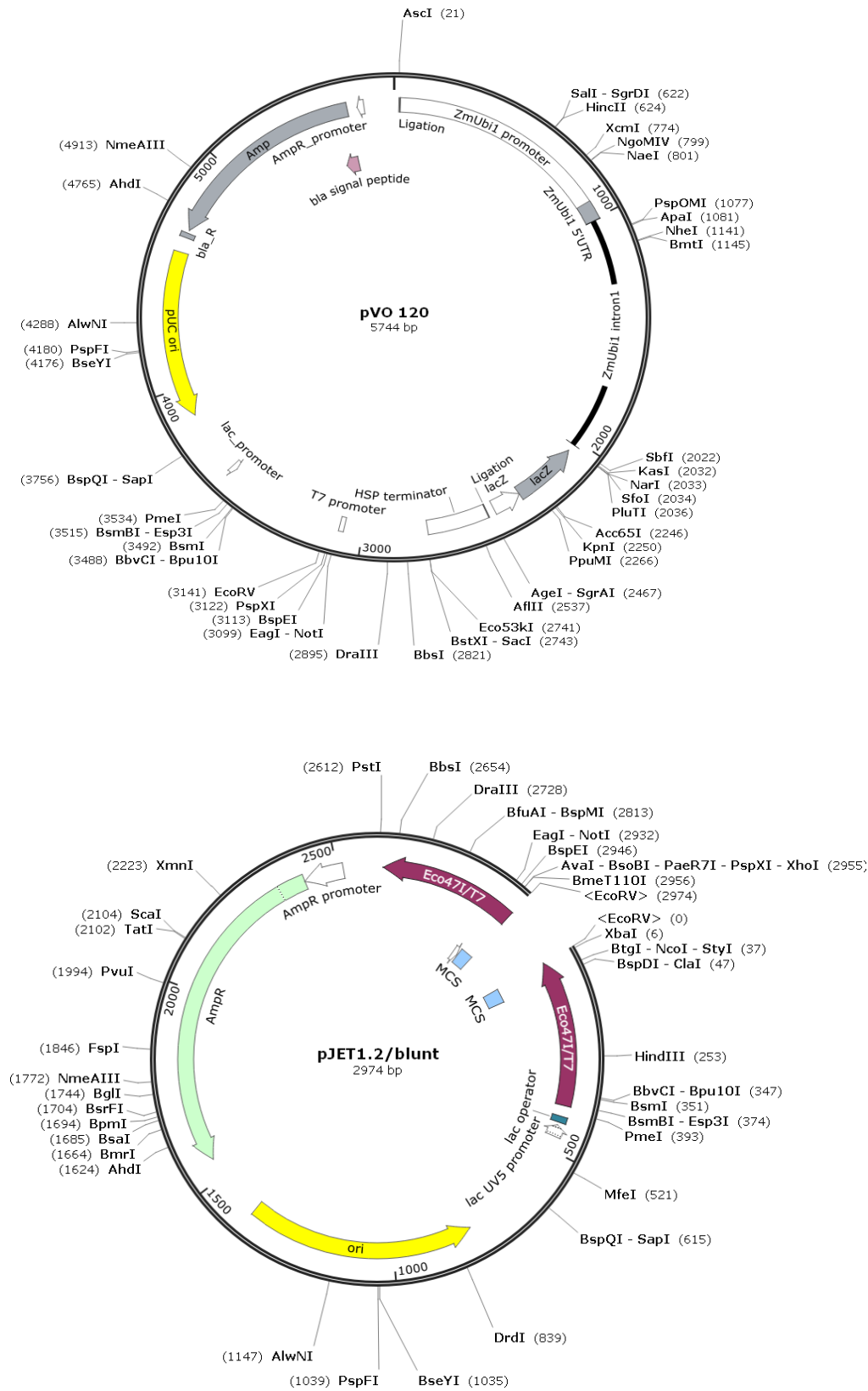
Príloha 1: Zoznam kandidátov a alelická konštitúcia testovaných génov (<i>VRN-H1</i> , <i>Ppd-H1</i> , <i>VRN-H2</i> : <i>ZCCT-Ha</i> , <i>ZCCT-Hb</i> , <i>ZCCT-Hc</i>).....	1
Príloha 2: Mapy klonovacích vektorov pVO120, pjet1.2/blunt a pKGWS7 zobrazených pomocou programu SnapGene.	3
Príloha 3: Alignment promotorovej oblasti <i>VRN-H1</i> génu u 21 kultivarov jačmeňa vytvorený v programe BioEdit.	5
Príloha 4: Alignment kódujúcej sekvencie <i>VRN-H1</i> génu vytvorený v programe BioEdit..	12
Príloha 5: Alignment proteínovej sekvencie MADS-box transkripčného faktoru <i>VRN-H1</i> vytvorený v programe BioEdit.	14

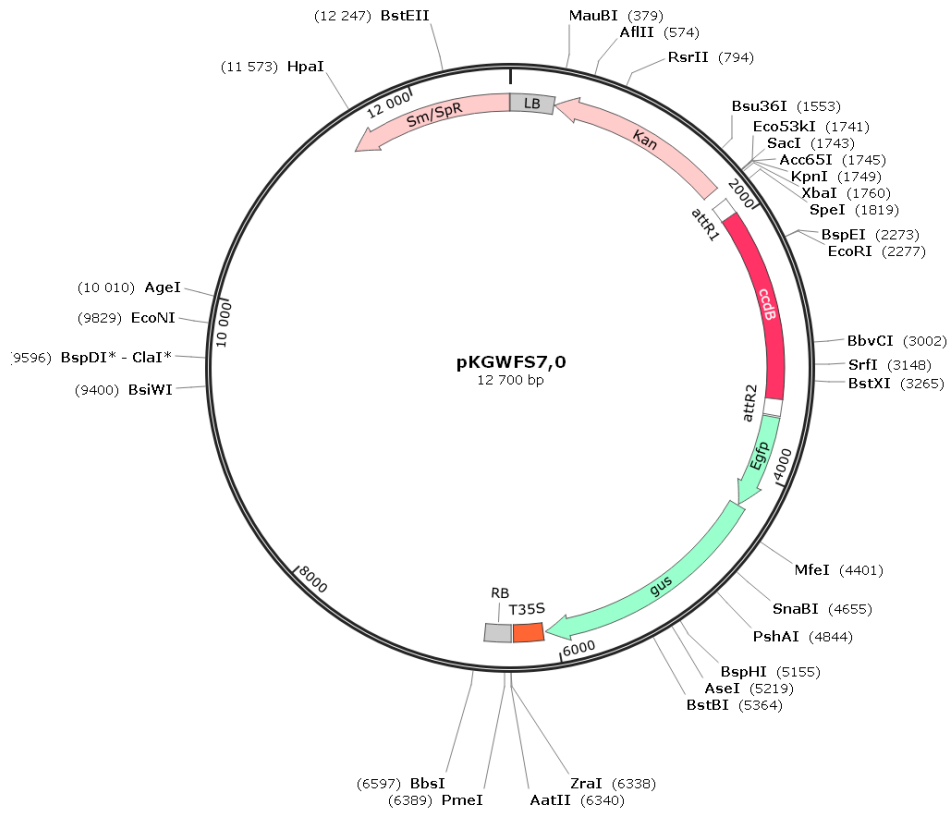
Príloha 1: Zoznam kandidátov a alelická konštitúcia testovaných génov (*VRN-H1*, *Ppd-H1*, *VRN-H2*: *ZCCT-Ha*, *ZCCT-Hb*, *ZCCT-Hc*). D – dominantná alela, R – recesívna alela, + – amplifikovaný produkt, - – žiaden produkt.

Označenie	Sadenie	Kvitnutie	Počet dní	Počet odnoží	Počet radov	<i>VRN-H1</i> primer 1	<i>VRN-H1</i> primer 3 (616/574 bp)	<i>VRN-H1</i> alela	<i>Ppd-H1</i>	<i>VRN-H2</i> (<i>ZCCT-Ha</i>)	<i>VRN-H2</i> (<i>ZCCT-Hb</i>)	<i>VRN-H2</i> (<i>ZCCT-Hc</i>)
ATL_A1	01.04.2020	29.05.2020	58	2	2	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A2	01.04.2020	29.05.2020	58	1	2	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A3	01.04.2020	29.05.2020	58	1	2	+	616	<i>HvVRN1</i>	D	+	+	+
ATL_A4	01.04.2020	13.06.2020	73	2	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	-
ATL_A5	01.04.2020	16.06.2020	76	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A6	01.04.2020	16.06.2020	76	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A7	01.04.2020	18.06.2020	78	2	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A8	01.04.2020	22.06.2020	82	4	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A9	01.04.2020	19.06.2020	79	-	6	-	-	-	-	-	-	-
ATL_A10	01.04.2020	19.06.2020	79	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A12	01.04.2020	19.06.2020	79	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A13	01.04.2020	19.06.2020	79	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A14	01.04.2020	19.06.2020	79	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A15	01.04.2020	19.06.2020	79	5	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	D	+	+	+
ATL_A16	01.04.2020	19.06.2020	79	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A17	01.04.2020	19.06.2020	79	3	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	D	+	+	+
ATL_A18	01.04.2020	19.06.2020	79	2	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A19	01.04.2020	26.06.2020	86	2	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A20	01.04.2020	26.06.2020	86	4	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A21	01.04.2020	26.06.2020	86	2	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A22	01.04.2020	27.06.2020	87	2	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A23	01.04.2020	26.06.2020	86	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A24	01.04.2020	26.06.2020	86	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A25	01.04.2020	26.06.2020	86	7	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+

ATL_A26	01.04.2020	26.06.2020	86	13	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A27	01.04.2020	26.06.2020	86	2	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	D	+	+	+
ATL_A28	01.04.2020	27.06.2020	87	3	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A28!	01.04.2020	27.06.2020	87	3	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A29	01.04.2020	27.06.2020	87	2	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	D	+	+	+
ATL_A30	01.04.2020	27.06.2020	87	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	D	+	+	+
ATL_A31	01.04.2020	28.06.2020	88	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A32	01.04.2020	28.06.2020	88	4	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A33	01.04.2020	29.06.2020	89	1	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+
ATL_A34	01.04.2020	29.06.2020	89	2	6	+	616	<i>HvVRN1</i>	R	+	+	+

Príloha 2: Mapy klonovacích vektorov pVO120, pJET1.2/blunt a pKGWS7 zobrazených pomocou programu SnapGene.





Strider
Igri
HOR3081
HOR3365
HOR21599
ZDM02064
OUN333
BlK-04-12
HOR13821
Morex
Akashinriki
Barke
Golden Promise
Hockett
HOR7552
HOR8148
HOR9043
HOR10350
HOR13942
RGT Planet
ZDM01467

Strider
Igri
HOR3081
HOR3365
HOR21599
ZDM02064
OUN333
BlK-04-12
HOR13821
Morex
Akashinriki
Barke
Golden Promise
Hockett
HOR7552
HOR8148
HOR9043
HOR10350
HOR13942
RGT Planet
ZDM01467

Strider
Igri
HOR3081
HOR3365
HOR21599
ZDM02064
OUN333
BlK-04-12
HOR13821
Morex
Akashinriki
Barke
Golden Promise
Hockett
HOR7552
HOR8148
HOR9043
HOR10350
HOR13942
RGT Planet
ZDM01467

Strider
Igri
HOR3081
HOR3365
HOR21599
ZDM02064
OUN333
BlK-04-12
HOR13821
Morex
Akashinriki
Barke
Golden Promise
Hockett
HOR7552
HOR8148
HOR9043
HOR10350
HOR13942
RGT Planet
ZDM01467

Legenda:

W/S: diagnostické regióny podľa von Zitzewitz *et al.*, 2005

CArG-like box: CCAATTTAAG, CCAAAAAGTAG, CCTCATTGG

CRT/DRE (väzobné miesto pre transkripčné faktory zohrávajúce úlohu v abiotickej stresovej odpovedi):

GTCGG, CCGAC, GTCGA

SPL (väzobné miesto pre proteín SPL): GTACGA

ARF (väzobné miesto pre proteín ARF): TCGACAGC

ATG: štart kodón

CAAT-box: CCAAT

TATA-box: TTAAAA

Priloha 5: Alignment proteínovej sekvencie MADS-box transkripčného faktoru *VRN-H1* vytvorený v programe BioEdit.

	<u>MADS-box doména</u>
Antonella	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
Strider	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
Igri	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
HOR3081	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
HOR3365	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
HOR21599	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
ZDM02064	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
OUN333	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
B1K-04-12	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
HOR13821	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
Morex	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
Akashinriki	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
Barke	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
Golden Promise	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
Hockett	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
HOR7552	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
HOR8148	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
HOR9043	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
HOR10350	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
HOR13942	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
RGT Planet	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
ZDM01467	MGRGKVLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVGLIIFSTKGLYEFSTESCMDKILERYERYSYAEKVLVSSSESIQGNWCHEYRKLKA
Antonella	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
Strider	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
Igri	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
HOR3081	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
HOR3365	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
HOR21599	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
ZDM02064	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
OUN333	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
B1K-04-12	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
HOR13821	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
Morex	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
Akashinriki	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
Barke	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
Golden Promise	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
Hockett	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
HOR7552	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
HOR8148	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
HOR9043	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
HOR10350	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
HOR13942	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
RGT Planet	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
ZDM01467	KVETIQKQKHLMGEDLESNLKELQOLEQOLESLLKHIRARKNQLMHESISELQKKERSLQEBNKVLQKELVEKQKAAQAQQDQTOPQTSSSSSSFMFR
Antonella	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
Strider	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
Igri	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
HOR3081	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
HOR3365	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
HOR21599	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
ZDM02064	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
OUN333	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
B1K-04-12	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
HOR13821	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
Morex	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
Akashinriki	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
Barke	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
Golden Promise	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
Hockett	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
HOR7552	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
HOR8148	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
HOR9043	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
HOR10350	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
HOR13942	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
RGT Planet	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*
ZDM01467	DAPPVADTSNHPAAAGERAEDVAVQPQVPLRTALPLMMVSHING*