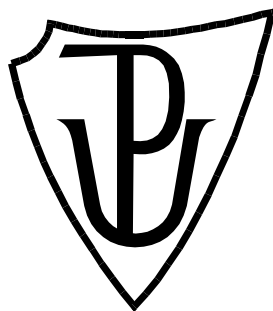


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Postavení trichomů vůči listu jako důležitý
agronomický znak
sója luštinaté *Glycine max* [L.] Merr.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Šárka Škrobánková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Chtěla bych poděkovat své vedoucí Mgr. Márii Škrabišové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady, skvělou komunikaci a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce. Děkuji za grantovou podporu projektu IGA_PrF_2020_013.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Šárka Škrobánková
Název práce	Postavení trichomů vůči listu jako důležitý agronomický znak sóji luštinaté <i>Glycine max</i> [L.] Merr.
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Bakalářská práce je věnována morfologickým znakům sóji luštinaté (*Glycine max*), konkrétně hustotě trichomů a postavení trichomů vůči listu. V teoretické části práce je stručně představena sója luštinatá a následně jsou popsány trichomy se zaměřením na sóju. Dále je zmíněn vývoj, vlastnosti a přínos trichomů pro rostliny a jejich důležitost při pěstování sóji. Cílem praktické části je předpovědět a ověřit kandidátní geny pro postavení trichomů vůči listu. Pomocí veřejně přístupných internetových nástrojů byla zpracována data, která vedla k ověření kandidátních genů na chromosomu 12, kde je přítomna alela *Pa1* a chromosomu 13, kde se nachází alela *Pa2*. Tyto dvě alely jsou zodpovědné za fenotypový projev postavení trichomů vůči listu. Pro chromosom 12 jsou potenciálními kandidátními geny *Glyma.12g213800* a *Glyma.12g213900* a pro chromosom 13 je kandidátním genem *Glyma.13g204900*.

Klíčová slova	Sója luštinatá, <i>Glycine max</i> , trichomy, postavení trichomů vůči listu, přirozená genetická variabilita, bioinformatické nástroje
Počet stran	65
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Šárka Škrobánková
Title	Pubescence formation as an important agronomical trait of soybean <i>Glycine max</i> [L.] Merr.
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

This bachelor thesis is devoted to morphological traits of soybean (*Glycine max*) specified on trichome density and trichome formation. Theoretical part of the thesis gives brief introduction of information about soybean and its trichomes. Development, features, and benefits of trichomes are mentioned next. The goal of practical part is to predict and verify candidate genes responsible for trichome formation. Data were analyzed by online bioinformatics tools with aim to verify candidate genes on chromosome 12, where *Pa1* allele is located and on chromosome 13, where is located *Pa2* allele. These two alleles are responsible for trichome formation. *Glyma.12g213800* and *Glyma.12g213900* are possible candidate genes for chromosome 12 and *Glyma.13g204900* is candidate gene for chromosome 13.

Keywords	Soybean, <i>Glycine max</i> , trichomes, trichome formation, natural genetic variation, bioinformatics tools
Number of pages	65
Number of appendices	1
Language	Czech

OBSAH

1 Úvod	9
2 Současný stav řešené problematiky	10
2.1 Sója luštinatá (<i>Glycine max</i>)	10
2.1.1 Ostatní morfologické znaky	13
2.2 Trichomy	14
2.2.1 Vývoj trichomů	15
2.2.2 Trichomy jako obrana proti škůdcům	18
2.2.3 Vliv trichomů na výpar vody	19
2.2.4 Vliv hustoty a morfologie trichomů na albedo plodin	19
2.2.5 Hustota trichomů	20
2.2.6 Ostatní morfologické znaky trichomů u sóji	24
2.2.7 Postavení trichomů vůči listu	25
2.2.8. Markery pro konkrétní fenotypy trichomů jako součást genotypizace důležitých agronomických znaků sóji	30
2.3 Morfologie trichomů jako důležitý agronomický znak u plodin	30
2.4 Přirozená genetická variabilita	31
2.4.1 Variabilita počtu kopií segmentu DNA	32
2.5 GWAS	34
3 Experimentální část A	35
3.1 Nástroj pro vyhledávání korespondence mezi genomovými modely	35
3.2 NCBI Genome Remapping Service (nástroj pro mapování mezi jednotlivými verzemi poskládání genomu)	35
3.3 AccuTool	36
3.4 NCBI Primer-BLAST	36
3.5 SNPviz (verze 2.0)	36
4 Výsledky a diskuse A	38
4.1 Určení regionu výskytu kandidátních genů	38
4.2 Určení kandidátních genů	40
4.3 Návrh primerů	48
5 Experimentální část B	50
5.1 Biologický materiál	50
5.2 Chemikálie	50
5.3 Přístroje a vybavení	50

5.4	Roztoky	50
5.5	Reagencie pro molekulární biologii	51
5.6	Metody	51
5.6.1	Whatman® FTA® karty	51
5.6.2	Polymerázová řetězová reakce	51
5.6.3	Elektroforéza na agarosovém gelu	52
5.6.4	Sangerovo sekvenování	53
5.7	Provedené experimenty	53
5.7.1	Izolace genomové DNA	53
5.7.2	PCR	54
5.7.3	Agarosová elektroforéza	55
6	Výsledky a diskuse B	56
7	Závěr	57
8	Literatura	58
9	Seznam použitých symbolů a zkratk	63
10	Přílohy	65

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

Teoretická část je věnována rešerši na téma morfologie trichomů jako důležitý agronomický znak sóji luštinaté. Především je zaměřena na hustotu trichomů a postavení trichomů vůči listu. Dále objasňuje přínos trichomů pro rostlinu a popisuje přirozenou genetickou variabilitu v souvislosti s trichomy sóji.

Praktická část:

Praktická část bakalářské práce se týká určení kandidátních genů zodpovědných za vzpřímený/částečně přilehlý/přilehlý fenotyp postavení trichomů vůči listu.

1 ÚVOD

Sója luštinatá (*Glycine max*) je celosvětově rozšířenou plodinou pocházející z Asie, jež se řadí mezi luštěniny, které jsou bohaté na proteiny. Je hodnotnou potravinou také díky velkému množství oleje. Různé kultivary sóji jsou šlechtěny a jsou neustále vylepšovány jejich vlastnosti, jako například odolnost vůči biotickým či abiotickým vlivům a další agronomicky důležité znaky.

Trichomy jsou epidermální výrostky pokrývající téměř celý povrch rostliny, u kterých je sledováno několik znaků, jako jejich hustota, postavení vůči listu, pigmentace, zakroucení atd. Jsou pro rostlinu přínosné zejména jako obrana proti škůdcům a nadbytečnému výparu vody. Využitím trichomů, jako přirozené obrany rostlin proti parazitům, by mohlo být dosaženo menší spotřeby pesticidů používaných v zemědělství. Kultivary sóji s hustším porostem trichomů vykazují vyšší rezistivitu proti škodlivému hmyzu, než rostliny s řidším porostem trichomů nebo lysé kultivary. Rostliny s hustším porostem trichomů také účinněji zadržují vodu, kdy nedochází k nadměrné evaporaci, což je přínosné pro pěstování plodin v suchých oblastech, aniž by byl snížen výnos (Gorashy *et al.*, 1971). Trichomy také ovlivňují albedo neboli odrazivost slunečních paprsků od povrchu listů. Může se jednat o jeden z dílčích faktorů při řešení klimatické krize (Doughty *et al.*, 2011).

Z hlediska hustoty trichomů je rozlišováno šest fenotypů, a to fenotyp hustý, částečně hustý, normální, částečně řídký, řídký a lysý. Byly identifikovány tři alely, *Pd1* na chromosomu 1, *Ps* na chromosomu 12 a *Pl* na chromosomu 9, zodpovědné za hustotu trichomů (Liu *et al.*, 2020). Pro postavení trichomů vůči listu jsou rozlišovány tři základní fenotypy – vzpřímený, částečně přilehlý a přilehlý. Alely *Pal* a *Pa2* podmiňující tento fenotyp jsou přítomny na chromozomech 12 a 13 (Gilbert, 2017).

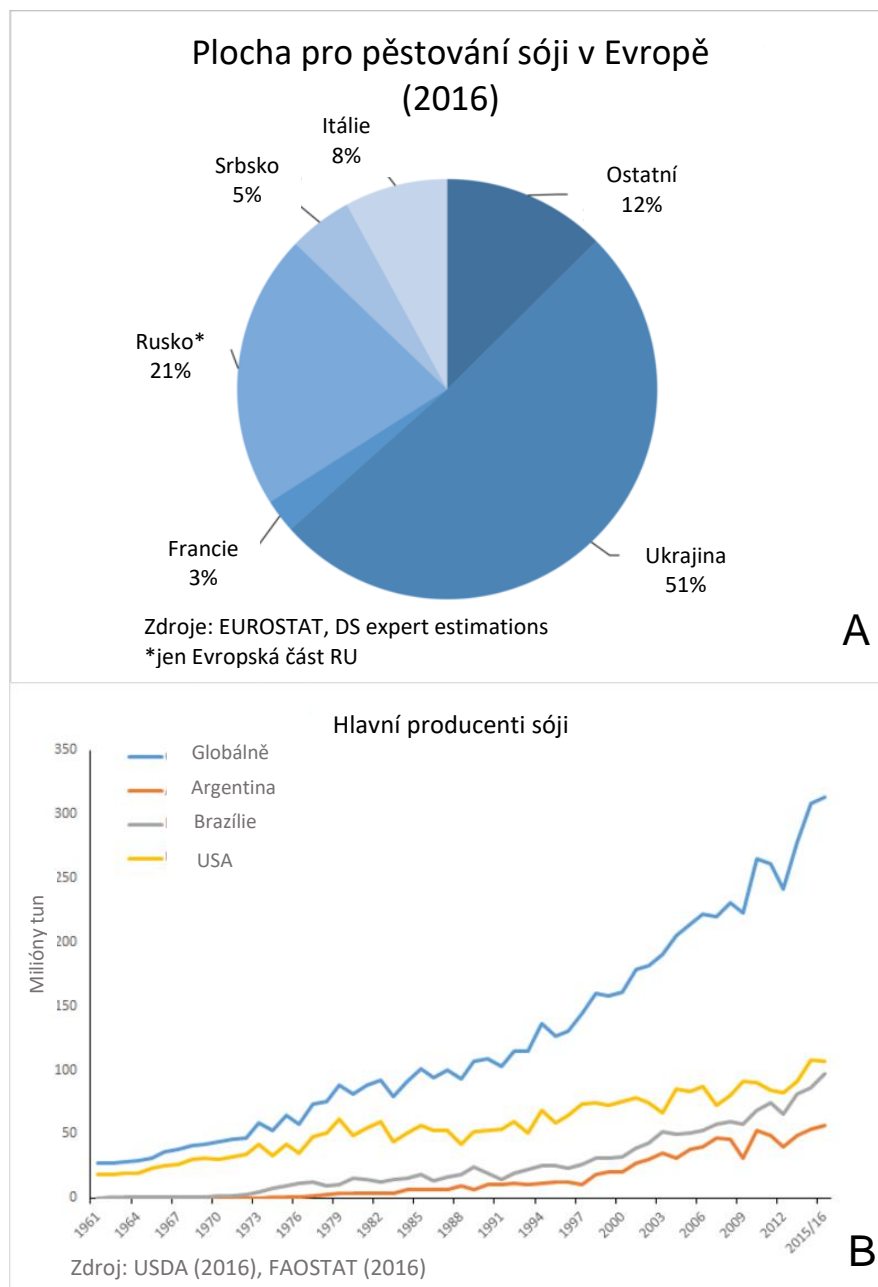
Pro přiřazení konkrétního znaku k části genomu je využívána metoda asociace genotypu na fenotyp (GWAS, genome-wide association study), pomocí které je možné identifikovat mutaci v konkrétním genu zodpovědnou za určitý fenotypový projev. Jelikož je práce s velkými genomickými daty náročná, slouží k manipulaci bioinformatické nástroje, kterých je však nedostatek. Nástroje, díky kterým lze predikce kandidátních genů zásadně zpřesnit, jsou vyvíjeny v rámci spolupráce skupiny genomiky luštěnin katedry biochemie s kolegy z University of Missouri.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Sója luštinatá (*Glycine max*)

Sója luštinatá je dvouděložná samosprašná jednoletá rostlina z čeledi bobovitých. Je hospodářsky významnou plodinou a své využití nachází v celé řadě potravinářských, krmivářských a průmyslových oblastí. Jedinečnost sóji spočívá ve schopnosti rozdělit tok uhlíku směrem k proteinu a oleji, a proto se jedná o jednu z nejhodnotnějších olejnin a také luštěnin vzhledem k vysokému obsahu proteinů (Mathieu *et al.*, 2008).

Sója pochází z jihovýchodní Asie a první zmínka o této plodině byla zaznamenána již před 2500 lety, kdy se jednalo o druh *Glycine gracilis*. Na konci 17. století se začala pěstovat i v Evropě. V posledních letech je sója nejhojněji pěstována v Severní i Jižní Americe (USA, Brazílie, Argentina) a v Asii (Čína, Indie) (Pagano a Miransari, 2016; Terzić *et al.*, 2018). Poptávka po sóji se však neustále zvyšuje, a proto je již poslední tři desetiletí snaha o pěstování po celém světě (Obr. 1). Roku 2016 zabírala v Evropské unii sója asi 11 % plochy, na které byla pěstována kukuřice. I tento malý podíl naznačoval velký potenciál pro expanzi sóji v Evropě (Obr. 1). Vzhledem k neustále rostoucí světové populaci, je očekáván v budoucnosti problém se zásobami potravy pro lidstvo, jelikož je v roce 2050 predikováno překročení hranice 9,6 miliard obyvatel na Zemi (Varshney *et al.*, 2013). Řešením tohoto problému by mohla být právě zvýšená produkce sóji, která v sušině obsahuje asi 40 % bílkovin a 21 % oleje (Chaudhary *et al.*, 2015).



Obr. 1 Plocha pro produkci sóji v Evropě (A) a hlavní producenti sóji na světě (B) pro rok 2016. (Převzato a upraveno z donausoja.org)

Rakouská organizace Donau Soja (www.donausoja.org) podporuje postupné změny při řešení sociálních, environmentálních a ekonomických nedostatků v produkci a spotřebě sóji. Jejich cílem je zvýšit účinnost, férovost a udržitelnost produkce ne-GMO (bez genetické modifikace, non-GMO) v Evropském potravinářství a krmivářství. Dále je cílem organizace podporovat regionální pěstování sóji, avšak za definovaných podmínek kvality.

Donau Soja uvádí, že nahrazením živočišných produktů sójovými produkty, by měla klesnout produkce skleníkových plynů až o 41 %. Byl proveden výzkum pro

krmivo lososů, kdy byli norští lososi krmeni certifikovaným Europe Soya SPC (Soy Protein Concentrate) krmivem. Následně proběhlo srovnání s daty z Brazílie, kde je používáno výchozí SPC krmivo pro lososy. Krmením směsí SPC certifikovanou Europe Soya bylo dosaženo o 41 % méně CO₂ emisí než při krmení brazilským výchozím SPC (Research institute of Organic Agriculture (FiBL) in Austria and Footprint-consult; www.feednavigator.com; www.donausoya.org).

Sója luštinatá pěstovaná a konzumovaná jako zelenina má název edamame. Tato speciální varieta sóji je oblíbená již několik stovek let v jihovýchodní Asii (Johnson *et al.*, 2000). V dnešní době získává popularitu i na ostatních kontinentech. Jedná se o neúplně zralou podobu lusků sóji, kde jsou konzumována semena, která nedosáhla konečného stadia zralosti – stádium R7.1 (Pereira Lima *et al.*, 2017). Stejně jako sója v klasické podobě je i tato forma bohatá na bílkoviny a vysoce výživná (Konovsky *et al.*, 1994; Born, 2006). Edamame je prodáváno v luscích, které musí splňovat určité požadavky, jako je jasně zelená barva lusků, minimum dvou semen na lusk a celková neporušenost lusků (Johnson *et al.*, 2000).

Aroma edamame hraje významnou roli při preferenci spotřebitele a může tak podmiňovat vyšší cenu potraviny. Předpokládá se, že příjemná vůně je způsobena přítomností 2AP (2-acetyl-1-pyrrolinu) díky neaktivní formě enzymu AMADH (aminoaldehyd dehydrogenasa, EC 1.2.1.19). Byly identifikovány dva geny *GmAMADH1* a *GmAMADH2*, které jsou homologní s genem kódujícím AMADH v rýži. Exprese genu *GmAMADH1* byla stejná u aromatické i nearomatické variety, ale u genu *GmAMADH2* byla nalezena mutace (delece TT), která posouvá čtecí rámeček a způsobuje předčasný stop kodon. Nedostatek produktu *GmAMADH2*, tedy AMADH podporuje biosyntézu 2AP, což způsobuje požadované aroma. Přírodně se vyskytující varieta s touto mutací se nazývá Kouri (Arikita *et al.*, 2011). Tato varieta má lusky pokryté světle žlutohnědými částečně přilehlými trichomy (kitazawaseed.com). Z hlediska hustoty trichomů se u Kouri jedná o částečně hustý až normální fenotyp (Obr. 2).

Spotřebitelé by byly zřejmě lépe vnímány variety edamame bez trichomů, a proto je důležité znát veškeré faktory ovlivňující vývoj trichomů u sóji.



Obr. 2 Varieta Kouri se světle žlutohnědými, částečně přilehlými trichomy. Porost trichomů je normální až hustý. (foto: M. Škrabišová)

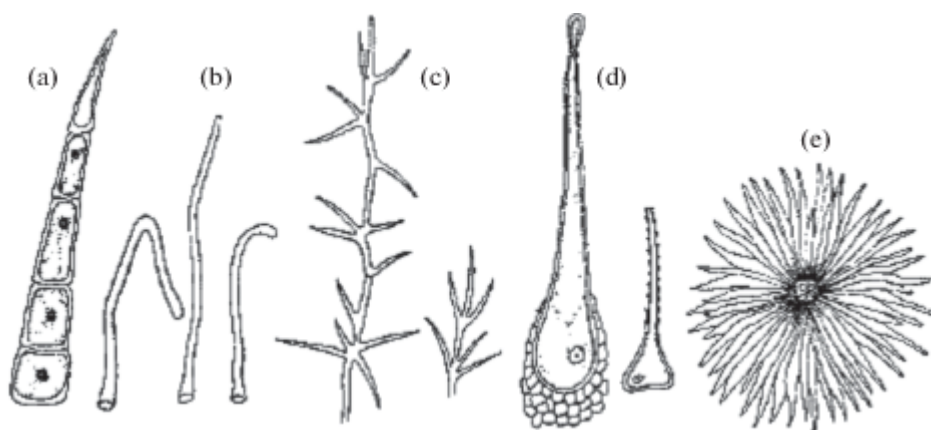
2.1.1 Ostatní morfologické znaky

Morfologické znaky sóji se dělí na kvalitativní (např. morfologické znaky nebo rezistence vůči patogenům) a kvantitativní (obsah proteinů, zastoupení mastných kyselin, obsah alergenních látek, doba kvetení, počet lusků na rostlinu, hmotnost semen na rostlinu, hmotnost sta semen atd.).

Některé morfologické znaky mohou být děděny společně, jako například úzké listy a 4 semena v lusku (Jeong *et al.*, 2011) nebo pigmentace trichomů a vyšší odolnost vůči chladu (Kurosaki *et al.*, 2004). Skupina Iqbal *et al.* (2010) objevila korelaci mezi časovou náročností dospívání rostliny, počtem lusků na rostlinu, počtem větví na rostlinu a výnosem semen.

2.2 Trichomy

Trichomy jsou epidermální výrostky, které se vyskytují na mnoha rostlinných orgánech, jsou morfologicky velmi rozmanité a mohou plnit různou funkci. Trichomy dělíme na jednobuněčné a mnohobuněčné, žláznaté a nežláznaté a také jednoduché a větvené (Obr. 3). Žláznaté i nežláznaté trichomy jsou pro rostliny přínosnou obranou proti býložravcům nebo škůdcům. Žláznaté trichomy však mohou být účinnější díky obsahu sekundárních metabolitů, které se při poškození rostliny vylučují (Bickford, 2016, Khan *et al.*, 2013).



Obr. 3 Typy trichomů: jednoduché mnohobuněčné (a, c), jednoduché jednobuněčné (b), žláznaté (d), jednoduché rozvětvené, tzv. hvězdčité (e). (převzato z Shvachko *et al.*, 2020)

Nežláznaté trichomy jsou zakončeny zúžením do špičky, kdežto apikální část žláznatého trichomu se zužuje a je zakončena hlavičkou. Hlavička může být pokryta kutikulou, která se při doteku poruší a sekret žláznatého trichomu se vylije. V dalším případě může být buněčná stěna pod hlavičkou inkrustována kyselinou křemičitou. Při doteku se vlivem křehkosti hlavička zlomí a obsah trichomu se vylije.

Trichomy se mohou lišit svou délkou, což bylo pozorováno u rostlin z čeledi cystovitých. Tyto keře jsou pokryty zejména dlouhými jednoduchými trichomy, které se vyskytují na listech osamoceně. Byla zaznamenána délka jednoduchých trichomů až 1200 μm . Dále však byly pozorovány i rozvětvené trichomy, které byly jak osamocené, tak i v hustých shlucích, ale jejich délka byla maximálně 400 μm . (Gülz *et al.*, 1996). Větvení trichomů bylo zkoumáno u *A. thaliana*, kde jsou trichomy dále děleny v důsledku buněčného dělení buněk krajní epidermální vrstvy. Trichomy, které jsou dále diferenciovány prochází čtyřmi endoreduplikačními cykly, což obvykle vede k výskytu třech nebo čtyř větví trichomu (Wang *et al.*, 2019).

Přítomnost trichomů na rostlinách obecně působí jako ochrana před okolními vlivy a může chránit rostlinu také před nebezpečnými chemikáliemi nebo těžkými kovy. Například trichomy *Pteris vittata* jsou schopny absorbovat arsen a předejít tak kontaminaci rostliny (Li *et al.*, 2005a).

Trichomy sóji luštinaté jsou modifikovanou epidermální tkání a pokrývají téměř celý povrch rostliny. Existují kultivary jak s trichomy, tak i bez trichomů. Mohou být jednobuněčné nebo mnohobuněčné a podmiňují odolnost a toleranci k biotickým a abiotickým hrozbám. Lysé rostliny (glabrous), tedy ty vykazující absenci trichomů, nemají zcela chybějící vývoj trichomů, ale v určité fázi vývoje je růst zastaven a trichomy opadnou. Trichomy pomáhají snižovat výpar vody tím, že ovlivňují mezní vrstvu na povrchu listu, a také mají vliv na odrazivost slunečních paprsků od povrchu. Hustota trichomů ovlivňuje míru poškození listů larvami. Čím hustší porost trichomů se na listu vyskytuje, tím je pro parazity těžší se dostat k povrchu listu (Amaliah *et al.*, 2019).

2.2.1 Vývoj trichomů

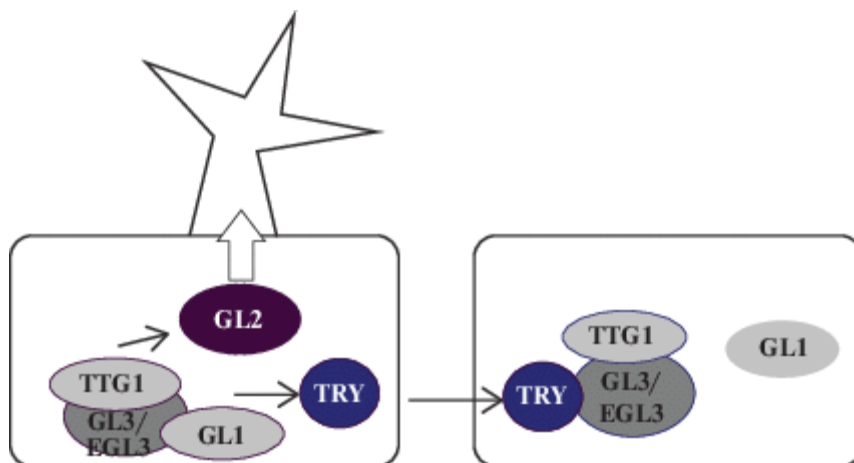
Způsob vývoje trichomů byl nejlépe popsán u modelové rostliny *A. thaliana*, kde se jedná o jednobuněčné trichomy. Trichomy jsou specializované epidermální buňky, jejichž rozmístění na rostlině je regulováno.

Listy produkované na začátku vývoje růžice postrádají trichomy na abaxiální, tedy spodní straně listu, kdežto listy produkované později jsou pokryty trichomy z obou stran. Listeny mají na horní (adaxiální) straně trichomů málo nebo jsou lysé. Distribuci trichomů reguluje několik faktorů, kdy u abaxiálních trichomů je produkce regulována spíše věkem než velikostí rostliny, což bylo dokázáno pozorováním mutací ovlivňujících rychlost nebo počátek iniciace listů. Produkce abaxiálních trichomů je koordinovaná stejně, jako reprodukční vývoj prýtu. Absence adaxiálních trichomů je spojena s procesem vývoje květenství, jelikož listeny postrádají trichomy na horní straně (Telfer *et al.*, 1997).

Prvním krokem ke vzniku trichomu z epidermální buňky je zastavení buněčného dělení za současného pokračování syntézy DNA, kdy dochází ke zvětšení jádra buňky. Následně se buňka radiálně zvětší asi na dvojnásobek velikosti buněk okolních a vytvoří stopku. Růst buňky pokračuje a jádro migruje k vrcholu trichomu. Expanze buňky je zastavena tehdy, kdy je dosažena požadovaná délka a průměr základny trichomu. Epidermální buňky v okolí trichomu jsou označovány jako soketové buňky a mají obdélníkový tvar (Healy *et al.*, 2009).

Pro iniciaci tvorby trichomů je nutná interakce mezi proteiny TTG1 (transparent testa glabra 1), GL3 (glabra 3) nebo EGL3 (enhancer of glabra 3) a GL1 (glabra 1). Tyto tři proteiny vytváří komplex, který aktivuje geny zapojené do iniciace trichomu. (Obr. 4). Největší efekt na formaci trichomu mají geny kódující proteiny GL1 a TTG1, jelikož bylo dokázáno, že mutace v těchto genech zabraňují iniciaci většiny trichomů. TTG1, který obsahuje WD doménu (krátký strukturální motiv asi 40 aminokyselin s terminálním dipeptidem Trp-Asp), ovlivňuje mimo formaci trichomů také tvorbu antokyanů, kořenového vlášení a slizového obalu semene. GL1 patří do rodiny MYB proteinů (rodina transkripčních faktorů) a má vliv pouze na vývoj trichomů, což bylo dokázáno faktem, že alela *gl1-1* u mutantních rostlin obsahuje delecii, která kompletně odstraňuje oblast kódující gen *GL1* a způsobuje fenotypový projev ztráty trichomů. *In situ* hybridizací pro lokalizaci *GL1* mRNA bylo dokázáno, že *GL1* je exprimován pouze u buněk určených k iniciaci trichomů.

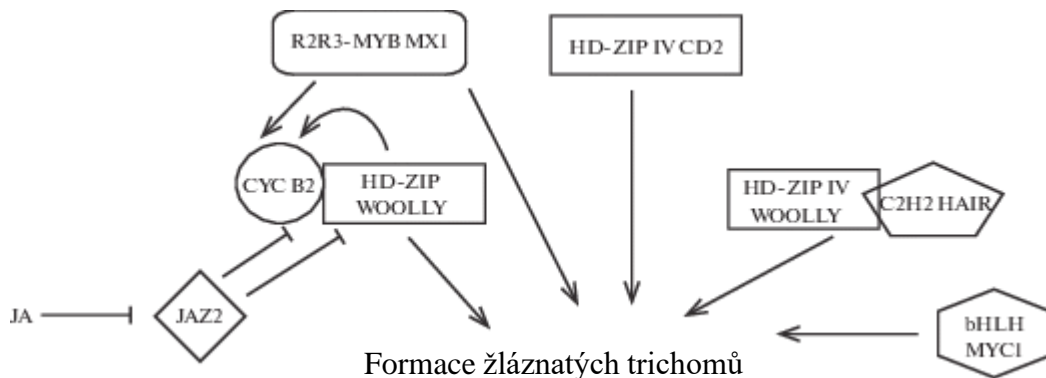
Esenciálním genem pro vývoj trichomů je také gen *GL3*, který však neovlivňuje počet trichomů. Komplex genů *GL1*, *TTG1* a *GL3* aktivuje expresi proteinu GL2, což indukuje tvorbu trichomů. Negativní regulaci tvorby trichomů v okolních buňkách zajišťuje TRY (triptychon) protein (Larkin *et al.*, 1994, Pattanaik *et al.*, 2014, Shvachko *et al.*, 2020).



Obr. 4 Model regulace iniciace trichomů na epidermis listu *A. thaliana*. Komplex GLABRA1 (GL1)–GLABRA3 (GL3)/ENHANCER GLABRA3 (EGL3)–TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) aktivuje expresi *GLABRA2* (*GL2*) a TRIPTYCHONU (*TRY*). *GL2* indukuje diferenciaci trichomů. *TRY* protein putuje do sousedící buňky a soutěží s *GL1* o vazebné místo komplexu. *TRY*-*GL3/EGL3*-*TTG1* komplex nepodporuje ani expresi *GL2*, ani iniciaci trichomu. (převzato z Shvachko *et al.*, 2020)

Mechanismus formace žláznatých trichomů není prozkoumán tak dobře jako u jednoduchých trichomů. Jako modelový objekt pro studium genové regulace je použito rajče (*Solanum lycopersicum*).

Formaci žláznatých trichomů ovlivňuje skupina transkripčních faktorů, které mohou být pozitivními nebo negativními regulátory iniciace žláznatých trichomů rajčete. Důležitým regulátorem tohoto procesu je transkripční faktor HD-ZIP IV WOOLLY (*Wo*, protein s motivem homeodomény a leucinovým zipem), který posiluje iniciaci žláznatého trichomu. Dominantní bodové mutace v C-koncové části *Wo* jsou zodpovědné za mutantní fenotyp se zvýšenou hustotou trichomů. Přímá interakce C_2H_2 SIH proteinů (transkripční faktory s motivem zinkového prstu) s HD-ZIP IV *Wo* transkripčním faktorem vytváří komplex, který zahajuje vývoj trichomu. Proces je regulován rostlinnými hormony, například jasmonáty. Negativním regulátorem celého procesu vývoje žláznatého trichomu je nadměrná exprese represoru JA *SLJAZ₂* (gen kódující protein s jasmonát-ZIM doménou) (Obr. 5) (Shvachko *et al.*, 2020).



Obr. 5 Formace žláznatých trichomů *Solanum lycopersicum*: transkripční faktor HD-ZIP IV WOOLLY interaguje s cyklinem CycB₂ typu B a s proteinem C₂H₂ (zinkový prst) a dochází k formaci žláznatých trichomů. (převzato a upraveno z Shvachko *et al.*, 2020)

2.2.2 Trichomy jako obrana proti škůdcům

Škůdci parazitující na sóji významně poškozují úrodu a způsobují tak finanční škody pěstitelům. Jelikož je sója stále častější zemědělskou komoditou, je důležité omezit poškození rostlin živočichy. Aby bylo zamezeno používání pesticidů, které více či méně škodí životnímu prostředí, je snaha vyšlechtit kultivary sóji odolné proti škůdcům.

Trichomy působí jako fyzická bariéra zabraňující poškození rostliny hmyzem. Experimenty bylo dokázáno, že rostliny s vyšší hustotou trichomů byly méně napadeny škůdci než rostliny bez trichomů nebo s nižší hustotou trichomů.

Nejvýznamnějším škůdcem v současné době je Potato leafhopper (*Empoasca fabae*). Jedná se o hmyz ze Severní Ameriky, který kromě sóji luštinaté parazituje také na bramborech, jablkách atd. Nejlépe se mu daří v sušším a teplém podnebí. Dalšími živočichy parazitujícími na sóji luštinaté jsou Mexican bean beetle (*Epilachna varivestis*), Velvet bean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) a Soybean looper (*Chrysodeixis includens*) (Chang a Hartman, 2017).

Chang a Hartman (2017) provedli analýzu pomocí metody GWAS, aby ověřili, zda má lokus zodpovědný za hustotu trichomů souvislost s lokusem, který kóduje rezistenci proti Potato leafhopper a nachází se na chromozomu 12. Bylo zjištěno, že regiony jsou příliš daleko od sebe, nepřekrývají se, a proto spolu nesouvisí. Podle Komatsu *et al.* (2007) není souvislost mezi geny zajišťující antibiální rezistenci proti škůdcům a geny zajišťující hustotu trichomů.

Hustota trichomů ale není jedním z nejvýznamnějších znaků pro rezistenci ke škůdcům. Důležitějším morfologickým znakem v tomto ohledu je orientace trichomů nebo chemikálie ve žláznatých trichomech.

2.2.3 Vliv trichomů na výpar vody

Hustota trichomů má vliv na transpiraci, smáčivost listu, zadržování kapek a absorpci vody listem. Aby mohla sója růst i v některých extrémních podmínkách, jsou šlechtěny kultivary odolné proti suchu. Trichomy omezují vypařování vody a snižují tak transpiraci. Pomáhají rostlině zadržet vodu, aby nedocházelo k nadměrné evaporaci.

Na druhou stranu trichomy mohou působit jako bariéra, kterou těžko pronikají fotony z povrchu listu a může být takto inhibována fotosyntéza. Pearman (1966) uvedl, že trichomy mohou snižovat množství světla, které vstupuje do listu, a proto snižovat absorpci.

Gorashy *et al.* (1971) provedli experiment, kde hodnotili efekt hustoty trichomů listu na transpiraci, fotosyntézu a s tím spojený výnos semen. Byly použity tři téměř isogenní linie sóji luštinaté, a to kultivary bez trichomů, s normálním porostem trichomů a s hustým porostem trichomů. Bylo zjištěno, že výnos semen a účinnost fotosyntézy nebyla signifikantně ovlivněna hustotou trichomů. Vypařování vody je regulováno průduchy a mezní vrstvou. Trichomy zvyšují rezistenci mezní vrstvy a tím pádem redukují difuzi vodní páry. Aby bylo snížení transpirace efektivní, je potřeba vyšší hustoty trichomů.

2.2.4 Vliv hustoty a morfologie trichomů na albedo plodin

Globální oteplování je celosvětovým problémem, a proto je neustálá snaha o zpomalení nebo celkové vyřešení tohoto problému. K celkovému ochlazení Země by mohlo dojít při zvýšení albeda hospodářsky významných plodin (Doughty *et al.*, 2011).

Albedo vyjadřuje míru odrazivosti elektromagnetického záření od tělesa nebo od povrchu daného tělesa. Již dříve byla snaha tento problém vyřešit pomocí sluneční clony nebo vstřikování aerosolu do atmosféry, který by odrážel elektromagnetické částice, ale tyto teze byly označeny za velmi riskantní.

Doughty *et al.* (2011) pomocí simulace klimatických podmínek pozorovali vliv určitých morfologických vlastností trichomů na odrazivost viditelného, blízkého infračerveného (NIR) a infračerveného světla (IR). Kudrnaté trichomy odrážely světlo

ve viditelné oblasti efektivněji než trichomy vzpřímené či přilehlé. Co se však týče IR a NIR, nebyly pozorovány výrazné rozdíly ve výsledcích. Trichomy se žlutohnědým zbarvením odrážely značně více radiace v oblasti NIR a IR než šedě zbarvené trichomy. Lysé listy propouštěly i odrážely světlo, kdežto listy s trichomy světlo absorbovaly. Co se týče hustoty trichomů bylo zjištěno, že isolinie s řídkým porostem trichomů neodrážely signifikantně více světla než fenotyp s hustým porostem trichomů.

Tento způsob snížení albeda není příliš efektivní z globálního hlediska, ale čím více dílčích lokálně působících faktorů se bude podílet na řešení tohoto problému, tím lépe.

2.2.5 Hustota trichomů

Je rozlišováno šest hlavních fenotypových kategorií, co se týče hustoty trichomů. Jedná se o hustý, částečně hustý, normální, řídký, částečně řídký porost trichomů a rostliny bez trichomů, tedy lysé (Obr. 6). Byly identifikovány tři alely *Pd1*, *Ps* a *PI* určující hustotu trichomů (Komatsu *et al.*, 2007). Alela *Pd1* je zodpovědná za hustý porost trichomů a alela *Ps* za řídký porost trichomů. Alela *PI* podmiňuje lysý fenotyp (Liu *et al.*, 2020).



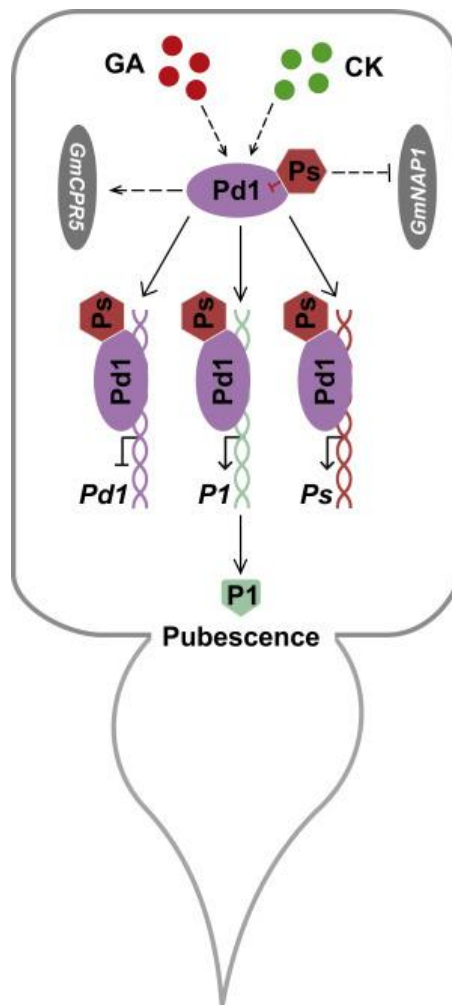
Obr. 6 Fenotypy hustoty trichomů: hustý (A), částečně hustý (B), normální (C), částečně řídký (D), řídký (E) a lysý (F) fenotyp. (Přezato a upraveno z databáze GRIN/U.S. National Germplasm System)

Bandillo *et al.* (2017) pomocí metody GWAS identifikovali SNP (single nucleotide polymorphism) signály, které korespondovaly s pozicí lokusu *Ps-Ps²-ps* na chromozomu 12 a lokusu *Pd1-pd1* na chromozomu 1 zodpovědných za hustotu trichomů. Byl také pozorován signál na chromozomech 7 a 14, a proto byla následně analýza zúžena na tři fenotypy s řídkým, částečně řídkým a normálním porostem trichomů. Znova byl identifikován signál na chromozomu 14, kdežto signál na chromozomu 7 zmizel. Dále byla asociační analýza omezena pouze na lokus *PI-p1*. Statisticky nejvýznamnější asociace byla zjištěna na chromozomu 9, kde byl jako kandidátní gen identifikován *Glyma09g38410* (*Glyma.09g248600*). Tento gen byl označen za možný kandidátní gen pro lokus *PI-p1*, ale tato teze byla vyvrácena. V této studii nebylo identifikováno, čím byl způsoben silný signál na chromozomu 14. Liu *et al.* (2020) následně v sérii experimentů (komplementace v transgenních liniích, nadexprese, mapování, protein-proteinové interakce) potvrdili jako korespondující gen

pro *PI Glyma.09g278000* což je gen, který kóduje rostlinný lipid přenášející protein s AAI (Trypsin-alfa amyláza inhibitorovou) doménou a podmiňuje lysý fenotyp.

Tři již zmíněné alely (*Pd1*, *Ps* a *PI*) jsou zodpovědné za fenotyp sóji s hustým porostem trichomů, řídkým porostem trichomů a bez trichomů. Bylo zjištěno, že *Pd1* kóduje homolog *GL2* z *A. thaliana* a byl navržen kandidátní gen *Glyma.01g240100* podmiňující hustý porost trichomů. Funkce *PI* a *Ps* nebyla definována, ale byl navržen kandidátní gen pro *Ps*, kterým je *Glyma.12g187200*. Gen má funkci negativního regulátoru hustoty trichomů, podmiňuje řídký porost trichomů a kóduje protein s WD40 (doména 40 aminokyselin s terminálním dipeptidem Trp-Asp) a RING (podobnost se zinkovým prstem, motiv Cys₃HisCys₄) doménou. Prostřednictvím analýz bylo ověřeno, že *Pd1*, *Ps* a *PI* tvoří komplexní síť dědičných odpovědí, která reguluje formaci trichomů. Díky těmto znalostem byl sestaven model interakce těchto tří genů (Liu *et al.*, 2020).

Pd1 se spojí s promotory *PI* a *Ps* a je zahájena transkripce. *Pd1* se váže s vlastním promotorem a kontroluje svou expresi, takto je vytvořena autoregulační smyčka. *Ps* interaguje s *Pd1*, aby byla oslabena transkripční aktivita *Pd1*. Gibereliny a cytokininy mohou také indukovat transkripci *Pd1*. *Pd1* a *Ps* ovlivňují transkripci *GmCPR5* a *GmNAP1*, což jsou dva hlavní faktory hrající roli ve správném vývoji trichomů. (Obr. 7) (Campbell *et al.* 2016, 2019; Tang *et al.*, 2020).



Obr. 7 Model ilustrující, jak zpětnovazebná smyčka *Pd1-Ps-P1* reguluje tvorbu trichomů u sóji. *Pd1* transkripce může být indukována gibereliny a cytokininy. *Pd1* reguluje expresi *P1*, *Ps* a *Pd1* navázáním na jejich promotory. Transkripční aktivita *Pd1* je ovlivňována interakcí s *Ps*. *Pd1* a *Ps* ovlivňují transkripci *GmCPR5* a *GmNAP1*. (převzato z Liu *et al.*, 2020)

Pro zjednodušení analýzy rostlin s rozdílnou hustotou trichomů je snaha zautomatizovat počítání trichomů. Vyvinutím automatizované nebo částečně automatizované metody počítání trichomů by byl zejména ušetřen čas a také by se snížil počet chyb způsobených manuálním počítáním. Bylo zjištěno, že plně automatizované metody také nejsou úplně přesné, jelikož nelze rozlišit překryv trichomů a správně vykreslit povrch listu, překážkou je také různé zbarvení trichomů. Nejlepším řešením je tedy částečně automatizovaná metoda, kdy je nutno manuálně vykreslit povrch listu nebo linii překrývající trichomy (Mirnezami *et al.*, 2020).

2.2.6 Ostatní morfologické znaky trichomů u sóji

Jednou z dalších morfologických vlastností trichomů je jejich zakroucení. Za tuto vlastnost je zodpovědná pouze alela *Pc-pc*. Znak zakroucení trichomů je děděn recesivně. Trichomy tohoto typu mají ze začátku trubkovitý tvar, ale následně se zkrouť ještě před úplným vývinem rostlinného orgánu, na kterém se vyskytují. Kvůli zakroucení nemohou být tyto trichomy vzpřímené a jsou přilehlé k epidermis. Ještě před dosažením zralosti rostliny většina zkroucených trichomů odpadne. Může se vyskytovat také fenotyp s částečně zkroucenými trichomy (Bernard a Singh, 1969).

Z hlediska barvy trichomů se rozlišují čtyři barevné fenotypy – žlutohnědý, světle žlutohnědý, téměř šedý a šedý. Za zbarvení trichomů jsou zodpovědné alely *T* a *Td*, které kódují mimo jiné produkci flavonoidů. Dominantní *T* a recesivní *t* alela způsobuje žlutohnědé a šedé zbarvení. V přítomnosti dominantní *T* alely a dominantní a recesivní *Td* alely se vyskytuje žlutohnědé a světle žlutohnědé zbarvení trichomů (Yan *et al.*, 2020).

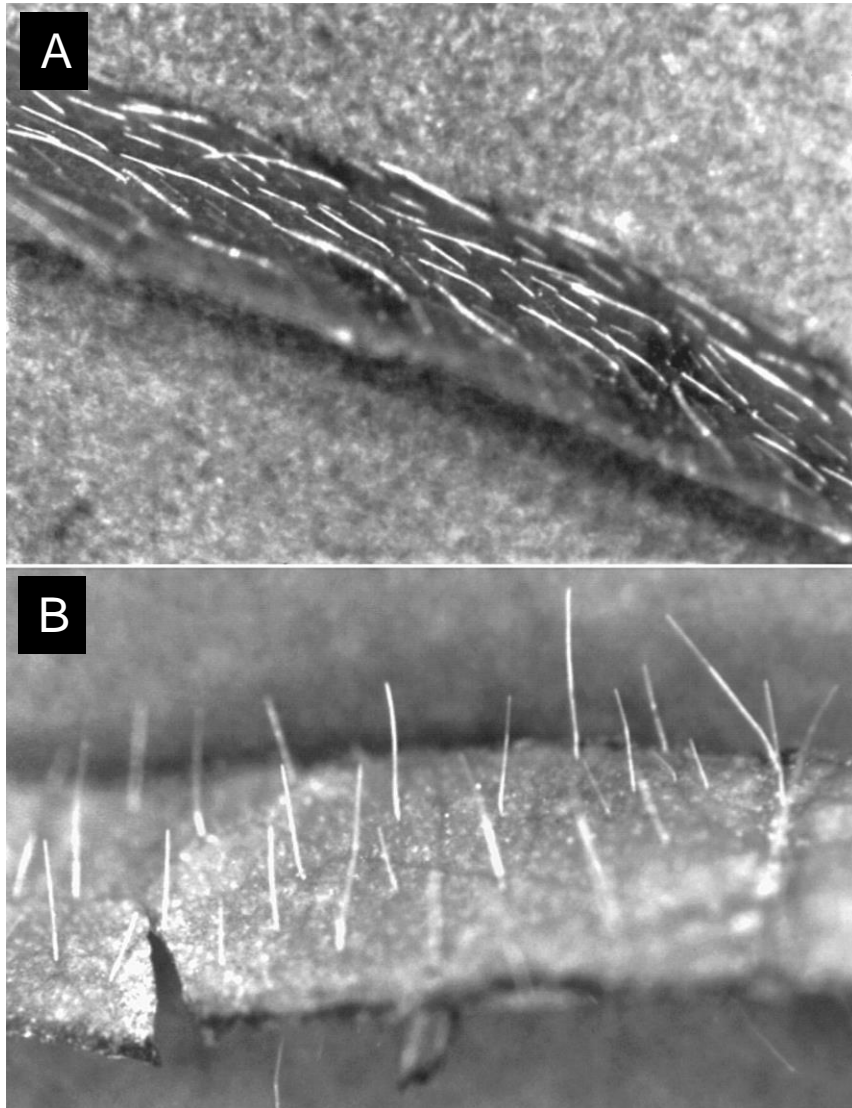
U některých variet sóji se mohou vyskytovat nepravidelné trichomy, tedy trichomy s abnormálním tvarem, které slouží jako ochrana před poškozením epidermis škůdci (Robbins *et al.*, 1979). V případě velmi krátkých, ale okem pozorovatelných trichomů se jedná o trichomy puberulentní (Bernard a Singh, 1969).

Podle délky jsou rozlišovány dva základní fenotypy s dlouhými a krátkými trichomy. U rostlin divokého typu se nacházely dlouhé trichomy, kdežto u mutantního typu byly pozorovány krátké trichomy. Jádro buňky dlouhého trichomu bylo výrazně větší, než buněčné jádro krátkého trichomu (Campbell *et al.*, 2019).

Jsou také rozlišovány trichomy s ostrým a tupým zakončením. Za tento znak je zodpovědná *Pd* alela (Healy *et al.*, 2005).

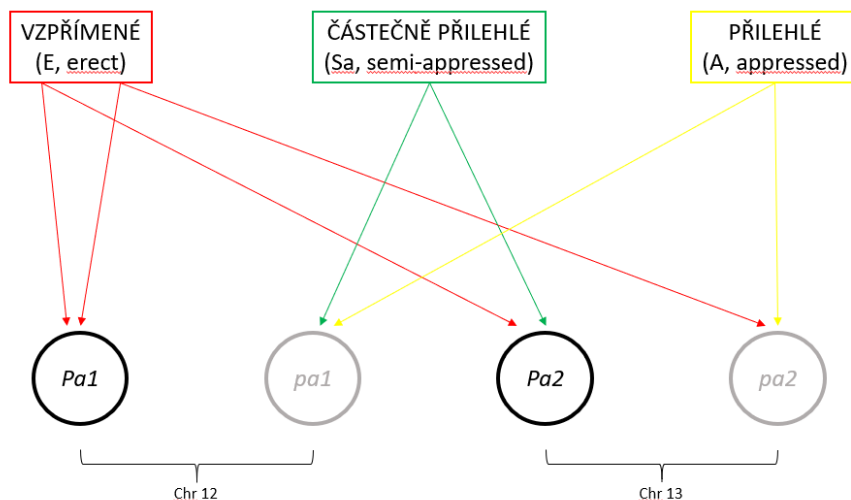
2.2.7 Postavení trichomů vůči listu

Z hlediska postavení trichomů vůči epidermis jsou rozlišovány tři základní fenotypy se vzpřímenými, částečně přilehlými a přilehlými trichomy. (Obr. 8) Za tyto fenotypové projevy jsou zodpovědné alely *Pal-pal* na chromozomu 12 a *Pa2-pa2* na chromozomu 13 (Obr. 9) (Bernard, 1975c). Ve dřívějších studiích byl gen *Pal* přiřazován ke chromozomu 11 (Lee, 1999). Tato domněnka však byla vyvrácena (Bandillo *et al.*, 2017; Gilbert, 2017).



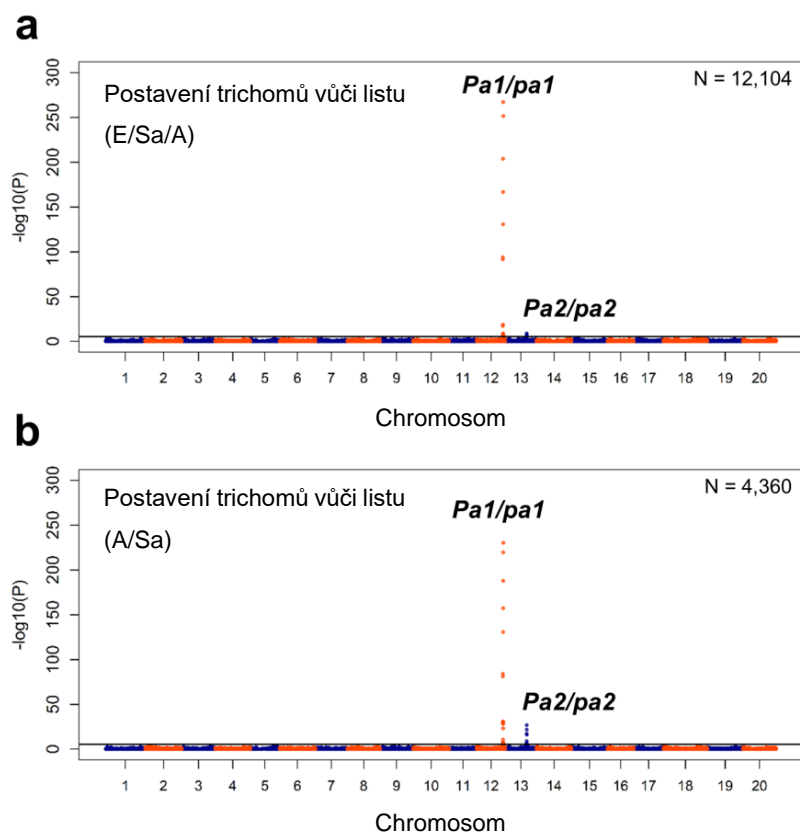
Obr. 8 Fenotypy postavení trichomů vůči listu: přilehlý (A) a vzpřímený (B) fenotyp. (Převzato z Lee *et al.*, 1999)

Postavení trichomů vůči listu



Obr. 9 Schéma kombinace alel pro fenotyp postavení trichomů vůči listu. Vzprámené (*Pa1-Pa2* nebo *Pa1-pa2*), částečně přilehlé (*pa1-Pa2*) a přilehlé (*pa1-pa2*) trichomy. Alela *Pa1* se nachází na chromosomu 12, alela *Pa2* se nachází na chromosomu 13.

Bandillo *et al.* (2017) použili pro analýzu nejprve všechny tři fenotypy postavení trichomů vůči listu v jedné asociaci pomocí GWAS, kde byl potvrzen signál na chromozomu 12 a 13 (Obr. 10). Následně byl analyzován pouze fenotyp s částečně přilehlými a přilehlými trichomy (Obr. 10), aby byl zmírněn vliv epistáze (efektu, kdy je aktivita jednoho genu maskována efekty jiného genu). Signál *Pa1-pa1* se o moc nezmenšil, ale signál *Pa2-pa2* byl zvětšen až čtyřnásobně. Výsledky mapování byly pozoruhodné, protože signál *Pa2-pa2* určil na chromosomu 13 oblast menší než 50 kb (31.878.146-31.921.097), kdežto signál *Pa1-pa1* na chromosomu 12 vymežil oblast 750 kb (36.991.996-37.757.311). Byly také navrženy kandidátní geny pro příslušné alely na chromozomu 12 i 13 (Tab. 1).

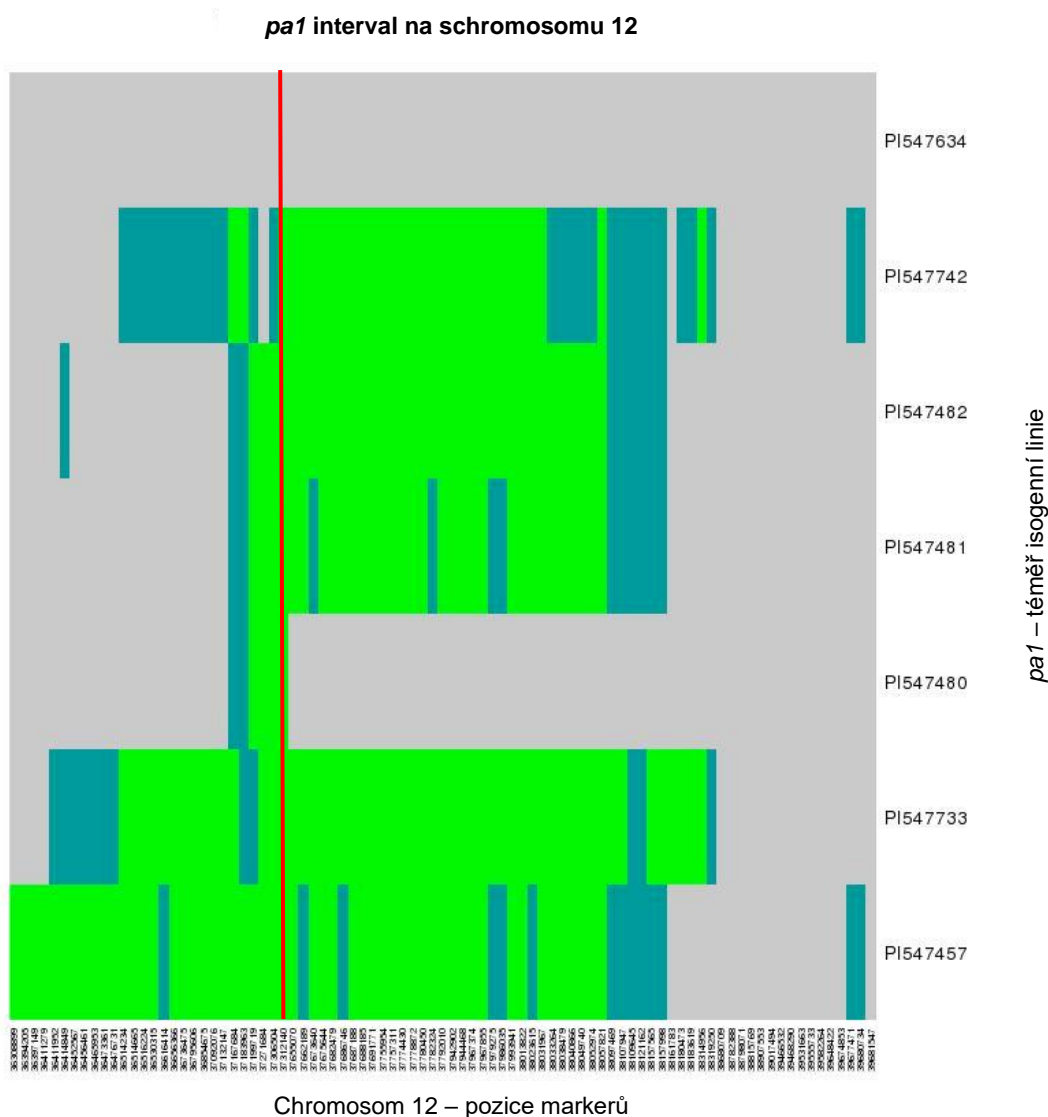


Obr. 10 Manhattan plot pro alely způsobující fenotypový projev postavení trichomů vůči listu, (a) všechny fenotypové kategorie – vzpřímené, částečně přilehlé a přilehlé trichomy, (b) jen částečně přilehlý a přilehlý fenotyp. (převzato a upraveno z Bandillo *et al.*, 2017)

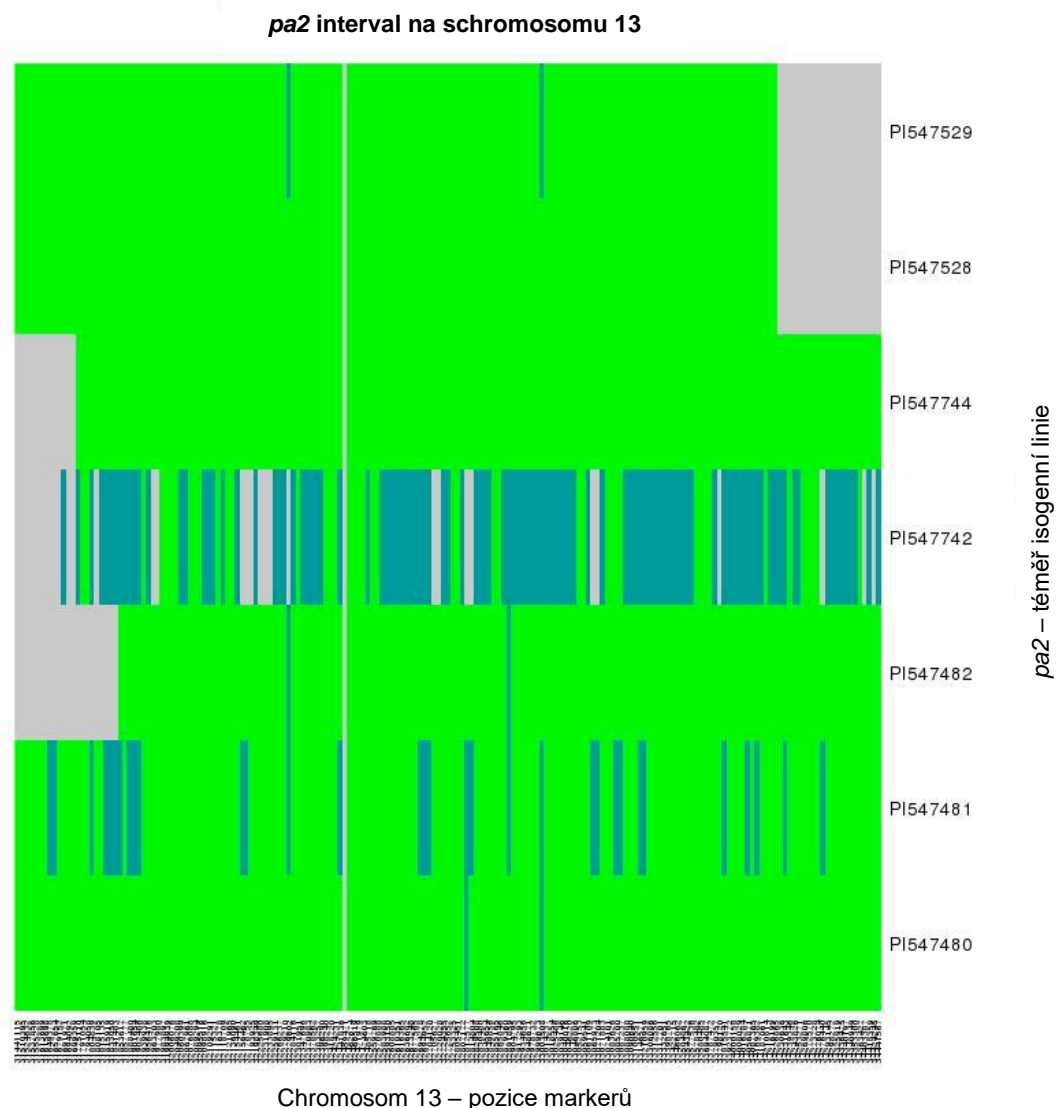
Tab. 1 Potencionální kandidátní geny pro alely zodpovědné za fenotyp postavení trichomů vůči listu na chromozomu 12 a 13 podle Bandillo *et al.* (2017). Jsou uvedeny názvy genů v nomenklatuře Wm82.a1.v1.1 i Wm82.a2.v1.

chr 12		chr 13	
Wm82.a1.v1.1	Wm82.a2.v1	Wm82.a1.v1.1	Wm82.a2.v1
<i>Glyma12g34300</i>	<i>Glyma.12g214900</i>	<i>Glyma13g27490</i>	<i>Glyma.13g204800</i>
<i>Glyma12g34140</i>	<i>Glyma.12g213400</i>	<i>Glyma13g27455</i>	<i>Glyma.13g204400,</i>
<i>Glyma12g34310</i>	<i>Glyma.12g215000</i>	<i>Glyma13g27600</i>	<i>Glyma.13g205900,</i>
<i>Glyma12g34100</i>	<i>Glyma.12g213200</i>	<i>Glyma13g27430</i>	-
<i>Glyma12g34280</i>	<i>Glyma.12g214700</i>	<i>Glyma13g27500</i>	<i>Glyma.13g204900,</i>
<i>Glyma12g34175</i>	<i>Glyma.12g213700</i>	<i>Glyma13g27590</i>	<i>Glyma.13g205800,</i>
<i>Glyma12g34330</i>	<i>Glyma.12g215200</i>	<i>Glyma13g27440</i>	<i>Glyma.13g204300,</i>
<i>Glyma12g34210</i>	<i>Glyma.12g214100</i>	<i>Glyma13g27390</i>	<i>Glyma.13g203900,</i>
<i>Glyma12g34090</i>	<i>Glyma.12g213100</i>	<i>Glyma13g27660</i>	<i>Glyma.13g206600,</i>
<i>Glyma12g34320</i>	<i>Glyma.12g215100</i>	<i>Glyma13g27570</i>	<i>Glyma.13g205600</i>
<i>Glyma12g34190</i>	-	<i>Glyma13g27480</i>	<i>Glyma.13g204700</i>
<i>Glyma12g34221</i>	<i>Glyma.12g214200</i>		
<i>Glyma12g34241</i>	<i>Glyma.12g214400</i>		
<i>Glyma12g34110</i>	<i>Glyma.12g213300</i>		

Analýzou lokusů v oblastech *pal* a *pa2* byla analyzována homologie mezi isogenními liniemi sóji segregujícími pro částečně přilehlý a přilehlý fenotyp trichomů (Obr. 11, Obr. 12, Glibert, 2017). V práci Gilbert (2017) byl jako kandidátní gen pro *pal* označen *Glyma.12g213900* (37.310.637-37.312.496), jelikož jeho homolog v *A. thaliana At3g01140.1* je zodpovědný za postavení trichomů vůči epidermis. Potencionálním paralogem, tedy genovou kopií, která byla vytvořena duplikací, na chromozomu 13 je *Glyma.13g287700*, který se však nachází pod intervalem, který byl mapováním přiřazen *pa2* (Tab. 2) (Gilbert, 2017).



Obr. 11 Vizualizace intervalu pro *pal* – částečně přilehlý fenotyp. Finální interval byl vybrán na chromozomu 12 v pozici 37.092.076-37.662.189. Červená linie vyznačuje přibližnou pozici genu *Glyma.12g213900*. (převzato a upraveno z Gilbert, 2017)



Obr. 12 Vizualizace intervalu pro *pa2* – přílehlý fenotyp. Finální interval byl vybrán na chromozomu 13 v pozici 31.833.050-34.231.643. (převzato a upraveno z Gilbert, 2017)

Tab. 2 Počáteční a koncové pozice regionů určených pro alelu *Pa2* na chromosomu 13 podle Bandillo *et al.* (2017) a Gilbert (2017). Počáteční a koncová pozice potenciálního kandidátního genu *Glyma.13g287700* pro alelu *Pa2*, který byl určen studií Gilbert (2017).

chromosom 13, alela <i>Pa2</i>	počáteční pozice	koncová pozice
Bandillo <i>et al.</i> (2017)	31.878.146	31.921.097
Gilbert (2017)	31.833.050	34.231.643
<i>Glyma.13g287700</i>	38.819.754	38.820.478

Při srovnání výsledku ze studie Bandillo *et al.* (2017) je nutné si povšimnout, že statisticky významný lokus pro alelu *pa2* na chromozomu 13 byl identifikován na začátku intervalu, který určil Gilbert (2017) a není v blízkosti paralogu *Glyma.13g287700* (Tab. 2). Geny, které jsou spojeny se stejnými dráhami, jsou lokalizovány a obklopeny *pa1* i *pa2* intervaly a pořadí genů je obecně zachováno. Jestli jsou tedy kandidátní geny pro *pa1* a *pa2* opravdu paralogy, měl by být v blízkosti obou genů přítomen zmíněný lokus. Místo toho jsou přítomny vysoce významné lokusy v duplikovaných chromozomálních oblastech, což naznačuje, že se nejedná o paralogy, ale o geny stejné dráhy ovlivňující postavení trichomů vůči listu.

2.2.8. Markery pro konkrétní fenotypy trichomů jako součást genotypizace důležitých agronomických znaků sóji

Jelikož je sója v současné době velice žádanou komoditou, je důležité připravovat nové kultivary. Spojení barvy listů, barvy trichomů a hustoty trichomů je významným znakem pro snížení albeda osévaných zemědělských ploch. Vzhledem ke komplikovanému genetickému pozadí sklonu trichomů vůči listu bude užitečné vyvinout markery, kterými by se daly identifikovat alely *pa1/Pa1* a *pa2/Pa2*.

2.3 Morfologie trichomů jako důležitý agronomický znak u plodin

Trichomy a jejich morfologie je zkoumána kromě sóji i u dalších plodin, kde jsou přítomny. Při procesu evoluce byly rostliny nuceny se přizpůsobit danému stavu prostředí vlivem dynamických změn environmentálních podmínek. Diverzita trichomů v rostlinné říši je obrovská a zahrnuje trichomy na listech a řapících, trny růží, trichomy Dosery nebo bavlněná vlákna. Trichomy se liší tvarem, velikostí, strukturou, umístěním na rostlině a schopností sekrece. Sdílí základní funkci, a to chránit rostlinu před různými biotickými a abiotickými vlivy (Shvachko *et al.*, 2020).

Například u vinné révy se vyskytují jednoduché i žláznaté trichomy přítomné na stonku, větvích, abaxiální i adaxiální straně listů a také na řapíku. Agronomický i ekonomický význam hroznového vína spočívá jak ve zpracování na víno a rozinky, tak v konzumaci čerstvého ovoce (Ma *et al.*, 2016). Jsou šlechtěny kultivary vinné révy rezistentní proti houbovým onemocněním, kde hraje důležitou roli hustota trichomů. V případě houbových infercí trichomy sice neovlivňují přichycení spory na povrch rostliny, ale zabraňují průniku spor k povrchu listu a slouží tak jako bariéra (Kortekamp a Zyprian, 1999).

U ovoce kiwi (rod *Actinidia*) byly popsány dva druhy trichomů, a to trichomy velké, které jsou mnohobuněčné a zužují se směrem ke špičce a trichomy malé, které jsou jednobuněčné a zkroucené (White, 1986). Rod *Actinidia* pojímá spoustu druhů, které se liší vzhledem epidermis a také přítomností nebo nepřítomností trichomů. Stejně jako kutikula nebo tlustá pokožka, slouží trichomy jako ochrana proti škůdcům a proti výparu vody. Například druhy *A. chinensis* a *A. deliciosa* mají specifickou tlustou strukturu epidermis s přítomností trichomů (Hallett a Sutherland, 2005). Při dospívání plodu trichomy kolabují, praská kutikula a vytváří se tak masitá tkáň tvořící většinu vnějšího oplodí (Celano *et al.*, 2009). Plody *A. arguta* označované jako minikiwi jsou zelené a lysé, tedy nemají trichomy a jsou velké 5–7 cm. Trichomy jsou na plodu přítomny pouze v embryonálním stádiu a následně opadají (Shvachko *et al.*, 2020).

Další významnou plodinou, u které se vyskytují trichomy je pšenice. N. I. Vavilov roku 1923 zjistil, že trichomy se vyskytují na listech všech typů pšenice, ale na stonku se vyskytují jen u některých. Identifikoval chlupatý, sametový a řasinkový typ trichomů u pšenice. Později bylo molekulárně genetickými metodami zjištěno, že za přítomnost a růst trichomů jsou odpovědné dva geny. Gen *H11* se vyskytuje na chromozomu 4 a je zodpovědný za iniciaci trichomů a jejich růst, kdežto *H12* byl identifikován na chromozomu 7 a ovlivňuje délku trichomů.

Cílená selekce často působí proti rozvoji trichomů, kdy například u výběru ovocných stromů jsou upřednostňovány ty s lysými plody. U divokých druhů byla také detekována vnitrodruhová variabilita, co se týče přítomnosti/nepřítomnosti trichomů (Shvachko *et al.*, 2020). Selektivní manipulací vývoje trichomů ve specifických orgánech by mohlo být dosaženo přípravy plodin s ideální kombinací přítomnosti či nepřítomnosti trichomů na vegetativních orgánech a plodech. Mohla by být využita funkce regulačních genů v transgenních rostlinách. Manipulace těchto genů, jako je ekotopická exprese nebo nadměrná exprese, vede často ke dramatickým změnám ve vlastnostech rostlin. Řízená exprese transkripčních faktorů nabízí selektivní řízení metabolismu a vývoje rostlin (Martin, 1996).

2.4 Přirozená genetická variabilita

Přirozenou genetickou variabilitu můžeme obecně vysvětlit jako rozdíly v sekvenci DNA mezi genomy jedinců jednoho druhu organismu. Tyto rozdíly mohou být prezentovány několika základními formami. Velmi časté jsou jednonukleotidové polymorfismy (SNP), kdy dochází ke krátké delecii či inserci nebo substituci, tedy

záměně jednoho nukleotidu za druhý, který nese jinou bázi. Dále se jedná o variabilní počet tandemových repetice (VNTR), mezi které se řadí inserce/delece (INDEL). Také zde patří krátké tandemové repetice (STR), variabilita počtu kopií (CNV) atd. (Freeman *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009; Say, 2017). Dříve byly za převažující formu genomových variací považovány SNP, ale skupina Iafrate *et al.* (2004) zveřejnila studii, kde prezentovala rozsáhlou přítomnost variabilního počtu kopií segmentu DNA (Copy number variation, CNV) v lidském genomu. Současně byla tato fakta potvrzena studií Sebat *et al.* (2004).

2.4.1 Variabilita počtu kopií segmentu DNA

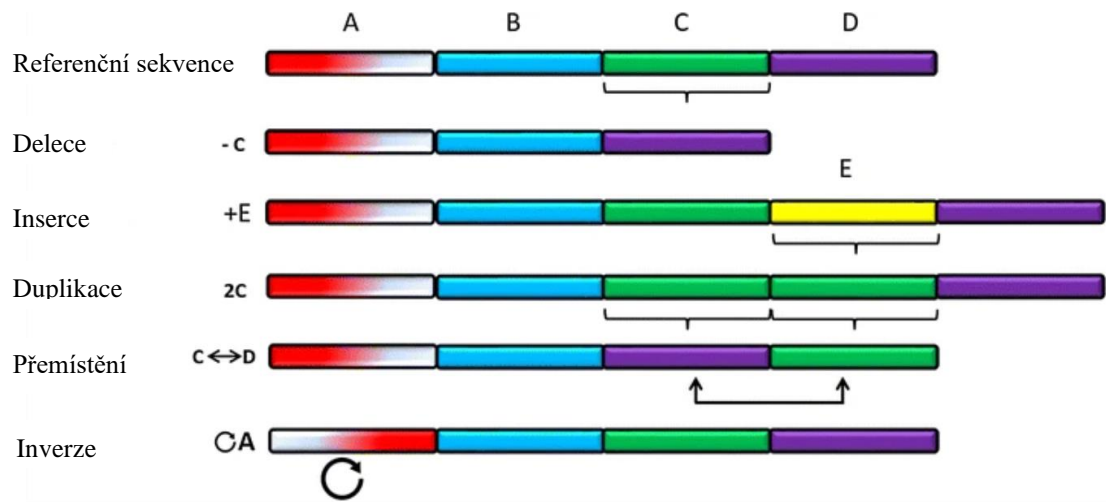
Variabilita počtu kopií (CNV) je definována, jako segment DNA o velikosti 1.000 bp, až 5.000.000 bp, který podmiňuje genetickou změnu. CNV zahrnuje duplikace (kopie sekvence) a delece (ztráta části genetického materiálu) a mění strukturu genomu (Obr. 13). Tyto změny v lidském genomu mohou podmiňovat některá dědičná onemocnění, jako například mentální retardaci, schizofrenii nebo autismus. I když jsou tyto strukturní varianty individuálně vzácné, mohou být kolektivně běžné a představovat větší podíl dědičného rizika, než se dříve předpokládalo (Eichler *et al.*, 2008).

Tato forma genetické variability se vyskytuje i u dalších organismů z živočišné a rostlinné říše. Rozsáhle je zkoumán dopad na fenotyp u domestikovaných zvířat, což je důležité pro chovatele a veterinární lékaře (Clop *et al.*, 2012). U skotu obsahují CNV geny, které souvisí s imunitní odpovědí a interakcí s prostředím. Mnoho z těchto genů vykazuje proměnlivost CNV mezi plemeny, což může objasnit rozdíly v imunologické odpovědi na různé klinické stavy mezi populacemi skotu (Upadhyay *et al.*, 2017). U kuřat byly identifikovány geny zahrnující CNV, které ovlivňují ukládání tuku v břišní dutině, což mění celkový obsah tuku (Zhang *et al.*, 2014). Příkladem z rostlinné říše je pšenice, u které CNV ovlivňují dobu kvetení a výšku rostliny (Žmieňko *et al.*, 2014).

I u sóji se vyskytuje celá řada CNV v důležitých agronomických znacích. CNV v hydrofobním proteinu sóji způsobuje asthma u osob postižených alergií na prach, když je do ovzduší dispergován posklizňový prach tvořený mikročásticemi pletiv (Gijzen *et al.*, 2006).

V morfologii trichomů jde například segment o velikosti 25,6 kb způsobující fenotyp s řídkým porostem trichomů, který je podmíněn alelou *Ps*. Tento segment

zahrnuje gen *Glyma.12g187200* kódující protein s WD doménou a RING doménou (proteinová doména podobná zinkovému prstu obsahující motiv Cys₃HisCys₄), který je zároveň kandidátním genem pro řídký porost trichomů (Liu *et al.*, 2020).



Obr. 13 Některé typy CNV. Delece segmentu C, inserce segmentu E, duplikace segmentu C, přemístění segmentu C a D, inverze segmentu A. (Převzato z Dolatabadian *et al.*, 2017)

2.5 GWAS

Metoda asociace genotypu na fenotyp (GWAS, Genome-wide association study) je experimentální postup používaný pro identifikaci části genomu asociovaného mezi genetickými variantami a fenotypovými projevy ve vzorcích populace (Visscher *et al.*, 2017). Metoda může být aplikována na jakýkoli organismus s dostupným genomem a fenotypem, kdy objasňuje geneticky podmíněné vlastnosti. Například u lidského genomu byly pomocí této metody asociovány genomové regiony s určitými onemocněními, jako schizofrenie, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba nebo rakovina prsu (Kraft a Haiman, 2010; Jia *et al.*, 2010; Ramanan a Saykin, 2013).

GWAS identifikuje v určitém genomovém regionu změny neboli mutace, kterými mohou být jednonukleotidové polymorfismy (SNP), inserce/delece (INDEL), variabilní počet kopií (CNV), atd. Principem je provedení resequenace, kdy dochází ke srovnání genomového úseku s referenčním genomem a odhalení těchto změn, které jsou následně přiřazeny specifickému fenotypovému projevu.

DNA čipy (DNA microarray) učinily GWAS dostupnější, levnější a rychlejší, ale poskytují pouze přibližnou oblast, která může být asociována s fenotypem. Čipy jsou schopny detekovat pouze SNP, které tvoří jen nepatrné procento z celkového množství genomických variant. DNA čip je malá destička s krátkými úseky DNA (sondami), které detekují konkrétní SNP. Po promytí vzorku fragmentované DNA přes čip hybridizuje s těmito sondami právě sekvence, která je se sondou komplementární ve smyslu přítomnosti daného SNP. Následně dochází k detekci skenovacím softwarem (Norrgard, 2008). Americká firma Illumina se zabývá výrobou a prodejem těchto čipů pro GWAS analýzy pro celou řadu organismů. Technologie Illumina čipů používá mikrokuličky z oxidu křemičitého v jamkách. Ty jsou pokryty několika vrstvami oligonukleotidových sond, které jsou specifické pro konkrétní lokus v genomu (<https://www.illumina.com/>).

Skupina Song *et al.* (2015) navrhla specifický SoySNP50K čip pro sóju, který je důležitým nástrojem pro charakterizaci vazebné nerovnováhy a genetické rozmanitosti sóji. Díky tomuto čipu je možné zkonstruovat vazebné mapy ve vysokém rozlišení, což je přínosem pro sestavení sekvence celého genomu sóji. Čip byl vyroben díky společností Illumina, která nabízí produkt Infinium HTS iSelect čipy vyráběné na míru.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A

3.1 Nástroj pro vyhledávání korespondence mezi genomovými modely

Genomové sekvence a modely genů jsou neustále vylepšovány díky rychlému pokroku v technologiích a levnějšímu sekvenování, což přináší obrovský objem dat. Důsledkem a podstatnou nevýhodou je skutečnost, že se nové genomové modely mnohdy liší od předešlých anotací. Předpokladem pro budoucí vývoj je zachování přesnosti anotace, a proto je u organismů přijímána nová nomenklatura, pomocí které jsou pojmenovány nově anotované geny (Cheng *et al.*, 2017).

U sóji nová nomenklatura přidává tečku za zkratku organismu a za písmenem g je šest číslic oproti předešlým pěti (př.: *Glyma.12g213900*). Webová doména soybase.org poskytuje nástroj, který jednoznačně porovnává genomové modely uvedené v předchozí anotaci Glyma Wm82.a1.v1.1 s novou nomenklaturou Wm82.a2.v1 (<https://soybase.org/correspondence>). Pro tento účel byl nástroj použit v bakalářské práci a názvy genů byly převedeny do nové nomenklatury.

3.2 NCBI Genome Remapping Service (nástroj pro mapování mezi jednotlivými verzemi poskládání genomu)

NCBI (National Center of Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) je webová doména poskytující nástroj Genome Remapping Service (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/remap>). Tento nástroj umožňuje uživatelům promítat data obsahující informace o konkrétní pozici v genomu určitého organismu z jednoho formátu do druhého, kdy je využito promítání dat mezi dvěma sekvencemi. Pro limitovaný počet organismů je možné využít i přemapování mezi dvěma druhy. Doména NCBI podporuje tři varianty přemapování: assembly-assembly, Clinical Remap a Alt loci remap. Tento nástroj byl využit pro převedení počátečních a koncových pozic sekvencí genomu sóji z formátu Wm82.a1.v1.1 do formátu Wm82.a2.v1, kdy byla využita assembly-assembly varianta nástroje. Je nutné zadávat data ve formátu: číslo chromozomu : počátek sekvence..konec sekvence (př.: chr12:37,469,548.. 37,472,029).

3.3 AccuTool

Bioinformatický nástroj AccuTool (<http://soykb.org/AccuTool/index.php>, <https://github.com/nad7wf/AccuTool>) dostupný jako webová aplikace, je služba, která slouží k výpočtu přímé korespondence mezi konkrétní pozicí genomické varianty a fenotypem. Umožňuje zpracování dat získaných pomocí GWAS zejména pro uživatele, kteří nemají odborné znalosti v oblasti bioinformatiky či programování. Nástroj je určen k prozkoumání širokého spektra asociací mezi jednotlivými pozicemi v genomu a celým genomovým regionem na určitém chromozomu, který je definován uživatelem. Ke kalkulaci přesnosti asociace jsou použita veřejně přístupná data 775 geneticky odlišných variant sóji, včetně referenčního genomu variety Williams 82. Přímá korespondence, neboli míra asociace, je vyčíslena jako tzv. přesnost - accuracy. Tato přesnost udává procentuální zastoupení všech linií, které obsahují specifickou asociaci (<https://github.com/nad7wf/AccuTool>, Škrabišová *et al.*, 2021a).

Nejprve jsem specifikovala chromosom, v mém případě 12 nebo 13 a vybrala jsem, zda je referenční fenotyp MUT (mutantní) nebo WT (divokého typu). Dále jsem nahrála soubor s fenotypovými daty a určila modifikaci, jestli má nástroj zhodnotit všechny varianty mutací nebo pouze varianty měnící aminokyseliny. Po stisknutí tlačítka Calculate Accuracy (spočítej přesnost) nástroj zobrazil výsledky.

3.4 NCBI Primer-BLAST

Vhodná volba primerů je jednou z nejdůležitějších podmínek pro úspěšný průběh PCR reakce. Hlavním požadavkem je, aby primery korespondovaly pouze se specifickou částí DNA, která má být amplifikována a nebyly shodné s jinými sekvencemi, což by vedlo k nežádoucí amplifikaci (Ye *et al.*, 2012).

NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) poskytuje svým uživatelům online nástroj pro tvorbu primerů specifických k určité sekvenci DNA. Využívá Primer3 (primer3.ut.ee) k návrhu primerů pro PCR a následně BLAST a globální srovnávací algoritmus k detekci takových primerů, které nezpůsobují nescifické amplifikace (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)

3.5 SNPviz (verze 2.0)

SNPviz (<http://soykb.org/newSNPviz/>) je bioinformatický nástroj dostupný jako webová aplikace, která slouží k zobrazení haplotypů. V porovnání s podobnými

nástroji je obohacen o vyjimečné funkcionality doplňující GWAS analýzu, pomocí které je sice možné najít genetické variace asociované se znaky, ale není možné zjistit funkci těchto variací a jejich výskyt v širším kontextu okolních genomických variant. Oproti jiným nástrojům byl SNPviz v2.0 vytvořen pro vizualizaci a analýzu haplotypů obsahujících kromě obvyklých SNP i těžko uchopitelné INDELY. Nástroj tak zprostředkovává analýzu SNP a INDEL veřejně dostupných resequencovaných souborů publikovaných dat sóji se zastoupením variet jak *G. Soja* tak *G. max* v těchto data setech: GWAS, USB-15x, USB-40x, Zhou302, MSMC, NAM41. SNPviz ve verzi 2.0 byl vyvíjen v rámci spolupráce skupiny genomiky luštěnin katedry biochemie s kolegy z University of Missouri, USA: Zeng *et al.*, 2020, 2021, (Zeng *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2021).

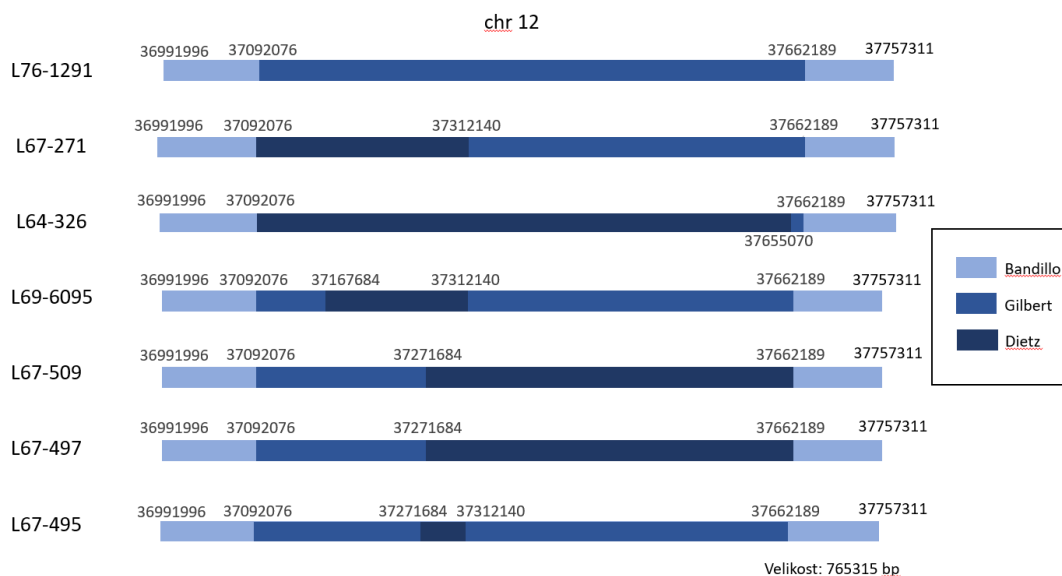
Pro účely této bakalářské práce jsem specifikovala chromosom a určila počáteční a koncovou pozici regionu, ve kterém dojde k zobrazení haplotypů. Následně jsem vybrala možnost, kdy nástroj zobrazí pouze SNP a INDELY, nahrála soubor, kde byly barevně odlišeny fenotypy a vybrala možnost zobrazení PI (identifikátoru variet podle GRIN). Analýzu jsem provedla s použitím datasetu USB-15x. Po nastavení všech parametrů jsem stiskla jsem tlačítko Clustering a nástroj zobrazil výsledky.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE A

4.1 Určení regionu výskytu kandidátních genů

Pro určení regionů, kde by se měly potenciálně vyskytovat kandidátní geny pro postavení trichomů vůči listu na chromozomu 12 a 13 byla použita data ze tří zdrojů. Průnikem dat byl následně určen nejmenší region možného výskytu kandidátních genů.

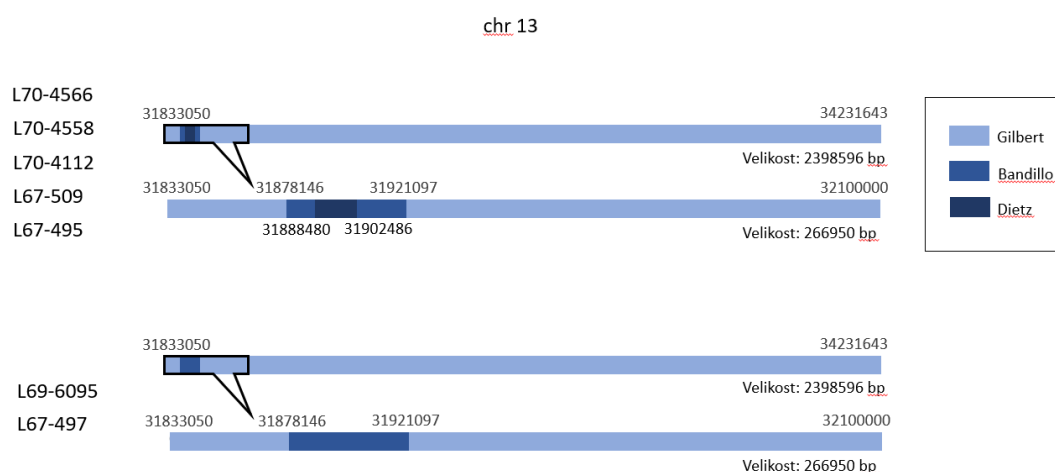
Na chromozomu 12 byl podle studie Bandillo *et al.* (2017) identifikován region o velikosti 765.315 bp (36.991.996-37.757.311). Gilbertovi (2017) se podařilo určit o něco menší region o velikosti 570.113 bp (37.092.076-37.662.189), kdy právě v této oblasti byla analyzována data sedmi isogenních linií (isolinií) sóji segregujících pro daný fenotyp: L76-1291 (PI547634), L67-271 (PI547733), L64-326 (PI547457), L69-6095 (PI547742), L67-509 (PI547482), L67-497 (PI547481) a L67-495 (PI547480). Průnikem těchto dat byl určen region o velikosti 40.456 bp (37.271.684-37.312.140), ve kterém byly následně vyhledávány možné kandidátní geny (Obr 14).



Obr. 14 Graf průniku regionů v lokusu *Pal* u téměř isogenních linií sóji segregujících pro částečně přilehlý fenotyp postavení trichomů vůči listu. V těchto průnicích se předpokládá výskyt kandidátních genů, jejichž přirozená genomická varianta podmiňuje daný fenotyp. Světle modrá barva znázorňuje region určený Bandillo *et al.* (2017), kde bylo použito mapování pomocí GWAS. Modrá barva znázorňuje region, který určil Gilbert (2017) mapováním pomocí genetických markerů. Tmavě modrou barvou je vyznačen region, který získal N. Dietz (spolupráce s University of Missouri) mapováním sedmi isolinií pomocí genetických markerů – u jedné isolinie nebyl v této oblasti zaznamenán žádný signál poukazující na mutaci. Vzdálenosti v grafu jsou proporcionální. Grafy byly vytvořeny pomocí tabulkového procesoru Excel a nástroje PowerPoint.

Na chromosomu 13 identifikoval Gilbert (2017) velmi rozsáhlý region o velikosti 2.398.596 bp (31.833.050-34.231.643), kdežto Bandillo *et al.* (2017) identifikoval výrazně menší oblast o velikosti 42.951 bp (31.878.146-31.921.097).

V této oblasti byly následně vyhledávány signály ze souboru dat získaných analýzou sedmi isogenních linií: L70-4566 (PI 547529), L70-4558 (PI 547528), L70-4112 (PI 547744), L69-6095 (PI 547742), L67-509 (PI 547482), L67-497 (PI 547481) a L67-495 (PI 547480). Všechny tyto isolinie jsou druhu *Glycine max* s normálním nebo částečně řídkým porostem trichomů. Zbarvení lusku je hnědé, obal semene je žlutý a pigmentace pupku je žlutá nebo černá. U dvou isolinií nebyl v této oblasti identifikován žádný signál, který by zaznamenal mutaci, ale u zbylých pěti byl následně identifikován region o velikosti 14.006 bp (31.888.480-31.902.486) (Obr 15). Jak již bylo zmíněno, tento signál nebyl pozorován u všech isolinií, a proto byl pro další analýzu vybrán region, který určil Bandillo *et al.* (2017).



Obr. 15 Graf průniku regionů v lokusu *Pa2* u téměř isogenních linií sóji segregujících pro přílehlý fenotyp postavení trichomů vůči listu. V těchto průnicích se předpokládá výskyt kandidátních genů, jejichž přirozená genomická varianta podmiňuje daný fenotyp. Světle modrá barva znázorňuje region podle Gilbert (2017), kde bylo použito mapování pomocí genetických markerů. Modrou barvou je vyznačen region, který určil Bandillo *et al.* (2017) metodou GWAS. Tmavě modrou barvou je vyznačen region, který získal N. Dietz (spolupráce s University of Missouri) mapováním sedmi isolinií pomocí genetických markerů – u dvou isolinií nebyl v této oblasti zaznamenán žádný signál poukazující na mutaci. Vzdálenosti v grafu jsou proporcionální. Celková oblast regionu v grafu byla velmi rozsáhlá, a proto schéma obsahuje také přiblížený graf. Grafy byly vytvořeny pomocí tabulkového procesoru Excel a nástroje PowerPoint.

4.2 Určení kandidátních genů

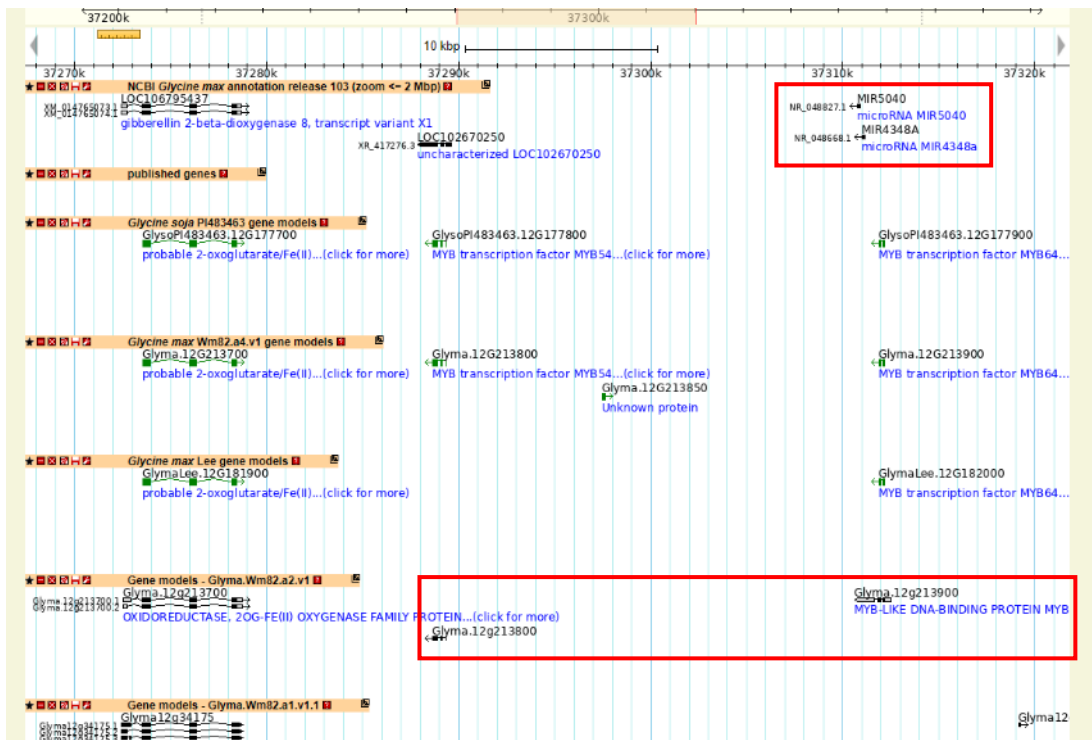
Pomocí bioinformatického nástroje AccuTool byly vyhledávány konkrétní kandidátní geny na chromosomu 12 zodpovědné za fenotypový projev postavení trichomů vůči listu. Pro analýzu byl zvolen region o velikosti 40.456 bp (37.271.684-37.312.140) a byly použity čtyři různé datasety: E a Sa1 vs. A2 (vzpřímený a částečně přilehlý fenotyp – divoký typ, přilehlý fenotyp – mutantní), E1 vs. A a Sa2 (vzpřímený fenotyp – divoký typ, přilehlý a částečně přilehlý fenotyp – mutantní), E1 vs. Sa2 (vzpřímený fenotyp – divoký typ, částečně přilehlý fenotyp – mutantní) a E1 vs. A2 (vzpřímený fenotyp – divoký typ, přilehlý fenotyp – mutantní). Vzprámený fenotyp je divokého typu a je podmíněn dominantní alelou *Pal*, kdežto částečně přilehlý a přilehlý fenotyp je mutantní a je podmíněn recesivní alelou *pal*. Významné výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3).

Tab. 3 Významné výsledky z AccuTool pro chromosom 12, všechny varianty. Jednotlivé datasety jsou seřazeny podle klesající průměrné přesnosti. Dataset: 1 (E a Sa1 vs. A2), 2 (E1 vs. A a Sa2), 3 (E1 vs. Sa2), 4 (E1 vs. A2).

dataset	gen	pozice	reference	alternativa	průměrná přesnost (%)	kombinovaná pesimistická přesnost (%)	přesnost pro divoký typ (%)	přesnost pro mutantní typ (%)	efekt
1	.	37.303.793	A	C	94,0	14,3	96,8	91,3	C intergenic_region
	.	37.285.619	G	C	93,9	14,8	92,1	95,7	C intergenic_region
	.	37.301.250	T	G	92,4	49,3	95,9	88,9	G intergenic_region
	.	37.303.889	C	T	91,6	14,2	96,8	86,4	T intergenic_region
	<i>Glyma.12g213800</i>	37.289.984	A	T	91,4	48,0	95,5	87,3	T upstream_gene_variant
	<i>Glyma.12g213900</i>	37.311.042	C	T	90,9	57,7	95,3	86,5	T 3_prime_UTR_variant
	<i>Glyma.12g213700</i>	37.272.932	A	AT	90,8	55,1	96,1	85,5	AT 5_prime_UTR_variant
2	.	37.285.619	G	C	95,6	15,5	97,9	93,3	C intergenic_region
	.	37.285.619	G	A	95,6	15,5	97,9	93,3	A intergenic_region
	.	37.303.793	A	C	92,1	14,3	98,9	85,2	C intergenic_region
	<i>Glyma.12g213800</i>	37.287.015	T	A	86,9	13,7	97,8	76	A downstream_gene_variant
	<i>Glyma.12g213900</i>	37.310.618	A	T	78,5	53,7	98,3	58,8	T downstream_gene_variant
3	.	37.285.619	G	C	91,8	12,6	97,9	85,7	C intergenic_region
	.	37.285.619	G	A	91,8	12,6	97,9	85,7	A intergenic_region
	<i>Glyma.12g213800</i>	37.287.015	T	A	82,2	11,7	97,8	66,7	A downstream_gene_variant
	<i>Glyma.12g213900</i>	37.311.263	G	A	64,3	12,9	100	28,6	A 3_prime_UTR_variant
4	.	37.285.619	G	C	96,8	14,7	97,9	95,7	C intergenic_region
	.	37.301.250	T	G	93,5	44,5	98,0	88,9	G intergenic_region
	.	37.303.889	C	T	92,7	13,5	98,9	86,4	T intergenic_region
	<i>Glyma.12g213800</i>	37.289.984	A	T	92,6	43,2	97,9	87,3	T upstream_gene_variant
	<i>Glyma.12g213900</i>	37.311.042	C	T	92,4	52,0	98,3	86,5	T 3_prime_UTR_variant
	<i>Glyma.12g213700</i>	37.272.932	A	AT	91,8	49,4	98,2	85,5	AT 5_prime_UTR_variant

Na základě hodnot uvedených v tabulce (Tab. 3) byl určen kandidátní gen *Glyma.12g213900*, který byl navržen již ve studii Gilbert (2017). Pravidlost hypotézy byla potvrzena výsledky uvedenými v této bakalářské práci. Zároveň se jeví jako kandidátní gen i *Glyma.12g213800*. V obou případech se jedná o gen kódující DNA-vazebný protein s MYB doménou, který obsahuje HTH (helix-otočka-helix) motiv a je významný při regulaci transkripce v rostlinách (Jin a Martin, 1999). Zároveň jsou geny *Glyma.12g213800* a *Glyma.12g213900* lokalizovány na chromosomu 12 poměrně blízko sebe, což může evokovat CNV (Obr. 16). Pro ověření této možnosti byly porovnány proteinové sekvence obou genů (Obr. 17). Na základě výsledků porovnání proteinových sekvencí se dá odhadovat, že se nejedná o CNV. Gen *Glyma.12g213900* byl zřejmě vytvořen duplikací genu *Glyma.12g213800* s následnou nezávislou evolucí. Studie Bandillo *et al.* (2017) tyto dva kandidátní geny vůbec nezmiňuje, jelikož ve verzi nomenklatury Wm82.a1.v1.1, se kterou Bandillo pracoval, vůbec nejsou. Zajímavá je anotace modelu genu podle nástrojů NCBI, kde je v 3' oblasti genu *Glyma.12g213900* místo něj anotován jiný gen pro nespecifickou microRNA (Obr. 17). Ty mají, jak je známo regulační vliv. Mutace v odpovídající oblasti případného možného výskytu funkční varianty tohoto genu mají srovnatelně vysokou přesnost jako mutace v kandidátních genech.

S vysokou hodnotou průměrné přesnosti byl stanoven také gen *Glyma.12g213700*. Spojitost tohoto genu s fenotypovým projevem postavení trichomů vůči listu však postrádá biologický smysl, jelikož se jedná o gen kódující protein s oxidoreduktasovou aktivitou.



Obr. 16 Lokalizace kandidátních genů *Glyma.12g21380* a *Glyma.12g21390* v genomu sóji (ohraničeno) a nespecifická microRNA (ohraničeno). (převzato ze soybase.org)

```

Glyma.12g21380 METGVQFLPKQETSFEDLTIIELHVGNKWSIIASHLWKQ- TSNGIMNYWN
Glyma.12g21390 MEKI-----NSKLVVYVEKHHGHNWCSVPEKAGLQRCRRSCLRWI
                *.          . : . . : * * . : * . : . . . : * . . . *

```

```

Glyma.12g21380 TNVKKRFIRMDIHSITHKSKANTFEAYGGHQSKDVIRINHMMGECSI
Glyma.12g21390 SDLKPETT-----
                : : : * .

```

Obr. 17 Porovnání proteinové sekvence genů *Glyma.12g21380* a *Glyma.12g21390* pomocí T-Coffee ClustalW. (ebi.ac.uk)

Vybraný region podle Bandillo *et al.*, (2017) na chromosomu 13 o velikosti 42.951 bp (31.878.146-31.921.097) byl analyzován pomocí bioinformatického nástroje AccuTool. Stanovení na chromosomu 13, kde se nachází alela *Pa2* je značně ztíženo skutečností, že vzpřímený fenotyp (E, erect) může být zapříčiněn jak dominantní alelou *Pa2*, tak i recesivní alelou *pa2*. Proto je možné získat významné výsledky pouze porovnáním částečně přilehlého fenotypu, který je podmíněn dominantní alelou *Pa2* a přilehlého fenotypu, který podmiňuje recesivní alela *pa2*. Proto byl použit dataset A1 vs. Sa2 (přilehlý fenotyp – divoký typ, částečně přilehlý fenotyp – mutantní) a byly získány výsledky uvedené v tabulkách (Tab. 4, Tab. 5). Aby byly zohledněny veškeré hodnoty a byl vybrán vhodný kandidátní gen, byly výsledky filtrovány podle jednotlivých parametrů vždy od nejvyšší hodnoty.

Analýzou výsledků, které byly získány pomocí AccuTool (Tab. 4, Tab. 5) je možné obecně říct, že analýza přesnosti asociace sice pomohla vysvětlit situaci v oblasti lokusu *Pa2*, ale rozhodně jednoznačně neurčila kandidátní gen, jako v případě alely *Pa1*, kde se hodnoty přesnosti u kandidátních variant pohybovaly i nad 90 %. Vzhledem k tomu, že momentálně neexistuje bioinformatický nástroj, který by umožnil analýzu případného výskytu vícečetných alel, což by analýzu zpřesnilo, byl pro alelu *Pa2* na základě získaných výsledků vybrán jako potenciální kandidátní gen *Glyma.13g204900*. Jedná se o gen kódující DNA vazebný protein obsahující homeobox doménu neboli homeodoménu, kde vazba DNA probíhá pomocí struktury helix-otočka-helix. Tento gen se jeví také jako potenciální paralog genu *Glyma.12g213900*, jelikož oba geny kódují proteiny se stejnou funkcí. *Glyma.13g204900* určil jako možný kandidátní gen také Bandillo *et al.* (2017), ale ve výčtu potenciálních kandidátních genů uvádí tato studie i geny *Glyma.13g204700* a *Glyma.13g204800*, které se také objevily ve výsledcích získaných pomocí nástroje AccuTool. *Glyma.13g204700* kóduje glykosyl-transferasu a *Glyma.13g204800* kóduje protein účastnící se proton-transportního řetězce ATPasy, a proto není předpokládána spojitost těchto dvou genů s fenotypovým projevem postavení trichomů vůči listu. Nástroj přiřadil signifikantně významnou přesnost i genu *Glyma.13g205000*, avšak s nízkou hodnotou kombinované pesimistické přesnosti, jelikož u tohoto genu chybí fenotypová data. Zároveň není známa funkce tohoto genu.

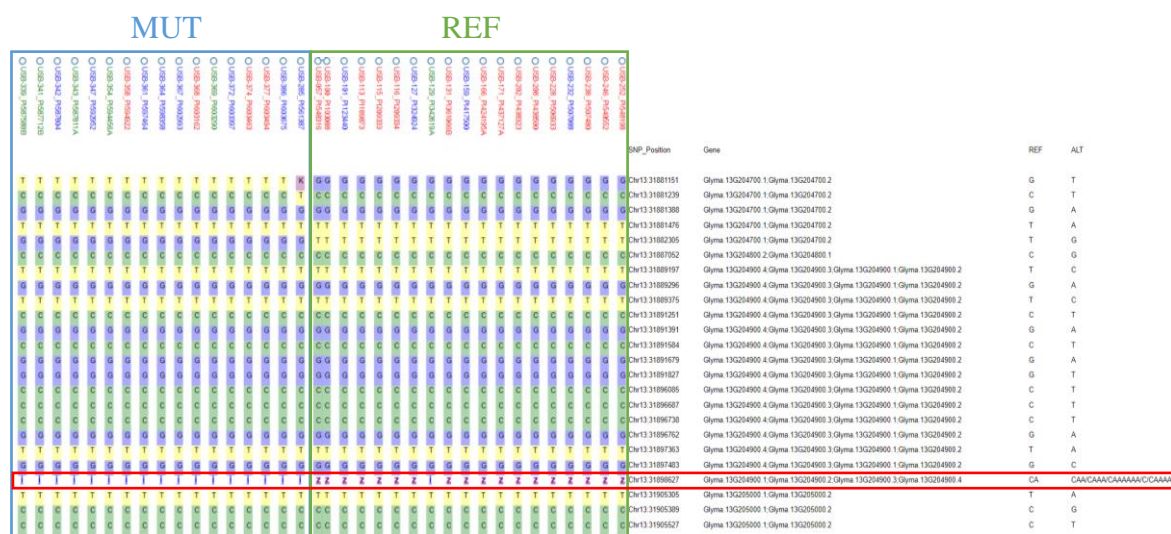
Tab. 4 Významné výsledky z Accutool pro chromosom 13, pouze varianty měnící aminokyseliny. Filtrování: 1. řazení podle průměrné přesnosti, 2. řazení podle kombinované pesimistické přesnosti, 3. přesnost pro divoký typ = 100% a seřazeno podle průměrné přesnosti, 4. přesnost pro mutantní typ = 100% a seřazeno podle průměrné přesnosti.

filtrování	gen	pozice	reference	alternativa	průměrná přesnost (%)	kombinovaná pesimistická přesnost (%)	přesnost pro divoký typ (%)	přesnost pro mutantní typ (%)
1	<i>Glyma.13g204700</i>	31.881.151	G	T	61,2	10,3	64,4	57,9
	<i>Glyma.13g204900</i>	31.889.296	G	A	58,0	11,0	91,0	25,0
	<i>Glyma.13g204800</i>	31.887.664	C	A	52,2	10,2	97,4	6,9
2	<i>Glyma.13g204900</i>	31.889.296	G	A	58,0	11,0	91,0	25,0
	<i>Glyma.13g204700</i>	31.881.239	C	T	57,1	11,0	94,9	19,3
	<i>Glyma.13g204800</i>	31.887.664	C	A	52,2	10,2	97,4	6,9
	<i>Glyma.13g205000</i>	31.905.389	C	G	50,9	10,2	100	1,7
3	<i>Glyma.13g204900</i>	31.889.375	T	C	51,0	7,0	100	2,0
	<i>Glyma.13g204800</i>	31.887.052	C	G	51,0	6,8	100	2,0
	<i>Glyma.13g205000</i>	31.905.535	GC	G	51,0	6,8	100	2,0
	<i>Glyma.13g204700</i>	31.881.280	C	A	50,9	10,3	100	1,7
4	<i>Glyma.13g204700</i>	31.881.470	C	T	53,2	8,0	6,4	100
	<i>Glyma.13g204900</i>	31.889.197	T	C	50,6	7,6	1,3	100

Tab. 5 Významné výsledky z Accutool pro chromosom 13, všechny varianty. Filtrování: 1. řazení podle průměrné přesnosti, 2. řazení podle kombinované pesimistické přesnosti, 3. přesnost pro divoký typ = 100% a seřazeno podle průměrné přesnosti, 4. přesnost pro mutantní typ = 100% a seřazeno podle průměrné přesnosti.

filtrování	gen	pozice	reference	alternativa	průměrná přesnost (%)	kombinovaná pesimistická přesnost (%)	přesnost pro divoký typ (%)	přesnost pro mutantní typ (%)
1	<i>Glyma.13g205000</i>	31.903.821	ATATATATAT					
			ATATATATAT	A	100	0,3	100	100
2	.	31.913.480	T	C	62,1	11,6	89,7	34,5
	.	31.916.013	TCTTAGTATC	T	62,5	11,5	81,0	43,9
	.	31.912.570	A	G	62,3	11,5	89,6	35,1
	.	31.913.370	T	A	62,0	11,4	89,5	34,5
	<i>Glyma.13g204900</i>	31.894.381	C	A	63,5	11,2	75,3	51,8
3	<i>Glyma.13g205000</i>	31.903.821	ATATATATAT					
			ATATATATAT	A	100	0,3	100	100
	.	31.900.997	T	A	68,8	3,7	100	37,5
	.	31.902.201	C	T	68,8	3,4	100	37,5
	.	31.909.313	G	A	66,7	3,1	100	33,3
	<i>Glyma.13g204900</i>	31.900.357	T	A	60,7	3,5	100	21,4
<i>Glyma.13g204800</i>	31.887.709	CTTG	C	57,1	3,2	100	14,2	
4	<i>Glyma.13g205000</i>	31.903.821	ATATATATAT					
			ATATATATAT	A	100	0,3	100	100
	.	31.917.757	TCTTC	T	60,0	0,5	20,0	100
<i>Glyma.13g204900</i>	31.900.493	T	C	60,0	0,3	20,0	100	

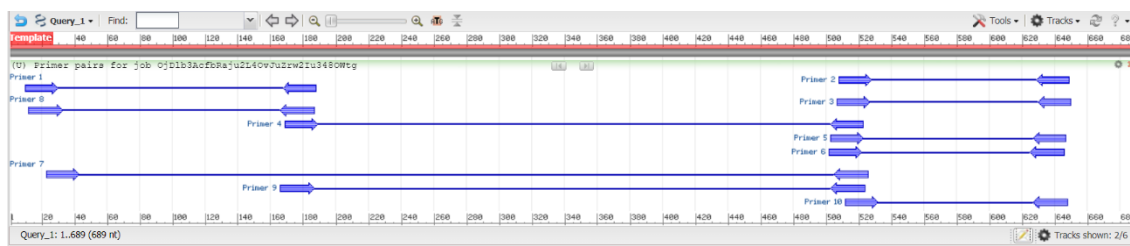
Výsledky uvedené v tabulce (Tab. 5) poukazují na komplikaci v *Pa2* lokusu, která se projevuje velice nízkou (až nulovou) kombinovanou pesimistickou přesností. Ta je dána vysokým procentem chybějícího genotypu. To může být následkem nedostatečné kvality tzv. skvenačních readů varet v Soy775 data setu nebo také nepřesným poskládáním sekvence referenční variety Williams 82. Pro ověření kontextu asociovaných mutací v této oblasti byla provedena analýza haplotypu pomocí SNPviz 2.0. Následně byla v této oblasti hledána konkrétní mutace, která by byla zodpovědná za fenotypový projev postavení trichomů vůči listu. Analýza haplotypu byla provedena v rozsahu 31.880.000-31.910.000, kdy byla v pozici 31.898.627, která se nachází v oblasti genu *Glyma.13g204900*, nalezena mutace, konkrétně inserce, která by mohla být zodpovědná za znak postavení trichomů vůči listu. Specifická podoba této inserce však známa není, ale je navrženo několik variant, jak by mohla inserce vypadat (Obr. 18). V referenčním genomu se vyskytuje varianta CA, kdežto v mutantním genomu se může vyskytovat CAA, CAAA, CAAAAA, C nebo CAAA. Sekvenování insercí tohoto charakteru je však momentálně technicky náročné. Výsledkem analýzy pomocí SNPviz 2.0 je předpoklad, že by tato mutace moha být potenciálně specifická mezi vzprímenými a přilehlými trichomy aspoň u části varet. Dá se tedy usuzovat, že tyto variety nemusí mít jednotné genetické pozadí. Tuto mutaci by bylo nutné ověřit u jednotlivých vybraných varet například pomocí Sangerova sekvenování.



Obr. 18 Vizualizace alely *Pa2* na chromosomu 13 pomocí SNPviz 2.0, kdy na genu *Glyma.13g204900* v pozici 31.898.627 dochází k nespecifické inserci – ohraničeno červěně. REF = referenční genom, MUT = mutantní genom. Fenotypy: červená – vzprímené trichomy, modrá – částečně přilehlé trichomy, zelená – přilehlé trichomy.

4.3 Návrh primerů

Pomocí webového nástroje Primer-BLAST byly navrženy primery, které by byly následně využity při PCR reakci pro amplifikaci genu *Glyma.12g213800*. Gen se nachází na chromosomu 12 v pozici 37.288.662-37.289.350. Do nástroje byla vložena mRNA genu, která je dostupná na soybase.org. a po úpravě některých dalších parametrů bylo nástrojem navrženo deset potenciálních primerů (Obr. 19, Tab. 6). Následně by byl vybrán nejvhodnější primer, který by svými parametry soughlásil s požadavky pro danou PCR reakci.



Obr. 19 Grafické znázornění primerů navržných pomocí nástroje NCBI Primer-BLAST pro amplifikaci genu *Glyma.12g213800*.

Tab. 6 Konkrétní primery navržené pomocí nástroje NCBI Primer-BLAST pro amplifikaci genu *Glyma.12g213800*, jejich sekvence, teplota tání (T_m), délka primeru (NTP), obsah guaninu a cytosinu (GC) a délka amplifikované části.

primerový pár	primery	sekvence (5' → 3')	T _m (°C)	délka (NTP)	obsah GC (%)	délka amplikonu
1	přímý	GGCGTTCAATTCCTGCCAAA	59,68	20	50	178
	zpětný	CCACCTCAGTCGATCTGCAA	59,75	20	55	
2	přímý	GGAAGCAAACGAGCAATGGG	60,11	20	55	141
	zpětný	CGTCCTTCGACTGATGACCA	59,47	20	55	
3	přímý	TGGAAGCAAACGAGCAATGG	59,40	20	50	143
	zpětný	ACGTCCTTCGACTGATGACC	59,47	20	55	
4	přímý	TGCAGATCGACTGAGGTGGA	60,61	20	55	354
	zpětný	TGCTCGTTTGCTTCCACAAG	59,34	20	50	
5	přímý	CTTGTGGAAGCAAACGAGCA	59,34	20	50	144
	zpětný	TCCTTCGACTGATGACCACC	59,10	20	55	
6	přímý	ACTTGTGGAAGCAAACGAGC	59,34	20	50	144
	zpětný	CCTTCGACTGATGACCACCAT	59,79	21	52	
7	přímý	TGCCAAAGCAGGTAAACCAC	58,96	20	50	503
	zpětný	CATTGCTCGTTTGCTTCCACA	60,00	21	48	
8	přímý	CGTTCAATTCCTGCCAAAGCA	60,00	21	48	175
	zpětný	CACCTCAGTCGATCTGCAACT	60,07	21	52	
9	přímý	AGTTGCAGATCGACTGAGGTG	60,07	21	52	358
	zpětný	TTGCTCGTTTGCTTCCACAAG	59,93	21	48	
10	přímý	GCAAACGAGCAATGGGATCA	59,19	20	50	136
	zpětný	GTCCTTCGACTGATGACCACC	60,40	21	57	

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST B

5.1 Biologický materiál

Variety s odlišným fenotypem postavením trichomů vůči listu, viz. příloha 1 (Kaňovská, 2020). Celkem se jedná o 91 variet, kdy 25 má vzpřímený fenotyp (E), 8 má téměř vzpřímený fenotyp (nE), 34 má částečně přilehlý fenotyp (SA), 2 mají téměř přilehlý fenotyp (nA), 16 má přilehlý fenotyp (A) a 6 nemá fenotyp definován.

5.2 Chemikálie

- Ethylendiamintetraoctová kyselina (Fluka, Česká republika)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, Německo)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Německo)

5.3 Přístroje a vybavení

- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Digitální pH metr (InoLab, Německo)
- Elektroforetická cela (Bio-Rad, USA)
- Elektromagnetická míchačka (Biosan, Lotyšsko)
- Gel Doc EZ systém (BioRad, Německo)
- Předvážky (KERN, Německo)
- T100 Thermal Cyclor (BioRad)

5.4 Roztoky

- TAE (Tris-acetát-EDTA) pufr (0,04 M Tris-kyselina octová; 0,001 M EDTA; pH 8,3)
- TENT pufr (10 mM Tris-Cl; 1mM EDTA; 12 mM NaCl; 2,5% Triton X-100; pH 8)
- TE pufr (10 mM Tris-Cl; 0,1 mM EDTA; pH 8)

5.5 Reagencie pro molekulární biologii

- 5 mM dNTP (Thermo Scientific, USA)
- Barvivo GelRed® (Biotinum, USA)
- Hmotnostní standard GeneRuler 1kb DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
- iProof™ High-Fidelity DNA polymeráza (BioRad, Německo)
- iProof™ High-Fidelity pufr (BioRad, Německo)
- Nanášecí pufr – 6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific, USA)
- Primery 09_kin_new_fw a 09_kin_new_TTTrev
- Whatman® FTA® Cards (Sigma-Aldrich, USA)

5.6 Metody

5.6.1 Whatman® FTA® karty

Velmi efektivním způsobem zachycení rostlinných nebo živočišných organických materiálů jsou Whatman® FTA® (Flinders Technology Associates) karty. Vzorky jsou klasicky skladovány při velice nízkých teplotách, ale toto řešení může být velmi nákladné. Po zachycení tkáně nebo pletiva na Whatman® FTA® kartách mohou být vzorky po řádném zaschnutí dlouhodobě skladovány a přemísťovány při pokojových teplotách (Santos, 2018).

FTA karty jsou tvořeny speciálním typem filtračního papíru, který obsahuje látky zabírající lýzi buněk a denaturaci proteinů. Nukleové kyseliny jsou uvolněny, následně zafixovány a stabilizovány na kartě. Pro následovné použití vzorku je vyříznut kousek karty, se kterým se dále pracuje.

Kritickým faktorem je doba a teplota, při které zasychá biologický materiál na kartě. Největší koncentrace látek byly získány, když byly karty sušeny 2 hodiny při laboratorní teplotě nebo 5 až 10 minut při 60 °C. Sušení při vyšší teplotě je efektivnější, jelikož je to časově méně náročné (Vargas Wolfgramm *et al.*, 2009).

Pro další použití je nutné nukleové kyseliny aktivovat a z kousku karty eluovat. Tento proces se provádí promýváním pufru v mikrozkuhavce.

5.6.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce neboli polymerase chain reaction (PCR) je metoda rychlé amplifikace, tedy zmnožení úseku DNA. Pomocí této metody se enzymaticky syntetizuje specifická sekvence DNA. Metoda využívá dva primery hybridizující

opačné konce části nukleové kyseliny a vymežující úsek, který má být zmnožen. Probíhá repetitivní série cyklů zahrnující denaturaci templátu, navázání primeru a elongaci řetězce. Výsledkem PCR reakce je exponenciální akumulace specifického úseku DNA, jelikož každý nový řetězec jednoho cyklu se stává templátem pro další cyklus (Erlich, 1989). Za objev této metody byl v roce 1993 oceněn Kary Mullis Nobelovou cenou za chemii.

Aby reakce proběhla, je nutné mít ve směsi všechny potřebné komponenty. Samozřejmě součástí je templát DNA, který je amplifikován. Dále jsou ve směsi přítomny dva primery, což jsou oligonukleotidy komplementární ke koncům amplifikovaného úseku, na které nasedají. Jako stavební kameny slouží volné deoxyribonukleotidy (dNTP) – dATP, dGTP, dCTP a dTTP. Samotnou reakci zprostředkovává termostabilní enzym DNA polymerasa izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, který je aktivní i při teplotách přes 90 °C. Ke směsi je přidáván také pufr pro udržení stabilního pH.

V prvním kroku je směs zahřívána na teplotu okolo 95 °C, kdy dojde k porušení vodíkových můstků mezi jednotlivými vlákny DNA. Zahřívání při této teplotě probíhá v rámci desítek sekund. Následně je teplota snížena, aby mohly na rozvolněná vlákna nasednout komplementární primery a naváže se také DNA polymeráza. Teplota je opět zvýšena na 72 – 80 °C, kdy se DNA polymeráza nachází v teplotním optimu a dochází k samotné syntéze DNA od 5' konce ke 3' konci. Většinou se provádí asi 30 cyklů tohoto procesu, který se nazývá elongace. Celá reakce běží v termocykléru, což je přístroj schopný měnit teplotu během několika sekund.

5.6.3 Elektroforéza na agarosovém gelu

Agarosová gelová elektroforéza je jednoduchá a vysoce efektivní metoda pro separování, identifikaci a přečištění DNA fragmentů o velikosti 0,5 – 25 kb. Samotnému procesu rozdělení fragmentů DNA v elektrickém poli předchází příprava gelu a případně barvení vzorků. Barvivo může být přidáno také do gelu nebo pufru. Rutinně používanými barvivy jsou například ethidium bromid nebo GelRed. Musí být správně zvoleno napětí a čas, kdy proces probíhá, aby bylo dosaženo optimální separace (Voytas, 2000).

Agarosa je izolována z určitých rodů mořských řas a skládá se z opakovaných podjednotek agarobiosy (L- a D-galaktózy). (Lee *et al.*, 2012) Gel je připraven z agarosy rozpuštěné za tepla v pufru o koncentraci, která je vhodná pro separaci určité

velikosti fragmentů DNA. Směs je nalita do formy s hřebínkem pro vytvoření jamek a gel je ponechán, aby vychladnul na laboratorní teplotu a zatusnul. Gel je přenesen do elektroforetické cely, která je naplněna vhodným elektrolytickým pufrům a do jamek jsou nanášeny vzorky. Po zakrytí cely víkem a připojení ke zdroji je nastaveno vhodné napětí a probíhá dělení fragmentů. Konečná vizualizace gelu je prováděna pomocí UV lampy (Sambrook a Russell, 2006).

5.6.4 Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování nebo také metoda sekvenování ukončením řetězce byla vyvinuta a publikována roku 1977 Frederickem Sangerem a jeho týmem. Od té doby byla a je tato metoda hojně využívána a je považována za tzv. zlatý standard sekvenování. Nabízí spoustu výhod, ale také omezení, která však můžou v této době doplnit jiné techniky (Fakruddin a Chowdhury, 2012).

Klasická metoda využívá dideoxyribonukleotidové analogy trifosfátů (ddNTP), které se chovají jako inhibitory DNA polymerasy a specificky ukončují řetězec. Principem je zakomponování dideoxyribonukleotidu v rostoucím oligonukleotidovém řetězci do místa, kde by byl přiřazen příslušný deoxyribonukleotid. Jelikož ddNTP neobsahují žádnou hydroxy skupinu, je znemožněno navázání dalšího nukleotidu a vznikají tak oligonukleotidy lišící se délkou o jeden nukleotid. Reakční směs musí obsahovat primer, templát, DNA polymerasu, dideoxyribonukleotidy (ddATP, ddGTP, ddCTP a ddTT) a deoxyribonukleotidy (dATP, dGTP, dCTP a dGTP). Jednotlivé ddNTP mohou být označeny radioaktivním izotopem fosforu ^{32}P , kdy je vždy označen jeden nukleotid ve směsi a reakce musí probíhat zvlášť. Druhým způsobem je fluorescenční značení. Tento princip byl vyvinut později a má tu výhodu, že je každému ddNTP je přiřazeno specifické fluorescenční barvivo. Následně probíhá rozdělení fragmentů elektroforézou na polyakrylamidovém gelu a konečná vizualizace. Metoda je v průběhu let stále vylepšována nově vyvinutými vědeckými postupy (Sanger *et al.*, 1977; Stranneheim a Lundeberg, 2012).

5.7 Provedené experimenty

5.7.1 Izolace genomové DNA

Rostlinný materiál byl za sterilních podmínek izolován z FTA karet pomocí skalpelu, kdy byly vyřezávány čtverečky (asi 1 mm x 1 mm), které byly vloženy

do mikroskopavek. Následně byla aktivována a eluována rostlinná DNA pomocí dvou pufrů, které byly aplikovány automatickými pipetami. Vzorky byly promyty 3x 100 μ l TENT pufru, 2x 100 μ l TE pufru a sušeny v digestoři asi jednu hodinu.

5.7.2 PCR

V laminárním boxu, který byl předem sterilizován UV světlem (15 minut) byly připraveny roztoky pro PCR reakci (Tab. 7).

Tab. 7 Objemy jednotlivých roztoků použitých v reakční směsi pro PCR reakci

činidlo	V (μ l)	výsledná koncentrace
5x iProof pufr	10	1x
dNTPs	2	200 μ M (každý dNTP)
fw primer	1	0,5 μ M
rev primer	1	0,5 μ M
iProof DNA pol	0,25	
ddH ₂ O	35,75	0,02 U/ μ l
Σ	50	

Do mikroskopavek byly k suchým čtverečkům přidány roztoky potřebné pro PCR reakci. Mikroskopavky byly vloženy do přístroje T100 Thermal Cycler, kde byly nastaveny potřebné parametry (Tab. 8) a byla zahájena reakce. Proběhlo 30 cyklů a reakce trvala 1 hod 22 min.

Tab. 8 Parametry pro PCR reakci

fáze	teplota ($^{\circ}$ C)	čas (s)	počet cyklů
počáteční denaturace	98	30	1
denaturace	98	10	
nasednutí primerů	49,9	20	30
elongace	72	30	
finální denaturace	72	300	1

5.7.3 Agarosová elektroforéza

Agarosový gel (0,8%) byl připraven rozpuštěním 0,8 g agaru ve 100 ml TAE pufru za tepla. Dále byl gel přelit do nalévací vany a obarven barvivem GelRed. Po zatuhnutí byl gel s jamkami vytvořenými pomocí hřebínku, přenesen do elektroforetické cely, která byla naplněna TAE pufrem. Do první jamky byl nanesen standard GeneRuler 1 kb DNA ladder (6 μ l). Následně bylo vždy 5 μ l vzorku smícháno s 1 μ l nanášecího pufru a takto připravené vzorky byly napipetovány do jamek. Cella byla připojena ke zdroji napětí (90 V) a separace probíhala 1 hodinu. Po ukončení elektroforézy byl gel vložen do přístroje Gel Doc EZ (BioRad), kde proběhla vizualizace.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE B

V plánu experimentů byla izolace genomové DNA, PCR, přečištění PCR produktu, spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA, Sangerovo sekvenování a finální analýza, která by potvrdila nebo vyvrátila navržený kandidátní gen s určitou mutací.

Tyto experimenty byly provedeny cvičně s varietami bez trichomů pro objasnění a osvojení metod, protože doručení variet, se kterými jsem měla pracovat v této práci bylo z důvodů pandemické situace opožděno o půl roku.

Analogicky měly být pomocí zmíněných metod ověřeny kandidátní geny pro postavení trichomů vůči listu.

7 ZÁVĚR

V této práci byla vypracována literární rešerše, která se zabývá morfologickými znaky trichomů sóji luštinaté se zaměřením na hustotu trichomů, postavení trichomů vůči listu a přínosem trichomů pro rostlinu.

V experimentální části byly navrženy kandidátní geny pro znak postavení trichomů vůči listu, kde jsou rozlišovány tři fenotypy: vzpřímený, částečně přilehlý a přilehlý. Nejprve byl určen region výskytu kandidátních genů, který byl stanoven analýzou již publikovaných dat ze tří nezávislých zdrojů získaných mapováním pomocí genetických markerů nebo GWAS. Pro chromosom 12, kde je lokalizovaná alela *Pa1* byl určen region o velikosti 40.456 bp (37.271.684-37.312.140). Alela *Pa2* se nachází na chromosomu 13, kde byl určen region o velikosti 42.951 bp (31.878.146-31.921.097).

Následně byly pomocí webových nástrojů vyhledávány konkrétní kandidátní geny, případně i mutace v genech zodpovědné za postavení trichomů vůči listu. Pro chromosom 12 byly vybrány kandidátní geny *Gylma.12g213800* (mutace v pozici 37.289.948 bp, záměna adeninu za thymin: A→T, průměrná přesnost = 91,4 %) a *Glyma.12g213900* (mutace v pozici 37.311.042, záměna cytosinu za thymin: C→T, průměrná přesnost = 90,9 %). Oba tyto geny kódují DNA vazebný protein, který obsahuje MYB doménu. Za znak postavení trichomů vůči listu je zřejmě zodpovědná také microRNA nacházející se na chromosomu 12. Výsledky pro chromosom 13 naznačují, že je tato oblast komplikována kvalitou sekvenčních dat, a proto nebyl jednoznačně potvrzen žádný kandidátní gen na základě hodnot přesnosti. Jako nejvíce pravděpodobný kandidátní gen byl určen *Glyma.13g204900*, který kóduje DNA vazebný protein obsahující homeodoménu a je zároveň možným paralogem genu *Glyma.12g213900*. Právě v tomto genu byla také identifikována inserce, která může způsobovat rozdílné postavení trichomů vůči listu, ale míra nejistoty tohoto tvrzení je vysoká.

Byly také navrženy primery pro PCR reakci k amplifikaci genu *Glyma.12g213800*.

Osvojila jsem si popsané experimentální laboratorní metody, ale z pandemických důvodů jsem je nemohla použít pro vlastní vzorky.

8 LITERATURA

- Amaliah N., Zubaidah S., Kuswanto H. (2019): Trichomes and Stomata Diversity in Soybean (*Glycine max* L. Merrill) Lines. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* **276**:012025
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/276/1/012025/meta>
- Arikait S., Yoshihashi T., Wanchana S., Uyen T. T., Huong N. T., Wongpornchai S., Vanavichit A. (2011): Deficiency in the amino aldehyde dehydrogenase encoded by GmAMADH2, the homologue of rice Os2AP, enhances 2-acetyl-1-pyrroline biosynthesis in soybeans (*Glycine max* L.). *Plant biotechnology journal* **9**, 75-87.
- Bandillo N. B., Lorenz A. J., Graef G. L., Jarquin D., Hyten D. L., Nelson R. L., Specht J. E. (2017): Genome-wide Association Mapping of Qualitatively Inherited Traits in a Germplasm Collection. *The plant genome* **10**, 1-18.
- Bernard R. L. (1975c): The inheritance of appressed pubescence. *Soybean Genetics Newsletter* **2**, 34-36.
- Bernard R. L., Singh B. B. (1969): Inheritance of Pubescence Type in Soybeans: Glabrous, Curly, Dense, Sparse, and Puberulent. *Crop Science* **9**, 192-197.
- Bickford C. P. (2016): Ecophysiology of leaf trichomes. *Functional Plant Biology* **43**, 807-814.
- Born H. (2006): Edamame: vegetable soybean. *National Center for Appropriate Technology (NCAT) a Publication of ATTRA-National Sustainable Agriculture Information Service*.
<https://attra.ncat.org/atrapub/viewhtml.php>
- Campbell B. W., Hofstad A. N., Sreekanta S., Fu F., Kono T. J., O'Rourke J. A., Vance C. P., Muehlbauer G. J., Stupar R. M. (2016): Fast neutron-induced structural rearrangements at a soybean NAP1 locus result in gnarled trichomes. *Theoretical and Applied Genetics* **129**, 1725-1738.
- Campbell B. W., Hoyle J. W., Bucciarelli B., Stec A. O., Samac D. A., Parrott W. A., Stupar R. M. (2019): Functional analysis and development of a CRISPR/Cas9 allelic series for a CPR5 ortholog necessary for proper growth of soybean trichomes. *Scientific reports* **9**:14757.
<https://www.nature.com/articles/s41598-019-51240-7>
- Celano G., Minnocci, A., Sebastiani L., D'auria M., Xiloyannis C. (2009): Changes in the structure of the skin of kiwifruit in relation to water loss. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **84**, 41-46.
- Clop A., Vidal O., Amills M. (2012): Copy number variation in the genomes of domestic animals. *Animal genetics* **43**, 503-517.
- Dolatabadian A., Patel D. A., Edwards D., Batley J. (2017): Copy number variation and disease resistance in plants. *Theoretical and Applied Genetics* **130**, 2479-2490.
- DonauSoja: <https://www.donausoja.org/en/home/> (20. 2. 2021)
- Doughty C. E., Field C. B., McMillan A. M. (2011): Can crop albedo be increased through the modification of leaf trichomes, and could this cool regional climate?. *Climatic Change* **104**, 379-387.
- Eichler E. E. (2008): Copy number variation and human disease. *Nat Educ* **1**:1
<https://www.nature.com/scitable/topicpage/copy-number-variation-and-human-disease-741737/>
- Erlich H. A. (1989): Basic methodology. In: *PCR technology, Principles and Applications for DNA Amplification*. Vol. 246, (Erlich H. A.), Palgrave Macmillan, Londýn, 1-5.
- Fakruddin M. D., Chowdhury A. (2012): Pyrosequencing an alternative to traditional Sanger sequencing. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* **8**, 14-20.
- feednavigator.com: <https://www.feednavigator.com/Article/2020/12/11/Use-of-Europe-Soya-certified-SPC-source-in-feed-could-dramatically-boost-the-sustainability-profile-of-Norwegian-salmon-production> (12. 3. 2021).
- Freeman J. L., Perry G. H., Feuk L., Redon R., McCarroll S. A., Altshuler D. M., Aburatani H., Jones K. W., Tyler-Smith C., Hurles M. E., Carter N. P., Scherer S. W., Lee, C. (2006): Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome research* **16**, 949-961.

- Gijzen M., Kuflu K., Moy P. (2006): Gene amplification of the Hps locus in *Glycine max*. *BMC plant biology* **6**:6.
<https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2229-6-6>
- Gilbert E. F.-L. (2017): *A Genomewide Analysis of the USDA Soybean Collection*. Master thesis, University of Minnesota, Minneapolis, USA.
- Gorashy S. R., Pendleton J. W., Bernard R. L., Baner M. (1971): Effect of the leaf pubescens on transpiration, photosynthetic rate and seed yield of the three near-isogenic lines of soybean. *Crop Science* **11**, 426-427.
- GRIN/U.S. National Germplasm System,
<https://npgsweb.arsgrin.gov/gringlobal/descriptor/detail?id=51056> (27. 2. 2021).
- Gülz P. G., Herrmann T., Hangst K. (1996): Leaf trichomes in the genus *Cistus*. *Flora* **191**, 85-104.
- Hallett I. C., Sutherland P. W. (2005): Structure and development of kiwifruit skins. *International Journal of Plant Sciences* **166**, 693-704.
- Healy R. A., Horner H. T., Bailey T. B., Palmer R. G. (2005): A microscopic study of trichomes on gynoecea of normal and tetraploid Clark cultivars of *Glycine max* and seven near-isogenic lines. *International journal of plant sciences* **166**, 415-425.
- Healy R. A., Palmer R. G., Horner H. T. (2009): Multicellular secretory trichome development on soybean and related *Glycine* gynoecea. *International Journal of Plant Sciences* **170**, 444-456.
- Chang H. X., Hartman G. L. (2017): Characterization of insect resistance loci in the USDA soybean germplasm collection using genome-wide association studies. *Frontiers in plant science* **8**:670.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00670/full>
- Chaudhary J., Patil G. B., Sonah H., Deshmukh R. K., Vuong T. D., Valliyodan B., Nguyen H. T. (2015): Expanding omics resources for improvement of soybean seed composition traits. *Frontiers in plant science*, **6**:1021.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.01021/full>
- Cheng C. Y., Krishnakumar V., Chan A. P., Thibaud-Nissen F., Schobel S., Town C. D. (2017): Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *The Plant Journal* **89**, 789-804.
- Iafate A. J., Feuk L., Rivera M. N., Listewnik M. L., Donahoe P. K., Qi Y., Scherer S. W., Lee C. (2004): Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature genetics* **36**, 949-951.
- Illumina: <https://www.illumina.com/> (31. 3. 2021)
- Iqbal Z., Arshad M., Ashraf M., Naeem R., Malik M. F., Waheed A. (2010): Genetic divergence and correlation studies of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] genotypes. *Pakistan Journal of Botany* **42**, 971-976.
- Jia P., Wang L., Meltzer H. Y., Zhao Z. (2010): Common variants conferring risk of schizophrenia: a pathway analysis of GWAS data. *Schizophrenia research* **122**, 38-42.
- Jin H., Martin, C. (1999): Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant molecular biology* **41**, 577-585.
- Jeong N., Moon J. K., Kim H. S., Kim C. G., Jeong S. C. (2011): Fine genetic mapping of the genomic region controlling leaflet shape and number of seeds per pod in the soybean. *Theoretical and applied genetics* **122**, 865-874.
- Johnson D., Wang S., Suzuki A. (2000): Edamame: A vegetable soybean for Colorado. *Energy (Kcal)* **582**, 385-387
- Kaňovská I. (2020): *Genotypizace a fenotypizace důležitých agronomických znaků sóji Glycine max [L.] Merr.* Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Khan G., Zhang F., Gao Q., Rehman K., Khan M. A., Chen, S. (2013): Trichomes diversity in the tropical flora of Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research* **7**, 1587-1592.
- Kitazawa Seed Co.: https://www.kitazawaseed.com/seed_272-8.html (16. 3. 2021).

- Komatsu K., Okuda S., Takahashi M., Matsunaga R., Nakazawa Y. (2007): Quantitative trait loci mapping of pubescence density and flowering time of insect-resistant soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Genetics and Molecular Biology* **30**, 635-639.
- Konovsky J., Lumpkin T. A., McClary D. (1994): Edamame: the vegetable soybean. *Understanding the Japanese food and agrimarket: A multifaceted opportunity* **1988**, 173-181.
- Kortekamp A., Zyprian E. (1999): Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew of grape. *Journal of Phytopathology* **14**, 453-459.
- Kraft P., Haiman C. A. (2010): GWAS identifies a common breast cancer risk allele among BRCA1 carriers. *Nature genetics* **42**, 819-820.
- Kurosaki H., Yumoto S., Matsukawa I. (2004): Correlation of cold-weather tolerance with pubescence color and flowering time in yellow hilum soybeans in Hokkaido. *Breeding science* **54**, 303-311.
- LAB Guide Průvodce laboratoří: <https://labguide.cz/wp-content/uploads/2014/10/Ke-sta%c5%been%c3%ad-PCR1.pdf> (5. 3. 2021).
- Larkin J. C., Oppenheimer D. G., Lloyd A. M., Pappozzi E. T., Marks M. D. (1994): Roles of the GLABROUS1 and TRANSPARENT TESTA GLABRA genes in Arabidopsis trichome development. *The Plant Cell* **6**, 1065-1076.
- Lee J. M., Bush A. L., Specht J. E., Shoemaker R. C. (1999): Mapping of duplicate genes in soybean. *Genome* **42**, 829-836.
- Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y., Kim Y. H. (2012): Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* **62**:3923. <https://www.jove.com/t/3923/agarose-gel-electrophoresis-for-the-separation-of-dna-fragments?text=agarose&>
- Li W., Chen T., Chen Y., Lei M. (2005): Role of trichome of *Pteris vittata* L. in arsenic hyperaccumulation. *Science in China Series C: Life Sciences* **48**, 148-154.
- Liu S., Fan L., Liu Z., Yang X., Zhang Z., Duan Z., Liang Q., Imran M., Zhang M., Tian Z. (2020): A Pd1–Ps–PI Feedback Loop Controls Pubescence Density in Soybean. *Molecular Plant* **13**, 1768-1783.
- Ma Z. Y., Wen J., Ickert-Bond S. M., Chen L. Q., Liu X. Q. (2016): Morphology, structure, and ontogeny of trichomes of the grape genus (*Vitis*, Vitaceae). *Frontiers in plant science* **7**:704. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00704/full>
- Martin C. (1996): Transcription factors and the manipulation of plant traits. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 130-138.
- Mathieu M., Winters E. K., Kong F., Wan J., Wang S., Eckert H., Luth D., Paz M., Donovan C., Zhang Z., Somers D., Wang K., Nguyen H., Shoemaker R. C., Stacey G., Clemente T. (2008): Establishment of soybean (*Glycine max* Merr. L) transposon-based mutagenesis repository. *Planta* **229**, 279-289.
- Mirnezami S. V., Young T., Assefa T., Prichard S., Nagasubramanian K., Sandhu K., Sarkar S., Sundararajan S., O'Neal M. E., Ganapathysubramanian B., Singh A. (2020): Automated trichome counting in soybean using advanced image-processing techniques. *Applications in plant sciences* **8**:11375. <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/aps3.11375>
- NCBI National Center for Biotechnology Information: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome (24. 3. 2021)
- NCBI National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/remap> (18. 2. 2021)
- Norrsgard K. (2008): Genetic variation and disease: GWAS. *Nature Education* **1**:87. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/genetic-variation-and-disease-gwas-682/>
- Pagano M. C., Miransari M. (2016): The importance of soybean production worldwide. In: *Abiotic a Biotic Stresses in Soybean Production*. Vol. 1, (Miransari M., ed.), Academic press, 1-26.

- Pattanaik S., Patra B., Singh S. K., Yuan L. (2014): An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, Arabidopsis. *Frontiers in plant science* **5**:259.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00259/full>
- Pearman G. I. (1966): The reflection of visible radiation from leaves of some western Australian species. *Australian Journal of Biological Sciences* **19**, 97-104.
- Pereira Lima J. J., Buitink J., Lalanne D., Rossi R. F., Pelletier S., Da Silva E. A. A., Leprince O. (2017): Molecular characterization of the acquisition of longevity during seed maturation in soybean. *PLoS One* **12**:e0180282.
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0180282>
- Primer3: <https://primer3.ut.ee/> (24. 3. 2021)
- Ramanan V. K., Saykin, A. J. (2013): Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *American journal of neurodegenerative disease* **2**:145.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3783830/>
- Robbins J. C., Daugherty D. M., Hatchett J. H. (1979): Ovipositional and feeding preference of leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) on Clark soybeans in relation to plant pubescence. *Journal of the Kansas Entomological Society* **52**, 603-608.
- Sambrook J., Russell D. W. (2006): Agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, **1**:4020.
<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.prot4020.citation>
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences* **74**, 5463-5467.
- Santos G. da C. (2018): FTA cards for preservation of nucleic acids for molecular assays: a review on the use of cytologic/tissue samples. *Archives of pathology & laboratory medicine* **142**, 308-312.
- Say Y. H. (2017): The association of insertions/deletions (INDELs) and variable number tandem repeats (VNTRs) with obesity and its related traits and complications. *Journal of physiological anthropology*, **36**:1.
<https://link.springer.com/article/10.1186/s40101-017-0142-x>
- Sebat J., Lakshmi B., Troge J., Alexander J., Young J., Lundin P., Månér S., Massa H., Walker M., Chi M., Navin N., Lucito R., Healy J., Hicks J., Ye K., Reiner A., Gilliam T. C., Trask B., Patterson N., Zetterberg A., Wigler, M. (2004): Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* **305**, 525-528.
- Shvachko N. A., Semilet T. V., Tikhonova N. G. (2020): Trichomes of Higher Plants: Homologous Series in Hereditary Variability and Molecular Genetic Mechanisms. *Russian Journal of Genetics* **56**, 1359-1370.
- SNPViz Version 2.0: <http://soykb.org/newSNPViz/> (1. 4. 2021)
- Song Q., Hyten D. L., Jia G., Quigley C. V., Fickus E. W., Nelson R. L., Cregan P. B. (2013): Development and evaluation of SoySNP50K, a high-density genotyping array for soybean. *PLoS one*, **8**:54985.
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0054985>
- SoyBase:
https://www.soybase.org/sbt/search/search_results.php?category=FeatureName&version=Glyma2.0&search_term=Glyma.12g213800 (19. 2. 2021)
- Stranneheim H., Lundeberg J. (2012): Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnology journal* **7**, 1063-1073.
- Škrabišová M., Dietz N., Zeng S., Chan Y. O., Wang J., Liu Y., Biová J., Joshi T., Bilyeu K. D. (2021): An Inverse GWAS approach reveals the landscape of association for genomic variants and phenotypes. *Nature Scientific Reports* (under review).
https://github.com/nad7wf/AccuTool?fbclid=IwAR3a_J-NrOBbnmVuWj9TKASF7EU49HFDTL2IUPAUAIkY5s0349SLmQTAw7w
- Tang K., Yang S., Feng X., Wu T., Leng J., Zhou H., Zhang Y., Yu H., Gao J., Ma j., Feng X. (2020): GmNAP1 is essential for trichome and leaf epidermal cell development in soybean. *Plant molecular biology* **103**, 609-621.

- T-Coffee: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/> (23. 4. 2021)
- Telfer A., Bollman K. M., Poethig R. S. (1997): Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 645-654.
- Terzic D., Popovic V., Tatić M., Vasileva V., Rajicic V, Ugrenović V., Popović S., Avdić P. (2018): Soybean area, yield and production in world. *XXII Eco-Conference® 2018, Ecological Movement of Novi Sad*,136-145.
https://www.researchgate.net/publication/327982246_SOYBEAN_AREA_YIELD_AND_PRODUCTION_IN_WORLD
- Upadhyay M., da Silva V. H., Megens H. J., Visker M. H., Ajmone-Marsan P., Bâlțeanu V. A., Dunner S., Garcia J. F., Ginja C., Kantanen J., Groenen M. A. M., Crooijmans R. P. (2017): Distribution and functionality of copy number variation across European cattle populations. *Frontiers in genetics* **8**:108.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2017.00108/full>
- Vargas Wolfgramm E. de, Carvalho F. M. de, Costa Aguiar V. R. da, Sartori M. P. D. N., Hirschfeld-Campolongo G. C., Tsutsumida W. M., Louro I. D. (2009): Simplified buccal DNA extraction with FTA® Elute Cards. *Forensic science international: Genetics* **3**, 125-127.
- Varshney R. K., Roorkiwal M., Nguyen H. T. (2013): Legume genomics: from genomic resources to molecular breeding. *Plant Genome*, **6**:3.
- Visscher P. M., Wray N. R., Zhang Q., Sklar P., McCarthy M. I., Brown M. A., Yang J. (2017): 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *The American Journal of Human Genetics* **101**, 5-22.
- Voytas, D. (2000): Agarose gel electrophoresis. *Current protocols in molecular biology* **51**, 2-5.
- Wang Z., Yang Z., Li F. (2019): Updates on molecular mechanisms in the development of branched trichome in *Arabidopsis* and nonbranched in cotton. *Plant biotechnology journal* **17**, 1706-1722.
- White J. (1986): Ontogeny and morphology of ovarian and fruit hairs in kiwifruit. *New Zealand Journal of Botany* **24**, 403-414.
- Yan F., Githiri S. M., Liu Y., Sang Y., Wang Q., Takahashi R. (2020): Loss-of-Function Mutation of Soybean R2R3 MYB Transcription Factor Dilutes Tawny Pubescence Color. *Frontiers in plant science* **10**:1809.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01809/full>
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. (2012): Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics* **13**:134.
<https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zeng S., Škrabišová M., Lyu Z., Chan Y. O., Bilyeu K., Joshi T. (2020): SNPviz v2.0: A web-based tool for enhanced haplotype analysis using large scale resequencing datasets and discovery of phenotypes causative gene using allelic variations. In *2020 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM) (IEEE)*, 1408-1415.
- Zeng S., Škrabišová M., Lyu Z., Chan Y. O., Dietz N., Bilyeu K., Joshi T. (2021): Application of SNPviz v2.0 utilizing next-generation sequencing datasets in the Discovery of potential causative mutations in candidate genes associated with phenotypes. *Journal of Data Mining and Bioinformatics* (In press).
- Zhang F., Gu W., Hurler M. E., Lupski J. R. (2009): Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annual review of genomics and human genetics* **10**, 451-481.
- Zhang H., Du Z. Q., Dong J. Q., Wang H. X., Shi H. Y., Wang N., Wang S. Z., Li H. (2014): Detection of genome-wide copy number variations in two chicken lines divergently selected for abdominal fat content. *BMC genomics* **15**:1.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24962627/>
- Žmieńko A., Samelak A., Kozłowski P., Figlerowicz M. (2014): Copy number polymorphism in plant genomes. *Theoretical and applied genetics*, **127**:1.
<https://link.springer.com/article/10.1007%252Fs00122-013-2177-7>

9 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2AP	2-acetyl-1-pyrrolin
A	Appressed (přilehlý fenotyp)
AAI doména	Trypsin-alfa amylasa inhibitorová doména
AMADH	Aminoaldehyd dehydrogenasa (EC 1.2.1.19)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C ₂ H ₂	Protein s motivem zinkového prstu
CNV	Copy number variation (variabilita počtu kopií)
CO ₂	Oxid uhličitý
ddNTP	dideoxyribonukleosidtrifosfát
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
E	Erect (vzpřímený fenotyp)
EGL3	Zesilovač GL 3
FTA	Flinders Technology Associates
GL1	GLABRA 1
GL2	GLABRA 2
GL3	GLABRA 3
<i>GmCPR5</i>	Ortholog genu CPR5 u sóji
<i>GmNAP1</i>	Homolog NCK-asociovaného proteinu 1 u sóji
GMO	Geneticky modifikovaný organismus
GRIN	Germplasm repository information network
GWAS	Genome-wide association study
HD-ZIP	Rodina transkripčních faktorů, motiv homeodomény s leucinovým zipem
HTH	helix-otočka-helix
HTS	High-throughput screening
IR	Infračervené světlo
INDEL	Inserce a delece
mRNA	Mediátorová ribonukleotidová kyselina
MYB	Rodina transkripčních faktorů
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nA	Near-appressed (téměř přilehlý fenotyp)
nE	Near-erect (téměř vzpřímený fenotyp)

NIR	Blízké infračervené světlo
PCR	Polymerase chain reaction (polymerasová řetězová reakce)
RING doména	Really interesting new gene domain, proteinová doména podobná zinkovému prstu obsahující motiv Cys ₃ HisCys ₄
SA/Sa	Semi-appressed (částečně přilehlý fenotyp)
<i>SIJAZ₂</i>	Gen kódující protein s jasmonát-ZIM doménou
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
SPC	Soy protein concentrate (sojový proteinový koncentrát)
STR	Krátké tandemové repetice
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
TE	Tris-EDTA pufr
TENT	Tris-EDTA-NaCl-Triton X-100 pufr
TRY	TRIPTYCHON
TTG1	TRANSPARENT TESTA GLABRA 1
UV	Ultrafialové světlo
VNTR	Variable number tandem repeat (variabilní počet tandemových repetice)
WD/WD40 doména	Krátký strukturální motiv asi 40 aminokyselin s terminálním dipeptidem Trp-Asp

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Tabulka variet s odlišnými fenotypy postavení trichomů vůči listu

Příloha 1: Tabulka variet s odlišným fenotypem postavením trichomů vůči listu

Tab. 5 Variety s odlišným fenotypem postavení trichomů vůči listu (*Glycine max*). V tabulce je uveden identifikátor variet v databázi GRIN (PI), identifikátor v datasetu (USB číslo pro každý vzorek), fenotyp podle Kaňovské (2020) a fenotyp uvedený v databázi GRIN. Zkratky: E (erect, vzpřímený fenotyp), nE (near-erect, téměř vzpřímený fenotyp), SA (semi-appressed, částečně přilehlý fenotyp), nA (near-appressed, téměř přilehlý fenotyp), A (appressed, přilehlý fenotyp).

PI	USB	fenotyp (Kaňovská, 2020)	fenotyp (GRIN)
PI180501	USB-005	E	E
PI33243		E	E
PI360957	USB-009	E	E
PI361093	USB-011	E	E
PI504288	USB-227	E	A
PI507088	USB-232	E	SA
PI518668	USB-018	E	E
PI547634		E	
PI547733		E	
PI547742		E	E
PI547744		E	
PI548193	USB-022	E	E
PI548325	USB-024	E	E
PI548360	USB-025	E	E
PI548364	USB-026	E	E
PI548520	USB-032	E	E
PI548561	USB-033	E	E
PI548619	USB-271	E	E
PI548656	USB-001	E	E
PI567407	USB- 306	E	E
PI567788	USB-411	E	E
PI592523	USB-045	E	E
PI592954	USB-046	E	SA
PI603442	USB-050	E	E
PI86904	USB-084	E	SA
PI379618	USB-143	nE	SA
PI407742	USB-151	nE	SA
PI547481		nE	
PI547528		nE	
PI548978	USB-276	nE	SA
PI549026	USB-036	nE	SA
PI567426	USB-040	nE	E
PI603397	USB-372	nE	SA

Tab. 1 Variety s odlišným fenotypem postavení trichomů vůči listu (*Glycine max*). V tabulce je uveden identifikátor variet v databázi GRIN (PI), identifikátor v datasetu (USB číslo pro každý vzorek), fenotyp podle Kaňovské (2020) a fenotyp uvedený v databázi GRIN. Zkratky: E (erect, vzpřímený fenotyp), nE (near-erect, téměř vzpřímený fenotyp), SA (semi-appressed, částečně přilehlý fenotyp), nA (near-appressed, téměř přilehlý fenotyp), A (appressed, přilehlý fenotyp). (pokračování)

PI	USB	fenotyp (Kaňovská, 2020)	fenotyp (GRIN)
PI123440	USB-101	SA	SA
PI324924	USB-127	SA	SA
PI342434	USB-128	SA	A
PI361087	USB-010	SA	E
PI404187	USB-148	SA	A
PI416838	USB-153	SA	SA
PI417479	USB-158	SA	A
PI417500	USB-159	SA	SA
PI437662	USB-182	SA	SA
PI438335	USB-013	SA	E
PI495020	USB-223	SA	A
PI497967	USB-226	SA	SA
PI507467	USB-235	SA	A
PI507471	USB-236	SA	SA
PI548256	USB-254	SA	SA
PI548490	USB-031	SA	A
PI549017	USB-277	SA	A
PI549041A	USB-037	SA	E
PI561387	USB-285	SA	SA
PI567558	USB-041	SA	E
PI567576	USB-320	SA	SA
PI567675	USB-322	SA	SA
PI578495	USB-044	SA	E
PI592940	USB-346	SA	SA
PI592952	USB-347	SA	SA
PI594880	USB-357	SA	SA
PI597464	USB-361	SA	SA
PI602993	USB-367	SA	SA
PI603675	USB-386	SA	SA
PI603722	USB-388	SA	A
PI612730	USB-392	SA	SA
PI62203	USB-066	SA	SA
PI90763	USB-054	SA	E
PI95860	USB-098	SA	SA
PI549018	USB-035	nA	A
PI598358	USB-364	nA	SA

Tab. 1 Variety s odlišným fenotypem postavení trichomů vůči listu (*Glycine max*). V tabulce je uveden identifikátor variet v databázi GRIN (PI), identifikátor v datasetu (USB číslo pro každý vzorek), fenotyp podle Kaňovské (2020) a fenotyp uvedený v databázi GRIN. Zkratky: E (erect, vzpřímený fenotyp), nE (near-erect, téměř vzpřímený fenotyp), SA (semi-appressed, částečně přilehlý fenotyp), nA (near-appressed, téměř přilehlý fenotyp), A (appressed, přilehlý fenotyp). (pokračování)

PI	USB	fenotyp (Kaňovská, 2020)	fenotyp (GRIN)
PI165675	USB-108	A	A
PI166105	USB-004	A	E
PI417215	USB-154	A	A
PI430595	USB-167	A	A
PI507180	USB-017	A	A
PI518727	USB-241	A	A
PI548447	USB-028	A	A
PI548473	USB-262	A	A
PI567231	USB-295	A	A
PI567428	USB-312	A	A
PI567525	USB-317	A	A
PI567746	USB-326	A	A
PI578504	USB-336	A	SA
PI594307	USB-047	A	A
PI603290	USB-369	A	A
PI81785	USB-003	A	SA
PI468908	USB-014		E
PI548452	USB-029		SA
PI549028	USB-279		SA
PI578309	USB-043		SA
PI587804	USB-342		SA
PI597476	USB-048		SA