

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Ústav experimentální botaniky
Akademie věd České republiky

David Cháb

**Identifikace a studium exprese genů účastnících se kvetení
u modelové rostliny merlík červený (*Chenopodium rubrum*)**

Disertační práce

Školitelka: RNDr. Helena Štorchová, CSc.

Praha 2009

Poděkování

Toto místo patří vyjádření mého poděkování všem, kteří přispěli k tomu, abych mohl v rámci PhD. studia dojít až sem. Můj první dík směřuje k mé školitelce Dr. Heleně Štorchové za její vedení, obrovskou dávku vložené energie a předání mnoha znalostí a dovedností. Děkuji též všem dalším kolegům z Laboratoře reprodukce rostlin - Jiřímu Libusovi, Karlovi Müllerovi, Hosamovi el Ansary a Martině Dostálové za přátelské prostředí, pomoc a společnou práci. Dále patří můj dík všem lidem z ÚEB AV ČR v.v.i., především Dr. Janu Kolářovi, Dr. Ivaně Macháčkové, Michalovi Hálovi, Janu Matouškovi, Davidovi Reňákovi a Dr. Věře Čapkové. Ze srdce děkuji Lence, Anetce, sestře Monče a svým rodičům za lásku a všeobecné podporování, díky Vám. V neposlední řadě necht' přijmou mé poděkování mnozí další, kteří mě tak či onak v životě vedli správnou Cestou.

Projekt řešený v rámci této disertační práce byl financován grantem GAČR 522/03/0300.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracoval sám s použitím citované literatury. Pokud jsou v této práci uváděny některé společné výsledky, je podíl jiných autorů na příslušných místech v textu specifikován. Taktéž prohlašuji, že tato disertační práce je předkládána k obhajobě pouze na Univerzitě Karlově v Praze, Přírodovědecké fakultě, v programu doktorského studia Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie.

Praha, Česká republika

Únor 2009

OBSAH:

1. SEZNAM ZKRATEK.....	12
2. CÍLE PRÁCE.....	14
3. ÚVOD.....	15
3.1. Regulace kvetení	15
3.2. Fotoperiodismus a florigen	15
3.3. Molekulární základy indukce kvetení u <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
3.3.1. Vnitřní hodiny <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
3.3.2. Signální dráhy účastníci se indukce kvetení v <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
3.3.2.1. Signální dráha závislá na fotoperiodě.....	19
3.3.2.2. Vernalizační a autonomní signální dráha.....	22
3.3.2.3. Gibereliny.....	23
3.3.2.4. Účinek microRNA.....	23
3.4. Molekulární základy indukce kvetení u rýže (<i>Oryza sativa</i>).....	24
3.4.1. Vnitřní hodiny rýže.....	24
3.4.2. Signální dráhy účastníci se indukce kvetení u rýže.....	25
3.4.2.1. Signální dráha závislá na fotoperiodě.....	25
3.4.2.2. Autonomní signální dráha.....	27
3.4.2.3. Vernalizace.....	28
3.5. Molekulární základy indukce kvetení u <i>Pharbitis nil</i>.....	28
3.5.1. Signální dráha závislá na fotoperiodě.....	28
3.5.2. Gibereliny.....	29
3.6. Klíčové geny účastníci se fotoperiodické indukce kvetení u <i>A. thaliana</i>.....	30
3.6.1. <i>CONSTANS-like (COL)</i> geny.....	30
3.6.2. <i>FLOWERING LOCUS T-like (FTL)</i> geny.....	31
3.6.3. Molekulární podstata florigenu a <i>CO - FT</i> interakce.....	34
3.6.4. <i>LEAFY (LFY)</i> gen v <i>A. thaliana</i> a dalších rostlinách.....	35
3.7. Klíčové geny účastníci se fotoperiodické indukce kvetení u dalších druhů rostlin...36	
3.7.1. Rýže.....	36
3.7.2. <i>Pharbitis nil</i>	37
3.7.3. Rajče (<i>Lycopersicon esculentum</i>).....	37
3.7.4. Regulace kvetení u <i>Lolium temulentum</i> prostřednictvím giberelinů a <i>LtFT</i>	37

3.8. Night-break.....	38
3.8.1. Night-break u rýže.....	38
3.8.2. Night-break u <i>Pharbitis nil</i>	38
3.9. <i>Chenopodium rubrum</i> jako modelová rostlina ve studiu kvetení.....	39
4. MATERIÁL A METODY.....	41
4.1. Chemikálie, vybavení a software.....	41
4.1.1. Chemikálie.....	41
4.1.2. Antibiotika.....	41
4.1.3. Enzymy.....	42
4.1.3.1. Restrikční enzymy.....	42
4.1.3.2. Polymerázy.....	42
4.1.4. Kity.....	43
4.1.5. Média a pufry.....	43
4.1.5.1. Média.....	43
4.1.5.2. Pufry.....	44
4.1.6. Vybavení.....	44
4.1.6.1. Přístroje.....	44
4.1.7. Software.....	45
4.1.8. Plazmidy.....	45
4.1.9. Bakterie.....	46
4.2. Rostlinný materiál.....	46
4.2.1. <i>Chenopodium rubrum</i>	46
4.2.1.1. Semenáčky.....	46
4.2.1.2. Dospělé rostliny.....	47
4.2.2. <i>Chenopodium sp.</i> , <i>Atriplex nitens</i>	47
4.2.3. <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
4.2.3.1. Standardní genotyp, <i>ft</i> mutanty a <i>co</i> mutanty.....	49
4.2.3.2. Transformanty (T1 + T2 generace).....	49
4.3. Elektroforéza.....	50
4.4. Extrakce RNA.....	50
4.5. Klonování.....	50
4.5.1. Ligace.....	50
4.5.2. Příprava PCR fragmentu pro ligaci.....	51

4.5.3. Transformace <i>Escherichia coli</i> a selekce bakteriálních kolonií.....	51
4.6. Izolace plazmidů.....	52
4.6.1. Izolace plazmidů z <i>Escherichia coli</i> metodou CTAB.....	52
4.6.2. „Rapid toothpick isolation“ metoda pro ověření inserce v plazmidu.....	52
4.6.3. Izolace plazmidů z <i>Agrobacterium tumefaciens</i> metodou alkalické lyze.....	52
4.7. Konstrukce cDNA knihovny.....	53
4.7.1. Extrakce RNA.....	53
4.7.2. Příprava cDNA SMART™ technologií.....	53
4.7.3. Klonování ds cDNA do pGEM-T Easy.....	53
4.8. Sekvenování.....	54
4.9. PCR s univerzálními primery.....	54
4.10. Metoda modifikované RACE.....	54
4.10.1. RACE.....	55
4.10.2. Semi-nested PCR.....	55
4.11. Příprava cDNA klonů o úplné délce pro transformaci.....	56
4.11.1. A-tailing.....	57
4.12. PCR primery.....	58
4.13. Subklonování <i>CrFTL</i> a <i>CrCOL</i> genů.....	60
4.14. Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	61
4.15. Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	62
4.16. Měření transkripčních profilů nově identifikovaných genů.....	62
4.16.1. Příprava cDNA reverzní transkripcí (RT).....	62
4.16.2. Kvantitativní Real-Time PCR.....	63
4.16.2.1. Kvantitativní Real-Time PCR se SYBR Green.....	63
4.16.2.2. Kvantitativní Real-Time PCR s TaqMan sondami.....	63
4.16.3. Normalizace výsledků kvantitativní Real-Time PCR.....	64
4.17. Extrakce genomické DNA.....	65
4.18. Sekvenování genomického fragmentu nesoucího třetí intron <i>FTL</i> genů u zástupců rodu <i>Chenopodium</i>.....	65
4.19. Southernova hybridizace.....	65
4.19.1. Příprava DNA fragmentů a jejich přenos na membránu kapilárním sáním.....	66
4.19.2. Značení sondy digoxigeninem (DIG) pomocí PCR.....	66
4.19.2.1. Hybridizační sonda pro detekci <i>CrFTL1</i>	66
4.19.2.2. Hybridizační sonda pro detekci <i>CrFL</i>	66

4.19.3. Hybridizace.....	67
4.19.4. DNA DOT Blotting.....	67
4.20. Analýza sekvencí a fylogenetická analýza.....	68
4.20.1. Skládání a editace sekvencí.....	68
4.20.2. Fylogenetická analýza.....	68
4.20.2.1. Fylogenetické analýzy na základě sekvence aminokyselin.....	68
4.20.2.2. Fylogenetické analýzy na základě sekvence nukleotidů.....	68
5. VÝSLEDKY.....	70
5.1. Úplné kódující sekvence nově identifikovaných genů z <i>C. rubrum</i>.....	70
5.1.1. Konstrukce cDNA knihoven.....	70
5.1.2. Získání úplných kódujících sekvencí <i>CrFTL1</i> a <i>CrFTL2</i>	71
5.1.2.1. PCR s FT-univerzálními primery.....	71
5.1.2.2. <i>CrFTL2</i> : 3' RACE a získání 3' konce.....	71
5.1.2.3. <i>CrFTL1</i> : 3' RACE + 3' semi-nested PCR a získání 3' konce.....	71
5.1.2.4. <i>CrFTL2</i> : 5' RACE a získání 5' konce.....	72
5.1.2.5. <i>CrFTL1</i> : 5' RACE a získání 5' konce.....	72
5.1.2.6. Amplifikace úplných kódujících sekvencí <i>CrFTL1</i> a <i>CrFTL2</i>	72
5.1.3. Analýza úplných kódujících sekvencí <i>CrFTL1</i> a <i>CrFTL2</i>	72
5.1.3.1. Fylogenetická analýza <i>CrFTL1</i> a <i>CrFTL2</i> proteinů.....	73
5.1.4. Získání úplných kódujících sekvencí <i>CrCOL1</i> , <i>CrCOL1s</i> , <i>CrCOL2</i> a <i>CrCOL2s</i>	74
5.1.4.1. PCR s CO-univerzálními a CO-specifickými primery.....	74
5.1.4.2. 5' RACE a získání dvou 5' konců <i>CrCOL</i>	75
5.1.4.3. 3' RACE + 3' semi-nested PCR a získání 3' konce <i>CrCOL</i>	75
5.1.4.4. Amplifikace úplných kódujících sekvencí <i>CrCOL1</i> , <i>CrCOL1s</i> , <i>CrCOL2</i> a <i>CrCOL2s</i>	75
5.1.5. Analýza úplných kódujících sekvencí čtyř formem <i>CrCOL</i> transkriptů.....	75
5.1.5.1. Alternativní sestřih <i>CrCOL1</i> a <i>CrCOL2</i>	76
5.1.5.2. Ověření alternativního sestřihu <i>CrCOL1</i> a <i>CrCOL2</i>	80
5.1.5.2.1. Ověření alternativního sestřihu <i>CrCOL1</i> a <i>CrCOL2</i> metodou PCR.....	80
5.1.5.2.2. Ověření alternativního sestřihu <i>CrCOL1</i> a <i>CrCOL2</i> metodou qPCR.....	80

5.1.5.3. Analýza aminokyselinových sekvencí CrCOL1 a CrCOL2s.....	81
5.1.6. Získání úplné kódující sekvence <i>CrFL</i>	82
5.1.6.1. 3' RACE + 3' semi-nested PCR a získání 3' konce <i>CrFL</i>	83
5.1.6.2. 5' RACE 1 a získání sekvence prodloužené k 5' konci <i>CrFL</i>	83
5.1.6.3. 5' RACE 2 + semi-nested PCR 2 a získání sekvence prodloužené k 5' konci <i>CrFL</i>	83
5.1.6.4. 5' RACE 3 + semi-nested PCR 3 - bez nalezení úplného 5' konce <i>CrFL</i>	83
5.1.7. Analýza úplné kódující sekvence <i>CrFL</i>	84
5.1.8. Problémy metody RACE při identifikaci genů a jejich řešení.....	84
5.1.8.1. Problémy RACE.....	84
5.1.8.2. Řešení problémů a zkušenosti.....	85
5.1.8.3. Doporučený postup.....	85
5.2. Počet kopií <i>CrFTL1-like</i> a <i>CrFL-like</i> sekvencí v genomu <i>C. rubrum</i>.....	86
5.2.1. Počet kopií <i>CrFTL1-like</i> genů v genomu <i>C. rubrum</i>	86
5.2.2. Počet kopií <i>CrFL-like</i> genů v genomu <i>C. rubrum</i>	86
5.3. Genomické sekvence nově identifikovaných genů z <i>C. rubrum</i>.....	87
5.3.1. Získání genomické sekvence <i>CrFTL1</i>	88
5.3.2. Získání genomické sekvence <i>CrFTL2</i>	88
5.3.3. Analýza genomických sekvencí <i>CrFTL1</i> a <i>CrFTL2</i>	88
5.3.3.1. Genomické sekvence <i>CrFTL1a</i> , <i>CrFTL1b</i>	88
5.3.3.2. Genomická sekvence <i>CrFTL2</i>	90
5.3.3.3. Srovnání genomických struktur <i>FT</i> z <i>A. thaliana</i> a <i>CrFTL1</i> a <i>CrFTL2</i> z <i>C. rubrum</i>	91
5.3.4. Získání genomické sekvence <i>CrCOL1</i>	91
5.3.5. Analýza genomické sekvence <i>CrCOL1</i>	91
5.3.6. Získání genomických sekvencí <i>CrFL</i> a dvou <i>LFY-like</i> z <i>C. bonus henricus</i>	92
5.3.6.1. První intron <i>CrFL</i>	92
5.3.6.2. Hledání druhého intronu v <i>CrFL</i> a v <i>LFY-like</i> z <i>C. bonus henricus</i>	92
5.3.7. Analýza genomických sekvencí <i>CrFL-like</i> z <i>C. rubrum</i> a <i>CbhLFY1</i> a <i>CbhLFY2</i> z <i>C. bonus henricus</i>	93
5.3.7.1. Sekvence prvního intronu <i>CrFL-like</i> z <i>C. rubrum</i>	93
5.3.7.2. Genomická sekvence <i>CrFL</i> z <i>C. rubrum</i> a <i>CbhLFY1</i> a <i>CbhLFY2</i> z <i>C. bonus henricus</i> v oblasti druhého intronu.....	94

5.4. Vliv různých fotoperiodických podmínek na expresní profily nově identifikovaných genů z <i>C. rubrum</i>.....	98
5.4.1. Semenáčky: stálé světlo, jedna a tři induktivní periody tmy.....	98
5.4.1.1. Jedna a tři induktivní tmy korelují se vzrůstajícími hladinami <i>CrFTL1</i> mRNA a mírou kvetení.....	99
5.4.1.2. Jedna a tři induktivní tmy nemají vliv na hladiny <i>CrFTL2</i> mRNA...100	
5.4.1.3. Pravidelné střídání světla a tmy způsobuje rytmickou expresi <i>CrCOL</i> s maximy na konci fází tmy.....	100
5.4.1.3.1. Maxima exprese <i>CrCOL</i> za tmy odpovídají minimům <i>CrFTL1</i> a za světla naopak.....	101
5.4.1.4. Jedna a tři induktivní tmy korelují se vzrůstajícími hladinami <i>CrFL</i> mRNA a mírou kvetení.....	102
5.4.2. Semenáčky: stálé světlo, různě dlouhé periody tmy.....	103
5.4.2.1. Délka fáze tmy koreluje s výší hladin <i>CrFTL1</i> transkriptu.....	103
5.4.2.2. Délka fáze tmy nemá vliv na výši hladin <i>CrFTL2</i> transkriptu.....	104
5.4.2.3. Délka fáze tmy nemá vliv na výši hladin <i>CrCOL</i> transkriptů.....	105
5.4.2.3.1. Délka tmy nekoreluje s výší hladin <i>CrCOL</i> mRNA a naopak koreluje s výší hladin <i>CrFTL1</i> mRNA a mírou kvetení.....	106
5.4.3. Semenáčky: stálá tma.....	107
5.4.3.1. Přesun semenáčků <i>C. rubrum</i> ze světla do tmy indukuje rytmickou expresi <i>CrFTL1</i> s velmi nízkými amplitudami.....	107
5.4.3.2. Transkripce <i>CrFTL2</i> za stálé tmy je srovnatelná s transkripcí v semenáčcích za všech studovaných světelných režimů.....	108
5.4.3.3. Přesun semenáčků <i>C. rubrum</i> ze světla do tmy indukuje rytmickou expresi <i>CrCOL</i> s vysokými amplitudami.....	108
5.4.3.3.1. Poměr expresí <i>CrCOL2s</i> a <i>CrFTL1</i> za stálé tmy naznačuje odlišnou regulaci rytmické exprese obou genů.....	109
5.4.4. Semenáčky: night-break.....	110
5.4.4.1. Night-break inhibuje expresi <i>CrFTL1</i>	110
5.4.4.2. Night-break nemá vliv na expresi <i>CrFTL2</i>	111
5.4.4.3. Night-break nemá vliv na expresi <i>CrCOL</i>	111
5.4.5. Dospělé rostliny – jedna, dvě nebo tři induktivní periody tmy.....	113
5.4.5.1. Aplikace jedné, dvou a tří induktivních fází tmy u 15-ti denních rostlin koreluje se vzrůstající transkripcí <i>CrFTL1</i> a mírou kvetení.....	114

5.4.5.2. V 15-ti denních rostlinách je <i>CrFTL2</i> exprimováno konstitutivně s nižšími hladinami mRNA v porovnání se semenáčky.....	114
5.5. Příprava cDNA pro přenos do <i>A. thaliana</i>.....	115
5.5.1. Vyštěpení cDNA genu z pGEM-T Easy a separace fragmentu.....	115
5.5.2. Přidání 35S promotoru a poly-A signálu ke klonované cDNA přenosem do pRT101.....	116
5.5.2.1. Příprava vektoru pRT101 pro ligaci.....	116
5.5.2.2. Úprava konců restričních fragmentů pRT101, <i>CrFTL1</i> , <i>CrCOL1</i> a <i>CrCOL2s</i> pro ligaci natupo.....	116
5.5.2.3. Ligace cDNA genů do pRT101.....	116
5.5.2.4. Ověření správné orientace cDNA za 35S promotorem v pRT101....	117
5.5.2.5. Vzdálenost start kodónu od počátku transkripce u <i>CrFTL1</i>	117
5.5.3. Vyštěpení fragmentu nesoucího 35S::cDNA a poly-A signál z pRT101 a jeho separace.....	117
5.5.4. Příprava vektoru pGreenII0179 pro vlastní transformaci <i>Arabidopsis thaliana</i> pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	118
5.5.4.1. Příprava vektoru pGreenII0179 pro ligaci.....	118
5.5.4.2. Ligace 35S:: <i>CrFTL</i> a 35:: <i>CrCOL</i> fragmentů do pGreenII0179.....	118
5.5.4.3. Ověření vložení fragmentu nesoucího 35S::cDNA a poly-A signál do pGreenII0179.....	118
5.6. Transgenoze.....	118
5.6.1. Přenos <i>CrFTL1</i> do standardního genotypu Ler a <i>ft</i> mutantů <i>A. thaliana</i>	119
5.6.1.1. Přenos <i>CrFTL1</i> do standardního genotypu Ler.....	119
5.6.1.2. Přenos <i>CrFTL1</i> do <i>ft</i> mutantů <i>A. thaliana</i>	119
5.6.1.2.1. Transformace <i>ft</i> mutantu N184.....	119
5.6.1.2.1.1. Přítomnost <i>CrFTL1</i> v genomu T2 generace transformantů koreluje s časným kvetením.....	121
5.6.1.2.2. Transformace <i>ft</i> mutantu N56.....	121
5.6.2. Přenos <i>CrFTL2</i> do standardního genotypu Ler, <i>ft</i> mutantů a <i>co</i> mutantu <i>A. thaliana</i>	121
5.6.2.1. Přenos <i>CrFTL2</i> do standardního genotypu Ler.....	122
5.6.2.2. Přenos <i>CrFTL2</i> do <i>ft</i> mutantů <i>A. thaliana</i>	122
5.6.2.3. Přenos <i>CrFTL2</i> do <i>co</i> mutantu <i>A. thaliana</i>	122
5.6.3. Přenos <i>CrCOL</i> do standardního genotypu Ler a <i>co</i> mutantu <i>A. thaliana</i>	122

5.6.3.1. Přenos <i>CrCOL1</i> a <i>CrCOL2s</i> do standardního genotypu Ler.....	123
5.6.3.2. Přenos <i>CrCOL1</i> do <i>co</i> mutantu <i>A. thaliana</i>	123
5.6.3.3. Přenos <i>CrCOL2s</i> do <i>co</i> mutantu <i>A. thaliana</i>	123
5.7. Využití třetího intronu <i>FTL</i> genů jakožto markeru pro fylogenetickou analýzu a určení původu jednotlivých genomických sad u rodu <i>Chenopodium</i>.....	123
5.7.1. Fylogenetická analýza na základě sekvence nukleotidů kódující oblasti <i>FTL</i> genů.....	124
5.7.2. Fylogenetická analýza na základě sekvence nukleotidů třetího intronu <i>FTL</i> genů.....	126
5.7.3. Mitochondriální inserce ve třetím intronu <i>FTL-1845</i> genu <i>C. quinoa</i>	127
5.7.4. Dlouhá inserce ve třetím intronu <i>FTL</i> genů <i>B13-L</i> a <i>B29-L</i> v <i>C. quinoa</i> z Bolivijských And.....	129
5.8. Získané <i>FTL</i>, <i>COL</i> a <i>LFY</i> sekvence byly vloženy do GenBank.....	130
5.9. Částečné sekvence dalších genů z <i>C. rubrum</i> a ostatních druhů rodu <i>Chenopodium</i>.....	132
5.9.1. Expressed sequence tags (ESTs) z <i>C. rubrum</i>	132
5.9.2. Genomické sekvence genů izolované ze zástupců rodu <i>Chenopodium</i>	132
6. DISKUSE.....	135
6.1. <i>CrFTL1</i> z <i>C. rubrum</i> je ortologem <i>FT</i> z <i>A. thaliana</i>; <i>CrFTL2</i> je gen s neznámou funkcí.....	135
6.2. <i>CO</i> homology v <i>C. rubrum</i> podléhají alternativnímu sestřihu; fáze tmy má stimulační efekt a vliv světla inhibiční efekt na tvorbu <i>CrCOL</i> mRNA.....	138
6.3. Chybí merlíkům druhý intron vysoce konzervovaného <i>LFY</i> genu?.....	140
6.4. Třetí intron <i>FTL</i> genů - nový molekulární marker, využitelný zejména pro fylogenetické studium druhů z okruhu <i>C. album</i>.....	141
6.5. Přínos našeho studia.....	142
7. ZÁVĚRY.....	144
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	145
9. PŘÍLOHY.....	165

1. SEZNAM ZKRATEK

AMP	Ampicilin
bp	Páry bází DNA
cDNA	Komplementární DNA
CIP-FAO	Centro Internacional de la Papa
Cla	Claforan
cm	Centimetr
Cp	Crossing point
CTAB	Cetyltrimethylamonium bromid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ds	Dvou-vláknová (DNA)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EST	Expressed sequence tag
GA	Giberelin
gDNA	Genomická DNA
GEN	Gentamycin
hod	Hodina
HYG	Hygromycin
KAN	Kanamycin
kb	Tisíc bází
MADS-box	(MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS, SRF) DNA vážící doména
min	Minuta
ML	Maximum likelihood
MP	Maximální parsimonie (Maximum parsimony)
mRNA	Messenger RNA
mt	Mitochondriální
NB	Tzv. „night-break“, přerušení temné fáze fotoperiody krátkým časovým úsekem světla
NJ	Neighbour-joining
OD	Optická denzita
PCR	Polymerázová řetězová reakce
qPCR	Kvantitativní PCR v reálném čase

RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RIF	Rifampicin
RNA	Ribonukleová kyselina
RT	Reverzní transkripce
s	Sekunda
SDS	Dodecylsulfát sodný
ss	Jedno-vláknová (DNA)
Tc	Tetracyclin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Jednotka (unit) enzymu
USDA-NPGS	USDA-NPGS = USDA North Central Regional Plant Germplasm System
UTR	Nepřekládaná oblast genu
UV	Ultrafialové světlo

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Objasnit genetické základy signálních drah řídících indukci kvetení u modelové rostliny *Chenopodium rubrum* (ekotyp 374). Získat úplné kódující i nekódující sekvence *CrCOL*, *CrFTL* a *CrFL* - homologů genů *CONSTANS (CO)*, *FLOWERING LOCUS T (FT)* a *FLORICAULA/LEAFY (FLO/LFY)* z *C. rubrum* (ekotyp 374) účastnících se fotoperiodické indukce kvetení. Zjistit počet kopií *FT* a *LFY* genů u *C. rubrum* (ekotyp 374) a dalších zástupců rodu *Chenopodium*.
- 2) Studovat expresní profily nově identifikovaných genů v *C. rubrum* za induktivních i neinduktivních fotoperiodických režimů v semenáčcích a 15-ti denních rostlinách. Na základě expresních profilů genů zjistit jejich případnou účast na fotoperiodické indukci kvetení.
- 3) Přinést důkaz o funkci nově izolovaných genů pomocí funkční komplementace *ft* a *co* mutantů *A. thaliana*.
- 4) Provéřit využitelnost sekvence 3. intronů *FT-like* genů pro studium fylogenetických vztahů a určení rodičovských druhů u polyploidů rodu *Chenopodium*.

3. ÚVOD

3.1. Regulace kvetení

Kvetení je esenciálním procesem reprodukce rostlin. Správné načasování přechodu z vegetativního do generativního stádia je pro rostliny životně důležité obzvláště s ohledem na sezónní změnu okolních podmínek. Klíčení, kvetení, tvorba semen a opad listů musí proběhnout ve správném období v rámci roku. Zvláště ve vyšších zeměpisných šířkách podléhají životní podmínky rostlin v průběhu roku extrémním změnám, a tak jsou přechod z vegetativního do rozmnožovacího stádia, jakož i ostatní vývojové procesy rostlin velmi přísně kontrolovány.

Regulace indukce kvetení je realizována několika signálními drahami citlivými k okolním podmínkám i vnitřnímu stavu rostliny. Uplatňuje se vnímání teploty (v rámci vernalizace) (Sheldon et al., 2000; Sheldon et al., 2002) a změny délky dne, tzv. fotoperiody (Simpson et al., 1999; Lee et al., 2006). Dále působí vliv vnitřních faktorů - hormonů, zejména giberelinů (Wilson et al., 1992; Kulinowska-Gulewska et al., 2000; Moon et al., 2003; King et al., 2006) a autonomní signální dráha zodpovědná za indukci kvetení vyvolané stářím rostliny (He et al., 2003).

3.2. Fotoperiodismus a florigen

Schopnost rostlin rozlišovat a reagovat na změny v délce dne je známa jako **fotoperiodismus**. Dlouhodenní a krátkodenní druhy rostlin se liší v době kvetení v rámci vegetativního období. Krátkodenní rostliny setrvávají ve vegetativním stádiu až do doby, kdy je noc delší než určitý pro ně kritický limit. Dlouhodenní naopak kvetou, když je délka dne delší než prahový limit. Tento limit, tzv. kritická fotoperioda, je pro jednotlivé druhy rostlin různá. Kategorie dlouhodenní a krátkodenní jsou dále klasifikovány jako obligátní nebo fakultativní. Například obligátně krátkodenní rostlina, pro kterou je kritická fotoperioda 10 hodin světla/14 hodin tmy, vykvete pouze tehdy, pokud projde touto fotoperiodou nebo takovou s ještě kratším dnem. Naproti tomu fakultativně krátkodenní rostlina se stejnou kritickou fotoperiodou vykvete i tehdy, když neprojde ani jednou pro ni kritickou anebo kratší induktivní fotoperiodou, ale za delší čas, než kdyby jí prošla. Dále existují k fotoperiodě

neutrální rostliny, jako např. rajče (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), u nichž je indukce kvetení na délce fotoperiody nezávislá (Thomas a Vince-Prue, 1997).

Rostlina vnímá délku dne prostřednictvím listů, ale indukce kvetení se odehrává ve vzrostném vrcholu. Indukční signál lze přenést roubováním listu z rostliny indukované ke kvetení na rostlinu rostoucí při neinduktivní fotoperiodě a dochází k následné indukci kvetení v jejím vzrostném vrcholu. To bylo ukázáno u krátkodenní perily (*Perilla*). List z indukované rostliny naroubovaný na rostlinu rostoucí při neinduktivní fotoperiodě je schopný indukovat její kvetení, a to ještě po sedmi postupných roubováních (King a Zeevaart, 1973). Tak vznikla představa o látce, která se tvoří v listech za induktivní fotoperiody a je transportována floémem jakožto signál do vzrostného vrcholu, kde zprostředkovává indukci kvetení. Byla označena jako **florigen** (Chailakhyan, 1937; Zeevaart 1976). Fyziologové pátrali po původu florigenu několik desítek let, přičemž se ve svých studiích zaměřovali na různé typy biochemických látek včetně fytohormonů (Wilson et al., 1992).

3.3. Molekulární základy indukce kvetení u *Arabidopsis thaliana*

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*, L.) je klasická modelová rostlina z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) z řádu Brassicales. Jako první vyšší rostlina s kompletně osekvenovaným genomem se stala předmětem rozsáhlého molekulárně-genetického výzkumu i na poli indukce kvetení. *A. thaliana* je fakultativní dlouhodobá rostlina, která sice také kvete na krátkém dni, při dlouhé fotoperiodě však mnohem dříve.

3.3.1. Vnitřní hodiny *Arabidopsis thaliana*

Rostlina je schopna nejen vnímat světlo, ale také stanovit délku jeho trvání. Jako fotoreceptory používá fytochromy pro vnímání červeného světla a kryptochromy pro vnímání světla modrého. Délku trvání světla pomáhají rostlině vnímat tzv. vnitřní hodiny. Jedná se o mechanismus transkripčně translačních smyček založený na zpětné vazbě. Protein X inhibuje transkripci genu *Y*. Produkt genu *Y*, protein *Y*, zpětně aktivuje transkripci genu *X*. Hladiny proteinů *X* a *Y* rytmicky stoupají a klesají tak, že maximální hladina *X* odpovídá minimální hladině *Y* a naopak.

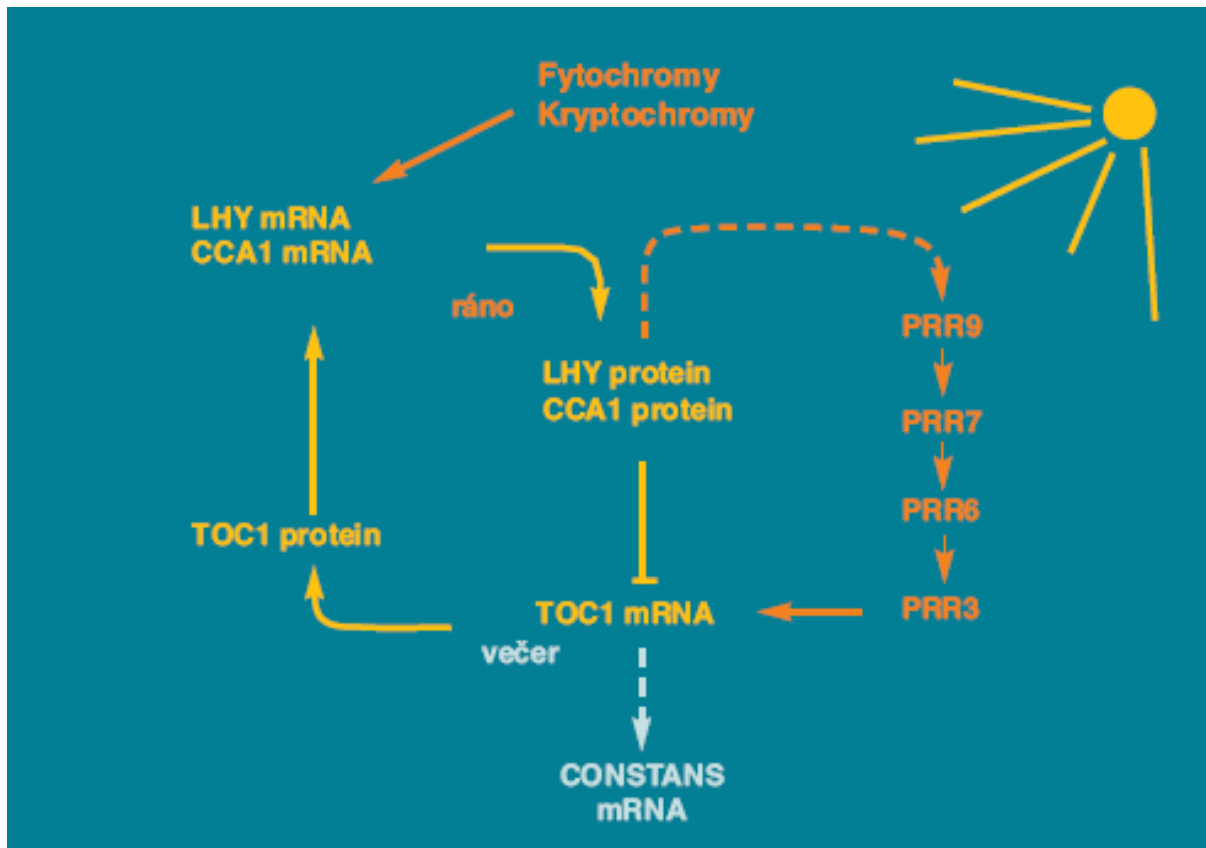
Ráno jsou vysoce transkribovány geny vnitřních hodin *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* (Wang a Tobin, 1998) a *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* (Schaffer et al., 1998), jejichž proteiny CCA1 a LHY tlumí transkripci genu *TIMING OF CAB 1 (TOC1)* (Strayer et al., 2000; Alabadí et al., 2001) a zároveň aktivují transkripci další zpětnovazebné smyčky představované geny *PSEUDORESPONSE REGULATOR (PRR)* (Nakamichi et al., 2005), které aktivují expresi *TOC1*. Protein TOC1 je potřebný pro aktivaci transkripce *CCA1* a *LHY* a jeho nízká hladina ráno způsobí postupné snížení hladiny *CCA1* a *LHY* proteinů během dne, a tak i postupnou aktivaci vlastní exprese, k čemuž přispívá i druhá zpětnovazebná smyčka postupně se aktivujících genů *PRR* (Para et al., 2007). Večer je tedy maximum TOC1 proteinu a minimum proteinů *CCA1* a *LHY*. V noci se však opět uplatní aktivace *CCA1* a *LHY* transkripce prostřednictvím TOC1 proteinu a ráno je znovu maximum *CCA1* a *LHY* a minimum TOC1 (obr. 1). Hladiny proteinů zpětnovazebně propojených mechanismem vnitřních hodin rytmicky oscilují v rámci opakování maxim a minim s periodou okolo 24 hodin v tzv. cirkadiánním rytmu. Rytmus je zachován po určitou dobu i za stálého světla nebo stálé tmy, ovšem postupně mizí. Mutanty *toc1* vykazují kratší periodu vnitřních hodin – 21 hodin ve srovnání s 24,5 hodinami standardního genotypu (Yanovsky a Kay, 2002).

Vnitřní hodiny se spoluúčastní kontroly a řízení mnoha mechanismů určujících růst a vývoj rostliny. Rostlina používá vnitřních hodin k tomu, aby byla schopna načasovat metabolické a fyziologické pochody v souladu s vnějšími podmínkami. Součinnost vnitřních hodin s cykly světla a teploty zajišťuje, že téměř 90% transkriptů je akumulováno ve specifický čas v průběhu dne (Michael et al., 2008b). Tak je například koordinována exprese genů biosyntézy, katabolismu, receptorů a signalizace různých signálních drah fytohormonů a také exprese cílových genů těchto signálních drah. Vnitřní hodiny se tedy prostřednictvím regulace exprese fytohormonů podílí na řízení růstu rostlin, jakož i na dalších vývojových procesech.

Například růst hypokotylu je nepřímo řízen vnitřními hodinami mechanismem udržování signálu o světle během rané fáze tmy. To zajišťuje, že za krátkého dne maximum transkriptů fytohormonů spadá na konec tmy, což se kryje s vnějším signálem, přechodem tma – světlo. Tehdy dochází k maximálnímu růstu. Tento mechanismus mimo jiné zajišťuje efektivní růst během krátkého dne na podzim, za včasného jara a také při podmínkách za sníženého světla/stínění (Michael et al., 2008a).

V rámci procesu indukce kvetení jsou signály z fotoreceptorů a vnitřních hodin integrovány prostřednictvím vnitřními hodinami řízeného genu *CONSTANS (CO)*. *CO* pak

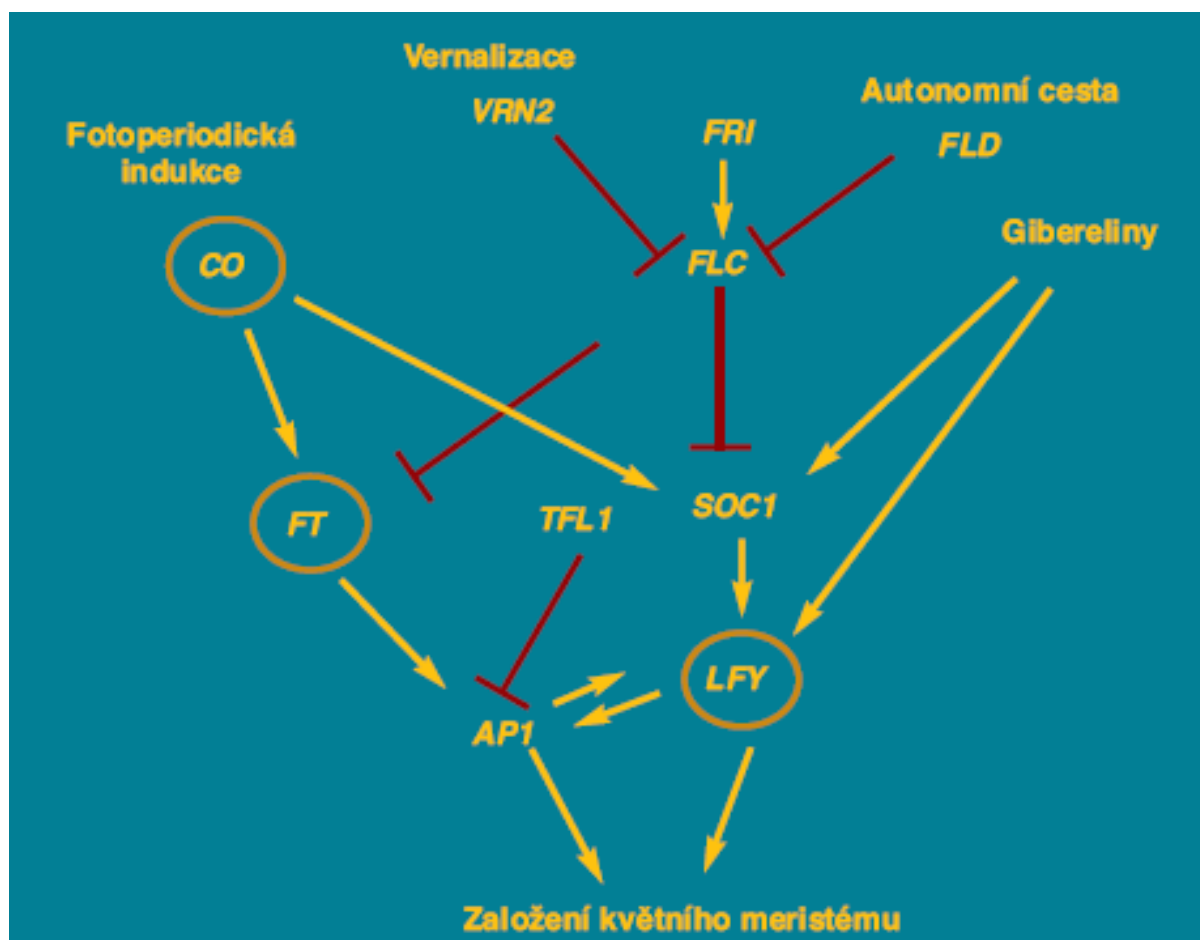
přenáší signál na další geny účastníci se indukce kvetení, jak bude popsáno v následující kapitole.



Obr. 1: Zjednodušené schéma vnitřních hodin *A. thaliana*. Mechanismus transkripčně translačních smyček založených na zpětné vazbě slouží k měření délky dne. CCA1 = CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1; LHY = LATE ELONGATED HYPOCOTYL; PRR = PSEUDORESPONSE REGULATOR; TOC1 = TIMING OF CAB 1; šipka - aktivační funkce genu; čára ve tvaru „T“ – inhibiční funkce genu; plná čára - přímá aktivace nebo inhibice; přerušovaná čára – aktivace zprostředkovaná dalšími geny; Štorchová, 2008

3.3.2. Signální dráhy účastníci se indukce kvetení v *Arabidopsis thaliana*

V posledních několika letech je snahou mnoha studií pochopení molekulárních základů kvetení. Ačkoli bylo identifikováno mnoho genů účastnících se tohoto procesu, stále je známo poměrně málo o jejich vzájemných vztazích. Načasování kvetení je na molekulární úrovni velmi složitě laděno na základě rovnováhy mezi induktivními a inhibičními signály (Blazques, 2000; Jack, 2004) (obr. 2).



Obr. 2: Vzájemné vztahy nejvýznamnějších genů různých signálních drah účastnících se indukce kvetení v *A. thaliana* (zjednodušené schéma). *AP1* = *APETALA 1*; *CO* = *CONSTANS*; *FLC* = *FLOWERING LOCUS C*; *FRI* = *FRIGIDA*; *FT* = *FLOWERING LOCUS T*; *LFY* = *LEAFY*; *SOC1* = *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*; *TFL1* = *TERMINAL FLOWER 1*; *VRN2* = *VERNALIZATION 2*; Žlutá šipka znázorňuje aktivační funkci genu, červená čára ve tvaru „T“ inhibující funkci genu. V kroužku jsou označeny geny mající klíčovou regulační funkci.

Jack, 2004 - upraveno

3.3.2.1. Signální dráha závislá na fotoperiodě

Světlo je vnímáno pomocí fytochromů a kryptochromů. PHYTOCHROME A (PHYA) (Johnson et al, 1994) je citlivý na dlouhovlnné červené světlo (700-760 nm), PHYTOCHROME B (PHYB) (Goto et al., 1991) na červené světlo (600-700 nm), kryptochromy CRYPTOCHROME 1 (CRY1) (Ahmad a Cashmore, 1993) a CRYPTOCHROME 2 (CRY2) (Guo et al., 1998) jsou citlivé k modrému světlu (400-500 nm). Signál o světle je vnášen do vnitřních hodin. Odtud je pak prostřednictvím genu *GIGANTEA* (*GI*) a jeho produktu přenášen na *CO* (Fowler et al., 1999; Park et al., 1999). U *gi*

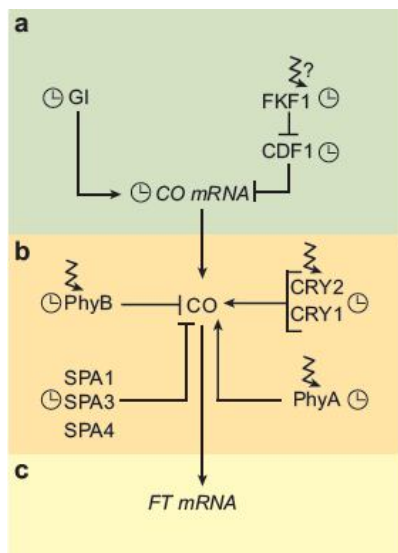
mutantů pozorujeme podstatně kratší cirkadiánní periodu a pozdější kvetení než u standardního genotypu.

Regulace exprese *CO* se odehrává jak na úrovni transkripce (1), tak posttranskripčně prostřednictvím stabilizace proteinu (2) (obr. 3).

(1) Vnitřními hodinami kontrolované geny *GI* (David et al., 2006) a *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* regulují expresi *CO*, přičemž *GI* je transkripčním aktivátorem a *CDF1* transkripčním inhibítoem *CO* (Shin et al., 2004). Vnitřními hodinami řízený FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1) zprostředkovává mechanismem závislým na proteazómu odpoledne degradaci *CDF1* proteinu (obr. 4a). Dále je prostřednictvím *CDF1* inhibována transkripce *CO*. Pokud je *CDF1* degradován, *CO* mRNA je stabilizována. *FKF1* se tak podílí na načasování transkripce *CO* v průběhu dne (Imaizuni et al., 2003; Imaizuni et al., 2005; Sawa et al., 2007). Hladiny *CO* mRNA v průběhu dne jsou zhruba stejné za dlouhého a krátkého dne, avšak vysoká hladina *CO* mRNA za dlouhého dne je na konci světelné fáze, za krátkého dne za tmy (obr. 4b).

(2) *CO* protein je za dlouhého i krátkého dne brzy ráno destabilizován prostřednictvím *PHYB* (Valverde et al., 2004) a je degradován *CO* ubiquitinací. Na konci dlouhého dne je *CO* naopak stabilizován *PHYA*, *CRY1* a *CRY2* (Valverde et al., 2004), což se však neděje za krátké fotoperiody, a tedy nedochází ke stabilizaci dostatečného množství *CO* proteinu (obr. 4c). Během noci je *CO* degradace závislá na přítomnosti SUPPRESSOR OF *PHYA*-105-1 (*SPA1*), *SPA3* a *SPA4* (Laubinger et al., 2006). Pouze za dlouhého dne tedy vzniká dostatečné množství *CO* proteinu, který aktivuje transkripci *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Turck et al., 2008) (obr. 4d).

Výše popsany mechanismus regulace kvetení je nazýván modelem externí koincidence. Regulace transkripce *CO* mRNA je řízena cirkadiánním rytmem. Ten je synchronizován světelným režimem. Světlo zároveň přímo ovlivňuje stabilitu a tedy i aktivitu *CO* proteinu (stabilita za dlouhého a nestabilita za krátkého dne). K pozitivní odezvě na fotoperiodu může tedy dojít pouze tehdy, pokud je rostlina v době, kdy je v listech syntetizováno maximum *CO* mRNA, zároveň vystavena světelné fázi rytmu. A k tomu dochází pouze za dlouhého dne.

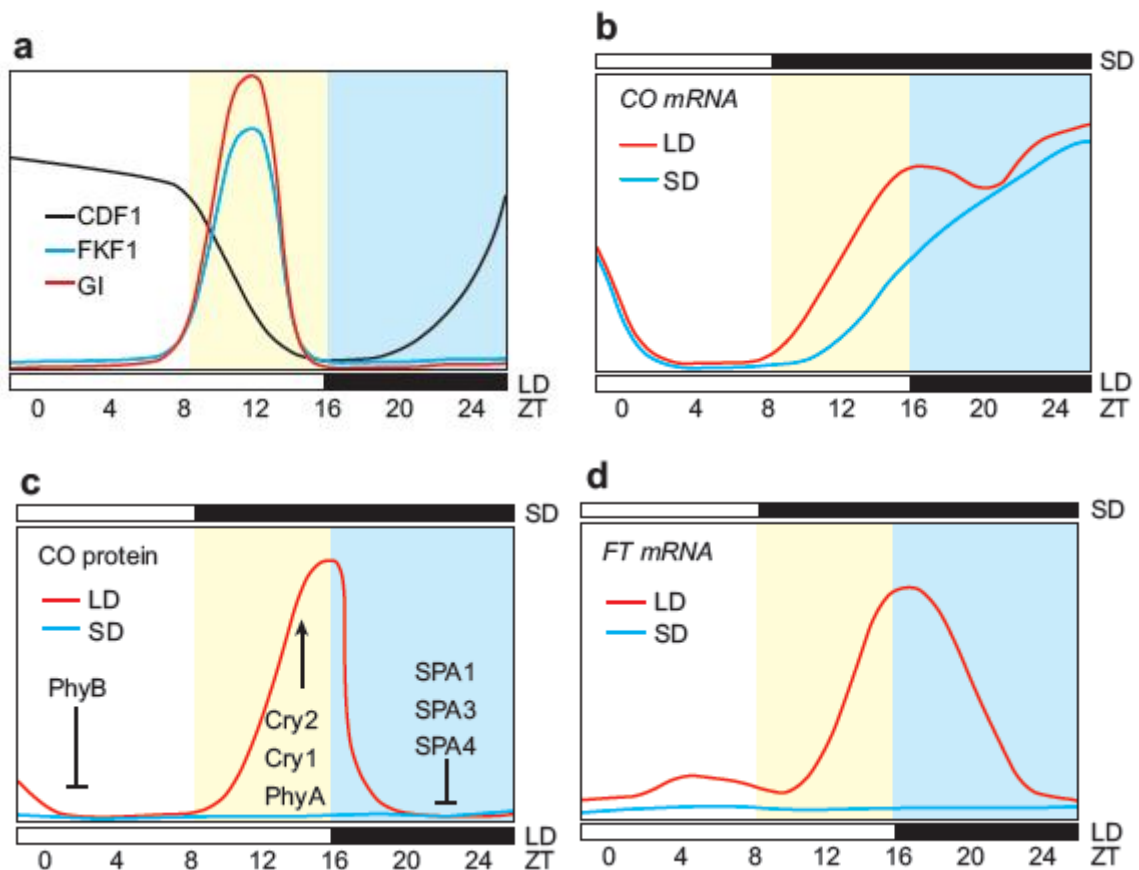


Obr. 3: Klíčová role CO proteinu v indukci kvetení spočívá v integraci signálů z více signálních drah.

- regulace *CO* mRNA na úrovni transkripce
- regulace *CO* na posttranskripční úrovni
- aktivace transkripce *FT*

CDF1 = CYCLING DOF FACTOR 1; CO = CONSTANS; CRY1 = CRYPTOCHROME 1; FKF1 = FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1; *FT* = *FLOWERING LOCUS T*; GI = GIGANTEA; PhyA = PHYTOCHROME A; PhyB = PHYTOCHROME B; SPA1 = SUPPRESSOR OF PHVA-105-1; Schématem hodin jsou označeny geny, jejichž exprese je řízena vnitřními hodinami.

Turck et al., 2008



Obr. 4: Expresní profily nejdůležitějších komponent signální dráhy indukce kvetení závislé na fotoperiodě. CDF1 = CYCLING DOF FACTOR 1; CO = CONSTANS; CRY1 = CRYPTOCHROME 1; FKF1 = FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1; *FT* = *FLOWERING LOCUS T*; GI = GIGANTEA; PhyA = PHYTOCHROME A; PhyB = PHYTOCHROME B; SPA1 = SUPPRESSOR OF PHVA-105-1; LD = dlouhodobá fotoperioda, SD = krátkodobá fotoperioda, ZT = čas v hodinách; bílá oblast grafu = fáze světla v LD i SD; žlutá oblast grafu = fáze světla za LD, ale fáze tmy za SD; modrá oblast grafu = fáze tmy za LD i SD; Turck et al., 2008

FT je další klíčový gen signální dráhy indukce kvetení závislé na fotoperiodě. Aktivuje kvetení (Kardailsky et al., 1999) a také integruje signály z jiných signálních drah (Lee et al., 2006). Současné studie naznačují, že dlouho hledaným florigenem by mohl být právě *FT* protein (Jaeger a Wigge, 2007; Tamaki et al., 2007; Yang et al., 2007). Naopak blízkce příbuzný *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* působí jako inhibitor kvetení proti funkci *FT*. Jejich společným cílem je *APETALA1 (API)*, gen zodpovědný spolu s *LEAFY (LFY)* za nastartování přeměny vegetativního meristému v květní meristém (obr. 2).

A. thaliana vykvete i za neinduktivní fotoperiody (krátkého dne), avšak později a za účasti jiného mechanismu, jak bude popsáno v následujících dvou kapitolách.

3.3.2.2. Vernalizační a autonomní signální dráha

Vernalizace je aktivace kvetení vystavením rostliny nízkým teplotám po několik dnů (Chouard, 1960). Signály z vernalizační a autonomní signální dráhy jsou integrovány genem *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Michaels a Amasino, 1999; Sheldon et al., 2000; Rouse et al., 2002). *FLC* je aktivován produktem genu *FRIGIDA (FRI)* (Johanson et al., 2000), který spoluzodpovídá za rozdílné požadavky různých ekotypů *A. thaliana* na vernalizaci. *FLC* je represorem kvetení působícím proti aktivaci *FT* prostřednictvím *CO* genu a také inhibuje *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* (Kardailsky et al., 1999), který integruje signály z vernalizační a geberelinové dráhy (Moon et al., 2003). Některé studie z poslední doby naznačují existenci genetické hierarchie mezi *FT* a *SOC1*, kdy *FT* aktivuje *SOC1* (Schmid et al., 2003; Michaels et al., 2005; Moon et al., 2005; Lee et al., 2006). Pokud rostlina neprojde vernalizací, *SOC1* je inhibován *FLC* a nedochází ke kvetení. *FLC* je po několikadenním působení nízkých teplot (vernalizaci) inhibován produktem genu *VERNALIZATION 2 (VRN2)* (Gendall et al., 2001), *SOC1* přestane být inhibován a aktivuje *LEAFY (LFY)*. *FLC* může taktéž být inhibován produktem genu *FLOWERING LOCUS D (FLD)* z autonomní dráhy, zprostředkovávající indukcí kvetení vyvolané stářím rostliny/počtem listů (He et al., 2003). *SOC1* pak aktivuje transkripční faktor *LEAFY (LFY)*.

LFY je aktivován nejen *SOC1*, ale i gibereliny a *API* (Abe et al., 2005), a tedy integruje výstupní signály ze všech signálních drah účastnících se indukce kvetení (Nilsson et al., 1998). Spolu s *API* je zodpovědný za přechod z vegetativní do generativní fáze a ovlivňuje vývoj květu (Schultz a Haughn, 1991).

3.3.2.3. Gibereliny

Rostlinné hormony gibereliny přímo aktivují geny *SOCI* a *LFY* (Blazquez et al., 1998; Blazques a Weigel, 2000), tedy aktivátory kvetení. Uplatňují se však v indukci kvetení především při krátké fotoperiodě (Wilson et al., 1992). *LFY* a *API* se aktivují navzájem (Liljegren et al., 1999) a taktéž indukují transkripci genů zodpovědných za zakládání květních orgánů (Ng a Yanofsky, 2001).

3.3.2.4. Účinek microRNA

V současné době je výzkum regulace genové exprese soustředěn na microRNA (miRNA). miRNA jsou nekódující cca 21-22 nukleotidů dlouhé RNA, které inhibují mRNA kódující proteiny (Llave et al., 2002; Reinhart et al., 2002). miRNA byly nalezeny u rostlin i živočichů a byla prokázána jejich účast v rámci regulace vývojových procesů u obou skupin organismů.

Biogeneze miRNA z *MIR* genů probíhá v několika krocích. V jádře 1) je *MIR* gen transkribován do primární miRNA (pri-miRNA), sekvence o několika stovkách bází. Tohoto kroku se účastní Pol II enzymy. 2) pri-miRNA je štěpena na 70-200 nt dlouhý miRNA prekurzor se strukturou vlásenky (pre-miRNA). Enzym účastnící se tohoto procesu je u živočichů nazýván Drosha RNase III endonuclease (Bartel, 2004), u rostlin Dicer-like 1 enzyme (DCL1) (Tang et al., 2003). 3) pre-miRNA je u živočichů exportována z jádra. V cytoplazmě dochází štípáním pre-miRNA pomocí RNase III-like enzymu (nazývaného Dicer) ke tvorbě miRNA:miRNA duplexu a posléze ke tvorbě a konečných miRNA. U rostlin je pre-miRNA štípána na miRNA:miRNA duplex v jádře, zřejmě pomocí Dicer-like 1 (DCL1). Dvouvláknové miRNA jsou transportovány do cytoplazmy. V cytoplazmě 4) jsou duplexy rozvinuty helikázami (Zhang et al., 2006). Nakonec hotové miRNA účinkují jako součást ribonukleoproteinového komplexu zvaného RNA-induced silencing complex (RISC) (Bartel, 2004). RISC komplex se díky komplementaritě miRNA váže na cílovou mRNA. To způsobí umlčení exprese genu, což u rostlin nazýváme post-transcriptional gene silencing (PTGS) (Baulcombe, 2004). Mechanismus účinku RISC komplexu je dvojitý: a) navázání RISC komplexu zabraňuje translaci mRNA; b) navázaný RISC komplex přímo štípe mRNA.

U *A. thaliana* byla prokázána účast miRNA v regulaci indukce kvetení a vývoje květu. miR159 se účastní štěpení mRNA kódujících *GAMYB* proteiny. *GAMYB* jsou transkripčními faktory, které za krátkého dne aktivují *LEAFY* v rámci giberelinové signální dráhy indukce kvetení. *GAMYB* se taktéž účastní regulace vývoje prašníků. Zvýšená exprese

transgenu miR159 ústí v nízké hladiny *LFY*, opožd'uje kvetení za krátké fotoperiody a působí změny ve stavbě květu (Achard et al., 2004).

APETALA2-like (*AP2-like*) geny jsou transkripční faktory specififikující identitu kališních lístků a koruny. miR172 inhibuje *AP2-like* geny a cíle genu *APETALA2* (*AP2*), inhibitory kvetení *TOE1* a *TOE2*. Mechanismem je zde spíše inhibice translace, než štěpení cílových sekvencí mRNA. Zvýšená exprese transgenu miR172 vede k časně kvetoucímu fenotypu, stejně jako u *ap2* mutantů (Aukerman a Sakai, 2003; Chen, 2004).

miR156 inhibuje expresi genů *SQUAMOSA promoter binding protein like* (*SPL*), které kódují transkripční faktory. Např. *SPL3* se účastní přechodu z vegetativní do generativní fáze a regulace kvetení. Zvýšená exprese transgenu miR156 opožd'uje přechod do generativní fáze a mírně opožd'uje dobu kvetení (Schwab et al., 2005). miR156 a miR172 působí proti sobě. První z nich prodlužuje vegetativní fázi, druhá ji zkracuje. Mutace v *MIR* genech mají zásadní účinek.

3.4. Molekulární základy indukce kvetení u rýže (*Oryza sativa*)

Další modelovou rostlinou ve studiu kvetení je rýže, jednoděložná rostlina z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) z řádu Poales. Jde o kulturní plodinu, která slouží jako základní potravina pro tři miliardy lidí. Původní rýže se kultivací rozlišila na tři typy: javanica, indica a japonica, a ačkoliv byla původně obligátní krátkodenní rostlinou, pro přežití v různých podmínkách vytvořila i fakultativní krátkodenní a neutrální genotypy (Lee a An, 2007).

V poslední době byly v krátkodenní rýži identifikovány ortology téměř všech genů účastnících se indukce kvetení v *A. thaliana*. Ačkoli jsou tyto ortology mezi rýží a *A. thaliana* vysoce konzervované a jejich funkce jsou obdobné, některé geny (převážně se účastnící fotoperiodické regulace kvetení) působí jinak. V úplně přečteném genomu rýže nebyly nalezeny homology *FLC*, *FRI* a naopak byly popsány geny se vztahem ke kvetení, které nemají obdobu v *A. thaliana*, např. *EARLY HEADING DATE 1* (*Ehd1*) (Doi et al., 2004).

3.4.1. Vnitřní hodiny rýže

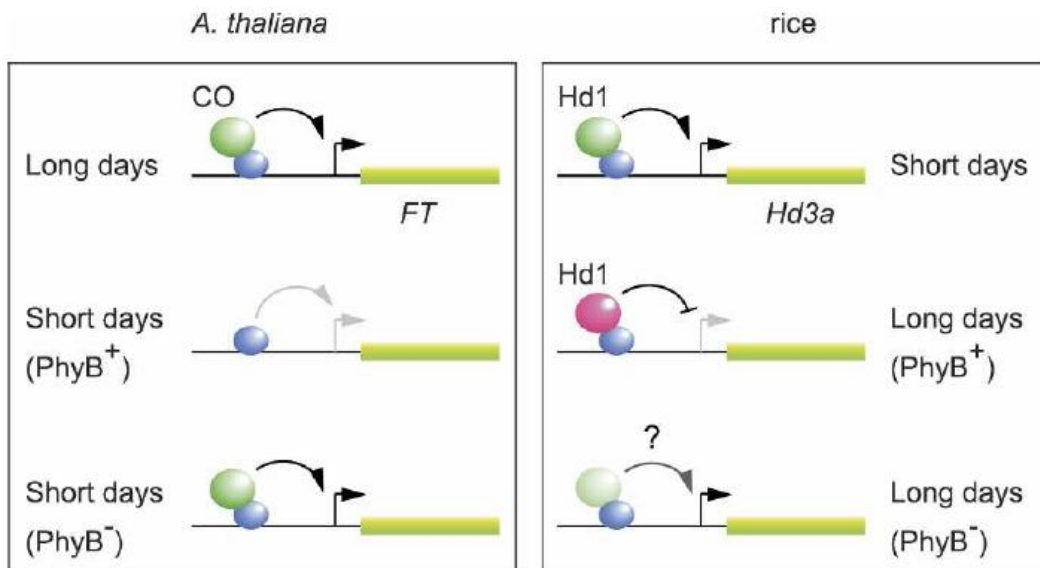
I v krátkodenní rýži byly identifikovány geny transkripčně translačního mechanismu zpětnovazebných smyček vnitřních hodin. Jejich počet ovšem není vždy stejný jako v *A.*

thaliana. Například ke dvěma genům *LHY* a *CCA1* v *A. thaliana* byl v rýži nalezen pouze jeden ortologní gen *OsLHY* (Izawa et al., 2002), který vykazuje cirkadiánní rytmus a podobný expresní profil jako *LHY*.

3.4.2. Signální dráhy účastníci se indukce kvetení u rýže

3.4.2.1. Signální dráha závislá na fotoperiodě

Rýže má oproti dvěma kopiím kryptochromů v genomu *A. thaliana* tři receptory modrého světla *OsCRY1a*, *OsCRY1b* a *OsCRY2* (Hirose et al., 2006) a oproti pěti kopiím fytochromů tři kopie *OsPHY*, které vnášejí signál o světle do vnitřních hodin. Ortolog *OsGI* v rýži (Hayama et al., 2002), stejně jako *GI* v *A. thaliana*, zprostředkovává výstup signálu z vnitřních hodin (Izawa et al., 2003) na *HEADING DATE 1 (Hd1)* (Yano et al., 2000), ortolog *CO*, který dále ovlivňuje transkripci *HEADING DATE 3a (Hd3a)* (Kojima et al., 2002; Kim et al., 2007), ortologu *FT*. Způsob regulace je ovšem jiný než v *A. thaliana*. *Hd1* hraje stejnou roli jako *CO* v dlouhodobí *A. thaliana* (Yano et al., 2000). Působí tedy jako aktivátor *Hd3a* za induktivní fotoperiody (krátkého dne). Avšak oproti *A. thaliana* navíc za neinduktivních podmínek (dlouhého dne) inhibuje *Hd3a* (Kojima et al., 2002). V *A. thaliana* je za neinduktivní fotoperiody (krátkého dne) *CO* protein destabilizován prostřednictvím *PHYB* a nedochází k aktivaci transkripce *FT*. Naproti tomu v rýži je za neinduktivní fotoperiody (dlouhého dne) *Hd1* protein syntetizován na světle za účasti fytochromu *OsPHYB*. Výsledkem je pozměněná forma *Hd1*, která inhibuje transkripci *Hd3a* (Kobayashi a Weigel, 2007) (obr. 5).



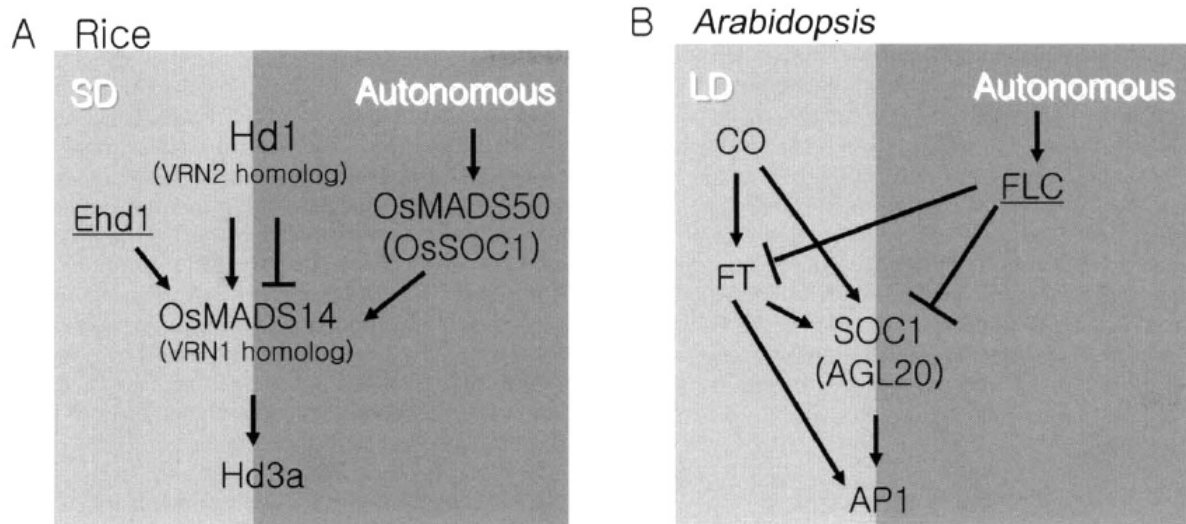
Obr. 5: Srovnání funkce ortologů CO v dlouhodobí *A. thaliana* a Hd1 v krátkodenní rýži. V *A. thaliana* je CO protein za dlouhého dne stabilizován a syntetizován v dostatečném množství a aktivuje transkripci *FT*. Za krátkého dne je destabilizován prostřednictvím PHYB (na obrázku PhyB^+) a nedochází k transkripci *FT*. V rýži je za krátkého dne syntetizováno dostatečné množství Hd1 a ten aktivuje transkripci *Hd3a*. Za dlouhého dne je Hd1 za účasti OsPHYB (na obrázku PhyB^+) syntetizován v pozměněné formě (červenou barvou), která inhibuje transkripci *Hd3a*. V *phyB/osphyB* mutantech (na obrázku PhyB^-) dochází v obou druzích rostlin k aktivaci kvetení i za neinduktivní fotoperiody, ovšem z různých důvodů. V *A. thaliana* není CO destabilizován nefunkčním *phyB* a aktivuje *FT*. V rýži *osphyB* nemodifikuje Hd1, a tedy nedochází k inhibici *Hd3a* a syntetizovaná forma Hd1 snad i aktivuje *Hd3a* (označeno otazníkem). CO = CONSTANS; *FT* = *FLOWERING LOCUS T*; Hd1 = *HEADING DATE 1*; *Hd3a* = *HEADING DATE 3a*; PHYB = PHYTOCHROME B; PhyB^- = *phyB/osphyB*, nefunkční gen PHYB/OsPHYB u *A. thaliana* respektive rýže; CO/Hd1 patrně interagují s *FT/Hd3a* skrze další proteiny (označeno modře).

Kobayashi a Weigel, 2007

Některé studie kvetení *A. thaliana* naznačují, že *SOC1* je cílem *FT* (Schmid et al., 2003; Michaels et al., 2005; Moon et al., 2005; Lee et al., 2006;) a *API* je pak aktivováno prostřednictvím *FT* i *SOC1*. Naproti tomu u rýže se *OsmADS14* (homolog *API*) zdá být prostředníkem signálu mezi *Hd1* a *Hd3a* při krátké fotoperiodě a zároveň při dlouhé fotoperiodě integruje signály od *Hd1* a z autonomní signální dráhy od *OsSOC1* (Lee a An, 2007). Navíc u rýže existuje alternativní indukční dráha účinkující za krátkého dne, která je nezávislá na *Hd1*, kdy *EARLY HEADING DATE 1* (*Ehd1*) aktivuje *OsmADS14* a ten indukuje *Hd3a* (Doi et al., 2004) (obr. 6).

3.4.2.2. Autonomní signální dráha

Rýže kvete i na stálém dlouhém dni a hlavním aktivátorem kvetení autonomní signální dráhy je *OsSOC1* (*OsMADS50*) (Lee et al., 2004). Role *OsSOC1* (*OsMADS50*) v rýži se tedy zdá být jiná než funkce jeho homologu *SOC1* v *A. thaliana*. V rýži nebyly nalezeny homology *FLC* a *FRI* z *A. thaliana* a autonomní dráha v rýži je tedy zřejmě integrována přímo *OsSOC1*. Zdá se, že za dlouhého dne existuje kompetice mezi signály z *OsSOC1* (aktivuje) a *Hd1* (inhibuje), které integruje *OsMADS14* (homolog *API*) (obr. 6). Zvýšená exprese transgenu *FLC* z *A. thaliana* v rýži vede k opožděnému kvetení (Noh a Noh, 2006), a tak není vyloučena existence jiného inhibitoru kvetení funkčně odpovídajícího *FLC*.



Obr. 6: Rozdílné vztahy genů fotoperiodické a autonomní signální dráhy indukce kvetení u rýže a *A. thaliana*. V rýži za krátkého dne hraje *API* homolog *OsMADS14* roli zprostředkovatele signálu mezi *Hd1* a *Hd3a*. Taktéž se účastní alternativní dráhy fotoperiodické indukce kvetení nezávislé na *Hd1*, kde účinkuje *Ehd1*. Za dlouhého dne integruje inhibiční signál přicházející z *Hd1* a aktivační signál přicházející z *OsSOC1* účinkujícího v autonomní signální dráze. Obdobný mechanismus mezi *Hd1* a *OsMADS14* byl nalezen u ozimé pšenice, kde *VRN1* aktivuje kvetení, které je pod kontrolou *VRN2* (nejedná se o homology genů *VRN1* a *VRN2* v *A. thaliana*, pouze jména se shodují). Vztahy genů v *A. thaliana* byly popsány v kapitolách 3.3.2.1. a 3.3.2.2. *AGL20* = *AGAMOUS-LIKE 20*; *API* = *APETALA 1*; *CO* = *CONSTANS*; *Ehd1* = *EARLY HEADING 1*; *FLC* = *FLOWERING LOCUS C*; *FT* = *FLOWERING LOCUS T*; *Hd1* = *HEADING DATE 1*; *Hd3a* = *HEADING DATE 3a*; *SOC1* = *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*; *OsMADS14* = *API* homolog v rýži; *VRN1* = *VERNALIZATION1*; *VRN2* = *VERNALIZATION2*;

Lee a An, 2007

3.4.2.3. Vernalizace

Na molekulární úrovni je signální dráha spojená s vernalizací u rýže méně zřetelná než u *A. thaliana*. V genomu rýže nebyly nalezeny homology *FLC* a *FRI*, což by mohlo naznačovat jejich pozdější adopci do genomu *A. thaliana* jako adaptaci na nízké teploty. Na druhou stranu *OsMADS50* (*OsSOC1*) a *OsMADS14* (homolog *API*) jsou homologní ke genům účastnícím se vernalizace u pšenice (Yan et al., 2004). Také bylo ukázáno, že např. *Hdl* zapojený do fotoperiodické indukce kvetení reaguje na teplotu těsně před započítím kvetení (Nakagawa et al., 2005), což odpovídá dřívějším zjištěním, že teplota těsně před započítím kvetení může silně ovlivnit dobu kvetení, a to zvláště u kultivarů citlivých k fotoperiodě (Shibata et al., 1973; Yin et al., 1997).

3.5. Molekulární základy indukce kvetení u *Pharbitis nil*

Další tradiční modelovou rostlinou používanou ke studiu kvetení je krátkodenní povijnice nachová (*Ipomoea nil*, L., dříve nazývaná *Pharbitis nil*) z čeledi svlačcovitých (*Convolvulaceae*) z řádu Solanales. V současné době je k dispozici částečně přečtený genom *Pharbitis nil*. Fyziologické experimenty ukázaly, že indukce kvetení je u *P. nil* určena spíše délkou noci, než délkou dne. Jednotlivé ekotypy mají různé nároky na kritickou délku noci indukující kvetení - podle zeměpisné šířky, ve které rostou (Imamura et al., 1966). Na stálém světle zůstávají rostliny vegetativní a pouhá jedna dostatečně dlouhá fáze tmy stačí k indukci kvetení. *P. nil* je rostlina, která může být (stejně jako *Chenopodium rubrum*) indukována ke kvetení ve stádiu semenáčku, ihned po plném otevření děloh (Imamura, 1967). K indukci kvetení v tomto stádiu postačí jedna tma dlouhá 14 hodin.

3.5.1. Signální dráha závislá na fotoperiodě

Mechanismus řízení exprese *FT* ortologů se ve *P. nil* odlišuje od rýže i *A. thaliana*. Cirkadiánní rytmus, zde nazývaný rytmus fotoperiodické odezvy, je započat přechodem z fáze světla do fáze tmy a trvá dále za tmy. Trvá-li tma delší než kritickou dobu, mechanismy kontrolované tímto rytmem indukují kvetení. Pokud je fáze tmy přerušena krátkou dobou světla (tzv. night-break, kapitola 3.8.), indukce kvetení je zrušena.

V *P. nil* byl identifikován *PnCO* (Liu et al., 2001), ortolog *CO*, *PnCOL1* (Kim et al., 2003), homolog *CO*, a dva ortology *FT*, *PnFT1* a *PnFT2* (Hayama et al., 2007). Vysoká hladina *PnCO* mRNA je po 14 hodinách od začátku fáze tmy, a to pouze za stálé tmy nebo pokud tma trvá alespoň 14 hodin. Gen *Pharbitis nil CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN* (*PnCAB*) je molekulárním markerem vnitřních hodin. *PnCAB* je exprimován rytmicky za světla i tmy. Za tmy se fáze exprese *PnCAB* a *PnCO* posouvá vůči začátku tmy v závislosti na tom, jak dlouhá byla fáze světla před započítáním tmy. Naproti tomu maximum exprese *PnFT* nacházíme v konstantní dobu po začátku tmy bez ohledu na délku předchozí fáze světla. *PnCO* a *PnCAB* podléhají tedy jiné kontrole fotoperiodou než *PnFT*.

Transkripce *PnFT1* a *PnFT2* je aktivována pouze za induktivní fotoperiody (krátkého dne), kdy fáze tmy trvá déle než 11 hodin, a *PnFT1* a *PnFT2* mRNA je syntetizována vždy ve stejnou dobu po začátku tmy. Jednotlivé kultivary *Pharbitis* s různou kritickou délkou noci transkribují *PnFT* v různé době po přechodu ze světla do tmy. Za stálé tmy podléhá transkripce *PnFT1* a *PnFT2* cirkadiánnímu rytmu. Amplituda rytmu exprese *PnFT* genů je za stálé tmy srovnatelná s amplitudou rytmu exprese za induktivní fotoperiody 10 hodin světlo/14 hodin tma.

Maxima *PnCO* a *PnFT* mRNA se za krátké fotoperiody kryjí. To však přestává platit s prodlužující se dobou, po kterou byly rostliny na světle před umístěním do tmy. *PnFT1* a *PnFT2* v *P. nil* se tedy nezdají být regulovány *PnCO*, ale neznámým genem CCG (clock-controlled gene) kontrolovaným cirkadiánními hodinami, které jsou zapnuty začátkem tmy. Za dlouhého dne (a krátké noci) se netvoří dostatečné množství *PnFT* mRNA, protože není dostatečné množství produktu hypotetického genu CCG. Potřebné množství hypotetického CCG je exprimováno pouze při dostatečně dlouhé noci (tedy za krátkého dne) (Hayama et al., 2007). Pokusy na *Pharbitis nil* ukazují, že mechanismus kontroly indukce kvetení je u různých rostlinných druhů variabilní.

3.5.2. Gibbereliny

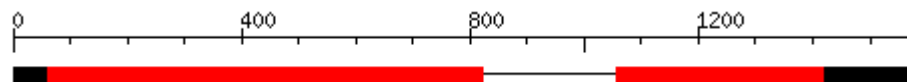
V *P. nil* je při plně induktivní fotoperiodě (8 hodin světlo/16 hodin tma) obsah giberelinů zvýšen v průběhu fáze tmy. Nejvyšší obsah giberelinů se vyskytuje na začátku a uprostřed fáze tmy. Exogenní gibereliny aplikované na dělohy neindukovaných rostlin nenahrazují induktivní fotoperiodu, ale při suboptimální fotoperiodě (12 hodin světlo/12 hodin tma) stimulují intenzitu kvetení. 2-chloroethyltrimethylammonium chlorid je

inhibitor biosyntézy giberelinů a pokud je aplikován v průběhu induktivní 16 hodin trvající tmy, má inhibiční efekt na kvetení. Tento efekt je zrušen aplikací exogenních giberelinů. Kvetení je utlumeno též vystavením rostlin patnácti minutám dlouhovlnného červeného světla (far red, 700 - 760 nm) těsně před induktivní tmou trvající 24 hodin. Podání exogenních giberelinů však tuto inhibici kvetení zvrátí (Kulinowska-Gulewska et al., 2000).

3.6. Klíčové geny účastníci se fotoperiodické indukce kvetení u *A. thaliana*

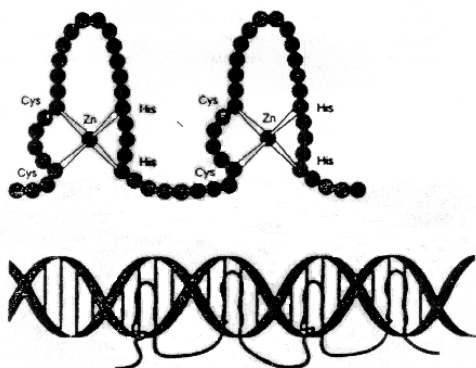
3.6.1. *CONSTANS-like (COL)* geny

V *A. thaliana* patří *CO* (Putterill et al., 1995) do početné *CONSTANS-like (COL)* genové rodiny kódující proteiny s doménou zinkového prstu (obr. 8), která čítá sedmnáct členů. Struktura *CO* genu sestává ze dvou exonů a jednoho intronu (obr. 7).



Obr. 7: Struktura *CO* genu v *A. thaliana*. Červenými bloky jsou vyznačeny exony, černou čarou intron a černé bloky znázorňují nepřekládané oblasti genu (UTR). Čísla na horní ose odpovídají párům bází DNA (bp).

The Institute for Genomic Research (TIGR), Rockville, MD 20850, USA, www.tigr.org



Obr. 8: Doména zinkového prstu je DNA vazebná struktura tvořena iontem zinku nekovalentně interagujícím se dvěma histidiny a dvěma cysteiny.

CO byl identifikován jako klíčový gen signální dráhy závislé na fotoperiodě (Suarez-Lopez et al., 2001). Pojmenování *CONSTANS* pochází ze zjištění, že *co* mutanty kvetou v přibližně stejný (konstantní) čas na dlouhém i krátkém dni, tedy kvetení je opožděno na dlouhém, nikoli však na krátkém dni (Koornneef et al., 1991). *CO* je exprimován v průběhu vývoje, v dospělých rostlinách převážně ve floému listů, kde je *CO* protein zapojen do

vnímání délky dne (An et al., 2004), a dále ve stoncích. Byla také potvrzena významná exprese *CO* ve vzrostném vrcholu. Na druhou stranu v květech, šesulích a kořenech jsou nízké hladiny *CO* mRNA (Ledger et al., 2001). Jak bylo popsáno v kapitole 3.3.2.1., v rámci induktivní fotoperiody, hladina *CO* mRNA kolísá s maximem od půli tmy do úsvitu. Situace za krátkého dne je podobná, kdy maximum hladiny *CO* mRNA je menší a užší. Bylo však ukázáno, že pro tvorbu *CO* proteinu je určující nejenom množství *CO* mRNA, ale také její výskyt v průběhu světelné fáze. Vysoké hladiny *CO* mRNA v průběhu světelné fáze neinduktivní fotoperiody u standardního genotypu vedou k indukci kvetení (Roden et al., 2002; Yanovsky a Kay, 2002).

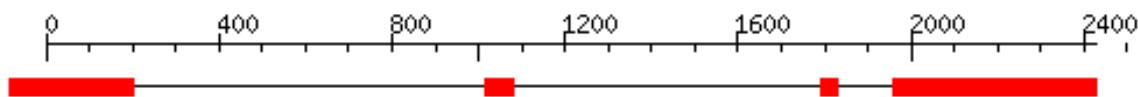
COL proteiny byly rozříděny do tří skupin podle podobnosti na základě přítomnosti strukturálních motivů nazývaných B-box (doména zinkového prstu) a CCT (*CONSTANS*, *CO-LIKE*, *TIMING OF CAB1*) domény (Putterill et al., 1995; Robson et al., 2001). První skupina zahrnuje proteiny se dvěma B-box doménami (*CO*, *COL1* - *COL5*). Proteiny patřící do druhé skupiny (*COL9* - *COL15*) taktéž obsahují dvě domény zinkového prstu, druhá z nich je však více odlišná od té, kterou nacházíme v *CO*. Třetí skupina proteinů (*COL6* – *COL8* a *COL16*) nese pouze jednu B-box doménu. CCT doménu nacházíme u všech zástupců rodiny a byla potvrzena její důležitost pro funkci *COL* proteinů (Griffiths et al., 2003; Shin et al., 2004). *CO* protein postrádá DNA vazebnou doménu a funguje zřejmě jako transkripční kofaktor (Ben-Naim et al., 2006).

Funkční studie *COL1* a *COL2* genů *A. thaliana* prokázaly jejich regulaci cirkadiánním rytmem s maximem hladiny mRNA okolo úsvitu. Na rozdíl od zvýšené exprese *CO*, která urychluje kvetení, zvýšená exprese *COL1* a *COL2* nemá téměř žádný vliv na dobu kvetení. (Harmer et al., 2000; Ledger et al., 2001). Funkčně se *COL1*, *COL2* a *CO* v rámci kontroly indukce kvetení nepřekrývají, ačkoli jsou podobné strukturně i svými expresními profily. *COL3* a *COL9* zřejmě fungují jako represory kvetení (Cheng a Wang, 2005; Datta et al., 2006).

3.6.2. FLOWERING LOCUS T-like (FTL) geny

FLOWERING LOCUS T (FT) (Kardailsky et al., 1999) kóduje malý protein o cca 175 aminokyselinách (21 kDa) podobný savčímu PEBP (phosphatidyl ethanolamine-binding protein) (Schoentgen et al., 1987). *FT* patří do malé genové rodiny regulátorů kvetení, která v

A. thaliana čítá celkem šest genů, přičemž *FT* vystupuje jako aktivátor kvetení. Struktura *FT* genu sestává ze čtyř exonů a tří intronů (obr. 9).



Obr. 9: Struktura *FT* genu v *A. thaliana*. Červenými bloky jsou vyznačeny exony, černou čarou introny. Čísla na horní ose odpovídají párům bází DNA (bp).

The Institute for Genomic Research (TIGR), Rockville, MD 20850, USA, www.tigr.org

Nejbližším příbuzným *FT* je *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, který je redundantním aktivátorem kvetení spolu s *FT* (Yamaguchi et al., 2005), ale účinkuje za jiných okolních podmínek. *TSF* je při nižší teplotě (16°C) exprimován více než *FT* (Blazquez et al., 2003) a také se účastní indukce kvetení za krátkého dne (Yamaguchi et al., 2005).

TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) (Bradley et al., 1997; Ohshima et al., 1997) je inhibítorem kvetení, ačkoli vykazuje vysokou sekvenční podobnost k *FT*. Bylo ukázáno, že za antagonistickou aktivitu TFL1 proteinu je zodpovědná asparagová kyselina v pozici 144 a histidin v pozici 88 (Hanzawa et al., 2005; Ahn et al., 2006) a tyto aminokyseliny jsou na uvedených pozicích konzervovány ve všech proteinech FT/TFL1 rodiny, které inhibují kvetení, včetně dalšího člena rodiny *A. thaliana CENTRORADIALIS homologue (ATC)* (Mimida et al., 2001).

MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT) je slabým induktorem kvetení (Kobayashi et al., 1999; Yoo et al., 2004). Zvýšená exprese *MFT* neovlivňuje expresi *FT* a *TFL1* a *mft* mutanty při induktivní fotoperiodě nevykazují pozdější kvetení (Yoo et al., 2004). O funkci posledního člena rodiny *BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)* (Kobayashi et al., 1999) se neví téměř nic.

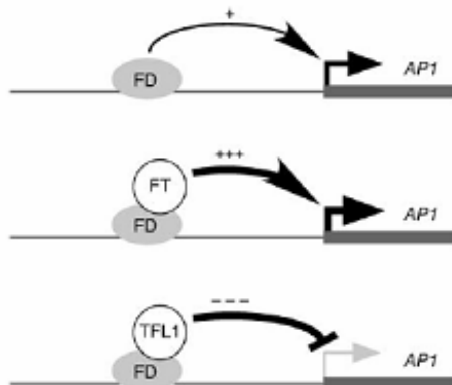
V *A. thaliana* jsou *FT* a *TSF* exprimovány především ve floému. In situ hybridizace lokalizovala *FT* mRNA v průvodních buňkách sítkovic. Vysoké hladiny *FT* mRNA byly nalezeny v listech a dělohách, nikoli v apexu (Wigge et al., 2005). Za induktivní fotoperiody *ft* mutanty kvetou opožděně a za krátkého dne je kvetení opožděno pouze nepatrně (Kardailsky et al., 1999).

Ačkoli jsou si zástupci FT/TFL1 rodiny sekvenčně velmi podobní, vystupují jako aktivátory i inhibitory kvetení. Srovnání aminokyselinové sekvence FT, TFL1 a MFT vypovídá o 36%-ní identitě a 68% sekvence obsahuje aminokyseliny o stejné biochemické funkci (Yoo et al., 2004). Studie chimérických *FT-TFL1* genů *A. thaliana* ukázala oblast

zodpovědnou za antagonistické aktivity FT a TFL1 proteinů lokalizovanou do segmentu čítajícího čtrnáct aminokyselin, který se vyvíjí velmi rychle u TFL1 ortologů, ale je téměř neměnný u FT ortologů. Tento segment tvoří povrchovou variabilní smyčku s místem pro vazbu anionu/ligandu a je kódovaný částí čtvrtého exonu. Tyrosin v pozici 85 v FT a histidin na odpovídajícím místě v pozici 88 u TFL1 se nacházejí na konci místa vázícího anion/ligand a jsou klíčové pro opačné aktivity FT a TFL1 proteinů. Záměnná mutace Tyr85His v FT má ve standardním genotypu silně inhibující efekt na kvetení, ale slabě urychluje kvetení v *ft tfl1* dvojitým mutantu. Taktéž bylo ukázáno, že glutamin v pozici 140 v FT a asparagová kyselina na odpovídajícím místě 144 v TFL1 zcela odlišují FT od TFL1 (Ahn et al., 2006). FT proteiny tvoří monofyletickou skupinu, na rozdíl od TFL1 proteinů, které mají polyfyletický původ (Mimida et al., 2001).

FT a TFL1 jsou kotranskripčními faktory proteinu FLOWERING LOCUS D (FD) (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). FD je transkripční faktor, který se váže na promotory genů exprimovaných v květech. FD je považován za slabý aktivátor kvetení, přičemž interakcí s FT nebo TFL1 se stává silným aktivátorem, respektive represorem. V rámci vazby FD mohou FT a TFL1 též vázat koaktivátor nebo korepresor (Ahn et al., 2006). Primárním cílem FT-FD komplexu je *APETALA1* (*AP1*) (Wigge et al., 2005) (obr. 10).

FD je na rozdíl od *FT* exprimován pouze ve vzrostném vrcholu, kde jeho expresi inhibuje *FLC*. Taktéž bylo ukázáno, že stimulus k utváření květů se neobejde bez *FD*.



Obr. 10: Interakce FD s FT a TFL1 a vazba *AP1* promotoru.

AP1 = *APETALA 1*; *FD* = FLOWERING LOCUS D; *FT* = FLOWERING LOCUS T; *TFL1* = TERMINAL FLOWER 1;

+ = slabá aktivace; +++ = silná aktivace; --- = silná inhibice;

Ahn et al., 2006

Sekvence a funkce *FT* a *TFL1* je v rámci vyšších rostlin konzervována (Kojima et al., 2002; Carmel-Goren et al., 2003; Hecht et al., 2005; Hsu et al., 2006), méně informací je však v tomto ohledu známo o ostatních členech *FT/TFL1* rodiny. Na základě uplatňování různých

životních strategií (letnička, trvalka) a forem (rostlina, keř, strom) se mohly vyvinout různé členy *FT/TFL1* rodiny a zaujmout různé funkce. Jeden z mechanismů, který dává vzniknout více *FT* kopiím je polyploidizace, běžná u vyšších rostlin (Aagaard et al., 2005). Je považována za jednu z hlavních hnacích sil evoluce nových genových funkcí (Ohno, 1970). Polyploidizace vede ke zdvojení či zmnohonásobení *FT/TFL1* genové rodiny. Vzhledem k tomu, že tyto geny hrají klíčovou roli ve vývojovém procesu kvetení, je zde nezbytná přísná kontrola funkce nově vzniklé kopie genu, aby bylo zajištěno přežití polyploidu (Otto a Yong, 2002). Druhá kopie genu si může buď 1) ponechat svou původní funkci, anebo 2) uniknout selekčnímu tlaku, akumulovat mutace a ztratit kódující kapacitu. Dalším scénářem je 3) získání funkce zcela nové (Lynch a Force, 2000).

3.6.3. Molekulární podstata florigenu a *CO - FT* interakce

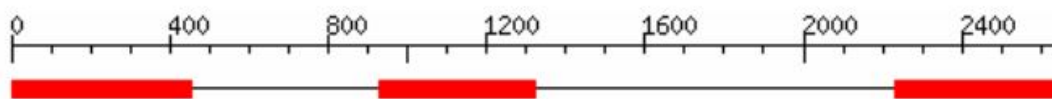
Vědělo se, že fotoperiodická aktivace *CO* reguluje expresi *FT* ve floému listů a že *FT* protein účinkuje ve vzrostném vrcholu. To byl podnět k myšlence, že *FT* mRNA nebo *FT* protein je oním elementem, který se pohybuje z listu do vzrostného vrcholu, tedy dlouho hledaným florigenem (Yu et al., 2006; Bohlenius et al., 2007). Poslední výzkumy ukazují, že oním pohyblivým elementem je *FT* protein (Jaeger a Wigge, 2007; Tamaki et al., 2007; Yang et al., 2007).

V *A. thaliana* *CO* i *FT* vykazují cirkadiánní expresi, která je charakteristická pro geny regulované vnitřními hodinami. Jak bylo popsáno v kapitole 3.3.2.1., *CO* za dlouhého dne aktivuje expresi *FT*, avšak *CO* protein neváže DNA přímo, ale za spoluúčasti HAP proteinů (Ben-Naim et al., 2006; Wenkel et al., 2006). Experimenty ukázaly, že zvýšená exprese *CO* pouze ve vzrostném vrcholu neovlivňuje dobu kvetení. Pokud je zvýšená exprese *CO* všudypřítomně nebo pouze ve floému listů, doba kvetení se zkracuje. Na druhou stranu zvýšená exprese *FT* urychluje kvetení, ať už je lokalizována ve floému listů, nebo ve vzrostném vrcholu (An et al., 2004).

3.6.4. *LEAFY (LFY)* gen v *A. thaliana* a dalších rostlinách

V *A. thaliana* je iniciace kvetení lokalizována ve vzrostném vrcholu a je aktivována expresí transkripčního faktoru *LEAFY (LFY)* (Weigel et al., 1992), který byl identifikován jako gen identity květního meristému stejně jako *FLORICAULA (FLO)* v hledíku větším

(*Antirrhinum majus*, L.) (Coen et al., 1990). *LFY* gen sestává ze tří exonů a dvou intronů v konzervovaných pozicích. Jeho struktura je znázorněna na obr. 11. *LFY* kóduje protein vysoce konzervovaný především v oblastech tzv. N a C domén, které tvoří něco přes polovinu proteinu (Maizel et al., 2005).



Obr. 11: Struktura *LFY* genu v *A. thaliana*. Červenými bloky jsou vyznačeny exony, černou čarou introny. Čísla na horní ose odpovídají párům bází DNA (bp).

The Institute for Genomic Research (TIGR), Rockville, MD 20850, USA, www.tigr.org

V *A. thaliana* je *LFY* stejně jako u většiny vyšších rostlin gen s jedinou kopií. *LFY* se podílí na regulaci tvaru květů a *lfy* mutanty mají vážné vývojové poškození. Primární cílovou sekvencí *LFY* proteinu jsou enhancery květních genů určující identitu květních orgánů, jako například *API* (Wagner et al., 1999; Lamb et al., 2002). Mutace v N a C doménách *lfy* redukuje in vitro vazbu na *API* promotor.

LFY najdeme u všech suchozemských rostlin. Sekvence identifikovaných *LFY* homologů z tabáku (Kelly et al., 1995), rajčete (Molinero-Rosales et al., 1999), *Chenopodium rubrum* (Veit et al., 2004), petunie (Souer et al., 1998), orchideie (Montieri et al., 2004), eukalyptu (Southerton et al., 1998), topolu (Rottmann et al., 2000), jablka (Wada et al., 2002) nebo borovice (Mellerowicz et al., 1998; Mouradov et al., 1998) svědčí o tom, že *LFY* proteiny jsou v rámci vyšších rostlin vysoce konzervované (Maizel et al., 2005).

U vyšších rostlin je *LFY* běžně gen s jedinou kopií, i když byly nalezeny druhy rostlin s více kopiemi *LFY* genu, např. *Pinus radiata*, *Malus x domestica* nebo *Eucalyptus* (Mouradov et al., 1998; Southerton et al., 1998; Wada et al., 2002). U polyploidů se jednotlivé kopie zřejmě neliší ve funkci (Wada et al., 2002; Bomblies et al., 2003). U nahosemenných se setkáváme se specifickou duplikací *LFY* genu (Mellerowicz et al., 1998), druhá kopie *NDLY* je pak u krytosemenných ztracena (Frohlich a Eastbrook, 2000). U nižších rostlin nacházíme další blízké příbuzné kopie genu, bez zřejmé subfunkcionalizace (Frohlich a Parker, 2000; Himi et al., 2001). U pravého mechu *Physcomitrella patens* jsou *LFY* homology zodpovědné za kontrolu životního cyklu – střídání fáze sporofytu a gametofytu (Maizel et al., 2005).

3.7. Klíčové geny účastníci se fotoperiodické indukce kvetení u dalších druhů rostlin

3.7.1. Rýže

V genomu rýže byl identifikován *CO* ortolog *OsA/HEADING DATE 1 (Hd1)* (Yano et al., 2000) a dalších 15 *COL* genů nazvaných *OsB – OsP* (Griffiths et al., 2003). Expresse *OsB/OsCO3* (S12569), *OsN* (S3574) a *OsP* (C60910) v kultivarech Ilpumbyeohave a Nippounbare korejské rýže vykazují vysoký stupeň podobnosti s expresí *COL* genů z *A. thaliana* a jejich expresní profily ukazují na cirkadiánní průběh. V porovnání se situací v *A. thaliana*, kde *CO*, *COL1* a *COL2* sdílejí podobný expresní profil, v rýži *OsN* a *OsP* taktéž sdílí podobný průběh exprese jako *Hd1*, kdežto expresní profil *OsB/OsCO3* je víceméně protichůdný (Shin et al., 2004). *OsB/OsCO3* je represorem kvetení, který inhibuje transkripci *Hd3a* a *OsFTL1* nezávisle na *Hd1*, *Ehd1* a *OsMADS50*. Zvýšená exprese transgenu *OsB/OsCO3* v *A. thaliana* však nemá vliv na dobu kvetení (Kim et al., 2008).

V rýži bylo identifikováno celkem 19 *PEBP-like* genů. Kromě *OsFTL2/HEADING DATE 3a (Hd3a)* (Kojima et al., 2002), funkčního ortologu *FT*, bylo identifikováno dalších dvanáct *FT-like* genů (*OsFTL1*, *OsFTL3 – OsFTL13*) (Izawa et al., 2003). Protějšek *MFT* v *A. thaliana*, představují dva *MFT* homology *MFT1* a *MFT2* v rýži. Geny *RCN1*, *RCN3*, *RCN2* a *RCN4* z rýže jsou fylogeneticky blíží *TFL1*, *ATC* a *BFT* z *A. thaliana* (Chardon a Damerval, 2005).

Za indukčních podmínek je hladina *Hd3a* mRNA detekovatelná 4 hodiny před úsvitem, vrcholí za úsvitu a nadále zůstává vysoká během dne. Dalších šest *OsFTL* genů (*OsFTL1*, *OsFTL3*, *OsFTL4*, *OsFTL5*, *OsFTL6* a *OsFTL11*) je během krátké fotoperiody transkribováno jen slabě a zřejmě se neúčastní indukce kvetení za krátkého dne (Ishikawa et al., 2005).

3.7.2. *Pharbitis nil*

V krátkodenní rostlině *Pharbitis nil* byly identifikovány dva *COL* geny, *CO* ortolog *PnCO* (Liu et al., 2001) a *CO* homolog *PnCOL1* (Kim et al., 2003). Expresse *PnCO* je vysoká po 14 hodin trvající tmě, nízká pokud tma trvá 12 a méně hodin. Většina *PnCO* transkriptu byla nalezena v nesestřižené formě včetně intronu, ovšem pouze sestřižená forma bez intronu komplementuje *co* mutanty *A. thaliana* (Liu et al., 2001).

V *P. nil* byly identifikovány dva ortology *FT* - *PnFT1* a *PnFT2* (Hayama et al., 2007). Více o těchto genech viz kapitola 3.5.1.

3.7.3. Rajče (*Lycopersicon esculentum*)

V rajčeti, rostlině neutrální k fotoperiodě byly identifikovány tři *COL* geny *TCOL1*, *TCOL2* a *TCOL3* (Ben-Naim et al., 2006) a *FT* ortolog *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* (Lifschitz et al., 2006). *TCOL* geny se neúčastní indukce kvetení v rajčeti. Naopak *SFT* je induktorem kvetení. Doba kvetení rajčete je na délce dne nezávislá a reaguje spíše na teplotu a intenzitu osvětlení. *sft* mutanty kvetou velmi pozdě a vykazují vývojové poruchy ve stavbě květu.

Sekvence a funkce *FT* genů je napříč rostlinnou říší evolučně konzervována. To bylo elegantně demonstrováno na pokusech s transgenem *SFT*. Ačkoli je rajče fotoperiodicky neutrální rostlina, zvýšená exprese transgenu *SFT* **urychluje kvetení** *sft* mutantů rajčete (poruchy ve stavbě květu se neobjevují), **neutrální** varianty Samsun tabáku, **krátkodenní** varianty Maryland Mammoth tabáku a **dlouhodenní** *A. thaliana* (Lifschitz et al., 2006).

3.7.4. Regulace kvetení u *Lolium temulentum* prostřednictvím giberelinů a *LtFT*

Jílek mámivý (*Lolium temulentum*) je obligátně dlouhodenní rostlina, která kvete pouze na dlouhém dni. Ke kvetení postačí pouhá jedna dlouhodenní fotoperioda se 14-16 hodinami světla. Při kratších fotoperiodách zůstává *L. temulentum* striktně vegetativní (Evans a King, 1985; McDaniel et al., 1991).

U *L. temulentum* se indukce kvetení významně účastní některé gibereliny (GA). GA_{19} je enzymem *LtGA20ox1* konvertován na GA_{20} . Z GA_{20} pak vzniká za účasti enzymu *LtGA2ox1* GA_5 . Za induktivní fotoperiody stoupá v listech obsah GA_{20} , GA_5 a enzymu *LtGA20ox1* konvertujícího GA_{19} na GA_{20} . Hladina GA_{19} , prekursoru GA_{20} , se naopak souhlasně snižuje.

V *L. temulentum* byly identifikovány *LtCO* (Martin et al., 2004) homologní ke *CO* a *LtFT* homologní k *FT* (King et al., 2006). Hladina *LtCO* mRNA je za induktivní fotoperiody vyšší než za krátké fotoperiody. Hladina *LtFT* mRNA je v noci následující po induktivní fotoperiodě více než 80x vyšší v porovnání se situací za krátké fotoperiody.

Aplikace GA₅ giberelinů při neinduktivní (krátké) fotoperiodě indukuje kvetení (King et al., 2003; King a Evans, 2003), avšak nemá vliv na hladinu *LtFT* mRNA (King et al., 2006). *LtFT* je naopak transkribováno nezávisle na obsahu giberelinů. Florigenní stimulus tvořený za induktivní fotoperiody u *L. temulentum* se zdá být dvojitý. Prvním z nich by mohl být GA₅, druhým z nich signál odvozený od *LtFT*, vzájemně jsou však na sobě nezávislé a mají povahu aditivní či alternativní (King et al., 2006).

3.8. Night-break

Krátké přerušení tmy světlem u krátkodenních rostlin inhibuje kvetení a tento jev je znám jako night-break (NB). NB je znám dlouhá léta (Hamner a Bonner 1938), ale jeho molekulární základy jsou do dnes nepříliš zřejmé. U rýže a *Pharbitis nil* bylo prokázáno, že krátký interval světla uprostřed noci inhibuje expresi *FT* genu (Ishikawa et al., 2005; Hayama et al., 2007). NB je patrný především u krátkodenních rostlin, i když určitý efekt má i u dlouhodenních rostlin. U krátkodenních rostlin i velmi krátký osvit světlem během tmy opoždí kvetení. Naproti tomu u dlouhodenních rostlin NB urychluje kvetení, ale je k tomu potřeba delší doba osvitů a efekt byl pozorován pouze u několika druhů rostlin (Goto et al., 1991; Thomas a Vince-Prue, 1997).

3.8.1. Night-break u rýže

U krátkodenní rýže pouhých 10 minut světla uprostřed 14 hodinové tmy opoždí kvetení. Nejcitlivější k NB jsou rostliny ve stáří 4-5 týdnů od vysetí. Nejsilnější efekt NB byl pozorován, když bylo světlo aplikováno uprostřed 14 hodin trvající tmy. Naproti tomu aplikace NB na začátku a konci tmy je bez efektu na dobu kvetení. NB u rýže silně inhibuje expresi *Hd3a* a tento efekt se ztrácí další den, přičemž nebyl zaznamenán žádný efekt na expresi *OsGI*, funkčního ortologu *GI* a *Hd1*, ortologu *CO* (Hayama et al., 2002; Ishikawa et al., 2005). Za zmíněný inhibiční efekt je zodpovědný OsPHYB (Izawa et al., 2002; Ishikawa et al., 2005), nikoli OsPHYA a OsPHYC. Represe *Hd3a* se odehrává na úrovni transkripce a možným mechanismem inhibice *Hd3a* exprese fytochromem B je destabilizace a degradace proteinového komplexu na *Hd3a* promotoru (Ishikawa et al., 2005). Nebyl zjištěn efekt NB na expresi žádného ze šesti dalších *OsFTL* genů (*OsFTL1*, *OsFTL3*, *OsFTL4*, *OsFTL5*, *OsFTL6*

a *OsFTL1*), což předpokládá jejich neúčast na indukci kvetení za krátké fotoperiody (Ishikawa et al., 2005).

3.8.2. Night-break u *Pharbitis nil*

Deset minut světla aplikovaných po osmi hodinách od začátku plně induktivní 48 hodin trvající tmy ruší kvetení. NB silně inhibuje hladiny *PnFT1* a *PnFT2* mRNA. V době, kdy je v kontrolních rostlinách maximum *PnFT1* a *PnFT2* mRNA, jsou v rostlinách po aplikaci NB hladiny těchto transkriptů více než 10x nižší (Hayama et al., 2007). Hladiny *PnCO* mRNA jsou ovlivněny NB jen nepatrně (Liu et al., 2001).

3.9. *Chenopodium rubrum* jako modelová rostlina ve studiu kvetení

V průběhu fotoperiodické indukce kvetení gen *CO* aktivuje *FT* expresi ve floému listů krátkodenních i dlouhodenních rostlin. Stejná genetická dráha zprostředkovává u *A. thaliana* a rýže rozdílné odpovědi na fotoperiodu. Na druhou stranu byla ukázána univerzalita systému indukce kvetení v pokusech s *SFT* (*FT* ortolog z rajčete), kdy zvýšená exprese transgenu *SFT* aktivuje kvetení v krátkodenních, dlouhodenních i neutrálních rostlinách (Lifschitz et al., 2006). Jsou proto potřeba studie objasňující molekulárně-genetické základy indukce kvetení u dalších dlouhodenních i krátkodenních rostlin, především takových, jejichž fyziologické základy kvetení byly již prostudovány. Obzvláště u krátkodenních rostlin lze očekávat rozmanité mechanismy regulace kvetení (Hayama et al., 2007).

Jedním z vhodných kandidátů pro studie tohoto typu je *Chenopodium rubrum*. Spolu s významnými kulturními plodinami špenátem (*Spinacia oleracea*), řepou cukrovkou (*Beta vulgaris*) a merlíkem čilským (*Chenopodium quinoa*) patří do čeledi merlíkovitých (*Chenopodiaceae*) z řádu Caryophyllales. Obecně se rod *Chenopodium* vyznačuje poměrně velkou odolností vůči suchu a salinitě, a preferuje stanoviště s vysokým obsahem dusíku a organických látek. *C. rubrum* je vyloženě nitrofilní rostlina, kterou najdeme na hnoji a v močůvce.

Rod *Chenopodium* obsahuje druhy dlouhodenní i krátkodenní. Například *C. murale* je dlouhodenní rostlina, zatímco většina ekotypů *C. rubrum* jsou krátkodenní nebo na fotoperiodě neutrální rostliny, ale existuje též dlouhodenní ekotyp 372. Rod *Chenopodium* též

zahrnuje rostliny s různým stupněm ploidie (Rahiminejad a Gornall, 2004). Např. rostliny *C. murale* jsou diploidní, *C. rubrum* a *C. quinoa* tetraploidní, *C. giganteum* hexaploidní.

C. rubrum bylo používáno ke studiu fotoperiodismu a kvetení desetiletí, především krátkodenní ekotyp 374 (Cumming et al., 1965; Cumming, 1967; Cumming a Seabrook, 1985; Ullmann et al., 1985), avšak o molekulárních základech signálních drah regulujících kvetení se ví jen málo. *C. rubrum* (ekotyp 374) může být indukováno ke kvetení pouhou jednou 12 hodin trvající tmou ve stáří čtyř až pěti dnů, krátce po otevření děložních lístků. Po tomto období vysoké fotoperiodické senzitivity se stává mnohem méně citlivé k fotoperiodě. Dvě až tři tmy trvající 12 hodin jsou potřeba k plné indukci kvetení (Seidlová a Krekule, 1973; Ullmann et al., 1985). Opětovná odezva ústící v kvetení po indukci pouhou jednou tmou je obnovena u rostlin starších než zhruba čtrnáct dnů. Počet krátkých fotoperiod potřebných pro kvetení závisí na formaci listů na vzrostném vrcholu (Ullmann et al., 1985; Blažková et al., 2000). Kritická fotoperioda pro krátkodenní *C. rubrum* (ekotyp 374) je závislá na pěstebních podmínkách, ale běžně se používá k vyvolání 100% kvetení 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Indukce ke kvetení je nejcitlivější k NB v šesté hodině tmy (Cumming et al., 1965).

Údaje o struktuře genů, účastnících se regulace kvetení u *C. rubrum* jsou dosud velmi kusé. V nedávné době byla popsána částečná sekvence *FLO/LFY* ortologu *CrFL* v *C. rubrum* (Veit et al., 2004). Sekvence fragmentu cDNA o délce 521 bp pokrývá asi 40% plné délky genu a je zhruba z 85% identická se sekvencí homologu *LFY* silenky *Silene coeli-rosa* a z 81% se sekvencí *LFY-like* genu rajčete (Molinero-Rosales et al., 1999). Dosud však nebyl v *C. rubrum* identifikován žádný člen *FT/TFL1* nebo *COL* genové rodiny.

Identifikace homologů klíčových regulačních genů *FT*, *CO* a *LFY* u *C. rubrum* (ekotyp 374) a analýza jejich exprese v různých vývojových stádiích a za různých fotoperiodických režimů se mimo jiné stala cíly této práce, neboť je důležitá a nezbytná nejen pro další pochopení výše popsaného zvláštního jevu senzitivity k fotoperiodě v rámci indukce kvetení, ale přinese i další vhled do složité problematiky vztahů genů účastnících se kvetení.

V nedávné době byla vyvinuta ve spolupracující laboratoři Dr. E. Wagnera metoda transformace *C. rubrum* (Veit et al., 2006). Tento nástroj v budoucnu umožní mnohem detailnější studium funkcí a vzájemných vztahů nově identifikovaných homologů *FT*, *CO* a *LFY* přímo v *C. rubrum*. Tím se krátkodenní *C. rubrum*, ekotyp 374 v rámci studia fotoperiodické indukce kvetení stává stejně významným modelem jako rýže nebo *Pharbitis nil*.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Chemikálie, vybavení a software

4.1.1. Chemikálie

Agar (Serva, Německo)

Agaróza (Serva, Německo)

Anti digoxigenin-AP conjugate, Fab fragments (Roche, Německo)

Blocking Reagent (Roche, Německo)

CDP-Star (Roche, Německo)

CTAB (USB, USA)

DIG Easy Hyb (Roche, Německo)

DNA Molecular-Weight Marker VII, DIG-labelled (Roche, Německo)

dNTP (Fermentas UAB, Litva)

D-Sorbitol (Serva, Německo)

EDTA (SigmaAldrich, Německo)

Fenol (Fluka, Japonsko)

Glycerol (SigmaAldrich, Německo)

Chloroform (Merck, Německo)

IPTG (ICN Biochemicals, USA)

Isopropanol (Fluka, Japonsko)

Kristalon (Hydro Agri Rotterdam, Holandsko; AGRO CS, ČR)

Kyselina octová (Merck, Německo)

Lambda DNA/PstI Marker, 24 (Fermentas UAB, Litva)

Maleic acid (Acros Organics, Belgie)

Mercaptoethanol (SigmaAldrich, Německo)

Oligonukleotidy (Metabion, Německo)

pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker (Fermentas UAB, Litva)

SDS (Fluka, Japonsko)

Silwet L-77 (Lehle seeds, USA)

TRIS (Serva, Německo)

Tween 20 (MP Biomedicals, Inc., Francie)

X-gal (MP Biomedicals, Inc., Francie)

4.1.2. Antibiotika

Ampicilin (SigmaAldrich, Německo)

Claforan/Sefotak (Valeant Czech Pharma, ČR)

Gentamycin (SigmaAldrich, Německo)

Hygromycin (SigmaAldrich, Německo)

Kanamycin (SigmaAldrich, Německo)

Rifampicin (SigmaAldrich, Německo)

Tetracyklin (Duchefa, Holandsko)

4.1.3. Enzymy

Klenow Fragment (Fermentas UAB, Litva)

Lysozyme Type VI (MP Biomedicals, Inc., Francie)

Protector RNase Inhibitor (Roche, Německo)

Proteinase K, Recombinant (Roche, Německo)

Ribonuclease A From Bovine Pancreas (SigmaAldrich, Německo)

4.1.3.1. Restrikční enzymy

BamHI (Fermentas UAB, Litva)

EcoRI (Fermentas UAB, Litva)

EcoRV (Fermentas UAB, Litva)

HindIII (Fermentas UAB, Litva)

NotI (Fermentas UAB, Litva)

SmaI (Fermentas UAB, Litva)

4.1.3.2. Polymerázy

AmpliTaq[®] Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, USA)

aTaq DNA polymerase (Promega, USA)

Phusion high fidelity polymerase (Finnzymes, Finsko)

M-MLV Reverse transcriptase RNase Minus, Point Mutation (Promega, USA)

4.1.4. Kity

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)

CycleReader™ Auto DNA Sequencing kit (Amersham Biosciences, USA)

DNA-free (Ambion, USA)

QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Německo)

QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Německo)

LightCycler® 480 Probes Master (Roche, Německo)

LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Německo)

LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit (Roche, Německo)

PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Německo)

pGEM-T® Easy Vector System I (Promega, USA)

RNeasy® Plant Mini kit (Qiagen, Německo)

SMART PCR cDNA Synthesis kit (Clontech, USA)

Thermo Sequenase™ Cy™5 Dye Terminator Kit (Amersham Biosciences, USA)

4.1.5. Média a pufry

4.1.5.1. Média

½ **MS médium** s vitamíny (Serva, Německo), složení viz příloha 1

LB (Luria-Bertani) médium: složení viz Maniatis et al., 1986

YEB médium (1 litr): Yeast Extrakt 1g

Pepton 10 g

MgSO₄ .7 H₂O 0,5 g

rozpustit, po rozpuštění upravit pH na 7,2;

Misky s pevným LB/YEB médiem: přidat agar (1,5%) 1,5 g/100 ml; roztok vyklávkovat; po vyklávkování přidáme 2,5 ml 40% roztoku sacharózy (rovněž vyklávkované); necháme vychladnout na cca 50°C a přidáme příslušná antibiotika; důkladně rozmícháme a rozlijeme do misek

0,5x Hoaglandův roztok: 0,5 mM NH₄H₂PO₄; 3 mM KNO₃; 2 mM Ca(NO₃)₂; 1 mM MgSO₄; 12,25 mM citrát železitý; 0,226 mM KI; 2,426 mM H₃BO₃; 2,96 mM MnSO₄; 0,348 mM ZnSO₄; 0,052 mM Na₂MoO₄; 0,005 mM CuSO₄; 0,0052 mM CoCl₂; 5 mM Na₂EDTA; 5 mM FeSO₄; s použitím NaOH nastavit pH 6,3

4.1.5.2. Pufry

1x TAE (1 l): 100 ml 0,5 M EDTA pH 8; 242 g TRIS; 57,1 ml koncentrované CH₃COOH

5x TBE (1 l): 0,45 M TRIS-borát (54g TRIS báze; 27,5 g kyselina boritá);

0,01 M EDTA (20 ml 0,5 M EDTA)

0,5x TBE: 10x naředit 5x TBE

1x TBE: 5x naředit 5x TBE

4.1.6. Vybavení

ARA systém (BETATECH bvba, Belgie)

Hybond N+ hybridizační membrána (Amersham, Velká Británie)

Hybridizační tuby (Amersham, Velká Británie)

Hyperfilm (Amersham, Velká Británie)

Kapiláry plastové (Genaxxon, Německo)

Kapiláry skleněné (Roche, Německo)

LightCycler[®] 480 Multiwell 96 (Roche, Německo)

Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization (Roche, Německo)

Perlit (Agro, ČR)

Rašelinové tablety (Jiffy seets, Bohemia seet, ČR)

Stender D-400 substrate (Stender, Rakousko)

Světelný filtr červený a žlutý (Rand Strand Electric, Velká Británie)

Whatman (Maidstone, Velká Británie)

Zahradnický substrát A (Rašelina Soběslav, ČR)

4.1.6.1. Přístroje

ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA)

BioRad *E. coli* Pulser (Bio-Rad, USA)

Centrifuga Hermle, Z 383 (Hermle, Německo)

Centrifuga Hettich, EBA 12 (Hettich, Německo)

Crosslinker ULTRA-LŮM CEX-800 (ULTRA-LŮM, USA)

Deep Freeze Sanyo MDF-U50V (Sanyo Electronic, Japonsko)

Digitální kamera Kodak DC 120 (Eastman Kodak Company, USA)

Hybridization oven/shaker (Amersham, Velká Británie)

Kultivační box Sanyo MLR-350HT (Sanyo Electronic, Japonsko)
Kultivační box Klimaprocessor SPJ (Družstvo Váha Kladno; Agroel, ČR)
LightCycler 1.2 (Roche, Německo)
LightCycler® 480 (Roche, Německo)
Mastercycler® ep *realplex* (Eppendorf, Německo)
Owl horizontální elektroforéza (Thermo Scientific, USA)
T Gradient cykler (Biometra, Německo)
TRIO-Termoblock (Biometra, Německo)

4.1.7. Software

ALFwin™ Software 2.0 (Amersham, Velká Británie)
BioEdit (Hall, 1999), (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>)
CODEHOP (<http://blocks.fhrc.org/codehop.html>)
Kodak Digital Science 1D v.2.0.3 (Eastman Kodak Company, USA)
LightCycler® 480 software v. 1.5 (Roche, Německo)
LightCycler software v. 3.5. (Roche, Německo)
MrBayes (<http://mrbayes.csit.fsu.edu/>)
PAUP* 4,0 b10 (<http://paup.csit.fsu.edu/>), (Swofford, 2003)
Photo Enhancer v.0.2 (PictureWorks Technology, Inc.; Velká Británie)
Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)
TAIR BLAST 2.2.8, (www.arabidopsis.org/Blast)
VectorNTI software Suite 9 (InforMax, Inc.; Invitrogen, Velká Británie)

4.1.8. Plazmidy

pGEM-T Easy (Promega, USA), ampicilinová rezistence
pGreenII0179 (poskytnutý Dr. N. S. Kiranem, ÚMBR AF v.v.i., MZLU Brno),
kanamycinová rezistence
pRT101 (poskytnutý Dr. N. S. Kiranem, ÚMBR AF v.v.i., MZLU Brno), ampicilinová
rezistence
pSOUP (poskytnuto Mgr. M. Pařezovou, ÚEB AV ČR, v.v.i., Praha), tetracyklinová
rezistence

4.1.9. Bakterie

Agrobacterium tumefaciens GV3101:pSOUP (poskytnuto Mgr. M. Pařezovou, ÚEB AV ČR, v.v.i., Praha, ČR a Dr. F. Cvrčkovou, UK, Praha, ČR)

E. coli XL-1 Blue: endA1, gyrA96, hsdR17, lac -, recA1, relA1, supE44, thi-1, [F' lacI qZ ΔM15, proAB, Tn10], tetracyklin rezistentní kmen (Bullock et al., 1987)

4.2. Rostlinný materiál

4.2.1. *Chenopodium rubrum*

Ve všech experimentech byly použity rostliny merlíku červeného (*Chenopodium rubrum* L.), ekotyp 374 (semena z Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky, v.v.i., získané od B. G. Cumminga z Univerzity of New Brunswick, Kanada). Byly pěstovány v kultivačních boxech (Klimaprocesor SPJ) při 20°C na stálém světle (chladné, bílé, fluorescentní, 100 μmol m⁻² s⁻¹) pokud nebyly vystaveny různým fotoperiodickým režimům, které budou popsány v kapitole 5.4. Rostliny *C. rubrum* byly pěstovány Dr. Janem Kolářem (ÚEB AV ČR, v.v.i., Praha - Lysolaje).

4.2.1.1. Semenáčky

Semenáčky použité v experimentech s indukcí kvetení byly pěstovány v 96-jamkových destičkách pro ELISA analýzy s plochým dnem, jeden semenáček v jedné jamce. Jamky byly naplněny perlitem (velikost partikulí 0,4 - 0,8 mm) s 1 mm otvorem ve dně pro vstup živného roztoku. Destičky plavaly v 0,5x Hoaglandově roztoku, který byl měněn každé dva dny. Ve stáří pěti dnů, když 40 - 60% semenáčků mělo plně otevřené dělohy, byly pro experiment vybrány průměrně vzrostlé rostlinky a ostatní byly zničeny. Šest hodin po této selekci byly rostlinky vystaveny různým fotoperiodickým režimům, jak je popsáno v kapitole 5.4. Kontrolní rostliny zůstaly na stálém světle.

Pro experiment studující vliv NB na indukci kvetení byly rostliny vystaveny 10 μmol m⁻² s⁻¹ červeného světla po dobu 15 min (chladné, bílé, fluorescentní světlo filtrované přes jednu vrstvu červeného plastového filtru a dvě vrstvy žlutého filtru od Rand Strand Electric). Tato kombinace filtrů neměla žádnou měřitelnou transmisi pod 580 nm. Expozice začala 6 hodin po začátku fáze tmy.

Pro extrakci celkové RNA a následné měření hladin mRNA *CrFTL*, *CrCOL* a *CrFL* genů byly odebírány celé nadzemní části rostlinek (2 rostlinky na jeden vzorek). Za tmy se odebírání vzorků odehrávalo za tlumeného zeleného fluorescentního světla, aby u rostlin nebyla vyvolána odezva na změněnou fotoperiodu. Pro zhodnocení vývoje kvetení bylo od každé varianty ponecháno 10-20 rostlin, které byly po vystavení fotoperiodickému režimu pěstovány při stálém světle do stáří čtrnácti dnů. Stádia kvetení byla poté určena pod stereomikroskopem.

4.2.1.2. Dospělé rostliny

V jiné sadě experimentů byly rostliny *C. rubrum* pěstovány v květináčích (8 x 8 cm) naplněných perlitem a zásobovaných 0,5x Hoaglandovým roztokem. Ve stáří 15 dnů byly rostliny indukovány ke kvetení jednou, dvěma nebo třemi periodami tmy (12 hodin tmy /12 hodin světla) v průběhu tří dnů. Prošly tedy jednou, dvěma nebo třemi fázemi dvanáctihodinové tmy. Poté byly vráceny na stálé světlo. Kontrolní rostliny byly pěstovány na stálém světle v průběhu celého experimentu. Stádium kvetení bylo určeno po osmi dnech analýzou jejich apexů pod mikroskopem.

Pro extrakci celkové RNA a následné měření hladin mRNA *CrFTL*, *CrCOL* a *CrFL* genů byly odebírány mladé pravé listy.

4.2.2. *Chenopodium* sp., *Atriplex nitens*

Semena *C. schraderianum* (= *C. foetidum*), *C. giganteum* (= *C. amaranticolor*) a *C. quinoa* byly darovány Dr. P. Komínkem (Oddělení virologie, VÚRV, ČR). Semena *C. quinoa*, kultivary Amachuma (reg. code Z55-0003) a Faro (reg. code Z55-0011) byly poskytnuty Dr. D. Janovskou (Genová banka, VÚRV, ČR). Semena *C. pumilio* poskytl Dr. J. Štěpánek (Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta UK, ČR), ostatní rostlinný materiál byl sebrán v terénu a určen Dr. J. Dostálkem (Ústav okrasného zahradnictví AVČR v.v.i., Průhonice, ČR). Dr. Dostálek rovněž poskytl semena *C. missouriense*, *C. probstii* a *C. ficifolium* (tabulka 1). Semena *C. quinoa* ze sbírek CIP-FAO a USDA-NPGS (Christensen et al., 2007) a *C. berlandieri* byla darována Dr. C. E. Colemanem (Brigham Young University, Department of Plant & Animal Sciences, Provo, Utah, USA) (tabulka 2).

Rostliny rodu *Chenopodium* byly pěstovány ve skleníku (minimální teplota 20°C) při přirozené fotoperiodě ve směsi substrátu Stender D-400 a perlitu v poměru 3:1. Semena byla

vyseta do 9 x 9 cm květináčů a čtyři týdny staré rostliny byly přesazeny do 13 x 13 cm květináčů. Pro usnadnění klíčení semen *C. hybridum* byla jejich osemení naříznuta skalpelem.

Rostlinný druh	Původ	Počet chromozómů (2n)
<i>C. album</i> ssp. <i>suecicum</i>	Sebráno 7.9.2004 v Kovářech (okolí Prahy) Herbářová položka PRC 400117	18/36 ¹
<i>C. quinoa</i>	Semena z VÚRV, Praha	36
<i>C. giganteum</i>	Semena z VÚRV, Praha	54
<i>Chenopodium</i> II Neurčený druh	Sebráno 15.9.06 v Praze Herbářová položka PRC 400115	?
<i>C. polyspermum</i>	Semena sebrána 9.7.2004, Orlické hory	18
<i>C. murale</i>	Ekotyp 197, semena z Ústavu experimentální botaniky, Praha	18
<i>C. rubrum</i>	Ekotyp 374, semena z Ústavu experimentální botaniky, Praha	36
<i>C. schraderianum</i>	Semena z VÚRV, Praha	18
<i>C. pumilio</i>	Semena sebrána J. Štěpánkem 19.9.2004, Praha	XX ²
<i>C. hybridum</i>	Sebráno 6.10.2004 v Kovářech (okolí Prahy)	18
<i>Atriplex nitens</i>	Sebráno 10.7.05 v Kovářech (okolí Prahy)	XX ²
<i>C. missouriense</i>	Lovosice – Silo, 18.10.07 Herbářová položka PRC 451128	54
<i>C. probstii</i>	Ústí n. L., Starý přístav, 18.10.07 Herbářová položka PRC 451130	54
<i>C. ficifolium</i>	Dostálek leg. Ústí n. L. – Starý přístav, 18.10.07 Herbářová položka PRC 451129	18
<i>C. berlandieri</i>	PI 612858, od C. E. Colemana	36
<i>C. bonus henricus</i>	Sebráno 7.9.2004 v Kovářech (okolí Prahy)	36

Tabulka 1: Původ a počet chromozómů zástupců rodu *Chenopodium* a *Atriplex nitens* použitých v této práci. Pokud není uvedeno jinak, počet chromozómů byl počítán Dr. Janem Kolářem (ÚEB AV ČR, v.v.i.);

¹ Kromě buněk s 18 chromozómy, bylo nalezeno též malé množství s 36 chromozómy. ² Data z literatury;

Název	Accession number	Původ	Zdroj
Kamira		Bolivie, jižní Andy	CIP-FAO
Ratuqui		Bolivie, jižní Andy	CIP-FAO
B9	PI 614910	Bolivie, Oruro, jižní Andy	USDA-NPGS
B13	PI 614915	Bolivie, Oruro, jižní Andy	USDA-NPGS
B27	PI 614931	Bolivie, Oruro, jižní Andy	USDA-NPGS
B29	PI 614933	Bolivie, Oruro, jižní Andy	USDA-NPGS
B39	PI 614002	Bolivie, Cochabamba, severní Andy	USDA-NPGS
B43	Ames 13218	Bolivie, La Paz, severní Andy	USDA-NPGS
CICA-127		Peru, Cusco, severní Andy	CIP-FAO
Kancolla		Peru, Puno, severní Andy	CIP-FAO
N2	Ames 13719	USA, New Mexico, pobřežní nížiny	USDA-NPGS
N16	Ames 13735	USA, New Mexico, pobřežní nížiny	USDA-NPGS
N18	Ames 13737	USA, New Mexico, pobřežní nížiny	USDA-NPGS
N25	Ames 13744	USA, New Mexico, pobřežní nížiny	USDA-NPGS
SC1	NSL 86649	USA, South Carolina, pobřežní nížiny	USDA-NPGS

Tabulka 2: Přehled *C. quinoa* ze sbírek USDA a CIP-FAO (Christensen et al., 2007) poskytnutých Dr. C. E. Colemanem. CIP-FAO = Centro Internacional de la Papa; USDA-NPGS = USDA North Central Regional Plant Germplasm System;

4.2.3. *Arabidopsis thaliana*

4.2.3.1. Standardní genotyp, *ft* mutanty a *co* mutanty

V experimentech směřujících k ověření funkce identifikovaných *CrFTL* a *CrCOL* genů byly použity rostliny standardního genotypu, *ft* mutantů a *co* mutantů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*, L.), ekotyp Landsberg erecta. Semena standardního genotypu (NW20, Ler-0), *ft-2* mutantů (N56, Ler, Late flowering a N184, Ler-0, Late flowering) a *co-2* mutantů (N175, Ler, Constans) byly získány z Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) (Koornneef et al., 1991; Scholl et al., 2000). Semena byla v 1,5 ml plastových eppendorfkách s 1 ml sterilní vody jarovizována 2-7 dní v lednici (kratší čas pro čerstvá semena, delší čas pro starší semena). Rostliny byly pěstovány ve směsi zahradnického startovacího substrátu A a perlitu (velikost partikulí 0,4 - 0,8 mm) v poměru 3:1 nebo na rašelinových tabletách (Jiffy seets) v kultivační místnosti při 20°C pod umělým osvětlením (chladné, bílé, fluorescentní světlo; Philips TL-D 36W/33-640) při dlouhém dni (16 hodin světlo/8 hodin tma) nebo ve skleníku při teplotách 20-35°C taktéž při dlouhém dni (16 hodin světlo/8 hodin tma). Rostliny pěstované pro získání většího počtu semen byly rozesazeny po jedné do ARA systému, rostliny určené k transformaci po pěti do květináčů 8 x 8 cm.

4.2.3.2. Transformanty (T1 + T2 generace)

Semena z transformovaných rostlin byla sterilizována a selektována vysetím na ½ MS medium s 25 µg/ml hygromycinu (HYG) a 250 µg/ml Claforanu (Cla) (protokol viz příloha 1). Selektce byla vyhodnocena po 2-4 týdnech. T1 generace transformantů s exprimovaným transgenem a hygromycinovou rezistencí přežívala a zůstávala zelená, rostliny bez transgenu a rezistence k hygromycinu nepřežívaly a zbělaly. Zelené rostliny byly po vytvoření dvou pravých listů přeneseny do květináče 8 x 8 cm s připraveným zahradnickým startovacím substrátem A a pěstovány v kultivační místnosti při dlouhém dni (16 hodin světlo/8 hodin tma). Z pletiv odumřelých rostlin byla izolována DNA a PCR metodou se specifickými primery byla ověřena na přítomnost transgenu.

Semena z T1 generace transformantů byla sklizena, jarovizována 5 dní a vyseta na rašelinové tablety. Rostliny (T2 generace) byly pěstovány v klimaboxu (Sanyo) na krátkém dni (8 hodin světlo/16 hodin tma) při teplotě 20°C a relativní vlhkosti 60% dokud nebyly patrné základy květenství. Poté byly přesunuty na dlouhý den (16 hodin světlo/8 hodin tma) a

pěstovány v kultivační místnosti při 20°C. DNA těchto rostlin byla též otestována PCR metodou na přítomnost příslušného transgenu.

Všechny rostliny *A. thaliana* byly v průběhu růstu pravidelně přihnojovány kristalonem (složení viz příloha 2). Poprvé byly hnojeny první nebo druhý den po vzejití zalitím kristalonem na podnos s květináči s přepařenou hlínou nebo rašelinovými tabletami. Poté se hnojilo většinou 1x týdně stejným způsobem až do stádia, kdy rostliny tvořily šesule.

4.3. Elektroforéza

Pokud nebude dále v textu uvedeno jinak, bylo elektroforetické dělení prováděno na horizontálním agarózovém gelu s ethidium bromidem v 1x TAE pufru na aparatuře od firmy Owl.

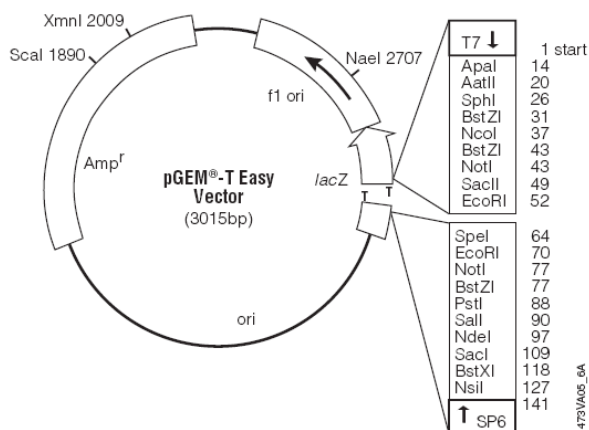
4.4. Extrakce RNA

Celková RNA byla izolována pomocí RNeasy Plant Mini kit z přibližně 100 mg rostlinného materiálu, který byl ihned po odběru zabalen do aluminiové folie a zamražen v tekutém dusíku. RNA byla ošetřena DNase I (kit DNA-free), aby byly odstraněny zbytky genomické DNA. Kvalita RNA byla ověřena na 0,8% agarózovém elektroforetickém gelu. Pro denaturaci sekundárních struktur byly RNA vzorky před nanesením na gel zahřáty 2 min při 75°C v přítomnosti 2,5% SDS (w/v). Koncentrace RNA byla změřena na spektrofotometru jako absorbance při 260 nm.

4.5. Klonování

4.5.1. Ligace

gDNA a cDNA fragmenty byly ligovány pomocí pGEM[®]-T Easy Vector System I do TA vektoru pGEM[®]-T Easy (obr. 12) podle návodu výrobce (pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems, Technical manual No. 042, Promega, 1999). 5 µl 2x ligačního pufru, 3 µl DNA fragmentu, 1 µl pGEM-T Easy (50 ng/µl) a 1 µl T4 DNA ligázy bylo smícháno v celkovém objemu 10 µl. Ligační směs byla ponechána přes noc na TRIO-Termobloku 15 hod při 4°C, poté zahřáta 15 min na 65°C pro deaktivaci ligázy a poté opět zchlazena na 4°C.



Obr. 12: pGEM-T Easy vektor používaný k TA klonování PCR fragmentů. Vektor nese gen pro rezistenci k ampicilinu a klonovací místo pro vložení insertu je v oblasti *lacZ* genu. Selektce bakterií probíhá na ampicilinu spolu s IPTG a X-gal. Bílé kolonie obsahují insertem přerušeny *lacZ* gen. Nedochozí v nich tedy k modifikaci X-gal na modrý produkt. Modré kolonie nesou vektor bez insertu, kde funkční *lacZ* způsobuje modifikaci X-gal na modrý produkt. IPTG se používá jako induktor.

pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Technical Manual No. 042, Promega (1999)
<http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>

4.5.2. Příprava PCR fragmentu pro ligaci

Pro klonování byly PCR fragmenty amplifikovány ve větším množství (10–20x 25 µl) a poté se postupovalo dvěma způsoby. V případě výskytu dimerů primerů nebo více PCR produktů na gelu byly jednotlivé PCR produkty o různé délce vyřezány z gelu, přečištěny pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu a klonovány zvlášť. V případě pouhého jednoho PCR produktu bez dimerů primerů na gelu byl výsledný PCR produkt přečištěn pomocí QIAquick PCR Purification Kitu a klonován. V obou případech byla oproti doporučenému minimálnímu elučnímu objemu 30 µl výsledná eluce PCR fragmentu z kolonky provedena v 16 – 20 µl elučního pufru (2x za sebou tím samým objemem). Tak bylo i za cenu větších ztrát docíleno maximální koncentrace PCR fragmentu potřebné k efektivní ligaci. Koncentrace byla poté ještě zvýšena odpařením eluovaného objemu 16-20 µl na výsledný objem 3-5 µl (20-30 min při 60°C na termobloku).

4.5.3. Transformace *Escherichia coli* a selektce bakteriálních kolonií

Ligační směs byla transformována tepelným šokem do *Escherichia coli* XL1-Blue. Bakterie byly pěstovány přes noc při 37°C na Petriho miskách s tuhým LB médiem a příslušnými antibiotiky. Pokud byly XL1-Blue transformovány plazmidem pGEM-T Easy nebo pRT101, probíhala selektce na miskách s 50 µg/ml ampicilinu (AMP). Pokud byly transformovány plazmidem pGreenII0179, byl pro selekci použit kanamycin (50 µg/ml).

V rámci transformace plazmidem pGEM-T Easy bylo na misky naneseno a rovnoměrně rozprostřeno 40 μ l X-gal (20 mg/ml v dimethylformamidu) a 5 μ l IPTG (170 mg/ml). Další den byly bílé kolonie sterilním párátkem v podobě proužků přeočkovány na novou misku s ampicilinem.

4.6. Izolace plazmidů

4.6.1. Izolace plazmidů z *Escherichia coli* metodou CTAB

Metodou CTAB (Del Sal et al., 1989) byly izolovány plazmidy z kultury *E. coli* narostlé přes noc při 37°C na vodní třepačce v 1,5 ml LB média s ampicilinem. Asi 0,5 - 1 μ g vyizolovaného plazmidu bylo štěpeno restričním enzymem EcoRI dle návodu výrobce a kontrolováno na elektroforetickém gelu na přítomnost restričního fragmentu odpovídajícího svou velikostí ligovanému DNA fragmentu.

4.6.2. „Rapid toothpick isolation“ metoda pro ověření inserce v plazmidu

Metodou „Rapid toothpick isolation“ byly izolovány plazmidy z bakteriálních proužků *E. coli* na Petriho miskách (protokol viz příloha 3). Plazmidy byly děleny na 0,7% agarózovém elektroforetickém gelu s ethidium bromidem spolu s pGEM-T Easy plazmidem jakožto velikostním markerem. Klony s posunem vůči pGEM-T Easy na elektroforetickém gelu (klony s vloženým insertem) byly vybrány pro izolaci plazmidu metodou CTAB.

4.6.3. Izolace plazmidů z *Agrobacterium tumefaciens* metodou alkalické lyze

Z *A. tumefaciens* byly izolovány plazmidy metodou alkalické lyze (protokol viz příloha 4).

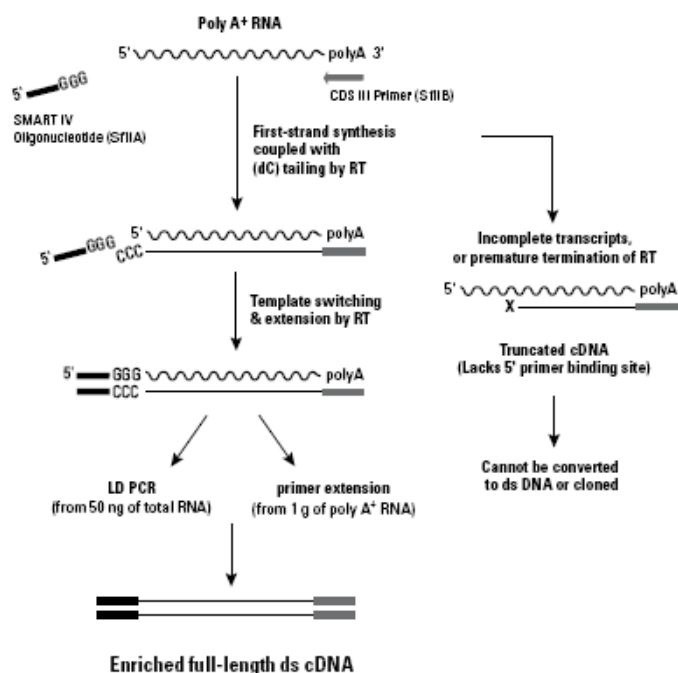
4.7. Konstrukce cDNA knihovny

4.7.1. Extrakce RNA

Pro přípravu cDNA knihovny, obsahující potenciální homology *CO*, *FT* a *LFY* genů byla extrahována celková RNA, jak bylo popsáno v kapitole 4.4.

4.7.2. Příprava cDNA SMARTTM technologií

K přípravě cDNA z celkové RNA byla použita SMARTTM technologie (Clontech), vedoucí k nabohacení cDNA o úplné délce. Při amplifikaci druhého řetězce cDNA je použit 5' PCR Primer II A, který je sekvenčně shodný s částí primeru SMART IV Oligonucleotide použitého při syntéze prvního cDNA řetězce v rámci RT. Pouze úplné ss cDNA obsahující sekvenci komplementární k 5' PCR Primeru II A tedy mohou sloužit jako templát pro syntézu druhého řetězce cDNA. 5' nekompletní ss cDNA jsou jakožto templát pro syntézu druhého vlákna cDNA eliminovány (CLONTECHniques XIII, 1998) (obr. 13).



Obr. 13: Schéma postupu při konstrukci cDNA knihovny SMARTTM technologií (Clontech). (CLONTECHniques XIII, 1998)

4.7.3. Klonování ds cDNA do pGEM-T Easy

SMARTTM technologií připravená ds cDNA byla klonována do pGEM-T Easy, jak bylo popsáno v kapitole 4.5.1.

4.8. Sekvenování

Byly sekvenovány plazmidy pGEM-T Easy ověřené na přítomnost inserce. Přímé (direct) sekvenování bylo použito pro získání sekvence neklonovaných PCR fragmentů. Veškeré sekvenování bylo prováděno na sekvenátoru ABI PRISM 3100 Genetic Analyser s použitím BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitu dle návodu výrobce (protokol viz příloha 5). Některé plazmidy byly orientačně sekvenovány na gelovém sekvenátoru ALFII s použitím CycleReader™ Auto DNA Sequencing kit dle návodu výrobce (protokol viz příloha 6).

4.9. PCR s univerzálními primery

V PCR s univerzálními primery z cDNA knihovny nebo gDNA z *C. rubrum* byla použita aTaq polymeráza (Promega). PCR reakce probíhaly v T Gradient cykleru v objemu 25 μ l za následujících podmínek: **počáteční denaturace 2 min při 94°C a dále 35 cyklů 40 s při 93°C, 45 s při 54°C a 2 min při 72°C; závěrečná extenze 10 min při 72°C.** (Tyto podmínky budou dále označovány jako „standardní PCR podmínky“ s uvedením teploty nasedání PCR primerů). PCR reakce obsahovala destilovanou deionizovanou vodu; 1x Reaction pufr; 3 mM Mg^{2+} ; 200 μ M dNTP; 0,12 μ M primer For; 0,12 μ M primer Rev a 1,25 U aTaq polymerázy.

4.10. Metoda modifikované RACE

cDNA knihovna byla použita jako templát v modifikované RACE proceduře (Rapid amplification of cDNA ends) založené na semi-nested PCR (Huang a Chen, 2006).

RACE je procedura pro amplifikaci 5' a 3' konců cDNA klonovaných v plazmidu. Jde o PCR s jedním primerem zacíleným do známé sekvence vektoru a druhým specifickým primerem komplementárním ke klonované sekvenci. V mnoha případech není amplifikováno dostatečné množství PCR produktu, což se týká především 5' konce sekvence genu.

Tento problém je řešen modifikací metody, která spočívá v zařazení dalšího kroku, semi-nested PCR. Malé množství PCR produktu z RACE je použito jako templát v semi-

nested PCR se stejným primerem cíleným do vektoru a dalším „nestovacím“ primerem zacíleným do specifické sekvence blíže konci genu.

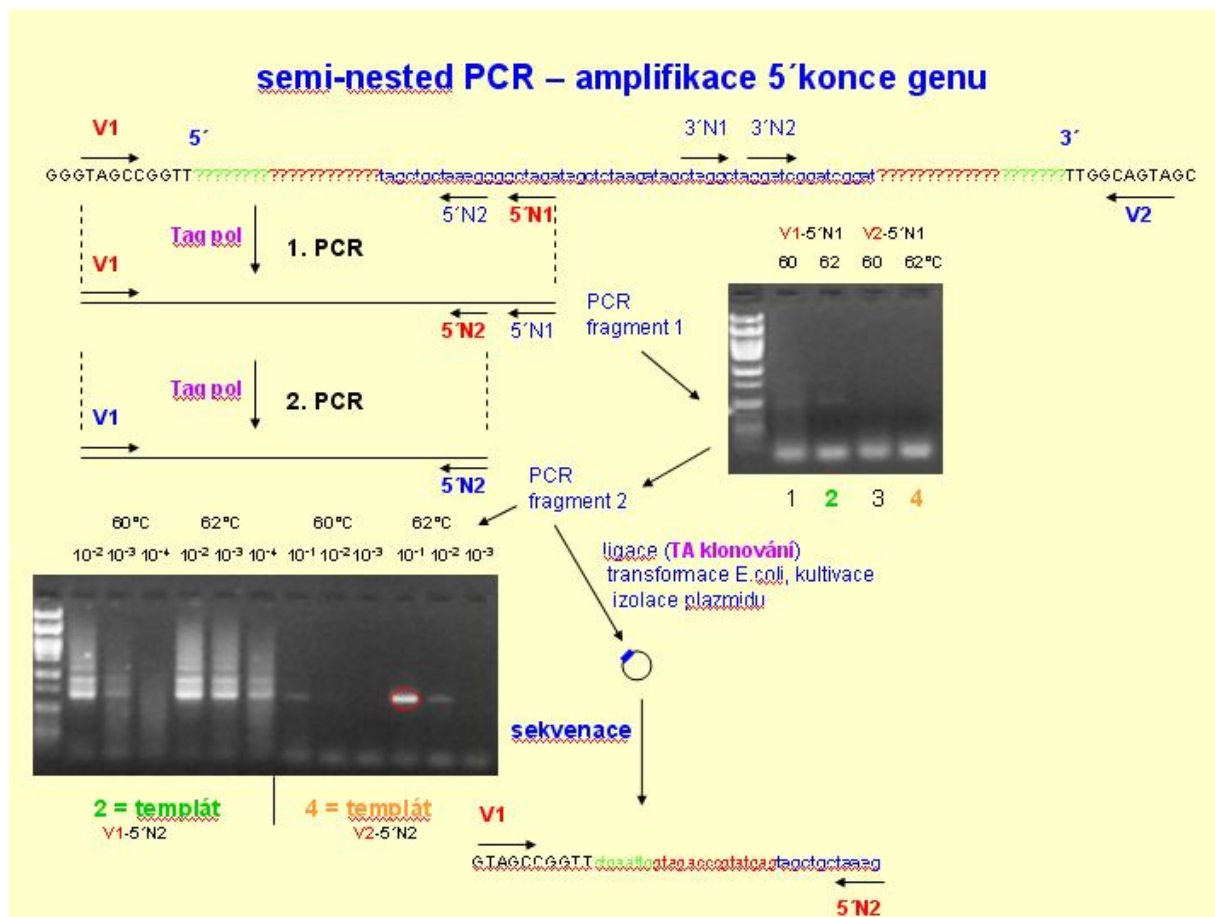
4.10.1. RACE

Pro identifikaci úplného 5' konce genu byla provedena RACE s cDNA knihovnou jako templátem. V RACE byly použit primer zacílený do sekvence pGEM-T Easy vektoru a dále specifický RACE reverse primer (tabulka 3). Pro identifikaci 3' konce genu bylo postupováno obdobně s použitím specifického forward RACE primeru (tabulka 3).

S ohledem na možnost vložení cDNA do vektoru v obou směrech byly použity kombinace více primerů zacílených do pGEM-T Easy se specifickým reverse RACE primerem pro nalezení 5' konce cDNA (RACE) a obdobně pro hledání 3' konce. PCR podmínky byly standardní.

4.10.2. Semi-nested PCR

Pokud nebyl po RACE proceduře na elektroforetickém gelu detekovatelný proužek PCR produktu, 10x až 1000x ředěný PCR produkt byl reamplifikován se stejným primerem zacíleným do pGEM-T Easy vektoru a dalším specifickým nestovacím primerem (tabulka 3) zacíleným blíže ke konci známé sekvence genu (semi-nested PCR). PCR běžela za standardních podmínek s tím, že byl použit gradient teplot nasedání primerů. PCR fragmenty byly klonovány a sekvenovány. Obdobně se postupovalo při získání 3' konce genů. Celý postup modifikované RACE je schematicky znázorněn na obr. 14.



Obr. 14: Modifikovaná RACE, semi-nested PCR: 1. PCR = RACE; 5'N1 = RACE primer pro amplifikaci 5' konce cDNA; 3'N1 = RACE primer pro amplifikaci 3' konce cDNA; 2. PCR = semi-nested PCR; 5'N2 = nestovací primer pro amplifikaci 5' konce cDNA z PCR produktu získaného v RACE; 3'N2 = nestovací primer pro amplifikaci 3' konce cDNA z PCR produktu získaného v RACE; V1 = Modified universal primer; V2 = Modified reverse primer; Taq pol = Taq polymeráza; černý kroužek znázorňuje plazmid, modrý úsek v něm vložený PCR fragment; 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} = použité ředění templátu; černě označená sekvence = sekvence vektoru; zeleně označená sekvence = sekvence UTR; červeně označená sekvence = sekvence 5' a 3' konce cDNA; modře označená sekvence = známá sekvence genu; červeně označený primer – použitý v dané PCR; PCR produkt v červeném kroužku na gelu poskytl hledanou sekvenci 5' konce genu.

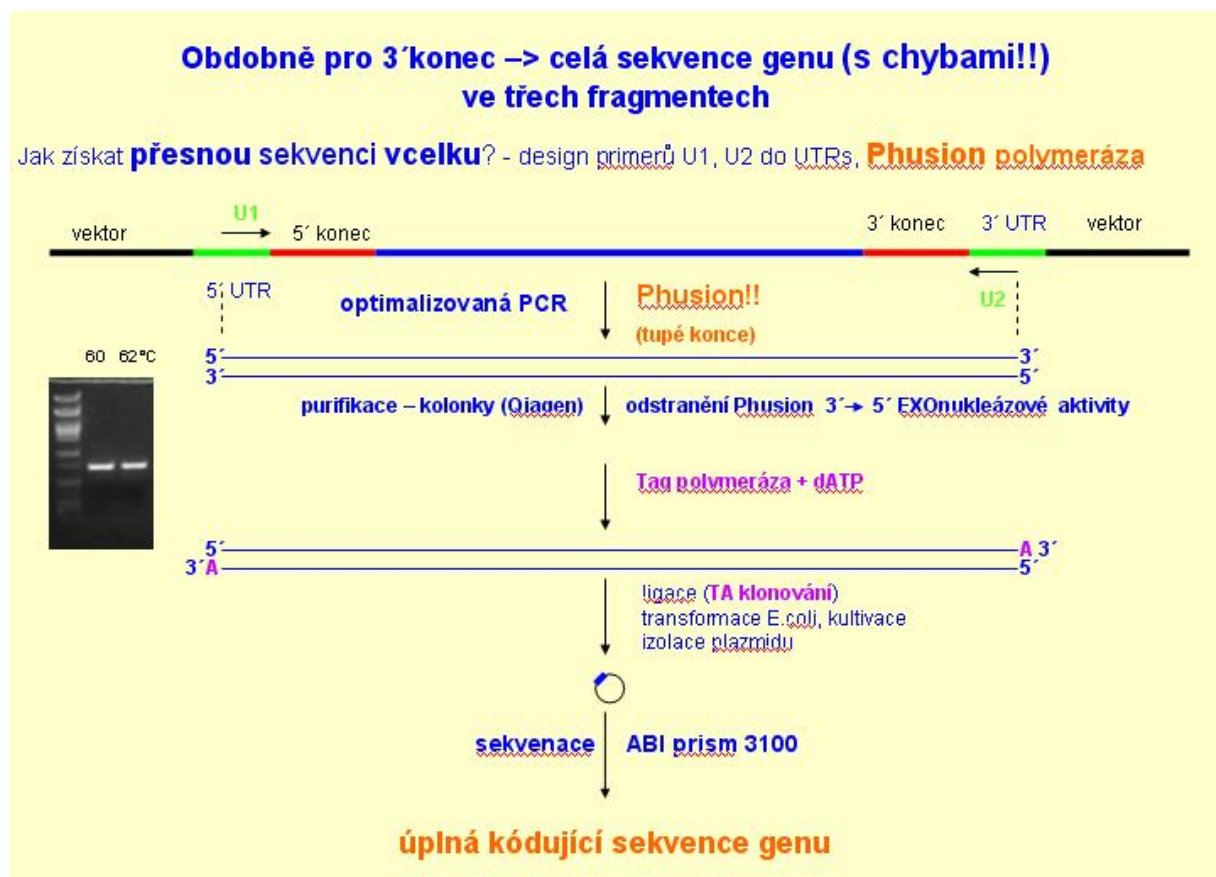
4.11. Příprava cDNA klonů o úplné délce pro transformaci

Pro amplifikaci cDNA genu o úplné délce byly použity primery cílené do 5' a 3' nepřekládaných oblastí genu (UTR) (tabulka 3). cDNA knihovna byla amplifikována pomocí Phusion high-fidelity DNA polymerase za následujících PCR podmínek: 30 s při 98°C a následně 35 cyklů 10 s při 98°C, 20 s při 57,3°C - 60°C a 45 s při 72°C; závěrečná extenze 5 min při 72°C. Phusion polymeráza generuje PCR produkty s tupými konci.

4.11.1. A-tailing

K tupým koncům PCR produktu amplifikovaného Phusion polymerázou byly na 3' konec obou řetězců přidány jednonukleotidové přesahy 2-deoxyadenosintrifosfátu (tzv. A-tailing) (Knoche a Kephart, 1999) (protokol viz příloha 7). Takto upravená cDNA o úplné délce byla klonována a sekvenována. Celý postup klonování genů o úplné délce je schematicky znázorněn na obr. 15.

Úplná cDNA genů byla dále připravena pro transformaci do *Agrobacterium tumefaciens* a *Arabidopsis thaliana*, jak bude popsáno v kapitole 4.13.



Obr. 15: Klonování cDNA o úplné délce. dATP = 2-deoxyadenosintrifosfát; U1 = forward primer zacílený do 5' nepřekládané oblasti genu; U2 = reverse primer zacílený do 3' nepřekládané oblasti genu; Taq pol = Taq polymeráza; černě označená sekvence = sekvence vektoru; zeleně označená sekvence = sekvence UTR; červeně označená sekvence = sekvence 5' a 3' konce cDNA; modře označená sekvence = (původně) známá sekvence genu;

4.12. PCR primery

V tabulce 3 je výčet všech PCR primerů navržených a použitých v této práci.

Účel primeru	Název primeru	Sekvence (5' – 3')
Identifikace a studium exprese <i>CrFTL</i>, <i>CrCOL</i> a <i>CrFL</i> genů		
Konstrukce cDNA knihovny		
Konstrukce univerzální cDNA knihovny	SMART II A Oligonukleotid	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
Konstrukce cDNA knihovny FT720-5	SMART IV TM Oligonucleotide	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTA CGGCCGGG
Konstrukce univerzální a FT720-5 cDNA knihovny	CDS III/3' PCR Primer	ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCCGACATG-d(T) ₃₀ N ₋₁ N N (A, C, G, T); N ₋₁ (A, C, G)
Konstrukce univerzální a FT720-5 cDNA knihovny	5' PCR Primer II A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
RACE + semi-nested PCR		
pGEM-T Easy	Modified universal primer	GGTAACGCCAGGGT
pGEM-T Easy	Modified reverse primer	TGTTATCCGCTCACAATTCC
pGEM-T Easy	M13(JL)	GTAACGACGACGGCCAGTG
pGEM-T Easy	M13rev(JL)	GCTATGACCATGATTACGC
RACE z univerzální cDNA knihovny	5' PCR Primer II A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
RACE z univerzální cDNA knihovny	CDSIII3'-23	ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCCGA
<i>CrFTL</i>		
<i>CrFTL1</i>		
<i>CrFTL1</i> 5' RACE	CrFT116Rev	CCTAATTGTCGAAACAACACGA
<i>CrFTL1</i> 5' Nestovací	CrFT83Rev	CACCGATGGTCTTGGACTCT
<i>CrFTL1</i> 3' RACE	CrFT39For	TTTGGCCAAGAGTTGTTTGG
<i>CrFTL1</i> 3' Nestovací	CrFT78For	TCGGTGGGTATACATCGATTCT
<i>CrFTL1</i> úplná sekvence	CrFTL1For	CAGGCAGATATATAGAGTTGTGCGAA
	CrFTL1Rev	TCCAATGATCTCTTCACGGTAG
<i>CrFTL1</i> - qPCR	CrFT720-52For	TGCACTGGTTGGTGACTGAT
	CrFT720-298Rev	CCCTCCCTTTGACAATTGAA
<i>CrFTL2</i>		
<i>CrFTL2</i> 5' RACE	CrFT142Rev	TCAGAGGATGCATCAGAGGT
<i>CrFTL2</i> 3' RACE	CrFT345For	GGTTGGTGACTGATATTCCAG
<i>CrFTL2</i> úplná sekvence	CrFT787-35For	GGGACAAAACCTTCCAATGA
	CrFT787-787Rev	GACATTAGGCAAACACTTGTAGAA
<i>CrFTL2</i> - qPCR	CrFT787-361For	ATATTCCCGGGACCTCTGAT
	CrFT787-536Rev	TTCAGCGAAGGCTTCTGTTT
<i>CrCOL</i>		
CO-univerzální	CONDEG94F	GAGCTAATCCTCTTGCTAGAAGACAYCANM GNRT
	CONDEG307R	TTTTCTAGTTTTCTTCTTTTCTCTATATCTAAG AACNCKNGCYTC
<i>CrCOL</i> 5' RACE	CrCON1523rev	GGCCTTGAATGTGACACAGA
<i>CrCOL</i> 3' RACE 1	CrCON138for	GTAAGGGGATGAGGATGAAG
<i>CrCOL</i> 3' RACE 2	CrCON1456for	TCCTCCCTAGATGTGGGTGT
<i>CrCOL</i> 3' Nestovací	CrCON1508for	TGTCACATTCAAGGCCTCCT
<i>CrCOL</i> úplná sekvence	CrCON51_5UTR1	GGGACAGCAGAGAGAACCAA
	CrCON51_3UTR	TTTATTGGCAGCACAAACCAA
<i>CrCOL1s</i> - qPCR	252+51F	GGATTCCCTGGACCTACCAGACA
	252+54R1	CAGAAITGATTATCTGCACCTGGG

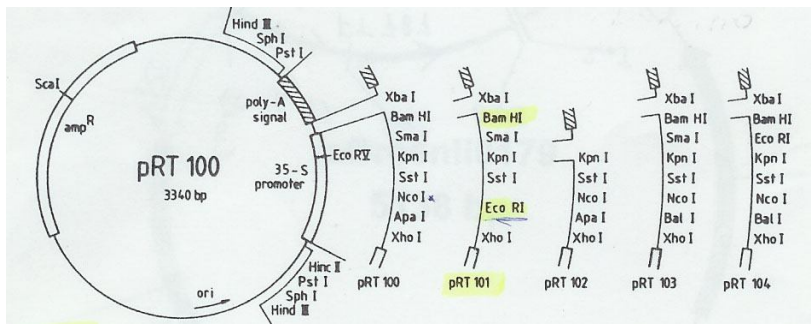
Účel primeru	Název primeru	Sekvence (5' – 3')
<i>CrCOL1s</i> - qPCR	Próba TMall	FAM-CGAAGCAGCTTCATCCTCATCCCC-TMR
<i>CrCOL1</i> - qPCR	252+51F	GGATTCCTGGACCTACCAGACA
	252+54R2	TCTGCACCTGAATTATACTCAAAGAG
	Próba TM252	FAM-CCTCCTCCAGTTAAAAACCCATTT-TMR
<i>CrCOL2s</i> - qPCR	54+256F	GATTCCTGGACCTGCCAGATG
	252+54R1	CAGAAYTGATTATCTGCACCTGGG
	Próba TMall	FAM-CGAAGCAGCTTCATCCTCATCCCC-TMR
<i>CrCOL2</i> - qPCR	54+256F	GATTCCTGGACCTGCCAGATG
	252+54R2	TCTGCACCTGAATTATACTCAAAGAG
	Próba TMall	FAM-CGAAGCAGCTTCATCCTCATCCCC-TMR
Ověření alternativního sestřihu <i>CrCOL</i> transkriptů	CrCON51for542	GCTACTTAACCCAGGTGCAGAT
	CrCON51rev710	ACATTCCATCCCGAACAAAA
	CrCON54for1	TGGGTTTTTAACAGGAGGAGA
	CrCON54rev1	TCACATTCCATTCCGAACAA
CrFL		
<i>CrFL</i> -částečná sekvence	LFY800For	CGAAAGGCAAAGGGAACACC
	LFY800Rev	ACCAGCAGAGATGGAGTTGC
<i>CrFL</i> 5' RACE 1	LFY200Rev	GCATCAATATCCCACCCTTG
<i>CrFL</i> 5' RACE 2	LFY456Rev	CGGAGCTTGGTGGGTACATA
<i>CrFL</i> 5' Nestovací 2	CrLFY171Rev	TCCTGGCACAGTTACAATGAA
<i>CrFL</i> 5' RACE 3	CrLFYfive4rev	TTCGAGTAACTCATGTGGTGGTTGTG
<i>CrFL</i> 5' RACE + nestovací 3	CrLFYfive3rev	GAGAGGCTGTTCATCATCTCATC
<i>CrFL</i> 5' RACE + nestovací 3	CrLFYfive2rev	CTCTTCTCCTTCATGTCCACTA
<i>CrFL</i> 5' Nestovací 3	CrLFYfive1rev	TCATGTCCACTAGTGTGTTACC
<i>CrFL</i> 3' RACE	LFY694for	CCAAGGGTGGGATATTGATG
<i>CrFL</i> 3' Nestovací	LFY734for	CGCCTCTCCATTTGGTATGT
<i>CrFL</i> - qPCR	LFY200For	GATTCGCAAAGAAAGCAGGA
	LFY200Rev	GCATCAATATCCCACCCTTG
Aktin		
Aktin - qPCR	ACT-2_for	CATCGTGCTCAGTGGTGGTA
	ACT-2_rev	TGAGGGATGCAGGGATAGAC
Příprava cDNA	Oligo-dT ₂₃ dV	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV
Amplifikace genomické sekvence <i>CrFTL</i>, <i>CrCOL</i> a <i>CrFL</i> genů z <i>C. rubrum</i>		
<i>CrFTL1</i> – 3. intron	CrFT345For	GGTTGGTACTGATATTCCAG
	CrFT501Rev	CGCCACCCTGGTGCATACAC
<i>CrFTL1a</i> , <i>CrFTL1b</i> – 1. a 2. intron	FTL1-224for	AATTCAGGCCCTCTCAGGTT
	FTL1-386rev	CTCCCCGGAATATCAGTCAC
<i>CrFTL1a</i> – 2. a 3. intron	FTL1a-5480F1	CTAAGCCAGGATTATACGCT
	CrFT720-298Rev	CCCTCCCTTTGACAATTGAA
<i>CrFTL1b</i> – 2. a 3. intron	FTL1b-5508F1	TTCTTGCTAAATACTCCCTCCA
	CrFT720-298Rev	CCCTCCCTTTGACAATTGAA
<i>CrFTL2</i> – 1. a 2. intron	FTL1-224for	AATTCAGGCCCTCTCAGGTT
	FTL1-386rev	CTCCCCGGAATATCAGTCAC
<i>CrFTL2</i> – 3. intron	CrFT787-361For	ATATTCCCGGGACCTCTGAT
	CrFT787-536Rev	TTCAGCGAAGGCTTCTGTTT
<i>CrCOL1</i> – 1. intron	CrCOintr410FOR	TTTTGTTCCGGGATGGAATGT
	CrCOintr1169REV	TGAGTTGGAGATAAACCCAGT
<i>CrFL</i> – 1. intron	CrLFYint1For1	AGGAAGAGGTGGATGAGATGATG
	CrLFYint1Rev1	TGACTTGTGTGGTGGTTGTTAGG
<i>CrFL</i> – 2. intron	LFY800For	CGAAAGGCAAAGGGAACACC
	LFY800Rev	ACCAGCAGAGATGGAGTTGC

Účel primeru	Název primeru	Sekvence (5' – 3')
Amplifikace genomického fragmentu <i>FTL</i> genů u zástupců rodu <i>Chenopodium</i>		
FT-univerzální	CrFT345For	GGTTGGTACTGATATTCCAG
	CrFT501Rev	CGCCACCCTGGTGCATACAC
Interní primery pro amplifikaci a sekvenaci 3. intronu <i>FTL</i> genu		
<i>C. album</i> ssp. <i>suecicum</i>	Chalb234IntronFor1	GGGATAAAAGGCGAGAAAGG
	Chalb234IntronRev1	GAGCAATGAATTGGTAAAGGCTA
<i>C. murale</i>	MuIntroFOR1	GCACATTGAATGCCCTGATA
	MuIntroREV1	CCACTTGGGAGTACCTTTGG
<i>C. hybridum</i>	HyIntron1154For1	TATATGCCGCATGCATTGAT
	HyIntron1154Rev1	CCACTCATTTGCGCTCCTTA
<i>C. polyspermum</i>	Polysp678IntronFor1	TATATGCCGCATGCATTGAT
	Polysp678IntronRev1	CACATCTTGTTGGGTGATGC
<i>C. schraderianum</i>	Foe1046IntronFOR1	ATTTGCGGTTGCTTTTATGC
	Foe1046IntronREV1	GCGTGTTGCATGGTTTATCA
<i>C. giganteum</i>	Chamar1714Int197For	ACTCACCGGAGAGCACTGTT
	Chamar1714Int937Rev	AACCAGGTTGAGTTCCTTACCA
<i>C. quinoa</i>	QuIntron 1845For	AAGTTGTTGTGTTTTTGCCCTTA
	QuIntron 1845Rev	GGCGGATAGCAACATTAACC
Mt insert ve 3. intronu <i>FTL1845</i> z <i>C. quinoa</i>	QuMTCH 1845For	GGTCGCGTTCCTTCTTAATG
	QuFT1845rev	TCGATGTATTCCCTGGGATG
Dlouhý insert ve 3. intronu <i>FTL</i> u <i>C. quinoa</i> z Bolívie	QuB13vnitr359For	TGTTTATGCCCTTCTAATTGTCT
	B13vnitr462	TGAGGGAAAACTCCTCACG
	QuB13vnitr742Rev	CAAGAGGAGTAAAGGAGTGC

Tabulka 3: Sekvence PCR primerů použitých a navržených v této práci. Primery pro aktin, LFY800For+Rev a LFY200For+Rev byly navrženy Justynou Veit, primery M13(JL) a M13rev(JL) navrhl Jiří Libus. Modified universal primer a Modified reverse primer jsou součástí Thermo Sequenase™ Cy™5 Dye Terminator Kit, primer SMART II A Oligonukleotid, CDS III/3' PCR Primer, SMART IV™ Oligonucleotide a 5' PCR Primer II A je součástí SMART PCR cDNA Synthesis kit a SMART™ cDNA Library Construction Kit. V degenerovaných primerech: K (G, T); M (A, C); N (A, C, G, T); R (A, G); V (C, G, T)

4.13. Subklonování *CrFTL* a *CrCOL* genů

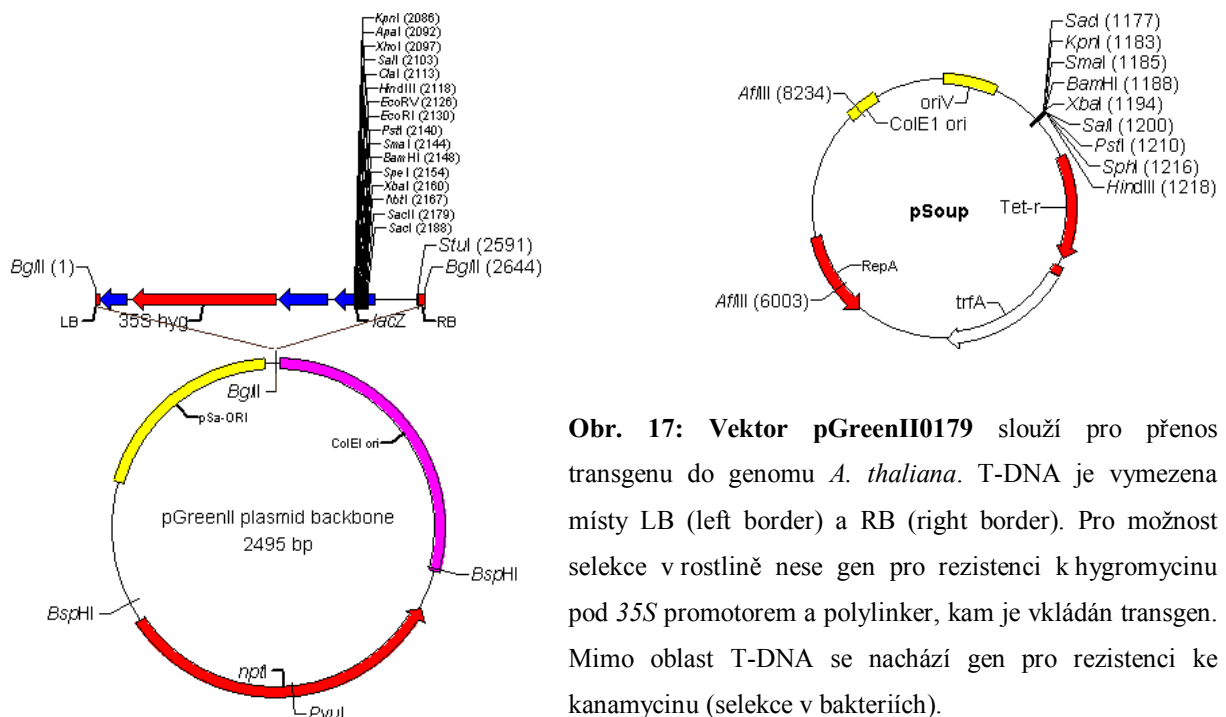
Pro možnost ověření funkce genů izolovaných z *C. rubrum* v *A. thaliana* bylo nutno opatřit je silným promotorem, zajišťujícím v rostlinách vysokou úroveň transkripce a poly-A signálem. Proto byly cDNA genů izolovaných z *C. rubrum* subklonovány do vektoru pRT101 za 35S promotor a před poly-A signál (obr. 16). Z pRT101 byly vyštěpeny fragmenty 35S::*FTL* respektive 35S::*COL* a dále subklonovány do vektoru pGreenII0179 odvozeného od Ti-plazmidu *A. tumefaciens*. pGreenII0179 umožňuje přenos konstruktu 35S::*FTL* respektive 35S::*COL* do genomu *A. thaliana*.



Obr. 16: Vektor pRT101 nesoucí promotor 35S z CaMV, viru kvěťákové mozaiky (Cauliflower mosaic virus) + poly-A signál a gen pro ampicilinovou rezistenci. Töpfer et al., 1987

4.14. Transformace *Agrobacterium tumefaciens*

Kmen GV3101 *Agrobacteria tumefaciens* je po vnesení konstruktů odvozeného od Ti-plazmidu *A. tumefaciens* schopen včlenit část tohoto konstruktů, tzv. T-DNA (transferred DNA) do rostlinného genomu. Tato metoda je používána ke vnášení transgenů do genetické informace rostliny. Jeden ze systémů přenosu transgenů do *A. thaliana* využívá vektorů pGreen, v našem případě pGreenII0179 (obr. 17) a tzv. helper plazmidu pSOUP (obr. 17) (Hellens et al, 2000).



Obr. 17: Vektor pGreenII0179 slouží pro přenos transgenů do genomu *A. thaliana*. T-DNA je vymezena místy LB (left border) a RB (right border). Pro možnost selekce v rostlině nese gen pro rezistenci k hygromycinu pod 35S promotorem a polylinker, kam je vkládán transgen. Mimo oblast T-DNA se nachází gen pro rezistenci ke kanamycinu (selekce v bakteriích).

Helper plazmid pSOUP nese *RepA* gen nutný pro in trans replikaci pGreen plazmidu v *A. tumefaciens*. Přesunutím *RepA* genu na Helper plazmid je dosaženo minimální velikosti pGreen plazmidů.

Hellens et al., 2000; www.pgreen.ac.uk

Agrobacterium tumefaciens GV3101 nesoucí pSOUP bylo pěstováno v tekutých médiích nebo na petriho miskách - YEB nebo LB médium s antibiotiky gentamycinem (GEN) 25 µg/ml, rifampicinem (RIF) 70 µg/ml a tetracyklinem (Tc) 10 µg/ml při 28°C. Pro dlouhodobé uložení byly připraveny konzervy v 32,5% glycerolu a zamraženy při -80°C (protokol viz příloha 8). Z GV3101 byly připraveny elektrokompetentní buňky (protokol viz příloha 9) a transformovány elektroporací na přístroji Bio-Rad *E. coli* Pulser (protokol viz příloha 10) plazmidem pGreenII0179 nesoucím cDNA *CrFTL* anebo *CrCOL* genu. Selektce probíhala na petriho miskách s YEB nebo LB médium a antibiotiky gentamycinem (GEN) 25 µg/ml, rifampicinem (RIF) 70 µg/ml, tetracyklinem (Tc) 10 µg/ml a kanamycinem (KAN) 50 µg/ml při 28°C. Z vyrostlých kolonií *A. tumefaciens* byly izolovány plazmidy metodou alkalické lyze (protokol viz příloha 4) a pomocí PCR se specifickými primery ověřeny na přítomnost *CrFTL1*, *CrFTL2*, *CrCOL1* a *CrCOL2s* cDNA. Z ověřených klonů *A. tumefaciens* byly udělány konzervy.

4.15. Transformace *Arabidopsis thaliana*

Rostliny určené k transformaci byly vyselektovány v době, kdy měly vytvořeny první 1-2 šesule. Bezprostředně před transformací byly rostlinám ostříhány již vytvořené šesule a rozvíjející se poupata, aby byla ze sklizně eliminována netransformovaná semena. Transformace byla prováděna máčením květenství v suspenzi *Agrobacterium tumefaciens* (floral dip) (Clough a Bent, 1998) (protokol viz příloha 11).

4.16. Měření transkripčních profilů nově identifikovaných genů

4.16.1. Příprava cDNA reverzní transkripcí (RT)

Pro účely měření hladin transkriptů nově izolovaných genů byla cDNA připravena následovně: 1-2 µg celkové RNA bylo smícháno s 500 ng primeru oligo-dT₂₃dV a zahřáto 5 min při 70°C, poté zchlazeno na ledu a smícháno s pufrem pro reverzní transkripci (RT), 1,2 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor (40 U/µl) a 100 U M-MLV Reverse Transcriptase RNaseH Minus, Point Mutation, v celkovém objemu 25 µl. První řetězec cDNA byl syntetizován 60 min při 42°C.

4.16.2. Kvantitativní Real-Time PCR

4.16.2.1. Kvantitativní Real-Time PCR se SYBR Green

Kvantitativní Real-Time PCR (qPCR) byla prováděna na přístroji LightCycler 1.2 (LC1.2) s použitím LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit a skleněných a plastových kapilár. První řetězec cDNA byl 20x naředěn a smíchán s 300 nM HPLC čištěnými primery v celkovém objemu 10 μ l. Amplifikace proběhla za následujících podmínek: 10 min počáteční denaturace při 95°C, 45 cyklů 10 s při 95°C pro denaturaci, 4 s při 58°C (aktin, *CrFTL1*) nebo 60°C (*CrFTL2*, *CrFL*) pro nasedání primerů a 7 s při 72°C pro amplifikaci. Po PCR byla zařazena analýza křivky tání (melting curve analysis) sestávající z 0 s při 95°C, 15 s při 60°C a zahřívání po 0,1°C/s na teplotu 95°C. V každém qPCR běhu byla zařazena cDNA z kalibrátorové RNA pro korekci variability měření mezi jednotlivými běhy.

Veškerá qPCR měření byla opakována na přístroji LightCycler[®] 480 (LC480) s použitím LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master a 96-jamkových destiček LightCycler[®] 480 Multiwell Plate 96 za stejných podmínek jako při měření aktinu a *CrFTL2* nebo lehce pozměněných podmínek: 10 s při 95°C pro denaturaci, 8 s při 58°C (*CrFTL1*) nebo 60°C (*CrFL*) pro nasedání primerů a 15 s při 72°C pro amplifikaci. Analýza křivky tání byla naprogramována následovně: 1 min při 95°C, 10 s při 60°C a zahřívání po 0,21°C/s na teplotu 95°C (souhrn viz tabulka 4).

4.16.2.2. Kvantitativní Real-Time PCR s TaqMan sondami

Pro rozlišení čtyř forem *CrCOL* transkriptů – alternativně sestřižené a nesestřižené formy *CrCOL1* a *CrCOL2* v rámci qPCR měření byly u TIB MOLBIOL GmbH (Německo) navrženy dva páry primerů a dvě TaqMan sondy (tabulka 3). qPCR bylo prováděno s použitím LightCycler[®] 480 Probes Master a 96-jamkových destiček LightCycler[®] 480 Multiwell Plate 96. Pro měření exprese všech čtyř forem *CrCOL* byl LC480 v rámci nastavení detekce Mono Color Hydrolysis Probes naprogramován takto: 10 min při 95°C a 45 cyklů 10 s při 95°C, 30 s při 60°C a 1 s při 72°C. První řetězec cDNA byl 20x naředěn a smíchán s 300 nM HPLC čištěnými primery a 50 nM TaqMan sondou v celkovém objemu 10 μ l.

Gen	<i>CrFTL1</i>		<i>CrFTL2</i>		<i>CrFL</i>		<i>Aktin</i>	
Přístroj	LC1.2	LC480	LC1.2	LC480	LC1.2	LC480	LC1.2	LC480
qPCR časy	10s-4s-7s	10s-8s-15s	10s-4s-7s	10s-4s-7s	10s-4s-7s	10s-8s-15s	10s-4s-7s	10s-4s-7s
Teplota	58°C	58°C	58°C	58°C	58°C	58°C	58°C	58°C
Primery	0,3 μM	0,4 μM	0,3 μM	0,4 μM	0,3 μM	0,4 μM	0,3 μM	0,5 μM
Plato/kapiláry	plast	96 jamek	plast	96 jamek	sklo	96 jamek	plast	96 jamek
Účinnost E	1,6	1,98	1,58	1,97	1,68	1,99	1,77	1,96
Gen	<i>CrFTL1</i>		<i>CrFTL2</i>		<i>CrFL</i>		<i>Aktin</i>	
Přístroj	Mastercycler ep <i>realplex</i>		Mastercycler ep <i>realplex</i>		Mastercycler ep <i>realplex</i>		Mastercycler ep <i>realplex</i>	
Algoritmus	Noise	CalQplex	Noise	CalQplex	Noise	CalQplex	Noise	CalQplex
qPCR časy	15s-15s-20s							
Teplota	58°C	58°C	60°C	60°C	60°C	60°C	58°C	58°C
Primery	0,3 μM							
Plato	96 jamek							
Účinnost E	1,65	1,67	1,91	1,87	1,54	1,54	1,63	1,65

Tabulka 4: qPCR podmínky pro měření transkripce genů *CrFTL1*, *CrFTL2*, *CrFL* a aktinu jakožto referenčního genu na přístrojích LC1.2, LC480 a Mastercycler® ep *realplex*. Teplota = teplota nasedání primerů;

V rámci výběrového řízení na koupi nového qPCR přístroje byl naší laboratoři zapůjčen přístroj Mastercycler® ep *realplex* (Eppendorf), na kterém byly změřeny transkripce všech čtyř studovaných genů (bez možnosti optimalizace qPCR podmínek). To poskytlo možnost srovnat výsledky měření na třech různých qPCR přístrojích. qPCR reakce se ukázaly být velmi robustní, neboť výsledky měření se od sebe významně nelišily.

Všechny qPCR reakce byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo maximální účinnosti PCR a nejnižších crossing pointů (Cp). Pro určení Cp byla použita metoda maxima druhé derivace, která je součástí LightCycler software v. 3.5 pro LC1.2, respektive LightCycler® 480 software v. 1.5. pro LC480. Všechny PCR produkty byly nanášeny na 1,8 - 2% agarózový gel s ethidium bromidem pro kontrolu přítomnosti nespecifických produktů.

4.16.3. Normalizace výsledků kvantitativní Real-Time PCR

Hladiny mRNA cílových genů v *C. rubrum* byly vztaženy k hladinám mRNA aktinu (AM263428; primery viz tabulka 3), jakožto referenčnímu genu. Přes kalibrátor normalizované poměry relativních množství cílového a referenčního genu byly spočítány takto:

$$E_T^{CpT(C)-CpT(S)} \times E_R^{CpR(S)-CpR(C)}$$

kde E_T , E_R jsou účinnosti cílového a referenčního genu qPCR analýzy, CpT , CpR crossing pointy cílového a referenčního genu, S je vzorek a C je kalibrátor.

Účinnost PCR byla stanovena z rovnice: $E = 10^{1/\text{slope}}$, popisující kalibrační křivku vygenerovanou z měření ředící řady cDNA o známém ředění. Hodnota směrnice (slope) byla získána z LightCycler software v. 3.5., LightCycler[®] 480 software v. 1.5 generoval účinnosti PCR automaticky podle stejného algoritmu.

4.17. Extrakce genomické DNA

Veškerá genomická DNA (gDNA) v rámci této práce byla extrahována metodou sorbitolové extrakce (Štorchová et al., 2000), standardně z přibližně 5 g živých listů rostlin. Extrakce DNA z transformantů *A. thaliana* byla prováděna z odumřelých pletiv.

4.18. Sekvenování genomického fragmentu nesoucího třetí intron *FTL* genů u zástupců rodu *Chenopodium*

Z genomické DNA třinácti zástupců rodu *Chenopodium* a *Atriplex nitens* byly s použitím FT-univerzálních primerů CrFT345for (třetí exon) a CrFT501rev (čtvrtý exon) amplifikovány PCR fragmenty *FTL* genů. PCR podmínky byly standardní s teplotou nasedání primerů při 54°C. PCR fragmenty byly klonovány a sekvenovány. Pokud nebylo možno složit forward a reverse sekvence z obou stran PCR fragmentu v důsledku jeho velké délky, byly navrženy nové „vnitřní“ primery (tabulka 3) použité pro sekvenaci vnitřní nepročtené oblasti zaklonovaného PCR fragmentu (příklad viz příloha 12).

4.19. Southernova hybridizace

Southernova hybridizace slouží k detekci specifických sekvencí v genomické DNA štěpené vhodným restriční enzymem. Ucelený protokol k provádění metody je uveden v příloze 13.

4.19.1. Příprava DNA fragmentů a jejich přenos na membránu kapilárním sáním

Přibližně 15-20 µg DNA bylo štěpeno enzymem EcoRI nebo HindIII po dobu 6 hodin. Restrikční fragmenty byly přes noc děleny na 0,8% elektroforetickém gelu s velikostním markerem DNA Molecular-Weight Marker VII, DIG-labelled v 1x TBE pufru při napětí 22 V. Fragmenty DNA byly kapilárním sáním (blotting) přeneseny v roztoku 20x SSC na pozitivně nabitou membránu Hybond N+ (Southern, 1975) a fixovány UV světlem (3 min 20 s, 1100 J/cm²) na přístroji ULTRA-LŮM CEX-800.

4.19.2. Značení sondy digoxigeninem (DIG) pomocí PCR

DIG značená sonda byla připravena v PCR s plazmidem nebo PCR fragmentem jakožto templátem a primery specifickými k *CrFTL1* respektive *CrFL* cDNA z *C. rubrum*. PCR byla provedena s použitím PCR DIG Probe Synthesis Kit podle návodu výrobce (Podrobný protokol viz příloha 14).

4.19.2.1. Hybridizační sonda pro detekci *CrFTL1*

Pokud byl jako templát k DIG značení použit přímo plazmid nesoucí zaklonovanou úplnou kódující sekvenci *CrFTL1* z cDNA, byla účinnost PCR výrazně nízká. Proto byl z tohoto plazmidu připraven PCR fragment genu *CrFTL1* pomocí primerů CrFT39For a CrFTL1Rev. PCR podmínky byly standardní s nasedáním primerů při 58°C. Tento PCR fragment byl 100x naředěn a použit jako templát v DIG značící PCR s použitím stejných primerů.

4.19.2.2. Hybridizační sonda pro detekci *CrFL*

Při přípravě sondy pro detekci *CrFL* byly pro amplifikaci použity primery LFY800for a LFY800rev nebo LFY456rev. Výchozím templátem byl osekvenovaný plazmid nesoucí PCR fragment *CrFL*. Tento fragment byl amplifikován z cDNA knihovny primery LFY800for a LFY800rev.

Pokud byla jako templát pro DIG značení použita cDNA knihovna (heterogenní směs templátů, nikoli osekvenovaný a tedy definovaný templát), poskytovala Southernova hybridizace jiné výsledky.

4.19.3. Hybridizace

Membrána Hybond N⁺ s fixovanou štěpenou DNA byla prehybridizována v hybridizačních tubách s 20-25 ml DIG Easy Hyb při 42°C po dobu 2-3 hodin a poté hybridizována s denaturovanou sondou přes noc při 42°C. Druhý den ráno byla membrána 2x promyta za zvyšujících se stringentních podmínek (2x SSC, 42°C a 0,1x SSC, 65°C) a omyta pomocí washing pufru. Po zablokování nespecifických míst pro vazbu protilátky proti DIG (blocking pufr) byla membrána koupána v roztoku Anti digoxigenin-AP conjugate, Fab fragments (konjugát protilátky proti DIG a alkalické fosfatázy) v blocking pufru. Nakonec byla membrána koupána v CDP-Star, substrátu pro alkalickou fosfatázu. Světelný signál byl detekován na Hyperfilmu a expozice 1,5 – 4 hodiny byla dostatečná k vizualizaci single genů.

V případě potřeby je možno hybridizovanou sondu z membrány odstranit (stripping) a znovu membránu hybridizovat s jinou sondou. Hybridizace strippovaných membrán stejně jako opakované použití sondy ústí ve slabší signál při detekci.

4.19.4. DNA DOT Blotting

Při hledání 5' a 3' konců cDNA genů některé PCR poskytovaly velké množství PCR produktů o různé velikosti. Ty bylo třeba rozklonovat a následně jednotlivé klony otestovat na přítomnost specifické sekvence. Taktéž bylo potřeba zjistit specifitu sondy pro detekci *CrFTL1* genu a tedy ji hybridizovat se sekvencemi *CrFTL1* a *CrFTL2*.

Pro oba tyto účely byla použita metoda DNA DOT Blotting a pro první z nich též Colony hybridization. Obě metody jsou modifikací Southernovy hybridizace. V případě DNA DOT Blotting se na membránu (Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization) přímo pipetuje malé množství plazmidů izolovaných z jednotlivých klonů bakterií. V případě Colony hybridization je na Hybond N⁺ membránu přenášena DNA přímo z proužků bakteriální kultury rostoucích na tuhém médiu v petriho misce. Následuje hybridizace se sondou detekující specifickou sekvenci DNA. Podrobný protokol k provádění DNA DOT Blotting a Colony hybridization viz příloha 15.

4.20. Analýza sekvencí a fylogenetická analýza

4.20.1. Skládání a editace sekvencí

Skládání a editace sekvencí byly prováděny v programu VectorNTI Suite 9. Výsledné sekvence byly alignovány nástrojem AlignX v programu VectorNTI a dále upraveny ručně. Pro vkládání mezer v alignmentu byl použit program BioEdit (Hall, 1999). Pro přenos alignmentů mezi programy VectorNTI a BioEdit byl použit msf formát souboru.

4.20.2. Fylogenetická analýza

Pro přesnější určení vzájemných vztahů mezi jednotlivými geny byly provedeny fylogenetické analýzy na základě sekvencí nukleotidů. Taktéž byly využity proteinové sekvence aminokyselin odvozené od nukleotidových sekvencí. Všechny fylogenetické analýzy byly udělány Dr. Helenou Štorchovou.

4.20.2.1. Fylogenetické analýzy na základě sekvence aminokyselin

Fylogenetické vztahy mezi jednotlivými geny byly určeny s použitím metody maximální parsimonie (MP) v programu PAUP* 4.0 b10 (Swofford, 2003) na základě sekvence aminokyselin. Byl začleněn model evoluce založený na jednotlivých kodónech, který považuje záměnu reziduí aminokyselin minimálním počtem nukleotidových změn potřebných pro záměnu jedné aminokyseliny v druhou (Felsenstein, 2004). Pro zkrácení času hledání fylogenetických stromů byly využity strategie heuristického hledání.

4.20.2.2. Fylogenetické analýzy na základě sekvence nukleotidů

Fylogenetická příbuznost mezi jednotlivými geny na základě kódujících sekvencí (část třetího a část čtvrtého exonu *FTL* genů) byla určena pomocí neighbour-joining (NJ, bez mezer) v programu PAUP* 4 b10 (Swofford, 2003) s použitím GTR substitučního modelu. Nejvhodnější substituční model byl vybrán pomocí Modeltest (Posada a Crandall, 1998).

Stejná data byla analyzována též metodou maximum likelihood (ML) s použitím GTR substitučního modelu. Tak byl odhadnut předpokládaný podíl neproměnných pozic a gamma distribuce poměrů na proměnných pozicích (GTR+G+I model). Podpora větví byla určena s použitím heuristického hledání a 500 pseudoreplik.

Alignment nekódujících sekvencí *FTL* genů (3. intron) obsahoval hodně mezer. Pro správné nakládání s insercemi a delecemi bylo použito jejich jednoduché kódování (Simmons

a Ochotorena 2000). Tato metoda považuje mezery jako odlišné znaky a ne jako páté báze. Mezery byly převedeny do matice znaků pomocí SeqState (Müller, 2005). Matice substituce nukleotidů a matice znaků tak vytvořily kombinovaná data, která byla analyzována metodou MrBayes (<http://mrbayes.csit.fsu.edu/>).

5. VÝSLEDKY

5.1. Úplné kódující sekvence nově identifikovaných genů z *C. rubrum*

Úplné kódující sekvence *CrFTL*, *CrCOL* a *CrFL* genů byly amplifikovány z dvou cDNA knihoven připravených SMARTTM technologií. Pro identifikaci úplné kódující sekvence genu bylo postupováno následovně: 1) PCR s univerzálními primery pro získání částečné sekvence genu; 2) RACE s následnou semi-nested PCR pro získání 5' a 3' konce cDNA; 3) PCR s primery zacílenými do 5' a 3' UTR genu pro amplifikaci úplné cDNA.

Všechny PCR s univerzálními primery, RACE a semi-nested PCR běžely za standardních PCR podmínek. Úplná kódující sekvence byla získána pomocí primerů cílených do UTR pomocí polymerázy Phusion.

5.1.1. Konstrukce cDNA knihoven

Pro amplifikaci úplných kódujících sekvencí *CrFTL1*, *CrFTL2*, *CrCOL1*, *CrCOL1s*, *CrCOL2* a *CrCOL2s* a neúplné sekvence *CrFL* sloužily jako PCR templát dvě cDNA knihovny, pracovně označené „univerzální“ a FT720-5.

Pro přípravu „univerzální“ cDNA knihovny, obsahující potenciální homology *CO*, *FT* a *LFY* genů byla použita celková RNA z apexů a svrchních listů 3-týdenních rostlin *C. rubrum*, které byly indukovány ke kvetení jednou 12 hodin trvající tmou. Z této knihovny byly získány dvě parciální sekvence *COL* genů – *CrCOL1s* a *CrCOL2* bez úplných 3' konců, neúplné sekvence *CrFTL1* a *CrFL* s chybějícími 5' konci a úplná sekvence *CrFTL2*.

Pro získání kompletního 5' konce *CrFTL1* a kompletní sekvence *CrFTL1* cDNA byla připravena nová cDNA knihovna (označená FT720-5). Z ní byly navíc amplifikovány úplné kódující sekvence *CrCOL1*, *CrCOL1s*, *CrCOL2* a *CrCOL2s*. Pro konstrukci FT720-5 knihovny byla použita celková RNA extrahovaná z listů patnáctidenních rostlin *C. rubrum*, které byly indukovány ke kvetení třemi 12 hodin trvajícími fázemi tmy. Jednalo se o RNA, která dle výsledků qPCR obsahovala velká množství *CrFTL1* mRNA.

Obě cDNA knihovny byly konstruovány Dr. Helenou Štorchovou (ÚEB AV ČR v.v.i., Praha).

5.1.2. Získání úplných kódujících sekvencí *CrFTL1* a *CrFTL2*

5.1.2.1. PCR s FT-univerzálními primery

Na základě alignmentu sekvencí studovaných a prokázaných *FT* genů (*A. thaliana*, *FT*, NM_105222.2; *Populus nigra*, *PnFT2a*, AB110009.1; rýže, *Hd3a*, AB052944.1; rajče, *SP3D*, AY186735.1; *Citrus unshiu*, *CiFT*, AB027456.1) byl navržen pár FT-univerzálních nedegenerovaných primerů zacílených do konzervované oblasti třetího (*CrFT345For*) a čtvrtého (*CrFT501Rev*) exonu (tabulka 3). 100x ředěná cDNA knihovna z *C. rubrum* byla amplifikována s nasedáním těchto primerů při teplotě 54°C. PCR fragment byl klonován a sekvenován a ze získané částečné *FTL* sekvence (pojmenované *CrFTL1*) byly navrženy nové specifické primery 3' RACE (*CrFT39For*), 3' nestovací (*CrFT78For*), 5' RACE (*CrFT116Rev*) a 5' nestovací (*CrFT83Rev*) pro hledání 5' a 3' konce genu (tabulka 3).

5.1.2.2. *CrFTL2*: 3' RACE a získání 3' konce

Pro nalezení 3' konce *FTL* sekvence byla provedena RACE se 100x ředěnou cDNA knihovnou. PCR běžela s nasedáním Modified universal primeru (součást Thermo Sequenase™ Cy™5 Dye Terminator Kit, Amersham Biosciences) (tabulka 3) a *CrFT345For* při 54°C. PCR produkt byl klonován a sekvenován. Sekvence odpovídala úplnému 3' konci *FTL* sekvence. Kódující oblast nově získané sekvence však byla odlišná od sekvence kódující oblasti získané FT-univerzálními primery (*CrFTL1*). Nová *FTL* sekvence byla pojmenována *CrFTL2*.

5.1.2.3. *CrFTL1*: 3' RACE + 3' semi-nested PCR a získání 3' konce

Pro nalezení úplného 3' konce *CrFTL1* byla provedena RACE s 1000x ředěnou cDNA knihovnou. PCR běžela s nasedáním primerů M13rev(JL) (tabulka 3) a *CrFT39For* při 60°C. PCR produkt byl 10-100x naředěn a použit v semi-nested PCR s nasedáním primerů M13rev(JL) a *CrFT78For* při teplotě 60 a 62°C. PCR produkt získaný ze 100-násobného ředění při 62°C byl klonován a sekvenován. Tak byla identifikována úplná 3' sekvence *CrFTL1*.

5.1.2.4. *CrFTL2*: 5' RACE a získání 5' konce

Pro identifikaci úplného 5' konce *CrFTL2* byla provedena RACE s 1000x ředěnou cDNA knihovnou jako templátem. Modified universal primer a RACE primer CrFT142Rev (tabulka 3) nasedaly v gradientu při 54 - 60°C. PCR produkt získaný při 60°C byl klonován a sekvenován. Tak byla identifikována úplná 5' sekvence *CrFTL2*.

5.1.2.5. *CrFTL1*: 5' RACE a získání 5' konce

Pro identifikaci úplného 5' konce *CrFTL1* byla provedena RACE s 1000x ředěnou cDNA knihovnou FT-720-5 jako templátem. PCR běžela s nasedáním M13rev(JL) (tabulka 3) a RACE primeru CrFT116Rev (tabulka 3) při 60°C. PCR produkt byl klonován a sekvenován. Tak byla identifikována úplná 5' sekvence *CrFTL1*.

5.1.2.6. Amplifikace úplných kódujících sekvencí *CrFTL1* a *CrFTL2*

Pro amplifikaci úplných sekvencí cDNA byly do 5' a 3' UTR oblastí *CrFTL1* navrženy primery CrFTL1For a CrFTL1rev (tabulka 3) a do UTR oblastí *CrFTL2* primery CrFT787-35For a CrFTL787-787Rev.

Pro amplifikaci úplné sekvence *CrFTL1* a *CrFTL2* byla použita polymeráza Phusion. V PCR pro amplifikaci úplné sekvence *CrFTL1* nasedaly příslušné primery při 58°C a templátem byla 100x ředěná cDNA knihovna FT720-5. Úplná sekvence *CrFTL2* byla amplifikována v PCR s 1000x ředěnou „univerzální“ cDNA knihovnou s nasedáním primerů při 60°C. PCR produkty byly klonovány a sekvenovány a tak byly získány úplné sekvence *CrFTL1* a *CrFTL2* cDNA.

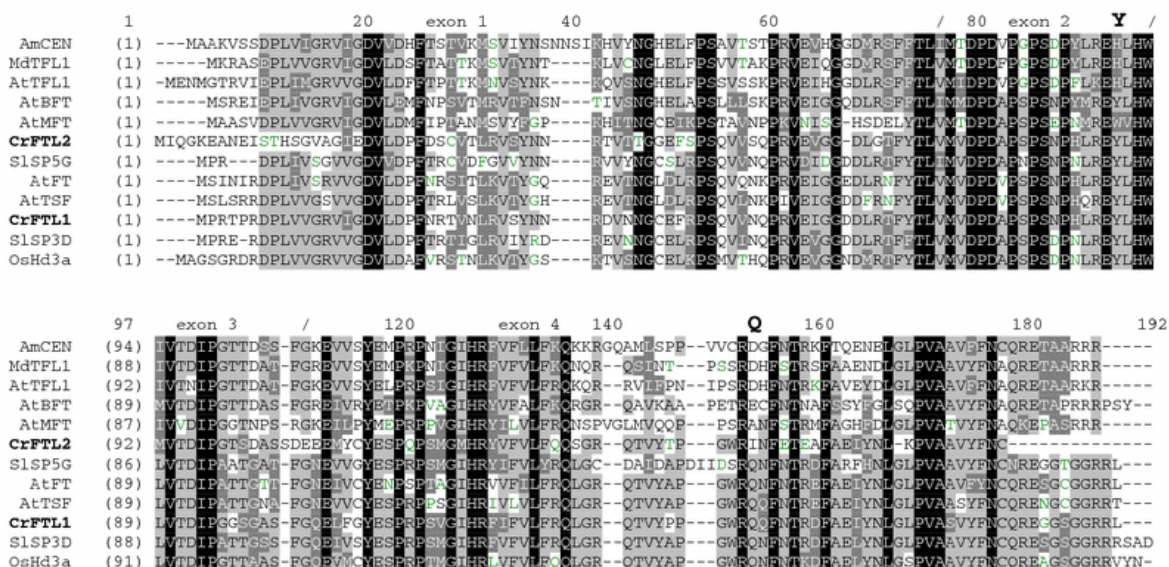
5.1.3. Analýza úplných kódujících sekvencí *CrFTL1* a *CrFTL2*

Z cDNA knihoven byly získány úplné kódující sekvence *CrFTL1* a *CrFTL2* genů o délce 528 bp (EU128013, *CrFTL1*) a 504 bp (EF445636, *CrFTL2*) (Cháb et al., 2008). Nukleotidové sekvence jsou uvedeny v přílohách 16 a 17. Z nukleotidových sekvencí *CrFTL1* a *CrFTL2* byly odvozeny předpokládané aminokyselinové sekvence CrFTL1 (ABV56568) a CrFTL2 (ABP02016) proteinů. Na obr. 18 je alignment předpokládaných aminokyselinových sekvencí CrFTL1 a CrFTL2 s dalšími členy FT/TFL1 rodiny z krytosemenných rostlin.

CrFTL2 je z 52% identický (62% podobnost) s FT z *A. thaliana* a v některých konzervovaných oblastech (pozice 1–18, 104–107 v alignmentu) se liší od všech ostatních

členů rodiny. V pozici 179 se nachází předčasný STOP kodón a CrFTL2 tak postrádá posledních 9-12 aminokyselin oproti ostatním FT/TFL1 proteinům. Pozice 144 u CrFTL2 je obsazena izoleucinem. Tato pozice je funkčně důležitá a její obsazení aminokyselinou (glutamin v FT a asparagová kyselina v TFL1) rozlišuje mezi FT a TFL1 (Ahn et al., 2006). Na základě výše uvedeného se lze domnívat, že funkce CrFTL2 je rozdílná od FT a TFL1.

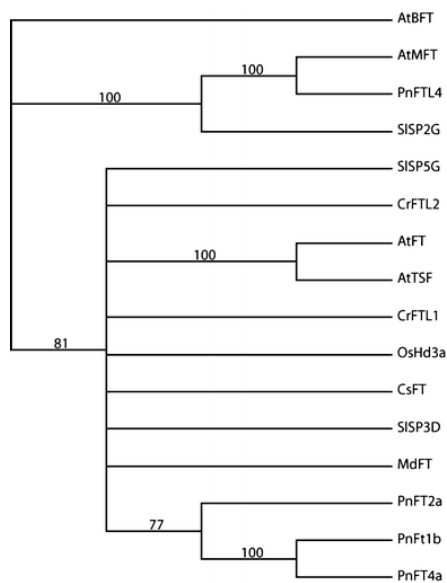
Na druhou stranu CrFTL1 je ze 73% identický s FT z *A. thaliana* a obsahuje pro FT ortolog funkčně důležitý glutamin v pozici 144 a tyrozin v pozici 93.



Obr. 18: Alignment aminokyselinových sekvencí CrFTL1 a CrFTL2 s dalšími členy FT/TFL1 rodiny z krytosemenných rostlin. Pomlčky značí mezery, lomítka značí hranice exonů, velká písmena nad alignmentem označují funkčně důležité konzervované aminokyseliny (Y/Tyr85 a Q/Gln140 v AtFT). Proteinové sekvence z GenBank: SlSP3D (AAO31792) a SlSP5G (AAO31793) z *Lycopersicon esculentum*; AmCEN (AAB36112) z *Antirrhinum majus*; AtMFT (AAD37380), AtTSF (Q9S7R5), AtFT (NP_176726), AtTFL1 (NP_196004) a AtBFT (Q9F1T4) z *Arabidopsis thaliana*; MdTFL1 (BAD06418) z *Malus × domestica*; OsHd3a (BAB61030) z *Oryza sativa*; Q/Gln = glutamin; Y/Tyr = tyrozin;

5.1.3.1. Fylogenetická analýza CrFTL1 a CrFTL2 proteinů

Pro přesnější ověření vzájemné příbuznosti CrFTL1 a CrFTL2 s dalšími FT/TFL1 proteiny byla provedena fylogenetická analýza. Fylogenetický strom generovaný metodou maximální parsimonie (MP) nebyl dobře rozlišený, ale podpořil hypotézu, že CrFTL1 a CrFTL2 jsou více příbuzné dalším FT homologům, než MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT) a BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT) a patří do FT/TFL1 rodiny proteinů (obr. 19).



Obr. 19: Phylogenetický strom generovaný metodou maximální parsimonie (MP) založený na sekvencích aminokyselin FT proteinů z krytosemenných rostlin. Změny mezi rezidui aminokyselin byly váženy minimem nukleotidových změn potřebných k vývoji jedné v druhou. AtBFT byla použita jako outgroup. Hodnoty podpory jednotlivých větví počítané z 1000 pseudoreplik jsou uvedeny u jednotlivých větví. Sekvence proteinů z GenBank jsou: SISP2G (AAO31791), SISP3D (AAO31792) a SIS5PG (AAO31793) z *Lycopersicon esculentum*; AtMFT (AAD37380), AtTSF (Q9S7R5), AtFT (NP_176726), AtTFL1 (NP_196004) a AtBFT (Q9F1T4) z *Arabidopsis thaliana*; MdFT (BAD08340) z *Malus × domestica*; CsFT (BAA77836) z *Citrus sinensis*; PnFT4a (BAD08337), PnFTL4 (BAD22677), PnFT2a (BAD01576) a PnFT1b (BAD01561) z *Populus nigra*; OsHd3a (BAB61030) z *Oryza sativa*; Autor: Matthew S. Olson

5.1.4. Získání úplných kódujících sekvencí *CrCOL1*, *CrCOL1s*, *CrCOL2* a *CrCOL2s*

5.1.4.1. PCR s CO-univerzálními a CO-specifickými primery

Na základě nukleotidového alignmentu sekvencí prokázaných *CO* genů převážně u dvouděložných rostlin (*A. thaliana*, *CO*, NM_121589.1; *Hordeum vulgare*, *HvCOL1*, AF490467.1; rýže, *Hdl*, AB041840.1; *Pharbitis nil*, *PnCO*, AF300700.1; rajče, *COL*, AY490251.1) byl navržen pár CO-univerzálních degenerovaných primerů (program CODEHOP) zacílených do konzervované oblasti prvního (CONDEG94F) a druhého (CONDEG307R) exonu (tabulka 3). 60x ředěná genomická DNA z *C. rubrum* byla amplifikována v T Gradient cykleru s použitím těchto CO-univerzálních primerů a AmpliTaq[®] Gold DNA polymerázy (Applied Biosystems) za následujících PCR podmínek: počáteční denaturace 9 min při 94°C a dále 36 cyklů 30 s při 94°C, 40 s při 56°C a 1,5 min při 72°C; závěrečná extenze 10 min při 72°C. PCR produkt byl klonován a sekvenován.

Na základě získané *CrCOL* sekvence byly navrženy nové specifické primery CrCON138for a CrCON1523rev (tabulka 3). PCR proběhla s Taq polymerázou a cDNA knihovnou jakožto templátem při standardních podmínkách s nasedáním primerů CrCON138for a CrCON1523rev při 58°C. PCR produkt byl těmito primery přímo sekvenován a byla získána částečná sekvence *CrCOL* z cDNA.

5.1.4.2. 5' RACE a získání dvou 5' konců *CrCOL*

Pro amplifikaci 5' konce *CrCOL* cDNA byla provedena RACE s nasedáním primerů M13rev(JL) a CrCON1523rev v gradientu při 54 - 60°C. PCR produkt byl klonován a sekvenováním byly identifikovány dvě různé úplné 5' sekvence, pracovně pojmenované *CrCOL1s* a *CrCOL2*.

5.1.4.3. 3' RACE + 3' semi-nested PCR a získání 3' konce *CrCOL*

PCR z 1000x ředěné cDNA knihovny s kombinací dvou primerů zacílených do vektoru M13(JL) (tabulka 3) a M13rev(JL) s primerem CrCON138for vedla k množství nespecifických produktů, proto byly pro nalezení 3' konce cDNA navrženy další primery pro RACE (CrCON1456for) a nestování (CrCON1508for) (tabulka 3). RACE s vektorovými primery M13(JL) a M13rev(JL) v kombinaci s CrCON1456for spolu s navazující semi-nested PCR s primerem CrCON1508for nevedla k získání 3' konce cDNA. Proto byla v rámci RACE amplifikována cDNA knihovna s primerem CDSIII3'-23 v kombinaci s CrCON1456for a CrCON1508for primery při teplotě nasedání primerů 60 a 62°C. Kombinace primerů CDSIII3'-23 a CrCON1456for při 60°C vedla k nalezení 3' úplného konce *CrCOL1s* sekvence.

5.1.4.4. Amplifikace úplných kódujících sekvencí *CrCOL1*, *CrCOL1s*, *CrCOL2* a *CrCOL2s*

Pro amplifikaci úplné *CrCOL1s* cDNA byly do 5' a 3' UTR oblastí navrženy primery CrCON51_5UTR1 a CrCON51_3UTR (tabulka 3). Ze 100x ředěné cDNA knihovny byl polymerázou Phusion při teplotě 57,3°C amplifikován PCR produkt o délce zhruba 1100 bp. PCR produkt byl klonován a sekvenováním klonů byly získány dvě různé úplné *COL* sekvence – *CrCOL1* a *CrCOL2s*. S použitím aTaq polymerázy byly navíc získány úplné kódující sekvence dalších dvou forem *CrCOL* transkriptů - *CrCOL1s* a *CrCOL2*.

5.1.5. Analýza úplných kódujících sekvencí čtyř forem *CrCOL* transkriptů

Celkem byly získány čtyři úplné *COL* sekvence *CrCOL1* o délce 1089 bp (EU395770), *CrCOL1s* o délce 999 bp, *CrCOL2* o délce 1098 bp a *CrCOL2s* o délce 1011 bp (EU395771).

5.1.5.1. Alternativní sestřih *CrCOL1* a *CrCOL2*

Na následujících třech stranách je na obr. 20 nukleotidový alignment *CrCOL1*, *CrCOL1s*, *CrCOL2* a *CrCOL2s*, který ukazuje na dvojici alternativně sestřižených sekvencí. Formy *CrCOL1* a *CrCOL1s* jsou sekvenčně stejné, *CrCOL1* však oproti *CrCOL1s* navíc obsahuje nesestřižený 90 bp dlouhý intron. Stejně tak formy *CrCOL2* a *CrCOL2s* si sekvenčně odpovídají, *CrCOL2* je forma s nesestřiženým 87 bp dlouhým intronem, *CrCOL2s* je forma bez intronu. Mimo oblast alternativně sestřižené sekvence jsou si všechny čtyři formy *CrCOL* sekvencí velmi podobné, a to i v oblastech UTR. Některé nalezené klony (např. pCON234 nebo pCON255) obsahují část sekvence *CrCOL1* a část sekvence *CrCOL2* a mohou tedy představovat rekombinantní formu genu. To svědčí pro to, že *CrCOL1* a *CrCOL2* jsou alelické geny.

		1		80
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(1)	-----GGGACAGCAGAGAGAACAAGCAATAAAGAGAGAAAAAGGAAGAAAAAAGAGAGATGA		
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(1)	-----GGGACAGCAGAGAGAAACA--GCAATAAAGAGAGAAAAAGGAAGAAAAA--GAGAGAGATGA		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(1)	-----ACAGCAGAGAGAAACA--GCAATAAAGAGAGAAAAAGGAAGAAAAA--GAGAGAGATGA		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(1)	-----GGGACAGCAGAGAGAAACAAGCAATAAAGAGAGAAAAAGGAAGAAAAAAGAGAGAAATGA		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(1)	-----GGGACAGCAGAGAGAAACAAGCAATAAAGAGAGAAAAAGGAAGAAAAAAGAGAGAAATGA		
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(1)	AACACATTTGCTTAAATTCACAGCAGAGAGAAACA--GCAGATAAAGAGAGAAAAAGGAAGAAAAAAGAGAGAAATGA		
		81		160
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(63)	TGAAGAAGGAAGTACCGGGGGG-ATAACAATAGCTGGGCACGTGTTTGTGACACATGCCGTTTCAGCACCGTGCACAGTG		
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(61)	TGAAGAAGGAAGTACCGGGGGGATAACAATAGCTGGGCACGTGTTTGTGACACATGCCGTTTCAGCACCGTGCACAGTG		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(58)	TGAAGAAGGAAGTACCGGGGGGATAACAATAGCTGGGCACGTGTTTGTGACACATGCCGTTTCAGCACCGTGCACAGTG		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(63)	TGAAGAAGGAAGTACCGGGAGGGATAACAATAGCTGGGCACGTGTTTGTGACACATGCCGTTTCAGCACCGTGCACAGTG		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(64)	TGAAGAAGGAAGTACCGGGAGGGATAACAATAGCTGGGCACGTGTTTGTGACACATGCCGTTTCAGCACCGTGCACAGTG		
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(80)	TGAAGAAGGAAGTACCGGGAGGGATAACAATAGCTGGGCACGTGTTTGTGACACATGCCGTTTCAGCACCGTGCACAGTG		
		161		240
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(142)	TACTGCAAAGAGACTCTGCCTTCCTGTGCACCAGCTGCGATGCACGGATCCACGCTGTCAATCAAATGGCGTCAAGGCA		
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(141)	TACTGCAAAGAGACTCTGCCTTCCTGTGCACCAGCTGCGATGCACGGATCCACGCTGTCAATCAAATGGCGTCAAGGCA		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(138)	TACTGCAAAGAGACTCTGCCTTCCTGTGCACCAGCTGCGATGCACGGATCCACGCTGTCAATCAAATGGCGTCAAGGCA		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(143)	TACTGCAAAGAGACTCTGCTTTCCTGTGCACCAGCTGCGACGCACGGATCCATGCTGTCAATCAGGTGGCGTCAAGGCA		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(144)	TACTGCAAAGAGACTCTGCTTTCCTGTGCACCAGCTGCGACGCACGGATCCATGCTGTCAATCAGGTGGCGTCAAGGCA		
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(160)	TACTGCAAAGAGACTCTGCTTTCCTGTGCACCAGCTGCGACGCACGGATCCATGCTGTCAATCAGGTGGCGTCAAGGCA		
		241		320
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(222)	CGAGCGGGTTTGGGTGTGTGAGGCGTGTGAACGTGAACCAGCAGCTTCTTGTGCAAGGCTGATGCAGCATCACTCTGTG		
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(221)	CGAGCGGGTTTGGGTGTGTGAGGCGTGTGAACGTGAACCAGCAGCTTCTTGTGCAAGGCTGATGCAGCATCACTCTGTG		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(218)	CGAGCGGGTTTGGGTGTGTGAGGCGTGTGAACGTGAACCAGCAGCTTCTTGTGCAAGGCTGATGCAGCATCACTCTGTG		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(223)	CGAGCGGGTTTGGGTGTGTGAGGCGTGTGAACGTGAACCAGCAGCTTCTTGTGCAAGGCTGATGCAGCATCACTCTGTG		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(224)	CGAGCGGGTTTGGGTGTGTGAGGCGTGTGAACGTGAACCAGCAGCTTCTTGTGCAAGGCTGATGCAGCATCACTCTGTG		
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(240)	CGAGCGGGTTTGGGTGTGTGAGGCGTGTGAACGTGAACCAGCAGCTTCTTGTGCAAGGCTGATGCAGCATCACTCTGTG		
		321		400
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(302)	CTACCTGTGATGCTGACATTCAGCTAACCCTGGCTCGCCGACACCACCGAGTCCCAATCATGCCTGTGGGTGTC		
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(301)	CTACCTGTGATGCTGACATTCAGCTAACCCTGGCTCGCCGACACCACCGAGTCCCAATCATGCCTGTGGGTGTC		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(298)	CTACCTGTGATGCTGACATTCAGCTAACCCTGGCTCGCCGACACCACCGAGTCCCAATCATGCCTGTGGGTGTC		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(303)	CTACCTGTGATGCTGACATTCAGCTAACCCTGGCTCGCCGACACCACCGAGTCCCAATCATGCCTGTGGGTGTC		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(304)	CTACCTGTGATGCTGACATTCAGCTAACCCTGGCTCGCCGACACCACCGAGTCCCAATCATGCCTGTGGGTGTC		
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(320)	CTACCTGTGATGCTGACATTCAGCTAACCCTGGCTCGCCGACACCACCGAGTCCCAATCATGCCTGTGGGTGTC		
		401		480
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(382)	GTTTATGGCCCCCAGACGGAAGGATGTCTGAGGATGGATTCTGGACCTACCAGACAGAGATGATCAGACCACGGATCA		
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(381)	GTTTATGGCCCCCAGACGGAAGGATGTCTGAGGATGGATTCTGGACCTACCAGACAGAGATGATCAGACCACGGATCA		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(378)	GTTTATGGCCCCCAGACGGAAGGATGTCTGAGGATGGATTCTGGACCTACCAGACAGAGATGATCAGACCACGGATCA		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(383)	GTTTATGGCCCCCAGACGGAAGGATGTCTGAGGATGGATTCTGGACCTACCAGATGGAGATGATCAGACCACGGATCA		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(384)	GTTTATGGCCCCCAGACGGAAGGATGTCTGAGGATGGATTCTGGACCTACCAGATGGAGATGATCAGACCACGGATCA		
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(400)	GTTTATGGCCCCCAGACGGAAGGATGTCTGAGGATGGATTCTGGACCTACCAGATGGAGATGATCAGACCACGGATCA		

		481		560
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(462)	TGAAGGGGATGAGGATGAAGCTGCTTCGTGGTTGCTACTTAACCCAG	-----	
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(461)	TGAAGGGGATGAGGATGAAGCTGCTTCGTGGTTGCTACTTAACCCAGGTAAGAACAGCGACAACCAAACACTACAATGGGT		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(458)	TGAAGGGGATGAGGATGAAGCTGCTTCGTGGTTGCTACTTAACCCAGGTAAGAACAGCAACAACCAAACACTACAATGGGT		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(463)	TGAAGGGGATGAGGATGAAGCTGCTTCGTGGTTGCTACTTAACCCAGGTAAGAACAGCAACAACCAAACACTACAATGGGT		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(464)	TGAAGGGGATGAGGATGAAGCTGCTTCGTGGTTGCTACTTAACCCAG	-----	
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(480)	TGAAGGGGATGAGGATGAAGCTGCTTCGTGGTTGCTACTTAACCCAG	-----	
		561		640
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(511)	-----	GTGCAGATAATCAATTCTGTGAG	
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(541)	TTTTAACTGGAGGAGGAGAAGTTGATGAGTACCTGGACCTCTTTGAGTATAATTCAGGTGCAGATAATCAATTCTGTGAG		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(538)	TTTTAACTGGAGGAGGAGAAGTTGATGAGTACCTGGACCTCTTTGAGTATAATTCAGGTGCAGATAATCAATTCTGTGAG		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(543)	TTTTAACTGGAGGAGGAGAAGTTGATGAGTACCTGGACCTCTTTGAGTATAATTCAGGTGCAGATAATCAATTCTGTGAG		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(513)	-----	GTGCAGATAATCAATTCTGTGAG	
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(529)	-----	GTGCAGATAATCAATTCTGTGAG	
		641		720
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(532)	CAGTATAACCCAGCAGCAGGAATTCAGTGTCCCTGAGAAGAACGTGGCGGCGACAGTGTGTGTAACCGTTTCAGTGCAGGGA		
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(621)	CAGTATAACCCAGCAGCAGGAATTCAGTGTCCCTGAGAAGAACGTGGCGGCGACAGTGTGTGTAACCGTTTCAGTGCAGGGA		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(618)	CAGTATAACCCAGCAGCAGGAATTCAGTGTCCCTGAGAAGAACGTGGCGGCGACAGTGTGTGTAACCGTTTCAGTGCAGGGA		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(620)	CAGTATAACCCAGCAGCAGGAATTCAGTGTCCCTGAGAAGAACGTGGAGGCGACAGTGTGTGTAACCGTTTCAGTGCAGGGA		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(534)	CAGTATAACCCAGCAGCAGGAATTCAGTGTCCCTGAGAAGAACGTGGAGGCGACAGTGTGTGTAACCGTTTCAGTGCAGGGA		
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(550)	CAGTATAACCCAGCAGCAGGAATTCAGTGTCCCTGAGAAGAACGTGGAGGCGACAGTGTGTGTAACCGTTTCAGTGCAGGGA		
		721		800
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(612)	AGTAAAAGATCACCAAATACAGTACCAGAACTTTTGTTCGGGATGGAATGTGAGACCAAATCTGAGTACACTTACAACA		
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(701)	AGTAAAAGATCACCAAATACAGTACCAGAACTTTTGTTCGGGATGGAATGTGAGACCAAATCTGAGTACACTTACAACA		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(698)	AGTAAAAGATCACCAAATACAGTACCAGAACTTTTGTTCGGGATGGAATGTGAGACCAAATCTGAGTACACTTACAACA		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(700)	AGTAAAAGATCACCAAATACAGTACCAGAACTTTTGTTCGGGATGGAATGTGAGACCAAATCTGAGTACACTTACAACA		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(614)	AGTAAAAGATCACCAAATACAGTACCAGAACTTTTGTTCGGGATGGAATGTGAGACCAAATCTGAGTACACTTACAACA		
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(630)	AGTAAAAGATCACCAAATACAGTACCAGAACTTTTGTTCGGGATGGAATGTGAGACCAAATCTGAGTACACTTACAACA		
		801	1. exon/2. exon	880
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(692)	CATCAATTAGTCACAGTGTTCAGTTCCTCCCTAGATGTGGGTGTGTACCAGAATCCACCATGAGTGATATGTCTGTG		
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(781)	CATCAATTAGTCACAGTGTTCAGTTCCTCCCTAGATGTGGGTGTGTACCAGAATCCACCATGAGTGATATGTCTGTG		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(778)	CATCAATTAGTCACAGTGTTCAGTTCCTCCCTAGATGTGGGTGTGTACCAGAATCCACCATGAGTGATATGTCTGTG		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(780)	CATCAATTAGTCACAGTGTTCAGTTCCTCCCTAGATGTGGGTGTGTACCAGAATCCACCATGAGTGATATGTCTGTG		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(693)	CATCAATTAGTCACAGTGTTCAGTTCCTCCCTAGATGTGGGTGTGTACCAGAATCCACCATGAGTGATATGTCTGTG		
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(710)	CATCAATTAGTCACAGTGTTCAGTTCCTCCCTAGATGTGGGTGTGTACCAGAATCCACCATGAGTGATATGTCTGTG		
		881		960
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(772)	TCACATTCAAGGCCTCCAAAGGAACAATCGACCTATTTTCTAGCACTCCGATGCAAGTGCCAACTCAACTATCACCGCT		
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(861)	TCACATTCAAGGCCTCCAAAGGAACAATCGACCTATTTTCTAGCACTCCGATGCAAGTGCCAACTCAACTATCACCGCT		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(858)	TCACATTCAAGGCCTCCAAAGGAACAATCGACCTATTTTCTAGCACTCCGATGCAAGTGCCAACTCAACTATCACCGCT		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(860)	TCACATTCAAGGCCTCCAAAGGAACAATCGACCTATTTTCTAGCACTCCGATGCAAGTGCCAACTCAACTATCACCGCT		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(773)	TCACATTCAAGGCCTCCAAAGGAACAATCGACCTATTTTCTAGCACTCCGATGCAAGTGCCAACTCAACTATCACCGCT		
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(790)	TCACATTCAAGGCCTCCAAAGGAACAATCGACCTATTTTCTAGCACTCCGATGCAAGTGCCAACTCAACTATCACCGCT		

		961		1040
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(852)	GGATAGAGAGGGCTAGGGTCATGAGATACAGAGAAA	GAAGAAGAATAGAAAATTTGAGAAGACAATCCGTTATGCTTCAA	
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(941)	GGATAGAGAGGGCTAGGGTCATGAGATACAGAGAAA	GAAGAAGAATAGAAAATTTGAGAAGACAATCCGTTATGCTTCAA	
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(938)	GGATAGAGAGGGCTAGGGTCATGAGATACAGAGAAA	GAAGAAGAATAGAAAATTTGAGAAGACAATCCGTTATGCTTCAA	
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(940)	GGATAGAGAGGGCTAGGGTCATGAGATACAGAGAAA	GAAGAAGAATAGAAAATTTGAGAAGACAATCCGTTATGCTTCAA	
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(853)	GGATAGAGAGGGCTAGGGTCATGAGATACAGAGAAA	GAAGAAGAATAGAAAATTTGAGAAGACAATCCGTTATGCTTCAA	
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(870)	GGATAGAGAGGGCTAGGGTCATGAGATACAGAGAAA	GAAGAAGAATAGAAAATTTGAGAAGACAATCCGTTATGCTTCAA	
		1041		1120
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(932)	GAAAGGCCATGCA GAGACTAGACCTCGGATCAAAGGCCGGTTCGCA	AAAAGAACAGATGTTGAAGCAGAGATGGACCAG	
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(1021)	GAAAGGCCATGCA GAGACTAGACCTCGGATCAAAGGCCGGTTCGCA	AAAAGAACAGATGTTGAAGCAGAGATGGACCAG	
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(1018)	GAAAGGCCATGCA GAGACTAGACCTCGGATCAAAGGCCGGTTCGCA	AAAAGAACAGATGTTGAAGCAGAGATGGACCAG	
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(1020)	GAAAGGCCATGCA GAGACTAGACCTCGGATCAAAGGCCGGTTCGCT	AAAAGAACAGATGTTGAAGCAGAGATGGACCAG	
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(933)	GAAAGGCCATGCA GAGACTAGACCTCGGATCAAAGGCCGGTTCGCT	AAAAGAACAGATGTTGAAGCAGAGATGGACCAG	
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(950)	GAAAGGCCATGCA GAGACTAGACCTCGGATCAAAGGCCGGTTCGCT	AAAAGAACAGATGTTGAAGCAGAGATGGACCAG	
		1121		1200
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(1012)	ATGTTCAACCAAC TCATTGATGTCAGATGGCGGATATGGCATTGTGCCATCCTTTT	GATATAATCTAGGTGATGTTTTAA	
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(1101)	ATGTTCAACCAAC TCATTGATGTCAGATGGCGGATATGGCATTGTGCCATCCTTTT	GATATAATCTAGGTGATGTTTTAA	
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(1092)	-----ACCAATTCATTGATGTCAGACGGTGGATATGGCATTGTGCCATCCTTTT	GATATAATCTAGGTGATGTTTTAA	
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(1100)	ATGTTCAACCAATTCATTGATGTCAGACGGTGGATATGGCATTGTGCCATCCTTTT	GATATAATCTAGGTGATGTTTTAA	
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(1012)	ATGTTCAACCAATTCATTGATGTCAGACGGTGGATATGGCATTGTGCCATCCTTTT	GATATAATCTAGGTGATGTTTTAA	
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(1030)	ATGTTCAACCAATTCATTGATGTCAGACGGTGGATATGGCATTGTGCCATCCTTTT	GATATAATCTAGGTGATGTTTTAA	
		1201		1232
pCON234 (<i>CrCOL1s</i> recomb?)	(1092)	ATGGAGTTGGTTGTGCTGCC-----		
pCON255 (<i>CrCOL1</i> recomb?)	(1181)	ATGGAGTTGGTTGTGCTGCCATTAAAAA----		
pCON252 (<i>CrCOL1</i>)_PHU	(1166)	ATGGAGTTGGTTGTGCTGCCATAATC-----		
pCON251 (<i>CrCOL2</i>)	(1180)	ATGGAGTTGGTTGTGCTGCCATTAAAAATCAC		
pCON236 (<i>CrCOL2s</i>)	(1092)	ATGGAGTTGGTTGTGCTGCCATTAAAAATC--		
pCON256 (<i>CrCOL2s</i>)_PHU	(1110)	ATGGAGTTGGTTGTGCTGCCAT-----		

Obr. 20: Alignment nukleotidových sekvencí *CrCOL1*, *CrCOL1s*, *CrCOL2s* a *CrCOL2*. Pomlčky značí mezery. Lomítko značí hranice exon/exon. pCON značí číslo klonu. Možná rekombinantní forma genu je označena v názvu „recomb?“ Klony amplifikované přesnou polymerázou Phusion jsou označeny v názvu PHU, ostatní klony byly amplifikovány aTaq polymerázou. Červeně je zvýrazněn start a stop kodón. Jednotlivé triplety kódující aminokyseliny jsou vyznačeny v horní sekvenci alignmentu šedým zvýrazněním.

5.1.5.2. Ověření alternativního sestřihu *CrCOL1* a *CrCOL2*

5.1.5.2.1. Ověření alternativního sestřihu *CrCOL1* a *CrCOL2* metodou PCR

Pokud je delece přítomna pouze v cDNA, naznačuje to možnost alternativního sestřihu. Ten tedy prokážeme, pokud v gDNA nalezneme pouze nezkrácenou formu genu. Pak bude zkrácení přináležet procesu posttranskripční úpravy primárního transkriptu – sestřihu.

Alternativní sestřih byl ověřován metodou PCR s primery CrCON51for542 a CrCON51rev710 pro amplifikaci sestřižené formy a primery CrCON54for1 a CrCON54rev1 pro amplifikaci nesestřižené formy *CrCOL* sekvence. PCR běžela za standardních podmínek s nasedáním primerů při 58°C s templátem 200x ředěné gDNA a 20x ředěné cDNA. Interpretací výsledku pouze na základě PCR by bylo zjištění sestřižených i nesestřižených *CrCOL* sekvencí v gDNA (viz obr. 21). Je však třeba si uvědomit, že CrCONrev primery se liší pouze v jedné bázi a primer CrCON51for542 (pro amplifikaci krátkých *CrCOL* forem) je způli komplementární k sekvenci dlouhých forem *CrCOL* (před a za alternativně sestřihovanou sekvencí). V případě gDNA si primery sednou na stejná místa jako v cDNA, přičemž primer CrCON51for542 je komplementární jen polovinou sekvence na svém 3' konci. To ovšem stačí k tomu, aby proběhla amplifikace. Rozhodnout o alternativním sestřihu tedy může pouze qPCR se specifickou sondou (viz další kapitola).

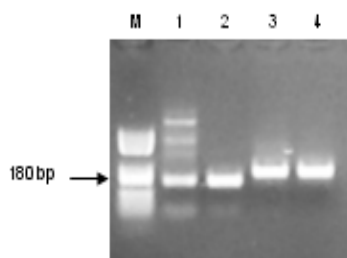
```
CrCOL1s (454) TGTCTGAGGATCGATTCTCTGGACCTAACCAGACAGAGATGATCAGACCACCGGATCATGAAGGGGATGAGGATGAAGCTGCTTCGTGGTTGCTACTT
CrCOL2 (470) TGTCTGAGGAAAGATTCTCTGGACCTGACAGTGGAGATGATCAGACCACCGGATCATGAAGGGGATGAGGATGAAGCTGCTTCGTGGTTGCTACTT

CrCOL1s (549) AACG-----CAGG
CrCOL2 (565) AACCCAGGTAAGAACAGCAACAATCAAACCTACAAATGGGGTTTTTAACAGGAGGAGAAGTTGATGAGTACCTGGACCTCTTTGAGTATAAATCAGG

CrCOL1s (557) TGCAGATAATCAATTCTCTGAGCAGTATAACCAGCAGCAGGAATTCAGTGTCCCTGAGAAGAAGCTGTGCCGGCAGACAGTGTSTACCGGTTTCAGT
CrCOL2 (660) TGCAGATAATCAATTCTCTGAGCAGTATAACCAGCAGCAGGAATTCAGTGTCCCTGAGAAGAAGCTGTGCCGGCAGACAGTGTSTACCGGTTTCAGT

CrCOL1s (652) GCAGGGAAGTAAAAGATCACC AATACAGTACCAGAACTTTTGTTCGGATGGAATGTGAGACCAAATCTGAGTACACTTACAACACATCAATT
CrCOL2 (755) GCAGGGAAGTAAAAGATCACC AATACAGTACCAGAACTTTTGTTCGGATGGAATGTGAGACCAAATCTGAGTACACTTACAACACATCAATT
```

PCR primery [CrCON51for542](#); [CrCON51rev710](#); [CrCON54for1](#) a [CrCON54rev1](#) jsou vyznačeny v sekvenci tučně a podtrženým písmem.



Obr. 21: Primery pro amplifikaci sestřižené a nesestřižené formy *CrCOL* sekvencí a PCR s těmito primery z genomické DNA a cDNA.

Alignment: Alignment části nukleotidových sekvencí *CrCOL* v oblasti kolem alternativně sestřihované sekvence. V sekvenci jsou barevně vyznačeny PCR primery pro ověření alternativního sestřihu.

Gel: M – Marker; 1 – 200x gDNA, kde se navíc objevují i nespecifické PCR produkty; 2 – 20x cDNA (PCR primery CrCON51for542, CrCON51rev710); 3 – 200x gDNA; 4 – 20x cDNA (PCR primery CrCON54for1; CrCON54rev1);

5.1.5.2.2. Ověření alternativního sestřihu *CrCOL1* a *CrCOL2* metodou qPCR

Protože standardní PCR nebyla schopna rozlišit mezi alternativně sestřiženými a nesestřiženými formami (viz předchozí kapitola), byla ověřována přítomnost všech čtyřech forem *CrCOL* sekvencí v gDNA metodou qPCR (LC480). qPCR probíhala za zcela stejných podmínek jako měření relativního množství *CrCOL* transkriptů se specifickými sondami. V rámci qPCR tedy bylo měřeno relativní množství sekvencí *CrCOL1*, *CrCOL1s*, *CrCOL2* a *CrCOL2s* ve dvou ředěních genomické DNA (20x a 200x) pomocí specifické kombinace dvou primerů a TaqMan sondy (tabulka 3), jak bylo popsáno v kapitole 4.16.2.2. V rámci *CrCOL* qPCR měření se dva forward primery odlišují pouze ve třech bázích. Dva reverse primery se navzájem liší – oba jsou navrženy přes hranici sestřihované a nesestřihované oblasti, oba jsou však částečně komplementární k jiné formě genu (sestřihované, či nesestřihované), než pro jejíž amplifikaci byly navrženy. Jsou tedy okrajově amplifikovány kromě měřené formy i sekvence jiných *CrCOL* forem, avšak v malých množstvích. Specifity pro rozlišení jednotlivých *CrCOL* forem je dosahováno kombinací dvojice primerů s jednou ze dvou sond. Cp z jednotlivých qPCR měření jsou uvedeny v tabulce 5. Z velkých rozdílů Cp pro sestřiženou a nesestřiženou formu vyplývá, že v gDNA se vyskytují pouze sekvence nesestřižené.

Sekvence	20x gDNA (Cp)	200x gDNA (Cp)
<i>CrCOL1s</i>	31,94	35,60
<i>CrCOL1</i>	23,13	27,62
<i>CrCOL2s</i>	32,90	36,59
<i>CrCOL2</i>	20,15	25,05

Tabulka 5: Crossing pointy (Cp) z měření relativního množství sekvencí *CrCOL1*, *CrCOL1s*, *CrCOL2* a *CrCOL2s* v genomické DNA *C. rubrum*. Nestřižené formy *CrCOL* sekvencí jsou vyznačeny tučně.

5.1.5.3. Analýza aminokyselinových sekvencí *CrCOL1* a *CrCOL2s*

Z úplných nukleotidových sekvencí *CrCOL1* a *CrCOL2s* byly odvozeny předpokládané aminokyselinové sekvence *CrCOL1* (ACB36911) a *CrCOL2s* (ACB36912) proteinů (přílohy 18 a 19). V příloze 20 je alignment aminokyselinových sekvencí *CrCOL1* a *CrCOL2s* s dalšími členy COL rodiny proteinů z krytosemenných rostlin. Přítomnost CCT domény a dvou B-box domén u obou *CrCOL* proteinů je řadí mezi COL proteiny nejvíce podobné pravému CO (Putterill et al., 1995; Robson et al., 2001). Oblasti vysoké homologie se nacházejí zejména v rámci evolučně konzervovaných B-box a CCT domén. Sekvence

CrCOL1 a CrCOL2s mají 88,5% identických aminokyselin (mimo alternativně sestřihovanou oblast 97%) a 89% podobných aminokyselin.

CrCOL1 je sekvenčně z 50% identický (59% podobnost) s CO z *A. thaliana*. Podstatně vyšší aminokyselinovou identitu (64%) a podobnost (74%) vykazuje CrCOL1 s PdCO2 z *Populus deltoides*. CrCOL2s je s CO z *A. thaliana* sekvenčně identický z 46% (54% podobnost). Vyšší sekvenční identitu (57%) a podobnost (67%) vykazuje CrCOL1 s PdCO2 z *Populus deltoides*.

Na obr. 22 je alignment částí odvozených aminokyselinových sekvencí CrCOL1 a CrCOL2s s dalšími členy COL rodiny z krytosemenných rostlin. Alternativně sestřihovaná sekvence nespadá do vysoce konzervovaných oblastí B-box1, B-box2 a CCT domén (Putterill et al., 1995; Robson et al., 2001). Je však součástí jiné, méně konzervované oblasti kódované prvním exonem *COL* genů. Nalézá se u všech dosud identifikovaných COL sekvencí. Námí popsaný typ alternativního sestřihu nebyl u známých *COL* genů popsán.

AtCO_A56133	(143)	EG--DKDAKEVASWLFPPNSDKNNMNQ-----NNGLLFSDEYLNLDVYNSMAYKFTGE
AtCOL1_CAA71587.1	(133)	---DEDEAEASWLLPNSGKNSGN-----NNGFSIGDEFLNLDVY--SSDKQFTDQ
AtCOL2_AAB67880.1	(122)	---DEDDREVASWLLPNSGKNSGN-----NNGFLFGVEYLDLVDYSSMDDNQFEDN
CrCOL1_ACB36911	(132)	TTDHEGDEDEASWLLLPNSGKNSN-----NQTTFNGFLTCGGEVDEYLDLVEYNSGADNQFCEQ
CrCOL2s_ACB36912	(132)	TTDHEGDEDEASWLLLPNSGKNSN-----ADNQFCEQ
PdCOL1_AAS00054	(188)	G---EEDEDEASWLLLPNSGKNSN-----NQNNG-FLFGGEVDEYLDLVEYNSCAENQYSDQ
PdCOL2_AAS00055	(137)	SEEEEEEDEDEASWLLLPNSGKNSK-----NQNNG-FLFEGEVDEYLDLVEYNSCTENQCSQDQ
PnCO_AAG24863	(165)	MD---EDEDEASWLLLPNSGKNSNPNPNPVKSMNSTNMCKGGNNNNEMSCAVEAVDAVYLDLAEFSSCHNMLFEDK

Obr. 22: Alignment částí aminokyselinových sekvencí CrCOL1 a CrCOL2s s dalšími členy COL rodiny z krytosemenných rostlin. Pomlčky značí mezery. Alternativně sestřihovaná oblast u CrCOL1 a CrCOL2s je vyznačena v alignmentu tučným písmem v červeném rámečku. Proteinové sekvence z GenBank: AtCO (A56133), AtCOL1 (CAA71587), AtCOL2 (AAB67880) z *Arabidopsis thaliana*; PdCOL1 (AAS00054) a PdCOL2 (AAS00055) z *Populus deltoides*; PnCO (AAG24863) z *Pharbitis nil*;

5.1.6. Získání úplně kódující sekvence *CrFL*

V roce 2004 byla identifikována částečná kódující sekvence *CrFL* (AJ585261) a odvozena předpokládaná částečná aminokyselinová sekvence CrFL proteinu (CAE51205) (Veit et al., 2004). Z nukleotidové sekvence *CrFL* (AJ585261) byly navrženy primery pro hledání 5' a 3' konce *CrFL* cDNA. Pomocí několika kol RACE a semi-nested PCR byla postupně získána téměř úplná kódující sekvence *CrFL* genu (1124 bp) bez úplného 5' konce. Ta byla poskytnuta laboratoři Dr. Edgara Wagnera. Zde bylo identifikováno zbylých 295 bp sekvence úplného 5' konce cDNA a tedy nalezena úplná kódující sekvence *CrFL* (Prusinska et al., v přípravě). Dále jsou popsány kroky, které vedly ke získání neúplné *CrFL* sekvence bez úplného 5' konce pomocí modifikované RACE.

5.1.6.1. 3' RACE + 3' semi-nested PCR a získání 3' konce *CrFL*

Pro identifikaci 3' konce *CrFL* cDNA byla provedena RACE s primerem M13rev(JL) a specifickým *CrFL* RACE primerem LFY694for (tabulka 3). V PCR s nasedáním primerů při 60°C byla použita jako PCR templát 1000x ředěná cDNA knihovna. Úplná sekvence 3' konce *CrFL* byla získána reamplifikací 100x – 10 000x ředěného PCR produktu z RACE s M13rev(JL) a nestovacím primerem LFY734for (tabulka 3) při 60°C.

5.1.6.2. 5' RACE 1 a získání sekvence prodloužené k 5' konci *CrFL*

Pro nalezení 5' konce *CrFL* byla amplifikována cDNA knihovna za pomoci primeru M13rev(JL) a LFY200rev (tabulka 3) zacíleného do známé sekvence *CrFL* (Veit et al., 2004). PCR běžela za stejných podmínek jako při hledání 3' konce. Na základě získané *LFY-like* sekvence prodloužené ve směru k 5' konci genu byl navržen nový nestovací primer CrLFY171rev (tabulka 3).

5.1.6.3. 5' RACE 2 + semi-nested PCR 2 a získání sekvence prodloužené k 5' konci *CrFL*

1000x ředěná cDNA knihovna byla dále amplifikována s primery M13rev(JL) a LFY456rev (tabulka 3) s nasedáním primerů při 60°C. PCR produkt byl 100 - 1000x naředěn a reamplifikován při dvou teplotách nasedání primerů 60 a 62°C s M13rev(JL) a nestovacím primerem CrLFY171rev. PCR produkty ze semi-nested PCR s nasedáním primerů při 62°C ze 100x ředěného PCR fragmentu z RACE byly klonovány. Sekvenováním PCR produktu o délce asi 800 bp byla získána prodloužená sekvence ve směru k 5' konci *CrFL* cDNA. Na jejím základě byly navrženy čtyři nové reverse primery CrLFYfive4rev, CrLFYfive3rev, CrLFYfive2rev, CrLFYfive1rev (tabulka 3) zacílené blízko 5' konci získané sekvence.

5.1.6.4. 5' RACE 3 + semi-nested PCR 3 - bez nalezení úplného 5' konce *CrFL*

Primery CrLFYfive4rev, CrLFYfive3rev, CrLFYfive2rev a CrLFYfive1rev byly použity pro další RACE a semi-nested PCR ve všech možných kombinacích. K nalezení sekvence úplného 5' konce *CrFL* touto metodou však nedošlo.

5.1.7. Analýza úplné kódující sekvence *CrFL*

Ve spolupráci s laboratoří Dr. Wagnera byla získána úplná nukleotidová kódující sekvence *CrFL* (EU410481). Z ní byla odvozena předpokládaná aminokyselinová sekvence *CrFL* proteinu (ABY91324) (Prusinska et al., v přípravě). Nukleotidová sekvence *CrFL*, aminokyselinová sekvence *CrFL* proteinu a alignment aminokyselinové sekvence *CrFL* s *LFY* ortology z krytosemenných rostlin jsou uvedeny v přílohách 21 a 22.

CrFL je sekvenčně z 54% identický (60% podobnost) s *LFY* (NP_200993) z *A. thaliana*. Oblasti vysoké homologie se nacházejí zejména v rámci evolučně konzervovaných N a C domén (Maizel et al., 2005). Podstatně vyšší sekvenční identitu (67%) a podobnost (76%) vykazuje *CrFL* s *LFY* homologem (CAC86163) ze *Silene coeli-rosa*. Blízkost *CrFL* a *LFY* ze *Silene coeli-rosa* je pochopitelná, protože *Chenopodium* a *Silene* patří do stejné vývojové větve Caryophyllales. *A. thaliana* je členem jiné vývojové větve Rosidae.

5.1.8. Problémy metody RACE při identifikaci genů a jejich řešení

5.1.8.1. Problémy RACE

Hledání úplné kódující sekvence genů z cDNA knihovny zaklonované v pGEM-T Easy sebou nesla i řadu problémů. V první řadě tomu tak bylo proto, že se jednalo o geny nově identifikované, jejichž expresní profily nebyly známy. I když se z literatury dalo usuzovat na tkáňovou specifitu jednotlivých genů, přesto nebylo známo, jak vysoká je transkripce těchto genů v jednotlivých pletivech v daném čase. Navíc nebylo zřejmé, zda se námi hledané homology *CO*, *FT* a *LFY* z *C. rubrum* účastní indukce kvetení ve stejné roli jako u *A. thaliana* a dalších modelových rostlin, jejichž *CO*, *FT* a *LFY* ortology byly identifikovány. *CrCOL*, *CrFTL* a *CrFL* jsou vesměs poměrně nízkce transkribované geny a obsahy jejich cDNA v cDNA knihovně byly tedy relativně nízké.

RACE používá v PCR amplifikaci jednoho primeru zacíleného do vektoru. V templátu (cDNA knihovně) tedy každá kruhová molekula pGEM-T Easy se zaligovanou jakoukoli cDNA obsahuje cílové místo pro nasedání primeru zacíleného do vektoru a je potenciálním templátem pro PCR reakci. Vybíráme tedy hledaný gen pouze jedním specifickým primerem. Pokud je tento primer byť i jen málo specifický k jiné sekvenci cDNA zastoupené v rámci cDNA knihovny mnohonásobně více oproti cDNA námi hledanému genu, bude výsledkem PCR nespecifický produkt. Celá procedura je hodně náchylná ke

kontaminacím jak primery tak PCR produktem, o čemž jsme měli tu možnost opakovaně se přesvědčit.

Vzhledem k nízkému zastoupení především *CrFTL1* a *CrFL* genů v cDNA knihovně neposkytovalo první kolo PCR dostatečné množství produktu. To bylo řešeno pomocí semi-nested PCR. Mnohdy však docházelo k tomu, že byly amplifikovány nespecifické sekvence, např. transpozony a retranspozony. V případě hledání 5' konce *CrFL* byly opakovaně amplifikovány sekvence genů, kódujících rozmanité DNA vazebné proteiny, viz např. EST pDCH2067 (tabulka 7) nebo částečná genomická sekvence pDCH91 (tabulka 8).

Kombinace výše uvedených faktorů vedla např. k tomu, že byla v rámci semi-nested PCR amplifikována sekvence neúplného 5' konce *CrFTL1* s navazující neznámou sekvencí, která není homologní k *FT*. Jindy byly získány dlouhé sekvence tandemově spojených PCR primerů.

5.1.8.2. Řešení problémů a zkušenosti

Ukázalo se jako vhodné navrhnout větší počet primerů v jednom směru (forward pro hledání 3' konce a reverse pro hledání 5' konce) a vzájemně je maximálně kombinovat jako primery pro RACE a semi-nested PCR. Taktéž je vhodné kombinovat specifické primery zacílené do sekvence hledaného genu nejen s primery zacílenými do vektoru, ale též se SMART primery, které sloužily ke konstrukci cDNA knihovny. Lepších výsledků bylo dosahováno s delšími specifickými primery (cca 24 bází). Velmi užitečné bylo předcházet PCR kontaminacím použitím špiček s filtrem a pipetováním ve flowboxu.

5.1.8.3. Doporučený postup

Na základě zkušeností s identifikací nízce transkribovaných genů účastnících se indukce kvetení v *C. rubrum* pomocí RACE se v řešení obdobné problematiky zdá být optimální následující postup. Po získání částečné sekvence hledaného genu univerzálními primery z DNA a „univerzální“ cDNA knihovny je vhodné navrhnout primery pro qPCR analýzu a změřit expresi genu v rostlinách v různých časech za induktivních fotoperiodických podmínek. Poté vybrat RNA s nejvyšším obsahem transkriptu hledaného genu a z ní konstruovat cDNA knihovnu. Pomocí RACE pak hledat v této knihovně. Vyplatí se (časově i finančně) udělat **více kvalitních** cDNA knihoven, kdy každá cDNA knihovna je konstruována pro amplifikaci pouze jednoho hledaného genu, než pouze jednu „univerzální“ cDNA

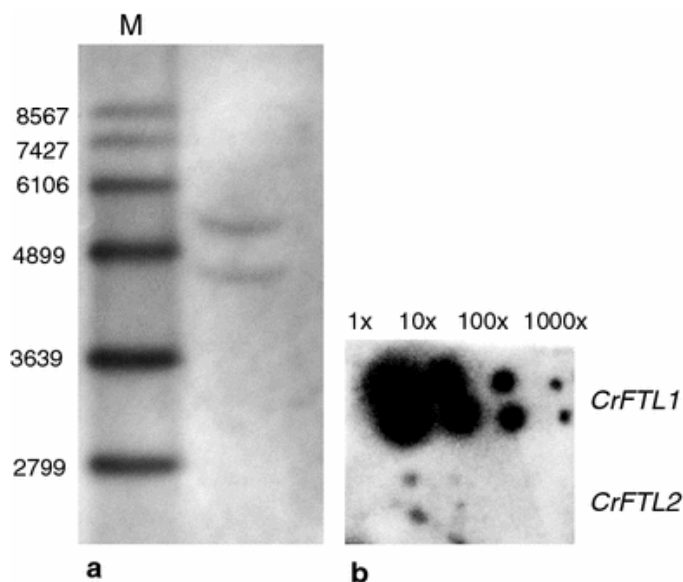
knihovnu pro hledání všech genů. Taktéž se vyplatí navrhnout větší množství primerů a vyzkoušet maximum kombinací, než trávit množství času s ne zcela optimálními primery.

5.2. Počet kopií *CrFTL1-like* a *CrFL-like* sekvencí v genomu *C. rubrum*

V *A. thaliana* *FT* a *LFY* kódují FT a LFY, důležité integrátory signálů v rámci indukce kvetení. *C. rubrum* je tetraploidní rostlina. Proto byl v genomické DNA *C. rubrum* studován počet kopií *CrFTL1* a *CrFL*, kódujících homology těchto důležitých proteinů.

5.2.1. Počet kopií *CrFTL1-like* genů v genomu *C. rubrum*

V genomu *C. rubrum* byly pomocí Southernovy hybridizace nalezeny dvě kopie *CrFTL1-like* sekvencí (obr. 23a). DNA byla štěpena pomocí HindIII, přičemž v sekvenci sondy není HindIII místo obsaženo. Specifita sondy pro detekci *CrFTL1* sekvence byla ověřena na hybridizaci k plazmidům nesoucím úplnou kódující sekvenci *CrFTL1* a *CrFTL2* v rámci DNA DOT blotting. Test prokázal vysokou specifitu sondy (obr. 23b).



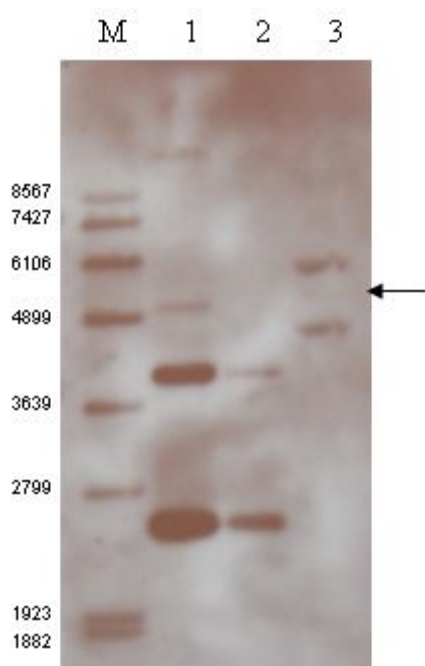
Obr. 23: Southernova hybridizace a DNA DOT blotting s DIG značenou sondou odvozenou z kódující sekvence *CrFTL1* genu.

a) V genomické DNA *C. rubrum* štěpené pomocí HindIII byly ověřeny dvě kopie *CrFTL1-like* sekvencí. M - DNA Molecular-Weight Marker VII, DIG-labelled; čísla nalevo označují počet párů bází

b) DNA DOT blot s plazmidy (v uvedeném ředění) nesoucími *CrFTL1* nebo *CrFTL2* cDNA. *CrFTL2* sekvence poskytla zhruba 1000x slabší signál.

5.2.2. Počet kopií *CrFL-like* genů v genomu *C. rubrum*

V genomu *C. rubrum* byly pomocí Southernovy hybridizace nalezeny tři *CrFL-like* sekvence (obr. 24). DNA byla štěpena pomocí HindIII, přičemž v sekvenci sondy není HindIII místo obsaženo. Pro ověření dostatečné citlivosti metody byly nanесeny na gel spolu s HindIII fragmenty genomické DNA *C. rubrum* také dvě ředění plazmidu nesoucího téměř úplnou kódující sekvenci *CrFL*. Odpovídající množství plazmidu byla 1 ng a 0,1 ng. Jak je vidět na obrázku 24, metoda je schopna detekovat specifickou sekvenci v množství menším než 0,1 ng DNA.



Obr. 24: Southernova hybridizace s DIG značenou sondou odvozenou z kódující sekvence *CrFL* genu. V genomické DNA *C. rubrum* štěpené pomocí HindIII byly ověřeny tři *CrFL-like* sekvence. Prostřední proužek je slabě viditelný (označen šipkou), ale jeho přítomnost byla potvrzena jinými bloty.

M - DNA Molecular-Weight Marker VII, DIG-labelled; čísla nalevo označují počet párů bází

1 - plazmid (ředění 10^{-3}) nesoucí sekvenci, z níž byla odvozena hybridizační sonda; množství plazmidu: 1 ng

2 - plazmid (ředění 10^{-4}) nesoucí sekvenci, z níž byla odvozena hybridizační sonda; množství plazmidu: 0,1 ng

3 - HindIII restriční fragmenty genomické DNA *C. rubrum*

5.3. Genomické sekvence nově identifikovaných genů z *C. rubrum*

V rámci identifikace nových genů účastních se fotoperiodické induce kvetení u *C. rubrum* byla studována i jejich genomická struktura, tj. délka a poloha exonů a intronů. V kapitolách 5.3.1. - 5.3.7.2. následuje přehled a analýza získaných genomických sekvencí nově identifikovaných genů z *C. rubrum* a v případě *LFY-like* sekvencí též z *C. bonus henricus*.

5.3.1. Získání genomické sekvence *CrFTL1*

Sekvence třetího intronu *CrFTL1* byla amplifikována z 200x ředěné gDNA *C. rubrum* za standardních PCR podmínek s nasedáním primerů CrFT345For a CrFT501Rev při 58°C. PCR fragment byl klonován a sekvenován.

Obdobně byla sekvence prvního a druhého intronu amplifikována pomocí primerů FTL1-224for (zacílený do prvního exonu) a FTL1-386rev (zacílený do třetího exonu) (tabulka 3). Výsledkem PCR za standardních podmínek při nasedání primerů při 58°C byly dva PCR produkty, které byly klonovány a sekvenovány. Tak byly získány parciální genomické sekvence dvou forem *CrFTL1-like* genů (*CrFTL1a* a *CrFTL1b*). Pro obě varianty byl na základě získaných sekvencí navržen nový forward primer (FTL1a-5480F1 a FTL1b-5508F1) zacílený do druhého intronu a použit v PCR v kombinaci s primerem CrFT720-298Rev (zacílený do čtvrtého exonu). Tak byly odlišeny dvě genomické formy *CrFTL1*.

5.3.2. Získání genomické sekvence *CrFTL2*

Sekvence třetího intronu *CrFTL2* byla amplifikována z 200x ředěné gDNA za standardních PCR podmínek s nasedáním primerů CrFT787-361for (zacílený do třetího exonu) a CrFT787-536rev (zacílený do čtvrtého exonu) při 64°C (tabulka 3). PCR fragment byl klonován a sekvenován.

Při hledání sekvence prvního a druhého intronu *CrFTL1* s primery FTL1-224for a FTL1-386rev (viz předchozí kapitola) byla amplifikována též sekvence, jejíž kódující oblasti (část prvního exonu, druhý exon a část třetího exonu) sekvenčně odpovídají *CrFTL2*. Primery pro amplifikaci genomického fragmentu *CrFTL1* tedy amplifikovaly též genomický fragment *CrFTL2*. Tak byla získána sekvence prvního a druhého intronu *CrFTL2*.

5.3.3. Analýza genomických sekvencí *CrFTL1* a *CrFTL2*

5.3.3.1. Genomické sekvence *CrFTL1a*, *CrFTL1b*

Z genomické DNA *C. rubrum* byla s použitím FT-univerzálních primerů CrFT345For a CrFT501Rev amplifikována genomická sekvence části třetího exonu, třetího intronu a části čtvrtého exonu *CrFTL1* o délce 902 bp (EF422350). Sekvence třetího intronu je 792 bp dlouhá.

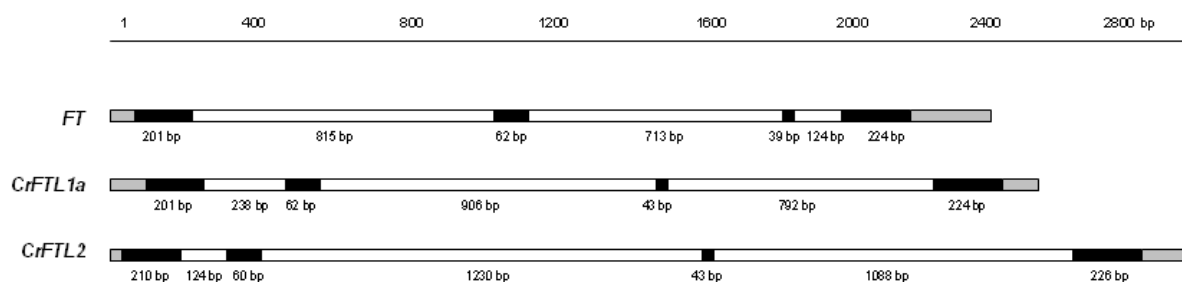
S použitím primerů FTL1-224for (zacílený do prvního exonu *CrFTL1*) a FTL1-386rev (zacílený do třetího exonu *CrFTL1*) byly amplifikovány dva PCR fragmenty o délce cca 1300 bp a 1600 bp. PCR fragmenty byly klonovány a sekvenovány. Oba obsahují sekvenci části prvního exonu, první intron, druhý exon, druhý intron a část třetího exonu *CrFTL1*. Byly tak získány sekvence dvou genomických forem *CrFTL1*. Sekvence prvního a druhého intronu odpovídá délce 238 bp a 906 bp (forma *CrFTL1a*, klon pDCH5480, celková délka klonu je 1304 bp) respektive 238 bp a 1209 bp (forma *CrFTL1b*, klon pDCH5508, celková délka klonu je 1606 bp). Alignment částečných genomických sekvencí *CrFTL1a* a *CrFTL1b* je na obrázku 25. Sekvence části prvního exonu, prvního intronu, druhého exonu a části třetího exonu forem *CrFTL1a* a *CrFTL1b* jsou téměř identické a liší se pouhými pěti bodovými záměnami. Druhé introny obou genů se oproti tomu liší jednou dlouhou a deseti kratšími insercemi/delecemi.

Sekvenování PCR fragmentů získaných primery FTL1a-5480F1 anebo FTL1b-5508F1 (specifické primery zacílené do sekvence druhého intronu) v kombinaci s primerem CrFT720-298Rev (čtvrtý exon) potvrdilo, že genomická forma *CrFTL1a* odpovídá námi identifikované a klonované cDNA označené *CrFTL1*.

Kódující oblast genomické formy *CrFTL1b* je sekvenčně téměř shodná s *CrFTL1a* a je tedy zřejmé, že v rámci qPCR byly měřeny exprese obou těchto genů. Abychom mohli spolehlivě rozlišit mRNA pro *CrFTL1a* a *CrFTL1b*, bude navržena sada PCR primerů do známé sekvence 5' i 3' UTR a kombinována se specifickými primery zacílenými do kódujících oblastí *CrFTL1*.

5.3.3.3. Srovnání genomických struktur *FT* z *A. thaliana* a *CrFTL1* a *CrFTL2* z *C. rubrum*

Na obrázku 26 je znázorněna genomická struktura *CrFTL1a* a *CrFTL2* z *C. rubrum* v porovnání s *FT* z *A. thaliana*. Pozice intronů jsou konzervovány, ale jejich délka se u jednotlivých genů liší. U *CrFTL* genů je oproti *FT* výrazně delší třetí intron. Naopak první introny *CrFTL1a* a *CrFTL2* jsou oproti *FT* výrazně kratší.



Obr. 26: Genomická struktura *FT* genu z *A. thaliana* ve srovnání s *CrFTL1a* a *CrFTL2* z *C. rubrum*. Exony jsou vyznačeny černě, UTRs šedě, introny bíle. Pozice intronů jsou konzervovány, avšak jejich délka se u jednotlivých genů liší. Nad schémata struktur genů je pro orientaci osa délky v párech bází. Délka jednotlivých exonů a intronů je vyznačena čísly pod příslušnými bloky.

5.3.4. Získání genomické sekvence *CrCOL1*

Sekvence intronu *CrCOL1* byla amplifikována za standardních PCR podmínek s nasedáním primerů CrCOintr410For a CrCOintr1169Rev při 58°C. Templátem byl plazmid nesoucí *CrCOL* genomický fragment amplifikovaný CO-univerzálními primery CONDEG94F a CONDEG307R.

5.3.5. Analýza genomické sekvence *CrCOL1*

Přímým sekvenováním primery CrCOintr410For a CrCOintr1169Rev byla získána sekvence intronu *CrCOL1*. Intron se nachází v konzervované pozici a jeho délka je 769 bp. Délka a sekvenční příslušnost k *CrCOL1* byla odvozena na základě alignmentu získané genomické sekvence se sekvencí *CrCOL1* z cDNA (viz příloha 23). Intron *CrCOL1* (769 bp) je více než 3x delší než intron genu *CO* (233 bp) a více než 7x delší než intron genu *COL1*, (109 bp) z *A. thaliana*

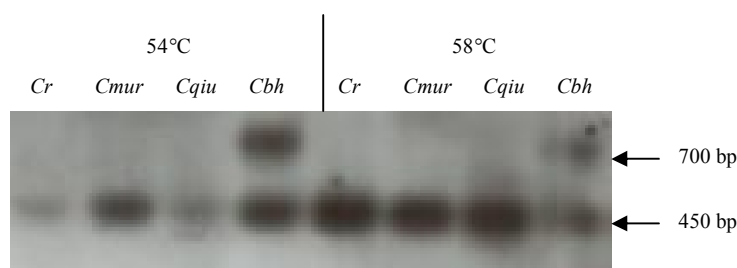
5.3.6. Získání genomických sekvencí *CrFL* a dvou *LFY-like* z *C. bonus henricus*

5.3.6.1. První intron *CrFL*

Sekvence prvního intronu *CrFL* byla amplifikována z 200x ředěné gDNA za standardních PCR podmínek s nasedáním primerů CrLFYint1For1 a CrLFYint1Rev1 při 64°C (tabulka 3).

5.3.6.2. Hledání druhého intronu v *CrFL* a v *LFY-like* z *C. bonus henricus*

Genomická DNA z *C. rubrum*, *C. murale*, *C. quinoa* a *C. bonus henricus* byla amplifikována pomocí primerů LFY800For a LFY456Rev v gradientu 54-60°C. Protože LFY800For je zacílen do druhého exonu a LFY456Rev do třetího exonu, měl by PCR fragment získaný z genomických DNA obsahovat druhý intron. Avšak získaný PCR produkt se velikostí rovnal PCR produktu získanému stejnými primery z cDNA. Hledaný intron tedy neobsahoval. PCR však mohla amplifikovat slabý proužek nedetekovatelný na gelu, amplifikovaný z paralogního dosud neznámého genu *CrFL-like*. Abychom zjistili jeho případnou existenci a velikost, gel se 100x naředěnými rozdělenými PCR produkty jsme hybridizovali. V rámci Southernovy hybridizace s *CrFL* specifickou sondou byl v *C. rubrum* stejně jako v *C. murale* a *C. quinoa* detekován jediný proužek o stejné délce (asi 450 bp). V tetraploidním *C. bonus henricus* byly detekovány proužky dva. Jeden z nich odpovídal velikostí proužku nalezenému u tří zmíněných druhů rodu *Chenopodium*, druhý byl delší (asi 700 bp) (obr. 27).



Obr. 27: Southernova hybridizace PCR fragmentů amplifikovaných primery LFY800For a LFY456Rev z gDNA *C. rubrum* (*Cr*), *C. murale* (*Cmur*), *C. quinoa* (*Cqui*) a *C. bonus henricus* (*Cbh*) se sondou specifickou k *CrFL* sekvenci. Teplota nasedání primerů při 54°C a 58°C. PCR fragmenty nanesené na 1,2% TAE gel byly 100x naředěny.

PCR s primery LFY800For a LFY456Rev z cDNA *C. rubrum* poskytla produkt o délce asi 450 bp a sekvenováním byla získána částečná kódující sekvence *CrFL*. Z gDNA *C. rubrum* byl amplifikován PCR produkt o téže délce (ověřeno Southernovou hybridizací).

Abychom ověřili možnost existence dlouhého druhého intronu *CrFL*, byla gDNA *C. rubrum* amplifikována za standardních PCR podmínek s nasedáním primerů LFY800For a LFY456Rev při 56°C se 3 min extenze. Takto lze amplifikovat PCR produkty až do délky kolem 3 kb. Žádný delší PCR produkt však amplifikován nebyl.

PCR produkty amplifikované primery LFY800For a LFY456Rev z gDNA *C. bonus henricus* byly rozklonovány a pomocí testování na přítomnost *CrFL-like* sekvence metodou DNA DOT blotting byly vybrány plazmidy nesoucí kratší (*CbhLFY1*) i delší (*CbhLFY2*) *LFY-like* fragment a sekvenovány.

5.3.7. Analýza genomických sekvencí *CrFL-like* z *C. rubrum* a *CbhLFY1* a *CbhLFY2* z *C. bonus henricus*

5.3.7.1. Sekvence prvního intronu *CrFL-like* z *C. rubrum*

Z genomické DNA *C. rubrum* byl primery CrLFYint1For a CrLFYint1Rev amplifikován PCR fragment nesoucí část prvního exonu, první intron a část druhého exonu *CrFL*. PCR fragment byl 1x přímo sekvenován z obou stran stejnými primery. Délka prvního intronu *CrFL-like* je 427 bp a byla odvozena na základě alignmentu genomické sekvence s úplnou kódující sekvencí *CrFL* (EU410481). Kódující oblasti ze získané genomické sekvence nejsou zcela homologní s kódující sekvencí *CrFL* (EU410481). To by bylo možno přičítat chybování Taq polymerázy. Vzhledem ke třem kopiím *CrFL-like* sekvencí v genomu *C. rubrum* (Southernova hybridizace, kapitola 5.2.2.) ovšem také nelze vyloučit, že se jedná o genomickou sekvenci jiné kopie *LFY-like* genu než *CrFL*. Získaná genomická sekvence je uvedena na obr. 28. První intron získané *LFY-like* kopie (427 bp) je podobně dlouhý jako první intron LFY z *A. thaliana*, který má délku 470 bp.

```

1 cttcttgttg ggaacgta cggcattaag gctgcaatcc gtgcagagag acgcccgttt
61 gaagagcttg aggagtcccg ccgccaccgt cacaaccaca tgagttactc gaatacggcc
121 ccgcccgatt cgactcacca cctcttcat gccctctctc aggaaggtaa acactcggac
181 cgtgacactc ctacattggt aaatatgac ttaattaagc atatacatc tcctataata
241 ttggaataat aagttgcatg tggcaagggt aggatgccct agattacctc ttaatttgg
301 gaactgtgca aagaacaac agttgggatt aataataagt aggaggata taatgtactt
361 atatgcatat ttgacaagtg tatattgata ttgtaaagct aacaattcat actcatattg
421 tatgtgttga tcgtttatga aagcttacag attaagaacc ttcaaaaatt aagaaccttc
481 aaaagatcaa acaatcttg cttattccga attgatgaag aagatagtaa atgtttagtc
541 caataccaaa ttcatttaag attgacactt acgtacacta tactggacta caggactatc
601 agaggaagga gtacatgaga aagaggtagt cggaagtggg ggcgggaact gggaaatggg
661 ggg

```

Obr. 28: Genomická sekvence z *C. rubrum* odpovídající části prvního exonu, prvnímu intronu a části druhého exonu *CrFL-like* genu. Tučně je zvýrazněna sekvence intronu, standardním písmem sekvence exonů.

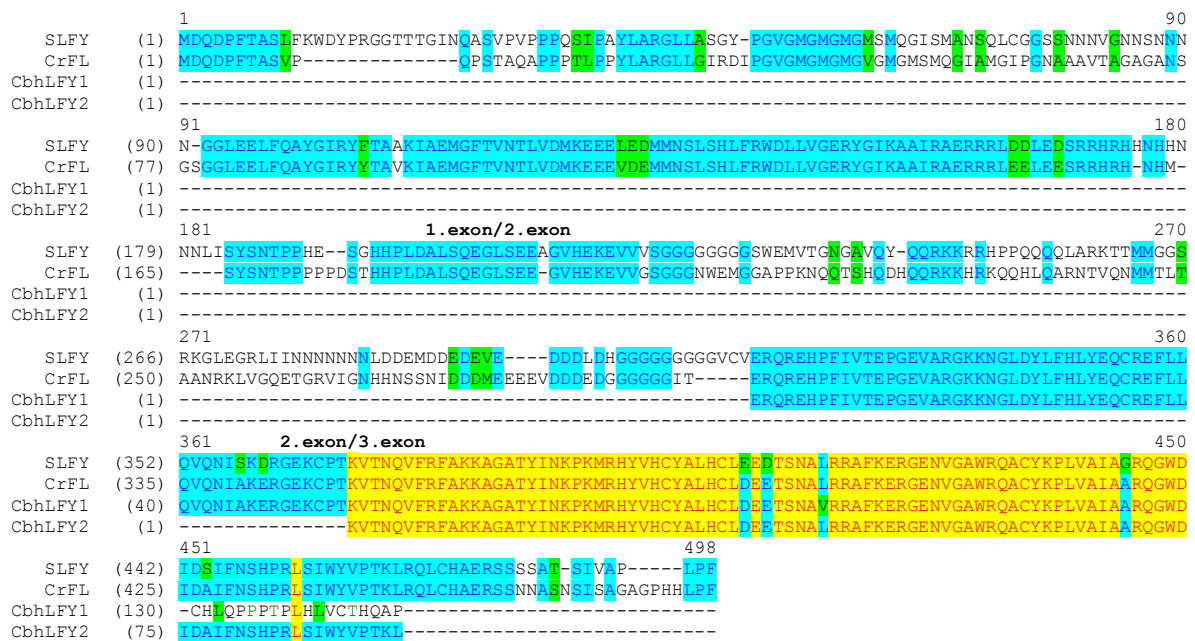
5.3.7.2. Genomická sekvence *CrFL* z *C. rubrum* a *CbhLFY1* a *CbhLFY2* z *C. bonus henricus* v oblasti druhého intronu

Druhý intron v *CrFL* z *C. rubrum* nebyl nalezen. Na základě shodné velikosti PCR produktu (450 bp) z cDNA i gDNA lze usuzovat na přítomnost jedné *CrFL-like* kopie bez druhého intronu. Není však vyloučeno, že v genomu *C. rubrum* existují jiné kopie *CrFL*, které druhý intron mohou obsahovat. U druhu *C. bonus henricus* byly získány dvě částečné genomické *LFY-like* sekvence (*CbhLFY1* a *CbhLFY2*). Na následujících dvou stranách je na obrázku 29 alignment *CbhLFY1*, *CbhLFY2* a kompletní sekvence *CrFL* z cDNA.

Kratší fragment *CbhLFY1* (448 bp) je sekvenčně téměř totožný s úsekem *CrFL* z cDNA získaným primery LFY800For a LFY456Rev a odpovídá části druhého a části třetího exonu, bez druhého intronu. Zdá se tedy, že v genomu *C. bonus henricus* existuje alespoň jedna *LFY-like* kopie bez druhého intronu. V rámci 448 bp dlouhé sekvence se *CbhLFY1* liší od odpovídající kódující sekvence *CrFL* (450 bp) dvěma bodovými záměnami a jednou krátkou delecí dvou bází. Dva různé sekvenční běhy existenci této delece potvrzují. Nejednalo se o chybu aTaq polymerázy (sekvenován byl pouze jeden klon), pak by delece způsobovala posun čtecího rámce ve vysoce konzervované oblasti kódující C doménu předpokládaného *CbhLFY1* proteinu (obr. 30). *CbhLFY1* je genomická sekvence a nevíme tedy, je-li vůbec transkribována. Je možné, že se jedná o pseudogen.

Delší genomický fragment *CbhLFY2* (celková délka 713 bp) je srovnatelný s *CbhLFY1* i *CrFL*. 427 bp od 5' konce získané *CbhLFY2* sekvence odpovídá části druhého intronu. Úsek 286 bp od jeho 3' konce odpovídá části třetího exonu od jeho začátku k neúplnému konci. V tomto úseku se liší sekvence *CbhLFY2* a *CrFL* třinácti bodovými záměnami. Ty jsou však synonymní a aminokyselinová sekvence *CbhLFY2* je zcela totožná s odpovídající sekvencí *CrFL* proteinu (obr. 30). Hranice druhého intronu a třetího exonu *CbhLFY2* odpovídá pozici u *LFY* z *A. thaliana*.

Naše předběžné výsledky (Southernova hybridizace, kapitola 5.3.6.2. a PCR z cDNA a gDNA *C. rubrum*) naznačují existenci *CrFL-like* kopie bez druhého intronu v genomu *C. rubrum* stejně, jak je tomu v případě *C. bonus henricus*. Dalšími kroky ke konečnému objasnění genomické struktury *LFY-like* genů v *C. rubrum* a *C. bonus henricus* bude navržení nových PCR primerů na základě úplné *CrFL* sekvence a získaných sekvencí *CbhLFY*. S nimi budou amplifikovány úplné sekvence intronů *LFY-like* genů z *C. rubrum* i *C. bonus henricus*.



Obr. 30: Alignment předpokládaných aminokyselinových sekvencí proteinů - úplných sekvencí SLFY ze *Silene coeli-rosa* (CAC86163) a CrFL z *C. rubrum* a částečných sekvencí CbhLFY1 a CbhLFY2 z *C. bonus henricus*. Pomlčky značí mezery, lomítka značí hranice exonů.

5.4. Vliv různých fotoperiodických podmínek na expresní profily nově identifikovaných genů z *C. rubrum*

Pro objasnění funkce nově identifikovaných genů z *C. rubrum* a jejich účasti na fotoperiodické indukci kvetení u této krátkodenní rostliny byly změřeny exprese těchto genů za podmínek vedoucích k indukci kvetení i za podmínek, které ke kvetení nevedou. Zaměřili jsme se především na semenáčky s rozvitými děložními lístky. Kromě toho jsme zkoumali exprese nově identifikovaných genů i u 15-ti denních rostlin s pravými listy. Semenáčky byly odebrány po dvou na jeden vzorek.

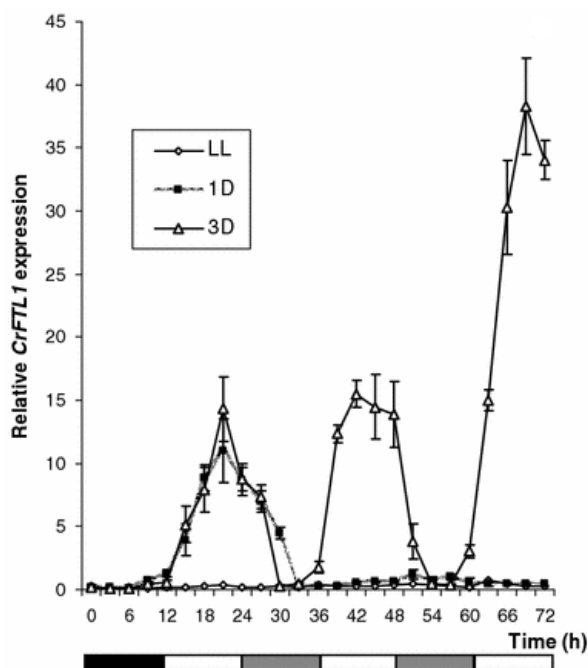
5.4.1. Semenáčky: stálé světlo, jedna a tři induktivní periody tmy

Expresní profily jednotlivých genů byly měřeny v 5 dní starých semenáčcích vystavených jedné, anebo třem po sobě jdoucím induktivním periodám tmy 12 hod tma /12 hodin světlo po dobu 72 hodin. Kontrolní rostliny byly pěstovány na stálém světle. Kvetení bylo určováno u 17-20 čtrnáctidenních rostlin z každého světelného režimu. Jedna 12 hod trvající tma indukovala ke kvetení 94% rostlin, tři fáze tmy 100% rostlin a rostliny pěstované

na stálém světle nekvetly. Hladiny mRNA jednotlivých genů se měnily následujícím způsobem.

5.4.1.1. Jedna a tři induktivní tmy korelují se vzrůstajícími hladinami *CrFTL1* mRNA a mírou kvetení

Expres *CrFTL1* při kontinuálním fotoperiodickém režimu 12 hod tma/12 hod světlo osciluje v diurnálním rytmu s maximy uprostřed fáze světla. Pokud po první fázi tmy následuje stálé světlo, diurnální rytmus se vytrácí a první maximum je následováno pouze slabým zvýšením exprese po 30-36 hodinách (obr. 31). To ukazuje na silnou potřebu tmy pro expresi *CrFTL1*. V kontrolních rostlinách na stálém světle byly naměřeny velmi nízké hladiny *CrFTL1*. Maximální hladiny *CrFTL1* po třech fázích tmy v rámci kontinuálního fotoperiodického režimu 12 hod tma/12 hod světlo korelují se 100% indukcí kvetení. Zhruba čtyřnásobně nižší hladiny *CrFTL1* po jedné tmě trvající 12 hodin korelují s o něco nižší (94%) indukcí kvetení.

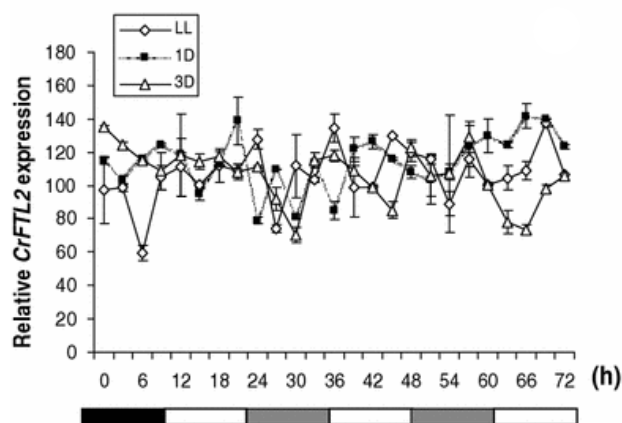


Obr. 31: Relativní exprese *CrFTL1* v 5 dní starých semenáčcích *C. rubrum*. Rostlinky prošly stálým světlem (LL), jednou (1D) anebo třemi (3D) induktivními fotoperiodickými režimy 12 hod tma /12 hod světlo.

Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány ze čtyř nezávislých měření dvou semenáčků. Pod grafem je schématicky znázorněna délka fáze tmy a fáze světla.

5.4.1.2. Jedna a tři induktivní tmy nemají vliv na hladiny *CrFTL2* mRNA

CrFTL2 je exprimováno konstitutivně (obr. 32). V rámci všech tří fotoperiodických režimů byly naměřeny zhruba stejné hladiny mRNA, které jsou asi 3x vyšší než nejvyšší hladiny *CrFTL1* mRNA naměřené po třech induktivních fotoperiodách.



Obr. 32: Relativní exprese *CrFTL2* v 5 dní starých semenáčcích *C. rubrum*. Rostlinky prošly stálým světlem (LL), jednou (1D) anebo třemi (3D) induktivními fotoperiodickými režimy 12 hod tma/12 hod světlo. Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány ze čtyř nezávislých měření dvou semenáčků. Pod grafem je schématicky znázorněna délka fáze tmy a fáze světla.

5.4.1.3. Pravidelné střídání světla a tmy způsobuje rytmickou expresi *CrCOL* s maximy na konci fází tmy

Byla studována exprese čtyř identifikovaných forem *CrCOL* transkriptů: sestřižené (*CrCOLs*) a nesestřižené (*CrCOL1*) sekvenční formy *CrCOL1* a sestřižené (*CrCOL2s*) a nesestřižené (*CrCOL2*) sekvenční formy *CrCOL2*.

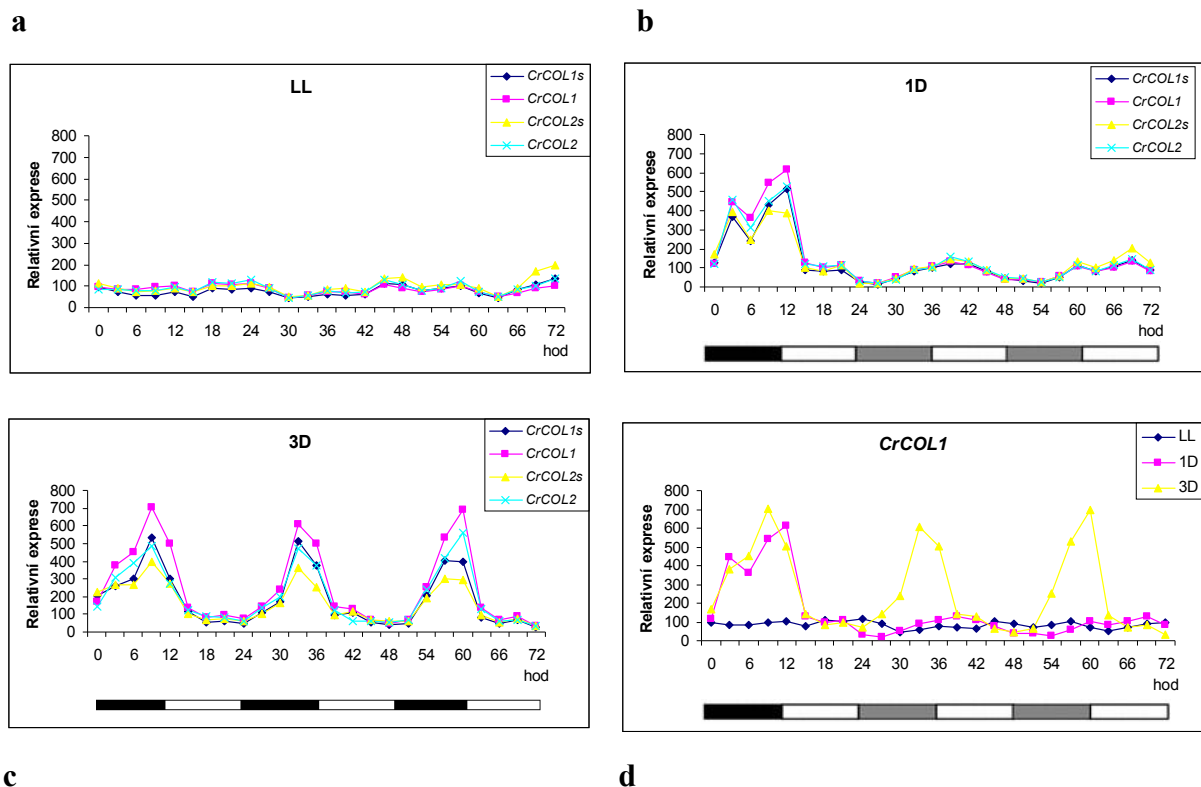
Transkripční profily všech čtyř forem *CrCOL* genů jsou v podstatě identické a mírně se liší jen výškami hladin mRNA. V rámci maxim exprese *CrCOL* za induktivních fotoperiodických režimů je nejvíce *CrCOL1* mRNA a nejméně *CrCOL2s* mRNA (obr. 33).

Za fotoperiodického režimu tří dní s třemi fázemi 12 hod tmy a 12 hod světla vykazují *CrCOL* transkripty rytmickou expresi s maximy na konci fází tmy. Perioda odpovídá zhruba 24 hodinám. Všechna tři maxima jednotlivých *CrCOL* mRNA jsou zhruba stejně vysoká.

Při aplikaci jedné induktivní periody tmy je maximum *CrCOL* transkriptů na konci fáze tmy. S rozbřeskem hladiny transkriptů klesají na minimum okolo druhé subjektivní tmy a poté se opět zvyšují až dosahují druhého nižšího maxima kolem začátku druhého subjektivního dne (po 29 hodinách po prvním maximu). Třetí maximum se vyskytuje ke konci třetího subjektivního dne v 69. hodině a svou výší je srovnatelné s druhým maximem a asi pětina vůči prvnímu maximu.

Za stálého světla jsou *CrCOL* exprimovány s náznakem rytmu s hladinami mRNA odpovídajícími minimům hladin *CrCOL* mRNA při aplikaci tří induktivních fází tmy.

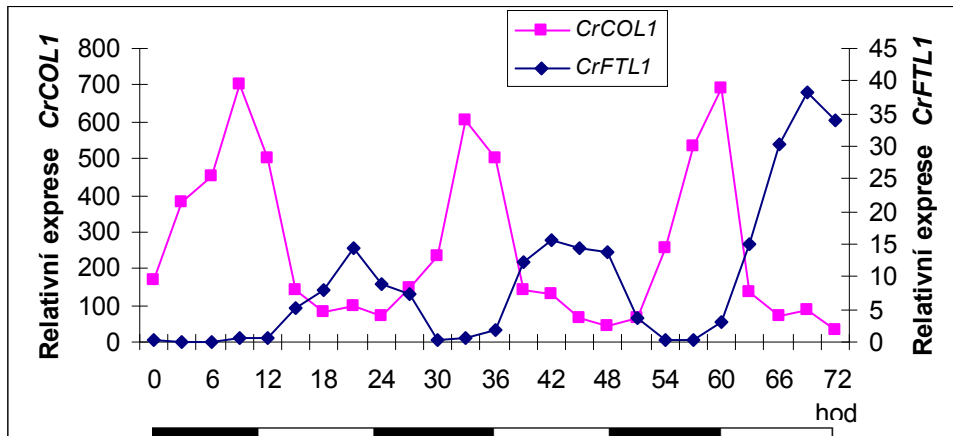
Pravidelné střídání světla a tmy způsobuje rytmickou expresi *CrCOL*. Z měření hladin *CrCOL* transkriptů za těchto fotoperiodických podmínek vyplývá, že pro transkripci *CrCOL* genů je potřeba fáze tmy, na jejímž konci jsou *CrCOL* geny transkribovány maximálně. Rytmicita exprese přetrvává, avšak s mnohem nižší amplitudou i za stálého světla následujícího po jedné fázi tmy. To naznačuje inhibiční efekt světla na tvorbu *CrCOL* transkriptů.



Obr. 33: Expresní profily čtyř forem *CrCOL* transkriptů v semenáčcích *C. rubrum* a) za stálého světla (LL), b) jednoho (1D) a c) tří (3D) po sobě jdoucích induktivních fotoperiodických režimů 12 hod tma /12 hod světlo. Expresní profily *CrCOL1* d) za všech tří fotoperiodických režimů. Pod grafy je schématicky znázorněna délka fáze tmy a fáze světla. Průměrné hodnoty byly spočítány z jednoho měření dvou semenáčků.

5.4.1.3.1. Maxima *CrCOL1* za tmy odpovídají minimům *CrFTL1* a za světla naopak

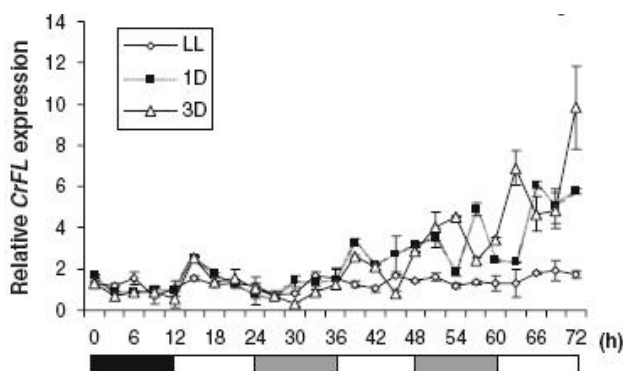
Obrázek 34 ukazuje vzájemný poměr exprese *CrCOL1* (jakožto zástupce *CrCOL* transkriptů) a *CrFTL1* za induktivního fotoperiodického režimu. Maxima *CrCOL1* za tmy odpovídají minimům *CrFTL1*. Naopak minima *CrCOL1* za světla odpovídají maximům *CrFTL1*.



Obr. 34: Vzájemný poměr expresí *CrCOL1* a *CrFTL1* v průběhu tří induktivních fotoperiodických režimů 12 hod tma/12 hod světlo. Maxima *CrCOL1* odpovídají minimům *CrFTL1* a naopak. Pod grafy je schématicky znázorněna délka fáze tmy a světla.

5.4.1.4. Jedna a tři induktivní tmy korelují se vzrůstajícími hladinami *CrFL* mRNA a mírou kvetení

Na stálém světle jsou hladiny *CrFL* mRNA konstantně nízké. Po aplikaci jedné anebo tří induktivních světelných režimů 12 hod tma/12 hod světlo se třetí den začínají zvedat (zhruba 10x po aplikaci tří induktivních fotoperiod) (obr. 35). Maximální hladiny *CrFL* po třech fázích tmy v rámci kontinuálního fotoperiodického režimu 12 hod tma/12 hod světlo korelují s maximální indukcí kvetení (100%). Zhruba poloviční hladiny *CrFL* po jedné tmě trvající 12 hodin korelují s nižší (94%) indukcí kvetení.



Obr. 35: Expresní profily *CrFL* v semenáčcích *C. rubrum* při jednom (1D) a třech (3D) po sobě jdoucích induktivních světelných režimech 12 hod tma/12 hod světlo. Kontrolní rostliny byly pěstovány na stálém světle (LL). Průměrné hodnoty byly spočítány ze čtyř nezávislých měření dvou semenáčků. Pod grafy je schématicky znázorněna délka fáze tmy a fáze světla.

5.4.2. Semenáčky: stálé světlo, různě dlouhé periody tmy

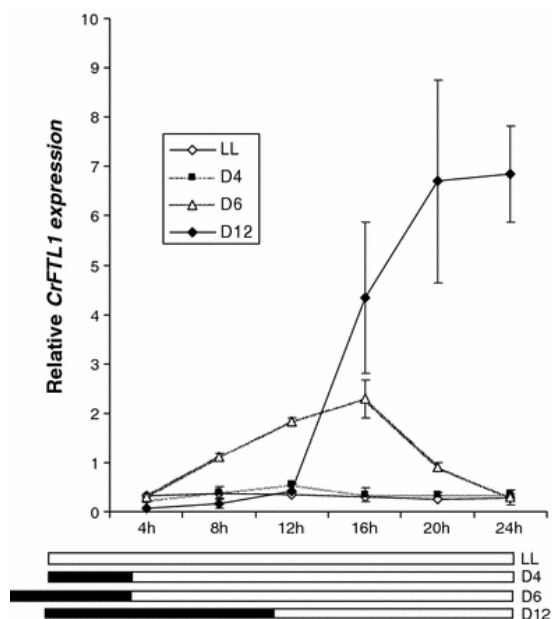
Zjišťovali jsme vliv délky periody tmy na exprese nově identifikovaných genů. Expresní profily jednotlivých genů v semenáčcích byly měřeny po dobu 24 hodin po 4, 6, anebo 12 hodinách tmy. Kontrolní rostliny byly pěstovány na stálém světle. Stádium kvetení analyzované u čtrnáctidenních rostlin ukázalo kvetení 90% rostlin po jedné 12 hod trvající tmě a 20% u rostlin po indukci šesti hodinami tmy. Rostliny, které prošly 4 hod tmy a stálým světlem, nekvetly.

5.4.2.1. Délka fáze tmy koreluje s výší hladin *CrFTLI* transkriptu

Expres *CrFTLI* v semenáčcích *C. rubrum* je závislá na délce temné fáze. Pětidenní semenáčky *C. rubrum* mohou být indukovány ke kvetení jednou fází tmy - optimálně 12 hodin dlouhou, kratší fáze tmy indukují ke kvetení pouze částečně. Tato zjištění zcela korelují s postupným nárůstem množství transkriptu *CrFTLI* za stálého světla a po 4, 6 a 12 hod trvající fázi tmy.

Hladina exprese *CrFTLI* se zvýšila zhruba 20x po fázi tmy trvající 12 hodin a 6x po 6 hodinách tmy. Po čtyřech hodinách tmy a na stálém světle zůstala hladina *CrFTLI* mRNA konstantně nízká (obr. 36).

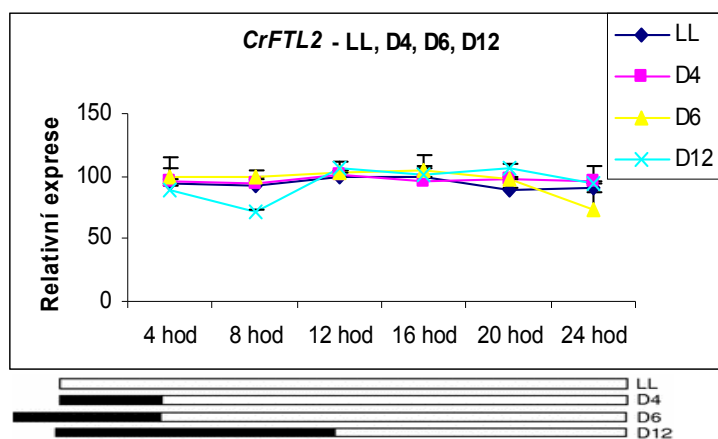
Výše hladin *CrFTLI* 12 hod po skončení tmy koreluje s délkou tmy. Výraznější nárůst *CrFTLI* nastal až po šesti hodinách tmy, která vyvolala kvetení u 20% rostlin. Dvanáctihodinová tma vyvolala 90% kvetení. Poměr relativních hladin *CrFTLI* naměřených po šesti hodinách tmy oproti vystavení čtyřem hodinám tmy je 5,8. Poměr relativních hladin *CrFTLI* naměřených po dvanácti hodinách tmy oproti vystavení šesti hodinám tmy je 3,1. Zhruba šestinásobný nárůst hladin *CrFTLI* je potřeba k vyvolání kvetení alespoň u části rostlin (20%) ve srovnání s hladinami *CrFTL* tvořenými po 4 hod tmy (nekvetou). Pouze trojnásobné zvýšení hladin *CrFTLI* je pak potřeba ke zvýšení indukce kvetení z 20% na 90%. Zdá se tedy, že existuje prahová hodnota hladin *CrFTLI* transkriptu, která vede k indukci kvetení alespoň u malého procenta rostlin. Tato prahová hodnota bude blízká relativní hodnotě *CrFTLI* naměřené u rostlin indukovaných ke kvetení šesti hodinami tmy.



Obr. 36: Expresní profily *CrFTL1* v semenáčcích *C. rubrum*. Semenáčky byly pěstovány pět dní na stálém světle a poté byly v čase 0 přesunuty do tmy a prošly 4 hod tmy (D4), 6 hod tmy (D6), anebo 12 hod tmy (D12). Rostliny, které prošly 6 hodinami tmy, byly přesunuty do tmy v čase -2 hod. Kontrolní rostliny byly pěstovány na stálém světle (LL). Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány z osmi nezávislých měření čtyř semenáčků. Pod grafem je schématicky znázorněna délka fáze tmy a fáze světla.

5.4.2.2. Délka fáze tmy nemá vliv na výši hladin *CrFTL2* transkriptu

CrFTL2 je exprimováno konstitutivně. V rámci všech tří fotoperiodických režimů byly naměřeny zhruba stejné hladiny mRNA. Ty odpovídají hladinám naměřeným u semenáčků na stálém světle a vystaveným jedné, anebo třem po sobě jdoucím induktivním fotoperiodickým režimům 12 hod tma/12 hod světlo (obr. 37).



Obr. 37: Expresní profily *CrFTL2* v semenáčcích *C. rubrum*. Semenáčky byly pěstovány 5 dní na stálém světle a poté byly v čase 0 přesunuty do tmy a prošly 4 hod tmy (D4), 6 hod tmy (D6), anebo 12 hod tmy (D12). Rostliny, které prošly 6 hodinami tmy, byly přesunuty do tmy v čase -2 hod. Kontrolní rostliny byly pěstovány na stálém světle (LL). Pod grafem je schématicky znázorněna délka fáze tmy a fáze světla.

Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány z osmi nezávislých měření čtyř semenáčků. Pod grafem jsou schématicky znázorněny délky fáze tmy a fáze světla jednotlivých fotoperiodických režimů.

5.4.2.3. Délka fáze tmy nemá vliv na výši hladin *CrCOL* transkriptů

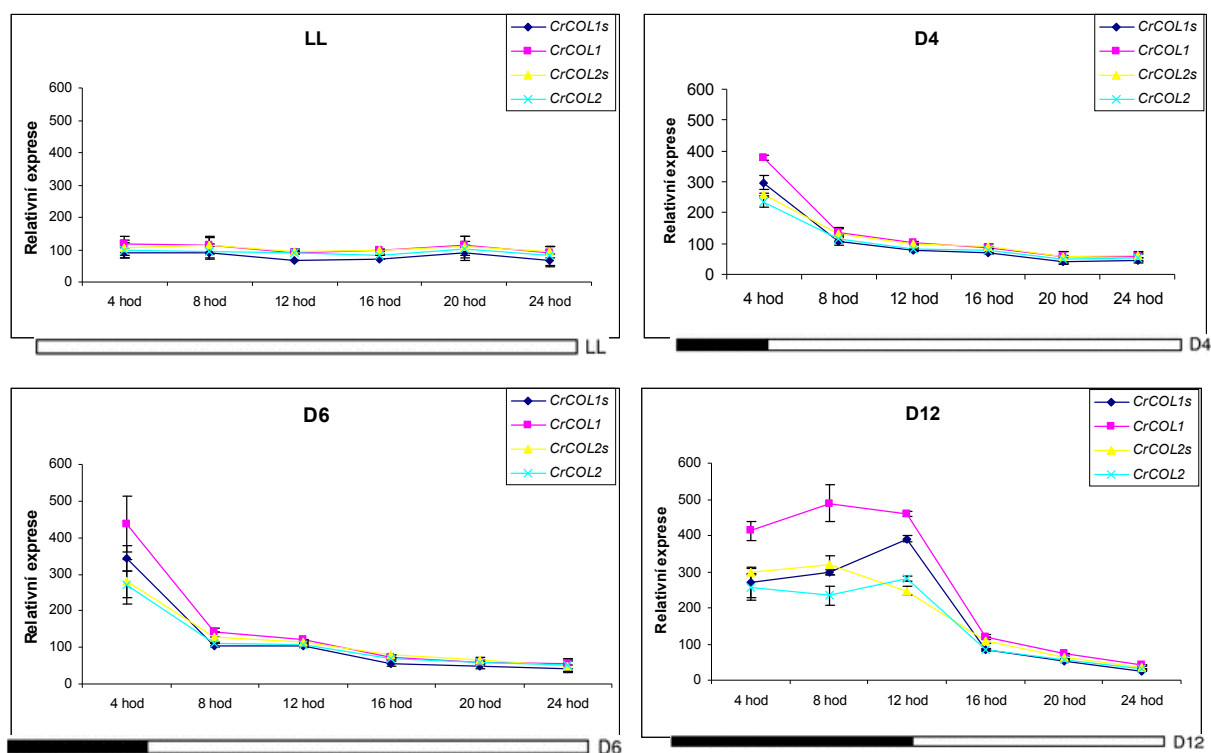
Expresní profily *CrCOL* transkriptů měřené po fázi tmy trvající 4, 6 a 12 hodin ukazují grafy na obr. 38.

Na stálém světle jsou čtyři formy *CrCOL* transkriptů exprimovány se slabým náznakem rytmu s relativně nízkými hladinami mRNA. Ty jsou srovnatelné s hladinami *CrCOL* mRNA na světle následujícím po 4, 6 a 12 hod tmy. Nejvíce abundantní jsou transkripty *CrCOL1* a *CrCOL2s*.

Expresní profily *CrCOL* transkriptů po 4 a 6 hod tmy jsou v podstatě stejné s tím, že na konci fáze tmy byla naměřena zhruba 3x (*CrCOL2s* a *CrCOL2*), 4x (*CrCOL1s*) a 5x (*CrCOL1*) vyšší exprese než v průběhu následující fáze světla. Nejvíce abundantní je transkript *CrCOL1*. S nástupem fáze světla exprese *CrCOL* transkriptů výrazně klesá. S postupujícím časem světelné fáze se hladiny všech *CrCOL* mRNA nadále zvolna snižují.

Maxima exprese *CrCOL* transkriptů v průběhu 12 hod tmy jsou u *CrCOL1* a *CrCOL2s* v 8. hodině tmy, u *CrCOL1s* a *CrCOL2* ve 12. hodině tmy. Za tmy je nejvíce abundantního transkriptu *CrCOL1* zhruba 2x více než nejméně abundantního transkriptu *CrCOL2*. V průběhu fáze světla byly naměřeny relativně nízké hladiny *CrCOL* mRNA, odpovídající hladinám mRNA za fáze světla po 4 a 6 hodinách tmy.

Z naměřených hladin mRNA čtyřech forem *CrCOL* transkriptů je zřejmé, že jejich vysoké hladiny se tvoří pouze za tmy a světelná fáze následující po tmě transkripci *CrCOL* inhibuje. Jednotlivé formy *CrCOL* se v rámci expresních profilů v podstatě neliší. Rozdíly jsou pouze ve výši hladin mRNA jednotlivých forem *CrCOL*.

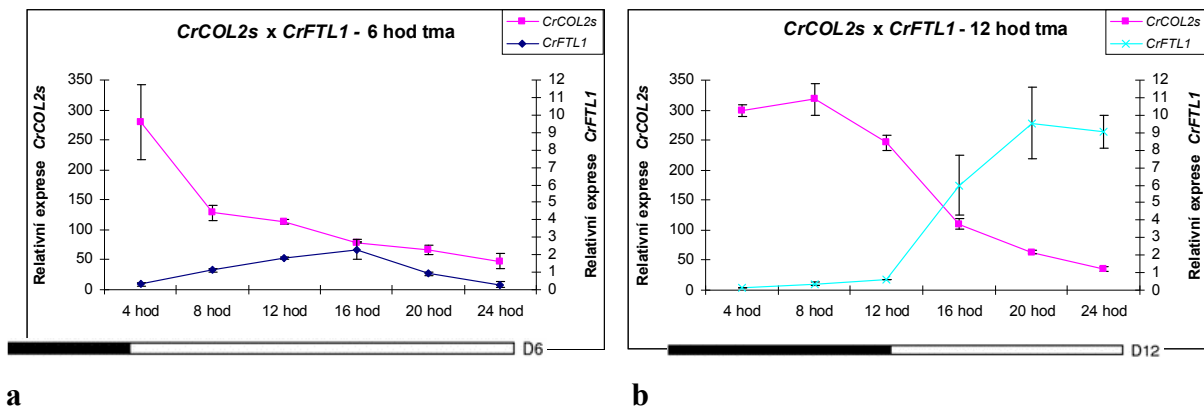


Obr. 38: Expresní profily čtyř forem *CrCOL* transkriptů v semenáčcích *C. rubrum*. Semenáčky byly pěstovány pět dní na stálém světle a poté byly v čase 0 přesunuty do tmy a prošly 4 hod tmy (D4), 6 hod tmy (D6), anebo 12 hod tmy (D12). Rostliny, které prošly 6 hodinami tmy, byly přesunuty do tmy v čase -2 hod. Kontrolní rostliny byly pěstovány na stálém světle (LL). Pod grafy je schématicky znázorněna délka fáze tmy a fáze světla. Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány ze dvou nezávislých měření čtyř semenáčků.

5.4.2.3.1. Délka tmy nekoreluje s výší hladin *CrCOL* mRNA a naopak koreluje s výší hladin *CrFTL1* mRNA a mírou kvetení

Obrázek 39a ukazuje vzájemný poměr expresí *CrCOL2s* (jakožto zástupce *CrCOL* transkriptů) a *CrFTL1* po tmě dlouhé 6 hod. Tato suboptimální délka tmy vedla pouze k částečné indukci kvetení (20%). Na obr. 39b je pak znázorněn vzájemný poměr expresí *CrCOL2s* a *CrFTL1* po plně inductivní fázi tmy, dlouhé 12 hod. Jak již bylo ukázáno v kapitole 5.4.1.3.1., maxima *CrCOL* za tmy odpovídají minimům *CrFTL1* a naopak. Z grafů je zřejmé, že hladiny *CrCOL* mRNA zůstávají vysoké za tmy (relativní hodnoty na konci tmy jsou stejné po tmě trvající 4, 6 i 12 hodin). Výrazně klesají se začátkem fáze světla, kdy naopak dochází k nárůstu hladin transkriptů *CrFTL1*. Tyto výsledky naznačují, že pro udržení rytmické exprese *CrCOL* genů je nutné střídání světla a tmy. Hladiny *CrCOL* transkriptů dramaticky poklesly během čtyř hodin po začátku světelné fáze bez ohledu na délku

předchozí temné priody. Tyto výsledky podporují představu o inhibičním vlivu světla na transkripci *CrCOL*.



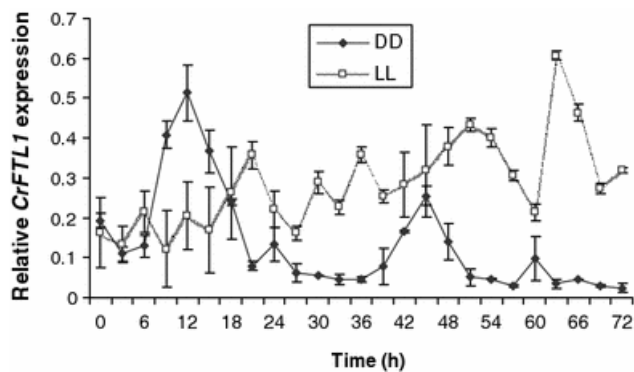
Obr. 39: a) Vzájemný poměr expresí *CrCOL2s* a *CrFTL1* za světla následujícího po 6 hod tmy. Ke kvetení bylo indukováno 20% rostlin. b) Vzájemný poměr expresí *CrCOL2s* a *CrFTL1* v průběhu jednoho induktivního fotoperiodického režimu 12 hod tma/12 hod světlo. Ke kvetení bylo indukováno 90% rostlin. Maxima *CrCOL2s* odpovídají minimům *CrFTL1* a naopak. Pod grafy je schématicky znázorněna délka fáze tmy a fáze světla.

5.4.3. Semenáčky: stálá tma

Maximum exprese *CrFTL1* je uprostřed fáze světla. Pro srovnání byly změřeny hladiny *CrFTL1* ale i *CrFTL2* a *CrCOL* mRNA za stálé tmy po dobu 72 hodin. Čtrnáctidenní rostliny pěstované 72 hod na stálé tmě nekvetly.

5.4.3.1. Přesun semenáčků *C. rubrum* ze světla do tmy indukuje rytmickou expresi *CrFTL1* s velmi nízkými amplitudami

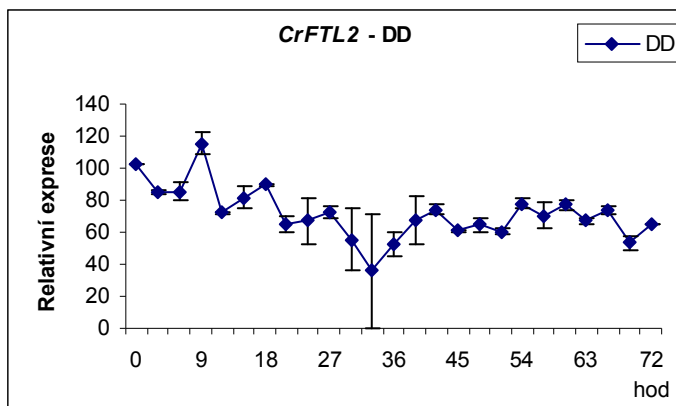
Na rozdíl od arytmičné exprese na stálém světle, za stálé tmy podléhá exprese *CrFTL1* zřetelné rytmicitě s prvním maximem okolo 12 hodin po začátku tmy. To odpovídá délce fáze tmy, která maximálně indukuje kvetení. Druhé, o něco nižší maximum se objevuje po 45 hod od začátku tmy a ukazovalo by na periodu rytmu okolo 33 hodin. Ovšem první maximum může být ovlivěno přechodem ze světla do tmy, a tak časové rozpětí mezi druhým a třetím maximem (15 hod) by mohlo lépe ukazovat na délku periody. Hodnota třetího maxima je zatížena velkou chybou měření. Obecně je však amplituda *CrFTL1* exprese velmi nízká, srovnatelná s hladinami exprese na stálém světle. Přesun semenáčků *C. rubrum* ze světla do tmy indukuje rytmickou expresi *CrFTL1*, ale s velmi nízkými amplitudami (obr. 40).



Obr. 40: Srovnání expresních profilů *CrFTL1* v semenáčcích *C. rubrum* za stálé tmy (DD) a stálého světla (LL). Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány ze čtyř nezávislých měření dvou semenáčků.

5.4.3.2. Transkripce *CrFTL2* za stálé tmy je srovnatelná s transkripcí v semenáčcích za všech studovaných světelných režimů

Na rozdíl od *CrFTL1* není *CrFTL2* za stálé tmy exprimováno rytmicky, ale konstitutivně (obr. 41). Hodnoty relativní exprese se výrazně neliší od hodnot naměřených ve všech ostatních experimentech s různými fotoperiodickými režimy.

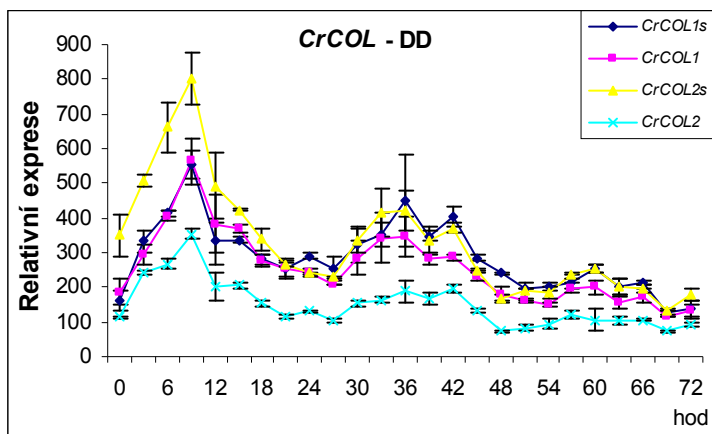


Obr. 41: Expresní profily *CrFTL2* v semenáčcích *C. rubrum* za stálé tmy (DD). Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány ze čtyř nezávislých měření dvou semenáčků.

5.4.3.3. Přesun semenáčků *C. rubrum* ze světla do tmy indukuje rytmickou expresi *CrCOL* s vysokými amplitudami

Na stálém světle vykazují exprese *CrCOL* náznak rytmu, ovšem s nízkými hladinami mRNA. Za stálé tmy podléhají exprese *CrCOL* zřetelné rytmicitě s prvním maximem okolo 9 hodin po začátku tmy. Druhé, asi poloviční maximum, se objevuje po 27 hod od prvního. První maximum může být ovlivěno přechodem ze světla do tmy, a tak časové rozpětí mezi druhým a třetím maximem (24 hod) pravděpodobně ukazuje na délku periody. Perioda je tedy za stálé tmy zachována. Amplituda *CrCOL* exprese za stálé tmy je relativně vysoká, srovnatelná s

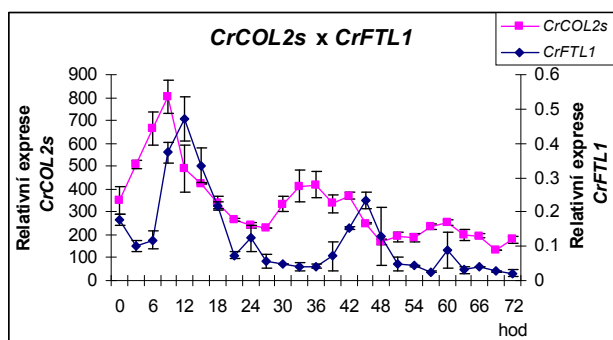
hladinami exprese za fáze tmy při induktivní fotoperiodě. Nejvíce je transkribována forma *CrCOL2s*, které je asi 2,5x více než nejméně transkribované formy *CrCOL2*. Přesun semenáčků *C. rubrum* ze světla do tmy indukuje rytmickou expresi *CrCOL* s relativně vysokými amplitudami (obr. 42).



Obr. 42: Expresní profily *CrCOL* v semenáčcích *C. rubrum* za stálé tmy (DD). Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány ze dvou nezávislých měření dvou semenáčků

5.4.3.3.1. Poměr expresí *CrCOL2s* a *CrFTL1* za stálé tmy naznačuje odlišnou regulaci rytmické exprese obou sledovaných genů

Obrázek 43 ukazuje vzájemný poměr expresí *CrCOL2s* (jakožto zástupce *CrCOL* transkriptů) a *CrFTL1* za stálé tmy. Expres obou sledovaných genů je rytmická. Hladiny *CrFTL1* mRNA oscilují s velmi nízkou amplitudou. Těmto velmi nízkým hladinám *CrFTL1* odpovídají vysoké hladiny *CrCOL* mRNA. Perioda *CrCOL* exprese je 24 hodin. Perioda *CrFTL1* je zřejmě 33 hodin (spolehlivě lze odečíst pouze čas mezi prvním a druhým maximem). První maximum *CrFTL1* následuje 4 hod po prvním maximu *CrCOL*. Druhé maximum exprese *CrFTL1* se překrývá s minimem exprese *CrCOL*. Tato situace je odlišná od poměru expresí *CrCOL* a *CrFTL1* za opakovaně se střídající tmy (12 hod) a světla (12 hod). Naše výsledky tak naznačují odlišnou regulaci rytmické exprese (rozdílná délka periody) obou sledovaných genů a soulad s předpokládaným inhibičním efektem *CrCOL* na *CrFTL1*.



Obr. 43: Vzájemný poměr expresí *CrCOL2s* a *CrFTL1* za stálé tmy ukazuje na odlišnou regulaci rytmické exprese *CrCOL* a *CrFTL1* genů.

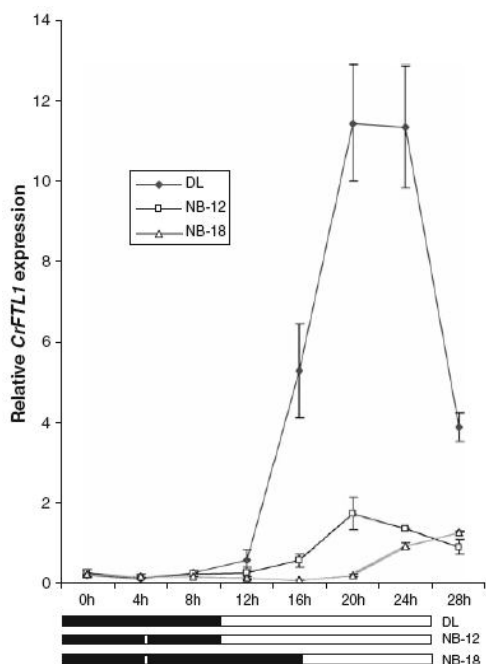
5.4.4. Semenáčky: night-break

Pro posouzení účasti jednotlivých genů na fotoperiodické indukci kvetení jsme také studovali vliv aplikace night-break (NB) na expresi nově identifikovaných genů z *C. rubrum*. Semenáčky *C. rubrum* byly pěstovány 5 dní na stálém světle, přesunuty do tmy na 12 (NB-12) anebo 18 hodin (NB-18) a poté zpět na stálé světlo. Obě sady rostlinek byly po 6 hod tmy vystaveny NB červeným světlem po dobu 15 min. Kontrolní rostliny byly vystaveny 12 hodinám tmy bez přerušování světlem (DL). Vzorky pro měření exprese genů byly odebrány po dobu 28 hodin. Kvetení bylo analyzováno u 20 rostlin z každé skupiny. 80% kontrolních rostlin kvetlo, kdežto žádné kvetení nebylo pozorováno u obou variant vystavených NB.

5.4.4.1. Night-break inhibuje expresi *CrFTL1*

Maximum exprese *CrFTL1* u kontrolních rostlin bylo po 6 hod po přesunu na světlo a dosahovalo 50-násobku hladin exprese *CrFTL1* za tmy. U rostlin vystavených NB to byl pouze 5-násobek, přičemž maximum *CrFTL1* transkriptu bylo naměřeno po 6-8 hod po přesunu na světlo. U varianty s 18 hodinovou fází tmy (6 hod tma, NB, 12 hod tma) byla maximální hladina *CrFTL1* mRNA naměřena o 8 hodin později oproti semenáčkům po 12 hodinách tmy (obr. 44).

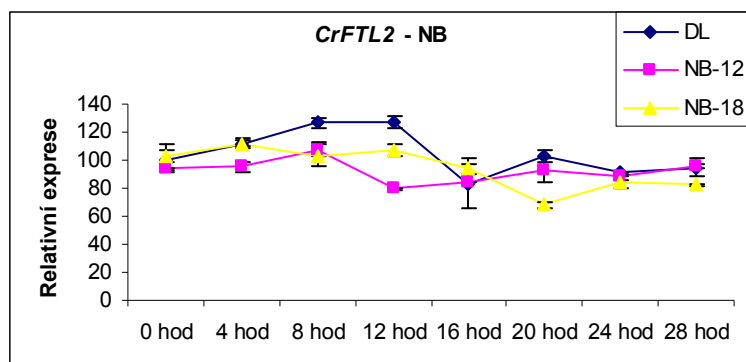
V rostlinách vystavených NB i v kontrolách došlo po přesunutí ze tmy na světlo ke zvýšení hladiny *CrFTL1* transkriptu, ovšem jeho hladina v kontrolních rostlinách byla asi 10x vyšší než u rostlin vystavených NB. Vysoké hladiny *CrFTL1* mRNA v kontrolách korelují s indukcí 80% rostlin, kdežto žádné kvetení nebylo pozorováno v rostlinách vystavených NB, kde byly naměřeny nízké hladiny *CrFTL1* mRNA. NB tedy výrazně inhibuje jak kvetení, tak úroveň exprese *CrFTL1*.



Obr. 44: Efekt NB na hladinu *CrFTL1* transkriptu v semenáčcích *C. rubrum*. Semenáčky byly pěstovány 5 dní na stálém světle a poté přesunuty do tmy na 12 (NB-12) anebo 18 hodin (NB-18) v čase 0. Po 6 hod od začátku tmy byly vystaveny NB. Kontrolní rostliny byly vystaveny 12 hod tmy bez přerušeni světlem (DL). Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány ze čtyř nezávislých měření dvou semenáčků. Pod grafy je schématicky znázorněna délka fáze tmy a fáze světla.

5.4.4.2. Night-break nemá vliv na expresi *CrFTL2*

Na rozdíl od *CrFTL1* nebyla exprese *CrFTL2* ovlivněna aplikací NB (obr. 45). *CrFTL2* je exprimováno konstitutivně s hladinami mRNA zhruba stejně vysokými jako ve všech předchozích měřeních za různých fotoperiodických podmínek.



Obr. 45: Efekt NB na hladinu *CrFTL2* transkriptu v semenáčcích *C. rubrum*. Semenáčky byly pěstovány 5 dní na stálém světle a poté přesunuty do tmy na 12 (NB-12) anebo 18 hodin (NB-18) v čase 0. Po 6 hod od začátku tmy byly vystaveny NB. Kontrolní rostliny byly vystaveny 12 hod tmy

bez přerušeni světlem (DL). Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány ze čtyř nezávislých měření dvou semenáčků.

5.4.4.3. Night-break nemá vliv na expresi *CrCOL*

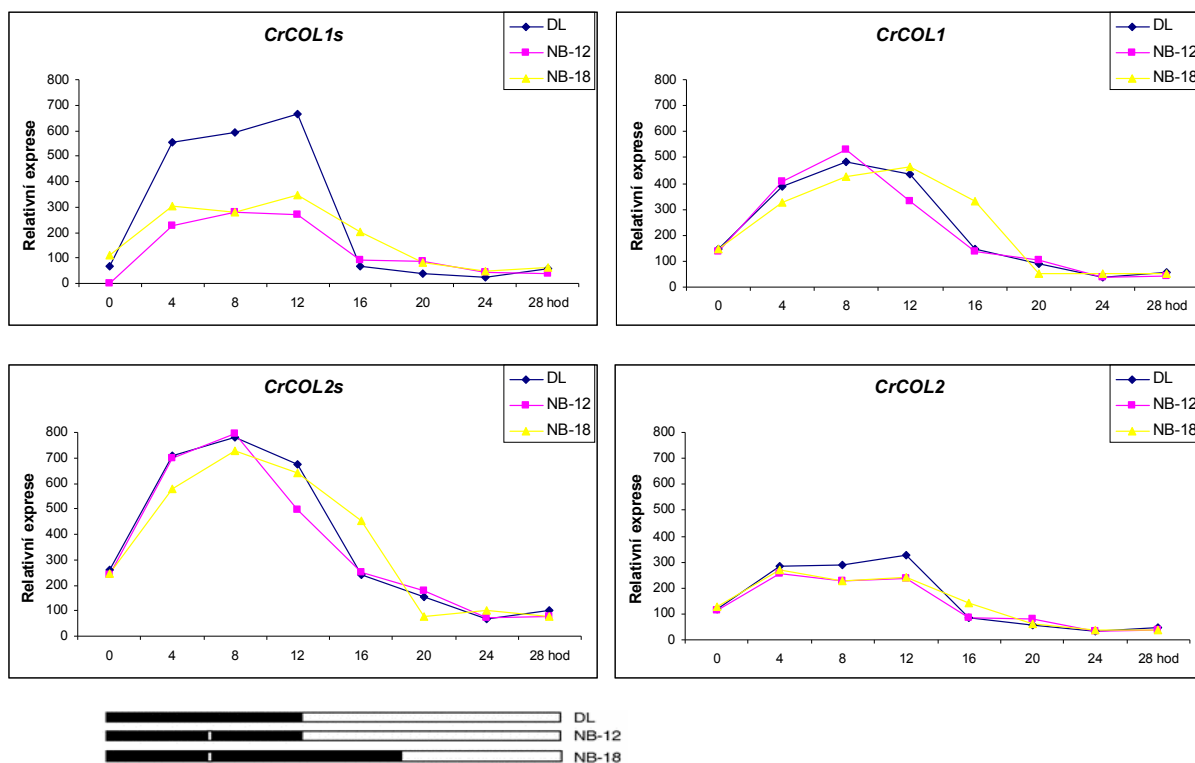
V rámci biologického pokusu s aplikací NB byly naměřeny vysoké hladiny *CrCOL* transkriptů za fáze tmy a nízké hladiny za fáze světla následující po tmě (obr. 46). U varianty NB-18 byly naměřeny vyšší hladiny všech *CrCOL* transkriptů i v 16. hodině tmy oproti

variantám s dvanácti hodinami tmy (NB-12; DL). Za delší tmy tedy přetrvává vysoká hladina exprese *CrCOL*.

Expresní profily *CrCOL1s* a *CrCOL2* jsou si podobnější, s maximem exprese ve 12. hodině tmy. Stejnětak jsou si podobnější expresní profily *CrCOL1* a *CrCOL2s* s maximem exprese v 8. hodině tmy.

NB nemá žádný znatelný vliv na expresi *CrCOL1*, *CrCOL2s* a *CrCOL1s*. Slabé snížení exprese vlivem NB lze uvažovat u formy *CrCOL2*, kde u obou NB variant po dvou hodinách po aplikaci NB hladina mRNA vůči kontrole mírně klesá. S ohledem na jedno měření však nelze jednoznačně rozhodnout. Hladiny *CrCOL1s* mRNA v 8. a 12. hodině tmy u variant po aplikaci NB jsou téměř dvojnásobně nižší oproti kontrole, ovšem takové byly již ve 4. hodině tmy před aplikací NB.

Souhrně lze říci, že exprese všech čtyř *CrCOL* transkriptů jsou stejně jako u předcházejících pokusů vysoké za tmy a nízké za světla. Taktéž je zřejmé, že nejsou výrazně ovlivněny aplikací NB. Opět se potvrzuje důležitost tmy pro tvorbu vysokých hladin *CrCOL* transkriptů a inhibice jejich tvorby za světla. Můžeme uzavřít, že zatímco 15 minut červeného světla nemá vliv na expresi *CrCOL* genů, k výraznému snížení hladin transkriptů dochází za dvě až čtyři hodiny působení bílého světla. Podrobnější studium délky světelného impulzu a barvy světla na expresi *CrCOL* bude velmi zajímavé.



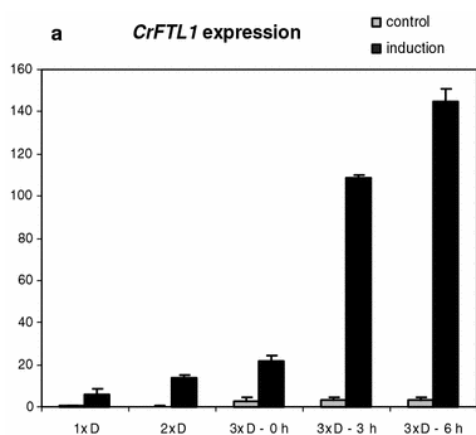
Obr. 46: Efekt NB na hladinu *CrCOL* transkriptů v semenáčcích *C. rubrum*. Semenáčky byly pěstovány 5 dní na stálém světle a poté přesunuty do tmy na 12 (NB-12) nebo 18 hodin (NB-18) v čase 0. Po 6 hod od začátku tmy byly vystaveny NB. Kontrolní rostliny byly vystaveny 12 hod tmy bez přerušování světlem (DL). Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány z jednoho měření dvou semenáčků. Vlevo pod grafy je schématicky znázorněna délka fáze tmy a fáze světla, schéma platí pro všechny čtyři grafy.

5.4.5. Dospělé rostliny – jedna, dvě nebo tři induktivní periody tmy

V kapitolách 5.4.1. – 5.4.4. byly prezentovány výsledky z měření exprese nově identifikovaných genů v semenáčcích *C. rubrum*. Vysoké hladiny *CrFTL1* korelovaly s indukcí kvetení a nízké hladiny *CrFTL1* byly naměřeny u rostlin, které nekvetly. Fotoperiodická indukce kvetení u této rostliny závisí na jejím stáří (Seidlová a Krekule, 1973; Ullmann et al., 1985). Zajímalo nás proto, jaká je exprese *CrFTL1* u starších rostlin s pravými listy. Byla měřena exprese *CrFTL1* a *CrFTL2* u patnáctidenních rostlin indukovaných ke kvetení jednou, dvěma nebo třemi periodami 12 hod tmy. V čase indukce měly rostliny pár plně vyvinutých pravých listů a stále zelené dělohy. Hladiny transkriptů byly měřeny ihned po konci první a druhé fáze tmy a 0, 3 a 6 hod po skončení třetí periody tmy. Kvetení bylo určováno 8 dnů po aplikaci tmy u 20 rostlin. Kvetlo 100% rostlin po aplikaci dvou nebo tří fází tmy a pouze 58% rostlin po aplikaci jedné fáze tmy. Kontrolní rostliny pěstované na stálém světle nekvetly.

5.4.5.1. Aplikace jedné, dvou a tří induktivních fází tmy u 15-ti denních rostlin koreluje se vzrůstající transkripcí *CrFTL1* a mírou kvetení

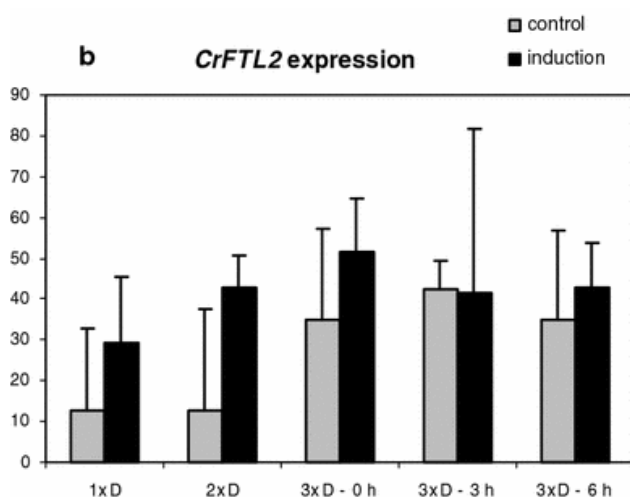
Hladiny transkriptu *CrFTL1* v listech po jedné periodě tmy se zvýšily asi 7x, po dvou periodách tmy asi 15x a nadále se zvyšovaly s časem po skončení třetí periody tmy. Po šesti hodinách po skončení třetí fáze tmy dosahovaly asi 50-násobku oproti kontrolním rostlinám (obr. 47). Zvyšující se hladiny *CrFTL1* po aplikaci jedné anebo dvou a tří induktivních fází tmy trvajících 12 hod korelují se vzrůstající indukcí kvetení: 58% kvetení po indukci jednou tmou, 100% kvetení po indukci dvěma nebo třemi fázemi tmy. K indukci exprese *CrFTL1* temnou periodou dochází nejen u semenáčků, ale i u rostlin s pravými listy.



Obr. 47: Relativní exprese *CrFTL1* v listech patnáctidenních rostlin *C. rubrum*. Rostliny byly pěstovány na stálém světle, poté byly vystaveny jednomu (1D), dvěma (2D), anebo třem (3D) induktivním fotoperiodickým režimům 12 hod tma/12 hod světlo. Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány ze čtyř nezávislých měření dvou semenáčků.

5.4.5.2. V 15-ti denních rostlinách je *CrFTL2* exprimováno konstitutivně s nižšími hladinami mRNA v porovnání se semenáčky

Na rozdíl od *CrFTL1* nebyla exprese *CrFTL2* ovlivněna aplikací jedné, dvou, anebo tří induktivních fází tmy (obr. 48). *CrFTL2* je exprimováno konstitutivně s hladinami mRNA zhruba 2-3x nižšími ve srovnání s hladinami naměřenými v semenáčcích za různých fotoperiodických podmínek.



Obr. 48: Relativní exprese *CrFTL2* v listech patnáctidenních rostlin *C. rubrum*. Rostliny byly pěstovány na stálém světle, poté byly vystaveny jedné (1D), dvěma (2D), anebo třem (3D) fotoperiodickým režimům 12 hod tma/12 hod světlo. Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky byly spočítány ze čtyř nezávislých měření dvou semenáčků.

5.5. Příprava cDNA pro přenos do *A. thaliana*

Úplné cDNA nově identifikovaných genů *CrFTL1*, *CrFTL2*, *CrCOL1* a *CrCOL2s* zaklonovaných v pGEM-T Easy bylo pro přenos do genomu *A. thaliana* potřeba vhodně připravit. Postup je popsán v kapitolách 5.5.1. – 5.5.9.

5.5.1. Vyštěpení cDNA genu z pGEM-T Easy a separace fragmentu

Výchozím konstruktem nesoucím úplnou cDNA genu z *C. rubrum* byl pGEM-T Easy. Asi 20 μ g vektoru bylo štěpeno restrikním enzymem dle návodu výrobce a enzym teplotně deaktivován. Byl použit takový restrikní enzym, který vyštěpil z pGEM-T Easy sekvenci klonovaného genu vcelku. Pro vyštěpení *CrFTL2* cDNA byl použit enzym EcoRI. Pro štěpení plazmidů nesoucích *CrFTL1*, *CrCOL1* a *CrCOL2s* cDNA byl použit enzym NotI.

Po restrikci byla směs linearizovaného vektoru pGEM-T Easy a fragmentu nesoucího klonovaný gen rozdělena na 1 - 1,2% elektroforetickém gelu a fragment s klonovaným genem byl vyřezán a přečištěn pomocí QIAquick Gel Extraction Kit.

5.5.2. Přidání 35S promotoru a poly-A signálu ke klonované cDNA přenosem do pRT101

5.5.2.1. Příprava vektoru pRT101 pro ligaci

Asi 5 µg vektoru pRT101 bylo štěpeno enzymem EcoRI, přečištěno metodou přesrážení s acetátem sodným a ethanolem (protokol viz příloha 24) a naředěno na koncentraci kolem 50 ng/µl.

5.5.2.2. Úprava konců restrikčních fragmentů pRT101, *CrFTL1*, *CrCOL1* a *CrCOL2s* pro ligaci natupo

Pro možnost použití pRT101 v ligaci natupo byly jeho 5' přesahující konce vzniklé štěpením EcoRI zatupeny pomocí Klenowova fragmentu dle návodu výrobce (protokol viz příloha 25). Stejným způsobem byly zatupeny též 5' přesahující konce NotI restrikčních fragmentů nesoucích cDNA *CrFTL1*, *CrCOL1* a *CrCOL2s*.

5.5.2.3. Ligace cDNA genů do pRT101

cDNA genů s vhodně upravenými konci byly ligovány za 35S promotor a před poly-A signál v pRT101.

1 µl pRT101 štěpený EcoRI (asi 50 ng/µl) byl ligován s 3 µl EcoRI restrikčního fragmentu (asi 50 ng/µl) nesoucího cDNA *CrFTL2*. Ligace probíhala s 5 µl 2x ligačního pufru a 1 µl T4 DNA ligázy z pGEM-T Easy Vector System I v celkovém objemu 10 µl.

1 µl pRT101 se zatupenými EcoRI konci byl ligován natupo s 3 µl restrikčního fragmentu nesoucího *CrFTL1*, *CrCOL1* anebo *CrCOL2s* se zatupenými NotI konci. Ligace natupo probíhala stejně, jako bylo popsáno v předchozím odstavci.

5.5.2.4. Ověření správné orientace cDNA za 35S promotorem v pRT101

Správná orientace vložení cDNA za 35S promotorem v pRT101 byla ověřena štěpením 4 µl plazmidu enzymem štěpícím 1x v sekvenci vektoru a 1x nesymetricky v rámci délky sekvence genu - v případě *CrFTL2* bylo použito dvojího ověření enzymy SmaI a EcoRV, v případě *CrFTL1*, *CrCOL1* a *CrCOL2s* enzymu BamHI.

5.5.2.5. Vzdálenost start kodónu od počátku transkripce u *CrFTL1*

Pro efektivní transkripci v rostlinném genomu hraje důležitou roli vzdálenost start kodónu genu od počátku transkripce. Start kodón *CrFTL1* je vzdálen 81 bp od počátku transkripce. Sekvence 35S promotoru v pRT101 a vzdálenost start kodónu *CrFTL1* od počátku transkripce je znázorněna na obrázku 49. Z předběžných výsledků transgenózy (viz kapitola 5.6.1.2.1.) je patrné, že toto uspořádání sekvencí potřebných pro efektivní transkripci v rostlině je plně funkční.

```
HindIII SphI PstI HincII
aagcttgcac gacctgcaggt cAACATGGTG GAGCACGACA CTCTCGTCTA CTCCAAGAAT ATCAAAGATA CAGTCTCAGA
AGACCAGAGG GCTATTGAGA CTTTTCAACA AAGGGTAATA TCGGAAACC TCCTCGGATT CCATTGCCCA GCTATCTGTC
ACTTCATCGA AAGGACAGTA GAAAAGGAAG ATGGCTTCTA CAAATGCCAT CATTGCGATA AAGGAAAGGC TATCGTTCAA
GAATGCCTCT ACCGACAGTG GTCCCAAAGA TGGACCCCA CCCACGAGGA ACATCGTGGA AAAAGAAGAC GTTCCAACCA
CGTCTTCAAA GCAAGTGGAT TGATGTGATA TCTCCACTGA CGTAAGGGAT GACGCACAAT CCCACTATCC TTCGCAAGAC
      TATA box                poč. transkripce  EcoRI/NotI - ligace natupo
CCTTCCTCTA TATAAGGAAG TTCATTTCAT TTGGAGAGGA Cctcga gaat tggccgggg aattcgattc aggcagatat
PCR primer CrFTL1For                Start kodón CrFTL1
atagagttgt cgaacacagaa aaataattct attccctatc atg..... - pokračuje kódující sekvence CrFTL1
```

Obr. 49: Vzdálenost start kodónu *CrFTL1* od TATA box a počátku transkripce 35S promotoru v pRT101.

Velkými písmeny – sekvence CaMV 35S promotoru v pRT101; podtrženým písmem – TATA box a počátek transkripce; tučným písmem – sekvence zatupených EcoRI a NotI konců ligovaných natupo a sekvence forward primeru CrFTL1For zacíleného do 5' UTR *CrFTL1*; červeně start kodón *CrFTL1*; vše popsáno nad příslušnými sekvencemi.

5.5.3. Vyštěpení fragmentu nesoucího 35S::cDNA a poly-A signál z pRT101 a jeho separace

Asi 20 µg plazmidu pRT101 s vloženou *CrFTL* respektive *CrCOL* cDNA ve správné orientaci za 35S promotorem bylo štěpeno enzymem HindIII. Fragmenty byly děleny na 1% elektroforetickém gelu a restriční fragment odpovídající 35S::*CrFTL* respektive 35S::*CrCOL* (cDNA *CrFTL* respektive *CrCOL* pod 35S promotorem) byl vyřezán a přečištěn pomocí QIAquick Gel Extraction Kit.

5.5.4. Příprava vektoru pGreenII0179 pro vlastní transformaci *Arabidopsis thaliana* pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

5.5.4.1. Příprava vektoru pGreenII0179 pro ligaci

Asi 5 µg vektoru pGreenII0179 bylo štěpeno enzymem HindIII, přečištěno metodou přesrážení s acetátem sodným a ethanolem (protokol viz příloha 24) a naředěno na koncentraci kolem 50 ng/µl.

5.5.4.2. Ligace 35S::*CrFTL* a 35::*CrCOL* fragmentů do pGreenII0179

3 µl HindIII fragmentu nesoucího 35S::*CrFTL1*, 35S::*CrFTL2*, 35::*CrCOL1* anebo 35::*CrCOL2s* byly ligovány s 1 µl pGreenII0179 štěpeného HindIII. Byly použity T4 DNA ligáza a ligační pufr z pGEM-T Easy Vector System I stejně, jak bylo popsáno v kapitole 5.5.2.3.

5.5.4.3. Ověření vložení fragmentu nesoucího 35S::*cDNA* a poly-A signál do pGreenII0179

Vložení fragmentu nesoucího 35S::*cDNA* a poly-A signál do pGreenII0179 byla ověřena štěpením 4 µl plazmidu enzymem HindIII. Ověřené klony pGreenII0179 plazmidů byly použity k transformaci *Agrobacterium tumefaciens* pro přenos 35S::*CrFTL* a 35::*CrCOL* do *A. thaliana*.

5.6. Transgenoze

Pro ověření funkce nově identifikovaných genů z *C. rubrum* byla jejich cDNA umístěna za 35S promotor zajišťující vysokou úroveň exprese v rostlinách. Konstrukt 35S::*CrFTL* anebo 35S::*CrCOL* byl přenesen do genomu standardního genotypu a *ft* anebo *co* mutantů *A. thaliana*.

5.6.1. Přenos *CrFTL1* do standardního genotypu Ler a *ft* mutantů *A. thaliana*

Pro ověření funkce *CrFTL1* byla *CrFTL1* cDNA o úplné délce umístěna za *35S* promotor (*35S::CrFTL1*) a tento konstrukt byl transformován do standardního genotypu a *ft* mutantů *A. thaliana*.

5.6.1.1. Přenos *CrFTL1* do standardního genotypu Ler

Transformací *CrFTL1* do standardního genotypu Ler NW20 *A. thaliana* (Scholl et al., 2000) byla získána T1 generace tří linií transformantů *35S::CrFTL1*. Byly označeny NW20-CrFTL1-1, NW20-CrFTL1-2 a NW20-CrFTL1-3.

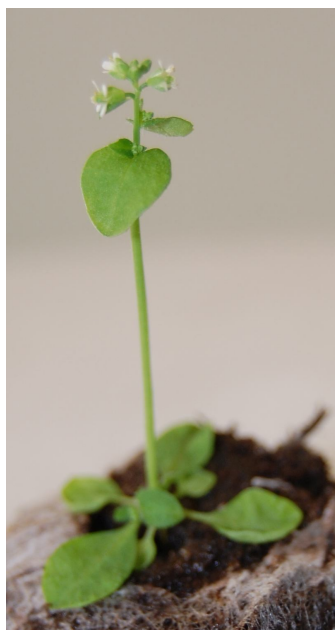
5.6.1.2. Přenos *CrFTL1* do *ft* mutantů *A. thaliana*

CrFTL1 cDNA byla transformována do dvou *ft* mutantů *A. thaliana* - N184 a N56 (Koornneef et al., 1991; Scholl et al., 2000). Oba *ft* mutanty kvetly na dlouhém dni přibližně po 8 týdnech od výsevu.

5.6.1.2.1. Transformace *ft* mutantu N184

V N184 byly získány dvě linie transformantů *ft35S::CrFTL1* označené N184-CrFTL1-1 a N184-CrFTL1-2. T1 generace obou linií kvetla na dlouhém dni na miskách s ½MS médiem relativně brzy. Již po vytvoření dvou pravých lístků kvetla a po přesazení do přepařeného substrátu špatně přežívala. V obou liniích byla pomocí PCR potvrzena přítomnost úplné *CrFTL1* sekvence.

T2 generace obou linií byly pěstovány na krátkém dni, dokud nebyly viditelné základy květenství. Poté byly rostliny přesunuty na dlouhý den. U linie N184-CrFTL1-1 byly první základy květenství pozorovány na krátkém dni po dvaceti dnech od vysetí. Z celkového počtu 35 rostlin jich kvetlo 29. Raně kvetoucí rostliny (křehké, světlezelené, třetina až polovina zakrnělých šesulí) byly habituelně nápadně odlišné od pozdně kvetoucích rostlin (robustní, tmavězelené), které se podobaly *ft* mutantní linii N184 (obr. 50 a 51). Fenotypový štěpný poměr raně kvetoucích (po třech týdnech, 5-6 listů v růžici) a pozdně kvetoucích (po osmi týdnech, 25-30 listů v růžici) rostlin je 4,8:1 (obr. 51). Blíží se tedy ideálnímu fenotypovému štěpnému poměru 3:1.



Obr. 50: T2 generace linie N184-CrFTL1-1 *A. thaliana* po 27 dnech od vysetí. 20 dní byly rostliny pěstovány na krátkém dni (8 hod světlo/16 hod tma), poté na dlouhém dni (16 hod světlo/8 hod tma). Vlevo jedna z 29-ti kvetoucích rostlin, vpravo jedna ze šesti nekvetoucích rostlin.



Obr. 51: T2 generace linie N184-CrFTL1-1 *A. thaliana* po 7 týdnech od vysetí. 20 dní byly rostliny pěstovány na krátkém dni (8 hod světlo/16 hod tma), poté na dlouhém dni (16 hod světlo/8 hod tma). Štěpný fenotypový poměr kvetoucích (29) a nekvetoucích (6) rostlin je 4,8:1.

5.6.1.2.1.1. Přítomnost *CrFTL1* v genomu T2 generace transformantů koreluje s časným kvetením

Všechny rostliny T2 generace linie N184-CrFTL1-2 kvetly pozdě (srovnatelně s *ft* mutantní linií N184) - po osmi týdnech. Taktéž habituelně si obě linie odpovídaly. To ukazovalo na umlčení exprese transgenu, anebo jeho ztrátu. Proto byly T2 generace obou získaných linií testovány na přítomnost *CrFTL1* genu v genomu pomocí PCR s primery CrFTL1For a CrFTL1rev zacílenými do UTR *CrFTL1* genu. Celkem byly testovány jedna pozdně kvetoucí a tři raně kvetoucí rostliny z linie N184-CrFTL1-1 a tři rostliny z linie N184-CrFTL1-2. Jako kontrola byla též testována DNA *A. thaliana* pro případ, že by primery byly částečně komplementární k UTR *FT* genu *A. thaliana*. PCR potvrdila přítomnost *CrFTL1* genu pouze v raně kvetoucích rostlinách T2 generace linie N184-CrFTL1-1. V genomu pozdně kvetoucích rostlin z téže linie a pozdně kvetoucích rostlin linie N184-CrFTL1-2 nebyla sekvence *CrFTL1* nalezena. Doba raného kvetení rostlin T2 generace transformantů tedy korelovala s přítomností *CrFTL1* sekvence v jejich genomu. Tyto výsledky, stejně jako fenotypové štěpení v T2 generaci N184-CrFTL1-1 (viz předchozí kapitola) ukazují na komplementaci *ft* mutantu *A. thaliana* genem *CrFTL1*. *CrFTL1* je tedy velmi pravděpodobně ortologem *FT* z *A. thaliana*.

5.6.1.2.2. Transformace *ft* mutantu N56

V N56 byla získána semena z T0 generace rostlin. Z těchto semen (T1 generace) budou selektovány jednotlivé linie transformantů *ft35S::CrFTL1*.

5.6.2. Přenos *CrFTL2* do standardního genotypu Ler, *ft* mutantů a *co* mutantu *A. thaliana*

Pro ověření funkce *CrFTL2* genu byla cDNA *CrFTL2* o úplné délce umístěna za 35S promotor (*35S::CrFTL2*) a tento konstrukt byl transformován do standardního genotypu, dvou *ft* mutantů a *co* mutantu *A. thaliana*. Dosavadní výsledky (exprese *CrFTL2* za různých fotoperiodických režimů) naznačovaly neúčast *CrFTL2* na kvetení u *C. rubrum*. Pro detailnější ověření případné nepřímé účasti *CrFTL2* v rámci indukce kvetení byla cDNA tohoto genu přenesena nejen do *ft* mutantů, ale též do *co* mutantu *A. thaliana*.

5.6.2.1. Přenos *CrFTL2* do standardního genotypu Ler

Transformací *CrFTL2* do standardního genotypu Ler NW20 *A. thaliana* (Scholl et al., 2000) byla získána T1 generace jedné linie transformantů *35S::CrFTL2*. Byla označena NW20-CrFTL2-1.

5.6.2.2. Přenos *CrFTL2* do *ft* mutantů *A. thaliana*

Konstrukt *35S::CrFTL2* byl transformován do dvou *ft* mutantů N184 a N56 *A. thaliana* (Koorneef et al., 1991; Scholl et al., 2000). V N184 i N56 byla získána semena z T0 generace rostlin. Z těchto semen (T1 generace) budou selektovány jednotlivé linie transformantů *ft35S::CrFTL2*.

5.6.2.3. Přenos *CrFTL2* do *co* mutantu *A. thaliana*

Konstrukt *35S::CrFTL2* byl transformován do *co* mutantu N175 (Koorneef et al., 1991; Scholl et al., 2000). V N175 byla získána semena z T0 generace rostlin. Z těchto semen (T1 generace) budou selektovány jednotlivé linie transformantů *co35S::CrFTL2*.

5.6.3. Přenos *CrCOL* do standardního genotypu Ler a *co* mutantu *A. thaliana*

Pro ověření funkce *CrCOL* genů byla jejich cDNA o úplné délce umístěna za *35S* promotor (*35S::CrCOL1* respektive *35S::CrCOL2s*) a tento konstrukt byl transformován do standardního genotypu a *co* mutantu *A. thaliana*. Tyto pokusy jsou obzvláště významné, protože mohou rozhodnout o funkci *COL* genů. Sekvence nově identifikovaných *CrCOL* genů a jejich expresní profily totiž nedaly jasnou představu o funkci, jak tomu bylo v případě *CrFTL1* a *CrFTL2*.

Do *A. thaliana* byly přeneseny obě alternativně sestřihované formy transkriptu, neseštěhovaná *CrCOL1* a sestřihovaná *CrCOL2s*. To by mohlo přispět k objasnění případného funkčního významu alternativního sestřihu těchto genů v rámci fotoperiodické indukce kvetení.

5.6.3.1. Přenos *CrCOL1* a *CrCOL2s* do standardního genotypu Ler

CrCOL1 a *CrCOL2s* byly transformovány do standardního genotypu Ler NW20 *A. thaliana* (Scholl et al., 2000). Ze semen z T0 generace rostlin budou selektovány rostliny T1 generace linií nesoucích *35S::CrCOL1*, anebo *35S::CrCOL2s*.

5.6.3.2. Přenos *CrCOL1* do *co* mutantu *A. thaliana*

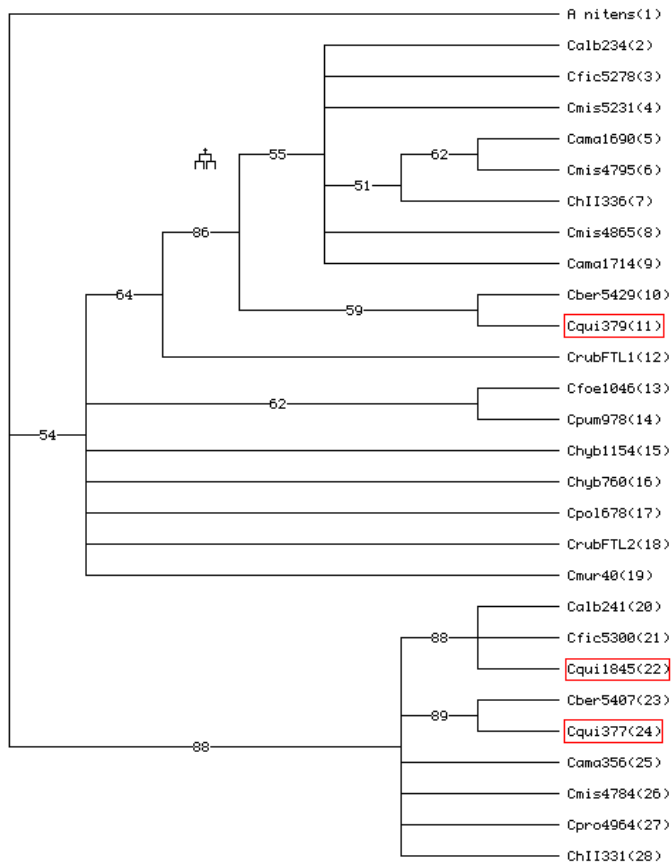
Pro ověření funkce *CrCOL1* genu byla cDNA *CrCOL1* o úplné délce umístěna za *35S* promotor (*35S::CrCOL1*) a tento konstrukt byl transformován do *co* mutantu N175 *A. thaliana* (Koornneef et al., 1991; Scholl et al., 2000). Ze semen těchto rostlin budou selektovány rostliny T1 generace linií transformantů *co35S::CrCOL1*.

5.6.3.3. Přenos *CrCOL2s* do *co* mutantu *A. thaliana*

Rostliny N175 (*co* mutanty) kvetly na dlouhém dni přibližně po 8 týdnech. Pro ověření funkce *CrCOL2s* genu byla cDNA *CrCOL2s* o úplné délce umístěna za *35S* promotor (*35S::CrCOL2s*) a tento konstrukt byl transformován do *co* mutantu N175 *A. thaliana* (Koornneef et al., 1991; Scholl et al., 2000). Byla získána T1 generace třinácti linií transformantů *co35S::CrCOL2s*. Linie byly označeny N175-CrCOL2s-1 až N175-CrCOL2s-13. Linie N175-CrCOL2s-1, -2, -4, -5, -6, -8, -9, -10, -11 začaly kvést po 24 dnech od vysetí, tedy zhruba o čtyři týdny dříve než rodičovské mutantní rostliny N175. To by naznačovalo komplementaci *co* mutace alternativně sestříženým transkriptem genu *CrCOL2* (*CrCOL2s*).

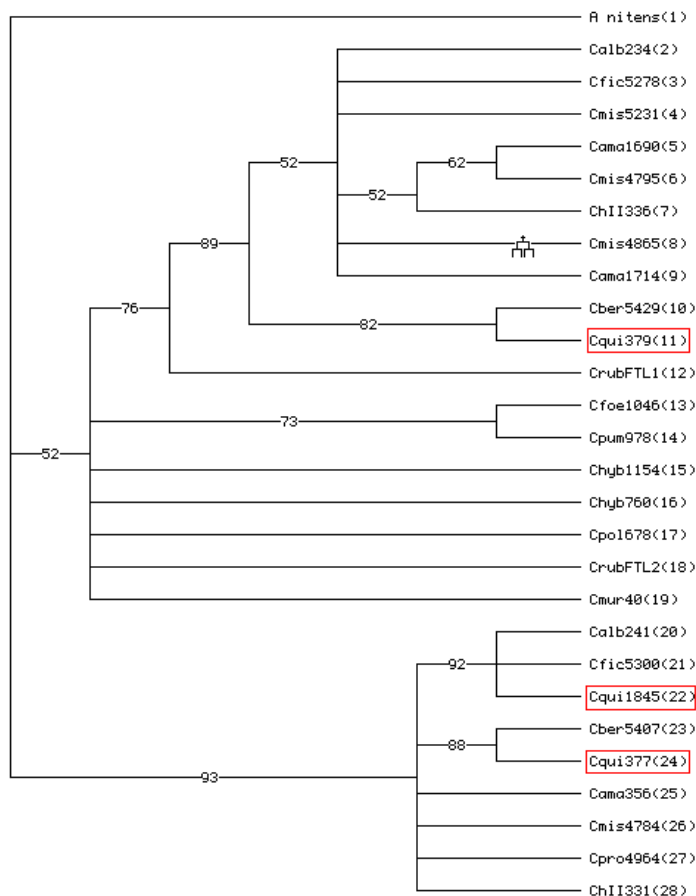
5.7. Využití třetího intronu *FTL* genů jakožto markeru pro fylogenetickou analýzu a určení původu jednotlivých genomických sad u rodu *Chenopodium*

Pro ověření možnosti využití části genomické sekvence *FTL* genů ke studiu příbuznosti druhů rodu *Chenopodium* byly získány a sekvenovány genomické fragmenty *FTL* genů z 13 druhů rodu *Chenopodium* a *Atriplex nitens*. Z každého z rostlinných druhů byly získány 1-3 PCR fragmenty *FTL* genů. Fragmenty sestávají z částí třetího a čtvrtého exonu (114 - 117 bp) a třetího intronu umístěného ve stejné pozici jako v *FTL A. thaliana*. Velikost



Obr. 53: Fylogenetický strom generovaný metodou ML ukazuje vzájemnou příbuznost *FTL* genů založenou na alignmentu 117 bp dlouhých částečných kódujících sekvencí třetího a čtvrtého exonu. Klon *Anit1637* z *Atriplex nitens* byl použit jakožto outgroup. Čísla u větví udávají podporu jednotlivých větví v procentech. Klony z *C. quinoa* jsou zvýrazněny v červeném rámečku.

Autor: Helena Štorchová;



Obr. 54: Fylogenetický strom generovaný metodou MP ukazuje vzájemnou příbuznost *FTL* genů založenou na alignmentu 117 bp dlouhých částečných kódujících sekvencí třetího a čtvrtého exonu. Klon *Anit1637* z *Atriplex nitens* byl použit jakožto outgroup. Čísla u větví udávají podporu jednotlivých větví v procentech. Klony z *C. quinoa* jsou zvýrazněny v červeném rámečku.

Autor: Helena Štorchová;

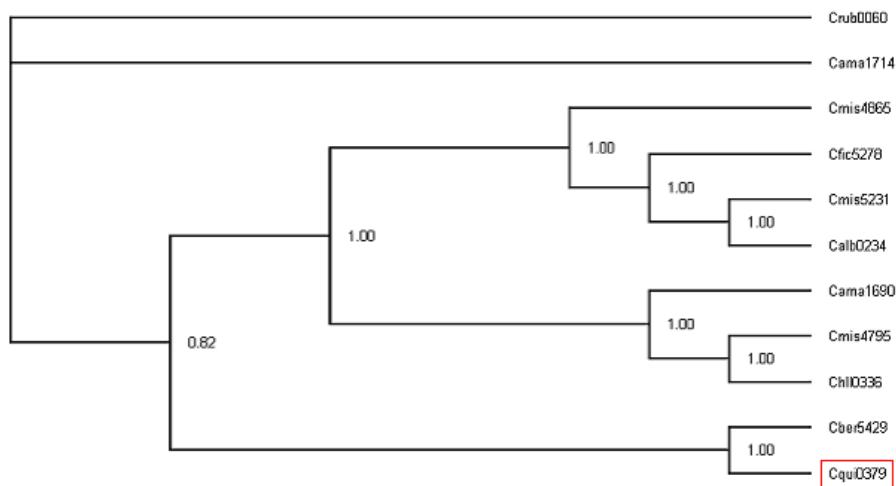
Fylogramy jsou informativní především pro druhy ze skupiny *C. album*. Podporují dva dobře odlišené shluky – větev *FTL234* a *FTL241*. Tyto větve zřejmě reprezentují *FTL* geny s mírně odlišnou funkcí. Naopak klony v témže shluku jsou pravděpodobně alely téhož genu, u polyploidních druhů indikují rodiče. *CrFTL1* tvoří dlouhou bazální větev klastru *Calb234*, což svědčí o jeho rychlé evoluci. Pro sekvence z ostatních zástupců rodu *Chenopodium* nejsou fylogramy rozlišené.

5.7.2. Fylogenetická analýza na základě sekvence nukleotidů třetího intronu *FTL* genů

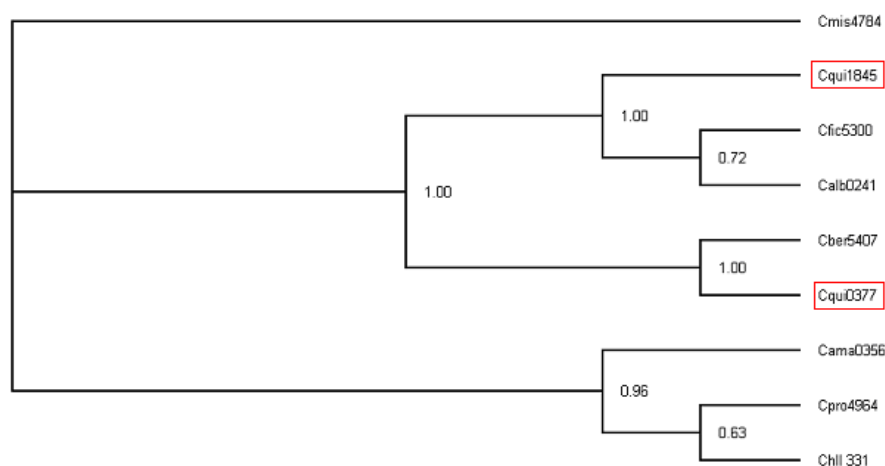
Třetí introny všech získaných *FTL* genů ze zástupců rodu *Chenopodium* nebylo možné srovnat pro jejich velkou sekvenční odlišnost. Byly proto analyzovány pouze některé skupiny intronů (alignments viz přílohy 27 a 28), především ze zástupců rodu *Chenopodium* příbuzných *C. album*. Z nich byly generovány fylogenetické stromy metodou MrBayes.

Fylogenetické stromy rozlišují sekvence do klastrů *Calb234* a *Calb241* s ještě vyšší podporou větví (obr. 55 a 56) než tomu bylo ve fylogramech založených na kódujících sekvencích *FTL* genů. Podobnost sekvencí intronů svědčí o příbuznosti příslušných genů, protože introny nejsou vystaveny selekčnímu tlaku a vyvíjí se mnohem rychleji než kódující sekvence (Hughes et al., 2006).

Naše fylogenetické stromy ukazují velmi blízkou příbuznost *C. berlandieri* a *C. quinoa*. To potvrzuje již dříve publikovaný předpoklad, že *C. berlandieri* je jedním ze dvou rodičovských druhů tetraploidního *C. quinoa*. K této informaci vedlo studium mikrosatelitních markerů *C. quinoa* a *C. berlandieri* (Mason et al., 2005). Naše fylogramy však přinášejí další, zcela novou informaci. Druhým rodičovským druhem *C. quinoa* je velmi pravděpodobně diploidní *C. album* ssp. *suecicum* nebo některý jemu blízký příbuzný druh. Námí nalezený molekulární marker (třetí intron *FTL* genů) se tak potvrdil být velmi dobře použitelným nástrojem pro porozumění původu polyploidních druhů merlíku.



Obr. 55: Fylogenetický strom generovaný metodou MrBayes ukazuje vzájemnou příbuznost *FTL* genů ze zástupců rodu *Chenopodium* příbuzných *C. album*. Analýza je založena na alignmentu nukleotidových sekvencí 3. intronu *FTL* genů podobných *Calb234*. Klon *CrubFTL1* (*Crub0060*) z *C. rubrum* byl použit jakožto outgroup. Klon z *C. quinoa* je zvýrazněn v červeném rámečku. Čísla u větví udávají pravděpodobnostní podporu (posterior probabilities) větví. Autor: Helena Štorchová;



Obr. 56: Fylogenetický strom generovaný metodou MrBayes ukazuje vzájemnou příbuznost *FTL* genů ze zástupců rodu *Chenopodium* příbuzných *C. album*. Analýza je založena na alignmentu nukleotidových sekvencí 3. intronu *FTL* genů podobných *Calb241*. Klon *Cmis4784* z *C. missouriense* byl použit jakožto outgroup. Klony z *C. quinoa* jsou zvýrazněny v červeném rámečku. Čísla u větví udávají pravděpodobnostní podporu (posterior probabilities) větví. Autor: Helena Štorchová;

5.7.3. Mitochondriální inserce ve třetím intronu *FTL-1845* genu *C. quinoa*

Třetí intron *FTL* genů izolovaných z *C. quinoa* (klon *Cqui1845*) a *C. album* ssp. *suecicum* (klon *Calb241*) se liší 573 bp dlouhou insercí v intronu *C. quinoa*. Pokud je tato

inserce vyloučena z alignmentu, sekvence obou intronů vykazují vysokou podobnost (96,2%). Inserce má výrazně vyšší obsah G+C (54,5%) než zbývající část intronu (35%). Na základě BLAST analýzy byla zjištěna podobnost inserce s mitochondriální (mt) DNA. Obrázek 57 ukazuje strukturu inserce, sestávající ze čtyř bloků, vysoce podobných (95 – 98%) k různým nekódujícím oblastem v mitochondriálním genomu *Beta vulgaris*, u níž je známa kompletní sekvence mt DNA. Dále obsahuje 82 bp dlouhý fragment z 82% podobný s mp1 mt plazmidem *C. album*. Inserce končí 23 bp dlouhým motivem sekvenčně shodným se sekvencí nalezenou v 5' UTR některých mitochondriálních genů mezi promotorem a start kodónem.

```

          1           A           43           B
acaagtgcatcatcatagactctcaattattaCGTCCTTTCTTTCTCTCGGCTCACCCCAACAAGATACGGCTCGGGCGGCAAGCAGGTGAATGTGATCTT
          89           C           131
GCCCTC TATCAGCCGGTGCGGGGAAAACATGAAAGCGGTCACTATACTAGAGGAGGGCATCCCCCGTGGGGTTGGGGGGTCCGCTTCCCT
CTTAATGTAGCTAATGTGGTTAATGTTGCTATCCGCCAGAAACATCATGGTAGAATAATCCTCCCCTGGCGAGTTGGACGGGGAAGGCAGA
          269           D
GGAAGCGGCTCCCCGGTGCCTTCGGTTCGGCTCTAGCGCTTATTCAATTAGCTGCCCTGCTCTTCTTTCTTTATTTCCCTCACTGAGCTCTCTCC
347   353           mp1
CCTCTGCCCCACGGGGGAGCACAGACACAGCGGAGGAGCGAAGCTACGACTTGTGAGTGAGAACTTGTTTCGAACGACGGCTGC
435
GTGAGCGCTCCTCATAGAACAAGAAGAACAATGAGGGGGGTACTCCCCCAGTGGAAAGACTGCGGATAGGGCTCAAATACCAGAATCAA
551
          5' conserved motif
GACATACTTGAATCACCAACCAAATCTAGAGGCTTGACGGAGTGAAGCttataactactaagttatttctac

```

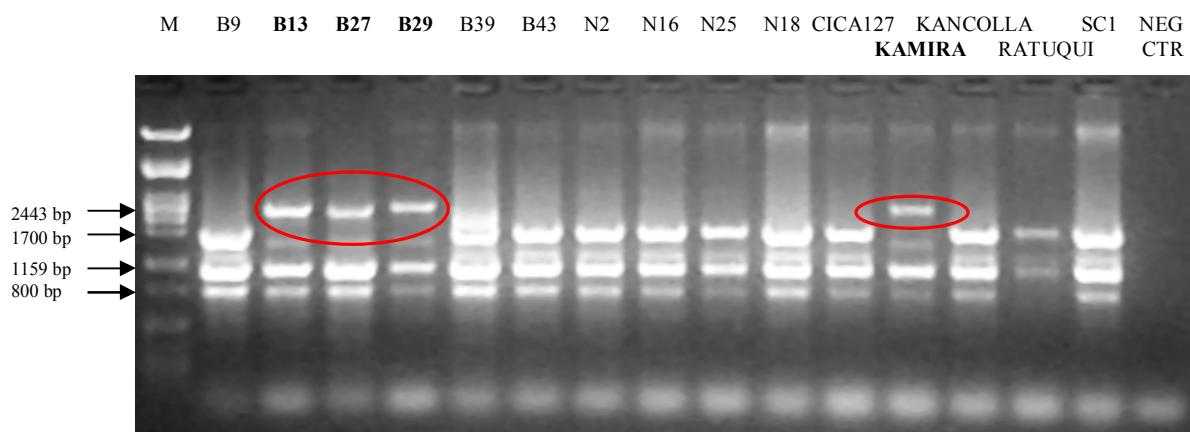
Obr. 57: Mozaiková struktura 573 bp dlouhé mitochondriální inserce ve třetím intronu *FTL-1845* genu *C. quinoa*. Mitochondriální DNA začíná pozicí 1, sekvence intronu je psána malými písmeny. Čísla označují začátek bloků podobnosti s mitochondriální DNA. A, B, C, D označují čtyři různé nekódující oblasti v mitochondriálním genomu *Beta vulgaris*. mp1 značí oblast podobnosti s mitochondriálním plazmidem mp1. Posledních 23 bp dlouhá oblast je nazývána „5' conserved motif“, protože se přesně shoduje se sekvencí nalezenou v 5' přiléhající oblasti některých mitochondriálních genů.

Vysoká sekvenční podobnost k mt genům *Beta vulgaris* (u *C. rubrum* není mt DNA známa) předpokládá nedávný původ mt inserce (Noutsos et al., 2005). Velmi vysoká podobnost *Cqui1845* a *Calb241*, která je vyšší než mezi *Cqui1845* a *Cqui377*, dvou intronů ze stejného rostlinného druhu spadajících do stejného shluku ukazuje na to, že diploidní *C. album* ssp. *suecicum* (nebo jeho blízký příbuzný druh) je jedním z rodičovských druhů tetraploidního *C. quinoa*. Znalost dvou blízkých příbuzných homologních jaderných sekvencí umožňuje přibližný časový odhad inserční události. Muselo se tak stát po divergenci *Cqui1845* a *Calb241*, ale zároveň před rozrůzněním jednotlivých kultivarů *C. quinoa*. Všechna osmnáct testovaných kultivarů *C. quinoa* - Amachuma, Faro, Ruzyně a 15 kultivarů amerických *C. quinoa* ze sbírek USDA a CIP-FAO (viz následující kapitola), totiž nesou tuto inserci. Vznik inserce mt DNA se pravděpodobně udál při vzniku *C. quinoa* v průběhu nového uspořádání mt DNA spojeného s polyploidizací.

5.7.4. Dlouhá inserce ve třetím intronu *FTL* genů *B13-L* a *B29-L* v *C. quinoa* z Bolivijských And

Po nalezení tří kopií *FTL* genů v *C. quinoa* byla navázána spolupráce s labortoří Dr. C. E. Colemana (Brigham Young University, Provo, Utah, USA), který se zabývá studiem genetické diverzity *C. quinoa* ze sbírek USDA a CIP-FAO (Christensen et al., 2007). Dr. Coleman nám laskavě poskytl semena 15 vybraných *C. quinoa* reprezentujících jihoamerické populace z nížin i Altiplana Bolívie a Peru, a dále zástupce z jižní Karoliny a Nového Mexika, USA (přehled viz tabulka 2, kapitola 4.2.2.) (Christensen et al., 2007).

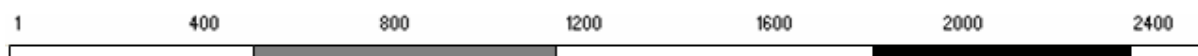
Genomická DNA těchto *C. quinoa* byla testována na přítomnost a počet *FTL* genů pomocí PCR. U některých *C. quinoa* (B13, B27, B29 a Kamira) byla pomocí PCR s primery CrFTL345for (zacílený do třetího exonu) a QuFT1845rev (zacílený do čtvrtého exonu, příloha 12, tabulka 3) nalezena místo *Cqui1845* jiná (delší) kopie *FTL* genu (obr. 58). Všechny tyto kultivary *C. quinoa* mají původ v Bolivijských jižních Andách.



Obr. 58: PCR s primery CrFTL345for a QuFT1845rev z genomické DNA amerických *C. quinoa*. U populací z jižních And v Bolívii (**B13, B27, B29, Kamira** - zvýrazněny tučným písmem) byl přítomen PCR fragment odpovídající novému *FTL* genu s dlouhou insercí (není mitochondriálního původu) ve 3. intronu (červeně zakroužkováno).

PCR fragment (část třetího exonu, třetí intron a část čtvrtého exonu) o délce cca 2,5 kb z *C. quinoa* B13 a B29 byl sekvenován (primery CrFTL345for, QuFT1845rev a vnitřními primery QuB13vnitr359For, B13vnitr46 a QuB13vnitr742Rev – tab. 3). Nově nalezené *FTL* geny byly pojmenovány *B13-L* a *B29-L* (*L* = long insertion, dlouhá inserce). Sekvenčně odpovídají *Cqui1845* a liší se od něj pouze přítomností 654 bp dlouhé inserce. Dlouhá inserce není homologní ke známým mt sekvencím ani kódujícím sekvencím. Původ dlouhé inserce bude zřejmě nedávný, protože je přítomna pouze v některých *C. quinoa* z vysokých

nadmořských výšek jižních And v Bolívii. Struktura třetího intronu *B29-L* je znázorněna na obrázku 59.



Obr. 59: Struktura třetího intronu genu *B29-L* z *C. quinoa* B29 z jižních And v Bolívii. Bílé bloky znázorňují intron, šedý blok dlouhou inserci (L= long insertion; 654 bp) a černý blok inserci mt DNA (573 bp). Čísla nad schématem udávají počet párů bází.

5.8. Získané *FTL*, *COL* a *LFY* sekvence byly vloženy do GenBank

FT-like, *CO-like* a *LFY* sekvence získané v této studii byly vloženy do databáze GenBank. Jejich přístupová čísla (accession numbers) jsou uvedena v tabulce 6.

Sekvence	GenBank accession number
Nukleotidové sekvence	
Kompletní kódující sekvence genů z <i>C. rubrum</i>	
<i>CrFTL1</i> , kompletní kódující sekvence	EU128013
<i>CrFTL2</i> , kompletní kódující sekvence	EF445636
<i>CrCOL1</i> , kompletní kódující sekvence	EU395770
<i>CrCOL2s</i> , kompletní kódující sekvence	EU395771
<i>CrFL</i> , kompletní kódující sekvence	EU410481
Genomické sekvence - část 3. exonu, 3. intron a část 4. exonu <i>FTL</i> genů a délka 3. intronu v bp	
<i>Calb234</i> : 1314	EF422341
<i>Calb241</i> : 1141	EF422351
<i>Cqui1845</i> : 1720	EF422349
<i>Cqui377</i> : 1027	EF422353
<i>Cqui379</i> : 779	EF422344
<i>Cgig356</i> : 1148	EF422343
<i>Cgig1690</i> : 1383	EF422357
<i>Cgig1714</i> : 1384	EF422348
<i>ChenII331</i> : 1148	EF422342
<i>ChenII336</i> : 1383	EF422352
<i>Cpol678</i> : 1275	EF422354
<i>Cmur40</i> : 1265	EF422340
<i>CrubFTL1</i> : 782	EF422350
<i>CrubFTL2</i> : 1088	EF422358
<i>Cschr1046</i> : 1753	EF422346
<i>Cpum978</i> : 1772	EF422355
<i>Chyb760</i> : 914	EF422345
<i>Chyb1154</i> : 1405	EF422356
<i>Anit1637</i> : 1548	EF422347
<i>Cmis4784</i> : 1151*	
<i>Cmis4795</i> : 1383*	
<i>Cmis4865</i> : 1324*	
<i>Cmis5231</i> : 1316*	
<i>Cpro4964</i> : 1143*	

Sekvence	GenBank accession number
<i>Cfic5278</i> : 1314*	
<i>Cfic5300</i> : 1128*	
<i>Cber5407</i> : 1020*	
<i>Cber5429</i> : 928*	
Aminokyselinové sekvence	
Odvozená kompletní sekvence CrFTL1 proteinu	ABV56568
Odvozená kompletní sekvence CrFTL2 proteinu	ABP02016
Odvozená kompletní sekvence CrCOL1 proteinu	ACB36911
Odvozená kompletní sekvence CrCOL2s proteinu	ACB36912
Odvozená kompletní sekvence CrFL proteinu	ABY91324
Odvozená částečná sekvence FTL proteinů kódovaných částí 3. a 4. exonu <i>FTL</i> genů	
Calb234	ABP81841
Calb241	ABP81851
Cqui1845	ABP81849
Cqui377	ABP81853
Cqui379	ABP81844
Cgig356	ABP81843
Cgig1690	ABP81857
Cgig1714	ABP81848
ChenII331	ABP81842
ChenII336	ABP81852
Cpol1678	ABP81854
Cmur40	ABP81840
CrubFTL1	ABP81850
CrubFTL2	ABP81858
Cschr1046	ABP81846
Cpum978	ABP81855
Chyb760	ABP81845
Chyb1154	ABP81856
Anit1637	ABP81847
Cmis4784*	
Cmis4795*	
Cmis4865*	
Cmis5231*	
Cpro4964*	
<i>Cfic5278</i> *	
<i>Cfic5300</i> *	
<i>Cber5407</i> *	
<i>Cber5429</i> *	

Tabulka 6: Sekvence získané v této práci a jejich přístupová čísla v databázi GenBank.

Anit – *Atriplex nitens*; *Calb* – *Chenopodium album* ssp. *suecicum*; *Cber* – *C. berlandieri*; *Cfic* – *C. ficifolium*; *Cgig* – *C. giganteum*; *ChenII* – *C. sp.* PRC400115; *Chyb* – *C. hybridum*; *Cmis* – *C. missouriense*; *Cmur* – *C. murale*; *Cpol* – *C. polyspermum*; *Cpro* – *C. probstii*; *Cpum* – *C. pumilio*; *Cqui* – *C. quinoa*; *Cr*, *Crub* – *C. rubrum*; *Cschr* – *C. schraderianum*; U genomických sekvencí části *FTL* genů (část 3. exonu, 3. intron a část 4. exonu) je za označím klonu uvedena délka 3. intronu v bp; *Sekvence byly odeslány do GenBank, přístupová čísla do databáze budou teprve obdržena.

5.9. Částečné sekvence dalších genů z *C. rubrum* a ostatních druhů rodu *Chenopodium*

Mimo sekvencí *CrFTL*, *CrCOL* a *CrFL* genů byly z *C. rubrum* a ostatních druhů rodu *Chenopodium* izolovány a identifikovány další sekvence odpovídající genům. Jejich přehled následuje v podkapitolách 5.9.1. a 5.9.2. Tyto sekvence postupně vkládáme do GenBank.

5.9.1. Expressed sequence tags (ESTs) z *C. rubrum*

V rámci PCR amplifikací při hledání sekvencí *CrFTL*, *CrCOL* a *CrFL* genů v cDNA knihovnách bylo zaklonováno a sekvenováno mnoho sekvencí, neodpovídajících *CrFTL*, *CrCOL* a *CrFL* genům. V mnoha případech šlo o částečné sekvence exprimovaných genů (tzv. ESTs). Jejich výčet je uveden v tabulce 7.

Plazmid a sekvenace ve směru for/rev	PCR primery	Velikost insertu bp	Sekvenční podobnost s
pDCH766 rev	ModifUNIVfor - CrFT345for	540	ABA40467, glycoprotein-like protein, ribozomal L14-like protein
pDCH857 for, rev	ModifUNIVfor - CrFT501rev	550	CAO40410, putative leucin rich protein
pDCH860 for	ModifUNIVfor - CrFT501rev	550	AAT94361, putative chalcone isomerase
pDCH866, 872 for	ModifUNIVfor - CrFT501rev	540	Hypotetický protein
pDCH870 for	ModifUNIVfor - CrFT501rev	580	CAC69138, MAP kinase kinase
pDCH876, 878, 910, 916 rev	ModifUNIVfor - CrFT501rev	700	AAD33868, Protodermal factor 1
pDCH909 rev	ModifUNIVfor - CrFT501rev	500	Hypotetický protein
pDCH925 rev	ModifUNIVfor - CrFT501rev	900	AAM22687, xyloglucan galactosyltransferase KATAMARI 1
pDCH1210, 1215 rev	5' PCR Primer II A - CrFT501rev	550	Q7XRA9, Fasta: Proline rich protein
pDCH1211 rev	5' PCR Primer II A - CrFT501rev	520	AAW82572, hypothetical protein, chloroplast 23S rRNA
pDCH1212 rev	5' PCR Primer II A - CrFT501rev	700	CAE02409, hypotetický protein
pDCH1238 rev	5' PCR Primer II A - CrFT501rev	1100	NP_173173, alanine aminotransferase
pDCH1242 rev	5' PCR Primer II A - CrFT501rev	500	BAE91897, glycine rich RNA binding protein
pDCH1987 rev	ModifUNIVfor – LFY200rev	300	NP_909883, putative inosine monophosphate dehydrogenase
pDCH2067 rev	ModifUNIVfor – LFY200rev	300	AJ489200, pol protein retrotranspozonu
pDCH 3174, 3177, 3197 for	M13rev(JL) - CrFT78for z PCR fragmentu M13rev (JL) - CrFT39for	500	CAA77084, alpha-N-acetylglucoamidase
pDCH 3735 rev	M13rev(JL) – CrFT83rev z PCR fragmentu M13rev (JL) – CrFT116rev	800	AJ313093, salt tolerance protein 2, <i>Beta vulgaris</i>

Plazmid a sekvenace ve směru for/rev	PCR primery	Velikost insertu bp	Sekvenční podobnost s
pDCH 4061, 4070 rev	M13rev(JL) – CrLFY171rev z PCR fragmentu M13rev (JL) – LFY456rev	600	CAA77084, N-acetylglucoamidase
pDCH 4122 for	M13rev-CrLFY171rev	900	CAQ43070, putative puroindoline b protein
pDCH 4190 for	M13rev(JL) – CrLFY171rev z PCR fragmentu M13rev (JL) – LFY456rev	750	Hypotetický protein
pDCH 4220 for	M13rev(JL) – CrLFY171rev z PCR fragmentu M13rev (JL) – LFY456rev	1000	AAK59662, putative isopropylmalate dehydratase, small subunit
pDCH 4221 for	M13rev(JL) – CrLFY171rev z PCR fragmentu M13rev (JL) – LFY456rev	900	BAE98420, glycin/prolin rich protein
pDCH 4230 for	M13rev(JL) – CrLFY171rev z PCR fragmentu M13rev (JL) – LFY456rev	850	Hypotetický protein
pDCH4608 for	M13rev(JL) - CrFT116 rev	550	CK438332, <i>Picea glauca</i> cDNA clone
pDCH4681 for, rev	CrFTL1-CrFTL1rev	600	ABM30199, sinaptobrevin-like
pDCH4706 for	CrFTL1-CrFTL1rev	550	ABF95097, putative eIF 4E
pCON60, 61, 64, 66, 68 for	M13rev(JL) - CrCON1508for	800	ABR92334, putative diene lactone hydrolase family protein
pChru131 for	SMART IV oligonucleotide		CAA63968, pom30, porin
pChru150, 157 for	SMART IV oligonucleotide		A55092, catalase (EC 1.11.1.6) CAT-2
pChru151 for	SMART IV oligonucleotide		AF078913, R30-33 metallothionein mRNA
pChru229 for	SMART IV oligonucleotide		AAG17877, suspensor-specific protein
pChru231 for	SMART IV oligonucleotide		AB221010, S-adenosyl-L-methionine synthetase, <i>Beta vulgaris</i>
pChru276, 279 rev	SMART IV oligonucleotide		ABD32162, IS4 transposase
pChru280 rev	SMART IV oligonucleotide		BAD35713, sterol carrier protein 2-like (SCP-2)
pChru290 rev	SMART IV oligonucleotide		Z98202, CQCHLOR1 - <i>C. quinoa</i> partial chloroplast genome

Tabulka 7: Sekvence ESTs z cDNA knihovny *C. rubrum*. Všechny sekvence jsou zaklonovány v pGEM-T Easy vektoru. Velikost insertu je uvedena pouze přibližně a byla odhadnuta ze štěpení plazmidu enzymem EcoRI. Sekvenční podobnost byla zjišťována v programu TAIR BLAST 2.2.8 (www.arabidopsis.org/Blast); ModifUNIVfor = Modified universal primer; pChru jsou označeny plazmidy, které vznikly transformací „univerzální“ cDNA knihovny do *E. coli* XL-1 Blue a izolací plazmidů z jednotlivých klonů *E. coli*. Nebyly štípány enzymem EcoRI, proto v tabulce není uvedena jejich přibližná délka.

5.9.2. Genomické sekvence genů izolované ze zástupců rodu *Chenopodium*

Z genomické DNA několika zástupců rodu *Chenopodium* byly získány sekvence podobné některým známým genům. Jejich přehled je v tabulce 8.

DNA z druhu	Plazmid a sekvenace ve směru for/rev	PCR primery	Velikost insertu bp	Sekvenční podobnost s
<i>C. murale</i>	pDCH91 for	LFY800 for - LFY 456 rev	230	AAT93995, putative nucleotide excision repair protein XP-D, pentatricopeptide
<i>C. rubrum</i>	pDCH3866 rev	CrFT787-110for – CrFT787-309rev	200	CAQ43070, putative puroindoline b protein
<i>C. rubrum</i>	pDCH4020 for, rev	CrFT787-110for – CrFT787-309rev	1000	ABA93603, hAT family dimerisation domain containing protein; AAL79684, putative transposase
<i>C. missouri-ense</i>	pDCH4838 rev	CrFTfor345 - CrFTrev501	1200	EAZ02052, Hypotetický protein
<i>C. probstii</i>	pDCH4940,5 rev	CrFTfor345 - CrFTrev501	1200	EAZ02052, Hypotetický protein
<i>C. rubrum</i>	pCON45 for	CON DEG94F - CON DEG307R	1500	BAB40833, Reverse transcriptase, <i>Spinacea oleracea</i>

Tabulka 8: Genomické sekvence z DNA *C. rubrum* a dalších zástupců rodu *Chenopodium*. Všechny sekvence jsou zaklonovány v pGEM-T Easy vektoru. Velikost insertu je uvedena pouze přibližně a byla odhadnuta ze štěpení plazmidu enzymem EcoRI. Sekvenční podobnost byla zjišťována v programu TAIR BLAST 2.2.8 (www.arabidopsis.org/Blast);

6. DISKUSE

Fotoperiodická indukce kvetení u modelových krátkodenních a dlouhodenních rostlin je v současné době předmětem intenzivního výzkumu rostlinné molekulární biologie. Byla objasněna funkce a částečně též vzájemné vztahy některých klíčových genů účastnících se tohoto procesu u dlouhodenní *A. thaliana* a krátkodenní rýže a *Pharbitis nil*. Vzhledem k rozmanitosti mechanismů působících v rámci fotoperiodické indukce kvetení především u krátkodenních rostlin je potřeba rozšířit studium o další vhodné modelové rostliny, jejichž fyziologie kvetení je dobře známa.

Jednou z takových rostlin je krátkodenní *Chenopodium rubrum* (ekotyp 374). *C. rubrum* bylo používáno ke studiu kvetení po několik desetiletí (Cumming et al., 1965; Seidlová a Krekule, 1973; Ullmann et al., 1985). Po celou dobu studia kvetení této rostliny pohledem fyziologů nebyly známy žádné geny účastnící se procesu fotoperiodické indukce kvetení. Až v poslední době byla identifikována částečná sekvence *CrFL* (Veit et al., 2004), ortologu *LFY* z *A. thaliana*. V rámci práce na této disertaci jsme se zaměřili na identifikaci dalších genů účinkujících v signální dráze indukce kvetení závislé na fotoperiodě, homologů *FT* a *CO*. Mimo to se naším cílem stalo i na získání úplné kódující sekvence *CrFL*. Využili jsme také qPCR, abychom zjistili průběh transkripce všech nově identifikovaných genů za proměnlivých délek dne a noci, za různých podmínek, které vedou či nevedou k indukcí kvetení.

6.1. *CrFTL1* z *C. rubrum* je ortologem *FT* z *A. thaliana*; *CrFTL2* je gen s neznámou funkcí

Identifikovali jsme úplné sekvence kódující oblasti dvou *FT* homologů - *CrFTL1* a *CrFTL2*. Jejich sekvence je podobná genu *FT* z dlouhodenní *A. thaliana*. Navzájem se poněkud liší nukleotidovou (i aminokyselinovou) sekvencí a expresními profily. Podrobná analýza jejich exprese pomocí qPCR prokázala zcela odlišnou regulaci transkripce u obou genů.

Expese *CrFTL1* se za induktivního světelného režimu 12 hod tma/12 hod světlo vyznačovala diurnální rytmitou s maximem kolem poledne. Naproti tomu v dlouhodenní *A. thaliana* vykazuje *FT* exprese diurnální profil s maximem na konci dlouhého dne (Suarez-Lopez et al., 2001; Yamaguchi et al., 2005). Maximum transkripce *Hd3a*, *FT* ortologu

v krátkodenní rýži je za úsvitu a následně hladiny transkriptu postupně během krátkého dne klesají (Kojima et al., 2002). Expres *FT* ortologů *PnFT1* a *PnFT2* ve *Pharbitis nil* oscilují v diurnálním rytmu s maximem po úsvitu (Hayama et al., 2007). Fáze rytmické exprese jsou tedy nejpodobnější u krátkodenní rýže a *Pharbitis nil*. Jelikož je *CrFTL1* exprimováno s maximem uprostřed dne (Cháb et al., 2008), odlišuje se tím jak od průběhu exprese *FT* v *A. thaliana*, tak od fáze exprese *FT* ortologů v rýži a *Pharbitis nil*.

Pokud byla první fáze tmy následována stálým světlem, došlo k výraznému utlumení exprese *CrFTL1*. Střídání fáze tmy a světla je tedy pro udržení exprese tohoto genu nezbytná (Cháb et al., 2008). Stejně je tomu i u rýže a *Pharbitis nil* (Kojima et al., 2002; Hayama et al., 2007).

Transkripce *CrFTL1* byla vysoce indukována tmou o délce 12 hodin, částečně též tmou trvající 6 hodin. Naproti tomu 4 hodiny tmy nebyly dostatečné pro tvorbu transkriptu. Úroveň transkripce *CrFTL1* korelovala s účinností indukce kvetení pro danou délku tmy (Cháb et al., 2008), což nasvědčuje, že by *CrFTL1* mohl být skutečným ortologem *FT*.

Za stálé tmy je exprese *CrFTL1* rytmická s velmi nízkou amplitudou (Cháb et al., 2008). V tom se liší od exprese *FT* ortologů v rýži a ve *Pharbitis nil*. Ve *Pharbitis* je amplituda exprese *FT* homologů za stálé tmy vyšší než za stálého světla (Hayama et al., 2007). Naše výsledky ukazují, že přesun semenáčků ze stálého světla do stálé tmy mění arytmičtý průběh exprese *CrFTL1* na rytmický. Nedochozí však k tvorbě dostatečně vysokých hladin transkriptu, potřebných k vyvolání indukce kvetení. K dosažení těchto hladin je zapotřebí následné fáze světla, tedy střídání induktivní fáze tmy a světla. Naše pozorování ukazují, že pro tvorbu dostatečného množství *CrFTL1* transkriptu je zapotřebí 1) induktivní fáze tmy a 2) světlo po jejím skončení (Cháb et al., 2008). Těmito požadavky se *CrFT* liší od svých protějšků u jiných rostlinných druhů. Je to jeden z nejzásadnějších poznatků, ke kterým jsme dospěli. K objasnění regulace kvetení u *C. rubrum* významně přispěje identifikace genů, které jsou za aktivaci *CrFTI* světlem i tmou odpovědné. Mohou to být ortology *CO*, ale i zcela jiné geny.

Stejně jako u studovaných modelových krátkodenních rostlin rýže a *Pharbitis nil* (Ishikawa et al., 2005; Hayama et al., 2007) je kvetení *C. rubrum* inhibováno aplikací night-break (NB). Ten zároveň inhiboval expresi *CrFTL1*. Zajímavé je, že po vrácení rostlin na světlo po aplikaci NB v rámci 12 hod trvající tmy došlo ke slabé aktivaci genu. Stejně tomu bylo i u varianty s NB v rámci 18 hod trvající tmy. Tato aktivace *CrFTL1* genu byla tedy řízena přesunem na světlo a ne časem od přesunu do tmy nebo časem od aplikace NB. To je ve shodě s předpokládaným aktivačním efektem světla na expresi *CrFTL1*. Po aplikaci NB

byl aktivační efekt induktivní fáze tmy zrušen a na světle došlo pouze k nízké aktivaci exprese *CrFTL1* (Cháb et al., 2008).

Ve všech experimentech korelovaly vysoké hladiny *CrFTL1* mRNA s indukcí kvetení, nízká exprese byla naměřena v rostlinách, které nekvetly (Cháb et al., 2008). Na základě těchto pozorování usuzujeme, že *CrFTL1* by v *C. rubrum* mohl plnit funkci jednoho z aktivátorů kvetení. Taktéž předběžné výsledky z přenosu *CrFTL1* cDNA pod 35S promotorem do *ft* mutantu *A. thaliana* prokazují skutečnou ortologii *CrFTL1* k *FT* genu z *A. thaliana* (Štorchová et al., v přípravě). Zkoumání transformovaných rostlin *A. thaliana* T2 generace prokázalo dramatické urychlení kvetení zhruba o pět týdnů oproti rodičovským *ft* mutantům.

Ve studovaných modelových rostlinách bylo identifikováno více induktorů kvetení, např. *TSF* v *A. thaliana* (Kobayashi et al., 1999) a *OsFTL1* v rýži (Doi et al., 2004). Jejich role v indukci kvetení však není prozatím zcela zřejmá. V genomu *C. rubrum* byla Southernovou hybridizací ověřena přítomnost dvou kopií *CrFTL1*, odlišných od *CrFTL2*. Identifikovali jsme též jejich genomické sekvence, pojmenované *CrFTL1a* a *CrFTL1b*. Genomická *CrFTL1a* sekvenčně odpovídá *CrFTL1*. Domníváme se, že díky téměř identické sekvenční podobnosti kódujících oblastí *CrFTL1a* a *CrFTL1b* jsme v rámci qPCR měřili expresi obou těchto genů. O rozlišení jejich cDNA se pokusíme v budoucnu pomocí PCR primerů zacílených do UTR (Štorchová et al., v přípravě). Odlišnost v expresi obou genů by mohla ukazovat specifickou roli každého z nich v indukci kvetení za různých podmínek, např. za různé teploty, jak je tomu třeba u *FT* a *TSF* v *A. thaliana* (Kobayashi et al., 1999). Téměř úplná totožnost sekvencí kódujících úseků *CrFTL1a* a *CrFTL1b* a blízká podobnost jejich intronů však naznačuje, že tyto kopie mohou pocházet od rodičů tetraploidního *C. rubrum* a jejich role se zřejmě překrývá.

Nevíme dosud, kolik je celkem v *C. rubrum* *FT-like* genů a kolik z nich je v roli aktivátorů kvetení. Pro zodpovězení těchto otázek je potřeba dalšího molekulárně biologického studia fotoperiodické indukce kvetení u *C. rubrum*.

Přes jistou podobnost indukce kvetení v krátkodenní rýži a *Pharbitis nil*, exprese *PnFT* ve *Pharbitis* je regulována jiným mechanismem než exprese *Hd3a* v rýži. Toto zjištění vedlo k hypotéze, že indukce kvetení v krátkodenních rostlinách je řízeno různými mechanismy (Hayama et al., 2007). Naše výsledky (zvláště velmi nízká exprese *CrFTL1* za stálé tmy v semenáčcích *C. rubrum*) tuto hypotézu podporují (Cháb et al., 2008).

Druhý *FT* homolog, *CrFTL2* z *C. rubrum* vykazoval za všech studovaných fotoperiodických režimů stálou hladinu exprese srovnatelnou s maximálními hodnotami transkripce genu *CrFTL1*. To naznačuje jeho neúčast při fotoperiodické indukci kvetení za studovaných podmínek. Exprese *CrFTL2* v listech 15-ti denních rostlin byla 2-3x nižší, než exprese v semenáčcích (Cháb et al., 2008). Zdá se tedy, že je *CrFTL2* exprimován rozdílně v závislosti na vývojovém stádiu rostliny. V jeho kódující sekvenci se nacházejí substituce vedoucí k záměnám velmi konzervovaných aminokyselin, které jsou nezbytně důležité pro funkci *FT* ortologů napříč krytosemennými rostlinami (Ahn et al., 2006). Oproti dalším genům *FT/TFL1* rodiny se v sekvenci *CrFTL2* nalézají předčasný stop kodón na 3' konci a odlišná sekvence na 5' konci jeho kódující oblasti. Jedná se proto buď o gen s jinou funkcí než *FT*, anebo o pseudogen. Vysoká hladina exprese *CrFTL2* (rozdílná v semenáčcích a 15-ti denních rostlinách), zachovaný čtecí rámeček a přesný sestřih intronu svědčí pro první možnost, tedy funkční gen s dosud neznámou funkcí (Cháb et al., 2008). Více napoví analýza transformovaných rostlin *A. thaliana*, nesoucích tento gen pod kontrolou 35S promotoru.

6.2. *CO* homology v *C. rubrum* podléhají alternativnímu sestřihu; fáze tmy má stimulační efekt a vliv světla inhibiční efekt na tvorbu *CrCOL* mRNA

Gen *FT* je v *A. thaliana* aktivován prostřednictvím *CONSTANS (CO)* (Putterill et al., 1995; Samach et al., 2000). V rýži *Hd1* (Yano et al., 2000), ortolog *CO*, působí na *Hd3a*, ortolog *FT*, dvojnásobně – jako aktivátor za induktivní a jako inhibitor za neinduktivní fotoperiody (Kojima et al., 2002; Hayama et al., 2003). U *Pharbitis nil* neřídí expresi *PnFT1* a *PnFT2* (ortology *FT*) *PnCO* (ortolog *CO*), ale jiný hypotetický gen, řízený vnitřními hodinami (clock-controlled gene, CCG) (Hayama et al., 2007). Abychom objasnili regulaci *CrFTL1* exprese, identifikovali jsme homology *CO* v *C. rubrum*.

Nalezli jsme úplné kódující sekvence dvou genů (*CrCOL1* a *CrCOL2*) (Cháb et al., v přípravě) sekvencně blízce příbuzných genům *CO*, *COL1* a *COL2* z *A. thaliana*. Pro oba *COL* geny jsme našli cDNA s alternativně vystřiženým úsekem o délce 90 bp (*CrCOL1s*) a 87 bp (*CrCOL2s*). Alternativní sestřih u *CO* homologů byl popsán také u *PnCO* ve *Pharbitis nil*. Alternativně sestřihována sekvence zde odpovídá intronu, umístěnému v konzervované pozici mezi prvním a druhým exonem. Byly nalezeny tři formy transkriptů – 1) sestřižená forma bez intronu a dále 2) forma s úplným a 3) neúplným intronem v konzervované pozici. Obě formy s intronem však mají pozměněný čtecí rámeček a introny

vnášejí do sekvence předčasné stop kodóny (Liu et al., 2001). Situace u *COL* transkriptů v *C. rubrum* je odlišná. Alternativně sestřihovaná oblast odpovídá části prvního exonu *CrCOL* sekvence, ve které je intron v konzervativní pozici mezi prvním a druhým exonem zcela a správně sestřižen.

Role alternativního sestřihu u *COL* genů *C. rubrum* není zatím známa. Transkripční profily všech čtyř *CrCOL* forem byly za všech studovaných fotoperiodických podmínek v podstatě identické a mírně se lišily jen výškami hladin mRNA. Důkaz o efektu alternativního sestřihu na funkci *CrCOL* genů a také odpověď na otázku, zda mají *CrCOL1* a *CrCOL2s* stejnou funkci jako *CO* v *A. thaliana*, přinesou probíhající pokusy s přenosem těchto genů do standardního genotypu a do *co* mutantu *A. thaliana* (Cháb et al., v přípravě).

V *A. thaliana* podléhá transkripce *CO* za induktivní fotoperiody cirkadiánnímu rytmu s maximem na konci dne a v noci (Suarez-Lopez et al., 2001), dostatečné množství *CO* proteinu pak aktivuje transkripci *FT* s maximem na konci dne. Maximum exprese *COL1* a *COL2* je za úsvitu (Ledger et al., 2001). V rýži je za krátkého dne *CO* ortolog *Hdl* transkribován s maximem v druhé půli noci (Yano et al., 2000; Kojima et al., 2002). *Hdl* protein syntetizovaný za tmy pak aktivuje transkripci *Hd3a* s maximem za úsvitu. Ve *Pharbitis nil* je *CO* ortolog *PnCO* transkribován rytmicky za tmy, pokud její délka trvá alespoň 14 hodin. *PnCO* však není aktivátorem transkripce *PnFT* (Liu et al., 2001; Hayama et al., 2007).

U *C. rubrum* se za induktivního světelného režimu (12 hod tma/12 hod světlo) geny *CrCOL* vyznačují cirkadiánní expresí s maximem na konci noci. Pokud je aplikována pouze jedna induktivní fáze 12-hodinové tmy, rytmus přetrvává i na stálém světle, avšak s menší amplitudou. V krátkodenní rýži a v kukuřici (k fotoperiodě neutrální rostlina) taktéž přetrvává rytmická exprese *Hdl* a *conz1* (homologu *CO*) na stálém světle po aplikaci jedné tmy. Oproti *CrCOL* však amplituda rytmu exprese *Hdl* a *conz1* zůstává nadále vysoká (Shin et al., 2004; Miller et al., 2008). Stejně jako v *A. thaliana*, rýži a *Pharbitis nil* jsou i v *C. rubrum* *COL* geny vysoce transkribovány v noci. U *CrCOL* genů *C. rubrum* však existují dvě zvláštnosti: 1) potřeba fáze tmy pro tvorbu mRNA, 2) inhibiční vliv světla na transkripci *CrCOL* (Cháb et al., v přípravě). Takovýto vliv světla na transkripci studovaných *COL* genů v *A. thaliana*, rýži a *Pharbitis nil* nebyl popsán. Rytmicita exprese *CrCOL* je tedy podpořena pravidelným střídáním fáze světla a tmy.

Za stálé tmy podléhají transkripce *PnCO* a *CrCOL* cirkadiánnímu rytmu s vysokými hladinami mRNA. První maximum *PnCO* mRNA je po 14 - 16 hodinách po přesunu do tmy, u *CrCOL* mRNA po 9 hodinách. Stejně jako v případě *PnCO* a *PnFT* u *Pharbitis nil* naše

výsledky naznačují poněkud odlišnou regulaci rytmické exprese *CrCOL* a *CrFTL1* v *C. rubrum* (Hayama et al., 2007; Cháb et al., v přípravě).

Shodně s *CO* ortology v krátkodenní rýži a *Pharbitis nil* nebyl zaznamenán vliv aplikace night-break na expresi *CrCOL* genů v *C. rubrum* (Liu et al., 2001; Ishikawa et al., 2005; Hayama et al., 2007; Cháb et al., v přípravě).

Posun fází rytmů exprese *COL* a *FT* homologů u *C. rubrum* je jiný než u *A. thaliana*, rýže a *Pharbitis nil*. Maxima *CrCOL* za tmy odpovídají zhruba minimům *CrFTL1*. Naopak minima *CrCOL* za světla odpovídají maximům *CrFTL1*. Je však třeba říci, že prozatím nevíme, zda je některá z identifikovaných forem *CrCOL* pravým ortologem *CO*. Navíc není zřejmé, zda *CO* ortolog v *C. rubrum* vůbec existuje. Pokud je přítomen, je možná i jeho neúčast na fotoperiodické indukci kvetení, jak je tomu např. u *Pharbitis nil* (Liu et al., 2001; Hayama et al., 2007).

6.3. Chybí merlíkům druhý intron vysoce konzervovaného *LFY* genu?

LFY je v *A. thaliana* důležitý integrátor signálů z drah ovlivňujících indukci kvetení. Je transkripčním faktorem zahajujícím expresi genů určujících tvorbu květních orgánů (Weigel et al., 1992). Ve spolupráci s laboratoří Dr. E. Wagnera (University of Freiburg, Německo) se nám na základě již známé částečné kódující sekvence *CrFL* (Veit et al., 2004) podařilo získat úplnou kódující sekvenci *CrFL* (Prusinska et al., v přípravě), *LFY* ortologu v *C. rubrum*. *CrFL* je zodpovědný za přechod z vegetativní do generativní fáze (Veit et al., 2004). Za induktivního světelného režimu 12 hod tma/12 hod světlo začíná exprese *CrFL* růst asi 30 hodin po konci první fáze tmy. To je několik hodin poté, co v *C. rubrum* květní stimulus (florigen) dosahuje vzrostného vrcholu (King, 1972). Zvýšené hladiny *CrFL* korelují s vysokými hladinami *CrFTL1* a vysokým stupněm indukce kvetení.

LFY je v rámci vyšších rostlin vysoce konzervovaný gen, zastoupený v genomu běžně jedinou kopií (Maizel et al., 2005). Byly však nalezeny i některé druhy rostlin, jejichž genom obsahuje více kopií tohoto genu (Mouradov et al., 1998; Southerton et al., 1998; Wada et al., 2002). Tak je tomu i v případě *C. bonus henricus* (druhu blízce příbuznému špenátu). V genomu *C. bonus henricus* byly nalezeny dvě částečné *LFY-like* sekvence, z nichž jedna neobsahuje druhý intron. Naše výsledky poukazují na existenci tří kopií *LFY-like* genu v *C. rubrum*, z nichž alespoň jedna taktéž postrádá druhý intron. Ten je u všech doposud identifikovaných *LFY* genů přítomen a umístěn v konzervované pozici (Maizel et al., 2005).

Absence druhého intronu *LFY* genu u vyšších rostlin dosud nebyla popsána. Ztráta druhého intronu *LFY* u *C. rubrum* a *C. bonus henricus* je s ohledem na vysokou strukturní konzervovanost *LFY* genů velice zajímavá a bude dále studována.

Naše práce rozšířila vzhled do složité problematiky vzájemných vztahů genů účastnících se fotoperiodické indukce kvetení. Svými výsledky potvrdila variabilitu mechanismů účinkujících v rámci tohoto procesu u krátkodenních rostlin (Hayama et al., 2007; Cháb et al., 2008). V současné době byla ve spolupracující laboratoři Dr. E. Wagnera vyvinuta metoda transformace *C. rubrum* (Veit et al., 2006). To otevírá široké možnosti mnohem detailnějšimu studiu funkcí a vzájemných vztahů nově identifikovaných homologů *FT*, *CO* a *LFY* přímo v *C. rubrum*. Také přenos již známých ortologů *FT*, *CO* a *LFY* ze studovaných modelových rostlin do *C. rubrum* by mohl přinést další významné informace. Tím se krátkodenní *C. rubrum*, ekotyp 374, v rámci studia fotoperiodické indukce kvetení stává významnou modelovou rostlinou srovnatelnou s rýží nebo *Pharbitis nil*.

6.4. Třetí intron *FTL* genů - nový molekulární marker, využitelný zejména pro fylogenetické studium druhů z okruhu *C. album*.

Kromě identifikace kódující sekvence homologů *FT* genů u *C. rubrum* jsme se zaměřili též na získání genomických sekvencí *FTL* genů (včetně intronů) u 13 druhů rodu *Chenopodium* a *Atriplex nitens*. Analýza částečné genomické sekvence 27 různých kopií *FTL* genů prokázala využitelnost třetího intronu *FT* genu pro stanovení fylogenetické příbuznosti druhů merlíku zejména ze skupiny *C. album* (Cháb et al., předkládáno). Tato skupina je velmi komplexní a vzájemné vztahy jednotlivých druhů jsou nejasné (Rahiminejad a Gornall, 2004; Maughan et al., 2006). Aplikace námi nově nalezeného molekulárního markeru je ve shodě se současnou strategií hledání rodově specifických jaderných markerů namísto „univerzálních“ genů použitelných pro kterýkoli druh (Hughes et al., 2006).

Jedním z druhů, jejichž původ nám sekvence třetího intronu *FTL* genů pomohla odhalit je i *C. quinoa*, významná zemědělská plodina Jižní Ameriky (Partap et al., 1998). *C. quinoa* je fakultativně krátkodenní rostlina (Bertero et al. 1999; Bertero 2003) a svou odpovědí na fotoperiodu se tedy podobá *C. rubrum*. *C. quinoa* pochází z jihoamerických And a je vysoce tolerantní k mrazu, suchu a zasolení, což jsou z agronomického hlediska velmi význačné vlastnosti. Význam *C. quinoa* v tomto ohledu vzrůstá především v souvislosti

s globálním oteplováním a nepředvídatelným počasím. Semena *C. quinoa* jsou nutričně velmi hodnotná – zejména pro vysoký obsah proteinů a vyvážené zastoupení všech esenciálních aminokyselin. Obsahuje hodně minerálů - dokonce více než ostatní tradiční obiloviny. Významný je též obsah fytoestrogenů, látek s potenciálem při léčbě osteoporózy, rakoviny prsu a srdečních chorob. Potraviny z *C. quinoa* jsou dobře stravitelné a mohly by být dobrou náhražkou masa a mléka (Rojas et al., 2004). V Evropě se *C. quinoa* používá jako tzv. pseudoobilovina pro bezlepkovou dietu a jako léčivá rostlina.

Sekvence třetího intronu *FTL* genů potvrdily, že *C. berlandieri* je jedním ze dvou rodičovských druhů tetraploidního *C. quinoa*. Toto bylo předpokládáno již dříve na základě studia mikrosatelitních markerů *C. quinoa* a *C. berlandieri* (Mason et al., 2005). Naše výsledky naznačují, že diploidní *C. album* ssp. *suecicum* nebo některý jemu blízký příbuzný druh je velmi pravděpodobně druhým rodičovským druhem *C. quinoa*. Ten nebyl dosud znám. Třetí intron *FTL* genů se ukázal být velmi dobře použitelným nástrojem zejména pro rozluštění původu polyploidních druhů merlíku.

U *C. quinoa* byl také objeven přenos kusu mitochondriální (mt) DNA (přes 500 bp) do třetího intronu *FTL* genu (Cháb et al., předkládáno). Vysoká podobnost inserce k mt DNA *Beta vulgaris* (mt sekvence *C. rubrum* není k dispozici) naznačuje, že se přenos udál poměrně nedávno (Leister, 2005; Noutsos et al., 2005). To, stejně jako mozaiková struktura inserce, je ve shodě s hypotézou přestavby mt DNA po setkání genomů rodičovských druhů (Noutsos et al., 2005). V některých *C. quinoa* z Bolivijských jižních And byl nalezen *FTL* gen sekvenčně totožný s *FTL-1845*, který navíc ve třetím intronu obsahuje další dlouhou (cca 650 bp) inserci (Cháb et al., předkládáno). Ta však není mitochondriálního původu. Vzhledem k tomu, že se tato druhá inserce nachází jen u omezeného souboru bolivijských populací, je zřejmé, že k inserci dlouhého fragmentu do třetího intronu *FTL* genu došlo později, než k přenosu mt DNA.

6.5. Přínos našeho studia

Naše studium molekulárních základů kvetení bylo zaměřeno hlavně na krátkodenní *C. rubrum* (ekotyp 374). Tato silně nitrofilní rostlina je v našem regionu považována za plevel. V posledních letech je v naší přírodě čím dále vzácnější. Význam studia kvetení u této rostliny je však větší, než je na první pohled zřejmé a to z následujících důvodů. 1) Fyziologie kvetení tohoto druhu je dobře prostudována. 2) U pětidenních semenáčků *C. rubrum* lze

vyvolat kvetení pouhou jednou indukční tmou. To by mohla být adaptace na okolní podmínky, neboť se jedná o pionýrskou rostlinu, obsazující disturbovaná stanoviště. Musí vykvést dříve, než vyklíčí a vyrostou druhy pozdějších sukcesních stádií. Regulace časného kvetení je dosud neprobádaná. 3) *C. rubrum* je příbuzné několika zemědělsky významným druhům - *C. quinoa*, řepě cukrovce a špenátu.

Naše výsledky přímo či nepřímo přispívají k pochopení problémů v následujících oblastech výzkumu.

- 1) Rozšiřují vzhled do problematiky vzájemných vztahů genů, účastnících se fotoperiodické indukce kvetení u krátkodenních rostlin.
- 2) Přináší základ pro další studium funkce genů účastnících se fotoperiodické indukce kvetení s ohledem na vývojové stádium rostliny.
- 3) S využitím námi navržených PCR primerů, optimalizovaných postupů a metod naše výsledky výrazně usnadňují identifikaci úplné kódující sekvence genů regulujících kvetení u zemědělsky významných *C. quinoa*, řepy cukrovky nebo špenátu. To přispěje k dalšímu využití těchto rostlin v zemědělství. Přirozenou cestou se tak naše výsledky stávají prakticky využitelnými.

7. ZÁVĚRY

- 1) Identifikovali jsme homology genů *CONSTANS (CO)* a *FLOWERING LOCUS T (FT)* (z *Arabidopsis thaliana*) účastnících se fotoperiodické indukce kvetení v *C. rubrum* (ekotyp 374). Nalezli jsme úplné kódující sekvence dvou *COL* genů *CrCOL1* a *CrCOL2*, dvou homologů *FT* genu *CrFTL1* (ve dvou pravděpodobně alelických formách *CrFTL1a* a *CrFTL1b*) a *CrFTL2* a již známého ortologu *LEAFY (LFY)* – *CrFL*. V genomu *C. rubrum* jsme našli tři kopie *CrFL*-like genů. Zjistili jsme úplné genomické sekvence *CrFTL1a* a *CrCOL1*. Překvapivé bylo zjištění, že genomická sekvence *CrFL* postrádá druhý intron, neboť toto zatím nebylo u známých *LFY* ortologů popsáno.
- 2) Studium expresních profilů nově identifikovaných genů za induktivních i neinduktivních fotoperiodických režimů v semenáčcích a 15-ti denních rostlinách přineslo následující představu o funkci těchto genů. *CrFTL1* je zřejmě pravým ortologem *FT*, kdežto *CrFTL2* je genem s neznámou funkcí. Na základě expresních profilů nebylo možno jednoznačně rozhodnout o funkci *CrCOL* genů. Avšak průběh rytmické exprese těchto genů není v rozporu s představou, že se jedná o ortology genu *CONSTANS*.
- 3) Transformace *CrFTL1* do *ft-2* mutantu *A. thaliana* zcela prokázala ortologii *CrFTL1* k *FT* z *A. thaliana*. Prozatímní výsledky transformace *CrCOL* genů do *co-2* mutantu *A. thaliana* naznačují komplementaci *co* mutace alternativně sestřiženou formou transkriptu genu *CrCOL2*. V tomto případě bychom prokázali funkci odpovídající *CONSTANS* u alespoň jednoho z nově identifikovaných *COL* genů.
- 4) Třetí intron *FTL* genů u zástupců rodu *Chenopodium* se ukázal být velmi dobře použitelným molekulárním markerem pro rozluštění původu polyploidních druhů merlíku z taxonomicky obtížného okruhu druhů *C. album*, zejména zemědělsky významného *C. quinoa*.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aagaard JE, Olmstead RG, Willis JH, Phillis PC (2005) Duplication of floral regulatory genes in the Lamiales. *Am J Bot* 92:1284-1293

Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309:1052–1056

Ahmad M, Cashmore AR (1993) *HY4* gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366:162–166

Ahn JH, Miller D, Winter VJ, Banfield MJ, Lee JH, Yoo SY, Henz SR, Brady RL, Weigel D (2006) A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J* 25:605–614

Achard P, Herr A, Baulcombe DC, Nicholas P, Harberd NP (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131:3357-3365

Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Hormon FG, Mas P, Kay SA (2001) Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 293:880-883

An HL, Roussot C, Suarez-Lopez P, Corbesler L, Vincent C, Pineiro M, Hepworth S, Mouradov A, Justin S, Turnbull C, Coupland G (2004) CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development* 131:3615-3626

Aukerman MJ, Sakai H (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell* 15:2730–2741

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297

Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431:356–363

Ben-Naim O, Eshed R, Parnis A, Teper-Bamnolker P, Shalit A, Coupland G, Samach A, Lifschitz E (2006) The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J* 46:462–476

Bertero HD (2003) Response of development to temperature and photoperiod in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food reviews international* 19:87-97

Bertero HD, King RW, Hall AJ (1999) Photoperiod-sensitive development phases in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Fields Crops Research* 60:231-243

Blazquez MA (2000) Flower Development Pathways. *J Cell Sci* 113:3547-3548

Blazquez MA, Ahn JH, Weigel D (2003) A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 33:168–171

Blazquez MA, Green R, Nilsson O, Sussman MR, Weigel D (1998) Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell* 10:791–800

Blazquez MA, Weigel D (2000) Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404:889–892

Blažková A, Vondráková Z, Krekule J (2000) The shoot apex as a marker of the responsivity to photoperiodic treatment inducing flowering of *Chenopodium rubrum* L. *Biol Plant* 43:31–34

Bohlenius H, Eriksson S, Parcy F, Nilsson O (2007) Retraction. *Science* 316:367

Bomblies K, Wang RL, Ambrose BA, Schmidt RJ, Meeley RB, Doebley J (2003) Duplicate *FLORICAULA/LEAFY* homologs *zfl1* and *zfl2* control inflorescence architecture and flower patterning in maize. *Development* 130:2385-2395

Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Coen C (1997) Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* 275:80–83

Bullock WO, Fernández JM, Short JM (1987) XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection. *Biotechniques* 4:376–378

Carmel-Goren L, Liu YS, Lifschitz E, Zamir D (2003) The *SELF-PRUNING* gene family in tomato. *Plant Mol Biol* 52:1215–1222

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-743

Coen ES, Romero JM, Doyle S, Elliott R, Murphy G, Carpenter R (1990) *Floricauca*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63:1311–1322

Cumming BG (1967) Early-flowering plants. In: Wilt FH, Wessels NK (eds) *Methods in developmental biology*. Crowell, New York, 277–299

Cumming BG, Hendricks SB, Borthwick HA (1965) Rhythmic flower responses and phytochrome changes in a selection of *Chenopodium rubrum*. *Can J Bot* 43:825–853

Cumming BG, Seabrook JEA (1985) *Chenopodium*. In: Halevy AH (ed) *CRC Handbook of Flowering*, vol II. CRC Press, Boca Raton, 96–228

Datta S, Hettiarachchi GHCM, Deng XW, Holm M (2006) *Arabidopsis* CONSTANS-LIKE3 Is a Positive Regulator of Red Light Signaling and Root Growth. *Plant Cell* 18:70–84

David KM, Armbruster U, Tama N, Putterill J (2006) *Arabidopsis* GIGANTEA protein is post-transcriptionally regulated by light and dark. *FEBS Lett* 580:1193–1197

Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C (1989) The CTAB-DNA Precipitation Method: A Common Mini-Scale Preparation of Template DNA from Phagemids, Phages or Plasmids Suitable for Sequencing. *Biotechniques* 7:514-520

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

Evans LT, King RW (1985) *Lolium temulentum*. In: AH Halevy (ed) *CRC Handbook of Flowering*. CRC Press, Boca Raton, 306–323

Felsenstein J (2004) *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland Mass

Fowler S, Lee K, Onouchoi H, Samach A, Richardson K, Morris B, Coupland G, Putterill J (1999) *GIGANTEA*: A circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J* 18:4679-4688

Frohlich MW, Estabrook GF (2000) Wilkinson support calculated with exact probabilities: an example using *Floricaula/LEAFY* amino acid sequences that compares three hypotheses involving gene gain/loss in seed plants. *Mol Biol Evol* 17:1914–1925

Frohlich MW, Parker DS (2000) The mostly male theory of flower evolutionary origins: from genes to fossils. *Syst Bot* 25:155–170

Gendall AR, Levy YY, Wilson A, Dean C (2001) The *VERNALIZATION2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* 107:525–535

Goto N, Kamagai T, Koornneef M (1991) Flowering responses to night-breaks in photomorphogenesis mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long-day plant. *Physiol Plant* 83:209-215

Griffiths S, Dunford RP, Coupland G, Laure DA (2003) The evolution of *CONSTANS-like* gene families in barley, rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131:1855-1867

Guo H, Yang H, Mockler TC, Lin C (1998) Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279:1360–1363

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98

Hamner KC, Bonner J (1938) Photoperiodism in regulation to hormones as factors in floral initiation and development. *Bot Gaz* 100:388-431

Hanzawa Y, Money T, Bradley D (2005) A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7748-7753

Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290:2110-2113

Hayama R, Izawa T, Shimamoto K (2002) Isolation of rice genes possibly involved in the photoperiodic control of flowering by a fluorescent differential display method. *Plant Cell Physiol* 43:494-504

Hayama R, Agashe B, Luley E, King R, Coupland G (2007) A Circadian Rhythm Set by Dusk Determines the Expression of *FT* Homologs and the Short-day Photoperiodic Flowering Response in *Pharbitis*. *Plant Cell* 19:2988-3000

He Y, Michaels SD, Amasino RM (2003) Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. *Science* 302:1751–1754

Hecht V, Foucher F, Ferrandiz C, Macknight R, Navarro C, Morin J, Vardy ME, Ellis N, Beltran JP, Rameau C, Weller JL (2005) Conservation of *Arabidopsis* flowering genes in model legumes. *Plant Physiol* 137:1420–1434

Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42:819–832

Himi S, Sano R, Nishiyama T, Tanahashi T, Kato M, Ueda K, Hasebe M (2001) Evolution of MADS-box gene induction by *FLO/LFY* genes. *J Mol Evol* 53:387-393

Hirose F, Shinomura T, Tanabata T, Shimada H, Takano M (2006) Involvement of rice phytochromes in de-etiolation responses and flowering. *Plant Cell Physiol* 47:915-925

Hsu CY, Liu YX, Luthe DS, Yuceer C (2006) Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell* 18:1846–1861

Huang JC, Chen F (2006) Simultaneous amplification of 5' and 3' cDNA ends based on template-switching effect and inverse PCR. *Biotechniques* 40:187–189

Hughes CE, Eastwood RJ, Bailey CD (2006) From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Science* 361:211-225

Cháb D, Kolář J, Štorchová H; *CONSTANS-like* genes are alternatively spliced in *Chenopodium rubrum*. V přípravě

Cháb D, Kolář J, Olson MS, Štorchová H (2008) Two *FLOWERING LOCUS T (FT)* homologs in *Chenopodium rubrum* differ in expression patterns. *Planta* 228:929–940

Cháb D, Kolář J, Štorchová H; The introns in *FTL (FLOWERING LOCUS T-like)* genes of *Chenopodium* serve as molecular markers for the identification of the origin of polyploid species. Předkládáno do *Theor Appl Genet*

Chailakhyan MK (1937) Concerning the hormonal nature of plant development processes. *Doklady Akad Nauk SSSR* 16:227– 230

Chardon F, Damerval C (2005) Phylogenetic Analysis of the PEBP Gene Family in Cereals. *J Mol Evol* (2005) 61:579–590

Chen X (2004) A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science* 303:2022–2025

Cheng XF, Wang ZY (2005) Overexpression of *COL9*, a *CONSTANS-LIKE* gene, delays flowering by reducing expression of *CO* and *FT* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 43:758–768

- Chouard P (1960) Vernalization and its relations to dormancy. *Annu Rev Plant Physiol* 11:191–238
- Christensen SA, Pratt DB, Pratt C, Nelson PT, Stevens MR, Jellen EN, Coleman CE, Fairbanks DJ, Jellen EN, Bonifacio A, Maughan PJ (2007) Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellite markers. *Plant Genet Resour* 5:82-95
- Imaizumi T, Schultz TF, Hormon FG, Ho LA, Kay SA (2005) FKF1 F-Box Protein Mediates Cyclic Degradation of a Repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Science* 309:293-297
- Imaizumi T, Tran HG, Swartz TE, Briggs WR, Kay SA (2003) FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 426:302–306
- Imamura S (1967) Photoperiodic induction and the floral stimulus. In: Imamura S (ed) *Physiology of Flowering in Pharbitis nil*. Japanese Society of Plant Physiologists, Tokyo, 15-28
- Imamura S, Muramatsu M, Kitajo S, Takimoto A (1966) Varietal difference in photoperiodic behavior of *Pharbitis nil*. *Bot Mag Tokyo* 79:714-721
- Ishikawa R, Tamaki S, Yokoi S, Inagaki N, Shinomura T, Takano M, Shimamoto K (2005) Suppression of the floral activator *Hd3a* is the principal cause of the night break effect in rice. *Plant Cell* 17:3326-3336
- Izawa T, Oikawa E, Sugiyama N, Tanisaka T, Yano M, Shimamoto K (2002) Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic control of flowering of rice. *Gene Dev* 16:2006-2020
- Izawa T, Takahashi Y, Yano M (2003) Comparative biology comes into bloom: Genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 6:113-120
- Jack T (2004) Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* 16:S1-S17

- Jaeger KE, Wigge PA (2007) FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 17:1050–1054
- Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, Dean C (2000) Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* 290:344–347
- Johnson E, Bradley M, Harberd NP, Whitelam GC (1994) Photoresponses of light-grown *phyA* mutants of *Arabidopsis*: Phytochrome A is required for the perception of daylength extensions. *Plant Physiol* 105:141–149
- Kardailsky I, Shukla V, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, Chory J, Harrison MJ, Weigel D (1999) Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science* 286:1962–1965
- Kelly AJ, Bonnländer MB, Ry Meeks-Wagner D (1995) *NFL*, the tobacco homolog of *FLORICAULA* and *LEAFY*, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems. *Plant Cell* 7:225–234
- Kim SJ, Moon J, Lee I, Maeng J, Kim SR (2003) Molecular cloning and expression analysis of a CONSTANS homologue, PnCOL1, from *Pharbitis nil*. *J Exp Bot* 54:1879-1887
- Kim SK, Yun CH, Lee JH, Jang YH, Park HY, Kim JK (2008) *OsCO3*, a *CONSTANS-LIKE* gene, controls flowering by negatively regulating the expression of *FT*-like genes under SD conditions in rice. *Planta* 228:355–365
- Kim SL, Lee S, Kim HJ, Nam HG, An G (2007) *OsMADS51* is a short-day flowering promoter that functions upstream of *Ehd1*, *Os-MADS14*, and *Hd3a*. *Plant Physiol* 145:1484–1494
- King RW (1972) Timing in *Chenopodium rubrum* of export of the floral stimulus from the cotyledons and its action at the shoot apex. *Can J Bot* 50:697–702
- King RW, Evans LT (2003) Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prizing open the lid of the „florigen“ black box. *Annu Rev Plant Biol* 54:307-328

- King RW, Evans LT, Mander LN, Moritz T, Pharris RP, Twitchin B (2003) Synthesis of gibberellin GA6 and examination of its role in flowering of *Lolium temulentum*. *Phytochemistry* 62:77–82
- King RW, Moritz T, Lloyd TE, Martin J, Andersen CH, Blundell C, Kardailsky I, Chandler PM (2006) Regulation of Flowering in the Long-Day Grass *Lolium temulentum* by Gibberellins and the *FLOWERING LOCUS T* Gene. *Plant Physiol* 141:498-507
- King RW, Zeevaart JA (1973) Floral stimulus movement in *Perilla* and flower inhibition caused by noninduced leaves. *Plant Physiol* 51:727–738
- Knoche K, Kephart D (1999) Cloning Blunt-End Pfu DNA Polymerase-Generated PCR Fragments into pGEM[®]-T Vector Systems. *Promega Notes* 71:10
- Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286:1960–1962
- Kobayashi Y, Weigel D (2007) Move on up, it's time for change – mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Gene Dev* 21:2371-2384
- Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M (2002) *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short day conditions. *Plant Cell Physiol* 43:1096–1105
- Koornneef M, Hanhart CJ, van der Veen JH (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 229:56-66
- Kulinowska-Gulewska H, Majewska M, Kopcewicz J (2000) Gibberellins in the control of photoperiodic flower transition in *Pharbitis nil*. *Physiol Plantarum* 108:202-207
- Lamb RS, Hill TA, Tan KG, Irish VF (2002) Regulation of *APETALA3* floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* 129:2079-2086

Laubinger S, Marchal V, Le Gourrierc J, Wenkel S, Adrian J, Jang S, Kulajta C, Braun H, Coupland G, Hoecker U (2006) *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development* 133:3213-3222

Ledger S, Strayer C, Ashton F, Kay SA, Putterill J (2001) Analysis of the function of two circadian-regulated *CONSTANS-LIKE* genes. *Plant J* 26:15-22

Lee JH, Hong SM, Yoo SJ, Park OK, Lee JS, Ahn JH (2006) Integration of floral inductive signals by *Flowering locus T* and suppressor of overexpression of *Constans 1*. *Physiol Plantarum* 126:475-483

Lee S, An G (2007) Diversified Mechanisms for Regulating Flowering Time in a Short-Day Plant Rice. *J Plant Biol* 50:241-248

Lee S, Kim J, Han JJ, Han MJ, An G (2004) Functional analyses of the flowering time gene *OsMADS50*, the putative *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1/AGAMOUS-LIKE 20 (SOC1/AGL20)* ortholog in rice. *Plant J* 38:754-764

Leister D (2005) Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends in Genetics* 21:655-663

Lifchitz E, Eviatar T, Rozman A, Shalit A, Goldschmidt A, Amsellem Z, Alvarez JP, Eshed Y (2006) The tomato *FT* ortholog triggers systematic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *PNAS* 103:6398-6403

Liljegren SJ, Gustafson-Brown C, Pinyopich A, Ditta GS, Yanofsky MF (1999) Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* Specify Meristem Fate. *Plant Cell* 11:1007-1018

Liu J, Yu J, McIntosh L, Kende H, Zeevaart JA (2001) Isolation of a *CONSTANS* ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering. *Plant Physiol* 125:1821-1830

Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14:1605–1619

Lynch M, Force A (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154:459–473

Maizel A, Busch MA, Tanahashi T, Peckovic J, Kato M, Hasebe M, Weigel D (2005) The Floral Regulator *LEAFY* Evolves by Substitutions in the DNA Binding Domain. *Science* 308:260-263

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1986) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 12th printing

Martin J, Storgaard M, Andersen CH, Nielsen KK (2004) Photoperiodic regulation of flowering in perennial ryegrass involving a *CONSTANS*-like homolog. *Plant Mol Biol* 56:159–169

Mason SL, Stevens MR, Jellen EN, Bonifacio A, Fairbanks DJ, Coleman CE, McCarty RR, Rasmussen AG, Maughan PJ (2005) Development and Use of Microsatellite Markers for Germplasm Characterization in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Crop Sci* 45:1618-1630

Maughan PJ, Kolano BA, Maluszynska J, Coles ND, Bonifacio A, Rojas J, Coleman CE, Stevens MR, Fairbanks DJ, Parkinson SE, Jellen EN (2006) Molecular and cytological characterization of ribosomal RNA genes in *Chenopodium quinoa* and *Chenopodium berlandieri*. *Genome* 49:825-839

McDaniel CN, King RW, Evans LT (1991) Floral determination and in vitro floral differentiation in isolated shoot apices of *Lolium temulentum* L. *Planta* 185:9–16

Mellerowicz EJ, Horgan K, Walden A, Coker A, Walter C (1998). *PRFLL*, a *Pinus radiata* homologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordia. *Planta* 206:619–629

Michael TP, Breton G, Hazen SP, Priest H, Mockler TC, Kay SA, Chory J (2008a) A morning-specific phytohormone gene expression program underlying rhythmic plant growth. *PLoS Biol* 6:e225. doi:10.1371/journal.pbio.0060225

Michael TP, Mockler TC, Breton G, McEntee C, Byer A, Trout JD, Hazen SP, Shen RK, Priest HD, Sullivan CM, Givan SA, Yanovsky M, Hong FX, Kay SA, Chory J (2008b) Network discovery pipeline elucidates conserved time of day specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet* 4:e14. doi:10.1371/journal.pgen.0040014

Michaels SD, Amasino RM (1999) *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Gene Dev* 10:1812-1821

Michaels SD, Himmelblau E, Kim SY, Schomburg FM, Amasino RM (2005) Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137:149-156

Miller TA, Muslin EH, Dorweiler JE (2008) A maize *CONSTANS*-like gene *conz1*, exhibits distinct diurnal expression patterns in varied photoperiods. *Planta* 227:1377-1388

Mimida N, Goto K, Kobayashi Y, Araki T, Ahn JH, Weigel D, Murata M, Motoyoshi F, Sakamoto W (2001) Functional divergence of the *TFL1-like* gene family in *Arabidopsis* revealed by characterization of a novel homologue. *Genes Cells* 6:327-336

Molinero-Rosales N, Jamilena M, Zurita S, Gomez P, Capel J, Lozano R (1999) *FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant J* 20:685-693

Montieri S, Gaudio L, Aceto S (2004) Isolation of the *LFY/FLO* homologue in *Orchis italica* and evolutionary analysis in some European orchids. *Gene* 333:101-109

Moon J, Lee H, Kim M, Lee I (2005) Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 46:292-299

- Moon J, Suh SS, Lee H, Choi KR, Hong CB, Paek NC, Kim SG, Lee I (2003) The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J* 35:613–623
- Mouradov A, Glassick T, Teasdale RD (1998) *NEEDLY*, a *Pinus radiata* ortholog of *FLORICAULA/LEAFY* genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6537–6542
- Müller K (2005) SeqState - primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics* 4:65-69
- Nakagawa H, Yamagishi J, Miyamoto N, Motoyama M, Yano M, Nemoto K (2005) Flowering response of rice to photoperiod and temperature: A QTL analysis using a phenological model. *Theor Appl Genet* 110:778-786
- Nakamichi N, Kita M, Ito S, Yamashino T, Mizuno T (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, Together Play Essential Roles Close to the Circadian Clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46:686-698
- Ng M, Yanofsky MF (2001) Activation of *Arabidopsis* B class homeotic genes by *APETALA1*. *Plant Cell* 13:739-753
- Nillson O, Lee I, Blazquez MA, Weigel D (1998) Flowering-time genes modulate the response to *LFY* activity. *Genetics* 150:403-410
- Noh B, Noh YS (2006) Chromatin-mediated regulation of flowering time in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* 126:484-493
- Noutsos C, Richly E, Leister D (2005) Generation and evolutionary fate of insertions of organelle DNA in the nuclear genomes of flowering plants. *Genome Research* 15:616-628
- Ohno S (1970) *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag, Berlin

Ohshima S, Murata M, Sakamoto W, Ogura Y, Motoyoshi F (1997) Cloning and molecular analysis of the *Arabidopsis* gene *Terminal Flower 1*. *Mol Gen Genet* 254:186–194

Otto SP, Yong P (2002) The evolution of gene duplicates. *Adv Genet* 46:451–483

Para A, Farré E, Imaizumi T, Pruneda-Paz JL, Harmon FG, Kay SA (2007) PRR3 Is a Vascular Regulator of TOC1 Stability in the *Arabidopsis* Circadian Clock. *Plant Cell* 11:3462-3473

Park DH, Somers DE, Kim YS, Choy YH, Lim HK, Soh MS, Kim HJ, Kay SA, Nam HG (1999) Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis* *GIGANTEA* gene. *Science* 285:1579-1582

Partap T, Joshi BD, Galway NW (1998) Chenopods. *Chenopodium* spp. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 22. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA by substitution *Bioinformatics* 14:817-818

Prusinska JM, Kukla I, Cháb D, Štorchová H, Wagner E; Identification and characterization of *Chenopodium rubrum* *CrFL* gene involved in the photoperiodic flower induction. V přípravě

Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G (1995) The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80:847–857

Rahiminejad MR, Gornall RJ (2004) Flavonoid evidence for allopolyploidy in the *Chenopodium album* aggregate (Amaranthaceae). *Plant Syst Evol* 246:77–87

Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Gene Dev* 16:1616–1626

- Robson F, Costa MM, Hepworth SR, Vizir I, Pineiro M, Reeves PH, Putterill J, Coupland G (2001) Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J* 28:619–631
- Roden LC, Song HR, Jackson S, Morris K, Care IA (2002) Floral responses to photoperiod are correlated with the timing of rhythmic expression relative to dawn and dusk in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13313–13318
- Rojas W, Soto JL, Carrasco E, Sanjinés CS (2004) Study on the social, environmental and economic impacts of Quinoa promotion in Bolivia. PROINPA Foundation, La – Paz, Bolivia
- Rottmann WH, Meilan R, Sheppard LA, Brunner AM, Skinner JS, Ma C, Cheng S, Jouanin L, Pilate G, Strauss SH (2000) Diverse effects of overexpression of *LEAFY* and *PTFL*, a poplar (*Populus*) homolog of *LEAFY/FLORICAULA*, in transgenic poplar and *Arabidopsis*. *Plant J* 22:235–245
- Rouse DT, Sheldon CC, Bagnall DJ, Peacock WJ, Dennis ES (2002) *FLC*, a repressor of flowering is regulated by different genes in different inductive pathways. *Plant J* 29:183–191
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G (2000) Distinct Roles of *CONSTANS* Target Genes in Reproductive Development of *Arabidopsis*. *Science* 287:1613–1616
- Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, Imaizumi T (2007) FKF1 and GIGANTEA Complex Formation Is Required for Day-Length Measurement in *Arabidopsis*. *Science* 318:261–265
- Seidlová F, Krekule J (1973) The negative response of photoperiodic floral induction in *Chenopodium rubrum* L. to preceding growth. *Ann Bot* 37:605–614
- Sheldon CC, Conn AB, Dennis ES, Peacock WJ (2002) Different regulatory regions are required for vernalization-induced repression of *FLOWERING LOCUS C* and for epigenetic maintenance of repression. *Plant Cell* 14:2527–2537

Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (2000) The molecular basis of vernalization: The central role of *FLOWERING LOCUS C*. Proc Natl Acad Sci USA 97:3753-3758

Shibata M, Sasaki K, Shimazaki Y (1973) Effect of air temperature and water temperature at each stage of growth of lowland rice: II. Effect of air temperature and water temperature on the heading date. Proc Crop Sci Soc Jpn 42:267-274

Shin BS, Lee JH, Lee JH, Neony HJ, Yun CH, Kim JK (2004) Circadian Regulation of Rice (*Oryza sativa L.*) *CONSTANS-like* Gene Transcripts. Mol Cell 17:10-16

Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carre IA, Coupland G (1998) The *late elongated hypocotyl* mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. Cell 93:1219–1229

Schmid M, Uhlenhaut NH, Godard F, Demar M, Bressan R, Weigel D, Lohmann JU (2003) Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. Development 130:6001-6012

Schoentgen F, Saccoccio F, Jolles J, Bernier I, Jolles P (1987) Complete amino-acid-sequence of a basic 21 kDa protein from bovine brain cytosol. Euro J Biochem 166:333–338

Scholl RL, May ST, Ware DH (2000) Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. Plant Physiol 124:1477-1480

Schultz EA, Haughn GW (1991) *LEAFY*, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. Plant Cell 8:771–781

Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. Plant Cell 18:1121–1133

Simmons MP, Ochotorena H (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. Systematic Biology 49:369-381

Simpson GG, Gendall AR, Dean C (1999) When to switch to flowering. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:519-520

SMART PCR cDNA Library Construction Kit (1998) CLONTECHniques XIII:9-10

Souer E, van der Krol A, Kloos D, Spelt C, Bliiek M, Mol J, Koes R (1998) Genetic control of branching pattern and floral identity during *Petunia* inflorescence development. *Development* 125:733–742

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Molecular Biology* 98:503–517

Southerton SG, Strauss SH, Olive MR, Hercourt RL, Decroocq V, Zhu X, Llewellyn DJ, Peacock WJ, Denis ES (1998) *Eucalyptus* has a functional equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene *LEAFY*. *Plant Mol Biol* 37:897–910

Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Mas P, Panda S, Kreps JA, Kay SA (2000) Cloning of the *Arabidopsis* Clock Gene *TOC1*, an *Autoregulatory Response Regulator* Homolog. *Science* 289:768–771

Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson K, Onouchi H, Valverde F, Coupland G (2001) *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410:1116-1119

Swofford DL (2003) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland

Štorchová H (2008) Molekulární genetika rozluštila záhadu florigenu, faktoru navozujícího kvetení. *Živa* 3:100-102

Štorchová H, Hrdličková R, Chrtek J Jr, Tetera M, Fitze D, Fehrer J (2000) An improved method of DNA isolation from plants collected in the field and conserved in saturated NaCl/CTAB solution. *Taxon* 49:79–84

Štorchová H, Cháb D, Kolář J; *FTL1*: The structure and function of the *FTL1a* and *FTL1b* genes in *Chenopodium rubrum*. V přípravě

Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, Yokoi S, Shimamoto K (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316:1033–1036

Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17:49-63

Thomas B, Vince-Prue D (1997) *Photoperiodism in Plants*. Academic Press, New York

Töpfer R, Matzeit V, Gronenborg B, Schell J, Steinbiss HH (1987) A set of plant expression vector for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res* 15:5890

Turck F, Fornara F, Coupland G (2008) Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. *Annual Review of Plant Biology* 59:573-94

Ullmann J, Seidlová F, Krekule J, Pavlová L (1985) *Chenopodium rubrum* as a model plant for testing the flowering effects of PGRs. *Biol Plant* 27:367–372

Valverde F, Mouranov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G (2004) Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 303:1003-1006

Veit J, Wagner E, Albrechtová JTP (2004) Isolation of a *FLORICAULA/LEAFY* putative orthologue from *Chenopodium rubrum* and its expression during photoperiodic flower induction. *Plant Physiol Biochem* 42:573–578

Veit J, Wagner E, Albrechtová JTP (2006) Floral Dip Transformation of *Chenopodium rubrum*. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Vol II*:49-52

Wada M, Cao QF, Kotoda N, Soejima JI, Masuda T (2002) Apple has two orthologues of *FLORICAULA/LEAFY* involved in flowering. *Plant Mol Biol* 49:567–577

Wagner D, Sablowski RWM, Meyerowitz EM (1999) Transcriptional activation of *APETALA1* by *LEAFY*. *Science* 285:582-584

Wang Z-Y, Tobin EM (1998) Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93:1207–1217

Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF, Meyerowitz EM (1992) *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69:843-859

Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierec J, Samach A, Coupland G (2006) CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:2971–2984

Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohman JU, Weigel D (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309:1056–1059

Wilson RN, Heckman JW, Somerville C (1992) Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol* 100:403-408

Yamaguchi A, Kobayashi Y, Goto K, Abe M, Araki T (2005) *TWIN SISTER OF FT (TSF)* acts as a floral pathway integrator redundantly with *FT*. *Plant Cell Physiol* 46:1175–1189

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

Yang Y, Klejnot J, Yu X, Liu X, Lin C (2007) Florigen (II): It is a Mobile Protein. *J Integr Plant Biol* 49:1665-1669

Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T (2000) *Hdl*, a major photoperiod sensitivity quantitative

trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*.
Plant Cell 12:2473-2483

Yanovsky MJ, Kay SA (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*.
Nature 419:308-312

Yin XY, Kropff MJ, Goudriaan J (1997) Changes in temperature sensitivity of development
from sowing to flowering in rice. Crop Sci 37:1787-1794

Yoo SY, Kardailsky I, Lee JS, Weigel D, Ahn JH (2004) Acceleration of flowering by
overexpression of *MFT* (*MOTHER OF FT AND TFL1*). Mol Cells 17:95–101

Yu X, Klejnot J, Lin C (2006) Florigen: One Found, More to Follow? J Integr Plant Biol
48:617-621

Zeevaart JAD (1976) Physiology of flower formation. Annu Rev Plant Physiol 27:321–348

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2006) Plant microRNA: A small molecule with big
impact. Dev Biology 289:3-16

9. PŘÍLOHY

Příloha 1

Protokol - výsev semen *A. thaliana* na misky

Sterilizace semen: 10% SAVO (5 ml SAVO + 45 ml H₂O + 0,02% TWEEN 20 - detergent)

Sterilizaci provádíme ve flowboxu

1. Přidáme k semínkům v 1,5 ml eppendorfce takové množství 96% etanolu, aby byly všechny ponořené (30 s namočit, netřepat)
2. Inverzním otáčením zkumavky míchat po dobu 5 min
3. Etanol odtáhnout pipetou (poté co se semínka usadí na dně) a přidáme 10% SAVO v takovém množství, aby byly všechny ponořené
4. Vortexujeme na stojanu 15 min
5. SAVO odstranit pipetou a semena 5x propláchnout destilovanou vyklávanou vodou a odstranit ji pipetou
6. Poté přidat zklávanou 0,1% agarózu, semínka se na misky nanášejí v ní – aby se nelepily k sobě, (v 0,1% agaróze se rozdělí)

½ MS medium s vitamíny (300 ml)

0,66 g Murashige and Skoog (MS) medium including vitamins
3 g sacharózy

pH 5.7 (nastavit pomocí 4 M KOH)

Agar 2,4 g (0,8%) – horizontální médium

1. Rozpustit MS a sacharózu ve 200 ml sterilní vody
2. Nastavit pH 5,7 pomocí KOH
3. Přidat agar
4. Doplnit na 300 ml sterilní vody
5. Sterilizovat autoklávováním
6. Po zchlazení na cca 50°C přidat antibiotika HYG 25 µg/ml a Cla 250 µg/ml

Po cca 30 ml se nalévá do petriho misek

Semínka se na misky vysévají ve sterilním flowboxu 1 ml pipetou do řádků

Potom se misky zalepí po obvodě páskou a dají se na 48 hod do chladu (lednice), potom do kultivační místnosti.

Příloha 2

Kristalon – složení hnojiva

Na 5 l hnojiva:

4 g kristalon podzim jeseň
3,3 g kristalon plod a květ
2,25 g Ca(NO₃)₂ · 4H₂O

Příloha 3

Rapid toothpick isolation

Lytic solution - skladovat při -20°C

275 µl sterilní vody

25 µl 1M TRIS pH 8,0

50 µl 0,5 M EDTA

50 µl RNase A (10 mg/ml)

100 µl lysozymu ve vodě (5 mg/ml).

Do 1,5 ml ependorfy napipetovat 15 µl lytic solution a resuspendovat v něm párátkem 1 stěr z bakteriálního proužku, inkubovat 5 min při laboratorní teplotě, poté přidat 2 µl equilibrovaného fenolu, krátce zvortexovat, centrifugovat 2 min při 12000 rpm. Na 0,7% agarózový gel nanést 8 µl horní fáze odpipetované z povrchu.

Příloha 4

Plasmid mini preparation – ALKALICKÁ LYZE

Agro GV 3101 – v 50 ml Erlen. baňce nechat růst **2 dny** v **5 ml** LB media + antibiotika (GEN 25 µg/ml, RIF 70 µg/ml, KAN 50 µg/ml, Tc 10 µg/ml)

GTE: 50 mM glukóza

25 mM Tris-HC

10 mM EDTA 1

klávkovat!!

pH 8

NaOH/SDS: 0,2 M NaOH + 1% SDS – do 15 ml

KOAc/HOAc: 3 M octan draselný

2 M kyselina octová

pH 4,8

1. Centrifugace 5 ml narostlých buněk 8 min při 4000 rpm v 12 ml zkumavkách
2. Pellet rozpustit ve 180 µl GTE a vortexovat – buňky musí být úplně resuspendovány
3. Přidat 360 µl NaOH/SDS a 2-4 min jemně šejkovat – **NEVORTEXOVAT!!**
4. Přidat 270 µl KOAc/HOAc, **ihned** jemně promíchat a pak vortexovat
5. Centrifugace 5 min při 7000 rpm
6. Supernatant přenést do 2 ml EPP zkumavky – bez bílé sraženiny
7. Přidat 1,2 ml 96% EtOH, vortexovat
8. Centrifugace 15 min při 13 000 rpm a vylít supernatant
9. Přidat 200 µl 70% EtOH a dát na 10-15 min do mrazáku (-20°C)
10. Centrifugace 10 min při 13 000 rpm a vylít supernatant
11. Nechat pellet sušit cca 20 min při pokojové teplotě
12. Rozpustit ve 20 µl destilované deionizované vody
13. Nechat rozpouštět přes noc v lednici a další den nanést na gel 5 µl plazmidu

Příloha 5

Sekvenování pomocí BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitu

Sekvenovací PCR:

0,9 µl vody
1,5 µl 5x BigDye buffer.....uchovávat v lednici
1,6 µl primer (10 µM)
1 µl BigDye 3.1 mix.....uchovávat v temnu a -20°C
5 µl templát

Celkový objem 10 µl

Množství templátu je nutno upravit podle jeho koncentrace a poté upravit též objem vody.

PCR podmínky: 96°C 1 min
 30 cyklů: 96°C 10 s
 50°C 5 s
 60°C 4 min
 4°C forever

Etanolvé přečištění (pro 10 µl sekvenační reakci):

1. Po PCR krátce zcentrifugovat
2. Přenést objem 10 µl PCR reakce do nové 0,5 ml zkumavky
3. Přidat 1,5 µl 3 M acetátu sodného a 40 µl 96% etanolu
4. Dobře zvortexovat
5. Ponechat při laboratorní teplotě 30 - 60 min (maximálně)
6. Centrifugovat 12 500 rpm při 6°C 20 min (nebo pokud to není možné, tak v nechlazené centrifuze)
7. Velmi opatrně odlít supernatant (neztratit pellet!)
8. Přidat 250 µl 80% etanolu a krátce zvortexovat
9. Centrifugovat 12 500 rpm při 6°C 20 min (nebo pokud to není možné, tak v nechlazené centrifuze)
10. Velmi opatrně odlít supernatant (neztratit pellet!)
11. Vysušit pellet ponecháním otevřené zkumavky dnem vzhůru na buničině - asi půl hodiny při laboratorní teplotě

Příloha 6

Sekvenování na gelovém sekvenátoru ALFII s použitím CycleReader™ Auto DNA Sequencing kit

Příprava sekvenačního gelu:

Silan: 333 µl ethanolu + 83,33 µl 10% kyseliny octové + 1 µl silanu, silan je nutno míchat vždy čerstvý

1. Vyleštit skla isopropanolem, vložit spacers
2. Nanést na sklo Silan a rozleštit ubrouskem
3. Složit skla tak, aby byl nápis po zavěšení čitelný a zpevnit je svorkami
4. Namíchat **akrylamidový gel** (přednostně se používá ReproGel™ Long Read, ale lze použít i ReproGel™ High Resolution, který ovšem dává kratší sekvence) celkový objem gelu 50 ml (33,3 ml solution B + 16,7 ml solution A) a opatrně promíchat, aby se nevytvořily bubliny
5. Opatrně nalít gel umístěný ve vodorovné poloze na k tomu určeném stolku; gel naléváme odspoda skel, gel se natáhne mezi skly až na druhou stranu, kam se umístí uje hřeben
6. Případné bubliny odstranit jejich vytažením odspodu gelu k tomu určeným umělohmotným „hákem“
7. Po nalití gelu zasunout pomalu mezi skla hřeben (pozor na vytvoření bublin)
8. Přiklopit gel na stolku pod UV zářivku a pečeme 10 min (škodlivé záření, opustíme místnost)
9. Po zapečení gelu **velmi opatrně a pomalu** vytáhnout hřeben

10. Gel ve sklech zavěsit do přístroje ALFII na určené šrouby
11. Spodní vanu pod gelem vypláchnout destilovanou vodou a do vany naliit 1 litr pufru 0,5x TBE (200 ml 5x TBE a doplnit do 2 l sterilní vodou), do horní vany naliit zbývající litr pufru
12. Připojit svorky s hadicemi pro cirkulaci vody
13. Pokud je třeba, dolít sterilní vodu do přístroje – stříčkou do hadice vpravo na přístroji a zapnout jej na pravém boku
14. Zapnout počítač, aktivovat ALFwin Software Instrument Control 2.0 a zvolit Instrument 2
15. Poté co program načte přístroj, zavřít víko a zvolit nastavení laseru (realign laser), transmittance by měla být alespoň 90%, pokud je nižší, upravit výšku gelu a znova nastavit laser
16. 2x propláchnout injekční stříkačkou každou jamku od kousků gelu a nečistot
17. Do jamky nanést 8 µl z PCR reakce v pořadí A, C, G, T pro každý sekvenovaný vzorek
18. Připojit elektrody
19. Zavřít víko, nastavit v programu parametry elektroforézy: Run Time: 1000 min; Current: 60 mA; Temperature: 55°C; Voltage 1500 V; Power 25 W
20. Spustit „Start“
21. Druhý den zavřít program a znova jej otevřít z ikony na ploše počítače, zvolit „Sequence analyser“ a tím spustit ALFwin Software Sequence analyser 2.10, ve kterém prohlížíme raw data nebo procesované sekvence (vybrat Analysis, Process)
22. Sekvence exportujeme ve formátu ASCII (textový soubor)

Příloha 7

A-tailing s použitím aTaq DNA polymerázy (Promega)

Do 0,2 ml PCR zkumavky s vypouklým víčkem napipetujeme:

1 µl 10x Buffer

1 µl dATP (2 mM)

0,6 µl Mg²⁺ (25 mM)

1 µl aTaq DNA polymerase 5 U/µl

6,4 µl PCR fragmentu po přečištění QIAquick Gel Extraction kit, nebo QIAquick PCR Purification kit

70°C po dobu 30 min v termocykleru

Příloha 8

Konzervace *A. tumefaciens*

Příprava bakteriální kultury

1. Asi 1 ml bakteriální kultury (pěstované při laboratorní teplotě přes dvě noci) centrifugovat při 3000 rpm 3 min na centrifuze Hettich, laboratorní teplota. Odstranit supernatant.
2. K pelletu přidat 0,5 ml sterilního YEB média bez antibiotik. Resuspendovat na ledu.
3. Smíchat s 65% glycerolem (viz níže) v poměru 1:1
4. Skladovat v -80°C

Stock solution pro *Agrobacterium*:

65% glycerol

0,01 M MgSO₄

25 mM TRIS

pH 8,0

Příloha 9

Příprava elektrokompetentních buněk *A. tumefaciens* GV3101

Jsou potřeba: 2 litry vychlazené sterilní deionizované vody, 1 litr YEB média

1. Z čerstvé kultury na misce nasadit monokolonii GV3101 do 10 ml YEB média s antibiotiky (GEN 25 µg/ml, RIF 70 µg/ml, KAN 50 µg/ml a Tc 10 µg/ml) a nechat třepat při cca 180 rpm na vodní třepačce při 28°C
2. Den předem vychladit falkony (250 ml, Nalgene) a vodu v lednici
3. Ráno přelít narostlou kulturu do 1 l YEB média s těmi samými antibiotiky a kultivovat do dalšího dne
4. Vychlazenou vodu a kyvety dát na led
5. Kulturu přelít do vychlazených kyvet a nechat zchladnout na ledu 15 min a pak centrifugovat v křížovém rotoru při 4°C 4000 rpm 15 min (kyvety na předvážkách vyvážit na 0,1 g)
6. Odlít supernatant, bakteriální pellet z každé kyvety resuspendovat nejprve v 1 ml vody a pak doplnit vodou do plné kyvety (cca 250 ml) a znova stejně centrifugovat
7. Opakovat krok 6 s tím, že se resuspenduje v polovičním objemu vody
8. Resuspendovat ve 20 ml 10% zklávaného glycerolu
9. Přesunout do dvou 50 ml kyvet a stejně centrifugovat
10. Resuspendovat ve 2-3 ml 10% zklávaného glycerolu
11. Na ledu připravit aliquoty po 50 µl, zamrazit je v dusíku a skladovat v deep freezu při -80°C

Příloha 10

Elektroporace *A. tumefaciens* GV3101

1. Dáme na led rozmrznout alikvotu elektrokompetentních buněk Agro a vychladit porační kyvety, plazmid a 1 ml LB media na každou poraci
2. Ke kompetentním buňkám přidáme 1-2 µl plazmidu (tj. asi 200 - 400 ng DNA)
3. K elektroporátoru připojíme porační komůrku (v šupletí u stolu)
4. Zapneme elektroporátor (vpravo na straně)
5. Pomocí tlačítek *set volts* a *raise* nastavíme hodnotu 2 500 V (maximální hodnota)
6. Pipetou přeneseme 100 µl kompetentních bakterií s plazmidem do porační kyvety (**BEZ BUBLIN!!**) a poklepáním o stůl sklepneme na dno kyvety a zavřeme víčkem
7. Důkladně otřeme kyvetu (aby nedocházelo ke zkratu)
8. Kyvetu vsadíme do porační komůrky a současně stlačíme obě tlačítka *pulse*. Držíme, dokud elektroporátor nevydá zvuk
9. **IHNED** přidáme do kyvety 1 ml vychlazeného LB média a zamícháme špičkou
10. Zkontrolujeme pomocí tlačítek *set+actual volts* (stiskneme současně) časovou konstantu – měla by být okolo 5,7 ms. Rozhodně by neměla být menší než 4,5 ms.
11. Přeneseme do 1,5 ml Eppendorfky a necháme při pokojové teplotě
12. Porační kyvetu ihned namočíme do 1% SDS (a necháme alespoň 10 minut stát)
13. Před vypnutím elektroporátoru snížíme voltáž na nulu: pomocí tlačítek *set volts* a *lower*, teprve poté jej můžeme vypnout
14. Kyvety vypláchneme vodou, poté sterilní vodou a nakonec denaturovaným ethanolem, osušíme dnem vzhůru na buničině, asi půl hodiny
15. Kyvety uložíme zpět do skladovací erlenky a uzavřeme alobalem
16. Bakterie v LB/YEB médiu přeneseme do 15 ml skleněné zkumavky a dáme zregenerovat na 2-3 hod do třepačky při 28 °C
17. Před výsevem zakoncentrujeme – centrifugace 3500 rpm a resuspendujeme ve 100 µl, které se vysejí na misky s odpovídajícími antibiotiky (GEN 25 µg/ml, RIF 70 µg/ml, KAN 50 µg/ml a Tc 10µg/ml)

Příloha 11

Floral dip - Transformace *A. thaliana* namáčením květenství do suspenze *A. tumefaciens*

Silwet – uchovávat při laboratorní teplotě

1. Z čerstvé kultury na misce nasadit monokolonii GV3101 do 5 ml YEB média s antibiotiky (GEN 25 µg/ml, RIF 70 µg/ml, KAN 50 µg/ml a Tc 10µg/ml) a nechat třepat přes noc při cca 180 rpm na vodní třepačce při 28°C
2. Ráno přelít narostlou kulturu do 150 ml YEB média s těmi samými antibiotiky a kultivovat do dalšího dne
3. Kulturu přelít do vychlazených 250 ml kyvet a centrifugovat v křížovém rotoru na centrifuze Hermle při 4°C 4500 rpm 20 min (kyvety na předvážkách vyvážit na 0,1 g)
4. Rostlinám vybraným k transformaci ostříhat již vytvořené šesule a bílé kvítky
5. Připravit 103 ml 10% sacharózy + 0,05% Silwet
6. Slít supernatant a pellet resuspendovat ve 3 ml 10% sacharózy a 0,05% Silwet
7. Odebrat 1 ml suspenze (z kroku 6.) do 100 ml lázně (10% sacharóza + 0,05% silwet) a změřit OD lázně při 600 nm, poté se přikapává ze suspenze do lázně tak, aby konečná OD byla ideálně 0,8 (může být i trochu vyšší, až do OD=1)
8. Koupání celého květenství, rostlina za rostlinou (asi 5-10 s) a pak ještě jednou zopakovat
9. Lehce osušit (okapat a pak dobře osušit ubrousky z buničiny), uzavřít do plastového sáčku, zavázat (provázek nebo gumička) a umístit rostliny do tmy při pokojové teplotě přes noc (skříňka, komora u sekvenátoru 3. patro)
10. Rostliny vyndat ze sáčků a vrátit do kultivační místnosti nebo skleníku
11. Po 5-7 dnech znova zopakovat transformaci pro zvýšení její účinnosti

Příloha 13

Southernova hybridizace

20x SSC 3 M NaCl 175,3 g **na 1 l**
 0,3 M citrát sodný .2 H₂O 88,2 g **pH 7,0**

2x SSC 10x naředit 20x SSC

Denaturační roztok 1,5 M NaCl 87,5 g **na 1 l**
 0,5 M NaOH 20,0 g

Neutralizační roztok 1,5 M NaCl 87,5 g **na 1 l**
 0,5 M Tris-HCl pH 7,5 60,5 g

Příprava gelu

1. (Fotografování s fluoreskujícím pravítkem a odříznutí standardů, pokud nebyl použit velikostní marker). Pracujeme v chirurgických rukavicích, gelu ani membrány se zbytečně nedotýkáme
2. Dvakrát 30 minut denaturace v čerstvě připraveném Denaturačním roztoku za pomalého kývání (15 kývnutí/min), doba závisí na tloušťce gelu
3. Krátké opláchnutí destilovanou vodou
4. Dvakrát 30 minut neutralizace v Neutralizačním roztoku
5. 10 minut ekvilibrace ve 20x SSC
6. Příprava knotů z Whatmanu (stejně širokých jako šířka gelu), ponořených do blotovacího roztoku (20x SSC), uhladíme skleněnou pipetou zavlhka
7. Překlopíme gel vzhůru nohama na Whatman, přeneseme 2 pinzetami vlhkou membránu Hybond N+ od Amersham (asi o 2 mm širší než gel na každé straně) a ustříhneme levý dolní roh, abychom označili orientaci gelu
8. Přiložíme tři Whatmany rozměrů gelu, navlhčené v blotovacím pufru
9. Navrstvíme hraničku suché buničiny, přiměřeně zatížíme a okraje blotovací misky zakryjeme potravinářskou folií proti odpaření
10. Necháme prosávat do dalšího dne
11. Ráno rozebereme vrstvu mokré, pufrém nasáklé buničiny a pinzetou přeneseme membránu na Whatman kontaktní stranou nahoru, označíme ji tužkou a na ní start pozici DNA
12. Membránu položit na Whatman jemně nasáklý 2x SSC a na skle přenést do crosslinkeru, kde 3,3 min crosslinkujeme (energie 1100 J/cm²)
13. Membránu ponecháme uschnout v obálce z Whatmana při laboratorní teplotě až do okamžiku hybridizace

Hybridizace

1. Prehybridizace 2-3 hodiny při 42°C ve 20 ml DIG Easy Hyb předehřátém na 42° C v hybridizačních tubách v píce Amersham
2. **Příprava hybridizačního roztoku:** 10 µl DIG označeného PCR fragmentu napipetovat do eppendorfky s 50 µl sterilní vody, obtočit teflonovou páskou a vložit do vroucí vodní lázně na 10 minut, poté rychle ochladit na ledu a ponechat zchladit 10 minut, přepipetovat do 5 ml DIG Easy Hyb ve sterilní kyvetě (12 ml) vyhřátého na hybridizační teplotu 42°C;
(Pokud je sonda použita opakovaně, je danaturována na vodní lázni při 68°C po dobu 10 min)
3. Z rolleru vylít prehybridizační roztok a nahradit hybridizačním
4. Hybridizujeme přes noc při 42°C
 $T_m = 49,82 + 0,41(\%G+C) - (600/\text{délka hybridu v bp})$, hybridizovat 20-25°C pod T_m hybridu, při neúplné homologii snížit hybridizační teplotu

Detekce

1x Maleic acid pufr: 100 mM kyselina maleinová, 150 mM NaCl, pH 7,5; klávovat

Washing pufr: 100 mM kyselina maleinová, 150 mM NaCl, pH 7,5; 0,3% (v/v) Tween 20

Blocking pufr: 1% (w/v) Blocking reagent pro hybridizaci nukleových kyselin rozpustit v 1x maleic acid pufru;

zásobní roztok 10x Blocking pufr (uchovávat v -20°C) se ředí 10x a uchovává v lednici; klávovat

Protilátka: 1:20 000 Anti digoxigenin-AP conjugate v Blocking pufru

Detection pufr: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5; klávovat

CDP-Star: 1:100 v Detection pufru

1. Další den slít hybridizační roztok zpět do 12 ml kyvety a provést stringentní promývání – 2 x 5 min ve 200 ml 2x SSC + 0,1% SDS (předehřátý na 42°C) při 42°C, poté 2 x 30 min ve 200 ml 0,1x SSC + 0,1% SDS (předehřátý na 65°C) při 65°C
2. Membránu přenést do plastové misky a koupat 5 min ve 100 ml washing pufru – kýveme v plastové misce na kývačce, nejméně 5 min
3. Slijeme a koupeme ve 100 ml blocking pufru, kýveme nejméně 30 min
4. Slijeme a koupeme v 50 ml roztoku protilátky (2,5 µl Anti digoxigenin-AP conjugate v 50 ml Blocking pufru), kýveme **přesně** 30 min
5. Slijeme a koupeme 2x 15 min ve 100 ml washing pufru
6. Equilibrujeme ve 100 ml Detection pufru
7. Membránu uložíme na plastovou fólii
8. Na membránu nanese 14 µl CDP-Star ve 1,4 ml Detection pufru, přiklopíme fólií, rovnoměrně rozhladíme pipetou a necháme působit přesně 5 min
9. Membránu osušíme okapáním a přiložením hranou na suchý čistý Whatman
10. Membránu uložíme na plastovou fólii a zatavíme (bez bublin)
11. Ponecháme ve tmě ve vyvolávací kazetě s Hyperfilmem 1- 5 hodin a poté vyvoláme
12. Při červení světla anebo lépe ve tmě 3 min koupat ve vývojce, 3 min ve vodě a nakonec 3 min v ustalovači a znova 3 min ve vodě

Neradioaktivní stripping

- 1) koupat 1 min v H₂O
- 2) Inkubovat 10 min v 0,2 M NaOH + 0,1% SDS, při 37°C
- 3) Opakovat inkubaci za stejných podmínek
- 4) Důkladně opláchnout ve 2x SSC
- 5) Zatavit membránu do fólie a uložit v 4°C, membrána nesmí uschnout

Příloha 14

DIG značení hybridizační sondy

100 – 1000x ředěný PCR produkt použit jako templát v DIG značící PCR reakci následovně:
 Připravit 2 typy mastermixu - první z nich s použitím DIG mixu a druhý s nezačenými dNTP, který bude sloužit jako velikostní kontrola na gelu (DIG označený PCR produkt se bude na agarózovém gelu díky vyšší molekulové hmotnosti pohybovat pomaleji vůči nezačenému PCR produktu).

Pro jednu DIG značící reakci napipetovat 17 µl vody, 2,5 µl pufru, 2,5 µl DIG mixu, 0,3 µl for a rev primerů a 0,4 µl polymerázy, připipetovat 2 µl templátu.

Pro kontrolní reakci obdobně s tím, že místo DIG mixu použít 2,5 µl 2 mM dNTP.

PCR podmínky:

94°C – 2 min; 35 cyklů: 93°C – 30 s, 58°C (nebo dle primerů) – 45 s, 72 °C – 1 min; závěrečná extenze 72 °C - 5 min

Kontrola značení na 1,8% (*CrFTLI* sonda) nebo 1,4% (*CrFL* sonda) elektroforetickém gelu:

5 µl z DIG značící i kontrolní PCR reakce nanést na gel a po půl hodině ověřit velikostní rozdíl značeného fragmentu oproti kontrole.

Příloha 16

Kompletní kódující sekvence *CrFTL1*

Úplná nukleotidová kódující sekvence *CrFTL1* (EU128013.1) a předpokládaná aminokyselinová sekvence CrFTL1 proteinu (ABV56568.1) z GenBank. Barevně jsou vyznačeny hranice exon/exon.

1: [EU128013](#). Reports [Chenopodium rubru...](#)[gi:157429034] [Links](#)

- [Features](#)
- [Sequence](#)

LOCUS EU128013 528 bp mRNA linear PLN 15-OCT-2007
DEFINITION *Chenopodium rubrum* Flowering locus T-like 1 protein (FTL1) mRNA, complete cds.
ACCESSION [EU128013](#) REGION: 100..627
VERSION EU128013.1 GI:157429034
KEYWORDS .
SOURCE *Chenopodium rubrum* (red goosefoot)
ORGANISM [Chenopodium rubrum](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; Caryophyllales; Amaranthaceae; *Chenopodium*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 528)
AUTHORS Chab,D., Kolar,J., Olson,M.S. and Storchova,H.
TITLE Two Flowering locus T (FT) homologs in *Chenopodium rubrum* differ in expression patterns
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 528)
AUTHORS Storchova,H. and Chab,D.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (30-AUG-2007) Plant Morphogenesis, Institute of Experimental Botany, Rozvojova 263, Praha 16500, Czech Republic
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..528
/organism="Chenopodium rubrum"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:3560"
gene <1..>528
/gene="FTL1"
/note="CrFTL1"
CDS 1..528
/gene="FTL1"
/note="flowering regulatory protein"
/codon_start=1
/product="Flowering locus T-like 1 protein"
/protein_id="ABV56568.1"
/db_xref="GI:157429035"

```
/translation="MPRTPRDPLVVGRVIGDVLDPFNRTVNLRVSYNNRDVNNNGCEFR  
PSQVVNQPRVEIGGDDLRTFYTLVMDPDPAPSPSNPHLREYLHWLVTDIPGSTGASFG  
QELFGYESPRPSVGIHRFIFVLFRQLGRQTVYPPGWRQQFNTRDFAEIYNLGLPVASV  
YFNCQREGGSGGRRL"
```

ORIGIN

```
1 atgcctagaa caccaagga tctctagta gtcggtcggg ttatcgggga tgttttagat  
61 cccttcaaca ggactgtaa tctgagagta agctataaca atagagatgt taataatgga  
121 tgtgaattca ggccctctca ggttgtaaat caaccaagag ttgagatcgg aggcgatgac  
181 cttaggactt tctacacctt ggtgatggtg gaccgggatg ctcctagccc aagtaatcca  
241 cacctgaggg agtacttgca ctggttggtg actgatattc cggggagcac aggtgcatcc  
301 tttggccaag agttggttgg ttatgagagt ccaagaccat cggtggtgat acatcgattc  
361 atattcgtgt tgtttcgaca attgggtagg caaactgttt atcctccagg gtggcgccaa  
421 caatttaaca ctagagattt tgccgaaatc tacaaccttg gcttgcccgt tgcttctgtc  
481 tacttcaatt gtcaaagga gggaggctct ggtggaagaa ggttgtaa
```

Příloha 17

Kompletní kódující sekvence *CrFTL2*

Úplná nukleotidová kódující sekvence *CrFTL2* (EF445636.1) a předpokládaná aminokyselinová sekvence CrFTL2 proteinu (ABP02016.1) z GenBank. Barevně jsou vyznačeny hranice exon/exon.

1: [EF445636](#). Reports [Chenopodium rubru...](#)[gi:144687041]

[Links](#)

•	Features
•	Sequence
LOCUS	EF445636 504 bp mRNA linear PLN 15-APR-2007
DEFINITION	Chenopodium rubrum flowering locus T-like 2 (FTL2) mRNA, complete cds.
ACCESSION	EF445636 REGION: 35..538
VERSION	EF445636.1 GI:144687041
KEYWORDS	.
SOURCE	Chenopodium rubrum (red goosefoot)
ORGANISM	Chenopodium rubrum Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; Caryophyllales; Amaranthaceae; Chenopodium.
REFERENCE	1 (bases 1 to 504)
AUTHORS	Chab,D., Kolar,J. and Storchova,H.
TITLE	Two flowering locus T (FT) homologs in Chenopodium rubrum differ in expression patterns and evolution rates
JOURNAL	Unpublished
REFERENCE	2 (bases 1 to 504)
AUTHORS	Storchova,H. and Chab,D.
TITLE	Direct Submission
JOURNAL	Submitted (19-FEB-2007) Laboratory of Plant Reproduction, Institute of Experimental Botany, Rozvojova 263, Praha 16502, Czech Republic
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..504 /organism="Chenopodium rubrum" /mol_type="mRNA" /db_xref="taxon: 3560 " /ecotype="374"
gene	<1..>504 /gene="FTL2" /note="CrFTL2"
CDS	1..504 /gene="FTL2" /codon_start=1 /product="flowering locus T-like 2" /protein_id=" ABP02016.1 " /db_xref="GI:144687042"

```
/translation="MIQGKEANEISTHSGVAGIEDVLDPFDCVTLRVSYNNRTVTTG  
GEFSPSQVVSQPRVEVGGDLGTFYTLVMDPDPAPSPSNPHLREYLHWMVTDIPGTS  
SDDEEMYCYESPQPSMGHRYVFLFQQSGRQTVYTPGWRINFETEAFAEIYNLKP  
AAVYFNC"
```

ORIGIN

```
1 atgatccaag gcaagaagc caatgagata tctactcatt caggcgttgc aggtattgaa  
61 gatgttttgg atcccttcga tagttgtgtg actcctaagag tcagctataa caatagaact  
121 gttactactg gaggtgaatt tagtccctct caagttgtta gccaacctag ggtcagggtt  
181 ggaggtgacc ttgggacttt ctacaccttg gtaatggtgg atcctgatgc tcctagccca  
241 agcaaccccc accttaggga gtacttgcac tggatggtga ctgatattcc cgggacctct  
301 gatgcatcct ctgacgaaga ggaaatgtat tgctatgaga gccacaacc atcaatgggg  
361 atgcatcgat atgtatttgt gttgtttcaa caatcgggaa ggcaaactgt ttatactcct  
421 ggggtggcgta ttaatttcga aacagaagcc ttcgctgaaa tctataatct taagccagtt  
481 gctgctgtct atttcaattg ttga
```


Příloha 18

Kompletní kódující sekvence *CrCOL1*

Úplná nukleotidová kódující sekvence *CrCOL1* (EU395770) a předpokládaná aminokyselinová sekvence CrCOL1 proteinu (ACB36911) z GenBank. Fialově je označena alternativně sestříhovaná sekvence. Barevně jsou vyznačeny hranice exon/exon.

1: [EU395770](#). Reports [Chenopodium rubru...\[gi:170779035\]](#) [Links](#)

- [Features](#)
- [Sequence](#)

```
LOCUS          EU395770                1089 bp    mRNA    linear    PLN 15-JUL-2008
DEFINITION     Chenopodium rubrum CONSTANS-like protein 1 (COL1) mRNA, complete
                cds, alternatively spliced.
ACCESSION      EU395770 REGION: 54..1142
VERSION        EU395770.1  GI:170779035
KEYWORDS       .
SOURCE         Chenopodium rubrum (red goosefoot)
ORGANISM       Chenopodium rubrum
                Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
                Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
                Caryophyllales; Amaranthaceae; Chenopodium.
REFERENCE      1 (bases 1 to 1089)
AUTHORS        Chab,D., Kolar,J. and Storchova,H.
TITLE          CONSTANS-like genes are alternatively spliced in Chenopodium rubrum
JOURNAL        Unpublished
REFERENCE      2 (bases 1 to 1089)
AUTHORS        Chab,D. and Storchova,H.
TITLE          Direct Submission
JOURNAL        Submitted (11-JAN-2008) Laboratory of Plant Reproduction, Institute
                of Experimental Botany, Rozvojova 263, Praha 16502, Czech Republic

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1089
                       /organism="Chenopodium rubrum"
                       /mol_type="mRNA"
                       /db_xref="taxon:3560"
                       /ecotype="374"
     gene              <1..>1089
                       /gene="COL1"
                       /note="CrCOL1"
     CDS               1..1089
                       /gene="COL1"
                       /note="zinc finger containing protein; B-box-type zinc
                       finger and CCT motif containing protein; alternatively
                       spliced"
                       /codon_start=1
                       /product="CONSTANS-like protein 1"
                       /protein_id="ACB36911.1"
                       /db_xref="GI:170779036"
```

```
/translation="MMKKEVPGGDNNSWARVCDTCRSAPCTVYCKEDSAFLCTSCDAR
IHAVNQMASRHERVWVCEACEREPA AFLCKADAASLCATCDADIHSANPLARRHHRVP
IMPVGCVYGPSDGRMSEDFGLDLPDRDDQTTDHEGDEDEAASWLLLNP GKNSNNQFTN
GFLTGGGEVDEYLDLFEYNSGADNQFCEQYNQQQEFVPEKNCGGDSVVPVQCREVKD
HQIQYQNFLFGMECETKSEYTYNTSIS HSVSVSLLDVGVPPESTMSDMSVSHSRPPKG
TIDLFSSTPMQVPTQLSPLDREARVMRYREKKKRNKFEKTI RYASRKAYAETRPRIKG
RFAKRTDVEAERTNSLMSDGGYGIVPSF"
```

```
misc_feature      452..541
                  /gene="COL1"
                  /note="alternatively spliced intron"
```

ORIGIN

```

1 atgatgaaga aggaagtacc ggggggggat aacaatagct gggcacgtgt ttgtgacaca
61 tgccgttcag caccgtgcac agtgtactgc aaagaggact ctgccttctt gtgcaccagc
121 tgcgatgcac ggatccacgc tgtcaatcaa atggcgtcaa ggcacgagcg ggtttgggtg
181 tgtgaggcgt gtgaacgtga accagcagct ttcttgtgca aggctgatgc agcatcactc
241 tgtgctacct gtgatgctga cattcactca gctaaccacac tggctcgcgc acaccaccga
301 gtcccaatca tgccctgtggg ttgcgtttat ggcccctcag acggaaggat gtctgaggat
361 ggattcctgg acctaccaga cagagatgat cagaccacgg atcatgaagg ggatgaggat
421 gaagctgctt cgtgggttgc acttaacca ggtagaaca gcaacaacca aactacaaat
481 ggggtttttaa ctggaggagg agaagttgat gagtacctgg acctcttga gtataattca
541 ggtgcagata atcaattctg tgagcagtat aaccagcagc aggaattcag tgtccctgag
601 aagaactgtg gcggcgacag tgttgaccg gttcagtgca ggaagtaaa agatcaccaa
661 atacagtacc agaacttttt gttcgggatg gaatgtgaga ccaaactctga gtacacttac
721 aacacatcaa ttagtcacag tgttcagtt tcctccctag atgtgggtgt tgtaccagaa
781 tccaccatga gtgatatgtc tgtgtcacat tcaaggcctc ctaaaggaac aatcgacctc
841 ttttctagca ctccgatgca agtgccaact caactatcac cgctggatag agaggctagg
901 gtcgatgagat acagagaaaa gaagaagaat agaaaatttg agaagacaat ccggtatgct
961 tcaagaaagg cctatgcaga gactagacct cggatcaaag gccggttcgc aaaaagaaca
1021 gatgttgaag cagagagaac caattcattg atgtcagacg gtggatatgg cattgtgcca
1081 tccttttga

```

Příloha 19

Kompletní kódující sekvence *CrCOL2s*

Úplná nukleotidová kódující sekvence *CrCOL2s* (EU395771) a předpokládaná aminokyselinová sekvence *CrCOL2s* proteinu (ACB36912) z GenBank. Fialově je označeno místo alternativního sestříhu. Barevně jsou vyznačeny hranice exon/exon.

1: [EU395771](#). Reports [Chenopodium rubru...\[gi:170779037\]](#) [Links](#)

- [Features](#)
- [Sequence](#)

LOCUS EU395771 1011 bp mRNA linear PLN 15-JUL-2008

DEFINITION *Chenopodium rubrum* CONSTANS-like protein 2s (COL2s) mRNA, complete cds.

ACCESSION [EU395771](#) REGION: 76..1086

VERSION EU395771.1 GI:170779037

KEYWORDS .

SOURCE *Chenopodium rubrum* (red goosefoot)

ORGANISM [Chenopodium rubrum](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; Caryophyllales; Amaranthaceae; *Chenopodium*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1011)
AUTHORS Chab,D., Kolar,J. and Storchova,H.
TITLE CONSTANS-like genes are alternatively spliced in *Chenopodium rubrum*
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1011)
AUTHORS Chab,D. and Storchova,H.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (11-JAN-2008) Laboratory of Plant Reproduction, Institute of Experimental Botany, Rozvojova 263, Praha 16502, Czech Republic

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1011
/organism="Chenopodium rubrum"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:3560"
/ecotype="374"

gene <1..>1011
/gene="COL2"

```

CDS          /note="CrCOL2s"
            1..1011
            /gene="COL2"
            /note="zinc finger containing protein; B-box-type zinc
            finger and CCT motif containing protein"
            /codon_start=1
            /product="CONSTANS-like protein 2s"
            /protein_id="ACB36912.1"
            /db_xref="GI:170779038"

```

```

/translation="MMKKEVPGGDNNSWARVCDTCRSAPCTVYCKEDSAFLCTSCDAR
IHAVNQVASRHERVWVCEACEREPAAFLCKADAASLCATCDADIHSANPLARRHHRVP
IMPVGCVYGPSDGRMSEEGFLDLPDGDDQTTDHEGDEDEAASWLLLNPGADNQFCEQY
SQQQEFVPEKNCGGDSVVPVQCREVKDHIQYQKFLFGMECETKSEYNYNTSISHSV
SVSSLDVGVVPESTMSDMSVSHSRPPKGTIDLFSPPMQVPTQLSPLDREARVMRYRE
KKKNRKFECTIRYASRKAYAETRPRIKGRFAKRTDVEAEMDQMF'TNSLMSDGGYGIVP
SF"

```

ORIGIN

```

   1 atgatgaaga aggaagtacc gggaggggat aacaatagct gggcacgtgt ttgtgacaca
  61 tgccgttcag caccgtgcac agtgtactgc aaagaagact ctgctttcct gtgcaccagc
 121 tgcgacgcac ggatccatgc tgtcaatcag gtggcgctcaa ggcacgagcg ggtttgggtg
 181 tgtgaggcgt gtgaacgtga accagcagcc ttcttgtgca aggctgacgc agcatcactc
 241 tgtgctacct gtgatgctga cattcactca gctaaccacac tggcccgcgc ccaccaccgg
 301 gtcccaatca tgccctgtggg atgcgtttat ggcccctcag acggaaggat gtctgaggaa
 361 ggattcctgg acctgccaga tggagatgat cagaccacgg atcatgaagg ggatgaggat
 421 gaagctgctt cgtgggttgc actcaacca gggtgcagata atcagttctg cgagcagtat
 481 agccagcagc aggaattcag tgtccctgag aagaactgtg gaggcgacag tgtcgtaccg
 541 gttcagtgca ggaagtaaa agatcaccaa atacagtacc agaaattttt gttcggaatg
 601 gaatgtgaga ccaaactctga gtacaattac aacacatcaa ttagtcacag tgtttcagtc
 661 tcctccctag atgtgggtgt cgtaccagaa tccaccatga gtgatatgtc tgtgtcacat
 721 tcaaggcctc ccaaaggaac aattgacctt ttttctagcc ctccgatgca agtgccaact
 781 caactatcac cgctggatag agaggctagg gtcattgagat acagagaaaa gaagaagaat
 841 agaaaatttg agaagacaat ccgttatgct tcaagaaagg cctatgcaga gactagacct
 901 cggatcaaag gccggttcgc taaaagaaca gatggtgaag cagagatgga ccagatgttc
 961 accaattcat tgatgtcaga cgggtggatat ggcattgtgc catccttttg a

```

Příloha 20

Alignment aminokyselinových sekvencí CrCOL s dalšími členy COL rodiny

Pomlčky značí mezery, lomítka značí hranice exonů. Proteinové sekvence z GenBank: AtCO (A56133), AtCOL1 (CAA71587), AtCOL2 (AAB67880) z *Arabidopsis thaliana*; PdCOL1 (AAS00054) a PdCOL2 (AAS00055) z *Populus deltoides*; PnCO (AAG24863) z *Pharbitis nil*; Nad alignmentem je zelenou čarou označena sekvence odpovídající B-box 1 doméně, červenou čarou sekvence odpovídající B-box 2 doméně a modrou čarou sekvence odpovídající CCT doméně.

1 100

AtCO_A56133 (1) -----MLKQESNDIISGENNRRARP CDTCRSNACTVYCHADSAYLCMS CDAQVHSA

AtCOL1_CAA71587.1_ (1) -----MLKVES-----NWAQACDTCR SAACTVYCRADSAYLCSS CDAQVHAA

AtCOL2_AAB67880.1_ (1) -----MLKEESNESG-----TWARACDTCR SAACTVYCEADSAYLCIT CDARVHAA

CrCOL1_ACB36911 (1) -----MMKKEVFGGDN---NSWARVCDTCR SAPCTVYCKEDSAFLCTSCDARIHAV

CrCOL2s_ACB36912 (1) -----MMKKEVFGGDN---NSWARVCDTCR SAPCTVYCKEDSAFLCTSCDARIHAV

PdCOL1_AAS00054 (1) MPRFTSLILSSPLVFFLQVSLILATNAHSLSYIAKDSIIEIGIGREREEMLKESGGSGVNNWARVCDTCRAAACTVYCRADSAYLCAGCDARVHAA

PdCOL2_AAS00055 (1) -----MLKQESSGS---GGDNRRALCDTCRAAACTVYCRADSAYLCAGCDARVHAA

PnCO_AAG24863 (1) -----MLKEESCEVLDLDTIGSSSGSRSGNKNNWARVCDTCR SAACS VYCRADLALYLCGG CDARVHGA

101 200

AtCO_A56133 (51) NRVASRHRVRFVCE SCERAPAAFLCEADDASLCTACDSEVHSANPLARRHQRVPILPISGNSFSMTTTHHQSEKMT-----DPKRLVLDQEEGE

AtCOL1_CAA71587.1_ (43) NRLASRHERVRFVQSCERAPAAFFCKADAASLCTTCDSEIHSANPLARRHQRVPILPIS EYSSTATNHG-CETTVT-----DPENRVLGQEE-

AtCOL2_AAB67880.1_ (47) NRVASRHERVRFVQSCESAPAAFLCKADAASLCTACDAEHSANPLARRHQRVPILPLSANS CSMPAPSET-----DADN-----

CrCOL1_ACB36911 (49) NQVASRHERVWVCEACEREPAAFLCKADAASLCTACDADHSANPLARRHHRVPIIMPVG-CVYCPSDGRMS-----EDGFLLDPDRDQ

CrCOL2s_ACB36912 (49) NQVASRHERVWVCEACEREPAAFLCKADAASLCTACDADHSANPLARRHHRVPIIMPVG-CVYCPSDGRMS-----EDGFLLDPDGDQ

PdCOL1_AAS00054 (101) NRVASRHERVRFVCEACERAPAAFLCKADAASLCTACDADHSANPLARRHQRVPILPISGYLYGTQVGPAA GET-----EDQFMTOEGEETI

PdCOL2_AAS00055 (50) NRVASRHERVWVCEACERAPAAFLCKADAASLCTACDADHSANPLARRHQRVPILPISGCLHGSQVGPAA GET-----EDRFITTOEGEETI

PnCO_AAG24863 (65) NTVAGRHERVLVCEACESAPAAVTVCKADAASLCAACDSIHSANPLARRHHRVPILPISGTYLGPPTSNPCRESSMMVGLTGDAAEEDNGFLTQAEETT

201 300

AtCO_A56133 (143) EG--DKDAKIVASWLLFPNSDKNNNQ-----NNGLLFSDEYLNLDVYNSMDYKFTGEMSQH-QQNC SVPQT--SYGGDRVVPI

AtCOL1_CAA71587.1_ (133) ---DEDEEAASWLLFPNSGKNSGN-----NNGFSIGDEFNLNLDVYSSSDKQFIDCSNQY-QLDCNVPQR--SYGEDGVVPI

AtCOL2_AAB67880.1_ (122) ---DEDDRIVASWLLPNPGKNIGNQ-----NNGFLFGVYLDLDVYSSSMDNQFEDN-----QYTHYQR--SEGGDRVVPI

CrCOL1_ACB36911 (132) TTDHEGDEDEAASWLLNPNPKNSN-----NQTTNGFLTGGGEVDEYLDLFEYNSGADNQFCEQYNO--QQEFSVPEK--NCGGDSVVPI

CrCOL2s_ACB36912 (132) TTDHEGDEDEAASWLLNPNPKNSN-----NNGFLFGVYLDLDVYSSSMDNQFEDN-----QYTHYQR--SEGGDRVVPI

PdCOL1_AAS00054 (188) G---EEDDEEAASWLLNPNPKNSN-----NONNNG-FLFGGEVDEYLDLVEYNSCAENQYSDQYN--QQHYSVPEK--SCGGDSVVPI

PdCOL2_AAS00055 (137) SEEEEEDEEAASWLLNPNPKNSK-----NONNNG-FLFEGEVDEYLDLVEYNSCTENQCSQYNO--QQHYCVPEK--SYGGDRVVPI

PnCO_AAG24863 (165) MD---EEDDEEAASWLLNPNPNPNPNPKNSNNTNMCKGNNNNNEMSCVEAVLADLDAEFSSCHNNLFEDKYSINQQQYNSVPEKNSYRGSIVPE

301 400

1. exon / 2. exon

AtCO_A56133 (217) KLEESNGHCHN---QONFQFNFKYG-SSSTHYNDN--GSIHNNAYISSMFTGVVPESTACVTTASHPRTPKGTVEQQPDEASOMITVITQLSPMDREARV

AtCOL1_CAA71587.1_ (203) QIEVSKGMYQE---QONFQISINCG-SWCA LRSSN--GSIHSHMNVSSMDLGVVPESTSDATVSNPRSPKAVTDQPPYFPAQML----SPRDREARV

AtCOL2_AAB67880.1_ (188) QVEESTSHLQCS---QONFQLGINSWFSSCAHYNNNSLKDINHSAVSMSMDLGVVPESTASDITVQHPRITKETIDQLSGFPPTOVVQ--QLTPMREARV

CrCOL1_ACB36911 (212) QCREVKDHIQY---QNFIFGMECHT-KSEYTYNTS---ISHSVSVSSLDVGVVPESTMSDMSVSHSRPFKGTIDLFSSTPMQVFP--TQLSPLDREARV

CrCOL2s_ACB36912 (182) QCREVKDHIQY---QNFIFGMECHT-KSEYNYNTS---ISHSVSVSSLDVGVVPESTMSDMSVSHSRPFKGTIDLFSSTPMQVFP--TQLSPLDREARV

PdCOL1_AAS00054 (263) QYGEKDHQQQQQQYHNFQGLGEYEPKAAAYSVDGS---VSQGVSMSSMDVGVVPESTMSSEISISHQSASRGITIDLFSSTPIOMP--SOLSPMDREARV

PdCOL2_AAS00055 (215) QYGEKDHQQQR--QYHNFQGLGEYEPKAAAYSVDGL---ISQSVSMSSMDVGVVPESTMSEISISHQRTPKRTIELFSSTAIQMP--SOLSPMDREARV

PnCO_AAG24863 (262) HGKN-QFHYTG---LQHNHHAIFNCKEWNMRIL---TRDMVSISSMDVGVVPESTISDTSISHSRASKGTIDLFSSTPIOMPQLQLSQMDREARV

401 465

AtCO_A56133 (311) LRYREKKTTRKFEKTIYASRKAYAEIRPRNNGRFAKREIEAEQ--GNIMLMYN TGYGIVPSE

AtCOL1_CAA71587.1_ (291) LRYREKKNRKF EKTIRYASRKAYAEKRPRIKGRFAKRDVDEANQAFSTMITFDTGYGIVPSE

AtCOL2_AAB67880.1_ (283) LRYREKKTTRKFEKTIYASRKAYAEIRPRIKGRFAKRIETEAAEI FSTLSMSE TGYGIVPSE

CrCOL1_ACB36911 (302) LRYREKKNRKF EKTIRYASRKAYAEIRPRIKGRFAKRTDVEAE R---INSLMSDGGY GIVPSE

CrCOL2s_ACB36912 (272) LRYREKKNRKF EKTIRYASRKAYAEIRPRIKGRFAKRTDVEAE MDQMFINSLMSDGGY GIVPSE

PdCOL1_AAS00054 (358) LRYREKKNRKF EKTIRYASRKAYAEIRPRIKGRFAKRTDVEVDQMFSSSTLMAETAY GIVPSE

PdCOL2_AAS00055 (308) LRYREKKTTRKFEKTIYASRKAYAEIRPRVGRFAKRDVEEDDRTFSSSTLMAETGCGIVPSE

PnCO_AAG24863 (353) LRYREKKTTRKFEKTIYASRKAYAEIRPRIKGRFAKRTDVTEDVQIFVAPLMAESGY GIVPSE

Příloha 21

Kompletní kódující sekvence CrFL

Úplná nukleotidová kódující sekvence *CrFL* (EU410481.1) a předpokládaná aminokyselinová sekvence CrFL proteinu (ABY91324.1) z GenBank. Tučně je zvýrazněna sekvence získaná pomocí RACE metody v rámci této práce. Barevně jsou vyznačeny hranice exon/exon.

1: [EU410481](#). Reports [Chenopodium rubru...](#)[gi:166851670] [Links](#)

- [Features](#)
- [Sequence](#)

LOCUS EU410481 1419 bp mRNA linear PLN 09-FEB-2008

DEFINITION *Chenopodium rubrum* FLO/LFY-like protein mRNA, complete cds.

ACCESSION [EU410481](#) REGION: 116..1534

VERSION EU410481.1 GI:166851670

KEYWORDS .

SOURCE *Chenopodium rubrum* (red goosefoot)

ORGANISM [Chenopodium rubrum](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;

Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;

Caryophyllales; Amaranthaceae; *Chenopodium*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1419)

AUTHORS Prusinska, J.M., Kukla, I., Chab, D., Storchova, H. and Wagner, E.

TITLE Identification and characterization of *Chenopodium rubrum* CrFL gene involved in the photoperiodic flower induction

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1419)

AUTHORS Prusinska, J.M., Kukla, I., Chab, D., Storchova, H. and Wagner, E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (17-JAN-2008) Department of Genetics, Nicolaus Copernicus

University, Gagarina 9, Torun 87-100, Poland

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1419
/organism="Chenopodium rubrum"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:[3560](#)"

CDS 1..1419
/note="CrFL"
/codon_start=1
/product="FLO/LFY-like protein"
/protein_id="[ABY91324.1](#)"
/db_xref="GI:166851671"

/translation="MDQDPFTASVPQPSTAQAPPPTLPPYLARGLLGIRDIPGVGMGM
GMGVGMGMSMQGIAMGIPGNAAAVTAGAGANSVSGGLEELFQAYGIRYYTAVKIAEMG
FTVNTLVDMKEEEVDEMMNSLSHLFRWDLVGERYGKAAIRAERRRLEELEESRRHR
HNHMSYSNTPPPPDSTHHPDALSQ**EGLS**EEGVHEKEVVGSGGGNWEMGGAPPKNQQ
TSHQDHQQRKKHRKQOHLQARNTVQNMMLTAANRKLVGQETGRVIGNHHNSNIDDD
MEEEEVDDDEDGGGGGGITERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQCREFLL
QVQNIAKERGEK**PTKVT**NQVFRFAKKAGATYINKPKMRHYVHCYALHCLDEETSNA
LRRAFKERGENVGAWRQACYKPLVAIAARQGWIDAI FNSHPRLSIWYVPTKLRQLCHA
ERSSNNASNSISAGAPPHLPF"

ORIGIN

```

1 atggatcaag acccatttac agcaagtgtt cctcagccga gcacggctca agcgccgcc
61 cctacgctgc ctccgtatct tgcgcgaggg ctgctagggg taagagatat acctggagtg
121 ggaatgggaa tgggaatggg tgtgggaatg ggaatgagta tgcagggaaat tgctatggga
181 attccaggaa atgctgctgc tgttactgca ggagcaggag caaattcagg ttctgggtggc
241 ttggaagagt tattccaagc gtacggtata aggtattaca cggcggtgaa aatagcggag
301 atgggattca cggtgaacac actagtggac atgaaggagg aagaagtgga tgagatgatg
361 aacagccttt ctcaoctott cgggtgggac cttcttgttg ggaacgta cggcattaag
421 gcggaatcc gggctgagag acgccgtctt gaggagcttg aggagtcccg ccgccaccgt
481 cacaaccaca tgagttactc gaatacggcc cgcggccgc cggattcgac tcaccaccct
      E G L S
541 cttgatgccc tctcccagga aggactatca gaggaaggag tacatgagaa agaggtagtc
601 ggaagtggcg gcggaaactg ggaaatgggg ggagcacctc ctaagaacca acagacaagt
661 catcaggatc atcaacagag aaaaaaacac aggaaacagc agcatcttca agcgaggaac
721 acggtccaaa acatgatgac cttaacagct gctaatagga aattagtagg gcaagaaact
781 ggtagagtaa tagggaacca tcataacagc agtaacatcg atgatgacat ggaagaagag
841 gaagtagacg acgatgagga tgggtggcggg ggtggtggaa ttaccgaaag gcaaagggaa
901 cacccttca ttgtaactga gccaggagaa gtagcgcgag ggaagaagaa tggattggat
961 tatttgttcc atttgtatga gcaatgccgt gaatttttgc tacaagtca aaacattgct
      P T K V
1021 aaggagcgtg gtgaaaaatg cctactaag gtaaaccaacc aggtattcag attcgcaaag
1081 aaagcaggag caacgtacat caacaaacc aaaatgaggc actatgtgca ttgctacgct
1141 ctccactgcc tagacgagga gacatccaac gccctgagaa gagccttcaa agagagagga
1201 gaaaatgtag gtgcttggag gcaggcctgt tacaagcccc tggttgcaat tgctgcgcgc
1261 caaggggtggg atattgatgc catottcaac tcccaccac gcctctccat ttggtatgta
1321 cccaccaagc tccgccagct ttgtcatgct gagcgcagtt ctaataatgc aagcaactcc
1381 atctctgctg gtgctggacc ccaccatctt cctttctag

```

Last update: Thu, 03 Jul 2008 Rev. 132917

Příloha 22

Alignment aminokyselinové sekvence CrFL s dalšími LFY ortology

Pomlčky značí mezery, lomítka značí hranice exonů. Proteinové sekvence z GenBank: AFL1 (ABF84008), AFL2 (AB056195) z *Malus x domestica*; LFY (NP_200993) z *A. thaliana*; SLFY (CAC86163) ze *Silene coeli-rosa*; Nad alignmentem je zelenou čarou označena sekvence odpovídající N doméně, červenou čarou sekvence odpovídající C doméně.

Příloha 23

První intron CrCOL1

Alignment částečné genomické sekvence *CrCOL1* a úplné kódující sekvence *CrCOL1*. Sekvence intronu *CrCOL1* je dlouhá 769 bp.

		1		80
CrCOL1	(1)	ATGATGAAGAAGGAAGTACCGGGGGGGATAACAATAGCTGGGCACGTGTTTGTGACACATGCCGTTTCAGCACCGTGCAC		
CrCOLintron	(1)	-----		
		81		160
CrCOL1	(81)	AGTGTACTGCAAAGAGGACTCTGCCTTCTGTGCACCAGCTGCGATGCACGGATCCACGCTGTCAATCAAATGGCGTCAA		
CrCOLintron	(1)	-----		
		161		240
CrCOL1	(161)	GGCACGAGCGGGTTTGGGTGTGTGAGGCGTGTGAACGTGAACCAGCAGCTTCTTGTGCAAGGCTGATGCAGCATCACTC		
CrCOLintron	(1)	-----		
		241		320
CrCOL1	(241)	TGTGCTACCTGTGATGCTGACATTAACCTAGCTAACCCTGGCTCGCCGACACCACCGAGTCCCAATCATGCCTGTGGG		
CrCOLintron	(1)	-----		
		321		400
CrCOL1	(321)	TTGCGTTTATGGCCCTCAGACGGAAGGATGCTGAGGATGGATTCCCTGGACCTACCAAGACAGAGATGATCAGACCACGG		
CrCOLintron	(1)	-----ATTCCCTGGACCTACCAAGACAGAGATGATCAGACCACGG		
		401		480
CrCOL1	(401)	ATCATGAAGGGGATGAGGATGAAGCTGCTTCGTGGTTGCTACTTAACCCAGGTAAGAACAGCAACAACCAAATACAAAT		
CrCOLintron	(39)	ATCATGAAGGGGATGAGGATGAAGCTGCTTCGTGGTTGCTACTTAACCCAGGTAAGAACAGCAACAACCAAATACAAAT		
		481		560
CrCOL1	(481)	GGGTTTTTAACTGGAGGAGGAGAAGTTGATGAGTACCTGGACCTCTTTGAGTATAAATTCAGGTGCAGATAATCAATTCTG		
CrCOLintron	(119)	GGGTTTTTAACTGGAGGAGGAGAAGTTGATGAGTACCTGGACCTCTTTGAGTATAAATTCAGGTGCAGATAATCAATTCTG		
		561		640
CrCOL1	(561)	TGAGCAGTATAACCAGCAGCAGGAATTCAGTGTCCCTGAGAAGAACTGTGGCGGCACAGTGTGTACCGGTTTCAGTGCA		
CrCOLintron	(199)	TGAGCAGTATAACCAGCAGCAGGAATTCAGTGTCCCTGAGAAGAACTGTGGCGGCACAGTGTGTACCGGTTTCAGTGCA		
		641		720
CrCOL1	(641)	GGGAAGTAAAAGATCACCAAATACAGTACCAGAACTTTTGTTTCGGGATGGAATGTGAGACCAAATCTGAGTACACTTAC		
CrCOLintron	(279)	GGGAAGTAAAAGATCACCAAATACAGTACCAGAACTTTTGTTTCGGGATGGAATGTGAGACCAAATCTGAGTACACTTAC		
		721		800
CrCOL1	(721)	AACACATCAATTAGTCACAGT-----		
CrCOLintron	(359)	AACACATCAATTAGTCACAGTGTAAAGTAGATTCTCTGCTTAAATAGAAACCTTCCATTTTCTGCAATTCCTGTCACTTA		
		801		880
CrCOL1	(742)	-----		
CrCOLintron	(439)	TTTATGGTCAACTTCTAACATTAGCATTATTCTAAAATAAATATGTGTCTTTATGTTTTATGTCAACCTTAAAAGTATAT		
		881		960
CrCOL1	(742)	-----		
CrCOLintron	(519)	TACAGAAAGTTAAAAGAATTAGTCTGACCTAATTGACCATCATAACTACACAAAAGGACAAAGGATGAGAAACAATA		
		961		1040
CrCOL1	(742)	-----		
CrCOLintron	(599)	ATTAATAGACCATCAACAGAAATGCTGTCCCTCAATTTATTTTCTCTTTTCGAGCCTCAAGCCCTCAACTAGGATTA		
		1041		1120
CrCOL1	(742)	-----		
CrCOLintron	(679)	TGCTTGATCCTGTAGTTGTTTTGAAGAGATATATCTTGAGAAATATTATGACTGGTCAATCCTGCATAATCCATCTGT		
		1121		1200
CrCOL1	(742)	-----		
CrCOLintron	(759)	TTGTGAAAATCTGACAATTGTTGACTATATCTGTCCATGAAAAGGTTCTGTGTCAATACAAAGTTGAAGTTTAAATGTT		
		1201		1280
CrCOL1	(742)	-----		
CrCOLintron	(839)	ATATAATTACTGGGGTTTACTCCAACCTCAAAGATAAAAACCTAGATAGATCTAACAAAAGGTTACTAATCAGTA		
		1281		1360
CrCOL1	(742)	-----		
CrCOLintron	(919)	GTCACAGCTCCCTGCATTTTTCGCGGTAGAGAGAATTCACAGGCTTTATAAAACCTTGTGGATGTTTACAGGTTT		
		1361		1440
CrCOL1	(742)	-----		
CrCOLintron	(999)	ACGTTAGTTTACTCGACTTGAGTTATAATTTGAAATTAGCCAAAGTATAATTTTCTCTTGATAAAAATTTCTTTGTA		
		1441		1520
CrCOL1	(742)	-----		
CrCOLintron	(1079)	TTACTCGCATGAGATCCAGATACTGTTTCTCAATTTCTAGTAATCTGACCAAGAATTTTATGACTTTTAGGTTTCAGTTT		
		1521		1600
CrCOL1	(752)	CCTCCCTAGATGTGGGTGTTGTACCAGAATCCACCATGAGTGATATGTTCTGTGTACATTCAAGGCCTCCTAAAGGAACA		
CrCOLintron	(1159)	CCTCCCTAGATGTGGGTGTTGTACCAGAATCCACCATGAGTGATATGTTCTGTGTACATTCAAGGCCTCCTAAAGGAACA		
		1601		1680
CrCOL1	(832)	ATCGACCTATTTTCTAGCACTCCGATGCAAGTGCCAACTCAACTATCACCCGCTGGATAGAGAGGCTAGGGTCAATGAGATA		
CrCOLintron	(1239)	ATCGACCTATTTTCTAGCACTCCGATGCAAGTGCCAACTCAACTATCACCCGCTGGATAGAGAGGCTAGGGTCAATGAGATA		
		1681		1760
CrCOL1	(912)	CAGAGAAAAGAAGAAGAATGAAAAATTTGAGAAGACAATCCGTTATGTTCAAGAAAGGCTATGCAGAGACTTAGACCTC		
CrCOLintron	(1319)	-----		
		1761		1840
CrCOL1	(992)	GGATCAAAGGCCGTTTCGCAAAAAGAACAGATGTTGAAGCAGAGAGAACCAATTCATTGATGTCAGACGGTGGATATGCC		
CrCOLintron	(1321)	-----		
		1841	1858	
CrCOL1	(1072)	ATTGTGCCATCCTTTTGA		
CrCOLintron	(1321)	-----		

Příloha 24

Přesrážení s acetátem sodným a ethanolem

1. K roztoku DNA přidáme 1/10 objemu 3 M acetátu sodného a 3,6x objemu 96% etanolu
2. Dobře promícháme (vortex)
3. Dáme na 1 hod do mrazáku (-20°C)
4. Centrifugujeme 14000 rpm 20 min
5. Slijeme supernatant, přidáme 200 µl 75% etanolu a krátce zvortexujeme
6. Centrifugujeme 14000 rpm 15 min
7. Slijeme supernatant a necháme vyschnout půl hodiny při laboratorní teplotě
8. Rozpustíme ve vodě na potřebnou koncentraci (běžně ve 20 µl)

Příloha 25

Zatupení 5' přesahujících konců DNA Klenowovým fragmentem

Pro zatupení EcoRI/NotI restričního fragmentu smícháme:

2 µl 10x pufru pro Klenow Fragment

0,5 µl dATP/dCTP (2 mM)

0,5 µl dTTP/dGTP (2 mM)

0,5 µl Klenow fragment 2 U/µl

16,5 µl EcoRI/NotI fragmentu

37°C 10 min a pak 75°C 10 min pro deaktivaci enzymu – v termocykleru

Příloha 26

Alignment nukleotidových sekvencí části třetího a části čtvrtého exonu *FTL* genů ze zástupců rodu *Chenopodium*

A_nitens	GGAACCACTGGTGCACCTT	TGGTCAAGAGG---TGGTAT	GCT-ATGAGAGCCCAAGACC	ATCAATGGGGATACATCGGT	TCGTGTTTCGTGTTGTTCCAA
Calb234	GGGTCCACAGGTGCATCCTT	TGGCCAAGAGA---TTGTTT	GCT-ATGAGAACCCAAGACC	AGCAGTGGGAATACATCGAT	TCATCTTTGTGTTGTTTCGA
Cfic5278	GGGTCCACAGGTGCATCCTT	TGGCCAAGAGA---TTGTTT	GCT-ATGAGAACCCAAGACC	AGCAGTGGGAATACATCGAT	TCATCTTTGTGTTGTTTCGA
Cmis5231	GGGTCCACAGGTGCATCCTT	TGGCCAAGAGA---TTGTTT	GCT-ATGAGAACCCAAGACC	AGCAGTGGGAATACATCGAT	TCATCTTTGTGTTGTTTCGA
Cama1690	GGGTCCACAGGTGCATCCTT	TGGCCAAGAGA---TTGTTT	GCT-ATGAGAACCCAAGACC	AGCAGTGGGAATACATCGAT	TCATCTTTGTGTTGTTTCGA
Cmis4795	GGGTCCACAGGTGCATCCTT	TGGCCAAGAGA---TTGTTT	GCT-ATGAGAACCCAAGACC	AGCAGTGGGAATACATCGAT	TCATCTTTGTGTTGTTTCGA
ChiI336	GGGTCCACAGGTGCATCCTT	TGGCCAAGAGA---TTGTTT	GCT-ATGAGAACCCAAGACC	AGCAGTGGGAATACATCGAT	TCATCTTTGTGTTGTTTCGA
Cmis4865	??????????????????	?GCCAAGAGA---TTGTTT	GCT-ATGAGAACCCAAGACC	AGCAGTGGGAATACATCGAT	TCGTCTTTGTGTTGTTTCGA
Cama1714	GGGTCCACAGGTGCATCCTT	TGGCCAAGAGA---TAATTT	GCT-ATGAGAACCCAAGGCC	AGCAGTGGGAATACATCGAT	TCGTCTTTGTGTTGTTNCGA
Cher5429	GGGTCCACAGGTGCATCCTT	TGGCCAAGAGA---TAGTTT	GCT-ATGAGAGCCCAAGGCC	AGCAGTGGGAATACATCGAT	TCATCTTTGTGTTGTTTCAA
Cqui379	GGGTCCACAGGTGCATCCTT	TGGCCAAGAGA---TAGTTT	GCT-ATGAGAGCCCAAGGCC	AGCAGTGGGAATACATCGAT	TCAGCTTTGTGTTGTTTCAA
CrubFTL1	GGGAGCACAGGTGCATCCTT	TGGCCAAGAGT---TGTTT	GCTTACGAGAGTCCCAAGACC	ATCGTTGGGTATACATCGAT	TCATATTCGTGTTGTTTCGA
Cfoe1046	GGGACCCTCTGTTGCATCCTT	TGGCCAAGAGG---TTGTTT	GCT-ATGAGAGCCCAAGACC	ATCCAATGGGGATACATCGAT	TCGTATTTGTGTTGTTCCAA
Cpum978	GTGACCCTCTGTTGCATCCTT	TGGCCAAGAGG---TTGTTT	GCT-ATGAGAGCCCAAGACC	ATCCAATGGGGATACATCGAT	TCGTATTTGTGTTGTTTCAA
Chyb1154	GTGACCCTCTGTTGCATCCTT	TGGTCAAGAGG---TTGTTT	GCT-ATGAGAGCCCAAGACC	ATCCAATGGGGATACATCGAT	TCGTATTTGTGTTGTTTCAA
Chyb760	GGGACCCTCTGTTGCATCCTT	TGGTCAAGAGT---TTGTTT	GCT-ATGAGAGCCCAAGACC	ATCCAATGGGGATACATCGAT	TCGTATTTGTGTTGTTTCAA
Cpol678	GGGACCCTCTGTTGCATCCTT	TGGCCAAGAGG---TTGTTT	GCT-ATGAGAGCCCAAGACC	ATCCAATGGGGATACATCGAT	TCGTATTTGTGTTGTTTCAA
CrubFTL2	GGGACCCTCTGTTGCATCCTT	TGACGAAGAGGAAATGTATT	GCT-ATGAGAGCCCAAGACC	ATCCAATGGGGATACATCGAT	TCGTATTTGTGTTGTTTCAA
Cmur40	GGGACCACCGTGCACCTT	TGGTCAAGAGG---TAGTTT	GCT-ATGAGAGTCCACGACC	ATCCAATGGGGATACATCGAT	TCGTATTTGTGTTGTTTCAG
Calb241	GGGACCCTCTGTTGCACCTT	TGGTCAAGAGG---TGGCTT	GTT-ATGAGAGCCCAAGGCC	ATCCCAGGGGAATACATCGAT	TCGTGTTTGTGTTGTTTCAA
Cfic5300	GGGACCCTCTGTTGCACCTT	TGGTCAAGAGG---TTGTTT	GTT-ATGAGAGCCCAAGGCC	ATCCCAGGGGAATACATCGAT	TCGTGTTTGTGTTGTTTCAA
Cqui1845	GGGACCCTCTGTTGCACCTT	TGGTCAAGAGG---TTGTTT	GTT-ATGAGAGCCCAAGGCC	ATCCCAGGGGAATACATCGAT	TCGTGTTTGTGTTGTTTCAA
Cher5407	GGGACCCTCTGTTGCACCTT	TGGTCAAGAGG---TTGTTT	GTT-ATGAGAGCCCAAGGCC	ATCCCAGGGGAATACATCGAT	TCGTGTTTGTGTTGTTTCAA
Cqui377	GGGACCCTCTGTTGCACCTT	TGGTCAAGAGG---TTGTTT	GTT-ATGAGAGCCCAAGGCC	ATCCCAGGGGAATACATCGAT	TCGTGTTTGTGTTGTTTCAA
Cama356	GGGACCCTCTGTTGCACCTT	TGGTCAAGAGG---TTGTTT	GTT-ATGAGAGCCCAAGGCC	ATCCCAGGGGAATACATCGAT	TCGTGTTTGTGTTGTTTCAA
Cmis4784	GGGACCCTCTGTTGCACCTT	TGGTCAAGAGG---TTGTTT	GTT-ATGAGAGCCCAAGGCC	ATCCCAGGGGAATACATCGAT	TCGTGTTTGTGTTGTTTCAA
Cpro4964	GGGACCCTCTGTTGCACCTT	TGGTCAAGAGG---TTGTTT	GTT-ATGAGAGCCCAAGGCC	ATCCCAGGGGAATACATCGAT	TCGTGTTTGTGTTGTTTCAA
ChiI331	GGGACCCTCTGTTGCACCTT	TGGTCAAGAGG---TTGTTT	GTT-ATGAGAGCCCAAGGCC	ATCCCAGGGGAATACATCGAT	TCGTGTTTGTGTTGTTTCAA

At_nitens CAGCTCGGAAGGCAAAC
 Calb234 CAACTCGGAAGGCAAAC
 Cfic5278 CAACTCGGAAGGCAAAC
 Cmis5231 CAACTCGGAAGGCAAAC
 Camal690 CAACTCGGAAGGCAAAC
 Cmis4795 CAACTCGGAAGGCAAAC
 ChII336 CAACTCGGAAGGCAAAC
 Cmis4865 CAACTGGGAAGGCAAAC
 Camal714 CAACTGGGAAGGCAAAC
 Cber5429 CAACTAGGAAGGCAAAC
 Cqui379 CAACTAGGAAGGCAAAC
 CrubFTL1 CAATTAGGTAGGCAAAC
 Cfoe1046 CAATTGGGAAGGCAAAC
 Cpum978 CAATTGGGAAGGCAAAC
 Chyb1154 CAATTGGGAAGGCAAAC
 Chyb760 CAATTGGGAAGGCAAAC
 Cpol678 CAATTGGGAAGGCAAAC
 CrubFTL2 CAATCGGAAGGCAAAC
 Cmur40 CAACTGGGAAGGCAAAC
 Calb241 CAGCTAGGAAGGCAAAC
 Cfic5300 CAGCTAGGAAGGCAAAC
 Cqui1845 CAGCTAGGAAGGCAAAC
 Cber5407 CAACTCGGAAGGCAAAC
 Cqui377 CAACTCGGAAGGCAAAC
 Cama356 CAACTCGGAAGGCAAAC
 Cmis4784 CAACTCGGAAGGCAAAC
 Cprob4964 CAACTCGGAAGGCAAAC
 ChII331 CAACTCGGAAGGCAAAC

Příloha 27

Alignment nukleotidových sekvencí třetího intronu *FTL* genů podobných *Calb234* ze zástupců rodu *Chenopodium*

Cmis4795	GTGAGTTTCCCTTATCATT	AATCAAAATCCAAGCATCGG	ATGTTCCCTATTGAATATTT	GTTTGATGTAGTTTTAGGC
ChenII336	GTGAGTTTCCCTTATCATT	AATCAAAATCCAAGCATCGG	ATGTTCCCTATTGAATATTT	GTTTGATGTAGTTTTAGGC
Camal690	GTGAGTTTCCCTTATCATT	AATCAAAATCCAAGCATCGG	ATGTTCCCTATTGAATATTT	GTTTGATGTAG-TTTTAGGC
Cber5429	GTGAGTATCCCTTATCATT	AATCAAAA-----	-----	-----
Cqui379	GTGAGTATCCCTTATCATT	AATCAAAA-----	-----	-----
CrubFTL1	GTGAGTTTCCCTTATCACC	AATCAAAATATAGGCATTAG	ATGTTCCCTGTTGAATTTTT	CA--GATGCAGTTTT-AGGC
Camal714	GTGAGTTTCCCTTATCATT	AATCAAAATCCAAGCATCGG	ATGTTCCCTATTGAATATTT	GTTTGATGTAGTTTTGAGC
Cmis4865	????????????????	????????????????	????????????????	?GATTATGTAGTTTTAGGC
Cfic5278	GTGAGTTTCCCTTGTCTGTT	AATCAAAATCCAAGCATCGG	ATGTTTCTATTGAATATTT	ATTTGATGTAGTTTTAGGC
Cmis5231	GTGAGTTTCCCTGTCTGTT	AATCAAAATCCAAGCATCGG	ATGTTTATATTGAATATTT	ATTTGATGTAGTTTTAGGC
Calb234	GTGAGTTTCCCTGTCTGTT	AATCAAAATCCAAGCATCGG	ATGTTTATATTGAATATTT	ATTTGATGTAGTTTTAGGC
Cmis4795	ACTATAGCTAGGAA--GTTC	TGTTTAGTATT-----AA	--GGCCTC-TACATACTGCA	TGAA-CATGTGTTTTACTTT
ChenII336	ACTATAGCTAGGAA--GTTC	TGTTTAGTATT-----AA	--GGCCTC-TACATACTGCA	TGAA-CATGAGTTTTACTTT
Camal690	ACTATAGCTAGGAA--GTTC	TGTTTAGTATT-----AA	--GGCCTC-TACATACTGCA	TGAA-CATGTGTTTTACTTT
Cber5429	-----TTTGAA--TTTC	TGTTTAGTATT-----	--GGGCCCC--ACATAGTTCA	TATA-----TTT-----
Cqui379	-----TTTGAA--TTTC	TGTTTAGTATT-----	GGGGCCCC--ACATAGTTCA	TATA-----TTT-----
CrubFTL1	ACAATAGTTTGGAAA--TTTC	AGTCTAAACTATCGTTCT-A	--GGGTCCTC-TATAGATTGTG	TGCA-CATGTGTTTT-CTTA
Camal714	ACTATAGTTAGGAA-TTTT-	TGTTTAGTATT-----T-A	--GGGCCCC--TACATGGTACA	TACTGCATG-AAATGGTGTG
Cmis4865	ACTATAGCTAGGAA--GTTC	TGTTTAGTATT-----AA	--GGCCTC-TACATACTGCA	TGAA-CATGTGTTTTACTTT
Cfic5278	ACTATAGCTAGGAA--TTTC	TGTTTAG-----	--GGCCCC-TACATACTGCA	TGAA-CATGT-TATTACGTT
Cmis5231	ACTATAGCTAGGAA--TTTC	TGTTTAG-----	--GGCCCC-TACATACTGCA	TGAA-CATGT-TATTACGTT
Calb234	ACTATAGCTAGGAA--TTTC	TGTTTAG-----	--GGCCCC-TACATACTGCA	TGAA-CATGT-TATTACGTT
Cmis4795	TGCTCATTGACTCCCGGAG	AGTACTGTTGTTTTACTAG	CCTAGACTCTTCGATTT---	-----ACCTTAAGTGC---
ChenII336	TGCTCATTGACTCCCGGAG	AGTACTGTTGTTTTACTAG	CCTAGACTCTTCGATTT---	-----ACCTTAAGTGC---
Camal690	TGCTCATTGACTCCCGGAG	AGTACTGTTGTTTTACTAG	CCTAGACTCTTCGATTT---	-----ACCTTAAGTGC---
Cber5429	-----TGTCTCATTGACTCCCGGAG	-----	-----	-----
Cqui379	-----TGTCTCATTGACTCCCGGAG	-----	-----	-----
CrubFTL1	TAATCTAAAG-TACTCAAG-	-----	-----	-----TTAAGTACATA
Camal714	TGCTCAATGACTCACCGGAG	AGCACTGTTGTTTTACTGG	CCTAGACTCTTCTATTTTTA	GTAGTTACCTTAAGTAC---
Cmis4865	TGCTCATTGACTCCCGGAG	AGTACTGTTGTTTTACTAG	CCTAGACTCTTCGATTT---	-----ACCTTAAGTGC---
Cfic5278	TGCTCATTGACTCACCGGAG	AGTACTGTTGTTTTACTGG	CCTAGACTCTTCGATTT---	-----ACCTTAAGTAC---
Cmis5231	TGCTCATTGACTCACCGGAG	AGTACTGTTGTTTTACTGG	CCTAGACTCTTCGATTT---	-----ACCTTAAGTAC---
Calb234	TGCTCATTGACTCACCGGAG	AGTACTGTTGTTTTACTGG	CCTAGACTCTTCGATTT---	-----ACCTTAAGTAC---
Cmis4795	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTGAACAGATTTACC	TCAAGTACTTGATACAATGA
ChenII336	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTGAACAGATTTACC	TCAAGTACTTGATACAATGA
Camal690	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTGAACAAATTTACC	TCAAGTACTTGATACAATGA
Cber5429	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTGAACAAATTTACC	-----
Cqui379	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTGAACAAATTTACC	-----
CrubFTL1	AAATATAGATTGAGTTATTTG	ACACCTTTTC-----	-----ATAAAATGATCG	A-----
Camal714	-----TTTTTCTGTGCAAA	AAAAAAAAGTAACTTCTGTT	TTTTTGAGAACAATTTACC	TTAC--ACTTGATGCCATGA
Cmis4865	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTAAACAGATTTACC	TCAAGTACTTGATACAATGA
Cfic5278	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTGAACAAATTTACC	TTAAGTACTTGATACAATGA
Cmis5231	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTGAACAAATTTACC	TTAAGTACTTGATACAATGA
Calb234	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTAT-----	-----TTTTTGAACAAATTTACC	TTAAGTACTTGATACAATGA

Cmis4795	GGAAATGTGACTCTTATTAA	TTTTTT-----GACAAAAT	AGTCGAGTTTGACTCTTAGT	ACATTACATGTT----ACTA	TGTTAGTAATCGAATTTGAG
ChenI1336	GGAAATGTGACTCTTATTAA	TTTTTT-----GACAAAAT	AGTCGAGTTTGACTCTTAGT	ACATTACATGTT----ACTA	TGTTAGTAATCGAATTTGAG
Camal1690	GGAAATGTG--ACTTATTAA	TTTTTT-----GACAAAAT	AGTCGAGTTTGACTCTTAGT	ACATTACATGTT----ACTA	TGTTAATAATCGAATTTGAG
Cber5429	-----	-----	-----	-----	-----
Cqui379	-----	-----	-----	-----	-----
CrubFTL1	-----	-----	-----	-----GTCT--CACAC	-----TTTAAAGACTGAATTTGAG
Camal1714	GGAAATGTGACTTCTTTTTA	TTTTTTAATAATAATAAAAT	GGTCAAGTTTGACTGTTAGT	ACTTTACATGTCTTCAACAC	TTTGTATCTCCGAATTTGAG
Cmis4865	GGAAATGTGACTCTTATTAA	TTTTTT-----GACAAAAT	AGTCGAGTTTGACTCTTAGT	ACATTACATGTT----ACTA	TGTTAGTAATCGAATTTGAG
Cfic5278	GGAAATGTGACTCTTATTAA	TTTTTT-----GACAAAAT	AGTCGAGTTTGACTCTTAGT	ACATTACATGTT----ACTA	TGTTAGTAATTTGAATTTGAG
Cmis5231	GGAAATGTGACTCTTATTAA	TTTTTT-----GACAAAAT	AGTCGAGTTTGACTCTTAGT	ACATTACATGTT----ACTA	TGTTAGTAATTTGAATTTGAG
Calb234	GGAAATGTGACTCTTATTAA	TTTTTT-----GACAAAAT	AGTCGAGTTTGACTCTTAGT	ACATTACATGTT----ACTA	TGTTAGTAATTTGAATTTGAG
Cmis4795	TAGTACAGCCGTAGATGCCA	CAAAATTCATCGATGTATTA	TGTGATATCTGGCATGGTGT	GCTGATCATGTGGG-----	-----ATAAAAGGTGCCA
ChenI1336	TAGTACAGCCGTAGATGCCA	CAAAATTCATCGATGTATTA	TGTGATATCTGGCATGGTGT	GCTGATCATGTGGG-----	-----ATAAAAGGTGCCA
Camal1690	TAGTACAGCCGTAGATGCCA	CAAAATTCATCGATGTATTA	TGTGATATCTGGCATGGTGT	GCTGATCATGTGGG-----	-----ATAAAAGGTGCCA
Cber5429	-----GTAGATGCCT	CAAAATTCATCGATGTATTA	TGTGATATCTGGCATGGTGT	GCTGATCATGTGA-----	-----AGA
Cqui379	-----GTAGATGCCT	CAAAATTCATCGATGTATTA	TGTGATATCTGGCATGGTGT	GCTGATCATGTGA-----	-----AGA
CrubFTL1	TAATATAGACTTAGATATCT	CAAA--TTCATCCATGTATTA	TGTGATATCTGGCATGGTGT	GTGCACCTGTTCACATCGATT	ATTGATT-----
Camal1714	TAATATAGCTGTAGATCCCT	CAAAATTCATCGATGTATTA	TGTGATATCTGGCATGGTGT	GCTGATCATGTGC-----	-----AGA
Cmis4865	TAGTACAGCCGTAGATGCCA	CAAAATTCATCGATGTATTA	TGTGATATCTGGCATGGTGT	GCTGATCATGTGGG-----	-----ATAAAAGGTGCCA
Cfic5278	TAGTACAGCCGTAGATGCCA	CAAAATTCATCGATGTATTA	TGTGATATCTGGCATGGTGT	GCTGATCATGTGGG-----	-----ATAAAAGGTGCCA
Cmis5231	TAGTACAGCCGTAGATGCCA	CAAAATTCATCGATGTATTA	TGTGATATCTGGCATGGTGT	GCTGATCATGTGGG-----	-----ATAAAAGGTGCCA
Calb234	TAGTACAGCCGTAGATGCCA	CAAAATTCATCGATGTATTA	TGTGATATCTGGCATGGTGT	GCTGATCATGTGGG-----	-----ATAAAAGGTGCCA
Cmis4795	GAGGATGG-TGGAGGGGAAA	AAAA-----CA---GTAAAA-	GGTAGTTAATTTAGGTGGGT	GT-GGGAGCTTATTA----C	ATGGGAG-GAA-GTTGAGGC
ChenI1336	GAGGATGG-TGGAGGGGAAA	AAAA-----CA---GTAAAA-	GGTAGTTAATTTAGGTGGGT	GT-GGGAGCTTATTA----C	ATGGGAG-GAA-GTTGAGGC
Camal1690	GAGGATGG-TGGAGGGGAAA	AAAA-----CA---GTAAAA-	GGTAGTTAATTTAGGTGGGT	GT-GGGAGCTTATTA----C	ATGGGAG-GAA-GTTGAGGC
Cber5429	GAGGATGG-TGGAGGGGAAA	----GGAGGG---GTAAA-G	GGTAGTTAATTTAGGTGGGT	GT-GGGAGCTTATTA----C	ATGGGAG-GAA-GTTGAGGC
Cqui379	GAGGATGG-TGGAGGGGAAA	----GGAGGG---GTAAA-G	GGTAGTTAATTTAGGTGGGT	GT-GGGAGCTTATTA----C	ATGGGAG-GAA-GTTGAGGC
CrubFTL1	ATGTTGGATGGAGGAAA--	----GAGAAGCTGGAATG	GGTAGTTAATTTAGGTGGGT	GC-GGGAGCTTA--GTAGC	TAA-GAAGGAAGTTGGG-C
Camal1714	GAGGATGG-TGGAGGGGAAA	AAAA-----CA---GGAAAAA	GGTAGTTAATTTAGGTGGGT	GAGGGGAGCTAA-----C	TAGGGAA-GAA-GTTGAGTC
Cmis4865	GAGGATGG-TGGAGGGGAAA	AAAA-----CA---GGAAAAA	GGTAGTTAATTTAGGTGGGT	GT-GGGAGCTTA-----C	ATGGGAG-GAA-GTTGAGGC
Cfic5278	GAGGATGG-TGGAGGGGAAA	AAAA-----CA---GGAAAAA	GGTAGTTAATTTAGGTGGGT	GT-GGGAGCTTA-----C	ATGGGAG-GAA-GTTGAGGC
Cmis5231	GAGGATGG-TGGAGGGGAAA	AAAA-----CA---GGAAAAA	GGTAGTTAATTTAGGTGGGT	GT-GGGAGCTTA-----C	ATGGGAG-GAA-GTTGAGGC
Calb234	AAGGATGG-TGGAGGGGAAA	AAAA-----CA---GGAAAAA	GGTAGTTAATTTAGGTGGGT	GT-GGGAGCTTA-----C	ATGGGAG-GAA-GTTGAGGC
Cmis4795	CTTGGAGGTTTATTCCTTGT	AAG-AAAAGACCACACAAAT	GAAAAA--GAGTAATTTCTT	TCTTT--GTTGAGC-CAAAC	-ATCTGAAATTCATTAAGCA
ChenI1336	CTTGGAGGTTTATTCCTTGT	AAG-AAAAGACCACACAAAT	GAAAAA--GAGTAATTTCTT	TCTTT--GTTGAGC-CAAAC	-ATCTGAAATTCATTAAGCA
Camal1690	CTTGGAGGTTTATTCCTTGT	AAG-AAAAGACCACACAAAT	GAAAAA--GAGTAATTTCTT	TCTTT--GTTGAGC-CAAAC	-ATCTGAAATTCATTAAGCA
Cber5429	-----TTATTCCTTGT	AAGAAAAAGACCACAAAT	GAAAAA--GGTAATTTCTT	TCTTT-----C	-CTCTGAAATTTATTAAGCA
Cqui379	-----TTATTCCTTGT	AAGAAAAAGACCACAAAT	GAAAAA--GGTAATTTCTT	TCTTT-----C	-CTCTGAAATTTATTAAGCA
CrubFTL1	CTTGGGGTTTATTCCTTGT	ATG-AAAAAACACACAAAT	GAAAAA--GGTAATTTCTT	TATT--CGTGT-AAAACAAAC	-ATCTGAAATTTATTAAGCA
Camal1714	CTTGAAGGTTTATTCCTTGT	AAGAAAAAGACCACAAAT	GAAAAA--GGTAATTTCTT	TATTTCCGTTGGACCGAAC	ACTCTGAAATTTATTAAGCA
Cmis4865	ATTGAAAGTTTATTCCTTGT	AAGAAAAAGACCACAAAT	GAAAAA--GGTAATTTCTT	T-----	-----
Cfic5278	ATTGAAAGTTTATTCCTTGT	AAGAAAAAGACCACAAAT	GAAAAA--GGTAATTTCTT	T-----	-----
Cmis5231	ATTGAAAGTTTATTCCTTGT	AAGAAAAAGACCACAAAT	GAAAAA--GGTAATTTCTT	T-----	-----
Calb234	ATTGAAAGTTTATTCCTTGT	AAGAAAAAGACCACAAAT	GAAAAA--GGTAATTTCTT	T-----	-----
Cmis4795	TCCTTTGCTGCTTTATTTTT	AAA-TTCCCATTCCTCTT	TCACC-TTTTGTGACTTAA	ATGCTCACCACGAATAGCAT	TTGCTTTTGTGCTCCTCC
ChenI1336	TCCTTTGCTGCTTTATTTTT	AAA-TTCCCATTCCTCTT	TCACC-TTTTGTGACTTAA	ATGCTCACCACGAATAGCAT	TTGCTTTTGTGCTCCTCC
Camal1690	TCCTTTGCTGCTTTATTTTT	AAA-TTCCCATTCCTCTT	TCACC-TTTTGTGACTTAA	ATGCTCACCACGAATAGCAT	TTGCTTTTGTGCTCCTCC
Cber5429	TCCTTTGCTGCTTTTCTT	AAA-TTCCCATTCCTCTT	TCACC-TTTTGTGACTTAA	ATGCTCACCACGAATAGCAT	TTGCTTTTGTGCTCCTCC
Cqui379	TCCTTTGCTGCTTTTCTT	AAA-TTCCCATTCCTCTT	TCACC-TTTTGTGACTTAA	ATGCTCACCACGAATAGCAT	TTGCTTTTGTGCTCCTCC
CrubFTL1	TCCTTTACG----TATCCTT	AAA-TTCCCATTCCTCTT	ATCCC-TTATGTGACTTAA	ATGCTTACCACGAAGA--	-----
Camal1714	TCCTTTGCTGCTTTATTCCT	AAA-TTCCCATTCCTCTT	TCACC-TTTTGTGACTTAA	ATGCTTACCACGAATAGCAT	TTGCTTTTGTGCTCCTCC
Cmis4865	-----GCTGCTTTATTTTT	AAA-TTCCCATTCCTCTT	TCACC-TTTTGTGACTTAA	ATGCTCACCACGAATATCAT	TTGCTTTTGTGCTCCTCC
Cfic5278	-----GCTGCTTTATTTTT	AAA-TTCCCATTCCTCTT	TCACC-TTTTGTGACTTAA	ATGCTCACCACGAATATCAT	TTGCTTTTGTGCTCCTCC
Cmis5231	-----GCTGCTTTATTTTT	AAA-TTCCCATTCCTCTT	TCACC-TTTTGTGACTTAA	ATGCTCACCACGAATATCAT	TTGCTTTTGTGCTCCTCC
Calb234	-----GCTGCTTTATTTTT	AAA-TTCCCATTCCTCTT	TCACC-TTTTGTGACTTAA	ATGCTCACCACGAATATCAT	TTGCTTTTGTGCTCCTCC
Cmis4795	TT-----	-----	-----	-----	-----
ChenI1336	TT-----	-----	-----	-----	-----
Camal1690	TT-----	-----	-----	-----	-----
Cber5429	--GTGAAGATTGCAACCAGC	TTCCCTCGTGGACTAGTGGT	AAGAGAATGTAAGCTCTGAA	GTCTAGGTCACGAGATCAAG	CATTGGTACCACCTCCCTTT
Cqui379	--CTGAAGATTGCAA-----	-----	-----	-----	-----
CrubFTL1	TT-----	-----	-----	-----	-----
Camal1714	TT-----	-----	-----	-----	-----
Cmis4865	TT-----	-----	-----	-----	-----
Cfic5278	TT-----	-----	-----	-----	-----
Cmis5231	TT-----	-----	-----	-----	-----
Calb234	TT-----	-----	-----	-----	-----
Cmis4795	-----AAGGTTTCGT	TTTCGACTGCCTTAGTAATC	TTAAGGGAGTTGCTATTTGA	T-CATGAGGTTCTTTTTAAG	CTTAGGCTGAATTTGAGTGT
ChenI1336	-----AAGGTTTCGT	TTTCGACTGCCTTAGTAATC	TTAAGGGAGTTGCTATTTGA	T-CATGAGGTTCTTTTTAAG	CTTAGGCTGAATTTGAGTGT
Camal1690	-----AAGGTTTCGT	TTTCGACTGCCTTAGTAATC	TTAAGGGAGTTGCTATTTGA	TCCATGAGGTTCTTTTTAAG	CTTAGGCTGAATTTGAGTGT
Cber5429	CTCTCTTCTCTAA-----	-----	-----	-----	-----
Cqui379	-----	-----	-----	-----	-----
CrubFTL1	-----	-----	-----	-----TTGT-----	-----
Camal1714	-----AAGGTTTGT	TTTCGACTGCCTTAGTAGTC	TTAAGGGAGTTGCTATTTGA	T-CATTAGGTCCTTTTTAAG	CTTAGGCTGAATTTGAGTGT
Cmis4865	-----AAGGTTTCAT	TTTCGACTGCCTTAGTAATC	TTAAGGGAGTTGCTATAT--	--CATGAGGTTCTTTTTAAG	CTTAGGCTGAATTTGAGTGT
Cfic5278	-----AAGGTTTCAT	TTTCGACTGCCTTAGTAATC	TTAAGGGAGTTGCTATAT--	--CATGAGGTTCTTTTTAAG	CTTAGGCTGAATTTGAGTGT
Cmis5231	-----AAGGTTTCAT	TTTCGACTGCCTTAGTAATC	TTAAGGGAGTTGCTATAT--	--CATGAGGTTCTTTTTAAG	CTTAGGCTGAATTTGAGTGT
Calb234	-----AAGGTTTCAT	TTTCGACTGCCTTAGTAATC	TTAAGGGAGTTGCTATAT--	--CATGAGGTTCTTTTTAAG	CTTAGGCTGAATTTGAGTGT
Cmis4795	ATATTGGTGAAAGGTAGATC	TGTGAAGAAAAGAGTGAAGAT	TGCAAAGCTACGTGTGACCT	AATAAATTTGACTCTGTCTC	TTAATGAACCTCAATTTCTGGT
ChenI1336	ATATTGGTGAAAGGTAGATC	TGTGAAGAAAAGAGTGAAGAT	TGCAAAGCTACGTGTGACCT	AATAAATTTGACTCTGTCTC	TTAATGAACCTCAATTTCTGGT
Camal1690	ATATTGGTGAAAGGTAGATC	TGTGAAGAAAAGAGTGAAGAT	TGCAAAGCTACGTGTGACCT	AATAAATTTGACTCTGTCTC	TTAATGAACCTCAATTTCTGGT
Cber5429	-----AAAGAGTGAAGAT	-----	TGCAAAGCTATTTGGGCT	AATAAATTTGACT--GTCTT	GTAAAGAACTCAA--CTTGGT
Cqui379	-----	-----	-----AGCTATTTTGTGG--	-----GTCTT	GTAAAGAACTCAA--CTTGGT
CrubFTL1	-----	-----GAATAGC---ATT	TGC-----TTTGTTTTCTCCG	GCTTTTAGGCTTGTPTTCGG	-----
Camal1714	ATATTGGTGAAAGA----TC	TGKGAAGAAAAGAGTGAAGAT	TGCAAAGCTACGTGTGACCT	AATAAATTTGACTCTGTCTC	GTAAAGAACTCAA--CTTGGT
Cmis4865	ATATTGGTGAAAGATAGATC	TGTGAAGAAAAGAGTGAAGAT	TGCAAAGCTACGTGTGACCT	AATAAATTTGACTCTGTCTC	GTAAAGAACTCAA--CTTGGT
Cfic5278	ATATTGGTGAAAGATAGATC	TGTGAAGAAAAGAGTGAAGAT	TGCAAAGCTACGTGTGACCT	AATAAATTTGACTCTGTCTC	GTAAAGAACTCAA--CTTGGT
Cmis5231	ATATTGGTGAAAGATAGATC	TGTGAAGAAAAGAGTGAAGAT	TGCAAAGCTACGTGTGACCT	AATAAATTTGACTCTGTCTC	GTAAAGAACTCAA--CTTGGT
Calb234	ATATTGGTGAAAGATAGATC	TGTGAAGAAAAGAGTGAAGAT	TGCAAAGCTACGTGTGACCT	AATAAATTTGACTCTGTCTC	GTAAAGAACTCAA--CTTGGT

Cmis4795	TTGTGTAAGAAAGTTTGT	GGTACTATGATCATGTCAAA	GAGAATCTGCTTTCCAAAG	TGACAAAAT-ATATGATTAG	AATATTTGAATCTAGAATAT
ChenI1336	TTGTGTAAGAAAGTTTGT	GGTACTATGATCATGTCAAA	GAGAATCTGCTTTCCAAAG	TGACAAAAT-ATATGATTAG	AATATTTGAATCTAGAATAT
Camal1690	TTGTGTAAGAAAGTTTGT	GGTACTATGATCATGTCAAA	GAGAATCTGCTTTCCAAAG	TGACAAAAT-ATATGATTAG	AATATTTGAATCTAGAATAT
Cber5429	TTGTGTAAGAAAGTTTGT	GGTACTATGATCATGTCAAA	GAGAATCTGCTTTCCAAAG	TGACAAAAT-ATATGATTAG	AATATTTGAATCTAGAATAT
Cqui379	TTGTGTAAGAAAGTTTGT	GGTACTATGATCATGTCAAA	GAGAATCTGCTTTCCAAAG	TGACAAAAT-ATATGATTAG	AATATTTGAATCTAGAATAT
CrubFTL1	TTGTGTAAGAAAGTTTGT	GGTACTATGATCATGTCAAA	GAGAATCTGCTTTCCAAAG	TGACAAAAT-ATATGATTAG	AATATTTGAATCTAGAATAT
Camal1714	TGGNGTAAGAAATCTTCT	GGTACTATGATCATGTCAAA	GAGAATCTGCTTTCCAAAG	TGACAAAAT-ATATGATTAG	AATATTTGAATCTAGAATAT
Cmis4865	TTTTCGAAGAAATCTTCT	GGTACTATGATCATGTCAAA	GAGAATCTGCTTTCCAAAG	TGACAAAAT-ATATGATTAG	AATATTTGAATCTAGAATAT
Cfic5278	TTTTGCAAGAAATCTTCT	GGTACTATGATCATGTCAAA	GAGAATCTGCTTTCCAAAG	TGACAAAAT-ATATGATTAG	AATATTTGAATCTAGAATAT
Cmis5231	TTTTGCAAGAAATCTTCT	GGTACTATGATCATGTCAAA	GAGAATCTGCTTTCCAAAG	TGACAAAAT-ATATGATTAG	AATATTTGAATCTAGAATAT
Calb234	TTTTGCAAGAAATCTTCT	GGTACTATGATCATGTCAAA	GAGAATCTGCTTTCCAAAG	TGACAAAAT-ATATGATTAG	AATATTTGAATCTAGAATAT
Cmis4795	TTATT-AAAGGTCAGAAAAT	AAGATTAAGGTTGATCTTTG	TACT----ATGATCATGTCA	ATCATCATCCCTCATTTTAT	A-----GCAATAAGTAC
ChenI1336	TTATT-AAAGGTCAGAAAAT	AAGATTAAGGTTGATCTTTG	TACT----ATGATCATGTCA	ATCATCATCCCTCATTTTAT	A-----GCAATAAGTAC
Camal1690	TTATT-AAAGGTCAGAAAAT	AAGATTAAGGTTGATCTTTG	TACT----ATGATCATGTCA	ATCATCATCCCTCATTTTAT	A-----GCAATAAGTAC
Cber5429	--ATT-AAAGGTCAGAAAAT	AATATTAAGGTTGATCTTTG	TACT----ATGATCATGTCA	ATCATCATCCCTCATTTTAT	A-----GCAATAAGTAC
Cqui379	--ATT-AAAGGTCAGAAAAT	AATATTAAGGTTGATCTTTG	TACT----ATGATCATGTCA	ATCATCATCCCTCATTTTAT	A-----GCAATAAGTAC
CrubFTL1	--ATT-AAAGGTCAGAAAAT	AATATTAAGGTTGATCTTTG	TACT----ATGATCATGTCA	ATCATCATCCCTCATTTTAT	A-----GCAATAAGTAC
Camal1714	TTATTTAA-----	--GA-TAAAGTTGGTCTTCG	TACTATC-ATGA-----	-----TCATCTTTAT	A-----GCAGTAAGTAC
Cmis4865	TTATT-AAAGGTCAGAAAAT	AAGATTAAGGTTGATCTTTG	TACTATC-ATGA-----	-----TCATCTTTAT	A-----GCAGTAAGTAC
Cfic5278	TTATC-AAAGGTCAGAAAAT	AAGATTAAGGTTGATCTTTG	TACTATC-ATGA-----	-----TCATCTTTAT	A-----GCAGTAAGTAC
Cmis5231	TTATT-AAAGGTCAGAAAAT	AAGATTAAGGTTGATCTTTG	TACTATC-ATGA-----	-----TCATCTTTAT	A-----GCAGTAAGTAC
Calb234	TTATT-AAAGGTCAGAAAAT	AAGATTAAGGTTGATCTTTG	TACTATC-ATGA-----	-----TCATCTTTAT	A-----GCAGTAAGTAC
Cmis4795	AATTTTAAGAAATAATTTT	TAGATGAGAGAATAGAGCA-	--TTGATTCATAT--TGTA	AAAGTTACTTCAGAACAAAT	CAAAATTTTAGCCTTTACCA
ChenI1336	AATTTTAAGAAATAATTTT	TAGATGAGAGAATAGAGCA-	--TTGATTCATAT--TGTA	AAAGTTACTTCAGAACAAAT	CAAAATTTTAGCCTTTACCA
Camal1690	AATTTTAAGAAATAATTTT	TAGATGAGAGAATAGAGCA-	--TTGATTCATAT--TGTA	AAAGTTACTTCAGAACAAAT	CAAAATTTTAGCCTTTACCA
Cber5429	GGTTTTAAGAAATAATTTT	TAGACAGA-AATAGAACAT	TATTGATTCATATATTGTAA	AAAGTTACTTCAGAACAAAT	CAAAATTTTAGCCTTTACCA
Cqui379	GGTTTTAAGAAATAATTTT	TAGACAGA-AATAGAACAT	TATTGATTCATATATTGTAA	AAAGTTACTTCAGAACAAAT	CAAAATTTTAGCCTTTACCA
CrubFTL1	GGTTTTAAGAAATAATTTT	TAGACAGA-AATAGAACAT	TATTGATTCATATATTGTAA	AAAGTTACTTCAGAACAAAT	CAAAATTTTAGCCTTTACCA
Camal1714	GGTTTTAAGAAATAATTTT	TAGACAGA-AATAGAACAT	TATTGATTCATATATTGTAA	AAAGTTACTTCAGAACAAAT	CAAAATTTTAGCCTTTACCA
Cmis4865	GGTTTTAAGAAATAATTTT	TAGACAGA-AATAGAACAT	TATTGATTCATATATTGTAA	AAAGTTACTTCAGAACAAAT	CAAAATTTTAGCCTTTACCA
Cfic5278	GATTTTATAGAAATAATTTT	TAGATGAGA-AATAGAGCA-	--TTGATTCATAT--TGTA	AAAGTTACTTCAGAACAAAT	CAAAATTTTAGCCTTTACCA
Cmis5231	GATTTTATAGAAATAATTTT	TAGATGAGA-AATAGAGCA-	--TTGATTCATAT--TGTA	AAAGTTACTTCAGAACAAAT	CAAAATTTTAGCCTTTACCA
Calb234	GATTTTATAGAAATAATTTT	TAGATGAGA-AATAGAGCA-	--TTGATTCATAT--TGTA	AAAGTTACTTCAGAACAAAT	CAAAATTTTAGCCTTTACCA
Cmis4795	ATTCAGTGTCTCTTGTGTC	TATTTTCATCTTATTTTCCT	AATTATGTACATATAAGTAA	AAATAAATTTAGTTTAAACAGA	TTAGCATTCTTTACTTTTGT
ChenI1336	ATTCAGTGTCTCTTGTGTC	TATTTTCATCTTATTTTCCT	AATTATGTACATATAAGTAA	AAATAAATTTAGTTTAAACAGA	TTAGCATTCTTTACTTTTGT
Camal1690	ATTCAGTGTCTCTTGTGTC	TATTTTCATCTTATTTTCCT	AATTATGTACATATAAGTAA	AAATAAATTTAGTTTAAACAGA	TTAGCATTCTTTACTTTTGT
Cber5429	ATTTATTGCTCTTGTGTC	TATTTTCATCTTATTTTCCT	AATTATGTACATATAAGTAA	AAATAAATTTAGTTTAAACAGA	TTAGCATTCTTTACTTTTGT
Cqui379	ATTTATTGCTCTTGTGTC	TATTTTCATCTTATTTTCCT	AATTATGTACATATAAGTAA	AAATAAATTTAGTTTAAACAGA	TTAGCATTCTTTACTTTTGT
CrubFTL1	A-----GTTCACTTCTCT	GTAA-CCATCTTTTCTCT	ATTTGTCTAATTTATGCTAC	TAAACAT-GAAGTAGAGGAA	TTAAAGTTTCTGCTTTTGT
Camal1714	ATTCCTTGCACCTGTAGCCA	TATTTTCATCTTATTTTCCT	AATTATGTACATATAAGTAA	AAATAAATTTAGTTTAAACAGA	TTAGCATTCTTTACTTTTGT
Cmis4865	ATTCCTTGCACCTGTAGCCA	TATTTTCATCTTATTTTCCT	AATTATGTACATATAAGTAA	AAATAAATTTAGTTTAAACAGA	TTAGCATTCTTTACTTTTGT
Cfic5278	ATTCCTTGCACCTGTAGCCA	TATTTTCATCTTATTTTCCT	AATTATGTACATATAAGTAA	AAATAAATTTAGTTTAAACAGA	TTAGCATTCTTTACTTTTGT
Cmis5231	ATTCCTTGCACCTGTAGCCA	TATTTTCATCTTATTTTCCT	AATTATGTACATATAAGTAA	AAATAAATTTAGTTTAAACAGA	TTAGCATTCTTTACTTTTGT
Calb234	ATTCCTTGCACCTGTAGCCA	TATTTTCATCTTATTTTCCT	AATTATGTACATATAAGTAA	AAATAAATTTAGTTTAAACAGA	TTAGCATTCTTTACTTTTGT
Cmis4795	TATATAAAGGGTAAACATTGA	TGTTGGTCTTAAAGTTTTCT	CACGATT---TCTACTCTCT	GAATATGACATTATTTTTG	TTTA
ChenI1336	TATATAAAGGGTAAACATTGA	TGTTGGTCTTAAAGTTTTCT	CACGATT---TCTACTCTCT	GAATATGACATTATTTTTG	TTTA
Camal1690	TATATAAAGGGTAAACATTGA	TGTTGGTCTTAAAGTTTTCT	CACGATT---TCTACTCTCT	GAATATGACATTATTTTTG	TTTA
Cber5429	GATATAA-----TTGA	TGTTGGTCTTAAAGTTTTCT	CACGATT---TCTACTCTCT	GAATATGACATTATTTTTG	TTTA
Cqui379	GATATAA-----TTGA	TGTTGGTCTTAAAGTTTTCT	CACGATT---TCTACTCTCT	GAATATGACATTATTTTTG	TTTA
CrubFTL1	TT-----TTGA	TGTTGGTCTTAAAGTTTTCT	CACGATT---TCTACTCTCT	GAATATGACATTATTTTTG	TTTA
Camal1714	GATATAAAGGGTAAACATTGA	TGTTGGTCTTAAAGTTTTCT	CACGATT---TCTACTCTCT	GAATATGACATTATTTTTG	TTTA
Cmis4865	TATATAAAGGGTAAACATTGA	TGTTGGTCTTAAAGTTTTCT	CACGATT---TCTACTCTCT	GAATATGACATTATTTTTG	TTTA
Cfic5278	TATATAAAGGGTAAACATTGA	TGTTGGTCTTAAAGTTTTCT	CACGATT---TCTACTCTCT	GAATATGACATTATTTTTG	TTTA
Cmis5231	TATATAAAGGGTAAACATTGA	TGTTGGTCTTAAAGTTTTCT	CACGATT---TCTACTCTCT	GAATATGACATTATTTTTG	TTTA
Calb234	TATATAAAGGGTAAACATTGA	TGTTGGTCTTAAAGTTTTCT	CACGATT---TCTACTCTCT	GAATATGACATTATTTTTG	TTTA

Příloha 28

Alignment nukleotidových sekvencí třetího intronu *FTL* genů podobných *Calb241* ze zástupců rodu *Chenopodium*

Cfic5300	GTGGGTTTCAATTCGGAT	CCAATCCTTAATCATCAACA	ATTA-----GTTT	AGATGCATAGCATAGTATTG	
Cqui1845	GTGACATTTCAATTCGGAT	CCAATCCTTAATCATCAACA	ATTA-----GTTT	AGATGCATAGCATAGTATTG	
Calb241	GTGTGTTTAAATTCGGAT	CCAATCCTTAATCATCAACA	ATTA-----GTTT	AGATGCATAGCATAGTATTG	
Cber5407	GTGAGTTTCAATTTCCGAT	-----CCTTAATCATCAACA	ATTA-----GTTT	AGATGCATAGCATAGTATTG	
Cqui377	GTGAGTTTCAATTTCCGAT	-----CCTTAATCATCAACA	ATTA-----GTTT	AGATGCATAGCATAGTATTG	
Cmis4784	GTGAGTTTCAATTTCCGAT	-----CCTTAATCATCAACA	ATTA-----GTTT	AGATGCATAGCATAGTATTG	
ChenI1331	GTGAGTTTCAATTTCCGAT	-----CCTTAATCATCAACA	ATTA-----GTTT	AGATGCATAGCATAGTATTG	
Cpro4964	GTGAGTTTCAATTTCCGAT	-----CCTTAATCATCAACA	ATTA-----GTTT	AGATGCATAGCATAGTATTG	
Cama356	GTGAGTTTCAATTTCCGAT	-----CCTTAATCATCAACA	ATTA-----GTTT	AGATGCATAGCATAGTATTG	
Cfic5300	CATGCACATTTACTAATGTG	GATTATTTCTTATACTACTCT	TTCATTACAACATTATATA	CATAT--GGTGCACCTAAGA	GTACCATCGTATGTATGTGT
Cqui1845	CATGCACATTTACTAATGTG	GATTATTTCTTATACTACTCT	TTCATTACAACATTATATA	CATAT--GGTGCACCTAAGA	GTACCATCGTATGTATGTGT
Calb241	CATGCACATTTACTAATGTG	GATTATTTCTTATACTACTCT	TTCATTACAACATTATATA	CATAT--GGTGCACCTAAGA	GTACCATCGTATGTATGTGT
Cber5407	CATGCACATTTAATAATGTG	GATT---TCTTATGCCATCC	TTCATT---AAGCATACTTA	TATA---ATGCACCTAAGA	GTATCATCGTATG-----A
Cqui377	CATGCACATTTAATAATGTG	GATT---TCTTATGCCATCC	TTCATT---AAGCATACTTA	TATA---ATGCACCTAAGA	GTATCATCGTATG-----A
Cmis4784	-----ATTC AATAGTGTG	GATT---TCTTATGCTATCT	TGCATTGCAAGCATTATATA	TATATA--GGTGCACCTAAGA	GTATCATCATATGTATGT--
ChenI1331	-----ATTC AATAGTGTG	GATT---TCTTATGCTATCT	TGCATTGCAAGCATTATATA	TATATA--GGTGCACCTAAGA	GTATCATCATATGTATGT--
Cpro4964	-----ATTC AATAGTGTG	GATT---TCTTATGCTATCT	TGCATTGCAAGCATTATATA	TATATA--GGTGCACCTAAGA	GTATCATCATATGTATGT--
Cama356	-----ATTC AATAGTGTG	GATT---TCTTATGCTATCT	TGCATTGCAAGCATTATATA	TATATA--GGTGCACCTAAGA	GTATCATCATATGTATGT--

Cfic5300	GCCATGACCCCTGGTCTAGT	GCATGAAATAATCTACGACT	TTTTT-GCACCCCA-TCTAG	T-AAACCCACACATGTATGT	AGGCCAAGATGCATTATTAT
Cqui1845	GCCATGACCCCTGGTCTAGT	GCATGAAATAATCTACGACT	TTTTT-GCACCCCA-TCTAG	T-AAACCCACACATGTATGT	AGGCCAAGATGCATTATTAT
Calb241	GCCATGACCCCTGGTCTAGT	GCATGAAATAATCTACGACT	TTTTT-GCACCCCA-TCTAG	T-AAACCCACACATGTATGT	AGGCCAAGATGCATTATTAT
Cber5407	GCGAC-----GCGAC	-----TAAAA-----CGTAC	C-GTTAGCCCATGGTCTGG	-----GCGAC-----CT	GGTGCATGAAAC--AATTTG
Cqui377	GCGAC-----GCGAC	-----TAAAA-----CGTAC	C-GTTAGCCCATGGTCTGG	-----GCGAC-----CT	GGTGCATGAAAC--ATCTTG
Cmis4784	GCGAGGACCCCTGGTGTGGT	GCATGAAATAATTTGCGTGT	TTGTT-GCACCCCT-GTCTAG	TG-AACCCATCCATGTATGT	AGGCCATGAATATGATGCTT
ChenI1331	GCGAGGACCCCTGGTGTGGT	GCATGAAATAATTTGCGTGT	TTGTT-GCACCCCT-GTCTAG	TG-AACCCATCCATGTATGT	AGGCCATGAATATGATGCTT
Cpro4964	GCGAGGACCCCTGGTGTGGT	GCATGAAATAATTTGCGTGT	TTGTT-GCACCCCT-GTCTAG	TG-AACCCATCCATGTATGT	AGGCCATGAATATGATGCTT
Cama356	GCGAGGACCCCTGGTGTGGT	GCATGAAATAATTTGCGTGT	TTGTT-GCACCCCT-GTCTAG	TG-AACCCATCCATGTATGT	AGGCCATGAATATGATGCTT
Cfic5300	ATCTTATTATACATACGCCA	CCGTATAGTATGCATTGATT	TAATATGATCAAACACTACTTA	AGGC-----	-----TTGAAGGCCA-
Cqui1845	ATCTTATTATACATACGCCA	CCGTATAGTATGCATTGATT	TAATATGATCAAACACTACTTA	AGGC-----	-----TTGAAGGCCA-
Calb241	ATCTTATTATACATACGCCA	CCGTATAGTATGCATTGATT	TAATATGATCAAACACTACTTA	AGGC-----	-----TTGAAGGCCA-
Cber5407	CGATTTATGTTGCATCCT---	-----GTCTG-AAAGACA	TAAAGTC-TGAAACTAAC-A	AGTGC-----	-----
Cqui377	CGATTTATGTTGCATCCT---	-----GTCTG-AAAGACA	TAAAGTC-TGAAACTAAC-A	AGTGC-----	-----
Cmis4784	AGCTTTATCATACTGATGCCA	TC-----GTATGCATTGATC	TAATATGATCAAACACTACTTA	AGGCCATAGCTTGAGATGAT	AATAAAAAATAGAAGGATAA
ChenI1331	AGCTTTATCATACTGATGCCA	TC-----GTATGCATTGATC	TAATATGATCAAACACTACTTA	AGGCCATAGCTTGAGATGAT	AATAAAAAATAGAAGGATAA
Cpro4964	AGCTTTATCATACTGATGCCA	TC-----GTATGCATTGATC	TAATATGATCAAACACTACTTA	AGGCCATAGCTTGAGATGAT	AA-----ATAGAAGGATAA
Cama356	AGCTTTATCATACTGATGCCA	TC-----GTATGCATTGATC	TAATATGATCAAACACTACTTA	AGGCCATAGCTTGAGATGAT	AA-----ATAGAAGGATAA
Cfic5300	TATAGGTTGAGA-----	-----TATTAA-GA	AATAGAAG--GAGAATACA	--GTG-----	-----
Cqui1845	TATAGGTTGAGA-----	-----TATTAA-GA	AATAGAAG--GAGAATACA	--GTG-----	-----
Calb241	TATAGGTTGAGA-----	-----TATTAA-GA	AATAGAAG--GAGAATACA	--GTG-----	-----
Cber5407	-----GATTGAGGA--GAAA	-----GATTGAGGA--GAAA	-----GATTGAGGA--GAAA	-----GAG	AGAGAGAGATGAATATAATT
Cqui377	-----GATTGAGGA--GAAA	-----GATTGAGGA--GAAA	-----GATTGAGGA--GAAA	-----GAG	AGAGAGAGATGAATATAATT
Cmis4784	TACAGTGTAGAGCTAATAT	GTGCATGCAGCTATTAAGA	GATTGAGGACTGAGAATTGA	AAGTGAGAAATATCATT---	-----AATT
ChenI1331	TACAGTGTAGAGCTAATAT	GTGCATGCAGCTATTAAGA	GATTGAGGACTGAGAATTGA	AAGTGAGAAATATCATT---	-----AATT
Cpro4964	TACAGTGTAGAGCTAATAT	GTGCATGCAGCTATTAAGA	GATTGAGGACTGAGAATTGA	AAGTGAGAAATATCATT---	-----AATT
Cama356	TACAGTGTAGAGCTAATAT	GTGCATGCAGCTATTAAGA	GATTGAGGACTGAGAATTGA	AAGTGAGAAATATCATT---	-----AATT
Cfic5300	-----TTAGCTGTACTGTT	TATGCC-----	-----TTAGCTGTACTGTT	-----TTAGCTGTACTGTT	-----TTTCTAATTGTCTACT
Cqui1845	-----TTAGCTGTACTGTT	TATGCC-----	-----TTAGCTGTACTGTT	-----TTAGCTGTACTGTT	-----TTTCTAATTGTCTACT
Calb241	-----TTAGCTGTACTGTT	TATGCC-----	-----TTAGCTGTACTGTT	-----TTAGCTGTACTGTT	-----TTTCTAATTGTCTACT
Cber5407	GGATA-----	-----	-----TTTAGCTGTTT-A	-----TTTAGCTGTTT-A	TGCA-TTCTAATTTTCTACT
Cqui377	GGATA-----	-----	-----TTTAGCTGTTT-A	-----TTTAGCTGTTT-A	TGCA-TTCTAATTTTCTACT
Cmis4784	GGACATTTAGCTGTATTGTT	TAAGCCGGCCCTCTTATGG	GATTAAAGGCTCTGATTGATT	GATTTAGTTGACTTTTTT-A	TGCA-TTCTAATTT-CTACT
ChenI1331	GGACATTTAGCTGTATTGTT	TAAGCCGGCCCTCTTATGG	GATTAAAGGCTCTGATTGATT	GATTTAGTTGACTTTTTT-A	TGCA-TTCTAATTT-CTACT
Cpro4964	GGACATTTAGCTGTATTGTT	TAAGCCGGCCCTCTTATGG	GATTAAAGGCTCTGATTGATT	GATTTAGTTGACTTTTTT-A	TGCA-TTCTAATTT-CTACT
Cama356	GGACATTTAGCTGTATTGTT	TAAGCCGGCCCTCTTATGG	GATTAAAGGCTCTGATTGATT	GATTTAGTTGACTTTTTT-A	TGCA-TTCTAATTT-CTACT
Cfic5300	ACTACATATTTTAAAGTCA	ATATAT-----AAGCCAT	AACCATATATGAAAGATTAT	CTTATTACAAGTGTGTGTGT	TTTTGCC--TTATTAGGATAT
Cqui1845	ACTACATATTTTAAAGTCA	ATATAT-----AAGCCAT	AACCATATATGAAAGATTAT	CTTATTACAAGTGTGTGTGT	TTTTGCC--TTATTAGGATAT
Calb241	ACTACATATTTTAAAGTCA	ATATAT-----AAGCCAT	AACCATATATGAAAGATTAT	CTTATTACAAGTGTGTGTGT	TTTTGCC--TTATTAGGATAT
Cber5407	AC-----TATATGTTT--AAGTCCAT	-----TATATGTTT--AAGTCCAT	AA---TTATGAAAGATAAAA	CGTATTACAAGTGTGTGTGT	TTTTGCC--TTATTAGGTTAT
Cqui377	AC-----TATATGTTT--AAGTCCAT	-----TATATGTTT--AAGTCCAT	AA---TTATGAAAGATAAAA	CGTATTACAAGTGTGTGTGT	TTTTGCC--TTATTAGGTTAT
Cmis4784	AC-----TATATGTTT--AGTCCAT	-----TATATGTTT--AGTCCAT	AA---TTATGAAAGATTAT	CATGTTACAAGTGTGTGTGT	TTTTGCC--TTATTAGGTTAT
ChenI1331	AC-----TATATGTTT--AGTCCAT	-----TATATGTTT--AGTCCAT	AA---TTATGAAAGATTAT	CATGTTACAAGTGTGTGTGT	TTTTGCC--TTATTAGGTTAT
Cpro4964	AC-----TATATGTTT--AGTCCAT	-----TATATGTTT--AGTCCAT	AA---TTATGAAAGATTAT	CATGTTACAAGTGTGTGTGT	TTTTGCC--TTATTAGGTTAT
Cama356	AC-----TATATGTTT--AGTCCAT	-----TATATGTTT--AGTCCAT	AA---TTATGAAAGATTAT	CATGTTACAAGTGTGTGTGT	TTTTGCC--TTATTAGGTTAT
Cfic5300	TTCTTCTGATTGT--GTAA--	--CAATAAGGGAGTTT-GTA	TACATGTTA-TTTTT--GC	AC-AAGATCAAT-GATACAG	GTGACTATTA--GAA--CA
Cqui1845	TTCTTCTGATTGT--GTAA--	--CAATAAGGGAGTTT-GTA	TACATGTTA-TTTTT--GC	AC-AAGATCAAT-GATACAG	GTGACTATTA--GAA--CA
Calb241	TTCTTCTGATTGT--GTAA--	--CAATAAGGGAGTTT-GTA	TACATGTTA-TTTTT--GC	AC-AA-ATCAAT-GATACGG	G-TGACTATTA--GAA--CA
Cber5407	TTCTTCTGCTTGT--GTAA--	--CTATGAGGGAGTTT-GTA	TTTATAGTCTTTTTT--GC	AC-AAGATCAAT--GGTACAA	GTGACTATTAAG--CCA
Cqui377	TTCTTCTGCTTGT--GTAA--	--CTATGAGGGAGTTT-GTA	TTTATAGTCTTTTTT--GC	CC-AAGATCA-T-GGTACAA	GTGACTATTAAG--CCC
Cmis4784	TTCTTCTGCTTGT--GTAAA	AA---TGAGGGATTTTG-TA	TGTATAGTTT-TTTTT--GGC	AC-AAGATCAAT-GATTCAG	GTGACTATTAFAA--CA
ChenI1331	TTCTTCTGCTTGT--GTAAA	AA---TGAGGGATTTTG-TA	TGTATAGTTT-TTTTT--GGC	AC-AAGATCAAT-GATTCAG	GTGACTATTAFAA--CA
Cpro4964	TTCTTCTGCTTGT--GTAAA	AA---TGAGGGATTTTG-TA	TGTATAGTTT-TTTTT--GGC	AC-AAGATCAAT-GATTCAG	GTGACTATTAFAA--CA
Cama356	TTCTTCTGCTTGT--GTAAA	A---TGAGG-ATTTT-GTA	TGTATAGTTT-TTTTT--GGC	ACCAAGATCAATGATTCAG	GTGACTATTAFAA--CA
Cfic5300	AAA-GGTAGG-----AGTA	GTTC-AA-----TCCC	-TCCCTTTTGTATTATTTGT	ACC-AATAATGAGTTGATCA	TATGGGG---GTATTCAT-
Cqui1845	AAA-GGTAGG-----AGTA	GTTC-AA-----TCCC	-TCCCTTTTGTATTATTTGT	ACC-AATAATGAGTTGATCA	TATGGGG---GTATTCAT-
Calb241	AAA-GGTAGG-----AGTA	GTTC-AA-----TCCC	-TCCCTTTTGTATTATTTGT	ACC-AATAATGAGTTGATCA	TATGGGG---GTATTCAT-
Cber5407	AA--GGAACGAG-CTGAGTA	GTTC-AA-----TCCC	-TCTCTTTTGTCTTTTGT	ACC-AATAATGAGTTGATCA	TATGG---GTATTCAT-
Cqui377	AA--GGAACGAGGCTGAGTA	GTTC-AAACTTCCAAATCCC	-TCTCTTTT-GTTCTTTAGT	ACC-AATAATGAGTTGATCA	TA-GG-----GTATTCAT
Cmis4784	AAA-GGAACG-----AGTA	GCTCC-AA-----TCCC	-TCTCTTTTGTCTTTTGT	ACC-AATAATGAGTTGATCA	TATGGGATCCGATATCCATT
ChenI1331	AAC-GGAATG-----AGTA	GCTCC-AA-----TCCC	-TCTCTTTTGTCTTTTGT	ACT-AATAATGAGTTGATCA	TATGGGATCCGATATCCATT
Cpro4964	AAC-GGAATG-----AGTA	GCTCC-AA-----TCCC	-TCTCTTTTGTCTTTTGT	ACC-AATAATGAGTTGATCA	TATGGGATCCGATATCCATT
Cama356	AACCGGAACG-----AGTA	GCTCCAA-----TCCC	CTCTCTTTTGTCTTTTGT	ACCCAAATGAGTTGATCA	TATGGGATCCGATATCCATT
Cfic5300	-AA---ATGTTCTAGCTA	----TTATTGATCACTCG--	--TGCATCTCTAC-TCCT	CTTGTATATATATAGAGTAG	GGGTATATGATTATAAATCT
Cqui1845	-AA---ATGTTCTAGCTA	----TTATTGATCACTCG--	--TGCATCTCTAC-TCCT	CTTGTATATATATAGAGTAG	GGGTATATGATTATAAATCT
Calb241	-AAATAATGTTCTAGCTA	----TTATTGATCACTCG--	--GCATCCCTCTACCTCT	CTGGTCATATATAGAGTAG	GGGTATATGATTATAAATCT
Cber5407	T-----ATGTTCTAGCTA	GCAATTTATGATCACTCGCG	TGTGATCTCTCTAG-TCCT	CTTGTATATTA--GAGTAG	GGGTATATAAATATAAATCT
Cqui377	-----ATGTTCCGTTCCTA	GCAATTTATGATCACTCGCG	TGTGATCTCTCTAG-TCCT	CTGGTCATATTA--GAGTAG	GGGTATATAAATATAAATCT
Cmis4784	G-----ATGGTC-CTAGCTA	GCCATTATCGATCACTCGC	-----GCATCCCTCT	--TGTCATATATGAAGTAG	GGGTATATGATTATAA--GCT
ChenI1331	G-----ATGGTC-CTAGCTA	GCCATTATCGATCACTCGC	-----GCATCCCTCT	--TGTCATATATGAAGTAG	GGGTATATGATTATAA--GCT
Cpro4964	G-----ATGGTC-CTAGCTA	GCCATTATCGATCACTCGC	-----GCATCCCTCT	--TGTCATATATGAAGTAG	GGGTATATGATTATAA--GCT
Cama356	G-----ATGGTC-CTAGCTA	GCCATTATCGATCACTCGC	-----GCATCCCTCT	--TGTCATATATGAAGTAG	GGGTATATGATTATAA--GCT
Cfic5300	CGAATTGCGTACGATTAAT-	AGTACC-AAGCGACAAAAG	AGAGAATTAATTTG-----	-----AAAAA	-----TAAGATCTAC
Cqui1845	CGAATTGCGTACGATTAAT-	AGTACC-AAGCGACAAAAG	AGAGAATTAATTTG-----	-----AAAAA	-----TAAGATCTAC
Calb241	CGAATTGCGTACGATTAAT-	AGTACC-AAGCGACAAAAG	AGAGAATTAATTTG-----	-----AAAAA	-----TAAGATCTAC
Cber5407	CGAATTGCGTACGATTAAT-	AGTACC-AAGCGACAAAAG	AGAGAATTAATTTG-----	-----AAAAA	-----TAAGATCTAC
Cqui377	CGAATTGCGTACGATTAAT-	AGTACC-AAGCGACAAAAG	AGAGAATTAATTTG-----	-----AAAAA	-----TAAGATCTAC
Cmis4784	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
ChenI1331	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
Cpro4964	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
Cama356	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
Cfic5300	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
Cqui1845	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
Calb241	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
Cber5407	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
Cqui377	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
Cmis4784	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
ChenI1331	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
Cpro4964	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----
Cama356	AGTATTGCGTACGATTAAT-	AGTATT-AAGGGACGAAAAG	AGAGAATTAATTTGATTTT	TTTTTTTTTTT	-----

Cfic5300	ACCAAAATTAAACTTGTT	GTAGCGGTTTTACCGAGGAC	CTATTGAAATGAACCCCTGTA	CTCTGAATATGAGGAAA---	TTTTTTTTTGGTATA----
Cqui1845	ACCAA-----AACTTGTT	GTAGCAGTTTTACCGAGGAC	CTATTGAAATGAACCCCTGTA	CTCTGAATATGAGGAAA---	TTTTTTTTTGGTATACTAGT
Calb241	ACCAA-----AACTTGTT	GTAGCAGTTTTACCGAGGAC	CTATTGAAATGAACCCCTGTA	TTCTGAATATGAGGAAAAA	---TTTTTTGGTATACTAGT
Cber5407	-----ACCGA---	GTAT-----	CTACTGAAATGGGCCCTGTA	TTTTGAATGTGAGGAAAGA-	TTTTTTTTTGGTAAACTAAT
Cqui377	-----ACCGA---	GTAT-----	CTACTGAAATGGGCCCTGTA	TTTTGAATGTGAGGAAAGA-	TTTTTTTTTGGTAAACTAAT
Cmis4784	-----ACCTTCAT	G-----	CTAGACAAAAGTGCACACTT	GTCT--ACATGAGTGA----	-----TAAGTAA-----
ChenI1331	-----ACCTTCAT	G-----	CTAGACAAAAGTGCACACTT	GTCT--ACATGAGTGA----	-----TAAGTAA-----
Cpro4964	-----ACCTTTTAT	G-----	CTAGACAAAAGTGCACACTT	GTCT--ACATGAGTGA----	-----TAAGTAA-----
Cama356	-----ACCTTCAT	G-----	CTAGACAAAAGTGCACACTT	GTCT--ACATGAGTGA----	-----TAAGTAA-----
Cfic5300	-----TTCA	TGCTAGACAAGAGTGTGTAC	TTGTCTACACAAGTGATTGA	TAAGTCTTGCTACTCATATA	AATATA-----T
Cqui1845	AGGTGGTGATCTGACCTTCA	TGCTAGACGAAAGTGTGTAC	TTGTCTACACAAGTGATTGA	TGAGTCTTGCTACTCATATA	AATATA-----T
Calb241	AGGTGGTGATCTGACCTTCA	TGCTAGACAAAAGTGTGTAC	TTGTCTACACAAGTGATTGA	TAAGTCTTGCTACTCATATA	AATATA-----T
Cber5407	AGGTGGTGAT--GACCTTCA	TGCTAGACAAAAGTTTAAA-	-----	-----TA	AATATATTTGTGTAATGCAT
Cqui377	AGGTGGTGAT--GACCTTCA	TGCTAGACAAAAGTTTAAA-	-----	-----TA	AATATATTTGTGTAATGCAT
Cmis4784	-----TACT	T-CGAGACGA-AGTATTACT	AGA-----	-----	---ATATCTTAGTAATGCAT
ChenI1331	-----TACT	T-CGAGACGA-AGTATTACT	AGA-----	-----	---ATATCTTAGTAATGCAT
Cpro4964	-----TACT	T-CGAGACGA-AGTATTACT	AGA-----	-----	---ATATCTTAGTAATGCAT
Cama356	-----TACT	T-CGAGACGA-AGTATTACT	AGA-----	-----	---ATATCTTAGTAATGCAT
Cfic5300	GTAACCAACAAGTTGTGTGG	TGCACGTGGTCCGCTA-GCT	AGG-----CCACTAGGGT	TCATCACATAAATCCACAAG	TGCA-TTCATCA--TAGACT
Cqui1845	GTAACCAACAAGATGTGTGG	TGCATGTGGTCCGCTA-GCT	AGG-----CCACTAGGGT	TCATCACGTAATTCACAAG	TGCA-TTCATCA--TAGACT
Calb241	GTAACCAACAAGATGTGTGG	TGCACGTGGTCCGCTA-GCT	AGG-----CCACTAGG-T	TCATCACATAAATCCACAAG	TGCA-TTCATCA--TAGACT
Cber5407	GTAACCAACAAGATGTGTGG	TGCACATGGTCCGCTAAGCT	AG---CTAGGCCGCTAGGGT	TCATCACACAATTCACAAG	TGCA-TTTATCA--TAGACT
Cqui377	GTAACCAACAAGACGTGTGG	TGCACATGGTCCGCTAAGCT	AG---CTAGGCCGCTAGGGT	TCATCACACAATTCACAAG	TGCA-TTTATCA--TAGACT
Cmis4784	GTAACCAACAAGATGTGTGG	TGCACGTGGTGGTTA-GCT	AGGCCACTAG---CTAGGGT	TCATCACA--TTTCACAAG	TGCAATT--ACATATAGGCT
ChenI1331	GTAACCAACAAGATGTGTGG	TGCATGTGGTGGTTA-GCT	AGGCCACTAG---CTAGGGT	TCATCACA--TTTCACAAG	TGCAATT--ACATATAGGCT
Cpro4964	GTAACCAACAAGATGTGTGG	TGCATGTGGTGGTTA-GCT	AGGCCACTAG---CTAGGGT	TCATCACA--TTTCACAAG	CGCAATT--ACATATAGGCT
Cama356	GTAACCAACAAGATGTGTGG	TGCATGTGGTGGTTA-GCT	AGGCCACTAG---CTAGGGT	TCATCACA--TTTCACAAG	TGCAATT--ACATATAGGCT
Cfic5300	CTCATATTATTTA-----	----T-TT-----	--ATACT--CACT-AAG--T	TTATTTCTACCATTCTTTGT	TTAG
Cqui1845	CTCAATTATTTA-----GGG	GG---T-TT-----	--ATACT--CACT-AAG--T	TTATTTCTACCATTCTTTGT	TTAG
Calb241	CTCAATTATTTA-----	----T-TT-----	--ATACT--CACT-AAG--T	TTATTTCTACCATTCTTTGT	TTAG
Cber5407	CTCAATTATTTAGTTTG---	--TCAT-TGCATTGGATGAT	CAATACT--CACTCAAGGTT	TTTTATCTACTATTCTTTGT	TTAG
Cqui377	CTCAATTATTTAGTTTG---	--TCAT-TGCATTGGATGAT	CAATACT--CACTCAAGGTT	TTTTATCTACTATTCTTTGT	TTAG
Cmis4784	CTCAATTATTTATTTTG---	--TCAT-TGCATTGGATGAT	GAATACTCTCACTCAAGGTT	TTATTTCCACCATTCTTTGT	TTAG
ChenI1331	CTCAATTATTTATTTTG---	--TCAT-TGCATTGGATGAT	GAATACTCTCACTCAAGGTT	TTATTTCCACCATTCTTTGT	TTAG
Cpro4964	CTCAATTATTTATTTTG---	--TCAT-TGCATTGGATGAT	GAATACTCTCACTCAAGGTT	TTATTTCCACCATTCTTTGT	TTAG
Cama356	CTCAATTATTTATTTTG---	--TCAT-TGCATTGGATGAT	GAATACTCTCACTCAAGGTT	TTATTTCCACCATTCTTTGT	TTAG