Univerzita Palackého v Olomouci

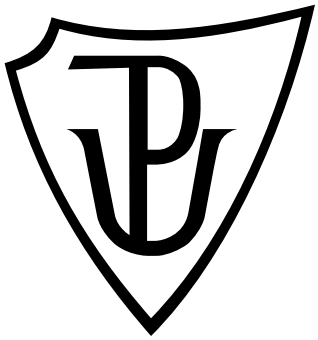
Bakalářská práce

Olomouc 2016 **Marie Šoborová**

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Studium genů ovlivňující dobu kvetení u pšenice

Bakalářská práce

Marie Šoborová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016 **Vedoucí práce: RNDr. Jan Šafář, PhD.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jana Šafáře, PhD. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne …… ……

Marie Šoborová

Souhrn

Optimální čas kvetení u hospodářských plodin je důležitý pro zvýšení výnosů. Iniciaci kvetení ovlivňuje celá řada genů, které navzájem interagují. Příkladem jsou geny zapojené ve vernalizační nebo fotoperiodické dráze. V rámci bakalářské práce byla vysázena mapovací populace F_2. Mapovací populace byla analyzována jak z hlediska fenotypu, tak genotypu. Rozdíl v době kvetení mezi rodičovkými liniemi DH397 a DH81 byl 5,5 dne. Pro genotypizaci bylo použito osm markerů DNA nacházejících se poblíž lokusů, které byly identifikovány v předchozí studii jako zodpovědné za determinaci času kvetení.

Získaná data byla dále použita pro QTL analýzu, pomocí níž byly určeny lokusy ovlivňující sledovaný fenotypový znak (čas kvetení). QTL analýza určila celkem čtyři markery DNA jako statisticky významné ($P < 0,001$). Tyto markery ovlivňovaly čas kvetení v mapovací populaci v nejvyšší míře a nacházely se na chromozomu 5A a 7A.

Správné načasování kvetení je důležitou součástí životního cyklu pšenice a ve významné míře ovlivňuje výnos.

Summary

Optimal flowering time is important for increasing the yield of wheat. The flowering initiation is influenced by a number of genes which interact with each other. As an examples can serve genes involved in vernalization or photoperiodic response. The phenotyping and genotyping of F_2 mapping population was the main objective of bachelor thesis. The difference in flowering time between parental lines DH397 and DH81 was 5.5 days. Eight DNA markers were used for genotyping. These markers were located in close proximity to loci potentialy influencing flowering time in previous study.

The obtained data was further used for QTL analysis. The aim of QTL analysis is identification of loci affecting the phenotypic trait (flowering time). Four DNA markers were determined as significantly responsible ($P < 0.001$) for this flowering time difference. Thus, these loci located nearby of DNA markers position influenced flowering time in analysed mapping population. Their position was determined on chromosomes 5A and 7A.

Correct timing of flowering is important part of the plant life cycle and sisgnificantly influence wheat yield.

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat RNDr. Janu Šafářovi, PhD. za jeho odborné rady, připomínky a čas během zpracování mé bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. Zuzaně Ivaničové za pomoc při provádění experimentů, poskytnutí mapovací populace a ochotu kdykoliv pomoct. V neposlední řadě děkuji také prof. Ing. Jaroslavu Doleželovi, DrSc. za možnost vypracovat bakalářskou práci na Ústavu experimentální botaniky, AV ČR v.v.i., v Olomouci.

Obsah

1 ÚVOD 9

2 CÍLE PRÁCE 10

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 11

3.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) 11
3.1.1 Původ pšenice 11
3.1.2 Genom pšenice 13
3.1.3 Kvetení 13
3.1.3.1 Vernalizace 14
3.1.3.2 Fotoperioda 17
3.1.3.3 Geny ranosti - earliness per se (Eps) 19

3.2 Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) 19
3.2.1 Kvetení 20

3.3 Rýže setá (*Oryza sativa* L.) 21
3.3.1 Kvetení 21

3.4 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) 23
3.4.1 Vernalizační dráha 23
3.4.1.1 Gen FRI 24
3.4.1.2 Gen FLC 24
3.4.2 Fotoperiodická dráha 24
3.4.2.1 Gen CO 24
3.4.2.2 Gen FT 25
3.4.3 Giberelinová dráha 25

4 MATERIÁLY A METODY 27

4.1 Biologický materiál 27

4.2 Seznam použitých chemikálií 27

4.3 Seznam použitých roztoků 28

4.4 Vybavení laboratoře 29

4.5 Pěstování mapovací populace a fenotypizace 30

4.6 Izolace DNA 30

4.7 Polymerázová řetězová reakce 31

4.8 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza a agarózová elektroforéza 34
4.8.1 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza 34
4.8.2 Agarózová elektroforéza 34

4.9 Zpracování získaných dat – QTL analýza 35

5 VÝSLEDKY 36

5.1 Fenotypování mapovací populace F_2 36

5.2 Genotypování mapovací populace F_2 37

5.3 QTL analýza 38

6 DISKUZE 39

7 ZÁVĚR 42

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 43

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 50

1 ÚVOD

Pšenice setá je významnou hospodářskou plodinou, která poskytuje přibližně 20 % kalorií spotřebovaných na světě. Pro její snadnou skladovatelnost a dlouhou trvanlivost je využívána v nejrůznějších odvětvích hospodářství. Pšenice je zdrojem potravy pro lidskou populaci (pečivo, těstoviny, apod.) a krmivem pro hospodářská zvířata.

V současnosti je snahou získat odolnější a výnosnější zemědělské plodiny. Důvodem je nepřetržitý růst lidské populace. Předpokládá se, že v roce 2050 bude na naší planetě kolem 10 mld lidí, a zemědělská produkce nezvládne pokrýt tak rychle se zvyšující spotřebu.

Výnos pšenice je ohrožen biotickým stresem (virové, bakteriální a houbové onemocnění; hmyzí škůdci) a abiotickým stresem souvisejícím s extrémními změnami počasí během vegetačního období. Kvůli těmto podmínkám je snaha vyšlechtit kultivary, které by byly odolnější vůči těmto stresovým faktorům na globální i lokální úrovni. Výnos je ohrožován také jednotvárností dnešních odrůd. Během procesu šlechtění došlo ke snížení genetické variability dnešních kultivarů. Naopak plané druhy pšenic a krajové odrůdy mohou být zdrojem nových alel, kterými lze dnešní kultivary obohatit.

Jednou z důležitých podmínek pro dosažení vyššího výnosu je načasování optimálního času kvetení. Studium kvetení u pšenice umožní hlubší porozumění genetické determinace iniciace kvetení a nalezení nových genů/alel, které tento proces ovlivňují. Získané poznatky mohou být využity při šlechtění nových kultivarů.

2 CÍLE PRÁCE

Předložená bakalářská práce se skládá z teoretické a praktické části. Cílem teoretické práce je vypracování literární rešerše zaměřené na geny indukující kvetení u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* a významných plodin – pšenice seté (*Triticum aestivum*), ječmene setého (*Hordeum vulgare*) a rýže seté (*Oryza sativa*). Cílem praktické části je identifikace lokusů ovlivňujících kvetení pomocí QTL analýzy u mapovací populace F_2. Tato mapovací populace byla odvozena křížením dihaploidních rodičovských linií DH397 a DH81, které obsahují introgrese *T. militinae* na genetickém pozadí *T. aestivum* variety Tähti.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.)

Pšenice setá patří do třídy jednoděložných rostlin (*Liliopsida*). Z taxonomického hlediska je zařazena do čeledi lipnicovité – *Poaceae*. Patří mezi obnovitelné zdroje potravy a krmiva (Gill *et al*., 2004). Pšenice je z hlediska obdělávané plochy nejvíce pěstovanou hospodářskou plodinou na světě. Ročně je vysazena na více než 217 miliónech hektarů (http://faostat3.fao.org/home/E). Pšenice patří mezi důležitý zdroj bílkovin a poskytuje přibližně 20 % kalorií spotřebovaných lidskou populací. Původní centrum výskytu předků pšenice je oblast, která je označována jako „oblast Úrodného půlměsíce“. Tato oblast se nachází v jihozápadní Asii (Obrázek 1). V dnešní době jsou zde státní útvary Izraele, Jordánska, Libanonu, Sýrie, Turecka, Íráku a Íránu (Gill *et al*., 2004). Území Úrodného půlměsíce je jedním z prvních domestikačních center. Byla tam domestikována pšenice jednozrnná (*T. monococcum*), pšenice dvouzrnná (*T. turgidum* sp. *dicoccum*) a ječmen setý (Harlan *et* Zohary, 1966).

Obrázek 1: Mapa vyznačující oblast „Úrodného půlměsíce“ (upraveno dle Charmet, 2011) Červený obrys vyznačuje oblast „Úrodného půlměsíce“, který je místem domestikace pšenice seté přibližně před 10 000 lety. Jedná se o území dnešního Izraele, Jordánu, Libanonu, jihovýchodního Turecka, Sýrie, Íráku a severního Íránu.

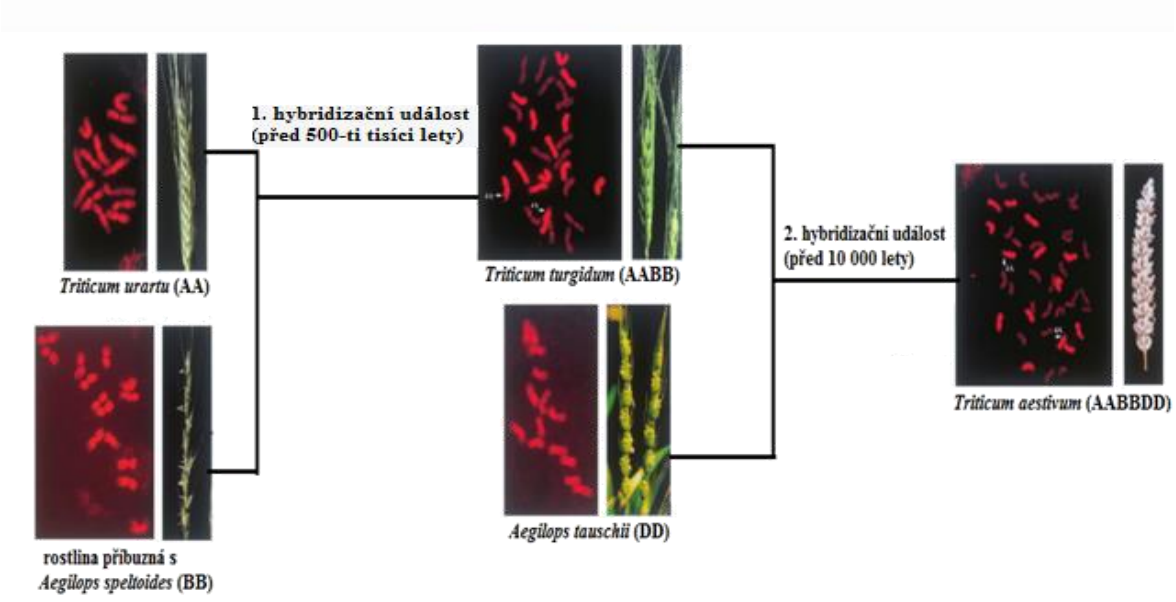
3.1.1 Původ pšenice

Rod *Triticum* zahrnuje diploidní (2n = 14), tetraploidní (2n = 28) a hexaploidní druhy (2n = 42). Pšenice setá je allohexaploidní druh. Její původ zahrnuje dvě hybridizační události

(Obrázek 2) následované allopolyploidizací a její genom se skládá ze tří homoelogních subgenomů (2n = 42, x = 7, AABBDD).

První hybridizační událost proběhla přibližně před 500 tisíci lety. Došlo ke zkřížení mezi planým druhem *Triticum urartu* (genom 2n = 14, A^uA^u) a druhem příbuzným s *Aegilops speltoides* Tausch. (genom 2n = 14, BB). Toto vedlo k vytvoření nového tetraploidního druhu *T. turgidum* ssp. *diccocoides* se 14 chromozomovými páry (A^uA^uBB), (dle Charmet, 2011).

Před 10 tisíci lety došlo k druhé hybridizaci mezi tetraploidní domestikovanou pšenicí *T. turgidum* sp. a diploidním druhem *Aegilops tauschii* Cosson (genom 2n = 14, DD). Vznikla tak hexaploidní pšenice setá *Triticum aestivum* s 21 páry chromozomů (2n = 42, AABBDD). Tento druh je známý pouze ve své domestikované formě (dle Charmet, 2011).



Obrázek 2: **Schéma dvou hybridizačních událostí vedoucích ke vzniku hexaploidní pšenice *Triticum aestivum* (převzato a upraveno od Gill *et al.*, 2004).**

Z původního území se *T. aestivum* prostřednictvím člověka rozšířila do oblastí s různými zeměpisnými šířkami a délkami. V současnosti se pěstuje od Norska a Ruska (65° s. š.) až po Argetinu (45° j. š.). V tropických a subtropických oblastech se pěstuje ve vyšších nadmořských výškách. Její rozšíření je dané přizpůsobením životního cyklu různým environmentálním podmínkám, a to především délce dne či specifickému teplotnímu režimu (Loukoianov *et al.*, 2005). Toto je umožněno různými alelickými variantami genů ovlivňující vnímání délky dne a potřebě vernalizace. Pšenice se pěstuje převážně v mírném podnebí, na rozdíl od kukuřice a rýže, které preferují tropické podmínky. Využívá se na

výrobu chleba, sušenek nebo pečiva. Kromě *T. aestivum* se pěstuje také *T. durum* Desf., která se využívá především na výrobu těstovin.

Do roku 2050 se předpokládá nárůst populace až k 10 mld. lidí na světě. Z tohoto důvodu poptávka po zdrojích potravy a krmiva narůstá. Snahou šlechtitelů je proto vytvořit nejrůznější odrůdy, které by byly odolnější vůči abiotickým (mráz, sucho, apod.) a biotickým (škůdci) stresům a zároveň dosahovaly vyšších výnosů.

3.1.2 Genom pšenice

Znalost genomu pšenice je výhodná pro identifikace agronomicky důležitých genů, které se následně mohou využívat při šlechtění. Pšenice setá je allohexaploid skládající se ze tří homoelogických subgenomů se základní sadou o sedmi chromozomech (2n = 6x = 42, AABBDD).

Genom obsahuje 17 Gbp (1C). Více než 80 % genomu je zastoupeno repetitivními sekvencemi a geny představují pouze 2 % genomu (Choulet *et al.*, 2014). Přítomnost dvou/více odlišných genomů je pro rostlinu výhodná. Zastoupení homoelogních sad genů a různých alel bývá výhodné pro větší možnosti přizpůsobení se širší škále environmentálních podmínek. Porovnání hexaploidní pšenice s jejími tetraploidními předky ukázalo, že hexaploidní pšenice je přizpůsobena k rozdílným fotoperiodickým podmínkám a teplotě ve vyšší míře a disponuje zvýšenou tolerancí k abiotickým (soli, nízké pH, hliník) a biotickým (patogeny) stresovým faktorům (Dubcovsky *et* Dvorak, 2007).

Po hybridizaci, vedoucí k hexaploidní podobě pšenice, došlo ke strukturním změnám a přestavbám ve všech subgenomech, které vedly k cytologické a genetické diploidizaci. Cytologická diploidizace, vedoucí k odlišení homoelogických subgenomů, a teda k obnovení diploidního chování během meiotického dělení, byla navíc umožněna genem *Ph1*. Gen *Ph1*, se nachází na dlouhém rameni chromozomu 5B a reguluje párování chromozomů během meiózy a to tak, že zabraňuje párování homoelogických subgenomů A, B a D (Gill *et al.*, 2004).

3.1.3 Kvetení

Tvorba květů je významná změna ve vývoji rostlin a je klíčová pro reprodukci. Jelikož rostliny nejsou mobilní, tak se musí umět vyrovnat s nejrůznějšími přírodními vlivy a regulovat správný čas změny stavu z vegetativního do generativního. Regulace iniciace a průběhu reproduktivní fáze závisí také na podmínkách vnějšího prostředí, jako je teplota,

délka dne a vlhkost. Reproduktivní fáze a její načasování ovlivňuje u hospodářsky významných plodin (např. pšenice, ječmen) celkový výnos.

Proces kvetení je u pšenice ovlivněn třemi základními skupinami genů: vernalizační geny (vytvářejí vernalizační dráhu), fotoperiodické geny (tvoří fotoperiodickou dráhu) a geny ranosti *per se* (Obrázek 3).

3.1.3.1 Vernalizace

Optimální doba kvetení je v životním cyklu každé rostliny velice důležitá. U některých rostlin ke kvetení nedojde, pokud nebudou vystaveny dlouhodobému působení nízkých teplot. Tento proces se nazývá vernalizace (jarovizace) a je jím zajištěno, že nedojde ke kvetení v nevhodnou dobu (před začátkem zimy). Teploty pro vernalizační proces se pohybují v rozmezí 1,3 – 15,7 °C (Kamran *et al.*, 2014) a jsou druhově charakteristické. Variety pšenice můžeme na základě potřeby vernalizace rozlišit na tři růstové typy: jarní, ozimé a přesívky. Ozimé odrůdy ke kvetení potřebují vernalizaci a lze je dále rozdělit na fakultativní nebo obligátní. Obligátní rostliny nevykvetou, pokud nebudou vystaveny vernalizaci. Fakultativní rostliny mohou vykvést bez dlouhodobého působení chladu. Proces kvetení je však u těchto rostlin pomocí vernalizace urychlený. Jarní druhy nevyžadují vernalizaci, nebo vykazují nízký vernalizační požadavek. Přesívky lze vysadit na podzim nebo na jaře.

Vernalizace teda zabezpečuje zpoždění přechodu z vegetativní do reprodukční fáze, a tak chrání meristémy před poškozením, které by mohlo být způsobeno mrazem.

Vernalizační geny (*VRN*)

Vernalizační geny jsou součástí vernalizační dráhy. K hlavním vernalizačním genům u pšenice patří geny *VRN1*, *VRN2* a *VRN3* (Yan *et al*., 2003; 2004; 2006). Vztah mezi vernalizačními geny u ozimých pšenic je charakteristický epistatickou interakcí, kdy alela *Vrn2* potlačí efekt alel *Vrn1* a *Vrn3* (Tranquilli *et al*., 2000). Dominantní formy genů *Vrn1* a *Vrn3* a recesivní forma genu *vrn2* jsou zodpovědné za vznik jařin. Alelické varianty dominantních a recesivních forem těchto genů se liší na sekvenční úrovni (Yan *et al*., 2003; 2004; 2006; Fu *et al.*, 2005).

Gen *VRN1*

Gen *VRN1* je základním genem vernalizační dráhy. Strukturními změnami v sekvenci genu došlo ke vzniku jarního růstového typu. Mezi geny *VRN1* se řadí *VRN-A1*,

VRN-B1 a *VRN-D1*. Jsou lokalizovány na dlouhém rameni chromozomů 5A, 5B a 5D. Recesivní forma je původní a nachází se u ozimých pšenic. Narušení regulace exprese tohoto genu v důsledku změn v jeho sekvenci vznikla dominantní forma, která je spojená se vznikem jarního fenotypu (Yan *et al.*, 2004a; Fu *et al.* 2005). S jarním růstovým typem se spojují sekvenční změny (delece či inzerce) v promotorové oblasti a v prvním intronu. V obou oblastech se nacházejí důležité regulační elementy, jejichž narušení vede k redukci nebo eliminaci vernalizačního nároku spojené se zvýšením exprese genu *VRN1* (Fu *et al.*, 2005).

VRN1 kóduje transkripční faktor patřící do rodiny proteinů MADS-box (Distelfeld *et al.*, 2009a). Tyto proteiny jsou definovány přítomností konzervativní aminokyselinové sekvence, která je charakteristická pro všechny členy této rodiny. Jde o souvislou sekvenci 56 aminokyselin, kde devět z těchto aminokyselin je identických u všech členů. Absolutní nevyhnutelnost tohoto genu pro iniciaci kvetení však byla vyvrácena studií z roku 2012. Chen a Dubcovsky (2012) identifikovali iniciaci kvetení i u mutantních rostlin, které neměly funkční gen *VRN1*. Nicméně je *VRN1* považován za klíčový promotor kvetení a je potřebný pro přechod mezi vegetativní a reproduktivní fází (Yan *et al*., 2003; Shitsukawa *et al.*, 2007).

U polyploidní pšenice byly pozorovány různé dominantní alely *Vrn-A1*. Alela *Vrn-A1a* je charakteristická inzercí repetitivního elementu spojenou s duplikací promotorové oblasti. Alela *Vrn-A1b* má několik jedno nukleotidových polymorfismů a delecí v promotorové oblasti (Yan *et al*., 2004a). Alela *Vrn-A1c* je charakteristická velkou delecí v prvním intronu (Fu *et al.*, 2005).

Rozdíly identifikované v alelelách *Vrn-B1* a *Vrn-D1* byly především inzerce nebo delece v oblasti prvního intronu. Alela *Vrn-B1c* byla charakteristická delecí 6850 bp v prvním intronu (Milec *et al.*, 2012). Delece v prvním intronu (4 235 bp) byla identifikována i u dominantní alely *Vrn-D1a* (Fu *et al.*, 2005). Zhang *et al.* (2012) pozorovali nukleotidovou substituci v CarG boxu nacházející se v promotorové oblasti *Vrn-D1b* v porovnání s alelou *Vrn-D1a*. Muterko *et al.* (2014) identifikovali inzerci transpozibilního DNA elementu (844 bp) u alely *Vrn-D1s* přítomné u *T. spelta* a *T. compactum*. Zhang *et al.* (2015) objevili novou dominantní alelu *Vrn-D1c* s174 bp inzercí.

Alely genu *VRN-1* patří mezi hlavní zdroje genetických rozdílů ve vernalizačním nároku u diploidních i polyploidních druhů pšenice (Loukoianov *et al.*, 2005). Přítomnost dominantní alely *Vrn-A1* vede k eliminaci potřeby vernalizace, zatímco s dominantní alelou

Vrn-D1 je spojen částečný vernalizační nárok. Jarní odrůdy s alelou *Vrn-A1* kvetou dříve než odrůdy, ve kterých jsou za jarní fenotyp zodpovědné alely *Vrn-B1* nebo *Vrn-D1*. Směrem k rovníku se frekvence dominantní alely *Vrn-D1* zvyšuje, zatímco frekvence alel *Vrn-A1* a *Vrn-B1* se snižuje (Fu *et al.*, 2005).

Gen *VRN1* je analogem genu *APETALA1* u *A. thaliana*, který je exprimován v apexu. Aktivace genu *VRN1* v apexu nastává po navázání komplexu proteinů VRN3, *Triticum aestivum* Flowering locus D-like 2 (TaFDL2) a 14-3-3 do jeho promotoru, čímž dojde k indukci kvetení (Li *et* Dubcovsky, 2008).

Gen *VRN2*

Geny *VRN2* byly identifikovány na genomu A a B (*Vrn-A2 a Vrn-B2)* u diploidní a tetraploidní pšenice (Yan *et al.*, 2004b; Distelfeld *et al.*, 2009b). Dubcovsky *et al.* (1998) využili mapovací populaci F_2 vzniklou zkřížením jarní (DV92) a zimní (G3116) odrůdy diploidní pšenice *T. monococcum* na lokalizaci genu *VRN2* na chromozomu 5A. Jde o hlavní represor transkripce genu *VRN3* (Chen a Dubovsky, 2012). Lokus tohoto genu obsahuje dva tandemově duplikované geny – *ZCCT1* a *ZCCT2*. Proteiny obou genů obsahují motiv zinkového prstu, který se nachází na N-konci a CTT doménu na C-konci. Doména CTT obsahuje 43 aminokyselin a byla poprvé popsána u proteinů *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh – CONSTANS, CONSTANS-like a TIMING OF CAB1 - podle nich byla i pojmenována (Yan *et al.*, 2004b).

Gen *VRN2* je hlavním represorem kvetení u rostlin bez dostatečné vernalizace (Yan *et al.*, 2004b), kdy potlačuje expresi genu *VRN3*. Negativní regulace transkriptu VRN3 genem *VRN2* je spojena s kompeticí mezi *VRN2* a fotoperiodickým genem *CO*, který je promotorem exprese genu *VRN3* o navázání na transkripční faktor NF-Y (komplexy nukleárního faktoru – Y) (Li *et al.*, 2011). Li *et al*. (2011) ve své studii identifikovali interakci mezi VRN2 a osmi různými proteiny NF-Y. Všech těchto osm proteinů NF-Y interagovalo i s CO. Mutace v CCT doméně genu *VRN2* u jarních odrůd vede k redukci síly vazby při interakci mezi VRN2 a NF-Y, čímž se sníží schopnost kompetice s CO. Tyto interakce zprostředkované doménou CCT tedy hrají u obilovin důležitou roli v integraci fotoperiodických a vernalizačních signálů. Tato kompetice probíhá v průběhu podzimu a zabraňuje expresi *VRN3* v listech, a tedy inhibuje kvetení během podzimu.

Na rozdíl od *VRN1* je zimní růstový typ určen dominantní formou genu *VRN2*. Jeho transkripce je negativně regulována nepřerušeným obdobím chladu a krátkým dnem.

U jarních pšenic byl vernalizační požadavek u tohoto genu eliminován v důsledku aminokyselinové záměny (tryptofan místo argininu) v doméně CTT, resp. úplné deleci genu *VRN2* (Yan *et al*., 2004a, Li *et al*., 2011).

Gen *VRN2* je analogem genu *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) u *A. thaliana*. Oba tyto geny mají stejnou funkci, ale odlišný původ, protože vernalizační dráha se u jednoděložných a dvouděložných rostlin vyvinula nezávisle (Yan *et al.*, 2004b).

Gen *VRN3*

Mezi geny *VRN3* se v hexaploidní pšenici řadí *Vrn-A3*, *Vrn-B3* a *Vrn-D3*, které byly lokalizovány na krátkém rameni sedmého chromozomu všech subgenomů (Yan *et al.*, 2006; Bonnin *et al.*, 2008). *VRN3* podporují transkripci genu *VRN1*, což zpětně vede ke zvýšení jeho vlastní transkripce (Yan *et al.*, 2006; Li *et* Dubcovsky 2008). Gen *VRN3* kóduje protein inhibující kinázu RAF (Li *et al.*, 2011). *VRN3* představuje florigen – mobilní signál, který je z listů přenášen do apikálního meristému a indukuje expresi genu *VRN1*, a teda iniciuje kvetení. Je hlavním integrátorem mezi vernalizačními a fotoperiodickými signály (Chen *et* Dubcovsky, 2012). Během podzimu je transkripce tohoto genu potlačena VRN2 (Li *et al.*, 2011).

Dominantní alela genu *VRN3* je charakteristická vyšší expresí vedoucí k dřívějšímu kvetení. Tato vyšší exprese je spojená s inzercí retroelementu do promotoru *VRN3* u hexaploidní pšenice Hope. Inzerce tohoto retroelementu nebyla nalezena u dalších odrůd pšenic a může být významným zdrojem genetické diverzity pro upravení času kvetení (Yan *et al.*, 2006). V této studii prokázali, že gen *VRN3* je homologním s genem *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), který byl identifikován u *A. thaliana*.

3.1.3.2 Fotoperioda

Fotoperiodismus je reakce rostliny na délku dne. Fotoperioda je definována jako doba, kdy je rostlina vystavena záření ve 24 hodinovém denním cyklu. Rostliny umějí pomocí fotoperiodických reakcí rozlišovat světlo od tmy a určit délku působícího záření. Determinací délky fotoperiody je rostlina informována o ročním období. Je to jeden z mechanizmů, který umožňuje rostlině kvést ve vhodné době (Procházka *et al.*, 1998).

Rostliny se dělí na citlivé a necitlivé vůči fotoperiodě. Necitlivé druhy mohou přejít do reprodukční fáze okamžitě, jakmile se na jaře oteplí. Naopak rostliny, které jsou citlivé vůči fotoperiodě, zůstávají ve vegetativní fázi, dokud délka dne není dostatečná, aby byl

splněn požadavek na fotoperiodu. Citlivé rostliny se dále dělí na dlouhodenní (kvetení indukováno dlouhým dnem) a krátkodenní (kvetení následkem krátkého dne). Nedostatečné splnění fotoperiodického požadavku kvetení zpožďuje. Obecně lze říct, že rostliny citlivé vůči fotoperiodě se vyskytují v jižních zeměpisných šířkách a necitlivé jsou více zastoupeny v severních zeměpisných šířkách. Vnímání světla je zajištěno fotoreceptory (dle Kamran *et al.*, 2014). Příkladem těchto fotoreceptorů jsou fytochromy, které vnímají červené světlo, a kryptochromy pro modré světlo.

Pšenice patří mezi dlouhodenní rostliny. Fotoperioda o délce nejméně 14 hodin značně urychluje kvetení. Naopak krátké dny způsobí zpoždění kvetení. V důsledku mutací ve fotoperiodických genech se vyvinuly linie, které byly necitlivé vůči fotoperiodě. Tyto linie byly selektovány a umožnily lepší adaptaci v odlišných environmentálních podmínkách (dle Milec *et al.*, 2014).

Fotoperiodické geny (*Ppd*)

Geny *Ppd* kontrolují fotoperiodickou dráhu a patří do proteinové rodiny Pseudo response regulator (PRR), (Beales *et al.*, 2007). Tyto geny jsou u pšenice lokalizovány na chromozomech 2A, 2B a 2D jsou označeny jako *Ppd-A1, Ppd-B1* a *Ppd-D1* (Welsch *et al.*, 1973; Law *et al.*, 1978; Mohler *et al.*, 2004). Dominantní alela genů *Ppd* je zodpovědná za necitlivost vůči fotoperiodě. Naopak recesivní alela je zodpovědná za fotoperiodickou citlivost (Pugsley, 1966). Alela *Ppd-D1a*, která obsahuje deleci 2 089 bp v promotorové oblasti, je predominantně zodpovědná za necitlivost k fotoperiodě. Její ektopická exprese je spojená se zvýšením exprese genu *VRN3* nezávisle od délky dne a následně dřívějším kvetením (Beales *et al.*, 2007). Necitlivost k fotoperiodě je determinována i alelami na dalších subgenomech, např. alela *Ppd-A1a* obsahuje deleci přibližně 1 kb v promotorové oblasti (Wilhelm *et al.*, 2009). Fotoperiodická necitlivost (insenzitivita) je podmíněna také změnou počtu genů *Ppd*. Zvýšení počtu kopií genu *Ppd-B1a* vedlo k dřívějšímu kvetení dané rostliny během krátkého dne (Díaz *et al.*, 2012).

Khlestkina *et al.* popsali v roce 2009 nový nový fotoperiodický gen *Ppd-B2*, který se nachází na krátkém rameni sedmého chromozomu. Tento gen urychluje kvetení při dlouhé fotoperiodě.

Fotoperiodická dráha u pšenice je tedy zprostředkována genem *Ppd1*. Ten během dlouhého dne stabilizuje protein *Triticum aestivum* CONSTANS (TaCO). Protein TaCO

ovlivňuje transkripci genu *VRN3*, který je klíčovým genem zabezpečujícím integraci vernalizační a fotoperiodické dráhy (Chen *et* Dubovsky, 2012).

Fotoperiodická nesenzitivita, a s ní spojené dřívější kvetení, umožnila pěstování pšenic v zeměpisných šířkách, ve kterých jsou optimální podmínky dosaženy během krátkého dne.

3.1.3.3 Geny ranosti - earliness per se (Eps)

Geny *Eps* se řadí mezi další geny, které ovlivňují čas kvetení. Regulují kvetení nezávisle na vernalizační a fotoperiodické dráze. Vliv některých dodnes identifikovaných genů *Eps* byl modifikován odlišnou teplotou (Lewis *et al.*, 2008).

Geny *Eps* neovlivňují dobu kvetení ve velké míře, ale slouží na jemné modifikace času kvetení. Jsou důležité pro přizpůsobení pšenice mikroklimatickým podmínkám prostředí. Účinek těchto genů není tak výrazný, a tak je jejich přesné mapování velice obtížné (Bullrich *et al.*, 2002).

Pochopení funkce genů *Eps* a jejich vlivu na rostlinu během jednotlivých fází vývoje nebo během působení různých environmentálních faktorů může vést k možnosti manipulace doby kvetení a případně přizpůsobit šlechtitelský proces ke vzniku kultivarů lépe adaptovaných ke specifickým podmínkám prostředí (Lewis *et al.*, 2008).

3.2 Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.)

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) patří společně s pšenicí mezi hlavní hospodářské plodiny. Jedná se o diploidní organizmus (2n = 14) s velikostí genomu 5,1 Gbp (1C). Přibližně 84 % genomu obsahuje mobilní elementy nebo repetitivní DNA sekvence (*International Barley Genome Sequencing Consortium*).

Podobně jako pšenice se i ječmen pěstuje v různých environmentálních podmínkách díky jeho přizpůsobení k délce dne a vernalizaci. Je to umožněno nejrůznějšími alelickými variantami genů, které jsou zapojeny ve fotoperiodické a vernalizační dráze. Na základě fotoperiodické odezvy jsou odrůdy ječmene rozdělené na citlivé a necitlivé k délce dne. Dle potřeby vernalizace se odrůdy dělí na zimní (vernalizace urychluje kvetení) a jarní (nevyžadují vernalizaci).

3.2.1 Kvetení

Načasování doby kvetení je důležitým krokem v životním cyklu ječmene, který ovlivní jeho výnos a kvalitu obilek. Mezi základní mechanizmy ovlivňující dobu kvetení patří vernalizační a fotoperiodická dráha.

Vernalizační dráha je u ječmene kontrolována třemi geny – *VRN-H1, VRN-H2* a *VRN-H3*. Mezi geny *VRN-H1* a *VRN-H2* je epistatická interakce (Takahashi *et* Yasuda, 1971). *VRN-H1* je dominantní pro jarní fenotyp, zatímco *VRN-H2* pro zimní. Jarní odrůdy obsahují delece v regulačních oblastech prvního intronu v genu *VRN-H1* (Fu *et al.*, 2005). Lokus genu *VRN-H2* obsahuje tři geny s motivem zinkových prstů a doménou CCT – geny *ZCCT*. Funkcí těchto genů je potlačení kvetení. Delece všech tří kopií měla za výsledek jarní fenotyp nezávisle na alele *VRN-H1* (Dubcovsky *et al.*, 2005, Yan *et al.*, 2004). Zvýšení exprese genů *ZCCT* u zimní odrůdy ječmene bylo detekováno jenom tehdy, když rostliny byly pěstovány při dlouhém dnu (Trevaskis *et al.*, 2006).

Ječmen patří mezi dlouhodenní rostliny. Hlavní geny fotoperiody jsou *Ppd-H1* a *Ppd-H2* (Laurie *et al.*, 1994; Laurie *et al.*, 1995). Dominantní alela *Ppd-H1* urychluje kvetení při dlouhém dni, naopak při krátkém je neúčinná. Aktivita genu *Ppd-H2* byla detekována při krátkodenní fotoperiodě (Laurie *et al.*, 1995). Odrůdy ječmene lišící se ve fotoperiodě mají odlišné alelické varianty v těchto dvou genech. Oba kódují protein patřící do genové rodiny PRR a jsou součástí cirkadiálních hodin. *Ppd-H1* ovlivňuje transkripci genu *HvFT1* a reguluje kvetení nezávisle na genu *Hordeum vulgare CO1* (*HvCO1*) (Turner *et al.*, 2005).

Gen *HvCO1* je ortologní ke genu *CO* u *A. thaliana*. Zvýšená exprese *HvCO1* vede k urychlení kvetení (Campoli *et al.*, 2012). Gen *HvFT1* je ortologem genu *FT* u *A. thaliana*. Zvýšená transkripce je pozorována u rostlin s dominantní alelou (dřívější kvetení), zatímco u rostlin s recesivní alelou vede snížená exprese k pozdějšímu kvetení. Rozdíly v dominantní a recesivní alele jsou způsobeny mutacemi v prvním intronu *HvFT1* (Yan *et al.*, 2006). Gen *HvFT1* je integrátorem signálů z vernalizační a fotoperiodické dráhy. Na podzim je exprese genu *HvFT1* potlačována genem *VRN-H2*. Během zimy je vlivem vernalizace zvýšená exprese genu *VRN-H1*, který slouží jako represor *VRN-H2*, a tím je umožněna transkripce *HvFT1*, která probíhá na jaře (Hemming *et al.*, 2008; Trevaskis *et al.*, 2006; Sasani *et al.*, 2009). Vznik jarního růstového typu je spojen i se zvýšením počtu kopií genu *HvFT1*. Vyšší počet kopií je spojen s epistatickou interakcí s *vrn-H1* a *Vrn-H2* a s dřívějším kvetením.

Alely *HvFT1* s rozdílnými počty kopií můžou být využity při vývoji nových odrůd, které budou přizpůsobeny různým environmentálním podmínkám (Nitcher *et al.*, 2013).

3.3 Rýže setá (*Oryza sativa* L.)

Rýže setá (*Oryza sativa*) je subtropická krátkodenní rostlina (Yano *et al.*, 2000; Andrés *et* Coupland, 2012). Je modelovým organizmem pro studium regulačních drah, které kontrolují proces kvetení u krátkodenních rostlin (Shrestha *et al.*, 2014). Rýže poskytuje kolem 21 % kalorií, které jsou na světě spotřebovány, v jihovýchodní Asii až 76 % (Fitzgerald *et al.*, 2009). Rýže je pěstována převážně v rozmezí 55° s. š. až 36° j. š., což je umožněno přispůsobením času kvetení různým environmentálním podmínkám. Jednou ze základních adaptací bylo částečné nebo úplné oslabení citlivosti k fotoperiodě. Pěstování rýže bylo tedy umožněno i v oblastech, kde se optimální podmínky vyskytovaly během dlouhého dne (Shrestha *et al.*, 2014).

3.3.1 Kvetení

Genetická regulace procesu kvetení je i u rýže ovlivněna vnějšími podmínkami prostředí. Je to důležité pro indukci kvetení v optimální době a má výrazný vliv na celkový výnos. Fotoperiodická dráha je u rýže podmíněna stejně jako u *A. thaliana* nebo pšenice, avšak kvetení je iniciováno krátkým dnem. Základní signální dráha (Obrázek 3) se skládá z těchto genů: *Oryza sativa GIGANTEA* (*OsGI)- Heading date 1* (*Hd1)- Heading date 3a* (*Hd3a*) – tato dráha je homologní k dráze *GI – CO – FT* ovlivňující kvetení u *A. thaliana*.

Transkripce *OsGI* je kontrolována cirkadiánním rytmem. OsGI aktivuje doposud neobjasněným mechanizmem expresi genu *Hd1* (Hayama *et al.*, 2003). V listech je následně iniciovaná exprese florigenu *Hd3a*, který je transportován do vzrostného vrcholu, kde umožňuje expresi genu *OsMADS15* (Komyia *et al.*, 2008).

Gen *Hd1* kóduje protein s motivem zinkového prstu. Tento gen kontroluje citlivost vůči fotoperiodě a iniciuje kvetení během krátkých dnů. Naopak během dlouhých dnů působí jako represor tohoto procesu. Tato dvojí funkce genu byla zjištěna během analýzy rostlin, které nenesly funkční alelu genu *Hd1*. Tyto rostliny kvetly později během krátkých dnů (nedocházelo k dostatečné akumulaci mRNA genu *Hd3a*) a během dlouhých dnů naopak kvetly rostliny dříve (Yano *et al.*, 2000).

U rýže byly určeny celkem dva florigeny – *Hd3a* a *RICE FLOWERING LOCUS T 1* (*RFT1*). Exprese obou genů je kontrolována komplexní genetickou sítí, která interaguje se signály fotoperiodické dráhy a cirkadiálních hodin (Tsuji *et al.*, 2013).

Gen *Hd3a* byl lokalizován na krátkém rameni šestého chromozomu (Yamamoto *et al.*, 1998). Jeho transkripce se zvyšuje během krátkého dne (Kojima *et al.*, 2002). Hd3a je floémem transportován do vzrostného vrcholu, kde interaguje s transkripčním faktorem OsFD1. Tento komplex aktivuje *OsMADS15* a vede k iniciaci kvetení (Taoka *et al.*, 2011). Gen *RFT1* je lokalizovaný na chromozomu 6 přibližně 11,5 kb od genu *Hd3a*. Je hlavním aktivátorem kvetení během dlouhých dnů (Komiya *et al.*, 2008). Gen *RFT1* je také ovlivňován *Hd1*, protože exprese *RFT1* byla výrazně snížena u rostlin, které neměly funkční gen *Hd1*. *RFT1* je také aktivátorem exprese genů *OsMADS14* a *OsMADS15*. Při absenci exprese *Hd3a* během krátkého dne funguje *RFT1* jako aktivátor kvetení. Přítomnost aspoň jednoho z obou genů je pro kvetení esenciální. Rostliny, u kterých nebyl ani jeden z obou genů funkční, nevykvetly ani 300 dní po jejich zasetí (Komiya *et al.*, 2008; Tsuji *et al.*, 2011).

Regulace exprese florigenů však není řízena jen dráhou *OsGI – Hd1 – Hd3a*, ale i dráhou zahrnující geny *Ehd1* a *Ghd7*, která je evolučně unikátní pro rýži. *Ehd1* iniciuje kvetení vlivem dlouhého i krátkého dne. Během krátkého dne aktivuje expresi genu *Hd3a*, při dlouhém dnu dojde k aktivaci exprese *RFT1* (Doi *et al.*, 2004).

Regulace *Ehd1* je tedy velice důležitá pro správný čas kvetení u rýže. Příkladem represoru *Ehd1* je gen *Grain number, plant height and heading date 7* (*Ghd7*). *Ghd7* kóduje protein s doménou CTT a je exprimován během dlouhého dne (Itoh *et al.*, 2010). Má vliv na čas kvetení, výšku rostliny nebo počet obilek (Xue *et al.*, 2008). Itoh *et al.* (2010) identifikovali, že během krátkého dne je exprese genu *Ghd7* redukována, a byla indukována exprese *Hd3a* a *Ehd1*. Během dlouhého dne je exprese *Ghd7* vyšší, čímž dojde k potlačení transkripce *Ehd1*, a tím ke zpoždění kvetení.

Odrůdy rýže rostoucí v severnějších zeměpisných šířkách využívají k iniciaci kvetení jak dráhu s *RFT1*, tak i s *Hd3a*. Odrůdy pěstované v jižních zeměpisných šířkách využívají převážně dráhu s *Hd3a* (Ogiso-Tanaka *et al.*, 2013).

3.4 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

Rostlina *A. thaliana* je vhodným modelovým organismem, který se využívá mimo jiné i ke studiu jednotlivých drah indukující kvetení. *A. thaliana* je vhodným modelovým organismem z několika důvodů: krátká vegetační doba (6-8 týdnů), zcela sekvenovaný a anotovaný genom (125 Mbp) (Kaul *et al.*, 2000), produkce velkého počtu semen a nenáročnost pěstování. Jednotlivé dráhy kvetení (vernalizační či fotoperiodická dráha) jsou proto nejpodrobněji popsány právě na této modelové rostlině. Determinace optimálního času kvetení prostřednictvím drah je důležitá pro samotnou reprodukci a dokončení všech vývojových stádií.

A. thaliana patří mezi dlouhodenní rostliny. Jednotlivé ekotypy *A. thaliana* jsou klasifikovány do dvou skupin dle doby kvetení: letní a zimní. Letní kvetou brzo po jejich zasazení vlivem dlouhého dne. Jejich životní cyklus trvá jen pár týdnů. Naopak zimní mohou růst několik měsíců, aniž by vykvetly. Poznatky získané studiem *A. thaliana* jsou využívány při studiu hospodářsky významných plodin a mohou vést ke šlechtění rostlin, které budou kvést synchronizovaně a v optimálním čase, čímž dojde k maximalizování výnosů (Andrés *et* Coupland, 2012).

U *A. thaliana* je popsáno několik drah, které kontrolují proces kvetení. Patří zde dráha vernalizační, fotoperiodická, giberelinová, autonomní a metylační. Vernalizační dráha zajišťuje (Obrázek 3), že rostlina nekvete, dokud není splněn vernalizační požadavek (dlouhodobé působení chladových teplot). Fotoperiodická dráha (Obrázek 3) kontroluje délku světelné části dne. Giberelinová dráha ovlivňuje kvetení při krátké fotoperiodě a je ovlivňována hormonálně. Autonomní dráha indukuje kvetení nezávisle na vnějším prostředí. A poslední zmíněná, metylační dráha, ovlivňuje kvetení regulací metylace DNA. Jedná se o nejpozději determinovanou dráhu.

3.4.1 Vernalizační dráha

Vernalizace je důležitým faktorem ovlivňujícím čas kvetení u různých ekotypů *A. thaliana*. Vernalizace je u *A. thaliana* podmíněna jinými regulačními drahami než u pšenice. V této dráze působí dva hlavní geny – *FRIGIDA* (*FRI*) a *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*). Gen *FLC* je represorem kvetení a jeho transkripce je snižována vernalizací, čímž je umožněná transkripce genu *FT*. Gen *FRI* je aktivátorem *FLC* (Michaels *et* Amasino, 1999).

3.4.1.1 Gen FRI

Gen *FRI* aktivuje transkripci *FLC*, a to pravděpodobně změnou chromatinové struktury vedoucí k uvolnění lokusu pro transkripční faktory. Gen *FRI* je lokalizován na čtvrtém chromozomu (Clark *et* Dean, 1994) a kóduje protein s doménou *coiled-coil*. Dominantní alela způsobuje zpoždění doby kvetení. Gazzani *et al.* (2003) identifikovali recesivní alely *fri*, kde sekvenční změna vedla k aminokyselinové záměně, resp. k předčasnému zařazení STOP kodónu, což způsobilo nefunkčnost proteinu, a následnému dřívějšímu kvetení.

3.4.1.2 Gen FLC

Gen *FLC* je transkripčním faktorem patřící do rodiny proteinů MADS-box a je lokalizován na pátém chromozomu. Je exprimován v listech i meristémech. Mutantní rostliny (*flc*) kvetly dříve, z čehož vyplývá, že aktivní gen *FLC* je zodpovědný za represi kvetení. Vazbou FLC na geny podporující kvetení (*SOC1* a *FT*) dojde k zablokování jejich transkripce, a tím k potlačení iniciace kvetení. Míra transkripce genu *FLC* je pozitivně regulována FRI a negativně vernalizací (Michaels *et* Amasino, 1999). Gen *FLC* má proto důležitou úlohu při vernalizaci (Sheldon *et al.*, 2000). Represe genu *FLC* je umožněna kromě vernalizace i dalšími mechanizmy, jako např. transkripčním faktorem *LUMINIDEPENDENS* (*LD*) (Lee *et al.*, 1994) nebo *FCA*, který kóduje protein vážící RNA a reguluje *FLC* na postranskripční úrovni (Macknight *et al.*, 1997).

3.4.2 Fotoperiodická dráha

Mezi hlavní fotoperiodické geny patří *GIGANTEA* (*GI*), *FLAVING KELCH F BOX 1* (*FKF1*), *CONSTANS* (*CO*) a *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). Všechny tyto geny se exprimují v listech. Cílem fotoperiodické dráhy je aktivovat transkripci *FT*. Represe genu *FT* je zapříčiněna proteinem FLC. Transkripce tohoto genu je regulována fotoperiodickou a vernalizační dráhou a nastává pouze během dlouhých dnů (Andrés *et* Coupland, 2012). FT představuje mobilní signál, který je transportován do vzrostného vrcholu a umožňuje iniciaci kvetení. Tento signál byl nazván jako „florigen“. Zvýšením exprese genů *CO*, *FT* nebo *SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) dojde ke dřívějšímu kvetení (An *et al.*, 2004).

3.4.2.1 Gen CO

Gen *CO* je společně s *FT* hlavním genem fotoperiodické dráhy (Mathieu *et al.*, 2007). Jde o transkripční faktor s motivem zinkového prstu, který umožňuje integraci informací

z vnějšího prostředí a umožňuje iniciaci kvetení ve vhodnou roční dobu. Protein CO přímo aktivuje expresi *FT* v listech (An *et al.*, 2004).

Transkripce *CO* je indukována interakcí mezi proteiny GI a FKF1, kdy protein FKF1 obsahuje doménu absorbující modré světlo (Sawa *et al.*, 2007). Tyto dva proteiny patří mezi komponenty cirkadiálních hodin. Vlivem světla dochází k interakci mezi GI a FKF1, a to vede k degradaci CYCLING DOF FACTORs (CDFs), který je represorem *CO*, a může tak dojít k jeho transkripci. Při snížené aktivitě *CDFs* jsou rostliny necitlivé vůči délce dne a kvetou brzo při jakékoliv fotoperiodě (Fornara *et al.*, 2009). Během krátkého dne je *CO* exprimován ve tmě a následně degradován prostřednictvím komplexu zahrnující proteiny: CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) a SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A (SPA1), (Andrés *et* Coupland, 2012). Při dlouhé fotoperiodě dochází k této interakci, protein CO je stabilizován a je umožněna jeho funkce při iniciaci exprese genu *FT* (Fornara *et al.*, 2009).

3.4.2.2 Gen FT

Gen *FT* je integrátorem mezi fotoperiodickou a vernalizační dráhou. *FT* je exprimován ve floému listů. Protein FT je podobný inhibitorům kináz RAF proteinů a je mobilním signálem, který je skrz floém transportován z listů k meristémům ve vzrostném vrcholu (Mathieu *e al.*, 2007). Ve vzrostném vrcholu interaguje s proteinem FLOWERING LOCUS D (FD), který patří mezi bZIP transkripční faktory, a proteinem 14-3-3. Takto vzniklý komplex umožní transkripci genu *APETALA1* (*AP1*), čím iniciuje přechod z vegetativního do generativního stádia (Jaeger *et al.*, 2007; Corbesier *et al.*, 2007).

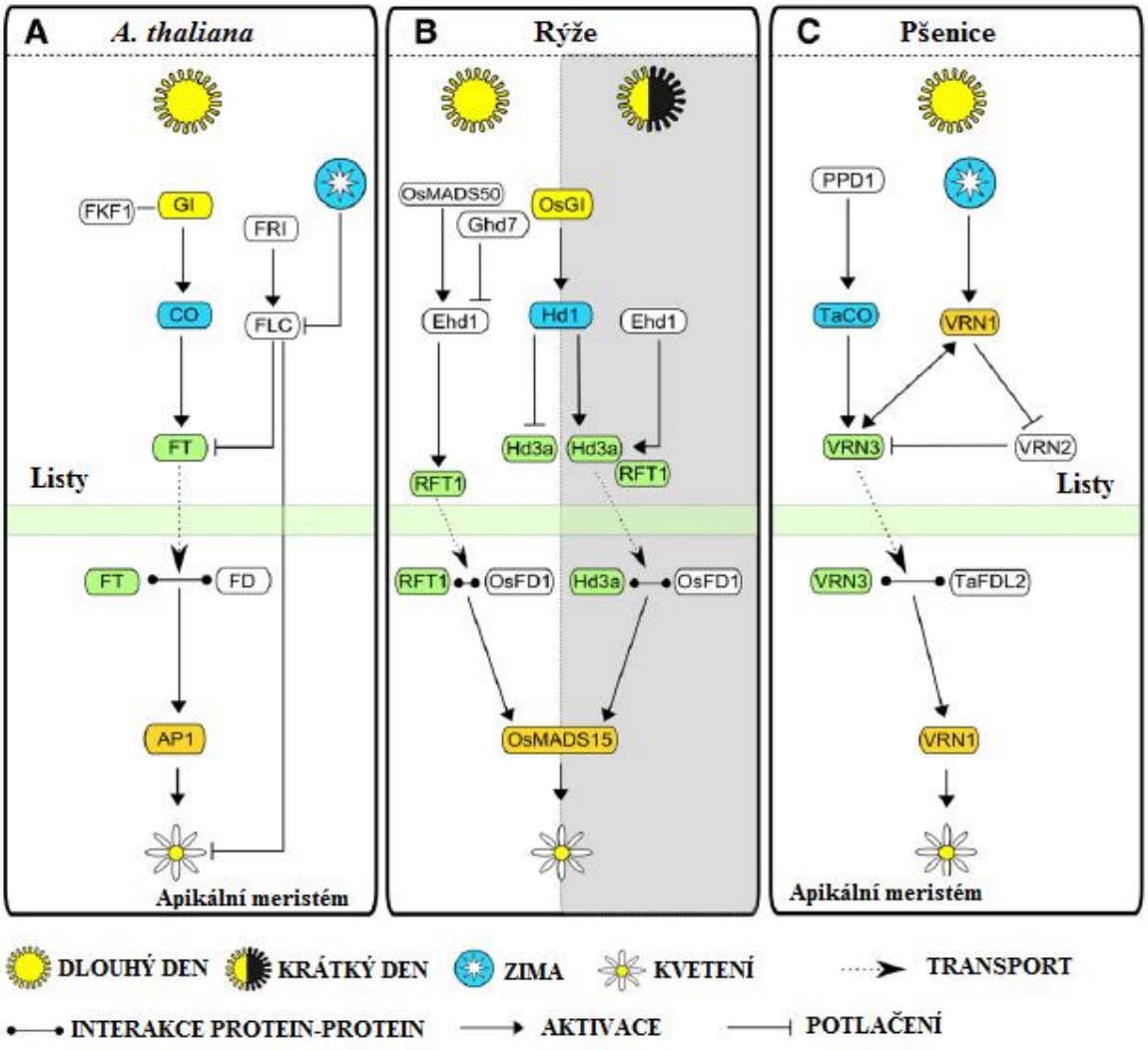
Exprese *AP1* je pozitivně ovlivňována CO a negativně FLC, který je součástí vernalizační dráhy. *AP1* je u *A. thaliana* exprimován v apexu (společně s geny *CAULIFLOWER* (*CAL)* a *FRUITFULL* (*FUL*)). Tyto geny jsou potřebné pro přechod z vegetativní do reproduktivní fáze (Yan *et al*, 2003). Mutanti ve všech třech těchto genech nikdy nevykvetli v běžných podmínkách (Ferrándiz *et al*., 2000).

3.4.3 Giberelinová dráha

Gibereliny (GA) patří mezi rostlinné hormony, které ovlivňují růst a vývoj rostlin. U *A. thaliana* tyto hormony iniciují kvetení v podmínkách krátkého dne. GA mají pravděpodobně vliv na květní meristémy a expresi genu *SOC1*. Gen *SOC1* je během dlouhých dnů stimulován proteinem CO, během krátkého dne je jeho exprese a exprese genu *LFY* stimulována GA (Eriksson *et al.*, 2006). Iniciace exprese těchto genů indukuje kvetení

v podmínkách krátkého dne. Exprese jiných genů ovlivňujících kvetení, jako je *FLC* nebo *FT*, není regulována giberlinovou drahou (Moon *et al*, 2003). Andrés *et al.* (2014) determinovali negativní efekt transkripčního faktoru patřícího do rodiny MADS box proteinů SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) na iniciaci kvetení, a to v důsledku potlačení biosyntézy GA. Naopak represe SVP vede ke zvýšení GA ve vzrostném vrcholu a indukci kvetení.

GA tedy mají vliv na dobu kvetení u *A. thalina*, a to během krátkého dne, zatímco indukce kvetení při dlouhé fotoperiodě je umožněna dráhou *GI – CO – FT*.



Obrázek 3: Schéma, které srovnává dráhu kvetení u *A. thaliana*, rýže a pšenice. (Převzato a upraveno dle Milec *et al.*, 2014). Obrázek popisuje interakce mezi jednotlivými geny, které indukují kvetení u třech modelových rostlin – *A. thaliana*, rýže a pšenice.

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Biologický materiál

Výchozím biologickým materiálem byla mapovací populace F_2 o velikosti 395 jedinců vzniklých reciprokým zkřížením dihaploidních (DH) rodičovských linií DH397 a DH81 a jejich následným samosprášením. Mapovací populace se skládala z 200 jedinců z křížení, kde byla linie DH397 mateřským rodičem a 195 jedinců, kde byla mateřským rodičem linie DH81. DH rodičovské linie jsou součástí mapovací populace skládající se z 314 linií a byly poskytnuty Irenou Jacobson z Tallinn Univerzity of Technology (Estonsko). DH mapovací populace je charakteristická přítomností introgresí *T. militinae* (2n = 28, A^uA^uGG) v genetickém pozadí *T. aestivum* kultivar Tähti (Jakobson *et al.*, 2006). DH mapovací populace byla odvozena z linie 8.1, která obsahovala introgrese na sedmi chromozomech: krátkého ramene chromozomů 1A, 2A, 1B, 5B a 7B a dlouhého ramene chromozomů 2A, 4A a 5A (Jakobson *et al.*, 2006, 2012).

Mapovací populace F_2 byla poskytnuta Mgr. Zuzanou Ivaničovou (Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Olomouc).

4.2 Seznam použitých chemikálií

magnetické kuličky (GeneFind 2.0, Immunotech)

agaróza (Sigma-Aldrich, USA)

velikostní marker GeneRuller 100 bp, DNA Ladder Plus (Fermentas, Kanada)

3-methakryloxypropyl-trimethoxysilan (Serva Fein Biochemika, USA)

N, N,N´,N´- tetramethylendiamin (TEMED, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

akrylamid (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

N, N´- metylenbisakrylamid (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

kyselina octová (Lachner, ČR)

96% ethanol (Lachner, ČR)

peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich, USA)

ethidium bromid (Sigma Chemical CO., USA)

sacharóza (Lechema, USA)

4.3 Seznam použitých roztoků

Základ lyzačního pufru

500 mmol/l	NaCl
100 mmol/l	Tris-HCl (Sigma-Aldrich, USA)
50 mmol/l	EDTA
pH 7,2	

Lyzační pufr

0,5%	hydrogensiřičitan sodný (Lachner, ČR)
0,1%	kyselina L-askorbová (Sigma-Aldrich, USA)
1%	2 – merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
10 mg/ml	RNAsa A (Invitrogen, USA)

5× TBE

450 mmol/l	Tris base
450 mmol/l	kyselina boritá (Lachner, ČR)
10 mmol/l	EDTA × $2H_2O$ (Fluka)

1× PCR pufr

10 mmol/l	Tris-HCl
1,5 mmol/l	$MgCl_2$
50 mmol/l	KCl
0,1%	Triton X-100
pH	8,2

Cresol red

0,01%	o-cresolsulfonephthalein (Sigma-Aldrich, USA)
1,5%	sacharóza

Nukleotidy (Fermentas, Litva)

200 μmol/l dATP

200 μmol/l dCTP

200 μmol/l dGTP

200 μmol/l dTTP

4.4 Vybavení laboratoře

automatický robot pro izolaci DNA (Beckman Coulter, Biomek NX^P, USA)

termostat BT 120M (Laboratorní přístroje Praha, ČR)

homogenizační oscilační mlýn MM301 (Retsch, Německo)

vodní lázeň (Jouan, Trigon-plus – ČR)

chlazená centrifuga Jouan CR4i (Thermo, USA)

elektroforetická aparatura pro agarózovou elektroforézu Thermo Scientific OWL A6 (Separation Systems, Inc., USA)

zdroj napětí pro agarózovou elektroforézu (Major Science, USA)

dokumentační systém Syngene s UV transiluminátorem (SynGene, UK)

nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)

thermocycler C1000 Touch™ (Bio-Rad, USA)

digitální předvážky (Shinko Denshi, Japonsko)

digestoř (Merci, ČR)

mikrovlnná trouba (Daewoo KOR-6C2B)

elektroforetická aparatura pro polyakrylamidovou elektroforézu C-DASG-400-50 (C.B.S. Scientific Company, Inc., USA)

zdroj napětí pro polyakrylamidovou elektroforézu (Major Science, USA)

automatické pipety (Nichipet EX Plus, USA)

stolní centrifuga (Benchmark MyFuge™ Mini)

4.5 Pěstování mapovací populace a fenotypizace

Semena jedinců mapovací populace F_2 a rodičovských linií DH397 (pět jedinců) a DH81 (tři jedinci) byla 24 hodin inkubována v 2ml mikrozkumavkách v pitné vodě. Následně byla přemístěna do Petriho misek s buničitou vatou navlhčenou pitnou vodou a umístěna do ledničky po dobu 48 hodin za účelem synchronizace. Poté byla inkubována 24 hodin v termostatě při 25 °C. Naklíčená semena byla sázena do jiffových květináčů (5 × 5 cm), které byly umístěny do skleníku při kontrolovaných podmínkách 24 °C den / 20 °C noc při přirozeném osvětlení. V době, kdy rostliny dosáhly vývojového stádia tří listů, byly vysazeny na pole. Vysazení rostlin na poli bylo randomizované.

U každého z jedinců mapovací populace byl zaznamenán čas metání, což je doba, kdy byla polovina klasu venku z praporcového listu. Datum metání bylo zaznamenáno každý den přibližně ve stejnou dobu (data poskytla Mgr. Zuzana Ivaničová). Následně byl určen počet dní od první manipulace se semínky (ponoření do vody na 24 hodin) po metání. Počet dní byl zaznamenán v přehledné tabulce a využit při další analýze.

4.6 Izolace DNA

Genomická DNA z jedinců mapovací populace F_2 a rodičovských linií byla izolována pomocí automatického robota (Beckman Coulter, Biomek NX^P, USA) v 96jamkových destičkách. Extrakce byla založena na vazbě molekul DNA na magnetické částice.

Z rostlin vysázených na poli byly odebrány 3 segmenty (3 × 3 cm) z hlavního listu do 96jamkové destičky s 2ml jamkami. Odebrané listy byly usušeny v termostatu (BT 120M, Laboratorní přístroje Praha, ČR) při 37 °C/48 hod. Rostlinný materiál byl homogenizován v oscilačním mlýnu (MM301 Retsch, Německo) se 2 skleněnými kuličkami při 27 Hz po dobu 4 minut. Získaný homogenát byl centrifugován při 4200 rpm/4 min (4 °C).

Ke každému vzorku bylo přidáno 300 µl předehřátého lyzačního pufru. Vzorky byly inkubovány ve vodní lázni při 65 °C/45 min. Lyzát byl centrifugován při 4 200 rpm/4 min (4°C). Následující kroky izolace DNA byly provedeny automatizovaným robotem (Beckman Coulter, Biomek NX^P, USA). K 10 µl magnetických kuliček (GeneFind 2.0, Immunotech), 1 µl RNAsy 80 µl izopropanolu v PCR destičce bylo přidáno 100 µl lyzátu. Směs se promíchala a inkubovala 5 min při pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky umístěny na magnet (Beckman Coulter, USA) po dobu 30 s a následně byl odpipetován supernatant. DNA navázaná na kuličkách byla promyta 100 µl 70% etanolu, promíchána

a inkubována 30 s. Supernatant byl následně odpipetován a promytí bylo 2× opakováno. Nakonec byla PCR destička se vzorky DNA vysušena při pokojové teplotě, resuspendována v 50 µl H_2O a uchována pro další využití v –20 °C.

4.7 Polymerázová řetězová reakce

DNA markery

Genotypizace jedinců mapovací populace F_2 bylo prováděna prostřednictvím jedenácti párů markerů DNA (Tabulka 4). DNA markery byly vybrány na základě předcházejících studií, kde byly lokalizovány v introgresích linie 8.1 pocházejících z *T. militinae* (Jakobson *et al.*, 2006, 2012). Dalším kritériem pro výběr byla pozice vybraných markerů na genetické mapě. Markery identifikovány v předcházejících experimentálních studiích se nacházely v blízkosti lokusů zodpovědných za rozdíly v době kvetení.

Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla využita k amplifikaci fragmentů DNA prostřednictvím vybraných primerů, a tedy k genotypizaci potomků mapovací populace F_2. Celkový reakční objem PCR byl 10 µl a obsahoval: 1× PCR pufr, 200 µmol/l z každého dNTP (Fermentas, Litva), 0,01% Cresol Red (Sigma-Aldrich, UK), 1,5% sacharózy (Lachema, ČR) 0,5 U *Taq* polymerasy (Solis, Biodyne, Estonsko), 1 µmol/l forward primeru (F), 1 µmol/l reverse primeru (R) a 10 ng templátové DNA. Pro amplifikaci byly využity SSR (*Simple Sequence Repeat*) primery, kde byl detekován délkový polymorfizmus a primer VrnA1_F4R4, kde byla genotypizace založena na délkovém polymorfizmu (433 bp) vzniklém v důsledku inzerce repetitivního elementu v genu *VRN-A1*. Použité reakční podmínky jsou uvedeny v Tabulkách 1, 2 a 3.

Tabulka 1: Reakční podmínky pro amplifikaci genomické DNA prostřednictvím SSR markerů.

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	5 min	1
Denaturace	95	30 s	34
Annealing	55 nebo 60 (viz Tabulka 2)	30 s	
Elongace	72	30 s	
Závěrečná polymerace	72	7 min	1

Tabulka 2: Teploty annealingu (T_A) využité pro amplifikaci jednotlivých SSR markerů a jejich separace v 3,5% nebo 6% nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu.

DNA marker	T_A [°C]	Polyakrylamidový gel
psp3151	55	6%
psp3000	60	3,5%
gwm382	55	3,5%
gwm71	60	6%
owm82	60	3,5%
gwm213	60	6%
cfa2155	60	3,5%
psp3050	60	6%
wmc283	60	6%
barc70	60	6%

Tabulka 3: Reakční podmínky pro PCR amplifikaci genomické DNA prostřednictvím markeru *Vrn1A_F4R4*.

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	5 min	1
Denaturace	95	30 s	34
Anelace	65-53 (–0,7 °C/cyklus)	40 s	
Elongace	72	1,5 min	
Denaturace	95	40 s	19
Anelace	53	40 s	
Elongace	72	1,5 min	
Závěrečná polymerace	72	10 min	1

Tabulka 4: DNA markery použité pro genotypizaci mapovací populace F_2. Ve sloupcích je uveden název DNA markeru, umístění na chromozomu, sekvence F a R primeru a literární zdroj.

DNA marker	Chromozom	Sekvence 5´→ 3´	Literární zdroj
psp3151	1A	F_GGCTGGTGTAGTAGGTTGCGA R_CGCAACACCATATCATGTGTCAA	Stephenson P (1998)
psp3000	1B	F_GCAGACCTGTGTCATTGGTC R_GATATAGTGGCAGCAGGATACG	Stephenson P (1998)
gwm382	2AL	F_GTCAGATAACGCCGTCCAAT R_CTACGTGCACCACCATTTTG	Roder MS (1998)
gwm71	2AS	R_GAAGTGGAGCATTAGGTACACG F_ GGCAGAGCAGCGAGACTC	Roder MS (1998)
owm82	4A	F_GGGAGAGACGAAAGCAGGTA R_CTTGCATGCACGCCAGAATA	Poskytla Mgr. Eva Komínková
gwm213	5B	F_TGCCTGGCTCGTTCTATCTC R_CTAGCTTAGCACTGTCGCCC	Roder MS (1998)
Vrn1A_F4R4	5A	F_ACCCCAAGTGGAAGGGTTAA R_CTTTTCCGTTAGCGCCGCG	Ivaničová Z (2016)
cfa2155	5A	F_TTTGTTACAACCCAGGGGG R_TTGTGTGGCGAAAGAAACAG	Sourdille P (2001)
psp3050	7A	F_TAACTCACCTGCGAACTGTG R_CCGATAAAAGTTTAGCGACC	Stephenson P (1998)
wmc283	7A	F_CGTTGGCTGGGTTATATCATCT R_GACCCGCGTGTAAGTGATAGGA	Somers DJ (2004)
barc70	7A	F_GCGAAAAACGATGCGACTCAAAG R_GCGCCATATAATTCAGACCCACAAAA	Somers DJ (2004)

4.8 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza a agarózová elektroforéza

Produkty PCR byly separovány v polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu. V 1,5% agarózovém gelu v horizontálním uspořádání byly separovány pouze produkty z DNA markeru Vrn1A_F4R4. Ostatní PCR produkty byly separovány v 3,5% nebo 6% nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu ve vertikálním uspořádání (Tabulka 2).

4.8.1 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza

Pro separaci vzorků byla použita 3,5% nebo 6% nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza. Před přípravou polyakrylamidového gelu bylo sklo silanizováno 3 µl 3-methakryloxypropyl-trimethoxysilanem v 1 ml 0,5% kyseliny octové a 96% ethanolu.

3,5% polyakrylamidový gel byl připraven smícháním 15 ml 5× TBE, 15 ml 40% směsi akrylamid:N,N´-metylenbisakrylamidu v poměru 19:1, 100 µl TEMED, 1 ml 1% peroxodisíranu amonného a doplněno do 150 ml vodou. Gel polymerizoval 45 min při pokojové teplotě. Připravený gel byl umístěn do vertikální elektroforetické aparatury a saturován 10 µl 10% ethidiem bromidu (Sigma Chemical CO., USA) 1,5 hod při 300 V. Po nanesení vzorků a velikostního markeru GeneRuller 100 bp (Fermentas, Kanada) probíhala elektroforéza 1 - 2 hod při 350 V v 0,5× pufru TBE. Separované DNA fragmenty byly vizualizovány a vyfoceny dokumentačním zařízením ChemiGenius BioImagine systém (Syngene, UK).

6% polyakrylamidový gel byl připraven smícháním 15 ml 5× TBE, 22,5 ml 40% směsi akrylamid:N,N´-metylenbisakrylamidu v poměru 19:1, 100 µl TEMED, 1 ml 1% peroxodisíranu amonného a doplněno do 150 ml vodou. Gel polymerizoval 45 min při pokojové teplotě. Připravený gel byl umístěn do vertikální elektroforetické aparatury a saturován 10 µl 10% ethidiem bromidu (Sigma Chemical CO., USA) 2 - 3 hod při 300 V. Po nanesení vzorků a velikostního markeru GeneRuller 100 bp (Fermentas, Kanada) probíhala elektroforéza 1 - 2 hod při 350 V v 0,5× pufru TBE. Separované DNA fragmenty byly vizualizovány a vyfoceny dokumentačním zařízením ChemiGenius BioImagine systém (Syngene, UK).

4.8.2 Agarózová elektroforéza

Pro agarózovou elektroforézu byl použit 1,5% agarózový gel. Gel polymerizoval 60 min při pokojové teplotě. Na gel bylo naneseno 5 µl vzorku a velikostní marker (60 ng, GeneRuller 100 bp, DNA Ladder Plus, Fermentas, Kanada). Elektroforéza probíhala

v elektroforetické aparatuře po dobu 75 min při 120 V v 0,5× pufru TBE. Následně byl gel obarven v roztoku 0,002% ethidia bromidu po dobu přibližně 30 min. Separované DNA fragmenty byly vizualizovány a vyfoceny dokumentačním zařízením ChemiGenius BioImagine systém (Syngene, UK).

4.9 Zpracování získaných dat – QTL analýza

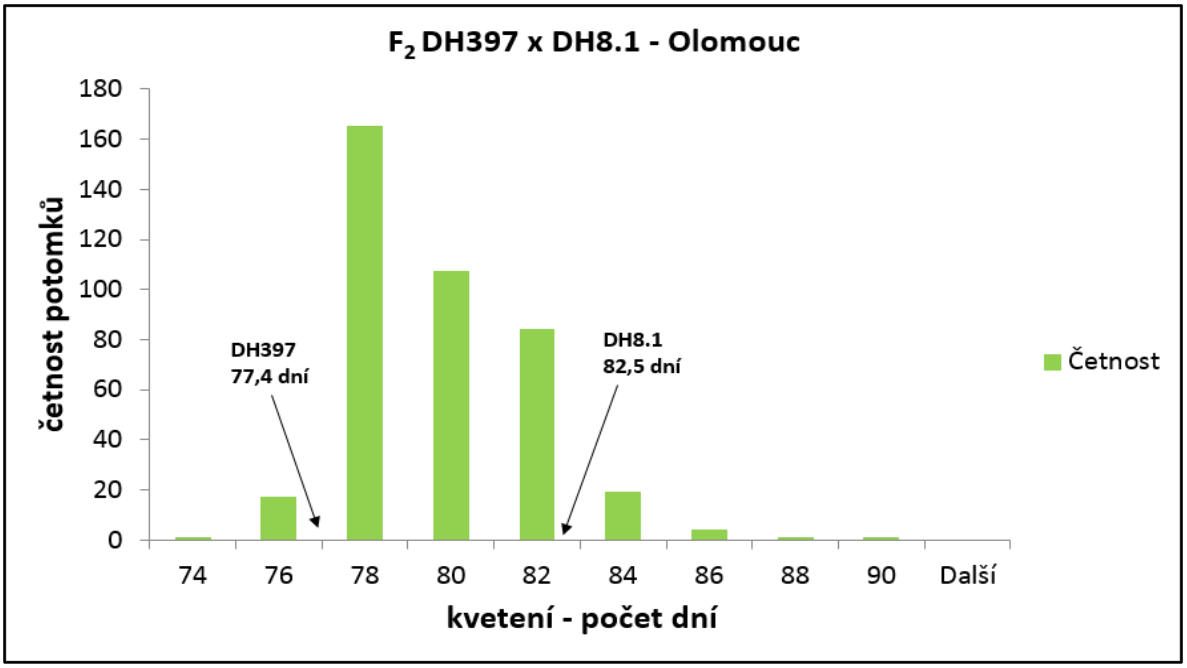
Genotypizace byla provedena na základě dat získaných separací produktů PCR jednotlivých markerů, kde byl na základě souborů získaných dokumentačním systémem ChemiGenius BioImagine systém (Syngene, UK) identifikován délkový polymorfizmus. U rodičovských linií byla identifikována délka amplikonů. Následně byli genotypováni jednotliví jedinci mapovací populace F_2, přičemž heterozygotní jedinci byli označeni H, jedinci s alelou rodičovské linie DH397 byli označeni A a jedinci s alelou DH81 byli označeni B. Výsledky byly zapisovány do tabulky v počítačovém programu *Microsoft Office Excel 2013*. Výsledky fenotypování byly statisticky zpracovány ve stejném programu. Následným krokem byla QTL analýza získaných dat prostřednictvím počítačového programu Map Manager QTX verze b16 (Manly *et al.*, 2001). Asociace markeru s fenotypem byla determinována prostřednictvím regresní analýzy. Prahová hodnota určující významnost daného markeru - *Likelihood ratio statistic* (LRS) - byla identifikována pro každý marker, přičemž byla určena pro tři kategorie, které rozdělují lokusy na základě pravděpodobnosti zodpovědnosti za sledovaný fenotypový znak: vysoce signifikantní (< 0,0001), signifikantní (< 0,001) a domnělý (< 0,05).

5 VÝSLEDKY

V souladu se zadanými cíli práce byly identifikovány lokusy zodpovědné za rozdíl v době kvetení v rámci mapovací populace F_2. Samotné identifikaci lokusů předcházela charakterizace populace na genotypové a fenotypové úrovni následovaná statistickou analýzou dat a QTL analýzou. Jednotlivými částečnými výsledky se budou zaobírat tři samostatné podkapitoly, kde budou charakterizovány výsledky genotypizace, fenotypizace a závěrečná QTL analýza.

5.1 Fenotypování mapovací populace F_2

Sledovaným fenotypickým znakem u mapovací populace F_2 byla doba kvetení. Determinace doby kvetení je založena na identifikaci času metání. Počet dní uplynulých do metání byl využit k statistické charakterizaci mapovací populace a QTL analýze. Analýzou průměrné doby kvetení rodičovských linií byl identifikován signifikantní rozdíl v kvetení – 5,5 dne ($P < 0,05$). Linie DH397 (77,4 ± 6,8) kvetla dříve než linie DH81 (82,5 ± 3,25). Doba kvetení jedinců mapovací populace F_2 se pohybovala v intervalu 76 – 89 dní. Histogram získaný zpracováním fenotypových údajů mapovací populace je uveden v Grafu 1. Průměrná doba kvetení jedinců byla 79,2 dní. Modus (hodnota s nejvyšší četností) byl 78. Medián (prostřední hodnota) populace byla 79. Směrodatná odchylka byla rovna 2,1 dne.

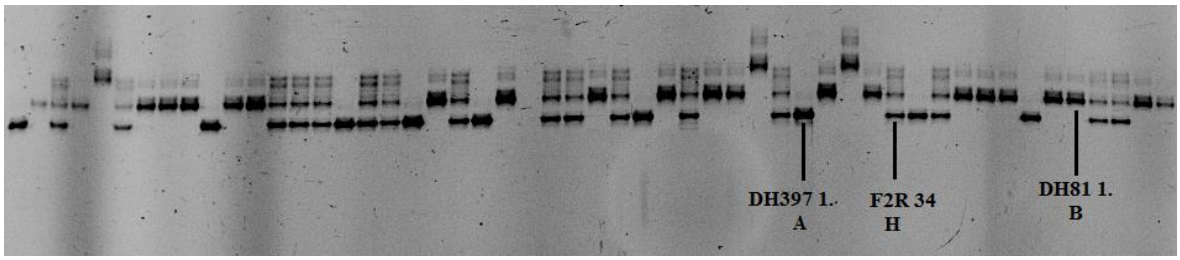


Graf 1: Distribuce času kvetení jedinců mapovací populace F_2 a rodičovských linií. Na ose x je uveden počet dní od ponoření semen do vody po metání. Na ose y je uvedena četnost potomků s pozorovaným fenotypovým znakem. Průměrný čas kvetení rodičovských linií je označen šipkou. DH397 kvetl v průměru za 77,4 dní po zasetí, DH81 za 82,5 dní.

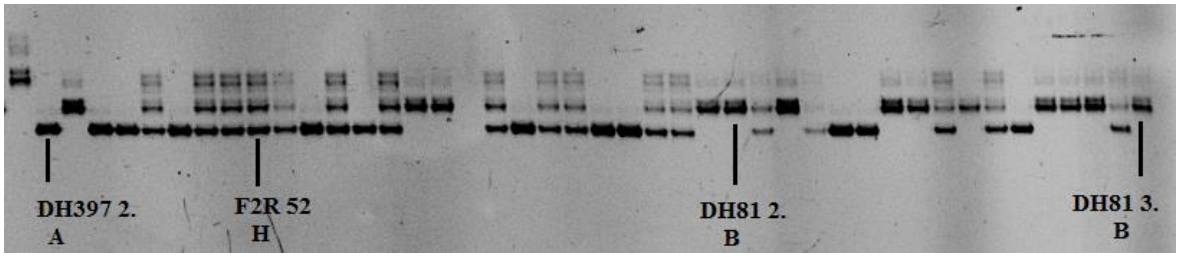
5.2 Genotypování mapovací populace F_2

Genotypování jedinců mapovací populace F_2 byla provedena prostřednictvím jedenácti markerů DNA. Z celkového počtu byl mezi rodičovskými liniemi identifikovaný délkový polymorfizmus u osmi markerů nacházejících se na chromozomech 1A, 1B, 5B, 5A a 7A. Tři DNA markery (*gwm382*, *gwm71* a *owm82*), lokalizovány na chromozomech 2AL, 2AS a 4A, nebyly polymorfní mezi rodičovskými liniemi, a tedy nebyly využity pro genotypování jedinců mapovací populace F_2. Všechny polymorfní markery byly kodominantní, a tedy byla možná identifikace heterozygotních jedinců v mapovací populaci. Prostřednictvím genotypování byla určena přítomnost jednotlivých introgresí u jednotlivých jedinců mapovací populace F_2. Na obrázcích 4a a 4b je zobrazen délkový polymorfizmus SSR markeru *psp3151* na jedincích mapovací populace F_2.

Údaje získané z genotypování jedinců mapovací populace F_2 byly zaznamenány v přehledné genotypové tabulce, kde byl genotyp rodiče DH397 označen jako A, genotyp rodiče DH81 jako B. Heterozygotní genotyp byl označen písmenem H.



4a



4b

Obrázek 4: Analýza délkového polymorfizmu kodominantního SSR markeru *psp3151* prostřednictvím 6% nedenaturující polyakrylamidové elektroforézy. Na obrázcích 4a a 4b jsou výsledky separace PCR produktů získaných amplifikací markeru *psp3151* na jedincích mapovací populace F_2. Jsou zde označeny genotypy rodičovských linií DH397 (A) a DH81 (B), kdy bylo využito celkem pět rodičovských linií DH397 a tři rodičovské linie DH81. Příklad heterozygotního genotypu (H) je vyznačen u potomků F2R 34 a F2R 52.

5.3 QTL analýza

Quantitative Trait Loci (QTL) analýza spočívala ve statistickém zpracování dat získaných z fenotypování a genotypování. Analýza byla provedena v programu MapManager QTX verze b16 (Manly *et al.*, 2001). Pro identifikaci markerů, které byly asociovány s analyzovaným fenotypem, byla provedena regresní analýza. Regresní analýza umožňuje určení pravděpodobnosti, s jakou je určitý marker DNA zodpovědný za pozorovaný fenotypový projev znaku. Výsledky regresní analýzy pro markery využité při genotypové charakterizaci mapovací populace jsou uvedeny v Tabulce 6. Prostřednictvím regresní analýzy byly identifikovány čtyři markery (Tabulka 6), které byly signifikantně ($P < 0,001$) asociovány s analyzovaným fenotypem, a tedy byly zodpovědné za identifikovaný fenotypový rozdíl v době kvetení. Markery *Vrn1A_F4R4* a *cfa2155* ($P < 0,0001$) byly lokalizovány na chromozomu 5A. Markery *psp3050* ($P < 0,0009$) a *wmc283* ($P < 0,0001$) byly lokalizovány na chromozomu 7A. Statisticky nejvýznamnější byl marker *cfa2155*, který měl 27% podíl na vzniku pozorovaného fenotypového rozdílu (Tabulka 6). 25% podíl fenotypového projevu bylo spojeno s markerem *Vrn1A_F4R4*.

Tabulka 6: Výsledky regresní analýzy provedené v programu MapManager QTX b16 (Manly *et al.*, 2001). V tabulce jsou zobrazeny výsledky regresní analýzy pro jednotlivé markery: P hodnota (P), procentuální podíl daného lokusu pro analyzovaný fenotypový rozdíl (%) a hodnota LRS. Prahové hodnoty LRS pro daný experiment byly: vysoce signifikantní 18,3 ($P < 0,0001$), signifikantní 9,3 ($P < 0,001$) a domnělý 3,1 ($P < 0,05$). Lokusy, které ovlivňovaly fenotyp s vysokou signifikancí, jsou vyznačeny tučným písmem.

Chromozom	Lokus	LRS	%	P
1A	psp3151	3,5	1	0,17238
1B	psp3000	0,3	0	0,86268
5B	gwm213	1,1	0	0,59032
5A	**Vrn1A_F4R4**	**97,5**	**25**	**<0,0001**
5A	**cfa2155**	**119,7**	**27**	**<0,0001**
7A	psp3050	14	4	0,0009
7A	**wmc283**	**20,5**	**5**	**<0,0001**
7A	barc70	1,1	0	0,58537

6 DISKUZE

Flexibilita a schopnost přizpůsobit iniciaci generativního stádia vnějším podmínkám umožnily pšenici růst v nejrůznějších environmentálních podmínkách. Determinace optimálních podmínek času kvetení je predominantně umožněno alelickými variantami ve vernalizačních (*VRN*) a fotoperiodických (*PPD*) genech. Jednotlivé alelické varianty tak umožnily kvetení v oblastech s různou délkou dne a různým teplotním režimem, a tedy rozšíření pšenice do různých zeměpisných šířek a délek.

Vhodný čas kvetení umožní rostlině např. využívat vyhovující podmínky ze začátku jara během krátkého dne, resp. vyhnout se suchému a teplému létu, které by mohlo vést ke snížení reprodukčního „fitness“ a v případě hospodářsky významných plodin tak výnosů. Studium procesu kvetení a identifikace nových genů a alel už známých genů je důležitým krokem ke šlechtění nových variet, které budou schopny přizpůsobit čas kvetení lokálním mikroklimatickým podmínkám.

V současné době je snaha při hledání nových vhodných alel využívat plané pšenice a krajové odrůdy, které si zachovaly původní variabilitu. V této práci byla využita mapovací populace obsahující introgrese z tetraploidní jarní odrůdy *Triticum militinae* (AAGG). Tato odrůda je potenciálním zdrojem nových alel. Tento předpoklad byl potvrzen determinací nového genu rezistence vůči padlí (*Blumeria graminis*) (Jakobson *et al.*, 2006 a 2012).

V rámci bakalářské práce byly na chromozomech 5A a 7A identifikovány lokusy, které byly zodpovědné za rozdíly v době kvetení v mapovací populaci F_2.

Lokus v největší míře zodpovědný za rozdíl ve kvetení se nacházel na chromozomu 5A v blízkosti genu *VRN-A1*. Tento gen má vliv na iniciaci kvetení a je součástí vernalizační dráhy (Yan *et al*., 2003; Shitsukawa *et al.*, 2007). Ivaničová *et al.* (2016) identifikovali lokus ovlivňující kvetení ve stejné pozici, přičemž při jeho identifikaci využili DH mapovací populaci, součástí které byly i linie DH397 a DH81 využité v této práci. Sekvenční analýzou genu *VRN-A1* identifikovali rozdíly v promotorové oblasti a v oblasti prvního intronu mezi rodičovskými liniemi. Alela přítomna u DH81 byla nazvána *VRN-A1f-like* kvůli podobnosti s alelou *VRN-A1f* identifikovanou v předchozí studii (Golovnina *et al.*, 2010). *Vrn-A1f-like* byla charakteristická inzercí neautonomního transpozónu MITE (*miniature inverted-repeats transposable element*) o velikosti 433 bp v oblasti prvního intronu. Dále byla identifikována 2753 bp delece. Linie Tähti - rekurentní rodičovská linie - byla charakteristická přítomností alely *Vrn-A1a* s inzercí *Spring foldback elementu* v promotorové oblasti (Yan *et al.*, 2004a;

Ivaničová *et al.,* 2016). V předchozích studiích byly identifikovány regulační elementy, které byly přítomny právě v promotorové oblasti a oblasti prvního intronu. Jejich narušení mělo vliv na dobu kvetení (Yan *et al.*, 2004a; Fu *et al.*, 2005; Dubcovsky *et al.*, 2006; Milec *et al.*, 2012). Právě z toho důvodu bylo zpoždění v době kvetení, identifikováno v této studii, zřejmě způsobeno přítomnosti alely *VRN-A1f-like*.

Ivaničová *et al.* (2016) využili ve své studii mapovací populaci F_2 se stejným původem, jako je původ mapovací populace využité v experimentální části bakalářské práce (v publikaci je označená jako VMP1). Mapovací populace analyzována v této práci se však lišila počtem jedinců (o 201 více) a sezónou, ve které byl fenotyp analyzován (sezóna 2014 – Ivaničová *et al.*, 2016; sezóna 2015 – tato práce). Rozdíl v době kvetení mezi rodičovskými liniemi byl pozorován v obou experimentálních studiích. Ve studii Ivaničová *et al.* (2016) byl identifikován rozdíl 6,5 dne mezi rodičovskými liniemi DH397 a DH81, v této práci byl rozdíl 5,5 dne. V obou případech byl rodič DH81 pozdnější. Odlišné rozpětí kvetení bylo způsobeno vlivem environmentálních podmínek (změny v teplotě a vlhkosti během vegetačního období) v sezónách 2014 nebo 2015. Podobný vliv environmentálních podmínek byl pozorován i při analýze mapovací populace F_3 (*T. aestivum* kultivar Mooni × DH81), kde byl identifikován rozdíl v kvetení mezi rodičovskými liniemi 9,8 dní v Olomouci a 29,9 dní v Tallinnu (Ivaničová *et al.*, 2016).

Identifikovaný lokus na chromozomu 5A byl zodpovědný za 27 % sledovaného fenotypového projevu. U mapovací populace VMP1 byl odpovědný za rozdíly v době kvetení z 9 % (Ivaničová *et al.*, 2016). Tento rozdíl v ovlivnění kvetení je způsoben zřejmě tím, že v bakalářské práci bylo pro genotypování použito celkem osm markerů DNA, zatímco ve výše zmíněné studii až 24, což umožnilo přesnější určení vlivu daného lokusu na kvetení.

Další lokus, který měl vliv na dobu kvetení, byl identifikován na chromozomu 7A. Jeho vliv na kvetení byl v menší míře než lokus na chromozomu 5A. Kvetení v mapovací populaci ovlivňoval z 5 % ($P < 0,0001$). Ve studii Ivaničová *et al.* (2016) v rámci mapovací populace DH, která zahrnovala všech 314 dihaploidních linií, byl tento lokus také vyhodnocen jako statisticky významný. Nicméně v mapovací populaci VMP1 nebyl efekt tohoto lokusu na kvetení identifikován. Jak již bylo řečeno, mapovací populace v této práci a ve studii Ivaničové *et al.* (2016) vznikla ze stejného křížení, ale lišila se v počtu jedinců. Velikost populace má vliv na detekci QTL. Při zvýšeném počtu potomků je vyšší rozlišení

a mohou tak být identifikovány lokusy, které by při sníženém počtu potomků nebyly určeny jako statisticky významné (Vinod, 2010). Právě to mohlo být důvodem, že v mapovací populaci využité v této práci byl tento lokus vyhodnocen jako statisticky významný ($P < 0{,}0001$). Na krátkém rameni chromozomu 7A se nachází gen *VRN3*, který hraje významnou roli v iniciaci kvetení. Je to integrátor vernalizačních a fotoperiodických signálů (Yan *et al.*, 2006; Bonnin *et al.*, 2008). Dominantní alela genu *VRN3* je charakteristická vyšší expresí, která vede k dřívějšímu kvetení. Zvýšená exprese je spojena s inzercí retroelementu do promotoru *VRN3* (Yan *et al.*, 2006). Zdali se identifikovaný lokus nachází ve vazbě s genem *VRN3* není potvrzeno, protože daný marker nebyl v rámci této práce při genotypování použit. Také je možné, že se v daném lokuse nachází nový, dosud neidentifikovaný gen, který má minoritní efekt na kvetení.

Analýzou mapovací populace F_2 byly identifikovány lokusy na chromozomech 5A a 7A, které byly zodpovědné za identifikovaný fenotypový rozdíl. Introgrese z jarní odrůdy *T. militinae* v této populaci tedy měly vliv na čas kvetení. Lokus 5A (spojován s genem *VRN1*) ovlivňoval kvetení v nejvyšší míře (27 %). Lokus na chromozomu 7A se také podílel na fenotypovém projevu dané populace. Jeho efekt na sledovaný fenotypový znak byl však menší (5 %). Dalším krokem pro přesnou identifikaci genů zodpovědných za kvetení bude vytvoření vyššího stupně mapovací populace, která poskytne vyšší rozlišení a umožní identifikaci lokusů ovlivňující kvetení v užším intervale a přesnou identifikaci genů ovlivňující kvetení.

7 ZÁVĚR

Schopnost regulovat dobu kvetení je pro rostlinu důležitou vlastností. Má vliv na její reprodukci a v případě hospodářských plodin na jejich výnos. V této práci byla analyzována mapovací populace F_2, která vznikla reciprokým křížením dihaploidních rodičovských linií DH81 a DH397 a následným samosprášením. Linie DH81 vznikla dihaploidizací linie 8.1, která obsahovala introgrese z tetraploidní jarní odrůdy *T. militinae*. Jedná se o planý druh, který by mohl být zdrojem nových genů nebo alel ovlivňující čas kvetení. Cílem práce bylo identifikovat pomocí QTL analýzy lokusy mající vliv na pozorovaný fenotypový projev znaku v dané populaci – dobu kvetení. Pro provedení QTL analýzy byla potřebná data z fenotypizace a genotypizace. Fenotypizací byl zjišten průměrný rozdíl v době kvetení mezi rodičovskými liniemi - 5,5 dne. Čas kvetení u potomků se pohyboval v rozmezí 76 - 89 dny. Z celkových osmi markerů DNA, použitých při genotypizaci, byly určeny čtyři, které se podílely na vzniku fenotypu ($P < 0,001$). Dva markery byly lokalizovány na chromozomu 5A. Na tomto chromozomu se nachází gen *VRNA1*, který je důležitý pro proces kvetení u pšenice. Další markery byly lokalizovány na chromozomu 7A, kde se nachází gen *VRN3*. Tento gen také ovlivňuje kvetení a je neméně důležitý. Lokus na chromozomu 7A ovlivňoval kvetení v menší míře, než lokus na chromozomu 5A. Zda lokus identifikovaný pomocí QTL na 7A je ve vazbě s genem *VRN3* není potvrzeno.

Optimální čas kvetení je důležitý pro výnos zemědělských plodin. V současné době je snaha porozumět procesu kvetení, a tím identifikovat nové geny, nebo alely již známých genů zapojených v tomto procesu. Alelelické varianty lze využívat při šlechtění nových variet, které budou lépe přizpůsobeny lokálním podmínkám prostředí. Důvodem získání výhodnějších variet je nepřetržitý růst lidské populace a pokrytí zvyšující se spotřeby zemědělských plodin.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Andrés, F., Coupland, G. (2012): The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. Nature Reviews Genetics, Vol. 13: 627 – 639

Andrés, F., Porri, A., Torti, S., Mateos, J., Romera-Branchat, M., García-Martínez, J. L. *et al.* (2014): SHORT VEGETATIVE PHASE reduces gibberellin biosynthesis at the *Arabidopsis* shoot apex to regulate the floral transition. Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 111: 2760 - 2769

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

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

Bonnin, I., Rousset, M., Madur, D., Sourdille, P., Dupuits, C., Brunel, D., Goldringer, I. (2008) FT genome A and D polymorphisms are associated with the variation of earliness components in hexaploid wheat. Theor Appl Genet, Vol. 116: 383 – 394

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

Campoli, CH., Drosse, B., Searle, I., Coupland, G., Korff, M. (2012): Functional characterisation of *HvCO1*, the barley (*Hordeum vulgare*) flowering time ortholog of *CONSTANS*. The Plant Journal, Vol. 69: 868 - 880

Clarke, J. H., Dean, C. (1994): Mapping *FRI*, a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana*. Molecular and General Genetics, Vol. 242: 81 – 89

Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan., Q., Searle, I., a kol. (2007): FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of *Aranidopsis*. Science, Vol. 316, 1030 - 1033

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

Distelfeld, A., Li, C., Dubcovsky J. (2009a): Regulation of flowering in temperate cereals. Current Opinion Plant Biology, Vol. 12: 178 - 184

Distelfeld, A., Tanquilli, G., Li, Ch., Yan, L., Dubcovsky, J. (2009b): Genetic and Molecular Characterization of the *VRN2* Loci in Tetraploid Wheat. Plant Physiology, Vol. 149, pp. 245 - 257

Doi, K., Izawa, T., Fuse, T., Yamanouchi, U., Kubo, T., Shimatani, Z., Yano, M., Yoshimura, A. (2004): *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT*- like gene expression independently of *Hd1*. Genes & Development, Vol. 18: 926 – 936

Dubcovsky, J., Dvorak, J. (2007): Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat Under Domesticiation. Science, Vol. 316, 1862 – 1865

Dubcovsky, J., Chen, Ch., Yan, L. (2005): Molecular characterization of the allelic variation at th *VRN-H2* vernalization locus in barley. Molecular Breeding. Vol. 15: 395 - 407

Dubcovsky, J., Lijavetzky, D., Appendino, L., Tranquilli, G. (1998): Comparative RFLP mappin of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. Theor Appl Genet 97: 968 – 975

Dubcovsky, J., Loukoianov, A., Fu, D., Valarik, M., Sanchez A., Yan, L. (2005): Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2*. Plant Molecular Biology 60: 469 – 480

Eriksson, S., Böhlenius, H., Moritz, T., Nilsson, O. (2006): GA_4 Is the Active gibberellin in the Regulation of *LEAFY* Transcription and *Arabidopsis* Floral Initiation. The Plant Cell, Vol. 18: 2172 – 2181

Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., Yanofsky, M. F. (2000): Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUIFULLI*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. Development 127, 725 – 734.

Fitzgerald, M. A., McCouch, S. R., Hall, R. D. (2009): Not just a grain of rice: the quest for quality. Trends in Plant Science, Vol. 14: 133 - 139

Fornara, F., Panigrahi, K. C. S., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Rühl, M., Jarillo, J. A., Coupland, G. (2009). *Arabidopsis* DOF Transcription Factors Act Redundantly to Reduce *CONSTANS* Expression and Are Essential for a Photoperiodic Flowering Response. Development Cell, Vol. 17: 75 - 86

Fu, D., Szűcs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J. S., Zitzewitz, J., Hayes, P. M., Dubcovsky, J. (2005): Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. Molecular Genetics and Genomics, Vol. 273: 54 – 65

Gazzani, S., Gendall, A. R., Lister, C., Dean, C. (2003): Analysis of the Molecular Basis of Flowering Time Variation in Arabidopsis Accessions. Plant Physiology, Vol. 132: 1107 - 1114

Gill, B. S., Appels R., Botha-Oberholster, A. M., Buell, C. R., Bennetzen, J. L., Chalhoub, B. Chumley, F. *et al*. (2004): A Workshop Report on Wheat Genome Sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. Genetics 168: 1087 – 1096

Golovnina, K. A., Kondratenko, E. Y., Blinov, A. G., Goncharov, N. P. (2010): Molecular characterization of vernalization loci VRN1 in wild and cultivated wheats. BMC Plant Biology; 10:168

Harlan, J.R., Zohary, D. (1966): Distribution of wild wheats and barley. *Science*. 153 (3740), 1074-1080.

Hayama, R., Yokoi, S., Tamaki, S., Yano, M., Shimamoto, K. (2003): Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. Nature, Vol. 422: 719 – 722

Hemming, M. N., Peacock, W. J., Dennis, E. S., Trevaskis, B. (2008): Low-Temperature and Daylength Cues Are Integrated to Regulate *FLOWERING LOCUS T* in Barley. Plant Physiology, Vol. 147: 355 – 366

Charmet, G. (2011): Wheat domestication: Lessons for the future. C. R. Biologies 334: 212 – 2011

Chen, A., Dubcovsky, J. (2012): Wheat TILLING Mutants Show That the Vernalization Gene *VRN1* Down-Regulates the Flowering Repressor *VRN2* in Leaves but Is Not Essential for Flowering. PLOS Genetics, Volume 8, Issue 12

Choulet, F *et al.* (2014): Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science*, 345(6194), 1249721

International Barley Genome Sequencing Consortium. "A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome." *Nature* 491.7426 (2012): 711-716.

Itoh, H., Nonoue, Y., Yano, M., Izawa, T. (2010): A pair of floral regulators sets critical day length for *Hd3a* florigen expression in rice. Nature Genetics, Vol. 42: 635 – 639

Ivaničová *et al.* (2016): Characterization of new allele influencing flowering time in bread wheat introgressed from *Titicum militinea*. New Biotechnology

Jakobson, I., Peusha, H. *et al.* (2006): Adult plant and seedling resistance to powdery mildew in a *Triticum aestivum* × *Triticum militinae* hybrid line. Theor Appl Genet, Vol. 112: 760 – 769

Jakobson, I., Reis, D., Tiidema, A. *et al*. (2012): Fine mapping, phenotypic characterization and validation of non-race-specific resistance to powdery mildew in a wheat – *Triticum militinae* introgression line. Theor Appl Genet, Vol. 125: 609 - 623

Jaeger, K. E., Wigge, P.A. (2007): FT Protein Acts as a Long-Range Signal in *Arabidopsis*. Current Biology 17, 1050 – 1054

Kamran, A., Iqbal, M., Spaner, D. (2014): Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. Euphytice 197: 1 – 26

Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M *et al.* (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature.* 408(6814), p.796-815

Khlestkina, E. K., Giura, A., Röder, M. S., Börner, A. (2009): A new gene controlling the flowering response to photoperiod in wheat. Euphytica, Vol. 165: 579 - 585

Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T., Yano, M. (2002): *Hd3a*, a Rice Ortholog of the *Arabidopsis FT* Gene, Promotes Transition to Flowering Downstream of *Hd1* under Short-Day Conditions. Plant and Cell Physiology, Vol. 43: 1096 - 1105

Komiya, R., Ikegami, A., Tamaki, S., Yokoi, S., Shimamoto, K. (2008): *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. Development, Vol. 135: 767 – 774

Laurie, D. A., Pratchett, N., Bezant, J. H., Snape, J. W. (1994): Genetic analysis of a photoperiod response gene on the short arm of chromosome 2 (2H) of *Hordeum vulgare* (barley). Heredity, Vol. 72: 619 - 627

Laurie, D. A., Pratchett, N., Snape, J. W., Bezant, J. H. (1995): RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in a winter x spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. Genome, Vol. 38: 575 - 585

Law, C. N., Sutka, J., Worland, A. J. (1978): A genetic study of day-length response in wheat. Heredity, Vol. 41: 185 - 191

Lee, I., Aukerman, M. J., Gore, S. L., Lohman, K. N. *et al*. (1994): Isolation of *LUMINIDEPENDENS*: a Gene Involved in the Control of Flowering Time in Arabidopsis. American Society of Plant Physiologists, Vol. 6: 75 - 83

Lewis, S., Faricelli, M. E., Appendino, M. L., Valárik, M., Dubcovsky, J. (2008): The chromosome region including the earliness per se locus *Eps-A^{m}1* affects the duration of early developmental phases and spikelet number in diploid wheat. Journal of Experimental Botany, Vol. 59, No. 13: 3595-3607

Li, Cj., Dubcovsky, J. (2008) Wheat FT protein regulates *VRN1* transcription through interactions with FDL2. The Plant Journal, Vol. 55: 543 - 554

Li, Ch., Distelfeld, A., Comis, A., Dubcovsky, J. (2011): Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. The Plant Journal, Vol. 62: 763 - 773

Loukoianov, A., Yan, L., Blechl, A., Sanchez, A., Dubcovsky, J. (2005): Regulation of *VRN-1* Vernalization Genes in Normal and Transgenic Polyploid Wheat. Plant Physiology, Vol. 138: 2364 – 2373

Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lister, C., Schmidt, R., Love, K *et al.* (1994): *FCA*, a Gene Controlling Flowering Time in Arabidopsis, Encodes a Protein Containing RNA-Binding Domains. Cell, Vol. 89: 737 – 745

Manly, K. F., Cudmore, R. H., Meer, J. M. (2001): Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. Mammalian Genome, Vol. 12: 930 - 932

Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F., Schmid, M. (2007): Export of FT Protein from Phloem Companion Cells Is Sufficient for Floral Induction in *Arabidopsis*. Current Biology 17, 1055 – 1060

Michaels, S. D., Amasino, R. M. (1999): *FLOWERING LOCUS C* Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering. The Plant Cell, Vol. 11: 949 – 956

Milec, Z., Tomková, L., Sumíková, T., Pánková, K. (2012): A new multiplex PCR test for the determination of *Vrn-B1* alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Molecular breeding, Vol. 30: 317 - 323

Milec, Z., Valárik, M., Bartoš, J., Šafář, J. (2014): Can a late bloomer become an early bird? Tools for flowering time adjustment. Biotechnology Advances, Vol. 32: 200 – 214

Mohler, V., Lukman, R., Ortiz-Islas, S., William, M., *et al.* (2004): Genetic and physical mapping of photoperiod insensitive gene *Ppd-B1* in common wheat. Euphytica, Vol. 138: 33-40

Moon, J., Suh, S. S., Lee, H., Choi, K. R., Hong, Ch. B., Paek, N. Ch., Kim, S. G., Lee, I. (2003): The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. The Plant Journal, Vol. 36: 613 – 623

Muterko, A., Balashova, I., Cockram, J., Kalendar, R., Sivolap, Y. (2014): The New Wheat Vernalization Response Allele *Vrn-D1s* is Caused by DNA Transposon Insertion in the First Intron. Plant Molecular Biology Reporter, Vol. 33: 294 – 303

Nitcher, R., Distelfeld, A., Tan, Ch., Yan, L., Dubcovsky, J. (2013): Increased copy number at the *HvFT1* locus is associated with accelerated flowering time in barley. Molecular Genetics and Genomics, Vol. 288: 261 - 275

Ogiso-Tanaka, E., Matsubara, K., Yamamoto, S., Nonoue, Y., Wu, J. *et al.* (2013): Natural Variation of the *RICE FLOWERING LOCUS T 1* Contributes to Flowering Time Divergence in Rice. PloS One, 8(10), e75959

Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J *et al.* (1998): Fyziologie rostlin, Academia Praha, ISBN 80-200-0568-2

Pugsley, AT (1966): The photoperiodic sensitivity of some spring wheats with special reference to the variety thatcher. Australian Journal of Agricultural Research, Vol. 17: 591 – 599

Roder, M. S. *et al.* (1998) A microsatellite map of wheat Genetics 149:2007-2023

Sasani, S., Hemming, M. N., Oliver, S. N. *et al.* (2009): The influence of vernalization and daylength on expression of flowering-time genes in the shoot apex and leaves of barley (*Hordeum vulgare*). Journal of Experimental Botany, Vol. 60: 2169 - 2178

Sawa, M., Nusinow, D. A., Kay, S. A., Imaizumi, T. (2007): FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. Science, Vol. 318: 261 – 265

Shitsukawa, N., Ikari, CH., Shimada, S., Kitagawa, S., Sakamoto, K. *et al.* (2007): The einkorn wheat (*Triticum monococcum*) mutant, maintained vegetative phase, is caused by a deletion in the *VRN1* gen. Genes & Genetic Systems, Vol. 82: 167 - 170

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 th National Academy of Science, Vol. 97: 3753 - 3758

Shrestha, R., Gómez-Ariza, J., Brambilla, V., Fornara, F. (2014): Molecular control of seasonal flowering in rice, arabidopsis and temperate cereals. Annals of Botany, Vol. 114: 1445 – 1458

Somers, D. J. *et al.* (2004) A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (Triticum aestivum L.) Theoretical and Applied Genetics 109:1105-1114

Sourdille, P. *et al.* (2001) Improvement of the genetic maps of wheat using new microsatellite markers. Plant & Animal Genome IX Abstracts 167

Stephenson, P. *et al.* (1998) Fifty new microsatellite loci for the wheat genetic map. Theoretical and Applied Genetics 97:946-949

Takahashi, R., Yasuda, S. (1971): Genetics of earliness and growth habit in barley. In: Nilan RA (ed) Proceedings of the 2nm International Barley Genetics Symposium. Washington Steta University Press, Washington, pp 388 - 408

Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T. *et al.* (2011): 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. Nature, Vol. 476: 332 - 335

Tranquilli, G., Dubcovsky, J. (2000): Epistatic Interaction Between Vernalization Genes *Vrn-A^{m}1* and *Vrn-A^{m}2* in Diploid Wheat. The Journal of Heredity, 91: 304 - 306

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, Vol. 140: 1397 - 1405

Tsuji, H., Nakamura, H., Taoka, K., Shimamoto, K. (2013): Functional Diversification of FD Transcription Factors in Rice, Components of Florigen Activation Complexes. Plant Cell Physiol., Vol. 54: 385 - 397

Tsuji, H., Taoka, K., Shimamoto K. (2011): Regulation of flowering in rice: two florigen genes, a complex gene network, and natural variation. Current Opinion in Plant Biology, Vol. 14: 45 – 52.

Turner, A., Beales, J., Faure, S., Dunford, R. P., Laurie, D. A. (2005): The Pseudo-Response Regulator *Ppd-H1* Provides Adaptation to Photoperiod in Barley. Science, Vol. 310: 1031 – 1034

Vinod, K. K. (2010): Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Short term training course on „Application of AFLP and SSR markers in crop improvement.*

Welsh, J. R., Klein, D. L. Pirastech, B., Richards, R. D. (1973): Genetic control of photoperiod response in wheat. In: E.R: Sears & L.M.S. Sears (Eds.), Proceedings of the 4th International Wheat Genetics Symposium, pp. 879 – 884

Wilhelm, E. P., Turner, A. S., Laurie, D. A. (2009): Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.). Theor Appl Genet, Vol. 118: 285 – 294

Xue, W., Xing, Y., Weng, X., Zhao, Y., Tang, W., Wang, L., Zhou, H., Yu, S., Xu, C., Li, X., Zhang, Q. (2008): Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. Nature Gentics, Vol. 40: 761 - 767

Yamamoto, T., Kuboki, Y., Lin, S. Y., Sasaki, T., Yano, M. (1998): Fine mapping of quantitative trait loci *Hd-1*, *Hd-2* and *Hd-3*, controlling heading of rice, as single Mendelian factors. Theoretical and Applied Genetics, Vol. 97: 37-44

Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, G., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S., Dubcovsky, J. (2006): The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. The National Academy of Science of the USA 103 (51): 19581 – 19586

Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherma, J., Dubcovsky, J. (2004a): Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. Theor Appl Genet, Vol. 109: 1677 - 1686

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

Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., SanMiguel, P., Bennetzen, J. L., Echenique, V., Dubcovsky, J. (2004b): The Wheat *VRN2* Gene Is a Flowering Repressor Down-Regulated by Vernalization. Science, Vol. 303: 1640 – 1644

Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L., Fuse, T. *et al.* (2000): *Hd1*, a Major Photoperiod Sensitivity Quantitative Trait Locus in Rice, Is Closely Related to the Arabidopsis Flowering Time Gene *CONSTANS.* The Plant Cell, Vol. 12: 2473 – 2483

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

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

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

bp pár bazí

DH dihaploidní linie

DNA deoxyribonukleová kyselina

dNTP deoxynukleotidy

EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová

F primer forward primer

F_2 druhá filiální generace

GA kyseliny giberelová

Gbp giga báze

kb kilo báze

Mbp mega báze

NF-Y komplex nukleárního faktoru Y

PCR polymerázová řetězová reakce

PPD fotoperiodické geny

QTL lokus pro kvantitativní znak (*quantitative trait locus*)

R primer reverse primer

ssp. poddruh

SSR mikrosatelit (*simple sequence repeat*)

TEMED N, N,N´,N´- tetramethylendiamin

VRN vernalizační geny