



VÚRV

Výzkumný ústav
rostlinné výroby

METODIKA PRO PRAXI

Určování genů ovlivňujících jarovizační nárok a dobu kvetení u *Triticum aestivum* L.

Ing. Martina Trávníčková, Mgr. Taťána Sumíková, Ph.D., Ing. Lenka Drábková



Martina Trávníčková, Taťána Sumíková, Lenka Drábková

Určování genů ovlivňujících jarovizační nárok a dobu kvetení u *Triticum aestivum* L.

METODIKA PRO PRAXI



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

2019

Určování genů ovlivňujících jarovizační nárok a dobu kvetení u *Triticum aestivum* L.

Pro produkci pšenice je velmi důležité správné načasování výsevu, pěstování a sklizně. Toto načasování lze cíleně ovlivňovat, neboť se různé odrůdy pšenice od sebe liší kombinací genů tří skupin - *Vrn*, *Ppd* a *Eps*. Růstový typ každé odrůdy je výslednicí účinků těchto tří systémů genů. Tato metodika je zaměřena na rozlišení odrůd ozimých, jarních a přesívkových. Detekce nejvýznamnějších genů *Vrn* a *Ppd* pomocí této metodiky je velmi důležitým zdrojem pro šlechtitele a zemědělce ke zpřesnění informací o dané odrůdě pšenice. Geny *Eps* jsou inherentní genetickou složkou ranosti nezávislou na vnějších podnětech a proto nejsou v této metodice zahrnuty. Zároveň tato metodika navrhuje zjednodušení a zrychlení těchto analýz.

Klíčová slova: *Vrn*, *Ppd*, fotoperioda, jarovizace, ozim, jařina

Determination of genes affecting the vernalization demand and flowering time in *Triticum aestivum* L.

The correct timing of sowing, planting and harvesting is very important for wheat production. This timing can be specifically influenced as different wheat varieties differ from each other by the combination of genes of three groups - *Vrn*, *Ppd* and *Eps* genes. The growth type of each variety is the result of the effects of these three gene systems. This methodology is focused on differentiation of winter, spring and alternative varieties. Detection of the most significant *Vrn* and *Ppd* genes using this methodology is a very important resource for breeders and farmers to refine information on a given wheat variety. *Eps* genes are an inherent genetic component of earliness independent of external influences and are therefore not included in this methodology. At the same time, this methodology suggests simplifying and speeding up these analyses.

Key words: *Vrn*, *Ppd*, photoperiod, vernalization, winter, spring

OBSAH

I. CÍL	5
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	5
1. ÚVOD	5
1.1. Geny <i>Vrn</i>	6
1.2. Geny <i>Ppd</i>	7
1.3. Geny <i>Eps</i>	7
2. PODSTATA METODY	8
3. POTŘEBNÉ TECH., MATERIÁLNÍ VYBAVENÍ A CHEMIKÁLIE	9
3.1. Přístrojové zabezpečení	9
3.2. Materiál	10
3.3. Použité chemikálie	11
4. METODICKÉ POSTUPY	12
4.1. Příprava roztoků	12
4.2. Odběr a příprava vzorků	13
4.3. Izolace DNA metodou CTAB	15
4.4. Metoda PCR	15
4.5. Příprava 1,5% agarózového gelu	16
4.6. Elektroforéza a vizualizace produktů	17
4.7. Určování genů <i>Ppd</i>	18
4.8. Určování genů <i>Vrn</i>	19
III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	27
IV. EKONOMICKÉ ASPEKTY	27
V. PŘEDNOSTI METODY	28
VI. ÚSKALÍ METODY, NEVÝHODY A OMEZENÍ	28
VII. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY PRO PRAXI	28
VIII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	29
IX. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZEJÍ METODICE	31

I. CÍL

Cílem metodiky je stanovení různých genů ovlivňujících jarovizační nárok a dobu kvetení u pšenice (*Triticum aestivum* L.). Metodika uvádí postupy pro detekci nejběžnějších a nejdůležitějších alel, ovlivňujících dobu kvetení a jarovizační nárok. Tato metodika zároveň navrhuje detekci různých alel *Vrn-B1* pomocí mnohonásobného PCR testu v rámci jedné analýzy.

Metodika může sloužit vědeckým pracovníkům ke studijním účelům, pracovníkům šlechtitelských stanic a také jako praktický návod na odběr vzorků a provedení izolace DNA pro větší počet vzorků.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. ÚVOD

Pšenice je pěstovaná od nejvyšších nadmořských výšek poblíž rovníku do nejbližších severních či jižních zeměpisných šířek zeměkoule, což je dané velkou vnitrodruhovou genetickou variabilitou (Snape, Pánková, 2007). Pro produkci pšenice je jednou z podstatných otázek správné načasování výsevu, pěstování a sklizně. Toto načasování se u odrůd pšenice liší a lze ho cíleně modifikovat, neboť záleží na přítomnosti a souhře genů skupin - *Vrn*, *Ppd* a *Eps* (Pánková et al., 2011).

Pšenice existuje v ozimé, jarní a v tzv. přesívkové formě. Její růstový typ je určen geneticky a je řízený procesem jarovizace (vernalizace), který vznikl druhotně v průběhu evoluce u původně jarní pšenice jako adaptační pojistka pro přežití silných mrazů. Za jarovizační požadavek ozimé pšenice jsou zodpovědné geny *Vrn*. Rostliny před zimou vytvoří několik odnoží, nicméně během zimy zůstávají ve vegetativní fázi. Jarovizace tudíž chrání rostlinu před vykvetením v nepříznivých podmínkách. Na jaře rostliny pokračují ve svém vývoji a přecházejí do tzv. generativní fáze. Na rozdíl od jarních odrůd, které nejsou odolné vůči mrazu, jejich přechod z vegetativní do generativní fáze je zajištěn fotoperiodickou reakcí, tj. dlouhým dnem. Přesívky jsou zvláštní formy odrůd kulturních rostlin, které při výsevu na podzim dobře přezimují a pokud je kvůli nepříznivému počasí znemožněn podzimní výsev, lze je vysít po celou zimu až do časného jara. Při jarním výsevu vytvoří generativní orgány a poskytují podobný hospodářský výnos jako jarní odrůdy.

1.1. Geny *Vrn*

Genetický rozdíl růstového typu pšenice je určován 3 hlavními geny označovanými jako *VRN1*, *VRN2* a *VRN3*. Jarovizační požadavek pšenice je z hlavní části řízen geny velkého účinku *Vrn-A1*, *Vrn-B1* a *Vrn-D1* (označované společně jako geny *VRN1*), jež byly lokalizovány na dlouhých ramenech chromosomů 5A, 5B a 5D (Leonova et al., 2003; Sarma et al., 1998; Shindo et al., 2003). Geny *Vrn* jsou lokalizované nejen na chromosomech 5. homoeologické skupiny pšenice, ale i a na chromosomu 7B (*VRN3*) (Danyluk et al., 2003; Fu et al., 2005).

Původní alely genů *Vrn* jsou recesivní, jejich mutované formy (dominantní alely) signalizují ztrátu tohoto nároku u jarních odrůd. Tento rozdíl je dán delecí určité části sekvence v oblasti prvního intronu, které se u jednotlivých alel liší (Fu et al., 2005). Recesivní sestava všech tří lokusů *VRN1* určuje ozimý typ pšenice. Jarní a přesívkový růstový typ se projevuje, je-li v genotypu přítomna alespoň jedna dominantní alela *VRN1*.

Zatímco dominantní alela lokusu *Vrn-A1* je epistatická a inhibuje potřebu jarovizace zcela, *Vrn-B1* a *Vrn-D1* inhibují potřebu jarovizace jen částečně. Kromě známých dominantních a recesivních alel *Vrn-A1*, *Vrn-B1* a *Vrn-D1* byly nalezeny další alely. Například u genu *Vrn-A1* jsou dnes známy další dominantní alely označované jako *Vrn-A1a*, *Vrn-A1b*, *Vrn-A1c*, *Vrn-A1d*, *Vrn-A1e*, *Vrn-A1f*, *Vrn-A1g* a *Vrn-A1h*. U genu *Vrn-B1* byly zjištěny alely *Vrn-B1a*, *Vrn-B1b* nebo *Vrn-B1c* (Milec et al., 2011; Santra et al., 2009; Shcherban et al., 2011). Alela *Vrn-B1c* má nejen pozměněnou sekvenci v prvním intronu, ale část sekvence prvního intronu je duplikována a přesunuta na místo delece. Přestože se jedná o změnu sekvence v nekódující oblasti, bylo zjištěno, že tato alela může ovlivňovat dobu kvetení. Ve srovnání s alelou *Vrn-B1a*, linie nesoucí alelu *Vrn-B1c* metají až o 14 dnů dříve.

Zatímco dominantní alela *VRN1* určuje jarní formu, dominantní alela genu *VRN2* determinuje formu ozimou. Tento gen slouží jako represor kvetení u rostlin, které nebyly dostatečně jarovizovány (Yan et al., 2004). Bylo zjištěno, že exprese genu *VRN2* je ovlivněna délkou dne a nízkými teplotami. Za krátkého dne dochází k jeho potlačení, a naopak za dlouhého dne je indukován (Dubcovky et al., 2006). Pokud jsou rostliny jarovizovány za dlouhého dne, je exprese genu *VRN2* potlačena, zatímco dochází k expresi genu *VRN1* (Yan et al., 2004). Podle Trevaskise et al. (2006) je naopak exprese genu *VRN2* bržděna expresí genu *VRN1*. Vzhledem k tomu, že v přirozených podmínkách probíhá jarovizace za krátkého dne, lze předpokládat, že během zimy není vliv genu *VRN2* na jarovizaci podstatný.

Gen lokalizovaný na krátkém rameni chromozomu 7BS, byl dříve označován jako *VRN-B4*, nyní nese označení *VRN3* (nebo *VRN-B3*). Tento gen se exprimuje

za dlouhého dne a dominantní alela napomáhá v expresi *VRN1*. Rostliny, které nebyly jarovizovány, vykazovaly vysokou expresi genu *VRN2*, ale nízkou expresi genů *VRN1* a *VRN3* (Yan et al., 2006).

1.2. Geny *Ppd*

Obdobným adaptačním mechanismem byl vytvořen zdroj variability i v požadavku délky světelné části dne, tzv. fotoperiody. Rostliny se obecně dělí podle fotoperiodické reakce na 3 skupiny: dlouhodobní (indukce kvetení je způsobena dlouhým dnem), krátkodobní (kvetení nastává po krátkém dni) a neutrální či intermediární (k indukci kvetení dochází na základě jiného podnětu, než je délka dne). Pšenice byla dříve klasifikována jako rostlina dlouhodobní (Vincence-Prue, 1975). V současné době jednotlivé genotypy pěstovaných odrůd vykazují rozdílnou fotoperiodickou citlivost a umožňují tak širokou adaptabilitu pšenice po celém světě. Za dlouhý den se považuje fotoperioda delší než 14 hodin. Tato délka dne je stanovena rostlinou pomocí cirkadiánních rytmů a informací z fotoreceptorů. Zatímco jarovizace je závislá na metabolických dějích, u fotoperiody musejí mít rostliny vytvořené listy, aby byly schopné určit délku dne.

Geneticky je fotoperiodická citlivost určena třemi geny, označenými *Ppd-D1*, *Ppd-B1*, *Ppd-A1* a lokalizovanými na chromozómech 2D, 2B a 2A (Welsh et al., 1973; Scarth & Law, 1983). Necitlivost je dominantní nad citlivostí (Pugsley, 1966), přičemž *Ppd-D1* působí nejvýrazněji a je k ostatním alelám epistatický. *Ppd-B1* má větší účinek než *Ppd-A1*. Vnesení dominantní alely *Ppd-D1* a tedy ztrátu fotoperiodického požadavku do genomů moderních odrůd spolu s genem zakrslosti *Rht*, přineslo lidstvu v 60. letech minulého století tzv. Zelenou revoluci. Pěstování pšenice se mohlo okamžitě rozšířit do rozsáhlých subtropických oblastí zeměkoule, kde dříve nemohlo být dosaženo úrody a saturovalo potřeby výživy lidstva, které v té době zdvojnásobilo svoji populaci (Borlaug, 1983; Worland, 1996).

1.3. Geny *Eps*

Třetí skupinou genů ovlivňujících dobu kvetení a tím ranost pšenice, je skupina genů ranosti „earliness *per se*“ (*Eps*), neboli inherentní genetická složka ranosti nezávislá na vnějších podnětech. Jedná se převážně o tzv. QTL (quantitative traits loci), modifikující ranost daných genotypů určitým vnitřním doladěním procesů kvetení. Tyto geny, jsou rozšířeny po celém genomu pšenice a ovlivňují dobu do dosažení kvetení a tím i sklizně v řádu několika dnů (Cockram et al., 2007).

2. PODSTATA METODY

Izolaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je možné provést různými metodami. Lze využít komerční kity nebo metodu CTAB (cetyltrimetylamonium-bromid). Zároveň je možná modifikace i daného způsobu izolace v jednotlivých krocích. V této metodice je modifikovaná metoda CTAB vycházející z metody, kterou popsal Saghai-Marroof et al. (1984). Izolace DNA metodou CTAB, je založena na principu schopnosti CTAB vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný, ale při nízké koncentraci solí vytváří sraženinu. CTAB zároveň umožňuje, jak uvolnit DNA z membrán a proteinů, tak na základě rozdílné rozpustnosti CTAB a DNA získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

Homogenizaci vzorku lze uskutečnit různými způsoby. Nejběžnější je použití kombinace porcelánových třecích misek s tloučky a tekutého dusíku. Tato metoda se používá s menšími počty vzorků, neboť je časově více náročná. Další způsob homogenizace je použití homogenizátoru (např. TissueLyser, Qiagen). U této metody se využívá adaptér se zkumavkami a kuličky z karbidu wolframu. Homogenizátor provádí pohyb o dané frekvenci, kterým dochází k cyklickému pohybu kuličky uvnitř každé mikrozkumavky a následně k rozmělnění buněčných stěn a homogenizaci vzorku. Vzhledem k tomu, že kuličky v mikrozkumavkách umístěných blíž k ose třepání se pohybují pomaleji, adaptéry se v polovině vyjmají a otáčejí tak, aby bylo dosaženo maximální homogenizace vzorku. Nastavení frekvence a doby homogenizace je závislé na množství vzorku a kompaktnosti listů izolované rostliny. Tato metoda je ideální pro práci s větším množstvím vzorků, neboť 1 adaptér se zkumavkami může pojmout až 96 vzorků. Při analýze je vhodné použít sudý počet adaptérů (s přibližně stejným počtem vzorků), kvůli následnému vyvážení homogenizátoru.

Pomocí kombinace nejméně dvou specifických primerů je následně získaná DNA amplifikována tzv. polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Jedná se o jednoduchou metodu rychlého zmožení určité části DNA.

Dále jsou fragmenty nukleových kyselin rozděleny podle jejich velikosti pomocí elektroforézy, která využívá rozdílné pohyblivosti jednotlivých fragmentů, kdy delší fragmenty migrují pomaleji než kratší. Fragmenty DNA nesou díky záporně nabitým fosfátům záporný náboj, a proto se v elektrickém poli pohybují od katody směrem k anodě.

Tato metodika poskytuje popis analýz, jejichž výsledkem je detekce genů ovlivňujících jarovizační nárok a dobu kvetení, tedy zjištění, jaký genotyp nese daná odrůda - jařina, ozim nebo přesívka. Zároveň odpovídá na otázku, zda je odrůda citlivá nebo necitlivá k fotoperiodě.

3. POTŘEBNÉ TECHNICKÉ, MATERIÁLNÍ VYBAVENÍ A CHEMIKÁLIE

3.1. Přístrojové zabezpečení

Analytická váha

Centrifugy - velkokapacitní stolní centrifuga na 96-plastové destičky
- mikrocentrifuga na PCR destičky

Dávkovač na kuličky - 96 kuliček o \varnothing 3 mm (Obr. 1)

Fotodokumentační zařízení

Homogenizátor (TissueLyser)

Horizontální elektroforéza + potřebné příslušenství (hřebínek a forma na gel)

Chladnička (+4 °C)

Kývačka

Magnetická míchačka + elektromagnetické míchadlo

Mikropipety - ideálně 2 samostatné sady (1 na izolaci a 1 na PCR) - možno využít
multikanálové pipety + pipetovací vaničky

Mikrovlnná trouba



Obr. 1: Dávkovač na 96 kuliček o průměru kuličky 3 mm

Mraznička (-20 °C), případně hlubokomrazicí box (-80 °C)

pH metr

Termocykler

Termostat
Transluminátor
Vortex
Zdroj k elektroforézám

3.2. Materiál

Adaptér (rack) s 96 mikrozkušavkami (Obr. 2)
Erlenmayerova baňka 250ml
Kádinky (na přípravu roztoků)
Kuličky z karbidu wolframu (3 mm)
Odměrný válec
Ochranné jednorázové rukavice
PCR destičky (0,2 ml) vč. víček nebo stripy + víčka
Sterilní zkumavky - 1,5-2 ml
Špičky kompatibilní na mikropipety
Uzavíratelné nádoby na uložení roztoků



Obr. 2: Adaptér (rack) s 96 mikrozkušavkami (1,2 ml)

3.3. Použité chemikálie

6x Loading Dye Solution - nanášecí barva

10x PCR pufr obsahujícího $MgCl_2$

Agaróza

CTAB (= cetrimoniumbromid)

Délkový standard (= ladder) - pro vyizolovanou DNA i pro PCR produkty

dNTP

EDTA (= kyselina ethylendiamintetraoctová)

Etanol 70% roztok

Ethidium bromid

H_2O - redestilovaná voda (r H_2O) - také jako double distilled H_2O / voda pro PCR
- destilovaná voda (d H_2O)

HCl (= kyselina chlorovodíková)

Chloroform

Isopropanol (= isoamylalkohol)

Ledová CH_3COOH (= ledová kyselina octová)

NaCl (= chlorid sodný)

NaOH (= hydroxid sodný)

Syntetické oligonukleotidy - primery

Taq polymeráza

TRIS báze (= tris(hydroxymethyl)aminomethan)

Dále bude potřeba drcený led pro přípravu PCR reakcí.

4. METODICKÉ POSTUPY

4.1. Příprava roztoků

CTAB PUF_R (500 ml)

CTAB	(s)	7,5 g
TRIS	1M (pH 7,5)	75 ml
EDTA	0,5 M (pH 8,0)	15 ml
NaCl	5 M	105 ml
d H ₂ O		doplnit do 500 ml

0,5 M EDTA (200 ml)

EDTA	(s)	29,23 g
NaOH	10 M	dle potřeby (na úpravu pH 8,0)
r H ₂ O		doplnit do 200 ml

5 M NaCl (100 ml)

NaCl	(s)	29,22 g
r H ₂ O		100 ml

TAE PUF_R 50x (1000 ml)

TRIS	(s)	242 g
EDTA	0,5 M (pH 8,0)	100 ml
ledová CH ₃ COOH	100%	57,3 ml
d H ₂ O		doplnit do 1 000 ml

TAE PUF_R 1x (1 000 ml)

TAE PUF _R	50x	20 ml
d H ₂ O		doplnit do 1 000 ml

TE PUF_R (100 ml)

TRIS	1M (pH 8,0)	1 ml
EDTA	0,5 M (pH 8,0)	0,2 ml
r H ₂ O		doplnit do 100 ml

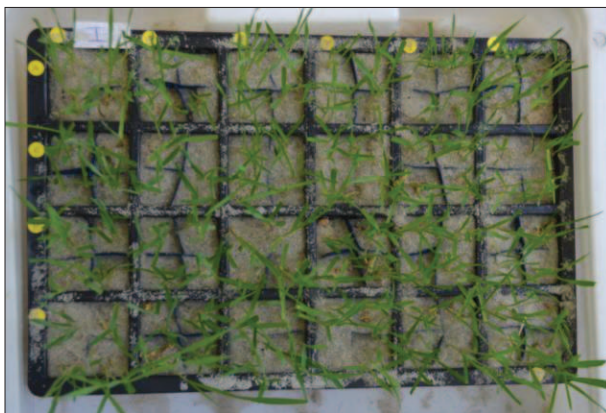
1M TRIS (200 ml)

TRIS (s) 24,2 g
r H₂O doplnit do 200 ml
podle potřeby upravit pomocí HCl na pH 7,5 nebo 8,0

Roztoky EDTA a TRIS se klávuji při 120 °C cca 20 minut a uloží při pokojové teplotě. Roztoky CTAB, TE se neklávuji!

4.2. Odběr a příprava vzorků

Pro izolaci DNA odrůd je vhodné mít vyseto alespoň 5 rostlin příslušné odrůdy (Obr. 3), aby byla zajištěna homogenita vzorku a odhalily se případné příměsi ve vzorku osiva.



Obr. 3: Příklad vysetí vzorků do písku - zde vyseto 8 x 12 vzorků, což odpovídá počtu vzorků u adaptéru se zkumavkami nebo klasické PCR destičky

Obilky je možné naklíčit na Petriho miskách (filtrační papír se popíše obyčejnou tužkou názvem vzorku, vloží se do Petriho misek, poskládají se na něj obilky a navlhčí se vodou) a umístí se na 3 dny do teploty 5 °C, aby bylo zajištěno synchronizované klíčení. Poté se teprve naklíčené obilky vysejí do květináčů se substrátem nebo pískem. Naklíčené obilky je lepší přesadit do květináčků z důvodu zabránění případných kontaminací listů houbami.

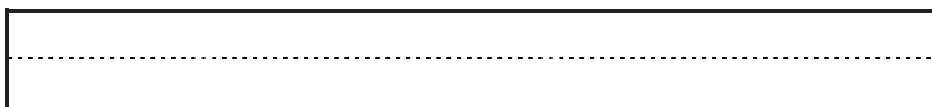
Isopropanol se převede do uzavíratelné nádoby v takovém množství, aby to bylo dostatečné na izolaci DNA (počet vzorků + 1 až 2 vzorky jako rezerva x 150 µl) a vloží se vychladit do mrazničky.

Dále je nutné před odběrem vzorků připravit adaptér, který se naplní mikrozkuvkami (1,2 ml), které jsou uspořádány do osmi řad a dvanácti sloupců (stejný formát jako PCR 96jamková destička a 96jamkový blok termocyklieru). Na dno každé zkušavky se umístí kulička z karbidu wolframu pomocí dávkovače na kuličky a přidá se 400 µl extrakčního pufru CTAB.

Odběr vzorků se provádí z listů mladých rostlin, především ze středové části. Jednotlivé listy se nastříhají na krátké, asi 1-2 centimetry dlouhé proužky (v celkovém množství cca 1 g) a vloží do mikrozkuvek umístěných v adaptéru. Každý vzorek se popíše do tabulky podobné jako je na Obr. 4 tak, aby byl v případě potřeby zpětně dohledatelný každý vzorek (stejnou tabulku lze využít jak na izolaci, tak při PCR). Je nutné také popsat jednotlivé adaptéry!

Kvůli následnému vyvážení homogenizátoru je nezbytné plánovat rozložení vzorků ve zkušavkách předem a mít tak připraveny dva adaptéry se zhruba stejným počtem vzorků.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12



Obr. 4: Vzor tabulky pro zápis vzorků umístěných v adaptéru s 96 mikrozkuvkami

4.3. Izolace DNA metodou CTAB

Adaptér s připravenými vzorky, kuličkou z karbidu wolframu a extrakčním pufrem se vloží do homogenizátoru, který provádí horizontální třepání. Pro účely izolace DNA z pšenice se homogenizace nastaví na nejvyšší frekvenci (30 Hz) na 2 minuty a 20 sekund. Po této době se adaptéry vyjmou, otočí a znovu vloží. Následuje opět homogenizace při frekvenci 30 Hz a 2:20 min.

Vzorky se inkubují po dobu 30 – 60 minut při teplotě 65 °C např. v termostatu. Během této inkubace je vhodné vzorky v adaptérech opatrně a lehce promíchat. Po inkubaci je třeba vzorky vychladit na laboratorní teplotu.

V digestoři se přidá do každé zkumavky 150 µl chloroformu (ideálně s použitím multikanálové pipety, což výrazně zkrátí čas celého postupu), lehce se protřepe a vloží na kývačku, kde se ponechá 10 minut při cca 3 Hz.

Po třepání jsou vzorky centrifugovány 5,5 minuty při maximálních otáčkách. Poté je odebrána vodná fáze (150 µl supernatantu) do nových a popsaných platíček. Ke směsi se přidá 150 µl vymraženého isopropanolu, lehce se promíchá a vloží na 5 minut do mrazničky.

Následně probíhá centrifugace 5 minut při maximálních otáčkách. Odpipetuje se supernatant (na dně každé zkumavky by měla zůstat malá peletka). Přidá se 200 µl 70% etanolu a jemně promíchá. Opět následuje centrifugace, ale tentokrát jen 1 minutu.

Odpipetuje se supernatant. Peletky DNA se nechají chvíli usušit (cca 5-15 minut), dokud nezmění barvu z bílé na průhlednou. Ale pozor, aby peletky nepřeschly!

Vysušená DNA je rozpuštěna ve 100 µl TE pufru a následuje inkubace 15 minut při 65 °C.

Izolovanou DNA lze krátkodobě uchovávat při +4 °C nebo dlouhodobě při -20 °C.

4.4. Metoda PCR

Před použitím DNA pro PCR je vhodné vzorky ověřit, zda je DNA kvalitní a stanovit její koncentraci. To je možné buď spektrofotometricky nebo na agarózovém gelu elektroforézou pomocí UV lampy. Optimální výchozí koncentrace je 100 ng/ µl.

Pro metodu PCR je v této metodice využito 96jamkových destiček nebo stripů po osmi zkumavkách o objemu 0,2 ml.

Složení a jednotlivé objemy reagensů pro každou z analýz jsou uvedeny v tabulkách v příslušné kapitole (kap. 4.7. a 4.8.). Zároveň je doplněna i informace o celkovém objemu reakční směsi v jedné reakci.

Reakční směs obsahuje templátovou DNA (koncentrace 100 ng/ μ l), dNTP (koncentrace 2 mM), 10x PCR pufru obsahujícího $MgCl_2$, primery (koncentrace 100 μ M) a Taq polymerázu (5U/ μ l).

Pro výpočet příslušného objemu PCR reakcí (mastermix) se počítá také s rezervou (o velikosti cca 1-2:10 reakcí kvůli ztrátám a nepřesnostem při pipetování).

Reagencie potřebné pro přípravu mastermixu (dNTP, 10x PCR pufr, primery) a DNA se nechají roztát, lehce promíchají a krátce centrifugují (stačí na minicentrifuze). Takto připravené chemikálie se vloží do nádoby s drceným ledem.

Připraví se uzavíratelná mikrozkušavka (velikost podle počtu PCR reakcí, většinou 1,5 - 2,0 ml velká), která se popíše. Do mikrozkušavky se napipetuje dd H_2O , pufr, dNTP, primery a Taq polymeráza podle tabulky na složení dané reakční směsi. Získaný premix se promíchá na vortexu a rozpipetuje se do tenkostěnných 0,2 ml mikrozkušavek na PCR (nebo stripů či destiček) připravených na ledu, kde do každé mikrozkušavky bude pipetován mastermix např. o objemu 14 μ l pro *Vrn* a 10 μ l pro *Ppd*. Následně se do každé PCR mikrozkušavky přidá 1 μ l genomické DNA analyzovaného vzorku, čímž bude získán celkový objem reakční směsi.

Mikrozkušavky se zavíčkují, obsah se krátce promíchá a lehce centrifuguje. Vzorky se umístí do termocykleru a zahájí se PCR reakce podle reakčních podmínek, které jsou uvedeny v tabulkách v příslušné kapitole (kap. 4.7. a 4.8.).

Pro spolehlivost interpretace výsledků, je vhodné do analýzy zařadit i pozitivní a negativní kontroly. Pozitivní kontrola je DNA, která obsahuje detekovaný gen. U negativní kontroly je DNA nahrazena sterilní destilovanou vodou.

4.5. Příprava 1,5% agarózového gelu

Podle velikosti formy na gel se zvolí dané množství agarózy a pufru 1x TAE. V této metodice se počítá s objemem 150 ml 1,5% gelu pro formu 10 x 14,5 cm.

Na analytických vahách se naváží 2,25 g agarózy, která se převede do 250 ml velké Erlenmayerovy baňky a přidá se 150 ml 1x TAE pufru. Směs se v mikrovlnné troubě přivede k varu, dokud se všechna agaróza úplně nerozpustí. Do baňky s rozpuštěnou agarózou se vloží elektromagnetické míchadlo a pak se postaví na magnetickou míchačku, kde se nechá za neustálého a mírného míchání dokud gel trochu nezchladne (většinou stačí, že Erlenmayerovy baňky se lze dotknout rukou, ale gel v baňce je stále tekutý).

Mezitím se připraví forma na gel, do které se umístí požadovaný hřebínek (minimálně počet vzorků + 2x ladder).

Tekutý roztok agarózy se převede do formy na gel, odstraní se z něj veškeré bublinky a nechá se ztuhnout (cca 20 minut). Po ztuhnutí gelu se opatrně vyjme hřebínek, v gelu zůstanou jamky pro nanášení vzorků.

4.6. Elektroforéza a vizualizace produktů

Vzorky se nanáší na 1,5% agarózový gel klasickou metodou. Separace, probíhá po dobu 1 – 1,5 hodiny při konstantním napětí 65/90 V (podle velikosti gelu).

Po skončení separace je gel přenesen do nádoby s roztokem ethidium bromidu (na 500 ml 1x TAE je použito 0,5 ml ethidium bromidu), která je umístěná na třepačce. Po 5 – 10 minutách jemného třepání, je gel přemístěn do fotodokumentačního zařízení, kde jsou pomocí UV záření vizualizovány PCR produkty.

Vzhledem k tomu, že ethidium bromid je mutagen, veškerá manipulace se provádí v rukavicích. Pro snížení rizika kontaminace laboratoře není ethidium bromid přidáván přímo do gelu. Veškerá manipulace s ethidium bromidem by měla být přesunuta do zvláštní místnosti s dokumentačním zařízením, kde je gel po elektroforéze barven v roztoku ethidia bromidu.

Velikost vytvořených produktů amplifikace je porovnána s velikostním standardem. Přítomnost fragmentu o požadované velikosti odpovídá přítomnosti dané alely nebo genu ve vzorku. Pokud je v daném vzorku absence fragmentu, znamená to absenci dané alely nebo genu ve vzorku.

4.7. Určování genů *Ppd*

Stanovení alel *Ppd-D1*, kdy dominantní alela *Ppd-D1a* je necitlivá na fotoperiodu, zatímco recesivní alela *Ppd-D1b* je citlivá alela a tudíž rostlina nesoucí tuto alelu kvete pomaleji za krátkého dne.

Tabulka č. 1: Seznam primerů pro detekci *Ppd-D1*

Primer	Sekvence
2DIusF1	ACGCCTCCCACTACACTG
2DIusR1	GTTGGTTCAAACAGAGAGC
2DIusR2	CACTGGTGGTAGCTGAGATT

Tabulka č. 2: Složení reakční směsi pro detekci *Ppd-D1*

Reagencie	Koncentrace	Objem v 1 reakci (μl)
r H ₂ O		6,91
PCR pufr obsahujícího MgCl ₂	10x	1,5
dNTP	2 mM	1,5
primery 1xF + 2xR	100 μM	3x 0,03
Taq polymeráza	5 U/ μl	0,07
DNA	100 ng/μl	1,0
Celkový objem 1 reakce		11,07

Tabulka č. 3: Reakční podmínky pro detekci *Ppd-D1*

Počet cyklů	Název cyklu	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	Počáteční denaturace	94	2 min
40 cyklů	Denaturace	94	30 s
	Anelační teplota	55	30 s
	Prodlužování	72	40 s
1 cyklus	Závěrečné prodlužování	72	4 min

Vyhodnocení amplifikovaných produktů

Tabulka č. 4: Vyhodnocení amplifikovaných produktů *Ppd-D1*

Alela	Velikost hlavního produktu	Účinek alely	Příklad odrůd nesoucí danou alelu
<i>Ppd-D1a</i>	288 bp	necitlivá	Saskia, Svitava
<i>Ppd-D1b</i>	414 bp	citlivá	Cubus, Floret

4.8. Určování genů *Vrn*

A/ Stanovení alely *Vrn-Ala*

Tabulka č. 5: Seznam primerů pro detekci *Vrn-Ala*

Primer	Sekvence
Ex1/C/F	GTTCTCCACCGAGTCATGGT
Intr1/A/R3	AAGTAAGACAACACGAATGTGAGA

Tabulka č. 6: Složení reakční směsi pro detekci *Vrn-Ala*

Reagencie	Koncentrace	Objem v 1 reakci (μl)
r H ₂ O		10,94
PCR pufr obsahujícího MgCl ₂	10x	1,5
dNTP	2 mM	1,5
primery 1xF + 1xR	100 μM	2x 0,03
Taq polymeráza	5 U/ μl	0,07
DNA	100 ng/μl	1,0
Celkový objem 1 reakce		15,07

Tabulka č. 7: Reakční podmínky pro detekci *Vrn-Ala*

Počet cyklů	Název cyklu	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	Počáteční denaturace	94	5 min
38 cyklů	Denaturace	94	30 s
	Anelační teplota	56	30 s
	Prodlužování	72	1 min
1 cyklus	Závěrečné prodlužování	72	10 min

Vyhodnocení amplifikovaných produktů

PCR produkt o velikosti 522 bp značí přítomnost alely *Vrn-Ala* v testovaném materiálu. Nepřítomnost značí absenci této alely.

B/ Stanovení alely *vrn-A1*

Tabulka č. 8: Seznam primerů pro detekci *vrn-A1*

Primer	Sekvence
Intr1/C/F	GCACTCCTAACCCACTAACC
Intr1/AB/R	TCATCCATCATCAAGGCAAA

Tabulka č. 9: Složení reakční směsi pro detekci *vrn-A1*

Reagencie	Koncentrace	Objem v 1 reakci (μl)
r H ₂ O		10,94
PCR pufr obsahujícího MgCl ₂	10x	1,5
dNTP	2 mM	1,5
primery 1xF + 1xR	100 μM	2x 0,03
Taq polymeráza	5 U/μl	0,07
DNA	100 ng/μl	1,0
Celkový objem 1 reakce		15,07

Tabulka č. 10: Reakční podmínky pro detekci *vrn-A1*

Počet cyklů	Název cyklu	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	Počáteční denaturace	94	5 min
38 cyklů	Denaturace	94	30 s
	Anelační teplota	56	30 s
	Prodlužování	72	1 min
1 cyklus	Závěrečné prodlužování	72	10 min

Vyhodnocení amplifikovaných produktů

PCR produkt o velikosti 1068 bp značí přítomnost recesivní alely *vrn-A1* v testovaném materiálu. Nepřítomnost značí absenci této alely.

C/ Stanovení alely *Vrn-A1c*

Tabulka č. 11: Seznam primerů pro detekci *Vrn-A1c*

Primer	Sekvence
Intr1/A/F2	AGCCTCCACGGTTTCAAAGTAA
Intr1/A/R3	AAGTAAGACAACACGAATGTGAGA

Tabulka č. 12: Složení reakční směsi pro detekci *Vrn-A1c*

Reagencie	Koncentrace	Objem v 1 reakci (μl)
r H ₂ O		10,94
PCR pufr obsahujícího MgCl ₂	10x	1,5
dNTP	2 mM	1,5
primery 1xF + 1xR	100 μM	2x 0,03
Taq polymeráza	5 U/ μl	0,07
DNA	100 ng/μl	1,0
Celkový objem 1 reakce		15,07

Tabulka č. 13: Reakční podmínky pro detekci *Vrn-A1c*

Počet cyklů	Název cyklu	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	Počáteční denaturace	94	2 min
35 cyklů	Denaturace	94	30 s
	Anelační teplota	58	30 s
	Prodlužování	72	1 min 40 s
1 cyklus	Závěrečné prodlužování	72	5 min

Vyhodnocení amplifikovaných produktů

PCR produkt o velikosti 1170 bp značí přítomnost alely *Vrn-A1c* v testovaném materiálu. Nepřítomnost značí absenci této alely.

D/ Stanovení různých alel *Vrn-A1* v rámci jedné PCR reakce I.

Tabulka č. 14: Seznam primerů pro detekci

Primer	Sekvence
VRN1AF	GAAAGGAAAAATTCTGCTCG
VRN1R	TGCACCTTCCCCCGCCCCAT

Tabulka č. 15: Složení reakční směsi pro detekci

Reagencie	Koncentrace	Objem v 1 reakci (μl)
r H ₂ O		10,94
PCR pufr obsahujícího MgCl ₂	10x	1,5
dNTP	2 mM	1,5
primery 1xF + 1xR	100 μM	2x 0,03
Taq polymeráza	5 U/ μl	0,07
DNA	100 ng/μl	1,0
Celkový objem 1 reakce		15,07

Tabulka č. 16: Reakční podmínky pro detekci

Počet cyklů	Název cyklu	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	Počáteční denaturace	94	10 min
40 cyklů	Denaturace	95	30 s
	Anelační teplota	55	30 s
	Prodlužování	72	1 min
1 cyklus	Závěrečné prodlužování	72	10 min

Vyhodnocení amplifikovaných produktů

Tabulka č. 17: Vyhodnocení amplifikovaných produktů

Alela	Velikost hlavního produktu
<i>Vrn-A1a</i>	715, 624 bp (624, 536 bp)
<i>Vrn-A1b</i>	464 bp
<i>Vrn-A1c, vrn-A1</i>	484 bp
<i>Vrn-A1d</i>	452 bp
<i>Vrn-A1e</i>	430 bp

E/ Stanovení různých alel *Vrn-A1* v rámci jedné PCR reakce II.

Tabulka č. 18: Seznam primerů pro detekci

Primer	Sekvence
VRN1AF	GAAAGGAAAAATTCTGCTCG
VRN1-INTR1R	GCAGGAAATCGAAATCGAAG

Tabulka č. 19: Složení reakční směsi pro detekci

Reagencie	Koncentrace	Objem v 1 reakci (μl)
r H ₂ O		10,94
PCR pufr obsahujícího MgCl ₂	10x	1,5
dNTP	2 mM	1,5
primery 1xF + 1xR	100 μM	2x 0,03
Taq polymeráza	5 U/ μl	0,07
DNA	100 ng/μl	1,0
Celkový objem 1 reakce		15,07

Tabulka č. 20: Reakční podmínky pro detekci

Počet cyklů	Název cyklu	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	Počáteční denaturace	94	10 min
38 cyklů	Denaturace	94	45 s
	Anelační teplota	50	45 s
	Prodlužování	72	1 min
1 cyklus	Závěrečné prodlužování	72	5 min

Vyhodnocení amplifikovaných produktů

Tabulka č. 21: Vyhodnocení amplifikovaných produktů

Alela	Velikost hlavního produktu
<i>Vrn-A1a</i>	965, 876 bp
<i>Vrn-A1b</i>	714 bp
<i>Vrn-A1c, vrn-A1</i>	734 bp

F/ Stanovení různých alel *Vrn-BI* - multiplex

Detekce alel *Vrn-B1a*, *Vrn-B1b*, *Vrn-B1c* a *vrn-BI* současně v jedné reakci.

Tabulka č. 22: Seznam primerů pro detekci *Vrn-BI* - multiplex

Primer	Sekvence
Intr1/B/F	CAAGTGG AACGGTTAGGACA
Ex1/B/F3	GAAGCGGATCGAGAACAAGA
Intr1/B/R3	CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA
Intr1/B/R4	CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA

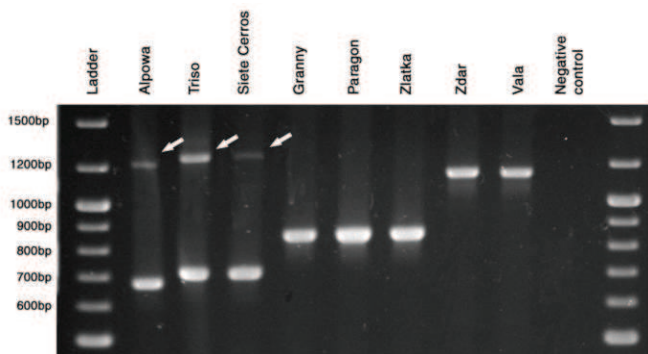
Tabulka č. 23: Složení reakční směsi pro detekci *Vrn-BI* - multiplex

Reagencie	Koncentrace	Objem v 1 reakci (μl)
r H ₂ O		10,88
PCR pufr obsahujícího MgCl ₂	10x	1,5
dNTP	2 mM	1,5
primery 2xF + 2xR	100 μM	4x 0,03
Taq polymeráza	5 U/ μl	0,07
DNA	100 ng/μl	1,0
Celkový objem 1 reakce		15,07

Tabulka č. 24: Reakční podmínky pro detekci *Vrn-BI* - multiplex

Počet cyklů	Název cyklu	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	Počáteční denaturace	94	2 min
35 cyklů	Denaturace	94	30 s
	Anelační teplota	56	30 s
	Prodlužování	72	1 min 40 s
1 cyklus	Závěrečné prodlužování	72	5 min

Vyhodnocení amplifikovaných produktů



Obr. 5: PCR test s primery Ex1/B/F3, Intr1/B/F, Intr1/B/R3 a Intr1/B/R4. Bílé šipky znázorňují bandy větší než 1 k bp, které se mohou také amplifikovat pro alely *Vrnr-B1a* nebo *Vrnr-B1b*.

Tabulka č. 25: Vyhodnocení amplifikovaných produktů *Vrnr-B1* - multiplex

Alela	Velikost hlavního produktu	Velikost vedlejšího produktu	Příklad odrůd nesoucí danou alelu
<i>Vrnr-B1a</i>	709 bp	1 235 bp	Triso, Siete Cerros
<i>Vrnr-B1b</i>	673 bp	1 199 bp	Alpowá
<i>Vrnr-B1c</i>	849 bp	-	Granny, Paragon, Zlatka
<i>vrnr-B1</i>	1 149 bp	-	Zdar, Vala

G/ Stanovení alel *Vrn-D1* a *vrn-D1*

Tabulka č. 26: Seznam primerů pro detekci alely *Vrn-D1*

Primer	Sekvence
Intr1/D/F	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC
Intr1/D/R3	GGTCACTGGTGGTCTGTGC

Tabulka č. 27: Seznam primerů pro detekci alely *vrn-D1*

Primer	Sekvence
Intr1/D/F	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC
Intr1/D/R4	AAATGAAAAGGAACGAGAGCG

Tabulka č. 28: Složení reakční směsi pro detekci alel *Vrn-D1* a *vrn-D1*

Reagencie	Koncentrace	Objem v 1 reakci (μl)
r H ₂ O		6,94
PCR pufr obsahujícího MgCl ₂	10x	1,5
dNTP	2 mM	1,5
primery 1xF + 1xR	100 μM	2x 0,03
Taq polymeráza	5 U/μl	0,07
DNA	100 ng/μl	1,0
Celkový objem 1 reakce		11,07

Tabulka č. 29: Reakční podmínky pro detekci alel *Vrn-D1* a *vrn-D1*

Počet cyklů	Název cyklu	Teplota (°C)	Čas
1 cyklus	Počáteční denaturace	94	1 min
30 cyklů	Denaturace	94	1 min
	0,5°C/s to 61°C		
	Anelační teplota	61	1 min
	0,5°C/s to 72°C		
	Prodlužování	72	1 min
1 cyklus	Závěrečné prodlužování	72	4 min

Vyhodnocení amplifikovaných produktů

PCR produkt o velikosti 1671 bp značí přítomnost alely *Vrn-DI* v testovaném materiálu. Nepřítomnost značí absenci této alely.

PCR produkt o velikosti 997 bp značí přítomnost alely *vrn-DI* v testovaném materiálu. Nepřítomnost značí absenci této alely.

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Metodika uvádí jedinečný souhrn optimalizovaných postupů, umožňujících spolehlivou detekci genů *Vrn* a *Ppd*. Tato práce vychází z již publikovaných molekulárních markerů pro dané geny, nicméně dosud nebyly uveřejněny v rámci jedné metodiky uvedené ověřené protokoly. Díky tomu je možné geny *Vrn* a *Ppd* rutinně stanovovat v běžné laboratoři s vybavením pro použití metody PCR.

IV. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Tato metodika zahrnuje extrakci DNA, PCR reakce a elektroforézu s následnou vizualizací produktů.

V porovnání ceny izolace DNA jednoho vzorku komerčním kitem Qiagen (cca 110,- Kč) nebo kitem GeneAll (cca 80,- Kč), je extrakce DNA metodou CTAB výrazně levnější (5-10,- Kč). Izolace DNA s použitím tekutého dusíku pro homogenizaci vzorků je časově a pracovně náročná. Výhodou této metodiky je navržený postup extrakce DNA metodou CTAB s vysokým počtem vzorků při relativně nízké námaze než při izolaci jednotlivých vzorků a homogenizací pomocí tekutého dusíku. Tímto postupem lze provést izolaci DNA v průměru u 384 až 768 vzorků za jeden den (4 x 96 až 8 x 96). Výsledky pro takový počet analýz můžou být tedy k dispozici během 24 - 48 hodin od odebrání vzorků.

Objem připravených roztoků, použitých při analýzách, se nezužítkuje celý a může být tedy použit i v následných analýzách. Dané množství závisí na nutnosti opakování některých analýz při provádění uvedených postupů.

Ceny analýz závisejí na aktuálních cenách chemikálií a počtu analýz v jedné sérii a jsou pouze orientační. Mimo cenu samotných analýz a chemikálií, je třeba počítat i s vedlejšími náklady pro zavedení metodiky do praxe v dané laboratoři.

Z navržených primerů pro detekci *Vrn-B1* byla vytvořena kombinace tak, že výsledkem amplifikace během jedné multiplex PCR byly získány jasné proužky rozlišující mezi alelami *Vrn-B1a*, *Vrn-B1b*, *Vrn-B1c* a *vrn-B1*, tím se snížil počet analýz a množství použitého materiálu a metoda se stala mnohem ekonomičtější.

V. PŘEDNOSTI METODY

Pomocí této metodiky lze určit známé geny ovlivňující jarovizační nárok a dobu kvetení u pšenice.

Použití uvedené metody představuje zrychlení procesu šlechtění, kdy na základě genetických analýz mohou být vybrány vhodné genotypy pro další šlechtění.

Metodika mnohonásobného testu PCR pro určování alel *Vrn-B1* u pšenice nebyla dosud v ČR publikována. Tento test zrychlí proces určování alel *Vrn-B1*, neboť pomocí jedné PCR reakce lze určit čtyři různé alely *Vrn-B1*.

VI. ÚSKALÍ METODY, NEVÝHODY A OMEZENÍ

Úskalím této metody může být nedodržení přesného pracovního postupu v jakémkoliv kroku.

Ethidium bromid je mutagen. Pro snížení zdravotního rizika je možné ethidiumbromid nahradit např. barvivem typu SYBR Green.

VII. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY PRO PRAXI

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy DNA pro velký počet vzorků.

Metodiku je možné využívat v běžných laboratořích pro výzkumné a šlechtitelské účely. Uplatněna bude v laboratořích těchto institucí nebo šlechtitelských stanic, kterým může zjednodušit proces šlechtění. Zároveň může tato metodika sloužit vědeckým pracovníkům a studentům ke studijním účelům na univerzitách.

VIII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Borlaug N.E. 1983: Contributions of conventional plant breeding to food production. *Science* 219: 689-693.
- Cockram J., Jones H., Leigh F.J., O'Sullivan D., Powell W., Laurie D.A., Greenland A.J. 2007: Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *Journal of Experimental Botany* 58: 1231-1244.
- Danyluk J., Kane N.A., Breton G., Limin A.E., Fowler D.B., Sarhan F. 2003: TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. *Plant Physiology* 132: 1849-1860.
- Dubcovsky J., Loukoianov A., Fu D.L., Valarik M., Sanchez A, Yan L.L. 2006: Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes VRN1 and VRN2. *Plant Mol Biol* 60: 469-480.
- Fu D.L., Szucs P., Yan L.L., Helguera M., Skinner J.S., von Zitzewitz J., Hayes P.M., Dubcovsky J. 2005: Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 273: 54-65.
- Leonova E., Pestsova E., Salina E., Efremova T., Röder M., Börner A. 2003: Mapping of the Vrn-B1 gene in *Triticum aestivum* using microsatellite markers. *Plant Breed* 122: 209-212.
- Milec Z., Tomková L., Sumíková T., Pánková K. 2011: A new multiplex PCR test for the determination of Vrn-B1 alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding* 30: 317-323.
- Milec Z., Sumíková T., Tomková L., Pánková K. 2013: Distribution of different Vrn-B1 alleles in hexaploid spring wheat germplasm. *Euphytica* 192: 371-378.
- Pánková K., Milec Z., Tomková L., Prášil I.T., Snape J.W. 2011: Vyhledávání a identifikace nových genů a alel ovlivňujících procesy kvetení pšnice pro dosažení vyšších výnosů v době měnícího se klimatu. Salaš, P (ed): „Rostliny v podmínkách měnícího se klimatu“. Lednice 20. - 21. 10. 2011, Úroda, vědecká příloha 445-454.
- Pugsley A.T. 1966: The periodic sensitivity of some wheats with special reference to the variety Thatcher. *Austral. J. Agric. Res.* 17: 591-599.
- Saghai-Marooif M.A., Soloman K.M., Jorgensen R.A., Allard R.W. 1984: Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 8014-8018.

- Sarma R.N., Gill B.S., Sasaki T., Galiba G., Sutka J., Laurie D.A. 1998: Comparative mapping of the wheat chromosome 5A Vrn-A1 region with rice and its relationship to QTL for flowering time. *Theor Appl Genet* 97: 103-109.
- Santra D.K., Santra M., Allan R.E., Campbell K.G., Kidwell K.K. 2009: Genetic and Molecular Characterization of Vernalization Genes Vrn-A1, Vrn-B1, and Vrn-D1 in Spring Wheat Germplasm from the Pacific Northwest Region of the U.S.A. *Plant Breeding* 128: 576-584.
- Scarth R., Law C.N. 1983: The location of the photoperiod gene Ppd2 and an additional genetic factor for ear emergence time on chromosome 2B of wheat. *Heredity* 51: 607-619.
- Shcherban A.B., Efremova T., Salina E.A. 2011: Identification of a new Vrn-B1 allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time. *Molecular Breeding* 29: 675-685.
- Shindo C., Tsujimoto, Sasakuma T. 2003: Segregation analysis of heading traits in hexaploid wheat utilizing recombinant inbred lines. *Heredity* 90: 56-63.
- Snape J., Pánková K. 2007: *Triticum aestivum* (wheat). In: *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, John Wiley & Sons, Chichester.
- Trevaskis B., Hemming M.N., Peacock W.J., Dennis E.S. 2006: HvVRN2 Responds to Daylength, whereas HvVRN1Is Regulated by Vernalization and Developmental Status. *Plant Physiology* 140: 1397-1405.
- Vincence-Prue D. 1975: *Photoperiodism in Plants*. Mc Graw-Hill, London.
- Welsh J.R., Keim D.L., Pirasteh B., Richards R.D. 1973: Genetic control of photoperiod response in wheat. In: Sears ER, Sears LMS (eds) *Proc 4th int wheat genet symp*. University of Missouri Research Station, Columbia, MO, USA: 879-884.
- Worland A.J. 1996: The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European winter wheat varieties. *Euphytica* 89: 49-57.
- Yan L., Fu D., Lin C., Blechl A., Tranquilli G., Bonafede M., Sanchez A., Valarik M., Dubcovsky J. 2006: The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 19581-19586.
- Yan L.L., Loukoianov A., Blechl A., Tranquilli G., Ramakrishna W., San Miguel P., Bennetzen J.L., Echenique V., Dubcovsky J. 2004: The wheat VRN2 gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science* 303: 1640-1644.

IX. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Milec Z. 2012: Studium účinků genů ovlivňujících dobu kvetení u pšenice (*Triticum aestivum* L.) [PhD Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Milec Z., Sumíková T., Tomková L., Pánková K. 2013: Distribution of different *Vrn-B1* alleles in hexaploid spring wheat germplasm. *Euphytica* 192: 371-378.
- Milec Z., Tomková L., Sumíková T., Pánková K. 2011: A new multiplex PCR test for the determination of *Vrn-B1* alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding*, 30: 317-323.
- Pánková K., Milec Z., Tomková L., Prášil I.T., Snape J.W. 2011: Vyhledávání a identifikace nových genů a alel ovlivňujících procesy kvetení pšenice pro dosažení vyšších výnosů v době měnícího se klimatu. Salaš, P (ed): „Rostliny v podmínkách měnícího se klimatu“. Lednice 20. - 21. 10. 2011, Úroda, vědecká příloha, 445-454.

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, 161 06, Praha 6 –Ruzyně

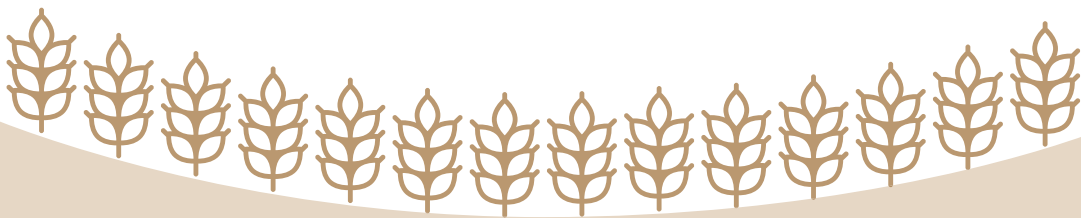
Redakce: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, 161 06, Praha 6 –Ruzyně

Náklad: 50 výtisků

Vyšlo: 2019, první vydání

Foto: Martina Trávníčková, Zbyněk Milec

Metodika je poskytována bezplatně a je veřejně přístupná na adrese www.vurv.cz
Vydáno bez jazykové úpravy



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.,
Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

ISBN: 978-80-7427-313-1