

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Analýza genu *VRN-1* u pšenice seté (*Triticum aestivum*)**

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Dominik Grebík**  
Studijní program: N1406 Biochemie  
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **RNDr. Jan Šafář, Ph.D.**  
Rok: 2021

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne.....

.....

Bc. Dominik Grebík

Rád bych poděkoval svému školiteli, RNDr. Janu Šafářovi, PhD., za rady, připomínky a pomoc při vypracování mé diplomové práce. Děkuji také celé výzkumné skupině Dr. Šafáře, zejména Ing. Zbyňku Milecovi, PhD., za pomoc v laboratoři a možnosti se na něj kdykoliv obrátit. Taktéž bych rád poděkoval celému týmu Ústavu experimentální botaniky AVČR za výbornou atmosféru na pracovišti a šanci vypracovat diplomovou práci právě tam.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Dominik Grebík
Název práce	Analýza genu <i>VRN-1</i> u pšenice seté ( <i>Triticum aestivum</i> )
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav experimentální botaniky AV ČR
Vedoucí práce	RNDr. Jan Šafář, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

### Abstrakt

Teoretická část diplomové práce se nejprve zabývá pšenicí setou – *Triticum aestivum* L., její evolucí a významem pro lidstvo. Dále jsou v teoretické části uvedeny informace o genech ovlivňující kvetení u obilovin, jsou zde popsány zejména geny fotoperiodické a vernalizační dráhy, a také geny ranosti *per se*. Zvláštní pozornost je věnována genům vernalizační dráhy.

Experimentální část této práce je rozdělena na dvě části. V první části je popsána analýza exprese genu *VRN-A1*. Je zde uvedena postupná selekce z původních 43 odrůd vybraných pro tuto analýzu, jejich alelická specifikace vedoucí k postupnému vyselektování odrůd splňujících podmínky kladené v cílech práce – stejná sestava alel *VRN-A1*, různý počet kopií genu *VRN-A1*. U těchto odrůd je následně analyzována exprese genu *VRN-A1* pomocí RT-qPCR. Jsou zde také výsledky z fenotypové analýzy metání. Ve druhé části experimentální práce se nachází výsledky ze sekvenování genu *VRN-1* metodou Sangerova sekvenování a Illumina iSeq.

Z výsledků v této práci vyplývá, že odrůda Branišovická nesoucí dvě kopie alely *Vrn-A1a* metala signifikantně později než odrůda Bastion mající jednu kopii tohoto genu, rozdíl byl pozorovatelný i na úrovni exprese – v případě odrůdy s jednou kopií exprese v čase stoupala, v případě odrůdy s 2 kopiemi alely *Vrn-A1a* docházelo ke stagnaci nebo poklesu exprese *VRN-A1*. V rámci sekvenování byly u 8. exonu *VRN-D1* u dvou odrůd identifikovány SNP, dále pak delece v tomto genu a taktéž delece v promotoru *VRN-A1*.

Klíčová slova	vernalizace, <i>VRN-AI</i> , sekvenování, CNV
Počet stran	76
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Dominik Grebík
Title	Analysis of VRN-1 gene in bread wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )
Type of thesis	Diploma
Department	Institute of Experimental Botany AS CR
Supervisor	RNDr. Jan Šafář, Ph.D.
The year of presentation	2021

### Abstract

The theoretical part of the master's thesis first deals with bread wheat – *Triticum aestivum* L., its evolution and significance for humanity. Furthermore, the theoretical part contains information about genes influencing flowering in cereals, there are mainly described genes of the photoperiodic and vernalization pathway, as well as genes of early earliness *per se*. Special attention is paid to the genes of the vernalization pathway.

The experimental part of this thesis is divided into two parts. The first part describes the analysis of *VRN-A1* gene expression. There is a gradual selection from the original 43 varieties selected for this analysis, their allelic specification leading to the gradual selection of varieties meeting the conditions set in the objectives – the same set of *VRN-A1* alleles, different copy number of *VRN-A1* gene. In these varieties, the expression of the *VRN-A1* gene is analyzed by RT-qPCR. There are also results from the phenotypic analysis of heading. The second part of the experimental work contains the results of sequencing of the *VRN-1* gene by Sanger sequencing and Illumina iSeq.

The results of this work show that the Branišovická variety carrying two copies of the *Vrn-A1a* allele headed significantly later than the Bastion variety with one copy of this gene, differences were also observable at the expression level – in the case of the one copy copy it increased over time, in the case of varieties with 2 copies of the *Vrn-A1a* allele, *VRN-A1* expression stagnated or decreased. As part of the sequencing, SNPs were identified in exon 8 of *VRN-D1* in two varieties, as well as deletions in the same gene and deletions in the *VRN-A1* promoter.

Keywords	vernalization, <i>VRN-A1</i> , sequencing, CNV
Number of pages	76
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

1 Úvod.....	11
2 Současný stav řešené problematiky .....	13
2.1 Obilniny .....	13
2.1.1 Rod pšenice .....	13
2.2 Kvetení .....	18
2.2.1 Indukce kvetení u <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
2.2.2 Indukce kvetení u pšenice .....	21
3 Experimentální část.....	32
3.1 Materiál .....	32
3.1.1 Rostlinný materiál .....	32
3.1.2 Chemikálie .....	35
3.1.3 Roztoky .....	36
3.1.4 Komerční kity.....	36
3.1.5 Přístroje .....	36
3.1.6 Software .....	37
3.2 Metody .....	37
3.2.1 Pěstování rostlin pro analýzu genové exprese a sekvenování.....	37
3.2.2 Izolace DNA.....	37
3.2.3 Genotypování alel <i>VRN-1</i> .....	38
3.2.4 Agarózová elektroforéza .....	40
3.2.5 Copy number variation (CNV) analýza .....	40
3.2.6 Fenotypová analýza.....	41
3.2.7 Izolace RNA.....	41
3.2.8 Přepis RNA do cDNA.....	42
3.2.9 Kvantitativní real-time PCR (RT-qPCR).....	43
3.2.10 Sekvenování <i>VRN-1</i> – Sangerova metoda.....	43
3.2.11 Sekvenování <i>VRN-1</i> – iSeq .....	44
4 Výsledky .....	46
4.1 Analýza exprese genu <i>VRN-A1</i> .....	46
4.1.1 Genotypování alel <i>VRN-A1</i> , <i>B1</i> , <i>D1</i> a určení počtu kopií genu <i>VRN-A1</i> .....	46
4.1.2 Fenotypová analýza odrůd Bastion a Branišovická .....	52
4.1.3 Analýza genové exprese <i>VRN-A1</i> .....	53
4.2 Sekvenování genu <i>VRN-1</i> .....	57
4.2.1 Sekvenování genu <i>VRN-1</i> – Sangerova metoda.....	57



4.2.2 Sekvenování <i>VRN-1</i> – iSeq.....	58
5 Diskuse.....	60
6 Závěr .....	63
7 Literatura .....	64
8 Seznam použitých zkratk.....	76

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

Cílem teoretické části je zpracování literární rešerše se zaměřením na geny ovlivňující kvetení u obilovin, především u pšenice seté (*Triticum aestivum*) a také u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Budou popsány geny vernalizační a fotoperiodické dráhy a geny ranosti *per se*.

### **Experimentální část**

V praktické části bude analyzován gen *VRN-1*, který je důležitý pro iniciaci kvetení a je významnou součástí vernalizační dráhy. Tento gen bude sekvenován u několika odrůd pšenice, dojde k porovnání sekvencí a identifikaci případných mutací. U testovaných odrůd bude stanovena alelická sestava *VRN-A1*, *VRN-B1* a *VRN-D1*. Dále bude stanoven počet kopií genu *VRN-A1*, protože zvýšený počet kopií může mít vliv na jeho transkripci. U odrůd se shodnou sestavou *VRN-1*, ale odlišným počtem kopií *VRN-A1* bude určena doba metání a pomocí kvantitativní PCR také stanovena úroveň exprese *VRN-A1*.

## 1 Úvod

Zemědělství a lidstvo v 21. století čelí mnoha výzvám: musí produkovat více potravin k nasycení stále rostoucí populace, přispět ke zvýšení životní úrovně v mnoha rozvojových zemích závislých na zemědělství, využívat účinnější a udržitelnější výrobní metody a přizpůsobit se změně klimatu.

Sezónní změny v délce dne, teplotě a srážkách výrazně ovlivňují vývoj rostlin. Rostliny mění své chování a růst v reakci na signály z vnějšího prostředí, jakými jsou délka dne nebo teplota (Hastings a Follet, 2001). Role délky dne (fotoperiody) při růstu rostlin byla nejdříve zmíněna Tournoisem (1912) a Klebsem (1913), ale Garner a Allard (1920, 1923) byli první, kdo jasně ukázali, že kvetení a další vývojové reakce by mohly být kontrolovány vystavením dlouhým nebo krátkým dnům v závislosti na druhu rostliny. Prokázali, že hlavním faktorem při regulaci vývoje rostlin je délka dne a zavedli pojem fotoperiodismus, který je definován jako reakce rostliny na délku dne, která umožňuje rostlinám přizpůsobit se sezónním změnám. Podle požadavku na délku dne lze rostliny klasifikovat do tří kategorií: rostliny dlouhodenní, které kvetou, když je fotoperioda (počet hodin světla v denním cyklu) delší než hraniční délka dne, krátkodenní rostliny kvetou, pokud je fotoperioda kratší než hraniční délka dne. Hraniční délka dne se obvykle pohybuje mezi 10-14 hodinami. Poslední skupinou jsou rostliny neutrální, u nichž přechod do reprodukční fáze probíhá bez ohledu na délku dne (Kim a Sung, 2014; Shrestha *et al.*, 2014). Ve starších publikacích se nicméně objevují informace, podle kterých je to ve skutečnosti délka tmy, na kterou rostlina reaguje, například experimenty provedené na rostlinách *Xanthium* a sóji ukazují, že pokud jsou krátkodenní a dlouhodenní rostliny pěstovány za krátkého dne a v průběhu noci dojde ke krátkému přerušení světlem, tak toto vede k tomu, že je u dlouhodenních rostlin kvetení indukováno, zatímco u krátkodenních inhibováno (Lang, 1965). Nicméně v aktuálně publikovaných článcích je jako kritická veličina uváděna délka dne, a tak tomu bude i v této práci.

Přechod z vegetativní do generativní fáze je významnou událostí ve vývoji rostliny. Je to proces, který je kromě délky dne ovlivňován celou řadou dalších faktorů. U mnoha druhů rostlin je potřebné, aby byly vystaveny nízkým teplotám po dobu několika týdnů – jedná se o proces známý jako vernalizace (jarovizace). Termín jarovizace zavedl ve 30. letech 20. století Lysenko, později překládáno jako „vernalization“ z latinského vernum = spring. Definici tohoto pojmu pak stanovil Chouard (1960) jako získání nebo zrychlení

schopnosti kvést vystavením rostlin chladu. Citlivost na tyto faktory prostředí je řízena vernalizačními (*VRN – vernalization*) a fotoperiodickými (*PPD – photoperiod*) geny.

Obilniny patří k nejvýznamnějším zemědělským plodinám a jsou cílem zájmu šlechtitelů a vědců. Správné načasování kvetení může velmi významně ovlivnit výnos, a tak cílem vědců je pochopení procesů kvetení, které by následně vedlo k vyšlechtění a produkci kultivarů s vysokými výnosy a adaptovaných na různé klimatické podmínky.

## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Obilniny

Obilniny patří do třídy jednoděložných, čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Jsou to plodiny zahrnující například pšenici, ječmen, rýži a kukuřici. Patří mezi hlavní zdroje potravy pro lidstvo. Domestikace těchto plodin způsobila převrat ve způsobu života lidí a má podíl na pokrocích, které v naší civilizaci nastaly. Posun od shánění potravy k její cílené produkci vedl k počátkům zemědělství v mnoha částech světa a mohl později za pokles genetické diverzity těchto plodin, což bylo urychleno domestikací a také šlechtěním moderních kultivarů (Gustafson *et al.*, 2009). V roce 2019 dosahovaly výnosy obilnin 2,7 miliardy tun, o 2,3% vyšší než v roce 2018 (www.fao.org, FAO Cereal Supply and Demand Brief).

Pšenice (společně s ječmenem) jsou dvě hlavní plodiny, které daly za vznik zemědělské revoluci před 10 000 lety v oblasti Úrodného půlměsíce, a pšenice dodnes zůstává mezi světově nejvýznamnějšími plodinami. Domestikace těchto plodin z jejich planých předchůdců vyžadovala evoluci těch znaků, které jsou pro člověka užitečné. Jednalo se například o retenci zrna, zlepšování výtěžku při mlácení, změny v citlivosti rostlin na fotoperiodu a také nutriční hodnoty těchto plodin (Haas *et al.*, 2019).

#### 2.1.1 Rod pšenice

Rod pšenice (*Triticum*) a jeho zástupci jsou jedny z nejrozšířenějších zemědělských plodin, které se pěstují na Zemi a přispívá přibližně pětinou všech kalorií spotřebovaných lidmi, zároveň poskytuje významné množství proteinů (www.fao.org, FAOSTAT databáze). V důsledku toho výnosy a produkce této plodiny ovlivňují globální ekonomiku a případná neúspěšná sklizeň (nízké výnosy sklizené pšenice, poničení úrody extrémním počasím) může mít i různé politické důsledky. Šlechtitelé se neustále snaží vytvořit vylepšené odrůdy pšenice úpravou genetických parametrů ovlivňujících výnos a taktéž kvalitu, s cílem současně zachovat stabilní výnosy a adaptaci této plodiny na podmínky regionů, ve kterých je pěstována (zejména s ohledem na biotické a abiotické stresy) (Atlin *et al.*, 2017).

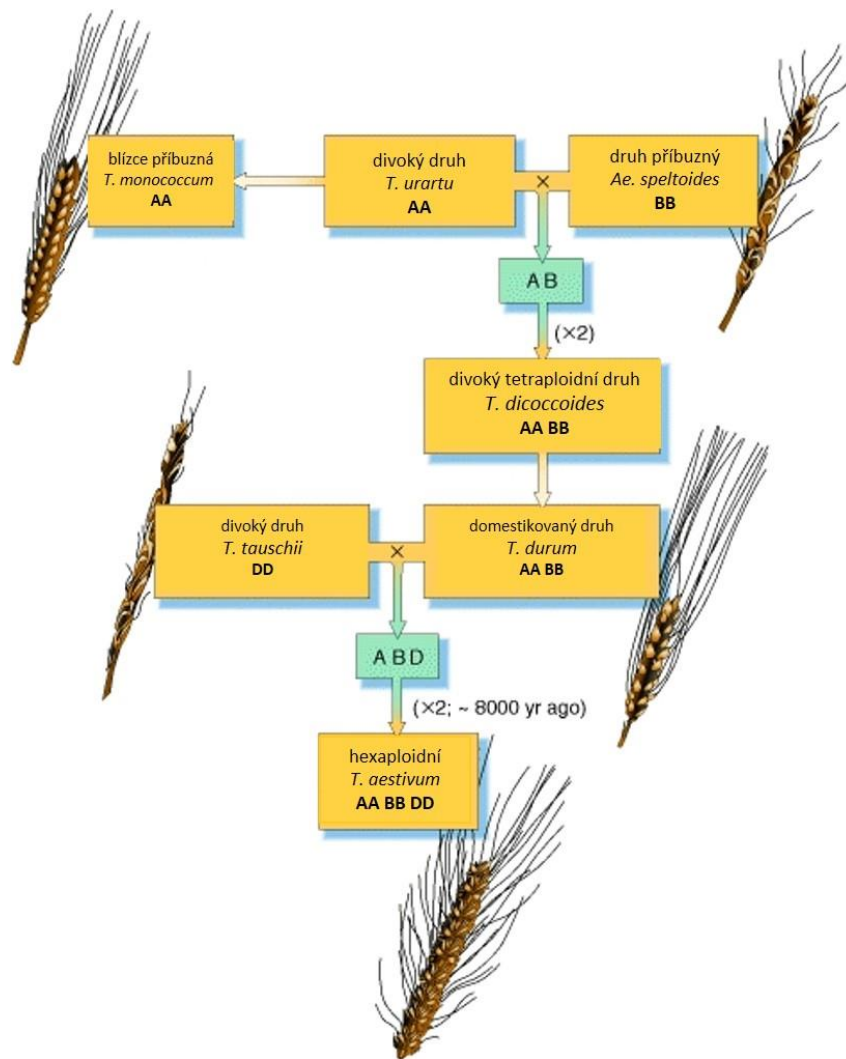
Proces domestikace, při kterém dochází k přeměně plané formy rostliny na rostliny domestikované, byl u pšenice poměrně komplexní. Z hlediska zemědělství je nejdůležitější pšenice setá (*Triticum aestivum*), která má hexaploidní genom ( $2n = 6x = 42$ ) (Sakamura, 1918) rozdělený do 3 subgenomů (A, B a D) pocházejících od tří diploidních planých předků: *Triticum urartu*, neznámého příbuzného *Aegilops speltoides*, a *Aegilops tauschii*.

### 2.1.1.1 Evoluce pšenice

Donorem A genomu se stal diploidní druh *T. urartu* (samotný *T. urartu* nebyl nikdy domestikován) (Dvořák *et al.*, 1993), kdy během amfiploidizační události, která se odehrála před méně než půl milionem let (Chalupska *et al.*, 2008), došlo k hybridizaci s dárce genomu B, který je dosud nezjištěn, nicméně je známo, že jde o druh ze sekce *Sitopsis*, příbuzného s druhem *Aegilops speltoides* (Blake *et al.*, 1999). Donor vajíčka v této počáteční hybridizaci byl donorem B genomu a dárce pylu přispěl A genomem. Výsledkem této iniciační hybridizace byla tetraploidní pšenice *T. dicoccoides*. Z tohoto vzniklého předchůdce vznikla pšenice naduřelá dvouzrnka (*T. dicoccum*), ze které byla domestikována například pšenice tvrdá (*T. durum*) (Haas *et al.*, 2019).

Asi 8 000 let př.n.l se udála další hybridizace, která se odehrála mezi domestikovanou tetraploidní *T. durum* a donorem D genomu – divoce rostoucím diploidním druhem *Aegilops tauschii*, což dalo za vznik hexaploidnímu druhu pšenici seté (*Triticum aestivum*) (Peng *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Evoluce pšenice je schematicky zobrazena na Obrázku 1.

Další domestikované druhy pšenice, jako pšenice špalda (*T. aestivum spelta*), byly široce pěstovány v Evropě do 20. století, kdy byly většinou nahrazeny pšenicí setou díky lepším vlastnostem. Pšenice špalda je v omezeném množství stále pěstována ve střední Evropě a může být cenným genetickým zdrojem pro budoucí zlepšování vlastností pšenice seté (Longin a Würschum 2016; Müller *et al.*, 2018).



Obrázek 1 – Schématické zobrazení evoluce pšenice. Genom A pochází od *T. urartu* (blízkým příbuzným *T. urartu* je *T. monococcum*, dodnes pěstovaný v horských oblastech Itálie a Španělska). Došlo k hybridizaci s dosud neznámým druhem příbuzným *Ae. speltoides*. Touto hybridizací vznikl planý tetraploidní druh *T. dicoccoides* a jeho následnou domestikací *T. durum*, která se asi 8 000 let př.n.l zkrížila s *T. tauschii* – donorem D genomu a výsledkem byla dodnes pěstovaná *T. aestivum* (upraveno podle The Bristol Wheat Genomics Website).

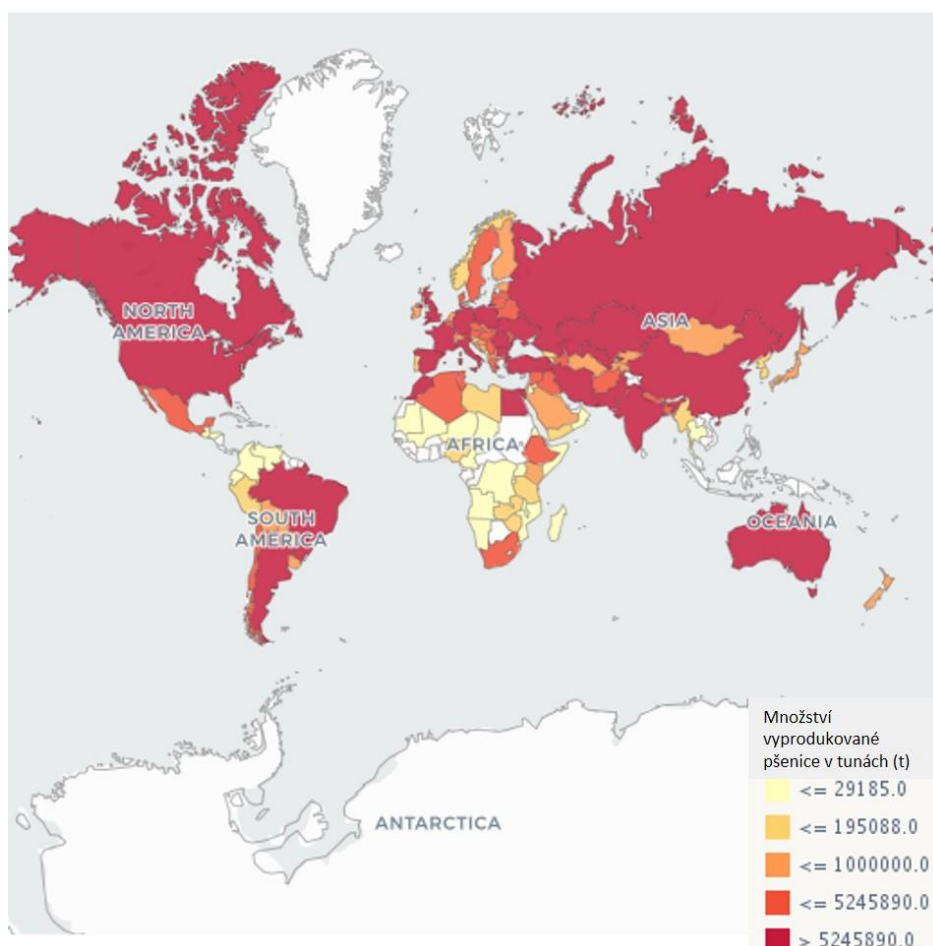
### 2.1.1.2 Pěstování pšenice v současnosti

Pšenice je rostlina samosprašná. Mezi domestikovanými a planými druhy pšenice existuje množství fenotypových odlišností, které jsou podmíněné geneticky. U planých forem pšenice dochází po dozrání k rozpadu klasu na jednotlivé klásky, zatímco u domestikované pšenice k tomuto rozpadu nedochází a zrna se z klásků uvolňují až při sklizni. Dále se jedná například o sníženou dormanci semen nebo pozměněnou dobu kvetení – jedná se o znaky, které usnadňují pěstování pšenice pro lidskou potřebu, ale v přírodě by mohly rostlinám škodit.

Moderní kultivary pšenice patří zejména do 2 polyploidních druhů: hexaploidní pšenice (*Triticum aestivum* –  $2n = 6x = 42$  chromozomů) a tetraploidní pšenice tvrdá (*T.*

*durum* –  $2n = 4x = 28$  chromozomů). Pěstovaná diploidní pšenice jednozrnka (*T. monococcum* –  $2n = 14$  chromozomů) je k nalezení pouze v horských regionech Itálie a Španělska (Gustafson *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2019).

Dnešní odrůdy pšenice jsou pěstovány v širokém spektru zeměpisných šířek – počínaje severními oblastmi zeměkoule, kde se pšenice pěstuje u severního polárního kruhu, až po jižní oblasti – zejména na jihu Chile (www.fao.org, FAOSTAT databáze). Tento rozsah je zřejmě dán plasticitou polyploidního druhu a způsobují ji geny řídící fotoperiodickou odezvu a vernalizační požadavky. V roce 2020 činily výnosy pšenice asi 772 milionů tun (www.fao.org, FAO Cereal Supply and Demand Brief). Mapa ukazující množství vyprodukované pšenice ve světě za rok 2018 je zobrazena na Obrázku 2.



Obrázek 2 – Mapa světa zobrazující množství vyprodukované pšenice. Jedná se o data za rok 2018. Jednotlivé státy jsou odlišeny barevně podle množství uváděného v tunách, které bylo v daném státě vyprodukováno. Data pocházejí z Organizace OSN pro výživu a zemědělství (FAO) (www.fao.org, FAOSTAT databáze).



### 2.1.1.3 Výzvy při šlechtění pšenice

Techniky tradičního šlechtění produkují plodiny s vysokou výživovou hodnotou a také výnosy, nicméně současná rychlost zvyšování výnosů je nedostatečná k tomu, aby vyhověla budoucím požadavkům. Vědci se zabývají zlepšením existujících plodin, které budou výnosnější, odolné vůči škůdcům a chorobám a budou více přizpůsobivé měnícímu se klimatu (The International Wheat Genome Sequencing Consortium *et al.*, 2018).

U ostatních rostlinných a živočišných organismů přístup ke zcela anotovanému genomu přispěl k vývoji systematictějších a efektivnějších přístupů pro selekci a porozumění důležitých znaků (Hickey *et al.*, 2017). Kompletní genomová sekvence pšenice nebyla dlouhou dobu dostupná, a to zejména kvůli problémům s velikostí genomu, který je více než pětikrát větší než lidský genom (Arumuganathan a Earle, 1991), hexaploidní povaze a velkému množství repetitivních sekvencí. V roce 2005 bylo založeno Mezinárodního konsorcium pro sekvenování genomu pšenice s cílem poskytnout kvalitní anotovanou referenční genomovou sekvenci pšenice kultivaru Chinese Spring (CS).

Byla uveřejněna sekvence genomu pšenice ve formě sekvencí 21 chromozomů společně s přesným umístěním 107 891 genů a více než 4 miliony molekulárních markerů (The International Wheat Genome Sequencing Consortium *et al.*, 2018). Došlo také k lokalizaci těchto genů a markerů na jejich specifické subgenomy, v práci se nacházejí i informace o sekvencích mezi geny a markery, což poskytuje komplexní pohled na organizaci genů a oblastí důležitých pro jejich regulaci.

Tato anotovaná referenční sekvence pšenice nyní slouží jako zdroj, který může vést k dalšímu zlepšování vlastností pšenice díky hlubším znalostem o této plodině a šlechtění založeném na genomice. S anotovaným a uspořádaným genomem mohou šlechtitelé a výzkumníci zjišťovat funkce jednotlivých genů, interakce mezi geny a jejich význam v průběhu vývoje rostliny. Díky známé sekvenci lze využívat moderní šlechtitelské techniky jako je například editace genomu (The International Wheat Genome Sequencing Consortium *et al.*, 2018).

## 2.2 Kvetení

Indukce kvetení je zásadní vývojovou změnou v životním cyklu rostlin. Jedná se o fyziologický proces, který představuje přechod od vegetativního (růst stonku, listů) k reprodukčnímu (tvorba květů a květenství) vývoji. Kvetení za příznivých podmínek má zásadní vliv na reprodukční úspěch rostlin – zajištění dostatečné produkce semen pro následné rozmnožování druhu. Rostliny proto kvetou pouze v určitých ročních obdobích a doba kvetení je přísně regulována vnímáním a interpretací signálů přicházejících z prostředí (délka dne, teplota, intenzita slunečního záření, dostupnost vody a živin) společně s endogenními podněty (juvenilita, stadium vývoje, hormonální regulace).

### 2.2.1 Indukce kvetení u *Arabidopsis thaliana*

Proces indukce a regulace kvetení byl nejrozsáhleji studován u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* se řadí mezi dlouhodobní rostliny, při krátkých dnech dochází ke zpoždění kvetení. Proces vernalizace je nutný pro přechod do generativní fáze rostliny (Martinez-Zapater *et al.*, 1994). Kromě těchto sezónních podnětů, kvetení ovlivňuje také například vystavení nižším teplotám (16 °C), které zpožďuje vykvetení ve srovnání s pěstováním rostlin při teplotách 20–24 °C (Blázquez *et al.*, 2003).

U *Arabidopsis thaliana* byly genetickými analýzami definovány čtyři hlavní dráhy podílející se na kvetení: fotoperiodická dráha, autonomní dráha, gibberelinová dráha a vernalizační dráha (Kim a Sung *et al.*, 2014).

#### 2.2.1.1 Fotoperiodická dráha u *Arabidopsis*

Ke vnímání fotoperiody rostlinou dochází v listech, nicméně květy vyrůstají ze stonkového apikálního meristému. V minulosti se tedy uvažovalo o existenci pohyblivého signálu nazvaného „florigen“ (Chailakhyan, 1936). Jako „florigen“ byl u *Arabidopsis* identifikován gen *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Corbesier *et al.*, 2007), kódující malý globulární protein, který je schopen translokovat z listů přes floém, do stonkového apikálního meristému.

Významným genem fotoperiodické dráhy u *Arabidopsis* je *CONSTANS (CO)*, což je transkripční faktor typu zinkového prstu, který integruje informace o vnějším prostředí a endogenních podnětech rostliny tak, aby spustil kvetení ve vhodném období. Ve vodivých pletivech listů aktivuje CO protein expresi *FLOWERING LOCUS T (FT)*, který kóduje protein podporující kvetení (An *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2010). Jak již bylo zmíněno výše, FT je transportován skrz floém do apikálního meristému stonku, transport FT vyžaduje membránový protein nazvaný FT-INTERACTING PROTEIN 1 (FTIP1) (Liu *et al.*, 2012).

Expresce *CO* je regulována cirkadiánními hodinami, které nastavují rytmus tak, že vrcholu exprese je dosaženo na konci dlouhého dne (Shrestha *et al.*, 2014). Cyklická změna abundance *CO* mRNA závisí na aktivitě proteinového komplexu tvořeného rostlinným specifickým proteinem GIGANTEA (GI), ubikvitin ligázou FLAVIN KELCH F BOX 1 (FKF1) a fotoreceptory (fytochromy a kryptochromy) (Baudry *et al.*, 2010; De Montaigu *et al.*, 2010). PHYTOCHROME B (PHYB) podporuje degradaci *CO* proteinu, zatímco PHYTOCHROME A (PHYA), CRYPTOCHROME1 (CRY1) a CRYPTOCHROME2 (CRY2) jej stabilizují. Tyto antagonistické aktivity vedou k hromadění *CO* na konci dne (Valverde *et al.*, 2004; Yanovsky a Kay, 2002). Interakce mezi GI a FKF1 vyžaduje světlo a přítomnost GI proteinu je nezbytná pro stabilitu proteinu FKF1 (Sawa *et al.*, 2007; Fornara *et al.*, 2009). Po interakci FKF1 s GI dochází k uvolnění represe *CO* a FKF1 zacílí za účelem degradace na transkripční represor známý jako CYCLING DOF FACTOR (CDF) (Sawa *et al.*, 2007). Proteiny CDF se přímo vážou k promotorům *CO* a *FT* proto, aby se zabránilo jejich expresi v případě, že jsou rostliny vystaveny krátkým fotoperiodám (Imaizumi *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2012).

Po transferu do stonkového apikálního meristému *FT* interaguje s bZIP transkripčním faktorem FLOWERING LOCUS D (FD), a tento protein-proteinový komplex (FT-FD) aktivuje expresi genu *APETALA1* (*API*) kódujícího MADS-box transkripční faktor, který je nezbytný pro vývoj květů (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). Samotná iniciace kvetení zahrnuje aktivaci ještě dalších MADS-box transkripčních faktorů, jako jsou *SUPPRESSOR OVEREXPRESSION CONSTANS 1* (*SOC1*) a *FRUITFULL* (*FUL*) (Lee *et al.*, 2008; Melzer *et al.*, 2008). *SOC1*, interagující s dalším MADS-box transkripčním faktorem AGAMOUS LIKE24 (*AGL24*) kontroluje expresi *LEAFY* (*LFY*) podílejícího se také na iniciaci vývoje květů (Lee *et al.*, 2008).

Proti genům identity meristému, *API* a *LFY*, antagonisticky působí protein TERMINAL FLOWER (*TFL1*). *TFL1* zabraňuje ektopické expresi *API* a *LFY* ve středu stonkového meristému. (Hanano a Goto, 2011). Nedávno bylo ale také zjištěno, že *LFY* a *API* mohou fungovat vzájemně protikladně při regulaci exprese genů. V práci Goslina *et al.* (2017) bylo ukázáno, že transkripce *TFL1* je potlačována *API*, ale podporována *LFY*.

### **2.2.1.2 Vernalizační dráha u *Arabidopsis***

U mnoha druhů rostlin může být kvetení stimulováno vystavením nízkým teplotám nad bodem mrazu po dobu několika týdnů. Tento proces, známý jako vernalizace, probíhá

v zimních měsících a připravuje rostlinu na reprodukční růst po chladném období, kdy se teploty opět začínají zvyšovat.

Nízké teploty spouští řadu fyziologických a molekulárních reakcí v rostlinách. Při teplotách nad bodem mrazu dochází k indukci aktivity množství genů za účelem spuštění procesu aklimatizace rostlin na chlad (Thomashow, 2001; Chinnusamy *et al.*, 2007). Vernalizace je podobná procesu aklimatizace na chlad, protože oba tyto děje jsou vyvolány nízkými teplotami (Lang, 1965; Bond *et al.*, 2011; Zografos a Sung, 2012). Mezi těmito ději však existují dva hlavní rozdíly. K aklimatizaci na chlad dochází v celé řadě rostlinných pletiv, včetně starších listů. Naproti tomu k účinku vernalizace dochází buď u stonkového apikálního meristému, nebo u mladých listů, což naznačuje, že na působení chladu reagují dělicí se buňky (Wellensiek, 1964; Lang, 1965; Zeevaart, 1976). Vernalizace navíc vyžaduje delší dobu vystavení chladu než aklimatizace na chlad. Aklimatizace rostlin může být dosaženo během několika dnů po vystavení chladu, zatímco vernalizace vyžaduje v případě *Arabidopsis* 4 až 6 týdnů vystavení nízkým teplotám (Lang, 1965; Bond *et al.*, 2011; Zografos and Sung, 2012).

Klíčovými geny zapojenými do vernalizace u *Arabidopsis*, jsou *FRIGIDA (FRI)* a *FLOWERING LOCUS C. FLC* je MADS-box transkripční faktor který se přímo váže na geny podporující vývoj květů a blokuje jejich transkripci, čímž působí jako represor kvetení (Michaels a Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999; Johanson *et al.*, 2000). *FRI* kóduje scaffold protein, který se podílí na transkripci *FLC* formací velkého transkripčního aktivátorového komplexu složeného z *FRI*, *FRI-LIKE 1 (FRL1)*, *FRI ESSENTIAL 1 (FES1)*, *SUPPRESSOR OF FRI 4 (SUF4)* a *FLC EXPRESSOR (FLX)*. Tento komplex společně s modifikátory chromatinu aktivuje transkripci *FLC* (Choi *et al.*, 2011). Vysoké hladiny exprese *FLC* potlačují transkripci dvou genů podílejících se na kvetení, *FLOWERING LOCUS T (FT)* a *SUPPRESSOR OVEREXPRESSION CO 1 (SOC1)*, což má za následek zpoždění ve kvetení (Michaels *et al.*, 2005; Sheldon *et al.*, 2006). V průběhu vernalizace dochází k postupnému utlumování transkripce *FLC* až k úplné stabilní represi *FLC* po ukončení vernalizace (Sheldon *et al.*, 2000). Zpočátku utlumování *FLC* koreluje s expresí nekódujících RNA nazývaných *COOLAIR* a *COLDAIR* (Heo a Sung, 2011). Stabilní represe *FLC* je spojena se změnami struktury chromatinu způsobené modifikacemi histonů. Před procesem vernalizace je typická trimethylace lysinu 4 na histonu 3 (H3K4me3) – dochází k vysoké expresi *FLC*. Trimethylace lysinu 27 na histonu 3 (H3K27me3) je známka snížené exprese – po proběhlé vernalizaci (Sung a Amasino, 2004).

Represe *FLC*, ke které dochází působením chladu, vyžaduje společnou aktivitu více genů, jakými jsou například *Arabidopsis thaliana* *VERNALIZATION 2* (*AtVRN2*) a *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*), které se podílejí na histonových modifikacích na *FLC* (Gendall *et al.*, 2001; Searle *et al.*, 2006; Bond *et al.*, 2009a). *AtVRN2* kóduje nukleoprotein zinkového prstu typu C2H2 a je jednou ze složek POLYCOMB-GROUP REPRESSIVE COMPLEX 2 (PRC2), který je potřebný pro stabilní udržení potlačení *FLC* po skončení vernalizace (Gendall *et al.* 2001). Dalším genem zapojeným do odpovědi rostlin na nízkou teplotu je *VERNALIZATION INSENSITIVE3* (*VIN3*), jehož exprese se zvyšuje během období vernalizace, při vyšších teplotách se vrací zpátky na svou bazální hladinu (Sung a Amasino, 2004). Jeho produktem je homeodoménový prstový protein *VIN3*, který může interagovat s PRC2 a způsobovat trimethylaci H3K27 (H3K27me3) v místě lokusu *FLC* (Wood *et al.*, 2006; Bond *et al.*, 2009a; Bond *et al.*, 2009b). Methylační status *FLC* je resetován v průběhu časně embryogeneze a v každé generaci je tak vyžadován nový cyklus vernalizace (Sheldon *et al.*, 2008).

### 2.2.2 Indukce kvetení u pšenice

Plodiny kmene *Triticeae*, do kterých patří například pšenice, ječmen a žito, jsou základními složkami výživy lidí a zvířat. V příštích desetiletích budou tyto plodiny hrát čím dál větší roli při zajišťování dostatku obživy, obiloviny jsou totiž jedním z nejdůležitějších zdrojů potravin, krmiv a také průmyslových surovin. Světová populace má z dnešních 7,8 miliard lidí překročit v roce 2050 hranici 9 miliard lidí a pro zajištění dostatku výživy pro obyvatelstvo je nutné zvyšovat výnosy (population.un.org, World Population Prospects 2019). Pšenice je plodinou, která má velký potenciál ke zvýšení výnosu. Díky podrobné znalosti dědičné informace pšenice získané v roce 2018 je možné, aby šlechtitelé rozpoznali geny zodpovědné za výnos, kvalitu zrna anebo také odolnost vůči různým chorobám (The International Wheat Genome Sequencing Consortium *et al.*, 2018). Je potřebné, aby došlo k prozkoumání všech možností, které by vedly ke zvýšené produkci obilovin. Existují důkazy o tom, že geny kontrolující kvetení mají vliv na produkci zrna, a pravděpodobně tedy ovlivňují i výnos (Jung a Müller, 2009; Ni *et al.*, 2009). Cílem šlechtitelského snažení je produkce takových kultivarů pšenice, které jsou adaptovány na různé klimatické podmínky. Produkce lokálně přizpůsobených kultivarů však není možná bez lepšího porozumění genům podílejících se na kvetení a jeho regulaci.

U pšenice je doba vykvetení důležitou vlastností, protože na ní závisí nejen včasné zrání semen, ale právě také schopnost rostlin přizpůsobit se různým podmínkám prostředí (Nitcher *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2015; Würschum *et al.*, 2015). Doba kvetení je obvykle spojena s dobou metání (fenologická fáze, kdy z praporcového listu vyčnívá právě polovina klasu), a jelikož je metání u pšenice snáze identifikovatelné, tak se při popisu doby kvetení pšenice používá. Doba kvetení (metání) je tedy vlastnost, která závisí na komplexu podmínek a může se v širokém rozmezí měnit (Cockram *et al.*, 2007). Obecně se uvádí, že doba metání hexaploidní pšenice závisí hlavně na třech genetických dráhách: geny *VRN* určující vernalizační požadavek, geny *PPD* určující citlivost rostliny na fotoperiodu a lokusy *EPS* (*Earliness per se*), které jsou zodpovědné za rozdíly v době metání u rostlin s uspokojenými požadavky na vernalizaci a fotoperiodu (Worland, 1996).

### 2.2.2.1 Fotoperiodická dráha u pšenice

Pšenice je původně rostlinou dlouhodenní, to znamená, že k iniciaci kvetení dochází, když doba trvání denního svitu překročí kritickou hladinu (Thomas a Vince-Prue, 1996; Dubcovsky *et al.*, 2006). Pšenice je citlivá na fotoperiodu ve všech stádiích vývoje (od klíčení až do metání) (Slafer a Rawson, 1994). Odrůdy lišící se vzájemně mírou citlivosti na fotoperiodu (až do úplné necitlivosti) byly šlechtiteli selektovány dlouhou dobu, tyto rostliny se lépe přizpůsobují měnícím se podmínkám prostředí (Borlaug, 1983; Beales *et al.*, 2007; Koshkin *et al.*, 2009). U rostlin neutrálních (na fotoperiodu necitlivých) není rozdíl v době kvetení za krátkého nebo dlouhého dne. Tento neutrální fenotyp byl důležitou součástí „zelené revoluce“ a stále se celosvětově využívá. Jako zelená revoluce je označováno období ve 2. polovině 20. století, kdy díky využití nových hnojiv, pesticidů a šlechtění nových odrůd došlo k výraznému zvýšení produktivity v zemědělství.

Hlavní lokusy ovlivňující citlivost na fotoperiodu byly mapovány v pšenici na chromozomech 2A, 2B a 2D (Law *et al.*, 1978; Scarth a Law, 1983; Wilhelm *et al.*, 2009). Jedná se o geny *PPD-1*, které jsou členy PRR (Pseudo Response Regulator) genové rodiny, stejně jako gen *PPD-H1* v ječmeni (Turner *et al.*, 2005; Beales *et al.*, 2007). Dominantní alely genů *Ppd-1* určují necitlivost rostliny na fotoperiodu, což způsobuje časně metání v podmínkách krátkého i dlouhého dne (Worland *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 2013), a to může rostlinám v určitých prostředích poskytovat výhodu (Worland *et al.*, 1998). U genů *PPD-1* byly detekovány rozmanité formy genu, které různě ovlivňovaly dobu metání. Alela *Ppd-D1a* u genu *Ppd-D1* s delecí 2 089 bp v promotorové oblasti způsobuje u rostlin necitlivost na fotoperiodu, což vede u pšenice k časnému metání

(Beales *et al.*, 2007). Alely v lokusu *Ppd-A1* s delecí ve stejné promotorové oblasti také způsobují necitlivost na fotoperiodu (Wilhelm *et al.*, 2009; Seki *et al.*, 2011). Byla také identifikována alela *Ppd-B1* s inzercí 308 bp v promotorové oblasti, která taktéž způsobuje necitlivost na fotoperiodu (Nishida *et al.*, 2013). Více kopií *Ppd-B1* může také způsobovat necitlivost na fotoperiodu (Díaz *et al.* 2012), pravděpodobně díky methyloci DNA v promotorové oblasti genu *Ppd-B1* (Sun *et al.*, 2014). Většina alel *Ppd-I* u pšenice způsobujících necitlivost na fotoperiodu je tedy charakterizována delecemi nebo inzercemi v oblasti promotoru genu, kde jsou umístěny regulační sekvence (Nishida *et al.*, 2013). Nemutované formy *PPD-I* genů jsou exprimovány ve dne s maximem přibližně 3–4 h po začátku svitu. V noci je exprese těchto genů potlačena. Pro všechny alely *Ppd-1a*, které způsobují necitlivost na fotoperiodu, dochází k narušení denního cyklu exprese ve srovnání s nemutovanou formou genu (geny jsou exprimovány jak ve dne, tak v noci) (Beales *et al.*, 2007; Wilhelm *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2012; Shaw *et al.*, 2012).

Expese genů *Ppd-I* je ovlivněna fytochromy *PhyB* a *PhyC* (Chen *et al.*, 2014; Pearce *et al.*, 2016), cirkadiálními rytmy a vnějšími světelnými signály (Chen *et al.*, 2014). Analýza promotorové oblasti genů *PPD-I* také odhalila vazebná místa transkripčních faktorů podílejících se na regulaci fytochromů, cirkadiálních rytmů a světla. Všechny rostliny s alelami *Ppd-la* necitlivými na fotoperiodu byly také charakteristické zvýšením exprese *FT1* (*VRN3*). Na základě toho lze soudit, že *Ppd-I* reguluje expresi genu *FT1* (Beales *et al.*, 2007; Wilhelm *et al.*, 2009; Shaw *et al.*, 2012). Je také známo, že fotoperiodickou dráhu u pšenice ovlivňují tři hlavní geny: *Triticum aestivum GIGANTEA* (*TaGI*), *Wheat CO1* (*WCO1*) a *Triticum aestivum heading date 1* (*TaHd1*). První z těchto genů je ortholog *GIGANTEA* u *Arabidopsis* (Zhao *et al.*, 2005), zatímco zbývající dva jsou orthology *CONSTANS* u *Arabidopsis* (Shimada *et al.*, 2009; Nemoto *et al.*, 2003).

#### **2.2.2.2 Vernalizační dráha u pšenice**

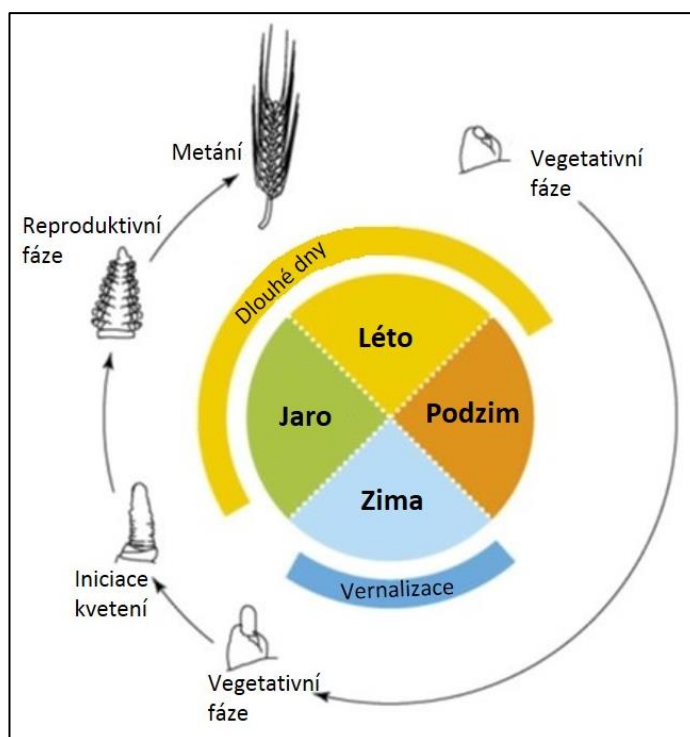
Odrůdy pšenice se dělí do dvou hlavních kategorií na základě jejich růstové formy: ozim a jařina. Ozimá pšenice vyžaduje dlouhodobou expozici nízkým teplotám (vernalizaci), aby došlo k urychlení přechodu z vegetativní do reprodukční fáze. Ozimá pšenice se zasévá na podzim, prochází vernalizací a kvete na jaře. Požadavek na vernalizaci zabraňuje kvetení na podzim a zajišťuje, že k vykvetení dojde v teplejších dnech během jara a léta. Ztráty ozimé pšenice kvůli velkému mrazu lze nahradit výsevem jařin, které buď nemají vernalizační požadavek nebo se u nich projevuje jen slabá vernalizační odezva a mají nízkou toleranci vůči mrazu. Ve středomořských oblastech s mírnou a

deštivou zimou jsou na podzim vysazeny jařiny, aby se v zimě využilo dostupnosti vody (Kippes *et al.*, 2018). Existují také odrůdy fakultativní – tyto odrůdy mají vyšší odolnost vůči mrazu (než jařiny) v případě vysetí na podzim, ale také vykvetou bez nutnosti vernalizace po vysetí na jaře (Flagsberger, 1929).

Vernalizační odpověď je kvantitativní – s rostoucí dobou vystavení rostlin nízkým teplotám dochází k postupnému snižování doby potřebné k metání, dokud není splněn požadavek na vernalizaci. Vernalizace je dokončena, pokud již nedochází ke zkracování doby potřebné k metání i přes další působení nízkých teplot (Kim *et al.*, 2009). Některé studie uvádějí, že u některých druhů rostlin (např. žito) může být vernalizace anulována krátkým obdobím vysokých teplot (~35 °C), tzv. devernalizací (Gregory a Purvis, 1948; Li *et al.*, 1987). Vliv sezónních podnětů (včetně vernalizace) na vzrostný vrchol obilovin je zobrazen na Obrázku 3.

U obilovin vyžadujících vernalizaci dochází v reakci na tento proces k expresi různých regulačních genů, jakými jsou *VRN-1*, *VRN-2* a *VRN-3* (Greenup *et al.*, 2009; Andres a Coupland, 2012). *VRN-1* kódující MADS-box transkripční faktor je indukován vernalizací a podporuje přechod od vegetativního k reprodukčnímu vývoji (Yan *et al.*, 2003). *VRN-2* kódující protein zinkového prstu je represorem kvetení, který zpožďuje kvetení, dokud rostliny neprojdou vernalizací (Yan *et al.*, 2004). Exprese genu *VRN-3*, který kóduje polyethanolamin vázající protein, je zprostředkována fotoperiodou a vernalizací a urychluje kvetení. Během vegetativní fáze ozimých obilovin na podzim je exprese *VRN-1* nízká a aktivita *VRN-2* potlačuje expresi *VRN-3* (Dubcovsky, 2005).





Obrázek 3 – Vliv sezónních podnětů na vzrostný vrchol u obilovin. Odrůdy vyžadující vernalizaci se vysévají koncem léta nebo na začátku podzimu. Vzrostný vrchol prochází vegetativní fází vývoje až do zimy, kdy dojde k vernalizaci. To podporuje iniciaci kvetení, ke kterému dochází při zvyšování teploty na jaře. Zároveň dochází k prodlužování dnů a začátkem léta dochází k metání. Převzato z Trevaskis *et al.*, 2007.

#### 2.2.2.2.1 Gen *VRN-1*

Geny *VRN-1* kontrolující vernalizační požadavek pšenice byly lokalizovány na pátém chromozomu u všech tří subgenomů a nesou tedy označení *VRN-A1*, *VRN-B1* a *VRN-D1* (Law *et al.*, 1976; Galiba *et al.*, 1995). Jak již bylo uvedeno, tyto geny kódují MADS-box transkripční faktory a jsou vysoce homologní s faktory APETALA-1, CAULIFLOWER a FRUITFUL v *Arabidopsis thaliana* (Yan *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2012), které regulují přechod z vegetativní fáze vývoje na generativní (Ferrándiz *et al.*, 2000). *VRN-1* hraje významnou roli v procesu iniciace kvetení v místě stonkového apikálního meristému (Trevaskis *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003). Bylo prokázáno, že pro přechod rostliny ke kvetení je potřebné, aby transkripční úroveň *VRN-1* dosáhla určité prahové hodnoty (Loukoianov *et al.*, 2005), nicméně existují i mutanti, kteří i s nefunkčním genem *VRN-1* vykvetou (Chen a Dubcovsky, 2012).

Před procesem vernalizace je bazální úroveň transkripce *VRN-1* velmi nízká, zvyšuje se s vystavením rostliny nízkým teplotám a vysoká úroveň exprese je udržována i po vernalizaci ve vzrostných vrcholech i listech ozimé pšenice. Tato transkripční dynamika může být ovládána histonovými modifikacemi (Trevaskis, 2010). Pro správnou funkci

genu *VRN-1* jsou důležitými oblastmi sekvence promotoru a prvního intronu (Yan *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005).

Odrůdy ozimé pšenice nesou recesivní alely *vrn-1*, jařiny jsou specifické dominantními alelami *Vrn-1*, které jsou konstitutivně exprimovány (Loukoianov *et al.*, 2005). Alelická variace v genu *VRN-1* je hlavním zdrojem genetické variace v požadavcích na vernalizaci u pšenice. Mutace v kterémkoli z homeologních genů *VRN-1* vedou k jarní růstové formě a absenci požadavku na vernalizaci (Greenup *et al.*, 2009). Delece a inserce v promotoru *VRN-1* a dlouhé delece v prvním intronu jsou spojovány s dominantními alelami vyskytujícími se u jařin, což naznačuje, že tyto regiony jsou mimořádně důležité pro potlačení exprese *VRN-1* před procesem vernalizace. Pro každý z dominantních *Vrn-1* genů je známo několik mutantních alel vedoucích k absenci požadavku na vernalizaci (Yan *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005; Shcherban *et al.*, 2012; Muterko *et al.*, 2016). Kombinace těchto alel mohou vést k rozdílům v době metání u jařin (Potokina *et al.*, 2012). Dominantní alela *Vrn-A1* se vyvinula z recesivní alely *vrn-A1* mutací v oblasti promotoru nebo prvního intronu. Yan *et al.* (2004) amplifikací a následným sekvenováním promotoru alely *Vrn-A1* odrůdy Triple Dirk D odhalili existenci MITE (miniaturní invertované opakovatelné transponovatelné elementy) fragmentů. Fu *et al.* (2005) zase odhalili sekvenováním celého *VRN-1* genu rozsáhlé delece v prvním intronu. Jak přítomnost MITE fragmentů, tak delece v prvním intronu způsobují vysokou bazální hladinu transkripce *VRN-A1* a vedou k jarnímu typu růstu.

*VRN-1* expresi modulují také další chladem indukované geny. *VER2*, indukovaný vernalizací, kóduje jacalinu podobný lektin s vysokou afinitou pro galaktosu a N-acetylglukosamin (GlcNAc) (Yong *et al.*, 2003; Xing *et al.*, 2009). Před vernalizací se protein GRP2 (GLYCINE RICH RNA-BINDING PROTEIN 2) váže na RIP3 oblast v místě prvního intronu nesestřížené *VRN-1* mRNA a tím inhibuje její sestřih, což vede k udržení nízké hladiny *VRN-1* mRNA. V průběhu vernalizace je GRP2 vystaven modifikacím (připojení N-acetyl-glukosaminu (O-GlcNAc)). Dlouhotrvající nízké teploty postupně zvyšují množství fosforylovaného VER2 v jádře. VER2 poté interaguje s modifikovaným GRP2 a transportuje jej z jádra do cytoplazmy. Tato translokace GRP2 vede k uvolnění jeho vazby z *VRN-1* pre-mRNA a akumulaci transkriptu *VRN-1* (Xiao *et al.*, 2014).

O úloze *VRN-A1* je však méně známo v případě rozdílů mezi ozimými a jejich potřebné délce trvání chladného období pro splnění vernalizačního požadavku. Tři nezávislé studie zjistily, že velká část variací ve vernalizačním požadavku u odrůd ozimé pšenice je

spojena s genem *VRN-A1*. Tyto tři studie však navrhují různá vysvětlení pro tyto rozdíly. Díaz *et al.* (2012) navrhli, že rozdíly v době metání byly způsobeny přítomností jedné kopie *VRN-A1* u odrůdy Claire a třemi kopiemi u odrůdy Hereward. Li *et al.* (2013) uvádí, že rozdíly v době metání byly způsobeny záměnou aminokyseliny alanin (u odrůdy Jagger) za valin (u odrůdy 2174) na pozici 180. Kippes *et al.* (2015) zjistili, že Claire a Jagger se lišily od Hereward a 2174 jednonukleotidovými polymorfismy (SNP) ve vazebném místě již zmiňovaného GRP2 proteinu v RIP3 oblasti prvního intronu *VRN-A1*. V další studii Kippes *et al.* (2018) ukázali, že polymorfismy v oblasti RIP3 *VRN-A1* segregující v analyzované populaci F<sub>2</sub> jsou spojeny s rozdíly v hladinách transkriptu *VRN-A1* a dobou metání nezávisle na rozdílech v počtu kopií *VRN-A1* a proteinové sekvenci.

U pšenice byl také popsán gen *VRN-D4*, který je rovněž zodpovědný za jarní růstový typ. Jedná se o extra kopii *VRN-A1*, která je dlouhá asi 290 kb a je lokalizována na chromozomu 5DS a bylo zjištěno, že interaguje s geny kontrolující vernalizaci a je tedy součástí vernalizační dráhy. V oblasti prvního intronu tohoto genu byly identifikovány 3 SNP, které narušují vazbu *TaGRP2* do této oblasti. Tento gen byl významný při vývoji jařin v oblasti jižní Asie. (Kippes *et al.*, 2014).

#### **2.2.2.2.2 Gen *VRN-2***

Dalším genem, který má vliv na vernalizační požadavek pšenice, je gen *VRN-2* (Yan *et al.*, 2004). Analýzy genetických epistatických interakcí ukazují, že *VRN-1* a *VRN-2* sdílejí genetickou dráhu (Distelfeld *et al.*, 2009). *VRN2*, jako represor kvetení kóduje transkripční faktor typu zinkového prstu s CCT doménou a jeho činnost je tlumena vernalizací a krátkými dny (Yan *et al.*, 2004; Dubcovsky *et al.* 2006; Distelfeld *et al.*, 2009). CCT doména proto přispívá k vernalizačnímu požadavku u ozimé pšenice a ječmene. Mutace nebo delece v CCT doméně vernalizační požadavek eliminují (Dubcovsky *et al.*, 2005b; Li a Xu, 2017). Kromě toho může expresi *VRN-2* ovlivnit také zmiňovaná délka fotoperiody. Bylo prokázáno, že vernalizace u odrůd pšenice citlivých na fotoperiodu může být nahrazena dočasným (až 6 týdnů trvajícím) vystavením rostlin krátkým dnům (Evans, 1978; Allard *et al.*, 2012). Tento jev nazvaný krátkodenní vernalizace je spojen s potlačením represoru kvetení – *VRN-2* (Dubcovsky *et al.*, 2006).

#### **2.2.2.2.3 Gen *VRN-3***

*VRN-3* (také označován jako *FLOWERING LOCUS T1 (FT1)*) je gen podporující kvetení a kódující protein podobný inhibitoru RAF kinázy, k jeho indukci dochází v listech za

podmínek dlouhého dne. Tento protein je funkčně podobný *FLOWERING LOCUS T* u *Arabidopsis* (Yan *et al.*, 2006; Pin *et al.*, 2010). *VRN-3* podporuje expresi *VRN-1* interakcí s bZIP transkripčním faktorem FDL2, což je ortholog proteinu FD u *Arabidopsis*, který se přímo váže na sekvenci ACGT v promotorové oblasti *VRN-1* (Abe *et al.*, 2005; Li a Dubcovsky, 2008). *VRN-3* také integruje signály vernalizace a fotoperiody za účelem urychlení kvetení.

Samotná indukce kvetení u rostlin probíhá tak, že krátké dny v zimě a dlouhodobé vystavení nízkým teplotám zvyšují expresi *VRN-1* (Yan *et al.*, 2003; Trevaskis, 2010). *VRN-2* je známým represorem genu *VRN-3* (Yan *et al.* 2006; Hemming *et al.*, 2008; Distelfeld *et al.*, 2009). Zvýšená exprese *VRN-1* způsobená vernalizací nebo mutacemi v genu vede k represi *VRN-2* a to vede k uvolnění represe *VRN-3*. *VRN-3* je transportován do stonkového apikálního meristému z listů, kde ještě dále zvyšuje expresi *VRN-1* na takovou úroveň, která iniciuje přechod z vegetativního růstu na reprodukční (Muterko *et al.*, 2015). Exprese *VRN-3* je také zprostředkována pomocí fotoperiodických genů *PPD-1* a *CO* (Li *et al.*, 2011). Světlem indukovaný PHYTOCHROME C (PHYC) zprostředkovává transkripční aktivaci *PPD-1* a *CO* což vede k zvýšené aktivitě *VRN-3* v pšenici (Chen *et al.*, 2014; Pearce *et al.*, 2016).

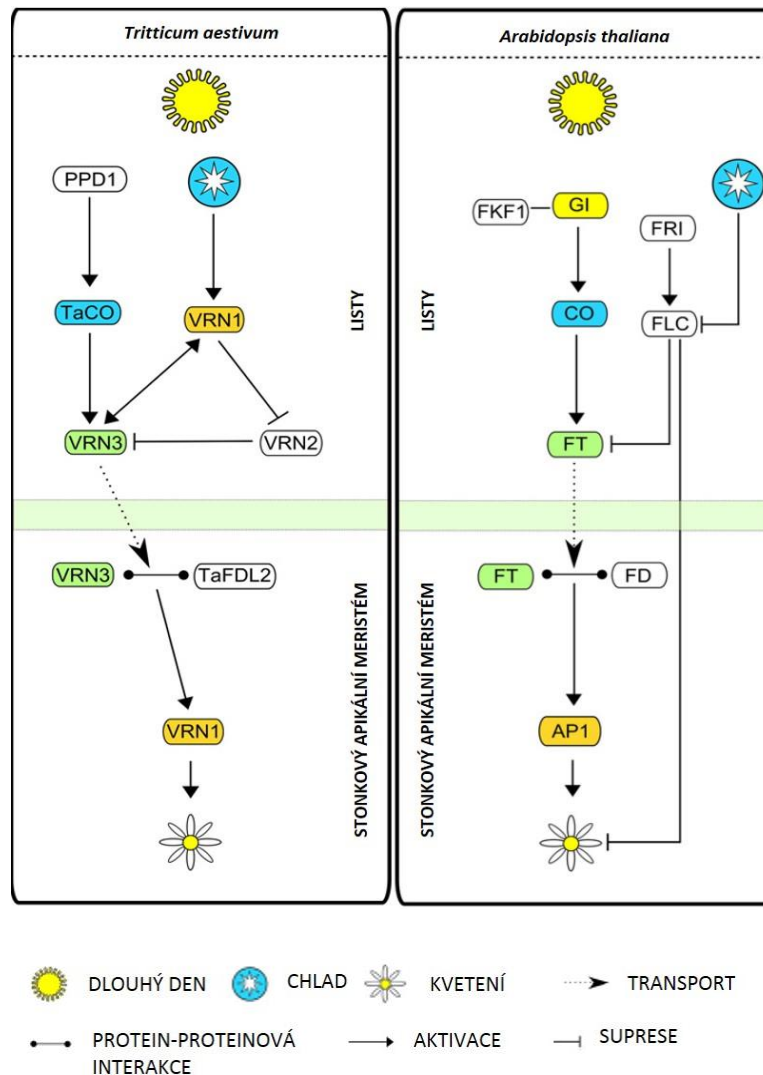
V ječmeni se *VRN-1* může přímo vázat na promotor *VRN-2* pro snížení jeho transkripce a také může zvýšit transkripci *VRN-3* vazbou na jeho promotor (Deng *et al.*, 2015). Zvýšená exprese *VRN-1* po zimě tedy potlačuje transkripci *VRN-2*, a to umožňuje transkripci *VRN-3* při podmínkách dlouhého dne na jaře (Hemming *et al.*, 2008; Shimada *et al.*, 2009).

#### **2.2.2.2.4 Epigenetická regulace vernalizace u pšenice**

U obilovin je epigenetická regulace vernalizace odlišná od regulace u *Arabidopsis*. U pšenice a ječmene není cílovým genem regulovaným epigenetickou modifikací represor kvetení, ale gen, který kvetení podporuje – *VRN-1* (Oliver *et al.*, 2009; Oliver *et al.*, 2013). Epigenetické modifikace v prvním intronu a promotoru *VRN-1* jsou zapojeny do epigenetické paměti vernalizace u pšenice a ječmene. V oblasti promotoru *VRN-1* byly mimo jiné nalezeny sekvence PRE/TRE (Polycomb/Trithorax responsive elements), což jsou vazebná místa pro Polycomb a Trithorax proteiny udržující aktivaci nebo represi vývojových genů, tyto proteiny jsou spojovány s regulací H3K4me3 a H3K27me3 (Sung a Amasino 2006; Diallo *et al.*, 2012). U pšenice analýza úrovně H3K4me3 (aktivní stav) a H3K27me3 (represivní stav) histonových modifikací promotorové oblasti *VRN-1* u

ozimů a jařin ukázala, že po vernalizaci podle Diallo *et al.* (2012) nenastaly ani u jednoho typu růstové formy v případě H3K27me3 signifikantní změny. Naopak Xiao *et al.* (2014) uvádějí, že u ozimu došlo ke snížení úrovně H3K27me3. Vernalizace způsobila zvýšení histonové modifikace H3K4me3 u ozimu, zatímco u jařin byl pozorován pokles této histonové modifikace (Diallo *et al.*, 2012). Tyto výsledky naznačují, že vernalizace podporuje aktivní stav chromatinu *VRN-1* u ozimu a redukci tohoto aktivního stavu u jařin. Výsledky jsou v souladu s relativním množstvím *VRN-1* mRNA u ozimé a jarní pšenice a naznačují, že gen *VRN1* je alespoň částečně regulován methylací histonu v oblasti promotoru (Diallo *et al.*, 2012).

Ačkoliv *VRN-1* má významný vliv na určení růstové formy pšenice (ozim/jařina) a čas metání, existují názory, že tyto geny nejsou nutné pro přechod do reprodukční fáze vývoje pšenice. K iniciaci kvetení a vývoji semen v tetraploidní pšenici s mutacemi ve dvou *VRN-1* genech (*VRN-A1* a *VRN-B1*) dochází bez narušení (i když se silným zpožděním) (Chen a Dubcovsky, 2012). Pravděpodobně existuje kompenzační účinek a funkce *VRN-1* mohou být částečně kompenzovány jinými geny (Yoshida *et al.*, 2010). Schématické zobrazení genů podílejících se na drahách iniciace kvetení u pšenice a *Arabidopsis* je na Obrázku 4.



Obrázek 4 – Schématické srovnání hlavních genů zapojených do kvetení u pšenice a *Arabidopsis*. U obou rostlin je indukce kvetení podněcována dlouhými dny a vernalizací. **Arabidopsis:** V *Arabidopsis* je denní rytmus analyzován pomocí *GIGIANTEA (GI)*, který společně s *FLAVIN KELCH F BOX 1 (FKF1)* indukuje za dlouhých dnů transkripci *CONSTANS (CO)*. Expresi *CO* zvyšuje transkripci *FLOWERING LOCUS T (FT)* a FT protein se přesouvá do stonkového apikálního meristému, kde interaguje s proteinem *FLOWERING LOCUS D (FD)*. Tento proteinový komplex iniciuje transkripci *APETALA1 (AP1)*, který podněcuje kvetení. K zabránění kvetení před vernalizací je aktivace *FT* potlačována pomocí *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Transkripce *FLC* je pravděpodobně aktivována genem *FRIGIDA (FRI)*. Vernalizace potlačuje expresi *FLC*, což vede k uvolnění transkripce *FT*. **Triticum aestivum:** Pšenice vnímá délku dne pomocí genů fotoperiody (*PPD1*), které působí na *Triticum aestivum CONSTANS (TaCO)*. Před zimním obdobím je kvetení potlačeno vysokými hladinami transkriptu *VRN-2* (což potlačuje expresi *VRN-3*). Během zimy je transkripce *VRN-1* aktivovaná vernalizací a potlačuje expresi *VRN-2*. Po proběhlé vernalizaci dlouhé dny indukují expresi *CO* a *VRN-3*. *VRN-3* sekvenčně podporuje transkripci *VRN-1* v listech. Protein *VRN-3* putuje do stonkového apikálního meristému, kde se v protein-proteinové interakci spojuje s *TaFDL2 (Triticum aestivum Flowering locus D-like)*. Tento komplex pak aktivuje *VRN-1* (= homolog *AP1*), což má za následek indukci kvetení. Převzato a upraveno podle Milec *et al.*, 2014.

### 2.2.2.3 Geny ranosti *per se*

Třetí skupinou genů, které ovlivňují kvetení u pšenice, jsou tzv. geny ranosti *per se* (earliness *per se*; *EPS*). Tyto geny jsou zodpovědně za rozdíly v době kvetení i poté, co jsou splněny nároky rostlin na vernalizaci a fotoperiodu a slouží k doladění procesů kvetení a adaptace pšenice k různým podmínkám prostředí (Slafer a Rawson, 1994; Zikhali a Griffiths, 2015).

*EPS* geny nejsou tak dobře prostudovány jako je tomu v případě genů *VRN* a *PPD-1*. Geny ranosti *per se* byly pomocí QTL identifikovány v několika studiích (Kato *et al.*, 2002; Valárik *et al.*, 2006; Gouis *et al.*, 2012). U pšenice a ječmene byly identifikovány orthology genů cirkadiálních hodin z *Arabidopsis*. U pšenice a ječmene jsou tyto geny spojeny s vlastnostmi genů ranosti *per se*. Konkrétně u *T. monococcum* byl na chromosomu 3A (*Eps-3A<sup>m</sup>*) identifikován *WPCL1*, ortholog *LUX ARRHYTHMO / PHYTOCLOCK 1 (LUX / PCL1)* z *Arabidopsis*, a jeho delece způsobuje narušení cirkadiálního rytmu (Mizuno *et al.*, 2012; Gawronski *et al.*, 2014). U *T. monococcum* byl také identifikován *Eps-A<sup>m1</sup>* jako kandidátní gen pro ranost *per se* (Lewis *et al.*, 2008). Tento gen je orthologem regulátoru cirkadiálních hodin *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)*, který se nachází v *Arabidopsis*, a mutace (změna ve čtyřech aminokyselinách) tohoto genu vede u pšenice ke změněné genové expresi *Ppd1*, *WFT1* a několika dalších genů (Alvarez *et al.*, 2016). U ječmene byl identifikován *EPS2* na chromozomu 2H, kandidátním genem pro *EPS2* je homolog z *Antirrhinum CENRORADIALIS (CEN)* označovaný jako *HvCEN* (Comadran *et al.*, 2012, Zikhal *et al.* 2014) ve své práci publikovali validaci *Eps* QTL lokalizovaného na chromozomu 1DL pomocí NIL (téměř izogenní linie). Tyto NIL vzniklé křížením mezi kultivary pšenice Spark a Griano pěstované jak v polních, tak v kontrolovaných podmínkách umožnily definovat QTL na 1DL jako efekt *Eps*.

Působení genů ranosti *per se* je důležitou adaptivní vlastností, nicméně všechny funkce těchto genů ještě nejsou dobře pochopeny. Například bylo zjištěno, že lokusy *Eps-A<sup>m1</sup>* a *Eps-3A<sup>m</sup>* jsou kromě regulace doby metání také citlivé na teplo a určují počet klasů, jakož i počet zrn v klasu (Bullrich *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2008; Gawronski *et al.*, 2014).

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 Rostlinný materiál

###### 3.1.1.1 Identifikace alelické sestavy genu *VRN-1* u testovaných odrůd a analýza genové exprese *VRN-A1* vyselektovaných odrůd

Jak již bylo zmíněno v cílech práce, pro analýzu genové exprese *VRN-1* byly vybrány ty odrůdy *T. aestivum*, které měly shodnou alelickou sestavu *VRN-1*, *PPD-1* a zároveň se lišily počtem kopií *VRN-A1*. Seznam pěstovaných odrůd, ze kterých byly selektovány odrůdy splňující podmínky je uveden v Tabulce 1. Pro tento typ experimentu byly zvoleny jařiny z různých geografických oblastí. Semena byla získána z Genové banky – VÚRV Praha a JIC Germplasm Resources Unit v Anglii.

Tabulka 1 – Seznam odrůd pěstovaných za účelem selekce a následné analýzy genové exprese *VRN-A1*. V tabulce je vždy uveden název odrůdy, země původu a růstový typ.

Odrůda	Původ	Růstový typ
Almansor	Portugalsko	jařina
Anza	USA	jařina
Artemovka	Ukrajina	jařina
Aurore	Austrálie	jařina
Baroota 8791	Alžírsko	jařina
Barta	Jižní Afrika	jařina
Bastion	Nizozemsko	jařina
Branišovická	Česká republika	jařina
Briscard	Francie	jařina
Capta	Francie	jařina
Carola	Německo	jařina
Centennial	USA	jařina
Chanate	Mexiko	jařina
Chianti	Itálie	jařina
Combination VII	Austrálie	jařina
Crespon	Španělsko	jařina
Dardo	Itálie	jařina
Dragon	Švédsko	jařina
Eurotas	Řecko	jařina
Gai Printemps	Francie	jařina
He460c	Československo	jařina
I BO 5/377	Itálie	jařina
Karagadinskaja	Kazachstán	jařina
Katepwa	Kanada	jařina
Kolchoznica	Rusko	jařina
Kompolti	Maďarsko	jařina
Kurskaya 263	Rusko	jařina
Loosdorfer	Rakousko	jařina



Tabulka 1 – Seznam odrůd pěstovaných za účelem selekce a následné analýzy genové exprese *VRN-A1*. V tabulce je vždy uveden název odrůdy, země původu a růstový typ. (pokračování)

Odrůda	Původ	Růstový typ
Marquis	Kanada	jařina
Marquis (b)	USA	jařina
Melia	Německo	jařina
Melissos	Maďarsko	jařina
Mongolia	Mongolsko	jařina
Orenburgskaja 1	Rusko	jařina
Paragon	UK	jařina
Peragis	Německo	jařina
Pyrothrix 28	Kazachstán	jařina
Reliance	USA	jařina
Rescue	Kanada	jařina
Rex-Vilmorin	Francie	jařina
Taichung	Japonsko	jařina
VL30	Indie	jařina
Zdar	Česká republika	jařina

### 3.1.1.2 Sekvenování genu *VRN-1*

K sekvenování genu *VRN-1* byly vybrány odrůdy *T. aestivum* uvedené v Tabulce 2. Odrůdy byly vybrány tak, aby zahrnovaly oba růstové typy (ozim, jařina) a zároveň byly dostatečně geograficky diverzifikovány. Následující seznam zahrnuje celkem 70 ozimů a 33 jařin. Semena byla získána z Genové banky – VÚRV Praha a JIC Germplasm Resources Unit v Anglii.

Tabulka 2 – Seznam odrůd pěstovaných za účelem sekvenování genu *VRN-1*. V tabulce je vždy uveden název odrůdy, země původu a růstový typ.

Odrůda	Původ	Růstový typ
148	Ukrajina	ozim
2174	Nepál	ozim
5499	Afghánistán	ozim
771-Vii/12	Makedonie	ozim
Apache	Francie	ozim
Apollo	Austrálie	ozim
Arina	Švýcarsko	ozim
Atlas 66	USA	ozim
Bagou	Francie	ozim
Balan De Figanesti	Rumunsko	ozim
Banderola	Polsko	ozim
Bankuta	Maďarsko	ozim
Barroko	Česká republika	ozim
Barryton	Německo	ozim
Batis	Německo	ozim

Odrůda	Původ	Růstový typ
Batkan Krasnaya	Kyrgyzstán	ozim
Botagoz	Kazachstán	ozim
Brilliant	Německo	ozim
Brokat	Rakousko	ozim
Ceylon	Nizozemsko	ozim
Claire	UK	ozim
Colonia	Německo	ozim
Complet	Německo	ozim
Corsaire	Francie	ozim
Dalmatia 2	Chorvatsko	ozim
Dromos	Německo	ozim
Elly	Česká republika	ozim
Eroica	Švédsko	ozim
Estivus	Německo	ozim
Etana	Německo	ozim
Euclide	Francie	ozim
Eurofit	Rakousko	ozim
F24	Čína	ozim
Fabius	Rakousko	ozim
Graindor	Francie	ozim
Hana	Československo	ozim
Hereward	UK	ozim
Hewitt	Nizozemsko	ozim
Chinese Spring	Čína	ozim
Chozo Mestnaja	Gruzie	ozim
Jagger	USA	ozim
Jindra	Česká republika	ozim
Jubile II	Belgie	ozim
Kanhard Selection Buck	Argentina	ozim
Košutka	Slovensko	ozim
Kulundinka	Rusko	ozim
Lena	Československo	ozim
Ludwig	Rakousko	ozim
Mara	Československo	ozim
Matylda	Česká republika	ozim
Naskov	Dánsko	ozim
Nordika	Česká republika	ozim
Norin 40	Japonsko	ozim
Norstar	Kanada	ozim
Pannonia NS	Srbsko	ozim
Patras	Německo	ozim
Renan	Francie	ozim
Rumunka	Bosna a Hercegovina	ozim
Sakura	Česká republika	ozim
Samanta	Československo	ozim
Saskia	Československo	ozim
Seu Seun 8	Jižní Korea	ozim
Simila	Česká republika	ozim
Sumai3	Čína	ozim
Svitava	Česká republika	ozim
TDC	Austrálie	ozim
Tilman	Francie	ozim
Tir	Turecko	ozim

Tabulka 2 – Seznam odrůd pěstovaných za účelem sekvenování genu *VRN-1*. (pokračování)

Odrůda	Původ	Růstový typ
Todireshti	Moldávsko	ozim
Venistar	Slovensko	ozim
Almansor	Portugalsko	jařina
Anza	USA	jařina
Artemovka	Ukrajina	jařina
Aurore	Austrálie	jařina
Baroota 8791	Alžírsko	jařina
Barta	Jižní Afrika	jařina
Bastion	Nizozemsko	jařina
Branišovická IX/49	Česká republika	jařina
Briscard	Francie	jařina
Capta	Francie	jařina
Carola	Německo	jařina
Centennial	USA	jařina
Chianti	Itálie	jařina
Combination VII	Austrálie	jařina
Crespon	Španělsko	jařina
Dardo	Itálie	jařina
Eurotas	Řecko	jařina
Gai Printemps	Francie	jařina
I BO 5/377	Itálie	jařina
Kompolti	Maďarsko	jařina
Kurskaya 263	Rusko	jařina
Loosdorfer MW	Rakousko	jařina
Marquis	Kanada	jařina
Marquis (b)	USA	jařina
Melissos	Německo	jařina
Orenburgskaja 1	Rusko	jařina
Paragon	UK	jařina
Pyrothrix 28	Kazachstán	jařina
Rescue	Kanada	jařina
Rex-Vilmorin	Francie	jařina
Taichung No.29	Japonsko	jařina
VL 30	Indie	jařina
Zdar	Česká republika	jařina

### 3.1.2 Chemikálie

Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), HOT FIREPol DNA polymerase (Solis Biodyne), nukleotidy – dATP, dCTP, dGTP, dTTP (ThermoFisher), agaróza (Sigma Aldrich), GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoFisher), ethidium bromid (Sigma Aldrich),  $\beta$ -merkapt ethanol (Sigma Aldrich), ethanol absolutní (Penta), DNA Gel Loading Dye (6X) (ThermoFisher), ROTI<sup>®</sup> Nucleic Acid Free (Roth)

### 3.1.3 Roztoky

#### 5x TBE (pH = 8):

450 mmol/l	tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma Aldrich)
450 mmol/l	kyselina boritá (Lachner)
10 mmol/l	dihydrát disodné soli EDTA (Fluka)

#### 1x PCR pufr (pH = 8,2):

10 mmol/l	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Sigma Aldrich)
1,5 mmol/l	MgCl <sub>2</sub> (Sigma Aldrich)
50 mmol/l	KCl (Lachner)
0,1%	Triton X-100 (Sigma-Aldrich)

### 3.1.4 Komerční kity

NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel)

RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche)

qPCR 2x SYBR Master Mix (Top-Bio)

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher)

Agencourt CleanSEQ Kit (Beckman Coulter)

### 3.1.5 Přístroje

Qubit 4 Fluorometer (ThermoFisher), NanoDrop One (ThermoFisher), Flow-box Holten LaminAir (Trigon Plus), automatický robot Biomek NX<sup>P</sup> (Beckman Coulter), Applied Biosystems™ 3730xl DNA Analyzer (ThermoFisher), UV transiluminátor s dokumentačním systémem Syngene (SynGene), homogenizační oscilační mlýn MM301 (Retsch), termoblok (VWR), vodní lázeň (Julabo), C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, C1000 Touch Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System, aparatura pro agarózovou elektroforézu OWL A6 (ThermoFisher), zdroj napětí pro elektroforézu (Major Science), automatické pipety (Eppendorf), mikrovlnná trouba (Daewoo), laboratorní předvážky (Shinko Denshi), myFuge™ Mini Centrifuge (Benchmark Scientific), stolní centrifuga Centrifuge 54150 (Eppendorf), fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)

### **3.1.6 Software**

MS Office 2016 (Microsoft), geneSNAP (SYNGENE), Geneious (Biomatters), CFX Maestro Software (Bio-Rad), Minitab 18

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Pěstování rostlin pro analýzu genové exprese a sekvenování**

Od každé odrůdy bylo na samostatnou Petriho misku umístěno alespoň 5 semen. Petriho miska obsahovala buničinu a filtrační papír navlhčený pitnou vodou. Po vysazení semen byly Petriho misky ponechány 24 hodin ve fytotronové komoře (den 16 hod/20 °C, noc 8 hod/16 °C; vlhkost 60%). Následně byly misky umístěny do chladové místnosti (den 8 hod/4 °C, noc 16 hod/4 °C; vlhkost 85%) na 72 hodin za účelem synchronizace jejich klíčení. Poté byly misky umístěny zpět do fytotronu. Po objevení koleoptile byly rostliny přesazeny do květináčů (15x15 cm) se zahraničným substrátem (Rašelina Agro) a byly pěstovány za kontrolovaných podmínek. Od každé odrůdy byly vysazeny 3 rostliny, které byly dále analyzovány samostatně. Tento postup měl odhalit případně příměsi jiných odrůd v dodaných vzorcích osiva a zajistit reprodukovatelné výsledky následných analýz.

### **3.2.2 Izolace DNA**

Za účelem izolace DNA byly z jednotlivých rostlin odebrány kousky listových segmentů (maximálně 100 mg rostlinného pletiva) do 2 ml mikrozkuřavky obsahující skleněnou kuličku. Listové segmenty byly odebírány z mladých, zdravě vypadajících listů. Mikrozkuřavky byly ihned po odběru vloženy do tekutého dusíku. Se vzorky bylo po celou dobu zacházeno tak, aby nedošlo k jejich rozmrznutí. Po zmrazení vzorků následovala homogenizace na oscilačním mlýnu při 27 000 Hz po dobu 1 min 30 s tak, aby rozdrčené listové segmenty byly ve formě jemného prášku. Celková genomická DNA byla izolována pomocí NucleoSpin Plant II kitu. Samotná izolace započala lýzí buněk, ke zhomogenizovanému vzorku bylo přidáno 400 µl pufru PL1 a mikrozkuřavka byla důsledně zvortexována. Následně bylo přidáno 10 µl RNAzy A opět došlo k zvortexování. Vzniklá suspenze byla inkubována 30 minut při teplotě 65°C.

Následovala fáze filtrace, kdy byla do další 2 ml mikrozkuřavky umístěna kolonka NucleoSpin®. Na tuto kolonku byl nanesen lyzát, poté proběhla centrifugace po dobu 2 minut při 11 000 x g. K přefiltrovanému lyzátu bylo přidáno 450 µl PC pufru a směs byla zvortexována. Následovalo navázání DNA na membránu v kolonce. Do čisté 2 ml mikrozkuřavky byla umístěna NucleoSpin® kolonka, a na tu byl nanesen vzorek. Centrifugace 2 minuty při 11 000 x g vedla k navázání DNA na membránu v kolonce.

Dalším krokem bylo přečištění a vysušení membrány. Na kolonku bylo nanaseno 400  $\mu$ l PW1 pufru a proběhla centrifugace při 11 000 x g 2 minuty. Následovalo další promytí 700  $\mu$ l pufru PW2 a centrifugace 2 minuty při 11 000 x g. Finální promývací krok spočíval v přidání 200  $\mu$ l pufru PW2 a centrifugace 2 minuty při 11 000 x g za účelem odstranění promývacího pufru a vysušení membrány.

Posledním krokem byla eluce DNA, kdy byla NucleoSpin<sup>®</sup> kolonka s navázanou DNA přemístěna do čisté 1,5 ml zkumavky. Na kolonku bylo následně nanaseno 50  $\mu$ l PE pufru (předem zahřátého na 65 °C) a proběhla inkubace při teplotě 65 °C po dobu 5 minut, následovala centrifugace 2 minuty při 11 000 x g. Tento eluční krok byl následně ještě jednou opakován. Po izolaci byla na Nanodropu změřena koncentrace a čistota DNA, vzorky byly umístěny do mrazáku (-20 °C).

### 3.2.3 Genotypování alel *VRN-1*

U odrůd pěstovaných za účelem analýzy genové exprese *VRN-A1* bylo nutné provést genotypování alel genů *VRN-A1*, *VRN-B1* a *VRN-D1* a také *PPD-1*. Genotypování bylo provedeno pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR proběhla v reakčním objemu 15  $\mu$ l v 96 jamkových PCR destičkách v termocykléru C-1000 Touch. Celkové složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3 – Složení PCR reakční směsi

Složka reakční směsi	Objem [ $\mu$ l]
HOT FIRE <sup>®</sup> 10x pufr B1	1,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,05
2 mM dNTP	1,5
100 $\mu$ M forward (F) primer	0,04
100 $\mu$ M reverse (R) primer	0,04
HOT FIRE <sup>®</sup> DNA polymeráza (5 U/ $\mu$ l)	0,1
Destilovaná voda	9,77
10 ng/ $\mu$ l DNA	1
Celkem	15

Reakční podmínky pro PCR jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4 – Podmínky PCR

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	15 min	1
Denaturace	95	30 s	34
Nasedání	viz Tab. 5 a 6	30 s	
Elongace	72	~1 min/kb	
Závěrečná elongace	72	10 min	1

Sekvence primerů, které byly použity pro detekci alel jsou spolu s teplotami nasedání uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5 – Primery určené pro genotypování *VRN-A1*, *VRN-B1* a *VRN-D1*.

Gen	Teplota nasedání [°C]	Délka produktu [bp]	Sekvence 5'→3'	Zdroj
<b><i>VRN-A1</i></b> <i>vrn-A1</i>	56	1068	F: GCACTCCTAACCCACTAACC R: TCATCCATCATCAAGGCAAA	Yan <i>et al.</i> , 2004 Fu <i>et al.</i> , 2005
<i>Vrn-A1a</i>	50	965 a 876	F: GAAAGGAAAAATTCTGCTCG R: GCAGGAAATCGAAATCGAAG	
<b><i>VRN-B1*</i></b> <i>vrn-B1</i> <i>Vrn-B1a</i> <i>Vrn-B1c</i>	56	1675 1235 849	F1: CAAGTGGAACGGTTAGGACA R1: CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA F2: GAAGCGGATCGAGAACAAGAT R2: CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	Fu <i>et al.</i> , 2005 Milec <i>et al.</i> , 2012
<b><i>VRN-D1</i></b> <i>Vrn-D1</i>	61	1671	F: GTTGTCTGCCTCATCAAATCC R: GGTCACCTGGTGGTCTGTGC	Fu <i>et al.</i> , 2005
<i>vrn-D1</i>	61	997	F: GTTGTCTGCCTCATCAAATCC R: AAATGAAAAGGAACGAGAGCG	

\*genotypování alel v případě genu *VRN-B1* proběhlo pomocí multiplex PCR

U odrůd, které měly stejnou sestavu alel *VRN-A1*, *B1*, *D1* proběhlo po určení počtu kopií genu *VRN-A1* genotypování alel genu *PPD-A1* a *D1*, u *Ppd-B1* se stanovoval počet kopií podle Díaz *et al.*, 2012 (viz Tab.7). Primery použité pro specifikaci alel *PPD-1* jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6 – Primery použité pro genotypování *PPD-A1* a *PPD-D1*.

Gen	Teplota nasedání [°C]	Délka produktu [bp]	Sekvence 5'→3'	Zdroj
<i>PPD-A1</i> * <i>Ppd-A1a</i> <i>Ppd-A1b</i>	57	338 299	F: CGTACTCCCTCCGTTTCTTT R2: AATTTACGGGGACCAAATACC R3: GTTGGGGTCGTTTGGTGGTG	Nishida <i>et al.</i> , 2013
<i>PPD-D1</i> * <i>Ppd-D1a</i> <i>Ppd-D1b</i>	54	288 414	F: ACGCCTCCCACTACTACTG R1: TGTTGGTTCAAACAGAGAGC R2: CACTGGTGGTAGCTGAGATT	Beales <i>et al.</i> , 2007

\*genotypování alel v případě genů *PPD-A1* a *PPD-D1* proběhlo pomocí multiplex PCR

### 3.2.4 Agarózová elektroforéza

Po ukončení PCR byly produkty separovány elektroforézou na 1,5% gelu (4,5 g agarózy a 300 ml 0,5x TBE pufru). Pro separaci bylo 5 µl PCR produktu smícháno s 3 µl 6x DNA Gel Loading Dye a došlo k nanesení na gel. Pro určení velikosti PCR produktů byly na gel naneseny také 3 µl velikostního markeru GeneRuler 100 bp Plus. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 130 V po dobu 1-2 hod (v závislosti na velikostech očekávaných PCR produktů). Po proběhlé separaci byl gel obarven v roztoku ethidium bromidu po dobu 15 minut a následně byla provedena vizualizace v UV transiluminátoru.

### 3.2.5 Copy number variation (CNV) analýza

Jednou ze stanovených podmínek pro analýzu genové exprese *VRN-A1* byla vzájemná odlišnost v počtu kopií tohoto genu mezi odrůdami. Proto bylo u pěstovaných odrůd provedeno stanovení počtu kopií genu *VRN-A1* a také genu *PPD-B1* vzhledem k tomu, že počet kopií *Ppd-B1* určuje (ne)citlivost k fotoperiodě.

CNV analýza byla provedena technologií TaqMan<sup>®</sup> společností iDNA Genetics v Anglii. V Tabulce 7 jsou uvedeny sekvence primerů a sond, které byly pro zjišťování počtu kopií použity

Tabulka 7 – Sekvence primerů a sond použitých pro CNV analýzu *VRN-A1* a *PPD-B1*.

Gen	Sekvence 5'→3'
<i>VRN-A1</i>	F: GCAGCCCACTTTTGGTCTCTA R: TCTGCCCTCTCGCCTGTT Sonda: FAM-TGTGTTTCGCTTTGGTTGTGCAGCA-TAMRA
<i>PPD-B1</i>	F: GCGTAAGTACTATCTCTCATGGTGTATC R: TTTGTTTTAGTACCCAGTACCATAACCAG Sonda: FAM-CTGCTGCTTCAGTTCCTAGTTTCACCTTGTGTCC-TAMRA



### 3.2.6 Fenotypová analýza

Po selekci těch odrůd, které měly stejnou sestavu alel pro geny *VRN-1* a *PPD-1*, vzájemně se shodovaly v počtu kopií genu *PPD-B1* a zároveň se lišily v počtu kopií *VRN-A1* byly tyto odrůdy vysazeny a pěstovány za kontrolovaných podmínek. U pěstovaných rostlin byla určena doba metání – fáze, kdy z praporcového listu vyčnívala právě polovina klasu. Takováto rostlina byla označena visačkou, na které bylo zaznamenáno datum metání. Po vymetání všech rostlin byl proveden výpočet doby metání – za kolik dnů od vysazení rostlina vymetala a proběhlo statistické vyhodnocení, zda se doba metání mezi odrůdami významně liší.

### 3.2.7 Izolace RNA

Za účelem genové exprese *VRN-A1* bylo nutné izolovat RNA z vyselektovaných odrůd *T. aestivum*. Izolace RNA byla prováděna ve flowboxu tak, aby všechny jednotlivé kroky probíhaly v RNase-free prostředí. Jeden vzorek pro izolaci RNA sestával z 3 rostlin – potomků stejné rostliny. Z jednotlivých rostlin byly odebrány listové segmenty (max 100 mg rostlinného pletiva) do sterilní mikrozkuřavky obsahující skleněnou kuličku. První odběr listů proběhl 7 dnů po výsadbě semen, ve fázi prvního listu, další odběr proběhl po 10 dnech ve fázi 3 listů. Plánovaný třetí odběr nemohl být proveden kvůli technické závadě na fytotronu. Odběry proběhly v 7 hodin ráno – tři hodiny po začátku světelného režimu ve fytotronu. Odebrané vzorky byly ihned umístěny do tekutého dusíku, aby bylo zabráněno degradaci RNA. Se vzorky bylo následně zacházeno tak, aby nedošlo k jejich rozmrznutí.

RNA byla izolována pomocí kitu RNeasy Plant Mini. Vzorky v mikrozkuřavkách byly homogenizovány v oscilačním mlýnu při 27 000 Hz po dobu 1 min 30 s až do podoby jemného prášku. Po proběhlé homogenizaci bylo do mikrozkuřavek přidáno 450  $\mu$ l RLT pufru (který byl předtím smíchán s 4,5  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanolu) a obsah mikrozkuřavky byl zvortexována. Následovala inkubace 3 min při 56°C. Poté probíhala izolace na kolonkách. Vzniklý lyzát byl nanesen na filtrační kolonku a byl centrifugován 2 min při 13 000 rpm. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkuřavky a bylo k němu přidáno 225  $\mu$ l absolutního ethanolu a směs byla zvortexována. Vzorek byl následně přenesen na novou kolonku a proběhla kcentrifugace po dobu 30 s při 13 000 rpm za účelem navázání RNA na membránu v kolonce.

Dalším krokem bylo odstranění DNA přidáním 80  $\mu$ l roztoku, který se skládal z 10  $\mu$ l DNázy a 70  $\mu$ l RDD pufru, následovala inkubace za laboratorní teploty po dobu 15 minut.

Poté bylo přidáno 350  $\mu\text{l}$  pufru RW1 a došlo k centrifugaci 30 s při 13 000 rpm. Následovalo promývání, kdy bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  pufru RPE (do pufru RPE byl ještě před použitím přidán absolutní ethanol podle pokynů výrobce), centrifugace 30 s při 13 000 rpm. Tento krok byl poté ještě jednou zopakován s delší centrifugací po dobu 2 min. Poté byla kolonka přemístěna do čisté mikrozkušavky a za účelem vysušení membrány proběhla centrifugace po dobu 1 min při 13 000 rpm.

Posledním krokem byla eluce RNA, která byla provedena přidáním 40  $\mu\text{l}$  RNase-free vody a centrifugace 1 min při 13 000 rpm. Po proběhlé izolaci byla změřena koncentrace a čistota RNA na nanodropu a vzorky bylo umístěny do mrazáku ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.2.8 Přepis RNA do cDNA

Přepis vzorků z RNA do cDNA byl proveden Transcriptor High Fidelity cDNA Sythesis kitem, podle návodu výrobce. Složení reakční směsi je v Tabulce 8. Vzniklá směs byla následně inkubována 10 min při  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  a po inkubaci okamžitě přenesena na led. Poté následovala reakce s reverzní transkriptázou. Celková reakční směs měla 20  $\mu\text{l}$ , její složení je uvedeno v Tabulce 9. Tato reakční směs byla inkubována 30 min při  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  s následnou deaktivací reverzní transkriptázy zahřátím na  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 min. Nakonec byla koncentrace cDNA změřena na fluorimetru Qubit a vzorky cDNA byly uloženy do mrazáku ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Tabulka 8 – Složení reakční směsi pro přepis RNA do cDNA

Složka reakční směsi	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
RNA (minimálně 2000 ng)	x
anchored-oligo(dT) <sub>18</sub> primer	1
Destilovaná voda	Doplnit do konečného objemu
Celkem	11,4

Tabulka 9 – Složení reakční směsi pro přepis RNA do cDNA

Složka reakční směsi	Objem [ $\mu\text{l}$ ]
Inkubovaná směs	11,4
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer 5x	4
Protector RNase Inhibitor	0,5
Deoxynucleotide mix (10 mM)	2
DTT	1
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1,1
Celkem	20

### 3.2.9 Kvantitativní real-time PCR (RT-qPCR)

Pro provedení qPCR byl použit 2x SYBR Master Mix. Reakční směs se skládala z 7,5 µl SYBR Master Mix, 0,4 µl F i R primeru (10 µmol/l), 15 ng cDNA a reakční směs byla doplněna vodou do celkového objemu 15 µl. RT-qPCR probíhala v termocykléru C1000 Touch – CFX96<sup>TM</sup> Real Time System. Reakční podmínky jsou uvedeny v Tabulce 10. V Tabulce 11 jsou uvedeny sekvence primerů použité pro RT-qPCR, jako referenční gen byl použit *GAPDH*.

Tabulka 10 – Podmínky RT-qPCR

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

Tabulka 11 – Sekvence primerů použitých pro RT-qPCR.

Gen	Sekvence 5'→3'	Zdroj
<i>VRN-A1</i>	F: TCCACCGAGTCATGTATGGA R: GAGAACCTTTTCTGCATAAGAA	Kippes <i>et al.</i> , 2018
<i>GAPDH</i>	F: TTAGACTTGCGAAGCCAGCA R: AAATGCCCTTGAGGTTTCCC	Sun <i>et al.</i> , 2014

### 3.2.10 Sekvenování *VRN-1* – Sangerova metoda

Sangerovou metodou došlo k sekvenování posledního 8.exonu u genů *VRN-A1* a *VRN-D1*. Sekvence primerů použitých pro amplifikaci exonu jsou uvedeny v Tabulce 12. Získané produkty PCR byly enzymaticky přečištěny metodou ExoSAP. Reakční směs pro přečištění se skládala z 1 µl PCR produktu, 0,5 µl enzymu alkalické fosfatázy (FastAP), 0,05 µl enzymu exonukleáza I a 5,45 µl 1xPCR pufru. Směs byla následně inkubována 30 min při 37 °C, poté za účelem inaktivace enzymů zahřátí na teplotu 95 °C 5 min.

Tabulka 12 – Navržené primery pro amplifikaci a sekvenování 8.exonu *VRN-A1* a *VRN-D1*.

Gen	Teplota nasedání [°C]	Délka produktu [bp]	Sekvence 5'→3'
<i>VRN-A1</i> (8. exon)	64	639	F: CAAACTCAGCCTCAAACCAGC R: AAACAACACCCAGTAGAGACGG
<i>VRN-D1</i> (8. exon)	64	617	F: ACTCAGCCTCAAACAAGCTCT R: ACATCCCCTAGAGACGGGTAT

Přečištěné amplikony byly následně použity pro sekvenační reakci pomocí BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 13, podmínky sekvenační reakce pak v Tabulce 14.

Tabulka 13 – Složení reakční směsi sekvenační reakce

Složka reakční směsi	Objem [ $\mu$ l]
5x sekvenační pufr	1,5
Big Dye	0,5
10 mM primer F nebo R	1
Přečištěný PCR produkt	X $\mu$ l (~10ng)
Destilovaná voda	Doplnit do konečného objemu
Celkem	10

Tabulka 14 – Podmínky sekvenační reakce

Krok	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
1	98	5 min	1
2	96	10 s	60
3	50	5 s	
4	60	4 min	

Sekvenační produkty byly poté přečištěny použitím magnetických kuliček Agencourt CleanSEQ Kit na automatickém robotu Biomek NX<sup>P</sup>, následovalo samotné sekvenování přístrojem 3730cl DNA Analyzer. Získané sekvence byly zpracovány v programu Geneious.

### 3.2.11 Sekvenování *VRN-1* – iSeq

Sekvenování genu *VRN-1* (*VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1*) bylo součástí projektu, který si kladl za cíl prozkoumat genetickou variabilitu tohoto genu, včetně důležitých promotorových sekvencí u ozimých a jarních odrůd hexaploidní pšenice. Vzhledem k délce genu *VRN-1* bylo jeho sekvenování rozděleno do několika částí. Mým úkolem bylo sekvenování zejména 8.exonu *VRN-A1* a *VRN-D1* (viz předchozí kapitola výše). Sekvenování ostatních částí genu *VRN-1* a následná analýza sekvencí proběhla ve spolupráci se skupinou Dr. Šafáře a budou součástí připravované publikace. Z toho důvodu je zde metodika sekvenování pomocí iSeq uvedena ve zkrácené formě. Dlouhé amplikony byly amplifikovány pomocí PrimeSTAR GXL DNA Polymerase nebo Expand Long Range, dNTPack podle pokynů výrobce. Primery použité pro amplifikaci jsou uvedeny v Tabulce 15.

PCR produkty byly přečištěny pomocí magnetických kuliček Ampure XP Beads, DNA byla kvantifikována technologií Qubit. Pro každý PCR amplikon nebo skupinu

amplikonů byla připravena knihovna k sekvenování použitím NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® s následujícími modifikacemi v postupu: 1. DNA byla fragmentována v 50 µl použitím Bioruptor Plus v cyklu 8x/30 s v nastavení „HIGH“. 2. Byla provedena velikostní selekce inzertu na velikost 500–700 bp. 3. Obohacení PCR bylo provedeno v 3-4 cyklech. Knihovny byly ekvimolárně smíchány (poolovány) a sekvenovány Illumina iSeq systémem. Tento systém produkuje velikost tzv. readů 150 bp (paired-ends). Sekvenování bylo ukončeno, když bylo dosaženo minimálně 100násobného pokrytí velikosti amplikonu (100x coverage).

Jako referenční sekvence sloužila ozimá odrůda Triple Dirk C. Zpracování sekvenačních dat bylo provedeno v rámci skupiny Dr. Šafáře.

Tabulka 15 – Sekvence primerů použitých pro amplifikaci a sekvenování genu *VRN-1*.

Region	Teplota nasedání [°C]	Amplifikace	Sekvence 5'→3'	Zdroj, technologie sekvenování
<i>VRN-A1</i> , <i>VRN-D1</i> , <i>Vrn-B1</i>	-	PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara), 2-step protocol	F: GCTGAAGCGGATCGAGAACAAGATCA R: CTGCAAGGAACAACCCGACCAA TTCAAAAG	Illumina iSeq
<i>vrn-B1</i>	65	Expand Long Range, dNTPack (Roche), HOT FIREPol DNA Polymerase (Solis BioDyne)	2F: CTCTCCTCCCTCTCTTCCGC 2R: TTGGTCACACATGTCATTCTCT 3F: ACGCACATGCCTAAAGGTGT 3R: CGCGTCTCCCTGTGAGAAAT 4F: TAGGCACGAGGAGGTGGTTA 4R: GCAACCGCAACATACACCAG	Guedira <i>et al.</i> , 2016; Illumina iSeq
<i>VRN-A1</i> promotor	60 (F1R1); 53 (F3R3); 55	HOT FIREPol DNA Polymerase (Solis BioDyne)	F1: GCCTAGTTCGACGTGTGATG R1: CTTCTGCAGTGACCAGCTTC F2: CACCGCAAAGTTTAGGGATGT R2: GAGTGGGCGCAGTGTATTTT F3: CAGCACGGCCCTATATATCG R3: AGAAGAAGGGAAAGAGCGGA F4: CCAGCCAGCATTTCCTCTTT R5: CCTGCCGGTTGATCTTGTCT	Kippes <i>et al.</i> , 2018; Sanger
<i>VRN-B1</i> promotor	60	PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara), 3-step protocol	F: AAGTGTTAGTAGGATGGGAGTGATG R: CCTTGGTGGAGAAGATGATGAGG	Illumina iSeq
<i>VRN-D1</i> promotor	63	PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara), 3-step protocol	F: TTTGACCGTGCTAAGTGGTAGTATT R: TTTCCCTTGGTGGAGAAGATGATG	Illumina iSeq

## 4 Výsledky

V této kapitole jsou představeny výsledky experimentální části diplomové práce. Výsledky jsou rozděleny do dvou částí. V první části je ve formě tabulek demonstrována postupná selekce z původního souboru odrůd až k výsledným dvěma odrůdám, které splňovaly námi kladené podmínky stanovené v cílech práce. Dále jsou v první části uvedena data z fenotypové analýzy – stanovení doby metání a také analýza genové exprese *VRN-A1*. Ve druhé části jsou pak data ze sekvenování genu *VRN-I*.

### 4.1 Analýza exprese genu *VRN-A1*

#### 4.1.1 Genotypování alel *VRN-A1*, *B1*, *D1* a určení počtu kopií genu *VRN-A1*

U odrůd, které byly pěstovány za účelem analýzy exprese genu *VRN-A1* došlo k určení alel genů *VRN-A1*, *VRN-B1* a *VRN-D1* pomocí PCR reakce a následné agarozové elektroforózy. Určení bylo provedeno u tří rostlin stejné odrůdy z toho důvodu, aby byl odhalen případný směsný vzorek obilek. V Tabulce 16 jsou uvedeny detekované alely genu *VRN-A1*, *VRN-B1* a *VRN-D1* spolu se zjištěným počtem kopií genu *VRN-A1*. Na Obrázku 5 je pak vyobrazena ukázka genotypování alely genu *VRN-A1* u několika odrůd.

V rámci tohoto experimentu bylo pracováno s jařinami a jak již bylo uvedeno v teoretické části, jařiny nesou alespoň jednu dominantní alelu některého z *VRN-I* genů, což souhlasí s výsledkem alel detekovaných v tomto experimentu – každá odrůda nesla alespoň jednu dominantní alelu pro některý z homeologů *VRN-I* genů. Nejčastěji detekovanou kombinací alel *VRN-I* byla dominantí alela *Vrn-A1a* spolu s recesivními alelami *vrn-B1* a *vrn-D1*, tuto kombinaci neslo celkem 11 odrůd (Anza, Barta, Briscard, Capta, Crespon, Katepwa, Marquis (b), Melia, Mellissos, Taichung a Zdar). Druhou nejčastější detekovanou kombinací alel *VRN-I* byla dominantí alela *Vrn-A1a*, dominantí *Vrn-B1a* a recesivní *vrn-D1*, tato kombinace byla detekována u 9 odrůd (Artemovka, Baroota, Centennial, Combination, Eurotas, Gai Printemps, Marquis, Oreburskaja a Rex-Vilmorin), tyto odrůdy tedy nesly hned 2 dominantí alely pro *VRN-I* gen. Celkem 6 odrůd neslo kombinaci dominantní alely *Vrn-A1a* a *Vrn-B1c* a recesivní *vrn-D1* (Bastion, Branišovická, Kolchoznica, Kompolti, Kurskaya a Paragon). Z toho vyplývá, že většina testovaných odrůd nesla dominantní alelu *Vrn-A1a*. Detekována u několika odrůd byla také kombinace s recesivními alelami *vrn-A1* a *vrn-D1* s dominantní *Vrn-B1a* – 5 odrůd (Almansor, Aurore, Carola, Dardo, Rescue), u odrůd Loosdorfer a Pyrothrix byly detekovány recesivní alely *vrn-A1*, *vrn-D1* a dominantní *Vrn-B1c*. Nejméně zastoupenou dominantní alelou pak byla *Vrn-D1*, ta se objevila u odrůdy Chianti v kombinaci s dominantní alelou *Vrn-A1a* a recesivní *vrn-B1*. Dvě odrůdy (I BO a VL-30) pak nesly

samostanou dominantí alelu *Vrn-D1* a recesivní alely *vrn-A1* a *vrn-B1*.

Jak již bylo zmíněno výše, Tabulka 13 obsahuje také informace o počtu zjištěných kopií genu *VRN-A1*. Naprostá většina odrůd analyzovaných v tomto experimentu nesla jednu kopii genu *VRN-A1* – jednalo se celkem o 19 odrůd. Celkem 15 odrůd pak neslo 2 kopie tohoto genu. Maximální počet detekovaných kopií genu *VRN-A1* byly tři kopie, ty nesly 2 odrůdy (VL30 a Loosdorfer). V tabulce jsou vždy stejně barevně vyznačeny odrůdy, které nesou stejnou kombinaci alel.

Na základě detekovaných alel a zjištěných počtu kopií genu byly poté identifikovány odrůdy, které mohly potenciálně splňovat námi kladené podmínky v cílech práce. Z kapacitních důvodů pro provedení fenotypového experimentu bylo vybráno vždy jen několik odrůd, které nesly stejnou kombinaci alel *VRN-I*, nesly dominantní alelu *Vrn-A1a* a a lišily se kopiemi genu *VRN-A1*.

Tabulka 16 – Určení alel *VRN-A1*, *VRN-B1* a *VRN-D1* u testovaných odrůd společně se zjištěným počtem kopií genu *VRN-A1*. Barevně jsou označeny odrůdy, které nesou stejnou sestavu alel. Odrůdy, které podbarveny nejsou se buď v rámci 3 testovaných rostlin vzájemně lišily v počtu kopií genu *VRN-A1* nebo kombinaci alel *VRN-I*, pravděpodobně se tedy jednalo o směsné vzorky.

Odrůda	Počet kopií <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-B1</i>	Alela <i>VRN-D1</i>
Almansor-1	1	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Almansor-2	1	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Almansor-3	1	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Aurore-1	1	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Aurore-2	1	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Aurore-3	1	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Carola-1	2	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Carola-2	2	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Carola-3	2	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Dardo-1	2	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Dardo-2	2	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Rescue-1	2	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Rescue-2	2	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Rescue-3	2	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Anza-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Anza-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Anza-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Barta-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Barta-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Barta-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Briscard-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Briscard-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Briscard-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Capta-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Capta-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Capta-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Crespon-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Crespon-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>

Tabulka 16 – Určení alel *VRN-A1*, *VRN-B1* a *VRN-D1* u testovaných odrůd společně se zjištěným počtem kopií genu *VRN-A1*. (pokračování)

Odrůda	Počet kopií <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-B1</i>	Alela <i>VRN-D1</i>
Crespon-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Katepwa-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Katepwa-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Katepwa-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Marquis (b)-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Marquis (b)-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Marquis (b)-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Melia-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Melia-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Melissos-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Melissos-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Melissos-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Taichung-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Taichung-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Taichung-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Zdar-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Zdar-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Zdar-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Artemovka-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Artemovka-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Baroota 8791-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Baroota 8791-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Baroota 8791-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Centennial-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Centennial-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Centennial-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Combination-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Combination-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Eurotas-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Eurotas-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Eurotas-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Gai Printemps-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Gai Printemps-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Gai Printemps-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Marquis-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Marquis-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Marquis-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Orenburgskaja-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Rex Vilmorin-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Rex Vilmorin-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Rex Vilmorin-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Bastion-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Bastion-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Bastion-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Branišovická-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Branišovická-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Branišovická-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Kolchoznica-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>



Tabulka 16 – Určení alel *VRN-A1*, *VRN-B1* a *VRN-D1* u testovaných odrůd společně se zjištěným počtem kopií genu *VRN-A1*. (pokračování)

Odrůda	Počet kopií <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-B1</i>	Alela <i>VRN-D1</i>
Kompolti-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Kompolti-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Kompolti-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Kurskaya263-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Kurskaya263-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Kurskaya263-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Paragon-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Paragon-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Paragon-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Chianti-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>
Chianti-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>
Chianti-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>
I BO 5/377-1	2	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>
I BO 5/377-2	2	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>
I BO 5/377-3	2	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>
VL30-1	3	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>
VL30-2	3	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>
VL30-3	3	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>
Loosdorfer-1	3	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Loosdorfer-2	3	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Loosdorfer-3	3	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Pyrothrix 28-1	2	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Pyrothrix 28-2	2	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Pyrothrix 28-3	2	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Chanate-1	mutace	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Chanate-2	mutace	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Chanate-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Dragon-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Dragon-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Dragon-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
He460c-1	1	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>Vrn-D1</i>
He460c-2	1	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
He460c-3	1	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Karagadinsjaka-1	3	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Karagadinskaja-2	1	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Karagadinskaja-3	3	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>
Mongolia-1	3	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>
Mongolia-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>
Mongolia-3	3	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1</i>
Peragis-1	3	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Peragis-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Peragis-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Reliance-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Reliance-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>
Reliance-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>



Obrázek 5 – Ukázka genotypování alel pro gen *VRN-A1*, L značí velikostní marker, pod separovanými PCR produkty je seznam testovaných odrůd.

První skupinou potenciálně vhodných odrůd pro analýzu genové exprese byly odrůdy Artemovka, Baroota 8791 a Centennial, které nesly dominantní alely *Vrn-A1a*, *Vrn-B1a* a recesivní alelu *vrn-D1*. Odrůdy Artemovka a Baroota 8791 nesly 2 kopie genu *VRN-A1*, Centennial nesla 1 kopii tohoto genu. U těchto odrůd byla provedena genotypizace genu *PPD-D1* a bylo zjištěno, že zatímco alely Artemovka a Baroota 8791 nesly alelu *Ppd-D1b*, Centennial nesla alelu odlišnou – *Ppd-D1a* (Tab. 17). Artemovka a Baroota 8791 tedy sice nesly alelu shodnou i pro gen *PPD-D1*, zároveň ale měly také stejný počet kopií genu *VRN-1* a tak nebyly vhodné pro analýzu genové exprese *VRN-A1*.

Tabulka 17 – Přehled detekovaných alel *VRN-1* a *PPD-D1* u odrůd Artemovka, Baroota 8791 a Centennial.

Odrůda	Počet kopií <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-B1</i>	Alela <i>VRN-D1</i>	Alela <i>PPD-D1</i>
Artemovka-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Artemovka-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Baroota 8791-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Baroota 8791-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Baroota 8791-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Centennial-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<b><i>Ppd-D1a</i></b>
Centennial-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<b><i>Ppd-D1a</i></b>
Centennial-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<b><i>Ppd-D1a</i></b>

Další skupinou odrůd, které byly identifikovány jako potenciálně vhodné pro analýzu genové exprese *VRN-A1* byly odrůdy Bastion a Branišovická, které nesly kombinaci dominantních alel *Vrn-A1a*, *Vrn-B1c* a recesivní alelu *vrn-D1*. Odrůdy se také lišily v počtu kopií genu *VRN-A1*, Branišovická nesla 2 kopie tohoto genu, zatímco Bastion 1 kopii. Genotypováním bylo zjištěno, že obě odrůdy nesou shodnou alelu – *Ppd-D1b* (Tab.18) a jsou tak vhodné pro analýzu genové exprese.

Tabulka 18 – Přehled detekovaných alel *VRN-1* a *PPD-D1* u odrůd Bastion a Branišovická.

Odrůda	Počet kopií <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-B1</i>	Alela <i>VRN-D1</i>	Alela <i>PPD-D1</i>
Branišovická-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Branišovická-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Bastion-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Bastion-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Bastion-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>

Poslední skupinou odrůd, které byly vybrány jako vhodné pro analýzu genové exprese byly odrůdy Zdar, Marquis (b) a Melia, nesoucí kombinaci dominantní alely *Vrn-A1a* a dvou recesivních alel – *vrn-B1* a *vrn-D1*. Odrůdy Zdar a Marquis (b) nesly 2 kopie genu *VRN-A1*, odrůda Melia 1 kopii. Také u této skupiny došlo k určení alely *PPD-D1* a bylo zjištěno, že odrůdy Zdar a Marquis (b) nesly shodně alelu *Ppd-D1b*, zatímco odrůda Melia nesla alelu *Ppd-D1a* (Tab.19). Z toho vyplynulo, že tato skupina odrůd nebyla vhodná pro analýzu genové exprese *VRN-A1*.

Tabulka 19 – Přehled detekovaných alel *VRN-1* a *PPD-D1* u odrůd Zdar, Marquis (b) a Melia.

Odrůda	Počet kopií <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-B1</i>	Alela <i>VRN-D1</i>	Alela <i>PPD-D1</i>
Zdar-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Zdar-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Marquis (b)-1	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Marquis (b)-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Marquis (b)-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>
Melia-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<b><i>Ppd-D1a</i></b>
Melia-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<b><i>Ppd-D1a</i></b>

Po vyhodnocení alelické specifikace *PPD-D1* u vybraných odrůd vyplynulo, že vhodnými odrůdami pro analýzu genové exprese *VRN-A1* jsou Bastion a Branišovická. Tyto odrůdy měly stejnou alelickou sestavu *VRN-1*, zároveň se lišily v počtu kopií genu *VRN-A1* a nesly také stejnou alelu *PPD-D1*. Proto u těchto odrůd ještě proběhlo genotypování alel *PPD-A1* a také zjištění počtu kopií genu *PPD-B1*. Analýza počtu kopií genu *PPD-B1* ukázala, že obě odrůdy shodně nesly 1 kopii tohoto genu (Tab. 20). Tyto dvě odrůdy tedy nesly shodnou sestavu alel pro geny *VRN-1*, shodný počet kopií genu *PPD-B1* a zároveň se lišily v počtu kopií genu *VRN-A1* a byly tedy vhodné pro analýzu genové exprese *VRN-A1*.

Tabulka 20 - Přehled detekovaných alel *VRN-1* a *PPD-1* u odrůd Bastion a Branišovická. V tabulce je také uveden počet kopií genu *VRN-A1*, počet kopií genu *PPD-B1* je uveden v závorce za alelou *Ppd-B1*.

Odrůda	Počet kopií <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-A1</i>	Alela <i>VRN-B1</i>	Alela <i>VRN-D1</i>	Alela <i>PPD-D1</i>	Alela <i>PPD-B1</i>	Alela <i>PPD-A1</i>
Branišovická-2	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	<i>Ppd-B1 (1)</i>	<i>Ppd-A1a</i>
Branišovická-3	2	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	<i>Ppd-B1 (1)</i>	<i>Ppd-A1a</i>
Bastion-1	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	<i>Ppd-B1 (1)</i>	<i>Ppd-A1a</i>
Bastion-2	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	<i>Ppd-B1 (1)</i>	<i>Ppd-A1a</i>
Bastion-3	1	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1c</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	<i>Ppd-B1 (1)</i>	<i>Ppd-A1a</i>

#### 4.1.2 Fenotypová analýza odrůd Bastion a Branišovická

Odrůdy Bastion a Branišovická splňovaly kladené podmínky pro analýzu genové exprese *VRN-A1*. Za účelem zjištění, zda odlišný počet kopií genu *VRN-A1* má nějaký vliv na fenotyp, byly tyto dvě odrůdy vysázeny a pěstovány za kontrolovaných podmínek. Byla stanovena doba metání. Poté co rostliny vymetaly došlo k vypočtení počtu dnů potřebných k vymetání a ke statistickému zhodnocení, zda mezi metáním těchto dvou odrůd byl statisticky významný rozdíl. Na Obrázku 6 je výsledek statistické analýzy doby metání odrůd Bastion a Branišovická metodou ONE-way ANOVA s následným Tukey HSD testem. Statistická analýza byla provedena programem Minitab 18 (<https://www.minitab.com/en-us/>).

#### Tukey Pairwise Comparisons

##### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

variety	N	Mean	Grouping
Branisovicka	16	64,56	A
Bastion	17	59,647	B

N – počet hodnocených rostlin  
Mean – průměrný počet dnů potřebných k vymetání

*Means that do not share a letter are significantly different.*

Obrázek 6 – Statistická analýza doby metání odrůdy Bastion a Branišovická, výstup pochází ze softwaru Minitab18.

Statistická analýza prokázala, že rozdíl mezi metáním Bastionu a Branišovické byl statisticky signifikantní, průměrná doba potřebná k vymetání u odrůdy Branišovická byla (po zaokrouhlení) 65 dnů. Naproti tomu odrůda Bastion metala dříve, její průměrný počet dnů potřebných k vymetání činil 60 dnů, odrůda Bastion tedy metala asi o 5 dnů dříve než Branišovická. Obě tyto odrůdy byly pěstovány za stejných kontrolovaných podmínek. Bastion a Branišovická nesou stejnou sestavu alel *VRN-1* a *PPD-1*, a zároveň se liší počtem kopií genu *VRN-A1*, z čehož lze usuzovat, že počet kopií genu *VRN-A1* mohl mít

vliv na dobu metání. Odrůda Bastion nese jednu kopii genu *VRN-A1*, zatímco odrůda Branišovická nese dvě kopie tohoto genu, v tomto provedeném experimentu tedy odrůda s jednou kopií metala signifikantně dříve než odrůda se 2 kopiemi.

Tento výsledek byl překvapivý z toho důvodu, že se předpokládalo dřívější metání odrůdy se dvěma kopiemi, protože *Vrn-A1a* má vysokou úroveň transkripce. Proto byl experiment ještě jednou zopakován za účelem ověření pozorovaného jevu a analýzy exprese genu *VRN-A1*. Z tohoto důvodu jsou výsledky této fenotypové analýzy uvedeny v podkapitole Analýza genové exprese *VRN-A1*.

#### **4.1.3 Analýza genové exprese *VRN-A1***

Za účelem analýzy genové exprese *VRN-A1* byly z pěstovaných rostlin odrůd Bastion a Branišovická odebrány části listových segmentů. První odběr proběhl ve fázi prvního listu (po 7 dnech od vysazení). Jeden vzorek byl vždy tvořen odběrem ze tří rostlin tzv. poolování. Další odběr nastal po 10 dnech ve fázi 3 listů. Třetí plánovaný odběr bohužel nebyl proveden z důvodu technické závady na fytotronu. Poté následovala izolace RNA, přepis do cDNA a RT-qPCR. U těchto pěstovaných rostlin došlo opět k analýze metodou ONE-way ANOVA s následným Tukey HSD testem.

Na Obrázku 7 je výsledek statistické analýzy doby metání u rostlin použitých k analýze exprese. V případě odrůdy Branišovická byla průměrná doba metání u vzorku Branišovická-1 63 dnů, v případě druhého vzorku se jednalo o 66 dnů – podobně jako u prvního provedení fenotypové analýzy. Odrůda Bastion metala stejně jako v pilotním fenotypovém experimentu dříve než Branišovická – vzorek Bastion-1 průměrně metal 59 dnů od vysazení, u druhého vzorku to bylo průměrně 60 dnů po vysazení – opět podobně jako u prvního opakování. Po statickém zhodnocení se vzorek Branišovická-2 signifikantně lišil od obou vzorků Bastion a zároveň se nelišil od vzorku Branišovická-2. Vzorek Branišovická-1 se od vzorku Bastion-2 signifikantně v metání nelišil, v případě jeho srovnání se vzorkem Bastion-1 se ale už jednalo o signifikantní rozdíl.

I v tomto případě odrůda Bastion nesoucí 1 kopii genu *VRN-A1* metala dříve než odrůda Branišovická, která má 2 kopie tohoto genu.

### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Variety	N	Mean	Grouping	
Branisovicka-2	3	66,33	A	
Branisovicka-1	3	62,667	A	B
Bastion-2	3	59,667	B	
Bastion-1	3	58,667	B	

N – počet hodnocených rostlin  
Mean – průměrný počet dnů  
potřebných k vymetání

*Means that do not share a letter are significantly different.*

Obrázek 7 – Statistická analýza doby metání odrůdy Bastion a Branišovická pomocí Tukeyovy metody, výstup pochází ze softwaru Minitab18.

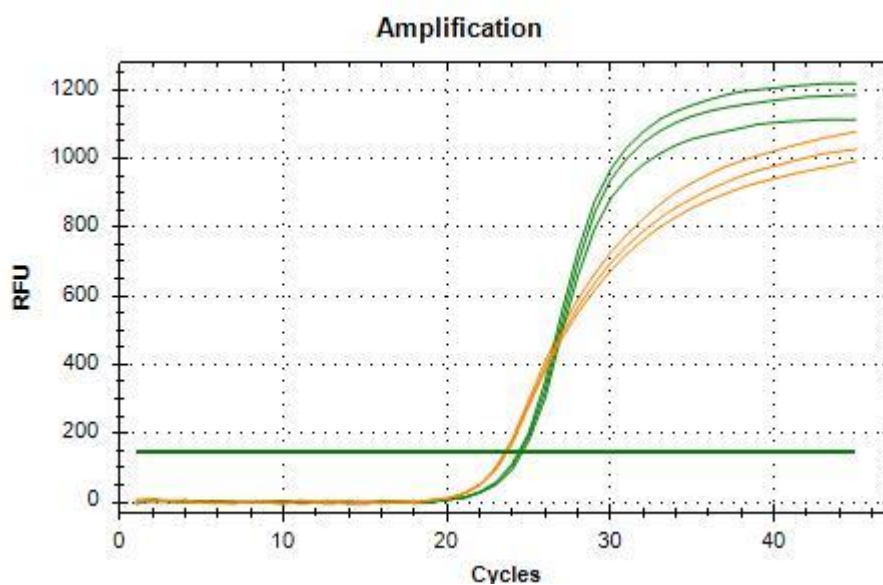
Analýza exprese genu *VRN-A1* proběhla pomocí RT-qPCR, jako referenční gen sloužil *GAPDH*. Byla provedena analýza exprese ve 2 vývojových fázích rostlin. Za použití CFX Maestro Software proběhla analýza RT-qPCR reakce a vyhodnocení úrovně relativní exprese ve formě sloupcového grafu u jednotlivých vzorků. Specificita vznikajících produktů byla ověřena analýzou křivek teploty tání, každý hodnocený vzorek byl ve třech technických replikátech.

Vyhodnocení exprese genu *VRN-A1* ukázalo na zajímavé trendy u odrůd Bastion a Branišovická. Na Obrázku 8 je ukázka průběhu RT-qPCR. Grafické znázornění úrovně exprese ve formě sloupcových grafů je na Obrázku 9. U vzorku Bastion-1 byla relativní míra exprese v případě stádia rostlin v prvním listu okolo hodnoty  $0,71 \pm 0,21$ , po 10 dnech se exprese genu *VRN-A* zvýšila na hodnotu  $0,94 \pm 0,12$ . Stejný trend nastal také u druhého vzorku – Bastion-2, kde byla počáteční míra relativní exprese okolo hodnoty  $0,61 \pm 0,05$ , po 10 dnech došlo ještě k většímu nárůstu exprese než v případě vzorku Bastion-1 – relativní míra exprese dosahovala hodnoty  $1,17 \pm 0,15$ . U odrůdy Bastion tedy docházelo k tomu, že v průběhu vývoje rostliny docházelo k růstu exprese genu *VRN-A1*.

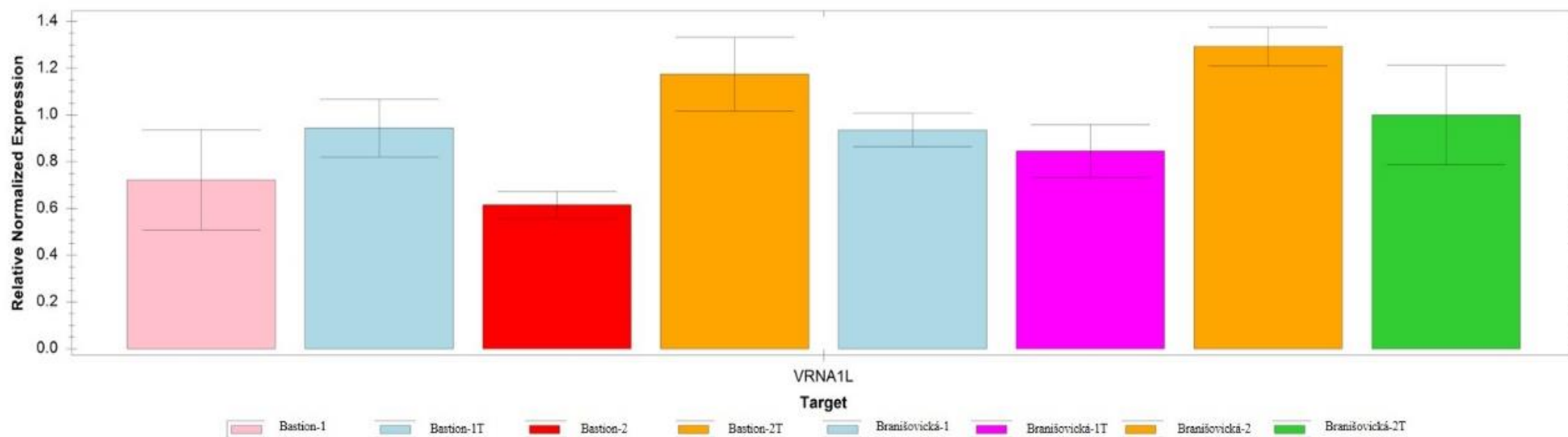
V případě odrůdy Branišovická byl trend proměny exprese v čase jiný. U vzorku Branišovická-1 dosahovala počáteční míra exprese hodnoty  $0,93 \pm 0,07$ , nicméně po 10 dnech, kdy byly rostliny ve fázi 3 listů došlo u vzorku Branišovická-1 k mírnému poklesu relativní míry exprese na hodnotu  $0,84 \pm 0,11$ . Analýza exprese u vzorku Branišovická-2 ukázala, že i zde docházelo ke snížení exprese *VRN-A1*. Počáteční hodnota se u tohoto vzorku pohybovala na hodnotě  $1,29 \pm 0,08$ , nicméně po 10 dnech hodnota exprese klesla na hodnotu  $0,98 \pm 0,21$ . Pro odrůdu Branišovická byl tedy trend exprese takový, že u těchto rostlin v průběhu vývoje exprese genu *VRN-A1* stagnovala a měla spíše klesající charakter.

Zároveň je také z grafického znázornění viditelné, že počáteční hodnoty exprese u

odrůdy Branišovická byly v obou případech vyšší než u Bastionu. Nicméně v průběhu vývoje rostliny u Bastionu docházelo k nárůstu exprese a u Branišovické naopak ke stagnaci až poklesu. Z fenotypové analýzy vyplynulo, že odrůda Bastion metá průměrně o několik dní dříve než Branišovická. Vzhledem k tomu, že gen *VRN-A1* má na metání značný vliv, souhlasí výsledky získané z analýzy exprese *VRN-A1* s fenotypovou analýzou – u Bastionu metajícího dříve dochází v průběhu času ke zvyšování exprese a může to být jeden z důvodů, proč u Branišovické – metající později, exprese *VRN-A1* stagnuje/klesá. Je také zajímavé, že právě u Bastionu nesoucího jednu kopii genu *VRN-A1* k tomuto zvyšování docházelo, zatímco Branišovická, která má kopie tohoto genu dvě exprese klesala.



Obrázek 8 – Ukázka RT-qPCR při analýze exprese genu *VRN-A1*. V grafu je zobrazen vzorek odrůdy Branišovická v rámci triplikátu. (Zelená amplifikační křivka odpovídá amplifikaci genu *VRN-A1*, oranžová křivka pak referenčnímu genu *GAPDH*, grafický výstup pochází z programu Bio-Rad CFX Maestro)



Obrázek 9 – Vyhodnocení exprese genu *VRN-A1* u jednotlivých vzorků odrůd Bastion a Branišovická. Jako referenční gen byl použit *GAPDH*. Vzorky, které byly odebrány ve fázi prvního listu jsou označeny čísly, vzorky odebrané ve fázi tří listů jsou označeny čísly a písmenem T. Expresse byla analyzována pomocí CFX Maestro Software.

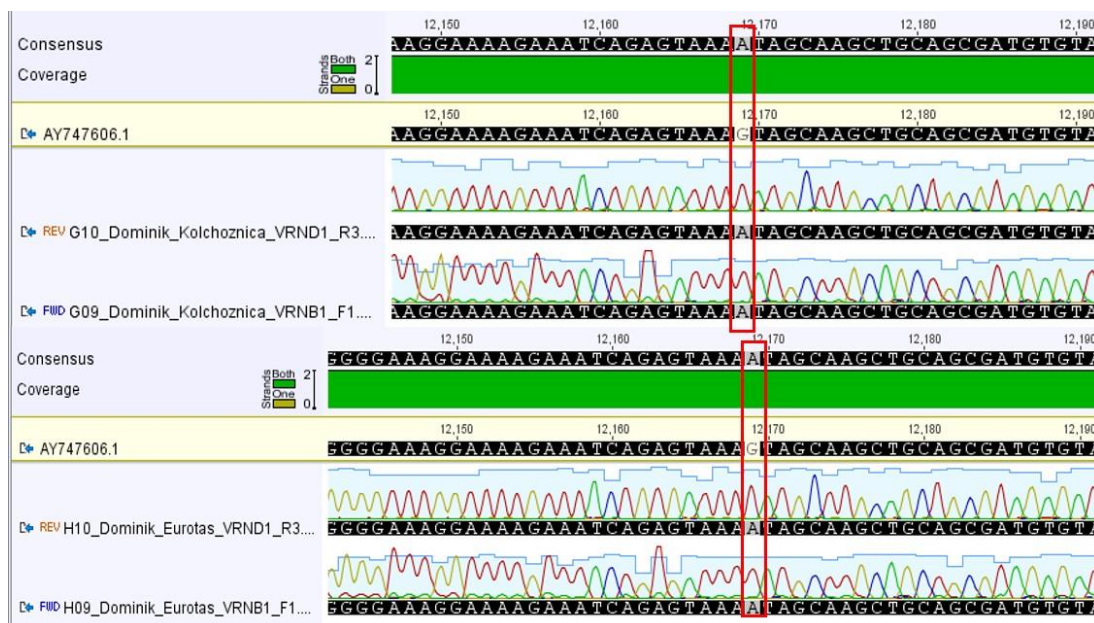


## 4.2 Sekvenování genu *VRN-1*

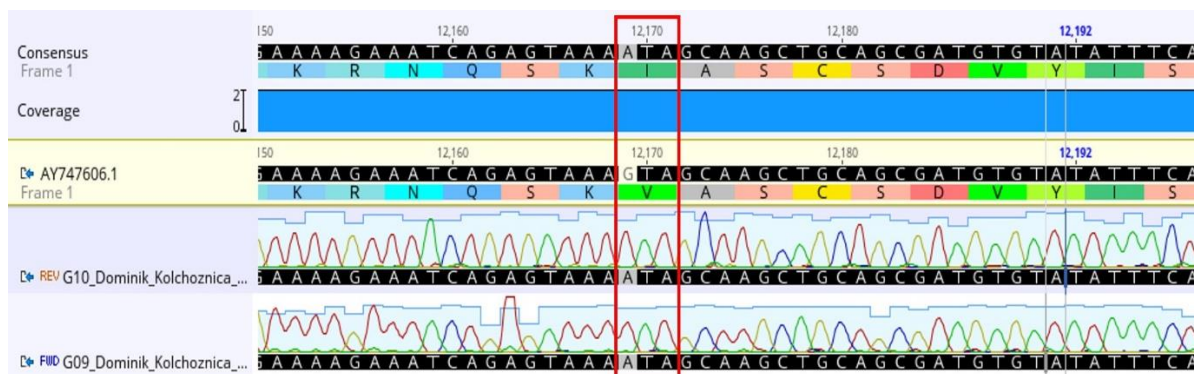
### 4.2.1 Sekvenování genu *VRN-1* – Sangerova metoda

Sangerovou metodou došlo k sekvenování posledního 8.exonu u genů *VRN-A1* a *VRN-D1* za účelem porovnání s referenční sekvencí a případného zjištění polymorfismů v sekvencích. Jako referenční sekvence sloužila pro *VRN-A1*: *Triticum aestivum* cultivar Triple Dirk C line *VRN-A1* (GenBank: AY747600.1) a pro *VRN-D1*: *Triticum aestivum* cultivar Triple Dirk C line *VRN-D1* (GenBank: AY747606.1). Sekvence byly porovnány v programu Geneious. Celkem bylo sekvenováno 33 jařin a 70 ozimů.

V sekvencích 8.exonu nebyly u žádné analyzované odrůdy v případě genu *VRN-A1* nalezeny jakékoliv polymorfismy ve srovnání s referenční sekvencí. V případě sekvenování 8.exonu *VRN-D1* byla u dvou odrůd – Kolchoznica a Eurotas na pozici 12 169 nalezena mutace (jednonukleotidový polymorfismus, SNP) kde se místo guaninu nacházel adenin (**G12169A**), a tím se také zaměnila aminokyselina (valin → isoleucin) v proteinu VRN-D1. Identifikované polymorfismy jsou zobrazeny na obrázcích 10 a 11. Žádné jiné další polymorfismy nebyly v případě 8.exonu *VRN-1* nalezeny.



Obrázek 10 – Část sekvence 8. exonu *VRN-D1* zobrazující substituci guaninu za adenin ve srovnání s referenční sekvencí.



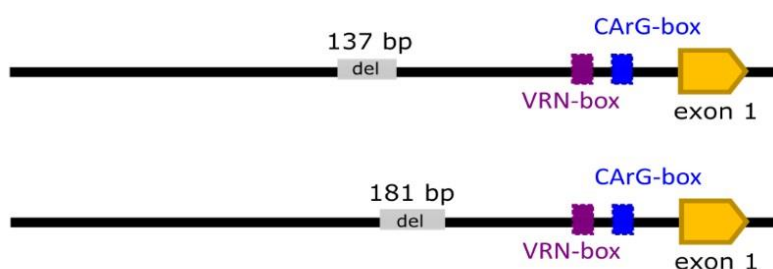
Obrázek 11 – Část sekvence 8.exonu *VRN-D1* zobrazující záměnu aminokyseliny v proteinu VRN-D1 způsobenou substitucí ve srovnání s referenční sekvencí. Zpracováno v software Geneious.

#### 4.2.2 Sekvenování *VRN-1* – iSeq

Metodou Illumina iSeq bylo sekvenováno 70 ozimých a 33 jařiných odrůd *Triticum aestivum*, jako referenční sekvence sloužila ozimá odrůda Triple Dirk C. Jak bylo již uvedeno v metodické části práce, sekvenování *VRN-1* bylo součástí projektu ve spolupráci se skupinou Dr. Šafáře, veškeré výsledky budou součástí připravované publikace, a tak jsou ve výsledkové části uvedeny jen některé zjištěné polymorfismy.

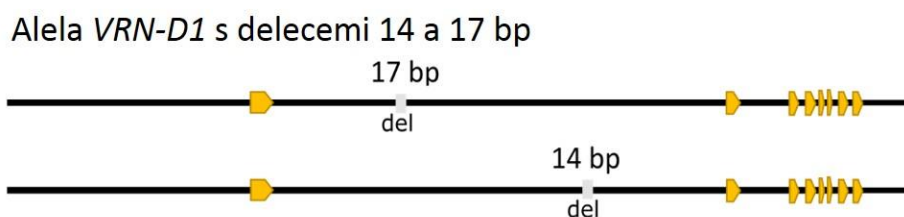
V rámci sekvenování genu *VRN-1* a jeho jednotlivých homeologů technologií Illumina iSeq se podařilo identifikovat významné odlišnosti v sekvenci ve srovnání s referenční sekvencí. Jednalo se například o odlišnosti v sekvenci promotoru genu *VRN-A1* – byly identifikovány varianty promotoru obsahující 137 bp a 181 bp dlouhé delece. U odrůdy Ludwig nesoucí 3 kopie *vrn-A1* byly identifikovány obě varianty delece – 137 i 181. bp. Schéma zobrazující identifikované delece je na Obrázku 12.

#### Promotor *VRN-A1* s delecí 137 a 181 bp



Obrázek 12 – Schématické zobrazení identifikovaných delecí v promotoru *VRN-A1*. Delece jsou vyobrazeny jako šedé obdelníky.

Dalším významným polymorfismem, který se podařilo při sekvenování *VRN-1* identifikovat byly delece u *VRN-D1*. Ze sekvenovaných odrůd byly tyto delece identifikovány u 23 z nich. Celkem u 13 odrůd byla identifikována delece 17 bp a u 10 odrůd 14 bp delece. Obě tyto delece se nacházely v prvním intronu a byly přítomny jak u dominantní, tak recesivní alely *VRN-D1*. Schéma zobrazující identifikované delece je na Obrázku 13.



Obrázek 13 – Schématické zobrazení identifikovaných delecí v prvním intronu *VRN-D1*. Delece jsou vyobrazeny jako šedé obdelníky, žluté mnohoúhelníky zobrazují exony.

## 5 Diskuse

Vhodné načasování metání u pšenice v průběhu roku je velmi důležitou adaptivní vlastností, která ovlivňuje reprodukční úspěch rostliny a je kritická pro výnos této plodiny – rostliny tak předcházejí nepříznivým klimatickým podmínkám. Šlechtění pšenice umožňuje modifikovat i tuto vlastnost, a tak mohou rostliny růst produktivně v různých geografických oblastech. U několika stěžejních genů ovlivňujících kvetení pšenice byly identifikovány mutantní alely, které mají změny v sekvencích jako inserce, delece nebo bodové mutace (Fu *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009).

Díaz *et al.* (2012) podrobněji studovali geny regulující kvetení pšenice (alely *PPD-B1* a *VRN-A1*) u takových variet, pro které nebyly v sekvencích těchto genů nalezeny žádné mutace. Jejich výzkum ukázal, že variabilita v době metání nemusí být způsobena jen sekvenčními změnami, ale také počtem kopií daného genu. Různý počet kopií vedl také ke změnám k expresi – jak v případě *VRN-A1*, tak také *PPD-B1*. Gen *VRN-A1* byl zkoumán na ozimých odrůdách Claire, Malacca a Hereward a bylo zjištěno, že odrůdy s větším počtem kopií genu *VRN-A1* vyžadují delší dobu vernalizace, toto také silně korelovalo s rozdíly v době kvetení – například tedy odrůda Hereward nesoucí 3 kopie alely *vrn-A1* vymetala po 10 týdnech vernalizace za 50 dnů, odrůdě Claire nesoucí 1 kopii této alely stačilo k vymetání za 50 dnů pouze 6 týdnů vernalizace. Analýza exprese *VRN-A1* u ozimých odrůd ukázala, že exprese se v průběhu času nejintenzivněji zvyšovala u odrůdy Claire (1 kopie), nejméně v případě Hereward (3 kopie). Mezi nimi byla odrůda Malacca (2 kopie) a byl zde jasně viditelný trend, že zvýšený počet kopií vedl k pomalejší indukci exprese, což bylo konzistentní s pozorovanými rozdíly v metání. V této diplomové práci bylo v případě analýzy exprese *VRN-A1* pracováno s jařinami, které nemají žádný nebo jen minimální vernalizační nárok, nicméně i u jařin byl pozorovatelný vliv více kopií genu *VRN-A1*. Podle Díaz *et al.*, (2012) vede zvýšený počet kopií alely *vrn-A1* k potřebě delšího vernalizačního nároku, tedy delší době vystavení nízkým teplotám v porovnání s ostatními odrůdami, a také u exprese dochází u odrůd s více kopiemi *VRN-A1* k pomalejší indukci. U jařin v našem experimentu jsme pozorovali, že odrůda Branišovická s vyšším počtem kopií alely *Vrn-A1a* (2 kopie) metala signifikantně později než odrůda Bastion s jednou kopií této alely (Obr. 6 a 7). U exprese byla naopak počáteční hodnota vyšší u odrůdy Branišovická (2 kopie) než Bastion (1 kopie) nicméně v průběhu času u Bastionu úroveň exprese rostla, zatímco u Branišovické k růstu nedocházelo (Obr.9).

Dominantní *VRN-1* alely, které determinují jarní růstový typ nesou mutace v oblasti promotoru a prvního intronu.

Ze 3 homeologních *VRN-1* genů byl polymorfismus v kódující sekvenci recesivní alely (způsobující zimní typ růstový typ) identifikován jen pro *VRN-A1* gen. Na základě nukleotidu nacházejícího se v pozici 20 bp čtvrtého exonu *VRN-A1* se rozlišují haplotypy C (Ex4C, divoký typ) a T (Ex4T, mutantní typ) (Chen *et al.*, 2009). Mutace způsobená přechodem „C-> T“ v exonu 4 *VRN-A1* vede k nahrazení leucinu fenylalaninem v aminokyselinové sekvenci. Na základě předchozích studií je tento polymorfismus spojován se změnou počtu dní, kdy dochází k prodlužování stonků, doby trvání vernalizačního požadavku, mrazuvzdornosti a doby kvetení ozimé pšenice *T. aestivum*. Dalším důležitým jednonukleotidovým polymorfismem (SNP) v sekvenci kódující *VRN-A1* je přechod „C-> T“ v exonu 7, který vede k nahrazení alaninu za valin v aminokyselinové sekvenci (Sherman *et al.*, 2004). Navzdory lokalizaci této mutace na C-konci proteinu *VRN-A1*, kde nebyly identifikovány žádné funkční domény, je polymorfismus v tomto místě spojen se změnou doby trvání vernalizačního požadavku a doby kvetení pšenice. Dále bylo zjištěno, že mutace Ala180 / Val180 ve *VRN-A1* ovlivňuje interakci tohoto proteinu s produktem genu *TaHOX1*, což ovlivňuje dobu kvetení (Li *et al.*, 2013). Muterko a Salina (2018) při analýze distribuce *VRN-A1* exon 4 haplotypů u 12 tetraploidních a hexaploidních odrůd a různých *VRN-A1* alel zjistili, že mutantní typ exonu 4 se nacházel jen v hexaploidní pšenici s recesivní *vrn-a1* alelou a pouze v kombinaci s intaktní verzí exonu 4 (Ex4C) tohoto genu (v případě alespoň 2 kopií *VRN-A1*). V této studii Muterko a Salina také analyzovali polymorfismus exonu 7. Odrůdy hexaploidní pšenice, které nesly oba haplotypy exonu 4 (tzn. alespoň 2 kopie *VRN-A1*) měly zároveň mutantní variantu exonu 7. V předchozích studiích bylo uváděno, že haplotyp Ex7C převažuje u jařin, zatímco haplotyp Ex7T u ozimů. V této studii Muterka bylo zjištěno, že všechny zkoumané alely *Vrn-A1a* nesou Ex7C haplotyp. Tyto různé kombinace haplotypů exonu 4 a 7 ve spojení s různým počtem kopií genu *VRN-A1* zřejmě přispívají k vysoké adaptabilitě pšenice v různých podmínkách a tím k rozšíření pšenice po celém světě.

Muterko a Salina (2019) taktéž zkoumali počet kopií genu *VRN-A1* nejen u různých ozimých, ale i jarních odrůd pšenice. Vyvinuli vlastní metodu pro zjišťování počtu kopií – tato metoda se liší od analýzy s využitím TaqMan sondy, pomocí které byl zjišťován počet kopií genu v této diplomové práci. Jejich metoda byla založena na kvantifikaci PCR fragmentů a verifikována qPCR – podle nich by pro řádné zjištění počtu kopií mělo dojít

k fragmentaci templátové DNA. Vůbec poprvé ukázali, že u analyzovaných odrůd byla dominantní alela *Vrn-A1a* nejčastěji duplikována u hexaploidní pšenice, u tetraploidní pšenice byly dominantní i recesivní alela v jedné kopii, pouze u dvou tetraploidů byla recesivní alela duplikována. Také si všimli, že multiplikace *VRN-A1* vedla k bezosinným klasům, v případě odrůd analyzovaných v této diplomové práci měla odrůda Branišovická (2 kopie) osinatý klas. V práci Muterka a Saliny byla také identifikována duplikace genu *VRN-B1* u *T.compactum* a *T.spelta*, tyto výsledky tedy dále rozšiřují znalosti a genetické diverzity *VRN-1* genů u pšenice. U žádné ze zkoumaných odrůd nezaznamenali více než 2 kopie *Vrn-A1a*.

V současné době se jedná o jedinou publikovanou práci, kde bylo v rámci analýzy genu *VRN-A1* a vlivu více kopií tohoto genu pracováno i s jařinými odrůdami, ovšem nebyla provedena analýza fenotypu nebo exprese u těchto odrůd. V této diplomové práci se tedy nacházejí zcela originální výsledky. Zjištění Muterka a Saliny, kdy neidentifikovali více než 2 kopie dominantní alely *Vrn-A1a* souhlasí s našimi zjištěními – maximální počet kopií genu *VRN-A1* s dominantní alelou *Vrn-A1a* u testovaných odrůd byly právě 2 kopie. Vzhledem ke skutečnosti, že alela *Vrn-A1a* má vysokou bazální úroveň transkripce je možné spekulovat, že rostlina je pravděpodobně zahlcena transkriptem produkovaným větším počtem kopií alely *Vrn-A1a* a v důsledku toho dochází ve srovnání s jařinami s jednou kopií k pozdějšímu metání a stagnující úrovni exprese *Vrn-A1a*. Lze se domnívat, že rostliny nesoucí více než dvě kopie *Vrn-A1a* byly během evoluce znevýhodněny. K tomuto by bylo ale potřeba provést další výzkum, roli můžou hrát i klimatické podmínky (polní experiment) nebo také samotná struktura více kopií genu *VRN-A1* – zda se jedná o identické kopie nebo se od sebe liší jako například v případě haplotypu C-T.

V rámci sekvenování genu *VRN-1* bylo sekvenováno 103 odrůd hexaploidní pšenice, aby bylo pokryto širokého spektra možných alelických variant. Jako referenční sekvence byla vybrána ozimá odrůda Triple Dirk C. Dominantní alely definující jarní typ růstu se vyvinuly z původní recesivní alely určující ozim díky mutacím v promotoru nebo prvním intronu (Fu *et al.*, 2005). Vliv těchto delecí nebyl zatím dále zkoumán, je však plánována analýza exprese alel s těmito delecemi. Identifikovány byly také například nové delece v prvním intronu *VRN-D1* o velikosti 17 a 14 bp. Další data získaná sekvenováním *VRN-1* homeologů jsou uvedena v připravované publikaci In-depth sequence analysis of bread wheat *VRN-1* genes.

## 6 Závěr

Tato diplomová práce byla rozdělena na teoretickou a experimentální část, v teoretické části byly uvedeny základní informace o pšenici seté – *T. aestivum*. Hlavní částí literární rešerše bylo popsání genů fotoperiodické a vernalizační dráhy, které mají vliv na kvetení u pšenice. Pozornost byla věnována zejména jednotlivým *VRN-1* genům.

Experimentální část diplomové práce byla rozdělena na dvě části. V první části byly za pomoci genotypování alel *VRN-1* selektovány z původního souboru 43 jařiných odrůd takové odrůdy, které měly shodnou sestavu alel *VRN-1*, dále byl určen počet kopií genu *VRN-A1*, čímž byl vyselektován základní soubor odrůd shodujících se v sestavě alel *VRN-1*. Pomocí genotypování alel *PPD-1* a určení počtu kopií *PPD-B1* proběhla další selekce a byly vyselektovány 2 odrůdy, které splňovaly podmínky kladené v cílech práce – stejná sestava alel *VRN-1*, *PPD-1* a vzájemně se lišící v počtu kopií genu *VRN-A1*. U těchto dvou odrůd – Bastion a Branišovická byla následně provedena analýza doby metání, ze které vyplynulo, že Bastion s jednou kopií metá signifikantně dříve než Branišovická s 2 kopiemi tohoto genu za stejných kultivačních podmínek, z čehož vyplývá, že za rozdílem v metání mohl být rozdílný počet kopií genu *VRN-A1*. U následné analýzy exprese *VRN-A1* byly také pozorovatelné rozdíly – u odrůdy Bastion s 1 kopií *VRN-A1* se relativní míra exprese v čase zvyšovala, zatímco u odrůdy Branišovická s 2 kopiemi relativní míra exprese buď stagnovala, nebo klesala. U ozimých odrůd v dřívějších publikacích ukazují data na rozdílnou expresi u různého počtu kopií genu *VRN-A1*, u jařin doposud k takovéto analýze nebyla provedena. Na základě výsledků v této diplomové práci je možné se domnívat, že rozdílný počet kopií dominantní alely *Vrn-A1a* má vliv i na jařiny a 2 kopie tohoto genu mohou být pro rostlinu náročné z hlediska transkripce genu *VRN-A1*, což může vést k pozdějšímu metání.

Ve druhé části byl sekvenován gen *VRN-1*, které je součástí projektu sekvenování *VRN-1*. Pomocí Sangerova sekvenování došlo k sekvenování 8. exonu u genů *VRN-A1* a *VRN-D1*, u 2 odrůd – Kolchoznica a Eurotas byly nalezeny SNP. Zbývající části genu byly sekvenovány technologií Illumina iSeq, byly identifikovány například delece v promotoru *VRN-A1* a v prvním intronu *VRN-D1*.

## 7 Literatura

- Abe M., Kobayashi Y., Yamamoto S., Daimon Y., Yamaguchi A., Ikeda Y., Ichinoki H., Notaguchi M., Goto K., Araki T. (2005): FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at shoot apex. *Science* **309**, 1052-1056.
- Allard V., Veisz O., Koszegi B., Rousset M., Gouis J.L., Martre P. (2012): The quantitative response of wheat vernalization to environmental variables indicates that vernalization is not a response to cold temperature. *Journal of Experimental Botany* **63**, 847-857.
- Alvarez M.A., Tranquilli G., Lewis S., Kippes N., Dubcovsky J. (2016): Genetic and physical mapping of the earliness per se locus Eps-A(m)1 in *Triticum monococcum* identifies EARLY FLOWERING 3 (ELF3) as a candidate gene. *Functional and Integrative Genomics* **16**, 365-382.
- An H., Rousset C., Suárez-López P., Corbesier L., Vincent C., Pineiro M., Hepworth S., Mouradov A., Justin S., Turnbull C., Coupland G. (2004): CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that includes photoperiodic flowering of arabidopsis. *Development* **131**, 3615-3626.
- Andrés F., Coupland G. (2012): The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics* **13**, 627-639.
- Arumuganathan K., Earle E.D. (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**, 208-218.
- Atlin G.N., Cairns, J.E., Das B. (2017): Rapid Breeding and Varietal Replacement Are Critical to Adaptation of Cropping Systems in the Developing World to Climate Change. *Global Food Security* **12**, 31-37.
- Baudry A., Ito S., Song Y.H., Strait A.A., Kiba T., Lu S., Henriques R., Pruneda-Paz J.L., Chua N-H., Tobin E.M., Kay S.A., Imaizumi T. (2010): F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control Arabidopsis clock progression. *Plant Cell* **22**, 606-622.
- Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J.W., Laurie D.A. (2007): A pseudo-response regulator is mixexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theoretical and Applied Genetics* **115**, 721-733.
- Blake N.K., Leheldt B.R., Lavin M., Talbert L.E. (1999): Phylogenetic Reconstruction Based on Low Copy DNA Sequence Data in an Allopolyploid: The B Genome of Wheat. *Genome* **42**, 351-360.
- Blázquez M.A., Ahn J.H., Weigel D. (2003): A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* **33**, 168-171.
- Bond D.M., Dennis E.S., Pogson B.J., Finnegan E.J. (2009b): Histone acetylation, VERNALIZATION INSENSITIVE 3, FLOWERING LOCUS C, and the vernalization response. *Molecular Plant* **2**, 724-737.
- Bond D.M., Dennis E.S., Finnegan E.J. (2009a): Hypoxia: a novel function for VIN3. *Plant Signalling & Behavior* **4**, 773-776.
- Bond D.M., Dennis E.S., Finnegan E.J. (2011): The low temperature response pathways for cold acclimation and vernalization are independent. *Plan, Cell & Environment* **34**, 1737-1748.



- Borlaug N.E. (1983): Contributions of conventional plant breeding to food production. *Science* **219**, 689-693.
- Bullrich L., Appendino M.L., Tranquilli G., Lewis S., Dubcovsky J. (2002): Mapping a thermo-sensitive earliness per se gene on Triticum monococcum chromosome 1A<sup>m</sup>. *Theoretical and Applied Genetics* **105**, 585-593.
- Cockram J., Jones H., Leigh F.J., O'Sullivan D., Powell W., Laurie D.A., Greenland A.J. (2007): Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1231-1244.
- Comadran J., Kilian B., Russell J., Ramsay L., Stein N., Ganai M., Shaw P., Bayer M., Thomas W., Marshall D., Hedley P., Tondelli A., Pecchioni N., Francia E., Korzun V., Walther A., Waugh R. (2012): Natural variation in a homolog of Antirrhinum CENTRORADIALIS contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley. *Nature Genetics* **44**, 1388-1392.
- Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C., Coupland G. (2007): FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**, 1030-1033.
- De Montaigu A., Tóth R., Coupland G. (2010): Plant development goes like clockwork. *Trends in Genetics* **26**, 296-306.
- 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.
- Diallo A.O., Ali-Benali M.A., Badawi M., Houde M., Sarhan F. (2012): Expression of vernalization responsive genes in wheat is associated with histone H3 trimethylation. *Molecular Genetics and Genomics* **287**, 575-590.
- Díaz A., Zikhali M., Turner A.S., Isaac P., Laurie D.A. (2012): Copy number variation affecting the Photoperiod-B1 and Vernalization-A genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). *PLoS One* **7**, e33234.
- Distelfeld A., Tranquilli G., Li C., Yan L., Dubcovsky J. (2009): Genetic and molecular characterization of the VRN2 loci in tetraploid wheat. *Plant Physiology* **149**, 245-257.
- Dubcovsky J. (2005): Regulation of flowering time in wheat and barley. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **141**, 263-264.
- Dubcovsky J., Che C., Yan L. (2005b): Molecular characterization of the allelic variation at the VRN-H2 vernalization locus in barley. *Molecular Breeding* **15**, 395-407.
- Dubcovsky J., Loukoianov A., Fu D., Valárik 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.
- Dvořák J., Terlizzi P.D., Zhang H. B., Resta P. (1993): The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* **36**, 21-31.
- Evans L.T. (1987): Short day induction of inflorescence initiation in some winter wheat varieties. *Australian Journal of Plant Physiology* **14**, 277-286.

- Ferrándiz C., Gu Q., Martienssen R., Yanofsky M.F. (2000): Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFUL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**, 725-736.
- Flagsberger K.A. (1929): Pšenicy dvuručki. In *Izv. Gosud. Inst. Opytoj agronomii Sv.VII*, 3-4.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO Cereal Supply and Demand Brief: [fao.org/worldfoodsituation/csdb/en](http://fao.org/worldfoodsituation/csdb/en) (23. 3. 2021).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT statistics database, Food balance sheets (2017): [www.fao.org/faostat/en/#data/FBS](http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT statistics database, Crops (2017): [www.fao.org/faostat/en/#data/QC](http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT statistics database: [www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize](http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize) (22.3.2020)
- Fornara F., Panigrahi K.C.S, Gissot L., Sauerbrunn N., Rühl M., Jarillo J.A., Coupland G. (2009): Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Developmental Cell* **17**, 75-86.
- Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J.S., von Zitzewitz J., Hayes P.M., Dubcovsky J. (2005): Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barely and wheat. *Molecular Genetics and Genomics* **273**, 54-65.
- Galiba G., Quarrie S.A., Sutka J., Morgounov A., Snape J.W. (1995): RFLP mapping of the vernalization (Vrn1) and frost resistance (Fr1) genes on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **90**, 1174-1179.
- Garner W.W., Allard H.A. (1920): Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Journal of Agricultural Research* **18**, 553-606.
- Garner W.W., Allard H.A. (1923): Further studies on photoperiodism, the response of plants to relative length of day and night. *Journal of Agricultural Research* **23**, 871-920.
- Gawronski P., Ariyadasa R., Himmelbach A., Poursarebani N., Kilian B., Stein N., Steuernagel B., Hensel G., Kumlehn J., Sehgal S.K., Gill B.S., Gould P., Hall A., Schnurbusch T. (2014): A distorted circadian clock causes early flowering and temperature-dependent variation in spike development in the Eps-3Am mutant of einkorn wheat. *Genetics* **193**, 1253-1261.
- Gendall A.R., Levy Y.Y., Wilson A., Dean C. (2001): The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in Arabidopsis. *Cell* **107**, 525-535.
- Goslin K., Zheng B., Serrano-Mislata A., Rae L., Ryan P.T., Kwaśniewska K., Thomson B., Ó'Maoiléidigh D.S., Madueno F., Wellmer F., Graciet E. (2017): Transcription factor interplay between LEAFY and APETALA1/CAULIFLOWER during floral initiation. *Plant Physiology* **174**, 1097-1109.
- Gouis J.L., Bordes J., Ravel C., Heumez E., Faure S., Praud S., Galic N., Remoue C., Balfourier F., Allard V., Rousset M. (2012): Genome-wide association analysis to identify chromosomal regions determining components of earliness in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **124**, 597-611.

- Greenup A., Peacock W.J., Dennis E.S., Trevaskis B. (2009): The molecular biology of seasonal flowering-responses in Arabidopsis and the cereals. *Annals of Botany* **103**, 1165-1172.
- Gregory F.G., Purvis O.N. (1948): Reversal of vernalization by high temperature. *Nature* **161**, 859.
- Guedira M., Xiong M., Hao Y.F., Johnson J., Harrison S., Marshall D., Brown-Guedira G. (2016): Heading Date QTL in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) Coincide with Major Developmental Genes VERNALIZATION1 and PHOTOPERIOD1. *PLoS One* **11**, e0154242.
- Gustafson P., Raskina O., Ma X., Nevo E. (2009): Wheat evolution, domestication, and improvement. *Wheat: Science and Trade*, 5-30.
- Haas M., Schreiber M., Mascher M. (2019): Domestication and Crop Evolution of Wheat and Barley: Genes, Genomics, and Future Directions. *Journal of Integrative Plant Biology* **61**, 204-225.
- Hanano S., Goto K. (2011): Arabidopsis TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *Plant Cell* **23**, 72-84.
- Hastings M.H., Follet B.K. (2001): Towards a molecular biological calendar? *Journal of Biological Rhythms* **15**, 424-430.
- Hemming M.N., Peacock W.J., Dennis E.S., Trevaskis B. (2008): Integration of seasonal flowering time responses in temperate cereals. *Plant Signaling and Behavior* **3**, 601-602.
- Heo J.B., Sung S. (2011): Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* **331**, 76-79.
- Hickey J.M., Chiurugwi T., Mackay I., Powell W. (2017): Implementing Genomic Selection in CGIAR Breeding Workshop Participants, Genomic prediction unifies animal and plant breeding programs to form platforms for biological Discovery. *Nature Genetics* **49**, 1297-1303.
- Chailakhyan M.K. (1936): New facts in support of the hormonal theory of plant development. *Proceedings of the USSR Academy of Sciences* **13**, 79-83.
- Chalupska D., Lee H.Y., Faris J.D., Evrard A., Chalhoub B., Haselkorn R., Gornicki P. (2008): Acc Homoeoloci and the Evolution of Wheat Genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**, 9691-9696.
- Chen A., Dubcovsky J. (2012): Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene VRN1 down-regulates VRN2 in leaves but is not essential for flowering. *PLoS Genetics* **8**, e1003134.
- Chen A., Li C., Hu W., Lau M.Y., Lin H., Rockwell N.C., Martin S.S., Jernstedt J.A., Lagarias J.C., Dubcovsky J. (2014): PHYTOCHROME C plays major role in the acceleration of wheat flowering under long-day photoperiod. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **111**, 10037-10044.
- Chen Y, Carver BF, Wang S, Zhang F, Yan LL (2009) Genetic loci associated with stem elongation and winter dormancy release in wheat. *Theor Appl Genet* **118**: 881–889.
- Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.K. (2007): Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science* **12**, 444-451.

- Choi K., Kim J., Hwang H.-J., Kim S., Park C., Kim S.-Y., Lee I. (2011): The FRIGIDA complex activates transcription of FLC, a strong flowering repressor in Arabidopsis, by recruiting chromatin modification factors. *Plant Cell* **23**, 289-303.
- Chouard P. (1960): Vernalization and its Relations to Dormancy. *Annual Review of Plant Physiology* **11**, 191-238.
- Imaizumi T., Schultz T.F., Harmon F.G., Ho L.A., Kay S.A. (2005): FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science* **309**, 293-297.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) (2018): Shifting Limits in Wheat Research and Breeding Using a Fully Annotated Reference Genome. *Science* **361**, eaar 7191.
- Johanson U., West J., Lister C., Michales S., Amasino R., Dean C. (2000): Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* **290**, 344-347.
- Jung C., Müller A. (2009): Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends in Plant Science* **14**, 563-573.
- Kato K., Miura H., Sawada S., McIntosh R.A. (2002): Characterization of QEet.ocs-5A.1, a quantitative trait locus for ear emergence time on wheat chromosome 5AL. *Plant Breeding* **121**, 389-393.
- Kim D.H., Doyle M.R., Sung S., Amasino R.M. (2009): Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **25**, 277-299.
- Kim D.-H., Sung S. (2014): Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Vernalization. *The Arabidopsis book* **12**, e0171
- Kippes N., Debermardi J.M., Vasquez-Gross H.A., Akpinar B.A., Budak H., Kato K., Chao S., Akhunov E., Dubcovsky J. (2015): Identification of the *VERNALIZATION 4* gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **112**, 5401-5410.
- Kippes N., Guedira M., Lin L., Alvarez M.A., Brown-Guedira G.L., Dubcovsky J. (2018): Single nucleotide polymorphisms in regulatory site of VRN-A1 first intron are associated with differences in vernalization requirement in winter wheat. *Molecular Genetics and Genomics* **293**, 1231-1243.
- 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. *Molecular Genetics and Genomics* **289**, 47-62.
- Klebs G. (1913): Über das Verhältnis der Aussenwelt zur Entwicklung der Pflanze. *Heidelberger Akademie der Wissenschaften* **5**, 1-47.
- Koshkin V.A., Matvienko I.I., Egorova E.M. (2009): The use of allele-specific markers of the Ppd-D1 gene for analysis of isogenic lines of spring common wheat. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i selektsii* **166**, 151-156.

- Kumar S., Sharma V., Chaudhary S., Taygi 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. *Journal of Genetics* **91**, 33-47.
- Lang A. (1965): Physiology of flower initiation. In: Lang A. (eds) *Differenzierung und Entwicklung / Differentiation and Development. Handbuch der Pflanzenphysiologie/ Encyclopedia of Plant Physiology*, vol **15**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1380-1536.
- Law C.N., Sutka J., Worland A.J. (1978): A genetic study of day-length response in wheat. *Heredity* **41**, 185-191.
- Law C.N., Worland A.J., Giorgi B. (1976): The genetic control of ear-emergence time by chromosomes 5A and 5D of wheat. *Heredity* **36**, 49-58.
- Lee J., Oh M., Park H., Lee I. (2008): SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates leafy. *Plant Journal* **55**, 832-843.
- Lewis S., Faricelli M.E., Appendino M.L., Valárik M., Dubcovsky J. (2008): The chromosome region including the earliness per se locus *Eps-Am1* affects the duration of early developmental phases and spikelet number in diploid wheat. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3595-3607.
- Li C., Distelfeld A., Comis A., Dubcovsky J. (2011): Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. *Plant Journal* **67**, 763-773.
- Li C., Dubcovsky J. (2008): Wheat FT protein regulates VRN1 transcription through interactions with FDL2. *Plant Journal* **55**, 543-554.
- Li G., Yu M., Fang T., Cao S., Carver B.F., Yan L. (2013): Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by TaVRN-A1 at the protein level. *Plant Journal* **76**, 742-753.
- Li Xiu-zhen, Hao Nai-bin and Tan Ke-hui (1987): Effect of Devernalization on Soluble Protein Component in Winter Wheat Seedling and Subsequent Plant Developmental State. *Journal of Integrative Plant Biology* **29**, 320-323.
- Li Y., Xu M. (2017): CCT family genes in cereal crops: A current overview. *The Crop Journal* **5**, 449-458.
- Liu L., Liu C., Hou X., Xi W., Shen L., Tao Z., Wang Y., Hao Y. (2012): FTIP1 is an essential regulator required for florigen transport. *PLOS Biology* **10**, e1001313.
- Longin C.F.H., Würschum T. (2016): Back to the Future-Tapping Into Ancient Grains for Food Diversity. *Trends in Plant Science* **21**, 731-737.
- 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* **138**, 2364-2373.
- Martinez-Zapater J.M., Coupland G., Dean C., Koornneef M. (1994): The transition to flowering in Arabidopsis. *Cold Spring Harbor Monograph Series; Arabidopsis*, 403-433.
- Melzer S., Lens F., Gennen J., Vanneste S., Rohde A., Beeckman T. (2008): Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics* **40**, 1489-1492.

- Michaels S., Amasino R.M. (1999): FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**, 949-956.
- Michaels S.D., Himmelblau E., Kim S.Y., Schomburg F.M., Amasino R.M. (2005): Integration of flowering signals in winter-annual Arabidopsis. *Plant Physiology* **137**, 149-156.
- 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* **30**, 317-323.
- Milec Z., Valárik M., Bartoš J., Šafář J. (2014): Can a late bloomer become an early bird? Tools for flowering time adjustment. *Biotechnology Advances* **32**, 200-214.
- Mizuno N., Nitta M., Sato K., Nasuda S. (2012): A wheat homologue of PHYTOCLOCK 1 is a candidate gene conferring the early heading phenotype to einkorn wheat. *Genes and Genetic Systems* **87**, 357-367.
- Müller T., Schierscher-Viret B., Fossati D., Brabant C., Schori A., Keller B., Krattinger S.G. (2018): Unlocking the Diversity of Genebanks: Whole-Genome Marker Analysis of Swiss Bread Wheat and Spelt. *Theoretical and Applied Genetics* **131**, 407-416.
- Muterko A., Kalendar R., Salina E. (2016): Novel alleles of the VERNALIZATION1 genes in wheat are associated with modulation of DNA curvature and flexibility in the promoter region. *BMC Plant Biology* **16**, 9.
- Muterko A., Salina E. (2018): Origin and Distribution of the VRN-A1 Exon 4 and Exon 7 Haplotypes in Domesticated Wheat Species. *Agronomy* **8**, 156.
- Muterko A., Salina E. (2019): VRN-1 ratio test for polyploid wheat. *Planta* **250**, 1955-1965.
- Muterko A.F., Balashova I.A., Fayt V.I., Sivolap Y.M. (2015): Molecular-genetic mechanisms of regulation of growth habit in wheat. *Cytology and Genetics* **49**, 58-71.
- Nemoto Y., Kisaka M, Fuse T., Yano M., Ogihara Y. (2003): Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the CONSTANS flowering time gene in transgenic rice. *Plant Journal* **36**, 82-93.
- Ni Z., Kim E.D., Ha M., Lackey E., Liu J., Zhang Y., Sun Q., Chen Z.J. (2009): Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* **457**, 327-331.
- 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* **31**, 27-37.
- Nitcher R., Pearce S., Tranquilli G., Zhang X., Dubcovsky J. (2014): Effect of the hope FT-B1 allele on wheat heading time and yield components. *Journal of Heredity* **105**, 666-675.
- Oliver S.N., Deng W., Casao M.C., Trevaskis B. (2013): Low temperatures induce rapid changes in chromatin state and transcript levels of the cereal VERNALIZATION1 gene. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2413-2422.

- Oliver S.N., Finnegan E.J., Dennis E.S., Peacock W.J., Trevaskis B. (2009): Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the VERNALIZATION1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**, 8386-8391.
- Pearce S., Kippes N., Chen A., Debernardi J.M., Dubcovsky J. (2016): RNA-seq studies using wheat PHYTOCHROME B and PHYTOCHROME C mutants reveal shared and specific functions in the regulation of flowering and shade-avoidance pathways. *BMC Plant Biology* **16**, 141.
- Peng J., Sun D., Nevo E. (2011): Wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, occupies a pivotal position in wheat domestication process. *Australian Journal of Crop Science* **5**, 1127-1143.
- Pin P.A., Benlloch R., Bonnet D., Wremmerth-Weich E., Kraft T., Gielen J.J., Nilsson O. (2010): An antagonistic pair of FT homologs mediates the control of flowering time in sugar beet. *Science* **330**, 1397-1400.
- Potokina E.K., Koshkin V.A., Alekseeva E.A., Matvienko I.I., Filobok V.A., Bespalova L.A. (2012): The combination of the Ppd and Vrn gene alleles determines the heading date in common wheat varieties. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* **2**, 311-318.
- Sakamura T. (1918): Kurze mitteilung uber die chromosomenzahlen und die verwandtschaftsverhaltnisse der *Triticum* arten. *Shokubutsugaku Zasshi* **32**, 150-153.
- Sawa M., Nusinov D.A., Kay S.A., Imaizumi T. (2007): FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in arabidopsis. *Science* **318**, 261-265
- Scarth R., Law C.N. (1983): The location of the photoperiod gene, Ppd2 and an additional genetic factor for ear-emergence time on chromosome 2B of wheat. *Heredity* **51**, 607-619.
- Searle I., He Y., Turck F., Vincent C., Fornara F., Kröber S., Amasino R.A., Coupland G. (2006): The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signalling in Arabidopsis. *Genes & Development* **20**, 898-912.
- Seki M., Chono M., Matsunaka H., Fujita M., Oda S., Kubo K., Kiribuchi-Otobe C., Kojima H., Nishida H., Kato K., (2011): Distribution of photoperiod-insensitive alleles Ppd-B1 and Ppd-D1a and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars. *Breeding Science* **61**, 405-412.
- Shaw L.M., Turner A.S., Herry L., Griffiths S., Laurie D.A. (2013): Mutant alleles of Photoperiod-1 in wheat (*Triticum aestivum* L.) that confer a late flowering phenotype in long days. *PLoS One* **8**, e79459.
- Shaw L.M., Turner A.S., Laurie D.A. (2012): The impact of photoperiod insensitive Ppd-1a mutations on the photoperiod pathway across the three genomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Journal* **71**, 71-84.
- Sheldon C., Hills M., Lister C., Dean C., Dennis E.S., Peacock W.J. (2008): Resetting of FLOWERING LOCUS C expression after epigenetic repression by vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**, 2214-2219.
- Sheldon C.C., Burn J.E., Perez P.P., Metzger J., Edwards J.A., Peacock W.J., Dennis E.S. (1999): The FLS MADS box gene: A repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* **11**, 445-458.

- Sheldon C.C., Finnegan E.J., Dennis E.S, Peacock W.J. (2006): Quantitative effects of vernalization on FLC and SOC1 expression. *Plant Journal* **45**, 871-883.
- 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). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 3753-3758.
- Sherman, J.D., Yan, L., Talbert, L., Dubcovsky, J. (2004): A PCR Marker for Growth Habit in Common Wheat Based on Allelic Variation at the VRN-A1. *Crop Science* **44**, 1832–1838.
- 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* **29**, 675-685.
- Shimada S., Ogawa T., Kitagawa S., Suzuki T., Ikari C., 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 APETALA/FRUITFULL-like gene, VRN1, is upstream of FLOWERING LOCUS T. *Plant Journal* **58**, 668-681.
- Shrestha R., Gómez-Arza J., Brambilla V., Fornara F. (2014): Molecular control of seasonal flowering in rice, arabidopsis and temperate cereals. *Annals of Botany* **114**, 1445-1458.
- Slafer G.A., Rawson H.M. (1994): Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: a re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. *Functional Plant Biology* **21**, 393-426.
- Song Y.H., Shim J.S., Kinmonth-Schultz H.A., Imaizumi T. (2015): Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 441-464.
- Song Y.H., Smith R.W., To B.J., Millar A.J., Imaizumi T. (2012): FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. *Science* **336**, 1045-1049.
- Sun 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* **204**, 682-692.
- Sung S., Amasino R.M. (2004): Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 4-10.
- Sung S., Amasino R.M. (2006): Molecular genetic studies of the memory of winter. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3369-3377.
- The Bristol Wheat Genomics:  
[cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/WheatBP/Documents/DOC\\_Evolution.php](http://cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/WheatBP/Documents/DOC_Evolution.php) (23.3.2020)
- Thomas B., Vince-Prue D. (1996): *Photoperiodism in plants* (2nd ed.), Academic Press, New York.
- Thomashow M.F. (2001): So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology* **125**, 89-93.



- Tiwari S.B., Shen Y., Chang H-C, Hou Y., Harris A., Ma S.F., McPartland M., Hymus G.J., Adam L., Marion C., Belachew A., Repetti P.P., Reuber T.L., Ratcliffe O.J. (2010): The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *New Phytologist* **187**, 57-66.
- Tournois J. (1912): Influence de la lumière sur la floraison du houblon japonais et du chanvre déterminées par des semis hâtifs. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences de Paris* **155**, 297-300.
- Trevaskis B. (2010): The central role of the VERNALIZATION1 gene in the vernalization response of cereals. *Functional Plant Biology* **37**, 479-487.
- 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 USA* **100**, 13099-13104.
- Trevaskis B., Hemming M.N., Dennis E.S., Peacock W.J. (2007): The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends in Plant Science* **12**, 352-357.
- Turner A., Beales J., Faure S., Dunford R.P., Laurie D.A. (2005): The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* **310**, 1031-1034.
- United Nations – Department of Economic and Social Affairs Population Dynamics, World Population Prospects 2019: population.un.org/wpp/ (7. 5. 2020).
- Valárik M., Linkiewicz A.M., Dubcovsky J. (2006): A microcolinearity study at the earliness per se gene Eps-A(m)1 region reveals an ancient duplication that preceded the wheat-rice divergence. *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 945-957.
- Valverde F., Mouradov A., Soppe W.J., Ravenscroft D., Samach A., Coupland G. (2004): Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**, 1003-1006.
- Wang J., Luo M., Chen Z., You F.M., Wei Y., Zheng Y., Dvorak J. (2013): *Aegilops tauschii* Single Nucleotide Polymorphism Shed Light on the Origins of Wheat D-genome Genetic Diversity and Pinpoint the Geographic Origin of Hexaploid Wheat. *New Phytologist* **198**, 925-937.
- Wellensiek S.J. (1964): Dividing Cells as the prerequisite for vernalization. *Plant Physiology* **39**, 832-835.
- Wigge P.A., Kim M.C., 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* **309**, 1056-1059.
- Wilhelm E.P., Turner A.S., Laurie D.A. (2009): Photoperiod insensitive Ppd-A1a mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theoretical and Applied Genetics* **118**, 285-294.
- Wood C.C., Robertson M., Tanner G., Peacock W.J., Dennis E.S., Helliwell C.A. (2006): The Arabidopsis thaliana vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 14631-14636.
- Worland A.J. (1996): The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats vernalization sensitivity. *Euphytica* **89**, 49-57.

- Worland A.J., Börner A., Korzun V., Li W.M., Petrović S., Sayers E.J. (1998): The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats. *Euphytica* **100**, 385-394.
- Würschum T., Langer S.M., Longin C.F. (2015): Genetic control of plant height in European winter wheat cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* **128**, 865-874.
- Xiao J., Xu S., Li C., Xu Y., Xing L., Niu Y., Huan Q., Tang Y., Zhao C., 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* **5**, 4572.
- Xing L., Li J., Xu Y., Xu Z., Chong K. (2009): Phosphorylation modification of wheat lectin VER2 is associated with vernalization-induced O-GlcNAc signaling and intracellular motility. *PLoS One* **4**, e4854.
- Yan L., Fu D., Li C., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valárik M., Yasuda S., Dubcovsky J. (2006): The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 19581-19586.
- Yan L., Loukoianov A., Blechl A., Tranquilli G., Ramakrishna W., SanMiguel P., Bennetzen J.L., Echenique V., Dubcovsky J. (2004): The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* **303**, 1640-1644.
- Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G., Helguera M., Fahima T., Dubcovsky J. (2003): Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **13**, 6263-6268.
- Yanovsky M.J., Kay S.A. (2002): Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature* **419**, 308-312.
- Yong W.D., Xu Y.Y., Xu W.Z., Wang X., Li N., Wu J.S., Liang T.B., Chong K., Xu Z.H., Tan K.H., Zhu Z.Q. (2003): Vernalization-induced flowering in wheat is mediated by a lectin-like gene VER2. *Planta* **217**, 261-270.
- 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. *Theoretical and Applied Genetics* **120**, 543-552.
- Zeevaart J.A.D. (1976): Physiology of flower formation. *Annual Review of Plant Physiology* **27**, 321-348.
- Zhao X.Y., Liu M.S., Li J.R., Guan C.M., Zhang X.S. (2005): The wheat TaGI1, involved in photoperiodic flowering, encodes an Arabidopsis GI ortholog. *Plant Molecular Biology* **58**, 53-64.
- Zikhali M., Griffiths S. (2015): The effect of Earliness per se (Eps) genes on flowering time in bread wheat. In: *Ogihara, Yasunari, Takumi, Shigeo, Handa, Hirokazu, eds. Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field, Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Wheat Genetics Symposium*. Springer, Japan, 339-345.
- Zikhali M., Leverington-Waite M., Fish L., Simmonds J., Orford S., Wingen L. U., Goram R., Gosman N., Bentley A., Griffiths S. (2014): Validation of a 1DL earliness per se (eps) flowering QTL in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Breeding: new strategies in plant improvement* **34**, 1023-1033.

Zografos B.R., Sung S. (2012): Vernalization-mediated chromatin changes. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4343-4348.

## 8 Seznam použitých zkratek

**AGL24** agamous like 24

**AP1** apetala 1

**CDF** cycling dof factor

**CO** constans

**CRY** cryptochrome

**EPS** earliness *per se*

**FD** flowering locus D

**FES1** fri essential

**FLX** FLC expressor

**FKF1** flavin kelch f box 1

**FRI** frigida

**FRL1** fri-like

**FT** flowering locus T

**FTIP1** FT-interacting protein 1

**FUL** fruitfull

**GI** gigantea

**GRP2** glycine-rich RNA-binding protein 2

**MITE** miniaturní invertované opakovatelné transponovatelné elementy

**PHY** phytochrome

**PPD** photoperiod

**PRC2** polycomb-group repressive complex 2

**PRE/TRE** polycomb/trithorax responsive elements

**PRR** pseudo response regulator

**SOC1** suppressor overexpression constans

**SUF4** suppressor of fri 4

**TFL1** terminal flower

**VIN3** vernalization insensitive