

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Expresse alely *VRN-1lf-like* u vybraných  
kultivarů pšenice**

**Diplomová práce**

**Bc. Marie Šoborová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2018**

**Vedoucí práce: RNDr. Jan Šafář, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jana Šafáře, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne .....

.....  
Bc. Marie Šoborová

# Souhrn

Iniciace kvetení je důležitým krokem v životním cyklu každé rostliny. Pro hospodářské plodiny, jako je pšenice, je načasování optimální doby kvetení důležité také z hlediska jejího výnosu a kvality zrna. V rámci diplomové práce byla provedena expresní analýza alel genu *VRN1* v průběhu světelného části dne u vybraných kultivarů a linií jarních pšenic. Předmětem analýzy byla standardní alela *Vrn-A1a* a nedávno popsána alela *Vrn-A1f-like*. Zmíněné alely se liší jak na sekvenační úrovni, tak svým fenotypovým projevem. Rostliny nesoucí alelu *Vrn-A1f-like* kvetou signifikantně později. Na základě porovnání relativních expresí mezi studovanými alelami bylo zjištěno, že hladina relativní exprese alely *Vrn-A1a* je vyšší, a to u nevernalizovaných i vernalizovaných rostlin. To koreluje s fenotypovým projevem, kdy rostliny s alelou *Vrn-A1a* kvetou dříve. Dále bylo zjištěno, že vernalizace má vliv na expresi jednotlivých alel, kdy byla pozorována zvýšená exprese u vernalizovaných rostlin.

Další část práce se zabývala analýzou přítomnosti alely *Vrn-A1f-like* u vybraných skupin tetraploidních pšeni *T. araraticum* respektive *T. timopheevii*, které mají genom AAGG. Alela *Vrn-A1f-like* poskytuje jarní fenotyp. V rámci analýzy byly detekovány druhy, které patřily mezi jařiny, ale nenesly alelu *Vrn-A1f-like*. Proto byla provedena sekvenační analýza genů, které kódují protein VRN2 a detekci polymorfizmů, které by mohly mít vliv na pozorovaný fenotyp. V rámci této analýzy nebyly zjištěny žádné polymorfizmy, které by měly vliv na jarní fenotypový projev rostlin, které by nebyly nositelkou alely *Vrn-A1f-like*.

# Summary

Initiation of flowering is an important step in the life cycle of each plant. Optimal flowering time also influences yield and grain quality in crops like wheat. An expression analysis of the *VRN1* allele during daylight for selected cultivars and spring wheat lines was performed in presented thesis. Standard *Vrn-A1a* allele and a recently described allele *Vrn-A1f-like* were analysed. These alleles differ at the sequencing level as well as in phenotype. Plants with allele *Vrn-A1f-like* flower significantly later. Based on the comparison of relative expressions between these two alleles it was found that the level of relative expression of *Vrn-A1a* allele is higher in both vernalized and non-vernalized plants. This observation fully correlates with phenotype. Plants, which carry *Vrn-A1a* allele flower earlier. Furthermore, it was found that vernalization proces itself has an effect on the expression level of *VRN-A1* alleles. The expression of both alleles were higher at vernalized plants.

Another part of the thesis describes the presence of the *Vrn-A1f-like* allele in selected groups of tetraploid wheats *T. araraticum* and *T. timopheevii* with AAGG genomic composition. The *Vrn-A1f-like* allele confers spring growth habit. Analysis revealed species having spring growth habit, but did not carry the *Vrn-A1f-like* allele. Therefore a sequence analysis of genes for VRN2 protein and detection of polymorphisms possibly effecting the observed phenotype was performed. The results showed no polymorphisms that could have affect to spring growth habit at plants which did not carry the *Vrn-A1f-like* allele.

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Janu Šafářovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, připomínky a čas věnovaný v průběhu zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Zuzaně Ivaničové, Ph.D. za pomoc v rámci experimentální části diplomové práce a za její ochotu kdykoliv poradit. V neposlední řadě děkuji kolektivu Centra strukturní a funkční genomiky rostlin, Ústavu experimentální botaniky, AV ČR v.v.i., v Olomouci za vytvoření přátelského prostředí.

# Obsah

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>2</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>3</b>
3.1 Kvetení.....	3
<b>3.2 Huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>) .....</b>	<b>4</b>
3.2.1 Vernalizace.....	4
3.2.2. Fotoperioda.....	5
<b>3.3 Pšenice setá (<i>Triticum aestivum</i> L.) .....</b>	<b>7</b>
3.3.1 Domestikace a evoluce.....	7
3.3.2 Genom pšenice seté.....	9
<b>4 MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Biologický materiál .....</b>	<b>22</b>
4.1.1 Analýza genové exprese.....	22
4.1.2 Analýza přítomnosti alely <i>Vrn-A1f-like</i> a polymorfizmů genů kódující protein VRN2 u vybraných pšenic s genomem AAGG .....	22
<b>4.2 Seznam použitých chemikálií.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3 Seznam použitých roztoků .....</b>	<b>25</b>
<b>4.4 Seznam použitých komerčních kitů .....</b>	<b>26</b>
<b>4.5 Seznam použitých přístrojů a zařízení.....</b>	<b>26</b>
<b>4.6 Pěstování linií pro analýzu genové exprese .....</b>	<b>26</b>
<b>4.7 Analýza genové exprese.....</b>	<b>27</b>
<b>4.8 Izolace RNA .....</b>	<b>27</b>
<b>4.9 Přepis RNA do cDNA .....</b>	<b>27</b>
<b>4.10 Real-time PCR.....</b>	<b>28</b>
<b>4.11 Analýza přítomnosti alely <i>Vrn-A1f-like</i> u vybraných pšenic s genomem AAGG .....</b>	<b>29</b>
<b>4.12 Analýza polymorfizmů genů kódující protein VRN2 u vybraných pšeni s genomem AAGG .....</b>	<b>30</b>
4.12.1 Polymerázová řetězová reakce .....	30
4.12.2 Agarózová elektroforéza .....	31
4.12.3 Sekvenování – Sangerova metoda.....	31
<b>5 VÝSLEDKY .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Analýza genové exprese.....</b>	<b>34</b>
5.1.1 Nevernalizovaná sada.....	34

5.1.2 Vernalizovaná sada .....	38
5.1.3 Srovnání expresí vernalizované a neernalizované sady .....	40
<b>5.2 Identifikace alely <i>Vrn-Alf-like</i> u vybraných pšenic s genomem AAGG.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3 Analýza polymorfizmů genů kódujících protein VRN2 u vybraných pšenic s genomem AAGG .....</b>	<b>46</b>
<b>6 DISKUZE .....</b>	<b>51</b>
<b>7 ZÁVĚR .....</b>	<b>57</b>
<b>8 LITERATURA .....</b>	<b>58</b>

# 1 ÚVOD

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) patří mezi důležité hospodářské plodiny. Jedná se o základní potravinu pro lidskou populaci po celém světě. Počet lidí každým rokem neustále roste, a je tak důležité zvyšovat její každoroční výnosy. Předpokládá se, že světová populace dosáhne v roce 2050 až devíti miliard lidí. Současná produkce této hospodářské plodiny by nedokázala tento počet lidí uživit. Negativní vliv na zvyšování výnosů, a tím na zemědělskou produkci, mají změny v životním prostředí. Současný výnos pšenice je především ohrožován abiotickými a biotickými stresy.

Pěstování pšenice v různých zeměpisných šířkách je umožněno její vysokou přizpůsobivostí podmínkám vnějšího prostředí. Ta je umožněna alelickou variací v genech, které kontrolují správné načasování doby kvetení. Iniciale kvetení je jedním z důležitých procesů v životním cyklu rostliny. Podmínky, ve kterých rostlina přechází do procesu kvetení, jsou pro ni důležité, a to z hlediska počtu a kvality zrn. Studium genů/alel zodpovědných za rozdílnou dobu kvetení, jejich charakterizace a pochopení vzájemných interakcí umožňuje porozumění celému procesu kvetení. Získané znalosti mohou být využity ke zlepšení a zkvalitnění jednotlivých odrůd a kultivarů, které budou lépe přizpůsobeny lokálním podmínkám a rostliny budou kvést v optimálním čase. Vyhnutí se nevhodným podmínkám, jako je sucho či mráz, tak vede k zabránění poškození rostlinných meristémů, a tím redukci úrody.

Pšenice setá patří mezi hexaploidní druh. Proto studium procesu kvetení je velice složité a komplikované. Důvodem je velikost genomu a přítomnost tří homoeologních subgenomů, které nesou podobné kopie genů. Současný vývoj molekulárních metod umožňuje studium takto komplikovaných rostlin jako je pšenice. I když je kvetení složitý proces, tak pochopení celého tohoto děje jde pomocí molekulárních metod dopředu. Získané znalosti jsou následně využité ve šlechtitelství.



## 2 CÍLE PRÁCE

Diplomová práce se skládá z teoretické a praktické části. Cílem teoretické části je vypracování literární rešerše, která je zaměřená na geny ovlivňující kvetení u obiloviny pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) a modelového organismu *Arabidopsis thaliana*. Cílem praktické části je studium hladin relativních expresí u dvou odlišných alel genu *VRN1*, a to *Vrn-A1a* a *Vrn-A1f-like*, v průběhu dne a jejich srovnání v podmínkách vernalizace a bez ní. Dalším cílem praktické části je detekce přítomnosti alely *Vrn-A1f-like* u vybraných tetraploidních pšenic s genomem AAGG, která poskytuje jarní fenotyp a následná analýza genů kódujících protein VRN2.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Kvetení

Správné načasování doby kvetení je nezbytné pro reprodukční úspěch každé rostliny. Na iniciaci kvetení má vliv nejen genotyp a fyziologický stav rostliny, ale i podmínky vnějšího prostředí jako jsou délka dne (fotoperioda), teplota (např. vernalizace) či kvalita světla. Díky komplexní regulační síti je možné přizpůsobit indukci kvetení vnějším podmínkám, a tím zvýšit reprodukční úspěch rostliny. Výzkumy v oblasti procesu kvetení se intenzivně zabývají významnými zemědělskými plodinami (např. pšenice). Jako modelová rostlina pro studium tohoto procesu je využívána rostlina *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Kvetení je u pšenice řízeno celou řadou genů. Jednotlivé geny lze zařadit do dvou hlavních drah zodpovědných za tento proces. Jedná se o vernalizační dráhu, která je tvořena vernalizačními geny a fotoperiodickou dráhu tvořenou fotoperiodickými geny. Na čas kvetení mají také vliv geny ranosti (*earliness per se*). Nicméně tyto geny nemají na tento proces tak velký vliv jako vernalizační a fotoperiodické geny. Slouží spíše pro jeho jemné doladění. Správné načasování přechodu z vegetativní fáze do fáze reprodukční je pro rostlinu klíčové a je důležité pro její reprodukční úspěch. U pšenice se jedná především o počet obilek v kasu a jejich kvalitu. Schopnost adaptace pšenice na širokou škálu environmentálních podmínek je umožněna plasticitou genomu a významnou úlohu hraje zejména alelická rozmanitost v rámci genů regulujících vernalizaci (*VRN*) a fotoperiodu (*PPD*).

U modelové rostliny *A. thaliana* je popsáno celkem pět drah, které ovlivňují kvetení. Podobně jako u pšenice je i u *A. thaliana* vernalizační dráha, která reguluje dobu kvetení vlivem dlouhodobého působení nízkých teplot a dráha fotoperiodická, u které má vliv na kvetení délka dne. Další dráha je autonomní, která je nezávislá na vernalizaci a fotoperiodě. Giberelinová signální dráha vyžaduje kyselinu giberelovou pro iniciaci kvetení. Poslední dráhou u *A. thaliana* je dráha endogenní, která kromě doby kvetení ovlivňuje i stáří rostliny. Zmíněné dráhy tak tvoří společně komplexní genovou síť. Nicméně, jednotlivé dráhy lze považovat za mechanismus pro přesnou regulaci aktivity relativně malého počtu genů, které představují regulační „uzly“ (dle Srikanth *et* Schmid, 2011).

## 3.2 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

Rostliny jsou fixovány celý svůj životní cyklus na jednom místě. Z tohoto důvodu u nich došlo k vyvinutí nejrůznějších mechanismů, které jim umožní přizpůsobit jejich životní cyklus změnám podmínek vnějšího prostředí. Vliv genetických, epigenetických a environmentálních faktorů na přechod z vegetativní do generativní fáze je intenzivně studován na modelové rostlině *A. thaliana*. Důvodem je její krátký životní cyklus a relativně malý genom (1C ~ 125 Mbp), který je osekvenován a plně anotován.

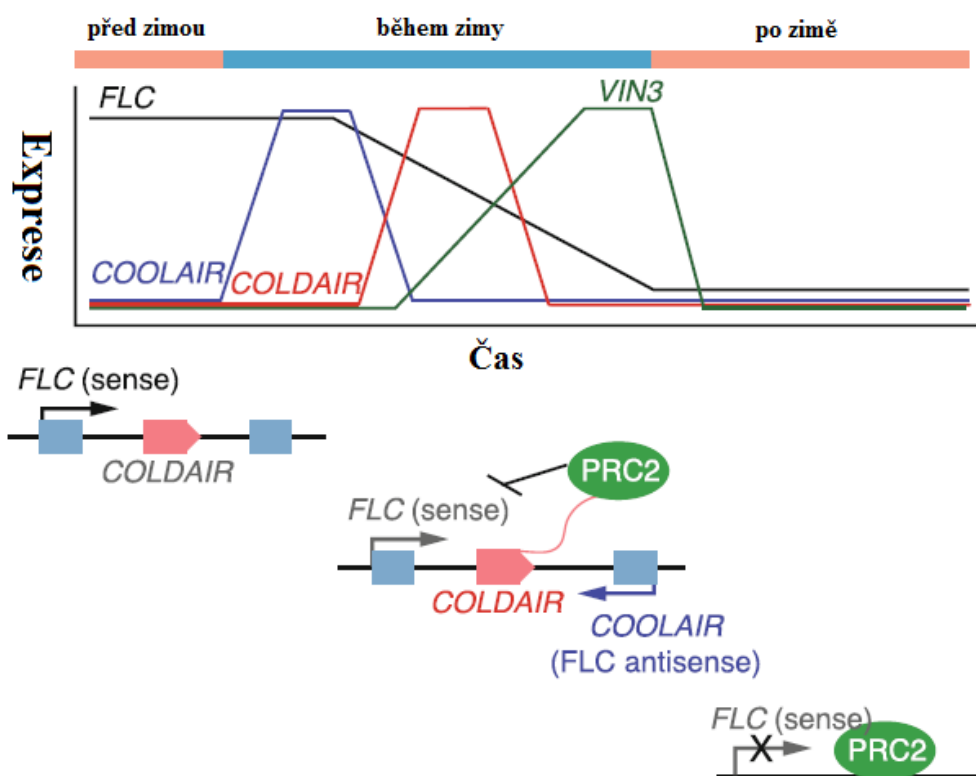
### 3.2.1 Vernalizace

Přechod z vegetativního k reprodukčnímu vývoji je u rostlin specificky regulovaný proces. Informace o podmínkách vnějšího prostředí jsou pro rostlinu důležité a umožní ji rozhodnout o iniciaci kvetení. Jeden ze signálů je vystavení dlouhodobým nízkým teplotám (vernalizace). Geny, které potlačují kvetení před nástupem nepříznivého chladového období u *A. thaliana*, jsou *FRIGIDA (FRI)* (Johanson *et al.*, 2000) a *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Michaels *et Amasino*, 1999).

Gen *FRI* kóduje rostlině specifický protein se dvěma regiony nazývanými jako „coiled-coil“. Tento gen ovlivňuje indukci kvetení u rostlin a to tak, že v případě přítomnosti dominantní alely dochází k pozdějšímu kvetení. Nefunkčnost tohoto genu způsobuje dřívější kvetení (Johanson *et al.*, 2000; Shindo *et al.*, 2005). Produkt tohoto genu má zřejmě vliv na strukturu chromatinu genu *FLC*, čímž dojde k aktivaci jeho transkripce (Johanson *et al.*, 2000) (Obrázek 4).

Gen *FLC* kóduje MADS-box transkripční faktor a jedná se o represor kvetení (Michaels *et Amasino*, 1999; Sheldon *et al.*, 2000). Potlačuje expresi genů *FLOWERING LOCUS T (FT)* a *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, které patří mezi aktivátory kvetení (Lee *et al.*, 2000, Searle *et al.*, 2006). Alelické varianty tohoto genu ovlivňují potřebnou délku expozice vůči nízkým teplotám mezi různými ekotypy *A. thaliana* (Shindo *et al.*, 2006). Expresi tohoto genu negativně ovlivňuje vernalizace, a to snížením jeho exprese (Michaels *et Amasino*, 1999; Sheldon *et al.*, 1999; Johanson *et al.*, 2000). Na začátku chladného období dojde k potlačení exprese pomocí nekódujících RNA tzv. COOLAIR a COLDAIR (Obrázek 1) (Heo *et Sung*, 2011, Csorba *et al.*, 2014). Represe je způsobena změnami ve struktuře chromatinu (histonové modifikace). Jedná se o trimetylací lysinu 27 na histonu 3 (H3K27me3). Zabudování H3K27me3 umožňuje PRC2 (Polycomb repressive complex2) interagující s proteinem VIN3 (Heo *et Sung*, 2011).

*VERNALIZATION INSENSITIVE3* (*VIN3*) je tak dalším genem zapojeným do vernalizace (Sung *et al.*, 2004). Změna prostorové konformace chromatinu genu *FLC* je příkladem epigenetické regulace exprese genu. Nicméně původní metylační stav je obnoven v časně embryogenezi, a proto je vernalizace vyžadována v každé generaci (Sheldon *et al.*, 2008).



**Obrázek 1:** Schéma negativní regulace exprese genu *FLC* pomocí nekódujících RNA – *COLDAIR* a *COOLAIR*. (Převzato a upraveno dle Yamaguchi *et al.*, 2012). Gen *FLC* je aktivně transkribován před začátkem chladného období. V první části chladného období dochází k akumulaci transkriptu *COOLAIR*. Následně dojde k transkripci *COLDAIR* (z oblasti prvního intronu genu *FLC*), čímž dojde k potlačení exprese *FLC* prostřednictvím komplexu PRC2. Postupnou akumulací *COLDAIR* se zvyšuje exprese *VIN3*. Na konci chladného období se exprese *VIN3* snižuje.

### 3.2.2. Fotoperioda

Délka dne ovlivňuje dobu kvetení, čímž rostlinám umožňuje jejich přizpůsobení odlišným zeměpisným šířkám a tím i úspěšnou reprodukci. K načasování je zapotřebí endogenního časovače tzv. cirkadiánní hodiny, který měří trvání délky dne/noci. Vliv fotoperiody na kvetení je studováno u modelové rostliny *A. thaliana*. Tato rostlina patří mezi dlouhodobní rostliny. Hlavní geny, které jsou zapojeny do fotoperiodické odezvy, jsou *GIGANTEA* (*GI*), *CONSTANS* (*CO*) a *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). Vnímání délky dne probíhá v listech, zatímco květní meristémy se tvoří na vzrostlém vrcholu.

Fotoperiodická odpověď je převážně kontrolována genem *CONSTANS* (*CO*). Gen *CO* urychluje kvetení v podmínkách dlouhého dne. Patří do rodiny regulátorů transkripce,

kteřá zahrnuje 17 členů. Tyto proteiny obsahují jednu nebo dvě tandemové domény B-box s motivem zinkového prstu na N-konci a konzervovanou C-terminální doménu s motivem CCT (*CO*, *CO-like*, *TOC1*) (Putterill *et al.*, 1995; Robson *et al.*, 2001). Expze genu *CO* je regulována cirkadiánními hodinami (Suárez-Lopéz *et al.*, 2001). Destabilizace a degradace proteinu *CO* probíhá ve tmě, z čehož vyplývá, že jeho aktivita je omezena na světelnou část dne (Valvedre *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2010). Světelná aktivace transkripce *CO* je indukována interakcí mezi proteiny GIGANTEA (GI) a FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX1 (FKF1) (Baundry *et al.*, 2010). FKF1 vnímá světlo prostřednictvím chromoforu. Interakce mezi zmíněnými proteiny je tedy závislá na světle a indukuje transkripci *CO* tím, že podporuje degradaci transkripčních represorů genu *CO*, které jsou známé jako CYCLING DOF FACTORS (CDFs) (Sawa *et al.*, 2007). Další regulace tohoto genu je na posttranslační úrovni. Protein *CO* je ubikvitován komplexem ubikvitin ligáza, který obsahuje dvě složky: CONSTITUTIVE PHOTOMORFOGENIC 1 (COP1) a SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A (SPA1). Degradace probíhá v 26S proteázomu (Laubinger *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). Degradace proteinu *CO* probíhá ve tmě, protože světlo potlačuje aktivitu degradačního komplexu.

Gen *FT* má specifickou roli v procesu kvetení. Jedná se o integrátor signálů získaných z vernalizace a fotoperiody. K aktivaci genu *FT* dochází v listech během dlouhých dnů genem *CO* (An *et al.*, 2004; Wigge *et al.*, 2005). Gen *FT* kóduje mobilní signální protein tzv. florigen. Následně je protein *FT* floémem transportován do vzrostného vrcholu, kde interaguje s FLOWERING LOCUS D (FD). Celý komplex aktivuje transkripci genů indukujících kvetení – *APETALA1* (*AP1*), *SOC1* a *FRUITFULL* (*FUL*) (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Corbesier *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008). Protein *SOC1* interaguje s dalším MADS-box transkripčním faktorem AGAMOUS LIKE24 (*AGL24*), který má vliv na expresi genu *LEAFY* (*LFY*). Tento gen je také zapojen do procesu iniciace kvetení (Lee *et al.*, 2008).

Jak již bylo řečeno, tak gen *FLC* potlačuje expresi genů *FT* a *SOC1*. Kvůli tomuto represivnímu účinku musí být expze *FLC* nejprve snížena, aby mohl být gen *FT* aktivován a došlo tak k indukci kvetení (Searle *et al.*, 2006). Mezi homologní geny ke genu *FT* patří geny *Heading date3a* (*Hd3a*) a *FT1* (Yan *et al.*, 2006). První zmíněný se vyskytuje u rýže a druhý u pšenice. Oba fungují jako promotory kvetení.

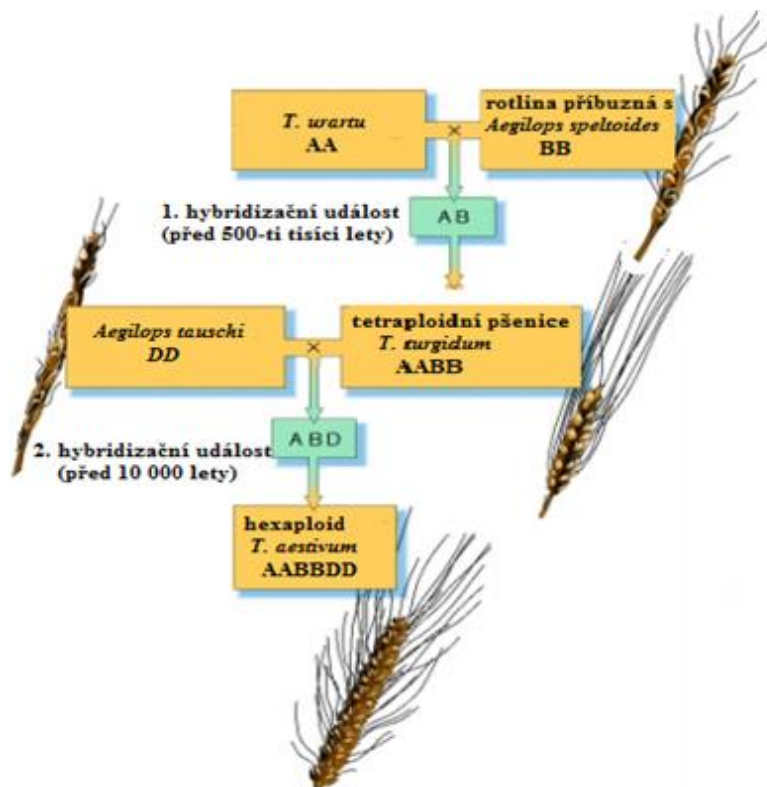
### 3.3 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

Pěstované druhy pšenice a jejich blízcí příbuzní (např. rýže, ječmen, kukuřice) jsou řazeny do čeledi *Poaceae* (lipnicovité), kmen *Triticeae*. Samotný rod *Triticum* se skládá celkem z šesti druhů: *Triticum monococcum* L. (genom AA), *Triticum urartu* Tumanian ex Gandilyan (genom AA), *Triticum turgidum* L. (genom AABB), *Triticum timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. (genom AAGG), *Triticum aestivum* L. (genom AABBDD) a *Triticum zhukovskiyi* Menabde & Ericz. (genom AAAAGG). Jednotlivé druhy jsou řazeny do tří skupin: Monococcon (obsahuje diploidní druhy), Dicoccoidea (obsahuje tetraploidní druhy) a Triticum (obsahuje hexaploidní druhy). Některé druhy jsou známé pouze ve své plané formě (př. *T. urartu*), zatímco některé pouze v domestikované (např. *T. aestivum*, *T. zhukovskiyi*), (Matsuoka, 2011).

Pšenice setá patří mezi nejrozšířenější pěstovanou obilovinu po celém světě. Pěstuje se ve velmi různorodých klimatických podmínkách. Schopnost jejího přizpůsobení vnějším podmínkám byla umožněna kombinací polyploidizačních událostí (Dubcovsky *et* Dvořák, 2007). Plasticita genomu je spojena se silným selekčním tlakem během domestikace a rozšiřování zemědělství. Pěstování pšenice v různých podmínkách vnějšího prostředí umožnila genetická diverzita v genech, které mají vliv na její reprodukční vývoj. Tato rozmanitost je využívána pro výběr optimálních odrůd do určitých lokalit. Z původního centra její vzniku (oblast Úrodného půlměsíce) se pšenice rozšířila do celého světa. Dnes je pšenice pěstována od 60° severní šířky (odpovídá oblasti Norska a Ruska) až po 45° jižní šířky (oblast Argentiny), (Dubcovsky *et* Dvořák, 2007). Jedná se o důležitý zdroj kalorií a proteinů. Z hlediska nutriční hodnoty je obsah nutričních látek kvalitnější v porovnání s dalšími obilovinami (ječmen, kukuřice, rýže). Převážně se pěstuje tzv. chlebová pšenice (95 %), která se využívá k výrobě chleba, pečiva, sušenek. Zbývajících 5 % tvoří pšenice tvrdá (*T. turgidum* ssp. *durum*). Ta se využívá k výrobě těstovin (Dubcovsky *et* Dvořák, 2007).

#### 3.3.1 Domestikace a evoluce

Domestikace pšenice seté proběhla v oblasti Úrodného půlměsíce v průběhu neolitického období. Její pěstování je spojeno s rozšiřováním zemědělství. Hexaploidní genom současně pěstované pšenice je výsledkem dvou spontánních hybridizačních událostí mezi třemi různými diploidními druhy (Obrázek 2). Po jednotlivých hybridizacích následovala polyploidizace, během které došlo ke zdvojení chromozómů (Feldman *et* Leavy, 2009).



**Obrázek 2: Schéma hybridizačních událostí, které vedly ke vzniku hexaploidní pšenice *T. aestivum*** (převzato a upraveno dle [http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/WheatBP/Documents/DOC\\_Evolution.php](http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/WheatBP/Documents/DOC_Evolution.php))

První hybridizační událost (před 500 tisíci lety) proběhla mezi divokou diploidní pšenicí *T. urartu* (genom A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>, 2n = 2x = 14) jako donorem genomu A, a rostlinou příbuznou s *Aegilops speltoides* Tausch. (genom BB, 2n = 2x = 14), jako donorem genomu B. Výsledkem této hybridizace byla tetraploidní pšenice *T. turgidum* (genom A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>BB, 2n = 4x = 28). Jedná se o předka pšenice tvrdé, která se pěstovala na Blízkém východě, a *T. turgidum* ssp. *durum* (Dvořák *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 2002) (Obrázek 2). Další skupinou tetraploidních pšenic je tzv. „*Timopheevii*“. Tato skupina zahrnuje blízké příbuzné druhy *T. araraticum* Jakubz a *T. timopheevii* (Zhuk) Zhuk. *T. araraticum* vznikla hybridizací mezi *T. urartu* (donor genomu A<sup>u</sup>) a rostlinou příbuznou s *Ae. speltoides* (donor genomu G) (Dvořák *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 2002; Kilian *et al.*, 2007). Domestikací *T. araraticum* vznikla odrůda *T. timopheevii* (genom A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>GG).

Druhá hybridizační událost, které proběhla přibližně před 10 000 lety, dala vznik hexaploidním pšenicím *T. aestivum* (chlebová pšenice) a *T. zhukovskii*. Hexaploidní pšenice *Triticum aestivum* (genom AABBDD, 2n = 6x = 42) vznikla hybridizací mezi domestikovanou formou pšenice *T. turgidum* a donorem genomu D, *Aegilops tauschii* Cosson (genom DD, 2n = 14) (Obrázek 2) (Dvorak *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2002; Petersen

*et al.*, 2006). Další hexaploidní pšenice *Triticum zhukovskii* (genom A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>GGA<sup>b</sup>A<sup>b</sup>) vznikl hybridizací mezi *T. timopheevii* a *T. monococcum* (Dvořák *et al.*, 1993).

Po hybridizačních a polyploidizačních událostech následovala řada strukturálních a funkčních změn, které vedly ke stabilizaci genomu (Feldman *et Leavy*, 2009).

### 3.3.2 Genom pšenice seté

Pšenice setá je allohexaploidní druh s 42 chromozómy (genom AABBDD,  $2n = 6x = 42$ ). Genom se skládá ze tří homoelogních subgenomů (A, B a D), přičemž každý nese podobné kopie genů. Hybridizace mezi třemi různými diploidními druhy vedla ke vzniku velkého a komplexního genomu (1C ~ 16 Gb; Choulet *et al.*, 2014). Kolem 80 % genomu je tvořeno repetitivními sekvencemi. Ačkoliv je pšenice hexaploidní, tak se v průběhu meiózy chová jako diploidní druh. To zajišťuje gen *Ph1*, který brání homoelognímu párování chromozómů (Martinez-Perez *et al.*, 2001). Gen *Ph1* je lokalizován na chromozómu 5B (Griffiths *et al.*, 2006).

Pro rostlinu je přítomnost více genomů výhodná. Kombinace homoeologních genů jí umožňuje lepší adaptaci na podmínky vnějšího prostředí. Hexaploidní pšenice kombinuje genom D pocházející od *A. tauschii* s genomy AB od tetraploidní pšenice. Ve srovnání s tetraploidní pšenicí má hexaploid *T. aestivum* větší adaptabilitu na různé požadavky mezi které můžeme zařadit fotoperiodu či vernalizaci. Dále vykazuje lepší toleranci vůči zvýšenému množství solí, nízkému pH či působení chladu. Také jsou odolnější vůči škůdcům a chorobám (Dubcovsky *et Dvořák*, 2007).

Pšenice má nepochybný význam jako plodina, která zajišťuje až 20 % kalorií. Nicméně slouží také jako jeden z modelů pro studium vývoje polyploidního genomu. Duplikací genomu získává rostlina navíc genetický materiál, který se může vyvíjet a případně být změněn, aniž by to mělo vliv na životaschopnost rostliny. Dostupnost diploidních a tetraploidních předchůdců hexaploidní pšenice umožňuje studovat účinky polyploidizace na diverzifikaci genů, přeskupování genomů, vliv repetitivních sekvencí či epigenetických změn na aktivaci/tlumení/ztrátu genů (Kashkush *et al.*, 2002; Chantret *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2013).

### 3.3.3 Vernalizační dráha

Vernalizace (jarovizace) je proces, kdy je rostlina dlouhodobě vystavena nízkým teplotám. Tento proces je zásadní pro adaptaci rostlin na nepříznivé podmínky. Funkcí



vernalizačního procesu je ochrana citlivých květních meristémů před působením chladných teplot během zimy. Jinými slovy, u rostlin vysévaných na podzim nedochází k poškození meristémů tím, že kvetení je načasováno do jarního období a meristémy nejsou vystaveny nízkým teplotám. U *T. aestivum* jsou známy dva hlavní růstové typy, které lze rozdělit podle požadavku na vernalizaci, a to jarní a ozimý. Jarní odrůdy (jařiny) nevyžadují vernalizaci, aby vykvetly, nebo mají částečný vernalizační nárok. Naopak ozimé odrůdy (ozimy) vyžadují tento proces. Ozimé odrůdy se zasévají na podzim, aby mohlo dojít ke splnění vernalizačního požadavku, který je nutný pro přechod rostliny z vegetativní fáze do fáze reproduktivní (Kamran *et al.*, 2014). Některé odrůdy pšenice jsou řazeny mezi tzv. přesívky. Přesívky lze zasévat na podzim i na jaře. Oproti modelové rostlině *A. thaliana* je molekulární základ vernalizačního procesu u obilovin málo prozkoumán. Je to dáno jejich genetickou složitostí a také obtížností při získávání jednotlivých mutantů.

Regulace vernalizačního procesu u obilovin je řízena čtyřmi geny – *VRN1*, *VRN2*, *VRN3* a *VRN-D4* (Yan *et al.*, 2003; 2004b; 2006; Danyluk *et al.*, 2003; Trevaskis *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2010; Kippes *et al.*, 2015). První tři zmíněné vernalizační geny byly klonovány a jsou charakterizovány mutace, které vedly ke ztrátě vernalizačního požadavku (Yan *et al.*, 2004a; 2006; Fu *et al.*, 2005; Diselfeld *et al.*, 2009). Homoeologní geny *VRN1*, *VRN2* a *VRN3* byly identifikovány na všech třech subgenomech u hexaploidní pšenice, ale gen *VRN4* byl identifikován pouze na subgenomu D. Vernalizační proces je regulován především různými alelickými variantami ve vernalizačních genech *VRN1* a *VRN2* (Yan *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2004b). U ozimých odrůd je charakteristická epistatická interakce mezi vernalizačními geny. Gen *VRN2* je považována za represor genu *VRN3* (Tranquilli *et Dubcovsky.*, 2000) (Obrázek 4). Různé druhy hexaploidních a tetraploidních pšenic jsou využívány jako genetický zdroj pro nové alely, které modulují dobu kvetení a mohou tak být využity ve šlechtitelském odvětví. Změny v expresi u jakéhokoliv genu z vernalizační dráhy má za výsledek modulaci transkripčního profilu ostatní genů, čímž dojde ke změně doby kvetení.

### **Gen *VRN1***

Gen *VRN1* je klíčovým genem v genetickém systému kontrolující dobu kvetení u obilovin. Jedná se o promotor kvetení a jeho dominantní forma se nachází u jařin (Yan *et al.*, 2003). Gen *VRN1* kóduje MADS-box transkripční faktor, který se váže na specifické místo v CArG boxu v promotorové oblasti cílových genů (Kane *et al.*, 2007).

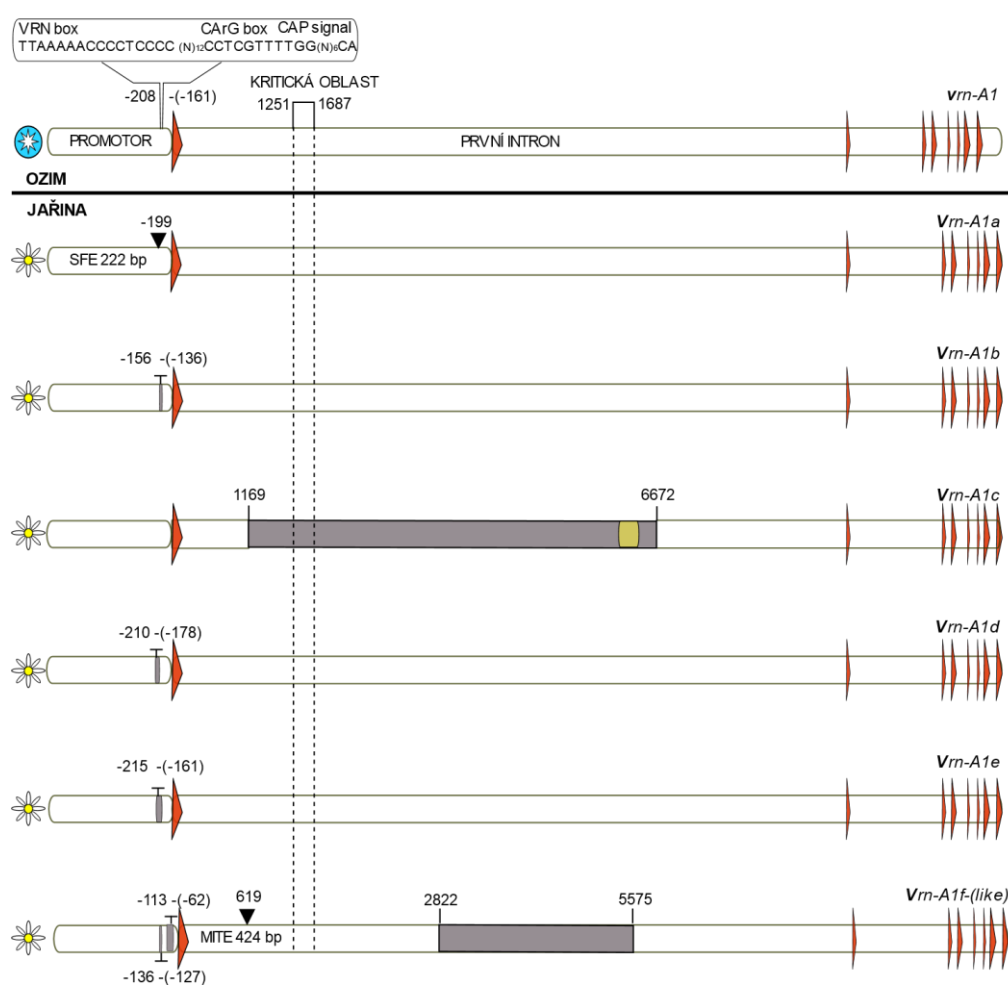
Jedná se o homologní gen s geny *API*, *FUL* a *CAULIFLOWER (CAL)*, které se nachází u *A. thaliana* (Danyluk *et al.*, 2003; Trevaskis *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003) a jsou zodpovědné za iniciaci přechodu z vegetativní do reprodukční fáze. Funkce tohoto genu je sice zachována, ale jeho regulace je odlišná od genů *A. thaliana*. U pšenice jsou jednotlivé alely *VRNI* charakterizovány změnami v promotorové oblasti a/nebo v prvním intronu (Yan *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2004a; Fu *et al.*, 2005). U *A. thaliana* je variabilita spojována s nefunkčností nebo „slabými“ alelami *FRI* a *FLC* než mutacemi v *API*, *FUL* nebo *CAL* (Gazzani *et al.*, 2003).

*VRNI* geny jsou lokalizovány na dlouhých ramenech chromozómů 5A (*VRN-A1*), 5B (*VRN-B1*) a 5D (*VRN-D1*). Rozdíly v promotorové oblasti nebo v prvním intronu genu *VRNI* jsou spojeny s redukcí nebo eliminací vernalizačního požadavku a tím vzniku jařin. Recesivní forma genu se nachází u ozimých odrůd (Yan *et al.*, 2004a; Fu *et al.* 2005). Odlišné jarní fenotypy jsou spojeny se sekvenčními změnami (delece, inserce) v promotorové oblasti a/nebo v prvním intronu. Změny na úrovni sekvencí vedou k redukcí nebo zcela eliminaci vernalizačního požadavku, čímž dojde ke zvýšení exprese genu *VRNI* (Fu *et al.*, 2005).

Shitsukawa *et al.* (2007) vytvořili mutantní rostliny *T. monococcum* v genu *VRNI*, které nebyly schopné vykvést. Tím demonstrovali, že tento gen je nezbytný pro přechod z vegetativní fáze do reprodukční. Nicméně studie Chen *et Dubcovsky* z roku 2012 tuto teorii vyvrátila a prokázala, že gen *VRNI* není nezbytný pro iniciaci kvetení. Mutantní rostliny v tomto genu kvetly sice později, ale produkovaly normální květy i fertilní semena.

Jak již bylo řečeno výše, tak jarní alely se liší na sekvenční úrovni (Obrázek 3). U alely *Vrn-A1a* byla pozorována inserce repetitivního elementu v promotorové oblasti, který byl pojmenován jako „Spring foldback element“ (SFE). Promotorová oblast této alely byla duplikována. Repetitivní element je složen ze dvou fragmentů o velikosti 222 bp a 131 bp (Yan *et al.*, 2004a). Alela *Vrn-A1b* má dvě mutace v oblasti nazvané „host direct duplications“ (HDD) a delecí v 5'UTR o velikosti 20 bp (nepřekládaná oblast). Tato alela se vyskytuje u tetraploidních i hexaploidních odrůd (Yan *et al.*, 2004a). Alela *Vrn-A1c* obsahuje delecí v prvním intronu (Fu *et al.*, 2005). Alely *Vrn-A1d* a *Vrn-A1e* byly identifikovány u tetraploidních odrůd. Alela *Vrn-A1d* obsahuje 32 bp delecí v HDD oblasti. Alela *Vrn-A1e* má 54 bp delecí, která se nachází v CArG box (Fu *et al.*, 2005). Alela *VRN-A1f* je charakteristická 8 bp a 50 bp delecí v promotorové oblasti (Golovkina *et al.*,

2010). Ve studii Ivaničová *et al.* (2016) byla identifikována další alela ovlivňující dobu kvetení u jarních odrůd a kvůli své podobnosti s alelou *Vrn-A1f* byla pojmenována *VRN-A1f-like*. Tuto alelu charakterizuje inserce neautonomního transpozónu MITE (*miniature inverted-repeats transposable element*), který se nachází v prvním intronu a jeho velikost je 433 bp. Dále se u této alely nacházela 2753 bp delece. Rozdíl mezi alelami *Vrn-A1f* a *Vrn-A1f-like* je 1 bp indel v HDD oblasti (Ivaničová *et al.*, 2016). Shcherban *et al.* (2016) se ve své studii snažili objasnit původ jarního fenotypu u *T. timopheevii*. Podle závěrů autorů je inserce transpozónu MITE zodpovědná za vznik jařin, protože tato inserce nebyla identifikována u odrůd se ozimým růstovým typem.



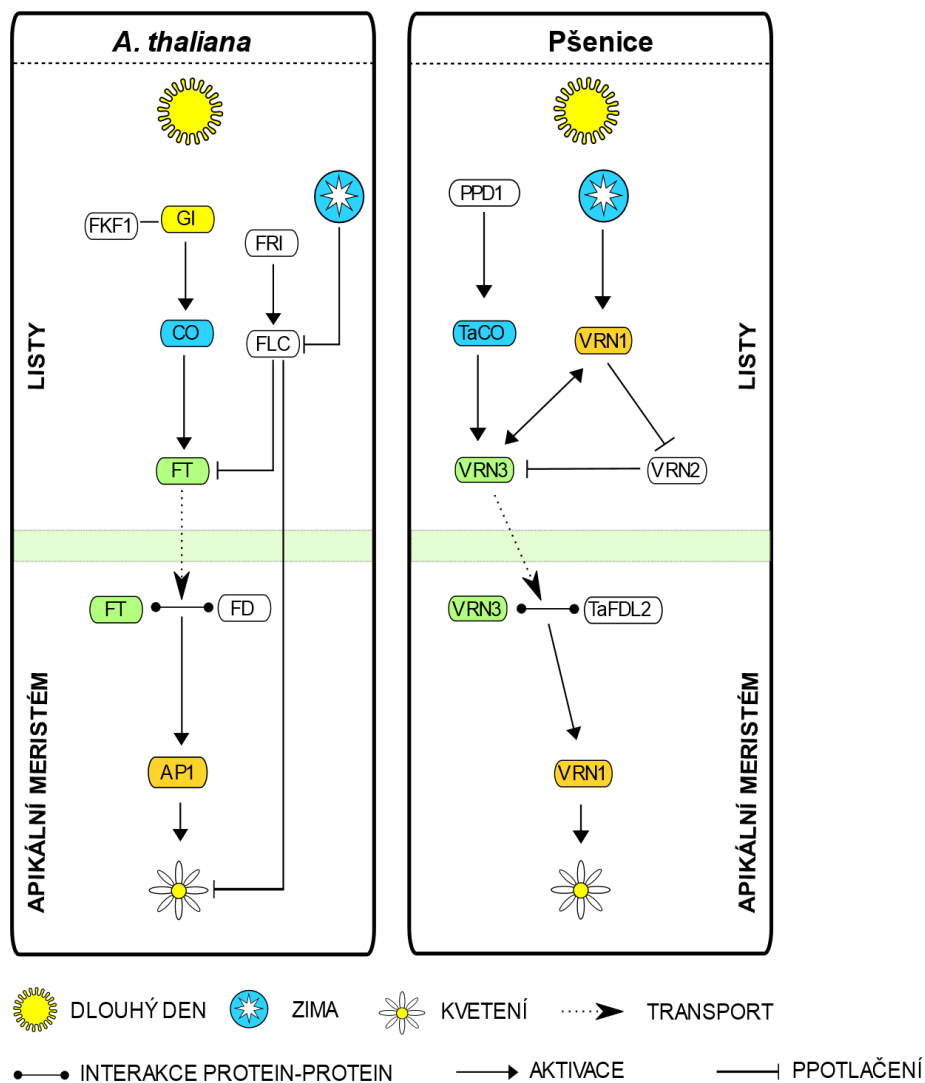
**Obrázek 3: Schématický přehled alel *VRN-A1* (převzato a upraveno dle Ivaničová, 2017)**

Schématiké porovnání dominantních alel *VRN-A1*, které způsobují jarní fenotyp, v porovnání s recesivní alelou *vrn-A1*, která se nachází u ozimých pšenic. Exony jsou v obrázku vyznačeny jako oranžové šipky a introny jako bílé obdélníky. Promotor se nachází před prvním exonem. Každá dominantní alela je charakteristická insercí a/nebo delecí v promotorové oblasti a/nebo v prvním intronu.

Odlišné jarní alely byly popsány také u dominantních genů *Vrn-B1* a *Vrn-D1*. U obou genů jsou rozdíly mezi alelami především na základě změn v prvním intronu v porovnání s jejich recesivními alelami (Yan *et al.*, 2004a; Fu *et al.*, 2005). Alela *Vrn-B1a* obsahuje delecii v oblasti prvního intronu (Fu *et al.*, 2005). Alela *Vrn-B1b* byla identifikována u odrůdy Alpowa. Tato alela v porovnání s alelou *Vrn-B1a* obsahuje navíc 36 bp delecii a SNP (Santra *et al.*, 2009). Milec *et al.* (2012) identifikovali alelu *Vrn-B1c*, která má delecii a zároveň duplikaci v prvním intronu. Tato alela byla také identifikována ve studii Shcherban *et al.* (2012). Fu *et al.* (2005) charakterizovali dominantní alelu *Vrn-D1a*, která měla 4 235 bp delecii v prvním intronu. Alela *Vrn-D1b* navíc obsahuje nukleotidovou substituci v promotorové oblasti (CaG box) v porovnání s alelou *Vrn-D1a* (Zhang *et al.*, 2012). Další popsanou alelou byla *Vrn-D1c*, která obsahovala 174 bp inzerci (Zhang *et al.*, 2015).

Jednotlivé polymorfizmy v regulačních oblastech promotoru nebo v prvním intronu genu *VRNI* jsou spojovány se ztrátou vernalizačního požadavku nebo jeho snížením (Yan *et al.*, 2003, 2004b; Fu *et al.*, 2005). Dominantní alela *Vrn-A1* způsobuje kompletní ztrátu vernalizačního požadavku a je epistatická vůči dominantním alelám *Vrn-B1* a *Vrn-D1*. Tyto dvě alely mají malou citlivost vůči vernalizaci. V případě jejich vystavení vernalizačnímu procesu dojde k urychlení doby kvetení. (Pugsley, 1971). *Vrn-A1* má silnější jarní fenotyp v porovnání s *Vrn-B1* a *Vrn-D1* (Trevaskis *et al.*, 2003).

Gen *VRNI* má dvojí roli v procesu iniciace kvetení. Jedná se o ortologní gen ke genu *API*, který se nachází u *A. thaliana*, a je exprimován v apikálním meristému (apex) (Loukoianov *et al.*, 2005) (Obrázek 4). Během vernalizace dochází k indukci transkripce genu *VRNI*, a to jak v listech, tak v apexu. V apexu *VRNI* iniciuje přechod z vegetativní do reprodukční fáze. Naopak v listech má tento gen vliv na gen *FLOWERING LOCUS T-LIKE 1 (FT1)*, (Deng *et al.*, 2015), který je součástí fotoperiodické dráhy.



Obrázek 4: Schéma porovnávací dráhy indukující kvetení u *A. thaliana* a pšenice. (Převzato a upraveno dle Milec *et al.*, 2014). Na obrázku jsou znázorněny genové interakce indukující kvetení u *A. thaliana* a pšenice.

### Gen *VRN2*

Gen *VRN2* je považován za hlavní represor kvetení. Nicméně ve studii Xiao *et al.* (2014) popsali další mechanismus, který má vliv na akumulaci mRNA genu *TaVRN1*. Produkt genu *TaGRP2* se váže na pre-mRNA genu *TaVRN1*. Dojde tak k poklesu množství mRNA genu *TaVRN1*, a tím potlačení kvetení. Naopak vernalizační proces vede ke snížení množství proteinu *TaGRP2* a může dojít k akumulaci mRNA genu *TaVRN1*. Exprese genu *VRN2* je snižována vernalizací a krátkými dny (Yan *et al.*, 2004b; Dubcovsky *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012). Geny *VRN2* jsou lokalizovány na 5A a 5B chromozómu u tetraploidní pšenice. (Yan *et al.*, 2004b; Distelfeld *et al.*, 2009). Lokus genu *VRN2* zahrnuje dva tandemově se opakující geny – *ZCCT1* a *ZCCT2*, jejichž proteiny mají motiv

zinkového prstu a obsahují CCT doménu (Yan *et al.*, 2004b). Zinkový prst se nachází na N-konci proteinu a CCT doména na jeho C- konci. Produkty exprese genu *VRN2* snižují transkripci genu *VRN3* během podzimu a inhibují tak kvetení (Yan *et al.*, 2006). Inhibice probíhá prostřednictvím kompetitivní interakce jiných proteinů s CCT doménou. CCT doména interaguje s transkripčním faktorem NF-Y (komplex nukleárního faktoru – Y). Li *et al.* (2011) s využitím kvasinkových dvou a tří-hybridních systémů zjistili, že s CCT doménou, která se nachází u proteinů *VRN2* a *CO* (protein fotoperiodické dráhy), interaguje stejná podskupina různých osmi proteinů NF-Y. Jedná se tedy o kompetici mezi genem *VRN2* a genem *CO*. Dále prokázali, že mutace v CCT doméně u genu *VRN2* eliminují požadavek na vernalizaci u ozimé pšenice.

Gen *VRN2* nemá jasný ortolog u *A. thaliana*. Nejbližším orthologem je gen *Ghd7* nacházející se u rýže. Tento gen je také represorem kvetení (Xue *et al.*, 2008). Současné odstranění nebo mutace v obou genech *ZCCT1* a *ZCCT2* (u všech homologů) je spojeno s recesivní alelou a tím vzniku jařin (Yan *et al.*, 2004b; Distelfeld *et al.*, 2009). Dominantní forma genu se nachází u ozimých odrůd. Hlavní úloha genu *VRN2* je potlačení indukce genu *VRN3* během podzimu, čímž dochází k zabránění kvetení před zimou.

Nefunkční alely *VRN2* jsou běžnější u diploidních druhů pšenice. U hexaploidní pšenice je efekt nefunkčních alel *VRN2* často maskován z důvodu přítomnosti dalších dvou kopií. Ve studii Kippes *et al.* (2016) vyvinuli trojitě mutanty pro gen *VRN2*. Nevernalizované *vrn2*-null rostliny kvetly o 118 dní dříve než ozimé kontroly a vykazovali omezenou vernalizační odpověď. Alela *Vrn-B2* v porovnání s *Vrn-D2* je exprimována ve vyšších hladinách a také vykazuje silnější represivní efekt při částečné vernalizaci. Tudíž kombinace alel *Vrn-B2* a *Vrn-D2* by mohla být využita pro modulaci vernalizačního procesu v oblastech s mírnými zimami (Kippes *et al.*, 2016).

### **Gen *VRN3***

Gen *VRN3* je integrátorem signálů mezi fotoperiodickou (*Ppd*) a vernalizační (*VRN1* a *VRN2*) dráhou. Kóduje mobilní element (tzv. florigen), který je z listů transportován do apexu, kde indukuje kvetení tím, že aktivuje expresi *VRN1*. Gen *VRN3* je homologem ke genu *FT*, který se nachází u *A. thaliana* (Yan *et al.*, 2006). Urychluje reprodukční vývoj apexu a je indukován dlouhými dny. Dominantní alela *VRN3* je spojována s inzercí retroelementu do promotoru (Yan *et al.*, 2006).

Geny *VRN3* jsou *Vrn-A3*, *Vrn-B3* a *Vrn-D3*. Jsou lokalizovány na 7A, 7B a 7D chromozómech a patří mezi RAF kinázové inhibitory (Yan *et al.*, 2006; Bonnini *et al.*, 2008). Alely s vysokou hladinou exprese jsou spojovány s dominantním jarním typem u pšenice (Yan *et al.*, 2006). Během podzimu je exprese *VRN3* v listech snižována genem *VRN2*, aby se zabránilo kvetení před zimou (Yan *et al.*, 2004b). V průběhu vernalizace dochází k expresi genu *VRN1* v listech, čímž dojde k potlačení exprese genu *VRN2*. Nepřítomnost produktu genu *VRN2* a zvyšování délky dne během jara vede k indukci exprese genu *VRN3*. Následuje transport produktu do apexu s následnou indukcí kvetení (Loukaianov *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012, Distelfeld *et al.*, 2009). Protein *VRN3* interaguje s FLOWERING LOCUS D-LIKE 2 (FDL2) (Li *et al.*, 2008). Tento proteinový komplex se následně váže do promotoru genu *VRN1* (Li *et al.*, 2015), čímž zvýší jeho expresi nad kritickou hodnotu. Ta je potřeba k přechodu do reprodukční fáze (Distelfeld *et al.*, 2009).

Stejně jak je tomu u *VRN1*, tak i dominantní alely *VRN3* poskytují jarní fenotyp. Dominantní alela *Vrn-B3a* obsahuje 5,3 kb inzerci retrotranspozónu v promotorové oblasti, zatímco alela *Vrn-B3b* má 890 bp inzerci v 5'UTR oblasti. Alela *Vrn-B3c* se liší od alely *Vrn-B3a* delecemi 20 a 4 bp v sekvenci retrotranspozónu. Nicméně tato delece nemá vliv na transkripci a doba kvetení u rostlin s těmito alelami je porovnatelná (Yan *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2013). Také byly identifikovány dvě recesivní alely *vrn-D3*, které se lišily v počtu guaninových bazí ve 3. exonu. Alela *vrn-D3a* má celkem čtyři guaniny, alela *vrn-D3b* o jeden guanin méně. Rostliny s alelou *vrn-D3a* kvetou dříve než s *vrn-D3b* (Bonnini *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010).

### **Gen *VRN4***

Gen *VRN4* nebyl identifikován na všech subgenomech, ale pouze na subgenomu D (*VRN-D4*). Je lokalizován na krátkém raménku chromozómu 5D (Kippes *et al.*, 2014). Autoři předpokládají, že se jedná o kopii genu *VRN1*, který byl translokován do této oblasti. Přítomnost alely *Vrn-D4* je spojována se zvýšením transkripce *VRN1* a *FT1* a snížením transkripce *VRN2* v listech (Yoshida *et al.*, 2010). Ačkoliv k expresi *VRN-D4* dochází během počátečního vývoje v nepřítomnosti vernalizace, tak sekvence tohoto genu neobsahuje známé mutace, které jsou spojovány s jařinami a byly popsány u *VRN1*. Namísto toho byly identifikovány tři jedno-nukleotidové polymorfizmy v oblasti prvního intronu, které jsou pravděpodobně zodpovědné za jarní růstový typ. Kromě změn v prvním intronu

identifikovali jeden jedno-nukleotidový polymorfismus v oblasti čtvrtého exonu (Kippes *et al.*, 2015).

### 3.3.4. Fotoperiodická dráha

Nezanedbatelný vliv na kvetení rostliny má délka dne. Schopnost rostlin reagovat na změny v délce osvitů se nazývá fotoperiodizmus. Vnímání délky dne umožňuje rostlinám rozeznávat, jak dlouho jsou vystaveny vnějšímu záření a odlišit den/noc. Informace o změnách v délce dne rostliny využívají pro načasování fenologických změn. Díky tomu mohou přizpůsobit svůj růst a vývoj na období, kdy se nacházejí v příznivých podmínkách. Tímto minimalizují poškození orgánů, které jsou nezbytné pro kvetení. Před samotným kvetením u pšenice musí dojít ke koordinaci fotoperiodické dráhy a dráhy vernalizační. Teprve po splnění vernalizačního i fotoperiodického požadavku může rostlina vykvést (Kumar *et al.*, 2012).

Dle nároku na fotoperiodu se rostliny dělí na krátkodenní a dlouhodenní. Krátkodenní rostliny přecházejí do generativní fáze vlivem krátkého dne. U dlouhodenních rostlin je potřeba dlouhého dne pro indukci kvetení. V případě, že nedojde k dostatečnému splnění fotoperiodického požadavku, dochází ke zpoždění kvetení. Krátkodenní a dlouhodenní rostliny se řadí do skupiny tzv. citlivých rostlin k fotoperiodě. Druhou skupinou jsou rostliny necitlivé k fotoperiodě. Tyto rostliny nevyžadují fotoperiodu pro přechod do reprodukční fáze a přecházejí do ní v okamžiku, jak dojde na jaře k oteplení (Kamran *et al.*, 2014).

Pšenice setá se řadí mezi dlouhodenní rostliny a k tomu, aby vykvetla, potřebuje nejméně 14 hodin světla. Expozice dlouhým dnem urychluje její kvetení, naopak krátký den kvetení zpožďuje (dle Milec *et al.*, 2014). Nicméně postupnými mutacemi ve fotoperiodických genech došlo u některých linií pšenice ke ztrátě citlivosti k fotoperiodě. Tyto linie kvetou během krátkého i dlouhého dne. Pšenice necitlivá k fotoperiodě je rozšířená v oblastech s krátkou fotoperiodou, nebo tam kde je potřeba, aby pšenice dozrála před nástupem horních letních teplot, čímž se zabrání redukci celé úrody (např. jižní Evropa nebo oblast Úrodného půlměsíce). Naopak linie, které jsou citlivé, se nacházejí ve vyšších zeměpisných šířkách. Fotoperioda je u pšenice především kontrolována geny *Ppd* (Turner *et al.*, 2005; Beales *et al.*, 2007).



## **Fotoreceptory**

Světlo je u rostlin důležitým enviromentálním podnětem, který řídí jejich vývoj, morfogenezi i fyziologii. Světlo je vnímáno pomocí specializovaných fotoreceptorů, které jsou schopné detekovat a reagovat na různé světelné změny jako je kvalita, intenzita či délka působení. Proteiny, které umožňují vnímat světlo a reagovat na specifické vlnové délky, obsahují chromofory. Mezi hlavní fotoreceptory u rostlin se řadí fytochromy (vnímání červeného světla) a kryptochromy (vnímání modrého světla) (Christie *et al.*, 2015).

Fytochromy jsou chromoproteiny absorbující červené světlo a tzv. far red světlo a obsahují kovalentně navázaný chromofor. Fytochromy phyA a phyB jsou nejdůležitějšími a nejpočetnějšími z celé skupiny fytochromů. Ve tmě jsou fytochromy přítomné v inaktivované formě (Pr). Tato forma absorbuje červené světlo, čímž se neaktivní forma konvertuje na aktivní formu (Pfr). Aktivní forma Pfr přechází zpátky do neaktivní konformace Pr tím, že absorbuje světlo o vyšší vlnové délce (tzv. far red světlo) (Rockwell *et al.*, 2006; Quail, 2007).

Kryptochromy byly mezi prvními receptory, které byly charakterizovány na molekulární úrovni. Regulují fotomorfogenní vývoj a fotoperiodickou kontrolu ovlivňující kvetení rostlin. Kryptochromy vykazují určitou homologii s fotolyázami, jejichž funkcí jsou opravy DNA. Fotolyázy jsou enzymy, které jsou aktivovány modrým světlem. Stejným způsobem jsou aktivovány i kryptochromy (dle Christie *et al.*, 2015). Kryptochromy mají dvě domény. Jedná se o N- a C- terminální domény. Na N-terminálním konci se nachází PHR (Photolyase-Homologous Region), kde dochází k absorpci fotonů a je zde navázán FAD chromofor. U *A. thaliana* byly identifikovány celkem tři kryptochromy: cry1, cry 2 a cry3. Cry2 je zapojen do regulace kvetení vlivem délky dne (Liu *et al.*, 2011).

## **Geny *Ppd***

Geny *Ppd* byly identifikovány na krátkém raménku druhého chromozómu na všech třech subgenomech (*Ppd-A1*, *Ppd-B1* a *Ppd-D1*). Jsou součástí proteinové rodiny Pseudo response regulator (PRR) a jejich orthologem je gen *Ppd-H1*, který se nachází u ječmene (Turner *et al.*, 2005; Beales *et al.*, 2007). Khlestkina *et al.* (2009) popsali gen *Ppd-B2*, který je lokalizován na krátkém raménku sedmého chromozómu. Tento gen urychluje kvetení při dlouhém dnu.

Dominantní alela se nachází u linií, které jsou necitlivé vůči fotoperiodě. Tyto alely se označují písmenem „a“. Naopak alely citlivé vůči fotoperiodě se značí písmenem „b“ (Beales *et al.*, 2007). Citlivost vůči fotoperiodě poskytují recesivní alely. Odlišné alely genů *Ppd* vedou k různé potřebě fotoperiody a tím vzniku rozdílných odrůd (Wilhelm *et al.*, 2009; Beales *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2012; Nishida *et al.*, 2013). Necitlivé alely k fotoperiodě (*Ppd-1a*) se nacházejí u odrůd, které kvetou dříve. Zvýšení exprese alel *Ppd-D1a* a *Ppd-A1a* je způsobena delecemi v promotorové oblasti. Tím se liší od alely *Ppd-B1a*, kde je zvýšena exprese zapříčiněna zvýšeným počtem kopií zmíněného genu (Díaz *et al.*, 2012).

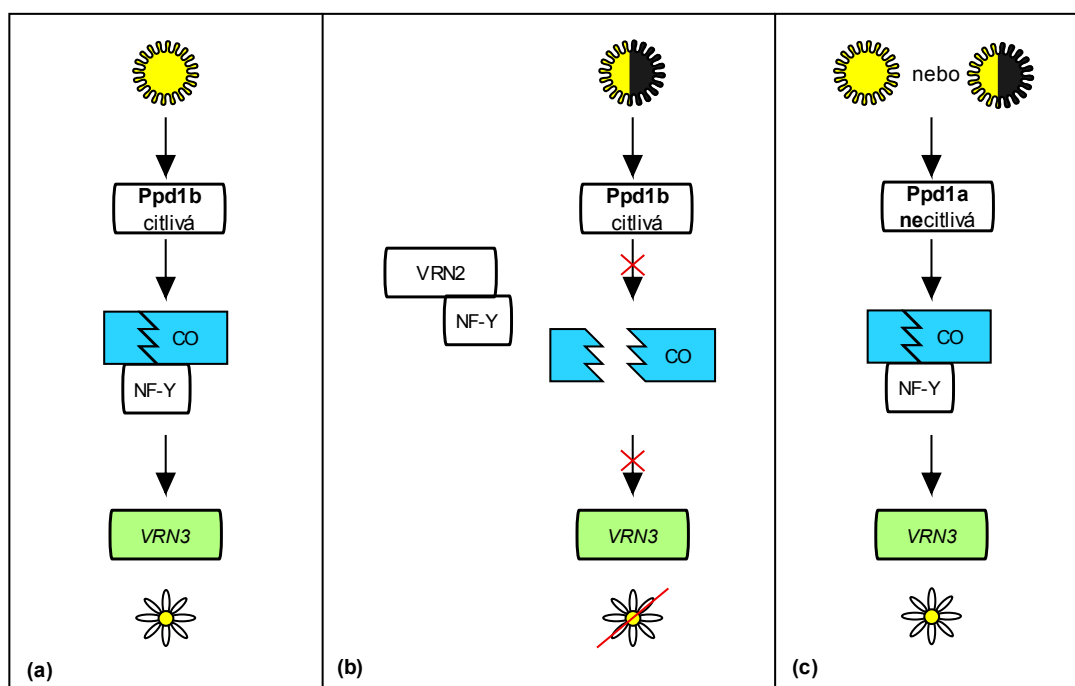
Nejsilnější efekt na dobu kvetení ve srovnání s ostatními geny má gen *Ppd-D1*. Predominantní mutace v alele *Ppd-D1a* vedla ke vzniku linií necitlivých k fotoperiodě. Alela *Ppd-D1a* obsahuje 2 089 bp delecí v promotorové oblasti a způsobuje aktivaci fotoperiodické dráhy bez ohledu na délku dne (Beales *et al.*, 2007). Ve studii Wilhelm *et al.* (2009) byla popsána necitlivá alela *Ppd-A1a* u *T. durum*. Obsahovala delecí 1 029 bp nebo 1 117 bp. Alela *Ppd-A1a* popsána Nishidou *et al.* (2013) měla 1 085 bp delecí v 5'UTR oblasti. Alela *Ppd-B1a1* je charakteristická 308 bp inzercí v kódující oblasti. Tato alela je také zodpovědná za necitlivost vůči fotoperiodě (Nishida *et al.*, 2013).

Díaz *et al.*, (2012) pozorovali dřívější kvetení u rostlin během krátkého dne, které měly zvýšený počet kopií genu *Ppd-B1a*. V případě jedné kopie genu *Ppd-B1a* byla rostlina citlivá vůči fotoperiodě a postupné zvyšování počtu kopií vedlo k necitlivosti a tím k dřívějšímu kvetení. Nicméně ve studii Ivaničová *et al.* (2017) rostliny se stejným počtem kopií genu *Ppd-B1* nekvetly ve stejnou dobu. Mapovací populace vznikla z křížení dvou jarních hexaploidních odrůd. Rozdíl mezi některými rostlinami byl 16 dnů. Podle autorů je za rozdíl v době kvetení pravděpodobně zodpovědná změna na úrovni genové exprese a metylace příslušného genu. Již dříve se metylací genu *Ppd-B1* zabývala studie Sun *et al.* (2014). Zjistili, že metylace je spojena s vyšší expresí *Ppd-B1*. To vedlo k dřívějšímu kvetení a ztrátě citlivosti k fotoperiodě. Regulací genu *Ppd-B1* a jeho vlivu na dobu kvetení se dále zabývali ve studii Kiseleva *et al.* (2017). Pro křížení použili kultivary, které se lišily v době kvetení. Linie Ppd-m a Ppd-w obsahovaly introgrese *Ppd-B1a* z kultivaru Sonora. Tyto linie se však lišily v době kvetení. Ppd-m kvetla o 4 dny dříve než Ppd-w. Analýzou příslušného lokusu identifikovali, že rozdíl mezi alelami je dán přítomností dvou jednonukleotidových polymorfizmů a indelem, který se nachází v promotorové oblasti. Také se zabývali interakcí

mezi *Ppd-B1a* s fytochromy a geny indukujícími kvetení (*VRN1* a *TaFT1*). Potvrdili, že existuje pozitivní obousměrná regulace *Ppd-B1a* a PhyC s přispěním FHY3/FAR1.

Alely citlivé k fotoperiodě jsou exprimovány během dne a nejvyšší exprese se vyskytuje 3 až 6 hodin po svítání. Tyto alely se neexprimují ve tmě. Naproti tomu alely necitlivé vůči fotoperiodě jsou charakteristické abnormální expresí v průběhu celého dne (Beales *et al.*, 2007; Wilhelm *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2012).

Fotoperiodická dráha zprostředkovávaná geny *Ppd* ovlivňuje expresi vernalizačního genu *VRN3* (Obrázek 5). Protein Ppd působí na expresi genu *VRN3* pomocí proteinu *Triticum aestivum* CONSTANS (TaCO). Stejně jako gen *VRN2* i *Ppd* obsahuje CTT doménu. Jak již bylo zmíněno výše, tak s CTT doménou interaguje transkripční faktor NF-Y. Před nástupem zimy se na tento transkripční faktor váže VRN2, čímž dojde k destabilizaci TaCO, potlačení exprese *VRN3* a zabránění kvetení (Chen *et* Dubcovsky, 2012; Li *et al.*, 2011).



**Obrázek 5: Schématický model determinace (ne)citlivosti k fotoperiodě u pšenice (převzato a upraveno dle Ivaničová, 2017).** Na obrázku (a) je znázorněná citlivá alela k fotoperiodě v podmínkách dlouhého dne. Obrázek (b) znázorňuje alelu citlivou k fotoperiodě v podmínkách krátkého dne. Na obrázku (c) je znázorněna necitlivá alela k fotoperiodě bez ohledu na délku dne. Exprese alel *Ppd* vede ke stabilizaci komplexu CO – NF-Y, který má vliv na gen *VRN3* a dojde k indukci kvetení. V případě citlivosti vůči fotoperiodě v podmínkách krátkého dne (b) nedochází ke stabilizaci zmíněného komplexu, a tím k represí kvetení.

### 3.3.5 Geny ranosti – *Earliness per se* (*Eps*)

Třetí skupinou genů, které ovlivňují dobu kvetení u pšenice, jsou geny *Eps*. Tyto geny jsou důležité pro jemné doladění času kvetení a tím spojenou adaptaci dané rostliny k rozdílným enviromentálním podmínkám. Appendino *et al.* (2003) definují geny *Eps* jako čas do doby kvetení poté, co byl splněn vernalizační a fotoperiodický požadavek.

Detailnější studium mechanismu a vlivu genů *Eps* na dobu kvetení je umožněno tehdy, když dojde k eliminaci efektu genů *VRN* a *PPD* (Kamran *et al.*, 2014). Většina studií uváděla jen jejich vliv na kvetení, ale některé uvádí, že mají tzv. pleiotropní efekt. To znamená, že kromě kvetení ovlivňují i jiné agronomické znaky (např. počet klásků, počet zrn na klas), (Bullrich *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2007). Dále bylo uváděno, že geny *Eps* nejsou závislé na podmínkách vnějšího prostředí. Nicméně některé studie potvrdily, že např. odlišná teplota má na tyto geny vliv (Bullrich *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2007). Několik lokusů *Eps* bylo mapováno na různých chromozómech u pšenice (Miura *et al.*, 1994; Griffiths *et al.*, 2009; Bullrich *et al.*, 2012).

Vzhledem k jejich poměrně malému účinku, byly geny *Eps* dříve mapovány pouze jako QTL. V posledních letech však geny *Eps* byly definovány přesněji pomocí téměř izogenických linií (NILs). Gen *Eps-A<sup>m1</sup>* je studován již po delší dobu a byl identifikován na chromozómu 1A<sup>mL</sup> u *T. monococcum* (Bullrich *et al.*, 2002). Kromě vlivu na kvetení má tento gen vliv na počet klásků a počet zrn na klas u diploidní pšenice (Lewis *et al.*, 2008). Jako kandidátní geny pro lokus *Eps-A<sup>m1</sup>* jsou navrženy geny *MOLYBDENUM TRANSPORTER 1 (MOT1)* a *FILAMENTATION TEMPERATURE SENSITIVE H (FtsH4)*, (Faricelli *et al.*, 2010). Ve studii Alvarez *et al.* (2016) byl určen další kandidátní gen pro tento lokus – *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)*. Další definovaný lokus je *Eps-3A<sup>m</sup>* (Gawroński *et al.*, 2012). Mezi lokusy *Eps-A<sup>m1</sup>* a *Eps-3A<sup>m</sup>* existují nápadné podobnosti. Oba mají pleiotropní efekt (Lewis *et al.*, 2008, Gawroński *et al.*, 2014) a jsou termosenzitivní (Bullrich *et al.*, 2002; Gawroński *et al.*, 2014).

Lepší pochopení mechanismu genů *Eps* a jejich efektu na jednotlivé vývojové fáze umožní šlechtitelům přizpůsobit pěstování odrůd v rozdílných enviromentálních podmínkách a zvýšit tím potenciální výnos (Griffiths *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2008).

## 4 MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Biologický materiál

#### 4.1.1 Analýza genové exprese

Jako biologický materiál byla použita semena *Triticum aestivum* kultivary Tähti a Mooni, *Triticum militinae* a linií - DH81 a F<sub>3</sub> 147. Kultivary Tähti a Mooni mají alelu *Vrn-A1a*. Zbývající linie mají alelu *Vrn-A1f-like* (Tabulka 1). Linie DH81 vznikla dihaploidizací linie 8.1, která nesla introgrese na sedmi chromozomech pocházejících z *T. militinae* (Jakobson *et al.*, 2006, 2012). Linie 147 byla vybrána z F<sub>3</sub> generace, která vznikla zkřížením mezi linií DH81 a kultivarem Mooni.

Semena byla poskytnuta Mgr. Zuzanou Ivaničovou, Ph.D. (Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Olomouc).

**Tabulka 1:** Přehled použitých kultivarů a linií pro analýzu relativní exprese genu *VRN1* s jejich růstovým typem, genomem a typem alely genu *VRN1*

Varieta	Růstový typ	Genom	Alela
<i>T. aestivum</i> kultivar Tähti	jařina	hexaploid	<i>Vrn-A1a</i>
<i>T. aestivum</i> kultivar Mooni	jařina	hexaploid	<i>Vrn-A1a</i>
linie DH81	jařina	hexaploid	<i>Vrn-A1-f-like</i>
linie F <sub>3</sub> 147	jařina	hexaploid	<i>Vrn-A1-f-like</i>
<i>T. militinae</i>	jařina	tetraploid	<i>Vrn-A1-f-like</i>
<b>Experiment 1a</b>	Neernalizovaná sada rostlin		
<b>Experiment 1b</b>	Vernalizovaná sada rostlin		

#### 4.1.2 Analýza přítomnosti alely *Vrn-A1f-like* a polymorfizmů genů kódující protein VRN2 u vybraných pšenic s genomem AAGG

Pro analýzu bylo použito celkem 93 různých linií tetraploidních pšenic s genomem AAGG (Tabulka 2 a 3). DNA extrahovaná z těchto linií byla poskytnuta Mgr. Zuzanou Ivaničovou, Ph.D. (Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Olomouc).

**Tabulka 2:** Rostlinný materiál použitý pro analýzu přítomnosti alely *Vrn-A1f-like* a sekvenční analýzu genu *VRN2* (rostliny získané z genové banky IPK Gatersleben)

Položka	Druh
TRI 11345	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nachitschevanicum</i>
TRI 11354	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>thumanianii</i>
TRI 11356	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>thumanianii</i>
TRI 11358	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>araraticum</i>
TRI 11361	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nachitschevanicum</i>
TRI 11362	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nachitschevanicum</i>
TRI 11363	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nachitschevanicum</i>
TRI 11364	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nachitschevanicum</i>

**Pokračování tabulky 2:** Rostlinný materiál použitý pro analýzu přítomnosti alely *Vrn-Alf-like* a sekvenční analýzu genu *VRN2* (rostliny získané z genové banky IPK Gatersleben)

<b>Položka</b>	<b>Druh</b>
TRI 11365	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>thumanianii</i>
TRI 11366	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nachitschevanicum</i>
TRI 11367	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>araraticum</i>
TRI 11506	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>thumanianii</i>
TRI 11507	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i> var. <i>kurdistanicum</i>
TRI 11508	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i> var. <i>kurdistanicum</i>
TRI 11509	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i> var. <i>nabelicum</i>
TRI 11564	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i> var. <i>araxinum</i>
TRI 11939	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i> var. <i>kurdistanicum</i>
TRI 11945	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>thumanianii</i>
TRI 11947	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>araraticum</i>
TRI 12751	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>timopheevii</i>
TRI 13159	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk.
TRI 13604	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>viticulosum</i>
TRI 13606	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>timopheevii</i>
TRI 14269	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>thumanianii</i>
TRI 16597	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 16598	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 16599	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 16600	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 16602	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 17028	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i> var. <i>nabelicum</i>
TRI 17216	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>araraticum</i>
TRI 17218	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 17220	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 18469	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>araxinum</i>
TRI 18470	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>araxinum</i>
TRI 18471	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 18472	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i> var. <i>kurdistanicum</i>
TRI 18473	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i>
TRI 18474	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i>
TRI 18476	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i>
TRI 18483	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i>
TRI 18509	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i>
TRI 18510	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>thumanianii</i>
TRI 18511	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 18513	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 18514	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i>
TRI 18515	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i>
TRI 18517	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i>
TRI 18518	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i>
TRI 18522	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nachitschevanicum</i>
TRI 18534	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nigricans</i>
TRI 18535	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nachitschevanicum</i>
TRI 18537	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nachitschevanicum</i>
TRI 18538	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 18540	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>kurdistanicum</i>
TRI 19075	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nigrum</i>

**Pokračování tabulky 2:** Rostlinný materiál použitý pro analýzu přítomnosti alely *Vrn-A1f-like* a sekvenční analýzu genu *VRN2* (rostliny získané z genové banky IPK Gatersleben)

<b>Položka</b>	<b>Druh</b>
TRI 28646	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>viticulosum</i>
TRI 29358	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>thumanianii</i>
TRI 3407	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>thimopheevii</i>
TRI 3433	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>thimopheevii</i>
TRI 4349	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>thimopheevii</i>
TRI 4362	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>viticulosum</i>
TRI 5352	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>thimopheevii</i>
TRI 677	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>thimopheevii</i>
TRI 6912	<i>Triticum araraticum</i> Jakubz.
TRI 7272	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>thimopheevii</i>
TRI 7301	<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. var. <i>nigrum</i>
TRI 7388	<i>Triticum araraticum</i> subsp. <i>araraticum</i> var. <i>nachitschevanicum</i>

**Tabulka 3:** Rostlinný materiál použitý pro analýzu přítomnosti alely *Vrn-A1f-like* a sekvenční analýzu genu *VRN2* (rostliny získané z genové banky United States Department of Agriculture – Agriculture Research Service, National Small Grains Collection)

<b>Položka</b>	<b>Druh</b>
PI 538464	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538470	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538472	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538473	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538474	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538475	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538476	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538477	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538484	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538485	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538496	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538497	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538498	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538504	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538505	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538506	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538507	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538512	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 538516	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 542472	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>timopheevii</i>
PI 572916	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>timopheevii</i>
PI 572917	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>timopheevii</i>
PI 596290	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)
PI 654340	<i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>armeniicum</i> (Jakubz.)

## 4.2 Seznam použitých chemikálií

magnetické kuličky (GeneFind 2.0, Immunotech), agaróza (Sigma-Aldrich, kat. č. A9539), velikostní marker GeneRuler 100 bp, DNA Ladder Plus (Fermentas, Kanada), ethidium bromid (Sigma Chemical CO., kat. č. E8751), sacharóza (Sigma-Aldrich, kat. č. S0389),  $\beta$ -merkapt ethanol (Sigma-Aldrich, kat. č. M3148), nukleotidy – dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Fermentas kat. č. 10297117), HOT FIREPol DNA polymerase (Solis-Biodyne, Estonsko),

## 4.3 Seznam použitých roztoků

### 5× TBE (pH = 8):

450 mmol/l	tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, kat. č. 741883)
450 mmol/l	kyselina boritá (Lachner, kat. č. 10017-APO)
10 mmol/l	dihydrát disodné soli EDTA (Fluka, kat. č. 03610)

### 1× PCR pufr (pH = 8,2)

10 mmol/l	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Sigma-Aldrich, kat. č. 252859)
1,5 mmol/l	MgCl <sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, kat. č. M2393)
50 mmol/l	KCl (Lachner, kat. č. 30079-CP0)
0,1%	Triton X-100 (Sigma-Aldrich, kat. č. T8787)

### Cresol red

0,01%	<i>o</i> -kresolsulfoftalein (Sigma-Aldrich, kat. č. W348007)
1,5%	sacharóza (Sigma-Aldrich, kat. č. S0389)

### Nukleotidy (Fermentas, kat. č. 10297117)

200 $\mu$ mol/l	dATP
200 $\mu$ mol/l	dCTP
200 $\mu$ mol/l	dGTP
200 $\mu$ mol/l	dTTP



#### 4.4 Seznam použitých komerčních kitů

RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (Qiagen, kat. č. 74903)

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, kat. č. 05081955001)

qPCR 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, s.r.o., kat. č. p551)

BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies<sup>™</sup>, kat. č. 4337455)

Agencourt<sup>®</sup> CelanSeq<sup>®</sup> Kit (Beckman Coulter, kat. č. A29151)

#### 4.5 Seznam použitých přístrojů a zařízení

automatický robot (Beckman Coulter, Biomek NX<sup>P</sup>, USA), homogenizační oscilační mlýn MM301 (Retsch, Německo), termostat BT 120M (Laboratorní přístroje Praha, ČR), vodní lázeň (Julabo, TW8 – ČR), elektroforetická aparatura pro agarózovou elektroforézu Thermo Scientific OWL A6 (Separation Systems, Inc., USA), zdroj napětí pro agarózovou elektroforézu (Major Science, USA), dokumentační systém Syngene s UV transiluminátorem (SynGene, UK), nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), thermocycler C1000 Touch<sup>™</sup> (Bio-Rad, USA), digitální předvážky (Shinko Denshi, Japonsko), mikrovlnná trouba (Daewoo KOR-6C2B), automatické pipety (Nichipet EX Plus, USA), stolní centrifuga (Benchmark MyFuge<sup>™</sup> Mini), stolní centrifuga (Centrifuge 54150, Eppendorf, USA), Flow-box (Holten LaminAir, Trigon-plus, ČR), Qubit<sup>®</sup> 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific)

#### 4.6 Pěstování linií pro analýzu genové exprese

60 semen z každé výše zmíněné linie a kultivarů bylo umístěno na samostatné Petriho misky s buničitou vatou navlhčenou pitnou vodou. Petriho misky byly umístěny do ledničky po dobu 72 hodin s cílem synchronizace jejich klíčení. Následně byla semena inkubována 24 hodin v termostatu při 25 °C. Pro experiment 1a byla naklíčená semena každé linie (20 semen od všech zmíněných linií) sázena do květináčů se zahradnickým substrátem (Rašelina Agro) a umístěny do fytotronu při kontrolovaných podmínkách 20 °C /16 hod při vlhkosti 60 % (den) a 16 °C /8 hod při vlhkosti 60 % (noc). Pro experiment 1b byly sázeny jednotlivé linie (celkem 20 semen) do jiffvých květináčů (5 x 5 cm). Klíčivost jednotlivých linií se lišila, a v důsledku nízké klíčivosti semen *T. militinae* nebyla tato semena do studie v rámci pokusu 1b zařazena. Jiffvové květináče byly také umístěny do fytotronu při kontrolovaných podmínkách 20 °C /16 hod při vlhkosti 60 % (den) a 16 °C /8 hod při vlhkosti 60 % (noc) po dobu 4 dnů. Následně byly rostliny přemístěny do podmínek 6 °C /8

hod při vlhkosti 65 % (den) a 6 °C/16 hod při vlhkosti 65 % (noc) z důvodu jejich vernalizace. Po 4 týdnech byly rostliny opět přemístěny do původních podmínek.

#### **4.7 Analýza genové exprese**

Expresí alel *Vrn-A1a* a *Vrn-A1f-like* byla analyzována u rostlin v obou částech experimentu (1a, 1b), a to v podmínkách dlouhého dne. Z jednotlivých rostlin byly odebrány tři listové segmenty (3 x 3 cm) do 2 ml mikrozkušavky se dvěma skleněnými kuličkami (0,5 mm). Mikrozkušavky byly ihned po odebrání vloženy do tekutého dusíku. Poté byly odebrané vzorky přemístěny do mrazáku (-80 °C). Sběr nevernalizovaných a vernalizovaných rostlin byl proveden po šesti týdnech od jejich vysazení. První sběr listů byl pro oba experimenty proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu, a to v šest hodin ráno. Pro analýzu exprese v průběhu dne byly vzorky odebírány každé tři hodiny. Poslední sběr byl proveden po sedmnácti hodinách od začátku světelného režimu, a to v devět hodin večer. Celkem bylo provedeno šest sběrů vzorků.

#### **4.8 Izolace RNA**

Celková buněčná RNA z rostlin jednotlivých linií byla izolována pomocí komerčního kitu RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (Qiagen, Německo). Mikrozkušavky s rostlinným materiálem byly homogenizovány v oscilačním mlýnu (MM301 Retsch, Německo) se dvěma skleněnými kuličkami při 27 000 Hz/2 minuty. Před samotnou homogenizací, v jejím průběhu a po ní bylo se vzorky zacházeno tak, aby nedošlo k jejich rozmrznutí. Po homogenizaci byl přidán do mikrozkušavek 550 µl RLC pufru, který byl předem smíchán s β-merkptoethanolem (4,5 µl). Mikrozkušavka byla okamžitě po přidání pufru zvortexována a následně inkubována ve vodní lázni při 56 °C/2 min. Následné kroky izolace RNA na kolonkách byly provedeny podle návodu od výrobce. Po izolaci byla zjištěna koncentrace a čistota vyizolované RNA na nanodropu (ND-1000 Spectrophotometer) a následně byla vyizolovaná RNA umístěna do mrazáku (-80 °C).

#### **4.9 Přepis RNA do cDNA**

Přepis vzorků z RNA do cDNA byl proveden pomocí Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kitu (Roche, Německo). Jednotlivé kroky přepisu byly provedeny podle návodu od výrobce. Bylo použito 9 µl vyizolované RNA a použit anchored-oligo(dT)<sub>18</sub> primer. Směs byla nejprve inkubována při 65 °C po dobu 10 minut a následně byla přidána reverzní transkriptáza. Kompletní reakční směs pro syntézu cDNA měla celkový objem 20 µl a byla inkubována při 50 °C po dobu 30 minut. Po této inkubaci ještě proběhla

deaktivace enzymu reverzní transkriptázy, a to při 85 °C po dobu 5 minut. Koncentrace cDNA byla změřena na fluorimetru Qubit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) a cDNA byla uložena do mrazáku (-20 °C).

#### 4.10 Kvantitativní *real-time* PCR

Reakční směs pro qPCR se skládala z 1x SYBR Master Mix (Top-Bio, s.r.o., ČR), 10 ng cDNA a H<sub>2</sub>O do celkového objemu 15 µl. Reakce probíhala v termocykléru C1000 Touch™ Thermal cycler – CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, USA). Reakční podmínky jsou uvedeny v Tabulce 4 a sekvence použitých primerů v Tabulce 5.

**Tabulka 4:** Reakční podmínky pro amplifikaci cDNA *real-time* PCR

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	10 s	44
Annealing	60	40 s	
Elongace	72	10 s	
Analýza teploty tání	65 → 94 (0,5 °C/s)	5 s	1

**Tabulka 5:** Sekvence primerů použitých při kvantitativní *real-time* PCR

Gen	Sekvence 5' → 3'	Literární zdroj
<i>VRN-A1</i>	F_GGAAACTGGTGTCACGAATA R_TGTTTCAGTGAGCTTCCAG	Loukoianov <i>et al.</i> (2005)
<i>GAPDH</i>	F_TTAGACTTGCGAAGCCAGCA R_AAATGCCCTTGAGGTTCC	Sun <i>et al.</i> (2014)

Data byla vyhodnocena pomocí programu Bio-Rad CFX Manager 3.1, který určil hodnoty C<sub>T</sub> vzorků. K vyhodnocení expresí jednotlivých vzorků byla využita metoda  $\Delta\Delta C_T$  (Livak *et Schmittgen*, 2001). Referenčním genem byl gen *GAPDH* (*glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza*). Jako kontrolní vzorek pro nevernalizovanou sadu byla použita nevernalizovaná rostlina DH81, která byla odebrána dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00). Pro vernalizovanou sadu byla použita vernalizovaná rostlina DH81, která byla taktéž odebrána dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00). Také byla použita jedna kontrola pro obě sady, a to vernalizovaná rostlina linie DH81 odebrána po čtrnácti hodinách od začátku světelného režimu (18:00).

Získaná data byla následně zpracována v počítačovém programu *Microsoft Office Excel 2016*. Byl proveden výpočet směrodatných odchylek a jednofaktorová ANOVA (analýza rozptylu). Jednofaktorová ANOVA byla provedena pro zjištění signifikantních rozdílů genové exprese v rámci stejné hodiny mezi linií Tähti a ostatními studovanými liniemi. Pomocí tohoto analytického nástroje se provádí analýza rozptylu dat. Tímto způsobem se zjistilo, zda jsou příslušné hodnoty relativní exprese mezi porovnávanými liniemi signifikantně odlišné (\* $P < 0,05$  nebo \*\* $P < 0,01$ ). V případě, že je hodnota  $P$  menší než 0,05 tak lze říct, že hodnoty  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  se mezi jednotlivými liniemi významně liší, a tedy se liší i jejich exprese v daném časovém úseku.

#### 4.11 Analýza přítomnosti alely *Vrn-A1f-like* u vybraných pšeníc s genomem AAGG

U vybraných TRI a PI linií byla nejprve zjištěna přítomnosti či nepřítomnosti dominantní alely *Vrn-A1f-like* pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) dle podmínek uvedených v Tabulce 7. Dominantní alely se nacházejí u jařin, zatímco recesivní alely jsou přítomné u ozimů. Byly použité tři sady primerů (Tabulka 6). Primerový pár *VRNA1\_F3R3* detekoval inserci transpozónu MITE. Druhý primerový pár *VRNA1\_F6R6* umožňoval detekci recesivní alely *vrn-A1*, protože amplifikací tímto párem vznikal jen produkt charakteristický pro tuto alelu. Amplifikací prostřednictvím primerového páru *VRNA1\_F6R9a* vznikal produkt jenom při přítomnosti alely *Vrn-A1f-like*.

**Tabulka 6:** Sekvence primerů pro detekci alel *Vrn-A1f-like* a *vrn-A1* u vybraných TRI a PI linií

Gen	Sekvence 5' → 3'	Velikost produktu (bp)	Literární zdroj
<i>VRNA1_F3_R3</i>	F_TGCGCACCGTTCTGGTCCT R_GGAGCTACCAATATGAATGATAGC	<i>Vrn-A1f-like</i> – 1002 <i>vrn-A1</i> - 569	Ivaničová <i>et al.</i> , 2016
<i>VRNA1_F6_R6</i>	F_CAAACGACATATAGATGATCAGC R_CACATGTGATATGAAGACTG	<i>vrn-A1</i> – 931	Ivaničová <i>et al.</i> , 2016
<i>VRNA1_F6_R9a</i>	F_CAAACGACATATAGATGATCAGC R_CCAAGCCATCTCAGACGATGTC	<i>Vrn-A1f-like</i> – 567	Ivaničová <i>et al.</i> , 2016

## 4.12 Analýza polymorfizmů genů kódující protein VRN2 u vybraných pšeni s genomem AAGG

Přítomnost polymorfizmů genů kódující protein VRN2 byla zjišťována sekvenováním kódující oblasti těchto genů. Před samotným sekvenováním byla provedena amplifikace fragmentů genomické DNA prostřednictvím primerů pomocí PCR. Následovala separace v agarózovém gelu pro ověření přítomnosti PCR produktu a následná sekvenace pomocí kapilárního analyzátoru ABI 3730xl (Applied Biosystems, USA).

### 4.12.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR reakce obsahovala: 1× PCR pufr, 200 μmol/l z každého dNTP (Fermentas, Litva), 0,01% Cresol Red (Sigma-Aldrich, UK), 0,5 U HOT FIREPol DNA polymerase (Solis-Biodyne, Estonsko), 1 μmol/l forward primeru (F), 1 μmol/l reverse primeru (R) a 10 ng templátové DNA. Celkový reakční objem byl 20 μl. Reakce probíhala v thermocycleru C-1000 (Bio-Rad, Kanada). Amplifikace probíhala pomocí *Touch down* PCR reakce a její reakční podmínky jsou uvedeny v Tabulce 7. Primery použité pro sekvenování jsou uvedeny v Tabulce 8.

**Tabulka 7:** Reakční podmínky pro *Touch down* PCR amplifikaci fragmentů genomické DNA vybraných linií s genomem AAGG

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	5 min	1
Denaturace	95	30 s	17
Annealing	65-53 (-0,7 °C/cyklus)	40 s	
Elongace	72	1,5 min	
Denaturace	95	40 s	19
Annealing	53	40 s	
Elongace	72	1,5 min	
Závěrečná elongace	72	10 min	1

**Tabulka 8:** Primery použité pro amplifikaci fragmentů genomické DNA genu *VRN2*

Gen	Sekvence 5' → 3'	Velikost produktu (bp)
<i>ZCCT1_Ex1</i>	F_AGTACGGCCCTAGCTACTAC R_TTTTAAAGGAGGAAGCCAGG	514
<i>ZCCT2_Ex1</i>	F_GCAAGCAAGCAAACGTAGG R_ACTTTTGTTAGAAGGAGGCC	404
<i>ZCCT2_Ex2</i>	F_TGGACACAAAGGCCCGGGA R_CATTGTACATCTTTGGCGGTC	846

#### 4.12.2 Agarózová elektroforéza

Agarózová elektroforéza byla použita pro ověření přítomnosti PCR produktu. Byl použit 1,5% agarózový gel. Pro separaci bylo naneseno na gel 5 µl vzorku a 5 µl velikostního markeru (GeneRuler 100 bp, DNA Ladder Plus, Fermentas, Kanada). Elektroforéza probíhala při 130 V (4,5 V/cm) po dobu 1 hod v 0,5× pufru TBE. Po separaci byl gel obarven v 0,002% roztoku ethidium bromidu po dobu 30 minut. Nakonec byla provedena vizualizace a vyfocení separovaných DNA fragmentů pomocí dokumentačního zařízení ChemiGenius BioImage systému (Syngene, UK).

#### 4.12.3 Sekvenování – Sangerova metoda

Před samotným sekvenováním PCR produktů bylo provedeno jejich enzymatické přečištění. Reakční směs obsahovala 1 U exonukleázy 1 (Fermentas, Kanada) a 0,5 U FastAP™ termosenzitivní alkalické fosfatázy (Fermentas, Kanada). Na přečištění bylo použito 4 µl PCR produktu (v závislosti na množství amplikónu bylo možné toto množství upravit). Celkový objem reakce byl 7 µl a byl doplněn 1× PCR pufrům. Připravená směs byla inkubována 30 minut při 37 °C v thermocycleru. Následně byly enzymy inaktivovány po dobu 5 minut při 95 °C.

Pro sekvenační reakci byl použit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies™, USA). Reakční směs byla připravena z 0,75× sekvenačního pufru; 0,937 µl BDX64; 0,063 µl BigDye®; 1 µmol/l F primeru; 3 µl přečištěného PCR produktu a doplněna vodou do celkového objemu 10 µl. Připravená reakční směs byla vložena do thermocycleru při následujících reakčních podmínkách: 98 °C/5 min a 60 cyklů: 96 °C/10 s, 50 °C/ 5 s, 60 °C/ 4 min.

Sekvenační produkt byl následně přečištěn pomocí magnetických kuliček (podle návodu od výrobce Agencourt® CleanSeq®, Beckman Coulter, USA) na automatickém robotu Biomek® NX<sup>P</sup> (Beckman Coulter, USA). Poté byla provedena separace kapilární elektroforézou, kde byly detekovány fluorescenčně značené dideoxynukleotidy. Separace byla provedena automatickým kapilárním analyzátozem ABI 3730xl (Applied Biosystems, USA). Získané sekvence byly upraveny a zpracovány v programu Geneious 5.6.4 (<https://www.geneious.com/>, Kearse *et al.*, 2012).

## 5 VÝSLEDKY

Výsledky diplomové práce jsou rozděleny do tří samostatných podkapitol. První podkapitola se zabývá analýzou změn expresních profilů *T. aestivum* kultivarů Tähti a Mooni, linie DH81, *T. militinae* a linie F<sub>3</sub> 147 v průběhu světelné části dne, a to v podmínkách dlouhého dne. První dva zmíněné kultivary nesou alelu *VRN-A1a*. Zbývající linie nesou alelu *VRN-A1f-like* (Tabulka 9). V předcházejících pokusech bylo zjištěno, že linie s alelou *VRN-A1f-like* kvetou později než linie s alelou *VRN-A1a*. Kultivar Tähti metal v průměru za 79 dní a kultivar Mooni v průměru za 79,4 dní od jejich vysazení. U *T. militinae* byla pozorovaná doba metání za 88 dní, u DH81 za 82 dní a linie F<sub>3</sub> 147 metala po 86 dnech. Doba metání byla zaznamenána v momentě, kdy polovina klasu byla venku z praporcového listu (Ivaničová *et al.*, 2016). Experiment byl rozdělen na dva pokusy (1a a 1b) lišících se chladovým působením (Tabulka 9).

**Tabulka 9:** Přehled použitých kultivarů a linií pro analýzu relativní exprese genu *VRN1* s jejich růstovým typem, genomem, typem alely genu *VRN1* a průměrnou dobou kvetení

Varieta	Růstový typ	Genom	Alela	Průměrná doba kvetení
<i>T. aestivum</i> kultivar Tähti	jařina	hexaploid	<i>Vrn-A1a</i>	79 dní
<i>T. aestivum</i> kultivar Mooni	jařina	hexaploid	<i>Vrn-A1a</i>	79,4 dní
linie DH81	jařina	hexaploid	<i>Vrn-A1-f-like</i>	82 dní
linie F <sub>3</sub> 147	jařina	hexaploid	<i>Vrn-A1-f-like</i>	86 dní
<i>T. militinae</i>	jařina	tetraploid	<i>Vrn-A1-f-like</i>	88 dní
<b>Experiment 1a</b>	Neernalizovaná sada rostlin			
<b>Experiment 1b</b>	Vernalizovaná sada rostlin			

V další části práce jsem se zabývala analýzou odrůd pšenic s genomem AAGG. Konkrétně se jedná o odrůdy patřící ke druhům *T. araraticum* a *T. timopheevi*. Druhá podkapitola se tak zabývá identifikací alely *Vrn-A1f-like* ve vybraných odrůdách tetraploidních pšenic. V rámci práce jsme se snažili najít polymorfizmy v genu, který kóduje protein VRN2, a které by tak mohly mít vliv na vznik jarního fenotypu u studovaných jařin, které nenesly alelu *Vrn-A1f-like*. Třetí podkapitola je tak věnována analýze polymorfizmů v genu kódující protein VRN2.



## 5.1 Analýza genové exprese

V rámci této podkapitoly byla studována exprese dvou alel genu *VRNI* v průběhu světelného režimu. Jednalo se o „standardní“ alelu *Vrn-A1a* a nedávno objevenou alelu *Vrn-A1f-like* (Ivaničová *et al.*, 2016). Důvodem studia změn relativních expresí v průběhu dne je doplnění informací o expresních profilech alel genu *VRNI* v krátkém časovém úseku. Zajímalo nás tedy, zda i v kratším časovém úseku dochází ke kolísání a změnám v hladinách relativních expresí.

Relativní exprese u jednotlivých vzorků byla stanovena pomocí kvantitativní *real-time* PCR. Byla analyzována hladina exprese v průběhu světelného režimu v podmínkách dlouhého dne. Experiment byl rozdělen na dvě části – 1a a 1b (Tabulka 9). Experiment 1b byl zařazen z důvodu zjištění, zdali existuje částečný vernalizační nárok u jarních odrůd a případného vlivu vernalizace na expresi. Pro každý časový bod byla analyzována exprese ve třech opakováních na vzorek a získané hodnoty byly zprůměrovány. Specifita produktu byla ověřena analýzou křivek teplot tání.

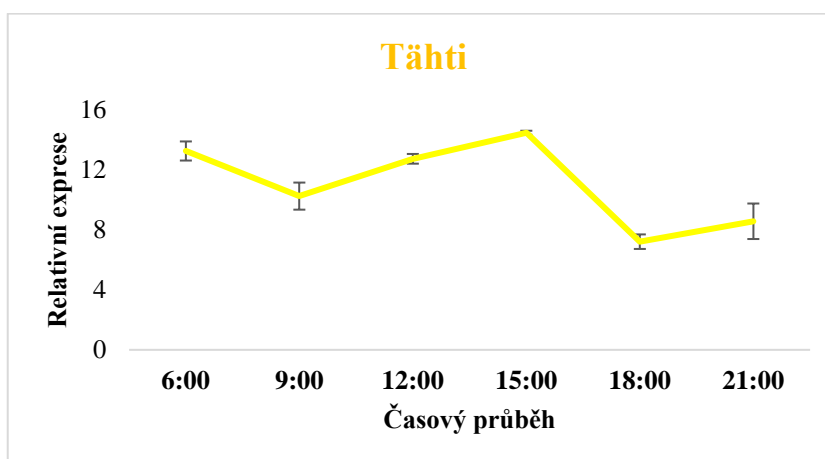
### 5.1.1 Nevernalizovaná sada

U této sady jsou přítomné expresní profily pro všechny výše zmíněné linie a kultivary. Z důvodu znehodnocení biologického materiálu jsme byli nuceni některé vzorky vyloučit z dalších analýz. Jako kontrolní vzorek byl použit nevernalizovaný vzorek linie DH81, který byl odebrán dvě hodiny po začátku světelného režimu.

#### Linie s alelou *Vrn-A1a*

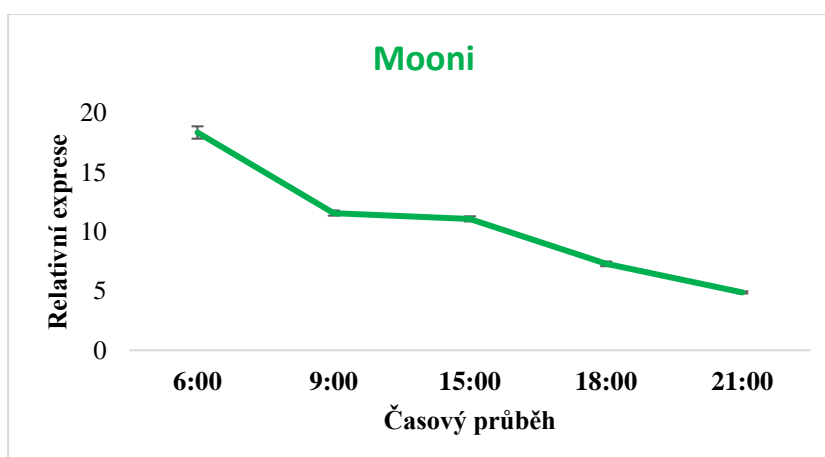
Alelu *Vrn-A1a* nesly kultivary Tähti a Mooni. U obou kultivarů byla pozorována změna exprese v průběhu světelného režimu. Exprese u kultivaru Tähti se v průběhu světelného režimu zvyšovala, kdy maxima dosáhla po jedenácti hodinách (15:00) (Graf 1). Naopak exprese u kultivaru Mooni postupně klesala (Graf 2). Pro kultivar Mooni nejsou dostupné hodnoty exprese pro všechny odběry. V průběhu experimentu byly znehodnoceny dva vzorky odebrané po dvou hodinách a jeden vzorek odebraný po pěti hodinách od začátku světelného režimu.

**Graf 1: Expresní profil alely *Vrn-A1a* u kultivaru Tähti**



Časový průběh exprese alely *Vrn-A1a* kultivaru Tähti pro nevernalizované rostliny. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

**Graf 2: Expresní profil alely *Vrn-A1a* u kultivaru Mooni**

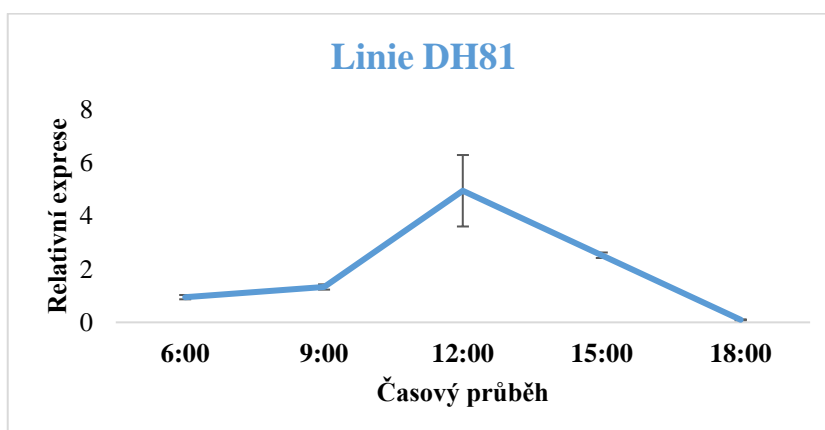


Časový průběh exprese alely *Vrn-A1a* kultivaru Mooni pro nevernalizované rostliny. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

### **Linie s alelou *Vrn-A1f-like***

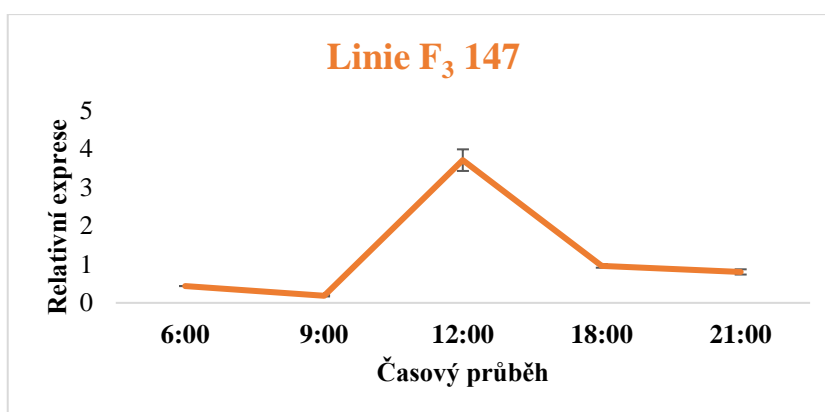
Alelu *Vrn-A1f-like* nesly linie DH81, F<sub>3</sub> 147 a *T. militinae*. U linie DH81 exprese v průběhu světelného režimu vzrůstala a maxima dosáhla po osmi hodinách (12:00) (Graf 3). U linie F<sub>3</sub> 147 byla nejvyšší exprese dosažena po osmi hodinách (12:00) (Graf 4). Pro kultivar *T. militinae* je průběh relativní exprese zaznamenán v Grafu 5.

**Graf 3: Expresní profil alely *Vrn-A1f-like* u linie DH8**



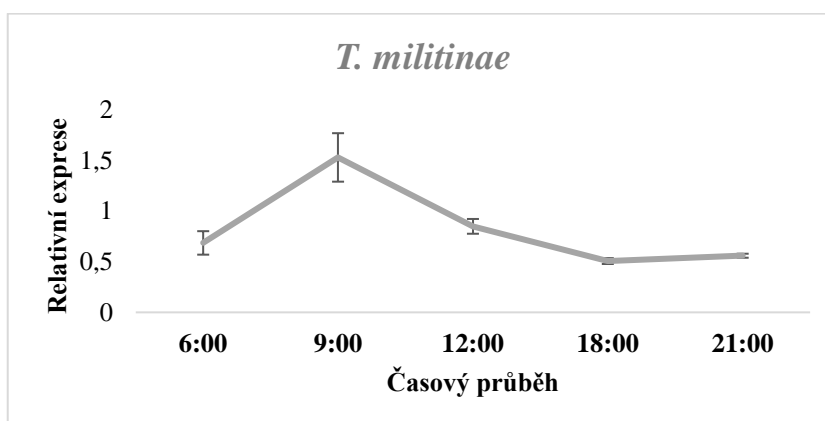
Časový průběh exprese alely *Vrn-A1f-like* linie DH81 pro nevernalizované rostliny. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

**Graf 4: Expresní profil alely *Vrn-A1f-like* u linie F<sub>3</sub> 147**



Časový průběh exprese alely *Vrn-A1f-like* linie F<sub>3</sub> 147 pro nevernalizované rostliny. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

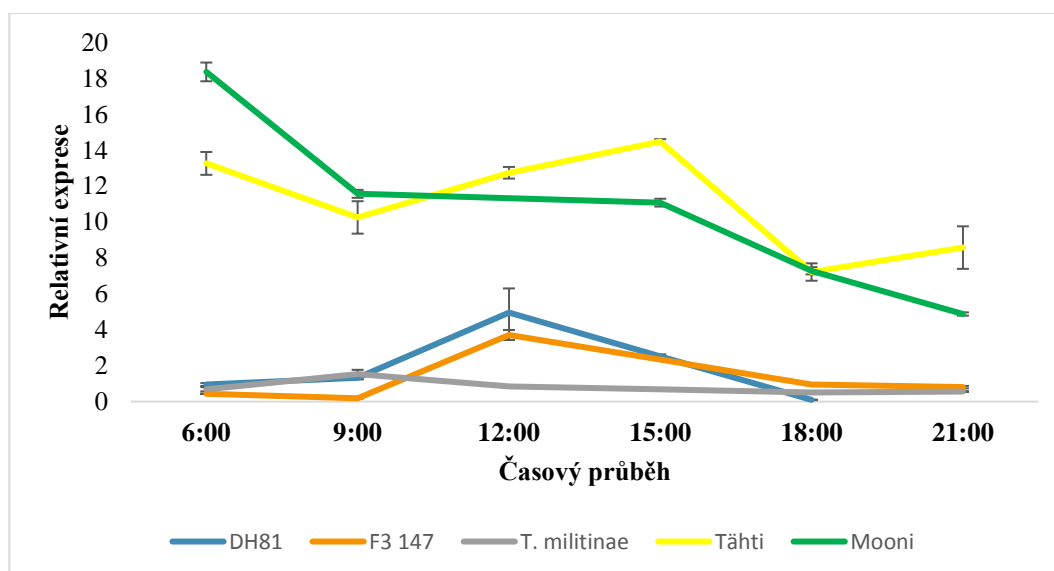
**Graf 5: Expresní profil alely *Vrn-A1f-like* u kultivaru *T. militinae***



Časový průběh exprese alely *Vrn-A1f-like* kultivaru *T. militinae* pro nevernalizovanou rostlinu. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

Pro nevernalizovanou sadu byl vytvořen souhrnný graf (Graf 6). Z grafu lze zjistit, že vzorky s alelou *Vrn-A1a*, které kvetly dříve, mají vyšší relativní expresi než vzorky s alelou *Vrn-A1f-like*, které kvetly později. U *T. militinae*, odkud původně alela *Vrn-A1f-like* pochází, je relativní exprese nižší, než exprese této alely u linie DH81 a F<sub>3</sub> 147 (Graf 6).

**Graf 6: Expresní profil alel *Vrn-A1a* a *Vrn-A1f-like* nevernalizované sady**



Časový průběh relativních expresí nevernalizované sady a jejich srovnání. Kultivary Tähti a Mooni nesou alelu *Vrn-A1a*. Linie DH81, F<sub>3</sub> 147 a *T. militinae* nesou alelu *Vrn-A1f-like*. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

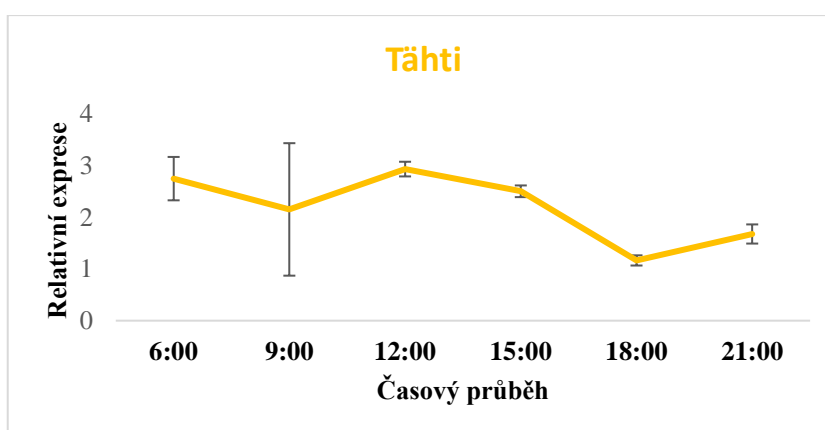
### 5.1.2 Vernalizovaná sada

Vernalizovány byly všechny kultivary a linie kromě *T. militinae*, a to z důvodu nízké klíčivosti semen. U všech linií byla pozorována změna relativní exprese genu *VRN1* v průběhu světelného režimu. Jako kontrolní vzorek byl použit vernalizovaný vzorek linie DH81 odebrán dvě hodiny po začátku světelného režimu.

#### Linie s alelou *Vrn-A1a*

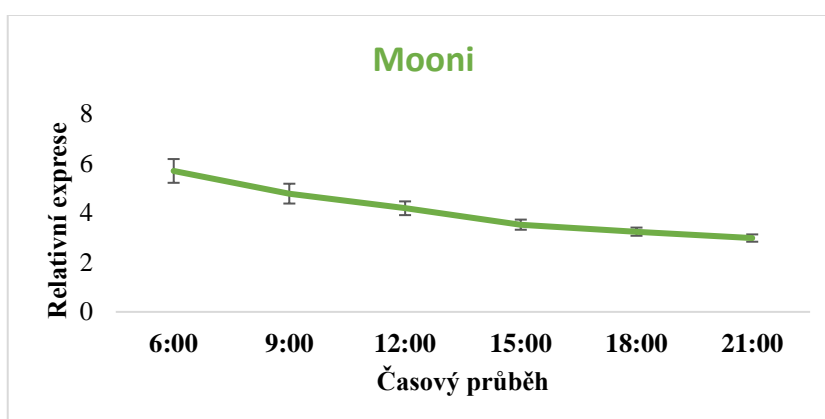
Relativní exprese alely *Vrn-A1a* u kultivaru Tähti po začátku světelného režimu rostla do svého maxima po osmi hodinách (12:00) (Graf 7). U kultivaru Mooni relativní exprese této alely v průběhu světelného režimu postupně klesala (Graf 8).

**Graf 7: Expresní profil alely *Vrn-A1a* u kultivaru Tähti**



Časový průběh exprese alely *Vrn-A1a* kultivaru Tähti pro vernalizované rostliny. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

**Graf 8: Expresní profil alely *Vrn-A1a* u kultivaru Mooni**

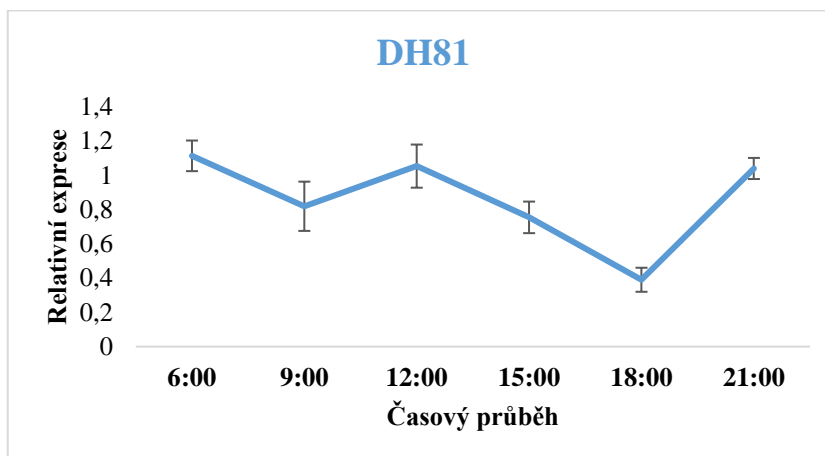


Časový průběh exprese alely *Vrn-A1a* kultivaru Mooni pro vernalizované rostliny. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

### Linie s alelou *Vrn-A1f-like*

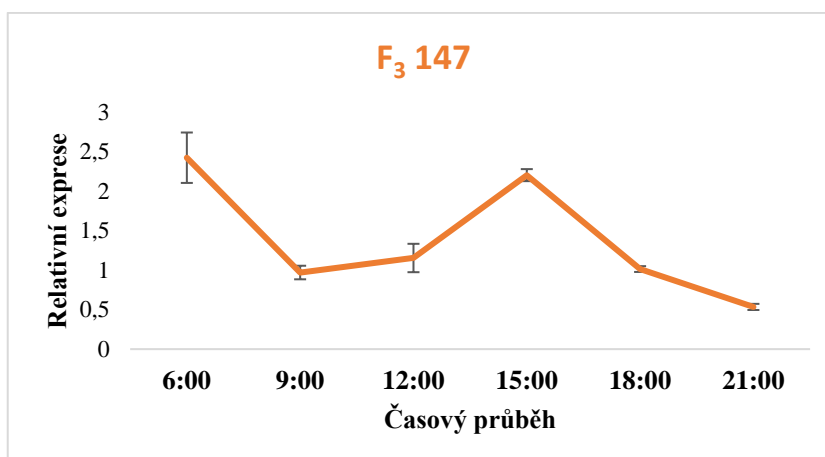
U linie DH81 relativní exprese v průběhu světelného režimu dosáhla svého maxima po osmi hodinách (12:00). Následně relativní exprese klesala a na konci světelného režimu stoupla (Graf 9). Linie F<sub>3</sub> 147 dosáhla nejvyšší hladiny exprese po dvou hodinách od začátku světelného režimu (6:00) a nejnižší po sedmnácti hodinách (21:00) (Graf 10).

**Graf 9: Expresní profil alely *Vrn-A1f-like* u linie DH81**



Časový průběh exprese alely *Vrn-A1f-like* linie DH81 pro vernalizované rostliny. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

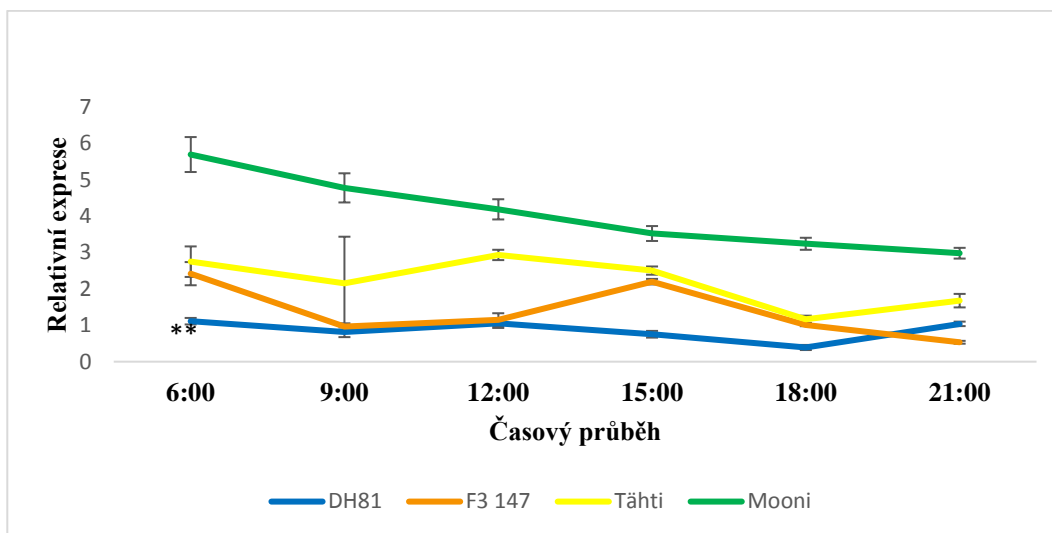
**Graf 10: Expresní profil alely *Vrn-A1f-like* u linie F<sub>3</sub> 147**



Časový průběh exprese alely *Vrn-A1f-like* linie F<sub>3</sub> 147 pro vernalizované rostliny. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

Linie DH81 a F<sub>3</sub> 147 s alelou *Vrn-Alf-like* kvetly později než kultivary Mooni a Tähti nesoucí alelu *Vrn-A1a*. Na souhrnném grafu pro vernalizovanou sadu rostlin (Graf 11) lze vidět, že hladina relativní exprese linií s *Vrn-Alf-like* je opět nižší, než exprese linií s alelou *Vrn-A1a*.

**Graf 11: Expresní profil alel *Vrn-A1a* a *Vrn-Alf-like* vernalizované sady**

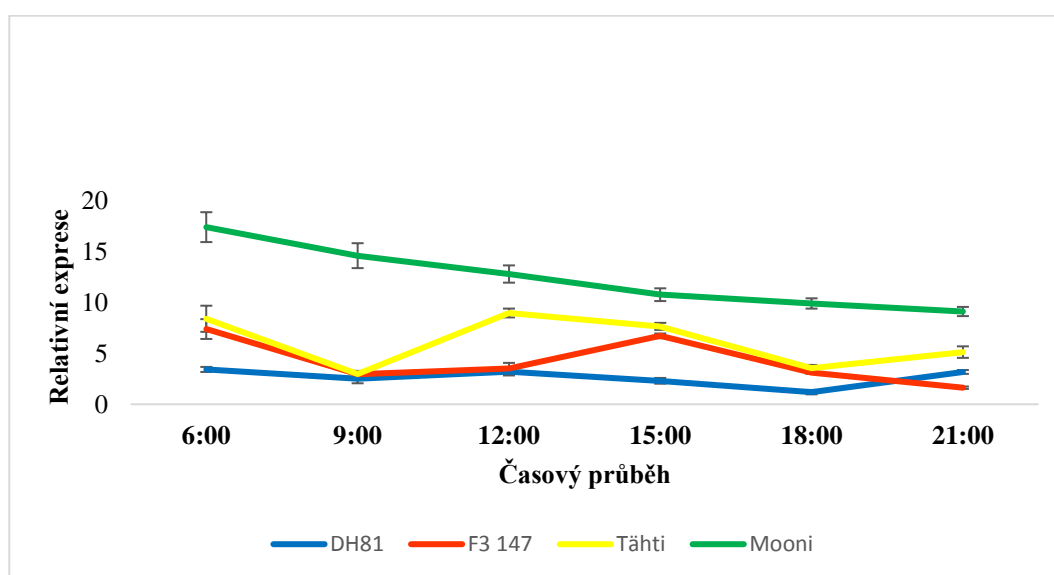


Časový průběh relativních expresí vernalizované sady a jejich srovnání s kontrolním vzorkem DH81\_V\_6:00. Linie DH81 a F<sub>3</sub> 147 nesou alelu *Vrn-Alf-like*. Kultivary Tähti a Mooni nesou alelu *Vrn-A1a*. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

### 5.1.3 Srovnání expresí vernalizované a neernalizované sady

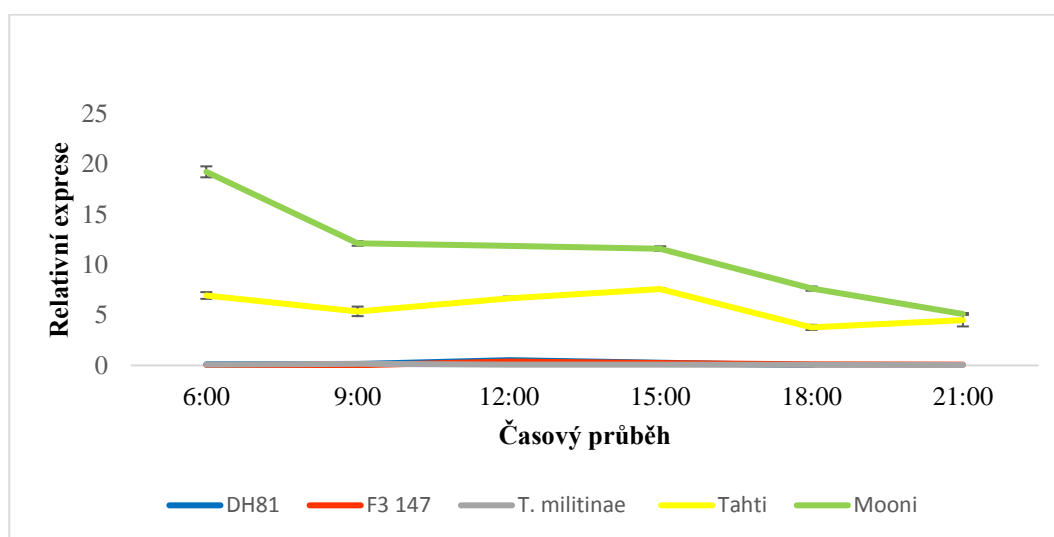
Analýza genové exprese byla provedena pro obě sady s kontrolou, která byla odebrána po čtrnácti hodinách od začátku světelného režimu (18:00). Jednalo se o vernalizovanou linii DH81. Graf 12 srovnává relativní expresi vernalizovaných rostlin. Rostliny nesoucí alelu *Vrn-A1a* mají vyšší expresi než rostliny s alelou *Vrn-Alf-like*. Graf 13 porovnává hladiny relativních expresí neernalizovaných rostlin nesoucích alelu *Vrn-A1a*. Graf 14 porovnává hladiny relativních expresí neernalizovaných rostlin nesoucích alelu *Vrn-Alf-like*. Neernalizované rostliny s alelou *Vrn-A1a* mají hladinu relativní exprese vyšší než ty s alelou *Vrn-Alf-like*.

**Graf 12: Expresní profil alel *Vrn-A1a* a *Vrn-A1f-like* vernalizované sady**



Časový průběh relativních expresí vernalizované sady a jejich srovnání s kontrolním vzorkem DH81\_V\_18:00. Linie DH81 a F<sub>3</sub> 147 nesou alelu *Vrn-A1f-like*. Kultivary Tähti a Mooni nesou alelu *Vrn-A1a*. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

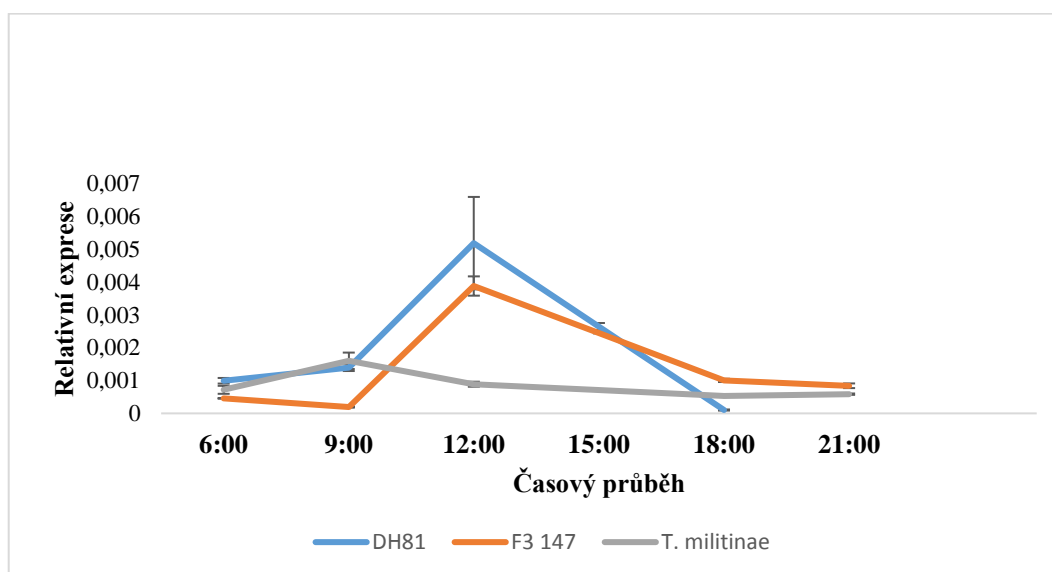
**Graf 13: Expresní profil alel *Vrn-A1a* a *Vrn-A1f-like* neernalizované sady:**



Časový průběh relativních expresí alel *Vrn-A1a* a *Vrn-A1f-like* neernalizované sady a jejich srovnání s kontrolním vzorkem DH81\_V\_18:00. Z důvodu nižších hladin expresí pro linie DH81, F<sub>3</sub> 147 a *T. militinae* a daného rozlišení grafu, nejsou tyto linie vidět, a proto jsou uvedené v Grafu 15. Linie DH81, F<sub>3</sub> 147 a *T. militinae* nesou alelu *Vrn-A1f-like*. Kultivary Tähti a Mooni nesou alelu *Vrn-A1a*. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).



**Graf 14: Expresní profil alely *Vrn-Alf-like* nevernalizované sady:**

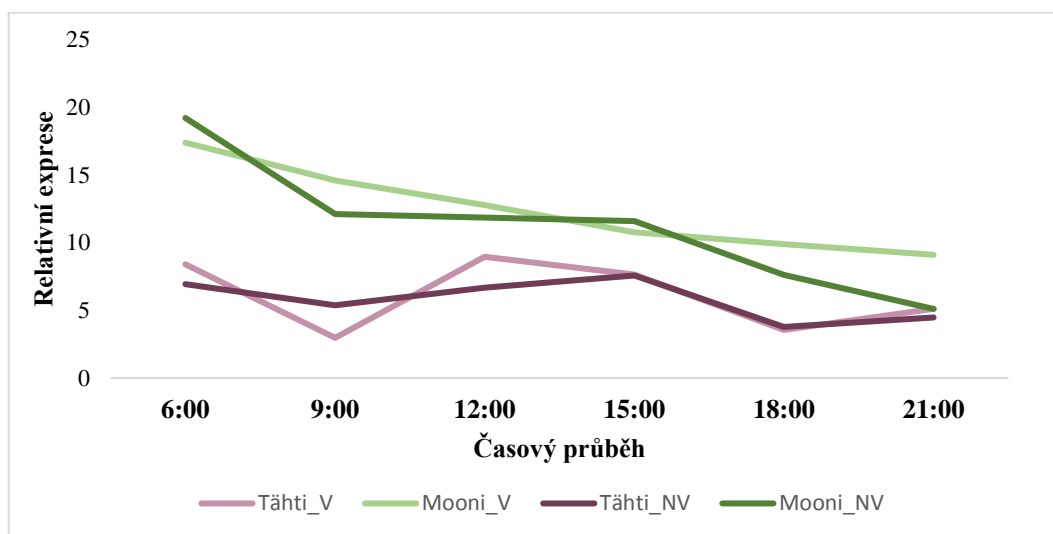


Časový průběh relativních expresí alely *Vrn-Alf-like* vernalizovaných linií DH81, F<sub>3</sub> 147 a *T. militinae* a jejich srovnání s kontrolním vzorkem DH81\_V\_18:00. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

V případě alely *Vrn-Ala* u kultivarů Tähti a Mooni nebyly pozorovány signifikantní změny v hladině relativních expresí mezi vernalizovanou a nevernalizovanou sadou (Graf 15). U alely *Vrn-Alf-like* byly hladiny relativních expresí vyšší u vernalizované sady v porovnání s nevernalizovanou sadou mezi studovanými rostlinami (Graf 16).

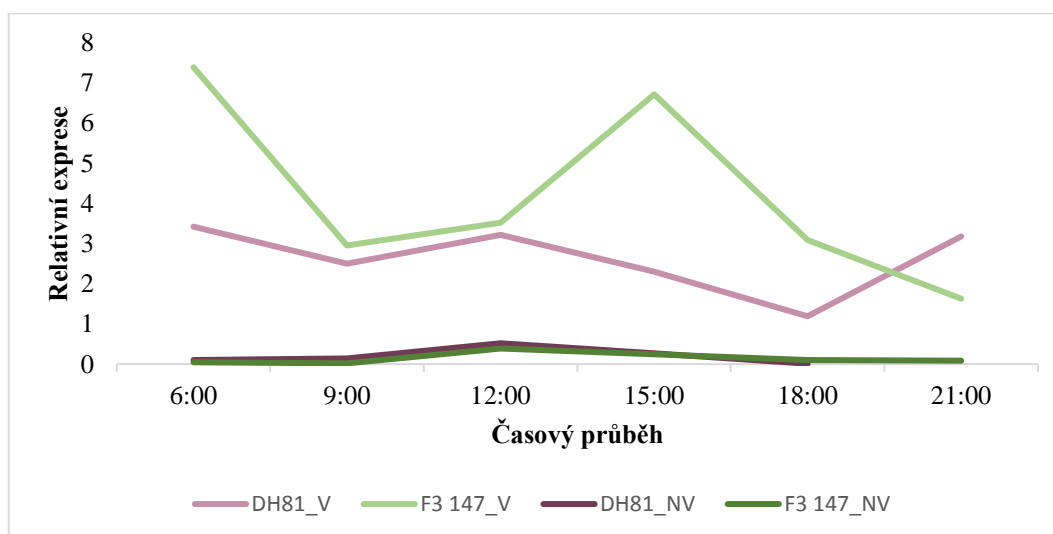
V rámci expresní analýzy jsme zjistili, že exprese alely *Vrn-Ala* je vyšší u vernalizovaných i nevernalizovaných rostlin v porovnání s alelou *Vrn-Alf-like*. Proto rostliny nesoucí alelu *Vrn-Ala* zřejmě kvetou dříve. U obou studovaných alel byla pozorovaná změna exprese v průběhu světelného režimu, a to v podmínkách vernalizace i bez ní.

**Graf 15: Expresní profil alely *Vrn-A1a* vernalizované a nevernalizované sady**



Srovnání hladin relativních expresí alely *Vrn-A1a* u nevernalizované a vernalizované sady kultivarů Tähti a Mooni s kontrolním vzorkem DH81\_V\_18:00. V případě označení „V“ se jedná o vernalizovaný kultivar, označení „NV“ představuje nevernalizovaný kultivar. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

**Graf 16: Expresní profil alely *Vrn-A1f-like* vernalizované a nevernalizované sady**



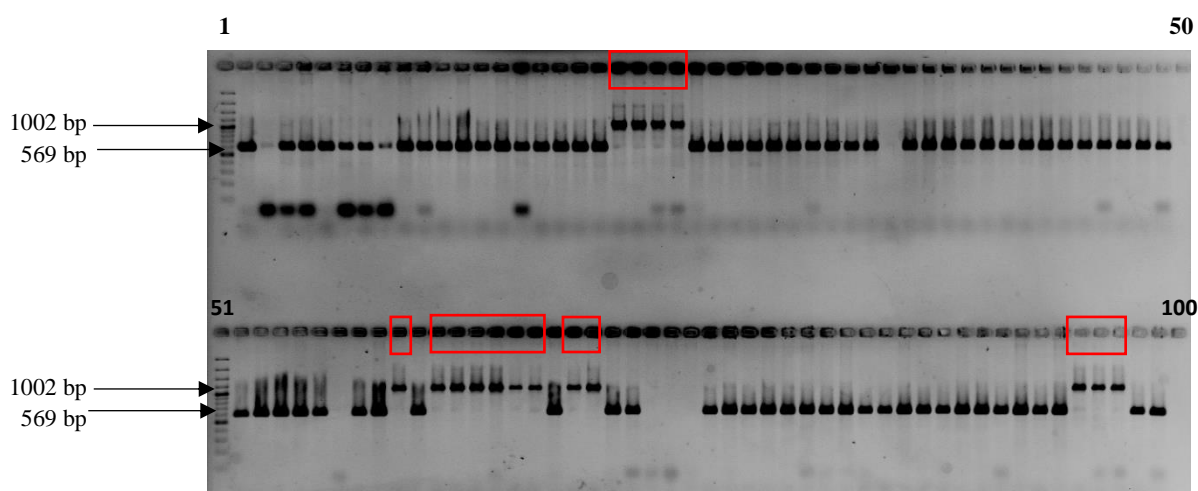
Srovnání hladin relativních expresí alely *Vrn-A1f-like* u nevernalizované a vernalizované sady linií DH81 a F3 147 s kontrolním vzorkem DH81\_V\_18:00. V případě označení „V“ se jedná o vernalizovanou linii, označení „NV“ představuje nevernalizovanou linii. Na ose x jsou uvedeny reálné časy jednotlivých sběrů vzorků, kdy první sběr byl proveden dvě hodiny po začátku světelného režimu (6:00).

## 5.2 Identifikace alely *Vrn-A1f-like* u vybraných pšenic s genomem AAGG

U analyzovaných rostlin s genomem AAGG byla nejprve zjištěna přítomnost či nepřítomnost alely *Vrn-A1f-like*. Pro genotypování těchto položek byly použity celkem tři

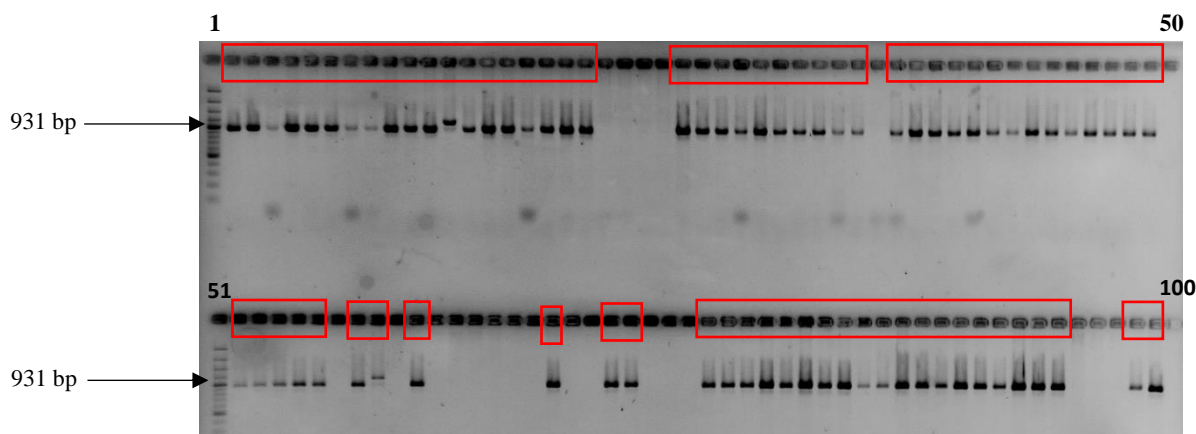
sady primerů, které byly převzaty z publikace Ivaničová *et al.* (2016). Marker *VRNA1\_F3R3* byl navržen pro zjištění inserce MITE transpozónu o velikosti 433 bp, který se nachází u alely *Vrn-A1f-like* (Obrázek 6). V případě alely *Vrn-A1f-like* byla očekávaná velikost produktu 1002 bp. Inzerce této alely se nacházela pouze u jarních odrůd. U ozimů detekována nebyla. Primerový pár *VRNA1\_F6R6* detekuje recesivní alelu *vrn-A1*. V případě, že daná odrůda byla nositelkou této alely, byl detekován band o příslušné velikosti, a to 931 bp (Obrázek 7). Posledním využitým markerem byl *VRNA1\_F6R9a*. Jedná se o dominantní marker, který se amplifikuje u odrůd s alelou *Vrn-A1f-like*. Byl detekován band o velikosti 567 bp (Obrázek 8). Na základě kombinace výše popsaných markerů jsme byli schopni identifikovat, které odrůdy nesou alelu *Vrn-A1f-like*. Dalším účelem bylo případné nalezení linie, která by obsahovala pouze inserci transpozónu MITE nebo jen delecí, abychom zjistili, zda jařiny potřebují oba charakteristické znaky pro alelu *Vrn-A1f-like*. Následně jsme porovnávali, zda odrůdy nesoucí alelu *Vrn-A1f-like*, jsou skutečně všechny jařiny. Na základě informací z genových bank, fenotypu a určeného genotypu jsme zjistili, že některé odrůdy jsou jařiny, aniž by nesly alelu *Vrn-A1f-like* (Tabulka 10). Proto byla následně provedena sekvenační analýza genů kódujících protein *VRN2*, a to z důvodu zjištění případných polymorfizmů, které by mohly mít na vznik jarního fenotypu.

**Obrázek 6:** Identifikace přítomnosti alely *Vrn-A1f-like* ve vybraných TRI a PI odrůdách pšenice pomocí kodominantního markeru *VRNA1\_F3R3*



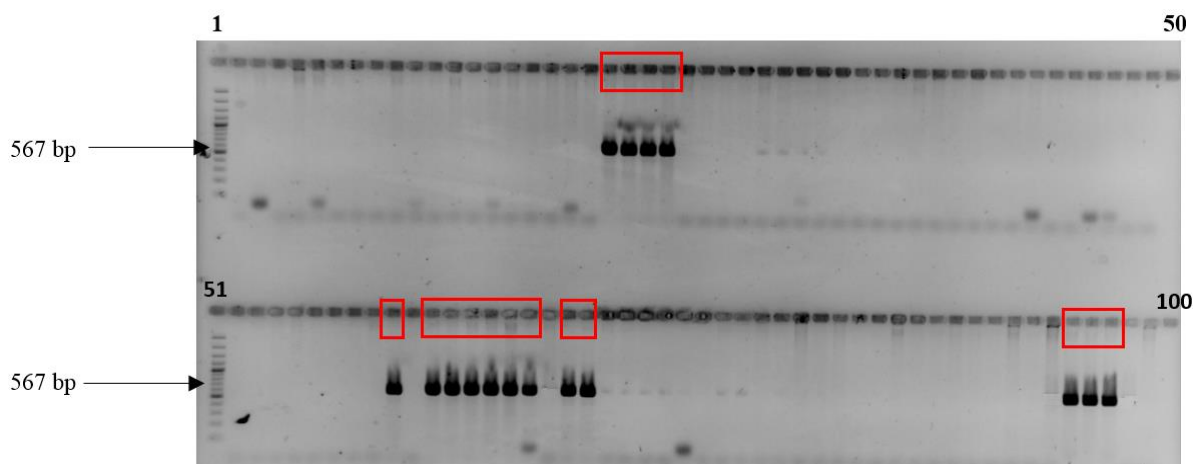
Dráhy č. 1 a 51 obsahují velikostní marker GeneRuler 100 bp. Mezi dráhami č. 1 a 50 jsou nanesené vzorky v pořadí dle Tabulky 2. Mezi dráhami č. 51 a 100 jsou nanesené vzorky v pořadí dle Tabulky 2 a 3. Dráhy označené červeným obdélníkem obsahují vzorky nesoucí alelu *Vrn-A1f-like*.

**Obrázek 7:** Identifikace přítomnosti alely *vrn-A1* ve vybraných TRI a PI odrůdách pšenice pomocí dominantního markeru *VRNA1\_F6R6*



Dráhy č. 1 a 51 obsahují velikostní marker GeneRuler 100 bp. Mezi dráhami č. 1 a 50 jsou nanesené vzorky v pořadí dle Tabulky 2. Mezi dráhami č. 51 a 100 jsou nanesené vzorky v pořadí dle Tabulky 2 a 3. Dráhy, ve kterých byl detekován produkt o velikosti 931 bp, obsahují vzorky s recesivní alelou *vrn-A1* – označení červeným obdélníkem.

**Obrázek 8:** Identifikace přítomnosti alely *Vrn-A1f-like* ve vybraných TRI a PI odrůdách pšenice pomocí dominantního markeru *VRNA1\_F6R9a*



Dráhy č. 1 a 51 obsahují velikostní marker GeneRuler 100 bp. Mezi dráhami č. 1 a 50 jsou nanesené vzorky v pořadí dle Tabulky 2. Mezi dráhami č. 51 a 100 jsou nanesené vzorky v pořadí dle Tabulky 2 a 3. Dráhy, ve kterých byl detekován produkt o velikosti 567 bp, obsahují vzorky s alelou *Vrn-A1f-like* – označení červeným obdélníkem.

V rámci genotypové analýzy tak bylo zjištěno, že z 93 linií neslo recesivní alelu *vrn-A1* celkem 76 % linií a dle fenotypové analýzy se jednalo o ozimy. Dominantní alela *Vrn-A1f-like* byla identifikována u 17 % linií, které dle fenotypu patřily mezi jařiny (shrnutí v Tabulce 10). U pěti linií však nebyla identifikována dominantní alela *Vrn-A1f-like*, ale dle fenotypu jsou tyto položky zařazeny mezi jařiny (Tabulka 10). Následně tak byla provedena sekvenační analýza genů kódujících protein VRN2

**Tabulka 10:** Přehled analyzovaných položek s identifikovanými alelami a fenotypem

<b>Položka</b>	<b>Fenotyp</b>	<b>Alela</b>	<b>Položka</b>	<b>Fenotyp</b>	<b>Alela</b>
TRI 11345	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 18517	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 11354	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 18518	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 11356	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 18522	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 11358	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 18534	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 11361	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 18535	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 11362	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 18537	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 11363	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 18538	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 11364	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 18540	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 11365	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 19075	jařina	<i>vrn-A1</i>
TRI 11366	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 28646	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 11367	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 29358	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 11506	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 3407	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 11507	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 3433	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 11508	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 4349	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 11509	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 4362	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 11564	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 5352	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 11939	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 677	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 11945	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 6912	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 11947	ozim	<i>vrn-A1</i>	TRI 7272	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 12751	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>	TRI 7301	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 13159	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>	TRI 7388	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 13604	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>	TRI 7389	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 13606	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>	PI 538464	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 14269	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538470	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 16597	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538472	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 16598	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538473	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 16599	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538474	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 16600	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538475	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 16602	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538476	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 17028	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538477	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 17216	jařina	<i>vrn-A1</i>	PI 538484	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 17218	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538485	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 17220	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538496	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 18469	-	-	PI 538497	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 18470	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538498	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 18471	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538504	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 18472	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538505	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 18473	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538506	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 18474	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538507	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 18476	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 538512	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 18483	jařina	<i>vrn-A1</i>	PI 538516	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 18509	jařina	<i>vrn-A1</i>	PI 542472	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 18510	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 572916	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 18511	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 572917	jařina	<i>Vrn-A1f-like</i>
TRI 18513	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 596290	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 18514	ozim	<i>vrn-A1</i>	PI 654340	ozim	<i>vrn-A1</i>
TRI 18515	jařina	<i>vrn-A1</i>			

Zeleně jsou vyznačené položky patřící k *T. araraticum*. Modře jsou položky patřící k *T. timopheevii*. Žlutě označené buňky obsahují položky patřící mezi jařiny bez identifikace alely *Vrn-A1f-like*.

### 5.3 Analýza polymorfizmů genů kódujících protein VRN2 u vybraných pšenic s genomem AAGG

V rámci podkapitoly 5.2 jsme zjistili, že některé z analyzovaných odrůd patří mezi jařiny, aniž by nesly dominantní alelu *Vrn-A1f-like*. Proto jsme se v rámci této podkapitoly zabývali hledáním polymorfizmů genů, které kódují protein VRN2, u různých pšenic s genomem AAGG. Analyzovalo se celkem 93 vzorků patřících do *T. araraticum*, respektive *T. timopheevii*.

Byla sekvenována oblast genu *VRN2*. Jak již bylo zmíněno v literární rešerši, tak lokus genu *VRN2* zahrnuje dva tandemově se opakující geny – *ZCCT1* a *ZCCT2*. Byla tak sekvenována oblast domény *ZCCT1* (exon 1) a *ZCCT2* (exon 1, 2). Získané sekvence byly porovnány se sekvencí *T. turgidum* cv. Langdon (GenBank: AY485979.1) v programu Geneious 5.6.4 a zarovnány byly pomocí algoritmu MUSCLE.

V sekvenci prvního exonu domény *ZCCT1* nebyly nalezeny žádné polymorfizmy.

V sekvenci prvního exonu domény *ZCCT2* byla identifikována inserce o velikosti 12 bp. Inserce nenarušovala čtecí rámec a nacházela se v oblasti 190 bp. Ve výsledném proteinu se inserce 12 bp odrazila jako inserce 4 aminokyselin – Thr-Thr-Ala-Ala. Dále u vzorků, které obsahovaly výše zmíněnou inserci, se nacházel polymorfizmus na pozici 165 bp, kde se místo guaninu nacházel adenin (CGA → CGG), čímž došlo ke změně aminokyseliny (Ser → Pro) (Obrázek 9). Výše popsaná změna byla identifikována celkem u čtyř vzorků TRI – 18483, 18522, 18534 a 18535. Vzorek TRI 18483 je řazen mezi jařiny, ale jeho jarní fenotyp není způsoben přítomností alely *Vrn-A1f-like*. Vzorek TRI 18522 je řazen mezi ozimy. Tato skutečnost byla potvrzena i fenotypovou a genotypovou analýzou. Vzorek TRI 18534 je v genové bance zařazen mezi jarní odrůdy. Nicméně fenotypová a genotypová analýza odhalila, že je to ozimá odrůda. A poslední vzorek – TRI 18535 – patří taktéž mezi ozimy.

V sekvenci exonu 2 v doméně *ZCCT2* byly identifikovány tři substituce v pozicích 359, 402 a 443 bp (Obrázek 10). Substituce v pozici 359 bp se nacházela pouze u jednoho vzorku. Jednalo se o TRI 19075, který patří mezi jařiny. Došlo ke změně aminokyseliny (Asp → Gly). Substituce v pozici 402 bp byla synonymní (CTC → CTT), kdy nedošlo ke změně aminokyseliny. Tato substituce byla identifikována u 23 vzorků. U substituce na pozici 443 bp byl cytosin nahrazen adeninem (GAC → GCC) a došlo tak ke změně

aminokyseliny (Ala → Asp). Tato substituce byla identifikována také u 23 vzorků. Všechny vzorky s touto substitucí obsahovaly i výše zmíněnou synonymní substituci.

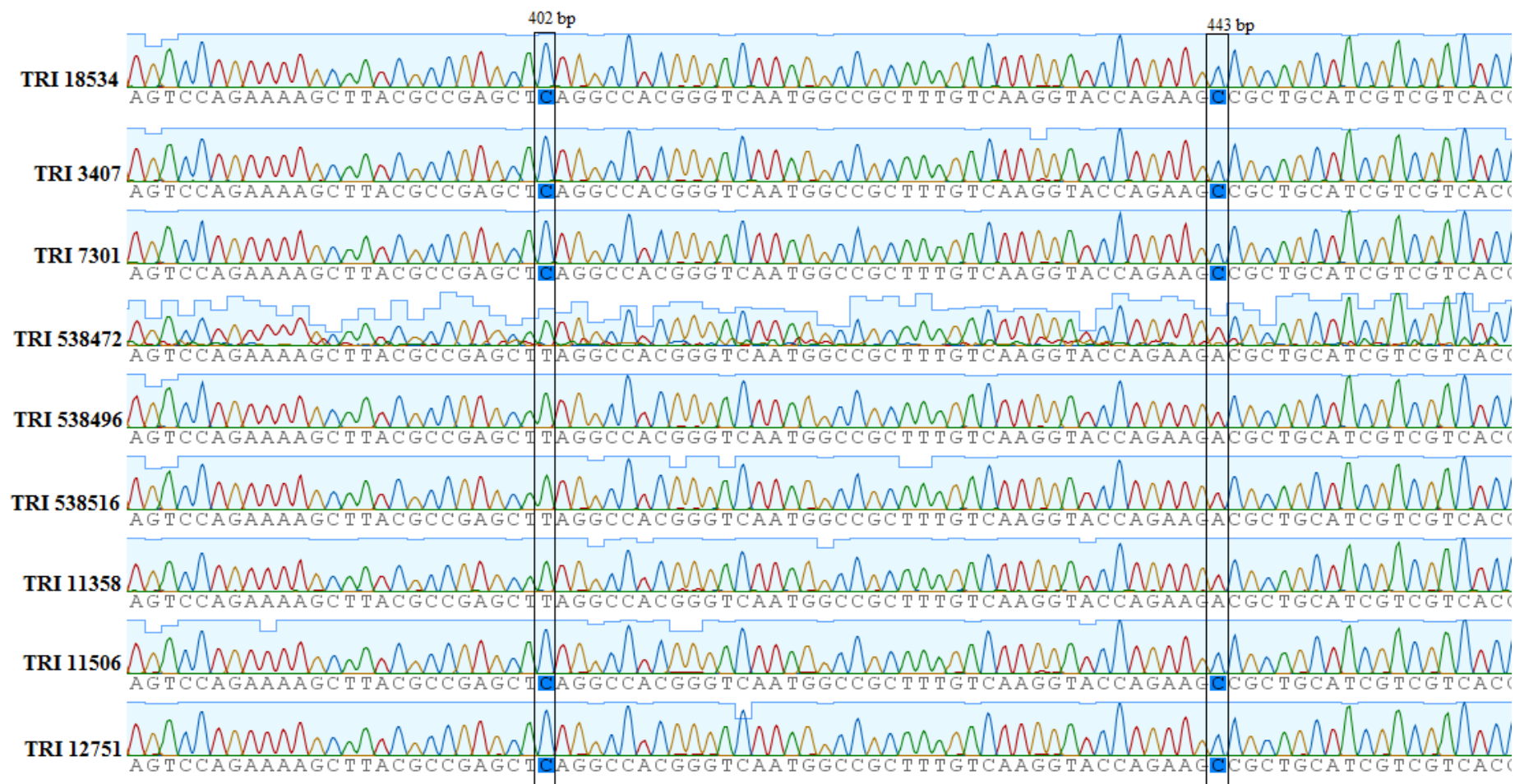
Nebyly nalezeny žádné polymorfizmy, které by se nacházely pouze u vzorků, u kterých nebyla identifikována alela *Vrn-Alf-like* a patřily mezi jařiny. Tudiž se nám nepovedlo identifikovat polymorfizmy, které by mohly mít podíl na vzniku jarních odrůd, které nenesly alelu *Vrn-Alf-like*.

**Obrázek 9:** Část domény *ZCCT2* (exon 1) s 12 bp inzercí a jedno nukleotidovým polymorfizmem u vybraných TRI linií (místa se substitucí a inzercí jsou vyznačena černým obdélníkem)





**Obrázek 10:** Část domény *ZCCT2* (exon 2) s dvěma jedno nukleotidovými polymorfizmy v pozicích 402 a 443 bp u vybraných TRI linií (místa, kde se substituce nachází, jsou vyznačena černým obdélníkem)



## 6 DISKUZE

Pšenice je během jejího vývinu ovlivňována různými podmínkami vnějšího prostředí. Pšenice má komplexní genom, který ji umožnil vytvořit nejrůznější regulační mechanismy, a tedy se adaptovat na stále se měnící podmínky prostředí. Jedním z nich je regulace doby kvetení, která je pro pšenici důležitá z hlediska jejího reprodukčního úspěchu. Do procesu kvetení je zapojeno velké množství genů, které vytvářejí navzájem propojené regulační dráhy. Zdrojem genetické variability a plasticity v době kvetení u pšenice jsou především alelické variace ve vernalizačních (*VRN*) a fotoperiodických (*PPD*) genech. Variabilita ve zmíněných genech je často způsobena různým počtem kopií těchto genů nebo mutacemi v regulačních elementech či kódujících oblastech (Yan *et al.*, 2004a; Fu *et al.*, 2005).

Vznik mutace genu *VRN1* u dominantních alel je zodpovědná za vznik jarního růstového typu pšenic. Přítomnost různých dominantních alel tohoto genu je zároveň zodpovědná za rozdíly v době kvetení jařin. Jednotlivé alely se liší mutacemi v promotorové oblasti nebo v oblasti prvního intronu (Dubcovsky *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2004a; Golovnina *et al.*, 2010; Milec *et al.*, 2012).

V rámci diplomové práce byl analyzován expresní profil u rostlin nesoucích alelu *Vrn-A1a* nebo *Vrn-A1f-like* v průběhu světelné části dne u vybraných kultivarů a linií hexaploidní a tetraploidní pšenice. Kultivary Tähti a Mooni nesly alelu *Vrn-A1a*. *T. militinae*, linie DH81 a F<sub>3</sub> 147 nesly alelu *Vrn-A1f-like*. Tyto dvě alely se liší na sekvenční úrovni v oblasti promotoru a prvního intronu. Alela *Vrn-A1a* obsahuje inzerci repetitivního elementu SFE v promotorové oblasti (Yan *et al.*, 2004a). Naopak u alely *Vrn-A1f-like* tato inzerce identifikována nebyla. Dále byly u alely *Vrn-A1f-like* identifikovány rozdíly v prvním intronu. V této oblasti byla detekována inzerce MITE transpozónu a delece o velikosti 2 753 bp (Ivaničová *et al.*, 2016). Kromě rozdílů na sekvenční úrovni tyto alely vykazují odlišný fenotypový projev v době kvetení. Rostliny s alelou *Vrn-A1a* kvetou dříve než ty, které nesou alelu *Vrn-A1f-like* (Ivaničová *et al.*, 2016).

Pro experiment byly použité dvě sady rostlin – nevernalizované (experiment 1a) a vernalizované (experiment 1b). U všech vybraných kultivarů a linií v obou částech experimentu byla pozorována změna exprese v průběhu světelného režimu (Grafy 1-5, 7-10). Studie Shimada *et al.* (2009) provedla expresní analýzu genu *VRN1* v listech v podmínkách dlouhého i krátkého dne u jarního kultivaru pšenice Triple Dirk ve vývojovém

stádiu tří listů. Také detekovali změnu exprese ve světelné části dne, a to v podmínkách dlouhého i krátkého dne. Expres v jejich případě dosáhla svého vrcholu na začátku světelného režimu, a to v devět hodin ráno pro dlouhý den, respektive v jedenáct hodin ráno pro krátký den. Podobný čas vrcholu exprese byl pozorován u nevernalizovaných rostlin s alelou *Vrn-A1a*. V další části exprese v rozmezí 9:00-15:00 však u kultivaru Tähti došlo v průběhu dne k mírnému nárůstu hladiny relativní exprese. V případě kultivaru Mooni relativní exprese pouze klesala. Jediný tento kultivar vykazuje odlišnou změnu expresního profilu od ostatních linií a kultivaru. U rostlin s alelou *Vrn-Alf-like* byl vrchol exprese dosažen až později v průběhu světelného režimu, kdy v případě linií DH81 a F<sub>3</sub> 147 to bylo po osmi hodinách od začátku světelného režimu. U *T. militinae* byl vrchol dosažen dříve, a to po pěti hodinách. Zmíněné rozdíly mezi studovanými alelami mohou být například způsobeny rozdíly v sekvenci těchto alel nebo genetickým pozadím daného kultivaru, linie. Inzerce transpozónu MITE může mít vliv na sekundární strukturu, a tím i vést ke zpoždění exprese, čímž dojde k akumulaci příslušné mRNA o něco později v průběhu dne. Na základě toho, že exprese je nejvyšší na začátku světelné části dne, Shimada *et al.* (2009) navrhuje, že exprese *VRN1* je řízena cyklem světlo – tma. Naše výsledky však poukazují na to, že vrchol exprese může nastat i v pozdějších hodinách. Rozdíl může být způsoben odlišností mezi sekvencemi studovaných alel.

V případě vernalizovaných rostlin u kultivarů Tähti a Mooni (alela *Vrn-A1a*) byl průběh relativní exprese podobný s nevernalizovanou sadou. Jediný rozdíl byl pozorován u kultivaru Tähti, kdy u vernalizovaných rostlin (Graf 7) byl dosažen vrchol relativní exprese dříve, než u nevernalizovaných rostlin (Graf 1). V případně vernalizované linie DH81 byl vrchol exprese dosažen na začátku světelného režimu. To koreluje se studií Shimada *et al.* (2009). Nicméně v porovnání s nevernalizovanou sadou je průběh relativních expresí vernalizované sady linie DH81 během světelného režimu odlišný, a je možné, že vernalizace mohla mít vliv na expresi zmíněné alely, a tím i na její průběh. U linie F<sub>3</sub> 147 byl rozdíl v průběhu dne také pozorován. Vernalizovaná linie dosáhla svého maxima relativní exprese později než nevernalizovaná linie. U obou linií nebylo dosaženo vrcholu na začátku světelného režimu, jak tomu bylo ve studii Shimada *et al.* (2009), ale později. V případě linie DH81 byl vrchol dosažen po osmi hodinách od začátku světelného režimu (12:00). Linie F<sub>3</sub> 147 měla vrchol relativní exprese po jedenácti hodinách od začátku světelného režimu (15:00). Na rozdílný průběh hladin relativních expresí mohl mít vliv vernalizační proces.

Ze souhrnného grafu nevernalizované sady (Graf 6) je vidět, že vzorky s alelou *Vrn-A1a* mají vyšší relativní expresi než vzorky s alelou *Vrn-Alf-like*. To je pravděpodobně důvod, proč rostliny s alelou *Vrn-A1a* kvetou dříve. Důvodem pozorovaného rozdílu může být to, že v rámci experimentu 1a byly veškeré vzorky odebírány ve stejnou dobu, a to po šesti týdnech od jejich vysazení. U vzorků s alelou *Vrn-Alf-like* zřejmě nebyla v tuto dobu vysoká hladina exprese a je možné, že v případě pozdějšího sběru listů by hodnoty relativních expresí byly již vyšší, a rozdíl mezi různými alelami by nebyl tak velký.

Jarní odrůdy pšenice obecně nemají požadavek na vernalizaci, ale některé kultivary mohou reagovat na nízkou teplotu např. dřívějším kvetením (Levy *et* Peterson, 1972; Iqbal *et al.*, 2006). První zmínky vlivu vernalizace na jarní odrůdy pšenice pochází již z roku 1972. Levy *et* Peterson (1972) studovali vliv vernalizace a fotoperiody na dobu kvetení či počet listů. Některé jarní odrůdy reagovaly na vernalizační proces snížením počtu listů, i když pozorované rozdíly byly malé. Rostliny byly vernalizovány v rozmezí jednoho až sedmi týdnů. Se vzrůstající dobou působení vernalizace byla doba kvetení urychlována.

U vernalizovaných rostlin byla také hladina relativní exprese alely *Vrn-A1a* vyšší, než u alely *Vrn-Alf-like*. Nicméně rozdíly v relativních expresích mezi studovanými alelami nejsou tak vysoké (Graf 11). Možným vysvětlením je, že vernalizační proces mohl mít vliv na aktivaci exprese, čímž došlo k vyrovnání expresí vernalizovaných rostlin oproti nevernalizovaným. Druhým důvodem může být, že vernalizace mohla inhibovat expresi alely *Vrn-A1a* u kultivarů Mooni a Tähti.

Geny zapojené do procesu vernalizace nepřímo přispívají ke zlepšení výnosů a kvalitě obilek tím, že ovlivňují dobu kvetení či počet klasů. I když jarní odrůdy pšenice vernalizační proces nevyžadují pro přechod do reprodukční fáze, existují studie, které prokázaly efekt vernalizace na kvetení těchto pšenic. Příkladem je studie Iqbal *et al.* (2011), která zkoumala vliv vernalizace na plnění obilek a jejich hmotnosti u pěti jarních kultivarů. Tyto kultivary se lišily v reakci na vernalizační proces (Iqbal *et al.*, 2006). Iqbal *et al.* (2011) pozorovali, že vernalizace měla vliv na plnění obilek u odrůdy citlivé na vernalizaci, tak i u odrůdy necitlivé na vernalizaci. Je však možné, že se jedná pouze o shodu okolností a vernalizace na tento proces nemusí mít vůbec žádný vliv, a jsou do tohoto procesu zapojeny jiné mechanismy. Kromě plnění obilek pozorovali i změny v jejich hmotnosti. V rámci studie byly použity dvě odrůdy, které byly citlivé vůči vernalizaci. U jedné odrůdy byla změna hmotnosti zrn pozorována, zatímco u druhé nikoliv. To potvrzuje předešlou

domněnku, že vernalizace může mít vliv na tento proces. Vernalizace tedy mohla mít v případě studovaných alel v jarních odrůdách pšenice vliv na pozorovaný průběh a hladiny relativních expresí v průběhu dne. Také mohla ovlivnit další mechanismy, které mohou být nepřímo spojené s expresí studovaných alel.

S vernalizací není spojen jen gen *VRN1*, ale také geny *VRN2* a *VRN3*. Ve studii Jin *et Wei* (2015) se zabývali analýzou expresních profilů zmíněných tří vernalizačních genů v listech, a to jak v podmínkách vernalizace, tak i bez ní v podmínkách dlouhého dne. Expresce nebyla studována v průběhu jednoho dne jako v této práci, ale sběr vzorků byl proveden každý týden a změny v expresi byly studovány v průběhu týdnů. Expresce byla studována u jarní i ozimé odrůdy v rozdílných podmínkách (vernalizované/nevernalizované rostliny). Jednotlivé expresce se mezi studovanými odrůdami lišily, a to v obou zmíněných podmínkách. U jarní odrůdy byla detekována vyšší hladina transkriptu u nevernalizovaných rostlin v porovnání s vernalizovanými. I když jarní odrůda nevyžaduje vernalizaci, tak vernalizační proces ovlivnil expresi genu *VRN1*. Nicméně při srovnání relativních expresí mezi vernalizovanými a nevernalizovanými rostlinami v této práci v případě alely *Vrn-A1a* nebyly hladiny relativních expresí signifikantně odlišné. U alely *Vrn-A1f-like* jsou však hladiny relativních expresí vyšší u vernalizovaných rostlin. To, že vernalizace může ovlivnit transkripci dominantní jarní alely je popsáno také ve studii Peral *et al.* (2011). Tato studie zkoumala expresi pro různé alely genu *VRN1*. Jedna ze studovaných alel byla alela *Vrn-A1a*. Po působení dlouhodobého chladu po dobu šesti týdnů byla expresce této alely vyšší než v případě bez procesu vernalizace.

Další část diplomové práce se zabývala analýzou přítomnosti alely *Vrn-A1f-like* u vybraných pšenic s genomem AAGG a přítomností případných polymorfizmů genů kódujících protein *VRN2*. Zajímavým zdrojem genetické variability jsou divoké odrůdy pšenic. Příkladem je tetraploidní pšenice *T. militinae* ( $2n = 4x = 28$ , genom  $A^tA^tGG$ ), která patří do skupiny *Timopheevii*. Hybridizační událost, která vedla ke vzniku těchto odrůd, byla oddělena od hybridizačních událostí vedoucích ke vzniku hexaploidních pšenic *T. aestivum*. Plané druhy *Tritiaceae* jsou původně ozimy. Z toho vyplývá, že recesivní alely genu *VRN1* jsou jejich původní formou. Existují však i druhy, které patří mezi jarní pšenice, a obsahují nejméně jednu dominantní alelu genu *VRN1*, *VRN3* nebo recesivní alelu *VRN2* (Goncharov, 1998).

V rámci práce byly pro výše zmíněnou analýzu vybrány linie z genových bank, které mají genom AAGG a patří k druhu *T. araraticum*, respektive *T. timopheevi*. Jednalo se celkem o 93 linií. Nejprve byla zjištěna přítomnost/nepřítomnost alely *Vrn-Alf-like*. Tato alela se nachází u jarních odrůd pšenic a je zodpovědná za jarní fenotyp (Ivaničová *et al.*, 2016). Důvodem, proč byly analyzovány tyto linie je fakt, že alela *Vrn-Alf-like* původně pochází od *T. militinae*, která patří do skupiny *T. timopheevii*. Dále byla snaha také identifikovat linie, které by měly jarní fenotyp, ale neměly by oba znaky charakteristické pro alelu *Vrn-Alf-like* (přítomnost inserce MITE a delece v prvním intronu). Nicméně některé analyzované linie, které jsou řazeny mezi jařiny, nebyly nositelkou zmíněné alely. Ve studii Shcherban *et al.* (2016) identifikovali jarní tetraploidní druhy *T. timopheevii* (genom AAGG), které jsou nositelkou jen alely *Vrn-Alf-like*. Zjistili, že se tato alela vyvinula u tohoto tetraploida, kdy je pro ně tato alela charakteristická a nebyly identifikovány jiné alely typické pro běžnou hexaploidní pšenici, která má odlišný evoluční původ. Z tohoto důvodu byla provedena sekvenční analýza genů kódující protein VRN2. Cílem bylo nalezení změn, které by mohly být příčinou vzniku jarního fenotypu.

Lokus genu *VRN2* zahrnuje dva tandemově se opakující geny (*ZCCT1*, *ZCCT2*). Sekvenována tak byla oblast domény *ZCCT1* (exon 1) a *ZCCT2* (exon 1,2). Polymorfizmy byly identifikovány pouze v oblasti *ZCCT2*, a to pro oba exony. V sekvenci prvního exonu domény *ZCCT2* byla identifikována inserce o velikosti 12 bp. Nacházela se celkem u čtyř vzorků. U vzorku TRI 18483 nebyla identifikována alela *Vrn-Alf-like*, nicméně i tak se jednalo o jarní odrůdu. Proto by zmíněná inserce, která nenarušuje čtecí rámec, mohla mít vliv na gen *VRN2* a jeho expresi, čímž by vznikl jarní fenotyp. Další tři linie, u kterých byla identifikována 12 bp inserce, také nenesly alelu *Vrn-Alf-like*. Tyto linie ale nepatří mezi jařiny. Z tohoto důvodu nemůžeme říct, že by inserce měla vliv na vznik jarního fenotypu, protože se nachází jak u ozimů, tak u jařin. V sekvenci druhého exonu domény *ZCCT2* byly identifikovány tři substituce v pozicích 359, 402 a 443 bp. Všechny tři zmíněné substituce se nacházely u jednoho vzorku – linie TRI 19075. Tato linie sice nese alelu *Vrn-Alf-like*, ale patří mezi jařiny. U dvou ze tří zmíněných substitucí (359 bp a 443 bp) došlo k aminokyselinové záměně. Aminokyselinové bodové mutace mohou změnit strukturu a funkci výsledného proteinu. Na základě tohoto předpokladu, by mohly mít tyto substituce vliv na vznik jarního fenotypu. Substituce 402 a 443 bp byly dále identifikovány u dalších 23 vzorků. Substituce se ale nenacházely pouze u ozimů nebo jařin. Z tohoto důvodu nelze říct, že by měly vliv na vznik jařin. U substituce 359 bp byla změněna aminokyselina. Místo

kyseliny asparagové je kódovaný glycin. Byla tak nahrazena kyselá aminokyselina neutrální aminokyselinou. U substituce 443 bp byla místo alaninu vložena kyselina asparagová. Zde je změna opačná, a to místo neutrální aminokyseliny kyselá aminokyselina. Substituce 402 bp byla synonymní.

Ve studii Shcherban *et al.* (2016) se snažili zjistit původ jarního růstového typu u skupiny tetraploidních pšenic *Timopheevi*. Porovnávali mezi sebou druh *T. araraticum* s jeho domestikovanou jarní odrůdou *T. timopheevii*. Studovali pouze alelovou variabilitu genu *VRN1* mezi zmíněnými tetraploidními druhy. Identifikovali, že u variet *T. araraticum* jsou přítomny ozimy i jařiny, a to s převahou ozimů (Shcherban *et al.*, 2016). Ve své studii Shcherban *et al.* (2016) studovali promotorovou oblast a oblast prvního intronu genu *VRN1*. V promotorové oblasti u všech studovaných tetraploidů identifikovali již dříve popsanou alelu *Vrn-A1f* (Golovnina *et al.*, 2010). V porovnání s jinými známými sekvencemi *Vrn-A1* obsahuje promotor alely *Vrn-A1f* 50 bp delecí nedaleko start kodónu. V oblasti prvního intronu byly nalezeny větší rozdíly. Popsali celkem tři rozdílné alely. Alela *Vrn-A1f-del* obsahovala delecí v centrální části prvního intronu a nacházela se jen u *T. araraticum*. Alela *Vrn-A1f-ins* obsahovala inzerci transpozónu MITE o velikosti 0,4 kb a alela *Vrn-A1f-ins/del* obsahovala jak delecí, tak inzerci transpozónu MITE. Obě tyto alely identifikovali pouze u *T. timopheevii*. Inzerce transpozónu MITE byla také popsána u alely *Vrn-A1f-like* ve studii Ivaničová *et al.* (2016). Závěrem studie Shcherban *et al.* (2016) je, že *Vrn-A1f* a *Vrn-A1f-del* jsou spojeny se ozimým růstovým typem u *T. araraticum*. Druhy *T. timopheevii*, které nesly alelu *Vrn-A1f-del/ins* a *Vrn-A1f-ins*, byly jařiny. V rámci diplomové práce se nepodařilo identifikovat linie, které měly jen delecí nebo jen inzerci, avšak studie Shcherban *et al.* (2016) prokázala, že vložení transpozónu MITE do oblasti prvního intronu genu *Vrn-A1* je pravděpodobně spojené s jarním růstovým habitem *T. timopheevii*. Závěr, že alela *Vrn-A1f-like* se nachází pouze u druhu *T. timopheevii* se shoduje s analýzou v této práci. Také tato alela byla identifikována pouze u linií patřících k druhu *T. timopheevii*. U *T. araraticum* tato alela identifikována nebyla.

V rámci provedených analýz v této práci se nepodařilo identifikovat polymorfizmy, které by se nacházely pouze u vzorků bez alely *Vrn-A1f-like* a jednalo se o jařiny. Je možné, že za vznik jarního fenotypu u těchto linií nebyl zodpovědný gen *VRN2*. V této práci nebyly například analyzovány geny *VRN3* nebo lokus *VRN-G1* nacházející se na subgenomu G.

## 7 ZÁVĚR

V této práci byla analyzována exprese alel *Vrn-A1a* a *Vrn-A1f-like* u vybraných zástupců jarních pšenic. Kultivary Tähti a Mooni nesly alelu *Vrn-A1a*. Tetraploidní pšenice *T. militinae*, linie DH81 a F<sub>3</sub> 147 nesly alelu *Vrn-A1f-like*. Relativní exprese alely *Vrn-A1a* byla vyšší než relativní exprese *Vrn-A1f-like* v podmínkách dlouhého dne, a to u nevernalizovaných i vernalizovaných rostlin. Důvodem expresní analýzy těchto dvou alel byl jejich rozdílný fenotypový projev. Rostliny s alelou *Vrn-A1a* kvetly dříve než rostliny s alelou *Vrn-A1f-like*. Rozdílný fenotyp je pravděpodobně způsoben dřívější akumulací mRNA alely *Vrn-A1a* v listech, kdy v rámci této alely byla detekována vyšší hladina relativní exprese u vernalizovaných i nevernalizovaných rostlin. Vyšší hladina relativní exprese alely *Vrn-A1a* tak koreluje s pozorovaným fenotypem. U obou alel bylo pozorováno kolísání hladin relativních expresí v průběhu světelné části dne. Dále byl studován vliv vernalizace na expresi zmíněných alel. Oproti nevernalizovaným rostlinám byly hladiny relativních expresí v případě alely *Vrn-A1f-like* u vernalizovaných rostlin vyšší. Tyto výsledky potvrzují, že vernalizační proces má vliv na expresi genu *VRN1*.

Druhá část práce se zabývala analýzou přítomnosti alely *Vrn-A1f-like* u vybraných zástupcích tetraploidních pšenic s genomem AAGG. Bylo analyzováno celkem 93 linií patřících do druhů *T. araraticum*, respektive *T. timopheevii*. Alela *Vrn-A1f-like* byla identifikována pouze u linií patřících k druhu *T. timopheevii*. Tato alela je zodpovědná za jarní fenotyp. U některých linií, které měly jarní fenotyp, alela *Vrn-A1f-like* identifikována nebyla. Z tohoto důvodu byly linie sekvenovány v oblasti domény *ZCCT1* (exon 1) a *ZCCT2* (exon 1, 2). V oblasti prvního exonu domény *ZCCT1* nebyly identifikovány žádné polymorfizmy v porovnání se sekvencí *T. turgidum* kultivar Langdon. V oblasti prvního a druhého exonu domény *ZCCT2* byly identifikovány polymorfizmy. Detekované polymorfizmy se ale nacházely u rostlin s jarním i ozimým růstovým typem. Z tohoto důvodu neměly pravděpodobně vliv na pozorovaný fenotypový projev.



## 8 LITERATURA

Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y. *et al.* (2005): FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex, *Science*, Vol. 309: 1052-1056

Alvarez, M. A., Tranquilli, G., Lewis, S., Kippes, N., Dubcovsky, J. (2016): Genetic and physical mapping of the earliness *per se* locus *Eps-A<sup>m</sup>1* in *Triticum monococcum* identifies *EASLY FLOWERING 3 (ELF3)* as a candidate gene. *Funct. Integr Genomics*, Vol. 16: 365 – 382

An, H., Roussot, C., Suárez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C. *et al.* (2004): CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development*, Vol. 131: 3615 - 3626

Appendino, M. L., Slafer, G. A. (2003): Earliness *per se* and its dependence upon temperature in diploid wheat lines differing in the major genes *Eps-A<sup>m</sup>1* alleles. *The Journal of Agricultural Science*. Vol. 141, Issue 2, pp. 149 – 154

Baudry, A., Ito, S., Song, Y. H., Strait, A. A., Kiba, T. (2010): F-Box Proteins FKF1 and LKP2 Act in Concert with ZEITLUPE to Control *Arabidopsis* Clock Progression. *The Plant Cell*, Vol. 22: 606 - 622

Beales, J., Turner, A., Griffiths, S., Snape, J. W., Laurie, A. (2007): A *Pseudo-Response Regulator* is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, Vol. 115: 721 – 733

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*, Vol. 116: 383 – 394

Bullrich, L., Appendino, M. L., Tranquilli, G., Lewis, S., Dubcovsky, J. (2002): Mapping of a thermo-sensitive earliness *per se* gene on *Triticum monococcum* chromosome 1A<sup>m</sup>. *Theor Appl Genet* 105: 585-593

Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q. *et al.* (2007): FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of *Arabidopsis*. *Science*, Vol. 316: 1030 – 1033

Csorba, T., Questa, J. I., Sun, Q., Dean, C. (2014): Antisense *COOLAIR* mediates the coordinated switching of chromatin states at *FLC* during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 111: 16160-16165

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 on Cereals. *Plant Physiol.* Vol. 132: 1849 – 1860

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

Díaz, A., Zikhali M., Turner, A. S., Isaac, P., Laurie, D. A. (2012): Copy Number Variation Affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* Genes Is Associated with Altered Flowering Time in Wheat (*Triticum aestivum*). *PLoS ONE*, Vol. 7, Issue 3

- Distelfeld, A., Li, C., Dubcovsky J. (2009a): Regulation of flowering in temperate cereals. *Current Opinion Plant Biology*, Vol. 12: 178 - 184
- Distelfeld, A., Tanquilli, G., Li, Ch., Yan, L., Dubcovsky, J. (2009): Genetic and Molecular Characterization of the *VRN2* Loci in Tetraploid Wheat. *Plant Physiology*, Vol. 149, pp. 245 – 257
- Dubcovsky, J., Dvorak, J. (2007): Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat Under Domestication. *Science*, Vol. 316, 1862 – 1865
- 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 Molecular Biology* 60: 469 – 480
- Dvorak, J., Luo, M.-C., Yang, Z.-L., Zhang, H.-B. (1998): The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet*, Vol 97: 657-670
- Dvořák, J., Terlizzi, P., Zhang, H. B., Resta, P. (1993): The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*, Vol 36: 21 – 31
- Dvořák, J., Zhang, H. B. (1990): Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 87: 9640-9644
- Faricelli, M. E., Valárik, M., Dubcovsky, J. (2010): Control of flowering time and spike development in cereals: the earliness *per se Eps-I* region in wheat, rice and *Brachypodium*. *Functional & Integrative Genomics*, Vol. 10: 293-306
- Feldman, M., Levy, A. A. (2009): Genome evolution in allopolyploid wheat – a revolutionary reprogramming followed by gradual changes. Vol. 36: 511-518
- Fu, D., Szűcs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J. S., 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. *Molecular Genetics and Genomics*, Vol. 273: 54 – 65
- Gawroński, P., Ariyadasa, R., Himmelbach, A., Poursarebani, N., Kilian, B. *et al.* (2014): A Distorted Circadian Clock Causes Early Flowering and Temperature-Dependent Variation in Spike Development in the *Eps-3A<sup>m</sup>* Mutant of Einkorn Wheat. *Genetics*, Vol. 196: 1253 - 1261
- Gawroński, P., Schnurbusch, T. (2012): High-density mapping of the earliness *per se-3A<sup>m</sup>* (*Eps-3A<sup>m</sup>*) locus in diploid einkorn wheat and its relation to the syntenic regions in rice and *Brachypodium distachyon* L. *Molecular Breeding*, Vol. 30: 1097 - 1108
- Gazzani, S., Gendall, A. R., Lister, C., Dean, C. (2003): Analysis of the Molecular Basis of Flowering Time Variation in Arabidopsis Accessions. *Plant Physiology*, Vol. 132: 1107 - 1114
- Golovnina, K. A., Kondratenko, E. Y., Blinov, A. G., Goncharov, N. P. (2010): Molecular characterization of vernalization loci *VRN1* in wild and cultivated wheats. *BMC Plant Biology*; 10:168
- Goncharov, N. P. (1998): Genetic resources of wheat related species: The *Vrn* genes controlling growth habit (spring vs. winter). *Euphytica*, Vol. 100: 371-376

- Griffiths, S., Simmonds, J., Leverington, M., Wang, Y., Fish, L. *et al.* (2009): Meta-QTL analysis of the genetic control of ear emergence in elite European winter wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 199: 383-395
- Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T. N., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., Colas, I., Moore, G. (2006): Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature*, Vol 439: 749-752
- Heo, J. B., Sung, S. (2011): Vernalization-Mediated Epigenetic Silencing by a Long Intronic Noncoding RNA. *Science*, Vol. 331: 76-79
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Faris, J., Gill, B., Haselkorn, R., Gornicki, P. (2002): Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 99: 8133-8138
- Hu, Z., Han, Z., Song, N., Chai, L. *et al.* (2013): Epigenetic modification contributes to the expression divergence of three *TaEXPA1* homoeologs in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist*, Vol. 2013: 1344-1352
- Chantret, N., Salse, J., Sabot, F., Rahman, S. *et al.*, (2005): Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *The Plant Cell*, Vol. 17: 1033-1045
- 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*, Volume 8, Issue 12
- Chen, F., Gao, M., Zhang, J., Zuo, A., Shang, X., Cui, D. (2013): Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China. *Plant Biology*, Vol. 13: 199
- Chen, Y., Carver, B. F., Wang, S., Cao, S., Yan, L. (2010): Genetic regulation of developmental phases in winter wheat. *Molecular Breeding*, Vol. 26: 573-582
- Choulet, F *et al.* (2014): Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science*, Vol. 345: 124971 (1-7)
- Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J., Sullivan, S. (2015): Plant Flavoprotein Photoreceptors. *Plant Cell Physiol*. Vol. 56: 401-413
- Ivaničová, Z., Jakobson, I., Reis, D., Šafář, J., Milec, Z., Abrouk, M., Doležel, J., Järve, K., Valárik, M., (2016): Characterization of new allele influencing flowering time in bread wheat introgressed from *Triticum militinae*. *New Biotechnology*, Vol. 33: 718–727
- Ivaničová, Z., Valárik, M., Pánková, K., Trávníčková, M., Doležel, J., Šafář, J., Milec, Z. (2017): Heritable heading time variation in wheat lines with the same number of *Ppd-B1* gene copies. *Plos One*.
- Ivaničová, Z. (2017): Mapping and identification of flowering time genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Dizertační práce*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc
- Iqbal, M., Navabi, A., Salmon, D. F., Yang, R., Spaner, D. (2006): A genetic examination of early flowering and maturity in Canadian spring wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, Vol. 86: 995-1004

- Iqbal, M., Fayyaz, M., Shahzad, A., Ahmed, I., Ali, G. M., Masood, S., Spaner, D. (2011): Effect of vernalization on grain fill duration and grain weight in spring wheat. *Pak. J. Bot.*, Vol. 43: 689-694
- Jang, S., Marchal, V., Panigrahi, K., Wenkel, S., Soppe, W. *et al.* (2008): *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *The EMBO Journal*, Vol. 27: 1277–1288
- Jin, F. F., Wei, L. (2015): The Expression Patterns of Three *VRN* Genes in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) in Response to Vernalization. *Cereal Research Communications*, Vol. 44: 1-12.
- 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*, Vol. 290: 344-347
- Jakobson, I., Peusha, H. *et al.* (2006): Adult plant and seedling resistance to powdery mildew in a *Triticum aestivum* × *Triticum militinae* hybrid line. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol 112: 760 – 769
- Jakobson, I., Reis, D., Tiidema, A. *et al.* (2012): Fine mapping, phenotypic characterization and validation of non-race-specific resistance to powdery mildew in a wheat – *Triticum militinae* introgression line. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol.125: 609 - 623
- Kamran, A., Iqbal, M., Spaner, D. (2014): Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. *Euphytica* 197: 1 – 26
- Kane, N. A., Agharbaoui, Z., Diallo, A. O., Adam, H., Tomiaga, Y., Ouellet, F., Sarhan, F. (2007): TaVRT2 represses transcription of the wheat vernalization gene *TaVRN1*. *The Plant Journal*, Vol 51: 670 – 680
- Kashkush, K., Feldman, M., Levy. A. A. (2002): Gene Loss, Silencing and Activation in a Newly Synthesized Wheat Allotetraploid. *Genetics*, Vol. 160: 1651 – 1659
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A. *et al.* (2012): Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, Vol. 28: 1647-1649
- Khlestkina, E. K., Giura, A., Röder, M. S., Börner, A. (2009): A new gene controlling the flowering response to photoperiod in wheat. *Euphytica*, Vol. 165: 579 – 585
- Kilian, B., Özkan, H., Deusch, O., Effgen, S., Brandolini. A., Kohl, J. *et al.* (2007): Independent Wheat B and G Genome Origins in Outcrossing *Aegilops* Progenitor Haplotypes. *Mol. Biol. Evol.* Vol 24: 217 - 227
- Kiseleva, A. A., Potokina, E. K., Salina. E. A. (2017): Features of *Ppd-B1* expression regulation and their impact on the flowering time of wheat near-isogenic lines. *BMC Plant Biology*, p. 72-85
- Kippes, N., Debernardi, J. M., Vasquez-Gross, H. A., Akpınar, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol: 112: E5401-E5410

- Kippes, N., Chen, A., Zhang, X., Lukaszewski, A. J., Dubcovsky, J. (2016): Development and characterization of a spring hexaploid wheat line with no functional *VRN2* genes. *Theor. Appl. Genet*, Vol: 129: 1417 – 1428
- Kippes, N., Zhu, J., Chen, A., Vanzetti, L., Lukaszewski, A., Nishida, H., Kato, K., Dvorak, J., Dubcovsky, J. (2014): Fine mapping and epistatic interactions of the vernalization gene *VRN-D4* in hexaploid wheat. *Mol Genet Genomics*, Vol: 289: 47-62
- Kumar, S., Sharma, V., Chaudhary, S., Tyagi, A., Mishra, P., Priyadarshini, A, Singh, A (2012). Genetics of flowering time in bread wheat *Triticum aestivum*: complementary interaction between vernalization-insensitive and photoperiod-insensitive mutations imparts very early flowering habit to spring wheat. *Indian Academy of Sciences*, Vol: 91: 33-47
- Laubinger, S., Marchal, V., Gourrierc, J., Wenkel, S. *et al.* (2006): *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development*, Vol. 133: 3213–3222
- Lee, J., Oh, M., Park, H., Lee, I. (2008): SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY*. *The Plant Journal*, Vol. 55: 832–843
- Levy, J., Peterson, M. L. (1972): Responses of Spring Wheats to Vernalization and Photoperiod. *Crop Science*, Vol. 12: 487-490
- Li, Ch., Distelfeld, A., Comis, A., Dubcovsky, J. (2011): Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. *The Plant Journal*, Vol. 62: 763–773
- Li, Ch., Lin, H., Dubcovsky, J. (2015): Factorial combinations o protein interactions generate a multiplicity of florigen activation complexes in wheat and barley. *The Plant Journal*, Vol. 84: 70-82
- Liu, L., Zhang, Y., Li, Q., Sang, Y., Mao, J. *et al.* (2008): COP1-Mediated Ubiquitination of CONSTANS Is Implicated in Cryptochrome Regulation of Flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. 20: 292–306
- Liu, H., Liu, B., Zhao, Ch., Pepper, M., Lin, Ch. (2011): The action mechanisms of plant cryptochromes. *ScienceDirect*, Vol. 16: 684-691
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *ScienceDirect*, Vol. 25: 402-408
- Lewis, S., Faricelli, M. E., Appendino, M. L., Valárik, M., Dubcovsky, J. (2008): The chromosome region including the earliness per se locus *Eps-A<sup>m</sup>1* affects the duration of early developmental phases and spikelet number in diploid wheat. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59, No. 13: 3595-3607
- Loukoianov, A., Yan, L., Blechl, A., Sanchez, A., Dubcovsky, J. (2005): Regulation of *VRN-1* Vernalization Genes in Normal and Transgenic Polyploid Wheat. *Plant Physiology*, Vol. 138: 2364 – 2373
- Martinez-Perez, E., Shaw, P., Moore, G. (2001): The *Ph1* locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere asociation. *Nature*, Vol. 411: 204-207
- Matsuoka, Y. (2011): Evolution of Polyploid *Triticum* Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. *Plant & Cell Physiology*, Vol. 52(5): 750 - 764

- Milec, Z., Tomková, L., Sumíková, T., Pánková, K. (2012): A new multiplex PCR test for the determination of *Vrn-B1* alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular breeding*, Vol. 30: 317 – 323
- 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*, Vol. 11: 949-956
- Miura, H., Worland, A. J. (1994): Genetic Control of Vernalization, Day-length Response, and Earliness per se by Homoeologous Group-3 Chromosomes in Wheat. *Plant Breeding*, Vol. 133: 160 - 169
- Nishida, H., Yoshida, T., Kawakami, K., Fujita, M., Long, B., Akashi, Y., Laurie, D. A., Kato, K. (2013): 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. *Molecular Breeding*, Vol.31: 27-37
- 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*, Vol. 6
- Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., Berthelesen, K. (2006): Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol 39: 70 - 82
- Pugsley, AT (1971): A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat. *Australian Journal of Agricultural Reseachr*, 22(1) 21- 31
- 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*, Vol. 80: 847 – 857
- Quail, P. H (2007): Phytochrome-regulated Gene Expression. *Journal of Integrative Plant Biology*, Vol. 49: 11-20
- Robson, F., Coast, M. M. R., Hepworth, S. R., Vizir, M. *et al.* (2001): Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *The Plant Journal*, Vol. 28: 619-631
- Rockwell, N. C., Su, Y., Lagarias, J. C. (2006): Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 57: 837-858
- Santra, D. K., Santra, M., Allan, R. E., Campbell, K. G., Kidwell, K. K. (2009): Genetic and Molecular Characterization of Vernalization Genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, and *Vrn-D1* in Spring Wheat Germplasm from the Pacific Northwest Region of the U.S.A. *Plant Breeding*, Vol. 128: 576 - 584
- 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*, Vol. 318: 261 – 265
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent *et al.* (2006): The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, Vol. 20: 898 - 912

- Shcherban, A. B., Efremova, T. T., Salina, E. A. (2012): Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time. *Molecular Breeding*, Vol. 29: 675–685
- 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(Suppl 3): 236
- Sheldon, C. C., Burn, J. E., Perez, P. P. *et al.* (1999): The *FLF* MADS Box Gene: A Repressor of Flowering in Arabidopsis Regulated by Vernalization and Methylation. *The Plant Cell*, Vol. 11: 445-458
- Sheldon, C. C., Hills, M. J., Lister, C. *et al.* (2008): Resetting of *FLOWERING LOCUS C* expression after epigenetic repression by vernalization. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 105: 2214-2219
- Sheldon, C. C., Rouse, D. T., Finnegan, E. J., Peacock, W. J., Dennis, E. S. (2000): The molecular basis of vernalization: The central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 97: 3753-3758
- Shimada, S., Ogawa, T., Kitagawa, S., Suzuki, T., Ikari, Ch., Shitsukawa, N., Abe, T., Kawahigashi, H., Kikuchi, R., Handa, H., Murai, K. (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*, Vol. 58: 668-681
- Shindo, Ch., Aranzana, M. J., Lister, C., Baxter, C. *et al.* (2005): Role of *FRIGIDA* and *FLOWERING LOCUS C* in Determining Variation in Flowering Time of Arabidopsis. *Plant Physiology*, Vol. 138: 1163-1173
- Shindo, Ch., Lister, C., Creyillen, P., Nordborg, M., Dean, C. (2006): Variation in the epigenetic silencing of *FLC* contributes to natural variation in *Arabidopsis* vernalization response. *Genes & Development*, Vol. 20: 3079-3083
- Shitsukawa, N., Ikari, CH., Shimada, S., Kitagawa, S., Sakamoto, K. *et al.* (2007): The einkorn wheat (*Triticum monococcum*) mutant, maintained vegetative phase, is caused by a deletion in the *VRN1* gene. *Genes & Genetic Systems*, Vol. 82: 167 – 170
- Srikanth, A., Schmid, M. (2011): Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 68: 2013-2037
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., Coupland, G. (2001): *CONSTANS* mediates between the circadian clock and control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, Vol. 410: 1116 - 1120
- Sun, H., Guo, Z., Gao, L., Zhao, G., Zhang, W., Zhou, R., Wu, Y., Wang, H., An, H., Jia, J. (2014): DNA methylation pattern of *Photoperiod-B1* is associated with photoperiod insensitivity in wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist*, Vol. 204: 682 – 692
- Sung, S., Amasino, R. M. (2004): Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature*, Vol. 427: 159-164
- Tiwari, S. B., Chang, H., Hou, Y., Harris, A. *et al.* (2010): The flowering time regulator *CONSTANS* is recruited to the *FLOWERING LOCUS T* promoter via a unique *cis*-element. *New Phytologist*, Vol. 187: 57-66

- Tranquilli, G., Dubcovsky, J. (2000): Epistatic Interaction Between Vernalization Genes *Vrn-A<sup>m1</sup>* and *Vrn-A<sup>m2</sup>* in Diploid Wheat. *The Journal of Heredity*, 91: 304 - 306
- Trevaskis, B., Bagnall, D. J., Ellis, M. H., Peacock, W. J., Dennis, E. S. (2003): MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol: 100: 13099 – 13104
- 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*, Vol. 310: 1031 – 1034
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., Coupland, G. (2004): Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science*, Vol. 303: 1003 - 1006
- Wang, S., Carver, B., Yan, L. (2009): Genetic loci in the photoperiod pathway interactively modulate reproductive development of winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 118: 1339-1349
- Wigge, P. A., Kim, M. Ch., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., Weigel, D. (2005): Integration of Spatial and Temporal Information During Floral Induction in *Arabidopsis*. *Science*, Vol. 309: 1056-1059
- Wilhelm, E. P., Turner, A. S., Laurie, D. A. (2009): Photoperiod insensitive *Ppd-Ala* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theor Appl Genet*, Vol. 118: 285–294
- WheatBP. [online] [navštíveno 15.2.2018] Dostupné z [http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/WheatBP/Documents/DOC\\_Evolution.php](http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/WheatBP/Documents/DOC_Evolution.php)
- Xiao, J., Xu, S., Li, Ch., Xu, Y., Xing, L., Niu, L., Huan, Q., Tang, Y., Zhao, Ch., Wagner, D., Gao, C., Chong, K. (2014): O-GlcNAc-mediated interaction between VER2 and TaGRP2 elicits *TaVRN1* mRNA accumulation during vernalization in winter wheat. *Nature Communications*, Vol. 5: 4572
- 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. *Nature Genetics*, Vol. 40: 761 - 767
- Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, G., 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*. *The National Academy of Science of the USA* 103 (51): 19581 – 19586
- Yamaguchi, A., Abe, M. (2012): Regulation of reproductive development by non-coding RNA in *Arabidopsis*: to flower or not to flower. *Journal of Plant Research*, Vol. 125: 693-704
- Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherma, J., Dubcovsky, J. (2004a): Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. *Theor Appl Genet*, Vol. 109: 1677 - 1686
- Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., SanMiguel, P., Bennetzen, J. L., Echenique, V., Dubcovsky, J. (2004b): The Wheat *VRN2* Gene Is a Flowering Repressor Down-Regulated by Vernalization. *Science*, Vol. 303: 1640 – 1644



Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., and Dubcovsky, J. (2003): Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 100: 6263 – 6268

Yoshida, T., Nishida, H., Zhu, J., Nitcher, R., Distelfeld, A., Akashi, Y., Kato, K., Dubcovsky, J. (2010): *Vrn-D4* is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat. Theor Appl Genet, Vol:120: 543 – 552

Zhang, J., Wang, Y., Wu, S., Yang, J., Liu, H., Zhou, Y. (2012): A single nucleotide polymorphism at the *Vrn-D1* promoter region in common wheat is associated with vernalization response. Theor Appl Genet, Vol. 125: 1697 – 1704

Zhang, X., Gao, M., Wang, S., Chen, F., Cui, D. (2015): Allelic variation at the vernalization and photoperiod sensitivity loci in Chinese winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). Frontiers in plant science 6