

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2024

Bc. Andrea Skibová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Analýza předčasného stop kodonu u *Vrn-A1a* alely a jeho vlivu na dobu metání u pšenice seté

Diplomová práce

Bc. Andrea Skibová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrea SKIBOVÁ**
Osobní číslo: **R220036**
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Analýza předčasného stop kodonu u *Vrn-A1* a alely a jeho vlivu na dobu metání u pšenice seté**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

Studentka vypracuje literární rešerši týkající se indukce kvetení u pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) se zaměřením na geny fotoperiodické a vernalizační dráhy. Hlavní důraz bude kladen na regulaci vernalizačního mechanismu. Praktická část práce se bude týkat stanovení exprese genu *VRN1* u dvou mutantních linií jarní pšenice Cadenza. Tyto linie mají předčasný stop kodon u alely *Vrn-A1a*. Cílem práce je určit, jaký vliv má tato mutace na expresi nejen *Vrn-A1a*, ale také *VRN-B1* a *VRN-D1*. Bude také stanovena doba metání obou linií, která bude porovnána s nemutovanou odrůdou Cadenza. Studentka bude využívat metody molekulární genetiky, jako jsou izolace DNA a RNA, PCR, tvorba cDNA a RT-qPCR. Bude také provádět křížení rostlin. Získaná data budou vyhodnocena statistickou analýzou.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Andrés F, Coupland G (2012) The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics* 13:627–639. <https://doi.org/10.1038/nrg3291>
Fu D, Szűcs P, Yan L, et al (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. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1095-4>
Krasileva KV, Vasquez-Gross HA, Howell T, et al (2017) Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:E913–E921. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619268114>
Trevaskis B (2010) The central role of the VERNALIZATION1 gene in the vernalization response of cereals. *Functional Plant Biology* 37:479. <https://doi.org/10.1071/FP10056>
Trevaskis B, Bagnall DJ, Ellis MH, et al (2003) MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:13099–13104. <https://doi.org/10.1073/pnas.1635053100>
Yan L, Helguera M, Kato K, et al (2004) Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 109:1677–1686. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1796-4>
http://www.wheat-training.com/wp-content/uploads/Functional_studies/PDFs/Selecting-TILLING-mutants.pdf

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Beáta Strejčková**
Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání diplomové práce: 31. října 2022
Termin odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, Dr.Sc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 8. února 2023

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení:	Andrea Skibová
Název práce:	Analýza předčasného stop kodonu u <i>Vrn-A1a</i> alely a jeho vlivu na dobu metání u pšenice seté
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Ústav experimentální botaniky AV ČR, Olomouc Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Beáta Strejčková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024
Abstrakt:	<p>Kvetení pšenice seté je ovlivněno geny vernalizační a fotoperiodické dráhy a geny ranosti <i>per se</i>. Hlavními geny vernalizační dráhy jsou <i>VERNALIZATION 1 (VRN1)</i>, <i>VRN2</i> a <i>VRN3</i>. Tato diplomová práce se soustředí především na klíčový gen dráhy, <i>VRN1</i>, který působí jako transkripční faktor aktivující kvetení. Ve vernalizační dráze funguje jako aktivátor genu <i>VRN3</i>, a naopak umlčuje represor kvetení <i>VRN2</i>. V rámci diplomové práce bylo pracováno s dvěma TILLING liniemi jarní odrůdy pšenice seté Cadenza, které nesou předčasný stop kodon v genu <i>VRN-A1a</i>. Cílem závěrečné práce bylo zjistit, jak tento předčasný stop kodon ovlivňuje dobu metání a expresi genů vernalizační dráhy. Byla provedena fenotypová analýza M₄ a F₂ generace s následnou analýzou relativní exprese genů vernalizační dráhy. Výsledky jasně ukazují, že mutantní protein má vliv jak na dobu metání, tak na expresi hlavních genů vernalizační dráhy. Tato práce přiblíží vzájemné interakce mezi geny vernalizační dráhy.</p>
Klíčová slova:	Pšenice, <i>VRN1</i> , předčasný stop kodon, doba metání, exprese
Počet stran:	63 + xii
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Andrea Skibová
Title:	Analysis of a premature stop codon in the <i>Vrn-A1a</i> allele and its effect on heading time in bread wheat
Type of thesis:	Diploma
Department:	Institute of experimental botany of the AS CR, Olomouc Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor:	Mgr. Beáta Strejčková, Ph.D.
The year of presentation:	2024
Abstract:	<p>The flowering of wheat is influenced by the vernalization and photoperiodic pathway genes and early <i>per se</i> genes. The main genes of the vernalization pathway are <i>VERNALIZATION 1 (VRN1)</i>, <i>VRN2</i> and <i>VRN3</i>. This thesis focuses primarily on the key gene of the pathway, <i>VRN1</i>, which acts as a transcription factor activating flowering. In the vernalization pathway, <i>VRN1</i> induces <i>VRN3</i> gene and, conversely, silences the repressor of flowering, the <i>VRN2</i> gene. In the thesis, two TILLING lines of the spring wheat cultivar Cadenza, which carry a premature stop codon in the <i>VRN-A1a</i> gene, were investigated. The aim of the thesis was to uncover how premature stop codons affect the heading time and the expression of vernalization pathway genes. A phenotypic analysis of the M₄ and F₂ generation was performed, followed by an analysis of the relative expression of the vernalization pathway genes. The results indicate that the mutant protein affects both the heading time and the expression of the major genes of the vernalization pathway. This thesis will shed light on some interactions between the vernalization pathway genes.</p>
Keywords:	Wheat, <i>VRN1</i> , premature stop codon, expression, heading time
Number of pages:	63 + xii
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Beáty Strejčkové, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci dne:

.....

Bc. Andrea Skibová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce Mgr. Beátě Strejčkové, Ph.D. za její odborné vedení, připomínky a čas věnovaný zpracování diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat celému kolektivu Ústavu experimentální botaniky AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Evoluce a domestikace pšenice seté (<i>Triticum aestivum</i>).....	3
3.2	Mechanismus kvetení u pšenice seté	5
3.2.1	Vernalizační dráha	6
3.2.1.1	Gen <i>VRN1</i>	7
3.2.1.2	MADS-box transkripční faktory	9
3.2.1.3	Gen <i>VRN2</i>	10
3.2.1.4	Gen <i>VRN3 (FTI)</i>	11
3.2.2	Fotoperiodická dráha	11
3.2.2.1	Fytochromy a cirkadiální hodiny	12
3.2.2.2	Gen <i>PPD1</i>	13
3.2.3	Geny ranosti <i>per se</i>	13
3.3	TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genomes)	14
3.3.1	Tvorba TILLING populací	16
3.3.2	Metody identifikace mutací	17
3.3.3	TILLING linie pšenice seté Cadenza 0309 a Cadenza 1617	17
4	MATERIÁL A METODY	19
4.1	Biologický materiál	19
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	19
4.2.1	Použité chemikálie	19
4.2.2	Použité soupravy	20
4.2.3	Použité roztoky a jejich příprava.....	20
4.3	Seznam použitých přístrojů, zařízení a programů	21
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	22
4.4.1	Izolace DNA.....	22
4.4.2	Sekvenování <i>VRN1</i> genu	22
4.4.2.1	Illumina sekvenování	22
4.4.2.2	Sangerovo sekvenování	23
4.4.3	Zpětné křížení mutantů.....	26
4.4.4	Fenotypová analýza rostlin.....	27
4.4.5	Genotypování mutantů	27
4.4.6	Analýza relativní exprese genů vernalizační dráhy.....	31

5	VÝSLEDKY	33
5.1	Sekvenování genu <i>VRN1</i>	33
5.2	Křížení	33
5.2.1	Křížení M ₄ generace.....	33
5.2.2	Křížení F ₁ generace	34
5.3	Fenotypová analýza rostlin	34
5.3.1	Fenotypová analýza rostlin M ₄ generace.....	35
5.3.2	Fenotypová analýza rostlin F ₁ generace.....	37
5.4	Genotypování mutantů	37
5.4.1	Genotypování mutantu CAD 1617	38
5.4.2	Genotypování mutantu CAD 0309	39
5.5	Analýza relativní exprese genů vernalizační dráhy	39
5.5.1	Analýza relativní exprese genů M ₄ generace	39
5.5.2	Analýza relativní exprese genů F ₂ generace	44
6	DISKUSE.....	46
7	ZÁVĚR	49
8	LITERATURA.....	50

Seznam symbolů a zkratek

<i>A.</i>	<i>Arabidopsis</i>
<i>Ae.</i>	<i>Aegilops</i>
AG	AGAMOUS
ANOVA	Analýza variací
AP1	APETTALA1
bp	páry bází
CAD	Cadenza
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence
CCT	<u>C</u> ONSTANS, <u>C</u> O-like, <u>T</u> OC1
CO	CONSTANS
ddPCR	Droplet digital PCR
DEF	DEFICIENS
DHLPC	Denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DNF	Nekvetoucí
dNTPS	Deoxynukleotid trifosfát
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
ELF3	EARLY FLOWERING 3
EMS	Ethyl metansulfonát
EPS	EARLINESS PER SE
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FDL	FLOWERING LOCUS D-like
FIND-IT	Fast Identification of Nucleotide variants by droplet DigITal PCR
FT	FLOWERING LOCUS T
FtsH4	FILAMENTATION TEMPERATURE SENSITIVE H
GAPDH	GLYCERALDEHYD-3-FOSFÁT DEHYDROGENÁZA
GI	GIGANTEA
GM	Geneticky modifikované
GRP2	GLYCINE RICH RNA-BINDING PROTEIN 2
H3K27me3	Trimethylace lysinu 27 na histonu 3

H3K36me3	Trimethylace lysinu 36 na histonu 3
H3K4me3	Trimethylace lysinu 4 na histonu 3
HRM	High-resolution melting analýza
IC	Inter-run kalibrátor
IPCC	Mezivládní panel pro změnu klimatu
IWGSC	Mezinárodní konsorcium pro sekvenování genomu pšenice
kb	Kilobáze
LI-COR	<u>L</u> amba <u>I</u> nstruments <u>C</u> orporation
lncRNA	Dlouhé nekódující RNA
LUX	LUX ARRHYTMO
MADS-box	<u>M</u> INICHROMOSOME <u>M</u> AINTENANCE <u>F</u> ACTOR 1, <u>A</u> GAMOUS, <u>D</u> EFICIENS, <u>S</u> ERUM RESPONSE FACTOR
MCM1	<u>M</u> INICHROMOSOME <u>M</u> AINTENANCE <u>F</u> ACTOR 1
MIKC	<u>M</u> ADS-box, <u>I</u> nvertovaná, <u>K</u> eratin-like, <u>C</u> -terminální domény
MNU	N-methyl-N-nitrosomočovina
MOT1	<u>M</u> OLYBDENUM <u>T</u> RANSPORTER 1
NGS	Sekvenování nové generace
PCL1	<u>P</u> HYTOCLOCK 1
PHYB	<u>P</u> HYTOCHROME B
PHYC	<u>P</u> HYTOCHROME C
PPD	<u>P</u> HOTOPERIOD
PRC2	<u>P</u> OLYCOMB <u>R</u> EPRESSIVE <u>C</u> OMPLEX 2
PRR37	<u>P</u> SEUDO- <u>R</u> ESPONSE <u>R</u> EGULATOR 37
QTL	Quantitative Trait Locus
RF2a	Transkripční faktor RF2a
RF2b	Transkripční faktor RF2b
RIP3	RNA Immune Precipitation fragment 3
SFE	Spring foldback element
SNP	Jednonukleotidová mutace
SRF	<u>S</u> ERUM <u>R</u> ESPONSE <u>F</u> ACTOR
ssp.	Poddruh

<i>T.</i>	<i>Triticum</i>
TBE	Tris-kyselina boritá-EDTA
TILLING	Targeting Induced Local Lesion IN Genomes
UN	Spojené národy
VAS	VERNALIZATION1 ALTERNATIVE SPLICING
VER2	VERNALIZATION-RELATED 2
VRN	VERNALIZATION
VRT2	VEGETATIVE TO REPRODUCTIVE TRANSITION 2

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma evoluce pšenice (<i>T. aestivum</i>).....	4
Obrázek 2: Schéma vernalizační dráhy pšenice.	7
Obrázek 3: Obecné schéma MADS box transkripčního faktoru <i>VRN-A1</i> a jeho mutantní formy studované v této diplomové práci.....	10
Obrázek 4: Schéma přípravy TILLING populací pšenice seté.....	15
Obrázek 5: Jednonukleotidové mutace v genu <i>VRN-A1</i> u TILLING linií CAD 0309 a CAD 1617.....	18
Obrázek 6: Vykastrovaný klas.	27
Obrázek 7: Výsledky sekvenování genu <i>VRN-A1</i> u CAD 0000 a CAD 0309 s přiblížením na exon 6.	33
Obrázek 8: Úspěšně nakřížené klasy.	34
Obrázek 9: Rozdíl v metání u mutantních rostlin CAD 0309.	36
Obrázek 10: Genotypování mutantních rostlin CAD 1617.	38

Seznam grafů

Graf 1: Statistické vyhodnocení doby metání mutantů CAD 0309 a CAD 1617 v porovnání s wild-typem CAD 0000.	36
Graf 2: Statistické vyhodnocení doby metání mutantů CAD 0309 F ₁ generace v porovnání s wild-typem CAD 0000.	37
Graf 3: Relativní exprese M ₄ generace po 14 dnech.	40
Graf 4: Relativní exprese M ₄ generace po 28 dnech.	41
Graf 5: Relativní exprese M ₄ generace po 42 dnech.	42
Graf 6: Relativní exprese M ₄ generace po 58 dnech.	43
Graf 7: Relativní exprese F ₂ generace.	45

Seznam tabulek

Tabulka 1: Kontrolované podmínky pěstování pšenice ve fytotronu	19
Tabulka 2: Složení reakční směsi pro amplifikaci genu <i>VRNI</i> po exon 7	22
Tabulka 3: Sekvence primerů použitých k a amplifikaci genu <i>VRNI</i> po exon 7.....	23
Tabulka 4: Teplotní podmínky k amplifikaci genu <i>VRNI</i> po exon 7.....	23
Tabulka 5: Složení reakční směsi k amplifikaci genu <i>VRNI</i> od intronu 7.....	24
Tabulka 6: Sekvence primerů a jejich podmínky pro amplifikaci genu <i>VRNI</i> od intronu 7 ..	24
Tabulka 7: Teplotní průběh amplifikace genu <i>VRNI</i> od intronu 7	24
Tabulka 8: Složení reakční směsi k přečištění PCR produktů před sekvenační reakcí	25
Tabulka 9: Teplotní průběh reakce k přečištění PCR produktů před sekvenační reakcí	25
Tabulka 10: Složení sekvenační reakce k sekvenování genu <i>VRNI</i> od intronu 7	26
Tabulka 11: Teplotní průběh sekvenační reakce k sekvenování genu <i>VRNI</i> od intronu 7	26
Tabulka 12: Složení reakční směsi k amplifikaci exonů 3 a 6 genu <i>VRN-A1</i>	28
Tabulka 13: Seznam použitých primerů k rozlišení mutantních alel od wild-type alely	28
Tabulka 14: Teplotní průběh reakce amplifikace exonů 3 a 6 genu <i>VRN-A1</i>	29
Tabulka 15: Složení reakční směsi pro štěpení pomocí enzymu BseNI.....	29
Tabulka 16: Teplotní průběh štěpení pomocí enzymu BseNI.....	30
Tabulka 17: Složení reakční směsi pro štěpení pomocí enzymu XbaI	30
Tabulka 18: Teplotní průběh štěpení pomocí enzymu BseNI.....	30
Tabulka 19: Složení reakční směsi RT-qPCR k analýze relativní exprese genů vernalizační dráhy u wild-typu a mutantů	32
Tabulka 20: Primery použité k analýze relativní exprese genů vernalizační dráhy u wild-typu a mutantů	32
Tabulka 21: Teplotní průběh RT-qPCR k analýze relativní exprese genů vernalizační dráhy u wild-typu a mutantů	32

1 ÚVOD

Pšenice setá je významnou kulturní plodinou, která dnes tvoří až pětinu světového jídelníčku, což klade velké požadavky na její výnos, a tudíž i na její šlechtitele. Jedním z aspektů optimálního výnosu je správně načasované kvetení, které u pšenice ovlivňují tři skupiny genů – vernalizační a fotoperiodické geny a geny ranosti *per se*. Detailní porozumění mechanismu kvetení může pomoci ve šlechtění takových odrůd pšenice, které se dokáží vyhnout nepříznivým podmínkám a vykvést v ten správný čas pro maximalizování výnosu.

Hlavním genem vernalizační dráhy je gen *VERNALIZATION 1*, který je aktivovaný vernalizací, tedy dlouhodobým působením nízkých teplot. Tento gen dále aktivuje další gen vernalizační dráhy, gen *VERNALIZATION 3* a umlčuje gen *VERNALIZATION 2*. *VERNALIZATION 1* patří do rodiny MADS-box transkripčních faktorů a interaguje s mnoha dalšími proteiny a geny, avšak dynamika těchto interakcí na proteinové úrovni není téměř vůbec prozkoumána. Tato diplomová práce by mohla přispět k lepšímu porozumění dynamiky proteinu *VERNALIZATION 1* a mechanismu kvetení.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce je vypracovat literární rešerši zabývající se indukcí kvetení u pšenice seté (*Triticum aestivum*) se zaměřením na geny fotoperiodické a vernalizační dráhy s důrazem na vernalizační dráhu.

Praktická část práce se bude týkat stanovení exprese genu *VRN1* u dvou mutantních linií jarní pšenice Cadenza s předčasným stop kodonem u alely *Vrn-A1a*. Cílem práce je určit, jaký vliv má tato mutace na expresi nejen *Vrn-A1a*, ale také *VRN-B1* a *VRN-D1*. Bude také stanovena doba metání obou linií, která bude porovnána s nemutovanou odrůdou Cadenza.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Evoluce a domestikace pšenice seté (*Triticum aestivum*)

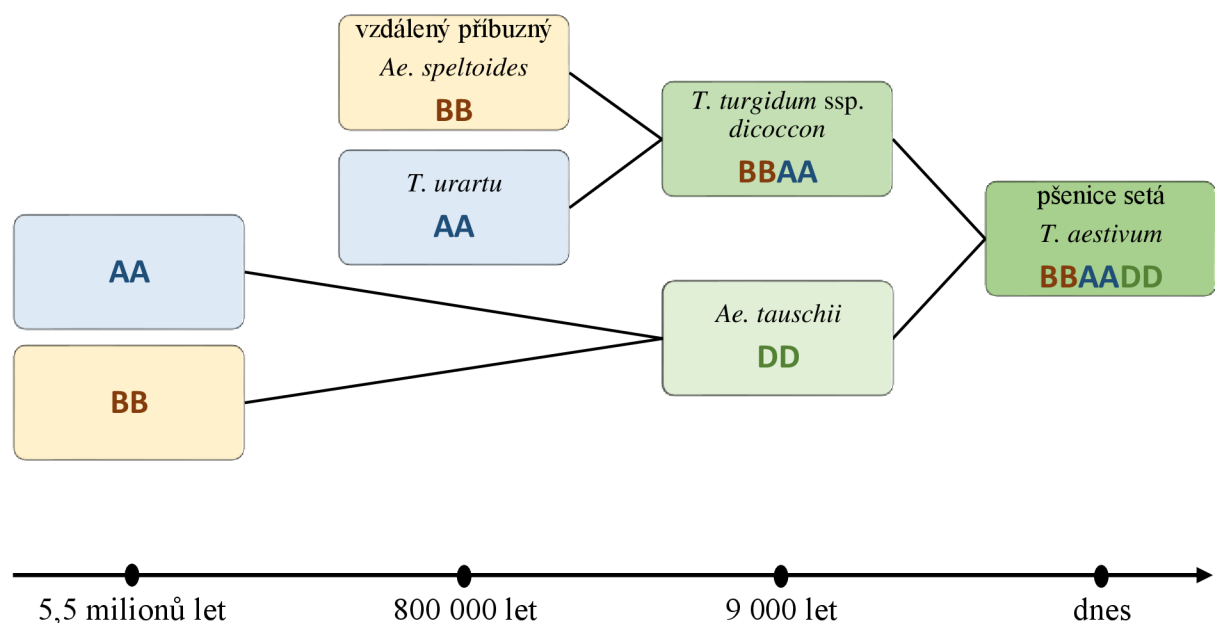
Pšenice setá (*T. aestivum*) je významnou kulturní plodinou, která se po její domestikaci před tisíci lety rychle rozšířila po celém světě. K jejímu širokému rozšíření přispěla schopnost adaptovat se na nejrůznější klimatické podmínky (Dubcovsky *et* Dvořák, 2007). Dnes se pěstuje od severu Norska až po jih Argentiny – může být tedy pěstována jak v mírném podnebí České republiky, tak v subtropických i tropických oblastech (Feldman, 2001; FAO, 2024). V loňském roce dosáhla celosvětová produkce pšenice necelých 790 milionů tun. Mezi její největší producenty patří Čína a Indie, v Evropě je to pak Francie (FAO, 2024). Protože je pšenice podstatnou součástí lidské stravy, je kladen velký důraz na porozumění jejího genomu. Pšenice setá je allohexaploid s 21 páry chromozomů organizovaných do tří subgenomů A, B a D, což komplikuje její studium (Sakamura, 1918; Sears, 1952). V roce 2005 bylo založeno Mezinárodní konsorcium pro sekvenování genomu pšenice (IWGSC). Samotné sekvencování genomu o celkové velikosti ~16 Gbp bylo dokončeno v roce 2018 (IWGSC, 2018).

Jak již bylo zmíněno výše, pšenice setá je allohexaploid (BBAADD, $2n = 6x = 42$) a zjednodušeně by se dalo říci, že vznikla hybridizací tetraploidní (BBAA) a diploidní (DD) pšenice. Evoluce pšenice seté (Obrázek 1) je ale mnohem složitější a stále je předmětem studií. Již v první polovině 20. století byly identifikovány všechny tři její subgenomy. Na základě analýzy párování chromozomů v F_1 generaci hybridů hexaploidní (BBAADD) a tetraploidní pšenice *T. turgidum* ssp. *dicoccon* (BBAA) bylo zjištěno, že část genomu hexaploidní pšenice tvoří subgenomy B a A (Kihara, 1919; McFadden a Sears, 1944, 1946). Cytogenetická zkoumání uměle vytvořených hexaploidních hybridů tetraploidní pšenice (BBAA) a *Aegilops tauschii* (DD) zase ukázala, že třetí subgenom D pochází z *Ae. tauschii* (McFadden a Sears, 1944, 1946). Sám subgenom D má původ v subgenomech A a B a vznikl přibližně před ~5,5 miliony lety (Luo *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017; Marcussen *et al.*, 2014).

Samotný vznik hexaploidní pšenice zahrnoval dva procesy allopolyploidizace s následnou diploidizací. Přibližně před 800 000 lety došlo k hybridizaci diploidních donorů subgenomů A a B, za vzniku divokého předka *T. turgidum* ssp. *dicoccon* (BBAA; Marcussen *et al.*, 2014). Ještě nedávno byl za donora subgenomu B považován *Ae. speltooides*, nicméně Li *et al.* (2022) na základě celogenomového sekvenování zjistil, že *Ae. speltooides* se z donora subgenomu B pouze vyvinul a není jeho donorem. Podle této studie je donorem subgenomu B vzdálený příbuzný *Ae. speltooides*, který buďto vyhynul nebo ještě nebyl popsán. Donorem

subgenomu A je pak *T. urartu* (Marcussen *et al.*, 2014). Druhá allopolyploidizace, při které již vznikl předek dnešní hexaploidní pšenice seté (BBAADD) proběhla před ~9000 lety, kdy došlo k hybridizaci předků *T. turgidum* ssp. *dicoccon* (BBAA) a *Ae. tauschii* (DD; Feldman, 2001).

K domestikaci hexaploidní pšenice, ale i jiných druhů obilovin, došlo v oblasti úrodného půlměsíce před přibližně 9 500–8 500 lety. Postupně se ukotvovaly fenotypové znaky, které byly vhodné pro rozsáhlé pěstování pšenice. Právě těmito znaky se odlišují domestikované druhy od svých divokých příbuzných nebo předků (Dubcovsky *et Dvořák*, 2007). Mezi tyto znaky patří především posílené stéblo a přechod na tzv. nahou pšenici, ale také zvýšení velikosti a počtu semen na jeden klas a redukce dormance. Všechny tyto znaky umožnily vyšší výnosy pšenice (Feldman, 2001; Levy *et Feldman*, 2022).



Obrázek 1: Schéma evoluce pšenice (*T. aestivum*). Před ~5,5 miliony lety došlo k hybridizaci neznámých donorů genomů AA a BB za vzniku *Ae. tauschii* s genomem DD. Při hybridizaci (před 800 000 lety) vzdáleného příbuzného *Ae. speltoides* (AA) a *T. urartu* (BB) vznikla tetraploidní pšenice *T. turgidum* ssp. *dicoccon* (BBAA). Před přibližně 9 000 lety došlo k poslední hybridizaci v procesu evoluce pšenice, a to spojením právě *T. turgidum* ssp. *dicoccon* (BBAA) a *Ae. tauschii* (DD) za vzniku hexaploidní pšenice seté se subgenomy BBAADD

3.2 Mechanismus kvetení u pšenice seté

V roce 2030 se předpokládá nárůst světové populace na 8,5 miliard lidí, což, vzhledem k tomu, že pšenice tvoří 20 % lidského jídelníčku, klade velký tlak na zvyšování celosvětové produkce pšenice (Shiferaw *et al.*, 2013; Dreisigracker *et al.*, 2021; UN, 2024). Nicméně klesající dostupnost a kvalita zemědělské půdy a stále častěji se opakující extrémní počasí, jako sucho a vysoké teploty, vedou ke snižování kvality a výnosu pšenice. V budoucnu tak nebudeme schopni dostatečně pokrýt potřeby populace (Ray *et al.*, 2013; IPCC, 2014; Lesk *et al.*, 2016; Zandalinas *et al.*, 2018). Fábíán *et al.* (2019) ve své studii demonstroval negativní vliv vysokých teplot a sucha na morfologii klasu a životnost pylu, kdy působení těchto dvou extrémních faktorů počasí způsobilo sníženou fertilitu, která koreluje se sníženým výnosem.

Aby se tedy maximalizoval výnos, musí se rostlina vyhnout kvetení při nepříznivých podmínkách a začít kvést při těch optimálních (Trethowan, 2014). Jestliže dojde ke kvetení příliš brzy, hrozí rostlině umrznutí, naproti tomu při opožděném kvetení je rostlina vystavená suchu a vysokým teplotám (Flohr *et al.*, 2017). Optimální doba kvetení je podle Flohr *et al.* (2017) definovaná jako část roku, kdy jsou ztráty na výnosu vzhledem k stresovým podmínkám minimální. Správné načasování kvetení je tak pro rostlinu kritickým a komplexním krokem v jejím vývoji (Kamran *et al.* 2014), který zajišťují tři skupiny genů. Jsou to geny vernalizační (*VRN*) a fotoperiodické dráhy (*PPD*) a geny ranosti *per se* (*EPS*). Vernalizační dráha je aktivována chladem za účasti tří genů – *VERNALIZATION 1 (VRN1)*, *VERNALIZATION 2 (VRN2)* a *VERNALIZATION 3 / FLOWERING LOCUS T 1 (VRN3/FT1)* (Chouard, 1960). Na základě vernalizačního nároku je pšenice rozdělena na jarní a ozimé odrůdy. Ozimé odrůdy potřebují k aktivaci vernalizační dráhy dlouhodobé působení nízkých teplot, tzv. vernalizaci (Trevaskis *et al.*, 2003). Naproti tomu jarní odrůdy ji nevyžadují (Fu *et al.*, 2005). Fotoperiodická dráha aktivuje kvetení v závislosti na prodlužujících se dnech (Searle *et al.* Coupland, 2004). Součástí fotoperiodické dráhy je gen *PHOTOPERIOD 1 (PPD1)*, fytochromy a geny cirkadiálních hodin. Třetí skupina genů, geny ranosti *per se*, stále nejsou dostatečně prozkoumány, ale podílejí se na časovém „doladování“ kvetení (Slafer *et al.* Rawson, 1994; Zikhali *et al.*, 2015). Zároveň jsou často kandidátní *EPS* geny součástí cirkadiálních hodin (Gawroński *et al.*, 2014; Alvarez *et al.*, 2016)

Z výše uvedeného vyplývá, že studium a pochopení mechanismu kvetení je důležitou součástí snahy vědců vyšlechtit takové odrůdy, které se dokážou přizpůsobit měnícím se environmentálním podmínkám, čímž se zajistí potřebný výnos. Bohužel u pšenice není zcela

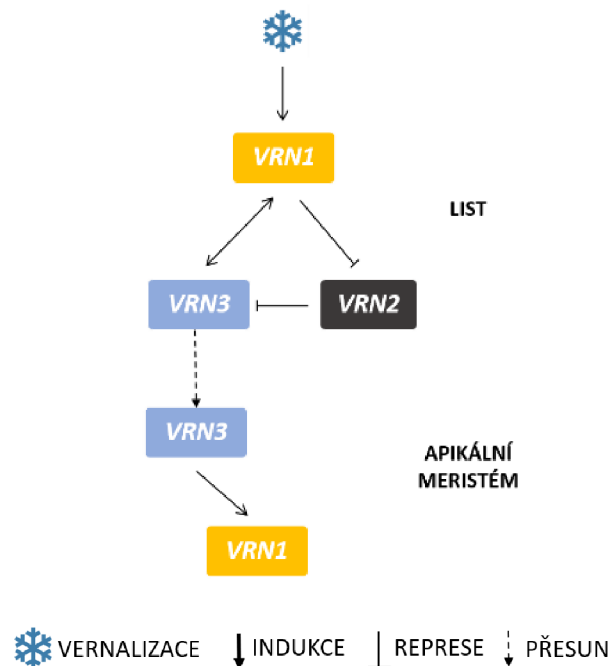
možné pro studium fungování a regulace kvetení použit modelový organismus *Arabidopsis thaliana*, u kterého je kvetení velmi dobře popsáno. Kvetení je u *A. thaliana* v mnoha případech regulováno jinými geny než u pšenice, a proto není vhodným modelem. Jedním z největších rozdílů mezi *A. thaliana* a pšenicí je absence orthologa genu *VRN2* u *A. thaliana*, která naznačuje, že celá vernalizační dráha se u obou rostlin vyvinula samostatně (Yan *et al.*, 2004a). Dalším rozdílem je, že ač se u *A. thaliana* nacházejí orthology genu *VRN1*, jako je například *APETTALA 1 (API)*, nejsou tyto geny součástí vernalizační dráhy (Yan *et al.*, 2004a). Pro studium kvetení pšenice je tak nutné pracovat přímo s tímto polyploidním druhem, či jeho příbuzným diploidním druhem, ječmenem (Greenup *et al.*, 2009; Lü *et al.*, 2015).

3.2.1 Vernalizační dráha

Vernalizační dráha je jedna ze tří drah regulující kvetení, která zajišťuje přechod rostliny z vegetativní do generativní fáze ve správnou dobu, tedy po skončení zimy a mrazů. Hlavním genem vernalizační dráhy je gen *VRN1*, u kterého musí být splněn vernalizační nárok, aby došlo k jeho aktivaci (Chouard, 1960). Vernalizace je období nízkých teplot (4–6 °C) dlouhé 3 až 8 týdnů, kterým musí rostlina projít k iniciaci kvetení (Košner *et Pánková*, 2002; Cockram *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013). Délka vernalizace je určena jednonukleotidovými polymorfismy (SNP) v genu *VRN1* (Li *et al.*, 2013; Kippes *et al.*, 2018). Na základě vernalizačního nároku, který je podmíněn alelickými variacemi genu *VRN1* a *VRN2*, dělíme pšenici na ozimé a jarní odrůdy. Ozimé odrůdy, které jsou sety na podzim, nesou recesivní alely *vrn1* a k jejich aktivaci je zapotřebí vernalizace. Jarní odrůdy naopak mají dominantní alely *Vrn1*, které ke své aktivaci vernalizaci nevyžadují a jsou sety na jaře (Yan *et al.*, 2004a; Fu *et al.*, 2005). I přes to, některé studie ukázaly, že po krátké vernalizaci jarních odrůd pšenice může dojít k urychlení jejich kvetení (Iqbal *et al.* 2006). Kromě genu *VRN1*, jsou v dráze ještě další dva geny *VRN2* a *VRN3*. Všechny geny jsou pak přítomny ve třech variantách – homeolozích, jelikož je pšenice hexaploidní rostlina a její genom je tvořen ze tří subgenomů A, B a D. Tyto tři homeology jednoho genu, např. *VRN1*, se obecně označují *VRN-A1*, *VRN-B1* a *VRN-D1*, jednotlivé alely pak např. *Vrn-A1a* (dominantní alela a genu *VRN-A1*). Stejně tak je tomu i ostatních genů v pšeničném genomu.

V rámci vernalizační dráhy (Obrázek 2) všechny tři její geny navzájem ovlivňují. Geny *VRN1* a *VRN3* figurují jako aktivátory kvetení (Pugsley, 1971; Yan *et al.*, 2006), kdežto gen *VRN2* jako jeho represor (Trevaskis *et al.*, 2007). Před vernalizací je aktivní gen *VRN2* (Dubcovsky *et al.*, 2006), který inhibuje *VRN3*. Po aktivaci *VRN1* vernalizací, tento gen zároveň umlčuje represor *VRN2* (Chen *et Dubcovsky*, 2012) a aktivuje *VRN3*, který zpětně přispívá

k aktivaci *VRN1* (Distelfeld *et al.*, 2009). Tato část dráhy probíhá v listu a následně se přesouvá do apikálního meristému stonku, kam je protein VRN3 z listu translokován (Corbesier *et al.*, 2007). V apikálním meristému pravděpodobně VRN3 aktivuje gen *VRN1*, který iniciuje kvetení (Li *et Dubcovsky*, 2008). Samozřejmě všechny dráhy ovlivňující kvetení jsou navzájem propojené a přispívají k regulaci ostatních genů.



Obrázek 2: Schéma vernalizační dráhy pšenice. Interakce v rámci vernalizační dráhy probíhají na dvou místech v rostlině – v listu a apikálním meristému. V listu, po aktivaci *VRN1* vernalizací dochází jednak k represí genu *VRN2*, který funguje jako represor *VRN3* a za druhé k aktivaci *VRN3*. Ten pak ještě zpětně aktivuje *VRN1*. Gen *VRN3* kóduje mobilní protein, který je z listu transportován do apikálního meristému stonku, kde opět aktivuje *VRN1*. Gen *VRN1* v apikálním meristému iniciuje přechod rostliny z vegetativní fáze do reprodukční.

3.2.1.1 Gen *VRN1*

Za hlavní gen vernalizační dráhy můžeme označit MADS-box transkripční faktor *VRN1* (Yan *et al.*, 2003). Tento transkripční faktor je exprimován jak v listech, tak v apikálním meristému (Yan *et al.*, 2003). V listech působí jako represor genu *VRN2* a zároveň aktivuje expresi genu *VRN3*. V apikálním meristému interaguje s mobilním proteinem VRN3 z listu a iniciuje kvetení. Aktivace genu *VRN1* závisí na tom, zda se jedná o dominantní nebo recesivní alelu. Recesivní alely vyžadují ke své aktivaci proces vernalizace, kdežto dominantní alely jsou aktivní bez ní (Yan *et al.*, 2004b; Fu *et al.*, 2005). Dominantní alely, přítomny u jarních odrůd pšenice, vznikly insercemi a delecemi v promotoru a delecemi v prvním intronu genu (Yan *et al.*, 2004b; Fu *et al.*, 2005). Alela s označením *Vrn-A1a* má duplikovaný region

(obsahující část promotoru, první exon a část intronu 1) po inserci transpozónu SFE (spring foldback element), čímž pravděpodobně došlo k narušení vazebného místa pro represor nacházející se v prvním intronu (Yan *et al.*, 2004b). U dalších dominantních alel jako *Vrn-Alb* a *Vrn-Dlc* byly objeveny delece a inserce v jejich promotorech (Yan *et al.*, 2004b; Zhang *et al.*, 2015).

Právě mutace v promotorech a prvních intronech dominantních alel pravděpodobně zapříčiňují expresi genu bez potřeby vernalizace. Exprese genu *VRNI* (především u ozimých odrůd) je modulována mnoha faktory, jejichž vazebná místa se pravděpodobně nacházejí v prvním intronu nebo promotoru. Jedním z mechanismů regulace *VRNI* je jeho udržování v neaktivním stavu trimethylací lysinu 27 na histonu 3 (H3K27me3), což zajišťuje POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2 (PRC2; Alonso-Peral *et al.*, 2011; Strejčková *et al.*, 2020). Vernalizace indukuje změnu stavu z neaktivního (H3K27me3) na aktivní pomocí trimethylace lysinu 4 a 36 na histonu 3 (H3K4me3 a H3K36me3; Xiao *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2024). Původní zjištění naznačovala, že hypermethylace se odehrává pouze v rámci kritického regionu v prvním intronu (Xiao *et al.*, 2014), ale Niu *et al.* (2024) v nejnovější studii dokázal, že se změny v methylaci týkají také promotoru a celého genu *VRNI*. Dalším modulátorem *VRNI* v rámci prvního intronu je *VERNALIZATION-RELATED 2* (*VER2*), jehož exprese roste s vernalizací v jádrech buněk apikálního meristému a mladých lístků (Xing *et al.*, 2009). *VER2* v průběhu vernalizace interaguje s represorem genu *VRNI*, *GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 2* (*GRP2*), který se váže na pre-mRNA *VRNI* do 19 bp konzervativní sekvence v prvním intronu, označované jako RNA imine precipitation fragment 3 (*RIP3*; Xiao *et al.*, 2014). Během vernalizace dochází k O-GlcNAcylování proteinů, včetně *GRP2* na threoninu 17 (Xing *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2014). *VER2* rozpoznává takto modifikovaný *GRP2*, váže se na něj a uvolňuje ho z pre-mRNA, která může dále pokračovat k sestřihu (Xiao *et al.* 2014). Xu *et al.* (2021) v nedávné studii pozoroval další mechanismus aktivace transkripce *VRNI*, a to pomocí dlouhé nekódující RNA (long noncoding RNA – lncRNA). Tato lncRNA je produktem alternativního sestřihu pre-mRNA *VRNI* a podle toho nese i svůj název *VRNI ALTERNATIVE SPLICING* (*VAS*). *VAS* hraje pravděpodobně důležitou roli v aktivaci *VRNI* u ozimých odrůd, kde je *VAS* produkovaný během prvních týdnů vernalizace. Xu *et al.* (2021) zjistil, že se společně s *VAS* podílejí na aktivaci *VRNI* transkripční faktory RF2b a RF2a. Komplex *VAS-RF2b* se váže do promotoru *VRNI*, kde RF2b aktivuje transkripci genu tvorbou heterodimeru s RF2a. Promotor *VRNI* je cílem také pro další modulátor *VEGETATIVE TO REPRODUCTIVE TRANSITION 2* (*VRT2*; Xie *et al.*, 2019). Dříve byl *VRT2* považován za

repressor kvetení (Kane *et al.*, 2005; Kane *et al.*, 2007), Xie *et al.* (2019) však tato tvrzení svými experimenty vyvrátil a demonstroval funkci *VRT2* jako aktivátoru kvetení. *VRT2* tvoří heterodimer společně s proteinem *VRN1*, který se váže zpátky do promotoru *VRN1*, čímž je gen aktivován (Xie *et al.*, 2019). Pouze v apikálním meristému je *VRN1* aktivován ještě komplexem *VRN3-FLORING LOCUS D-like (FDL)*, který se váže do jeho promotoru (Li *et Dubcovsky*, 2008). *VRN3* se jako mobilní protein přesouvá z listu do apikálního meristému stonku, kde se společně s *FDL* váže do *VRN1* (Corbesier *et al.*, 2007; Li *et Dubcovsky*, 2008).

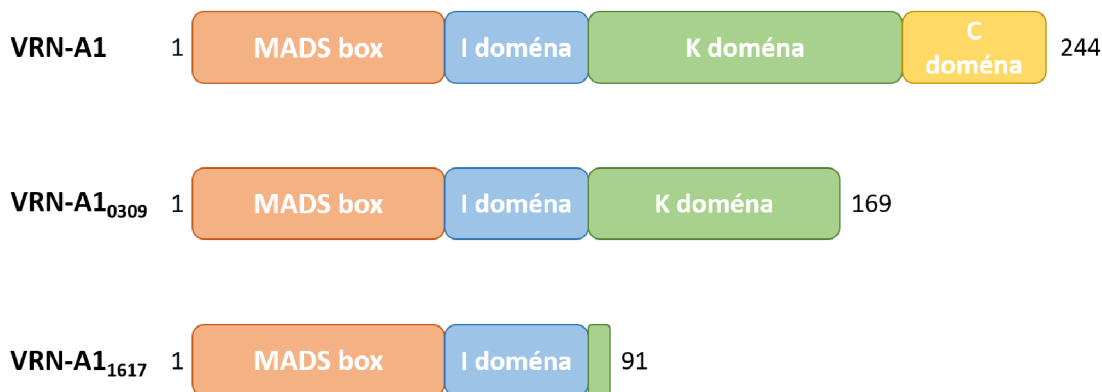
Geny *VRN1* se nachází na dlouhém rameni chromozomů 5A, 5B a 5D (Snape *et al.*, 2001). Translokací 290 kb velkého regionu z dlouhého ramene chromozomu 5A nesoucího recesivní alelu *vrn-A1* na krátké rameno chromozomu 5D, vznikl čtvrtý gen vernalizační dráhy *VRN-D4* (Kippes *et al.*, 2015). Kromě jeho translokace, došlo také k jednonukleotidové mutaci, která změnila typ alely z recesivní na dominantní (Kippes *et al.*, 2015). Gen *VRN-D4* byl objeven a vyskytuje se výhradně u jarních odrůd pšenice v jižní Asii (Kippes *et al.*, 2015).

3.2.1.2 MADS-box transkripční faktory

Jak již bylo zmíněno, *VRN1* patří do rodiny MADS-box transkripčních faktorů, přesněji do typu II, označovaných také jako MIKC-typy (Muenster *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2003). MIKC je pořadí čtyř domén, které tyto transkripční faktory obsahují – MADS-box, I (invertovaná), K (keratin-like) a C-terminální doména (Obrázek 3; Kaufmann *et al.*, 2005). Tyto transkripční faktory se váží do specifické sekvence DNA jako homo/heterodimery nebo multimery (Kaufmann *et al.*, 2005). DNA vazebná MADS-box doména obsahuje velice konzervativní sekvenci. Poprvé byla objevená u genů *MINICHROMOSOME MAINTENANCE FACTOR 1 (MCM1)*, *AGAMOUS (AG)*, *DEFICIENS (DEF)* a *SERUM RESPONSE FACTOR (SRF)*, po kterých nese svůj název (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990). Specifickou vazbu k DNA zajišťuje N-terminální konec MADS-box domény. C-terminální konec má zase svou úlohu v dimerizaci proteinu (Treisman, 1995). Po MADS-box doméně následuje I doména, která hraje roli ve specifitě protein-protein interakce (Kaufmann *et al.*, 2005). Následuje K doména, která je rovněž jako MADS-box doména velice konzervativní a nejčastěji je kódovaná třemi exony (Kaufmann *et al.*, 2005; Gramzow *et Theißen*, 2015). Dá se dále dělit do tří subdomén K1, K2 a K3 a každá z těchto subdomén iniciuje interakci protein-protein mezi MADS-box transkripčními faktory (Kaufmann *et al.*, 2005). Kromě dimerizační funkce, se C-terminální část K domény také podílí také na tvorbě tetramerů nebo dalších multimerů (Kaufmann *et al.*, 2005; Melzer *et Theißen*, 2009). Na konci těchto transkripčních faktorů se nachází nejméně

konzervovaná část – C-terminální doména. Ta se taktéž může podílet na tvorbě dimerů a multimerů a transkripční aktivaci (Kaufmann *et al.*, 2005).

V rámci této diplomové práce bylo pracováno s mutantními liniemi, u kterých došlo vinou předčasných stop kodonů ke změnám v proteinových doménách (Obrázek 3). Tyto linie budou popsány podrobněji dále v této práci.



Obrázek 3: Obecné schéma MADS box transkripčního faktoru *VRN-A1* a jeho mutantní formy studované v této diplomové práci. *VRN-A1* patří mezi MADS box transkripční faktory, které mají čtyři domény. MADS box doména se podílí na vazbě k DNA, I doména se podílí na protein-protein interakci, K doména je určena také k protein-protein interakci a k tvorbě dimerů/multimerů. C-terminální doména má funkci dimerizační a transkripčně aktivační. Předčasný stop kodon u *Vrn-A1*₀₃₀₉ způsobil ztrátu C-terminální domény a malé části K domény. U *Vrn-A1*₁₆₁₇ došlo k ztrátě C-terminální domény a téměř celé K domény. (Kaufmann *et al.*, 2005; EnsemblPlants).

3.2.1.3 Gen *VRN2*

Gen *VRN2* je represorem kvetení, jehož protein má motiv zinkového prstu a CCT doménu (Yan *et al.*, 2004b). CCT doména je zkratka genů *A. thaliana* *CONSTANS*, *CONSTANS-like* a *TIMING OF CAB1*, kde byla tato doména poprvé nalezena (Strayer *et al.*, 2000). Homoelogy *VRN-B2* a *VRN-D2* se nacházejí na chromozomech 4B a 4D (Tan *et al.*, 2016). Naproti tomu *VRN-A2* se nachází na dlouhém rameni chromozomu 5A, kde byl translokován z dlouhého ramene chromozomu 4A (Dubcovsky *et al.*, 1998). Ozimé odrůdy pšenice disponují dominantní alelou *Vrn2* alespoň v jednom ze tří homeologů (Yan *et al.*, 2004b). Dominantní alela *Vrn2* chrání rostlinu před brzkým kvetením během zimy a před ukončenou vernalizací (Takahashi *et al.*, 1971). Shaw *et al.* (2020) v nedávné studii ukázal, že *Vrn2* je během dlouhých dní před naplněnou vernalizací (tedy během podzimu) indukován genem fotoperiodické dráhy *PPD1*. Aktivní alely *Vrn2* pak inhibují aktivátor kvetení *VRN3*, čímž brání rostlině vykvést (Hemming *et al.*, 2008). Před vernalizací je *VRN2* aktivován za

pomocí *PPD1* (Shaw *et al.*, 2020). Během vernalizace dochází ke snižování exprese *VRN2* a zároveň ke zvýšení exprese *VRN1*. Yan *et al.* (2004b) toto demonstroval pomocí RNA interference genu *VRN2*, kdy jeho inhibice vedla ke zvýšené expresi *VRN1* a zároveň ke snížené potřebě vernalizace. V případě ukončené vernalizace je gen *VRN2* inhibován hlavním genem vernalizační dráhy *VRN1* (Trevaskis *et al.*, 2006; Hemming *et al.*, 2008). Recessivní alely *vrn2* jsou přítomny u jarních typů pšenice a jsou výsledkem bodových mutací v kódující oblasti dominantní alely *Vrn2* (označované *vrn2a*) nebo její úplnou delecí (označovanou *vrn2b*; Yan *et al.*, 2004b). Dlouhé dny těchto u „nefunkčních“ alel indukují expresi *VRN3* a aktivují kvetení bez potřeby vernalizace (Yan *et al.*, 2006; Hemming *et al.*, 2008).

3.2.1.4 Gen *VRN3* (*FT1*)

Gen *VRN3* kóduje mobilní protein, který se transportuje z listu do apikálního meristému, kde iniciuje kvetení. Tento protein se podobá proteinu FLOWERING LOCUS T (FT) u *A. thaliana*, a proto je označován také jako FT1 (Yan *et al.*, 2006). Lv *et al.* (2014) demonstroval důležitou úlohu *VRN3* v indukcii kvetení ve svém experimentu, kdy pomocí RNA interference umlčel *VRN3*, což vedlo k opožděnému kvetení o 2 až 4 týdny. Exprese *VRN3* je modulována především třemi geny podílejících se na kvetení – *VRN1*, *VRN2* a *PPD1*. *VRN2* působí v listech jako jeho represor, *VRN1* a *PPD1* ho naproti tomu aktivují (Hemming *et al.*, 2008; Turner *et al.*, 2005; Distelfeld *et al.*, 2009). *VRN3* je exprimován pouze v listech po aktivaci geny *VRN1* a *PPD1* při dlouhých dnech (Hemming *et al.*, 2008; Pearce *et al.*, 2013). Mobilní protein *VRN3* se pak dále přesouvá do apikálního meristému, kde se v komplexu s transkripčním faktorem FLD váže do promotoru *VRN1*, čímž ho aktivuje (Corbesier *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Distelfeld *et al.*, 2009). Jak tomu bylo i u předchozích dvou genů vernalizační dráhy, také alely *VRN3* určují ozimé a jarní odrůdy pšenice. Ozimé odrůdy nesou recesivní alely *vrn3*, ze kterých se insercemi v promotoru vyvinuly jarní dominantní alely *Vrn3* (Yan *et al.*, 2006). Kromě toho, že je *VRN3* aktivátorem kvetení, Sakuma a Schnurbusch (2020) pozorovali také jeho vliv na počet a vývoj klasů. Chen *et al.* (2022) objevili jednonukleotidovou delecí guaninu ve třetím exonu genu *VRN-D3*, která měla za následek opožděné kvetení a zároveň zvýšený počet klasů.

3.2.2 Fotoperiodická dráha

Fotoperiodická dráha umožňuje rostlinám vnímat délku dne (fotoperiodu) a podle svých nároků na ni reagovat. Rýže nebo kukuřice kvetou nezávisle na délce dne a označují se jako krátkodenní rostliny. Dlouhodenní rostliny, jako pšenice nebo *A. thaliana*, vyžadují pro iniciaci

kvetení působení dlouhých dnů (8–16 hodiny světla denně; Slafer *et al.*, 1995). I přes to, že je pšenice dlouhodenní rostlina, některé odrůdy jsou k fotoperiodě necitlivé a mohou kvést i při krátkých dnech (Bloomfield *et al.*, 2018). Tato citlivost vůči fotoperiodě je dána genem *PPD1*, jinak známý jako *PSEUDORESPONSE REGULATOR 37* (*PRR37*; Beales *et al.*, 2007). Recessivní alely (označovány koncovkou b, např. *ppd-A1b*) zajišťují senzitivitu vůči délce dne, necitlivost je pak dána přítomností dominantní alely *Ppd-D1a* (dominantní alely jsou označovány koncovkou a; McIntosh *et al.*, 2007). Regulace kvetení fotoperiodickou dráhou má větší význam u jarních odrůd pšenice, které nevyžadují vernalizaci, a tak je jejich načasování kvetení převážně závislé na fotoperiodické dráze. Ozimé odrůdy jsou vnímavé k délce dne po ukončení vernalizace (Levy *et al.*, 1972; Davidson *et al.*, 1985). Dalšími geny, ale již ne tak významnými, které jsou součástí fotoperiodické dráhy, jsou *PRR73*, lokalizovaný na chromozomu 4A (Zhang *et al.*, 2016) a *PPD-B2* nacházející se na chromozomu 7B (Khlestkina *et al.*, 2009). Oba dva geny jsou asociovány s raně kvetoucími odrůdami pšenice a jsou také spojeny s dalšími fenotypovými znaky jako výška rostliny nebo zvýšené množství proteinů v zrnech (Zhang *et al.*, 2016; Khlestkina *et al.*, 2009). Důležitou úlohu při vnímání světla rostlinou hrají také fytochromy a cirkadiální hodiny, které se také podílejí na regulaci fotoperiodické dráhy.

3.2.2.1 Fytochromy a cirkadiální hodiny

Rostliny využívají speciální fotoreceptory nazývané fytochromy, aby přizpůsobily svůj růst a vývoj světelným podmínkám (Rockwell *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2014). Tyto dimerické proteiny, jejichž funkcí je detekovat červené světlo a okolní teplotu (Jung *et al.*, 2016) se v rostlině nacházejí ve dvou formách – inaktivní formě Pr a aktivní formě Pfr. Inaktivní forma Pr se po vystavení rostliny červenému světlu, tedy během dne, mění na aktivní formu Pfr, která se translokuje do jádra, kde transkripčně reguluje dráhy ovlivňující kvetení. Ve tmě je aktivní forma Pfr opět převedena na neaktivní Pr (Quail, 2002; Nagatani, 2004). Hlavními fytochromy, které u pšenice interagují s *PPD1* jsou *PHYTOCHROME C* (*PHYC*) a *PHYTOCHROME B* (*PHYB*). Fytochromy regulují *PPD1* přes *EARLY FLOWERING 3* (*ELF3*), který je součástí cirkadiálních hodin, přesněji tzv. večerního komplexu (Turner *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2016). Podle studie Alvarez *et al.* (2023) je *ELF3* přímým represorem *PPD1*, ale také *VRN2* a hraje podstatnou roli v regulaci kvetení skrze *PPD1* a fytochromy.

Na fotoperiodické dráze pšenice se podílejí také cirkadiální hodiny, jejímž hlavním genem je *CONSTANS* (*CO*), přesněji jeho dva homology *CO1* a *CO2* (Higgins *et al.*, 2010). *CO* hraje u *A. thaliana* zásadní roli v cirkadiálních hodinách, kde indukuje kvetení při dlouhých

dnech, tzv. *CO*-dependentní dráha (Putterill *et al.*, 1995; Suarez-Lopez *et al.*, 2001). Nicméně u pšenice v přítomnosti funkčních alel *PPD1*, figurují *CO1* a *CO2* pouze jako velmi slabé represory kvetení, kdy jsou propojeny s vernalizační drahou jako induktory *VRN2*. *CO1* a *CO2* indukují kvetení přes aktivaci *VRN3* pouze v rostlinách s nefunkčním genem *PPD1*. *CO*-dependentní dráha má tak u pšenice jen malý efekt na regulaci kvetení oproti *A. thaliana* (Shaw *et al.*, 2020). *GIGANTEA (GI)* je dalším genem, který je součástí cirkadiálních hodin. Li *et al.* (2024) ve své studii demonstrovala účinek *GI* jako pozitivního regulátoru *VRN3* a negativního *CO1* a *CO2*. Přestože u *A. thaliana* mají cirkadiální hodiny, především tedy *CO*, zásadní vliv na regulaci kvetení pomocí vnímání světla (Putterill *et al.*, 1995; Suarez-Lopez *et al.*, 2001), u pšenice jejich role není tak zásadní (Faure *et al.*, 2012).

3.2.2.2 Gen *PPD1*

Geny *PPD1* se nacházejí na krátkém rameni chromozomů 2A, 2B a 2D (Scarath *et al.*, 1984) a patří do rodiny pseudo-responzivních regulátorů (Beales *et al.*, 2007). Pseudo-responzivní regulátory jsou skupinou proteinů, obsahující CCT doménu, které modulují oscilující procesy v rámci rostlin jako např. cirkadiální hodiny. U ozimých odrůd po dokončené vernalizaci je *PPD1* aktivován dlouhou fotoperiodou na jaře a v létě, zatímco u jarních odrůd je *PPD1* aktivní nezávisle na fotoperiodě. *PPD1* aktivuje gen *VRN3* v listu, jehož mobilní protein je transportován do apikálního meristému, kde iniciuje kvetení aktivací *VRN1* (Corbesier *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Studie Shaw *et al.* (2020) ukázala, že *PPD1* hraje důležitou roli také v regulaci *VRN2*. Ozimé odrůdy vysazené na podzim jsou před zimou vystaveny dlouhým dnům, kdy v tomto případě ale *PPD1* neaktivuje *VRN3*, ale naopak aktivuje represor kvetení *VRN2*, který je inhibován až na jaře po dokončené vernalizaci.

Jak již bylo zmíněno, *PPD1* alely můžeme rozdělit na sensitivní (recesivní) a nesensitivní (dominantní) vůči fotoperiodě (McIntosh *et al.*, 2007). Alely sensitivní (*ppd-1b*) musí být světelně aktivovány pomocí fytochromů *PHYC* a *PHYB*, které inaktivují negativní efekt *ELF3* na *PPD1* (Turner *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2016). Dominantní alely (*Ppd-1b*), které jsou necitlivé k fotoperiodě, jsou exprimovány nezávisle na délce dne a vznikly jako výsledek mutací recesivních alel (Wilhelm *et al.*, 2009; Beales *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2012)

3.2.3 Geny ranosti *per se*

Appendino a Slafer (2003) definují účinek *EPS* genů jako čas potřebný k metání po naplnění vernalizačního a fotoperiodického nároku. I přes to, že má rostlina stejnou konstituci *VRN* a *PPD* genů, dochází k rozdílům v době kvetení a tyto rozdíly jsou přisuzovány

právě *EPS* genům (Lauri *et al.*, 2004). Zikhali a Griffiths (2015) ve své práci popisují *VRN*, *PPD* a *EPS* geny jako šrouby světelného mikroskopu – geny vernalizační a fotoperiodické dráhy jako makrošroub a *EPS* geny jako šroub zaostřovací. Pro svůj malý efekt je těžké tyto geny identifikovat jinak, než pouze jako QTL (Miura *et al.*, 1999). U hexaploidní pšenice byl *EPS* lokus identifikován na dlouhém rameni chromozomu 1D a jako kandidátní gen byl kromě *MOLYBDENUM TRANSPORTER 1 (MOT1)* a *FILAMENTATION TEMPERATURE SENSITIVE H (FtsH4)* jako u diploidní pšenice, navrhnout ještě *ELF3* (Faricelli *et al.* 2010; Zikhali *et al.*, 2014). Dříve byly *EPS* geny považovány jako nezávislé na okolním prostředí, toto tvrzení se ale postupně vyvrací (Bullrich *et al.*, 2002; Gawroński *et al.*, 2014). Závislost *EPS* genů na prostředí, tak v budoucnu může pomoci šlechtitelům k zvýšení výnosů pšenice (Zikhali *et Griffiths*, 2015).

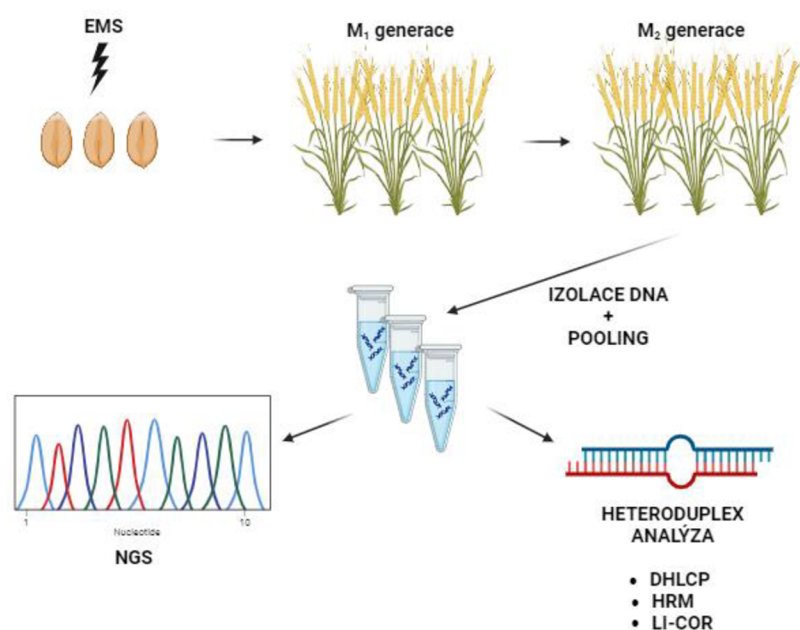
3.3 TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genomes)

Jednou z nejjednodušších cest, jak objasnit funkci genu je přístup přímé genetiky, který je založen na spojení fenotypu s mutací v genu. Opačným přístupem je reverzní genetiky, kdy je nejdříve nalezena mutace a ta je až následně přiřazena k fenotypu. K účelu studia funkce genů byly během let vytvořeny mutantní linie s mutacemi ve studovaných genech (Kurowska *et al.*, 2011). Jedním z přístupů, jak tyto linie vytvořit je TILLING, který může být použit jak k přímé, tak i k reverzní genetice (Szarejko *et al.*, 2016; Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023). TILLING byl poprvé použit McCallumem *et al.* (2000a, 2000b) u *A. thaliana* jako alternativa k inzerční mutagenézi. Kromě využití ve funkční genomice, se TILLING platforma stala užitečným pomocníkem ve šlechtitelství, kde nahradila transgenní přístup (Kurowska *et al.*, 2011).

Jednou z mnoha výhod TILLING je možnost aplikace na jakýkoli rostlinný druh nezávisle na velikosti genomu, ploidii nebo způsobu rozmnožování (Kurowska *et al.*, 2011). K vytvoření funkční platformy je potřeba menší množství rostlin (ve srovnání s jinými platformami) a jakmile dojde k jejímu vytvoření, je tato platforma dlouhotrvající, tzn., že jakmile je vytvořena, může být ve formě semínek udržována po jakkoli dlouhou dobu (Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023). Nevýhodou inzerční mutagenéze je tvorba především knock-out mutací, zatímco u TILLING je za použití chemických mutagenů vytvořeno celé spektrum mutací, které mohou vytvořit nové alely o různých „silách“. To je velkou výhodou u genů, jejichž úplné umlčení (jako u inzerční mutagenéze) by pro rostlinu mohlo být letální (Kurowska *et al.*, 2011; Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023). Poslední výhodou je, že při TILLING

přístupu nevznikají GM (geneticky modifikované) rostliny, jejichž způsob nakládání je v mnoha zemích, včetně EU, přísně regulováno (Kurowska *et al.*, 2011; Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023).

Obrovskou nevýhodou TILLING populací jsou mutace na pozadí, které mohou mít vliv na funkci studovaného genu. K jejich odstranění je potřeba zpětného křížení s rodičem, kdy se po každém takovém křížení počet mutací na pozadí sníží o polovinu. Cílem zpětného křížení je vytvořit mutanta v homozygotním stavu s co nejmenším počtem mutací na pozadí (Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023). Nové metody editace genomu jako CRISPR/Cas9, umožňují tvorbu mutací v zájmových genech bez vzniku mutací na pozadí a eliminují tak nutnost zpětného křížení (Irshad *et al.*, 2020; Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023). Další nevýhodou TILLING přístupu je velká časová náročnost přípravy platformy v homozygotním stavu (Kurowska *et al.*, 2011; Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023). Prvním časově náročným krokem k vytvoření TILLING linií je mutagenese semen a přípravy M₂ generace rostlin. Druhým krokem je identifikace vzniklých mutací, které mohou být spojeny s fenotypem. Nakonec je vytvořena databáze TILLING mutantů (Obrázek 4; Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023).



Obrázek 4: Schéma přípravy TILLING populací pšenice seté. Semena jsou v prvním kroku ošetřena chemickým mutagenem (nejčastěji EMS). Následně se semena množí až do M₂ generace, z které se odebírají vzorky pro izolaci DNA, které jsou pro zjednodušení a urychlení procesu poolovány. Po PCR oblastí našeho zájmu je provedena heteroduplex analýza (DHLPC, HRM, LI-COR) nebo sekvenování nové generace. Na základě výsledku je poté vytvořena databáze se všemi nalezenými mutacemi. Obrázek byl vytvořeno pomocí BioRender.

3.3.1 Tvorba TILLING populací

Prvním krokem v rámci TILLING platformy je vytvoření dostatečně velké zmutované populace, k čemuž se využívají chemické nebo fyzikální mutageny. Platí, že čím nižší je frekvence mutací v rámci genomu, tím je potřeba větší populace (Szarejko *et al.*, 2016; Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023). Frekvence tvorby mutací se u jednotlivých TILLING populací liší v závislosti na použitém mutagenu, ale pohybuje se přibližně v rozpětí jedné mutace na 20 kb až 7 Mb (Till *et al.*, 2018). Genetický materiál použitý k mutagenезi jsou nejčastěji semena, která jsou vhodná pro svou snadnou manipulaci a aplikaci mutagenu. Stejně tak je možné mutagen aplikovat u semen kdykoli, tudíž není mutagenезe závislá na vývojovém stádiu rostliny (Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023). Důležitým kritériem při přípravě TILLING populací je zvolená dávka mutagenu, protože příliš časté a velké mutace způsobené použitím vysoké dávky mohou vést k infertilitě a letalitě ošetřovaných semen. Naopak aplikací nízké dávky mutagenu se nemusí dosáhnout požadované frekvence mutací (Szarejko *et al.*, 2016). Za optimální dávku mutagenu je považována taková, která zpomalí růst u méně než 30 % rostlin (Maluszynski *et al.* 2009), i přes to se někdy mohou používat dávky vyšší (Martin *et al.* 2009). Nejčastěji používaným mutagenem je alkylační činidlo ethyl metansulfonát (EMS), který náhodně způsobuje bodové mutace záměnou G/A za C/T (Till *et al.*, 2003; Kurowska *et al.*, 2011). Dalšími používanými chemickými mutageny jsou N-methyl-N-nitrosomočovina (MNU) a azid sodný (NaN_3). Alkylační činidla mohou způsobovat nejen všechny typy bodových mutací, ale také větší chromozomové přestavby (Maluszynski *et al.* 2003). Cílem mutagenезe je tak vytvořit nové alely v rámci genů, které ovlivní jeho fenotyp a toho využít při studiu funkce genu (Szarejko *et al.*, 2016).

Po vystavení semen mutagenu, vzniká jejich naklíčením M_1 generace rostlin, které mají chimérickou povahu. Semeno je totiž tvořeno více buňkami a v každé z nich dochází k jiné mutaci. Dědičné mutace navíc vznikají pouze v buňkách zárodečné linie a k identifikaci dědičných mutací se tedy používají až rostliny M_2 generace. Jestliže je identifikována mutace v homozygotním stavu, fenotypová analýza může být provedena již v M_2 generaci. V opačném případě se homozygoti hledají v M_3 generaci a fenotyp je zkoumán v následných generacích. Všechny bodové mutace, které vznikají jsou náhodné, takže je potřeba vždy brát v potaz, že daný fenotyp mohou ovlivňovat mutace na pozadí v jiných genech. K odstranění těchto mutací se využívá zpětného křížení, kdy je mutantní rostlina křížená s rodičem. (Szarejko *et al.*, 2016)

3.3.2 Metody identifikace mutací

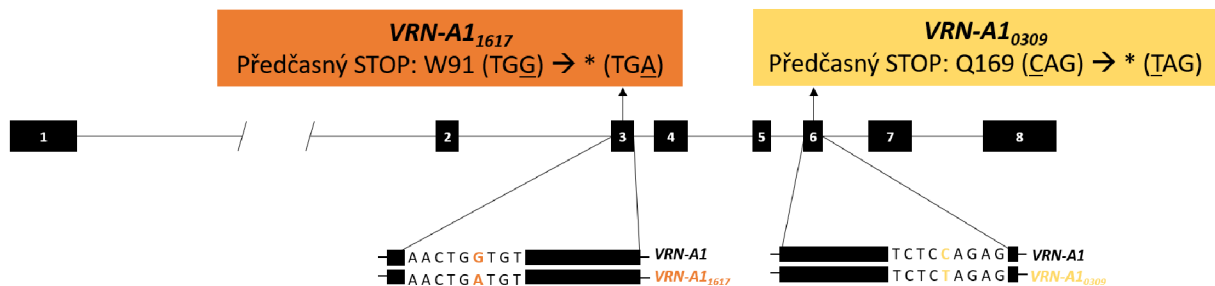
U každé rostliny M_2 generace je potřeba identifikovat mutace v genech a zhodnotit, zdali se jedná o homozygota nebo heterozygota pro danou mutaci. Během let se metody identifikace mutací vyvíjely a dnes jsou založeny převážně na sekvenování nové generace (NGS). Jelikož jsou v M_2 generaci stovky až tisíce rostlin, tak se pro identifikaci mutací využívá „poolování“, které celý proces zjednoduší a urychlí (Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023).

První použitou metodou byla denaturující vysokoúčinná kapalinová chromatografie (DHPLC; McCallum *et al.*, 2000a; McCallum *et al.*, 2000b). Princip této identifikační metody spočívá v PCR zájmových oblastí DNA M_2 rostlin (pool), při které vznikají hetero a homoduplexy, které jsou analyzovány DHPLC. Heteroduplexy se v záznamu projeví jako další signál. V případě rostlin, u kterých jsou zaznamenány heteroduplexy, se jejich PCR produkty osekvenují, aby se byla mutace přesně identifikována a popsána (Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023). Kromě DHPLC, i další metoda High-Resolution Melting (HRM) dokáže přímo identifikovat heteroduplexy (Gundry *et al.*, 2003; Surman-Zubrzycka *et al.*, 2017). Tato metoda je založena na poklesu fluorescence heteroduplexů v porovnání s homoduplexy, která nastává při analýze teploty tání (Kurowska *et al.*, 2011). Z DHPLC a HRM se postupně přešlo na metodu LI-COR (od firmy Lambda Instruments Corporation), která využívá endonukleázy štěpící heteroduplexy v místě mutace. Naštěpené heteroduplexy jsou poté vizualizovány na polyakrylamidovém gelu (Colbert *et al.*, 2001; Kurowska *et al.*, 2011). Nejčastěji používanou endonukleázou je u rostlin CEL I z celeru (Gottwald *et al.*, 2009). V dnešní době se k identifikaci mutací stále častěji využívá NGS, nejčastěji Illumina. Nevýhodou těchto metod je i přes stále klesající náklady jejich cena, pokud uvažíme množství rostlin, které musí být analyzovány. Z těchto důvodů se přistupuje pouze k sekvenování kódujících oblastí, tzv. „exome capture“ (Szurman-Zubrzycka *et al.*, 2023). Nejnovějším přístupem je metoda FIND-IT (Fast Identification of Nucleotide variants by droplet DigITal PCR), která celý proces identifikace mutací urychluje spojením „poolování“ velkého množství vzorků a ddPCR (Knudsen *et al.*, 2022).

3.3.3 TILLING linie pšenice seté Cadenza 0309 a Cadenza 1617

V rámci této diplomové práce byly použity dvě TILLING linie jarní odrůdy pšenice seté Cadenza (CAD), které byly vybrány v databázi Ensembl Plants. Jako mutagen k tvorbě těchto TILLING linií byl použit EMS. Použitá semena byly z M_4 generace.

Obě tyto linie, označené CAD 0309 a CAD 1617, mají bodovou mutaci v genu *VRN-A1α*, která způsobuje předčasný stop kodon (Obrázek 4). CAD 0309 má mutaci v exonu 6, kdy došlo k záměně C za T, což má za následek zkrácení VRN-A1 proteinu z 244 aminokyselin na 169. U CAD 1617 došlo k záměně G za A v exonu 3 a zkrácení proteinu na 91 aminokyselin. Mutantní proteiny u obou TILLING linií, tak přišly o C-terminální doménu, jejíž funkcí je tvorba dimerů/multimerů a transkripční aktivace (Kaufmann *et al.*, 2005). Zároveň CAD 0309 přišla o část a CAD 1617 o téměř celou K doménu podílející se na protein-protein interakci a dimerizaci (Kaufmann *et al.*, 2005).



Obrázek 5: Jednonukleotidové mutace v genu *VRN-A1* u TILLING linií CAD 0309 a CAD 1617. CAD 1617 má SNP v exonu 3, kde došlo ke změně z G na A za vzniku předčasného stop kodonu TGA. U CAD 0309 došlo k mutaci v exonu 6 (C za T) za vzniku předčasného stop kodonu TAG.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

V rámci diplomové práce bylo pracováno s třemi liniemi pšenice seté, kultivar Cadenza. Jednalo se o wild-type (CAD 0000) a o dvě mutované linie nesoucí předčasný stop kodon v genu *VRN-A1a* (CAD 1617 a CAD 0309). Mutant CAD 0309 nese jednonukleotidovou mutaci v exonu 6 (CAG → TAG). Mutant CAD 1617 má SNP v exonu 3 (TGG → TGA). Mutantní linie jsou podrobně popsány v kapitole 3.3.3 TILLING linie pšenice seté Cadenza 0309 a Cadenza 1617.

Rostliny byly naklíčeny na Petriho misce s vlhkou buničinou a filtračním papírem a na 7 dní uloženy v 6 °C ve tmě k synchronizaci klíčení. Poté byla semena přenesena do fytotronu, kde po vyklíčení byla přesazena do jifů se zahradnickým substrátem a po přibližně 7 dnech do květináčů (15x15 cm) a ošetřena travním hnojivem. Všechny rostliny v rámci diplomové práce byly dále pěstovány ve fytotronu v kontrolovaných podmínkách, které jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Kontrolované podmínky pěstování pšenice ve fytotronu

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

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- Agaróza (Top-Bio, kat. č. P045)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, kat. č. B0126)
- BseNI (Thermo Fisher, kat. č. ER0881)
- Buffer B (Thermo Fisher, kat. č. BB5)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleotidy (Sigma-Aldrich, kat. č. DNTP100-1KT)
- EDTA (kyselina ehyldiamintetraoctová) (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134)
- Ethidium bromid (Top-Bio, kat. č. P047)
- Ethylalkohol pro UV spektroskopii

- Ethylalkohol pro UV Spektroskopii (Lach:ner, kat. č. 20025-A99-M1000-1)
- Exonuclease I (Thermo Fisher, kat. č. EN0581)
- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher, kat. č. EF0654)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, kat. č. G5516)
- Kyselina boritá (Sigma-Aldrich, kat. č. B7660-500G)
- Marker molekulové hmotnosti GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher, kat. č. SM1331)
- Marker molekulové hmotnosti GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher, kat. č. SM0321)
- PCR Blue Buffer (TopBio, kat. č. T058)
- rCutSmart Buffer (BioLabs, kat. č. B6004S)
- ROTI® Nucleic Acid-free extra (Roth, kat. č. 1312.4)
- Taq DNA polymeráza (TopBio, kat. č. T032)
- Tekutý dusík
- Tris (Sigma-Aldrich, kat. č. T1503)
- XbaI (BioLabs, kat. č. R0145S)
- Xylenecyanol (Sigma-Aldrich, kat. č. X4126)

4.2.2 Použité soupravy

- HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis Biodne, kat. č. 01-02-00500)
- NucleoSpin® Plant II kit (Macherey-Nagel, kat. č. 740770)
- PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Takara Bio, kat. č. R050A)
- qPCR 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, kat. č. P553)
- Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS) (Thermo Fisher, kat. č. Q33230)
- Quick-RNA® MiniPrep (Zymo Research, kat. č. R1055)
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher, kat. č. K1621)
- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems™, kat. č. 4337455)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

- 5× TBE pufr: 54 g Tris + 27,5 g kyseliny borité + 20 ml 0,5 mol·l⁻¹ EDTA (pH 8), doplnit destilovanou vodou do objemu 1 000 ml.

- 6× STOP C (10 ml): 2 ml 0,5 mol·l⁻¹ EDTA + 5 mg bromfenolové modři, 5 mg xylenecyanolu a 4,3 ml 99,9% glycerolu, doplnit destilovanou vodou do 10 ml.
- Pracovní roztok ethidium bromidu (1 000 ml): 50 mg ethidium bromidu + 100 ml deionizované vody, doplnit na 1 000 ml

4.3 Seznam použitých přístrojů, zařízení a programů

- C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad)
- C1000 Touch Thermal Cycler CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad)
- CFX Maestro 2.0 software (Bio-Rad)
- Digitální předvážky (Shinko Denshi)
- Geneious Prime (Dotmatics)
- Homogenizátor MM301 (Retsch)
- Horizontální elektroforetická komora se zdrojem napětí (Bio-Tech)
- Chlazená mikrocentrifuga Fresco 17 (Thermo Scientific)
- Laminární box (Thermo Electron Industrie SAS)
- Mikrovlnná trouba (Daewoo)
- MS Excel (Microsoft)
- myFuge minicentrifuga (Benchmark)
- NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer, program ND-1000 V3.8.1 (Thermo Fisher Scientific)
- Qubit 4 fluorometr (Thermo Fisher)
- Růstová komora (fytotron; Weiss Gallenkamp)
- Sekvenátor ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems)
- Sekvenátor Illumina NovaSeq (Illumina)
- Třepačka Reax Top (Heidolph)
- Vodní lázeň (Julabo, TW8)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace DNA

K izolaci DNA byly odebrány listy do zkumavky se skleněnou kuličkou, které byly zmrazeny tekutým dusíkem a homogenizovány pomocí homogenizátoru MM301 (Retsch) po dobu 2,5 minuty s frekvencí 30 Hz. Samotná izolace byla provedena kitem NucleoSpin® Plant II kit (Macherey-Nagel) podle návodu výrobce. Koncentrace získané DNA byla změřena na NanoDropu One Microvolume UV-Vis a poté uchovávána při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.2 Sekvenování *VRNI* genu

Sekvenování mutantů CAD 0309, CAD 1716 a wild-typu byla provedena za účelem ověření přítomnosti dané mutace a zároveň k vyloučení dalších mutací v genu, které by mohly zkreslovat výsledky. Část genu až po exon 7 (~ 11 kb) byl sekvenován pomocí sekvenování nové generace Illumina a zbytek genu (~ 0,7 kb), včetně exonu 8, pomocí Sangerova sekvenování.

4.4.2.1 Illumina sekvenování

Amplifikace (PCR)

Část genu *VRNI* po exon 7 byl amplifikován pomocí PrimeSTAR® GXL DNA polymerázy (Takara Bio) v C1000 Touch Thermal cycleru (Bio-Rad) s hlubokými jamkami. Složení reakce, primery a teplotní průběh reakce jsou v Tabulkách 2, 3 a 4. Primery byly použity univerzální na všechny tři alely genu *VRNI*. Velikost výsledného produktu je přibližně 11 kb.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro amplifikaci genu *VRNI* po exon 7

Složka reakční směsi	Objem na 1 reakci [μl]
5X PrimeSTAR GXL pufr	10
dNTPs; $2,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	4
Forward primer; $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1
Reverse primer; $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1
Templát DNA	100–150 ng
PrimeSTAR® GXL DNA polymeráza, $1,25\text{ U}/\mu\text{l}$	1
Deionizovaná voda	doplnit do 50
Celkový objem	50

Tabulka 3: Sekvence primerů použitých k a amplifikaci genu *VRN1* po exon 7

Gen	Sekvence (5'→3')	Produkt	Literatura
VRN1_F	GCTGAAGCGGATCGAGAACAAGATCA	11 kb	Strejčková <i>et al.</i> , 2021
VRN1_R	CTGCAAGGAACAACCCGACCAATTCAAAAG		

Tabulka 4: Teplotní podmínky k amplifikaci genu *VRN1* po exon 7

Teplota [°C]	Čas	Opakování
98	10 s	30
68	10 min	

Elektroforetická separace PCR produktů

Přítomnost produktu byla ověřena elektroforetickou separací v 0,8% agarózovém gelu v 0,5X TBE pufru. Vzorek byl smíchán s 6x STOP C a jako velikostní marker byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher). Gel byl po separaci obarven v ethidiumbromidu a vizualizován na UV transiluminátoru InGenius LHR (Syngene). Koncentrace produktu byla změřena na Qubit 4 fluorometru (Thermo Fisher).

Sekvenování a vyhodnocení sekvenčních dat

Sekvenování bylo provedeno paní laborantkou Helenou Tvrdíkovou a Kateřinou Holušovou, PhD., na přístroji Illumina NovaSeq (Illumina). Sekvenační data byla zpracována pomocí GeneiousPrime (Dotmatics).

4.4.2.2 Sangerovo sekvenování

Amplifikace (PCR)

K amplifikaci genu *VRN1* od intronu 7 byla použita HOTFIRE[®] polymeráza a C1000 Touch Thermal cycler (Bio-Rad). Amplifikovaly se všechny tři alely genu *VRN1* třemi páry primerů. Jako forward primer pro amplifikaci alely *VRN-D1* byl použit forward primer pro amplifikaci alely *VRN-B1*. Složení reakce, použité primery a teplotní průběh amplifikace je v Tabulkách 5, 6 a 7.

Tabulka 5: Složení reakční směsi k amplifikaci genu *VRN1* od intronu 7

Složka reakční směsi	Objem na 1 reakci [μl]
10X pufr B1	1,50
MgCl ₂ , 2,5 mmol·l ⁻¹	1,05
dNTPs; 2 mmol·l ⁻¹	1,50
Forwad primer; 100 mmol·l ⁻¹	0,04
Reverse primer; 100 mmol·l ⁻¹	0,04
Templát DNA	10–20 ng
HOTFIREPol® DNA polymeráza; 5U/μl	1,00
Deionizovaná voda	doplnit do 15,00
Celkový objem	15,00

Tabulka 6: Sekvence primerů a jejich podmínky pro amplifikaci genu *VRN1* od intronu 7

Gen	Primery	Sekvence (5'→3')	Teplota nasedání a velikost produktu	Literatura
<i>VRN-A1</i>	VRNA1ex8_F	CAAACCTCAGCCTCAAACCAGC	64,5 °C	Strejčková <i>et al.</i> , 2021
	VRNA1ex8_R	AAACAACACCCAGTAGAGACGG	639 bp	
<i>VRN-B1</i>	VRNB1ex8_F	ACTCAGCCTCAAACAAGCTCT	64,5 °C	Strejčková <i>et al.</i> , 2021
	VRNB1ex8_R	ATTCACATAAACAACACCCGCTC	629 bp	
<i>VRN-D1</i>	VRNB1ex8_F	ACTCAGCCTCAAACAAGCTCT	64,5 °C	Strejčková <i>et al.</i> , 2021
	VRND1ex8_R	ACATCCCACTAGAGACGGGTAT	617 bp	

Tabulka 7: Teplotní průběh amplifikace genu *VRN1* od intronu 7

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	15 min	1
Denaturace	95	30 s	
Nasedání primerů	podle primerů	30s	34
Elongace	72	1 kb/min	
Závěrečná elongace	72	5 min	1

Elektroforetická separace PCR produktů

K separaci a vizualizaci produktů byla použita elektroforetická separace v 1,5% agarózovém gelu. Vzorek byl smíchán s 6x STOP C a jako marker molekulové hmotnosti byl použit GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher). Gel byl po obarvení v ethidiumbromidu vizualizován na UV transiluminátoru InGenius LHR (Syngene). Koncentrace produktů byla změřena na Qubit 4 fluorometru (Thermo Fisher).

Purifikace PCR produktů

K enzymatickému přečištění PCR produktů byly použity enzymy FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Fisher) a Exonuclease I (Thermo Fisher). Složení reakční směsi a teplotní průběh reakce je v Tabulkách 8 a 9.

Tabulka 8: Složení reakční směsi k přečištění PCR produktů před sekvenační reakcí

Složka reakční směsi	Objem na 1 reakci [μ l]
PCR produkt	1–4 μ l
Exonukleáza I; 20 U/ μ l	0,05
FastAP, 1 U/ μ l	0,50
1X pufr 1	doplnit do 7,00
Celkový objem	7,00

Tabulka 9: Teplotní průběh reakce k přečištění PCR produktů před sekvenační reakcí

Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas
37	30 min
95	5 min

Sekvenační reakce

K sekvenační reakci byl použit komerčně dostupný kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems™) a C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad). Složení reakční směsi a teplotní průběh reakce jsou v Tabulkách 10 a 11. Primery byly použity stejné jako pro amplifikaci genu *VRNI* od intronu 7 (Tabulka 6).

Tabulka 10: Složení sekvenační reakce k sekvenování genu *VRN1* od intronu 7

Složka reakční směsi	Objem na 1 reakci [μ l]
5X sekvenační pufr	1,5
BigDye	0,5
Primer; 10 mmol·l ⁻¹	1,0
Purifikovaný PCR produkt	5–20 ng (2,0–3,5 μ l)
Deionizovaná voda	doplnit do 10,0
Celkový objem	10,0

Tabulka 11: Teplotní průběh sekvenační reakce k sekvenování genu *VRN1* od intronu 7

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

Sekvenování a vyhodnocení sekvenačních dat

Samotné sekvenování bylo provedeno paní laborantkou Ing. Marií Seifertovou. Sekvenační data byla zpracována pomocí programu GeneiousPrime (Dotmatics).

4.4.3 Zpětné křížení mutantů

Ke křížení byli použiti mutanti CAD 0309 a CAD 1617 M₄ generace, kteří byli křížení s wild-typem CAD 0000 k zafixování dané mutace a zároveň k odstranění mutací na pozadí. Část klasů vzniklých kříženců byla samosprášena a další část použita ke křížení s CAD 0000.

Prvním krokem křížení je kastrování klasů (Obrázek 6). Klas vhodný ke kastrování je přibližně ze dvou třetin až tři čtvrtin vysunut z obalu. Z klasu jsou odstraněny nejmenší spodní a horní klásky, které jsou opožděny ve vývoji, stejně tak jako prostřední květy u každého klásku. Zbylým kláskům jsou ušříženy vršky obalů, díky čemuž lze z každého klásku odstranit tři nezralé tyčinky. Na takto vykastrované klasy jsou nasazeny papírové sáčky, aby se zabránilo opylení nežádoucím pylem. Zhruba po 3 až 6 dnech může být přistoupeno k druhému kroku křížení – opylení. K tomu jsou použity zralé tyčinky, které obsahují pyl. Těmi jsou poklepávány zralé blizny ve vykastrovaných klasech. Po opylení je klas znovu uzavřen do papírového sáčku. Po týdnu je kontrolována tvorba semen, které jsou po dozrání sklizeny.



Obrázek 6: Vykastrovaný klas. Vykastrovaný klas je zbaven horních a spodních klásků a prostředních květů, které jsou opožděny ve vývoji. Dále jsou odstřiženy vršky obalů a odstraněny všechny tyčinky. Na takto vykastrované klasy jsou nasazeny papírové sáčky k zabránění opylení nežádoucím pylem.

4.4.4 Fenotypová analýza rostlin

Jako sledovaný fenotyp byla vybrána doba metání, která je definována jako časový úsek od vysazení rostliny po vysunutí právě poloviny prvního klasu z listu (fáze 55 podle Zadoksovy stupnice; Zadoks *et al.*, 1974). Doba metání u jednotlivých skupin rostlin byla statisticky vyhodnocena v Excelu (Microsoft) ANOVA analýzou s post hoc Tukeyovým testem.

4.4.5 Genotypování mutantů

U vzniklých kříženců F_2 generace bylo potřeba rozlišit přítomnost wild-type a mutantní alely *Vrn-A1a*₀₃₀₉/*Vrn-A1a*₁₆₁₇. Přestože s mutantem CAD 1617 se z důvodu neúspěšného křížení dále nepokračovalo, genotypování bylo navrženo i pro něho. Prvním krokem genotypování byla amplifikace exonu 6 u CAD 0309 a exonu 3 u CAD 1617. Poté následovalo sekvenování nebo enzymatické štěpení v místě SNP, které rozlišilo mutantní alelu od wild-type alely.

Návrh primerů

Sekvence genu *VRN1* pro návrh primerů byla převzata z EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org/index.html>). Primery byly navrženy v GeneiousPrime (Dotmatics) pomocí programu Primer3. Pro identifikaci *Vrn-A1a*₀₃₀₉ alely byly primery navrženy na exon 6 genu *VRN-A1* a pro alelu *Vrn-A1a*₁₆₁₇ na exon 3. Pro oba mutanty bylo navrženo více páru primerů a z nich byl poté vybrán ten nejvhodnější, který byl použit pro genotypování.

Amplifikace exonů 3 a 6 genu *VRN-A1*

K amplifikaci exonů 3 a 6 byla použita Taq DNA polymeráza (TopBio) s PCR Blue Buffer (TopBio). K amplifikaci byl použit C1000 Touch Thermal cycler (Bio-Rad). Složení reakční směsi, použité primery a teplotní průběh reakce je v Tabulkách 12–14.

Tabulka 12: Složení reakční směsi k amplifikaci exonů 3 a 6 genu *VRN-A1*

Složka reakční směsi	Objem na 1 reakci [μ l]
10X PCR Blue Buffer	2,0
dNTPs; 2 mmol \cdot l ⁻¹	0,4
Forward primer; 10 mmol \cdot l ⁻¹	1,0
Reverse primer; 10 mmol \cdot l ⁻¹	1,0
DNA templát	10–20 ng
Deionizovaná voda	doplnit do 20,0
Celkový objem	20,0

Tabulka 13: Seznam použitých primerů k rozlišení mutantních alel od wild-type alely

Alela	Primery	Sekvence (5'→3')	Teplota nasedání a velikost produktu
<i>Vrn-</i>	CAD0309_gF4	CAGGGAAACTGGTGTCACGA	65 °C
<i>A1a₀₃₀₉</i>	CAD0309_gR4	ATCACCTGGTATTTGCGGCA	895 bp
<i>Vrn-</i>	CAD1617_gF2	TGCTATCCATGTGCCAGAGC	65 °C
<i>A1a₁₆₁₇</i>	CAD1617_gR2	TGCAAGGTTGACAGCTTACCT	744 bp

Tabulka 14: Teplotní průběh reakce amplifikace exonů 3 a 6 genu *VRN-A1*

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	3 min	1
Denaturace	94	30 s	
Nasedání primerů	podle primerů	30 s	35
Elongace	72	1 min/kb	
Závěrečná elongace	72	10 min	1

Elektroforetická separace PCR produktů

Úspěšnost amplifikace byla ověřena elektroforetickou separací v 1,5% agarózovém gelu. PCR produkt byl smíchán s 6X STOP C a jako marker molekulové hmotnosti byl použit GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher). Gel byl následně obarven v ethidiumbromidu a vizualizován na UV transiluminátoru InGenius LHR (Syngene).

Enzymatické štěpení

PCR produkty amplifikace exonů 3 a 6 byly dále použity pro štěpení rozlišující mutantní alely od wild-type alely. Sekvence exonu 3 a 6 získané z EnsemblPlants, byly podrobeny restriční analýze v Geneious Prime (Dotamtics) a na jejím základě byly vybrány enzymy, jejichž restriční místa se nacházejí buďto pouze ve SNP mutantu nebo pouze u wild-type.

Pro rozlišení wild-type a *Vrn-A1a1617* alely byl zvolen restriční enzym BseNI (Thermo Fisher) s restričním místem 5'...ACTGGN~...3', které je přítomno v místě SNP u wild-type alely. V rámci ampikonu se nacházejí ještě další dvě štěpná místa společná jak pro wild-type, tak pro *Vrn-A1a1617* alelu. Enzym BseNI štěpí wild-type alelu na čtyři fragmenty o velikostech 296, 248, 118 a 83 bp. U *Vrn-A1a1617* alely jsou výsledkem štěpení tři fragmenty o velikostech 331, 296 a 118 bp. Složení reakční směsi a teplotní průběh reakce jsou v Tabulkách 15 a 16.

Tabulka 15: Složení reakční směsi pro štěpení pomocí enzymu BseNI

Složka reakční směsi	Objem na 1 reakci [μl]
PCR produkt	100 ng
10X Buffer B	2
BseNI	1
Deionizovaná voda	doplnit do 32
Celkový objem	32

Tabulka 16: Teplotní průběh štěpení pomocí enzymu BseNI

Proces	Teplota [°C]	Čas
Inkubace	65	16 hod
Inaktivace	80	20 min

Pro genotypování CAD 0309 byl vybrán enzym XbaI (BioLabs), kdy SNP u CAD 0309 je součástí jeho restrikčního místa 5'...T~CTAGA...3'. U CAD 0000 i CAD 0309 se v rámci ampliconu nachází ještě jedno restrikční místo. Amplicon CAD 0309 je tedy enzymem štěpen na tři fragmenty o velikostech 354, 321 a 220 bp, zatímco amplicon u CAD 0000 je štěpen na dva fragmenty – 541 a 354 bp. Složení reakční směsi a teplotní průběh reakce jsou v Tabulkách 17 a 18.

Tabulka 17: Složení reakční směsi pro štěpení pomocí enzymu XbaI

Složka reakční směsi	Objem na 1 reakci [μl]
PCR produkt	100 ng
10X rCutSmart pufr	5
XbaI	1
Deionizovaná voda	doplňt do 50
Celkový objem	50

Tabulka 18: Teplotní průběh štěpení pomocí enzymu BseNI

Proces	Teplota [°C]	Čas
Inkubace	37	16 hod
Inaktivace	65	20 min

Elektroforetická separace produktů štěpení

Naštěpené amplicony CAD 0309 a CAD 1617 byly smíchány s 6X STOP C a separovány 3 hodiny v 2% agarózovém gelu při 55 V. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher). Gel byl následně obarven v ethidiumbromidu a vizualizován na UV transiluminátoru InGenius LHR (Syngene).

Sangerovo sekvenování

CAD 0309 byl genotypován také Sangerovým sekvenováním za použití stejných primerů jako pro genotypování pomocí štěpení (Tabulka 16). Purifikace PCR produktů, sekvenační reakce i vyhodnocení dat probíhal stejně jako v případě sekvenování genu *VRN1* od intronu 7.

4.4.6 Analýza relativní exprese genů vernalizační dráhy

Izolace RNA

K analýze exprese genů byly odebírány listy ve čtyřech/třech časových odběrech. První odběr byl proveden u rostlin ve stádiu tří listů a následující odběry vždy po dvou týdnech od toho předchozího. Listy byly odebrány do mikrozkušavky se skleněnou kuličkou a vloženy do tekutého dusíku. Následně byly zhomogenizovány na homogenizátoru MM301 (Retsch) – 2,5 minuty, 30 Hz. Izolace RNA byla provedena komerčně dostupným kitem Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research) podle návodu výrobce. Pomocí NanoDropu One Microvolume UV-Vis byla změřena koncentrace vyizolované RNA. Po celou dobu bylo se vzorky zacházeno tak, aby nebyly kontaminovány RNázami. Vzorky byly uchovávány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Reverzní transkripce

Za pomoci komerčního kitu RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher) byla RNA převedena do cDNA podle návodu výrobce. K reverzní transkripci byly využity oligo (dT)₁₈ primery. Množství RNA k převodu bylo zvoleno tak, aby výsledné množství cDNA bylo u každého vzorku stejné. Po celou dobu bylo s vzorky pracováno v laminárním boxu určeným pro práci s RNA. Převedená cDNA byla uchovávána v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kvantitativní PCR s reverzní transkripcí

RT-qPCR byla prováděna v 96jamkové destičce v cycleru C1000 Touch Thermal Cycler CFX96TM Real-Time Systém (Bio-Rad). Vzorky byly pipetovány ve dvou technických opakováních. Byl také použit inter-run calibrator (IC), který slouží pro srovnání jednotlivých destiček mezi sebou. IC byl připraven smícháním všech vzorků použitých pro RT-qPCR. Data byla vyhodnocena za použití $2^{-\Delta\Delta C_q}$ metody pomocí softwaru CFX Maestro 2.0 software (Bio-Rad) Analýza relativní exprese byla prováděna pro geny vernalizační dráhy *VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN2* a *FT-A1*, jako referenční gen byl zvolen gen *GLYCERALDEHYD-3-FOSFÁT DEHYDROGENÁZA (GAPDH)*. Složení reakce a její teplotní průběh je v Tabulkách 19 a 21. Použité primery jsou v Tabulce 20. K statistické analýze byla použita ANOVA s následným post hoc Tukeyova testem (Excel; Microsoft) a Wilcoxonův test (<https://www.statskingdom.com>).

Tabulka 19: Složení reakční směsi RT-qPCR k analýze relativní exprese genů vernalizační dráhy u wild-typu a mutantů

Složka reakční směsi	Objem na 1 reakci [μ l]
2X SYBR Master mix	7,5
Forward primer; 10 mmol·l ⁻¹	1,0
Reverse primer; 10 mmol·l ⁻¹	1,0
cDNA templát, 10 ng/ μ l	1,0
Deionizovaná voda	4,5
Celkový objem	15,0

Tabulka 20: Primery použité k analýze relativní exprese genů vernalizační dráhy u wild-typu a mutantů

Gen	Primery	Sekvence (5'→3')	Literatura
<i>VRN-A1</i>	VRNA1long-F1	TCCACCGAGTCATGTATGGA	Kippes <i>et al.</i> , 2018
	VRNA1long-R1	GAGAACCTTTTCTGCATAAGAA	
<i>VRN-B1</i>	VRNB1_ex_F2	TCAGCCTCAAACAAGCTCTTCT	Strejšková <i>et al.</i> , 2021
	VRNB1_ex_R1	CTCTGCCCTCTCTCCTGATG	
<i>VRN2</i>	VRN2_QF	CCGACACATGGCTCACCTAGTG	Xu <i>et al.</i> , 2021
	VRN2_QR	TTGCTTCATTGCTAATAGTGTTTGT	
<i>FT-A1</i>	TaFT-A1 R	CGAGCTGCTGGAAGAGC	Shaw <i>et al.</i> , 2012
	TaFT-A1 F	GGTACAACCTGGTGCCTCGTT	
<i>GAPDH</i>	GAPDH_F	TTAGACTTGCGAAGCCAGCA	Sun <i>et al.</i> , 2014
	GAPDH_R	AAATGCCCTTGAGGTTTCCC	

Tabulka 21: Teplotní průběh RT-qPCR k analýze relativní exprese genů vernalizační dráhy u wild-typu a mutantů

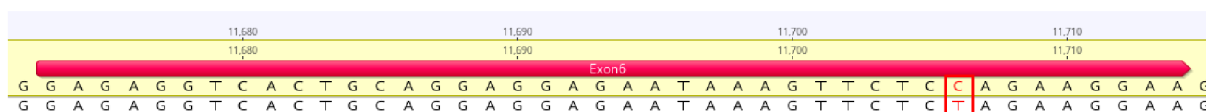
Proces	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	5 min	1
Denaturace	94	10 s	
Nasedání primerů	60	40 s	45
Elongace	72	10 s	
Závěrečná elongace	65→94	0,5 $^{\circ}$ C / s	1

5 VÝSLEDKY

5.1 Sekvenování genu *VRN1*

K ověření, že se v genu *VRN-1* nenacházejí žádné další mutace, které by mohly mít vliv na sledované znaky (doba metání a relativní exprese genů vernalizační dráhy) byla z každého genotypu (CAD 0000, CAD 0309 a CAD 1617) vybrána jedna rostlina, u které byl gen *VRN-1* osekvenován. Sekvenování bylo rozděleno na dvě části – sekvenování genu po exon 7 pomocí Illumina sekvenování a sekvenování zbylé části genu od intornu 7 Sangerovým sekvenováním.

U mutantů nebyly nalezeny žádné další mutace genu *VRN-1*, kromě již zmíněné jednonukleotidové mutace způsobující předčasný stop kodon. Stejně tak nebyly nalezeny žádné mutace u wild-typu. Sekvenování tedy potvrdilo, že se v rámci genu *VRN-1* nenacházely žádné další mutace, které by ovlivňovaly jeho expresi a funkci a zároveň potvrdilo přítomnost SNP způsobující předčasný stop kodon (Obrázek 7). Jedná se však o TILLING linie, takže nemohou být vyloučeny mutace na pozadí – v dalších genech, které by mohly ovlivňovat chování *VRN-1* nebo jinak zkreslovat zjištěné výsledky.



Obrázek 7: Výsledky sekvenování genu *VRN-1* u CAD 0000 a CAD 0309 s přiblížením na exon 6. Výsledky Illumina sekvenování části genu po exon 7 genu *VRN-1* u CAD 0000 a CAD 0309 s přiblížením na exon 6, ve kterém se u CAD 0309 nachází předčasný stop kodon. Horní sekvence (žlutá) patří CAD 0000, spodní sekvence (bílá) patří CAD 0309. V rámci exonu 6 se nachází SNP (červený obdélník), který u CAD 0309 způsobuje předčasný stop kodon TAG.

5.2 Křížení

V rámci diplomové práce bylo křížení provedeno dvakrát – křížení M_4 generace a následné křížení vzniklé F_1 generace. Jednalo se o zpětné křížení, tedy křížení mutantů s wild-typem k odfiltrování genetického pozadí a k fixaci SNP v genu *VRN-1* u mutantů CAD 0309 a CAD 1617.

5.2.1 Křížení M_4 generace

Pro křížení M_4 generace bylo pěstováno celkem 30 rostlin – 10 rostlin CAD 0000, 10 rostlin CAD 0309 a 10 rostlin CAD 1617. Mutanti CAD 0309 a CAD 1617 byli kříženi s wild-typem CAD 0000 nezávisle na tom, který genotyp bude donorem pyly. U mutantů

CAD 0309 se podařilo nakřížit celkem 4 z 10 rostlin o celkovém počtu 14 semen (Obrázek 8), která byla všechna naklíčena a použita pro další křížení (5.2.2 Křížení F₁ generace). U mutanta CAD 1617 křížení nebylo úspěšné a nepodařilo se tak získat žádná semena generace F₁. Neúspěšnost při křížení jak CAD 1617, tak CAD 0309 mohla být způsobena mutacemi na pozadí, jelikož se jedná o TILLING linie nebo špatným výběrem vývojového stádia prašníku.



Obrázek 8: Úspěšně nakřížené klasy. Na obrázku jsou ukázané úspěšně nakřížené klasy mutanta CAD 0309 s wild-typem. Černé šipky ukazují na vzniklá semena F₁ generace.

5.2.2 Křížení F₁ generace

Semena (F₁) získaná křížením mutantů M₄ generace byla dále použita ke křížení za vzniku F₁BC₁ generace. Ke křížení byl opět použit wild-type a celkově bylo získáno 19 semen. S těmito semeny se z časových důvodů (dlouhá generační doba pšenice) dále nepracovalo, ale byly archivovány pro budoucí práci. Semena F₁ generace, která nebyla využita pro křížení, byla ponechána k samosprášení, z kterého vznikla semena F₂ generace. U těchto rostlin pak byla provedena analýza relativní exprese genů vernalizační dráhy.

5.3 Fenotypová analýza rostlin

Jako fenotyp byla sledována doba metání, která je definována jako časový úsek mezi vysazením rostliny a začátkem kvetení, za které je zde považováno vysunutí poloviny prvního klasu z listu (fáze 55 podle Zadoksovy stupnice; Zadoks *et al.*, 1974). Pro každý genotyp byla stanovena průměrná doba metání, která byla statisticky vyhodnocena pomocí ANOVA testu

a post hoc Tukeyova testu v Excelu (Microsoft). Fenotypová analýza byla provedena u více skupin rostlin. První skupinou bylo 30 rostlin mutantů CAD 0309 a 1617 a wild-typu CAD 0000 určené ke křížení. Druhá skupina obsahovala 4 rostliny z každého genotypu (celkem 12 rostlin), u kterých byla také analyzována relativní exprese genů vernalizační dráhy – *VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN2* a *FT-A1*. Další skupinou, kde byl sledován fenotyp, byly rostliny F₁ generace.

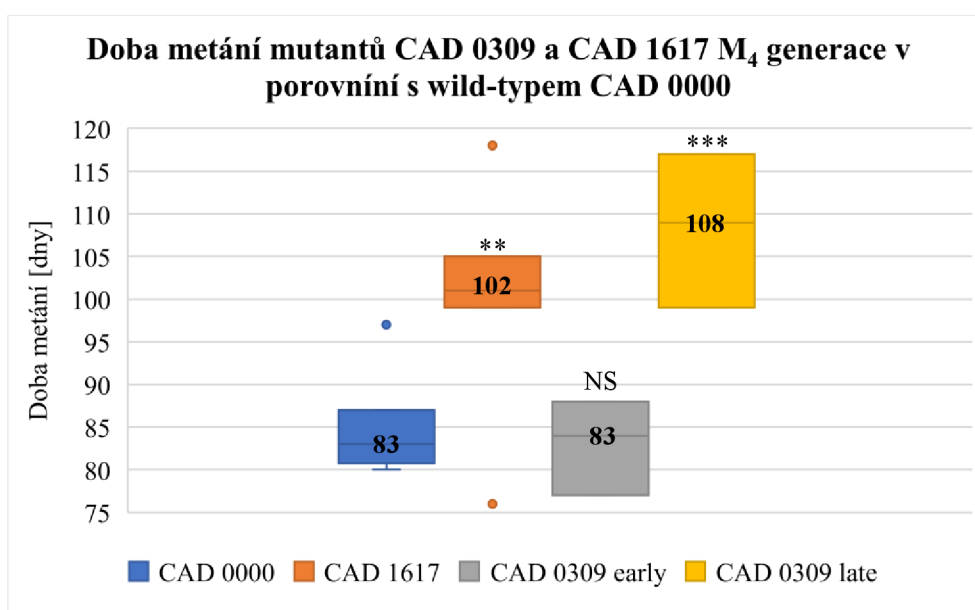
5.3.1 Fenotypová analýza rostlin M₄ generace

Z genotypu CAD 0000 bylo pěstováno 10 rostlin s průměrnou dobou metání 83 dní. Ve skupině se nacházela také jedna rostlina s odlehlou hodnotou metání (97 dní). Rostliny genotypu CAD 0309 byly na základě různých dob metání rozděleny do tří subpopulací, které byly následně potvrzeny také analýzou exprese genů vernalizační dráhy u skupiny rostlin určených k jejich analýze. Byly rozděleny na subpopulace CAD 0309 „early“ (raně kvetoucí; 3 rostliny) s průměrnou dobou metání 83 dní a CAD 0309 „late“ (pozdě kvetoucí; 3 rostliny) s průměrnou dobou metání 108 dní. V třetí subpopulaci CAD 0309 „did not flower – DNF“ (nekvetoucí) byly rostliny, které nevykvetly vůbec (4 rostliny). Na Obrázku 9 jsou porovnány rostliny CAD 0309 „late“ s CAD 0309 „DNF“. Rostliny CAD 0309 „early“ metaly stejně jako CAD 0000 průměrně za 83 dní. Mezi CAD 0309 „late“ a CAD 0000 byl výrazný signifikantní rozdíl v metání ($p < 0,001$), kdy rostliny CAD 0309 „late“ vykvetly o 25 dní později než wild-type. Z rostlin genotypu CAD 1617 bylo vysazeno také 10 rostlin, z nichž jich bylo fenotypováno 7. Zbylé 3 rostliny nepřežily napadení škůdcem. Stejně jako u CAD 0000, také ve skupině CAD 1617 se nacházely dvě rostliny s odlehlou hodnotou (118 a 76 dní). Rostliny CAD 1617 metaly průměrně za 102 dní, tedy o 19 dní později než CAD 0000 ($p < 0,01$). Výsledky fenotypové analýzy jsou zobrazeny v Grafu 1.

Obdobné výsledky byly pozorovány také u rostlin M₄ generace určených k analýze exprese genů vernalizační dráhy. Kvůli malému množství semen M₄ generace byly z každého genotypu pěstovány pouze 4 rostliny. CAD 0309 rostliny byly rozděleny opět do tří subpopulací – jedna rostlina do subpopulace CAD 0309 „early“ a jedna rostlina do subpopulace CAD 0309 „late“. Dvě rostliny, které nevykvetly, pak spadaly do subpopulace CAD 0309 „DNF“. Rozdělení do subpopulací bylo potvrzeno také pomocí analýzy relativní exprese genů vernalizační dráhy. V porovnání s wild-typem CAD 0000 je výrazný signifikantní rozdíl v době metání u CAD 1617 ($p < 0,001$) a CAD 0309 „late“ ($p < 0,001$). Mezi CAD 0000 a CAD 0309 „early“ nebyl opět žádný signifikantní rozdíl.



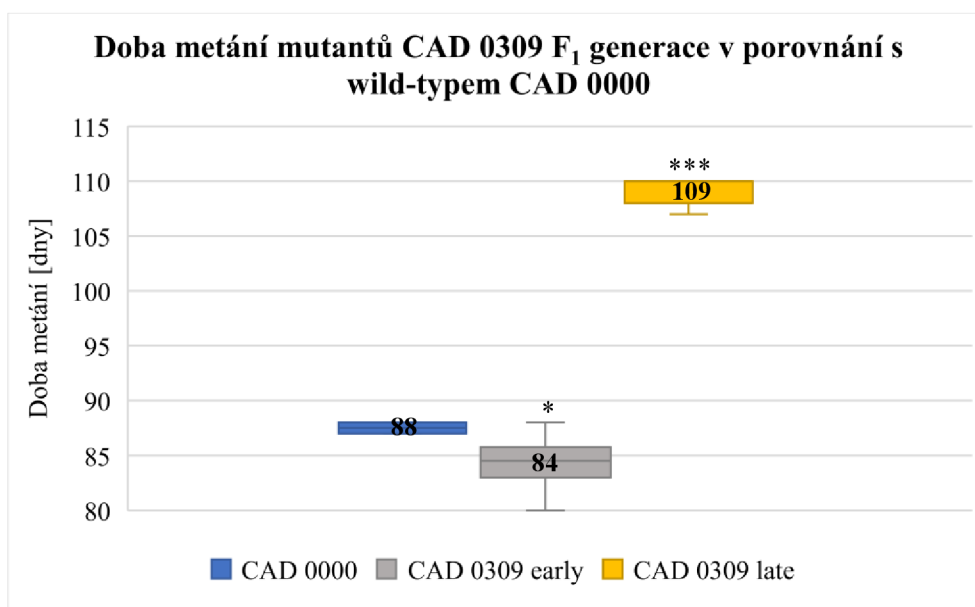
Obrázek 9: Rozdíl v metání u mutantních rostlin CAD 0309. Rostliny s mutantní alelou CAD 0309 byly rozděleny do tří skupin na základě doby metání a exprese genů ovlivňujících kvetení: CAD 0309 „early“ (průměrná doba metání: 83 dní), CAD 0309 „late“ (108 dní) a CAD 0309 „DNF“ (nekvetly). Na obrázku jsou porovnány rostliny CAD 0309 „late“ a CAD 0309 „DNF“ po 164 dnech od naklíčení. U CAD 0309 „late“ se postupně formují klasy, zatímco u CAD 0309 DNF jsou pouze listy, které postupně usychají, a klasy nejsou založeny.



Graf 1: Statistické vyhodnocení doby metání mutantů CAD 0309 a CAD 1617 v porovnání s wild-typer CAD 0000. Wild-type genotyp CAD 0000 kvete průměrně za 83 dní, stejně jako CAD 0309 „early“. Signifikantní rozdíly v metání oproti CAD 0000 pozorujeme jak u CAD 1617 (102 dní), tak u CAD 0309 „late“ (108 dní). V grafu není znázorněna třetí subpopulace genotypu CAD 0309 „DNF“, která nevykvetla. U CAD 0000 a CAD 1617 se vyskytují rostliny s odlehlou hodnotou metání, které jsou v grafu znázorněny tečkou. NS – není signifikantní; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.3.2 Fenotypová analýza rostlin F₁ generace

Křížením CAD 0309 a CAD 0000 se podařilo získat 14 semen F₁ generace, které byly všechny naklíčeny, a byla u nich provedena fenotypová analýza (Graf 2). CAD 0309 byl opět rozdělen do subpopulací CAD 0309 „early“ (8 rostlin) a CAD 0309 „late“ (5 rostlin). Pouze jedna rostlina byla zařazena do subpopulace CAD 0309 „DNF“. Stejně jako u M₄ generace, i v tomto případě je velký signifikantní rozdíl mezi CAD 0000 a CAD 0309 „late“ ($p < 0,001$). Wild-type metal průměrně za 88 dní a CAD 0309 „late“ o 21 dní později, tedy průměrně za 109 dní. Oproti M₄ generaci je rozdíl v metání mezi CAD 0000 a CAD 0309 „early“ ($p < 0,05$). Mutant metal o 4 dny dříve, za 84 dní. Rozdíl v metání CAD 0309 „early“ oproti M₄ generaci může být hypoteticky způsoben potlačením represoru kvetení, který byl v M₄ generaci aktivní v recesivně homozygotním stavu. V F₁ generaci se mohl dostat do heterozygotního stavu, ve kterém je takový represor neaktivní. Stále se jedná o TILLING linie, které mají mutace na pozadí, které mohou způsobovat takovéto odchylky.



Graf 2: Statistické vyhodnocení doby metání mutantů CAD 0309 F₁ generace v porovnání s wild-typer CAD 0000. Wild-type metal průměrně za 88 dní. Rozdíl v metání je jak u CAD 0309 „early“ (84 dní), tak u CAD 0309 „late“. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

5.4 Genotypování mutantů

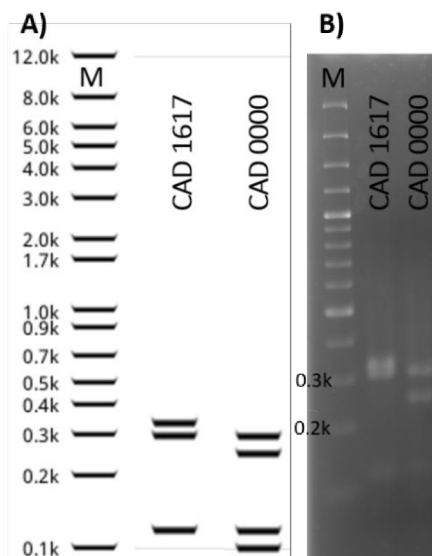
Cílem genotypování bylo identifikovat rostliny F₂ generace, které nesou dvě mutantní alely *Vrn-A1a₀₃₀₉* a jsou tedy homozygotní v genu *VRN-A1*. Ačkoli se nepodařilo nakřížit mutanty CAD 1617, genotypování bylo navrženo i pro rozlišení alely *Vrn-A1a₁₆₁₇* od wild-type alely. Pro účely genotypování byly navrženy 2 páry primerů pro CAD 1617 a 5 páru primerů

pro CAD 0309 tak, aby amplifikovaly oblast se SNP, tedy exon 3, respektive exon 6. Z navržených páru primerů byl vybrán vždy jeden nejvhodnější pár, u kterého byla optimalizována PCR. K rozlišení mutantních alel *Vrn-A1a₀₃₀₉* a *Vrn-A1a₁₆₁₇* od wild-type alely pak bylo navrženo enzymatické štěpení v místě SNP, kdy zvolený enzym štěpil buďto mutantní alelu se SNP nebo wild-type alelu bez SNP – byly vytvořeny CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) markery. Pro genotypování CAD 0309 bylo ale kvůli nedokonalému štěpení CAPS markerů nakonec zvoleno Sangerovo sekvenování

5.4.1 Genotypování mutantů CAD 1617

Vznikem SNP u CAD 1617 zaniklo restrikční místo pro enzym BseNI. Toto restrikční místo ale zůstalo zachováno u wild-type alely, a proto je štěpení tímto enzymem vhodné pro rozlišení mutantní alely *Vrn-A1a₁₆₁₇* a wild-type alely.

Exon 3 byl amplifikován s použitím navržených primerů za vzniku produktu o velikosti 744 bp. Ke štěpení byl použit enzym BseNI (Thermo Fisher). U wild-type alely jsou výsledkem štěpení čtyři produkty o velikostech 296, 248, 118 a 83 bp. Mutantní alela *Vrn-A1a₁₆₁₇* se štěpí na tři produkty o velikostech 331, 296 a 118 bp. Rozdíl ve štěpení je na Obrázku 10.



Obrázek 10: Genotypování mutantních rostlin CAD 1617. A) Teoretické výsledky štěpení podle Geneious Prime (Dotmatics) **B)** Reálné štěpení mutantní *Vrn-A1a₁₆₁₇* a wild-type alely restrikčním enzymem BseNI; CAD 1617: 331, 296 a 118 bp, CAD 0000: 296, 248, 118 a 83 bp; M – marker molekulové hmotnosti GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher).

Přestože na agaróзовém gelu nejsou dobře rozlišitelné fragmenty o velikostech 118 a 83 bp, tak 296 a 248 bp velké fragmenty u CAD 0000 jsou dostačující, aby byl rozeznán jasný rozdíl mezi CAD 1617 a CAD 0000.

5.4.2 Genotypování mutantu CAD 0309

V F₂ generaci bylo pěstováno celkem 48 rostlin, u kterých bylo nutno najít recesivní homozygoty s alelami *Vrn-A1a*₀₃₀₉. U těchto homozygotů byla poté provedena analýza exprese genů vernalizační dráhy, jejíž výsledky jsou popsány v následující podkapitole 5.5.2 Analýza relativní exprese genů F₂ generace.

Genotypování CAD 0309 pomocí CAPS markerů nebylo dostatečně účinné, a proto muselo být přistoupeno k náhradní metodě genotypování. Problémy s použitím CAPS markerů mohly být způsobeny allohexaploidní povahou pšenice a nespécifickou vazbou jednoho z primerů na další dvě varianty genu *VRN-B1* a *VRN-D1*, a ne pouze na *VRN-A1*, na které byly primery navrženy.

Pro neuspokojivé výsledky CAPS markerů bylo přistoupeno k Sangerovu sekvenování. Všechny 48 rostlin F₂ generace a wild-typů použitých jako kontrola, bylo osekvenováno. Z těchto 48 rostlin byly identifikovány pouze dvě rostliny, které byly homozygotní v alele *Vrn-A1a*₀₃₀₉.

5.5 Analýza relativní exprese genů vernalizační dráhy

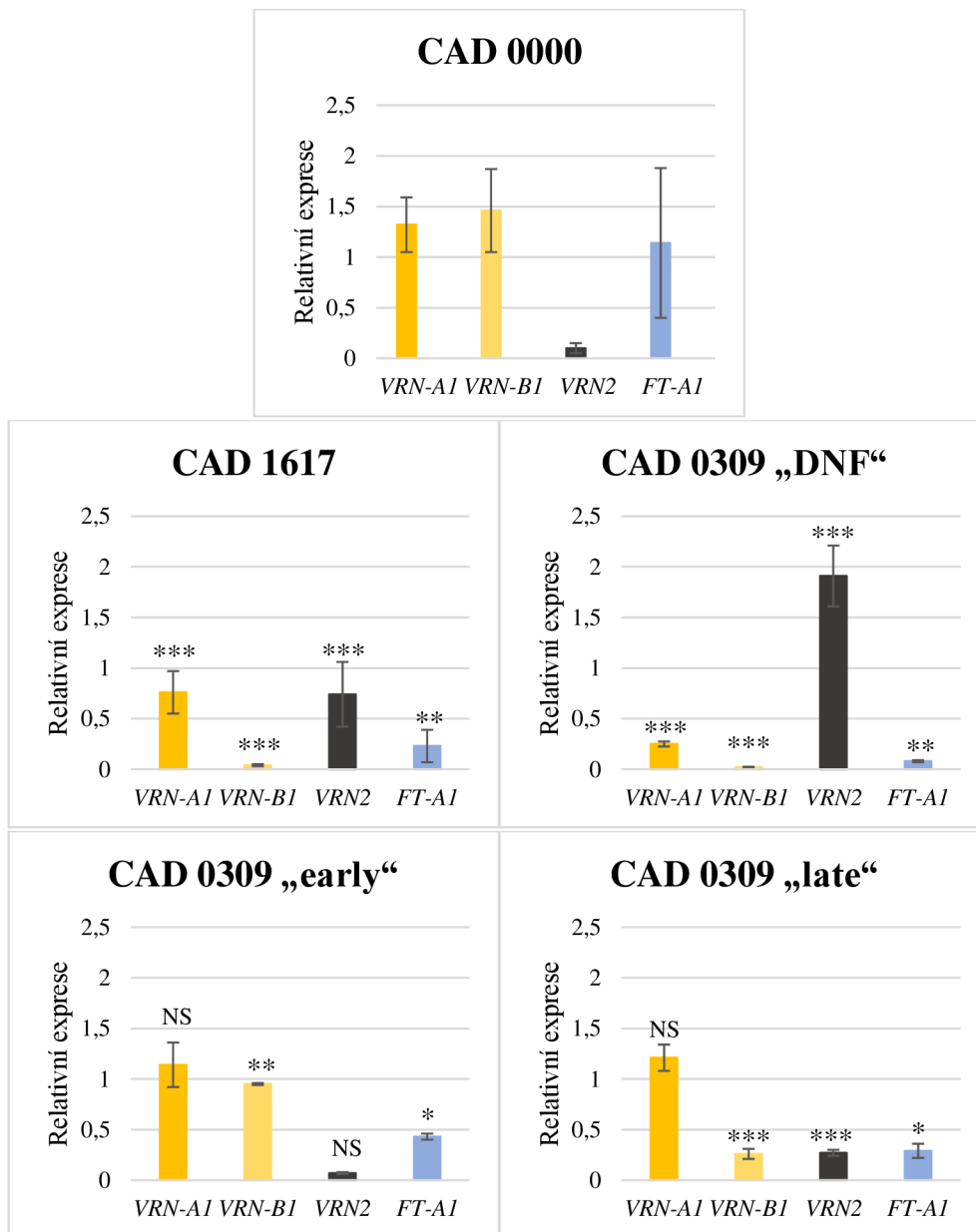
Analýza relativní exprese genů vernalizační dráhy byla provedena u rostlin M₄ (genotypy CAD 1617, CAD 0309 a CAD 0000) a F₂ generace (genotypy CAD 0309 a CAD 0000). Byla sledována exprese genu *VRN-A1*, dále jejího homeologa *VRN-B1* a dalších genů vernalizační dráhy *VRN2* a *FT-A1* (*VRN3*). Exprese genu *VRN-D1* sledována nebyla, jelikož není možné navrhnout funkční subgenomově specifický pár primerů, který by se vázal pouze na tuto variantu genu. Jako referenční gen byl pak zvolen gen *GAPDH*. Pro každá genotyp v M₄ generaci byla provedena statistická analýza ANOVA s následným post hoc Tukeyova testem v Excelu (Microsoft) vůči wild-typu. Pro statistickou analýzu exprese genů v F₂ generaci byl zvolen Wilcoxonův test, kvůli malému počtu vzorků a opakování.

5.5.1 Analýza relativní exprese genů M₄ generace

V M₄ generaci byly sledovány rozdíly v expresi daných genů u CAD 1617 a CAD 0309 vůči wild-typu CAD 0000. CAD 0309 byla dále rozdělena do tří subpopulací CAD 0309 „early“, CAD 0309 „late“ a CAD 0309 „DNF“. Celkově byly provedeny čtyři odběry, a to po 14, 28, 42 a 58 dnech od vysazení rostlin. U wild-typu CAD 0000 se ve všech čtyřech odběrech exprimovaly geny *VRN-A1*, *VRN-B1* a *FT-A1*, zatímco *VRN2* byl exprimován minimálně.

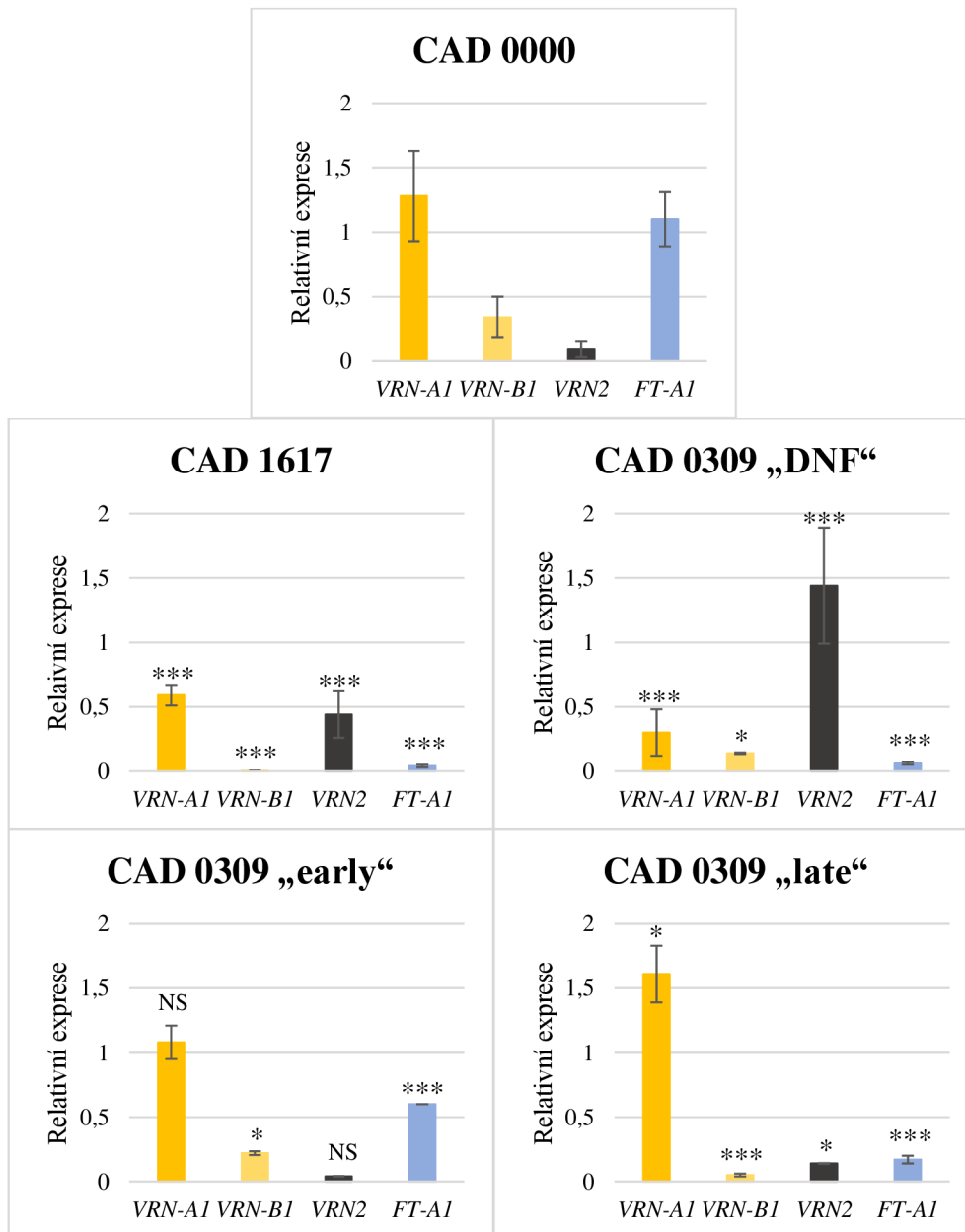
Po 14 dnech (Graf 3) došlo u CAD 1617 a CAD 0309 „DNF“ ke zvýšené expresi genu *VRN2*. Naproti tomu *VRN-A1*, *VRN-B1* a *FT-A1* byly exprimovány v menší míře. U CAD 0309

„early“ byla exprese genů *VRN-A1* a *VRN2* stejná jako u wild-typu, zatímco *VRN-B1* a *FT-A1* byly exprimovány méně. U CAD 0309 „late“ došlo ke snížené expresi *VRN-B1* a *FT-A1* a ke zvýšené expresi *VRN2*.



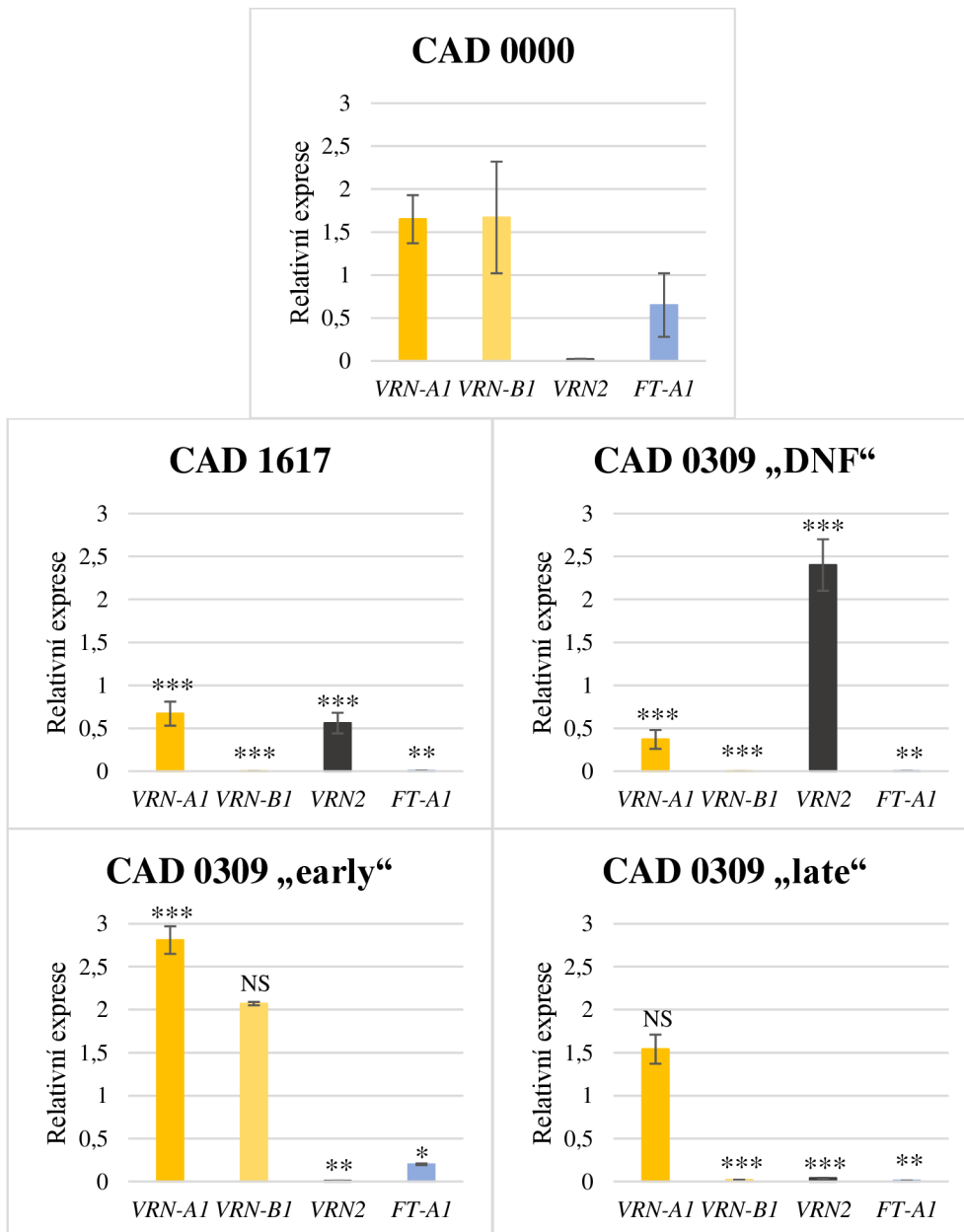
Graf 3: Relativní exprese M₄ generace po 14 dnech. Relativní exprese genů vernalizační dráhy (*VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN2* a *FT-A1*) u mutantů CAD 1617 a subpopulací CAD 0309 v porovnání s wild-typem CAD 0000 po 14 dnech od vysazení. NS – není signifikantní; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Po 28 dnech (Graf 4) byla situace u CAD 1617 a CAD 0309 „DNF“ a CAD 0309 „early“ obdobná jako po 14 dnech. U CAD 0309 „late“ byla exprese *VRN-A1* vůči wild-typu zvýšená, naopak u ostatních tří genů byla exprese nižší.



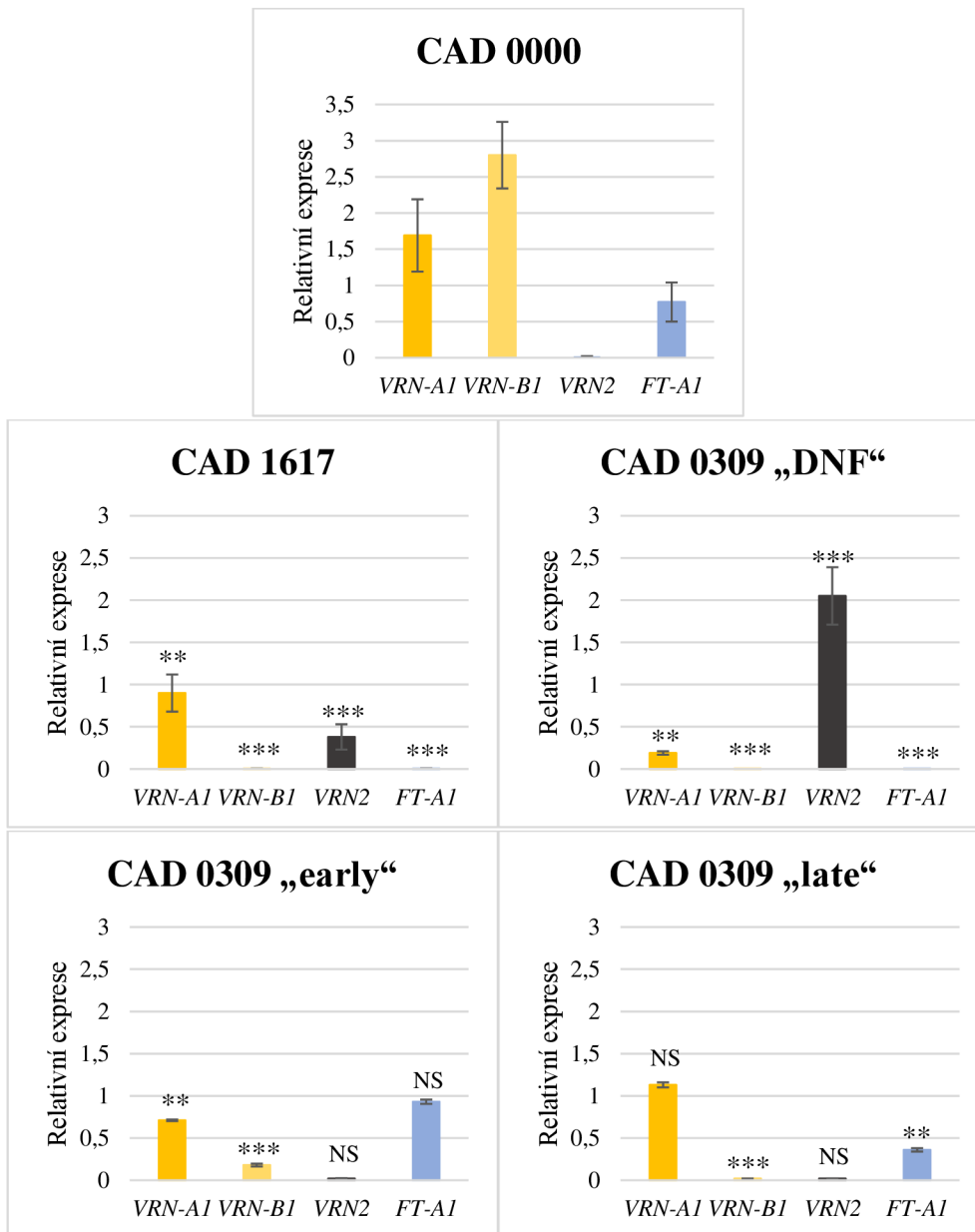
Graf 4: Relativní exprese M₄ generace po 28 dnech. Relativní exprese genů vernalizační dráhy (*VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN2* a *FT-A1*) mutantů CAD 1617 a subpopulací CAD 0309 v porovnání s wild-typerem CAD 0000 po 28 dnech od vysazení. NS – není signifikantní; * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$.

Po 42 dnech (Graf 5) došlo opět u CAD 1617 a CAD 0309 „DNF“ ke zvýšené expresi *VRN2*, a zároveň k snížené expresi *VRN-A1*, *VRN-B1* a *FT-A1*. V případě CAD 0309 „early“ došlo ke zvýšené expresi *VRN-A1* a ke snížené expresi *VRN2* a *FT-A1*. Expres *VRN-B1* se od CAD 0000 nelišila. U CAD 0309 „late“ došlo ke snížení exprese *VRN-B1* a *FT-A1* a ke zvýšení exprese *VRN2*, zatímco *VRN-A1* je stejná jako u CAD 0000.



Graf 5: Relativní exprese M₄ generace po 42 dnech. Relativní exprese genů vernalizační dráhy (*VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN2* a *FT-A1*) u mutantů CAD 1617 a subpopulací CAD 0309 v porovnání s wild-typerem CAD 0000 po 42 dnech od vysazení. NS – není signifikantní; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$.

Poslední odběr byl proveden po 58 dnech (Graf 6). Stejně jako v předchozích odběrech, byla exprese *VRN2* u CAD 1617 a CAD 0309 „DNF“ zvýšená, zatímco exprese ostatních genů naopak snižena. U CAD 0309 „early“ byla snižena exprese homeologů *VRN1*, naproti tomu exprese *FT-A1* a *VRN2* se od wild-typu nelišila. U CAD 0309 „late“ nedošlo v expresi genů *VRN-A1* a *VRN2* k žádným změnám oproti wild-typu, zatímco exprese *VRN-B1* a *FT-A1* byla snižena.



Graf 6: Relativní exprese M₄ generace po 58 dnech. Relativní exprese genů vernalizační dráhy (*VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN2* a *FT-A1*) u mutantů CAD 1617 a subpopulací CAD 0309 v porovnání s wild-typem CAD 0000 po 58 dnech od vysazení. NS – není signifikantní; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Celkově tedy u CAD 1617 a CAD 0309 „DNF“ došlo ve všech čtyřech odběrech k signifikantně nižší expresi genů aktivující kvetení *VRN-A1*, *VRN-B1* a *FT-A1* a k signifikantně vyšší expresi represoru kvetení *VRN2*. U CAD 0000 to bylo přesně naopak – dominovaly exprese *VRN-A1*, *VRN-B1* a *FT-A1* oproti *VRN2*. U CAD 0309 „early“ se gen *VRN-A1* v prvních dvou odběrech neodchyloval od wild-typu, až v třetím odběru se jeho exprese zvýšila a následně ve čtvrtém snížila ve srovnání s wild-typem. Expres *VRN-B1*, *FT-A1* a *VRN2* byly pak oproti wild-typu nižší nebo stejné. V rámci CAD 0309 „late“ byla exprese *VRN-A1*, až na

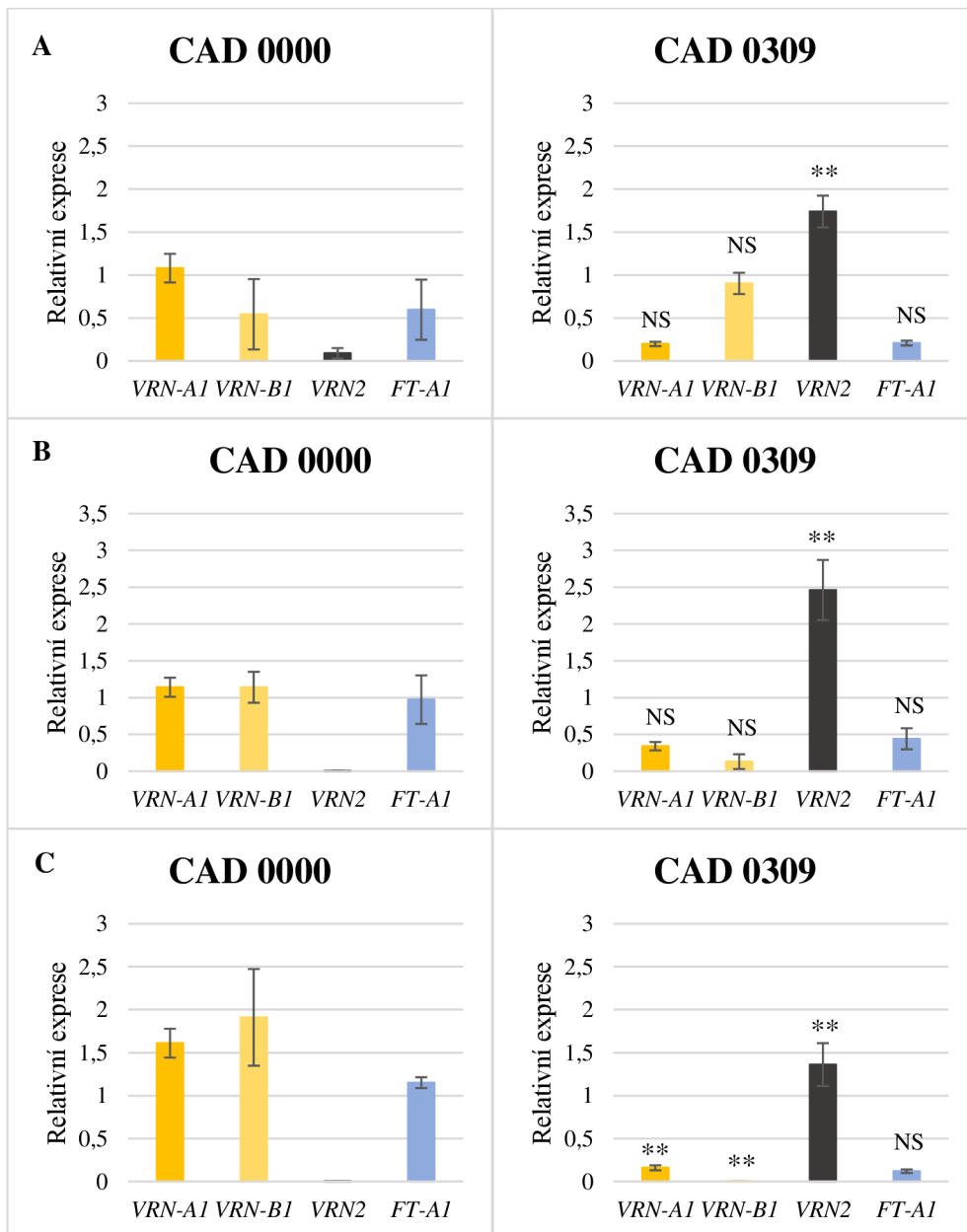
druhý odběr, kde byla vyšší, stejná jako u wild-typu. Geny *VRN-BI* a *FT-AI* byly oproti wild-typu exprimovány méně. Expres *VRN2* byla v prvních třech odběrech vyšší a v posledním odběru pak byla stejná. V rámci jednotlivých genotypů byla pozorována také přirozená variabilita v expresi genů, která mohla společně s malým vzorkem rostlin, ovlivnit statistickou analýzu.

5.5.2 Analýza relativní exprese genů F₂ generace

V F₂ generaci byly pozorovány rozdíly v expresi daných genů mezi wild-typem CAD 0000 a CAD 0309, který **byl** homozygot pro alelu *Vrn-A1a₀₃₀₉*. V tomto případě byly provedeny pouze tři odběry, a to z časových důvodů. První odběr byl proveden po 14 dnech od vysazení ve stádiu tří listů, druhý po 28 dnech a třetí po 42 dnech.

Výsledky po prvním a druhém odběru ukazují (Graf 7A a 7B), že v případě CAD 0000 dominovala exprese genů podporujících kvetení – *VRN-A1*, *VRN-B1* a *FT-A1*. U CAD 0309 byla signifikantně zvýšená exprese represoru kvetení *VRN2*, v expresi ostatních genů nebyly oproti wild-typu žádné změny. V třetím odběru (Graf 7C) u CAD 0309 došlo, kromě zmíněné dominance *VRN2*, k výraznému poklesu v expresi homeologů *VRN1*. Expres *FT-A1* byla neměnná.

I v tomto případě jsou porovnávány skupiny o malém počtu vzorků, což mohlo ovlivnit statistickou analýzu. V době odevzdání diplomové práce ještě nemohla být provedena fenotypová analýza těchto rostlin, a tak budou výsledky exprese porovnány s fenotypem členy výzkumné skupiny doktora Šafáře, až dojde ke kvetení rostlin.



Graf 7: Relativní exprese F₂ generace. Relativní exprese genů vernalizační dráhy (*VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN2* a *FT-A1*) u CAD 0309 v porovnání s expresí u wild-typu CAD 0000. **A** po 14 dnech; **B** po 28 dnech; **C** po 42 dnech od vysazení. NS – není signifikantní; ** $p < 0,01$.

6 DISKUSE

Diplomová práce se zabývá analýzou předčasného stop kodonu alely *VRN-A1a* a jejího vlivu na dobu metání, se kterou souvisí také analýza exprese genů vernalizační dráhy. K tomu byly použity dvě TILLING linie pšenice seté Cadenza s předčasným stop kodonem. Fenotypová analýza i analýza exprese genů byla provedena v generacích M₄ a F₂, která byla vytvořena zpětným křížením za účelem vytvoření homozygotů pro mutantní alelu. V rámci analýzy exprese genů byly sledovány geny *VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN2* a *FT-A1*.

Křížení

Úspěšnost křížení byla relativně nízká. Při křížení rostlin M₄ generace vzniklo pouze 14 semen CAD 0309 a při křížení F₁ generace 19 semen CAD 0309. U genotypu CAD 1617 se nepodařilo nakřížit žádná semena. Takováto neúspěšnost může být dána především mutacemi na pozadí, které se u TILLING linií vyskytují. Při tvorbě těchto linií vznikají bodové mutace náhodně v celém genomu, takže nemůžeme vyloučit, že byl zasáhnutý také gen nebo více genů, které se podílejí na fertilitě a rozmnožování. Samotná mutace v genu *VRN-A1* na neúspěšnost křížení pravděpodobně nebude mít vliv. Ačkoli se gen *VRN1* účastní přechodu rostliny z vegetativní do reprodukční fáze, neexistují žádné důkazy a studie o tom, že by se gen *VRN1* přímo podílel na fertilitě a rozmnožování.

Analýza fenotypu a exprese genů vernalizační dráhy u mutantů

V rámci fenotypové analýzy byla porovnávána doba metání mutantů CAD 0309 a CAD 1617 vůči wild-typu CAD 0000. Zjištěné fenotypy byly dále porovnány také s expresí genů vernalizační dráhy. Obecně bylo pozdější metání oproti wild-typu spojeno s nižší expresí genů podporující kvetení jako *VRN-A1*, *VRN-B1* a *FT-A1* a vyšší expresí represoru kvetení *VRN2*.

Mutantní rostliny CAD 1617 se oproti wild-typu opožďovaly v kvetení, což bylo pravděpodobně způsobeno zvýšenou expresí *VRN2* a sníženými expresemi homeologů *VRN1* a *FT-A1*.

U mutantů CAD 0309 došlo k rozdělení na základě fenotypu i exprese do tří subpopulací – CAD 0309 „early“, „late“ a „DNF“. Rozdělení připomíná 2. Mendelův zákon o náhodné segregaci genů do gamet, s tím rozdílem, že štěpný poměr byl 1:1:1, oproti Mendelově 1:2:1, to ale může být zapříčiněno malým množstvím rostlin. Za předpokladu, že mutantí v M₃ generaci byly pro daný gen heterozygoti pro wild-type a mutantní alelu, tak

rostliny CAD 0309 „early“ pak musely být wild-type homozygoti, CAD 0309 „late“ heterozygoti a CAD 0309 „DNF“ homozygoti pro mutantní alelu, což bylo u CAD 0309 „DNF“ potvrzeno sekvenováním genu *VRN-A1*. Zároveň tomuto předpokladu odpovídá rozdělení rostlin v F₁ generaci po zpětném křížení M₄ generace. Z rostlin CAD 0309 „early“ vznikly pouze rostliny s fenotypem „early“. Potomci CAD 0309 „late“ byly rozděleny v poměru 1:1 na CAD 0309 „early“ a „late“. Tomuto rozdělení v M₄ generaci by odpovídala také analýza fenotypu a exprese. CAD 0309 „early“ byla, co se týče fenotypu totožná s wild-typem. V analýze exprese se u CAD 0309 „early“ exprimoval *VRN2* ve stejně malém množství jako u wild-typu. U ostatních genů docházelo v průběhu odběrů k odchýlení od wild-typu, které mohlo být zapříčiněné mutacemi na pozadí. Avšak mírně odlišná exprese genů neměla žádný vliv na dobu metání. Heterozygotní CAD 0309 „late“ měla výrazně opožděnou dobu metání oproti wild-typu, která byla pravděpodobně zapříčiněna zvýšenou expresí *VRN2*, hlavně v prvních dvou odběrech a sníženou expresí *VRN-B1* a *FT-A1*, exprese *VRN-A1* pak byla vyšší nebo stejná jako u wild-typu. Subpopulace CAD 0309 „DNF“ měla jak fenotyp, tak expresi genů naprosto opačnou wild-typu: rostliny nevykvetly vůbec a ve všech čtyřech odběrech dominovala exprese represoru kvetení *VRN2*, která byla u wild-typu minimální. Rovněž CAD 0309 v F₂ generaci, homozygoti pro *Vrn-A1a0309* alelu, měli expresi genů opačnou k wild-typu, tedy vysokou expresí *VRN2* a nízkou *VRN-A1*, *VRN-B1* a *FT-A1*. Bohužel exprese genů u F₂ generace nemohla být v diplomové práci z důvodů dlouhé generační doby pšenice porovnána s fenotypem. Generační doba pšenice je dlouhá a v průměru trvalo vypěstovat jednu generaci rostlin až šest měsíců (v rámci diplomové práce). I přes to, se podařilo vypěstovat M₄ generaci z které byla získána samosprášená semena M₅ generace a nakřížená semena F₁ generace. Z F₁ generace vznikla křížením semena F₁BC₁ a F₂. Celkově se tedy podařilo vypěstovat a ofenotypovat dvě generace (M₄ a F₁), fenotypování třetí (F₂) proběhne v následujících měsících.

Analýza fenotypu a relativní exprese genů vernalizační dráhy naznačuje, že mutantní protein má negativní vliv a dobu metání. V případě mutantů CAD 1617 a CAD 0309 „late“ způsobuje opožděné kvetení a v případě CAD 0309 „DNF“ kvetení vůbec neproběhlo. Nicméně se jedná o TILLING mutanty, takže sledované odchylky, jak ve fenotypu, tak i v expresi, mohou být částečně způsobeny také mutacemi na pozadí.

Dynamika proteinu VRN-A1

Předčasný stop kodon u mutantů CAD 0309 a CAD 1617 způsobil zkrácení proteinu VRN-A1 o 75, respektive o 153 aminokyselin. Mutantní protein VRN-A1₀₃₀₉ přišel o celou C-

terminální doménu a malou část K-domény. VRN-A1₁₆₁₇ pak ztratil kromě celé C-domény také téměř celou K-doménu (EnsemblPlants). C-terminální doména je podstatná pro dimerizaci a multimerizaci a také slouží k transkripční aktivaci (Kaufmann *et al.*, 2005). K-doména je důležitá pro protein-protein interakce, včetně dimerizace a multimerizace (Kaufmann *et al.*, 2005; Melzer *et Theißen*, 2009). Na základě funkce ztracených domén vyplývá, že mutantní proteiny by měly mít problémy s protein-protein interakcemi. Samotná dynamika proteinu VRN1 s jinými proteiny není ale dostatečně prozkoumaná a proteomické analýzy chybí. Studie se po většinu času zaměřovaly na modulaci exprese genu *VRN1* pomocí transkripčních regulátorů, vážících se do oblasti promotoru a prvního intronu. Jedinou blíže prozkoumanou proteinovou interakcí je dimerizace VRN1 s VRT2 (Xie *et al.*, 2019). Tento heterodimer se váže zpět do genu *VRN1*, kde zesiluje jeho expresi. Není však známo, jakou proteinovou doménou spolu interagují, ale K- nebo C- terminální doména v této interakci mohou hrát roli. Výsledky mutantů totiž ukazují sníženou expresi *VRN-A1*, ale také téměř žádnou expresi *VRN-B1*. Některé experimenty totiž naznačují, že gen *VRN-A1* může indukovat expresi jeho dalších homeologů (Skibová, 2022). V tomto případě by tak mutantní VRN-A1 protein nebyl schopen zvyšovat expresi žádného z homeologů *VRN1*. Zároveň má poškozený protein problém inhibovat expresi *VRN2*, která je u mutantů zvýšená. Kromě toho je u mutantů snížená exprese *FT-A1*, který je podle Tanaka *et al.* (2018) aktivován vazbou VRN1 do promotoru *FT*. Zjištěné výsledky odpovídají nejnovějšímu modelu interakcí genů vernalizační dráhy (Debernardi *et al.*, 2022), kde se *VRN1* a *VRN3* navzájem aktivují a *VRN1* zároveň umlčuje *VRN2*, který před vernalizací umlčuje *VRN3*. Tzn., že u jarních odrůd by měla být vysoká exprese genů *VRN1* a *VRN3* a nízká exprese genu *VRN2*, aby došlo ke kvetení. Podle tohoto modelu by tedy mutantní proteiny VRN-A1 měly mít problém inhibovat expresi *VRN2* a aktivovat *VRN3*, což se podle výsledků exprese u mutantů děje. Chen *et Dubcovsky* (2012) provedli podobnou studii s TILLING mutanty s předčasným stop kodonem v genu *VRN1* u tetraploidní pšenice. Podle jejich studie docházelo u linií s mutantním proteinem VRN1 ke zvýšené expresi genu *VRN2*. Podobné výsledky byly pozorovány také v této práci.

7 ZÁVĚR

V diplomové práci byly charakterizovány dvě mutantní TILLING linie CAD 1617 a CAD 0309 s předčasným stop kodonem v alele *Vrn-A1a*. Pomocí Illumina a Sangerova sekvenování byla ověřena přítomnost SNP u mutantních linií a zároveň vyloučeny další mutace v genu *VRN1*. Pro zafixování mutantní alely a odstranění mutací na pozadí byly rostliny zpětně kříženy s wild-typem. Pro odlišení wild-type a mutantní alely v F₂ generaci byl navrhnut systém genotypování pro oba mutanty. U rostlin M₄ generace byla provedena fenotypová analýza a analýza exprese genů vernalizační dráhy. Stejně tak u F₂ generace byla provedena analýza exprese.

Pomocí použitých přístupů byl dokázán vliv mutantního proteinu na funkci vernalizační dráhy a dobu metání, kdy u mutantů docházelo k opožděnému kvetení a změně v expresi vernalizačních genů. Zjištěné výsledky popisují vliv mutantního proteinu VRN-A1 na jeho funkci a mohou pomoci k pochopení vzájemných interakcí v rámci genů vernalizační dráhy. Avšak pro lepší pochopení funkce a dynamiku interakcí proteinu VRN-A1 je potřeba dalších analýz, včetně těch proteomických. Tato diplomová práce může sloužit jako podklad pro další a rozsáhlejší studie zabývající se interakcí genů vernalizační dráhy.

8 LITERATURA

- Alonso-Peral M. M., Oliver S. N., Casao M. C., Greenup A. A., and Trevaskis B. (2011). The promoter of the cereal *VERNALIZATION1* gene is sufficient for transcriptional induction by prolonged cold. *PLoS One* 6, e29456. doi: 10.1371/journal.pone.0029456
- Alvarez M. A., Li C., Lin H., Joe A., Padilla M., Woods D. P., Dubcovsky J. (2023) *EARLY FLOWERING 3* interactions with *PHYTOCHROME B* and *PHOTOPERIOD1* are critical for the photoperiodic regulation of wheat heading time. *PLoS Genetics* 19(5): e1010655. doi: 10.1371/journal.pgen.1010655
- Alvarez M. A., Tranquilli G., Lewis S., Kippes N., Dubcovsky J. (2016): Genetic and physical mapping of the earliness per se locus *Eps-Am1* in *Triticum monococcum* identifies *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* as a candidate gene. *Functional & Integrative Genomics* 16(4): 365–82. doi: 10.1007/s10142-016-0490-3
- Appendino M. L., Slafer G. A. (2003): Earliness per se and its dependence upon temperature in diploid wheat lines differing in the major gene *Eps - Am1* alleles. *The Journal of Agricultural Science* 141: 149–154. doi: 10.1017/S0021859603003472
- 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(5): 721–33. doi: 10.1007/s00122-007-0603-4
- Bloomfield M. T., Hunt J. R., Trevaskis B., Ramm K., Hyles J. (2018): Ability of alleles of *PPD1* and *VRN1* genes to predict flowering time in diverse Australian wheat (*Triticum aestivum*) cultivars in controlled environments. *Crop & Pasture Science* 69, 1061–1075. doi: 10.1071/CP18102
- Bullrich L., Appendino M. L., Tranquilli G., Lewis S., Dubcovsky J. (2002) Mapping a thermo-sensitive earliness per se gene on *Triticum monococcum* chromosome 1A m. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 585–593. doi: 10.1007/s00122-002-0982-5
- Cockram, J., Chiapparino, E., Taylor, S. A., Stamati, K., Donini, P., Laurie, D. A., O’Sullivan, D. M. (2007): Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel *VRN-H1* alleles and a predominant winter *VRNH1/VRN-H2* multi-locus haplotype. *Theoretical and Applied Genetics* 115, 993–1001. doi: 10.1007/s00122-007-0626-x

- Colbert, T., Till, B., Tompa, R., Reynolds, S., Steine, M., Yeung, A., *et al.* (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiology* 126, 2 480–484. doi: 10.1104/pp.126.2.480
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountid A, Farrona S., Gissot L., Turnbull C., Coupland G. (2007): FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of arabidopsis. *Science* 316, 1030–1033. doi: 10.1126/science.1141752
- Davidson J. L., Christian K. R., Jones D. B., Bremner P. M. (1985): Responses of wheat to vernalization and photoperiod. *Australian Journal of Agricultural Research* 36: 347–359. doi: 10.1071/AR9850347
- Debernardi, J. M., Woods, D. P., Li, K., Li, C., Dubcovsky, J. (2022): MiR172-APETALA2-like genes integrate vernalization and plant age to control flowering time in wheat. *PLoS Genetics* 18, e1010157. doi: 10.1371/journal.pgen.1010157
- 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* 7: e33234. doi: 10.1371/journal.pone.0033234
- Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. (2009): Regulation of flowering in temperate cereals. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 178–184. doi: 10.1016/j.pbi.2008.12.010
- Dreisigacker S.; Burgueño J.; Pacheco A.; Molero G.; Sukumaran S.; Rivera-Amado C.; Reynolds M.; Griffiths S. (2021): Effect of Flowering Time-Related Genes on Biomass, Harvest Index, and Grain Yield in CIMMYT Elite Spring Bread Wheat. *Biology* 10: 855. doi: 10.3390/biology10090855
- Dubcovsky J. *et* Dvorak J. (2007): Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat Under Domestication. *Science* 316: 1862. doi: 10.1126/science.1143986
- Dubcovsky J., Lijavetzky D., Appendino L., Tranquilli G. (1998): Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theoretical and Applied Genetics* 97, 968–975. doi: 10.1007/s001220050978
- Dubcovsky J., Loukoianov A., Fu D., Valarik M., Sanchez A., and Yan L. (2006): Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2*. *Plant Molecular Biology* 60, 469–480. doi: 10.1007/s11103-005-4814-2

- Fábián A, Sáfrán E, Szabó-Eitel G, Barnabás B, Jäger K (2019): Stigma Functionality and Fertility Are Reduced by Heat and Drought Co-stress in Wheat. *Frontiers in Plant Science* 10: 244. doi: 10.3389/fpls.2019.00244
- Faricelli M. E., Valarik M., Dubcovsky J. (2010): Control of flowering time and spike development in cereals: the earliness per se *Eps-I* region in wheat, rice, and *Brachypodium*. *Functional & Integrative Genomics* 10: 293–306. doi: 10.1007/s10142-009-0146-7
- Faure S., Turner A. S., Gruszka D., Christodoulou V., Davis S., Von Korff M., Laurie D. A. (2012): Mutation at the circadian clock gene *EARLY MATURITY 8* adapts domesticated barley (*Hordeum vulgare*) to short growing seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 2–7. doi: 10.1073/pnas.1120496109
- Feldman M. (2001): The origin of cultivated wheat. In A Bonjean, W Angus, eds, *The World Wheat Book*. Lavoisier Tech. & Doc., Paris.
- Flohr B. M., Hunt J. R., Kirkegaard J. A., Evans J. R. (2017): Water and temperature stress define the optimal flowering period for wheat in south-eastern Australia. *Field Crops Research* 209, 108–119. doi: 10.1016/j.fcr.2017.04.012
- Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J. S., Von Zitzewitz J., Hayes P. M., Dubcovsky J. (2005): Large Deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 273: 54–65. doi: 10.1007/s00438-004-1095-4
- Gawroński P., Ariyadasa R., Himmelbach A., Poursarebani N., Kilian B., Stein N., Steuernagel B., Hensel G., Kumlehn J., Sehgal A. K., Gill B. G., Gould P., Hall A., Schnurbusch T. (2014): A distorted circadian clock causes early flowering and temperature-dependent variation in spike development in the *Eps-3Am* mutant of einkorn wheat. *Genetics* 196: 1253–1261. doi: 10.1534/genetics.113.158444
- Gottwald S., Bauer P., Komatsuda T., Lundqvist U., Stein N. (2009): TILLING in the two-rowed barley cultivar „Barke” reveals preferred sites of functional diversity in the gene *HvHox1*. *BMC Research Notes* 2: 258. doi: 10.1186/1756-0500-2-258
- Gramzow L. et Theißen G. (2015): Phylogenomics reveals surprising sets of essential and dispensable clades of MIKCC-type MADS-box genes in flowering plants. *The Journal of Experimental Zoology Part B* 324: 353–362. doi: 10.1002/jez.b.22598

- 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. doi: 10.1093/aob/mcp063
- Gundry C. N., Vandersteen J. G., Reed G. H., Pryor R. J., Chen J., Wittwer C. T. (2003): Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical Chemistry* 49 (3): 396–406. doi: 10.1373/49.3.396
- 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* 147: 355–366. doi: 10.1104/pp.108.116418
- Higgins J. A., Bailey P. C., Laurie D. A. (2010): Comparative genomics of flowering time pathways using *Brachypodium distachyon* as a model for the temperate grasses. *PLoS One* 5(4): e10065. doi: 10.1371/journal.pone.0010065
- Chen A. et Dubcovsky J. (2012): Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene *VRN1* down-regulates the flowering repressor *VRN2* in leaves but is not essential for flowering. *PloS Genetics* 8 e1003134. doi: 10.1371/journal.pgen.1003134
- Chen A., Li C., Hu W., Lau M. Y., Lin H., Rockwell N. C., Martin S. S., Jernstedt A. J., Lagarias J. C., Dubcovsky J. (2014): Phytochrome C plays a major role in the acceleration of wheat flowering under long-day photoperiod. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (28): 10037–44. doi: 10.1073/pnas.1409795111
- Chen Z., Ke W., He F., Chai L., Cheng X., Xu H., Wang X., Du D., Zhao Y., Chen X., Xin J., Xin M., Guo W., Hu Z., Su Z., Liu J., Peng H., Yao Y., Sun Q., Ni Z. (2022): A single nucleotide deletion in the third exon of *FT-D1* increases the spikelet number and delays heading date in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal* 20, 5: 920–933. doi: 10.1111/pbi.13773
- Chouard P. (1960). Vernalization and its relations to dormancy. *Annual Review of Plant Biology* 11, 191–238. doi: 10.1146/annurev.pp.11.060160.001203
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2014): Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, eds R. K. Pachauri and L. A. Meyer (Geneva: IPCC).

- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) (2018): Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361: eaar7191. doi: 10.1126/science.aar7191
- Iqbal M., Navabi A., Salmon D. F., Yang R-C., Spaner D. (2006): A genetic examination of early flowering and maturity in Canadian spring wheats. *Canadian Journal of Plant Science* 86: 995–1004. doi: 10.4141/P06-002
- Irshad A., Guo H., Zhang S., Liu L. (2020): TILLING in Cereal Crops for Allele Expansion and Mutation Detection by Using Modern Sequencing Technologies. *Agronomy* 10: 405. doi: 10.3390/agronomy10030405
- Jung J. H., Domijan M., Klose C., Biswas S., Ezer D., Gao M. J., Khattak A. S., Box M. S., Charoensawan V., Cortijo S., Kumar M., Grant A., Locke J. C. W., Schafer E., Jaeger K., Wigge P. A. (2016): Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science* 354(6314): 886–9. doi: 10.1126/science.aaf6005
- Kamran A.; Iqbal M.; Spaner D. (2014): Flowering Time in Wheat (*Triticum Aestivum* L.): A Key Factor for Global Adaptability. *Euphytica* 197, 1–26. doi: 10.1007/s10681-014-1075-7
- Kane N. A., Agharbaoui Z., Diallo A. O., Adam H., Tominaga Y., Ouellet F., Sarhan F. (2007): *TaVRT2* represses transcription of the wheat vernalization gene *TaVRN1*. *The Plant Journal* 51: 670–680. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2007.03172.x
- Kane N. A., Danyluk J., Tardif G., Ouellet F., Laliberte J. F., Limin A. E., Fowler D. B., Sarhan F. (2005): *TaVRT-2*, a member of the StMADS-11 clade of flowering repressors, is regulated by vernalization and photoperiod in wheat. *Plant Physiology* 138: 2354–2363. doi: 10.1104/pp.105.061762
- Kaufmann K., Melzer R., Theißen G., (2005): MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* 347, 183–198. doi: 10.1016/j.gene.2004.12.014
- Khlestkina E. K., Giura A., Roder M. S., Borner A. (2009): A new gene controlling the flowering response to photoperiod in wheat. *Euphytica* 165:579–585. doi: 10.1007/s10681-008-9783-5

- Kihara H. (1919): Uber cytologische Studien bei einigen Getreidiarten. I. Species-bastarde des weizens und weizenroggen-bastarde. Botanical Magazine Tokyo 32: 17–38.
- Kippes N., Guedira M., Lin L., Alvarez M. A., Brown-Guedira G. L., Dubcovsky J. (2018): Single nucleotide polymorphisms in regulat6ry site of *VRN-A1* first intron are associated with differences in vernalization requirement in winter wheat. Molecular Genetics and Genomics 293: 1231–1243. doi: 10.1007/s00438-018-1455-0
- Kippes, N., Debernardi, J. M., Vasquez-Gross, H. A., Akpinar, B. A., Budak, H., Kato, K., Chao S., Akhunov E., Dubcovsky J. (2015): Identification of the *VERNALIZATION 4* gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from south Asia. Proceedings of the National Academy of Sciences 112: E5401–E5410. doi: 10.1073/pnas.1514883112
- Knudsen S., Wendt T., Dockter C., Thomsen H. C., Rasmussen M., Egevang J6rgensen M., *et al.* (2022): FIND-IT: Accelerated trait development for a green evolution. Science Advances 8 (34): eabq2266. doi: 10.1126/sciadv.abq2266
- Kořner J., P6nkov6 K. (2002): Vernalization response of some winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 38, 97–103. doi: 10.17221/6242-CJGPB
- Kurowska M., Daszkowska-Golec A., Gruszka D., Marzec M., Szurman M., Szarejko I., Maluszynski M. (2011): TILLING – a shortcut in functional genomics. Journal of Applied Genetics 52, 371–390. doi: 10.1007/s13353-011-0061-1
- Laurie D. A., Griffiths S., Dunford R. P., Christodoulou V., Taylor S. A., Cockram J., Beales J., Turner A. (2004): Comparative genetic approaches to the identification of flowering time genes in temperate cereals. Field Crops Research 90:87–99. doi: 10.1016/j.fcr.2004.07.007
- Lesk C., Rowhani P., Ramankutty N. (2016): Influence of extreme weather disasters on global crop production. Nature 529: 84–87. doi: 10.1038/nature16467
- Levy A. A.; Feldman M. (2022): Evolution and origin of bread wheat, The Plant Cell 34 (7): 2549–2567, doi: 10.1093/plcell/koac130
- Levy J *et* Peterson M. L. (1972): Responses of spring wheats to vernalization and photoperiod. Crop Science 12: 487–490. doi: 10.2135/cropsci1972.0011183X001200040029x

- Li C. *et* Dubcovsky J. (2008): Wheat FT protein regulates *VRN1* transcription through interactions with FDL2. *The Plant Journal* 55: 543–554. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03526.x
- Li C., Lin H., Debernardi J. M., Zhang C., Dubcovsky J. (2024): GIGANTEA accelerates wheat heading time through gene interactions converging on FLOWERING LOCUS T1. *Plant Journal* 118(2): 519-533. doi: 10.1111/tpj.16622.
- Li G., Yu M., Fang T., Cao S., Carver B. F., Yan L. (2013): Vernalization requirement duration in winter wheat is controlled by *TaVRN-A1* at the protein level. *Plant Journal* 76: 742–753. doi: 10.1111/tpj.12326
- Li L. F., Zhang Z. B., Wang Z. H., Li N., Sha Y., Wang X. F., Ding N., Li Y., Zhao J., Wu Y., Gong L., Mafessoni F., Levy A. A., Liu B. (2022): Genome sequences of the five Sitopsis species of *Aegilops* and the origin of polyploid wheat B subgenome. *Molecular Plant* 15: 488–503. doi: 10.1016/j.molp.2021.12.019
- Lü B., Wu J., Fu D. (2015): Constructing the barley model for genetic transformation in Triticeae. *Journal of Integrative Agriculture* 14 (3): 453-468. doi: 10.1016/S2095-3119(14)60935-7.
- Luo M. C., Gu Y. Q., Puiu D., Wang H., Twardziok S. O., Deal K. R., Huo N., Zhu T., Wang L., Wang Y. *et al.* (2017): Genome sequence of the progenitor of the wheat D genome *Aegilops tauschii*. *Nature* 551: 498–502. doi: 10.1038/nature24486
- Lv B., Nitcher R., Han X., Wang S., Ni F., Li K., Pearce S., Wu J., Dubcovsky J., Fu D. (2014): Characterization of *FLOWERING LOCUS T1 (FT1)* Gene in *Brachypodium* and Wheat. *PLoS ONE* 9 (4): e94171. doi: 10.1371/journal.pone.0094171
- Maluszynski M., Szarejko I., Bhatia R., Nichterlein K., Lagoda P. J. L. (2009): Mutation techniques. In: Guimares E., Ceccarelli S., Weltzein E., Rajendran P. G. (eds). *Plant breeding book*. FAO, Rome, pp. 159–194
- Maluszynski M., Szarejko I., Maluszynska J. (2003): Mutation techniques. In: Thomas B., Murphy D. J., Murray B. G. (eds). *Encyclopedia of applied plant sciences*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 186–201
- Marcussen T., Sandve S. R., Heier L., Spannagl M., Pfeifer M., Jakobsen K. S., Wulff B. B. H., Steuernagel B., Klaus F. X., Mayer K. F. X., Olsen O. (2014): Ancient hybridizations

- among the ancestral genomes of bread wheat. *Science* 345: 288–291. doi: 10.1126/science.1250092
- Martin B., Ramiro M., Martínez-Zapater J. M., Alonso-Blanco C. (2009): A high-density collection of EMS-induced mutations for TILLING in Landsberg *erecta* genetic background of *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 9 (147): 1–9. doi: 10.1186/1471-2229-9-147
- McCallum C. M., Comai L., Greene E. A., Henikoff S. (2000a): Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology* 123: 439–442. doi: 10.1104/pp.123.2.439
- McCallum C. M., Comai L., Greene E. A., Henikoff, S. (2000b): Targeted screening for induced mutations. *National Biotechnology* 18: 455–457. doi: 10.1038/74542
- McFadden E. S., Sears E. R. (1944): The artificial synthesis of *Triticum spelta*. *Records of the Genetics Society of America* 13: 26–27.
- McFadden E. S., Sears E. R. (1946): The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *Journal of Heredity* 37: 81–89, 107–116.
- McIntosh R. A., Devos K. M., Dubcovsky J., Rogers W. J., Morris C. F., Appels R., Sommers D. J., Anderson O. A. (2007): Catalogue of gene symbols for wheat (supplement). USDA-ARS, Washington, DC.
- Melzer R. *et* Theißen G. (2009): Reconstitution of “floral quartets” *in vitro* involving class B and class E floral homeotic proteins. *Nucleic Acids Research* 37: 2723–2736. doi: 10.1093/nar/gkp129
- Miura H., Nakagawa M., Worland A. J. (1999): Control of ear emergence time by chromosome 3A of wheat. *Plant Breeding* 118: 85–87. doi: 10.1046/j.1439-0523.1999.118001085.x
- Muenster T., Pahnke J., Di Rosa A., Kim J. T., Martin W., Saedler H., Theissen G. (1997): Floral homeotic genes were recruited from homologous MADS-box genes preexisting in the common ancestor of ferns and seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 2415–2420. doi: 10.1073/pnas.94.6.2415
- Nagatani A. (2004): Light-regulated nuclear localization of phytochromes. *Current Opinion in Plant Biology* 7(6):708–711. doi: 10.1016/j.pbi.2004.09.010

- Niu D., Gao Z., Cui B., Zhang Y., He Y. (2024): A molecular mechanism for embryonic resetting of winter memory and restoration of winter annual growth habit in wheat. *Nature Plants* 10: 37–52. doi: 10.1038/s41477-023-01596-6
- Pearce S., Vanzetti L. S., Dubcovsky J. (2013): Exogenous gibberellins induce wheat spike development under short days only in the presence of *VERNALIZATION1*. *Plant Physiology* 163: 1433–1445. doi: 10.1104/pp.113.225854
- Pugsley A. (1971): A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 22: 21. doi: 10.1071/AR9710021
- 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(6): 847–57. doi: 10.1016/0092-8674(95)90288-0
- Quail P. H. (2002): Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(2): 85–93. doi: 10.1038/nrm728
- Ray D. K., Mueller N. D., West P. C., Foley J. A. (2013): Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS One* 8: e66428. doi: 10.1371/journal.pone.0066428
- Rockwell N. C., Su Y. S., Lagarias J. C. (2006): Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 837–858. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144208
- Sakamura T. (1918): Kurze Mitteilung uber die chromosomenzahlen und die Verwandtschaftsverhaltnisse der Triticum Arten. *Bot Mag Tokyo* 32: 151–154.
- Sakuma S. *et* Schnurbusch T. (2020): Of floral fortune: tinkering with the grain yield potential of cereal crops. *New Phytologist* 225: 1873–1882. doi: 10.1111/nph.16189
- Scarth R., Law C. N. (1984): The control of the day-length response in wheat by the group-2 chromosomes. *Zeitschrift fur Pflanzenzuchtung* 92: 140–150.
- Searle I., Coupland G. (2004): Induction of Flowering by Seasonal Changes in Photoperiod. *EMBO Journal* 23: 1217–1222. doi: 10.1038/sj.emboj.7600117
- Sears E. R. (1952): Homoeologous chromosomes in *Triticum aestivum*. *Genetics* 37: 624.

- Shaw L. M., Li C., Woods D. P., Alvarez M. A., Lin H., Lau M.Y., Chen A., Dubcovsky J. (2020): Epistatic interactions between *PHOTOPERIOD1*, *CONSTANS1* and *CONSTANS2* modulate the photoperiodic response in wheat. *PLoS Genetocs* 16(7): e1008812. doi: /10.1371/journal.pgen.1008812
- Shaw L. M., Turner A. S., Laurie D. A. (2012): The impact of photoperiod insensitive *Ppd-1a* mutations on the photoperiod pathway across the three genomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Journal* 71: 71–84. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04971.x
- Shiferaw B., Smale M., Braun H.-J., Duveiller E., Reynolds M., Muricho G. (2013): Crops that Feed the World 10. Past Successes and Future Challenges to the Role Played by Wheat in Global Food Security. *Food Security*, 5, 291–317. doi: 10.1007/s12571-013-0263-y
- Shimada S., Ogawa T., Kitagawa S., Suzuki T., Ikari C., Shitsukawa N., Abe T., Kawahigashi H., Kikuchi R., Handa H., Murai K. (2009): A genetic network of flowering time genes in wheat leaves, in which an *APETALA1/FRUITFULL*-like gene, *VRN1*, is upstream of *FLOWERING LOCUS T*. *Plant Journal* 58: 668–681. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03806.x
- Schwarz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W., Saedler H., Sommer H., (1990): Genetic-control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250: 931–936. doi: 10.1126/science.250.4983.931
- Skibová A. (2022): Studium zbytkového vernalizačního nároku u pšenice seté. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Slafer G. A., Rawson H. M. (1995): Photoperiod × temperature interactions in contrasting wheat genotypes: time to heading and final leaf number. *Field Crops Research* 44: 73–83. doi: 10.1016/0378-4290(95)00077-1
- Slafer G.; Rawson H. (1994): Sensitivity of Wheat Phasic Development to Major Environmental Factors: A Re-Examination of Some Assumptions Made by Physiologists and Modellers. *Functional Plant Biology* 21: 393–426. doi: 10.1071/PP9940393
- Snape J., Butterworth K., Whitechurch E., Worland A. J. (2001): “Waiting for fine times: Genetics of flowering time in wheat,” in *Wheat in a global environment*. Eds. Z. Bedö and L. Láng (Dordrecht: Springer Netherlands), 67–74. doi: 10.1007/978-94-017-3674-9_7

- Strayer C., Oyama T., Schultz T. F., Raman R., Somers D. E., Más P., Panda S., Kreps J. A., Kay S. A. (2000): Cloning of the arabidopsis clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 289: 768–771. doi: 10.1126/science.289.5480.768
- Strejčková B., Čegan R., Pečinka A., Milec Z., Šafář J. (2020): Identification of polycomb repressive complex 1 and 2 core components in hexaploid bread wheat. *BMC Plant Biology* 20: 175. doi: 10.1186/s12870-020-02384-6
- Strejčková B., Milec Z., Holušová K., Cápál P., Vojtková T., Čegan R., Šafář J. (2021): In-Depth Sequence Analysis of Bread Wheat *VRN1* Genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 12284. doi: 10.3390/ijms222212284
- 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(6832): 116–20. doi: 10.1038/35074138
- Sun H., Guo Z., Gao L., Zhao G., Zhang W., Zhou R., Wu Y., Wang H., An H., Jia J. (2014): DNA methylation pattern of *Photoperiod-B1* is associated with photoperiod insensitivity in wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* 204: 682-692. doi: 10.1111/nph.12948
- Szarejko I., Szurman-Zubrzycka M., Nawrot M., Marzec M., Gruszka D., Kurowska M., Maluszynski M. (2016): Creation of a TILLING Population in Barley After Chemical Mutagenesis with Sodium Azide and MNU. *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding*, 91–111. doi: 10.1007/978-3-319-45021-6_6
- Szurman-Zubrzycka M., Chmielewska B., Gajewska P., Szarejko I. (2017): “Mutation detection by analysis of DNA heteroduplexes in TILLING populations of diploid species,” in *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding. Protocols*. Eds. J. Jankowicz-Cieślak, T. H. Tai, J. Kumlehn and B. J. Till (Switzerland: Springer Open, Springer International Publishing), 281–304. doi: 10.1007/978-3-319-45021-6_18
- Szurman-Zubrzycka M., Kurowska M., Till B. J., Szarejko I. (2023): Is it the end of TILLING era in plant science? *Frontiers in Plant Science* 14: 1160695. doi: 10.3389/fpls.2023.1160695
- Takahashi R. et Yasuda S. (1971): Genetics of earliness and growth habit in barley. In: Nilan RA (ed) *Proceedings of the 2nd international Barley genetics symposium*. Washington State University Press, WA, pp 388–408

- Tan C. *et Yan L.* (2016): Duplicated, deleted and translocated *VRN2* genes in hexaploid wheat. *Euphytica* 208: 277–284. doi: 10.1007/s10681-015-1589-7
- Tanaka C., Itoh T., Iwasaki Y., Mizuno N., Nasuda S., Murai K. (2018): Direct interaction between *VRN1* protein and the promoter region of the wheat *FT* gene. *Genes & Genetic Systems* 93(1): 25-29. doi: 10.1266/ggs.17-00041
- Till B. J., Reynolds S. H., Greene E. A., Codomo C. A., Enns L. C., Johnson J. E., Burtner C., Odden A. R., Young K., Taylor N. E., Henikoff J. G., Comai L., Henikoff S. (2003): Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Research* 13: 524–530. doi: 10.1101/gr.977903
- Till B.J., Datta S., Jankowicz-Cieslak J. (2018): “TILLING: The Next Generation,” in *Plant Genetics and Molecular Biology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 164 . Eds. R. Varshney, M. Pandey and A. Chitikineni (Cham: Springer). doi: 10.1007/10_2017_54
- Treisman R. (1995): Inside the MADS box. *Nature* 376, 468–469. doi: 10.1038/376468a0
- Trethowan R. M. (2014): Defining a Genetic Ideotype for Crop Improvement Title. In *Crop Breeding Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*; Fleury D., Whitford R., Eds.; Humana Press: New York, NY, USA, 1145: 1–20. doi: 10.1007/978-1-4939-0446-4_1.
- Trevaskis B., Bagnall D. J., Ellis M. H., Peacock W. J., Dennis E. S. (2003): MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 13099–13104. doi: 10.1073/pnas.1635053100
- Trevaskis B., Hemming M. N., Dennis E. S., Peacock W. J. (2007): The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends in Plant Science* 12: 351–357. doi: 10.1016/j.tplants.2007.06.010
- 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(4): 1397-405. doi: 10.1104/pp.105.073486.
- Turner A. S., Faure S., Zhang Y., Laurie D. A. (2013): The effect of day-neutral mutations in barley and wheat on the interaction between photoperiod and vernalization. *Theoretical and Applied Genetics* 126(9): 2267–77. doi: 10.1007/s00122-013-2133-6

- Wilhelm E., Turner A. S., Laurie D.A. (2009): Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf) Theoretical and Applied Genetics 118: 285–94. doi: 10.1007/s00122-008-0898-9
- Xiao J., Xu S., Li C., Xu Y., Xing L., Niu Y., Huan Q., Tang Y., Zhao C., Wagner D., Gao C., Chong K. (2014): O-GlcNAc-mediated interaction between *VER2* and *TaGRP2* elicits *TaVRN1* mRNA accumulation during vernalization in winter wheat. Nature Communications 5: 4572. doi: 10.1038/ncomms5572
- Xie L., Zhang Y., Wang K., Luo X., Xu D., Tian X., Li L., Ye X., Xia X., Li W., Yan L., Cao S. (2019): *TaVrt2*, an SVP-like gene, cooperates with *TaVrn1* to regulate vernalization-induced flowering in wheat. New Phytologist 231(2): 834-848. doi: 10.1111/nph.16339
- Xing L., Li J., Xu Y., Xu Z., Chong K. (2009): Phosphorylation modification of wheat lectin *VER2* is associated with vernalization-induced O-GlcNAc signaling and intracellular motility. PloS One 4: e4854. doi: 10.1371/journal.pone.0004854
- Xu S., Dong Q., Deng M., Lin D., Xiao J., Cheng P., Xing L., Niu Y., Gao C., Zhang W., Xu Y., Chong K. (2021): The vernalization-induced long non-coding RNA VAS functions with the transcription factor TaRF2b to promote *TaVRN1* expression for flowering in hexaploid wheat. Molecular Plant 14: 1525–1538. doi: 10.1016/j.molp.2021.05.026
- 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*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103: 19581–19586. doi: 10.1073/pnas.0607142103
- 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. doi: 10.1007/s00122-004-1796-4
- 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. doi: 10.1126/science.1094305
- Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G., Helguera M., Fahima T., Dubcovsky J. (2003): Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 6263–6268. doi: 10.1073/pnas.0937399100

- Zadoks J. C., Chang T. T., Konzak C. F. (1974): A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14: 415–421. doi: 10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x
- Zandalinas I., Mittler R., Balfagón D., Arbona V., Gómez-Cadenas A. (2018): Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum* 162, 2–12. doi: 10.1111/ppl.12540
- Zhang W. P., Zhao G. Y., Gao L. F., Kong X. Y., Guo Z. A., Wu B. H., Jia J. (2016): Functional studies of heading date-related gene *TaPRR73*, a paralog of *Ppd1* in common wheat. *Frontiers in Plant Science* 7: 772. doi: 10.3389/fpls.2016.00772
- 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: 470. doi: 10.3389/fpls.2015.00470
- Zhao G., Zou C., Li K., Wang K., Li T., Gao L., Zhang X., Wang H., Yang Z., Liu X., Jiang W., Mao L., Kong X., Jiao Y, Jia J. (2017): The *Aegilops tauschii* genome reveals multiple impacts of transposons. *Nature Plants* 3: 946–955. doi: 10.1038/s41477-017-0067-8
- Zikhali M. et 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. Proceedings of the 12th International Wheat Genetics Symposium*; Ogihara Y., Takumi S., Handa H., Eds.; Springer: Tokyo, Japan, 339–345. doi: 10.1007/978-4-431-55675-6_1
- Zikhali M., Leverington-Waite M., Fish L., Simmonds J., Orford S., Wingen L. U., Gorman R., Gosman N., Bentley A., Griffiths S. (2014): Validation of a 1DL earliness *per se* (*Eps*) flowering QTL in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Breeding* 34: 1023–2033. doi: 10.1007/s11032-014-0094-3

Internetové zdroje:

- FAO statistics. [online] [navštívené 05.02.2024]. Dostupné z <https://www.fao.org/home/en>
- United nations [online] [navštívené 11.03.2024] Dostupné z <https://www.un.org/en/>
- EnsemblPlants [online] [navštívené 21.4.2023] Dostupné z <https://plants.ensembl.org/index.html>
- Statistic Kingdom [online] [navštívené 23.4.2024] Dostupné z <https://www.statskingdom.com>