

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

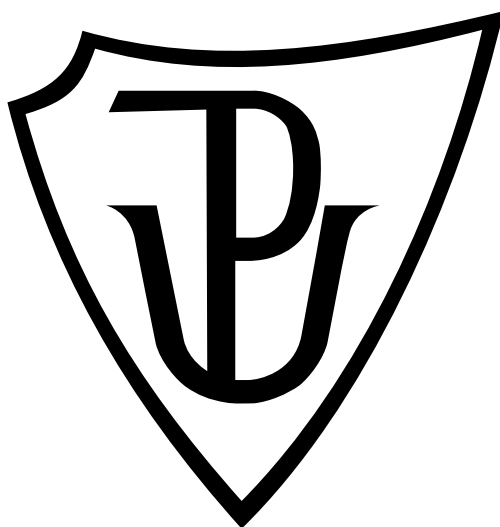
Olomouc 2017

Bc. Vendula Svobodová

Univerzita Palackého v Olomouci

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Charakterizace lokusu genu *SRS1* ovlivňujícího
výnos ve vybrané skupině odrůd pšenice**

Diplomová práce

Bc. Vendula Svobodová

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

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Miroslava Valárika, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci dne 28. 7. 2017

.....

Bc. Vendula Svobodová

Souhrn

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednou z nejdůležitějších zemědělských plodin na světě. Pšenice poskytuje základní potravu pro 30 % obyvatel Země a přibližně 20 % kalorií konzumovaných lidmi. Jedním z hlavních důvodů úspěšnosti pšenice je její přizpůsobivost k rozmanitosti přírodních podmínek. Přizpůsobení pšenice je zejména zásluhou allohexaploidního genomu, který se vyvíjel postupnými hybridizacemi tří blízce příbuzných genomů. Výsledkem toho je komplexní hexaploidní genom pšenice seté o velikosti cca 17 Gb ($2n = 6x = 42$, AABBDD), který patří mezi největší a nejsložitější genomy u obilovin.

S rostoucí lidskou populací a změnou stravovacích návyků se zvyšuje poptávka po potravinách, a tím se neustále zvyšují požadavky na produkci pšenice. Výnos pšenice je ohrožován omezenými osevnými plochami a také biotickými a abiotickými stresy jako jsou nemoci např. rzi a padlí travní nebo výrazné klimatické změny. Z těchto důvodů je nutné podpořit urychlení vývoje nových odrůd pšenice, které budou mít stabilně vysoký výnos a budou odolné k těmto stresům. Stabilní výnos pšenice je velice důležitý pro potravinovou bezpečnost světa.

Výnos je ovlivněn celou řadou faktorů zejména na genetické úrovni, ale významně i přírodními podmínkami. Jedním z kandidátních genů ovlivňujících výnos je pšeničný homolog rýžového genu *SRS1*. Tento gen, kromě tvaru semen, pravděpodobně také ovlivňuje větvení klasu a tím i počet semen na klas. Počet semen na klas je jedním z hlavních výnosových prvků výnosu. V této práci byla studována diverzita tohoto genu v rámci vybraných odrůd pšenice s větveným klasem a hledána asociace tohoto znaku s mutacemi v pšeničném homologu genu *SRS1*. Analýza sekvencí tohoto genu z 25 TRI linií s větveným klasem a DNA z tříděných homeologních subgenomů A, B, D kultivaru Chinese spring identifikovala 136 polymorfismů mezi homeologními subgenomy s 12 SNP mutacemi. Fylogenetická analýza těchto sekvencí ukázala, jak korelují tyto SNP s fenotypem větvení.

Summary

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important agricultural crops in the world. Wheat provides basic food for 30% of the Earth's population and about 20% of calories consumed by people. One of the main reasons for the success of wheat is its adaptability to the diversity of natural conditions. The adaptation of wheat is mainly due to the allohexaploid genome, which was developed by sequential hybridizations of three closely related genomes. The result is a complex hexaploid genome of approximately 17 gb ($2n = 6x = 42$, AABBDD), which is one of the largest and most complex genomes in cereals.

With the increasing human population and changing eating habits, food demand is on the rise, and there is also a growing demand for wheat production. The yield of wheat is threatened by limited crop fields and also by biotic and abiotic stresses, such as diseases e.g. rust and powdery mildew of cereals and grasses, or severe climate change. For these reasons, it is necessary to support the acceleration of the development of new wheat varieties that will have a steadily high yield and will be resistant to these stresses. A stable yield of wheat is very important for the world's food security.

The yield is influenced by a number of factors, especially on the genetic level, but by the natural conditions as well. One of the candidate genes influencing the yield is the wheat homologue of the rice gene *SRS1*. This gene, in addition to the shape of the seeds, is also likely to affect the branching of the spike and thus the number of seeds on the ears. The number of seeds per spike is one of the main yield components. In this work, the diversity of this gene was studied within the selected varieties of wheat with a branched spike and the association of this sign with mutations in the wheat homolog of the *SRS1* gene was sought. Sequence analysis of this gene from 25 TRI lines with branched spike and DNA from the sorted homeologous subgenomes A, B, D cultivars of the Chinese Spring cultivar identified 136 polymorphisms between homeologous subgenomes with 12 SNP mutations. Phylogenetic analysis of these sequences showed how these SNPs correlate with the branching phenotype.

Ráda bych poděkovala Mgr. Miroslavu Valárikovi, Ph.D. za jeho pomoc při zpracování diplomové práce, za odborné rady, trpělivost a čas, který věnoval této práci. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Barboře Balcárkové za její cenné připomínky. Dále bych chtěla poděkovat všem laborantkám, zejména Ing. Marii Seifertové za její vstřícnost a pomoc při sekvenování. Mé poděkování patří v neposlední řadě všem zaměstnancům i studentům Ústavu experimentální botaniky v Olomouci za vytvoření přátelského a pracovního prostředí.

Obsah

1 ÚVOD.....	8
2 CÍLE PRÁCE	9
3 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	10
3.1 Pšenice setá a ostatní obiloviny	10
3.1.1 Evoluce pšenice	11
3.1.2 Domestikace pšenice	13
3.1.3 Genom pšenice	15
3.1.4 Významné geny	17
3.1.5 Výnos	20
3.3 Významné kvantitativní znaky	21
3.3.1 Mapování QTL	22
3.2 Genom rýže jako model pro pšenici	23
3.2.1 Význam rýže	24
3.4 <i>SRS1</i> gen	26
4 MATERIÁL A METODIKA	29
4.1 Rostlinný materiál	29
4.1.1 Pěstování TRI linií pšenice	30
4.2 Metodika	30
4.2.1 Navrhování primerů	30
4.2.2 Extrakce DNA	30
4.2.3 Polymerázová řetězová reakce	32
4.2.4 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza	34
4.2.5 DNA sekvenování Sangerovou metodou	35
4.2.6 Fylogenetická analýza a použité programy	35
5 VÝSLEDKY	37
5.1 Extrakce DNA, PCR a sekvenování lokusu genu <i>SRS1</i>	37
5.2 Analýza sekvencí <i>SRS1</i> genu u TRI linií odrůd pšenice	38
5.2.1 Polymorfni oblasti v lokusu <i>SRS1</i> genu	39
5.4 Fenotyp větvení klasu u TRI linií	41
5.5 Fylogenetická analýza sekvenčních dat	42
6 DISKUSE	44

7 ZÁVĚR.....	48
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	49
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	59

1 ÚVOD

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je významnou obilovinou a celosvětově je pěstovaná na více než 95 % ploch, na kterých se pěstují pšenice. Pšenice má velké využití v potravinářství, je důležitým zdrojem bílkovin, sacharidů a minerálů. Díky své schopnosti adaptace je jednou z nejrozšířenějších obilnin v širokém rozhraní klimatických podmínek a také díky relativně vysoké výživové hodnotě, výnosu, široké škále podmínek pro pěstování a dlouhodobé trvanlivosti obilí.

Komplexní genom pšenice seté začal vznikat před půl milionem roků hybridizací planých druhů trav *Triticum urartu* (genom AA) a *Aegilops speltoides* (genom BB) v oblasti úrodného půlměsíce. Vzniklý hybrid *Triticum turgidum* měl celou genetickou informaci z obou druhů. V období neolitické revoluce před 10 tisíci lety došlo k další hybridizaci *Triticum turgidum* s *Aegilops tauschii* (genom DD) za vzniku původní pšenice seté, která si opět ponechala celou dědičnou informaci obou rodičů (genom AABBDD). Takto velký genom propůjčuje pšenici již zmiňovanou plasticitu, ale šlechtění nových odrůd pšenice s požadavky na odolnost vůči nemocem a extrémům podnebí a stabilitu výnosu zůstává výzvou.

Výnos pšeničného zrna je nejvýznamnějším agronomickým znakem. Výnos je komplexní kvantitativní znak s nízkou heritabilitou, protože je podmíněný velkým počtem genů malého účinku a dále je výrazně ovlivňován přírodními podmínkami. Výnos zrna je charakterizován třemi hlavními výnosovými prvky, které vykazují dobrou heritabilitu. Výnosovými prvky jsou počet klasů na m², počet zrn na klas a velikost zrna neboli váha tisíce zrn. Gen *SRS1* studovaný v této práci s největší pravděpodobností ovlivňuje zejména velikost a tvar zrna, ale možná také fenotyp celkové rostliny (hlavně větvení klasu) jak bylo popsáno u rýže. Proto byl homolog tohoto genu hledán studován u standardní pšenice a také u pšeničných linií s odpovídajícími aberacemi ve fenotypu.

V rámci této práce byl studován homolog rýžového *SRS1* genu na sekvenční úrovni u vybraných standardních odrůd pšenice a odrůd pšenice s větveným klasem. Z výsledných sekvencí byly zjištěny polymorfní oblasti v rámci lokusu genu *SRS1* a na jejich základě byl sestaven fylogenetický strom.

2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce bylo identifikovat homolog rýžového *SRS1* genu u pšenice. Dále studovat možnou diverzitu tohoto genu u různých kultivarů pšenice se standardním a změněným fenotypem a případně prokázat nebo vyvrátit asociaci tohoto genu s větvením klasu pšenice. Posledním cílem bylo studovat evoluci jednotlivých alel na základě sekvenčních dat a fylogenetické analýzy.

3 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

3.1 Pšenice setá a ostatní obiloviny

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je jednou z nejvýznamnějších obilovin světa a pro 30 % obyvatel Země je základní potravinou, která je bohatá na bílkoviny, sacharidy a minerály (Lobell a kol., 2011). Pšenice setá poskytuje přibližně 20 % kalorií konzumovaných lidmi (Feldman a kol., 2012). Jak roste světová populace a mění se stravovací návyky, hlavně v rozvojových krajinách, tak roste poptávka po potravinách a tudíž i po pšenici. Bohužel osevní plochy nejsou neomezené, a proto je potřeba šlechtit odolnější odrůdy pšenice s vyšším a stabilním výnosem (Abe a kol., 2010; Feuillet a kol., 2007). Pšenice setá patří do čeledi *Poaceae*, ze které se celosvětově získává až 60 % potravin (Keller a Feuillet, 2000).

Poaceae (čeleď lipnicovité, trávy) je jednou z nejdůležitějších čeledí pro zemědělství, která zahrnuje více než 10 000 druhů včetně tribu Triticeae. Tento tribus zahrnuje také rody *Triticum*, *Secale* a *Hordeum*. Reprodukční mechanismus, anatomie rostliny a genetická variabilita umožňuje travám adaptaci na široké přírodní podmínky. Genomy jednotlivých trav se od sebe velmi liší v počtu chromozomů i v celkové velikosti (Keller a Feuillet, 2000). Trávy se také od sebe odlišují ploidií. I přes tyto významné rozdíly, bylo komparativním mapováním zjištěno, že kolinearita genetických markerů a genů je velmi konzervovaná mezi různými genomy trav (Devos, 2005). Kolinearitu bylo využito pro strategie pozičního klonování u velkých genomů (Feuillet a Keller, 2002). Komparativní genomika umožňuje analyzovat strukturu genomu u těchto odlišných druhů a porozumět evolučnímu vývoji genomů. Pokud je uspořádání genů konzervované mezi druhy, tak menší genom může být použit jako referenční pro velký genom. Rýže (*Oryza sativa* L.) byla často využívána jako model pro trávy, stejně tak i huseníček (*Arabidopsis thaliana* L.), avšak ten má s travami omezenější kolinearitu (Keller a Feuillet, 2000).

Jedním z klíčových faktorů úspěšnosti pšenice, jako světové plodiny, je její adaptabilita na širokou škálu klimatických podmínek (Keller a Feuillet, 2000; Petersen a kol., 2006). Jenže vědci, šlechtitelé a pěstitelé se musejí stále více potýkat s rostoucími požadavky

na produkci pšenice. K tomu pěstitelé čelí většímu používání hnojiv a dalším nákladům spojených s pěstováním, extrémům počasí, konkurenci mezi potravinami a meztročně nestabilnímu výnosu (IWGSC, 2014).

K urychlení vývoje nových odrůd pšenice přispívají základní informace o genomech obilovin (rýže, kukuřice, čirok) vedoucí k porozumění zemědělsky významným vlastnostem na molekulární úrovni. Mezi něž patří výnos a tolerance k abiotickému i biotickému stresu (Eversole a kol., 2014; Petersen a kol., 2006). Zlepšení výnosu pšenice má velký význam pro zajištění odpovídající produkce obilí (Hedden, 2003).

3.1.1 Evoluce pšenice

Pšenice setá a příbuzné druhy se vyvinuly postupným křížením v oblasti Blízkého východu (Obr. 1) známé také jako „Úrodný půlměsíc“ (Izrael, Jordánsko, Turecko, Sýrie, Írán, Irák a Egypt). Pšeničné druhy sdílejí stejnou základní sadu sedmi chromozomů, většinou jako diploidi (Feuillet a kol., 2007). Pšenice setá má velký o 17 Gbp a komplexní genom ($2n = 6x = 42$, AABBDD), který vznikl na základě dvou hybridizací. Tato velikost a komplexita allohexaploidního genomu umožňuje pšenici přizpůsobení k širokému rozsahu přírodních podmínek (Cox, 1997).



Obr. 1: Domestikace obilovin na území „Úrodného půlměsíce“ (tmavě zelená)

(Převzato z Feuillet a kol. 2007.)

Odhaduje se, že k hybridizaci došlo někdy před půl milionem let a druhá následovala v době před asi deseti tisíci lety (Feldman a kol., 1995). V první hybridizaci se křížili dva diploidní druhy za vzniku tetraploida, který si ponechal veškerou dědičnou informaci obou rodičů. První planý diploidní druh *Triticum urartu* ($2n = 2x = 14$) je donorem genomu A a druhý diploidní druh je dosud neznámý druh úzce příbuzný s *Aegilops speltoides* ($2n = 14$, SS) ze sekce Sitopsis, který poskytl genom B. Zkřížením těchto dvou diploidů vznikl tetraploidní druh *Triticum turgidum* ($2n = 4x = 28$, AABB), předek *Triticum turgidum* sp. *durum*. Druhá hybridizace proběhla jižně od Kaspického moře, kde se zkřížil tetraploid *Triticum turgidum* s diploidem *Aegilops tauschii* ($2n = 2x = 14$), jenž je donorem genomu D. Čímž vznikl úrodný hexaploid *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$, AABBDD) s celými sadami chromozomů od všech svých předků (Schéma 1), (Dvořák a kol., 1988; Dvořák a Zhang, 1990; Dvořák a kol., 1993; Feuillet a kol., 2007). Od svého vzniku se pšenice setá intenzivně pěstuje po celém světě a je pěstovaná na více než 95 % všech ploch osetých pšenicemi (IWGSC, 2014).

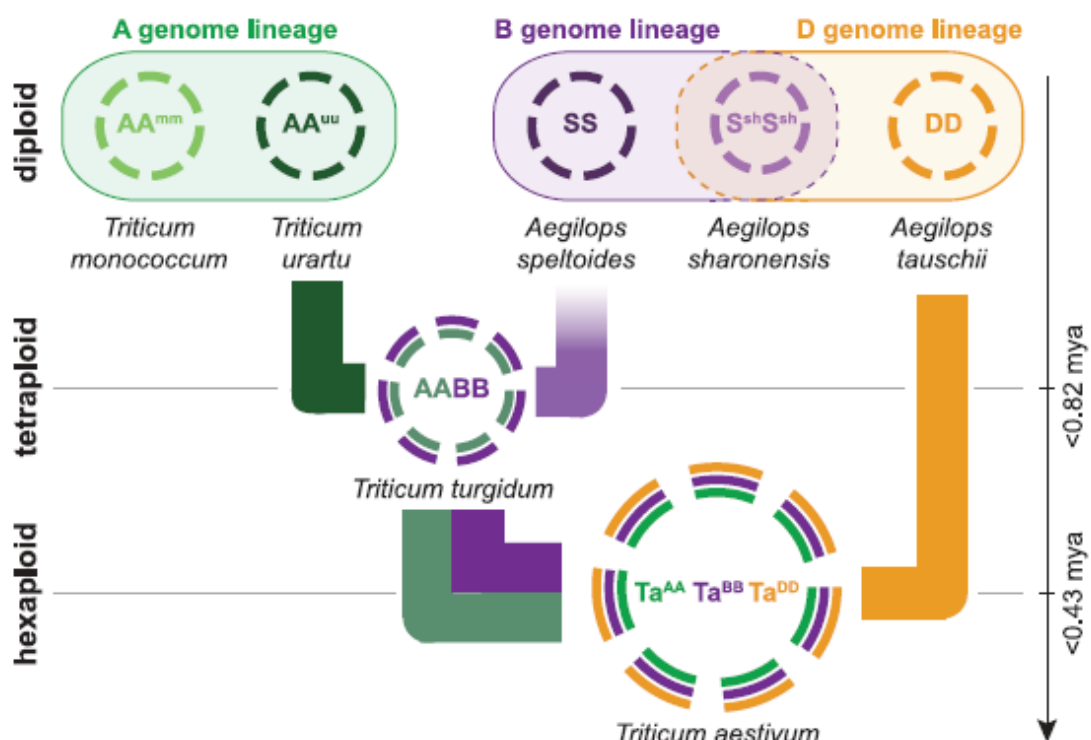


Schéma 1: Polyploidizace genomů pšenice

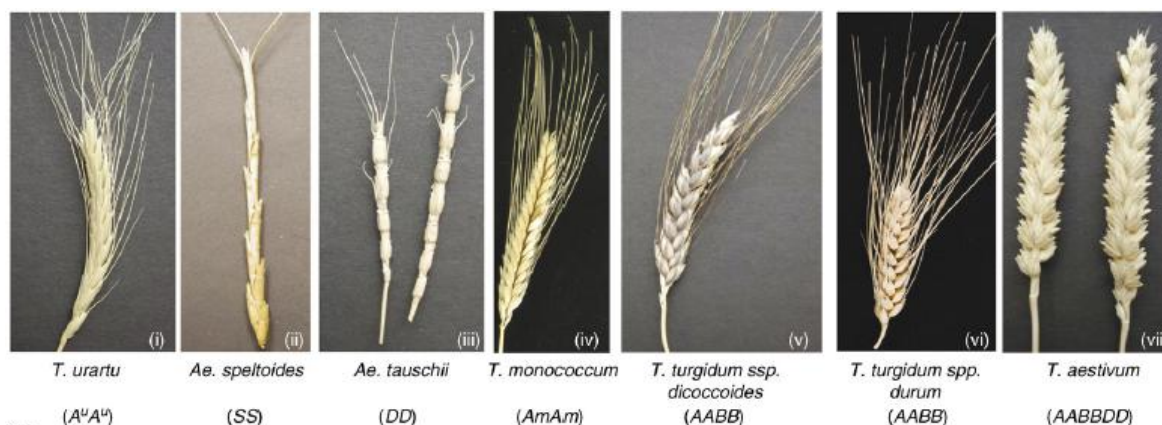
Znázornění příbuzných vztahů mezi předky pšenice v rámci polyploidizace. Znázorněny jsou jednotlivé linie genomů A, B, D a jejich splynutí do výsledného hexaploidního genomu. Kruhy představují chromozomální sady a k nim odpovídající zbarvení kruhu. (Převzato a upraveno z IWGSC, 2014.)

Příbuznost mezi jednotlivými subgenomy a diploidními druhy pšenice byla dobře popsána. Avšak doba divergence mezi třemi subgenomy stále ještě chybí. To je převážně z důvodu nedostatku fosilního materiálu z tribu Triticeae (Marcussen a kol., 2014) a tím je nemožná diverzifikace v čase (Escobar a kol., 2011). Avšak největší překážkou je nedostatek sekvencí v rámci složité hexaploidní pšenice seté a jejich příbuzných diploidů (Lobell a kol., 2011).

Fosilní data a fylogenetické studie naznačují, že se dvě linie trav oddělily od společného předka před 50 až 70 mil. lety (Salse a kol., 2008). Z první linie vznikla podčeď Panicoideae (kukuřice, čirok). Druhá linie dala vzniknout podčeďi Ehrhartoidea (rýže) a Pooideae (Triticeae a Brachypodieae), které se vyvíjely společně (Massa a kol., 2011; Wicker a kol., 2009). Řada studií potvrzuje, že genomy obilovin byly různě celogenomově duplikovány. Společná duplikace v rýži a pšenici naznačuje, že tato duplikace předcházela jejich divergenci ze společného předka před 50 až 70 mil. lety (Salse a kol., 2008). Rozdělení Pooideae a Ehrhartoidea je odhadované na 40 až 54 mil. let. Triticeae (pšenice, ječmen, žito) a Brachypodieae (válečka) se od sebe rozdělily nejspíše před 32 až 39 mil. lety. Pšenice a ječmen se oddělily před 11,6 mil. lety a od té doby bylo dále diverzifikováno několik dalších poddruhů (Wicker a kol., 2009; Massa a kol., 2011).

3.1.2 Domestikace pšenice

Vzestup moderního zemědělství a domestikace pšenice začaly na území „Úrodného půlměsíce“ přibližně před 10 000 lety. Jedná se o neolitickou revoluci, která byla rozhodující pro moderní historii lidstva (Heun a kol., 1997). Rané postupy v zemědělství využívaly planých diploidních druhů pšenice jako *Aegilops* a *Triticum*. Jak se zemědělství vyvinulo, plané plodiny byly postupně nahrazovány domestikovanými diploidními a polyploidními variantami pšenice (Obr. 2), (Salamini a kol., 2002). V současné době *Triticum aestivum* dominuje v celosvětové produkci pšenice (Marcussen a kol., 2014).



Obr. 2: Morfologie klasů planých a domestikovaných druhů pšenice

(Převzato z Feuillet a kol. 2007.)

V posledních několika tisíci letech lidé využívali široké adaptability *Poaceae* k domestikaci a šlechtění malé podmnožiny trav. Toto úsilí vedlo k pěstování důležitých kulturních plodin včetně pšenice, rýže, kukuřice a čiroku (Keller a Feuillet, 2000). Od počátku zemědělství byly obiloviny hlavním zdrojem kalorií pro lidstvo. Pro relativně vysoký výnos, výživovou hodnotu, snadné pěstování, přepravu a skladování byla celá řada různých obilovin domestikována původními farmáři na Středním východě, odkud započalo šíření po celém světě (Feuillet a kol., 2007; Zohary a Hopf, 2000).

Tribus Triticeae zahrnuje asi 500 taxonů v 37 rodech a dohromady přispívá k více než třetině světové produkce potravin. Do tohoto tribu patří diploidní ječmen a žito, tetraploidní pšenice tvrdá (*Triticum durum*) nebo *Triticum turgidum*, hexaploidní pšenice, špalda a tritikále. Za posledních sto let byly druhy Triticeae díky svému zemědělskému významu intenzivně šlechtěny. Bohužel s tímto intenzivním šlechtěním dochází k snižování diverzity genofondu (Feuillet a kol., 2007).

Dalšími důležitými druhy pšenice jsou *Triticum turgidum* a *Triticum monococcum*. Obě přispěly k vývoji k celé řadě příbuzných a dalších poddruhů pšenice, které byly pěstovány po celém světě tisíce let. Tetraploidní *Triticum turgidum* byla rovněž před více než 10 000 lety domestikována a stala se známou jako dvouzrnka. Je více poddajnou pšenicí a obecně přizpůsobivou k širší škále přírodních podmínek prostředí než její původní druhy. Ze všech poddruhů je dnes nejvýznamnější *Triticum turgidum* ssp. *durum* (pšenice tvrdá), který se hojně pěstuje pro výrobu těstovin. Naproti tomu diploidní jednozrnka *Triticum monococcum*

je v současnosti zemědělsky málo významná a pěstuje se pouze jako krmivo pro zvířata v horských oblastech Turecka, Itálie a Španělska. Byla pravděpodobně prvním druhem pšenice, který byl široce kultivován před více než 10 000 lety v jihovýchodním Turecku. Dnes je jednozrnka díky své nižší ploidii využívána jako genetický model pro analýzu s hexaploidní pšenicí. Jednozrnka byla vyšlechtěna z planého druhu *Triticum boeoticum* (Heun a kol., 1997; Luo a kol., 2007).

3.1.3 Genom pšenice

Pšenice setá je allohexaploid s 21 páry chromozomů, které jsou rozděleny do třech homeologních sad o sedmi chromozomech podle původního subgenomu A, B a D (Gale a kol. 1985; Gale a Devos, 1998). Celkem pšeničný genom dosahuje velikosti kolem 17 Gbp. Homeologní sady chromozomů jsou popsány jako 1A až 7A, 1B až 7B a 1D až 7D. Každá ze tří sad chromozomů nese velmi podobnou sadu genů (Choulet a kol., 2010) a navíc většinu genomu, více než 80 %, tvoří repetitivní elementy (Moore a kol., 1995), což znesnadňuje získání referenční sekvence genomu (Wicker a kol., 2011). Kromě negenové DNA obsahuje pšenice zhruba 120 tisíc genů. Největší chromozom pšenice 3B o velikosti téměř 1 Gb je více než sedmkrát větší než celá sekvence modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (IWGSC, 2014).

Podle fylogenetického vývoje se odhaduje, že původní A (*Triticum*) a B (*Aegilops*) genomy se rozešly od společného předka před více než sedmi miliony lety. Genom D vznikl homoploidní hybridizací mezi předky A a B genomu, více než před pěti miliony lety. Z toho vyplývá, že chromozomy homeologních genomů A a B jsou více podobné genomu D, než sobě navzájem (Marcussen a kol., 2014). Také byl zaznamenán vyšší počet genů v subgenomu B v porovnání se subgenomy A a D. V jednotlivých chromozomech se podíl genů mezi homeologními genomy mění (Wicker a kol. 2011; IWGSC, 2014). Tato pozorování ukazují na rozdíly v subgenomech ještě před polyploidizací pšenice. Také je tím naznačeno, že složení genomu zachovává kopie genů v každém z genomů A, B a D samostatně, v důsledku nezávislého párování během meiózy (Griffiths a kol., 2006). Správné párování a segregace chromozomů během meiózy jsou zásadní pro genovou stabilitu a funkční rozmnožování. Správné rozdělení chromozomů je náročnější u polyploidních organismů,

než u běžných diploidů. U polyploidní pšenice zodpovídají *pairing homoeologous (Ph)* geny (zejména *Ph1* lokus) za správné homeologní párování a rekombinaci. Takto se polyploid chová geneticky jako diploid a je zabráněno párování mezi subgenomy. U mutantů s delecí v *Ph1* dochází ke spárování chromozomů mezi subgenomy, a tím může dojít k rekombinaci i mezi málo příbuznými druhy (Feuillet a kol. 2007; Martinez-Perez a kol., 2001). Na každém chromozomu jsou geny duplikovány, možnou příčinou je nerovnoměrný crossing-over nebo chybovost při replikaci a také k duplikacím přispívá polyploidizace i tandemové repetitivní sekvence. Genová duplikace je proto významně vyšší u pšenice, než u jiných trav (IWGSC, 2014).

Genom D pšenice seté je původem z druhu *Aegilops tauschii*, který zanesl do pšeničného genomu geny přizpůsobivější na kontinentální klima Asie, a tak rozšířil celosvětové využití pšenice seté. Význam genomu D je také v kódování proteinů, které způsobují měkkost zrna v endospermu, a tím je zlepšena příprava chleba. Také obsahuje bílkoviny, které vychytávají CO₂ během kvašení, což je výhodné při kynutí chleba (Feuillet a kol., 2007; Chantret a kol., 2005). Podobnost genomů také naznačuje korespondující delece na chromozomu 6DS u *Aegilops tauschii* a stejně tak u pšenice seté, u které se pravděpodobně objevila po druhé hybridizační události (Pfeifer a kol., 2014).

Srovnáváním subgenomů pšenice seté s nejbližšími příbuznými druhy se prokázaly určité ztráty genů, ale i syntenie, četné duplikace genů, a to jako důsledek polyploidizace (IWGSC, 2014). Genom současné hexaploidní pšenice je výsledkem několika hybridních specií (homoploidní a polyploidní) a genom vypadá jako víceúrovňová fylogenetická mozaika (Marcussen a kol., 2014). Pro analýzu celého komplexního genomu a získání informací o jednotlivých 21 chromozomech, byly chromozomy rozříděny průtokovou cytometrií a klonovány pomocí BACů (Osoegawa a kol., 1998, Šafář a kol., 2004; Doležel a kol. 2007).

Odrůda pšenice Chinese Spring byla pro své rozsáhlé uplatnění při studiu v rámci genomiky vybrána k sekvenování (Brenchley a kol. 2012). U obilovin s vysoce repetitivním genomem byly nakombinovány různé sekvenační technologie a připraveny DNA knihovny o různých velikostech (Choulet a kol., 2014). Pro rozluštění složitého genomu vypracovalo IWGSC strategii fyzického mapování a sekvenování jednotlivých chromozomů i ramen chromozomů (IWGSC, 2014). Nicméně je stále málo známo o poloze genů na každém

z chromozomů a stejně tak o evoluci genomu hexaploidní pšenice během její polyploidizace (Wicker a kol. 2011; IWGSC, 2014).

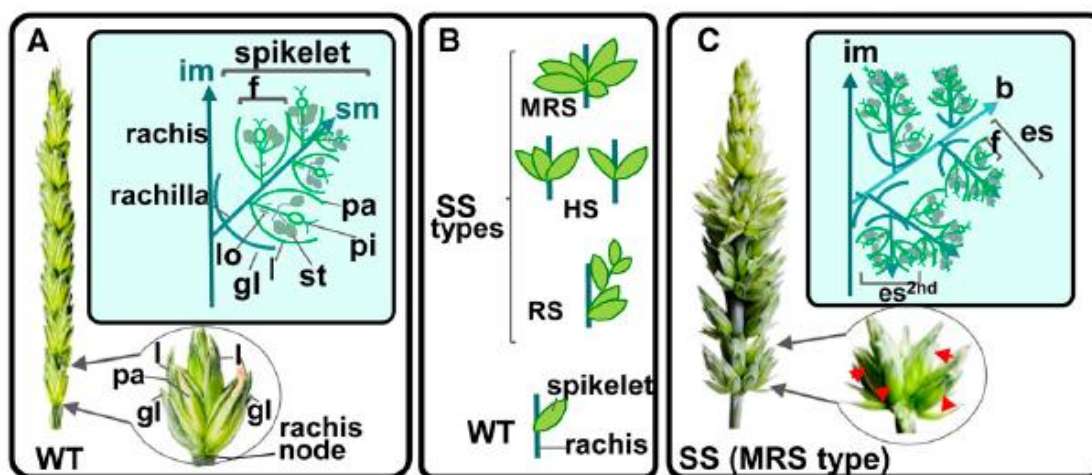
3.1.4 Významné geny

Anatomie rostliny, včetně její výšky, počtu odnoží, hustoty klasů a přizpůsobení na přírodní podmínky patří mezi významné vlastnosti, které ovlivňují výši výsledného výnosu pšenice. Zelená revoluce v 60. letech 20. století poznamenala pšenici i rýži objevením a využitím genů *semi-dwarf (sd)*, které přinesly meziroční nárůst výnosu v celosvětové produkci (Gale a kol., 1985; Hedden, 2003). U pšenice je známo více než 20 genů redukujících výšku (Chen a kol., 2015). Rostliny menšího vzrůstu reagují abnormálně na růstový hormon GA (kyselina gibberelová). Geny *REDUCED HEIGHT 1 (Rht-B1 a Rht-D1)* zvyšují úrodnost pšenice, protože zkrácený a silný stonek usnadňuje přívod asimilátů k reprodukční části rostliny. Dále rostlina s kratším stonkem nepoléhá a není tolik náchylná vůči deštům a větrům. Kratší a zároveň silnější stonek unese větší klasy s těžšími zrnky za výsledného vyššího výnosu (Peng a kol., 1999; Fischer, 2011). Hlavní geny zapojené do výšky rostliny jsou rozlišeny podle reakce na růstový hormon GA (Gale a kol., 1985). Optimalizovaná stavba a výška rostliny s hustotou klásků jsou důležité pro vyšší výnos pšenice (Hedden, 2003; Zhang a kol., 2006).

Výnos obilí do značné míry závisí na stavbě květenství (Malcomber a kol., 2006). Květenství pšenice je tvořeno přisedlými klásky přímo na hlavní ose, což vytváří nerozvětvený klas. Klásky na klasu jsou uspořádány ve dvou protilehlých řadách na ose. Jednotlivé klásky obsahují jeden nebo několik kvítků, produkujících jedno zrnko. U tetraploidní *Triticum turgidum* convar. *compositum* (Miracle-Wheat) i u ječmene bylo zaznamenáno větvení klasů, kdy jsou boční klásky jako malé sekundární klasy. Rozvětvený klas je zřejmě způsoben přirozenou mutací (Poursarebani a kol., 2015; Sharman, 1944). Větvení klasu bylo pozorováno u diploidní a tetraploidní pšenice díky mutacím v *bh* lokusu, u ječmene v *com2* lokusu a u rýže na lokusu *monstrosus ear 1 (mo1)*, (Amagai a kol., 2014; Devries a Sybenga, 1984; Klindworth a kol., 1997). V důsledku tohoto větvení vytváří pšenice podstatně více zrn na klas, což vede k vyššímu výnosu. První izolovaný gen *compositum 2 (com2)*, zodpovědný za větvení klasu byl u ječmene (Poursarebani a kol., 2015). Gen *COM2* je ortologní s lokusem

branched head (bh), regulující větvení klasu u tetraploidní pšenice *Triticum turgidum* convar. *compositum*. Podobný fenotyp se také projevuje u hexaploidní pšenice a žita, stejně jako u sbírky mutantů ječmene, kde byly nalezeny tři nezávislé lokusy. Recesivní gen *bh* odpovědný za rozvětvení klasu v tetraploidní pšenici byl mapován na krátkém rameni chromozomu 2A. Předpokládaná alela *bh* byla identifikována na krátkém rameni chromozomu 2D u pšenice seté. Molekulární podstata větvení klasu není u Triticeae zatím známa (Klindworth a kol., 1997; Dobrovolskaya a kol., 2009; Shitsukawa a kol., 2009). Rozdíl v sekvenci *bh* lokusu ve sbírce mutantů a u divoké tetraploidní pšenice je v jediné mutaci vedoucí k substituci aminokyseliny serinu (S) za arginin (G), (Poursarebani a kol., 2015). Lokusy ovlivňující větvené květenství v Triticeae jsou umístěny na syntenních pozicích chromozomů a pravděpodobně je větvení klasu u Triticeae kontrolováno hlavně ortologními geny. Boční větvení je odlišné od fenotypu nadpočetných klásků supernumerary spikelets (SS), (Pennell a Halloran 1983).

Nadpočetné klásky SS jsou vzácné, klas pšenice seté je za normálních okolností nerozvětvený s hlavní osou, nesoucí boční a přímo přisedlé jednotlivé klásky. U tetraploidních a hexaploidních druhů pšenice je vývoj nadpočetných klásků recesivně děděným znakem a je ovlivněn řadou faktorů z vnějšího prostředí. V tetraploidní pšenici je znak nadpočetných klásku děděn kvantitativně, podmíněn neznámým počtem genů malého účinku. V hexaploidní pšenici by měl být řízen dvěma nebo třemi lokusy (Dobrovolskaya a kol., 2009; Klindworth a kol., 1990; Peng a kol., 1998; Pennell a Halloran 1983). Jedním z typů nadpočetných klásků SS je podmíněn genem *multi-rowed spike (MRS)*, který je zodpovědný za velké množství rozvětvených klásků a byl zamapován na chromozomu 2DS pšenice seté (Dobrovolskaya a kol., 2009; Tanno a Takeda 2004). Lokusy *mrs* a *bh* jsou ortologní mezi druhy tribu Triticeae. Nadpočetné klásky jsou fenotypově rozmanité (Obr. 3), dalšími typy jsou horizontální klásky (HS), rozvětvené klásky (RS) nebo rozvětvené klasy (Dobrovolskaya a kol., 2015).



Obr. 3: Fenotyp nadpočetných klásků SS u pšenice seté

A – Znázornění klasu a klásku u kontrolní pšenice seté. B – Znázornění fenotypu nadpočetných klásků u typů s víceřadým klasem MRS, horizontálními klásky HS, rozvětvenými klásky RS v porovnání s kontrolní pšenicí. C – Znázornění klasu a klásku u MRS typu nadpočetných klásků. Vysvětlivky: im – meristém květenství, sm – meristém klásku, f – kvítek, lo – okvětí, gl – pleva, l – plucha, st – tyčinka, pi – pestík, pa – pluška. (Převzato z Dobrovolskaya a kol., 2015).

Geny *bh* a *com2* jsou ortologní k podobným genům v rýži *FRIZZY PANICLE/BRANCHED FLORETLESS 1 (FZP/BFL1)*. *FZP* geny jsou zodpovědné za nadpočetné klásky s cílem vylepšit výnos zvýšením počtu zrn (Komatsu K. a kol., 2003). Homologní *WFZP* geny byly identifikovány u pšenice na chromozomech 2AS (*WFZP-A*), 2BS (*WFZP-B*) a 2DS (*WFZP-D*). *WFZP* jsou klíčové při vývoji klásku. Mutace u tří homologních genů pšenice (*WFZP*) způsobují fenotyp nadpočetných klásků s kombinací posunu čtecího rámce (frameshift), (Dobrovolskaya a kol., 2015).

Dalšími významnými geny v přizpůsobení *Triticum aestivum* na rozmanitost přírodních podmínek jsou například geny ovlivňující citlivost na jarovizaci (vernalizace) a délku dne. Geny *Vrn* kontrolují jarovizaci a hlavními jsou *Vrn1* a *Vrn2* geny (Dubcovsky a kol., 1998). Rozdělují pšenici setou do dvou odrůd na ozim a jařinu. U ozimé pšenice je dominantní *Vrn2* gen. Ozimá pšenice vyžaduje období nízkých teplot, než mohou vykvést. Tento mechanismus zabraňuje vývoji květního meristému během zimy. U jařiny je nejúčinnějším genem pro redukci jarovizace v hexaploidní pšenici *Vrn-A1* (původně *Vrn1*), (Yan a kol., 2003). Tento gen byl mapován na dlouhém rameni chromozomu 5A. *Vrn-A1* je ortologní s genem *Vrn-A^m1*, který byl mapován u diploidní pšenice *Triticum monococcum*

pomocí RFLP markerů na dlouhém rameni chromozomu 5A^mL. Také je gen *Vrn-A^m1* ortologní s *Vrn-D1* (původně *Vrn3*), umístěným v oblasti chromozomu 5DL a s *Vrn-B1* (původně *Vrn4* a *Vrn2*), který je umístěný na chromozomu 5B (Dubcovsky a kol., 1998). Geny *Ppd* kontrolují citlivost rostliny na délku dne a hlavními geny jsou *Ppd-D1*, *Ppd-B1* a *Ppd-A1*. Tyto geny, které regulují dobu kvetení, byly zamapovány na chromozomech 2BS a 2DS (Jantasuriyarat a kol., 2004; Worland a kol., 1998).

3.1.5 Výnos

Výnos zrna je nejdůležitější agronomický parametr pšenice seté. Výnos pšenice je největším šlechtitelským zájmem po celá staletí. Výtěžek je komplexní kvantitativní znak, řízený větším počtem genů malého účinku a také je významně ovlivněn životním prostředím. Výnos je složen ze tří výnosových prvků, kterými jsou počet klasů na m², počet zrn na klas a velikost zrna, neboli váha tisíce zrn TKW (*thousand-kernel weight*), (Schéma 2). Několik genů zodpovídá za jednotlivé složky výnosu, nicméně jednotlivé komponenty výnosu jsou méně citlivé k životnímu prostředí a mají vyšší dědivost, než celkový výnos. Proto je dobré při vyhodnocování výnosu zrna kontrolovat spojitost mezi výnosem a jednotlivými výnosovými prvky (Cuthbert a kol., 2008).

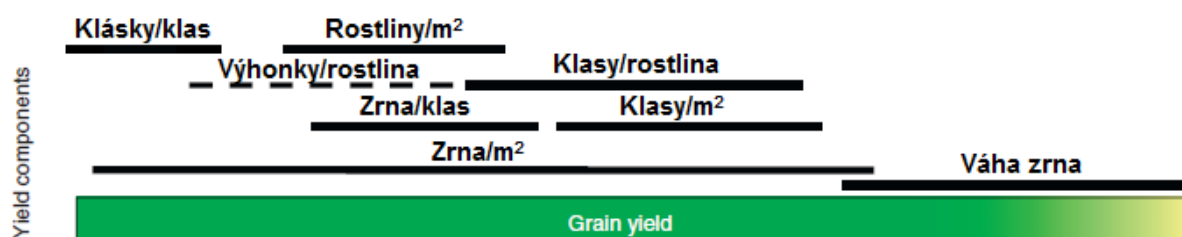


Schéma 2: Složky výnosu zrna

Znázornění jednotlivých složek podle ovlivnění výnosu zrna. (Upraveno podle Sreenivasulu a Schnurbusch 2012).

Výsledný počet zrn na rostlinu při sklizni je určen úrodnými klasy na rostlině, počtem plodných klásků na klas a počtem zrn v klásku. Konečný výtěžek zrna je souhrou počtu počtu klasů na m², zrn na rostlinu a průměrné hmotnosti zrna (Sakamoto a Matsuoka 2008; Sreenivasulu a Schnurbusch, 2012). Proto je cílem šlechtění posílení růstu obilných zrn. I přes

mnoho fyziologických znalostí ohledně růstu a vývoje klasu, je stále málo informací na molekulární úrovni (Reynolds a kol., 2009). Druhy Triticeae mají vytvořenou sbírku mutantů zasahující klíčové geny (zmíněny v této práci), které jsou zapojeny ve vývoji určující počet zrn na klas. Tyto genetické dráhy ovlivňující růstové fáze rostliny můžou být upraveny pro zvýšení výnosu (Ferrier a kol., 2011; Sreenivasulu a Schnurbusch, 2012).

Velikost zrna je důležitou složkou výnosu, u zrna je sledována délka, šířka a tloušťka. Velikosti zrna odpovídá hmotnosti zrna, která je hlavní součástí výnosu. Kromě váhy zrna jsou důležitými vlastnostmi velikost pestíku při kvetení, sušina zrna, příjem a ztráta vody v obilí, morfologie zrna a konečná hmotnost v rozdílných pozicích u klásků. Tyto vlastnosti byly mapovány v náhodných populacích nejen v populacích rekombinantní inbrední linií (RIL) křížením pšenice seté a špaldy (*Triticum spelta*). Vlastnosti jako velikost pestíku, sušina zrna, hromadění vody v obilí a rozměry zrna se navzájem ovlivňují (Gegas a kol, 2010, Messmer a kol., 1999; Xie a kol., 2015).

Endosperm samotného zrna pšenice seté se skládá ze tří hlavních a specializovaných buněčných vrstev. Ve vnitřní škrobové vrstvě se hromadí škrob, skladují proteiny a tvaruje se velikost zrna. Aleuronová vrstva obklopuje škrobovou vrstvu s výjimkou ventrální strany, kde se vyvíjí transportní buňky. Aleuronové buňky hromadí lipidy a hrají esenciální roli při klíčení zrna. Vrstva transportních buněk aktivně transportuje cukr z fotosyntetizujících pletiv do endospermu a embrya. Endosperm má čtyři stadia vývoje, a to v podobě mnohjaderného buněčného útvaru, celularizace jader, diferenciacní fáze a zrání. V endospermu je obsažen lepek, který je složen ze dvou bílkovinných podjednotek gliadinu a gluteninu a činí 80 % ze všech obsažených proteinů (Drea a kol., 2005; Esau, 1977; Evers, 1970; Pfeifer a kol., 2014).

3.3 Významné kvantitativní znaky

QTL (quantitative trait loci) jsou lokusy s geny pro kvantitativní znaky, které přispívají k fenotypové variabilitě. Kvantitativní znak je určen rozptylem několika lokusů a prostředím. Fenotypový projev je podmíněn spolupůsobením většího počtu genů, tzv. genů malého účinku

(polygeny), které se liší stupněm svého projevu. Většina důležitých agronomických vlastností v obilovinách je děděna kvantitativně a jejich detekce v genomu je obtížná (Börner a kol., 2002).

3.3.1 Mapování QTL

Pro identifikaci QTL je potřeba genetická mapa s dostatečnou hustotou markerů a spolehlivý fenotyp. U hexaploidní pšenice byly mapovány RFLP a mikrosatelitní markery, bylo mapováno asi 800 RFLP lokusů a 600 mikrosatelitních sekvencí (Marino a kol., 1996; Röder a kol., 1998). U mapovací populace o sadě 114 rekombinantních inbredních linií (RIL), pěstované za různých podmínek byly studovány morfologické znaky (barva plevy a osiny, voskovitost, vzpřímenost listu, délka stonku), agronomické vlastnosti (dobu vývoje, kvetení a zrání, výška rostliny, délka klasu, počet obilek na klasu, váha zrna, obsah bílkovin v obilce, teplotní odolnost) a odolnost proti chorobám (padlí, rzi, fusarium). Celkově bylo detekováno 210 QTL s LOD skórem vyšším než 2 (minoritní lokusy), z nichž 64 QTL dosáhlo LOD skóre vyšší jak 3 (majoritní lokusy). Detekované QTL byly porovnány s majoritními geny nebo s již popsány QTL lokusy v pšenici nebo u ostatních druhů z tribu Triticeae (Börner a kol., 2002).

QTL lokusy pro morfologické znaky pšenice jako barvu osiny a plevy byly zjištěny v distální oblasti chromozomů 1A, 1B, 1D, 1DS a na chromozomech 2DS a 7BL. QTL lokusy pro vzpřímenost listu byly objeveny na chromozomech 2AS a 2DL. Dva QTL lokusy pro délku stonku byly identifikovány na stejné pozici chromozomu 6AS v blízkosti centromery. QTL lokusy pro voskovitost byly zamapovány na chromozomech 1DL, 2DL a 4AL. QTL lokusy pro dobu vývoje pšenice byly zjištěny na chromozomu 2DS, 5 DL a v distální oblasti chromozomu 7DS. QTL lokusy pro kvetení byly nalezeny na chromozomu 2 DS, 2BS, 3 AL, 5DS. QTL lokusy pro výšku rostliny byly detekovány na chromozomech 1AS, 2DS, 4AL a 6AS. Největší počet lokusů byl objeven pro délku klasu, které byly zamapovány na chromozomech 1B, 4AS, 4AL, 5AL. QTL lokus pro teplotní odolnost byl mapován na chromozomu 6AS. QTL pro zrání obilky byly zjištěny na chromozomech 5AL a 5B. QTL lokusy pro počet obilek na klasu byly určeny na chromozomech 2DS a 4AL. QTL lokusy pro váhu zrna byly zamapovány na chromozomech 3AS a 5AL a 6BS. QTL lokusy

ovlivňující váhu obilek na klasu, která je ovlivněna počtem a váhou zrn byly mapovány na chromozomech 2DS, 4AL a 6BL. QTL lokusy pro obsah bílkovin v obilce byly objeveny na krátkých ramenech chromozomů 7A a 2D. QTL lokusy pro odolnost vůči chorobám a to na fusarium byly detekovány na dlouhém rameni chromozomu 6B a na chromozomu 5A, proti plísním na chromozomech 2DL, 7DS a na chromozomu 4B v blízkosti centromery, proti rzi na chromozomech 2BS, 7AL a 7DS (Börner a kol., 2002).

Sedm QTL lokusů v pšenici seté pro regulaci nadpočetných klásků SS bylo identifikováno na pěti chromozomech 2D, 5B, 6A, 6B a 7B (Echeverry-Solarte a kol. 2014; Poursarebani a kol., 2015). Pět QTL lokusů v pšenici bylo zjištěno pro výnos zrna na chromozomech 1A, 2D, 3B a 5A (Cuthbert a kol., 2008). Další QTL pro výnos byly nalezeny na chromozomech 2B, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 7D. QTL pro váhu tisíce zrn byly zamapovány na chromozomech 1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 2D, 3A, 3B, 3D, 4A, 4B, 5A, 5B, 6A, 6D, 7A, 7D. QTL pro obsah proteinu v obilce byly lokalizovány na chromozomech 1A, 2A, 3A, 3B, 4A, 4D, 5B, 6A, 7A, 7D (Groos a kol., 2003). Vlastnosti ovlivňující váhu zrna byly zamapovány QTL lokusy na chromozomech 2A, 3B, 4A, 5A, 5DL a 7B. Vnitřní procesy při vývoji zrna jsou řízeny převážně pleiotropním efektem nebo vazbou funkčně souvisejících genů. Vyplývá tak z analýzy účinků alel, kdy 16–49 QTL lokusů souvisí s 12 vlastnostmi (Messmer a kol., 1999; Xie a kol., 2015).

3.2 Genom rýže jako model pro pšenici

Komparativní analýza ujasňuje vztahy mezi genomy příbuzných druhů. Dřívější studie se zaměřila na stanovení chromozomálních oblastí, které zůstaly konzervovány po dlouhé evoluční období (Devos, 2005). V posledních letech se studie zaměřují na kolinearitu v rámci DNA sekvence. Bylo tak odhaleno mnoho malých přestaveb, které narušují kolinearitu v ortologních chromozomálních oblastech a nesouhlasí s již zamapovanými pozicemi. Sekvenování ESTů bylo provedeno pro účinnější komparativní mapování mezi rýží a pšenicí (Devos, 2005). V evolučních studiích se srovnávaly mapované ESTy pšenice se sekvencemi z BAC klonů rýže za užití algoritmu BLAST. Genom rýže se zdá být homologním ke genomu pšenice, avšak na základě komparativní analýzy byly odhaleny četné chromozomální přestavby (Sorrells a kol., 2003).

Malé fragmenty sekvence z genomu rýže byly porovnávány s modelovou rostlinou *Arabidopsis thaliana* a s několika blíže příbuznými obilovinami včetně kukuřice, čiroku, ječmene, pšenice a jinými druhy rýže. Genom rýže je relativně konzervovaný s genomy jiných trav. Nicméně, srovnání s jinými obilovinami ukázaly, že DNA mezi těmito obilnými druhy je vysoce variabilní a rychle se vyvíjí. Naproti tomu sekvence DNA (zejména exprimující geny) prošly mnohem více malými přestavbami, než bylo odhaleno rekombinantním mapováním. Kromě tandemových duplikací a delecí byly zaznamenány delece, inverze, translokace. Genomy jsou také ovlivněny transpozibilními elementy. Několik tisíc takových malých přestaveb v rámci genomu rýže komplikuje, ale nevylučuje jeho použití, jako model pro větší genomy obilnin (Bennetzen a Ma, 2003).

Planá a kultivovaná rýže mají vysoce konzervativní složení genomu. Planá rýže má vyšší počet chromozomů ($2n = 2x = 30$) v porovnání s kultivovanou rýží ($2n = 2x = 24$), v důsledku částečné nebo úplné duplikace chromozomů 1, 4 a 9. Genomy jílku (*Lolium perenne*) a kostřavy (*Festuca pratensis*) jsou podobné genomu Triticeae, s výjimkou chromozomu 4, který je kolineární s chromozomem 3 u rýže. Markery rýže, umístěné v distální oblasti na dlouhém rameni chromozomu 3, se také nacházejí na dlouhém rameni chromozomu 5 (5L) v Triticeae. Což dokazuje, že tato část byla translokovaná mezi rameny chromozomů 4S a 5L, po rozdělení Pooideae (Devos, 2005).

Studie dokazují homologii mezi chromozomy pšenice (W1–7) a rýže (R1–12). Chromozom rýže R1 je homologní s chromozomem pšenice W3, další chromozomy jsou homologní jako R2 s W6, R3 a R11 s W4, R4 a R7 s W2, R5 a R10 s W1, R6 a R8 s W7, R9 a R12 s W5. Jednotlivé chromozomy pšenice se zároveň většinou shodují také ve všech svých třech genomech. Tyto homologní sekvence chromozomů ukazují na více než 80% shodu mezi rýží a pšenicí (Sorrells a kol., 2003).

3.2.1 Význam rýže

Rýže stejně jako pšenice je jednou z nejvýznamnějších plodin na světě, kterou se živí více než polovina lidí na Zemi. Stavba laty a její morfologie, včetně velikosti obilek určují výnos obiloviny. Modifikací rostlinné stavby se vytváří nové odrůdy ke zlepšení výnosu zrna

(Wang a Li, 2008). Výnos rýže stejně jako u dalších obilovin závisí na několika faktorech včetně velikosti zrna (váže), počtu lat na rostlině a počtu zrn na latě (Song a Ashikari, 2008). Řada genů, které regulují velikost zrn, byla identifikována v rýži (Nagato a Yoshimura, 1998).

Vývoj laty rýže je komplikovaný proces, který byl rozdělen do devíti stupňů podle viditelných změn během vývoje. Pro hustotu a vzpřímenost laty ovlivňující výnos byly zamapovány QTL lokusy na chromozomu 9 (Yan a kol., 2007). Gen *DENSE AND ERECT PANICLE 1 (DEP1)* kódující PEBP (phosphatidylethalamín – vázající protein) byl zamapován na chromozomu 7. Mutanovaný gen *dep2 (dense and erect panicle 2)* se na rozdíl od *DEP1* projevuje fenotypem husté a vzpřímené laty. *DEP2* kóduje protein specifický pro rostliny bez jakékoliv známé funkční domény, což naznačuje nový protein. *DEP2* je vysoce exprimován v mladých pletivech a hojně v mladých latách. Mutace v *DEP2* postihují hlavně rychle prodlužování stonků, primární a sekundární větvení, ale nezhoršuje počáteční vývoj laty. Zkrácení délky laty u *dep2* je zapříčiněno defektem v proliferaci buněk během exponencionálního prodloužení laty. Avšak nebyla zaznamenána žádná patrná změna v produkci zrna mezi mutantem *dep2* a kontrolním druhem (Li a kol., 2010).

Další geny *erect panicle (EP2 a EP3)* ovlivňují fenotyp laty, *EP2* byl zamapován na chromozomu 4 a *EP3* kóduje F-box doménu proteinu (Piao a kol., 2009). Několik genů se podílí na tvorbě a zahájení kvetení, jako *MONOCULM 1 (MOC1)* důležitý pro vegetativní a reprodukční axilární meristém vyvíjející se v pupeny a postranní větve (Li a kol., 2003). Transkripční regulátor b-HLH kódován *LAX PANICLE (LAX)* ovlivňuje přeměnu meristému květenství (Komatsu K. a kol., 2003). Gen *FRIZZY PANICLE (FZP)* pozitivně reguluje meristém v květenství a potlačuje axilární meristém rýžových klásků. *FON1* gen je ortologní ke genu *CLV1 Arabidopsis*, který kontroluje velikost květního meristému a počet květních orgánů. *ABERANT PANICLE ORGANIZATION 1 (APO1)* je gen, který se podílí na tvorbě květního orgánu a na primárním větvení při uspořádání listů na stonku (Komatsu M. a kol., 2003; Suzaki a kol., 2004; Ikeda a kol., 2007). *CYTOKININ OXYDASE/DEHYDROGENASE (Os-CKX2)* kódující cytokinin oxidázu, která ovlivňuje počet zrn množstvím cytokininu, což naznačuje důležitou roli cytokininu ve vývoji rýžové laty (Ashikari a kol., 2005).

Geny zodpovědné za malý (krátký) fenotyp zrna byly identifikovány pomocí pozičního klonování. Mezi tyto geny patří *D1* neboli *RGA1* kódující α podjednotku G proteinu a *D11* kódující cytochrom P450 zapojený do biosyntézy brassinosteroidů (BR). Geny *BRD1* a *D2*

kódující rozdílné typy cytochromu P450 jsou také zapojeny do syntézy BR a *BRD2* kóduje enzym související s biosyntézou BR. Další gen *D61 (OsBR11)* kóduje receptor BR a konečně *SRS3* kódující protein kinesin 13. Takto bylo prokázáno, že obě signální dráhy G proteinu a BR hrají hlavní roli v regulaci velikosti zrna (Abe a kol., 2010; Ashikari a kol., 1999; Fujisawa a kol., 1999; Hong a kol., Kitagawa a kol., 2010; 2005; Tanabe a kol., 2005; Yamamuro a kol., 2000). Během vytváření rýžového zrna gen *D1* reguluje počet buněk a *SRS3* reguluje délku buněk. Zatímco geny související s BR zřejmě ovlivňují počet i délku buněk. Tudíž rozdílné typy funkčních genů regulují velikost zrna pomocí řízení délky buněk, počtu buněk, nebo oběma způsoby (Izawa a kol., 2010; Nakamura a kol., 2006; Abe a kol., 2010). Tyto regulační geny byly mutovány kvůli vylepšení výnosu zrna u rýže, jako chimérické geny kódující konstitutivní aktivní formu α podjednotky G proteinu. U mutantů *d1* s defektem genu pro α podjednotku byla pozorována délka a váha zrna, které byly podstatně zvýšeny u transformantů. Podobně byly sledovány i jiné studie, chimérické geny ovlivňující biosyntézu BR byly exprimovány v rýži a zrna byly těžší u transformátů než u divokých druhů (Oki a kol., 2005; Wu a kol., 2008). Studie navrhy, že zvýšení signální dráhy G proteinu může vést ke zvětšení velikosti zrna. Také řízením BR, pomocí souvisejících genů s biosyntézou BR, je možné zvýšit výnos zrna (Abe a kol., 2010).

3.4 *SRS1* gen

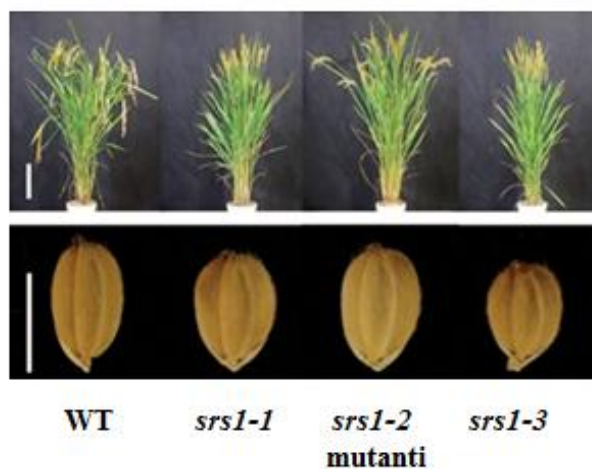
Gen *SMALL AND ROUND SEED 1 (SRS1)* byl objeven v rýži a je zodpovědný za malý a kulatý fenotyp zrna (Schéma 3). *SRS1* gen se skládá z 10 exonů a byl zhruba mapován v pozici 81–94 cM na chromozomu 7 pomocí mapovací populace F2. Gen *SRS1* kóduje neznámý protein složený z 1365 aminokyselin bez známé funkce. *SRS1* gen je identický k dříve uvedenému genu *DENSE AND ERECT PANICLE 2 (DEP2)*. U kontrolní rostliny rýže jsou hojné mRNA a proteiny kódované *SRS1*, zejména v mladých rostlinných orgánech, jako v mladých listech, internodiích a latách. *SRS1* je spojován s ovlivněním velikosti zrna regulací velikosti pluchy a plušky Pletiva exprimující *SRS1* jsou úzce spjatý s tkáněmi, které se projevují odchylkami u *srs1* mutantů (Abe a kol., 2010; McCouch a kol., 2002; Tanabe a kol., 2007).



Schéma 3: Gen *SRS1* u rýže v porovnání s předpokládaným genem *SRS1* u pšenice

Znázornění fyzické mapy lokusu genu *SRS1*. Struktura genu *SRS1* u rýže a pšenice – černé čtverečky značí exony genu a čáry mezi čtverečky jsou introny. (Upraveno podle Abe a kol., 2010).

Z dřívějšího mapování fenotypu ovlivňující zrno u mutantů na chromozomu 7 se vyvodilo, že mutace zasahuje nejspíš gen *SRS1*. Mutace genu *SRS1* se projeví na celkovém fenotypu rýže. Fenotypy mutantů *srs1-1*, *srs1-2*, *srs1-3* byli porovnány s kontrolní rýží rýže *Oryza sativa* L. (*japonica*), (Obr. 4). Mutace různými způsoby měly vliv na celkový vzrůst rostliny, velikost a tvar obilí, délku internodií i obilí, váhu zrn, počet obilí na latu, počet lat na rostlinu, vzpřímenost lat a listů. Dále byl ovlivněn podélný průřez pluch, a to délkou a počtem buněk (Abe a kol., 2010, Irimia a Roy 2008; Li a kol., 2010; Tanabe a kol., 2007).



Obr. 4: Porovnání fenotypu mutantů *srs1* s kontrolním druhem rýže *Oryza sativa* L.

(Převzato z Abe a kol., 2010).

SRS1 je novou bílkovinou. Sekvence aminokyselin proteinu SRS1 vykazuje určitou podobnost s ortologními proteiny z *Arabidopsis* (At3g14172, At1g72410). Proteiny jsou identické z 27 % a podobné ze 72 %. Geny *SRS1* jsou ortologní u rýže a huseníčka. Funkční domény u proteinu SRS1 nelze nalézt. Zbytek 180 aminokyselin z N-konce SRS1 proteinu je velice podobný s COP1-interagujícím proteinem 7 (CIP7) z *Arabidopsis*. Avšak toto místo není funkční doménou v CIP7, proto je potřeba ještě funkci SRS1 objasnit (Yamamoto a kol., 1998; Abe a kol., 2010). Velikost proteinu SRS1 je odhadována na 160 kDa podle separace na SDS-PAGE. Polypeptid je převážně nacházen v surové mikrosomální frakci, což naznačuje, že se jedná o membránový protein (Li a kol, 2010; Abe a kol, 2010). Hromadění *SRS1* transkriptů a proteinů v rýži během vývoje rostliny bylo studováno real-time RT-PCR a western blottingem. První vysoká hladina SRS1 proteinů byla zaznamenána v internodiích a latách, kdy je lata už dobře viděna bez listových obalů a také při kvetení. Když listy dosáhnou úplného vývoje (stádium 4) je hladina proteinu SRS1 významně vyšší, než u předchozích stádií listů. Protein SRS1 je vysoce exprimován při vývoji rostlinných orgánů a exprese se zmenšuje, jak orgány dosáhnou konečného vývoje. Množství SRS1 proteinu je vyšší při vývoji lat, než při jejich úplném rozvinutí a konečné délce. Celkově je hladina SRS1 proteinu vyšší v latách, než v ostatních orgánech. Podle kvantitativní real-time PCR téměř koreluje hladina *SRS1* transkriptů s těmito celkovými výsledky o množství SRS1 proteinu (Abe a kol., 2010).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Rostlinný materiál

Pro sekvenaci genu *SRS1* bylo použito 25 TRI linií odrůd pšenice (Tab. I). Použitý biologický materiál pocházel z genové banky The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) v Německu. TRI odrůdy pšenice byly vybrány na základě asociace s rozvětveným klasem. Pro kontrolu TRI linií pšenice byl zároveň použit kultivar Chinese spring a *Triticum monococcum* (2AS, DV92/G3116).

Tab. I: TRI linie pšenice

TRI	Název	Ploidie
TRI 4270	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>plinianum</i>	Tetraploidní linie
TRI 4341	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>columbinum</i>	
TRI 4446	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>columbinum</i>	
TRI 4448	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>compositum</i>	
TRI 4653	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>compositum</i>	
TRI 4879	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>compositum</i>	
TRI 5911	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>plinianum</i>	
TRI 7099	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>lenkoranicum</i>	
TRI 9548	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>nachitschevanicum</i>	
TRI 9652	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>pseudocervinum</i>	
TRI 19165	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>mirabile</i>	
TRI 900	<i>Triticum dicoccon</i> var. <i>tragi</i>	
TRI 901	<i>Triticum dicoccon</i> var. <i>novicum</i>	
TRI 2405	<i>Triticum dicoccon</i> var. <i>pseudomazzucati</i>	
TRI 2880	<i>Triticum dicoccon</i> var. <i>novicum</i>	
TRI 7011	<i>Triticum dicoccon</i> var. <i>melanurum</i>	
TRI 9346	<i>Triticum durum</i> var. <i>muticitalicum</i>	
TRI 9640	<i>Triticum durum</i> var. <i>muticito-coeruleus</i>	
TRI 9644	<i>Triticum durum</i> var. <i>muticitalicum</i>	
TRI 9921	<i>Triticum durum</i> var. <i>mutico-valencia</i>	
TRI 19161	<i>Triticum durum</i> var. <i>muticito-beofii</i>	
TRI 4345	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>plinianum</i>	Hexaploidní linie
TRI 5238	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>plinianum</i>	
TRI 11334	<i>Triticum vavilovii</i> var. <i>manuru</i>	
TRI 11555	<i>Triticum vavilovii</i> var. <i>mapuru</i>	

4.1.1 Pěstování TRI linií pšenice

Ze všech pšeničných TRI linií se nechaly naklíčit tři semínka v Petriho misce na vodou navlhčené buničité vatě po dobu 4–6 dnů při 4 °C. A dva dny při 25 °C. Naklíčená semena byla zasazena do jiffy květináčů (rašelinové květináčky) se zahradnickým substrátem 1% Agrisorbem a hnojivem (Hydrokomplex, YARA Agri), kde rostly při 25 °C. Rostliny ve stádiu 2–3 listu byly jarovizovány po dobu 8 týdnů při teplotách 0–10 °C a jednou týdně byly rostliny přihnojovány roztokem 1x Hoagland. Následně byly rostliny přesazeny na pole v areálu ÚEB Olomouc.

4.2 Metodika

4.2.1 Navrhování primerů

Páry primerů byly navrženy pro pokrytí celé délky genu *SRS1* za použití programu Primer 3. Výchozí nastavení bylo upraveno na délku primeru o 18–25 nukleotidech a teplota T_m odpovídala 58–62°C optimálně 60 °C. Délka ampliconu byla nastavená na 200–800 bp. Primery byly navrženy na základě sekvence pšeničné odrůdy Chinese Spring a nejsou specifické pro jediné subgenomy.

4.2.2 Extrakce DNA

Výchozím materiálem pro izolaci DNA byly listy. Ve stádiu třetího listu byly odebrány tři segmenty listu s délkou 3 cm. DNA byla extrahována použitím kitu Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Stratec, Německo) dle modifikovaného návodu výrobce. Z každé pšeničné TRI linie byly listy odebrány do 96jamkové destičky s 2ml jamkami. Listy v destičce byly sušeny v termostatu BT 120M (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) dva dny při 37 °C. Usušené listy v destičce byly homogenizovány dvěma skleněnými kuličkami (0,5 cm) pomocí homogenizačního oscilačního mlýnku MM301 (Retsch, Německo) 4 min při 27 Hz.

K jednotlivým homogenizovaným vzorkům bylo přidáno 400 µl lyzačního pufru, obsahující základ lyzačního pufru (500 mmol/l chloridu sodného, 100 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l EDTA, pH 7,2), s přidavkem 0,5% hydrogensířičitanu sodného, 0,1% kyseliny askorbové, 1% merkaptoethanolu, 0,03 mg/ml Rnázy A (Sigma-Aldrich, USA) a 0,3 mg/ml proteinázy K (Roche Diagnostics, Švýcarsko). Směs byla opatrně zamíchána a inkubována 30 min při 65 °C ve vodní lázni GRANT SUB 6 (Grant Instruments, UK). Lyzát byl přepipetován do Prefilter spin kolonky vložené do 2ml jímací mikrozkuhavky a byla provedena centrifugace v chlazené centrifuze Jouan GR 2022 (Thermo, USA) po dobu 1 min při 11000 rpm. Zachycený obsah na kolonce byl odstraněn. Do mikrozkuhavky bylo přidáno 200 µl Binding Buffer A a filtrát byl důkladně zamíchán. Suspenze byla přepipetována do Spin Filter spin kolonky vložené do 2ml mikrozkuhavky a inkubována 1 min při pokojové teplotě. Následovala centrifugace 11000 rpm při 2 min a filtrát byl odstraněn. Spin Filter spin kolonka byla vložena do 2ml mikrozkuhavky a byla promyta 550 µl Wash Buffer I za centrifugací 1 min při 11000 rpm. Přefiltrovaný obsah byl odstraněn. Spin Filter spin kolonka byla opět vložena do 2ml mikrozkuhavky a promyta 550 µl Wash Buffer II centrifugací 1 min při 11000 rpm. Tento krok promytí byl opakován ještě jednou. Nakonec byl odstraněn filtrát a Spin Filter spin kolonka v 2ml mikrozkuhavce byla ještě centrifugována 4 min při 11000 rpm. Spin Filter spin kolonka byla umístěna do nové 1,5ml mikrozkuhavky, na povrch kolonky bylo přidáno 100 µl elučního pufru TE (1 mmol/l Tris a 50 mmol/l EDTA, pH 8) předeřátého na 65 °C. Inkubace probíhala 3 min při pokojové teplotě a byla zakončena centrifugací při 11000 rpm 1 min. Extrahovaná DNA byla skladována při –20 °C.

Po extrakci byly vzorky DNA separovány na 1% agarózovém gelu pro ověření kvality DNA. Gel byl připraven smícháním 150 ml 0,5x TBE pufru (0,54 % Tris base, 0,275 % kyseliny borité, 1 mmol/l EDTA, pH 8,0) a 1,5 g agarózy. Směs byla zahřáta a nalita do horizontální elektroforetické vaničky Owl B2 (Thermo Scientific, USA) spolu s hřebínkem. Po ztuhnutí gelu bylo do první jamky nanášeno 5 µl velikostního markeru Gene Ruler™ 100bp, DNA Ladder Plus (Fermentas, Litva) v 6x Stop C (100mmol/l EDTA, 1% SDS, 0,05% bromfenolová modř, 0,05% xylencyanol, 42,5% glycerol) a do dalších jamek vzorky DNA po 2 µl spolu s 4 µl 6x Stop C. Separace DNA probíhala 40 min při 90 V. Výsledný gel s DNA byl obarven v 0,05% roztoku s ethidium bromidu (Sigma-Aldrich) po dobu 20 min. Separovaná DNA byla vizualizována pomocí UV transluminátoru Model GVM20 s dokumentačním zařízením pro analýzu elektroforetických gelů ChemiGenius BioImaging System (Syngene, UK). Množství DNA v každém vzorku bylo měřeno

na spektrofotometru Nicolet ANTARIS II FT (Thermo, USA). Než byla DNA použita k PCR reakcím, byly rozdíly v koncentraci DNA upraveny ředěním na jednotnou koncentraci 10 ng/μl pro všechny vzorky.

4.2.3 Polymerázová řetězová reakce

K amplifikaci jednotlivých fragmentů DNA v oblasti genu *SRS1* byla použita polymerázová řetězová reakce. Extrahovaná DNA byla amplifikována v lokusu genu *SRS1* navrženými primery (Tab. II). Pro amplifikaci požadovaných úseků DNA byly navrženy primery na základě lokusu genu *SRS1* u diploidního druhu pšenice (*Triticum monococcum*), aby pokryly celou délku genu. Polymerázová řetězová reakce byla provedena ve 25 μl, která obsahovala 1x PCR pufr (10mmol/l Tris-HCl, 50mmol/l chlorid draselný, 1,5mmol/l chlorid hořečnatý, 0,1% Triton X-100), 200 μmol/l z každého nukleotidu dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Fermentas, Kanada), 0,01% o-cresolsulfonephthalein, 1,5% sacharosu, 1,5 U *Taq* polymerázy, 1 μmol/l forward a reverse primeru a 20 ng DNA.

PCR reakce probíhala v termocykléru C-1000 (Bio-Rad, Kanada) použitím „Touch down“ protokolu, kdy teplota přisedání primerů byla cyklicky snižována. PCR reakce byla zahájena 5min denurací při 95 °C. V reakci následovalo 5 cyklů, jejíž součástí byla denaturace při 95°C po dobu 30 s, přisedání při 63 °C po dobu 30 s a elongace při 72 °C po dobu 30 s. Dále 5 cyklů 95 °C po dobu 30 s, 60 °C po dobu 30 s a 72 °C po dobu 30 s. Dalších 5 cyklů 95°C po dobu 30 s, 58 °C po dobu 30 s a 72 °C po dobu 30 s. Reakce pokračovala 25 cykly, které zahrnovaly 95 °C po dobu 30 s, 55 °C po dobu 30 s a 72 °C po dobu 30 s. PCR reakce byla ukončena inkubací při 72 °C o délce 10 min.

Tab. II: SRS primery

Označení F/R	Sekvence primeru	Podmínky přisedání
F1500	GCCATCTGAGAGCTGCATAA	55 °C, 30 s
F42	GCGCTCAAAAAGTGAAGTCC	55 °C, 30 s
F1000	ATCTTTCATTGCCCTTGCTG	53 °C, 30 s
F500	GCAAAATGGTCAGACCCGC	53 °C, 30 s
F52	GCGCACGTTATCGGATTC	51 °C, 30 s
F100	GCGCACGTTATCGGATTC	51 °C, 30 s
F12	ACTACGCGCTCTTCCAGCTC	59 °C, 30 s

Označení F/R	Sekvence primeru	Podmínky přisedání
F31	ATGCCTCGCCCTTCCGTTGC	51 °C, 30 s
F13	GGTGAAGCCGTTCTGTGAC	53 °C, 30 s
F14	GCTGGAGATGGCGAATACAT	55 °C, 30 s
F32	AGGTGCTACCTCGGGTCCAGC	65 °C, 30 s
F2	CAGCAGCTGCAGACATTACAA	57 °C, 30 s
F15	CAATTGCCGCTCATTTACCT	55 °C, 30 s
F33	TGTGACAACGCAATGTGCTGTGAGT	69 °C, 30 s
F1	CAATTGATGTCCGTTTAAGTGC	57 °C, 30 s
F16	CCAGCAGGCTGAGGTATGAT	57 °C, 30 s
F34	TTGGGAAAAGTTTGCAGGAGAAGG	65 °C, 30 s
F17	AGCGTCGTCCAGACATCAAT	55 °C, 30 s
F18	GCCTTCTGTTGCGTCCAT	51 °C, 30 s
F19	GCTTTCCCGAAACATTTTGA	51 °C, 30 s
F3	GCACAGGTTGATGACACACC	57 °C, 30 s
F20	GCAGAAGAGGGATGCAAAAC	55 °C, 30 s
F21	CTTCCAGGAGTGCTGATTCC	57 °C, 30 s
F35	TCCAAGGGAGGCATCCAGTACCA	67 °C, 30 s
F4	GTCCATCACCGTGGAACCTCT	57 °C, 30 s
F22	TGGCAATAGGATCCTCTGATG	57 °C, 30 s
F55	TGAGTTACTTTATCCTTGCTGACA	52 °C, 30 s
F5	AGTTTTGTGCATGGGAATGA	51 °C, 30 s
F23	CGCAGCTCCATTCCAAAC	51 °C, 30 s
F24	AAGCACCAGAGCTGGATTGT	55 °C, 30 s
F41	TCCTCTGCTGACATGCAAAC	55 °C, 30 s
F25	CCTGAATCAGAAAGGGGTGA	55 °C, 30 s
R52	GGTAAACGCCGGGGAGAC	55 °C, 30 s
R11	ATCCACCAGATCCGACCTC	55 °C, 30 s
R50	TCAGCCAGCCACCCTCAGCC	53 °C, 30 s
R12	CTCGTGGTGTCTGCAGTG	57 °C, 30 s
R31	TGCTCGGGTCGGTGGTCTGT	51 °C, 30 s
R13	TAGGAAGATTTACGCGGCA	51 °C, 30 s
R14	CTGCTTGTCAGCTGAAGCCT	57 °C, 30 s
R32	GCATGTGGACGATAACGCCCCGT	65 °C, 30 s
qR60	GCACAAGACGTGACAAGGTC	57 °C, 30 s
R2	CTTCATTTACGGACC	45 °C, 30 s
R15	ATTTTGCGGACCACTTTGGT	53 °C, 30 s
R33	TGAGATGCTGGATGGTGGAAAGTTGT	69 °C, 30 s
R16	CATCAATCCTCAGGCATCC	53 °C, 30 s
R1	TCACTGGAACAACCTTAGCA	53 °C, 30 s
R17	TCTGGAGGCCAGTTCAAAAG	55 °C, 30 s
R34	AAAGGATGGTGACAAGCCCAAGGA	57 °C, 30 s
R18	GGTTCATCTGGTAGGGACGA	57 °C, 30 s
R19	AGGATTGGAAGCTGCAGAAA	55 °C, 30 s
R20	TCACCCAAAAGGTTTTTCCC	55 °C, 30 s

Označení F/R	Sekvence primeru	Podmínky přisedání
R3	AATCAAGGGGATCACAGTCG	55 °C, 30 s
R21	GTCCATCACCGTGGAAGTCT	57 °C, 30 s
R35	GAGAACGAGGTTTTGACTGAACAAGGT	73 °C, 30 s
R22	TGAATTTGCAGAACAATCGCT	53 °C, 30 s
R5	TGAATTTGCAGAACAATCGCT	53 °C, 30 s
R4	GACTGAGGGAGGACCAACTG	59 °C, 30 s
R55	TCTAATTGAGCAGCTTAACATAAGAAC	54 °C, 30 s
R23	TTTTGTGATATGCTTGTATCTCCC	51 °C, 30 s
R24	AATCAATGCCCTTTGTCCAG	53 °C, 30 s
R41	TGTGACTGGAGCGTTGTAGG	57 °C, 30 s

4.2.4 Nedenaturující polyakrylamidová elektroforéza

Produkty PCR byly separovány pomocí nedenaturující polyakrylamidové elektroforézy na 4% gelu. Gel byl připraven v 150 ml a obsahoval 4 % směsi akrylamidu s N,N'-methylenbisakrylamidem v poměru 19:1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), 0,5x TBE, 0,73 % TEMEDU (N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) a 0,067 % APS (peroxodisíran amonný, Fluka BioChemika, USA). Po smíchání chemikálií byl roztok nalit do 1mm mezery mezi dvěma skly a společně s hřebínkem se nechal cca 45 min tuhnout při pokojové teplotě. Po ztuhnutí byl gel vložen do vertikální elektroforetické aparatury Dual Mega gel Kit C-DASG-400-50 (C. B. S. Scientific, USA). Horní a spodní vaničky aparatury byly naplněny 0,5x TBE pufrem a do anodové vaničky bylo přidáno ještě ethidium bromid do koncentrace 0,005 %. Pro nasycení gelu ethidium bromidem byl gel ponechán cca 1 hod při 300 V.

Poté bylo do první jamky naneseno 5 µl velikostního markeru Gene Ruler™ 100bp, DNA Ladder Plus (Fermentas, Kanada) v 6x Stop C a pak do dalších jamek po 5 µl PCR produktů. Dělení PCR produktů bylo prováděno při 350 V cca 1 hod a následně byla provedena vizualizace pomocí UV transluminátoru s dokumentačním zařízením pro analýzu elektroforetických gelů ChemiGenius BioImaging System (Syngene, UK). Editace výsledných obrázků byla prováděna v programech (Adobe Photoshop, Adobe Systems a CorelDRAW, Corel Corporation).

4.2.5 DNA sekvenování Sangerovou metodou

Amplikony separované na gelu o jednom fragmentu a odpovídající očekávané délce byly vybrány k sekvenování. Před samotnou sekvenací bylo provedeno enzymatické přečištění PCR produktů. Reakční směs pro přečištění byla připravena smícháním 1 U exonukleasy I (Fermentas, Kanada) a 0,5 U alkalické fosfatasy FastAP™ (Fermentas, Kanada). K roztoku enzymů byl přidán PCR produkt o objemu 2–5 µl podle množství separovaného fragmentu a celkový objem reakce byl doplněn 1x PCR pufrům na objem 7 µl. Smě byla inkubována v termocykléru při 37 °C po dobu 30 min, po které následovala denaturace 5 min při 95 °C.

Reakční směs pro sekvenaci byla připravena podle komerčního kitu BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies™, USA). Reakční směs obsahovala 1,5 µl 5x sekvenačního pufru, 0,125 µl BigDye®, 0,875 µl BDx64, 1 µl primeru o koncentraci 10 µmol/l a 2,5 µl pročištěné DNA. Roztok sekvenční směsi byl doplněn vodou na 10 µl. Sekvence byla provedena v termocykléru a reakce začala denaturací při 95 °C o délce 5 min, dále bylo zopakováno 60 cyklů zahrnující denaturaci při 96 °C po dobu 10 s, přisedání primerů při 50 °C o délce 5 s a polymeraci komplementárního řetězce trvající 4 min při 60 °C.

Poté byl produkt sekvenování přečištěn pomocí magnetických kuliček, kitem Agencourt® CleanSeq® (Beckman Coulter, USA) a robotické stanice Biomek® NX^P (Beckman Coulter, USA). Nakonec byla provedena separace pomocí kapilární elektroforézy s detekcí fluorescenčně značených inkorporovaných dideoxynukleotidů na automatickém genetickém analyzátoru ABI 3730xl (Applied Biosystems, USA).

4.2.6 Fylogenetická analýza a použité programy

Výsledkem z genetického analyzátoru byla sekvence DNA ve formátu ABI. Pro podrobnější náhled a kontrolu chromatogramu sekvence byl použit program Chromas (Technelysium Pty Ltd, Austrálie). Sekvence DNA byly analyzovány v programu Geneious. Po konverzi do formátu FASTA byly analyzovány v programu MEGA7 jednotlivé sekvence

DNA pro každou z odrůd pšenice samostatně. Také program MEGA7 byl použit pro porovnání výsledných konsenzuálních sekvencí mezi sebou tzv. multiple alignment a pro detekování polymorfismů. Sekvence TRI linií pšenice byly porovnávány společně se subgenomy A, B, D kultivaru Chinese spring. Konečným výsledkem pomocí programu MEGA7 byl fylogenetický strom získán algoritmem neighbor-joining.

5 VÝSLEDKY

5.1 Extrakce DNA, PCR a sekvenování lokusu genu *SRS1*

DNA pro sekvenování lokusu genu *SRS1* byla extrahována z 21 tetraploidních a 4 hexaploidních TRI linií odrůd pšenice (Tab. I). Výtěžek extrakce DNA z jednotlivých odrůd byl získán v průměru 116 ng/μl v rozahu 52–161 ng/μl na vzorek.

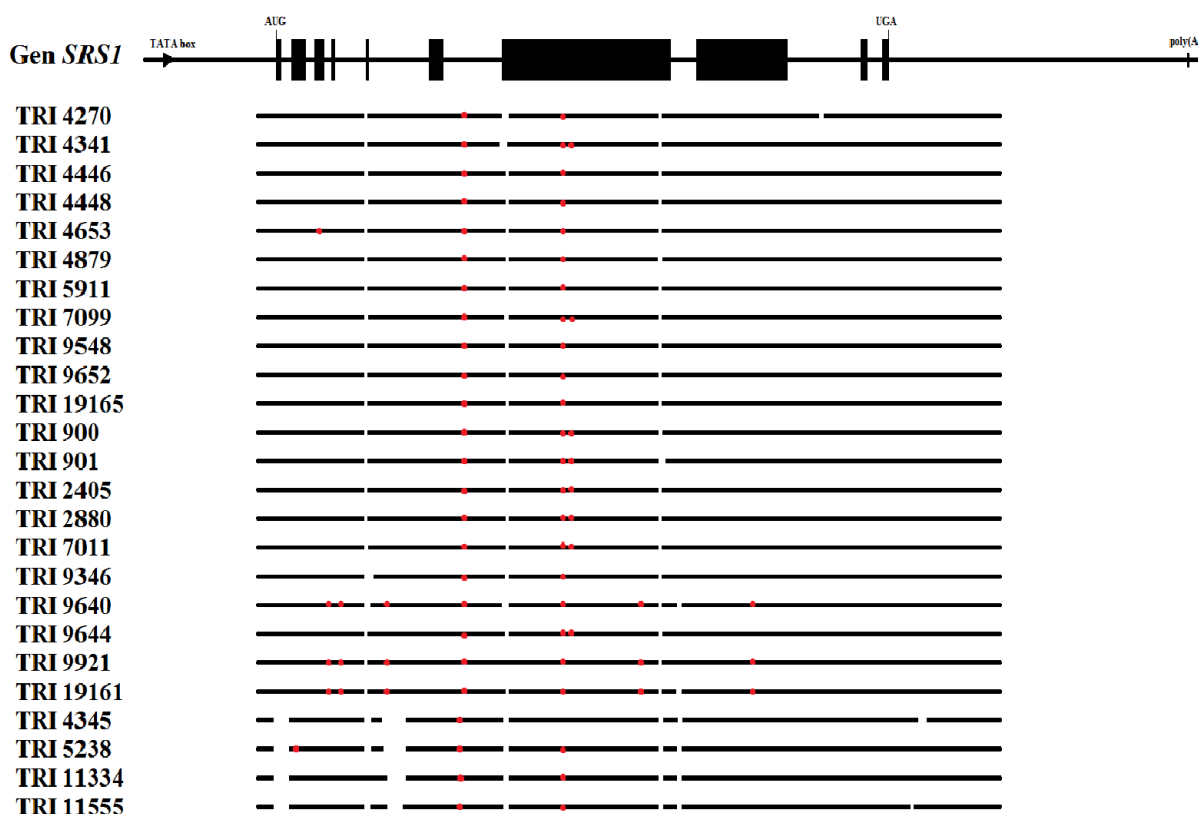
Pro PCR amplifikaci lokusu *SRS1* genu bylo navrženo 61 primerů (Tab. II). Testováno bylo 99 kombinací primerů, z těchto amplifikovalo jednokopiové fragmenty 34 kombinací primerů u tetraploidních linií a 35 kombinací primerů u hexaploidních linií (Tab. III). Celkem 44 párů primerů amplifikovalo pouze jeden fragment *SRS1* genu (Tab III, Obr. 5).

Tab. III: Kombinace specifických primerů

Oblast genu	Specifické pro tetraploidní a <u>hexaploidní</u> linie
Exon 1	F52/R11, F52/R31, F52/R14
Exon 2	F52/R31, F52/R14 , F13/R13
Exon 3	F52/R14 , F13/R13, F14/R14
Exon 4	F52/R14 , F14/R14, F32/R32
Exon 5	F52/R14 , F14/R14, F32/R32 , F2/R32, F2/qR60 , F2/R2
Exon 6	F2/qR60 , F15/qR60 , F2/R2 , F15/R15, F33/R2 , F33/R33, F33/R16, F1/R16 , F16/R16
Exon 7	F1/R16 , F16/R16, F34/R16 , F34/R34 , F17/R17, F17/R34 , F18/R17 , F18/R34 , F18/R18, F19/R18 , F19/R19, F20/R20, F20/R3
Exon 8	F20/R20, F20/R3 , F21/R3, F21/R21, F35/R21 , F35/R35, F4/R35, F4/R4, F22/R22, F22/R55
Exon 9	F4/R4, F22/R22, F22/R55, F55/R55, F55/R23 , F5/R4, F23/R23, F23/R24
Exon 10	F55/R23 , F23/R23, F23/R24 , F24/R23 , F24/R24, F24/R41 , F41/R41

Vysvětlivky: Normálním stylem psané primery jsou společné pro tetraploidní i hexaploidní linie. Boldem vyznačeny primery byly specifické jen pro **tetraploidní** linie. Boldem a podtržením jsou vyznačeny primery specifické jen pro hexaploidní linie.

Amplikony získané za použití primerů (Tab. II) byly sekvenovány Sangerovým sekvenováním (Obr. 5). Pro lokus *SRS1* genu bylo získáno v průměru 51 sekvencí pro každou TRI linii o délce 25–862 bp. Z jednotlivých sekvencí byla vytvořena konsenzuální sekvence pro všechny testované odrůdy o délce cca 9020 bp.



Obrázek 5: Schéma struktury genu *SRS1* a znázornění jeho sekvencí z TRI linií

Většina TRI linií je tetraploidních kromě posledních čtyř, které jsou hexaploidní. Gen *SRS1* – černé obdélníky znázorňují exony. TRI – čáry vyznačují osekvenované části genu a mezery jsou místa neosekvenovaná. Červené tečky vyznačují pozice identifikovaných SNP polymorfismů.

5.2 Analýza sekvencí *SRS1* genu u TRI linií odrůd pšenice

Gen *SRS1* má délku 7445 bp. Skládá se z 10 exonů a 9 intronů a kóduje 1352 aminokyselin (Obr. 5).

Sekvence získané v této práci pokrývají většinu *SRS1* lokusu, kromě krátkých oblastí napříč TRI liniemi (Obr. 5).

5.2.1 Polymorfní oblasti v lokusu *SRS1* genu

V rámci genu *SRS1* byly identifikovány polymorfismy v sekvencích mezi testovanými pšeničnými odrůdami a subgenomy A, B, D kultivaru Chinese spring. Bylo nalezeno 136 polymorfismů mezi homeologními subgenomy a 12 SNP mutací. Nalezené polymorfismy a zejména SNP mutace jsou zhrnuty v tabulce IV. a znázorněny na obrázku 5. Zašedlá pole v tabulce vyznačují podobu 136 polymorfismů mezi homeologními subgenomy, které nebyly zahrnuty do fylogenetické analýzy, kvůli pravděpodobnému polymorfismu mezi homeologními subgenomy. U 12 SNP mutací je popsána pozice v genu a co se vyskytovalo na stejné pozici u ostatních TRI linií a subgenomech Chinese spring. U 2 z těchto SNP mutací, nacházejících se v exonech, mohlo být pozorováno ovlivnění sekvence aminokyselin (v tabulce vyznačeny červeně):

V exonu 7 na pozici 4399 u TRI linií 9640, 9921, 19161 nedošlo k záměně aminokyseliny: **GGA** → **GGG** / Gly → Gly.

V exonu 8 na pozici 5873 u TRI linií 9640, 9921, 19161 došlo k následující záměně aminokyseliny: **AGT** → **CGT** / Ser → Arg.

U dalších SNP mutací nelze určit vliv na zařazení aminokyseliny, z důvodu pozice v intronu nebo nejasné identifikace nukleotidu v dané pozici.

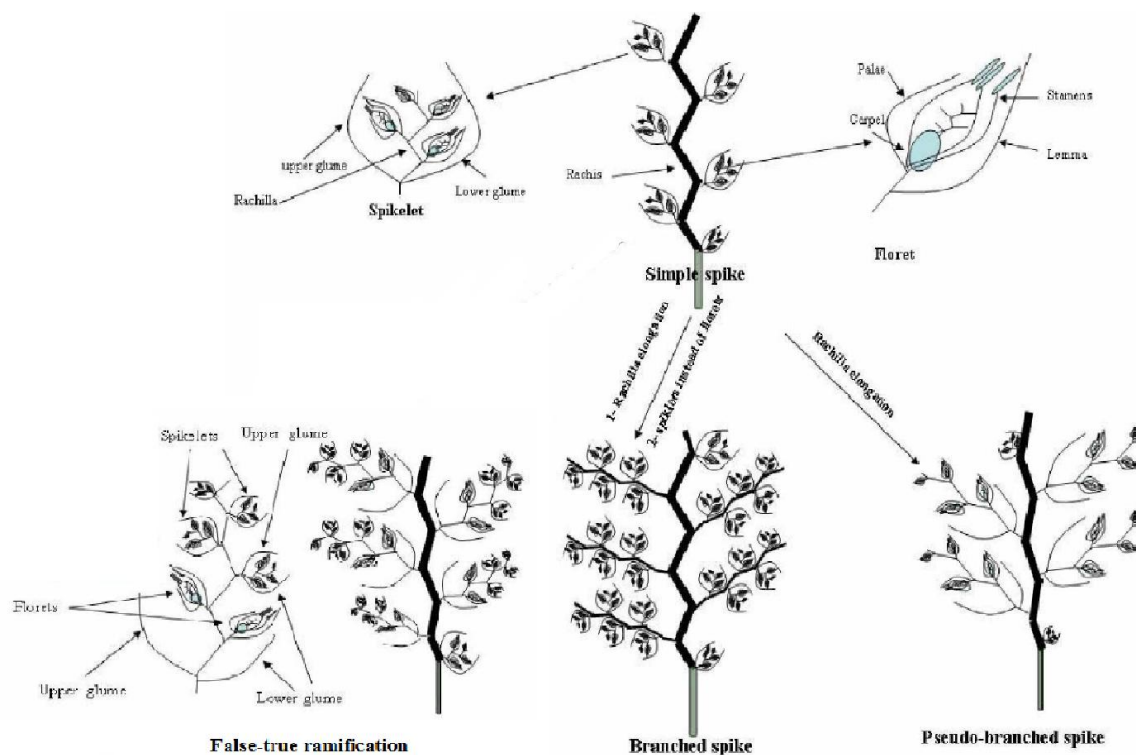
Tab. IV: Identifikované polymorfismy

	Exon/Intron (Délka v bp)	Exon 1 (59)	Intron 1 (96)	Exon 2 (180)		Intron 2 (104)	Exon 3 (106)	Intron 3 (80)	Exon 4 (31)	Intron 4 (366)	Exon 5 (34)	Intron 5 (731)	Exon 6 (153)	Intron 6 (693)		Exon 7 (2053)			Intron 7 (280)	Exon 8 (1291)	Intron 8 (875)	Exon 9 (84)	Intron 9 (164)	Exon 10 (65)	Typ větvení
	Pozice	-	-	210	222	353	452	617	-	780	-	1319	-	2209	2260	3464	3561	4399	4890	5873	-	-	-	-	-
	TRI																								
Tetraploidní linie	4270	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A	A	G	A	-	-	-	-	T
	4341	0	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A/T	A	G	A	-	-	-	-	T
	4446	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A	A	G	A	-	-	-	-	T
	4448	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A	A	G	A	-	-	-	-	T
	4653	-	-	T	G	G/A	G/T	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A	A	G	A	-	-	-	-	T
	4879	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A	A	G	A	-	-	-	-	T
	5911	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A	A	G	A	-	-	-	-	T
	7099	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A/T	A	G	A	-	-	-	-	T
	9548	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A	A	G	A	-	-	-	-	T
	9652	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A	A	G	A	-	-	-	-	T
	19165	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A	A	G	A	-	-	-	-	T
	900	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A/T	A	G	A	-	-	-	-	T
	901	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A/T	A	G	A	-	-	-	-	T
	2405	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A/T	A	G	A	-	-	-	-	T
	2880	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A/T	A	G	A	-	-	-	-	T
	7011	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A/T	A	G	A	-	-	-	-	T
	9346	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A	A	G	A	-	-	-	-	F-T
	9640	-	-	T	G	G/A	G	A	-	delece A	-	G	-	G	T/C	G/A	A	G	N	C	-	-	-	-	F-T
	9644	-	-	T	G	G/A	G	T	-	A	-	A	-	G	T/C	G/A	A/T	A	G	A	-	-	-	-	F-T
	9921	-	-	T	G	G/A	G	A	-	delece A	-	G	-	G	T/C	G/A	A	G	T	C	-	-	-	-	F-T
	19161	-	-	T	G	G/A	G	A	-	delece A	-	G	-	G	T/C	G/A	A	G	N	C	-	-	-	-	F-T
Hexaploidní linie	4345	-	-	G/T	G	G/A	G	T	-	G/A	-	A	-	G/C	C	A	A	A	N	A	-	-	-	-	T
	5238	-	-	G/T	G/T	G/A	G	T	-	G/A	-	A	-	G/C	C	G/A	A	A	N	A	-	-	-	-	T
	11334	-	-	G/T	G	G/A	G	T	-	G/A	-	A	-	G/C	C	G/A	A	A	N	A	-	-	-	-	T
	11555	-	-	G/T	G	G/A	G	T	-	G/A	-	A	-	G/C	C	G/A	A	A	N	A	-	-	-	-	T
Chinese spring	Subgenom																								
	A	-	-	T	G	G	G	T	-	A	-	A	-	G	C	A	A	A	G	A	-	-	-	-	-
	B	-	-	G	G	A	G	T	-	A	-	A	-	G	C	A	A	A	G	A	-	-	-	-	-
	D	-	-	G	G	A	G	T	-	G/A	-	A	-	G	C	A	A	A	G	A	-	-	-	-	-

Přesně popsány všechny pozice SNP mutací a šedě znázorněné dva příklady polymorfismů mezi homeologními subgenomy. Červeně vyznačené mutace ovlivňují sekvenci aminokyselin.

5.4 Fenotyp větvení klasu u TRI linií

K 25 TRI liniím pšenice byl přiřazen fenotyp klasu podle následující charakterizace typů větvení. Kromě jednoduchého větvení klasu s přímým větvením, na němž přisedá v úžlabí jen jeden klásek, byly popsány další typy větvení klasu (Obr. 6). Pravé větvení (branched spike) je charakterizováno prodlouženými sekundárními věténky, která nesou několik klásků a klas rozvětví. U nepravého větvení (pseudo-branched spike) jsou popsány prodloužená sekundární věténka nesoucí kvítka v každém úžlabí věténka, která jsou prodloužena po celém klasu. Další větvení je spojení nepravého a pravého větvení, kdy prodloužená věténka nesou kvítka v bazálním úžlabí a klásky na vrcholu věténka (Dorofeev a kol, 1979; Flaksberger, 1935; Gowayed, 2009).



Obr. 6: Typy větvení

(Převzato z Gowayed, 2009.)

Na základě uvedených typů větvení klasu byly TRI linie odrůd pšenice zařazeny do pravého větvení (T) a nepravo-pravého větvení (F-T), do nepravého větvení (F) nebyly žádné odrůdy zařazeny (Gowayed, 2009).

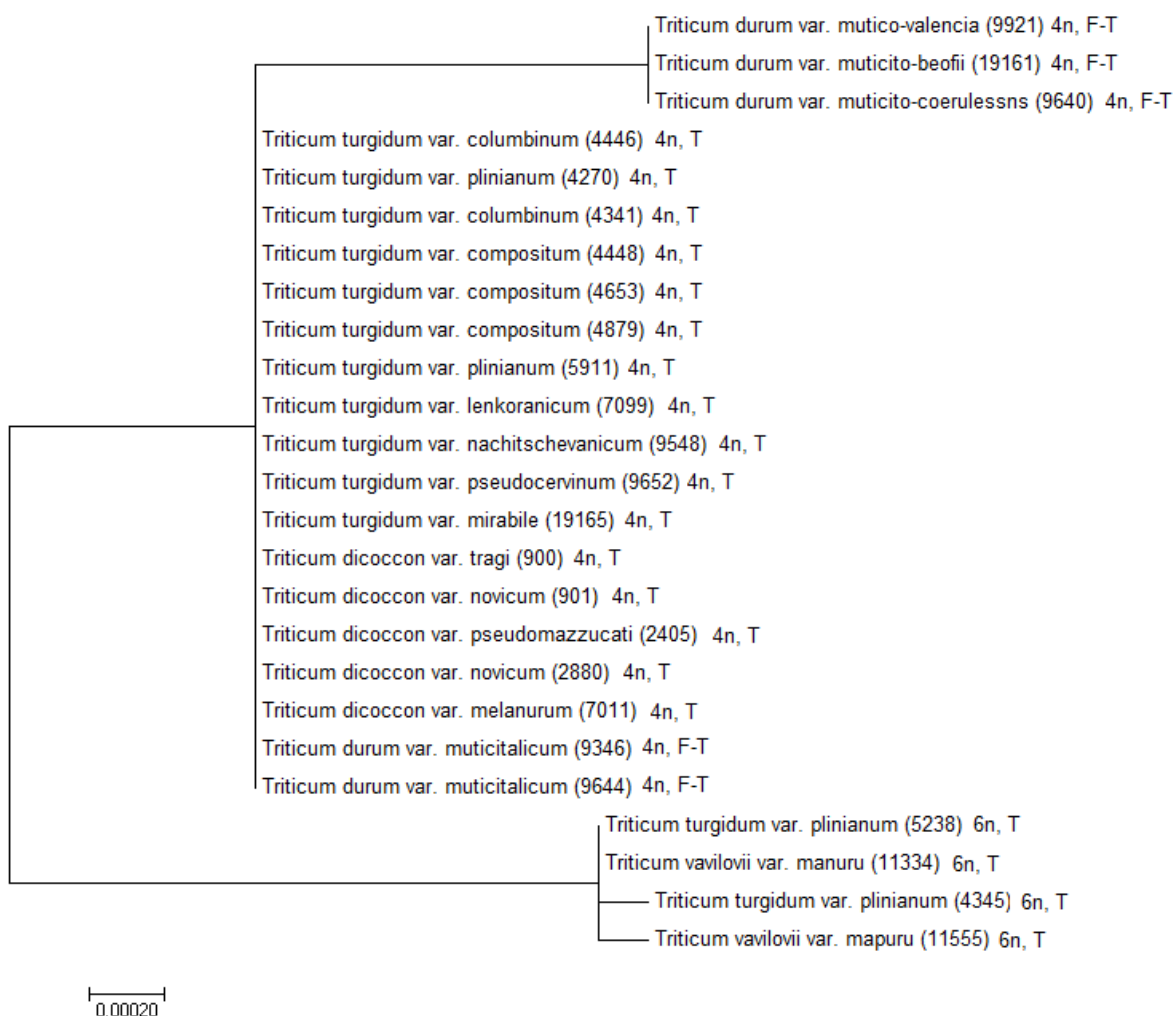
Do pravého větvení patří *Triticum turgidum* var. *plinianum* (4270), *Triticum turgidum* var. *columbinum* (4341), *Triticum turgidum* var. *columbinum* (4446), *Triticum turgidum* var. *compositum* (4448), *Triticum turgidum* var. *compositum* (4653), *Triticum turgidum* var. *compositum* (4879), *Triticum turgidum* var. *plinianum* (5911), *Triticum turgidum* var. *lenkoranicum* (7099), *Triticum turgidum* var. *nachitschevanicum* (9548), *Triticum turgidum* var. *pseudocervinum* (9652), *Triticum turgidum* var. *mirabile* (19165), *Triticum dicoccon* var. *tragi* (900), *Triticum dicoccon* var. *novicum* (901), *Triticum dicoccon* var. *pseudomazzucati* (2405), *Triticum dicoccon* var. *novicum* (2880), *Triticum dicoccon* var. *melanurum* (7011), *Triticum turgidum* var. *plinianum* (4345), *Triticum turgidum* var. *plinianum* (5238), *Triticum vavilovii* var. *manuru* (11334), *Triticum vavilovii* var. *mapuru* (11555).

Do nepravo-pravého větvení patří *Triticum durum* var. *muticitalicum* (9346), *Triticum durum* var. *muticito-coeruleus* (9640), *Triticum durum* var. *muticitalicum* (9644), *Triticum durum* var. *mutico-valencia* (9921), *Triticum durum* var. *muticito-beofii* (19161).

Nakonec bylo sledováno, jak polymorfismy v sekvencích TRI linií odrůd pšenice korelují s typem větvení klasu. Z identifikovaných polymorfismů (Tab. IV) vyplývá, že tetraploidní linie 9640, 9921, 19161 se často odlišují, jako na pozicích 617, 780, 1319, 4399, 5873 od ostatních TRI linií a jejich typem větvení je nepravo-pravé větvení. Avšak u TRI linií 9346 a 9644, ke kterým bylo také přiřazeno nepravo-pravé větvení, k těmto SNP mutacím nedošlo. Nelze s jistotou dokázat, že tyto SNP mutace ovlivňují větvení.

5.5 Fylogenetická analýza sekvenčních dat

Na základě 25 sekvencí TRI linií odrůd pšenice byl pomocí programu MEGA7 za použití algoritmu neighbor-joining získán fylogenetický strom (Obr. 7). Fylogenetický strom TRI linií je ovlivněn ploidií, nalezenými polymorfismy, jako homeologními mezi jednotlivými subgenomy a SNP mutacemi.



Obr. 7: Fylogenetický strom TRI linií

Kladogram znázorňující příbuznost TRI linií odrůd pšenice na základě sekvenčních dat lokusu genu *SRS1*, doplněn je ploidii 4n, 6n a typem větvení – pravé větvení (T) a nepravo-pravé větvení (F-T).

6 DISKUSE

Pšenice setá (*Triticum aestivum*) je třetí nejvýznamnější plodinou na světě a nejlépe studovaným znakem je její výnos. Výnos je ovlivněn, jak na genetické úrovni, tak vnějším prostředím (Cuthbert a kol., 2008; Lobell a kol., 2011). V této práci byl sekvenován gen *SRS1* (*small and round seed 1*), který je spojován s výnosovým prvkem tvaru semene a větvení klasu (počet obilek na klas). Několik genů ovlivňujících velikost zrna bylo identifikováno v rýži (Li a kol., 2010). Lokus s novým genem *SRS1*, zodpovědný za fenotyp malého a kulatého zrna byl identifikován na rýžovém chromozomu 7. Gen *SRS1* je sestavený z 10 exonů a kóduje nový protein o neznámé funkci a ovlivňuje také větvení klasu (Nagato a Yoshimura, 2007; Tanabe a kol., 2007; Abe a kol., 2010). Druhy trav z čeledi *Poaceae* mají zachovanou syntonii (Devos, 2005), proto byly homologní geny rýže hledány v pšenici. Hlavně z těchto důvodů a zejména, kvůli vlivu na výnos byl gen *SRS1* sekvenován u TRI linií odrůd pšenice, které mají různé formy větvení klasu. Po sekvenování lokusu s genem *SRS1* byla studována diverzita mezi TRI liniemi a asociace jednotlivých polymorfismů v genu s fenotypem.

Pšeničný homolog genu *SRS1* má délku cca 7445 bp a skládá se z 10 exonů a kóduje 1352 aminokyselin, jak bylo zjištěno ze sekvenčních dat v rámci této práce. Struktura pšeničného genu *SRS1* se výrazně neliší od toho v rýži. Gen *SRS1* byl klonován v rýži pomocí F_2 mapovací populace z křížení poddruhů *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* a *Oryza sativa* L. ssp. *Indica*. Bylo navrženo 8 primerů (čtyři páry F a R) pro dva STS markery (25249 a 25363) a dva SNP markery (25285As a 25340As) na chromozom 7. Mutace *srs1* rozlišující jeho funkci byla identifikována mezi STS markery (Tanabe a kol., 2007). Gen *SRS1* rýže (Os07g0616000) je složený z 10 exonů a 9 intronů a kódující cDNA obsahuje otevřený čtecí rámec s 1366 kodony (Li a kol., 2010). Dříve byl identifikován lokus, zodpovědný za fenotyp malého a kulatého zrna na chromozomu 7 u mutantů. Z toho vyplynulo, že k mutacím zřejmě došlo v lokusu genu *SRS1*, a tak byly sekvence s lokusem *srs1* u mutantů dále analyzovány (Irimia a Roy 2008). Analýzou mutace genu *srs1* byl odhalen pleiotropní efekt při vývoji rostlin, zahrnující zkrácení internodií, vzpřímenost listů a fenotyp malého a kulatého zrna ovlivňující morfologii obilky (Li a kol., 2010).

Porovnány byly fenotypy mutantů s kontrolním druhem rýže *Oryza sativa* L. (*japonica*), z kterého byli mutanti vytvořeni. Pro identifikaci místa mutace u *srs1* mutantů bylo navrženo 15 sad primerů pro PCR reakci, které pokryly 10 exonů v *SRS1* genu. Amplifikované fragmenty byly sekvenovány za využití stejných primerů jako při amplifikaci. Mutováno bylo více způsoby, mutanti *srs1-1*, *srs1-2*, *srs1-3* byli mutováni látkou N-methyl-N-nitrosourea, *srs1-4* mutován γ -zářením a *srs1-5* mutován neznámou látkou. Mutace u *srs1-1* mutantů je způsobena delecí 38 bp v exonu 7. U mutantů *srs1-2* a *srs1-5* byla detekována mutace v intronu 3. U mutantu *srs1-2* byla nalezena jednonukleotidová substituce G za T, která změnila místo sestřihu. Také u mutantu *srs1-5* došlo k záměně báze G za A v místě štěpení. Mutace mohou vést k abnormálnímu sestřihu. Pro potvrzení možných abnormálních sestřihů byla u těchto mutantů připravena cDNA. Produkty PCR byly sekvenovány a kvantifikovány real-time RT-PCR. Sekvenační analýzou cDNA z *SRS1* se ukázalo, že intron 3 o 120 bp není vystřižen, v důsledku mutace v místě sestřihu u mutantu *srs1-2*. Jelikož sekvence intronu 3 neobsahuje stop kodon, může teoreticky mutovaný protein SRS1 mít navíc sekvenci 40 aminokyselin, které mohou narušit funkci proteinu. Mutant *srs1-3* byl také poškozen bodovou mutací v substituci nukleotidu A za G, který se nachází ve stop kodonu. Výsledkem záměny je tryptofan (Trp) a další stop kodon se nachází za 183 bází. Takže protein by mohl být o 61 aminokyselin delší, než v normálním druhu rýže a může takto být narušena jeho funkce. Počet lat na rostlinu byl nižší u mutantů *srs1-2* a *srs1-3* narozdíl od kontrolních rostlin a dalších mutantů. Mutant *srs1-4* má delecí 31 bp v exonu 6. U mutantu *srs1-5* došlo opět chybným sestřihem ke ztrátě exonu 4. Celkově se mutanti *srs1* projeví menším vzrůstem rostliny s menšími obilkami. Délka internodií i obilek byla zkrácena u všech *srs1* mutantů, ačkoli míra snížení byla mezi mutanty odlišná. Zrna byly o něco širší a tlustší u všech mutantů, ale na rozdíl od kontrolního typu rýže, váha zrn byla u mutantů nižší. Počet obilek na latu nebyl významně odlišný mezi *srs1* mutantem a běžným druhem. Laty s klasy i listy byly vzpřímenější u mutantů než u kontrolního druhu rýže. V podélném řezu pluchy jsou buňky, jak v délce, tak v počtu snižené u mutantů *srs1* v porovnání s kontrolním druhem. Zatímco bočním řezem pluchy jsou buňky u *srs1* mutantů prodloužené více než u kontrolního typu, ale počet buněk je stejný u mutantu i u kontrolního druhu rýže (Abe a kol., 2010; Irimia a Roy 2008; Li a kol., 2010; Tanabe a kol., 2007).

Expresní a morfologická analýza poukázala, že mutace v *DEP2* (*dense and erect panicle 2*), dřívější název pro gen *SRS1*, ovlivňuje především prodloužení hlavní osy a primárních a sekundárních rozvětvených os na latě. U mutantů genu *DEP1* byly popsány

mutace jako substituce v intronu 2 G/A, která způsobila abnormální sestřih a delece 31 bp v exonu 6 (Li a kol., 2010). U TRI linií pšenice je sledován fenotyp větvení sekundárních větének na klasu, který je dáván do spojitosti s genem *SRS1*. K žádnému abnormálnímu sestřihu nedošlo v důsledku substituční mutace ani k mutaci nonsense.

V této práci byly navrženy primery pro pokrytí celého lokusu genu *SRS1* o délce cca 12 000 bp. Aby bylo dosaženo co největší specifity primerů za účelem jednokopiových fragmentů a zároveň se předešlo vzniku nespecifických produktů, byla provedena PCR reakce tzv. touch down, která byla popsána Don a kol. (1991). Avšak i když v některých případech PCR reakce neproběhla zcela správně. Amplifikováno bylo více DNA fragmentů o stejné délce, které nemohly být dále použity k sekvenaci, kvůli vzniku smíšených sekvencí nebo se objevily strukturální překážky. Naopak po správné amplifikaci DNA o jednokopiových fragmentech výjimečně proběhla špatná sekvenace tzv. smíšená sekvence. Potom se zkusily nakombinovat jiné sady F/R primerů pro chybný amplikon. Většina nepatrných mezer v rámci sekvencí TRI linií na lokusu *SRS1* genu zůstalo po sekvenování amplikonu, z důvodu ořezání prvních a posledních nukleotidů sekvence (Obr. 4). Z tohoto důvodu by bylo potřeba navrhnout další primery, které by tyto mezery překlenuly. Avšak tyto mezery představují jenom 4,2 % z celkové sekvence a nemají zásadní vliv na identifikaci mutací i exonových sekvencích.

Překvapivě se nedařilo amplifikovat a sekvenovat začátek genu včetně části promotoru o délce cca 1 400 bp, i když reakční směs PCR i její podmínky byly upraveny a byly testovány různé polymerázy (např.: One *Taq* s GC pufrem a Enhancerem) Možnými příčinami můžou být vyšší obsah GC v této oblasti, nebo jiná sekundární struktura DNA, což je obtížnější pro amplifikaci a sekвени. Pro PCR reakci, kdy je amplifikovaná oblast bohatá na GC je důležitá rovnováha délky sekvence s teplotou tání (McDowell a kol., 1998). Doporučeno bylo zahrnutí organických látek jako DMSO a glycerolu, které zlepšují amplifikaci oblastí s vyšším obsahem GC, tím že zesilují amplifikaci a brání vzniku sekundárních struktur, nebo nespecifických produktů (Musso a kol., 2006). Avšak použití One *Taq* High GC Enhanceru, z výše zmíněného kitu, který obsahoval DMSO i glycerol, nebylo úspěšné.

K vizualizaci vzorků DNA slouží chromatogram, který je výsledkem genetického analyzátoru. Slouží k pozorování a porovnávání výsledných sekvencí mezi jednotlivými

vzorky. Chromatogram znázorňuje jednotlivé píky nukleotidů v sekvenci DNA. Lze tak pozorovat jednokopiové, ale i více kopiové až smíšené sekvence. V této práci více píku značí heterozygota nebo polymorfismy mezi subgenomy A, B, D. Smíšené sekvence většinou značí špatné sekvenování v důsledku nevhodných sad primerů (Otto a kol. 2008).

V rámci genu *SRS1* bylo identifikováno napříč sekvencemi TRI linií odrůd pšenice celkem 136 polymorfismů mezi homeologními subgenomy a 12 SNP mutací v rámci genu *SRS1*. Bodové mutace způsobující záměnu aminokyselin, mohou a nemusí změnit strukturu a funkci proteinu. Nicméně při záměně aminokyselin s rozdílnými vlastnostmi je předpokládán výraznější vliv na výsledný protein avšak, bez znalosti dalších vlivů jako např. vnějšího prostředí nelze s jistotou předpovědět ovlivnění stability a funkce daného proteinu (Anfinsen, 1972; Schaefer a Rost, 2012). V rámci genu byly popsány 2 SNP, které mohou ovlivnit výsledný polypeptid. V exonu 7 na pozici 4399 u TRI linií 9640, 9921, 19161 byla identifikována SNP mutace. Jedná se o tichou mutaci, kdy se zařazením odlišného nukleotidu aminokyselina nemění. Zůstává nepolární aminokyselina glycinu, a k významnému ovlivnění polypeptidu nedochází. U stejných TRI linií 9640, 9921, 19161 v exonu 8 na pozici 5873 byla identifikována významnější SNP mutace. Jde o missense mutaci, kdy zařazení odlišného nukleotidu dochází ke změně smyslu tripletu a tím k záměně aminokyselin. Na tomto místě jde o polární aminokyseliny serin a arginin. Serin je aminokyselina s hydroxylovou skupinou v postranním řetězci bez náboje. Arginin je bazickou aminokyselinou s možným pozitivním nábojem. Z těchto důvodů může dojít ke změně funkce polypeptidu (Drake a kol., 1998; Lengyel a Söll, 1969; Topal a Fresco, 1976). Na základě těchto 2 SNP mutací nelze s určitostí prokázat korelaci s fenotypem větvení podle Gowayed, 2009. I když TRI linie s missense mutací patří do nepravo-pravého větvení a ve fylogenetickém stromu se společně rozvětvují, zároveň se často liší na určitých pozicích od ostatních TRI linií. Příčinou mohou být nerozpoznatelné homeologní polymorfismy i nespecifikované SNP mutace v důsledku subgenomů, tedy tetraploidie a hexaploidie. K lepšímu rozpoznání korelace polymorfismů s fenotypem by více přispělo specifické navrhnutí primerů pro jednotlivé subgenomy.

7 ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce byla identifikace pšeničného homologu rýžového genu *SRS1*. Lokus genu *SRS1* byl sekvenován u 25 TRI linií odrůd pšenice. Podařilo se osekvenovat lokus s délkou cca 9020 pro každou TRI lini. Samotný gen *SRS1* odpovídá délce 7445 bp a kóduje 1352 aminokyselin.

Prostudováním možné diverzity genu pomocí chromatogramu byly identifikovány modifikace v sekvenci mezi pšeničnými odrůdami. Bylo nalezeno 136 polymorfismů mezi homeologními subgenomy a 12 SNP mutací.

TRI linie odrůd pšenice byly rozděleny podle fenotypu větvení. 20 TRI linií odpovídalo pravému typu větvení a 5 nepravo-pravému typu. Na základě jedné SNP mutace u TRI linií 9640, 9921, 1916 nelze prokázat asociaci s větvením klasu pšenice. Jasnější by bylo specifikovat nalezené polymorfismy pro každý subgenom zvlášť.

Fylogenetická analýza sekvenčních dat naznačuje blízkou příbuznost vybraných TRI linií odrůd pšenice na základě jejich ploidie a identifikovaných polymorfismů.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abe, Y., Mieda, K., Ando, T., Kono, I., Yona, M., Kitano, H., Iwasaki, Y. (2010): The SMALL AND ROUND SEED1 (SRS1/DEP2) gene is involved in the region of seed size in rice. *Genes Genetic Systems* 85: 327–339.
- Anfinsen, C. B. (1972): The formation and stabilization of protein structure. *The Biochemical Journal* 128 (4): 737–749.
- Akhunova, A. R., Matniyazov, R. T., Liang, H., Akhunov, E. D. (2010): Homoeolog-specific transcriptional bias in allopolyploid wheat. *BMC Genomics* 11: 505.
- Amagai Y., Martinek P., Watanabe N., Kuboyama T. (2014): Microsatellite mapping of genes for branched spike and soft glumes in *Triticum monococcum* L. *Genetic Resources and Crop Evol.* 61: 465–471.
- Ashikari, M., Wu, J., Yano, M., Sasaki, T., and Yoshimura, A. (1999): Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene Dwarf 1 encodes the α -subunit of GTP-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 10284–10289.
- Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E. R., Qian, Q., Kitano, H., Matsuoka, M. (2005): Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309 (5735): 741–745.
- Belmonte, M. F., Kirkbride, R. C., Stone, S. L., Pelletier, J. M., Bui, A. Q., Yeung, E. C., Hashimoto, M., Fei, J., Harada, C. M., Munoz, M. D., Le, B. H., Drews, G. N., Brady, S. M., Goldberg, R. B., Harada, J. J. (2013): Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the Arabidopsis seed. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110 (5): E435–E444.
- Bennett, M. D. a Smith, J. B. (1976): Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B Biological Sciences* 274: 227–274.
- Bennetzen, J. L. a Ma, J. (2003): The genetic colinearity of rice and other cereals on the basis of genomic sequence analysis. *Current Opinion in Plant Biology* 6(2):128-33.
- Börner, A., Schumann, E., Fürste, A., Cöster, H., Leithold, B., Röder, S., Weber, E. (2002): Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105 (6–7):921–936.
- Brenchley, R., Spannagl, M., Pfeifer, M., Barker, G. L., D'Amore, R., Allen, A. M., McKenzie, N., Kramer, M., Kerhornou, A., Bolser, D., Kay, S., Waite, D., Trick, M., Bancroft, I., Gu, Y., Huo, N., Luo, M. C., Sehgal, S., Gill, B., Kianian, S., Anderson, O., Kersey, P., Dvořák, J., McCombie, W. R., Hall, A., Mayer, K. F., Edwards, K. J., Bevan, M. W., Hall, N. (2012): Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* 491 (7426): 705–710.

- Cox, T. S. (1997): Deepening the wheat gene pool. *Journal of Crop Production* 1 (1): 1–25.
- Cuthbert, J. L., Somers, D. J., Brûlé-Babel, A. L., Brown, P. D., Crow, G. H. (2008): Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 117 (4): 595–608.
- Devos, K. M. (2005): Updating the 'crop circle'. *Current Opinion in Plant Biology* 8 (2): 155–62.
- Devries J. N., Sybenga J. (1984): Chromosomal location of 17 monogenically inherited morphological markers in rye (*Secale cereale* L.) using the translocation tester set. *Journal of Plant Breeding* 92: 117–139.
- Dobrovolskaya, O., Martinek, P., Voylovkov, A. V., Korzun, V., Röder, M. S., Börner, A. (2009): Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*). *Theoretical and Applied Genetics* 119 (5), 867–874.
- Dobrovolskaya, O., Pont, C., Sibout, R., Martinek, P., Badaeva, E., Murat, F., Chosson, A., Watanabe, N., Prat, E., Gautier, N., Gautier, V., Poncet, C., Orlov, Y. L., Krasnikov, A. A., Bergès, H., Salina, E., Laikova, L., Salse, J. (2015): FRIZZY PANICLE drives supernumerary spikelets in bread wheat. *Plant Physiology* 167 (1): 189–199.
- Don, R., Cox, P., Wainwright, B., Baker, K., Mattick, J. (1991): “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification.. *Nucleic Acids Research* 19 (14): 4008.
- Doležel, J., Kubaláková, M., Paux, E., Bartoš, J., Feuillet, C. (2007). Chromosome-based genomics in the cereals. *Chromosome Research* 15 (1): 51–66.
- Dorofeev, V. F., Filatenko, A.A., Migushova, E.F., Udaczin, R.A. a R.R. Jakubziner, R.R. (1979). Wheat. *Flora of Cultivated Plants I* (V. F. Dorofeev and O. N. Korovina, eds.). Leningrad, Kolos, Russia.
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D. and Crow, J. F. (1998): Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148: 1667–686.
- Drea, S., Leader, D. J., Arnold, B. C., Shaw, P., Dolan, L., Doonan, J. H. (2005): Systematic spatial analysis of gene expression during wheat caryopsis development. *Plant Cell* 17 (8): 2172–2185.
- 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.
- Dubcovsky, J. a Dvořák, J. (2007): Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* 316 (5833): 1862–1866.
- Dvořák, J., McGuire, P. E., Cassidy, B. (1988): Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated

- nucleotide sequences. *Genome* 30 (5): 680–689.
- Dvořák, J., Zhang, H. B. (1990): Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 9640 – 9644.
- Dvořák, J., Terlizzi, P. Zhang, H. B., Resta, P. (1993): The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36 (1): 21–31.
- Echeverry-Solarte, M., A. Kumar, S. Kianian, E. E. Mantovani, S. Simsek (2014): Genome-wide genetic dissection of supernumerary spikelet and related traits in common wheat. *Plant Genome* DOI:10.3835/plantgenome2014.03.0013.
- Eilam, T., Anikster, Y., Millet, E., Manisterski, J., Sagi-Assif, O., Feldman, M. (2007): Genome size and genome evolution in diploid Triticeae species. *Genome* 50 (11): 1029–1037.
- Esau, K. (1977): *Anatomy of Seed Plants*. (New York: John Wiley & Sons).
- Escobar, J. S., Scornavacca, C., Cenci, A., Guilhaumon, C., Santoni, S., Douzery, E. J., Ranwez, V., Glémin, S., David, J. (2011): Multigenic phylogeny and analysis of tree incongruences in Triticeae (Poaceae). *BMC Evolutionary Biology*: 11:181.
- Evers, A. D. (1970): Development of the endosperm of wheat. *Annals of Botany (London)* 34: 547–555
- Eversole, K., Feuillet, C., Mayer, K. F., Rogers, J. (2014): Slicing the wheat genome. *Science* 345 (6194): 285–287.
- Feldman, M., Lupton, F. G. H., Miller, T. E. (1995): Wheat. In *Evolution of Crop Plants*, 2nd Smartt, J., Simmonds, N. W. editors (New York: Longman Scientific and Technical): 184–192.
- Feldman, M., Levy, A. A., Fahima, T., Korol, A. (2012): Genomic asymmetry in allopolyploid plants: wheat as a model. *Journal of Experimental Botany* 63 (2): 5045–5059.
- Ferrier, T., Matus, J. T., Jin, J., Riechmann, J. L. (2011): Arabidopsis paves the way: genomic and network analyses in crops. *Current Opinion in Biotechnology* 22 (2), 260–270.
- Feuillet, C. a Keller, B. (2002): Comparative genomics in the grass family: molecular characterization of grass genome structure and evolution. *Annals of Botany* 89 (1): 3–10.
- Feuillet, C., Langridge, P., Waugh, R. (2007): Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in Genetics* 24 (1):24–32.
- Fischer, R. A. (2011): Wheat physiology: a review of recent developments. *Crop and Pasture Science* 62 (2):95–114.

- Flaksberger, C. (1935). Cereals: Wheat. In: *Flora of Cultivated Plants I* (Wulf E. V., Ed.). Cos. Izd. Kolkh. Sovkh., Moscow and Leningrad (St. Petersburg). (In Russian) 263 pp.
- Fujisawa, Y., Kato, T., Ohki, S., Ishikawa, A., Kitano, H., Sasaki, T., Asahi, T., and Iwasaki, Y. (1999): Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 7575–7580.
- Gale, M. D. and Devos, K. M. (1998): Comparative genetics in the grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95 (5): 1971–1974.
- Gale, M. D., Youssefian, S., Russell, G. (1985): Dwarfing genes in wheat. *Progress in Plant Breeding* 1:35.
- Gegas, V. C., Nazari, A., Griffiths, S., Simmonds, J., Fish, L., Orford, S., Sayers, L., Doonan, J. H., Snape, J. W. (2010): A genetic framework for grain size and shape variation in wheat. *The Plant Cell* 22, 1046–1056.
- Gowayed Salah. Egyptian wheat. Witzenhausen, 2009. Disertační práce. Submitted for the degree of Doctor of Agricultural Sciences of the Institute of Crop Sciences of the University Kassel.
- Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T. N., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., Colas, I., Moore, G. (2006): Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* 439 (7077): 749–752.
- Groos, C., Robert, N., Bervas, E., Charmet, G. (2003): Genetic analysis of grain protein-content, grain yield and thousand-kernel weight in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 106 (6): 1032–1040.
- Hedden, P. (2003): The genes of the green revolution. *Trends in Genetics* 19 (1): 5–9.
- Heun, M., Ralf Schäfer-Pregl, R. S., Klawan, D., Castagna, R., Accerbi, M., Borghi, B., Salamini F. (1997): Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* 278, 1312–1314.
- Hong, Z., Ueguchi-Tanaka, M., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2005): The rice brassinosteroid-deficient dwarf2 mutant, defective in the rice homolog of Arabidopsis DIMINUTO/DWARF1, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone. *Plant Cell* 17: 2243–2254.
- Chen, S., Gao, R., Wang, H., Wen, M., Xiao, J., Bian, N., Zhang, R., Hu, W., Cheng, S., Bie, T., Wang, X (2015): Characterization of a novel reduced height gene (*Rht23*) regulating panicle morphology and plant architecture in bread wheat. *Euphytica*, 203 (3): 583–594.
- Choulet, F., Wicker, T., Rustenholz, C., Paux, E., Salse, J., Leroy, P., Schlub, S., Le Paslier, M. C., Magdelenat, G., Gonthier, C., Couloux, A., Budak, H., Breen, J., Pumphrey, M., Liu, S., Kong, X., Jia, J., Gut, M., Brunel, D., Anderson, J. A., Gill, B. S., Appels, R., Keller, B., Feuillet, C. (2010): Megabase level sequencing reveals contrasted

- organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces. *Plant Cell* 22 (6): 1686–1701.
- Chantret, N., Salse, J., Sabot, F., Rahman, S., Bellec, A., Laubin, B., Dubois, I., Dossat, C., Sourdille, P., Joudrier, P., Gautier, M. F., Cattolico, L., Beckert, M., Aubourg, S., Weissenbach, J., Caboche, M., Bernard, M., Leroy, P., Chalhou, B. (2005): Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell* 17 (4):1033–45.
- Choulet, F., Alberti, A., Theil, S., Glover, N., Barbe, V., Daron, J., Pingault, L., Sourdille, P., Couloux, A., Paux, E., Leroy, P., Mangenot, S., Guilhot, N., Le Gouis, J., Balfourier, F., Alaux, M., Jamilloux, V., Poulain, J., Durand, C., Bellec, A., Gaspin, C., Safar, J., Doležal, J., Rogers, J., Vandepoele, K., Aury, J. M., Mayer, K., Berges, H., Quesneville, H., Wincker, P., Feuillet, C. (2014): Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science* 345 (6194): 1249721.
- Ikeda, K., Nagasawa, N., Itoh, M., Kyojuka, J., Nagato, Y. (2007): Analyses of ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1 (APO1) gene regulating the spikelet number in rice. *Plant Cell Physiology* 48: S52–S52.
- Irimia, M. a Roy, S. W. (2008): Evolutionary convergence on highly-conserved 3' intron structures in intron-poor eukaryotes and insights into the ancestral eukaryotic genome. *PLoS Genetics* 4: 1–14.
- IWGSC (2014): A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* 345 (6194): 1251788.
- Izawa, Y., Takayanagi, Y., Inaba, N., Abe, Y., Minami, M., Fujisawa, Y., Kato, H., Ohki, S., Kitano, H., and Iwasaki, Y. (2010): Function and expression pattern of the α subunit of the heterotrimeric G protein in rice. *Plant Cell Physiology* 51: 271–281.
- Jantasuriyarat, C., Vales, M. I., Watson, C. J. W., Ruera-Lizaratu, O. (2004): Identification and mapping of genetic loci affecting the free-threshing habit and spike compactness in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 108: 261 – 27.
- Keller, B., a Feuillet, C. (2000): Colinearity and gene density in grass genomes. *Trends Plant Science* 5 (6): 246–51.
- Kitagawa, K., Kurinami, S., Oki, K., Abe, Y., Ando, T., Kono, I., Yano, M., Kitano, H., and Iwasaki, Y. (2010): A novel kinesin 13 protein regulating rice seed length. *Plant Cell Physiology* 51: 1315–1329.
- Klindworth, D. L., Klindworth, M. M, N. D. Williams, N. D. (1997): Telosomic mapping of four genetic markers in durum wheat. *The Journal of Heredity* 88, 229–232.
- Klindworth, D. L., Williams, N. D., Joppa, L. R. (1990): Inheritance of supernumerary spikelets in a tetraploid wheat cross. *Genome* 33: 509–514.
- Komatsu, K., Maekawa, M., Ujiie, S., Satake, Y., Furutani, I., Okamoto, H., Shimamoto, K., Kyojuka, J. (2003): LAX and SPA: major regulators of shoot branching in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100 (20): 11765–11770.

- Komatsu, M., Chujo, A., Nagato, Y., Shimamoto, K., Kyojuka, J. (2003) FRIZZY PANICLE is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets. *Development* 130 (16):3841–3850.
- Lengyel, P. a Söll, D. (1969): Mechanism of Protein Biosynthesis. *Bacteriological Reviews* 33 (2): 264–301.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S. (2000): The cradle of agriculture. *Science* 288 (5471): 1602–1603.
- Li, F., Liu, W., Tang, J., Tong, H., Hu, B., Li, Ch., Fang, J., Chen, M., Chu, Ch. (2010): Rice DENSE AND ERECT PANICLE 2 is essential for determining panicle outgrowth and elongation. *Cell Research* 20: 8638–849.
- Li, X., Qian, Q., Fu, Z., Wang, Y., Xiong, G., Zeng, D., Wang, X., Liu, X., Teng, S., Hiroshi, F., Yuan, M., Luo, D., Han, B., Li, J. (2003): Control of tillering in rice. *Nature* 422 (6932): 618–21.
- Lobell, D. B., Schlenker, W., Costa-Roberts, J. (2011): Climate trends and global crop production since 1980. *Science* 333 (6042): 616–620.
- Luo, M. C., Yang, Z. L., You, F. M., Kawahara, T., Waines, J. G., Dvorak J. (2007): The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theoretical and Applied Genetics* 14 (6): 947–59.
- Malcomber, S. T., Preston, J. C., Reinheimer, R. (2006): Developmental gene evolution and the origin of grass inflorescence diversity. *Advances in Botanical Research* 44: 423–479.
- Marcussen, T., Sandve, S. R., Heier, L., Spannagl, M., Pfeifer, M.; International Wheat Genome Sequencing Consortium, Jakobsen, K. S., Wulff, B. B., Steuernagel, B., Mayer, K. F., Olsen, O. A. (2014): Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread beat. *Science*, 345 (6194): 1250092.
- Marino, C. L, Nelson, J. C., Lu, Y. H., Sorrels, M. E., Leroy, P., Tuleen, N. A., Lopes, C. R., Hart, G. E. (1996): Molecular genetic maps of the group 6 chromosomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). *Genome* 39: 359–366.
- Martinez-Perez, E., Shaw, P., Moore, G. (2001): The Ph1 locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere association. *Nature* 411: 204–207.
- Massa, A. N., Wanjugi, H., Deal, K. R., O'Brien, K., You, F. M., Maiti, R., Chan, A. P., Gu, Y. Q., Luo, M. C., Anderson, O. D., Rabinowicz, P. D., Dvorak, J., Devos, K. M. (2011): Gene Space Dynamics During the Evolution of *Aegilops tauschii*, *Brachypodium distachyon*, *Oryza sativa*, and *Sorghum bicolor* Genomes. *Molecular Biology and Evolution* 28 (9): 2537–2547.
- McCouch, S. R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K. B., Clare, K., Walton, M., Fu., B., Maghirang, R., Li, Z., Xing, Y. (2002): Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 31: 199–207.

- McDowell, D. G., Burns, N. A., Parkes, H. C. (1998): Localized sequence regions possessing high melting temperature prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Research* 26 :3340–3347.
- Messmer, M. M., Keller, M., Zanetti, S., Keller, B. (1999): Genetic linkage map of a wheat × spelt cross. *Theoretical and Applied Genetics* 98, 1163–1170.
- Moore G., Devos, K. M., Wang, Z., Gale M. D. (1995): Cereal genome evolution. Grasses, line up and form a circle. *Current biology* 5 (7): 737–739.
- Musso, M., Bocciardi, R., Parodi, S., Ravazzolo, R., Ceccherini, I. (2006): Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *The Journal of Molecular Diagnostics* 8 :544–550.
- Nagato, Y. a Yoshimura, A. (1998): Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *Rice Genetics. Newsletter* 15: 13–74.
- Nakamura, A., Fujioka, S., Sunohara, H., Kamiya, N., Hong, Z., Inukai, Y., Miura, K., Takatsuto, S., Yoshida, S., Ueguchi-Tanaka, M. (2006): The role of OsBRI1 and its homologous genes, OsBRL1 and OsBRL3, in rice. *Plant Physiology* 140: 580–590.
- Oki, K., Fujisawa, Y., Kato, H., and Iwasaki, Y. (2005): Study of the constitutive active form of the α subunit of rice heterotrimeric G proteins. *Plant Cell Physiology* 46: 381–386.
- Osoegawa, K., Woon, P. Y., Zhao, B., Frengen, E., Tateno, M., Catanese, J. J., de Jong, P. J. (1998) An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. *Genomics* 52, 1–8.
- Otto, T. D., Vasconcellos, E. A., Gomes, L. H., Moreira, A. S., Degrave, W. M., Mendonça-Lima, L., Alves-Ferreira, M. (2008): ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genetics and Molecular Research* 7 (3): 861–71.
- Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J. W., Gale, M. D., Harberd, N.P. (1999): 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400 (6741): 256-561.
- Peng, Z. S., Yen, C., Yang, J. L (1998): Chromosomal location of genes for supernumerary spikelet in bread wheat. *Euphytica* 103: 109–114.
- Pennell, A. L. a Halloran, G.M. (1983): Inheritance of supernumerary spikelets in wheat. *Euphytica* 32: 767–776
- Petersen, G., Seberg, O., Yde M., Berthelsen, K. (2006): Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (Triticum aestivum). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39 (1): 70–82.

- Pfeifer, M., Kugler, K. G., Sandve, S. R., Zhan, B., Rudi, H., Hvidsten, T. R.; International Wheat Genome Sequencing Consortium, Mayer, K. F., Olsen, O. A. (2014): Genome interplay in the grain transcriptome of hexaploid bread wheat. *Science* 345 (6194): 1250091.
- Piao, R., Jiang, W., Ham, T. H., Choi, M. S., Qiao, Y., Chu, S. H., Park, J. H., Woo, M. O., Jin, Z., An, G., Lee, J., Koh, H. J. (2009): Map-based cloning of the ERECT PANICLE 3 gene in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 119 (8): 1497–1506.
- Poursarebani, N., Seidensticker, T., Koppolu, R., Trautewig, C., Gawronski, P., Bini, F., Govind, G., Rutten, T., Sakuma, S., Tagiri, A., Wolde, G. M., Youssef, H. M., Battal, A., Ciannamela, S., Fusca, T., Nussbaumer, T., Pozzi, C., Börner, A., Lundqvist, U., Komatsuda, T., Salvi, S., Tuberosa, R., Uauy, C., Sreenivasulu, N., Rossini, L., Schnurbusch, T. (2015): The Genetic Basis of Composite Spike Form in Barley and 'Miracle-Wheat'. *Genetics* 201 (1): 155–165.
- Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P., Ganal, M. W. (1998): A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007–2023.
- Reynolds, M., Foulkes, M. J., Slafer, G. A., Berry, P., Parry, M. A., Snape, J. W., Angus, W. J. (2009): Raising yield potential in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60 (7), 1899–1918.
- Sakamoto, T. and Matsuoka, M. (2008): Identifying and exploiting grain yield genes in rice. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 209–214.
- Salamini, F., Ozkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R., Martin, W. (2002): Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics* 3: 429–441.
- Salse, J., Bolot, S., Throude, M., Jouffe, V., Piegue, B., Quraishi, U. M., Calcagno, T., Cooke, R., Delseny, M., Feuillet, C. (2008): Identification and characterization of shared duplications between rice and wheat provide new insight into grass genome evolution. *Plant cell* 20 (1): 11–24.
- Schaefer, C. and Rost, B. (2012): Predict impact of single amino acid change upon protein structure. *BMC Genomics* 13 (4): S4.
- Sharman, B. C. (1944): Branched heads in wheat and wheat hybrids. *Nature* 153: 497–498.
- Shitsukawa, N., Kinjo, H., Takumi, S., Murai, K. (2009): Heterochronic development of the floret meristem determines grain number per spikelet in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. *Annals of Botany* 104 (2): 243–251.
- Song, X. J. and Ashikari, M. (2008): Toward an optimum return from crop plants. *Rice* 1: 135–143.
- Sorrells, M. E., La Rota, M., Bermudez-Kandianis, C. E., Greene, R. A., Kantety, R., Munkvold, J. D., Miftahudin, Mahmoud, A., Ma, X., Gustafson, P. J., Qi, L. L., Echalié, B., Gill, B. S., Matthews, D. E., Lazo, G. R., Chao, S., Anderson, O. D.,

- Edwards, H., Linkiewicz, A. M., Dubcovsky, J., Akhunov, E. D., Dvorak, J., Zhang, D., Nguyen, H. T., Peng, J., Lapitan, N. L., Gonzalez-Hernandez, J. L., Anderson, J. A., Hossain, K., Kalavacharla, V., Kianian, S. F., Choi, D. W., Close, T. J., Dilbirligi, M., Gill, K. S., Steber, C., Walker-Simmons, M. K., McGuire, P. E., Qualset, C.O. (2003): Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome research* 13 (8): 1818–1827.
- Sreenivasulu, N. a Schnurbusch, T. (2012): A genetic playground for enhancing grain number in cereals. *Trends in Plant Science*, 17 (2): 91–101.
- Suzaki, T., Sato, M., Ashikari, M., Miyoshi, M., Nagato, Y., Hirano, H. Y. (2004): The gene FLORAL ORGAN NUMBER1 regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to Arabidopsis CLAVATA1. *Development* 131 (22):5649-5657
- Šafář, J., Bartoš, J., Janda, J., Bellec, A., Kubaláková, M., Valárik, M., Pateyron, S., Weiserová, J., Tušková, R., Číhalíková, J., Vrána, J., Šimková, H., Faivre-Rampant, P., Sourdille, P., Caboche, M., Bernard, M., Doležel, J., Chalhou, B. (2004): Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat. *The Plant Journal* 39 (6): 960-968.
- Tanabe, S., Ashikari, M., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Yano, M., Yoshimura, A., Kitano, H., Mastuoka, M., Fujisawa, Y. (2005): A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, dwarf11, with reduced seed length. *Plant Cell* 17: 776–790.
- Tanabe, S., Mieda, K., Ashikari, M., Kitano, H., Iwasaki, Y. (2007): Mapping of small and round seed 1 gene in rice. *Rice Genetics Newsletter* 23: 44–47.
- Tanno, K. a Takeda, K. (2004): On the origin of six-rowed barley with brittle rachis, agriocrithon (*Hordeum vulgare* ssp. vulgare f. agriocrithon [Aberg] Bowd.), based on a DNA marker closely linked to the vrs1 (six-row gene) locus. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 145–150.
- Topal, M. D. a Fresco, J. R. (1976): Complementary base pairing and the origin of substitution mutations. *Nature* 263: 285–289.
- Wang, Y. a Li, J. (2008): Molecular basis of plant architecture. *Annual Reviews Plant Biology* 59: 253–279.
- Wicker, T., Krattinger, S. G., Lagudah, E. S., Komatsuda, T., Pourkheirandish, M., Matsumoto, T., Cloutier, S., Reiser, L., Kanamori, H., Sato, K., Perovic, D., Stein, N., Keller, B. (2009): Analysis of intraspecies diversity in wheat and barley genomes identifies breakpoints of ancient haplotypes and provides insight into the structure of diploid and hexaploid triticeae gene pools. *Plant Physiology* 149 (1): 258–270.
- Wicker, T., Mayer, K. F., Gundlach, H., Martis, M., Steuernagel, B., Scholz, U., Šimková, H., Kubaláková, M., Choulet, F., Taudien, S., Platzer, M., Feuillet, C., Fahima, T., Budak, H., Doležel, J., Keller, B., Stein, N. (2011): Frequent gene movement and pseudogene evolution is common to the large and complex genomes of wheat, barley, and their

- relatives. *The Plant Cell* 23 (5): 1706–1718.
- Wolfe, K. H., Gouy, M., Yang, Y. W., Sharp, P. M., Li, W. H. (1989): Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86 (16): 6201–6205.
- Worland, A. J., Borner, A., Korzun, V., Li, W. M., Petrovic, S., Sayers, E.J. (1998): The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats. *Euphytica* 100: 385 – 394.
- Wu, C., Trieu, A., Radhakrishnan, P., Kwok, S. F., Harris, S., Zhang, K., Wang, J., Wan, J., Zhai, H., Takatsuto, S. (2008): Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *Plant Cell* 20: 2130–2145.
- Xie, Q., Mayes, S., Sparkes, D. L. (2015): Carpel size, grain filling, and morphology determine individual grain weight in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 66 (21): 6715–6730.
- Yamamoto, Y., Matsui, M., Ang, L-H., Deng, X-W. (1998): Role of a COP1 interactive protein in mediating light regulated gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 1083–1094.
- Yamamoto, C., Ihara, Y., Wu, X., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Ashikari, M., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2000): Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *Plant Cell* 12: 1591–1605.
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., Dubcovsky, J. (2003): Positional cloning of wheat vernalization gene VRN-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 6263 – 6268.
- Yan, C. J., Zhou, J. H., Yan, S., Chen, F., Yeboah, M., Tang, S. Z., Liang, G. H., Gu, M. H. (2007): Identification and characterization of a major QTL responsible for erect panicle trait in japonica rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 115 (8): 1093–1100.
- Zhang, J. (2003): Evolution by gene duplication: An update. *Trends in Ecology and Evolution* 18 (16): 292–298.
- Zhang, X., Yang, S., Zhou, Y., He, Z., Xia, X. (2006): Distribution of the Rht-B1b, Rht-D1b and Rht8 reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers. *Euphytica* 152:109–116.
- Zohary, D., Hopf, M. (2000): *Domestication of plants in the old world*. Vydání 3. Oxford University Press, Oxford.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

APO1	<i>aberrant panicle organization 1</i>
APS	peroxodisulfát amonný (Ammonium Persulfate)
BAC	umělý bakteriální chromozóm (Bacterial Artificial Chromosome)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BH	<i>branched head</i>
b-HLH	basic helix loop helix
bp	páry bází (base pairs)
BR	brassinosteroidy
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CIP7	COP1-interagující protein 7
CLV1	<i>clavata 1</i>
COM2	<i>compositum 2</i>
DEP2	<i>dense and erect panicle 1 g</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EP	<i>erect panicle</i>
EST	místo s expresní adresou (Expressed Sequence Tag)
FON1	<i>floral organ number 1</i>
F	primer forward primer
FZP/BFL1	<i>frizzy panicle/branched floretless 1</i>
GA	kyselina giberelová
Gb	gigabáze (giga base)
HS	horizontální klásky
IWGSC	The International Wheat Genome Sequencing Consortium
LOD	logaritmus pravděpodobnosti (Logarithm Of Odds)
MO1	<i>monstrosum ear 1</i>
MOC1	<i>monoculm 1</i>
MRS	<i>multi-rowed spike</i>
MRS	víceřadý klas
n	haploidní počet chromozomů
Os-CKX2	<i>cytokinin oxydase/dehydrogenase</i>

PAGE	polyakrylamidová elektroforéza (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PEBP	phosphatidylethalamín
<i>PH</i>	<i>pairing homoeologous</i>
<i>PPD</i>	<i>photoperiod</i>
QTL	lokusy ovlivňující kvantitativní znaky (<i>quantitative trait loci</i>)
R	primer forward primer
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
<i>RHT</i>	<i>reduced height 1</i>
RIL	Rekombinantní inbrední linie (Recombinant Inbred Lines)
RNA	ribonukleová kyselina
RS	rozvětvené klásky
RT	Reverse Transcription
<i>SD</i>	<i>semi-dwarf</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
<i>SRS1</i>	<i>small and round seed 1</i>
SS	nadpočetné klásky (supernumerary spikelets)
STS	místo se sekvenční adresou (Sequence Tagged Site)
TE	pufr s Tris a EDTA
TEMED	tetrametyletylendiamin
TBE	pufr s Tris, kyselinou boritou a EDTA
TKW	váha tisíce zrn (<i>thousand-kernel weight</i>)
VRN	<i>vernalization</i>
x	základní chromozomové číslo