

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Alena Lázničková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Sekvenční analýza *VRN-1* genů u pšenice plané
dvouzrnky (*Triticum dicoccoides*)**

Bakalářská práce

Alena Lázničková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Mgr. Beáta Strejčková, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Alena LÁZNIČKOVÁ**
Osobní číslo: **R19887**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Sekvenční analýza VRN-1 genů u pšenice plané dvouzrnky (*Triticum dicoccoides*)**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování literární rešerše se zaměřením na vernalizaci a *VRN-1* geny u druhů z rodu *Triticum*.
2. Osvojení základních molekulárních metod. PCR amplifikace, PCR klonování a sekvenování jednotlivých částí *VRN-A1* a *VRN-B1* genů u pšenice plané dvouzrnky pomocí nově navržených primerů.
3. Vyhodnocení a interpretace získaných dat.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Konopatskaia, I., Vavilova, V., Kondratenko, E. Y., Blinov, A., and Goncharov, N. P. (2016). VRN1 genes variability in tetraploid wheat species with a spring growth habit. *BMC Plant Biol.* 16. doi:10.1186/s12870-016-0924-z.
2. Fu, D., Szucs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J. S., Von Zitzewitz, J., et al. (2005). Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol. Genet. Genomics* 273, 54–65. doi:10.1007/s00438-004-1095-4.
3. Yan, L., Helguera, A. M., Kato, A. K., Fukuyama, A. S., Sherman, J., and Dubcovsky, A. J. (2004). Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* doi:10.1007/s00122-004-1796-4.
4. Milec, Z., Valárik, M., Bartoš, J., and Šafář, J. (2014). Can a late bloomer become an early bird? Tools for flowering time adjustment. *Biotechnol. Adv.* 32, 200–214. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.09.008.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Beáta Strejčková

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 26. března 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

LS.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Alena Lázničková

Název práce: Sekvenční analýza *VRN-1* genů u pšenice plané dvouzrnky (*Triticum dicoccoides*)

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, Univerzita Palackého v Olomouci a Centrum strukturní a funkční genomiky rostlin, Ústav experimentální botaniky, AV ČR v.v.i.

Vedoucí práce: Mgr. Beáta Strejčková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2023

Klíčová slova: pšenice planá dvouzrnka (*Triticum dicoccoides*), vernalizace, *VRN-1* geny, PCR, sekvenování, klonování

Počet stran: 52

Jazyk: český

ABSTRAKT

Pšenice je základem stravy pro 40 % světové populace a vyrábí se z ní většina nezbytných potravin. Nárůst zalidnění ovšem způsobuje neustálý tlak na zvýšení její produkce. Z toho důvodu je nutné šlechtění nových kultivarů, které by se mohly lépe adaptovat na měnící se podmínky prostředí. Správné načasování doby kvetení je důležité pro reprodukční úspěch rostliny. Jedna z genetických drah, která kvetení ovlivňuje, je vernalizační dráha. Tato bakalářská práce se zaměřuje na sekvenční analýzu a hledání nových alel u nejdůležitějšího vernalizačního genu *VRN-1* u 93 genotypů tetraploidní pšenice plané dvouzrnky (*Triticum dicoccoides*).

V rámci teoretické části práce jsou popsány hlavní molekulární dráhy ovlivňující kvetení u modelového organismu *Arabidopsis thaliana* a pšenice, se zaměřením na vernalizaci. Dále teoretická část pojednává o vybraných metodách sekvenování.

V experimentální části práce byly sekvenovány *VRN-A1* a *VRN-B1* promotory u celkem 93 genotypů *T. dicoccoides* z oblasti Úrodného půlměsíce, které byly následně spojeny se sekvencemi celých genů za účelem analýzy sekvenční variability. V rámci *VRN-A1* i *VRN-B1* genů bylo nalezeno velké množství mutací, včetně mutací v exonech. Celkem bylo nalezeno 12 nepopsaných mutací u *VRN-A1* (jedna delece v oblasti promotoru, pět SNPs v exonech a šest

indelů v intronech) a 21 u *VRN-B1* (tři indely v promotoru, sedm SNPs v exonech a 11 indelů v intronech), jejichž vliv na kvetení je třeba charakterizovat a následně vybrat ty alely, které mohou být použity v rámci šlechtění.

Bibliographical identification

Author's name and surname: Alena Lázničková

Title: Sequence analysis of *VRN-1* genes in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*)

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Palacký University Olomouc and Centre of Plant Structural and Functional Genomics Institute of Experimental Botany AS CR, v. v. i.

Supervisor: Mgr. Beáta Strejčková, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Keywords: wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*), vernalization, *VRN-1* genes, PCR method, sequencing, cloning

Number of pages: 52

Language: Czech

ABSTRACT

Wheat is one of the world's main food sources (40 %) and is used to make most of the necessary foodstuff. However, the increase of population causes constant pressure to increase its production. For this reason, it is important to breed new cultivars that would be more resistant to deteriorating environmental conditions and could flower in shorter time. The timing of flowering is essential to the reproductive success of the plant. One of the genetic pathways that affect this flowering period is vernalization. This bachelor thesis is focused on the sequence analysis of *VRN-1* genes, which play a crucial role in the initiation of flowering, in selected cultivars of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) and the search for new alleles that could be used in breeding.

The theoretical part of the work describes the main molecular pathways that affect flowering in the model organism *Arabidopsis thaliana* and wheat, with the main focus on vernalization. The theoretical part also includes selected sequencing methods.

In the experimental part of the work, *VRN-A1* and *VRN-B1* promoters were sequenced in a total of 93 genotypes of *T. dicoccoides* from the Fertile Crescent area. The promoter sequences were subsequently merged with the sequences of whole genes in order to analyze the sequence variability. A large number of mutations, including mutations in exons, have been found within

both *VRN-A1* and *VRN-B1* genes. There were a number of SNPs (single nucleotide polymorphisms) found in the introns, as well as larger insertions and deletions. A total of 12 undescribed mutations were found in *VRN-A1* (one deletion in the promoter region, five SNPs in exons and six indels in introns) and 21 in *VRN-B1* (three indels in the promoter region, seven SNPs in exons and 11 indels in introns). The effect of these mutations on flowering is to be characterized to choose alleles that can be used in breeding.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Beáty Strejčkové, Ph.D., a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....
Alena Lázničková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Beátě Strejčkové, Ph.D., za vstřícnost při řešení jakéhokoli problému, její odborné vedení a cenné rady v průběhu zpracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala kolektivu Centra strukturní a funkční genomiky rostlin, Ústavu experimentální botaniky, AV ČR v.v.i., v Olomouci za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině, za to že mě vždy podporovala ve studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	PŠENICE PLANÁ DVOUZRNKA (<i>TRITICUM DICOCOIDES</i>)	3
3.1.1	Vznik a evoluce divoké tetraploidní pšenice	3
3.1.2	Domestikace	4
3.1.3	Složení genomu pšenice plané dvouzrnky	5
3.1.4	Problematika	5
3.2	KVETENÍ	5
3.2.1	Huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	6
3.2.2	Pšenice planá dvouzrnka (<i>Triticum dicoccoides</i>)	9
3.3	SEKVENOVÁNÍ	13
3.3.1	Sangerovo sekvenování	13
3.3.2	Sekvenační technologie nové generace	14
4	MATERIÁLY A METODY	17
4.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	17
4.1.1	Pěstování rostlinného materiálu pro izolaci DNA	17
4.1.2	Pěstování a fenotypizace rostlinného materiálu	17
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, SOUPRAVY A ROZTOKY	18
4.2.1	Použité chemikálie	18
4.2.2	Použité soupravy	18
4.2.3	Použité roztoky a jejich příprava	18
4.3	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ	19
4.4	POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY	19
4.4.1	Sekvenční analýza <i>VRN-1</i> genů u pšenice plané dvouzrnky (<i>Triticum dicoccoides</i>) 19	
4.4.2	Statistická analýza doby metání	27
5	VÝSLEDKY	28
5.1	FENOTYPOVÁ ANALÝZA	28
5.1.1	Průměr metání	28
5.2	SEKVENČNÍ VARIABILITA <i>VRN-1</i> GENU U 93 GENOTYPŮ <i>T. DICOCOIDES</i>	33
5.2.1	Všeobecný úvod	33
5.2.2	Sekvenční analýza <i>VRN-A1</i> genu	33
5.2.3	Sekvenční analýza <i>VRN-B1</i> gen	36
6	DISKUSE	39
7	ZÁVĚR	41
8	LITERATURA	42

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ANOVA	ANALYSIS OF VARIANCE
CDF	CYCLING DOF FAKTOR
CO	CONSTANS
ELF3	EARLY FLOWERING 3
EPS	EARLINESS PER SE
FBH	FLOWERING BHLH
FKF1	FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1
FLC	FLOWERING LOCUS C
FRI	FRIGIDA
FT	FLOWERING LOCUS T
GA	GENOME ANALYZER
GI	GIGANTEA
GRP2	GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 2
HMG1	HIGH MOBILITY GROUP 1
LTR	LONG TERMINAL REPEATS
MyoD	MYOBLAST DETERMINATION PROTEIN 1
NF-Y	NUCLEAR FACTOR-Y
ORF	OPEN READING FRAME
PE	PAIRED-END
PPD1	PHOTOPERIOD 1
PRR	PSEUDO RESPONSE REGULATORS
SBS	SEKVENOVÁNÍ SYNTÉZOU
SNP	SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM
SOC1	SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1
VIN3	VERNALIZATION INSENSITIVE 3

SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Obrázek 1: Schéma hybridizačních událostí vedoucích ke vzniku *Triticum dicoccoides*.

Obrázek 2: Vznik *Triticum turgidum* subsp. *durum* a *Triticum aestivum* z divoké pšenice dvouzrnky rostoucí v přirozeném prostoru v Izraeli.

Obrázek 3: Geny podílející se na dráhách kvetení u *Arabidopsis* a pšenice.

Obrázek 4: Elektroforetogram PCR produktů *VRN-B1* promotorů vybraných genotypů *T. dicoccoides*.

Graf 1: Závislost doby metání na zemi původu.

SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1:** Podmínky pěstování rostlinného materiálu ve fytotronu.
- Tabulka 2:** Primery použité k amplifikaci promotorů *VRN-A1* a *VRN-B1* za účelem sekvenování.
- Tabulka 3:** Složení PCR reakční směsi k amplifikaci promotoru *VRN-A1* pomocí primerů VRN1AF a VRN1INTR1R a promotoru *VRN-B1* pomocí primerů Pr1 a Pr2, VRNBPF1 a VRNBPR1 nebo vrnB1_1F a vrnB1_1R a HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis Biodyne, kat. č. 01-02-00500).
- Tabulka 4:** Teplotní program PCR cycleru k amplifikaci promotoru *VRN-A1* pomocí primerů VRN1AF a VRN1INTR1R a promotoru *VRN-B1* pomocí primerů Pr1 a Pr2 nebo VRNBPF1 a VRNBPR1 a HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis Biodyne, kat. č. 01-02-00500).
- Tabulka 5:** Složení reakční směsi enzymatického přečištění PCR produktů.
- Tabulka 6:** Teplotní program PCR cycleru pro enzymatické přečištění PCR produktů.
- Tabulka 7:** Složení reakční směsi sekvenační reakce s forward/reverse primerem.
- Tabulka 8:** Teplotní program PCR cycleru pro sekvenační reakci.
- Tabulka 9:** Složení reakční směsi na blunting reakci.
- Tabulka 10:** Složení reakční směsi na ligační reakci s vektorem pJET1.2.
- Tabulka 11:** Složení PCR reakční směsi k amplifikaci zaklonovaného PCR produktu vloženého do *E. coli*.
- Tabulka 12:** Teplotní program PCR cycleru k amplifikaci zaklonovaného PCR produktu vloženého do *E. coli*.
- Tabulka 13:** Počet dní od výsevu po metání, země původu a GenBank kód u 20 jarních genotypů *T. dicoccoides*.
- Tabulka 14:** Počet dní od výsevu po metání, země původu a GenBank kód u 75 ozimých genotypů *T. dicoccoides*.
- Tabulka 15:** Průměrná doba metání, medián a směrodatná odchylka pro genotypy *T. dicoccoides* z Izraele, Libanonu, Sýrie a Turecka.
- Tabulka 16:** ANOVA test.
- Tabulka 17:** Přepočítání Alfa hodnoty pro POST-HOC test.
- Tabulka 18:** POST-HOC test pro jednotlivé země.
- Tabulka 19:** Mutace v oblasti promotoru *VRN-A1* genu u 89 genotypů *T. dicoccoides*.

Tabulka 20: Delce v oblasti intronů *VRN-A1* genu u 89 genotypů *T. dicoccoides*.

Tabulka 21: Inzerce v oblasti intronů *VRN-A1* genu u 89 genotypů *T. dicoccoides*.

Tabulka 22: Mutace v oblasti exonů *VRN-B1* genu u 90 genotypů *T. dicoccoides*.

Tabulka 23: Mutace v oblasti intronů *VRN-B1* genu u 90 genotypů *T. dicoccoides*.

Tabulka 24: Inzerce v oblasti intronů *VRN-B1* genu u 90 genotypů *T. dicoccoides*.

1 ÚVOD

Správné načasování kvetení je pro rostlinu kritickou událostí, jelikož rostlině umožní, aby vykvetla v optimálních podmínkách, které jí zajistí maximální reprodukční úspěch. Desetiletí fyziologických studií odhalilo, že kvetení je iniciováno v reakci na exogenní a endogenní podněty. Environmentální podněty zahrnují délku dne (Garner & Allard, 1920) a změny teploty (Hay & Ellis, 1998). Endogenní dráhy naproti tomu fungují nezávisle na signálech prostředí a souvisí s vlastním vývojovým stavem rostliny (Srikanth & Schmid, 2011).

Vernalizace je proces vyvolávající kvetení pomocí prodlouženého vystavení zimě, čímž je u rostliny zajištěn přechod z vegetativního do reprodukčního stádia. Vernalizační dráhy se účastní geny *VRN-1*, *VRN-2* a *VRN-3*. Gen *VRN-1* hraje důležitou roli při zahájení kvetení. Jeho exprese se zvyšuje s délkou chladného období, načež aktivuje expresi genu *VRN-3*. Gen *VRN-1* se nachází na dlouhém raménku homologních chromozomů skupiny 5 a jeho regulační elementy jsou umístěny v oblasti promotoru a v prvním intronu. V ozimých kultivarech je vernalizace nutná pro indukci *VRN-1* a pro potlačení genu *VRN-2*, který je považovaný za dominantní represor kvetení.

Pšenice je základem stravy pro 40 % světové populace, jelikož se z ní vyrábí většina nezbytných potravin, jako jsou například těstoviny nebo pečivo. Je pěstovaná na největší ploše ze všech zemědělských plodin a v různé formě ji konzumuje 2,5 bilionů lidí. Nárůst populace a globální oteplování ovšem způsobují tlak na zvýšení produkce a ze statistických modelů vyplývá, že v roce 2050 budeme potřebovat o 70 % pšenice více než doposud.

Z tohoto důvodu je důležité šlechtění nových kultivarů, které vykvetou rychleji, nebo snesou větší sucho a vyšší teploty a zvýší se tak světová produkce pšenice. Tato bakalářská práce se zabývá hledáním nových alel *VRN-1* genů, které by mohly být využity pro šlechtění nových kultivarů.

2 CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše se zaměřením na vernalizaci a *VRN-1* geny u druhů z rodu *Triticum*.
2. Osvojení základních molekulárních metod. PCR amplifikace, PCR klonování a sekvenování jednotlivých částí *VRN-A1* a *VRN-B1* genů u pšenice plané dvouzrnky pomocí navržených primerů.
3. Vyhodnocení a interpretace získaných dat.

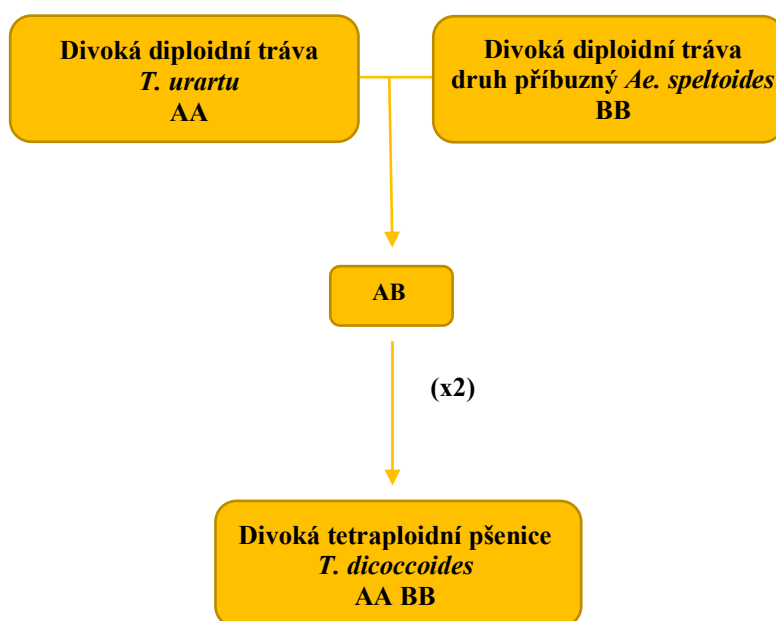
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Pšenice planá dvouzrnka (*Triticum dicoccoides*)

Pšenice planá dvouzrnka (*Triticum dicoccoides* Körn) je tetraploidní pšenice, která patří do podříše cévnaté rostliny (*Tracheophyta*), oddělení krytosemenné (*Magnoliophyta*), třídy jednoděložné (*Liliopsida*), čeledi lipnicovité (*Poaceae*) a rodu pšenice (*Triticum*). Je to divoký příbuzný *Triticum turgidum* a předchůdce domestikovaných forem pšenice *Triticum aestivum* a *Triticum durum* (Akpınar a kol., 2015).

3.1.1 Vznik a evoluce divoké tetraploidní pšenice

Divoká tetraploidní pšenice vznikla hybridizací následovanou polyploidizací před méně než půl milionem let (Chalupska a kol., 2008), konkrétně se udává 360 000–540 000 let (Dvořák & Akhunov, 2005). Při této události se donorem A genomu stala divoká diploidní tráva *Triticum urartu* a divoká diploidní tráva příbuzná druhu *Aegilops speltoides* poskytla B genom (Dvořák a kol., 1993) (Obrázek 1).

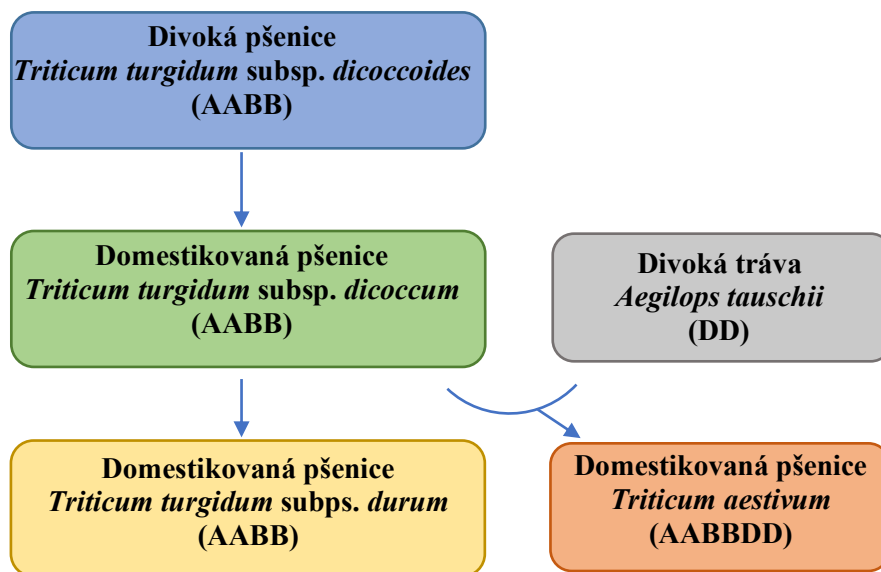


Obrázek 1: Schéma hybridizačních událostí vedoucích ke vzniku *Triticum dicoccoides*. Převzato a upraveno dle: Brewster a kol. (2019).

Dnes se porosty pšenice plané dvouzrnky vyskytují široce napříč obloukem Úrodného půlměsíce, kde vytvářejí dvě geneticky odlišné populace. Jižní populace zahrnuje oblast Izraele, Palestiny, Libanonu a jihozápadní Sýrie a severní populace zahrnuje oblast Turecka, Iráku a Íránu (Luo a kol., 2007).

3.1.2 Domestikace

Domestikace plodin spočívá v modifikaci jejich klíčových vlastností a znaků (Abbo a kol., 2014). *Triticum dicoccoides*, označovaná také jako *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides*, je předkem veškeré moderní kultivované tetraploidní pšenice (Zhu a kol., 2019) a její domestikace zahrnovala především změny v dormanci semen, morfologii klasu a vývoji zrna (Avni a kol., 2017). Selekcí z *T. dicoccoides* vznikl domestikovaný typ tetraploidní pšenice *Triticum turgidum* subsp. *dicoccum* (AABB) (Feldman & Kislev, 2007), který spontánně hybridizoval s trávou *Aegilops tauschii* (DD) za vzniku rané špaldy *Triticum spelta* (Kakizaki a kol., 2017). Z *T. dicoccum* se hybridizací s trávou *Ae. tauschii* vyvinula hexaploidní pšenice *Triticum aestivum*, která představuje asi 95 % světové produkce pšenice (Peng a kol., 2011). Z *T. dicoccum* nezávisle vznikla také tetraploidní pšenice *Triticum turgidum* subsp. *durum* (Akpınar a kol., 2015), která představuje zbylých 5 % světové produkce pšenice (Peng a kol., 2011) a pěstuje se především pro výrobu těstovin (Maccaferri a kol., 2019).



Obrázek 2: Vznik *Triticum turgidum* subsp. *durum* a *Triticum aestivum* z divoké pšenice dvouzrnky rostoucí v přirozeném prostoru v Izraeli. Převzato a upraveno dle Uauy (2017).

Domestikovaná forma pšenice se od divokého progenitora *T. dicoccoides* liší například v křehkosti klasů. Zralé klasy pšenice plané dvouzrnky se rozpadají, oproti tomu klasy domestikovaných typů pšenice zůstávají i při dozrání neporušené, což umožňuje snazší sklizeň (Avni a kol., 2017).

3.1.3 Složení genomu pšenice plané dvouzrnky

Přístup k plně anotovaným sekvencím genomu, včetně regulačních sekvencí a informací o genomové diverzitě, umožňuje efektivní studium významných genů, a tím pádem urychlení v oblasti výzkumu a šlechtění a lepší porozumění biologii pšenice (Appels a kol., 2018). U tetraploidní pšenice se stal první plně sekvenovanou odrůdou Zavitan (WEW_v1.0) (Avni a kol., 2017), který se používá jako referenční sekvence. Později byla genomová sekvence Zavitanu vylepšena (WEW_v2.0) za pomoci optických map (Zhu a kol., 2019). Úspěšné sestavení jeho genomu bylo důležitým milníkem v genomice pšenice (Zhu a kol., 2019).

Tetraploidní pšenice planá dvouzrnka má složitý polyploidní genom (AABB) s počtem chromozomů $2n = 4x = 28$ (Peng a kol., 2011), jehož velikost se odhaduje na $1C = 10,5$ Gb (Avni a kol., 2017), což ho činí třikrát větší než genom lidský. Obsahuje nad 85 % nekódujících repetitivních sekvencí DNA (Appels a kol., 2018) a většinu z nich představují transpozibilní elementy (TE). Celkový obsah TE se zdá být podobný pro oba subgenomy a představuje 82,2 %. Asi 70 % (Maccaferri a kol., 2019) TE tvoří LTR (long terminal repeats) retrotranspozony (Avni a kol., 2017). Počet anotovaných genů je 62 813 (Zhu a kol., 2019). Část homeologních genových párů se exprimuje výlučně v jednom ze dvou subgenomů, což naznačuje, že genová exprese regulovaná subgenomem může přispět k adaptacím různých odrůd pšenice (Avni a kol., 2017).

3.1.4 Problematika

Velká a rychle se zvětšující světová populace vytváří tlak na produkci potravin. V roce 2009 Organizace pro výživu a zemědělství uvedla, že počet lidí trpících hladem a chudobou nyní přesahuje 1 miliardu a očekává se, že v roce 2050 jejich počet překročí 9 bilionů. Zemědělská produkce by se tedy musela zvýšit o 70 % (Parry & Boyle, 2012). Dalšími problémy je rychlá urbanizace, která vedla k redukci orné půdy, a globální změna klimatu, která negativně ovlivňuje výnosy plodin. Všechny tyto změny působí omezení požadované zemědělské produkce. Z těchto důvodů je nutné plodiny geneticky vylepšovat pomocí genetického inženýrství a šlechtění (Lu & Ellstrand, 2014).

3.2 Kvetení

Vnímání změn světla a tepla slouží rostlinám k regulaci doby kvetení (Song a kol., 2018), která je zásadní pro jejich reprodukční úspěch. Z tohoto důvodu se u rostlin vyvinulo několik mechanismů k synchronizaci kvetení, které maximalizují výnosy semen (Purugganan & Fuller,

2009). Studium těchto změn především u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* výrazně napomohlo chápání molekulárních mechanismů, které jsou zodpovědné za zpracování různých environmentálních podnětů podporujících přechod z vegetativního stádia do stádia reprodukce, což je důležité v zemědělství.

3.2.1 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

Huseníček rolní je dvouděložná rostlina, která je ideálním modelovým organismem, a to hned z několika důvodů. Prvním důvodem je jeho malý genom, jehož velikost činí pouze 1C = 125 Mbp a obsahuje 25 498 genů kódujících proteiny (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Dalším důvodem je krátká generační doba. *A. thaliana* vykvete již 6 týdnů po vysetí, což poskytuje možnost získat až 6 generací do roka. Mimoto dobře roste v laboratorních podmínkách, při pokojové teplotě a s omezeným množstvím světla (Masson, 2001).

Hlavními environmentálními podněty ke kvetení u huseníčku jsou změna délky dne (fotoperiodická dráha) a zima (vernalizační dráha) (Mouradov a kol, 2002). Kromě nich existují tři další geneticky definované dráhy, které se podílí na kontrole kvetení. Giberelinová signalizační dráha odkazuje na požadavek kyseliny giberelinové pro normální průběh kvetení a interaguje s ostatními dráhami kvetení prostřednictvím proteinů DELLA (Bao a kol., 2020). Autonomní dráha zahrnuje endogenní regulátory, které nejsou závislé na fotoperiodické ani giberelinové dráze a byla popsána také endogenní dráha, kde je kvetení indukováno stářím rostliny (Srikanth & Schmid, 2011). V rámci této práce bude podrobněji popsána dráha vernalizační a fotoperiodická, reagující na vnější signály.

3.2.1.1 Fotoperiodická dráha

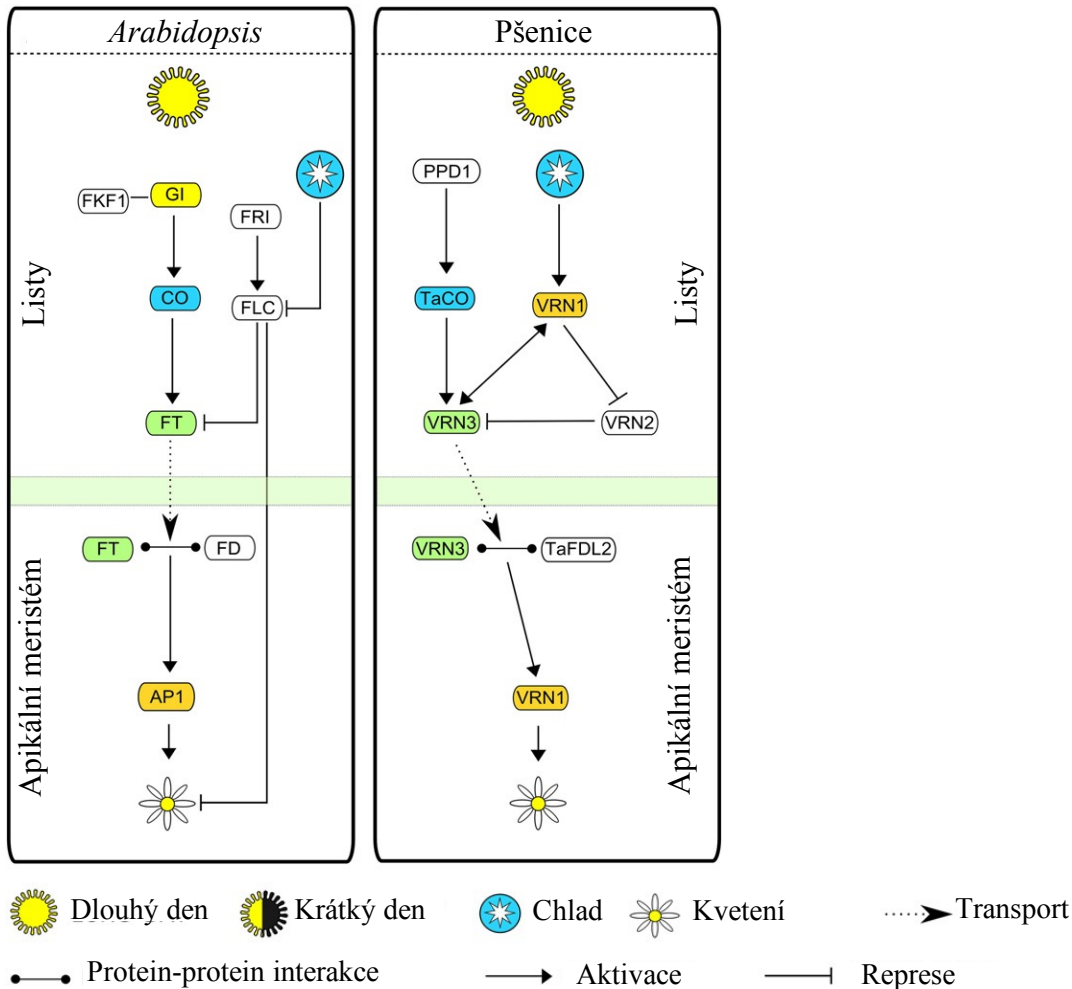
Fotoperioda neboli doba trvání světla během dne je kritickým faktorem, který kvetoucí rostliny využívají ke koordinaci svého reprodukčního vývoje s vnějším prostředím (Golembeski a kol., 2014). Na základě reakce na fotoperiodu jsou rostliny klasifikovány jako citlivé a necitlivé. Rostliny necitlivé na fotoperiodu kvetou po dosažení určité vývojové fáze nezávisle na délce dne. Rostliny citlivé na fotoperiodu se dále dělí na rostliny krátkodenní, které zahajují kvetení, když noc překročí kritickou délku (obvykle na podzim) a rostliny dlouhodenní, které kvetou, když výrazně klesne délka noci (obvykle koncem jara a léta) (Pouteau a kol, 2008). *A. thaliana* je typická dlouhodenní rostlina, což znamená, že kvete, když se délka dne prodlužuje, zatímco kratší dny kvetení brání (Blásquez a kol., 2001).

Mezi důležité geny (viz Obrázek 3), které se tohoto mechanismu účastní, patří *CO* (*CONSTANS*) (Putterill a kol, 1995), *GI* (*GIGANTEA*) (Fowler a kol., 1999), *FT* (*FLOWERING*

LOCUS T) (Kobayashi a kol, 1999) a *PRR* geny (*PSEUDO RESPONSE REGULATORS*) (Beales a kol, 2007).

Fotoperiodická dráha začíná vnímáním světelných signálů, za což jsou zodpovědné fotoreceptory v listech. Fotoreceptory v rostlinách spadají pod tři hlavní typy: fytochromy (Butler a kol., 1959), kryptochromy (Cashmore, 1997) a fototropiny (Christie a kol., 1999). Kryptochromy se nacházejí v buněčném jádře a reagují na modré světlo (Cashmore a kol., 1999). Fytochromy byly oproti tomu objeveny v rostlinách reagujících na světlo červené a jsou schopny vyvolat odpověď samy, nebo za spolupráce s jinými chromoproteiny (Borthwick a kol, 1952).

Snímaný signál je přenesen do cirkadiánních hodin (Somers a kol., 1998), které jsou zodpovědné za to, aby byl vnitřní čas v souladu s vnějším prostředím během 24hodinového cyklu (Xie a kol., 2019) a regulují transkripční faktor, který je kódován *CO* (An a kol., 2004). Úroveň transkripce *CO* ovlivňují FKF1 (FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1), GI, FBH (FLOWERING BHLH) a CDF (CYCLING DOF FAKTOR), což jsou transkripční faktory, které se vážou na regulační oblast *CO* a inhibují jeho transkripci (Fornara a kol., 2009). Naproti tomu *PRR* geny s *CO* v určitých časech během dne interagují a stabilizují ho. Způsobují jeho akumulaci, což vede ke zvýšené vazbě *CO* na promotor *FT* genu (Golembeski a kol., 2014), který se začne transkribovat (Hayama a kol., 2017). FT protein se poté přesune z listů do vrcholu výhonu, kde je zahájeno kvetení (An a kol., 2004).



Obrázek 3: Geny podílející se na drahách kvetení u *Arabidopsis* a pšenice. Schématické srovnání působení klíčových genů podílejících se na fotoperiodické a vernalizační dráze u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* a pšenice. Převzato a upraveno dle Milec a kol. (2013).

3.2.1.2 Vernalizační dráha

Vernalizace umožňuje některým rostlinám vegetativně přezimovat a vykvést až na jaře (Johanson a kol., 2000). U *A. thaliana* je podpora kvetení skrz vernalizační dráhu regulována především prostřednictvím genu *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) (Werner a kol, 2005) (viz Obrázek 3), který je aktivován genem *FRI* (*FRIGIDA*) (Michaels a kol., 2004) a potlačuje začátek kvetení (Searle a kol, 2006). Pomocí vernalizace lze dosáhnout jeho epigenetické represe (Wood a kol., 2006). Je-li *FLC* exprimován, působí v listech a apikálním meristému (Searle a kol., 2006) jako transkripční inhibitor genu *FT* a *SOCI* (*SUPRESSION OF OVEREXPRESSION OF CO 1*), což jsou geny podílející se na zahájení kvetení (Helliwell a kol., 2006). Před vernalizací potlačuje *FLC* iniciaci kvetení, čímž zabraňuje změnám, které přeměňují apikální meristém na meristém produkující reprodukční struktury. Po delší době nízké teploty je exprese *FLC* potlačena a rostliny jsou schopny zahájit kvetení. Represe *FLC* je

spojena s modifikacemi *FLC* chromatinu, které brání transkripční aktivitě genu (Bastow a kol, 2004). Dva lokusy regulující *FLC* jsou již zmíněný lokus *FRI* a lokus *VIN3* (*VERNALIZATION INSENSITIVE 3*) (Sung & Amasino, 2004). *FRI* je zodpovědná za vysokou úroveň produkce *FLC* proteinu, oproti tomu lokus *VIN3*, který je indukován nízkou teplotou během vernalizace, transkripční aktivitu *FLC* snižuje. To vede k podpoře zahájení kvetení (Sheldon a kol, 2000).

Alelická variace lokusu *FRI* ovlivňuje dobu kvetení (Johanson a kol., 2000). Dominantní alely *FRI* jsou zodpovědné za pozdní kvetení, v takovém případě rostlina vyžaduje vernalizaci. U raných odrůd se v genu *FRI* vyskytuje buď 16bp delece na konci exonu 1, která vede ke změně čtecího rámce a terminaci ORF (OPEN READING FRAME) hned na začátku exonu 2, nebo delece 376 bp kombinovaná s 31 bp inzercí, které naruší začátek ORF, což vede k odstranění start kodonu. Obě tyto mutace jsou zodpovědné za ztrátu funkce *FRI* a umožnily evoluci mnoha raně kvetoucích odrůd (Johanson a kol., 2000).

3.2.2 Pšenice planá dvouzrnka (*Triticum dicoccoides*)

Schopnost pšenice synchronizovat své kvetení s příznivými podmínkami prostředí je klíčovým faktorem pro její globální adaptibilitu umožňující produkovat uspokojivý výnos za velmi rozdílných teplot či při rozdílné vlhkosti půdy (Kamran a kol., 2014). Za výnosový potenciál pšenice v různých klimatech jsou zodpovědné tři hlavní genové systémy a jejich reakce na rostoucí teploty (Gororo a kol., 2001). Jedná se o vernalizaci, fotoperiodu a geny ranosti (*earliness per se*) (Herndl a kol., 2008). Geny fotoperiodické a vernalizační dráhy urychlují a zpomalují kvetení v reakci na podněty z okolního prostředí, čímž zajistí, že iniciace kvetení proběhne při optimální teplotě (Law & Worland, 1997).

3.2.2.1 Fotoperiodická dráha

Fotoperiodická dráha je zodpovědná za regulaci doby kvetení prostřednictvím citlivosti rostliny na světlo. Odrůdy necitlivé na fotoperiodu mohou přejít do reprodukčního stádia hned poté, co se na jaře zvýší teploty, zatímco odrůdy citlivé na fotoperiodu zůstávají ve vegetativní fázi do té doby, dokud se délka dne neprodlouží na požadovanou hodnotu (Worland & Snape, 2001).

Za genetickou kontrolu odpovědi na fotoperiodu u pšenice je zodpovědná série fotoperiodických genů, které jsou umístěny na homologních chromozomech skupiny 2 (Worland & Snape, 2001). Citlivost na délku dne je z velké části řízena především alelami genu *PPD1* (*PHOTOPERIOD1*) (Welsh a kol., 1973), který patří do *PRR* genové rodiny a je

také znám jako *PRR37* gen. Význam *PPD1* genu zdůrazňuje zásadní roli cirkadiálních hodin v koordinaci odpovědi na délku dne (Mizuno & Nakamichi, 2005). Cirkadiální hodiny byly intenzivně studovány v *A. thaliana* a výrazně méně u pšenice, ale jelikož se základní složky zdají být v obilovinách konzervované, tak se *A. thaliana* využívá jako modelový příklad (Hyles a kol., 2020). Cirkadiální hodiny hrají klíčovou roli v dráze fotoperiody hlavně z toho důvodu, že regulují expresi *CO* (Samach a kol., 2000). K nejvyšší transkripci *CO* dochází během pozdního odpoledne (Suarez-Lopez a kol., 2001) a odbourává se ve tmě. Z toho vyplývá, že za krátkých dnů, kdy se brzy stmívá, dochází k jeho degradaci, jelikož akumulace proteinu *CO* vrcholí až za tmy. Naopak během dlouhých dnů k maximální expresi dochází během světla a *CO* má možnost aktivovat *FT* gen a tím zahájit kvetení (Hyles a kol., 2020).

3.2.2.2 Vernalizační dráha

Vernalizace je proces zajištění nebo urychlení kvetení rostliny pomocí prodlouženého vystavení nízkým teplotám (Chouard, 1960). Probíhá v širokém rozpětí teplot od -1 °C do 15 °C (Porter & Gawith, 1999), nejefektivnější teploty se ovšem pohybují mezi 1–8 °C (Brooking & Jamieson, 2002). Na základě rozdílného požadavku na dobu trvání vernalizace jsou kultivary ozimé pšenice rozděleny na tři typy. Rané odrůdy jsou stimulovány ke kvetení krátkým vystavením nízké teplotě, intermediární odrůdy vyžadují 2–4 týdny a pozdní ozimé odrůdy potřebují 4–6 týdnů (Crofts, 1989). Oproti tomu jarní odrůdy pšenice vernalizaci nevyžadují a na působení chladem reagují relativně málo (Jedel a kol., 1986).

Vernalizace je zodpovědná za zahájení kvetení pšenice při optimálních teplotách. Například ve vysokých severních zeměpisných šířkách zpomalují vernalizační geny iniciaci kvetení u ozimé pšenice. Tím zabráňují poškození křehkých rostlinných orgánů nízkými teplotami (Law & Worland, 1997).

Hlavními geny, které se účastní vernalizační dráhy, jsou geny *VRN-1*, *VRN-2* a *VRN-3*.

3.2.2.2.1 *VRN-1* gen

VRN-1 gen je lokalizován na chromozomové skupině 5 (Galiba a kol., 1995) a je vnímán jako hlavní iniciační faktor regulující kvetení, jelikož kóduje transkripční faktor MADS-box, kontrolující přechod z vegetativního do reprodukčního stádia (Yan a kol., 2003). U ozimé pšenice nesoucí intaktní *VRN-1* alely je exprese *VRN-1* a její úroveň indukována vernalizací a její délkou (Loukoianov a kol., 2005; Trevaskis a kol., 2006). Jarní odrůdy pšenice nesou alespoň jednu dominantní alelu s mutací v regulačním regionu, tedy v oblasti promotoru nebo

prvního intronu (Distelfeld a kol., 2009a), a díky vysoké bazální expresi těchto alel nevyžadují ke svému kvetení vernalizaci (Greenup a kol., 2009). Alelická variabilita lokusů *VRN-1* je asociována s velkými rozdíly v kvetení a poskytuje polyploidní pšenici výhodu při adaptaci na širší škálu prostředí (Shcherban a kol., 2015).

Analýzou promotoru *VRN-1* genů bylo prokázáno, že obsahují konzervativní cis-elementy, které představují cíl pro transkripční faktory podílející se na reakci na působení chladu. Takovými místy jsou: CArG box (Yan a kol., 2003) typický pro *VRN-1* geny, který ovšem pro vernalizační odpověď není nezbytný (Pidal a kol., 2009); Vrn-box, který může obsahovat mutace ovlivňující vernalizační požadavek a dobu metání (Muterko a kol., 2016); dvě vazebná místa pro proteiny z rodiny bZIP (C-box a G-box) (Li & Dubcovsky, 2008); CCAAT box, což je vazebné místo komplexu NF-Y (Diallo a kol., 2012); vazebné místo proteinu podobného MyoD a rozpoznávací místo HMG1, což je možný modulátor struktury chromatinu (Golovnina a kol., 2010). Kromě promotoru se za důležitou oblast považuje i oblast takzvaného kritického regionu, který determinuje jarní růstový typ v případě, že obsahuje velké delece nebo inserce. Nachází se v prvním intronu a začíná v bodě, kde se všechny velké delece a v dominantních alelách překrývají (Fu a kol., 2005). K tomuto objevu došlo poté, co byla u pšenice a ječmene objevena řada dominantních alel obsahujících pouze velké delece právě v prvním intronu (Fu a kol., 2005). Například dominantní alely *VRN-A1c* a *VRN-B1a* obsahují velké delece v prvním intronu, zatímco jejich promotorové oblasti se neliší od promotorových oblastí odpovídajících recesivním alelám těchto lokusů (Shcherban & Salina, 2017). V prvním intronu byla také detekována místa pro vazbu GRP2 proteinu (GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 2), který působí jako represor *VRN-1* genu (Xiao a kol., 2014).

U tetraploidních pšenic bylo popsáno několik mutací *VRN-1* genu způsobujících jarní růstový typ. Mezi alely s mutací v promotoru patří alely *VRN-A1a.1-a.3*, které mají inserce buď 231 bp, 211 bp, nebo 52 bp; *VRN-A1e*, která má delecí 54 bp; *VRN-A1d*, která má delecí 19 bp a 32 bp v oblasti CArG boxu; *VRN-A1b*, která má delecí 20 bp (Yan a kol., 2004a), ale dnes je spojována se zimním růstovým typem, jelikož byla stejná delecí nalezena i u ozimých odrůd (Shcherban a kol., 2015); *VRN-B1ins*, která má 5.4 kb inserci (Chu a kol., 2011); *VRN-A1i*, u které se vyskytují jednonukleotidové polymorfismy (Muterko a kol., 2016); *VRN-A1k*, která má inserci 42 bp (KX874608.1); *VRN-B1a*, která má 127 bp inserci a *VRN-A1f*, která má delecí 50 bp (Golovnina a kol., 2010). Sekvenční analýza alely *VRN-A1f-like* odhalila významné variace v promotorových a regulačních oblastech prvního intronu, ve kterém bylo identifikováno také vložení transponovatelného elementu MITE, jehož velikost je 433 bp (Ivaničová a kol., 2016).

Mezi alely s mutací v prvním intronu patří alely *VRN-AIL*, která má delecii 7,2 kb (Fu a kol., 2005); *VRN-A1c*, která má delecii 5,5 kb (Yan a kol., 2004a); *VRN-B1a*, která má delecii 6,8 kb (Fu a kol., 2005) a *VRN-B1c*, která má 7,6 kb delecii a 0,4 kb duplikaci (Shcherban a kol., 2012).

3.2.2.2.2 *VRN-2* gen

VRN-2 gen slouží jako hlavní represor kvetení. Je-li *VRN-2* dominantní, má pšenice zimní růstový typ, na rozdíl od *VRN-1* genu, jehož dominantní forma zodpovídá za jarní růstový typ (Yan a kol., 2004b). *VRN-2* lokus zahrnuje doménu zinkového prstu spojenou s CCT doménou a nachází se zde dva geny (*ZCCT1* a *ZCCT2*). Srovnání mezi funkčními a nefunkčními alelami odhalilo, že geny *ZCCT1* a *ZCCT2* působí jako represory kvetení a mutace nebo delece obou genů jsou spojené s jarním růstovým typem (Distelfeld a kol., 2009b). Zvýšená exprese *VRN-1* způsobená vernalizací nebo mutací v tomto genu vede k potlačení *VRN-2* a následně k odstranění represe genu *VRN-3* (viz Obrázek 3) (Distelfeld a kol., 2009a).

3.2.2.2.3 *VRN-3* gen

Down-regulace *VRN-2* genu umožňuje aktivaci genu *VRN-3* (Distelfeld a kol., 2009a). Tento gen kóduje protein podobný inhibitoru RAF kinázy, který pozitivně ovlivňuje kvetení u pšenice (Yan a kol., 2006). Jeho aktivita je indukována také dlouhými dny, spojuje tedy vernalizační dráhu s dráhou fotoperiodickou, která pak ještě více urychluje přechod do reprodukčního stádia (Yan a kol., 2006). *VRN-3* gen zpětně působí na gen *VRN-1*, což vede k vytvoření pozitivní zpětnovazebné smyčky, která up-reguluje transkripty *VRN-1* do té doby, dokud není přesažena prahová hodnota a je zahájeno kvetení (Distelfeld a kol., 2009a). *VRN-3* vykazuje vysokou podobnost s *FT* genem, což je florigen popsáný u *A. thaliana*, a stejně jako on se *VRN-3* transportuje z listu do apikálního meristému (Yan a kol., 2006).

3.2.2.3 Geny ranosti (*earliness per se*)

Eps geny (*earliness per se*) neboli geny ranosti *per se* stejně jako vernalizační a fotoperiodické geny regulují dobu kvetení u pšenice, na rozdíl od nich však nejsou tolik prostudovány (Meluleki Zikhali & Simon Griffiths, 2015). Eps geny jsou zodpovědné za jemné doladění doby kvetení (Valárik a kol., 2006) a adaptaci pšenice na různá prostředí (Griffiths a kol., 2009). Mezi tyto geny se řadí například pšeničný ortolog regulátoru cirkadiálních hodin ELF3 (EARLY FLOWERING 3) (Alvarez a kol., 2016), který je zodpovědný za regulaci doby metání a tvoří součást cirkadiálního oscilátoru (Wittern a kol., 2022).

3.3 Sekvenování

Watson a Crick společně objevili trojrozměrnou strukturu DNA (Watson & Crick, 1953), což významně přispělo k chápání replikace DNA a kódování proteinů v nukleových kyselinách. Avšak metody, které by umožnily sekvenovat DNA, nebyly dostupné ještě několik let. Existující techniky, které byly vyvinuté k odvození sekvencí proteinových řetězců, se nedaly aplikovat na nukleové kyseliny zejména kvůli jejich délce a složení. Podjednotky nukleových kyselin si jsou totiž velice podobné, což je činilo velmi špatně rozlišitelné (Hutchison, 2007).

První pokusy o sekvenování se zaměřily na nejnázve dostupné druhy RNA, jako je transferová či mikrobiální ribozomální RNA, nebo genomy bakteriofágů s jednovláknovou RNA. Byly zvoleny z toho důvodu, že jsou často podstatně kratší než molekuly eukaryotické DNA a navíc nebylo sekvenování komplikováno komplementárním řetězcem. Navzdory těmto výhodám byl pokrok pomalý (Heather & Chain, 2016). Dostupné metody, které si vědci propůjčili z analytické chemie, byly schopny měřit pouze složení nukleotidů, nikoli jejich pořadí (Holley a kol., 1961). I navzdory tomu byl však jejich kombinací Robert Holley a jeho kolegové schopni v roce 1965 vytvořit první celou sekvenci nukleové kyseliny, kterou byla alaninová tRNA kvasinky pивní (*Saccharomyces cerevisiae*) (Holley a kol., 1965).

Paralelně s Robertem Holleyem Fred Sanger a jeho kolegové vyvinuli techniku založenou na detekci radioaktivně značených fragmentů tvořených pomocí 2D frakcionace (Sanger a kol., 1965). V té době začali vědci přizpůsobovat své metody za účelem sekvenování, nicméně skutečné stanovení bází bylo stále omezeno pouze na krátké úseky DNA a zahrnovalo množství analytické chemie a frakcionačních postupů (Heather & Chain, 2016). Hlavní průlom přišel v roce 1977, kdy Sanger vyvinul Sangerovu nebo také dideoxy metodu (Sanger a kol., 1977).

3.3.1 Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování je založeno na selektivních reakcích ukončujících prodlužování řetězce probíhající prostřednictvím *in vitro* replikace DNA pomocí DNA polymerázy (Sanger a kol., 1977). K tomu jsou využívány dideoxyribonukleotidy (ddNTP), chemické analogy deoxyribonukleotidů (dNTP), které plní funkci monomerů řetězce DNA. Dideoxyribonukleotidy postrádají hydroxylovou skupinu na 3' konci, která je nezbytná k prodloužení DNA řetězce, proto nemohou tvořit vazbu s fosfátem na 5' konci dalšího deoxyribonukleotidu (Chidgeavadze a kol., 1984) a používají se čtyři typy: ddATP, ddGTP, ddCTP a ddTTP. Do reakce se přidávaly radioaktivně značené jako zlomek koncentrace

standartních deoxyribonukleotidů a následně došlo k jejich náhodnému začlenění, což zastavilo další prodlužování. To vedlo k produkci řetězců DNA různých délek. Provedením čtyř paralelních reakcí obsahujících každou jednotlivou bázi ddNTP a zpracováním výsledků ve čtyřech drahách polyakrylamidového gelu je možné odvodit nukleotidovou sekvenci v původním templátu (Sanger a kol., 1977). Později se metoda ještě vylepšila, což primárně zahrnovalo nahrazení radioaktivního značení značením fluorescenčním markerem jiným pro každý dideoxyribonukleotid. To umožnilo nechat reakci probíhat pouze v jedné nádobě namísto čtyř (Prober a kol., 1987). Druhým vylepšením byla změna způsobu detekce, kdy se namísto polyakrylamidového gelu začala používat kapilární elektroforéza (Swerdlow & Gesteland, 1990). Díky těmto pokrokům Sangerova metoda nakonec umožnila dokončení první sekvence lidského genomu v roce 2004 (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

Sekvenátory první generace jsou schopné produkovat čtení dlouhá přibližně jednu kilobázi. Pro analýzu delších fragmentů se využívá technika shotgun sekvenování, kdy se překrývající se fragmenty nejprve naklonují, sekvenují odděleně a až poté jsou sestaveny do jedné souvislé sekvence *in silico* (Anderson, 1981).

3.3.2 Sekvenační technologie nové generace

Sekvenační technologie nové generace zahrnují různé vysoce výkonné sekvenační metody, které umožňují analýzu milionů až bilionů DNA templátů najednou, což značně usnadnilo a rozšířilo možnosti analýzy genomu. Na rozdíl od Sangerovy metody sdílejí tyto metody tři hlavní vylepšení: místo klonování fragmentů DNA je spoléháno na přípravu NGS knihoven v nebuněčném systému; místo stovek, tisíce až mnoho milionů sekvenačních reakcí při NGS sekvenování probíhá paralelně a výstup sekvenování je detekován přímo bez potřeby elektroforézy. Enormní množství čtení získaných pomocí sekvenování nové generace umožnilo sekvenovat celé genomy nesrovnatelnou rychlostí. Nevýhodou této technologie je však její relativně krátké čtení, které znesnadnilo sestavování genomu a vyžadovalo rozvoj nových algoritmů (van Dijk a kol., 2014).

3.3.2.1 Pyrosekvenování

První technikou NGS, která se objevila, bylo pyrosekvenování (Margulies a kol., 2005). Tato metoda produkující čtení o délce přibližně 1–100 párů bazí (Siqueira a kol., 2012), se výrazně liší od metod sekvenování první generace, a to především v tom, že neodvozuje nukleotidovou identitu pomocí radioaktivně nebo fluorescenčně značených deoxyribonukleotidů, ale namísto

toho využívá luminiscenční metodu určenou k měření úrovně syntézy pyrofosfátu (Nyrén & Ludin, 1985). Pyrosekvenování mělo řadu výhod, který byly považovány za přínosné: tato metoda mohla být provedena s použitím nemodifikovaných nukleotidů a mohla být také pozorována v reálném čase (Ronaghi a kol., 1996). Navzdory jiným rozdílům Sangerova metoda i pyrosekvenování využívají SBS technologii (sekvenování syntézou), protože obě vyžadují přímé působení DNA polymerázy k vytvoření pozorovatelného výstupu (Nyrén, 1987).

Prvním vysoce výkonným široce dostupným sekvenačním strojem se stal pyrosekvenátor 454 Genome sekvenátor (Voelkerding a kol., 2009), který generoval asi 200 000 čtení o 110 bp. O rok později byla uvedena na trh Solexa/Illumina (Illumina získala Solexu v roce 2007) a v roce 2007 SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection) (Valouev a kol., 2008). Princip provádění obrovského množství paralelních sekvenačních reakcí v mikrometrovém měřítku je tím, co definovalo druhou generaci sekvenování DNA (Shendure & Ji, 2008).

3.3.2.2 Illumina sekvenování

Po úspěchu 454 se objevila řada technik paralelního sekvenování. Nejdůležitější z nich je pravděpodobně metoda sekvenování Solexa, kterou později získala společnost Illumina (Voelkerding a kol., 2009). Sekvenování probíhá na destičce opatřené komplementárními oligonukleotidy, přes které prochází adaptory s navázanými molekulami DNA (Fedurco a kol., 2006). Při následné PCR na pevné fázi se adaptory zachycují na oligonukleotidy, čímž mezi nimi vznikají můstky, a jsou produkovány klastry klonálních populací od každého původního DNA řetězce. Kvůli replikujícím se řetězcům, které musí vytvořit můstek, aby vyvolaly další kolo polymerizace sousedních oligonukleotidů, se tento proces nazývá můstková amplifikace (Voelkerding a kol., 2009). Samotného sekvenování je dosaženo pomocí technologie SBS za využití fluorescenčně značených deoxyribonukleotidů, na které nemohou být okamžitě navázány další nukleotidy, jelikož fluorochrom zaujímá pozici na hydroxylovém 3' konci DNA řetězce a musí být tedy nejdříve odštěpen, než může polymerace pokračovat (Turcatti a kol., 2008). Tyto modifikované deoxyribonukleotidy a DNA polymeráza jsou v cyklech promývány přes jednovláknové klastry. Během každého cyklu je možné pomocí CCD kamery identifikovat identitu nově nasedajícího nukleotidu díky excitaci fluorochromu vhodným laserovým paprskem předtím, než dojde k enzymatickému odstranění blokujících fluorescenčních skupin navázaných na hydroxylovém 3' konci DNA řetězce a pokračování do další pozice. První GA (Genom Analyzer) stroje byly schopné pouze velmi krátkých čtení, dlouhých asi jen 35 párů bází, ale měly výhodu v tom, že dokázaly produkovat PE (paired-end) data, která poskytují

větší množství informací a jsou v nich zaznamenány sekvence z obou konců DNA klastru. Díky těmto informacím dochází ke větší přesnosti při mapování vůči referenčním sekvencím, zejména u repetitivních sekvencí (Balasubramanian, 2011). Standartní verzi GA (GAIIx) později následoval HiSeq, stroj schopný ještě větší délky a přesnosti čtení (2 x 150 bp), a poté MiSeq, který je schopný produkovat delší čtení (2 x 300 bp) (Quail a kol., 2012).

3.3.2.3 Sekvenování dlouhých čtení

V oblasti sekvenování DNA je momentálně neočekávanější vývoj v oblasti nanopórového sekvenování, které je odnoží většího pole výzkumu využívajícího nanopóry pro detekci a kvantifikaci všech druhů biologických a chemických molekul (Haque a kol., 2013). Jedná se o jednomolekulární metodu sekvenování, která nevyžaduje fluorescenční značení. K odštěpení jednotlivých nukleotidových molekul z DNA lze použít enzym exonukleázu, který ve spojení s vhodným detekčním systémem umožní identifikovat nukleotidy ve správném pořadí. Takovým systémem je proteinový nanopór s kovaletně připojenou molekulou adaptéru, který je schopný nepřetržitě identifikovat molekuly nukleosid-5'-monofosfátu (Clarke a kol., 2009).

To že mají nanopóry potenciál pro sekvenování bylo zjištěno ještě předtím, že se objevilo sekvenování druhé generace (například Illumina nebo pyrosekvenování), jelikož bylo prokázáno, že jednovláknová RNA nebo DNA může být pomocí elektroforézy vedena přes lipidovou dvojvrstvu prostřednictvím velkých α -hemolysinových iontových kanálů (Heather & Chain, 2016). Průchod kanálem navíc blokuje tok iontů, čímž se snižuje délka času průchodu úměrně k délce nukleové kyseliny (Kasianowicz a kol., 1996).

Oxford Nanopore Technologies (ONT) je první společnost nabízející nanopórové sekvenátory, jako jsou GridION a MinION, což je malé mobilní USB zařízení, které bylo poprvé uvedeno na trh v roce 2014 (Loman & Quinlan, 2014). Tyto platformy mají sice poměrně nekvalitní profily, představují však převratnou technologii v oblasti sekvenování DNA a to zejména proto, že produkují rychle a levně velmi dlouhá čtení neamplifikovaných sekvenčních dat (Branton a kol., 2008).

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál bylo použito 93 genotypů *Triticum dicoccoides* ze čtyř zemí oblasti Úrodného půlměsíce (Turecko, Sýrie, Libanon, Izrael), z toho bylo 20 genotypů jarních a 73 ozimých. Růstový typ byl určen podle databáze GR IN-Global database (Verze: 2.0.5.0).

Semena byla poskytnuta prof. Hakanem Özkanem z Çukurova University.

4.1.1 Pěstování rostlinného materiálu pro izolaci DNA

Od každého genotypu byla odebrána 3 semena, která se nejprve nechala naklíčit ve fytostronu na navlhčené buničině a filtračním papíru v Petriho misce. Po naklíčení byla zasazena do květináčů o velikosti 13x13 centimetrů, které obsahovaly zahradnický substrát (Rašelina Agro). Naklíčená semena byla pěstována ve fytostronu za dlouhého dne. Bližší podmínky pěstování ve fytostronu jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Podmínky pěstování rostlinného materiálu ve fytostronu.

	Den	Noc
Režim	16 hodin	8 hodin
Teplota	20 °C	16 °C
Vlhkost	60 %	60 %

Listy pro izolaci DNA byly odebrány ve fázi tří listů. Po dozrání klasů byla sklizena semena pro další experimenty.

4.1.2 Pěstování a fenotypizace rostlinného materiálu

Pěstování bylo opakováno ve třech po sobě jdoucích letech (20. 11. 2016, 12. 12. 2017, 4. 12. 2018) v Turecké Adaně prof. Hakan Özkanem a jeho týmem.

Semena se nejprve nechala naklíčit v malých květináčích. Ve fázi tří listů byly rostliny zasazeny do pole. Šest až sedm sazenice od každého genotypu bylo vysazeno do řádku dlouhého jeden metr. Bylo tak učiněno celkem ve dvou replikátech, tzn. dva řádky na genotyp. V čase metání byl řádek pečlivě zkontrolován, a pokud mělo asi 75 % rostlin v řádku viditelné klasy, stanovil se den metání na toto datum.

Podle data, kdy byla rostlina vyseta, byl zaznamenán počet dní od výsevu po metání.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- Agaróza (Meridian Bioscience[®], kat. č. BIO-41025)
- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ μ L) (Thermo Fisher, kat. č. EF0654)
- Exonuclease I (20 U/ μ L) (Thermo Fisher, kat. č. EN0581)
- Cresol-Red DNA Loading Dye (6x) (Sigma Aldrich, kat. č. 114472)
- Velikostí marker GeneRuler 100 bp plus DNA ladder (Thermo Scientific[™], kat. č. SM0322)
- Ethidium bromid (Sigma Aldrich, kat. č. E1510)
- Ethanol absolutní (Penta, kat. č. 71250-11001)
- Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, kat. č. A63881)
- Carbenicillin (Sigma Aldrich, kat. č. C1613)

4.2.2 Použité soupravy

- BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[™], kat. č. 4337455)
- CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher, kat. č. K1232)
- HOT FIREPol[®] DNA Polymerase (Solis Biodyne, kat. č. 01-02-00500)
- NucleoSpin[®] Plant II (Macherey-Nagel, kat. č. 740770.250)
- Taq DNA polymerase (Top Bio, kat. č. T032)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, kat. č. 27106)
- QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN, kat. č. 28706)
- Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA Assay Kit (Invitrogen, kat. č. P7589)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

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).

0,5x TBE (pH = 8): Nalít 100 ml 5x TBE pufru do nádoby a doplnit destilovanou vodou na objem 1000 ml.

LB médium: 1% trypton (Himedia), 0,5% kvasnicový extrakt (Himedia), 1% chlorid sodný (Lachner), deionizovaná voda.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Aparatura pro agarózovou elektroforézu OWL A6 (Thermo Fisher)
- Transiluminátor InGenius (Syngene), program GeneSnap
- Zdroj napětí pro elektroforézu (Major Science)
- Automatické pipety (Nichipet EX Plus)
- C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Elektroporátor (Cell-porator®)
- Mikrobiologický ochranný box (Thermo Fisher)
- Termoblok (Major Science)
- Třepací inkubátor (VWR)
- Fluorimetr (Turner BioSystem)
- Homogenizátor MM301 (Retsch)
- Laboratorní předvážky AJ-820CE (Shinko Denshi)
- Mikrovlnná trouba (Daewoo)
- Minicentrifuga (VWR)
- Sekvenátor ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems)
- Spektrofotometr NanoDrop One (Thermo Fisher)
- Stolní centrifuga (Thermo Fisher)
- Vortex (Heidolph REAX control)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Sekvenční analýza *VRN-1* genů u pšenice plané dvouzrnky (*Triticum dicoccoides*)

4.4.1.1 Izolace DNA

Z každé rostliny ve fázi tří listů bylo odebráno asi 100 mg listů a vloženo do 2ml mikrozkušavky se dvěma skleněnými kuličkami, která byla ihned po odběru zamražena v tekutém dusíku. Vzorky byly homogenizovány v homogenizátoru při 27 000 Hz 2 minuty. Následně byla genomická DNA izolována pomocí NucleoSpin® Plant II kitu (Macherey-Nagel, kat. č. 740770.250) dle instrukcí výrobce. Koncentrace jednotlivých vzorků byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop One (Thermo Fisher) a vzorky byly uloženy při -20 °C.

4.4.1.2 Příprava amplikonů pomocí polymerázové řetězové reakce

K amplifikaci části promotorů *VRN-A1* a *VRN-B1* obsahujících důležité regulační sekvence byly zvoleny již publikované primery, jejichž název, sekvence, teplota annealingu, doba elongace a literární zdroj jsou uvedeny v Tabulce 2. Zastoupení látek v reakční směsi a teplotní programy jsou uvedeny v Tabulkách 3 a 4.

Tabulka 2: Primery použité k amplifikaci promotorů *VRN-A1* a *VRN-B1* za účelem sekvenování.

Gen	Název primeru	Sekvence (5' → 3')	Velikost produktu	Teplota nasedání primeru	Doba elongace	Literární zdroj
<i>VRN-A1</i>	VRN1AF	GAAAGGAAAAATTCT GCTCG	678 bp	51 °C	1 min	Yan a kol. (2004b)
	VRN1INTR1R	GCAGGAAATCGAAAT CGAAG				
<i>VRN-B1</i>	Pr1	TACCCCTGCTACCAGT GCCT	968 bp	60 °C	1 min	Shcherba a kol. (2012)
	Pr2	GGCCAACCCTACACCC CAAG				
	VRNBPF1	CCCCTGCTACCAGTGC CTACTA	1000 bp	61 °C	1 min	Chu a kol. (2011)
	VRNBPR1	GCCCCATCTCCGCTGG AGAACG				
vrnB1_1F	GCTCTTTCCTTCTAC TAGGC	830 bp	59,8 °C	1 min	Guedira a kol. (2016)	
vrnB1_1R	CGAATCAACCAAACA GTGG					

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi k amplifikaci promotoru *VRN-A1* pomocí primerů VRN1AF a VRN1INTR1R a promotoru *VRN-B1* pomocí primerů Pr1 a Pr2, VRNBPF1 a VRNBPR1 nebo vrnB1_1F a vrnB1_1R a HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis Biodyne, kat. č. 01-02-00500).

Látka	Objem v 1 reakci [μl]
HOT FIREPol® Buffer B1 10x	1,5
MgCl ₂ , 25 mM	1,05
dNTPs, 2 mM	1,5
Forward primer, 100 μM	0,04
Reverse primer, 100 μM	0,04
Sterilní destilovaná voda	6,77
Cresol-Red DNA Loading Dye, 6x	3
HOT FIREPol® DNA Polymerase (5 U/μl)	0,1
DNA, 10 ng/μl	1
Celkový objem	15

Tabulka 4: Teplotní program PCR cycleru k amplifikaci promotoru *VRN-A1* pomocí primerů VRN1AF a VRN1INTR1R a promotoru *VRN-B1* pomocí primerů Pr1 a Pr2 nebo VRNBPF1 a VRNBPR1 a HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis Biodyne, kat. č. 01-02-00500).

Krok	Teplota [°C]	Doba trvání	Počet cyklů
Iniciace denaturace	95	15 min	1x
Denaturace	95	30 s	
Annealing	51–61	1 min/1kb	35 x
Elongace	72	1 min	
Finální elongace	72	5 min	1x
Chlazení	12	∞	

4.4.1.3 Elektroforetická separace v agarózovém gelu

Elektroforéza v 1,5% (w/v) agarózovém gelu byla využita k ověření přítomnosti PCR produktů. Pro stanovení velikosti PCR ampliconů byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Jednotlivé vzorky byly již při polymerázové řetězové reakci smíchány s příslušným množstvím nanášecího pufru (Cresol-Red DNA Loading Dye, 6x), z toho důvodu byly nanášeny rovnou na gel. Elektroforetická separace probíhala při pokojové teplotě po dobu 1,5 hodiny a při napětí 130 V v 0,5 x TBE pufru. Po dokončení elektroforézy byl gel barven po dobu 20 minut v roztoku ethidium bromidu a následně vizualizován a vyfocen pomocí UV transiluminátoru InGenius (Syngene) v programu GeneSnap.

4.4.1.4 Měření koncentrace na fluorimetru

Koncentrace PCR produktů byla změřena na fluorimetru (Turner BioSystem) pomocí Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay kitu (Invitrogen, kat. č. P7589).

4.4.1.5 Enzymatické přečištění PCR produktu

PCR produkty byly před sekvenační reakcí nejprve enzymaticky přečištěny pomocí enzymů FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher, kat. č. EF0654) a Exonuclease I (Thermo Fisher, kat. č. EN0581). Zastoupení látek v reakční směsi je uvedeno v Tabulce 5. Teplotní program pro inkubaci enzymatického přečištění je uveden v Tabulce 6.

Tabulka 5: Složení reakční směsi enzymatického přečištění PCR produktů.

Látka	Objem v 1 reakci [μ l]
DNA	1–4 (v závislosti na koncentraci PCR produktu)
Exonukleáza 1, 20 U/ μ l	0,05
FastAP, 1 U/ μ l	0,5
1 x PCR pufr	doplnit na 7 μ l
Celkový objem	7

Tabulka 6: Teplotní program PCR cycleru pro enzymatické přečištění PCR produktů.

Krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Doba trvání
Inkubace	37	30 min
Inaktivace enzymů	80	20 min
Chlazení	4	∞

4.4.1.6 Sekvenační reakce

Sekvenační reakce byla prováděna pomocí BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems[™], kat. č. 4337455). Zastoupení látek v reakční směsi pro sekvenační reakci s forward a reverse primerem je uvedeno v Tabulce 7. Teplotní program pro sekvenační reakci je uveden v Tabulce 8.

Tabulka 7: Složení reakční směsi sekvenační reakce s forward/reverse primerem.

Látka	Objem v 1 reakci [μ l]
Sequencing Buffer, 5x	1,5
BigDye	0,5
Forward/Reverse primer, 10 μ M	1
DNA	2–3,5 (v závislosti na koncentraci a typu DNA)
Sterilní destilovaná voda	doplnit na 10 μ l
Celkový objem	10

Tabulka 8: Teplotní program PCR cycleru pro sekvenační reakci.

Krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Doba trvání	Počet cyklů
Iniciace denaturace	98	5 min	1x
Denaturace	96	10 s	60 x
Annealing	50	5 s	
Elongace	60	4 min	
Chlazení	4	∞	

4.4.1.7 Sangerovo sekvenování

Nejprve bylo nutné PCR produkty enzymaticky přečistit (viz Tabulka 4–5) a provést sekvenační reakci (viz Tabulka 6–7).

Před samotným sekvenováním byly produkty sekvenační reakce přečistěny kvůli odstranění nepoužitých reakčních komponent. Byl použit systém Agencourt CleanSEQ - Dye Terminator Removal (Beckman Coulter), založený na principu reverzibilní imobilizace na pevné fázi. Produkty sekvenační reakce byly navázány na paramagnetické kuličky, které se imobilizovaly na stěnách jamek pomocí magnetu a byly opakovaně promývány 85% ethanolem. Po odstranění a vysušení poslední dávky ethanolu následovala eluce DNA sterilní H₂O.

Po purifikaci byly DNA fragmenty sekvenovány sekvenátorem ABI 3730xl DNA analyzer. Přečištění sekvenačních produktů a samotné sekvenování bylo provedeno laborantkou Ing. Marií Seifertovou.

V případě *VRN-AI* promotoru nebylo přímé Sangerovo sekvenování u dvou genotypů (T1, T13) úspěšné. Tyto amplikony tedy byly před samotným sekvenováním klonovány. PCR produkty byly rozděleny pomocí agarové elektroforézy a následně extrahovány z gelu.

4.4.1.8 Extrakce z gelu

Před vlastním klonováním bylo nutné PCR produkt přečistit na agarózovém gelu, aby se neklovaly případné vedlejší produkty PCR reakce, jako jsou dimery primerů a nespecifické produkty.

PCR produkty byly nejprve nanесeny na 1% agarózový gel a byla spuštěna elektroforetická separace, která probíhala při pokojové teplotě po dobu 1,5 hodiny a napětí 90 V v 0,5 x TBE pufre. Po následné vizualizaci byly bandy z gelu vyřezány na transiluminátoru InGenius (Syngene) a DNA byla z gelu extrahována pomocí QIAquick® Gel Extraction kitu (QIAGEN, kat. č. 28706). Bylo postupováno dle instrukcí výrobce s dvěma změnami. Krok promývání PE pufrem byl opakován 3x a k eluci DNA se používalo 50 µl vody předehřáté na 65 °C, přičemž byla kolonka s nanесenou vodou nejprve 4 minuty inkubována a až poté centrifugována. Koncentrace jednotlivých vzorků byla změřená pomocí spektrofotometru NanoDrop One (Thermo Fisher).

4.4.1.9 Ligace PCR fragmentů

Ke klonování PCR fragmentů do vektoru byl použit CloneJET PCR Cloning kit (Thermo Fisher, K1232). Nejprve bylo nutné vypočítat množství PCR produktu pro ligační reakci. Toto

množství bylo určeno na základě délky a koncentrace PCR produktu. Následně byly pomocí DNA blunting enzymu ztupeny lepivé konce (Tabulka 9) a poté byla provedena ligační reakce s klonovacím vektorem pJET1.2, která je uvedena v Tabulce 10.

Tabulka 9: Složení reakční směsi na blunting reakci.

Látka	Objem v 1 reakci [μ l]
Reaction buffer, 2x	10
přečištěný PCR produkt	1 (0,15 pmol ends)
Sterilní voda bez nukleázy	doplnit na 17
DNA blunting enzyme	1
Celkový objem	18
inkubovat 5 minut na 70 °C	

Tabulka 10: Složení reakční směsi na ligační reakci s vektorem pJET1.2.

Látka	Objem v 1 reakci [μ l]
Blunting reakční směs	18
pJET1.2/blunt, 50 ng/ μ l	1
T4 DNA ligase, 5U/ μ l	1
Celkový objem	20
inkubovat 5–10 minut na 20 °C	

4.4.1.10 Transformace bakterií *Escherichia coli* pomocí teplotního šoku

K transformaci bakterií *E. coli* byly využity TOP 10 chemicky kompetentní buňky, které byly skladovány při -80 °C.

K 50 μ l buněk bylo přidáno 5 μ l ligační směsi a takto připravená směs se nechala 30 minut inkubovat na ledu. Poté byl proveden teplotní šok v inkubátoru při 42 °C na 45 sekund a prudké zchlazení ponořením do ledu na 2 minuty. Ke zchlazeným vzorkům bylo přidáno 950 μ l LB média, směs se lehce promíchala a inkubovala 1 hodinu při 37 °C a 300 rpm. Zkumavka byla stočena při 6000 rpm po dobu 2 minut, supernatant byl vylit a k peletu bylo přidáno 100 μ l LB puftru, ve kterém byl pelet resuspendován pomocí pipetování. Transformované bakterie byly pomocí bakteriologické hokejky rozetřeny v Petriho misce na LB médiu (25 ml LB média + 25 μ l antibiotika Carbenicillin na jednu miskou) a byly inkubovány při 37 °C přes noc.

4.4.1.11 Transformace bakterií *Escherichia coli* pomocí elektroporace

Připravené ligační směsy byly alternativně transformovány pomocí elektroporace. Nejprve bylo nutné provést odsolení vzorků. Do odsolovací zkumavky bylo pipetováno 15 µl zředěné ligační směsi (10 µl ligační reakce + 5 µl sterilní destilované vody) a ta se nechala 20 minut stát na ledu. Poté byla odsáta zpět do zkumavky a použita k transformaci.

Byly využity elektrokompetentní bakterie DH10BT1R, které byly nejprve rozmrazeny na ledu a následně se k nim přidalo 0,7 µl odsolené ligační směsi. K samotné elektroporaci byl použit elektroporátor (Cell-porator®).

Do vychlazené elektroporační kyvety byl postupně pipetován celý vzorek (po 15 µl). Systém byl nabit na 300–350 V a poté byl udělen výboj. Směs byla odsáta z kyvety a přenesena do 950 µl LB média. Zkumavka byla inkubována 1 hodinu při 37 °C a 300 rpm. Zkumavka byla stočena při 6000 rpm po dobu 2 minut, supernatant byl vylit a k peletu bylo nakonec přidáno 100 µl LB pufru, ve kterém byl pelet resuspendován pomocí pipetování. Transformované bakterie byly rozetřeny v Petriho misce na LB médiu (25 ml LB média + 25 µl antibiotika Carbenicillin na jednu misku) po 20 µl a 80 µl a byly inkubovány při 37 °C přes noc.

4.4.1.12 Colony PCR

U kolonií, které narostly na Petriho miskách inkubovaných přes noc při 37 °C, bylo pomocí Colony PCR s primery pJET1.2 F a pJET1.2 R následované agarózovou elektroforézou v 1,5% gelu ověřeno, zda obsahují zaklonovaný PCR produkt. Zastoupení látek v reakční směsi je uvedeno v Tabulce 11. Teplotní program pro inkubaci enzymatického přečištění je uveden v Tabulce 12.

Tabulka 11: Složení PCR reakční směsi k amplifikaci zaklonovaného PCR produktu vloženého do *E. coli*.

Látka	Objem v 1 reakci [µl]
PCR Blue buffer complete, 10x	2
dNTPs, 10 mM	0,4
pJET1.2 F, 10 µM	1
pJET1.2 R, 10 µM	1
Taq DNA polym, 5 U/µl	0,4
Sterilní destilovaná voda	15,2
Celkový objem	20

Tabulka 12: Teplotní program PCR cycleru k amplifikaci zaklonovaného PCR produktu vloženého do *E. coli*.

Krok	Teplota [°C]	Doba trvání	Počet cyklů
Iniciace denaturace	94	3 min	1x
Denaturace	94	30 s	
Annealing	60	30 s	35 x
Elongace	72	1 min	
Finální elongace	72	10 min	1x
Chlazení	8	∞	

4.4.1.13 Inokulace pozitivních kolonií pro izolaci plasmidu

Pozitivní kolonie, u kterých byla ověřena přítomnost zaklonovaného PCR produktu, byly ve flowboxu inokulovány pomocí sterilních špiček do bakteriologických zkumavek s 5 ml LB média a 5 µl Carbenicillinu a inkubovány při 37 °C a 300 rpm.

4.4.1.14 Izolace plasmidové DNA

K izolaci plasmidové DNA byl použit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, kat. č. 27106). Postupováno bylo dle instrukcí výrobce s následujícími úpravami: všechny centrifugační kroky (kromě první centrifugace za účelem zisku peletu prováděné na 8000 rpm) bylo prováděno na 13500 rpm, k eluci DNA bylo použito 40 µl destilované vody předem ohřáté na 65 °C a kolonka se nechala před samotnou elucí 4 minuty stát. Koncentrace izolované plasmidové DNA byla poté změřena pomocí nanodropu a použita pro přípravu sekvenační reakce (viz Tabulka 7–8), přičemž bylo na jednu reakci použito 100–200 ng plasmidové DNA. Dále bylo postupováno stejně jako v podkapitole 4.4.1.7 Sangerovo sekvenování.

4.4.1.15 Vyhodnocení v Geneious prime

Sekvence promotoru získané pomocí Sangerova sekvenování byly analyzovány a vyhodnoceny pomocí softwaru Geneious prime® 2021.2.2. Sekvence z F a R primerů každého vzorku byly mapovány na referenční sekvenci, přičemž pro promotor *VRN-A1* byla jako referenční sekvence zvolena sekvence AY747600.1 a pro promotor *VRN-B1* sekvence AY747606.1.

Sekvence promotorů byly poté spojeny se sekvencemi celých genů získaných pomocí Illumina sekvenování, který byly poskytnuty vedoucí bakalářské práce, a byl proveden multiple alignment pomocí MAFFT v7.450 (Katoh & Standley, 2013; Katoh a kol., 2002), který je

součástí softwaru Geneious Prime®2021.2.2. Sekvenování genu *VRN-1* a následná analýza sekvencí proběhla ve spolupráci se skupinou Dr. Šafáře a výsledné sekvence budou součástí připravované publikace.

4.4.2 Statistická analýza doby metání

4.4.2.1 ANOVA test

V rámci statistického zpracování průměrné doby metání a určení toho, zda byla tato data statisticky signifikantní, byla v Microsoft Excelu verze 16.16.27 provedena analýza rozptylu neboli ANOVA test (Analysis of variance). Použitá funkce byl Anova: Single factor.

4.4.2.2 POST-HOC test

K upřesnění signifikantosti výsledků byl v Microsoft Excelu verze 16.16.27 proveden také POST-HOC test, pro který byla využita funkce TTEST.

5 VÝSLEDKY

5.1 Fenotypová analýza

5.1.1 Průměr metání

Podle data, kdy byla rostlina vyseta, byl zaznamenán počet dní od výsevu po metání, který je uveden v Tabulce 13 pro jarní genotypy a Tabulce 14 pro ozimé genotypy. Následně byla vypočítána průměrná hodnota metání za všechny tři roky pro každou rostlinu.

Tabulka 13: Počet dní od výsevu po metání, země původu a GenBank kód u 20 jarních genotypů *T. dicoccoides*.

Název	Země původu	2016/2017	2017/2018	2018/2019	Průměr	GenBank kód
T75	ISR	162,5	117,5	134	138,0	PI 428105
T76	ISR	163,5	117,5	129	136,7	PI 538696
T78	ISR	165,5	117	135	139,2	PI 538691
T79	ISR	163	110,5	129	134,2	PI 538692
T80	ISR	162	119,5	129	136,8	PI 538684
T81	ISR	161,5	118,5	132	137,3	PI 538695
T82	LBN	167	121	137,5	141,8	PI 352324
T83	ISR	156,5	113	128	132,5	PI 466980
T84	ISR	161,5	117	131,5	136,7	PI 538697
T85	ISR	157	112	125	131,3	PI 467015
T86	ISR	159	115,5	130	134,8	PI 466989
T87	ISR	164	114	132	136,7	TRI 18481, PI 428015
T88	ISR	167	117	134,5	139,5	PI 466988
T89	ISR	168,5	120	135,5	141,3	PI 467000
T90	ISR	158,5	114,5	128,5	133,8	TRI 16631
T91	ISR	157,5	113,5	132	134,3	PI 467001
T92	ISR	157	115	129	133,7	PI 467003
T93	ISR	164	116	135,5	138,5	PI 538698
T94	ISR	154,5	117	124	131,8	PI 466990
T95	ISR	158	115,5	132,5	135,3	PI 466981

Tabulka 14: Počet dní od výsevu po metání, země původu a GenBank kód u 75 ozimých genotypů *T. dicoccoides*.

Název	Země původu	2016/2017	2017/2018	2018/2019	Průměr	GenBank kód
T1	ISR	150,5	106	123,5	126,7	Assaf's line
T2	SYR	160,5	110,5	129,5	133,5	PI 466943

Pokračování Tabulky 14:

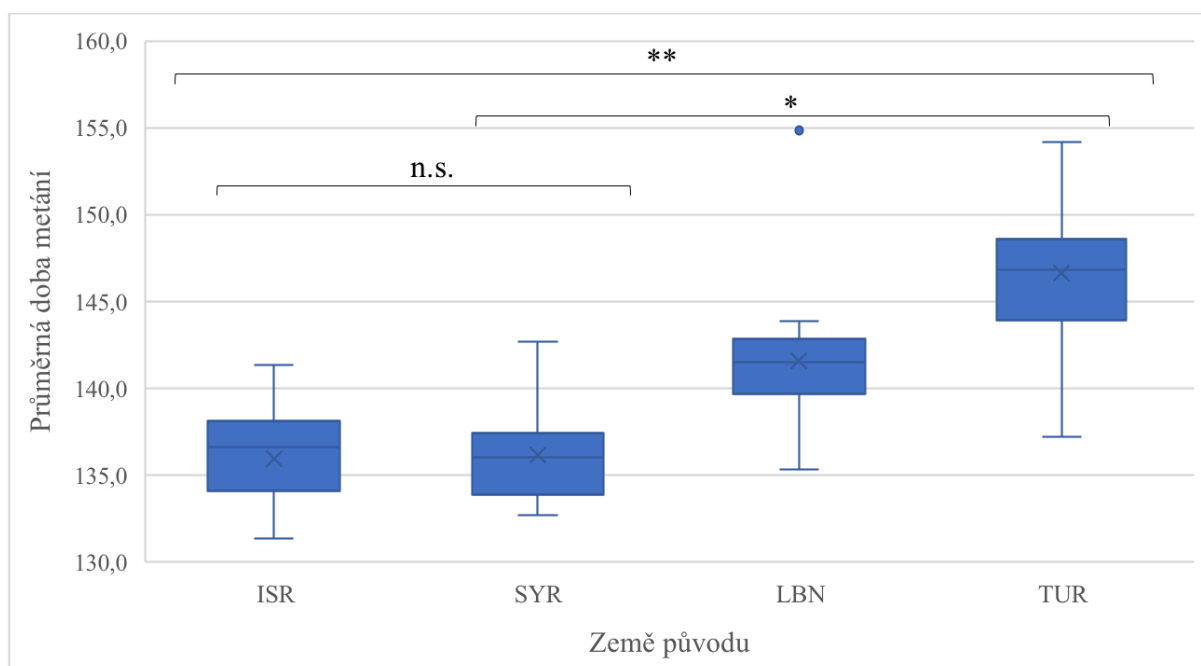
Název	Země původu	2016/2017	2017/2018	2018/2019	Průměr	GenBank kód
T3	SYR	159	112,5	136,5	136,0	PI 466946
T4	SYR	161	113,5	127	133,8	PI 470956
T5	ISR	158,5	113,5	128	133,3	PI 466958
T6	SYR	157	114	130,5	133,8	PI 466947
T8	SYR	159	114,5	132	135,2	PI 466939
T9	LBN	162	115	129	135,3	PI 352322
T7	TUR	165,5	114	132	137,2	PI 428082
T10	SYR	160	115	134	136,3	PI 470947
T11	SYR	162,5	115	130,5	136,0	PI 470949
T12	SYR	153,5	115,5	129	132,7	PI 487260
T13	ISR	160,5	115,5	128,5	134,8	PI 466961
T14	SYR	162,5	116	131,5	136,7	PI 487263
T15	SYR	162	116	139	139,0	PI 470945
T16	SYR	162	116	130,5	136,2	PI 466931
T17	LBN	160,5	116	130	135,5	PI 470978
T18	SYR	163	116	135,5	138,2	PI 466935
T19	ISR	165	116,5	130,5	137,3	TRI 18501, PI 470993
T20	ISR	162,5	116,5	129,5	136,2	PI 466967
T21	ISR	161,5	116,5	131,5	136,5	PI 471057
T22	ISR	158,5	116,5	129,5	134,8	PI 470975
T23	ISR	165,5	116,5	133	138,3	PI 503312
T24	ISR	164	117	140	140,3	PI 428112
T25	ISR	160,5	120	129,5	136,7	PI 428113
T26	LBN	167	120	138	141,7	PI 470982
T27	LBN	163,5	120	136,5	140,0	TRI 18489, PI 428136
T28	LBN	165,5	120,5	135,5	140,5	PI 538702
T29	TUR	164	120,5	144,5	143,0	PI 428054
T30	TUR	167,5	120,5	144	144,0	PI 538639
T31	SYR	170,5	120,5	137	142,7	PI 466991
T32	LBN	167,5	121	140	142,8	PI 538713
T33	TUR	167,5	121	144	144,2	PI 654317
T34	TUR	169,5	121	147	145,8	PI 428027
T35	TUR	166	121	144,5	143,8	PI 538637
T36	TUR	164,5	121	142	142,5	PI 428083
T37	TUR	169	121,5	140,5	143,7	PI 428089
T38	LBN	167,5	121,5	135,5	141,5	PI 428143
T39	TUR	170	121,5	142,5	144,7	PI 538631
T40	TUR	167	121,5	141	143,2	PI 503311
T41	TUR	164	121,5	142	142,5	PI 428028
T42	ISR	161,5	121,5	136,5	139,8	PI 479782

Pokračování Tabulky 14:

Název	Země původu	2016/2017	2017/2018	2018/2019	Průměr	GenBank kód
T43	TUR	166	121,5	144	143,8	PI 428092
T44	TUR	169	122	144,5	145,2	PI 538638
T45	LBN	167,5	122	142	143,8	CItr 17675
T46	TUR	168	122	144	144,7	PI 428043
T47	LBN	165	122	132	139,7	PI 538717
T48	TUR	165,5	122	141,5	143,0	PI 538636
T49	TUR	166	122	140,5	142,8	PI 538632
T50	TUR	164	126,5	144	144,8	PI 428089
T51	TUR	175	127	146	149,3	TRI 18521, PI 538661
T52	TUR	169,5	127	145,5	147,3	PI 538662
T53	TUR	168	127	145,5	146,8	PI 428069
T54	TUR	169	127	143,5	146,5	PI 428029
T55	TUR	168,5	127,5	144,5	146,8	PI 428063
T56	TUR	170	128	142,5	146,8	PI 538646
T57	TUR	169,5	128	145,5	147,7	PI 503310
T58	TUR	165,5	128,5	147	147,0	PI 428062
T59	TUR	168	129,5	144	147,2	PI 428057
T60	TUR	165,5	129,5	144	146,3	PI 538666
T61	TUR	170,5	130	148	149,5	PI 538660
T62	TUR	164,5	130	146,5	147,0	PI 538652
T63	TUR	168,5	130,5	146,5	148,5	PI 538643
T64	TUR	167	130,5	145	147,5	PI 538657
T66	TUR	164,5	131	146	147,2	PI 428055
T68	TUR	166	131,5	142,5	146,7	TRI 18519, PI 538651
T69	TUR	169,5	133,5	148	150,3	PI 538648
T70	TUR	171,5	135	147	151,2	PI 428046
T71	TUR	171	135,5	144	150,2	PI 428051
T72	TUR	172	135,5	153,5	153,7	PI 560877
T73	TUR	162	141	157	153,3	PI 560872
T74	LBN	167	142,5	155	154,8	PI 538709
T77	TUR	177,5	133,5	151,5	154,2	Hakan's line

Průměrná doba metání se u jarních genotypů pohybovala od 131,3 do 141,8 dní. Všechny genotypy pocházely z Izraele s výjimkou jednoho, který byl původem z Libanonu.

Průměrná doba metání u ozimých genotypů se pohybovala od 126,7 do 154,8 dní. Ozimé genotypy pocházely převážně z Turecka, přičemž rané genotypy byly převážně ze Sýrie a intermediární a pozdní genotypy z Turecka. Závislost doby metání na zemi původu je uvedena v Grafu 1.



Graf 1: Závislost doby metání na zemi původu. Grafické znázornění změn v průměrné době metání genotypů tetraploidní pšenice *T. dicoccoides* v závislosti na zemi původu (Izrael, Sýrie, Libanon, Turecko), které byly vysazeny a pěstovány ve třech po sobě jdoucích letech v Turecku (2016, 2017, 2018). n.s. - nesignifikantní, * - P-hodnota ≤ 0.05 , ** - P-hodnota ≤ 0.01 , **ISR** - Izrael, **SYR** - Sýrie, **LBN** - Libanon, **TUR** - Turecko.

V Tabulce 15 je uvedena průměrná doba metání pro jednotlivé země včetně mediánu a směrodatné odchylky.

Tabulka 15: Průměrná doba metání, medián a směrodatná odchylka pro genotypy *T. dicoccoides* z Izraele, Libanonu, Sýrie a Turecka.

Země původu	Počet genotypů	Rozsah průměrných hodnot metání		Průměr	Medián	Směrodatná odchylka
		maximální	minimální			
ISR	30	141,30	126,70	135,90	136,60	3,06
LBN	11	154,80	135,30	141,60	141,50	5,15
SYR	13	142,70	132,70	136,20	136,00	2,68
TUR	39	154,20	137,20	146,40	146,70	3,43

Z průměrného metání u 93 genotypů *T. dicoccoides* (viz Tabulka 13–14) z jednotlivých zemí Úrodného půlměsíce (Izrael, Libanon, Sýrie, Turecko) byla provedena analýza rozptylu neboli

ANOVA (Analysis of variance), pomocí které byla zjištěna P-hodnota. Jako prahová hodnota byla stanovena Alfa hodnota 0,05. Nutné bylo také vyslovení nulové hypotézy H_0 , podle které by nedošlo k žádným signifikantním rozdílům v metání, a hypotézu H_1 , podle které k signifikantním rozdílům došlo. ANOVA test vyvrátil nulovou hypotézu H_0 a tím ověřil, že jsou výsledky statisticky signifikantní, jelikož $1,0846E-21 < 0,05$. To potvrdila i F-hodnota, která byla větší než F kritická hodnota ($61,8 > 2,7$) (viz Tabulka 16). ANOVA tedy potvrdila signifikantní změny v analyzovaném souboru dat.

Tabulka 16: ANOVA test.

Rozptyl	Suma čtverců	Stupeň volnosti	Variabilita	F-hodnota	P hodnota	F kritická hodnota
Mezi skupinami	2227,801315	3	742,6004382	61,8090317	1,0846E-21	2,70699876
Uvnitř skupin	1069,284492	89	12,01443249			
Celkem	3297,085806	92				

Pro upřesnění toho, kde ke změnám docházelo, byl proveden POST-HOC test. Nejprve bylo ovšem nutné přepočítat Alfa hodnotu (viz Tabulka 17) tak, že byla vydělena počtem prováděných POST-HOC testů (tedy pěti).

Tabulka 17: Přepočítání Alfa hodnoty pro POST-HOC test.

Alfa hodnota	
Anova test	0,05
POST-HOC (Bonferroniho korekce)	0,00833333

POST-HOC test byl proveden pro 5 skupin, přičemž každá z nich obsahovala kombinace vždy dvou ze čtyř zemí Úrodného půlměsíce. Srovnáním výsledných P-hodnot, které byly zjištěny pomocí T-testu (viz Tabulka 18) s nově přepočítanou Alfa hodnotou bylo určeno, že pouze ve skupině Izrael x Sýrie nebyly v metání žádné signifikantní změny, zatímco rozdíly v metání u skupin Izrael x Libanon, Izrael x Turecko, Libanon x Sýrie, Libanon x Turecko i Sýrie x Turecko byly statisticky signifikantní, což je znázorněno také v Grafu 1.

Tabulka 18: POST-HOC test pro jednotlivé země.

POST-HOC TEST	P-hodnota	signifikantní
ISR x LBN	0,000097	ano
ISR x SYR	0,793844	ne
ISR x TUR	0,000000	ano
LBN x SYR	0,003179	ano
LBN x TUR	0,000602	ano
SYR x TUR	0,000000	ano

5.2 Sekvenční variabilita *VRN-1* genu u 93 genotypů *T. dicoccoides*

5.2.1 Všeobecný úvod

Sekvenování *VRN-1* u 93 genotypů *T. dicoccoides* bylo součástí projektu ve spolupráci se skupinou Dr. Šafáře a prof. Özkana. Byla nalezena velká sekvenční variabilita, *VRN-A1* i *VRN-B1* geny obsahovaly jednonukleotidové polymorfismy v exonech a jednonukleotidové polymorfismy a indely v intronech a promotorech. Zjištěná variabilita bude prezentována formou tabulek. Celkem se podařilo získat promotorovou sekvenci genu *VRN-A1* pro 89 genotypů a promotorovou sekvenci genu *VRN-B1* pro 90 genotypů z celkového počtu.

5.2.2 Sekvenční analýza *VRN-A1* genu

5.2.2.1 Promotor

V promotoru *VRN-A1* byla u genotypu T29 zjištěna 32 bp delce v oblasti Vrn-boxu v pozici -214 až -182 popsána u alely *VRN-A1d* (Yan a kol., 2004a). U genotypu T73 byla nalezena 8bp delece v pozici -127 až -135 od start kodonu a 50bp delece popsána u alely *VRN-A1f* (Golovnina a kol., 2010) v pozici -62 až -112 od start kodonu (viz Tabulka 19). Mimoto byla u 20 genotypů v promotorech *VRN-A1* detekována delece 20 bp v pozici -137 až -157 od start kodonu, která byla již popsána u alely *VRN-A1b* (Yan a kol., 2004a). Kratší 8bp delece (-127 až -135 nt) byla nalezena i u několika dalších genotypů. V promotoru genu se také nacházelo několik SNPs.

Tabulka 19: Mutace v oblasti promotoru *VRN-A1* genu u 89 genotypů *T. dicoccoides*.

Delece	Pozice počátečního nukleotidu	Genotyp
32 bp	-214 až -182	T29
20 bp	-137 až -157	T1, T2, T3, T6, T8, T10, T11, T15, T16, T18, T29, T32, T76, T80, T82, T84, T85, T91, T92, T93
8 bp	-127 až -135	T4, T19, T22, T26, T42, T73, T74, T81, T83
50 bp	-62 až -112	T73

5.2.2.2 Gen

5.2.2.2.1 Exony

V exonech *VRN-A1* genu byly nalezeno celkem čtrnáct jednonukleotidových polymorfismů (viz Tabulka 19), z toho bylo osm mutací synonymních a šest nesynonymních.

V prvním exonu byly detekovány dvě synonymní mutace u tří různých genotypů. V druhém exonu byly detekovány dvě synonymní mutace a u tří genotypů byla nalezena jedna konzervativní mutace měnící glutamin⁸⁸ na histidin⁸⁸. Ve čtvrtém exonu byla u jednoho genotypu nalezena synonymní mutace. V pátém exonu tři genotypů byla detekována substituce kyseliny glutamové¹⁴⁹ za glycin¹⁴⁹ a u jednoho genotypu byla nalezena synonymní mutace. V sedmém exonu byla u čtyřiceti genotypů nalezena mutace, při které byl alanin¹⁸⁰ zaměněn za valin¹⁸⁰. U dalších devíti genotypů byla nalezena synonymní mutace a u dvou došlo k záměně serinu¹⁹⁶ za cystein¹⁹⁶. V osmém exonu byla nalezena jedna synonymní mutace a poté substituce threoninu²¹⁵ za alanin²¹⁵ u jednoho genotypu, a substituce threoninu²¹⁵ za arginin²¹⁵ u dvou genotypů.

Tabulka 19: Mutace v oblasti exonů *VRN-A1* genu u 89 genotypů *T. dicoccoides*.

Exon	Pozice nukleotidu	Nukleotidová substituce	Mutace	Typ mutace	Genotyp
Exon 1	9	G/C	synonymní	-	T74
	81	G/A	synonymní	-	T4, T19
Exon 2	8757	C/T	synonymní	-	T2, T15, T18
	8763	A/T	synonymní	-	T22, T26, T42, T81, T83, T95
	8781	G/C	gln ⁸⁸ /his ⁸⁸	substituce	T69, T70, T71
Exon 4	10410	G/A	synonymní	-	T74
Exon 5	10717	A/G	glu ¹⁴⁹ /gly ¹⁴⁹	substituce	T4, T19, T74
	10733	T/G	synonymní	-	T74

Pokračování Tabulky 19:

Exon	Pozice nukleotidu	Nukleotidová substituce	Mutace	Typ mutace	Genotyp
Exon7	11053	C/T	ala ¹⁸⁰ /val ¹⁸⁰	substituce	T12, T14, T17, T30, T33–T37, T39–T43, T46, T48–T56, T58–T72, T77
	11093	A/T	synonymní	substituce	T4, T19, T22, T26, T42, T73, T74, T81, T95
	11101	C/G	ser ¹⁹⁶ /cys ¹⁹⁶	substituce	T73, T50
Exon 8	11321	A/G	synonymní	-	T74
	11322	A/G	thr ²¹⁵ /ala ²¹⁵	substituce	T74
	11323	C/G	thr ²¹⁵ /arg ²¹⁵	substituce	T22, T42

5.2.2.2.2 Introny

V intronech *VRN-AI* genu byly nalezeny tři delece, které jsou uvedeny v Tabulce 20. Největší delece o délce 122 bp byla nalezena v prvním intronu v rámci sekvencí 8 genotypů. Byly nalezeny také tři inserce, z nichž nejdelší byla dlouhá 177 bp, která byla již popsána u alely *VRN-AIb* (Strejčková a kol., 2021), a nacházela se v prvním intronu u dvaceti genotypů (viz Tabulka 21).

Tabulka 20: Delce v oblasti intronů *VRN-AI* genu u 89 genotypů *T. dicoccoides*.

Intron	Delece	Pozice	Genotyp
Intron 1	122 bp	834 až 956	T4, T19, T22, T26, T42, T81, T83, T95
	17 bp	3647 až 3664	T4, T19
Intron 4	18 bp	10614 až 10632	T84, T93

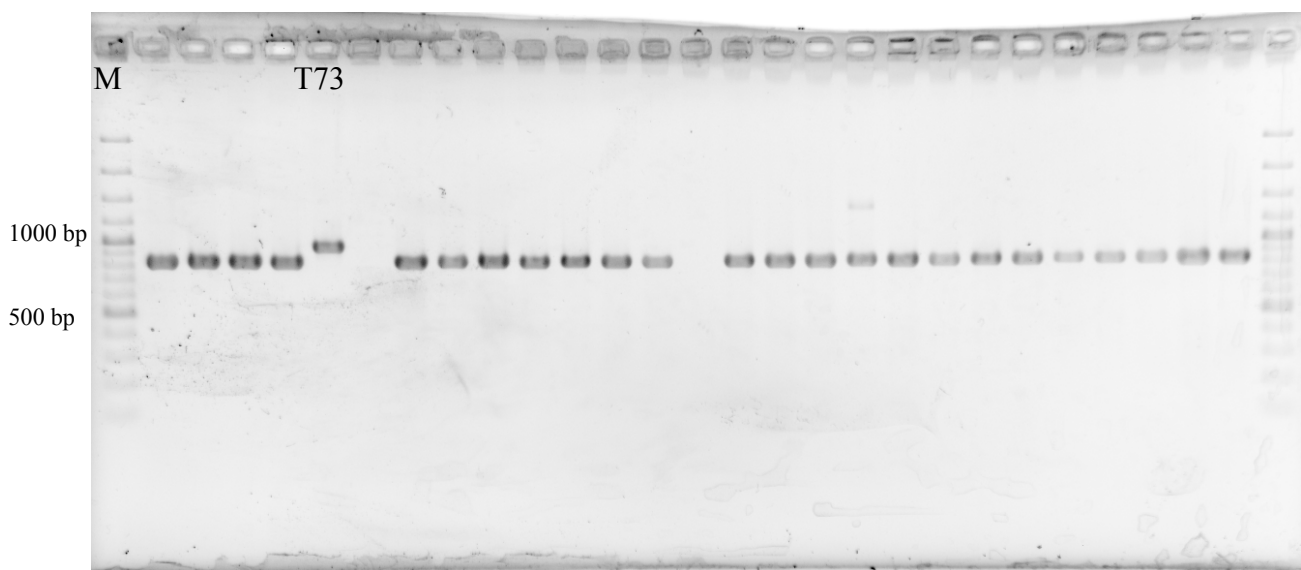
Tabulka 21: Inserce v oblasti intronů *VRN-AI* genu u 89 genotypů *T. dicoccoides*.

Intron	Inserce	Pozice	Genotyp
Intron 1	177 bp	2723	T1, T21, T3, T8, T10, T11, T15, T16, T18, T29, T32, T57, T76, T80, T82, T84, T85, T91, T92, T93
	5 bp	4051	T74
Intron 7	30 bp	11190	T5, T64, T66

5.2.3 Sekvenční analýza *VRN-B1* gen

5.2.3.1 Promotor

V promotoru *VRN-B1* genotypu T73 byla nalezena kombinace mutací: delece 110 bp v pozici -736 až -846 od start kodonu a 8 bp v pozici -586 až -594 od start kodonu společně s inzercí o délce 126 bp v pozici -100 od start kodonu, což bylo viditelné i při rozdělení PCR produktu na gelu (viz Obrázek 4). PCR produktem byly v tomto případě amplikony promotorové oblasti. Tento genotyp obsahoval také několik delecí v prvním intronu (viz Tabulka 23). U devíti genotypů byla nalezena delce 8 bp (-532 až -540). Mimoto byl v promotorech *VRN-B1* detekován také velký počet SNPs.



Obrázek 4: Elektroforetogram PCR produktů *VRN-B1* promotorů vybraných genotypů *T. dicoccoides*. Vyhodnocení separace PCR produktů *VRN-B1* promotorové oblasti 27 vzorků *T. dicoccoides* pomocí elektroforézy v 1,5% agaróze. **M** - standart molekulové hmotnosti (100 bp plus DNA Ladder, Gene Ruler), **T73** - vzorek DNA.

5.2.3.2 Gen

5.2.3.2.1 Exony

V exonech *VRN-B1* genu bylo nalezeno celkem osm jednonukleotidových polymorfismů (viz Tabulka 22), z toho bylo sedm mutací nesynonymních a jedna byla synonymní.

V prvním exonu byly detekovány tři SNPs u tří různých genotypů. Jedna mutace způsobila záměnu kyseliny glutamové¹² za glutamin¹² a druhá záměnu serinu⁴⁹ za prolin⁴⁹. Ve čtvrtém exonu u tří genotypů nukleotidová substituce vedla k záměně glutaminu¹³¹ za lysin¹³¹. V pátém exonu čtyř ozimých genotypů byla nalezena mutace způsobující substituci kyseliny

glutamové¹⁴⁹ za lysin¹⁴⁹. V šestém exonu jednoho genotypu byla nalezena záměna glutaminu¹⁶⁹ za stop kodon. V sedmém exonu byla u 3 ozimých genotypů nalezena inserce TCT, způsobující inserci serinu¹⁹², a u dalších patnácti genotypů byla nalezena substituce threoninu²⁰⁸ za alanin²⁰⁸.

Tabulka 22: Mutace v oblasti exonů *VRN-BI* genu u 90 genotypů *T. dicoccoides*.

Exon	Pozice nukleotidu	Nukleotidová substituce	Mutace	Typ mutace	Genotyp
Exon 1	34	G/C	glu ¹² /gln ¹²	substituce	T14
	105	C/T	synonymní	-	T29
	145	T/C	ser ⁴⁹ /pro ⁴⁹	substituce	T73
Exon 4	11 391	C/A	gln ¹³¹ /lys ¹³¹	substituce	T9, T25, T94
Exon 5	11 640	G/A	glu ¹⁴⁹ /lys ¹⁴⁹	substituce	T7, T27, T38, T57
Exon 6	11 855	C/T	gln ¹⁶⁹ /*	stop kodon	T31
Exon 7	12 014	inserce TCT	inserce ser ¹⁹²	inserce	T1, T19, T29
	12 062	A/G	thr ²⁰⁸ /ala ²⁰⁸	substituce	T2, T3, T4, T5, T6, T8, T10, T11, T15, T16, T20, T21, T22, T85, T92

5.2.3.2.2 Introny

V prvním intronu *VRN-BI* genu bylo nalezeno množství delecí, které jsou uvedeny v Tabulce 23. Dvě největší delece o délce 202 bp a 199 bp byly nalezeny v rámci sekvence T73. U dvou genotypů se nacházela delece 80 bp začínající na nukleotidové pozici 6452. V prvním intronu byly kromě delecí nalezeny také dvě inserce (viz Tabulka 24). Inserce 24 bp byla nalezena u tří genotypů a u jednoho genotypu se nacházela inserce dlouhá 15 bp.

Tabulka 23: Mutace v oblasti intronů *VRN-BI* genu u 90 genotypů *T. dicoccoides*.

Intron	Delece	Pozice	Genotyp
Intron 1	94 bp	2282 až 2376	T78, T81
	32 bp	3568 až 3600	T46
	36 bp	4878 až 4914	T29, T7, T27, T38, T57, T9, T45, T25, T94, T91, T73
	24 bp	5506 až 5530	T78, T81
	80 bp	6311 až 6391	T23, T26
	25 bp	6698 až 6723	T78, T81
	199 bp	7482 až 7681	T73

Pokračování Tabulky 23:

Intron	Delece	Pozice	Genotyp
Intron 1	84 bp	7597 až 7681	T7, T27, T38, T57, T9, T45, T25, T94
	202 bp	7820 až 8022	T73

Tabulka 24: Inzerce v oblasti intronů *VRN-B1* genu u 90 genotypů *T. dicoccoides*.

Intron	Inzerce	Pozice	Genotyp
Intron 1	24 bp	4594	T77, T94, T91
	15 bp	4611	T78

6 DISKUSE

Triticum dicoccoides je předkem veškeré moderní kultivované pšenice. Složitý proces jejího vývoje se do značné míry odráží v alelické diverzitě genů odpovídajících za fotoperiodickou citlivost (*Ppd* geny) a především pak genů regulujících vernalizační požadavek (*VRN* geny) (van Beem a kol., 2005).

Ozimé genotypy pšenice nesou intaktní *VRN-1* alely a jejich expresi je nutno indukovat vernalizací, která vyvolává kvetení vystavením chladu (Loukoianov a kol., 2005; Trevaskis a kol., 2006). Oproti tomu jarní genotypy vernalizaci nevyžadují (Jedel a kol., 1986). Za účelem objasnění původu jarního typu pšenice byla v minulosti zkoumána alelická variabilita *VRN-1* genu v širokém souboru genotypů *T. dicoccoides* (BBAA) pomocí diagnostických markerů, sekvenování promotorů a mapování pomocí restričních enzymů, přičemž bylo identifikováno několik typů mutantních alel. Na lokusu *VRN-B1* nebyla nalezena žádná významná variace, zatímco lokus *VRN-A1* obsahoval řadu dříve popsaných alel s malými delecemi v promotoru (Shcherban a kol., 2015), jakými je *VRN-A1b* obsahující 20 bp delecí (Yan a kol., 2004a) a *VRN-A1f* obsahující 50 bp delecí (Golovnina a kol., 2010). Byla nalezena také alela *VRN-A1d* s 32 bp delecí (Yan a kol., 2004a), která byla zodpovědná za chybějící Vrn-box.

Sekvenční analýza *VRN-1* genu při které by byly sekvenovány celé geny včetně promotorů nebyla u *T. dicoccoides* doposud provedena, podobná analýza byla ovšem nedávno realizována u hexaploidní pšenice (Strejčková a kol., 2021). Pomocí stejného postupu byly u *T. dicoccoides* získány sekvence promotorů a genů (celkem 89 sekvencí *VRN-A1* a 90 sekvencí *VRN-B1*). Jejich analýzou byla zjištěna velká variabilita v porovnání se sekvencemi genotypů hexaploidní pšenice, kde byly nalezeny pouze promotorové a intronové mutace. Genotypy *T. dicoccoides* oproti tomu obsahovaly mutace také v exonech.

V promotorech bylo nalezeno velké množství jednonukleotidových polymorfismů a také nově popsané delece a inserce, jako byla například 8bp delece v promotoru *VRN-A1* nebo 110 bp delece a 126bp inserce v promotoru *VRN-B1*. V promotorech se nacházely i již popsané mutace, například 50bp delece popsána u alely *VRN-A1f* (Golovnina a kol., 2010), kterou obsahoval genotyp T73. *VRN-A1f* je dominantní alela určující jarní fenotyp, v případě genotypu T73 byla ovšem průměrná doba metání 153,3 dní a tento genotyp se řadil mezi pozdní ozimy. To mohlo být způsobeno četnými mutacemi nalezenými ve *VRN-B1* genu (viz Tabulka 22–23).

V exonech *VRN-A1* bylo detekováno celkem čtrnáct jednonukleotidových polymorfismů, které v osmi případech měnily aminokyseliny v proteinech. Byla nalezena již dříve popsaná mutace C/T v exonu 7, při které došlo k záměně alaninu¹⁸⁰ za valin¹⁸⁰ (Sherman a kol., 2004).

Ze setu 89 studovaných genotypů se tato mutace nacházela u 38 ozimých genotypů, z nichž 34 vykazovalo pozdější metání s průměrnou dobou 144,78 dní. Na rozdíl od toho čtyři zbylé ozimé genotypy metaly za kratší dobu, průměrně 136,16 dní. Z genotypů s kratší dobou metání, genotyp T42 obsahoval kromě této mutace ještě synonymní mutaci v exonu 2, synonymní mutaci A/T v exonu 7 a mutaci C/G v exonu 8 způsobující záměnu threoninu²¹⁵ za arginin²¹⁵. U ozimého pozdě metajícího genotypu T74 byly nalezeno celkem pět synonymních mutací v exonu 1, 4, 5, 7 a 8; a dvě nesynonymní mutace. V exonu 5 došlo k záměně kyseliny glutamové¹⁴⁹ za glycin¹⁴⁹ a v exonu 8 došlo k záměně threoninu²¹⁵ za alanin²¹⁵.

V exonech genu *VRN-B1* bylo nesynonymních jednonukleotidových polymorfismů nalezeno sedm. Mutace G/C v prvním exonu, která měnila kyselinu glutamovou¹² na glutamin¹² se nacházela pouze u ozimého genotypu T14, který metal poměrně brzo. V prvním exonu se nacházela také mutace T/C, při které došlo k záměně serinu⁴⁹ za prolin⁴⁹. Tato mutace se vyskytovala pouze u genotypu T73, který je pozdně ozimý genotyp a metal pozdě. Tento genotyp obsahoval také 36 bp, 199 bp a 202 bp delecí v prvním intronu. U ozimého genotypu T31 s pozdějším metáním došlo v exonu 6 k záměně glutaminu¹⁶⁹ za stop kodon. V exonu 7 byla nalezena u tří genotypů inzerce serinu¹⁹².

V intronech *VRN-A1* genu byly nalezeny tři delece. Největší byla dlouhá 122 bp a nacházela se převážně u raných ozimých a jarních genotypů. Dále introny obsahovaly tři inzerce, z nichž 177bp inzerce byla již dříve popsána (Strejčková a kol., 2021). Obsahovalo ji 20 genotypů (8 jarních genotypů a 12 ozimých genotypů) a 16 z nich vykazovalo brzké metání (7 jarních genotypů a 9 ozimých genotypů). Introny *VRN-B1* genu obsahovaly velké množství delecí a dvě kratší inzerce (24 bp a 15 bp). Nejdelší delece byly dlouhé 202 bp a 199 bp a obě se nacházely u pozdního ozimého genotypu T73. Ve *VRN-B1* byla nalezena také 94bp delece, která se nacházela pouze u dvou jarních genotypů s brzkým metáním.

Celkově byla ve *VRN-I* genech divoké tetraploidní pšenice nalezena velká sekvenční variabilita. Exony byly variabilnější u genu *VRN-A1* zatímco introny byly variabilnější u genu *VRN-B1*. Nejvíce mutací nesl genotyp T73 z Turecka.

Z fenotypových a sekvenčních dat bylo zjištěno, že nejpozdnější genotypy pocházely z Turecka a z 69 % vykazovaly sekvenční similaritu *VRN-A1* i *VRN-B1* alel. Genotypy z různých oblastí Úrodného půlměsíce nesoucí rozdílné *VRN-I* alely naznačují možnou adaptivní roli *VRN-I* genu, avšak pro posouzení efektu tohoto genu na adaptaci bude zapotřebí navazujících studií s větším počtem vzorků.

7 ZÁVĚR

V rámci experimentální části této bakalářské práce jsem sekvenovala promotory *VRN-A1* a *VRN-B1* genů u 93 genotypů *T. dicoccoides* z oblasti Úrodného půlměsíce. Následně jsem provedla sekvenční analýzu jak promotorů, tak celých *VRN-A1* a *VRN-B1* genů. V analyzovaném setu sekvencí jsem našla velkou variabilitu, zahrnující jak synonymní jednonukleotidové polymorfismy, tak i nově popsané delece, inserce a 12 exonových mutací, které byly zodpovědné za změnu proteinu. Gen *VRN-A1* vykazoval větší variabilitu v oblasti exonů, zatímco gen *VRN-B1* byl variabilnější, co se týče intronové oblasti. Součástí práce bylo také vyhodnocení fenotypových dat metání ze tří let v Turecku. S těmito daty jsem poté asociovala nalezené mutace. Osm mutací se vyskytovalo pouze u jarních genotypů, sedm mutací pouze u brzce kvetoucích ozimů a 12 mutací pouze u pozdě kvetoucích ozimů. Alely nesoucí tyto mutace budou dále studovány, aby se potvrdila jejich asociace s daným fenotypem a mohly být případně využity při šlechtění nových genotypů pšenice.

8 LITERATURA

- Abbo, S., Pinhasi van-Oss, R., Gopher, A., Saranga, Y., Ofner, I., Peleg, Z. (2014): Plant domestication versus crop evolution: a conceptual framework for cereals and grain legumes. *Trends in Plant Science* 19: 351–360.
- Akpinar, B. A., Yuce, M., Lucas, S., Vrána, J., Burešová, V., Doležel, J., Budak, H. (2015): Molecular organization and comparative analysis of chromosome 5B of the wild wheat ancestor *Triticum dicoccoides*. *Scientific Reports* 5: 1450–1455.
- 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 & Integrative Genomics* 16: 365–382.
- An, H., Roussot, C., Suárez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C., Piñeiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C., Coupland, G. (2004): *CONSTANS* acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development* 131: 3615–3626.
- Anderson, S. (1981): Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments. *Nucleic Acids Research* 9: 3015–3027.
- Appels, R., Eversole, K., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Stein, N., Pozniak, C. J., Choulet, F., Distelfeld, A., Poland, J., Ronen, G., Barad, O., Baruch, K., Keeble-Gagnère, G., Mascher, M., Ben-Zvi, G., Josselin, A. A., Himmelbach, A., Balfourier, F., ... Wang, L. (2018): Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361: 719.
- Arabidopsis Genome Initiative. (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815.
- Avni, R., Nave, M., Barad, O., Baruch, K., Twardziok, S. O., Gundlach, H., Hale, I., Mascher, M., Spannagl, M., Wiebe, K., Jordan, K. W., Golan, G., Deek, J., Ben-Zvi, B., Ben-Zvi, G., Himmelbach, A., Maclachlan, R. P., Sharpe, A. G., Fritz, A., ... Distelfeld, A. (2017): Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. *Plant Genomics* 357: 93–97.
- Balasubramanian, S. (2011): Sequencing nucleic acids: From chemistry to medicine. *Chemical Communications* 47: 7281–7286.
- Bao, S., Hua, C., Shen, L., Yu, H. (2020): New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* 62: 118–131.

- Bastow, R., Mylne, J. S., Lister, C., Lippman, Z., Martienssen, R. A., Dean, C. (2004): Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. *Nature* 427: 164–167.
- Beales, J., Turner, A., Griffiths, S., Snape, J. W., Laurie, D. A. (2007): *A Pseudo-response regulator* is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 115: 721–733.
- Blázquez, M., Koornneef, M., Putterill, J. (2001): Flowering on time: genes that regulate the floral transition. *EMBO Reports* 2: 1078–1082.
- Borthwick, H.A., Hendricks, S.B., Parker, M.W., Toole, E.H., Toole, V.K. (1952): A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 38: 662–666.
- Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., Jovanovich, S. B., Krstic, P. S., Lindsay, S., Ling, X. S., Mastrangelo, C. H., Meller, A., Oliver, J. S., Pershin, Y. v., Ramsey, J. M., ... Schloss, J. A. (2008): The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 1146–1153.
- Brooking, I. R., Jamieson, P. D. (2002): Temperature and photoperiod response of vernalization in near isogenic lines of wheat. *Field Crops Research* 79: 21–38.
- Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H.W., Hendricks, S. B. (1959): Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 45: 1703–1708.
- Cashmore, A. R. (1997): A cryptochrome family of photoreceptors. *Plant, Cell & Environment* 20: 764–767.
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J., Liu, D. (1999): Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* 284: 760–765.
- Clarke, J., Wu, H. C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S., Bayley, H. (2009): Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology* 4: 265–270.
- Crofts, H. J. (1989): On defining a winter wheat. *Euphytica* 44: 225–234.
- 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.
- Distelfeld A, Li C, Dubcovsky J. (2009a): Regulation of flowering in temperate cereals. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 178–184.

- Distelfeld, A., Tranquilli, G., Li, C., Yan, L., Dubcovsky, J. (2009b): Genetic and molecular characterization of the *VRN2* loci in tetraploid wheat. *Plant Physiology*, 149: 245–257.
- Díaz, Aurora; Zikhali, Meluleki; Turner, Adrian S.; Isaac, Peter; Laurie, David A.; Hazen, Samuel P. (2012): Copy Number Variation Affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* Genes Is Associated with Altered Flowering Time in Wheat (*Triticum aestivum*). *PLOS One* 7: e33234.
- Dvorak, J., Akhunov, E. D. (2005): Tempos of gene locus deletions and duplications and their relationship to recombination rate during diploid and polyploid evolution in the *Aegilops-Triticum* alliance. *Genetics* 171: 323–332.
- Dvorak, J., Terlizzi, P. di, Zhang, H., Resta, P., Terlizzi, D. (1993): The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21–31.
- Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., Turcatti, G. (2006): BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research* 34: 22.
- Feldman, M., Kislev, M. E. (2007): Domestication of emmer wheat and evolution of free-threshing tetraploid wheat. *Israel Journal of Plant Sciences* 55: 207–221.
- Fornara, F., Panigrahi, K. C., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Ruhl, 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.
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., Putterill, J. (1999): *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *The EMBO Journal* 18: 4679–4688.
- Fu, D., Szűcs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J. S., von Zitzewitz, J., Hayes, P. M., Dubcovsky, J. (2005): Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *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 (*Frl*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*: 90: 1174–1179.
- Garner, W. W., Allard, H. A., (1920): Effects of the relative length of night and day and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Journal of Agricultural Research* 18: 553–606.

- Golembeski, G. S., Kinmonth-Schultz, H. A., Song, Y. H., Imaizumi, T. (2014): Photoperiodic Flowering Regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Advances in Botanical Research* 72: 1–28.
- Golovnina, K. A., Kondratenko, E. Y., Blinov, A. G., Goncharov, N. P. (2010): Molecular characterization of vernalization loci *VRN1* in wild and cultivated wheats. *BMC Plant Biology* 10: 1–15.
- Gororo, N. N., Flood, R. G., Eastwood, R. F., Eagles, H. A. (2001): Photoperiod and vernalization responses in *Triticum turgidum* x *T. tauschii* Synthetic hexaploid wheats. *Annals of Botany* 88: 947–952.
- 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.
- Griffiths, S., Simmonds, J., Leverington, M., Wang, Y., Fish, L., Sayers, L., Alibert, L., Orford, S., Wingen, L., Herry, L., Faure, S., Laurie, D., Bilham, L., Snape, J. (2009): Meta-QTL analysis of the genetic control of ear emergence in elite European winter wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 383–395.
- Haque, F., Li, J., Wu, H. C., Liang, X. J., Guo, P. (2013): Solid-state and biological nanopore for real-time sensing of single chemical and sequencing of DNA. *Nano Today* 8: 56–74.
- Hay, R. K. M., Ellis, R. P. (1998): The control of flowering in wheat and barley: what recent advances in molecular genetics can reveal. *Annals of Botany* 82: 541–554.
- Hayama, R., Sarid-Krebs, L., Richter, R., Fernández, V., Jang, S., Coupland, G. (2017): PSEUDO RESPONSE REGULATORS stabilize CONSTANS protein to promote flowering in response to day length. *The EMBO Journal* 36: 904–918.
- Heather, J. M., Chain, B. (2016): The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 107: 1–8.
- Helliwell, C. A., Wood, C. C., Robertson, M., James Peacock, W., Dennis, E. S. (2006): The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant Journal* 46: 183–192.
- Herndl, M., White, J. W., Hunt, L. A., Graeff, S., Claupein, W. (2008): Field-based evaluation of vernalization requirement, photoperiod response and earliness *per se* in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* 105: 193–201.
- Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R., Zamir, A. (1965): Structure of a Ribonucleic Acid. *Science* 147: 1462–1465.

- Holley, R. W., Apgar, J., Merrill, S. H., Zubkoff, P. L. (1961): Nucleotide and oligonucleotide compositions of the alanine-, valine-, and tyrosine-acceptor “soluble” ribonucleic acids of yeast. *Journal of the American Chemical Society* 83: 4861–4862
- Hutchison, C. A. (2007): DNA sequencing: Bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research* 35: 6227–6237.
- Hyles, J., Bloomfield, M. T., Hunt, J. R., Trethowan, R. M., Trevaskis, B. (2020): Phenology and related traits for wheat adaptation. *Heredity* 125: 417–430.
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2004): Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–945.
- Ivaničová, Z., Jakobson, I., Reis, D., Šafář, J., Milec, Z., Abrouk, M., Doležel, J., Järve, K., Valárik, M. (2016): Characterization of new allele influencing flowering time in bread wheat introgressed from *Triticum militinae*. *New Biotechnology* 33: 718–727.
- 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. *PNAS* 105: 9691–9696.
- Chidgeavadze, Z. G., Sh, R., Beabealashvilli, Atrazhev, A. M., Kukhanova, M. K., Azhayev, A. v, Krayevsky, A. A. (1984): 2', 3'-Dideoxy-3' aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases. *Nucleic acids research* 12: 1671–1686.
- Chouard, P. (1960): Vernalization and its Relation to dormancy. *Annual Review of Plant Physiology* 11: 191–238.
- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M., Briggs, W. R. (1999): LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 8779–8783.
- Chu, C. G., Tan, C. T., Yu, G. T., Zhong, S., Xu, S. S., Yan, L. (2011): A Novel Retrotransposon Inserted in the Dominant *Vrn-B1* Allele Confers Spring Growth Habit in Tetraploid Wheat (*Triticum turgidum* L.). *G3: Genes, Genomes, Genetics* 1: 637–645.
- Jedel, P. E., Evans, L. E., Scarth, R. (1986): Vernalization responses of a selected group of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Canadian Journal of Plant Science* 66: 1–9.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R., Dean, C. (2000): Molecular Analysis of *FRIGIDA*, a Major Determinant of Natural Variation in *Arabidopsis* Flowering Time. *Science* 290: 344–347.
- Kakizaki, A., Kawahara, T., Zhuk, M. A., Smekalova, T. N., Sato, K., Abe, T., Sasanuma, T. (2017): Genetic Characterization of Genetic Resources of *Aegilops tauschii*, Wheat

- D Genome Donor, Newly Collected in North Caucasia. *American Journal of Plant Sciences* 8: 2769–2784.
- Kamran, A., Iqbal, M., Spaner, D. (2014): Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): A key factor for global adaptability. *Euphytica* 197: 1–26.
- Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., Deamer, D. W. (1996): Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Biophysics* 93: 13770–13773.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T. (2002): MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059–3066.
- Katoh, K., Standley, D., M. (2013): MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30: 772-780.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., Araki, T. (1999): A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286: 1960–1962.
- Law, C. N., Worland, A. J. (1997): Genetic Analysis of Some Flowering Time and Adaptive Traits in Wheat. *The New Phytologist* 137: 19–28.
- Li, C., Dubcovsky, J. (2008): Wheat FT protein regulates *VRN1* transcription through interactions with FDL2. *Plant Journal* 55: 543–554.
- Loman, N. J., Quinlan, A. R. (2014): Poretools: A toolkit for analyzing nanopore sequence data. *Bioinformatics* 30: 3399–3401.
- 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.
- Lee, I., Bleecker, A., Amasino, R. (1993): Analysis of naturally occurring late flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG* 237: 171–176.
- Lu, B. R., Ellstrand, N. (2014): World food security and the tribe *Triticeae* (*Poaceae*): Genetic resources of cultivated, wild, and weedy taxa for crop improvement. *Journal of Systematics and Evolution* 52: 661–666.
- Luo, M. C., Yang, Z. L., You, F. M., Kawahara, T., Waines, J. G., Dvorak, J. (2007): The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 947–959.
- Luo, X., Yin, M., He, Y. (2022): Molecular genetic understanding of photoperiodic regulation of flowering time in *Arabidopsis* and soybean. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 466.

- Maccaferri, M., Harris, N. S., Twardziok, S. O., Pasam, R. K., Gundlach, H., Spannagl, M., Ormanbekova, D., Lux, T., Prade, V. M., Milner, S. G., Himmelbach, A., Mascher, M., Bagnaresi, P., Faccioli, P., Cozzi, P., Lauria, M., Lazzari, B., Stella, A., Manconi, A., ... Cattivelli, L. (2019): Durum wheat genome highlights past domestication signatures and future improvement targets. *Nature Genetics* 51: 885–895.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bembien, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. v., Goodwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., ... Rothberg, J. M. (2005): Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nature* 437: 376–380.
- Masson, P. H. (2001): Gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. Editors: Brenner, S., Miller, J. H. *Encyclopedia of Genetics*, Academic Press. 890–894.
- Michaels, S. D.; Bezerra, I. C.; Amasino, R. M. (2004): FRIGIDA-related genes are required for the winter-annual habit in *Arabidopsis*. *PNAS* 101: 3281–3285.
- Mizuno, T., Nakamichi, N. (2005): Pseudo-response regulators (PRRs) or true oscillator components (TOCs). *Plant and Cell Physiology* 46: 677–685.
- Mouradov, A., Cremer, F., Coupland, G. (2002): Control of Flowering Time: Interacting Pathways as a Basis for Diversity. *The Plant Cell* 14: 111–130.
- 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: 65–81.
- 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.
- NCBI (2022). National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.
- Nyrén, P. (1987): Enzymatic Method for Continuous Monitoring of DNA Polymerase Activity. *Analytical biochemistry* 167: 235–238.
- Nyrén, P., Ludin, A. (1985): Enzymatic Method for Continuous Monitoring of Inorganic Pyrophosphate Synthesis. *Analytical Biochemistry* 151: 504–509.
- Özkan, H., Willcox, G., Graner, A., Salamini, F., Kilian, B. (2011): Geographic distribution and domestication of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 11–53).
- Parry, J. E., Boyle, J. (2012): IISD Food Security and Climate Change Initiative: Addressing Financing for Agriculture: Ensuring a triple dividend for smallholders.

- 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.
- Pidal, B., Yan, L., Fu, D., Zhang, F., Tranquilli, G., Dubcovsky, J. (2009): The CArG-box located upstream from the transcriptional start of wheat vernalization gene *VRN1* is not necessary for the vernalization response. *Journal of Heredity* 100: 355–364.
- Porter, J. R., Gawith, M. (1999): Temperatures and the growth and development of wheat: a review. *European Journal of Agronomy* 10: 23–36.
- Pouteau, S., Carré, I., Gaudin, V., Ferret, V., Lefebvre, D., Wilson, M. (2008): Diversification of Photoperiodic Response Patterns in a Collection of Early-Flowering Mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 148: 1465–1473.
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., Baumeister, K., Prober, J. M., Dam, R. J., Robertson, C. W., Trainor, L., Hobbs, F. W., Zagursky, R. 1, Cocuza, A. J. (1987): A System for Rapid DNA Sequencing with Fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides. *Science* 238: 336–341.
- Purugganan, M. D., Fuller, D. Q. (2009): The nature of selection during plant domestication. *Nature* 457: 843–848.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., Coupland, G. (1995): The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80: 847–857
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., Gu, Y. (2012): A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics* 13: 1–13.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyrén, P. L. (1996): Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical biochemistry* 242: 84–89.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z. (2000): Distinct Roles of *CONSTANS* Target Genes in Reproductive Development of *Arabidopsis*. *Science* 288: 1613–1616.
- Sanger, F., Brownlee, G. G., Barrell, B. G. (1965): A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. *Journal of Molecular Biology* 13: 373–398.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74: 5463–5467.

- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R. A., Coupland, G. (2006): The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 20: 898–912.
- 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* 97: 3753–3758.
- Shendure, J., Ji, H. (2008): Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 1135–1145.
- 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.
- Shcherban, A. B., Salina, E. A. (2017): Evolution of *VRN-1* homoeologous loci in allopolyploids of *Triticum* and their diploid precursors. *BMC Plant Biology* 17: 1–9.
- Shcherban, A. B., Strygina, K. v., Salina, E. A. (2015): *VRN-1* gene-associated prerequisites of spring growth habit in wild tetraploid wheat *T. dicoccoides* and the diploid A genome species. *BMC Plant Biology* 15: 1–13.
- Siqueira, J. F., Fouad, A. F., Rôças, I. N. (2012): Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of Oral Microbiology* 4: 1–15.
- Somers, D. E., Webb, A. A., Pearson, M., Kay, S. A. (1998): The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 485–494.
- Song, Y. H., Kubota, A., Kwon, M. S., Covington, M. F., Lee, N., Taagen, E. R., Laboy Cintrón, D., Hwang, D. Y., Akiyama, R., Hodge, S. K., Huang, H., Nguyen, N. H., Nusinow, D. A., Millar, A. J., Shimizu, K. K., Imaizumi, T. (2018): Molecular basis of flowering under natural long-day conditions in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 4: 824–835.
- Srikanth, A., Schmid, M. (2011): Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68: 2013–2037.
- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., Coupland, G. (2001): *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410: 1116–1120.

- Sung, S., Amasino, R. M. (2004): Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* 427: 159–164.
- Swerdlow, H., Gesteland, R. (1990): Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Research* 8: 1415–1419.
- Trevaskis, B., Hemming, M. N., Peacock, W. J., Dennis, E. S. (2006): HvVRN2 responds to daylength, whereas HvVRN1 is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiology* 140: 1397–1405.
- Turcatti, G., Romieu, A., Fedurco, M., Tairi, A. P. (2008): A new class of cleavable fluorescent nucleotides: Synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Research* 36: e25.
- Valárik, M., Linkiewicz, A. M., Dubcovsky, J. (2006): A microcolinearity study at the earliness *per se* gene *Eps-Am1* region reveals an ancient duplication that preceded the wheat-rice divergence. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 945–957.
- Valouev, A., Ichikawa, J., Tonthat, T., Stuart, J., Ranade, S., Peckham, H., Zeng, K., Malek, J. A., Costa, G., McKernan, K., Sidow, A., Fire, A., Johnson, S. M. (2008): A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Research* 18: 1051–1063.
- van Beem, J., Mohler, V., Lukman, R., van Ginkel, M., William, M., Crossa, J., Worland, A. J. (2005): Analysis of genetic factors influencing the developmental rate of globally important CIMMYT wheat cultivars. *Crop Science* 45: 2113–2119.
- van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C. (2014): Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics* 30: 418–426.
- Voelkerding, K. v., Dames, S. A., Durtschi, J. D. (2009): Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry* 55: 641–658.
- Watson, J. D., Crick, F. H. C. (1953): Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* 171: 737–738.
- Welsh, J.R., D.L. Keim, B. Pirasteh and R.D. Richards (1973): Genetic control of photoperiod response in wheat. Proc. 4th International Wheat Genetics Symposium., Columbia, USA. 879–884.
- Werner, J. D., Borevitz, J.O., Uhlenhaut, N.H., Ecker, J.R., Chory, J., Weigel, D. (2005): FRIGIDA-independent variation in flowering time of natural *Arabidopsis thaliana* accessions. *Genetics* 170: 1197–1207.

- 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 3. PNAS 103: 14631–14636.
- Worland A. J., Snape J. W. (2001): Genetic basis of worldwide wheat varietal improvement. Editors: Bonjean A. P., Angus W. J. The World Wheat Book: a history of Wheat Breeding. Paris: Lavoisier Publishing Inc. 61–67.
- 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: 1–13.
- Xie, Y., Tang, Q., Chen, G., Xie, M., Yu, S., Zhao, J., Chen, L. (2019): New insights into the circadian rhythm and its related diseases. Frontiers in Physiology 10: 682.
- Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S., Dubcovsky, J. (2006): The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. PNAS 103: 19581–19586.
- Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherman, J., Dubcovsky, J. (2004a): Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. Theoretical and Applied Genetics 109: 1677–1686.
- Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., Sanmiguel, P., Bennetzen, J. L., Echenique, V., Dubcovsky, J. (2004b): The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor downregulated by vernalization. Science 303: 1640–1644.
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., Dubcovsky, J., Tanksley, S. D. (2003): Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. PNAS 100: 6263–6268.
- Zhu, T., Wang, L., Rodriguez, J. C., Deal, K. R., Avni, R., Distelfeld, A., McGuire, P. E., Dvorak, J., Luo, M. C. (2019): Improved genome sequence of wild emmer wheat Zavitan with the aid of optical maps. G3: Genes, Genomes, Genetics, 9: 619–624.
- Zikhali, M., Griffiths, S. (2015): The Effect of Earliness *per se* (*Eps*) Genes on Flowering Time in Bread Wheat. Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field 1: 339–345.