

Mendelova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta

Mendeleum – ústav genetiky



**Zahradnická
fakulta**

Genetická determinance dormance druhu

***Prunus armeniaca* (L.)**

Disertační práce

Vedoucí práce

doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.

Vypracovala

Ing. Jana Čechová

Lednice 2015

ZADÁNÍ DISERTAČNÍ PRÁCE

Zpracovatelka: **Ing. Jana Čechová**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Zahradnictví
Název tématu: **Genetická determinance dormance druhu *Prunus armeniaca* (L.)**
Rozsah práce: 100 stran

Zásady pro vypracování:

1. Shromáždit dostupné literární zdroje zabývající se dormancí u ovocných dřevin a metodami analýzy transkriptomu u rostlinných pletiv.
2. Optimalizovat přípravu ds cDNA, jejíž kvalita a kvantita je zásadní pro úspěšnou aplikaci cDNA-AFLP jakožto metody zvolené pro studium transkriptomu dormantních pletiv.
3. Odebírat vzorky květních pupenů zvolených odrůd meruněk v termínech pokrývajících období endogenní dormance, výstupu z ní a v termínech po výstupu z endogenní dormance a izolovat z těchto vzorků celkovou mRNA.
4. Analyzovat vzorky metodou cDNA-AFLP a na základě vývoje intenzity získaných fragmentů v různých termínech vytipovat ty, které mohou odpovídat genům s regulačním účinkem na dormanci.
5. Sekvenování vybraných fragmentů s možným regulačním účinkem na dormanci a jejich identifikace na základě srovnání získaných sekvencí s databázemi.

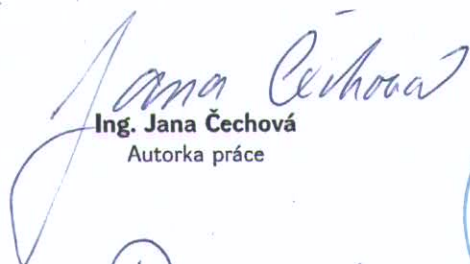
Seznam odborné literatury:

1. BACHEM, CH.; OOMEN, R.; VISSER, R. Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-step Protokol. In Plant Molecular Biology Report 16. Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1998. s. 157-173
2. BREYNE, P. at al. Quantitative cDNA-AFLP analysis for geonome-wide expression studies. MGG. Molecular genetics and genomics 269. 2003. s. 173-179,
3. COOKE, JEK et al. The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. Plant Cell and Environment 35. 2012. s. 1707-1728
4. LEIDA, C et al. Gene expression analysis of chilling requirements for flower bud break in peach Plant Breeding 131. s. 329-334
5. MAZZITELLI, L. et al. Co-ordinated gene expression during phases of dormancy release in raspberry (Rubus idaeus L.) buds. Journal of Experimental Botany 58. 2007. s. 1035-1045,

Datum zadání disertační práce: listopad 2012

Termín odevzdání disertační práce: listopad 2014

L. S.


Ing. Jana Čechová
Autorka práce


doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.
Vedoucí ústavu




doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.
Vedoucí práce


prof. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.
Děkan ZF MENDELU

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma **Genetická determinance dormance druhu *Prunus armeniaca* (L.)** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne: Podpis autora:

PODĚKOVÁNÍ

In memoriam děkuji prof. RNDr. Miroslavovi Pidrovi, CSc. za to, že mě motivoval a zaujal oborem molekulární genetiky. Vedl mě v začátcích mého bádání a aktivně mě zapojil do pracovního dění na ústavu Mendeleum.

Dále děkuji vedoucímu disertační práce doc. Mgr. Miroslavovi Baránkovi, Ph.D. za praktické i teoretické odborné vedení při zpracovávání práce. Za odborné konzultace a vedení při analýze obsahu kyseliny abscisové, etanu, etylénu a CO₂ v květních pupenech meruněk děkuji Dr. Ing. Heleně Fišerové a Ing. RNDr. Markovi Klemšovi, Ph.D. Za poskytnutý rostlinný materiál děkuji prof. Dr. Ing. Borisovi Krškovi.

Rovněž děkuji svému manželovi, rodině, přátelům a všem spolupracovníkům z ústavu Mendeleum, za významnou podporu v průběhu i při dokončování disertační práce.

SOUHRN

Jelikož jedním ze šlechtitelských cílů v procesu šlechtění meruněk v České republice je vyšší odolnost vůči mrazu, je také důležité hlubší pochopení genetických základů regulace výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance. Odolnost vůči mrazu totiž po výstupu květních pupenů z endogenní dormance významně klesá. Výsledky této práce by měly přispět k lepšímu pochopení determinace výstupu pletiv z dormance. Jelikož se jedná o složitou problematiku zahrnující různé fyziologické pochody probíhající v rostlině, byl v práci ověřován vývoj koncentrace některých konkrétních kandidátních substancí, stejně jako byly hledány geny, u kterých vývoj jejich exprese může naznačovat vliv na proces výstupu z endogenní dormance. Termín výstupu květních pupenů z dormance byl stanoven metodou počítáním vykvetlých květních pupenů po přenesení odebraných výhonů do laboratorních podmínek. Dále byl sledován stav produkce etylénu, etanu a CO₂ odebranými výhony s květními a listovými pupeny. Dalším sledovaným fyziologickým parametrem byla hladina kyseliny abscisové v květních pupenech a jejich váha v průběhu odebírání vzorků v období okolo termínu výstupu květních pupenů z endogenní dormance.

Pro hlubší pochopení genetického pozadí výstupu květních pupenů z endogenní dormance, byla na čtyřech zkoumaných odrůdách ('Sundrop', SEO, 'Vestra' a 'Betinka') provedena analýza transkriptomu metodou cDNA-AFLP. Získané transkripční profily byly vyhodnoceny hodnotícími schémata, pomocí nichž byly nalezeny fragmenty genů, které vykazovaly změny ve své expresi v průběhu sledovaného období. Tyto vybrané fragmenty byly sekvenovány a výsledné sekvence byly srovnány s referenčními nukleotidovými sekvencemi v elektronických databázích (NCBI a TIGR). Výsledky srovnávání vedly k identifikaci mnohých ze sekvenovaných genů. Výsledky potvrdily vhodnost použití metody cDNA-AFLP k identifikaci kandidátních genů a nastínění hlavních molekulárních mechanismů odehrávajících se v období výstupu květních pupenů z endogenní dormance. Vhodnost použitého postupu v práci potvrzuje shoda sekvenovaných úseků genů, s geny v literatuře popsanými v souvislosti s výstupem rostlin z endogenní dormance a s procesy v rostlinách, v souvislosti s dormancí, probíhajícími (např. gen kódující akvaporin, GTP-vazebné proteiny, elongační faktor 1 alfa, ubikvitin a xyloglucan endotransglykosyláza hydroláza (EXGT-A1)).

Výsledky sledování časové závislosti koncentrace vybraných substancí v průběhu výstupu z endogenní dormance neumožňují jednoznačné závěry o jejich vlivu na tento děj. Naopak bylo identifikováno několik genů, které by mohly být kandidáty markerů pro zjišťování načasování výstupu pupenů z endogenní dormance a poskytují dobrý výchozí bod pro další vědecký výzkum v této oblasti.

SUMMARY

As achieving higher frost resistance is one of the apricot breeding goals in the Czech Republic, it is important to obtain a deeper understanding of the genetic background of the exit from endogenous dormancy for apricot flower buds. The reason is that frost resistance of flower buds is significantly reduced after exit from endogenous dormancy. The aim of this work was to contribute to the understanding of the process of exit of various plant tissues from dormancy, as the problem is very complex and containing a number of physiological processes that are controlled by the function and regulation of many various substances and corresponding genes.

The time of exit of flower buds from endogenous dormancy was established by counting of flowering buds on sampled twigs after their transport to laboratory conditions. Furthermore, the production of ethylene, ethane, and CO₂ was monitored for sampled twigs with flower and leaf buds. Other physiological parameters monitored during the course of this study were the level of abscisic acid in flower buds and their weight during the sampling close to the period of exit from endogenous dormancy.

An analysis of transcriptome using the cDNA-AFLP method was carried out on four apricot variants ('Sundrop', SEO, 'Vestra' a 'Betinka') to achieve a deeper understanding of the genetic background of exit of flower buds from endogenous dormancy. The transcription profiles obtained from this experiment were evaluated for changes in the expression profiles and fragments of genes with modified expression during the monitored period were sequenced identified. Obtained sequences were compared with sequences in electronic databases (NCBI and TIGR). The results of this comparison led to the identification of a number of the sequenced genes. The results of this study confirmed the suitability of use of the cDNA-AFLP method for the identification of gene candidates and getting a preliminary picture of the main molecular mechanisms taking place during the time of exit of flower buds from endogenous dormancy. The suitability of the used procedure was confirmed by the match between the genes identified from the sequencing and genes already described in the literature as being linked to the exit of plants from endogenous dormancy (e.g. gene coding for aquaporin, GTP-binding proteins, elongation factor 1 alpha, ubiquitin, and xyloglucan endotransglycosylase hydrolase).

Measurements of concentration of selected substances during exit from endogenous dormancy do not allow definite conclusions about their influence on this process. On the other hand were identified several genes that might be candidates for markers identifying the output timing of endogenous dormancy of buds and provide a good starting point for further scientific research in this field.

OBSAH

1	ÚVOD.....	12
2	CÍL PRÁCE	15
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	16
3.1	Meruňka – <i>Prunus armeniaca</i> L.	16
3.2	Dormance pupenů vytrvalých dřevin.....	17
3.2.1	Dělení dormance	18
3.2.2	Vlivy prostředí působící na endogenní dormanci.....	20
3.2.3	Vnitřní vlivy působící na endogenní dormanci	21
3.2.4	Endogenní dormance v souvislosti s mrazuodolností	23
3.2.5	Dormance u meruněk.....	24
3.3	Metody analýzy transkriptomu u rostlinných pletiv	26
3.3.1	Metoda cDNA-AFLP (complementary DNA-Amplified fragment length polymorphism).....	27
3.3.2	Metoda RT-PCR a kvantitativní Real-Time PCR	29
3.3.3	Metoda Microarrays.....	30
3.3.4	Metoda sekvenování transkriptomu (RNA seq)	31
3.3.5	Metoda <i>In situ</i> hybridizace.....	32
3.3.6	Metoda SAGE („Serial Analysis of Gene Expression“)	33
3.3.7	Metoda Northern Blot.....	33
3.3.8	Metoda Subtraktivní hybridizace	34
3.4	Studie zaměřené na expresi genů v souvislosti s dormancí dřevin.....	34
3.4.1	Černý rybíz (<i>Ribes nigrum</i> L.).....	34
3.4.2	Kaštanovník setý (<i>Castanea sativa</i> Mill.).....	35
3.4.3	Kiwi (<i>Actinidia</i> spp.).....	36
3.4.4	Réva vinná (<i>Vitis vinifera</i> L.)	36
3.4.5	Maliny (<i>Rubus idaeus</i> L.).....	37
3.4.6	Topol (<i>Populus</i> spp.).....	38
3.4.7	Broskev (<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch)	39
3.4.8	Meruňka japonská / Slivoň japonská (<i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc.).....	40
4	MATERIÁL A METODY.....	42
4.1	Materiál.....	42
4.1.1	‘Sundrop’	42

4.1.2	‘Stark Early Orange’ (SEO).....	43
4.1.3	‘Vestar’	43
4.1.4	‘Betinka’	44
4.2	Metody	44
4.2.1	Stanovení výstupu z dormance metodou počtu vykvetlých květních pupenů	44
4.2.2	Stanovení produkce etylénu, CO ₂ a etanu	45
4.2.3	Stanovení hladiny kyseliny abscisové (ABA).....	45
4.2.4	Stanovení hmotnosti květních pupenů	46
4.2.5	Optimalizace syntézy ds cDNA jakožto templátu pro cDNA-AFLP	46
4.2.6	Použitý protokol pro cDNA-AFLP metodu	59
4.2.7	Vyhodnocení cDNA-AFLP analýzy.....	69
4.2.8	Sekvence vybraných fragmentů	71
4.2.9	Zpracování získaných sekvencí	76
4.2.10	Real-Time PCR	76
5	VÝSLEDKY.....	84
5.1	Stanovení výstupu z dormance květních pupenů meruněk různými metodami	84
5.1.1	Metoda počtu vykvetlých květních pupenů.....	84
5.1.2	Metoda stanovení produkce etylénu, CO ₂ a etanu	84
5.1.3	Metoda stanovení hladiny kyseliny abscisové (ABA)	90
5.1.4	Metoda stanovení hmotnosti květních pupenů.....	90
5.2	Optimalizace syntézy ds cDNA pro následnou cDNA AFLP analýzu	91
5.3	Metoda cDNA-AFLP	92
5.4	Sekvence vybraných fragmentů	94
5.5	Výběr genů s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů meruněk z endogenní dormance	97
5.6	Ověření specifických primerů pro amplifikaci vybraných fragmentů	99
5.6.1	Návrh specifických primerů.....	99
5.6.2	Testování a optimalizace specifických PCR reakcí.....	99
5.6.3	Real-Time PCR – test na fragmentu č. 111	100
6	DISKUZE	101
6.1	Stanovení výstupu z dormance květních pupenů meruněk.....	101
6.2	Optimalizace syntézy ds cDNA	103
6.3	Metoda cDNA-AFLP	104
6.4	Sekvence vybraných fragmentů	105

6.5	Identifikované geny s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů meruněk z endogenní dormance.....	107
6.5.1	Geny související s fotosyntézou a fotomorfogenezí	107
6.5.2	Geny související s transportem	107
6.5.3	Geny související s procesem realizace a regulace genové exprese.....	108
6.5.4	Geny související s energetickými procesy a metabolismem sacharidů.....	109
6.5.5	Geny související s biosyntézou proteinů a jejich modifikacemi	111
6.5.6	Ostatní geny	111
6.6	Metoda Real-Time PCR.....	113
7	ZÁVĚR	114
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	116
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	133
10	SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ A SPOLUAUTORSTVÍ	139
11	PŘÍLOHY	144

1 ÚVOD

Endogenní dormance slouží vytrvalým rostlinným druhům k ochraně před nepříznivými podmínkami vnějšího prostředí (Samish, 1954). Mrazuodolnost meruněk v období hlubokého vegetačního klidu (endogenní dormance) je vysoká a květní pupeny snesou i déle trvající mrazy až do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po krátkou dobu několika hodin snesou dormantní pupeny i teploty až $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Blažek *et al.*, 1998). Z tohoto důvodu je termín výstupu květních pupenů z endogenní dormance důležitý (Šebánek in Procházka *et al.*, 2003). Na výstup pupenů z dormance mají vliv také některé z vnějších podmínek prostředí. Mezi tyto faktory vnějšího prostředí ovlivňující dormanci patří množství denního osvětlení (délka dne), ale nejdůležitější z nich je teplota (Fuchigami *et al.*, 1982; Partanen *et al.*, 1998). Hladina fytohormonů rovněž ovlivňuje průběh endogenní dormance. Významný vliv na endogenní dormanci mají dva fytohormony: kyselina abscisová (ABA) a etylén (Eagles *et Wareing*, 1964; Nitsch, 1957; Sylvén, 1940; Weiser, 1970).

Květní pupeny meruněk bývají nejčastěji poškozovány mrazy v období po výstupu z endogenní dormance, a to zejména po předchozím oteplení (Nečas *et al.*, 2004). Poškození květních pupenů mrazem má mimo jiné vliv na kolísavou plodnost meruněk. Toto způsobuje problémy převážně v oblastech střední Evropy (České republiky), jelikož jde o nejsevernější polohu komerčního pěstování meruněk v Evropě. Z výzkumů bylo zjištěno, že termín kvetení je dědičným znakem. Jelikož se jedná o kvantitativní znak, může velký počet lokusů, který jej determinuje, přispívat k jeho variaci (Topp, 2008). Proto šlechtění genotypů se záměrem pozdnějšího rašení pupenů na jaře, potažmo pozdnějšího výstupu pupenů z endogenní dormance, může vézt ke snížení poškození pupenů mrazy (Hannerz, 1999). Proces šlechtění by usnadnila znalost molekulárního pozadí výstupu pupenů z endogenní dormance, nebo dostupnost molekulárního markeru, či markerů se silným vlivem na tento proces. K problematice genetické determinace dormance byly v poslední době publikovány nové studie. Cílem těchto prací bylo šířeji popsat molekulárně genetickou podstatu, popřípadě obecný biologický mechanismus tohoto procesu (Arora *et al.*, 2003; Horvath *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2010b; Leida *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009; Rohde *et al.*, 1999; Ruttink *et al.*, 2007; Yamane *et al.*, 2006). Nicméně úroveň poznání procesů, které se odehrávají během výstupu dřevin z endogenní dormance, je stále poměrně nízká. Mezi dřeviny řadíme i námi studovanou meruňku obecnou (*Prunus armeniaca* L.). Nové informace k tématu dormance

u rodu *Prunus* přinesla práce s mutantním genotypem bez dormance (označován jako evg; z anglického „non-dormant ever growing“) a jeho transkripčními faktory („Dormancy Associated MADS-box transcription factors“ – tzv. „DAM genes“). Některé z těchto genů byly exprimovány v zimním období, což naznačuje reálnou roli těchto genů v procesu endogenní dormance (Jiménez *et al.*, 2010b).

Pro studium transkripčních profilů se využívá velké množství metod. Například substraktivní hybridizace využívá srovnávání dvou populací mRNA a umožňuje identifikaci rozdílně exprimovaných genů. Tato metoda byla použita i při studiu raného kvetení, nebo dormantních pletiv (Jia *et al.*, 2006; Kawabata *et al.*, 2009). Další možnou metodou umožňující studium transkriptomu je metoda označovaná jako cDNA microarrays. Tato metoda byla použita například při studiu formování apikálního pupenu a indukce dormance u topolu (Ruttink *et al.*, 2007). Tyto přístupy přinášejí obvykle velké množství výsledků, ale vyžadují předchozí znalosti genových sekvencí zkoumaného rostlinného druhu. Tato skutečnost meruňku dlouhou dobu znevýhodňovala, neboť její genom nebyl až do nedávna plně sekvenován. V případě, že genom není dosud celý osekvenován, což byl případ počátků této studie, je vhodné použít metodu cDNA-AFLP („cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism“). Tato metoda je jednou z mála, která je schopna najít i geny, které dosud nebyly popsány (Bachem *et al.*, 1998; Breyne *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2001). Metoda je založena na analýze a porovnání transkriptomů v různých podmínkách (různý stres, různé rostlinné pletiva, různé termíny odběru vzorků, aj.). Hlavními nevýhodami této metody je její pracnost a také skutečnost, že analýza transkriptomu není komplexní. Ovšem na rozdíl od metod založených na sekvenování transkriptomu, které jsou finančně nákladné a náročné s ohledem na vyhodnocení velkého množství získaných dat, je metoda cDNA-AFLP poměrně levná a po stránce vyhodnocení dat méně náročná.

V této studii byly studovány změny v expresních profilech bezprostředně před, během a po výstupu z endogenní dormance květních pupenů meruňek. Jako studijní materiál byly zvoleny odrůdy meruňek s rozdílnou raností výstupu z endogenní dormance. Jednalo se o odrůdy: ‘Sundrop’, SEO, ‘Vestar’ a ‘Betinka’. Ke studiu transkriptomu byla použita právě metoda cDNA-AFLP. Cílem této práce bylo porovnat transkripční profily a podle, v práci navržených, hodnotících schémat vybrat fragmenty s rozdílnou mírou exprese v jednotlivých termínech. Vybrané fragmenty byly dále sekvenovány a získané sekvence byly srovnávány s dostupnými informacemi v elektronické databázi NCBI

(„National Center for Biotechnology Information“) a databázi TIGR („Plant Transcript Assemblies“).

Z důvodu přehlednosti práce jsou všechny výsledky (tabulky, grafy i obrázky) práce umístěny do příloh. Z důvodu velkého rozsahu příloh jsou v rámci příloh stránky číslovány.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo provést analýzu transkriptomu metodou cDNA-AFLP u vybraných vzorků květních pupenů meruněk odebraných v různých termínech kolem výstupu pupenů z endogenní dormance. Pro tuto práci byly vybrány čtyři odrůdy meruněk ('Sundrop', SEO, 'Vestar', 'Betinka') s dříve ověřenými rozdílnými termíny pro výstup z endogenní dormance. Záměrem bylo zkoumat a porovnávat transkripty u různých odrůd v různých termínech odběru, ale v přibližně stejném fyziologickém stavu, což by mělo mít největší vypovídající hodnotu o shodách v genové expresi odehrávající se u různých odrůd v období výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance.

K tomuto hlavnímu cíli vedly následující dílčí cíle.

Shromáždění dostupné literatury zabývající se dormancí u ovocných dřevin a metodami analýzy transkriptomu u rostlinných pletiv.

Odběr vzorků květních pupenů meruněk výše uvedených odrůd v termínech pokrývajících období endogenní dormance, výstupu z ní a v termínech těsně po výstupu z endogenní dormance.

Stanovení výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance.

Izolace celkové RNA z květních pupenů u vybraných odebraných vzorků.

Optimalizace přípravy ds cDNA, jejíž kvalita a kvantita je rozhodující pro zajištění kvality analýzy transkriptomu metodou cDNA-AFLP.

Dalším dílčím cílem bylo na vybraných vzorcích provést metodou cDNA-AFLP a na základě analýzy transkripčních profilů v různých termínech odběru vzorků vytipovat fragmenty s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů meruněk z endogenní dormance.

Sekvenace vybraných fragmentů a jejich identifikace na základě srovnání získaných sekvencí s databázemi.

Výběr genů s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů z endogenní dormance a, v případě že to bude možné, ověřit jejich expresi v delším časovém horizontu.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Meruňka – *Prunus armeniaca* L.

Nejstarší písemná zmínka o pěstování meruněk pochází z Číny. Dnešní území Číny představuje oblast prvotního genového centra meruněk. Střední Asie tvoří oblast mladšího druhotného genového centra (Vachůn, 1999). První písemné zmínky o pěstování meruněk na území České republiky pochází z 15. stol., kam se dostaly různými cestami, například přes Moldávii, Rumunsko a Maďarsko (Tetera, 1995). Botanicky se meruňky řadí do řádu *Rosales*, čeledi *Rosaceae*, podčeledi *Prunoideae*, rodu *Prunus* L., podrodu *Prunophora* Neck.) a sekce *Armeniaca* (Mill.) Koch (Bláha *et al.*, 1966; Rehder, 2001). Meruňka obecná, latinsky *Prunus armeniaca* L. (syn. *Armeniaca vulgaris* Lam.) je diploidním druhem ($2n = 16$) s poměrně malým genomem ($5,9 \times 10^8$ bp/2n) (Arumuganathan *et Earle*, 1991). Jelikož se meruňka geneticky vyvíjela v oblasti s kontinentálním klimatem, má krátkou, ale zato hlubokou endogenní dormanci. Po krátkou dobu několika hodin, snesou pupeny i teploty do -25 °C až -30 °C (Blažek *et al.*, 1998; Kalášek *et Richter*, 1989).

Dřevina může růst ve formě keře do výšky 2 m nebo ve stromové formě s výškou 10-15 m. Borka kmene má načervenalou barvu. Tvar koruny se dělí podle intenzity růstu. Odrůdy slabě rostoucí mají korunu malou kuželovitou nebo převislou. Odrůdy silně rostoucí mají korunu středně velkou, kulatou, kuželovitou nebo převislou. Odrůdy velmi silně rostoucí mají korunu velkou, kuželovitou, plochou nebo převislou. Kořenová soustava meruňky závisí na typu použité podnože, ale obecně její plocha přesahuje $1,5\times$ až $2\times$ průměr koruny. Plocha sacích kořenů je větší, než listová plocha. Listy má meruňka velké lysé, na bázi mírně srdčité, u špičky zašpičatělé, hustě pilovité, vejčitého nebo kulovitě vejčitého tvaru. Řapík je zavalitý a žláznatý. Doba květu meruňky závisí na teplotách vzduchu, které musí být po dobu několika dní 10 °C a více. Kvete před rašením, květy jsou samostatné a vyrůstají z laterálních pupenů výhonů z předchozí vegetace. Kališní lístky jsou tmavě červené a objevují se ihned po začátku zvětšování se květních pupenů. Korunní plátky jsou většinou bílé, u některých odrůd mohou být růžové a až v plném květu bílé. Plodem je peckovice, pro kterou jsou typickými odrůdovými znaky barva a ochmýření slupky, velikost a tvar plodu, barva a pevnost dužniny a její odlučitelnost od pecky, dále tvar a velikost pecky a chuť jádra. Barva plodu bývá většinou žlutá nebo bělavá, překrytá načervenalou barvou. Plody kulturních odrůd dosahují

hmotnosti 40-50 g, výjimečně až 100 g. Pecka bývá mírně zploštělá, hladká s vroubkovaným okrajem a hořkým nebo sladkým jádrem. Důležitou vlastností dužniny je její pevnost, šťavnatost a barva. Dále kořenitost, vůně a chuť, které se posuzují podle obsahu cukrů, kyselin a aromatických látek. Podle těchto parametrů se odrůdy meruněk dělí na vhodné pro přímý konzum a pro zpracování – konzervování, mražení, sušení a k destilaci (Bažant *et al.*, 2004; Cifranič, 1986; Hladík *et al.*, 1966).

Vhodné oblasti pro velkokapacitní pěstování meruněk jsou na jižní Moravě – v okresech Znojmo, Břeclav, Hodonín, Uherské Hradiště a Brno venkov. Tyto oblasti jsou v I. zóně vhodnosti pro pěstování meruněk s nadmořskou výškou do 200 m, průměrnou roční teplotou 9-10 °C a průměrným ročním úhrnem srážek 550-600 mm. Vhodné půdy pro pěstování meruněk jsou středně těžké, hlinité až hlinitopísčité, sušší, z toho důvodu je vhodnou podnoží do těchto oblastí meruňkový semenáč (Hladík *et al.*, 1966; Vachůn, 1999).

Na Zahradnické fakultě v Lednici se nachází kolekce meruněk, která slouží ke studiu některých významných znaků, jako je například mrazuodolnost, kvalita plodů a odolnost vůči chorobám. Využívání genofondu meruněk ve šlechtění začalo intenzivně koncem 70. let 20. století. V současnosti je v genofondu meruněk 336 položek, přičemž aktuálními šlechtitelskými cíli u meruněk jsou: mrazuodolnost květních pupenů a květů, rezistence k chorobám (PPV – šarka – „Plum Pox Virus“; ESFY – evropská žloutenka peckovin – „European Stone Fruit Yellow“), zlepšení kvality znaků plodů meruněk a šlechtění podnoží. Získávání podrobných informací o jednotlivých genotypech v genofondové kolekci slouží k selekci položek, které vykazují znaky vyšší adaptace vůči prostředí. Šlechtitelům umožní tyto znalosti výběr vhodných donorů potřebných znaků k dosažení výše uvedených šlechtitelských cílů. Vše vede k dosažení vyšší adaptability nově vyšlechtěných odrůd a ke zvýšení tržní hodnoty plodů (Krška *et al.*, 2004).

3.2 Dormance pupenů vytrvalých dřevin

Vytrvalé dřevnaté rostliny se klimatickým podmínkám mírného pásma přizpůsobují vstupem do dormance (Chouard, 1960). Květní pupeny se začínají vyvíjet v průběhu podzimu, v zimě během dormance ve vývoji pokračují a dokončují jej. Po ukončení vývoje mohou květní pupeny za příznivých podmínek začít růst (Rohde *et Bhalerao*, 2007). Dormance pupenů je periodicky opakujícím se obdobím odpočinku v životním cyklu

rostliny, které přerušuje vegetační fázi růstu (Cooke *et al.*, 2012). K vytvoření životní cykličnosti vedla rostliny nutnost přežít nepříznivé klimatické podmínky. V podmínkách mírného pásma to znamená odolat v zimním období nízkým teplotám (Šebánek *et Kocourek*, 1996). V posledních letech se na regulaci dormance dřevin pohlíží z další strany, a to z pohledu globální změny klimatu. Pro dřeviny je z hlediska jejich přežití velmi důležité, aby se přizpůsobily měnícím se klimatickým podmínkám mírného pásu, a to z pohledu harmonizace vegetačního cyklu. Tedy správnému střídání období aktivity (vegetace) a dormance dřevin, s ohledem na vhodné klimatické podmínky k růstu (Hänninen *et Tanino*, 2011). Za dormantní je považován takový pupen, u něhož za nepříznivých podmínek prostředí není meristéum schopeno růstu. Z pohledu této definice je dormance pupenů vlastností meristému (Rinne *et al.*, 2010; Rohde *et Bhalerao*, 2007). Lang (1987) ve své definici více zohledňuje fyziologické aspekty dormance s ohledem na vstupy a původ ukládaných podnětů působících na dormanci, než na stav dormance vykazovaný meristémem samotným.

3.2.1 Dělení dormance

Z hlediska dělení dormance je podstatné, zda je dočasné potlačení růstu způsobeno vnitřními příčinami či vnějšími podmínkami. Z tohoto pohledu se dormance dělí na odpočinek exogenní, neboli vynucený (ektodormance či kviescence), a endogenní dormanci (endodormanci), též hluboký vegetační klid.

Ektodormance (ecedormancy) je způsobena nepříznivými vnějšími podmínkami, které ve venkovních podmínkách brání rašení pupenů. Pokud ovšem umístíme výhony nařezané v ektodormanci do tepla a necháme je v nádobách s vodou, začnou rašit, jelikož jim z vnitřního fytohormonálního stavu v rašení nic nebrání. V tomto typu dormance se pupeny nacházejí od doby výstupu z endogenní dormance přibližně do března (Crabbe *et Barnola*, 1996; Horvath *et al.*, 2003; Lang, 1987; Nečas *et al.*, 2004; Procházka *et al.*, 1999; Šebánek *et Kocourek*, 1996).

Endogenní dormance se dělí do tří stádií, a to na predormanci, vlastní dormanci (hluboký vegetační klid) a postdormanci.

Období, kdy pupeny do dormance vstupují, se nazývá predormance (paradormancy). Ukončuje se korelativní vztah mezi dospělými listy a úžlabními pupeny. Dospělé listy tvorbou fytohormonů inhibují růst svých úžlabních pupenů. Pokud by byl

v tomto období zábranný vliv listů odstraněn a došlo by k dekapitaci, pupeny by začaly růst v podmínkách k růstu vhodných. U šeríku nastává toto období v květnu až červnu. Následně, přibližně od července, jsou inhibitory postupně transportovány z listů do úžlabních pupenů do té míry, že původní korelativně růstová inhibice přeroste do stádia predormance, ve kterém je již tak vysoká hladina ABA (kyselina abscisová), že jsou pupeny zcela dormantní. Toto období trvá přibližně dva měsíce, a to od poloviny srpna do poloviny října.

Na toto období navazuje období vlastní dormance (hluboký vegetační klid), které probíhá od poloviny října do poloviny prosince. Pupeny jsou v dormantním stavu udržovány vysokou hladinou kyseliny abscisové. Pod vlivem působení nízkých teplot dochází k postupnému snižování koncentrace kyseliny abscisové. Obecně jde o rušení zimní dormance působením teplot v rozmezí 0 °C až 10 °C po dobu 260 až 1 000 hodin.

Na období vlastní dormance navazuje období postdormance, kdy vlivem dostatečné sumy působících nízkých teplot vystupují pupeny z endogenní dormance. Hladina kyseliny abscisové je v tomto období už velmi nízká a pupeny pomalu přecházejí do vynucené dormance (ektodormance) způsobené nepříznivými vnějšími podmínkami pro rašení (Lang, 1987; Lang *et al.*, 1987; Nečas *et al.*, 2004; Šebánek *et Kocourek*, 1996).

Endogenní dormance (endodormancy), nazývaná též hlubokým vegetačním klidem (Vachůn *et* Hudý, 1974), je způsobena vnitřními, endogenními příčinami. Lang (1987) definoval endogenní dormanci jako stav vyvolaný vnímáním vnějších podmínek nebo vnitřních signalizačních podnětů působících na meristematická pletiva. Výhony nařezané v tomto období po přenesení do tepla neraší, jelikož to neumožňují vnitřní hladiny fytohormonů (Procházka *et al.*, 2003). Pro pletiva v endodormanci je charakteristický útlum metabolismu, nízká rychlost respirace a velmi nízký obsah RNA. Velmi nízký obsah RNA je v pletivech ještě několik týdnů před rašením, ale na konci postdormance se její obsah zvyšuje. V podmínkách mírného pásma (České republiky) začíná endogenní dormance během srpna a končí z pravidla v prosinci. Některé dřeviny však ukončují svou endogenní dormanci až v průběhu ledna (např. *Alnus glutinosa* L., *Tilia cordata* Mill., *Aesculus hippocastanum* L.) a některé až v únoru (*Fagus silvatica* L.). U většiny kultivarů meruněk se dá upřesnit výstup z endogenní dormance na konec prosince až polovinu ledna (Nečas *et al.*, 2004; Procházka *et al.*, 1999; Procházka *et al.*, 2003).

3.2.2 Vlivy prostředí působící na endogenní dormanci

Vnější faktory, jako například fotoperioda, vodní a minerální deficit, teplota a kvalita světla, ovlivňují v mírném pásmu endodormanci. Navozují vstup do dormance, její stav a výstup z ní. Chlad patrně ovlivňuje počátek genové exprese vedoucí v pupenu k obnovení metabolismu a ukončení dormance (Procházka *et al.*, 1999; Procházka *et al.*, 2003).

Rozsah chladového působení na výstup pupenů z dormance je dán geneticky (Samish, 1954). Požadavek jednotlivých odrůd na chladové působení se obvykle hodnotí jako počet hodin v rozmezí 0 °C až 7 °C, které jsou nezbytné pro rozkvetení minimálně 50 % květních pupenů v laboratorních podmínkách (Crabbe *et Barnola*, 1996; Lang, 1987). Ruiz *et al.* (2007) ve své práci sledoval působení chladu na ukončení dormance u deseti odrůd meruněk. Zjišťoval korelaci mezi termínem výstupu z dormance a termínem kvetení u jednotlivých odrůd. Odrůdy vybrané do pokusu pokrývaly celé období kvetení u druhu *Prunus armeniaca* L. Ve své práci dospěl k závěru, že meruňka vyžaduje od 596 CU (CU – „cilling units“ – chladových jednotek – hodiny působení chladu pod 7 °C) u odrůdy 'Currot' až po 1266 CU u odrůdy 'Orange Red', a že mezi termínem výstupu pupenů z dormance a termínem kvetení dochází k negativní korelaci. Yamane *et al.* (2006) stanovovala délku chladového působení u dvou odrůd meruněk pěstovaných v Japonsku. Jednalo se o odrůdu 'Nanko' (z mírného pásma Japonska) s požadavkem přibližně 500 chladových hodin (0 °C až 7 °C) pro výstup z dormance a odrůdu 'Elching' (ze subtropické části Taiwanu) s požadavkem přibližně 300 chladových hodin (0 °C až 7 °C) pro výstup z dormance. Mnoho dalších studií zabývajících se vlivem chladového působení na výstup pupenů z dormance prokázalo, že mezi různými odrůdami různých ovocných dřevin je pro výstup květních pupenů z endogenní dormance široký rozsah chladových požadavků (Alonso *et al.*, 2005; Couvillon *et Hendershott*, 1974; Egea *et al.*, 2003; Jonkers, 1979; Kester *et al.*, 1965).

Vliv krátkého dne (fotoperiody) v podzimním období, jakožto vnějšího vlivu uvádějícího dřeviny do dormance, bylo poprvé demonstrováno Garnerem a Allardem (Ruhland, 1961). Později byla významná role krátkodenní fotoperiody při zavádění široké škály dřevin (stromů i keřů) do dormance dokumentována mnoha dalšími autory (Böhlenius *et al.*, 2006; Downs *et Borthwick*, 1956; Højberg, 1978; Heide, 1974; Kramer, 1936; Nitsch, 1957; Wareing, 1956). Vlivem krátkého dne je do dormance zaváděn například rod: *Betula* L., *Populus* L., *Salix* L. a *Picea* L. (Cooke *et al.*, 2012). Jde o reakci

zprostředkovanou fytochromem a v případě působení dlouhého dne nebo trvalého osvětlení na dřeviny, vyžadující pro navození endodormance krátký den, tyto rostliny rostou nepřetržitě (např. *Betula pubescens* Ehrh., *Robinia pseudoacacia* L., *Cornus sanguinea* L.).

U jiných rodů dřevin hraje významnější roli při jejich zavádění do dormantních podmínek nízká teplota. Tyto rody nejsou k fotoperiodickým podmínkám citlivé (Nitsch, 1957). Jde o jabloně (*Malus* Mill.), hrušně (*Pyrus* L.), jeřáby (*Sorbus* L.) a peckoviny z čeledi *Rosaceae* (Heide, 2008, 2011; Heide *et al.*, 2005).

K dalšímu vlivu vnějšího prostředí na ukončení růstu a nástupu dřeviny do dormance patří nedostatek živin (zejména dusíku) a sucho. Tyto vlivy mají efekt při zavádění dormance u břízy (*Betula* L.) a topolu (*Populus* L.). U druhu *Picea abies* L. mají vliv i teplotní podmínky během vývoje semen. Tento epigenetický efekt nebyl prokázán u jiného druhu dřevin (Cooke *et al.*, 2012).

3.2.3 Vnitřní vlivy působící na endogenní dormanci

Se stavem endogenní dormance koreluje i množství produkovaného etylénu (plynný fytohormon). Jeho nízká produkce indikuje hlubokou dormanci. Vstup pupenů do endogenní dormance je charakterizován nárůstem obsahu nativních inhibitorů, převážně kyseliny abscisové (ABA), a poklesem hladiny endogenních giberelinů, popřípadě cytokininů. Výstup z dormance je zapříčiněn naopak poklesem hladiny kyseliny abscisové a nárůstem obsahu giberelinů. Dormanci zesiluje rovněž vyšší hladina auxinů (Procházka *et al.*, 2003). Kyselina abscisová a etylén mají antagonistické funkce v procesu kontroly rostlinného růstu a vývoje (Cheng, 2009).

3.2.3.1 Dormance ve vztahu k plynnému hormonu etylénu

Jak již bylo uvedeno, nízká hladina produkovaného etylénu pupeny ukazuje na stav hluboké dormance, a s klesající dormancí (s blížícím se výstupem z endogenní dormance) se množství vyprodukovaného etylénu rostlinou zvyšuje. Exogenní aplikovaný etylén je za použití optimální koncentrace schopen rušit dormanci pupenů (Procházka *et al.*, 2003). Etylén je znám jako inhibitor růstu stonků, listů a kořenů (Abeles *et al.*, 1992). Z tohoto důvodu může hrát zvýšení jeho produkce pupeny roli při přechodu z endogenní dormance do dormance exogenní (ektodormance), způsobené vnějšími podmínkami.

Jak již bylo uvedeno, jiné rostlinné části (stonky, listy, kořeny) mají zcela opačné reakce na množství etylénu než endodormantní pupeny. Například u hlíz bramboru kultivovaných v *in vitro* podmínkách docházelo po celou dobu kultivace hlízy k tvorbě nativního etylénu a vypěstované hlízy byly v endogenní dormanci po dobu 12-15 týdnů (Suttle, 1998). Ovšem při ošetření dormantních hlíz exogenním etylénem došlo ke dvěma efektům. Při prodloužené expozici ošetření etylénem došlo k výraznému zkrácení délky dormance, ale zároveň k inhibici prodlužování klíčků u skladovaných hlíz (Rylski *et al.*, 1974). V případě chryzantém docházelo při použití exogenně aplikovaného etylénu (přípravek Etefon) k zavádění standardních odrůd do dormance a zamezení možnosti jejich kvetení. U transgenního typu chryzantémy, která vykazovala sníženou citlivost k působení etylénu, po aplikaci endogenního etylénu nedošlo ke vstupu do dormance a rostlina byla schopna kvést (Sumitomo *et al.*, 2008). Podle výzkumů provedených na cibuli (*Allium cepa L.*) záleží na termínu aplikace exogenního etylénu a na části rostliny, na kterou etylén působí. Etefon aplikovaný na vyvíjející se cibule na poli, snižoval prorůstání cibule při skladování, ale Etefon aplikovaný na suché skladované cibule jejich prorůstání zvyšoval. Z výzkumu vyplývá, že má etylén na cibuli dva účinky. Inhibuje prodlužovací růst výhonků a přerušuje dormanci (Bufler, 2009).

Jansen *et al.* (2008) studovali změnu genové exprese při působení etylénu na květní pupeny jabloní od doby kvetení až do plné zralosti plodů. V práci bylo studováno 13 000 genů metodou čipových technologií (microarrays). Mezi geny se změněnou mírou exprese byl mj. nalezen i gen označovaný jako „Dormancy/ auxin associated“ (v rámci „Apple Genbankaccess“ označován jako CN917441).

3.2.3.2 Dormance ve vztahu k hormonu kyselina abscisová (ABA)

Izolace nativního inhibitoru, který zavádí javor (*Acer pseudoplatanus L.*) do dormance, vedlo k izolaci kyseliny abscisové (ABA). Pokusem s aplikací tohoto inhibitoru na listy javoru v podmínkách dlouhého dne byla u javoru uměle zavedena endogenní dormance (Procházka *et al.*, 2003), což prokázalo souvislost ABA s endogenní dormancí a především se zaváděním dormance. Použitím exogenních inhibitorů, z nichž nejvýznamnějším je ABA, je možné zvýšit obsah nativních inhibičních látek v rostlině a tím urychlit vstup pupenů do endogenní dormance v srpnu. S dřívějším nástupem dormance dojde i k opožděnému výstupu pupenů z endodormance, pozdějšímu rašení na

jaře, čímž mohou květy uniknout před jarními mrazíky (Procházka *et al.*, 2003). Pokusy s mutantními rostlinami *Arabidopsis thaliana* L. s deficitem ABA v semenech vedly ke zkrácení délky a intenzity dormance a ranému klíčení semen (Ghassemian *et al.*, 2000). Kromě toho, že ABA hraje významnou roli při růstu a vývoji rostliny za podmínek, které nejsou pro rostlinu stresující (klíčení, vývoj laterálních kořenů, růst sazenic, semenná dormance, přechod z vegetativní do generativní fáze rostliny), hraje klíčovou roli také při reakcích rostliny na abiotický stres (toleranci abiotického stresu). ABA pravděpodobně reguluje reakci na abioticky způsobený stres rostlin pomocí metylace DNA a cestou „krátkých interferujících RNA“ (siRNA) a „mikroRNA (miRNA)“ tzn. pomocí genetických a epigenetických mechanismů. Na druhou stranu tyto epigenetické procesy mohou regulovat hladinu ABA přes změny exprese genů zapojených do metabolismu ABA (Chinnusamy *et al.*, 2008).

3.2.4 Endogenní dormance v souvislosti s mrazuodolností

Odolnost vůči mrazu je významným ukazatelem schopnosti adaptace většiny ovocných druhů daným ekogeografickým podmínkám. Mrazuodolnost závisí na mnoha činitelích, například na průběhu teplot, průběhu morfologicko-fyziologického vývoje a na celkové odolnosti stromů. Délka endogenní dormance (hlubokého vegetačního klidu) květních pupenů a termín jejího ukončení je rovněž důležitou součástí celkové mrazuodolnosti. Meruňky bývají mrazem nejčastěji poškozovány v období postdormance a ektodormance, zejména po předchozím oteplení. Mrazuodolnost souvisí také s pomalým vývojem mikrosporogeneze (vývoj pylových buněk).

Květní pupeny meruňek mají svůj vývoj rozdělen do šesti etap (Nečas *et al.*, 2004): 1. začátek diferenciacie, 2. vývoj archesporia v prašnicích, 3. redukční dělení, 4. tvorba tetrad, 5. jednobuněčné pylové zrno, 6. dvoubuněčné pylové zrno, 7. syntéza škrobu v pylových zrnech. Květní pupeny meruňek nejvíce odolávají mrazu v období vývoje archesporiálního pletiva. Z tohoto důvodu je dlouhý archesporiální vývoj, a tedy i pomalé tempo předjarního vývoje květních pupenů, vyhledávaným šlechtitelským znakem spolu s dlouhou etapou endogenní dormance. Odrůdy meruňek s těmito vlastnostmi jsou méně poškozovány mrazy v období postdormance a ektodormance (Nečas *et al.*, 2004). Studium vývoje tyčinek v květních pupenech meruňek ve vztahu k výstupu pupenů z endogenní dormance meruňek se zabýval i Julian *et al.* (2011). Stav vývoje tyčinek studovali

cytochemicky. Změny ve vývoji tyčinek dávali do souvislosti s chladovými nároky zkoumané odrůdy meruněk (odrůda 'Monigui' vykazovala 1050-1150 CU a 779-956 hod. při teplotách pod 7 °C; Tabuenca, 1968; Tabuenca, 1979). Při výstupu květních pupenů z endogenní dormance na základě akumulace chladového působení dochází k akumulaci škrobu v prevaskulární oblasti nitky tyčinky, což předchází další diferenciaci cévního svazku v této oblasti. Tento škrob zmizel a vzniklo prokambium, které bylo aktivováno, a vzniklo cévní propojení vedoucí do prášníku tyčinky. Zároveň byla pozorována zvýšená aktivita ve sporangiálním pletivu prášníku, což ukazuje na začátek meiózy. Cévní spojení v nitce tyčinky nebylo navázáno před výstupem z endogenní dormance (Julian *et al.*, 2011). Tyto vývojové změny probíhající v tyčinkách květních pupenů vedou ke snížení odolnosti vůči mrazu (Julian *et al.*, 2007).

3.2.5 Dormance u meruněk

V původních oblastech výskytu druhů rodu *Armeniaca* jsou zimy tuhé a krátké. Přejít ze zimy do jara je rychlý, bez výraznějšího kolísání teplot. Odrůdy druhu *Armeniaca vulgaris* Lam., tvoří více jak 90 % produkčních ploch meruněk na světě. Vachůn *et* Hudý (1975) studovali vegetační klid vybraných genotypů meruněk v podmínkách ČR. V práci byly srovnávány odrůdy z různých ekologicko-geografických skupin, u kterých byl zjištěn rozdílný průběh vegetačního klidu. Výsledky této studie jsou velmi důležité, protože například raný nástup takzvaného vynuceného vegetačního klidu (ektodormance) v podmínkách jižní Moravy, kde se vyskytují zimy s kolísavými teplotami, může zvyšovat riziko poškození květních pupenů mrazem a tím i častější výskyt let s nízkou úrodou meruněk nebo bez úrody. Zjišťováním charakteru průběhu vegetačního klidu (endogenní dormance) byly získány podklady k výběru rodičovských odrůd pro novošlechtění. V těchto a dalších studiích věnujících se průzkumu vegetačního klidu bylo zjištěno, že jednotlivé odrůdy meruněk nemají průběh období vegetačního klidu stejný (Blažek *et al.*, 1998; Vachůn *et* Hudý, 1971; Vachůn *et* Hudý, 1975).

Odrůda 'Velkopavlovická' ze skupiny sledovaných odrůd se zařazením *Armeniaca vulgaris occidentalis* ukončuje obvykle hluboký vegetační klid v posledním týdnu v prosinci. Na rozdíl od 'Velkopavlovické' ukončuje svou endodormanci odrůda 'Oranževa krasnyj' (ekologicko-geografická skupina *A. v. orientalis*) o osm týdnů později a odrůda 'Nachiččevanskij krasnyj' (skupina *A. v. caucasica*) o šest týdnů později. Naopak

odrůda 'Čínská' (ekologicko-geografická skupina *A. v. chinensis*) má hluboký vegetační klid velmi krátký, ukončuje jej nejpozději 14 dnů po *A. v. occidentalis*. Pro svůj pozvolný přechod z hlubokého vegetačního klidu (endodormanci) k vynucenému (ektodormanci) jsou genotypy *A. v. caucasica* a *A. v. orientalis* velmi cenné. Listové pupeny zkoumaných genotypů mají o 1-4 týdny delší vegetační klid než pupeny květní (Vachůn *et* Hudý, 1975).

V rámci geotypu *occidentalis*, u druhu *Prunus armeniaca* L., jsou v průběhu ukončování hlubokého vegetačního klidu mezi jednotlivými odrůdami významné rozdíly. Nejdříve ze skupiny zkoumaných odrůd ukončily odpočinek odrůdy 'Cafona' a 'Hatif Colomer' (3-4 týdny před odrůdou 'Bergeron 2'). Do poslední dekády ledna byla ukončena endogenní dormance (hluboký vegetační klid) u všech 12 zkoumaných odrůd meruněk (Vachůn *et al.*, 1984).

Soubor hodnocených meruněk na ZF v Lednici byl rozdělen do 4 skupin podle mrazuodolnosti květních pupenů a rychlosti mikrosporogeneze (Nečas *et al.*, 2004). 1. skupina – odrůdy mrazuodolné s pomalou morfogenezí pylu ('Bergeron', 'Lebela', 'Lejuna', 'Leskora'); 2. skupina – odrůdy mrazuodolné s rychlou morfogenezí pylu ('Leala'); 3. skupina – odrůdy méně mrazuodolné s pomalou morfogenezí pylu ('Ledana', 'Lemira'); 4. skupina – odrůdy méně mrazuodolné s rychlou morfogenezí pylu ('Legolda', 'Lerosa', 'Marlen', 'Šalach', 'Hargrand', 'Velkopavlovická LE 12/2'). Při zkoumání ukončování hlubokého vegetačního klidu u 12 odrůd meruněk geotypu *occidentalis* u druhu *Prunus armeniaca* L. byla sledována i odolnost květních pupenů vůči mrazu. Největší úhyn pupenů byl zjištěn u odrůd 'Cafona' a 'Hatif Colomer', přičemž tyto odrůdy mají nejkratší dobu endodormance. U těchto odrůd dosáhl úhyn pupenů v roce 1981 hodnot 78,18 %-82,88 % a v roce 1982 100 %. Krátká endodormance u těchto odrůd může být příčinou neúrody v letech s vysokým poškozením květních pupenů mrazy. Jako nejodolnější vůči mrazu se v obou letech projevíly odrůdy 'Bergeron 1', 'Bergeron 2', 'Rouge de Mauves' a 'Stark Early Orange' (Vachůn *et al.*, 1984).

Výzkum ukončování hluboké dormance generativních pupenů vybraných kultivarů meruněk v podmínkách Středního Pováží, patří mezi další z mnoha studií potvrzujících význam zkoumání dynamiky jednotlivých fází mikrosporogeneze a termínu ukončování hluboké dormance květních pupenů. V této práci je poukazováno na možnost uplatnění více metod ke zkoumání ukončování hluboké dormance (Nitranský, 1981). Rozdíly v termínech výstupu z hluboké dormance, ovlivněné jednotlivými odrůdami, se pohybují v

rozmezí šesti týdnů (Nitranský, 1993). Šest týdnů uváděných Nitranským (1993) přibližně odpovídá 30. až 40. dnům, které uvádí také Kariev (1987).

Z pohledu délky endodormance a ektodormance květních pupenů meruněk a doby kvetení bylo zkoumáno také 40 odrůd meruněk v agro-ekologických podmínkách Vojvodina (Durić, 1980). Výzkum probíhal v průběhu zimního období 1978/79 a 1979/80. Hluboká dormance (endodormance) v květních pupenech byla dokončena v rozmezí od 30. ledna do 20. února, přesný termín závisel na jednotlivých odrůdách a vnějších podmínkách. Trvání ekologické dormance (ektodormance) květních pupenů meruněk záviselo hlavně na teplotách v přirozených podmínkách. Počátek a délka kvetení závisí na vnějších podmínkách a na jednotlivých kultivarech (Durić, 1980).

Pozdější výstup z hluboké dormance u meruněk je kvantitativně děděnou vlastností. Tato skutečnost byla zjištěna při vyhodnocování délky endogenní dormance dvou potenciálních hybridních kombinací na Zahradnické fakultě v Lednici (Krška, 1999).

3.3 Metody analýzy transkriptomu u rostlinných pletiv

Biologické procesy a vývoj rostlin jsou kontrolovány precizní regulací genové exprese. Vysoké procento genů, které hrají roli ve specifických procesech, jsou exprimovány během, nebo těsně před fází buněčného cyklu, ve které tento proces nastane, přičemž jejich koregulační geny mají stejný expresní profil. Studium genové exprese může vést k pochopení těchto procesů. Analýzy transkriptomu jsou analýzy mRNA (RNA kódující strukturální a regulační geny, tvoří 1-3 % celkové RNA). Pokud se pojednává o genové expresi v užším smyslu, jde o transkripci a sestřih primárního transkriptu („splicing“). V širším smyslu patří ke genové expresi kromě transkripce a sestřihu primárního transkriptu i translace a posttranslační úpravy proteinů. Transkriptom je narozdíl od genomu dynamický systém, liší se v různých pletivech a rostlinných částech a závisí na vnějším prostředí. Množství dané molekuly mRNA v dané buňce a v daném čase závisí nejen na transkripční aktivitě, ale také stabilitě mRNA. mRNA je poměrně nestabilní molekula a dochází u ní k rychlé degradaci následkem působení všudy přítomných RNáz. Proto se nejčastěji k analýzám transkriptomu používá stabilnější cDNA. mRNA se do cDNA přepisuje metodou reverzní transkripce za použití enzymu reverzní transkriptázy (Štípek, 1998). U nově identifikovaného genu je obvykle hledána shoda s referenční sekvencí v elektronických databázích. Ke studiím transkriptomu slouží různé molekulární

technologie. Jde například o řadové analýzy genové exprese (SAGE), metody založené na bázi hybridizace a technologie založené na bázi „RNA fingerprinting” gelu, jako je DD (z anglického „differential display”) a cDNA-AFLP (Bachem *et al.*, 1998; Breyne *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2001).

Dále se k analýzám transkriptomu využívají metody Northernblot, RNA seq, metody založené na RT-PCR, microarrays a další. Principy nejdůležitějších z nich jsou popsány níže.

3.3.1 Metoda cDNA-AFLP (complementary DNA-Amplified fragment length polymorphism)

Jedná se o polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů pracující s cDNA jakožto s templátem tzn., profilující genovou expresí (transkriptom). Některé molekulární metody využívané k analýzám transkriptomu mají problémy s opakovatelností. Tyto problémy nastávají při prvním použití náhodných oligonukleotidů. K pokusům o odstranění těchto problémů vedlo například zlepšení designu primerů (Diatchenko *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1995) a kombinace různých metod spadajících do oblasti „RNA fingerprinting” (Ivanova *et Belyavsky*, 1995; Kato, 1996). Metoda cDNA-AFLP velkou měrou problémy s opakovatelností překonává, je poměrně jednoduchá a rychle ověřitelná, finančně méně náročná. Výhoda metody je v tom, že je možné provádět systematický skrínig téměř všech transkriptů v daném biologickém systému při použití malého množství počátečního materiálu (Bachem *et al.*, 1998).

Při použití metody cDNA-AFLP dochází k rozdělení komplexu cDNA na malé podmnožiny použitím restričních enzymů. Následné použití takto upravené cDNA v PCR reakcích ve dvou stupních umožňuje detekci rozdílně exprimovaných transkriptů. Je to jedna z mála jednodušších metod, která je schopná nalézt geny, které ještě nejsou klonované resp. popsány v databázích. Tuto metodu lze použít i na druhy rostlin, jejichž genom dosud nebyl sekvenován, proto je použití této metody možné v širokém okruhu experimentálních systémů. Jak již bylo uvedeno, jde o poměrně levnou metodu, která může být zavedena v jakékoliv průměrně vybavené laboratoři pro molekulární genetiku (Bachem *et al.*, 1998; Bryne *et al.*, 2003; Kivioja *et al.*, 2005; Qin *et al.*, 2001; Vuylsteke *et al.*, 2007).

Prvním krokem metody cDNA-AFLP je příprava kvalitního cDNA templátu z mRNA, a to v dostatečném množství a kvalitě. Proto je důležitá kvantita a kvalita samotné extrahované RNA ze zkoumaného rostlinného pletiva, která se mění v závislosti na cytoplazmaticky bohaté frakci, aktivitě buněčného dělení ve zkoumaných pletivech a kvantitě přirozeně se vyskytujících kontaminantů působících při izolaci RNA (polysacharidy, polyfenoly atd.). Vysoký obsah kontaminantů v izolované RNA se projeví při kontrole kvality izolátu na gelu rozmazáním pruhů odpovídajících molekulám ribozomální RNA (Bachem *et al.*, 1998).

K syntéze ds cDNA(double-strand cDNA; dvouřetězcové cDNA) dochází reverzní transkripcí mRNA. Pro syntézu ds cDNA slouží jako templát mRNA v procesu katalyzovaném enzymem RNA-dependentní DNA polymerázou, který je označován také jako reverzní transkriptáza (Bachem *et al.*, 1998; Kodíček, 2004).

Dále následuje použití restrikčních enzymů. Stejně jako u standardní AFLP jsou i u cDNA-AFLP použity k produkci primárního templátu dva restrikční enzymy. Enzymy by měly být vybrány tak, aby jeden z nich reprezentoval tzv. „rare-cutting” – štípání s nižší četností. Z tohoto důvodu jsou používány endonukleázy s pěti nebo šesti bázemi v jejich rozeznávací sekvenci. Druhý enzym by potom měl být tzv. „frequent-cutting” enzym s rozeznávacím místem obsahujícím čtyři páry bází, který štípe cDNA s vyšší četností. V optimálním případě „rare-cutting” restrikční enzym štípe každou molekulu cDNA, ale v praxi mají takovéto restrikční enzymy místo jen v přibližně polovině cDNA molekul. Vhodné restrikční enzymy pro experimenty se vybírají např. podle zvláštního zájmu pro výzkum, nebo takové, které vytvoří fragmenty o očekávané velikosti. Po restrikčním štěpení ds cDNA dochází k ligaci adaptorů, kdy lepivý konec adaptoru komplementárně nasedá na lepivé konce vzniklé štípáním použitými restrikčními enzymy. Produkt vzniklý po ligaci adaptorů se nazývá primární templát (Bachem *et al.*, 2004).

Po přípravě primárního templátu následují pro vytvoření cDNA-AFLP fingerprintu tři kroky. Jedná se o pre-amplifikaci, dále ředění, kterým získáme sekundární templát, a selektivní amplifikaci sekundárního templátu. V této části protokolu cDNA-AFLP se používají přístupy založené na využití PCR reakce – polymerázová řetězová reakce (PCR z anglického „Polymerase Chain Reaction”). Jde o metodu syntézy nukleových kyselin, která vychází z procesu replikace. Tato technika umožňuje získávání velkého množství kopií určité sekvence DNA. V průběhu reakce se cyklicky opakují tři kroky: denaturace (cca 95 °C; rozdělení dvouřetězcové DNA), hybridizace krátkých oligonukleotidů tzv.

primerů (cca 50 °C; ohraničují amplifikované úseky DNA), amplifikace účinkem termostabilní DNA polymerázy (cca 70 °C; prodlužování řetězce DNA) (Kodíček, 2004). Efektivitu PCR reakce významně ovlivňují různé faktory jako je koncentrace Mg^{2+} iontů, typ polymerázy, základní složení templátu a primerů, složení pufru a teplotní profil PCR programu. Množství produktů vzniklých v PCR je určeno počtem cyklů (Bachem *et al.*, 1998).

První PCR reakce použitá v rámci cDNA-AFLP protokolu se nazývá pre-amplifikace primárního templátu a probíhá s primery korespondujícími se sekvencí použitých adaptorů. Primární templát se pro pre-amplifikaci používá 10× ředěný (Bachem *et al.*, 2004). Pro úspěšnou pre-amplifikaci je důležitý počet cyklů v PCR reakci. U vzorků po pre-amplifikaci se provede měření koncentrace a následně ředění vzorku. Úroveň ředění sekundárního templátu je rovněž jeden z klíčových parametrů metody. Vzniklý sekundární templát je následně použit jako templát do druhé PCR reakce, tzv. selektivní amplifikace. Počet použitých cyklů v selektivní amplifikaci je rovněž důležitým parametrem metody cDNA-AFLP. V selektivní amplifikaci se jedná o amplifikaci fragmentu s primery prodlouženými o jednu nebo více specifických bází (Bachem *et al.*, 1998). Tato selektivní amplifikace může být provedena pro jednu až tři fluorescenční značky v rámci jedné amplifikace při použití kapilárních systémů pro elektroforetické rozdělení získaných amplikonů.

3.3.2 Metoda RT-PCR a kvantitativní Real-Time PCR

Dalšími metodami umožňujícími získat informace týkající se transkriptomu jsou metody RT-PCR a kvantitativní Real-Time PCR. U RT-PCR je templátem ss cDNA získaná z mRNA. Jde o specifickou amplifikaci, při které lze detekovat specifickou mRNA v jediné buňce. Tato metoda je výhodná pro detekci mRNA, které se v buňkách vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Tato metoda slouží ke zjištění, zda je ve zkoumaném vzorku jeden zkoumaný gen exprimován (v případě multiplex reakce – více zkoumaných genů), či nikoli. Hodnocení reakce se provádí elektroforetickou separací PCR produktu na gelu a jeho vizualizací.

V případě Real-Time PCR se v podstatě jedná o sledování množství produktu PCR reakce v reálném čase, a to od okamžiku jeho vzniku až po ukončení PCR reakce. Templátem je rovněž cDNA získaná z mRNA. Metoda se provádí ve speciálním přístroji,

který funguje jako termocykler a zároveň jako detektor fluorescence. Tato metoda mj. slouží i ke zjištění kvantity amplifikovaného produktu, tzn. informace v jaké míře je sledovaný gen v daném pletivu exprimován. Míra exprese genu, resp. příslušného cDNA templátu na počátku reakce, se odvozuje od rychlosti nástupu příslušného amplikonu v průběhu reakce. Čím je více mRNA transkriptu ve vzorku, tím je více cDNA templátu a tím dříve nastane exponenciální fáze amplifikace. Při této metodě se využívá fluorescenční značení amplifikovaných produktů a odečítání množství fluorescence v každém cyklu PCR reakce. Používané fluorescenční barvivo může být nespecifické („SYBR Green“) nebo specifické (obvykle použití různých typů sond komplementárních se sledovaným úsekem cDNA). Nespecifické fluorescenční barvivo se váže na jakoukoliv dvouvláknovou DNA, což přináší riziko nespecifických signálů (signál odpovídající vzniku dimerů primerů, nespecifické produkty, kontaminace genomickou DNA). Specifická barviva jsou obvykle navázána na krátké úseky DNA (sondy), které se specificky váží na cílový produkt. Výhoda tohoto přístupu je i vtom, že je možné (pokud to přístroj umožňuje) použít více fluorescenčních značek v jedné reakci, což umožňuje získat informace současně pro dva i více genů (např. pro cílový gen a referenční gen při relativní kvantifikaci). Kvantifikace templátové cDNA může být absolutní (nutnost mít k dispozici standard o známé koncentraci a vytvořenou standardní křivku), nebo relativní (nutnost referenčního genu, obvykle tzv. „housekeeping gen“). Výsledky relativní kvantifikace se hodnotí pomocí statistických metod. Tato metoda je vhodná pro geny, které mají nízkou míru transkripce nebo pro analýzu transkripce z malého množství RNA (Garg *et al.*, 2010; Heid *et al.*, 1996; Jain *et al.*, 2006; Livak *et Schmittgen*, 2001).

3.3.3 Metoda Microarrays

Tato metoda historicky vychází z metody anglicky označované jakožto „Dot Blot Hybridization“, u které dochází k navázání sondy na membránu ve specifickém uspořádání – matici (arrays). Dnes nové technologie umožňují vyrobit mikromatrice, tzv. microarrays. Základem této metody jsou syntetické oligonukleotidy nebo produkty PCR, které odpovídají velkému počtu genů nebo všem genům daného organismu. Jde o čipovou technologii, kdy jsou tyto oligonukleotidy (sondy) robotem kovalentně navázány na speciální skleněnou destičku v podobě uspořádaných teček (array) o rozměrech v řádu jednotek až desítek μm (závisí na použité technologii). Tato metoda umožňuje velmi zevrubný pohled na genovou expresi ve zkoumaném vzorku. Na jednom sklíčku totiž může

být navázáno až desítky tisíc sond (dnes až 250 000). Podle toho jaký charakter má matrice zachycená na sklíčku (zachycovací destičce) se odvozují „cDNAarrays“ nebo „oligonukleotidové arrays“.

Postup je takový, že v hybridizační jednotce dojde k hybridizaci cDNA molekul z námi analyzovaného vzorku s próbami navázanými na sklíčku a následnému vymytí přebývající nenavázané cDNA. Molekuly cDNA jsou označeny fluorescenční barvou. Místa, kde došlo k hybridizaci, tedy vykazují fluorescenční aktivitu. Ta je následně pro jednotlivé body na sklíčku přečtena laserem ve specifickém a velmi nákladném skeneru, přičemž posléze dojde k počítačovému zpracování dat. Tato metoda se využívá k analýze velkého množství genů najednou, ke hledání kandidátních genů, ke hledání významných metabolických drah pro daný proces a k porovnávání variability exprese. Nevýhodou této metody jsou poměrně vysoké náklady a riziko tzv. cross-hybridizace (hybridizace cDNA s próbami sloužícími pro detekci jiných genů). Další nevýhodou této metody je také to, že může být efektivně použita jen pro organismy, jejichž genom již byl sekvenován (Anon., 2008; Qin *et al.*, 2001; Schenk *et al.*, 2000; Snustad *et Simmons*, 2009; Rabbani *et al.*, 2003).

3.3.4 Metoda sekvenování transkriptomu (RNA seq)

Tato metoda k získání informace o e exprimovaných genech a jejich kvantitě v daném okamžiku odběru rostlinného materiálu využívá schopností metod sekvenování nové generace (označovány jako NGS – z anglického „next generation sequencing“). Jde o kompletní identifikaci exprimovaných genů v daném pletivu. Touto cestou mohou být odhaleny případné nové sestřihové varianty genů (varianty genů vzniklých různým sestřihem hnRNA). Touto metodou může být prováděna i sekvenace transkriptomů neznámých druhů (*de novo* sekvenace). Tato metoda navíc poskytuje mnohem přesnější výsledky z hlediska měření množství transkriptů a jejich izoform než jiné metody (Wang *et al.*, 2009; Zhang, *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2015).

Metoda přímého sekvenování RNA (DRSTM – „Direct RNA sequencing“) vychází přímo z molekuly RNA bez přepisu na cDNA. Dochází k přímému masivně paralelnímu sekvenování RNA bez ovlivnění vzorku jakýmkoliv manipulacemi (např. ligace nebo amplifikace; Oszolak *et al.*, 2009).

Další příbuznou metodou je přístup označovaný jako DP-seq (z anglického „Designed Primer-based RNA sequencing“), přičemž na základě této metody je možné analyzovat transkripty z velmi malého množství vstupní RNA (z 50 až 100 buněk; Bhargava *et al.*, 2013). Pomocí tohoto přístupu se již dokonce podařilo provést analýzu transkriptomu pomocí sekvenace RNA z jádra jedné mozkové buňky laboratorního potkana (Grindberg *et al.*, 2013). Pomocí laserové mikrodisekce bylo vypreparováno jádro z jedné buňky, následně došlo k syntéze cDNA z mRNA obsažené v tomto jádře, její amplifikaci a sekvenaci pomocí SOLiD (Life Technologies) – sekvenace pomocí ligace a detekce oligonukleotidů (z anglického „Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection“).

3.3.5 Metoda *In situ* hybridizace

Jde o současné využití hybridizace nukleových kyselin a mikroskopie. Principem této metody je vytvoření řezů zkoumaného pletiva, jejich fixace na sklíčko, příprava na hybridizaci, denaturace, hybridizace se značenou antisense RNA sondou a vyhodnocení fluorescenčním mikroskopem. Výhodou této metody je přesná lokalizace genové exprese v pletivu a kolokalizace různých dalších transkriptů, jelikož hledaná sekvence RNA je imobilizována uvnitř buňky v mikroskopickém preparátu a vizualizována prostřednictvím sondy. Touto metodou může být provedeno srovnávání transkriptomů např. identifikace genů exprimovaných v jednom organismu (pletivu) a bez exprese v jiném organismu (pletivu). Nebo identifikace genů exprimovaných za různých podmínek. Nevýhodou této metody je riziko nespecifických signálů a nepřesná kvantifikace transkriptu.

Mezi nejznámější zástupce těchto metod patří přístupy označované jako ISH (z anglického „*in situ* hybridization“ sondy jsou obvykle značeny biotinem, digoxigeninem nebo radioaktivně) nebo FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), kde jsou sondy značeny fluorescenční značkou (nejčastěji fluorescein).

U této metody je možné použít i více barev pro jeden vzorek (Kočárek *et* Pánek, 2010; Maňáková *et* Seichertová, 2002).

3.3.6 Metoda SAGE („Serial Analysis of Gene Expression“)

Jde o sériovou analýzu genové exprese, která může poskytnout informace o intenzitě genové exprese srovnáváním jednotlivých vzorků. Jedná se o metodu pracnou, kterou je možno provádět pouze ve velmi dobře vybavených laboratořích (Qin *et al.*, 2001). Princip této metody je založen na izolaci RNA, vytvoření tagů (krátkých úseků RNA o délce 15 bp), izolaci těchto tagů z RNA, ligaci těchto tagů do jednoho vlákna a jejich zaklonování do vektoru. Dále následuje jejich sekvenace a analýza dat. Výhodou této metody je přesnější určení četnosti transkriptu a na rozdíl od metod ze skupiny „microarrays“ u těchto dat získaných sekvenací zde nejsou hybridizační artefakty. Nevýhodou této metody je skutečnost, že lze identifikovat pouze krátké fragmenty genů (15bp), což přináší nebezpečí, že dva různé geny mohou mít stejné tagy (Šmarda *et al.*, 2005; Velculescu *et al.*, 1995).

3.3.7 Metoda Northern Blot

Výhodou této metody je nízké riziko falešných artefaktů ve srovnání s metodami založenými na PCR a možnost určení relativní velikosti transkriptu a existence různých transkriptů daného genu (alternativní sestřih). Nevýhodou metody je, že neposkytuje údaje o absolutním množství dané mRNA, je reálná detekce pouze malého množství genů a uvádí se také nízká citlivost této metody (nehrozí zde ovšem falešně pozitivní výsledky). Dalšími negativy jsou velké riziko degradace vzorku v průběhu analýzy a obvyklá potřeba použití radioaktivního značení. Metoda je také náročná na poměrně vysoké množství vyizolované RNA, obvykle je potřeba alespoň 1 µg mRNA nebo 10 µg celkové RNA. Metoda je založena na izolaci RNA ze vzorku. Následně dojde k elektroforetické separaci RNA na gelu. Při této elektroforetické separaci dojde k rozdělení RNA podle velikosti, k separaci se používá pufr s přídavkem formaldehydu, který způsobí denaturaci RNA. Dále následuje krok Northernblotting, tzn. přenesení RNA na nylonovou membránu s pozitivním nábojem, v pufru používaném pro přenos je obvykle přidán formamid. Následně dojde k fixování (imobilizaci) přenesené RNA na membránu UV zářením nebo zahříváním a k hybridizaci membrány se značenými sondami (sondy jsou komplementární k cílové sekvenci). Posledním krokem je vizualizace značené RNA na rentgenovém filmu (Kevil *et al.*, 1997; Mičuda *et al.*, 2006; Rabbani *et al.*, 2003; Snustad *et al.*, 2009).

3.3.8 Metoda Subtraktivní hybridizace

Metoda je založena na hledání transkriptů přítomných v jednom vzorku (tzv. „tester“) a nepřítomných v druhém vzorku (tzv. „driver“), společné sekvence jsou v rámci postupu ze vzorku odstraněny. Nejprve dojde k izolaci mRNA z obou vzorků a přípravě cDNA, přičemž cDNA ze vzorku představujícího „driver“ je označena biotinem. Následně dojde ke smíchání cDNA ze vzorku „tester“ s nadbytkem cDNA ze vzorku „driver“, a následně k jejich denaturaci a renaturaci. Molekuly cDNA ze vzorku „tester“, které reprezentují mRNA přítomné v obou vzorcích, tvoří hybridy s cDNA ze vzorku „driver“. Po vzniku těchto hybridů „driver“/„tester“ a „driver“/„driver“ dojde k jejich odstranění streptavidinem. Ve vzorku po odstranění hybridů zůstanou pouze cDNA, které reprezentují transkripty přítomné jen ve vzorku „tester“. Po tomto kroku následuje skrínig genové knihovny nebo klonování a vytvoření subtraktivní knihovny cDNA (Anon., 2008; Cortés *et al.*, 2008; Santamaría *et al.*, 2011).

3.4 Studie zaměřené na expresi genů v souvislosti s dormancí dřevin

3.4.1 Černý rybíz (*Ribes nigrum* L.)

Poškozování úrody černého rybízu vlivem mírných zim v některých částech Evropy vedlo ke zvýšení zájmu o studium genetického pozadí dormance pupenů. Studie provedená kolektivem Hedley *et al.* (2010) se zaměřila na změnu genové exprese v listových pupenech černého rybízu v období jejich výstupu z dormance. Jelikož bylo v databázi NCBI („National Center for Biotechnology Information“) nalezeno méně než 30 sekvencí genů souvisejících černým rybízem a blízce příbuznými dřevinami, byla v této práci vytvořena vlastní cDNA knihovna z pletiv listových pupenů pro následné EST sekvenování („expressed sequence tag“). Listové pupeny byly pro tvorbu knihovny odebrány osmkrát od začátku prosince do konce března, tzn. v průběhu období dormance a po něm. Znalost sekvencí genů exprimovaných v pupenech vedla k přípravě vlastního čipu (microarray) ke zkoumání genové exprese genů souvisejících s dormancí a výstupem z dormance u pupenů černého rybízu. Studium exprimovaných genů bylo zjištěno, že nejnižší je exprese genů na začátku dormance a nejvyšší v době výstupu z dormance. Geny, u kterých byly nalezeny signifikantní změny, byly zapsány do tabulky (jsou zde uvedeny např. „60S ribosomal protein L35 gb“; „putative E2 ubiquitin-conjugating enzyme UVC7“; „plant lipid transfer protein“; „cyclin-like F-box“; „photosystem I

reaction centre submit IV/PsaE“; „putative ripening-related protein“; „Zincfinger B-box“; „transcription factor MADS-box“; „ATP binding“ ...). Jejich souvislost s dormancí byla prokázána i u jiných rostlinných druhů. Expresní profilování vedlo k identifikaci tří kandidátních genů ko-lokalizovaných s QTL (z anglického „quantitative trait loci“ – lokusy kvantitativních znaků) výstupu pupenů z dormance. Jednalo se o geny, které pravděpodobně kódují: „calmodulin-binding“ protein, beta tubulin a acetyl CoAcarboxylázu. Tyto geny související s výstupem pupenů z endogenní dormance by mohly být základem pro vývoj genetických markerů využitelných ve šlechtění rybízu (Hedley *et al.*, 2010).

3.4.2 Kaštanovník setý (*Castanea sativa* Mill.)

U jedlého kaštanu byl zkoumán rozdíl genové exprese v dormantních pupenech a nedormantních pletivech a vliv epigenetické regulace na dormanci. Pro zkoumání těchto rozdílů byly vytvořeny dvě cDNA knihovny s následným využitím pro subtraktivní hybridizaci. Jedna knihovna obsahovala geny související s dormancí a druhá obsahovala exprimované geny v nedormantních pletivech. Subtraktivní hybridizace poskytla 512 rozdílně exprimovaných sekvencí (ESTs). Třídění těchto exprimovaných sekvencí prokázalo, že pro dormantní pupeny byly charakteristické geny spojenými se stresovými reakcemi, zatímco nedormantní pletiva (pupeny) byly exprimovaly geny spojenými s energií, syntézou proteinů a buněčných komponent souvisejících s vývojem a růstem rostlin. Některé exprimované sekvence, nacházející se v obou knihovnách, ukazovaly na zapojení těchto genů do různých forem epigenetických změn, což naznačuje na zapojení různých mechanismů epigenetické kontroly v období dormance a v období růstu. S obdobím dormance byly spojeny geny mono-ubiquitináza HUB2 a histone acetyltransferáza GCN5L. Geny, které byly dány do souvislosti s dormancí u kaštanovníku, byly srovnány s geny ve spojitosti s dormancí u topolu a s dormancí semen u *Arabidopsis thaliana* L. Z výsledků vyplynulo, že všechny tři systémy mají společný základ (Santamaría *et al.*, 2011).

3.4.3 Kiwi (*Actinidia* spp.)

Další výzkumy zaměřené na geny související s dormancí byly provedeny na rostlinách kiwi. Při pěstování kiwi dochází k problémům v teplých oblastech, kde nedochází ke správnému a jednotnému výstupu květních pupenů z dormance, jelikož u rostlin nedojde k dostatečné akumulaci chladových hodin (Henzell *et al.*, 1991). V podmínkách pěstování kiwi se tento problém řeší chemickým ošetřením přípravkem – hydrogen cyanamide (HC), který vede ke zvýšení počtu pupenů vystupujících z dormance a k synchronizaci tohoto jevu. Toto ošetření nabízí také způsob zkoumání výstupu z dormance u kiwi. Identifikace genů exprimovaných po aplikaci přípravku HC ukazuje většinou na souvislost těchto genů s odpovědí rostlin na stres, u části z nich ale také jde o geny souvisejících s opětovným růstem. Na základě ošetření HC došlo k výraznému zvýšení exprese genů ze skupiny glutathion S-transferáza (GST), což jsou geny obecně spojované se signalizací stresu. Výstup z dormance na základě ošetření HC závisí na množství oxidovaného a redukováného glutathionu rostlinou. U jabloní bylo prokázáno, že zvýšené množství redukováného glutathionu během chladové periody bylo úzce spojeno s výstupem rostlin z endogenní dormance (Siller-Cepeda *et al.*, 1992; Walton, 2009; Wang *et al.*, 1991).

V další práci, zabývající se dormancí rostlin kiwi, bylo zjištěno, že v průběhu dormance je zvýšená exprese genů podobných s geny označovanými jako SVP u *Arabidopsis thaliana* L. („SVP-like – short vegetative phase“). U rostlin kiwi klesá exprese těchto genů s blížícím se výstupem pupenů z dormance. Tyto závěry byly potvrzeny i u jiných druhů dřevin, jako jsou meruňky, réva vinná a broskve (Diaz-Riquelme *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012; Yamanee *et al.*, 2008).

3.4.4 Réva vinná (*Vitis vinifera* L.)

Při zkoumání průběhu dormance u pupenů révy vinné byly zjištěny změny v aktivitě katalázy, která má vliv na hladinu H₂O₂ (peroxid vodíku) v pupenech révy vinné. V lokalitách s teplými zimami aktivita katalázy vzrostla na své maximum v průběhu dormance a po výstupu z ní klesla na méně než třetinu své maximální aktivity. Kataláza je hlavním oxidativním enzymem, který degraduje H₂O₂ na vodu a kyslík. Přechodné zvýšení hladiny H₂O₂ ukazuje na výstup pupenů z endogenní dormance. Byly provedeny pokusy s inhibicí aktivity katalázy. Její aktivita byla kompetitivně inhibována aplikací přípravku

hydrogen cyanamide (HC), jež je silným činidlem podporujícím rašení pupenů. Po aplikaci HC došlo k náhlému poklesu exprese katalázy, po čemž následovalo ukončení dormance. Z výsledků tedy vyplynulo, že exogenně aplikovaný HC má vliv na regulaci genové exprese enzymu kataláza. Na druhé straně genová exprese katalázy v přirozených cyklech dormance a růstu pupenů révy vinné má konstitutivní charakter a nekoreluje se zjištěnými výsledky, které ukazují na její sníženou aktivitu v období výstupu z dormance (Or *et al.*, 2002; Pérez *et Burgos*, 2004; Pérez *et Lira*, 2005).

Keilin *et al.* (2007) se ve své práci zabýval digitálním profilováním exprimovaných genů souvisejících s procesy probíhajícími v dormantních pupenech révy vinné. Pracoval s kolekcí 5516 veřejně dostupných sekvencí. 59 % těchto sekvencí nebylo v době analýzy umístěno v databázi TIGR (databáze, ve které jsou uloženy rostlinné traskripty – sekvence exprimovaných genů). Okolo 22 % těchto transkriptů neneslo podobnost s jiným rostlinným transkriptem. Těmito čísly autoři ukazují na potřebu práce s kolekcemi exprimovaných sekvencí EST (z anglického „expressed sequence tag“) a schopností srovnávání jednotlivých EST kolekcí mezi různými cDNA knihovnami. Výsledky tohoto digitálního profilování naznačují, že na proces regulace dormance pupenů révy vinné a výstupu z ní má vliv několik skupin genů. Geny související s oxidativním stresem, signalizací vápníku, intracelulárním vezikulárním transportem a anaerobním způsobem metabolismu sacharidů.

3.4.5 Maliny (*Rubus idaeus* L.)

U malin je obecný problém, že mnoho pupenů zůstane v dormantním stavu a následkem toho neplodí. Jejich výstup z dormance je špatný a nerovnoměrný. Výzkum kandidátních genů souvisejících s endogenní dormancí a výstupem z ní byl prováděn na odrůdě 'Glen Ample'. Byly vytvořeny dvě cDNA knihovny, jedna z pupenů v endodormanci a jedna z pupenů v paradormaci. Ke sledování změn v genové expresi při přechodech mezi jednotlivými typy dormance byla použita čipová technologie (microarray). Pomocí čipu bylo sledováno 5360 expresních profilů (2689 z endodormantní knihovny a 2671 z paradormantní knihovny). Analýza exprimovaných sekvencí (EST) vedla v mnoha případech k jejich funkční kategorizaci (37,1 % odpověď rostliny na stres a detoxikační odezva; 16,8 % hormonální odezva; 4,2 % metabolismus buněčné stěny; 3,6 % metabolismu ostatní) a rozvoji hypotéz týkajících se mechanismů výstupu pupenů

z dormance. Výsledky umožnili identifikaci genů souvisejících s různými změnami v dormantních pupenech. Práce poskytla mnoho informací o rozdílně exprimovaných genech a u některých se jejich souvislost s dormancí potvrzuje i u jiných rostlinných druhů (Mazzitelli *et al.*, 2007).

3.4.6 Topol (*Populus* spp.)

Jelikož dochází ke změnám klimatických podmínek, je nutné studovat vlivy těchto změn na lesní porosty. Jednou z modelových rostlin tohoto zkoumání je topol, na kterém bylo provedeno mnoho výzkumů ve vztahu k exprimovaným genům souvisejících s dormancí topolů.

V práci Ruttink *et al.* (2007) byly analyzovány transkripční profily (metodou čipové technologie; microarray) a profily metabolitů (metodou kombinace plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie; GC-MS) od indukčních krátkodobých podmínek do úplné dormance (v týdenních intervalech po dobu 6 týdnů). Metabolity a dynamika genové exprese sloužila k rekonstrukci časového sledu událostí v procesu vývoje pupenů. Dle autorů, vývoj pupene může být rozdělen do fází: formace pupene, jeho přizpůsobení se suchu a chladovému působení a dormance. V každé z těchto fází působí specifické regulační mechanismy, geny a metabolity. Procesy kontroly vývoje pupenů, jejich modifikace a terminace ovlivňují: světlo, etylén a kyselina abscisová. V období dormance došlo ke snížení exprese genů ANT (z anglického „AP2-like ethylene-responsive transcription factor“), CDKB (z anglického „CYCLIN-DEPENDENT KINASE B“), CYCA1 (z anglického „CYCLIN A1“), CYCB2, CYCD3.

V práci Ruonala *et al.* (2008) použili metodu Real-Time PCR a *in situ* hybridizaci ke zkoumání exprese některých genů v zóně vrcholového meristému (SAM – z anglického „shoot apical meristem“) a tzv. rib zóně (RM – z anglického „ribmeristem“) s vlivem na prodlužovací růst letorostu a přechod do dormance. Výsledky práce naznačují, že přechod do fáze dormance ovlivňuje fotoperioda působící na RM (ribmeristem) a snížená míra exprese CENL 1 (z anglického „CENTRORADIALIS-LIKE1“) v těchto meristematických buňkách.

Studiem cirkadiálního rytmu u topolu se zabývá práce Ibáñez *et al.* (2010). Práce studuje změnu exprese některých genů ve fázi růstu rostliny, ukončení růstu, odolnosti vůči mrazu v období dormance a rašení pupenů. Za geny související s odolností vůči mrazu

(s jejich sníženou, nebo zcela zastavenou expresí) označili geny PttLHY1 (z anglického „LATE ELONGATED HYPOCOTYL1“), PttLHY2 a C-REPEAT BINDING FACTOR1. Kromě toho geny PttLHY1 a PttLHY2 způsobují pozdější rašení pupenů.

Další práce zkoumá u topolu intracelulární signály a pozastavení komunikace mezi buňkami přes plazmodezmy v období dormance. Naopak v období výstupu z dormance dochází na základě chladového působení k uvolnění FT (z anglického „FLOWERING LOCUS T“) a GPI lipidových kotev. Dojde k obnovení transportu látek v buňkách a na základě zvýšené exprese CENL1 k rašení pupenů, prodlužovacímu růstu a morfogenezi (Rinne *et al.*, 2011).

3.4.7 Broskev (*Prunus persica* (L.) Batsch)

Genová exprese a její regulace byla studována prostřednictvím mikro RNA (miRNA) druhu *Prunus persica* (L.) Batsch (Barakat *et al.*, 2012). Byly porovnávány sekvence získané z mladých listů a dormantních pupenů (genotyp broskve 'Lovell'). Byly vytvořeny knihovny miRNA, které byly sekvenovány. V práci bylo analyzováno 21 miliónů malých RNA, z nichž bylo identifikováno 157 konzervativních a 230 nekonzervativních miRNA sekvencí. Analýza jejich exprese odhalila u některých miRNA zvýšenou, nebo sníženou expresi v dormantních pupenech, na rozdíl od jejich exprese v mladých listech. Některé z miRNA byly exprimované v dormantních pupenech a kolokalizované s QTL popsanými pro chladové nároky u broskve.

U mnoha druhů dřevin může krátkodenní perioda vyvolat zastavení růstu, vstup do dormance a, po akumulaci dostatečného chladového působení, výstup z dormance. Pro zkoumání těchto procesů byla pomocí subtraktivní hybridizace porovnávána exprese genů u klasické broskve a mutantního typu broskve (evg), který neukončuje růst a tím pádem nevstupuje do dormance. Touto metodou bylo nalezeno 23 genů se zvýšenou expresí u klasického typu broskve oproti mutantnímu (evg) typu broskve během krátkodenních podmínek. Exprese těchto genů byla ověřena metodou Real-Time PCR. Použití mutantního typu broskve (evg) umožnilo snížit počet kandidátních genů oproti běžným výsledkům exprimovaných genů v průběhu krátkodenních podmínek. Tyto geny jsou pravděpodobně zapojeny do signálních drah vnímání fotoperiody, které vedou k zastavení růstu a navození dormance (Jiménez *et al.*, 2010).

Mapováním a sekvenováním mutantního typu broskve (evg), který neukončuje svůj růst a nevstupuje do dormance, bylo identifikováno šest genů označených jako DAM geny (z anglického „dormancy associated MADS-box“). Tyto geny jsou kandidátními geny v procesu ukončování růstu a formace terminálního pupene. DAM geny byly sledovány u mutantního typu broskve (evg) v průběhu celého roku a za kontrolovaných podmínek krátkého i dlouhého dne. DAM geny 1, 2, 4, 5 a 6 reagovaly na krátkodenní periodu. DAM3 na fotoperiodu nereagoval, tzn., že může být regulován působením chladových teplot. DAM geny jsou tedy pro růst a vývoj broskví důležité (Jiménez *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). Ve spojitosti s endogenní dormancí laterálních pupenů broskví studovali Yamane *et al.* (2011) regulaci exprese dvou DAM genů, konkrétně PpDAM5 a PpDAM6. V této studii bylo zjištěno, že oba tyto geny vykazovaly zvýšenou expresi v průběhu endogenní dormance. Dále tyto geny vykazovaly zvýšenou expresi při působení chladových teplot na podzim a sníženou expresi v období výstupu z endogenní dormance a po delším působení nižších teplot v zimě. Tyto výsledky ukazují, že dva zkoumané DAM geny mohou hrát roli při působení chladových teplot na laterální pupeny broskví a také mohou mít vliv na inhibici růstu v době výstupu z dormance.

3.4.8 Meruňka japonská / Slivoň japonská (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)

Ke studiu endodormance laterálních pupenů japonské meruňky byla použita supresivní subtraktivní hybridizace se zrcadlovou orientací výběru (SSH/MOS – z anglického „suppression subtractive hybridization with mirror orientation selection“). Byly vytvořeny dvě cDNA knihovny, jedna z dormantních pupenů a druhá z paradormantních nebo ektodormantních pupenů. Tyto analýzy byly provedeny za účelem hledání genů se zvýšenou expresí v období indukce endogenní dormance nebo genů se sníženou mírou exprese v období výstupu z endogenní dormance. Skríníngem rozdílů v expresi genů a sekvenováním byla zjištěna zvýšená exprese genů v endodormantních pupenech u genů zapojených do: metabolismu giberelinů, odolnosti vůči stresu, modifikace buněčné stěny a signálů transdukce, jako jsou transkripční faktory. Na základě dalších analýz bylo zjištěno, že geny podobné SVP/AGL24-type MADS-box transkripčního faktoru byly exprimovány ve spojitosti s endodormancí (Yamane *et al.*, 2008).

V další studii provedené na japonských meruňkách bylo identifikováno šest tandemově uspořádaných PmDAM genů (PmDAM1 až PmDAM6; Sasaki *et al.*, 2011).

Všechny tyto geny mohou působit jako transkripční represory. Analýza genové exprese všech PmDAM genů a chladového působení na podzim ukazuje, že všechny geny byly potlačeny při dlouhodobém působení chladu a udržovány na nízké úrovni exprese až do doby výstupu z endogenní dormance. Exprese genů PmDAM4 a PmDAM6 byla v negativní korelaci s výstupem z endogenní dormance. Tyto geny mohou hrát také roli v rozdílných reakcích na krátkou dobu chladového působení mezi genotypy vyžadujícími nízké a vysoké množství chladových hodin. U genotypů vyžadujících vyšší množství chladových hodin došlo ke zvýšení exprese těchto dvou genů a u genotypů s nižšími nároky na sumu hodin chladového působení došlo k potlačení exprese těchto genů (Sasaki *et al.*, 2011).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

Pro tuto disertační práci byly vybrány 4 genotypy meruněk. Byla vybrána odrůda s velmi raným výstupem – ‘Sundrop’, raným výstupem – ‘Vestar’, ‘Betinka’ s pozdním výstupem a odrůda s velmi pozdním výstupem z endogenní dormance – ‘Stark Early Orange’ (SEO). Tyto odrůdy byly vybrány tak, aby mezi nimi byly v době výstupu květních pupenů z endogenní dormance co největší rozdíly a tím i rozdílná genová exprese v jednotlivých termínech časové řady odběrů analyzovaných vzorků.

Dvou až tříleté větve s paralelně morfologickými úseky s pupeny byly odebírány na pozemcích Ústavu ovocnictví, Zahradnické fakulty v Lednici, Mendelovy univerzity v Brně. Výhony byly v obou zimních obdobích (2007/2008 a 2008/2009) odebírány vždy z jednoho stanoveného stromu dané odrůdy. Výhony jednotlivých odrůd s květními pupeny byly systematicky odebírány v termínech pokrývajících období endogenní dormance, výstupu z ní a v termínech po výstupu z endogenní dormance (viz tab. 1, přílohy str. 7).

4.1.1 ‘Sundrop’

Odrůda ‘Sundrop’ je kanadského původu, která vznikla z volného opylení odrůdy ‘Perfection’ v roce 1975. Růst má bujný, tvar koruny je vzpřímený. I přes svou kratší dormanci má poměrně mrazuodolné pupeny. Je to cizosprašná odrůda, která často přeplozuje. Z tohoto důvodu vyžaduje probírku plodů. Dozrává 3 dny před odrůdou ‘Velkopavlovická’. Dozrává jednotně, hmotnost plodů se pohybuje od 30 do 50 g, průměrný obvod plodu je 13,2 cm. Plod je kulovitý až mírně oválný. Barva je pomerančová, výjimečně se slabě vyvinutým krycím líčkem s tečkováním na 0-15 % povrchu plodu. Dužnina má oranžovou barvu, je pevná, dobré chuti. Semenné jádro je hořké. Plody jsou vhodné ke konzervování i k přímému konzumu, dobře snáší transport. Odolnost proti moniliové hnilobě je střední (Della Strada *et al.*, 1989; Vysloužil et Nečas, 2010).

4.1.2 'Stark Early Orange' (SEO)

Odrůda 'Stark Early Orange' (SEO) pochází z USA (Washington). Je to kultivar neznámého původu z roku 1920, rozšířil se ovšem až v roce 1945. Strom je bujně rostoucí, kvete středně pozdně, plodonosným obrostem u této odrůdy, jsou kytičkovité útvary. Zraje 10 dní před odrůdou 'Velkopavlovická'. Plody jsou velké s průměrnou hmotností 79 g a průměrným obvodem plodu 15,9 cm. Tvar plodu je podélný, kulatě vejčitý. Barva plodu je pomerančová se světle zelenými oblastmi, vzácně se u této odrůdy vyskytují odstíny jasně červené barvy. Slupka je náchylná na praskání v oblasti u stopky. Dužninu má oranžovou, středně pevnou, středně jemné struktury. Je středně až málo náchylná k otlakům plodů při manipulaci. Z hlediska odolnosti odrůdy 'Stark Early Orange' k moniliové hnilobě jsou rostliny středně až nízké citlivé, na rozdíl od toho plody jsou citlivé vysoce (Della Strada *et al.*, 1989).

4.1.3 'Vestar'

Odrůda 'Vestar' vznikla křížením odrůdy 'Maďarská' a směsi pylu čínských odrůd na Slovensku. Svou zralostí se řadí do skupiny odrůd středně raných, zraje 5 dnů po odrůdě 'Velkopavlovická'. Strom je bujně rostoucí s rozložitým habitem a brzkým nástupem do plodnosti. Z hlediska použití podnože není tato odrůda náročná, lze u ní použít všechny dostupné podnože vhodné pro meruňky. Plodnost může být někdy při přeplození mírně střídavá, ale běžně bývá pravidelná a velká. Plody mají trojúhelníkový tvar se špičkou na vrcholu. Povrch plodu je hladký se slabě plstnatou slupkou, základní barva plodu je oranžová s výrazně červeným líčkem na osluněné straně plodu. Dužnina má tmavě oranžovou barvu, je tuhá až velmi tuhá s hrubou konzistencí. Chuť této odrůdy je sladce navinulá až nakyslá, v dobrých letech při plném vyzrání nasládlá. Aroma plodu je dobré až pikantní, je vhodná pro přímý konzum. Pecka je vejčitá a není od dužniny odlučitelná, což je výrazné negativum a značně snižuje možnost rozšíření této odrůdy. Naopak kladem této odrůdy je její vysoká odolnost proti pozdním jarním mrazíkům v době květu, nenáročnost na agrotechniku a stanovištní podmínky. Je doporučována do středně teplých a chladnějších pěstitelských oblastí. V letech s velkým množstvím srážek v době dozrávání může odrůda 'Vestar' trpět praskáním plodů a následnou moniliovou hnilobou (Jan, 2011).

4.1.4 'Betinka'

Odrůda 'Betinka' vznikla křížením v roce 1984 a následnou selekcí v roce 1992 na Zahradnické fakultě v Lednici. Svou zralostí se řadí do skupiny odrůd se střední dobou zrání. Zraje 2 dny po odrůdě 'Velkopavlovická'. Je cizosprašná, růst má silný a vzpřímený. Plodnost je středně vysoká až vysoká. Plody jsou atraktivní, střední až velké velikosti. Dužnina plodu je pevná s dobrou chutí. Je vhodná pro přímý konzum. Významným kladem této odrůdy je její rezistence vůči virové chorobě – šarka švestek (PPV – „Plam Pox Virus“ též nazývané virové neštovice švestky). Z tohoto důvodu je tato odrůda doporučována do oblastí s velkým rozšířením tohoto virového onemocnění (Anon., Betinka & Co.).

4.2 Metody

4.2.1 Stanovení výstupu z dormance metodou počtu vykvetlých květních pupenů

Toto stanovení bylo prováděno na základě poměru vykvetlých květních pupenů meruněk z celkového počtu známých květních pupenů. Od jedné odrůdy byl odebrán takový počet větví, aby na nich bylo přibližně sto květních pupenů, které bylo nutné spočítat a jejich počet si zapsat ihned po odběru. Nařezané větve byly umístěny na 14 dní do nádob s vodou při pokojové teplotě. Počet vykvetlých květních pupenů byl počítán po 7 dnech, kdy zároveň proběhlo nové zastřížení výhonů a výměna vody. Po 14 dnech byl počet vykvetlých květních pupenů opět spočítán. V případě, že po 14 dnech vykvetlo 50 a více procent květních pupenů, byl termín odběru daných větví označen za termín výstupu květních pupenů z endogenní dormance. Za vykvetlý květní pupen byl považován takový, který byl ve fenofázi „začátek butonizace až kvetení“, tedy stádium 'D' až 'F' dle Fleckingera a Grisvarda (Vachůn, 2003).

Zároveň se sledováním počtu vykvetlých květních pupenů byl zkoumán vztah rozkvetlých pupenů k sumě hodin při teplotách od 0-7 °C (Crabbe et Barnola, 1996). Přístup byl zvolený obdobně, jak uvádí Yamane *et al.* (2006) u jejich analýzy dvou kultivarů japonských meruněk (tab. 15, přílohy str. 47).

4.2.2 Stanovení produkce etylénu, CO₂ a etanu

U každé ze čtyř odrůd byla přichystána 3 opakování tohoto měření. Větve s květními pupeny meruněk byly v sadu odebrány a rozděleny na fragmenty o délce 120 mm. Pro každou odrůdu byly nachystány tři odměrné válce, každý o objemu 50 ml, a do každého z nich bylo nalito 10 ml deionizované vody. Do každého odměrného válce byly umístěny tři fragmenty, které byly předem zváženy v gramech s přesností na 2 desetinná místa. Takto nachystaná 3 opakování od jedné odrůdy byla ve stejný čas hermeticky uzavřena a dopravena na Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta Mendelovy univerzity v Brně, kde byly 24 hodin po uzavření analyzovány. Další analýza byla provedena po 7 dnech, během nichž byly odměrné válce otevřeny za běžného osvětlení a při pokojových teplotách. Po sedmi dnech byly odměrné válce znovu na 24 hodin uzavřeny a vytvořená atmosféra byla opětovně analyzována.

Pro samotnou analýzu byl třikrát odebrán 1 ml vytvořené atmosféry z odměrného válce injekční stříkačkou. Odebraná atmosféra byla analyzována metodou plynové chromatografie, což je typ separační metody, kdy se od sebe oddělují složky obsažené ve vzorku. Složky jsou při tomto postupu převedeny do plynné fáze, aniž by došlo k jejich rozkladu. Stacionární fáze interaguje se složkami vzorku, ten je unášen mobilní plynnou fází, proto se složky při pohybu zdržují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované. Pro plynovou chromatografii, kdy bylo měřeno množství etylénu a etanu, byl použit přístroj (Fissons Instrument) s kapilární, 24 m dlouhou kolonou HP-PLOT/Al₂O₃. Teplota detektoru byla 200 °C, nástřiku 230 °C a kolony 40 °C (Fišerová et Hradilík, 1994; Fišerová *et al.*, 2001; Fišerová *et al.*, 2008). Obsah oxidu uhličitého byl stanoven na plynovém chromatografu CHROM 5 s katharometrem, jakožto detektorem, který má 1,5 m dlouhou náplňovou kolonou plněnou PORAPAKem Q (Prokeš *et al.*, 2006). Získané výsledky byly po přepočtu na standard etylenu a CO₂ přepočteny na hmotnost materiálu, statisticky zhodnoceny a zpracovány graficky.

4.2.3 Stanovení hladiny kyseliny abscisové (ABA)

Stanovení hladiny kyseliny abscisové (ABA) bylo provedeno radioimunoanalytickou metodou (RIA) na Ústavu biologie rostlin. Tato metoda stanovení kyseliny abscisové využívá schopnost protilátky MAC 252 rozpoznat molekuly ABA (Quarrie *et al.*, 1988). Při přípravě vzorků byla pro každou odrůdu přichystána 2

opakování. Pupeny byly umístěny do 1,5 ml vymražených mikrokumavek, které byly umístěny v kovových vymrazovacích destičkách pro co nejrychlejší zchlazení. Minimální navážka pro jedno opakování byla 0,1 g. Každý vzorek byl přesně zvážen s přesností 0,0001 gramu a byl spočítán počet pupenů v navážce. Mikrokumavky se vzorky byly skladovány v - 80 °C a po nashromáždění všech vzorků byly převezeny v chladícím boxu na analýzu. RIA analýza byla provedena za použití monoklonální protilátky MAC 252 (Monoclonal Antibody Centre, Cambridge, UK) pro stanovení (+) – S-ABA a 3H-ABA (Amersham, spec. radioakt. 2,55 TBqmmol, 95,5 MBq.l-1). Radioaktivita byla měřena pomocí scintilačního spektrometru Packard 2 000 CA a programu „SECURIA – Packard“.

4.2.4 Stanovení hmotnosti květních pupenů

Při každém termínu odběrů vzorků bylo odebráno i 5 kusů květních pupenů, jež byly jednotlivě zváženy. Jejich hmotnosti byly zaznamenány do tabulky a vyhodnoceny v grafu.

4.2.5 Optimalizace syntézy ds cDNA jakožto templátu pro cDNA-AFLP

Při zavádění metodiky pro metodu cDNA-AFLP v letech 2005/2006 a 2006/2007, pro účely vypracování diplomové práce „Genetická determinance dormance a kvetení u meruněk“ (Čechová, 2007), byly zjištěny problémy především v části metodiky od izolace RNA po syntézu ds cDNA. Problém byl ve velké časové náročnosti rozlišení pupenů květních od listových, dále v nashromáždění dostatečného množství pupenů na jeden vzorek, což při používané metodě izolace RNA na bázi extrakce na oxidu křemičitém znamenalo potřebu zajistit přibližně 1 g pletiv pupenů. Dlouhá časová náročnost procesu od získání vzorků pro izolaci RNA, následné separace mRNA a přepis na ds cDNA byla u některých vzorků zdrojem problémů v důsledku částečné degradace nukleových kyselin. Tato částečná degradace se projevila po analýze vzorků na genetickém analyzátoru ABI-PRISM 310 (Applied Biosystems) absencí amplifikovaných fragmentů delších než 160 bp. Dalším problémem byla nízká výtěžnost ds cDNA, která se projevila v následném kroku protokolu metody cDNA-AFLP, kdy po preamplifikaci některé vzorky nebyly při zkoušce na polyakrylamidovém gelu dostatečně zřetelné. Nebylo ani možné změřit a tudíž sjednotit jejich koncentraci před finální analýzou na jednotnou úroveň (Čechová, 2007). Odstraňováním výše zmíněných problémů se zabývá část předkládané práce (viz níže).

4.2.5.1 Příprava květních pupenů a skladování vzorků pro izolaci RNA

Z odebraných výhonů meruněk byly v laboratoři odděleny květní pupeny. Pro kontrolu, zda se jednalo o květní či listový pupen, byl každý pupen s nejistým zařazením rozříznut. Na řezu pupenu byly pomocí lupy rozlišeny květní či listové základy, podle toho, o jaký druh pupenu se jednalo (obr. 1, přílohy str. 104).

Po opadu listů na podzim roku 2007 byl proveden test účinnosti komerčního přípravku RNeasy® Lysis Solution (Qiagen®) na stabilizaci RNA v pletivech květních pupenů meruněk. Test byl proveden tak, že byly odebrány dormantní květní pupeny meruněk, které byly rozpuřeny a ihned umístěny do 2 ml mikrozkušavek obsahujících 1 ml RNeasy® Lysis Solution. Takto připravené vzorky byly po dobu 24 hodin umístěny do 4 °C za účelem difuze přípravku RNeasy® Lysis Solution do pletiv pupenů. Po tomto ošetření byly pupeny umístěny do mrazícího boxu s - 80 °C na jeden měsíc. Po této době byly znovu odebrány čerstvé dormantní květní pupeny meruněk, z nichž byla vyizolována celková RNA. Celková RNA byla vyizolována rovněž ze skladovaných pupenů. Kvalita izolátů byla ověřena na RNáza „free“ agarózovém gelu (obr. 2, přílohy str. 104).

4.2.5.2 Izolace RNA – Spectrum plant total RNA kit

V prvotním protokolu použitým v rámci řešení diplomové práce (Čechová, 2007) byla u čerstvých odebraných pupenů meruněk prováděna okamžitá izolace RNA ihned po odběru vzorků. Izolace byla prováděna extrakcí na oxidu křemičitém podle upraveného protokolu izolace celkové RNA dle Foissac *et al.* (2001). Získané výsledky však byly poměrně nekvalitní, jak je patrné z provedené zkoušky kvality celkové vyizolované RNA (obr. 3, přílohy str. 105).

V rámci pokusné části disertační práce zaměřené na optimalizaci syntézy ds cDNA byl proto vyzkoušen jiný postup izolace celkové RNA. Na tuto izolaci byl použit komerční kit Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma). Izolace RNA byla prováděna až po zjištění pravděpodobného termínu výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance doprovodnými metodami. A to, pokud to bylo možné, ve dvou termínech před výstupem květních pupenů z endogenní dormance, v termínu výstupu a v jednom termínu po výstupu.

Použité chemikálie, roztoky, laboratorní pomůcky a přístroje pro izolaci prostřednictvím sady „Spectrum plant total RNA kit“:

- 100% etanol
- 2-Merkaptoetanol (dodávaný v kitu)
- Sada roztoků obsažená ve „Spectrum™ Plant Total RNA kitu“ :
 - Lytický roztok – „Lysis solution“
 - Vázací roztok – „Binding solution“
 - Promývací roztok 1 – „Wash solution 1“
 - Promývací roztok 2 – „Wash solution 2“
 - Vymývací roztok – „Elution solution“
- Kolony obsažené v „Spectrum™ Plant Total RNA kitu“ :
 - Filtrační kolona (modrá)
 - Vázací kolona (červená)
 - Sběrné mikroskopické kumavky
- Ostatní příslušenství
 - Třecí miska s tloučkem
 - 2 ml mikroskopické kumavky
 - Mikropipety různých rozsahů s příslušnými špičkami s filtry
 - Hlubokomrazicí box (Sanyo Ultra Low)
 - Centrifuga s rotorem pro 2 ml mikroskopické kumavky (Hettich)
 - Třepačka na mikroskopické kumavky (Ika)
 - Suchý termoblok (Biosan)
 - Digestoř (nutná při práci s merkaptoetanolem)

Protokol izolace celkové RNA pomocí kitu Spectrum™ Plant Total RNA:

- Třecí misky s tloučky, speciálně vyhrazené a ošetřované pro izolaci RNA, byly umístěny do hluboko mrazícího boxu minimálně na 2 hodiny před jejich vlastním použitím (nebo nejlépe přes noc, den před použitím).
- Květní pupeny meruněk zmražené v RNAlater®Solution byly rozmrazeny, vytaženy z roztoku a osušeny jednorázovým ubrouskem.
- Takto připravené pupeny (cca 150 mg) byly ihned umístěny do vymražených třecích misek.
- Pokračovalo vymražování pletiv i s třecími miskami po dobu jedné hodiny.
- Těsně před drcením vzorků byly připraveny popsané 2 ml mikrozkušavky s 500 µl lytického roztoku („Lysis solution“) a 5 µl 2-merkaptoetanolu.
- Po dokonalém rozdrčení vymražených pletiv bylo maximálně 100 mg převedeno do mikrozkušavek s předem připravenou směsí lytického roztoku a merkaptoetanolu (tuto maximální hmotnost vzorku bylo potřeba dodržet, aby nedošlo k přehlcení kolony, což by vedlo k nízkému výtěžku vyizolované celkové RNA).
- Následovalo důkladné protřepání vzorku na třepačce pro mikrozkušavky po dobu 30 sekund při 1400 rpm.
- Dále následovala inkubace vzorku v termobloku při teplotě 56 °C po dobu 4 minut.
- Vzorek byl odstředěn po dobu 3 minut do vytvoření pelet z buněčného odpadu. Tento a všechny následující centrifugační kroky byly prováděny při pokojové teplotě a při rychlosti 16000 g v mikrocentrifuze.
- Vzniklý supernatant byl odpipetován do filtrační kolony (modrá) umístěné ve 2ml sběrné mikrozkušavce tak, aby se jednorázová špička s filtrem, nedotkla peletu z buněčných trosek, následovalo odstředění po dobu 1 minuty.
- Po odstředění byla z mikrozkušavky odstraněna filtrační kolona a do vyčištěného lyzátu bylo napipetováno 500 µl vázacího roztoku („Binding solution“). Směs byla následně promíchána opětovným nasátím a vypuštěním vzorku z pipety (minimálně 5×).
- Následoval krok vázání RNA na vázací kolonu (červená), kdy bylo na tuto kolonu, umístěnou ve sběrné mikrozkušavce, napipetováno 700 µl směsi získané v předešlém kroku.

- Následovalo odstředění po dobu jedné minuty k navázání RNA na membránu kolony.
- Tekutina ze sběrné mikrozkušavky byla odlita a mikrozkušavka byla krátce poklepána o čistý savý papír k vysušení zbytkové tekutiny.
- Kolona byla vrácena do stejné sběrné mikrozkušavky.
- Následovalo napipetování zbytku směsi na vázací kolonu a zopakování centrifugačního a odlévacího kroku.
- Dalším krokem bylo první promývání kolony, při kterém bylo 500 μ l promývacího roztoku 1 („Wash Solution 1“) napipetováno na vázací kolonu se zachycenou RNA.
- Následovalo odstředění po dobu 1 minuty a následné odlití tekutiny prošlé přes kolonu.
- S mikrozkušavkou bylo krátce poklepáno o čistý savý papír k vysušení zbytkové tekutiny a kolona byla opět vrácena do stejné sběrné mikrozkušavky.
- Následovalo druhé promývání kolony prostřednictvím 500 μ l zředěného promývacího roztoku 2 („Wash Solution 2“).
- Po odstředění trávající 1 minutu došlo opět k odlití tekutiny prošlé přes kolonu a poklepání mikrozkušavkou o čistý savý papír k vysušení zbytkové tekutiny.
- Kolona byla opět vrácena do stejné sběrné mikrozkušavky a následovalo třetí promývání kolony, při kterém bylo na kolonu opět napipetováno 500 μ l zředěného promývacího roztoku 2.
- Následovalo odstředění po dobu 1 minuty, odlití tekutiny prošlé přes kolonu, poklepání mikrozkušavkou o čistý savý papír k vysušení zbytkové tekutiny a umístění kolony do stejné sběrné mikrozkušavky.
- Dalším krokem bylo sušení kolony, při kterém se sběrná mikrozkušavka s promytou vázací kolonou odstředila v mikrocentrifuze po dobu jedné minuty. Cílem bylo dokonalé osušení vázací kolony.
- Osušená vázací kolona byla přemístěna do nové čisté sběrné mikrozkušavky a následovalo první vymývání RNA prostřednictvím přidavku 50 μ l Elučního (vymývacího) roztoku („Elution solution“). Eluční roztok bylo nutné napipetovat přímo do středu vázací matrice na koloně.

- Poté následovala 1 minutová inkubace a následné odstředění opět po dobu 1 minuty.
- Následně bylo provedeno stejným způsobem druhé promytí do stejné mikrozkušavky (50 μ l elučního roztoku, 1 minuta inkubace, 1 minuta odstředění).
- Následovalo ošetření vyizolované RNA 1 μ l enzymu „RNase OUT“, který zamezí činnosti RNáz degradujících vyizolovanou RNA.

4.2.5.3 Kontrola kvality a kvantity izolátů celkové RNA

Kontrola kvality celkové RNA byla prováděna elektroforeticky na 1,2% RNáza „free“ agarózovém gelu. Kontrola kvantity celkové RNA v izolátu byla provedena fluorometricky na přístroji ModulusTM Single Tube Fluorometer 9200-000 (Turner Biosystems).

4.2.5.3.1 Kontrola kvality celkové RNA na RNáza „free“ agarózovém gelu

RNáza „free“ agarózový gel pro práci s RNA se vyrábí z autoklávaných chemikálií zbavených enzymu RNáza rozkládajícího RNA. Používá se elektroforéza a ostatní pomůcky důkladně očištěné pomocí 0,5% SDS. Tato opatření minimalizují nebezpečí rozkladu RNA během elektroforézy a tím umožní její vizualizaci.

Použité roztoky a chemikálie:

- Pufř TAE 50 \times RNáza „free“.

Jedná se o elektroforetický pufř, který zajišťuje vhodné pH pro migraci nukleových kyselin a zamezující vzniku gradientu pH v okolí elektrod.

Je součástí agarózových gelů, dávkovacího pufřu a vytváří samotné elektroforetické prostředí. Jako rozpouštědlo, byla pro přípravu pufřu použita voda ošetřena DEPC, který RNázy deaktivuje.

Pufř byl používán v pracovní koncentraci 1 \times .

Složení pufřu TAE: 2 M Tris base; 2 M ledová kyselina octová; 50 mM EDTA.

- Dávkovací pufr 6× RNáza „free“:

0,25% Bromphenol blue

0,25% Orange G

15% Ficcol

TAE 1×

- Ostatní chemikálie:

Agaróza pro elektroforézu (Serva); Gel Red (Biotium); 0,5% SDS; DEPC voda.

Použité přístroje a pomůcky:

Malá horizontální elektroforéza (Biometra), forma na gel, hřebínek do gelu, těsnění, kádinka, magnetické míchadlo (Ika), zdroj el. Napětí (Biometra), UV transiluminátor (Vilber Lourmat), digitální fotoaparát s přidaným červeným filtrem (Kodak), počítač.

Protokol:

- Všechny části použité při přípravě gelu byly důkladně očištěny 0,5% SDS a opláchnuty DEPC vodou umístěnou v rozprašovači. Elektroforéza, kádinka s magnetickým míchadlem byla umyta jarem, opláchnuta vodou a následně DEPC vodou. Vše bylo usušeno v digestoři na ubrousku.
- Na 30 ml 1,2% gelu bylo naváženo 0,36 g agarózy, která byla rozvařena ve vymyté kádince s 30 ml pufru TAE 1× RNáza „free“. Do gelu bylo přidáno barvivo Gel Red (Biotium) (v dávce 5 µl na 100 ml pufru, tj. 1,5 µl barviva). Gel byl zchlazen na elektromagnetické míchačce a nalit do připravené formy.
- Po ztuhnutí gelu bylo odstraněno těsnění s hřebíčky a gel s formou byl umístěn do elektroforézy a zalit pufrem TAE 1× RNáza „free“.
- DEPC voda byla použita i v pufru TAE 1× RNáza „free“.
- Na gel byla dávkována směs 7 µl vzorku a 3 µl dávkovacího pufru.
- Napětí použité při elektroforéze bylo po dobu 3 minut 50 V a po zbytek elektroforézy (přibližně 12 minut) 110 V.

- Po dokončení elektroforézy, signalizované úrovní migrace modrého pruhu způsobeného barvivem v dávkovacím puftru, byly produkty zviditelněny UV zářením na transiluminátoru.
- Fotografie gelů byly pořizovány digitálním fotoaparátem s přidaným červeným filtrem. Fotografie byly z paměti fotoaparátu transportovány do paměti počítače pomocí programu „Kodak Picture Transfer“. Dále byly fotografie upraveny pomocí funkcí programu „Adobe Photoshop“.

4.2.5.3.2 Fluorometrická kontrola kvantity celkové RNA

Pomocí přístroje ModulusTM Single Tube Fluorometer 9200-000 (Turner Biosystems) a kitu Quant-iTTM RiboGreen[®] RNA AssayKit (Invitrogen) bylo provedeno měření koncentrace celkové RNA.

Pracovní postup:

- RNA byla v mikrozkušavce (500 μ l) rozředěna pufrem TE 1 \times v poměru 1:199, nebo 1:499 tak, aby naměřená hodnota spadala do rozsahu připravené kalibrační přímky.
- Byl připraven čerstvý 200 \times ředěný roztok barviva RiboGreen. Barvivo se rovněž ředí pufrem TE 1 \times .
- 50 μ l rozředěné RNA bylo smícháno v nové popsané mikrozkušavce (200 μ l) s 50 μ l 200 \times ředěného fluorescenčního barviva RiboGreen, vše bylo řádně pipetováním promícháno a přepipetováno do skleněné kyvety (do doby vlastního měření fluorescence byly kyvety s připraveným vzorkem udržovány ve tmě, aby nedocházelo k degradaci barviva světlem).
- Byla změřena fluorescence směsi na přístroji ModulusTM Single Tube Fluorometer 9200-000.
- Z naměřených hodnot byla přepočtem zohledňujícím ředění vzorku dopočítána skutečná hodnota koncentrace izolátů RNA.

4.2.5.4 Výběr vzorků pro přepis mRNA na ds cDNA a následnou analýzu metodou cDNA-AFLP

Z celkového počtu 34 odebraných vzorků ('Sundrop' – 5 odebraných vzorků, 'SEO' – 12 odebraných vzorků, 'Vestar' – 7 odebraných vzorků, 'Betinka' – 10 odebraných vzorků) bylo nakonec vybráno 15 (viz tab. 2, přílohy str. 8, kde jsou uvedeny ve dvou variantách – varianta A a varianta B). Tyto byly přepsány na ds cDNA a následně analyzovány metodou cDNA-AFLP. Tyto vzorky byly vybrány tak, aby byly analyzovány u každé odrůdy 2 odebrané vzorky před výstupem z endogenní dormance, jeden vzorek v termínu výstupu a jeden vzorek po termínu výstupu z endogenní dormance. U odrůdy 'Sundrop' byl k dispozici pouze jeden termín odběru vzorku před výstupem z endogenní dormance, takže počet analyzovaných vzorků u této odrůdy byl 3 a ne 4, jako u ostatních odrůd.

Termín výstupu z endogenní dormance byl co možná nejpřesněji stanoven výše zmiňovanými metodami (metodou počítání počtu vykvetlých květních pupenů – kapitola 4.2.1; stanovením produkce etylénu, CO₂ a etanu – kapitola 4.2.2; stanovením hladiny kyseliny abscisové (ABA) – kapitola 4.2.3; stanovením hmotnosti květních pupenů – kapitola 4.2.4), z nichž největší váhu pro stanovení tohoto termínu měla metoda počítání počtu vykvetlých květních pupenů.

4.2.5.5 Přepis mRNA na ds cDNA pomocí MINT cDNA synthesis kit (EVROGEN)

U vybraných vzorků byl proveden přepis na ds cDNA pomocí komerčního kitu MINT cDNA synthesis kit od (EVROGEN). Schematický nákres pracovního postupu syntézy ds cDNA pomocí tohoto kitu je znázorněn na obrázku č. 5 (přílohy str. 106). K tomuto přepisu je možné použít celkovou RNA bez potřeby separace mRNA. V tomto kitu je použita Mint reverzní transkriptáza, která je založena na bázi reverzní transkriptázy MMLV.

Použité chemikálie, roztoky, laboratorní pomůcky a přístroje:

- Komponenty dodané v komerčním kitu:
 - 5× pufr pro syntézu prvního řetězce ds cDNA („First-Strand Buffer“)
 - DTT (20 mM)

50× dNTP mix (směs 10 mM pro dATP, dGTP, dCTP a dTTP))

PlugOligo adapter (10 μM)*

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGGGGG-P-3'

3'-primer (10 μM)*

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₃₀VN-3'

*Rsa I – restrikční místo je podtrženo; N=A, C, G nebo T; V=A, G nebo C

Reverzní transkriptáza (Mint Reverse Transcriptase)

Roztok IP („IP-solution“)

Kontrolní celková RNA („Control total RNA template“ – 0,5 μg·μl⁻¹)

PCR Primer M1 (10 μM)

5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

50× Encyclo polymerázový mix („Encyclo polymerase mix“)

10× Encyclo pufr („Encyclo buffer“)

Sterilní RNáza „free“ voda

- Komponenty nedodávané v zakoupeném kitu:

Sterilní mikrozkušavky o objemech 1,5 ml, 500 μl a 200 μl

Vymrazovací stojan na mikrozkušavky

Sada pipet určených pro práci s RNA s příslušnými špičkami s filtry

DNA velikostní standard 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

- Komponenty potřebné pro elektroforetickou separaci

Agaróza (Serva), pufr 1× TAE, dávkovací pufr, plastová forma na agarózový gel, hřeben, těsnění, horizontální elektroforéza (Biometra), zdroj energie (Biometra)

- Ostatní přístroje

Biohazard box (vhodné použít při práci s RNA)

Třepačka na mikrozkušavky (Ika)

Mikrocentrifuga (Shelton Scientific)

Termocykler (Biometra)

Syntéza prvního řetězce cDNA a začlenění PlugOligo adaptéru

- Pro inkubační kroky potřebné k syntéze prvního řetězce cDNA byl dle doporučení použit termocykler s vyhřívaným víkem (Biometra).
- Nejprve byly připraveny vzorky RNA tak, aby množství celkové RNA vstupující do reakce bylo v doporučováním rozmezí 0,25 – 2 µg.
- V první testovací sadě vzorků byla použita koncentrace 0,363 µg RNA na vzorek (tato hodnota se odvíjí od množství RNA ve vzorku o nejnižší koncentraci).
- Ve druhé sadě vzorků bylo podobným způsobem vstupující množství celkové RNA sladěno na 0,45 µg u všech vzorků (tab. 3, přílohy str. 9).
- Před odebráním celkové RNA z mikrokumavky, ve které byla skladována po izolaci, byly vzorky zahřáty na 65 °C po dobu 2 minut a následně promíchány pozvolným cvrnkáním prsty.
- Pro kontrolní reakci bylo použito 2 µl kontrolní RNA.
- Následující 2 komponenty byly smíchány pro všechny vzorky tzv. „master mix“ a následně rozpipetovány v dávce 2 µl na vzorek.

1 µl 3' – primer (10 µM)

1 µl PlugOligo adaptor

- Celkové množství vzorku bylo 4 µl.
- Po smíchání naředěné RNA se zbytkem reakční směsi byly mikrokumavky umístěny do termocykleru a inkubovány při 70 °C po dobu 2 min.
- Následně byla teplota inkubace snížena na 42 °C po dobu potřebnou k přípravě „RT master mixu“.
- „Master mix“ pro RT všech vzorků byl připraven v následujícím složení:

2 µl 5× pufr („First – Strand buffer“)

1 µl DTT (20 mM)

1	μl	50× dNTP (10 mM)
1	μl	reverzní transkriptáza (Mint Reverse transcriptase)
5	μl	celkové množství

- „RT master mix“ byl pipetováním jemně promíchán a krátce odstředěn na mikrocentrifuze.
- 5 μl master mixu bylo přidáno do každé mikrozkušavky s inkubujícím se vzorkem přímo v termocykleru.
- Vzorky byly z termocykleru vytaženy pouze na nezbytnou dobu pro přidání „RT master mixu“. Dále následovala inkubace při 42 °C po dobu 20 min.
- Po této inkubaci následovalo okamžité přidání 5 μl roztoku s označením „IP-solution“ do každé reakční mikrozkušavky.
- Mikrozkušavky byly vytaženy z termocykleru jen na nezbytně dlouhou dobu pro přidání „IP-solution“.
- Následovalo promíchání pipetováním a inkubace při 42 °C po dobu 1 hodiny a 40 minut.
- Po ukončení reakce byly vzorky umístěny na vymrazovací stojan.
- Takto připravená jednořetězcová cDNA byla v zápětí použita jakožto templát pro syntézu ds cDNA.

Syntéza ds cDNA pomocí PCR amplifikace

- Výrobce kitu byla doporučena optimalizace počtu PCR cyklů pro syntézu ds cDNA.
- Použití optimálního počtu PCR cyklů zabezpečí, že syntéza ds cDNA zůstává v exponenciální fázi amplifikace.
- Pro rozmezí použité celkové RNA 0,25-0,5 μg je výrobcem doporučováno otestovat 18, 21 a 24 PCR cyklů (dle tab. 4, přílohy str. 10).

- Z těchto testovaných byl pro námi zkoumaný materiál (RNA z květních pupenů meruněk) vybrán jakožto optimální počet 21 PCR cyklů (závěr vychází z obr. 6 a 7, přílohy str. 107).
- Pro každý vzorek jednořetězcové cDNA byl připraven master mix o objemu 49 μ l zkombinováním následujících komponent v předepsaném pořadí:

40	μ l	RNáza „free“ voda
5	μ l	10 \times Encyclo PCR pufr (Encyclo PCR buffer)
1	μ l	50 \times dNTP mix
2	μ l	PCR Primer M1 (10 μ M)
1	μ l	50 \times Encyclo polymerázový mix (Encyclo polymerase Mix)
49	μ l	Celkové množství

- Mix PCR komponentů byl promíchán pipetováním a krátce odstředěn v mikrocentrifuze.
- 49 μ l PCR master mixu bylo rozpipetováno do příslušného množství mikrozkuvek o objemu 200 μ l.
- Do takto rozpipetovaného master mixu byl přidán 1 μ l připravené jednořetězcové cDNA.
- Mikrozkuvky byly umístěny do termocykleru, ve kterém byl spuštěn následující teplotní program:

počáteční denaturace	95 °C	1 min
cyklování 21 \times		
denaturace	95 °C	10 s
hybridizace	66 °C	20 s
prodlužování	72 °C	3 min
finální prodlužování	66 °C	15 s
	72 °C	3 min

- Následovala analýza 4 μ l roztoku po PCR reakci na 1,2% agarózovém gelu v 1 \times TAE pufu (obr. 8, 9a, 9b, přílohy str. 108, 109 a 110).
- Zbytek takto syntetizované ds cDNA byl skladován při - 20 °C.
- Z důvodu ověření, zda řádně fungují všechny komponenty kitu, byla vždy při syntéze ds cDNA zkoumaných vzorků provedena i souběžná kontrolní syntéza ds cDNA z dodané RNA v kitu.

4.2.6 Použitý protokol pro cDNA-AFPL metodu

4.2.6.1 Restrikční štěpení enzymem *Mse* I

- K 20 μ l ds cDNA, získaných pomocí MINT cDNA synthesis kit (EVROGEN), bylo přidáno 20 μ l „master mixu“, který pro jeden vzorek obsahoval:

1	μ l	Enzym <i>Mse</i> I (10U; New England Biolabs, Inc.)
4	μ l	NEB buffer 2 (10 \times ; New England Biolabs, Inc.)
0,4	μ l	BSA (100 \times zásobní roztok; New England Biolabs, Inc.)
14,6	μ l	HPLC vody

- Celkem tedy 40 μ l vzorku bylo inkubováno při teplotě vhodné pro štěpení enzymem *Mse* I, což bylo 37 °C po dobu 12 hodin.
- Sekvence rozpoznávaná enzymem *Mse* I je: 5' – T↓TAA – 3', šipka označuje místo, kde dochází ke štěpení nukleové kyseliny.

4.2.6.2 Restrikční štěpení enzymem *Apo* I

- Ke směsi po prvním štěpení o objemu 40 μ l, bylo přidáno 10 μ l následujícího master mixu, který pro jeden vzorek obsahoval:

1	μl	NEB buffer 3 (10×; New England Biolabs, Inc.)
1	μl	Enzym <i>Apo</i> I (10U; New England Biolabs, Inc.)
8	μl	HPLC vody

- Výsledná směs o objemu 50 μl byla inkubována 3 hodiny při teplotě 50 °C.
- Po skončení digesce byla provedena tepelná inaktivace enzymů. Enzym *Apo* I vyžadoval pro svou inaktivaci vyšší teplotu a to 80 °C po dobu 20 minut.
- Sekvence rozpoznávaná enzymem *Apo* I je: 5' – (A,G)↓AATT(T,C) – 3', šipka označuje místo, kde dochází ke štěpení, závorka označuje degenerovanou pozici – místo ve kterém enzym vyhledává na řetězci nukleové kyseliny všechny z vypsanych dusíkatých bází.

4.2.6.3 Příprava adaptorů

Adaptor (1) *Mse* I

- Adaptor *Mse* I se skládá ze dvou oligonukleotidů dodávaných odděleně jako jednovláknové.
- Před použitím adaptoru musí dojít k vytvoření dvouvláknového adaptoru s lepidlymi konci, viz níže:

Mse-AD-H: 5' – GACGATGAGTCCTGAG – 3' (VBC – Biotech)

Mse-AD-S: 5' – TACTCAGGACTCAT – 3' (VBC – Biotech)

Vzhled dvouvláknového adaptoru: 5' – GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT – 5'

- Směsný roztok obou příslušných oligonukleotidů tvořících adaptor *Mse* I byl připraven tak, aby oba byly zastoupeny v koncentraci 50 μM.

- Mikrozkušavka, ve které byly oba řetězce jednotlivých adaptorů smíchány, byla inkubována po dobu 5 min při 95 °C.
- Proběhlo spojení oligonukleotidů do dvouvláknového adaptoru.
- Poté se nechala směs vychladnout po dobu 10 minut při pokojové teplotě.

4.2.6.4 Ligace adaptorů a vznik primárního templátu

- Ke každému vzorku o objemu 50 μ l bylo přidáno 5 μ l master mixu, který pro jeden vzorek obsahoval:

1	μ l	adaptor (1) (tzn. 50 pmol: <i>Mse</i> I)
1	μ l	adaptor (2) (tzn. 5 pmol: <i>Apo</i> I)
0,55	μ l	100 mM ATP (Fermentans)
0,25	μ l	T4DNA ligase (400U· μ l ⁻¹ , New England Biolabs, Inc.)
2,2	μ l	HPLC vody

- Celková směs 55 μ l byla po smíchání inkubována přes noc při 16 °C.
- Produktem ligace adaptorů byl „Primární templát“.
- Pro následnou pre-amplifikaci byl používán zředěný 10 \times (tzn. 55 μ l vzorku + 495 μ l HPLC vody).

4.2.6.5 Pre-amplifikace primárního templátu

- K 10 μl 10 \times ředěného primárního templátu bylo přidáno 40 μl master mixu, který pro jeden vzorek obsahoval:

1	μl	Primer <i>Apo</i> -Preamp (100 ng· μl^{-1}) (VBC – Biotech)
1	μl	Primer <i>Mse</i> -Preamp (100 ng· μl^{-1}) (VBC – Biotech)
5	μl	PCR buffer (10 \times) (Fynzymes)
0,5	μl	dNTPs (25 mM) (Promega)
0,625	μl	Taq-Pol (Dynazyme II DNA Polymerase; 2U· μl^{-1} ; Fynzymes)
31,875	μl	HPLC vody

- Výsledná směs 50 μl v 200 μl mikrozkušavkách byla umístěna do termocykleru (Biometra) a byl spuštěn preamplifikační program:

počáteční denaturace	94 °C	120 s
cyklování 21 \times		
denaturace	94 °C	60 s
hybridizace	55 °C	60 s
prodlužování	72 °C	60 s
finální prodlužování	72 °C	10 min

Sekvence Preamp-primerů jsou:

Apo-Preamp: 5' – CTCGTAGACTGCGTACCAATT – 3' (VBC – Biotech)

Mse-Preamp: 5' – GACGATGAGTCCTGAGTAA – 3' (VBC – Biotech)

- Po pre-amplifikaci byla provedena kontrola na nativním polyakrylamidovém gelu, jelikož na obvykle doporučeném agarózovém gelu v protokolu nebyly produkty preamplifikace vůbec viditelné.
- Na gel bylo nadávkováno 3,5 μ l vzorku a 1,5 μ l dávkovacího pufru.
- Na gel byl pro srovnání nadávkován 100 bp velikostní standard (obr. 10, přílohy str. 111).

PAGE – Polyakrylamidový gel

Použité roztoky a chemikálie:

- TBE pufr 5 \times – zásobní roztok.
- Používá se jako elektroforetický pufr.
- Zásobní roztok byl zředěn deionizovanou vodou na koncentraci 1 \times .
- Složení TBE pufru:
 - 445 mM Tris base
 - 445 mM kyselina boritá
 - 10 mM EDTA, pH 8
- Nedenaturační A+B roztok, složení:
 - Akrylamid
 - Bisakrylamid
- 10% peroxodisíran amonný (NH₄S₂O₈).
- Iniciátor polymerizační reakce.
- Roztok byl připravován v malém množství (1-2 ml), jelikož má malou životnost (cca 2 týdny). Skladováno v chladu.
- TEMED – katalyzátor polymerizační reakce.
- Dávkovací pufr, složení:
 - 10 mM NaOH
 - 95% formamid

0,05% xylen cyanol

- SybrGold (Life Technologies) – velmi citlivé fluorescenční barvivo určené pro detekci dvou i jednořetězcových DNA a RNA fragmentů v gelech.
- Oproti etidium bromidu se udává jeho citlivost desetkrát vyšší (Moravcová, 2005) při mutagenitě výrazně nižší.
- Ostatní chemikálie:
etanol

Použité přístroje a pomůcky:

Souprava pro polyakrylamidovou elektroforézu (Biometra), kádinka, elektromagnetická míchačka, magnetické míchadlo (Ika).

Protokol:

- Prvním krokem byla příprava skel.
- Skla byla očištěna etanolem a ošetřena prostředkem pro následně snadnější snímání gelu ze skel (Blue Slick; Serva).
- Na spodní sklo bylo přiloženo těsnění a na něj bylo přiloženo horní sklo. Skla byla fixována svorkami.
- Dále byl připraven gel o objemu 40 ml do větší elektroforetické soupravy.
- Do kádinky bylo dáno 8 ml TBE 5×, 5,2 ml nedenačného A + B roztoku, směs byla doplněna deionizovanou vodou na 40 ml.
- Dále bylo přidáno 280 µl 10% peroxidisíranu amonného a 28 µl TEMED.
- Směs byla promíchána a nalita do připravených skel.
- Po polymerizaci, projevující se zatuhnutím gelu, bylo odstraněno těsnění a skla s gelem byla umístěna do soustavy pro vertikální elektroforézu.
- Po umístění gelu byl dolit pufr TBE 1× do spodní i horní části elektroforézy a vytažen hřebínek.
- Následně byla provedena preelektroforéza na 15 minut při 20 W bez vzorků.

- Dále bylo provedeno dávkování na gel v poměru 2,5 μ l dávkovacího pufru a 5 μ l vzorku při použití hřebenu pro velké komory, nebo 1,5 μ l dávkovacího pufru a 3,5 μ l vzorku do malých komor.
- Vzorky byly dávkovány dlouhými špičkami speciálními pro dávkování na PAGE gel.
- Byla spuštěna elektroforéza na 60 minut při 20 W.
- Po dokončení elektroforézy, což signalizoval rovněž barevný pruh barvy obsažené v dávkovacím pufru, byl gel vyjmut ze skel a umístěn do barvicí lázně (fluorescenční barvivo SybrGold ředěné 10000 \times puftrem TBE 1 \times ; 130 ml pufru TBE 1 \times + 13 μ l barviva SybrGold) na 20 minut.
- Poté byl gel přemístěn na UV transiluminátor a vyfocen.

4.2.6.6 Fluorometrické měření koncentrace vzorků po pre-amplifikaci

Pomocí přístroje ModulusTM Single Tube Fluorometer 9200-000 (Turner Biosystems) a kitu Quant-iTTM PicoGreen[®] ds DNA Reagent (Invitrogen) bylo provedeno měření koncentrace vzorků po pre-amplifikaci.

Pracovní postup:

- DNA byla v mikrozkušavce (200 μ l) rozředěna puftrem TE 1 \times v poměru 1:49 tak, aby naměřená hodnota odpovídala rozsahu připravené kalibrační přímky.
- Byl připraven čerstvý 200 \times ředěný roztok barviva PicoGreen. Barvivo se rovněž ředí puftrem TE 1 \times .
- 50 μ l rozředěné DNA bylo smícháno s 50 μ l 200 \times ředěného fluorescenčního barviva PicoGreen.
- Vše bylo řádně pipetováním promícháno a přepipetováno do skleněné kyvety (do doby vlastního měření fluorescence byly kyvety s připraveným vzorkem udržovány ve tmě, aby nedocházelo k degradaci barviva světlem).
- Byla změřena fluorescence směsi na přístroji ModulusTM Single Tube Fluorometer.

- Z naměřených hodnot byla přepočtem zohledňujícím ředění vzorku dopočítána skutečná hodnota koncentrace (tab. 5, přílohy str. 10-11).

4.2.6.7 Příprava sekundárního templátu

Pro výběr nejvhodnější koncentrace pro ředění sekundárního templátu, potažmo pro co nejkvalitnější výsledky analýz metodou cDNA-AFLP, byl proveden test různých koncentrací sekundárního templátu (2 ng·μl⁻¹, 5 ng·μl⁻¹, 10 ng·μl⁻¹). Z těchto testovaných hodnot vyšly nejlépe (nejkvalitnější a nejjednodušší výsledky analýzy pro všechny analyzované vzorky) při použití koncentrace sekundárního templátu 5 ng·μl⁻¹. Tato koncentrace byla proto použita pro všechny analýzy (viz tab. 5, přílohy str. 10-11). Takto připravené vzorky jsou označovány jako sekundární templát. V případě, že byl sekundární templát spotřebován, byl znovu připraven výše uvedeným způsobem.

4.2.6.8 Selektivní amplifikace

- K 5 μl sekundárního templátu (5 ng·μl⁻¹) bylo přidáno 10 μl master mixu, který pro jeden vzorek obsahoval:

0,75	μl	Značený-Primer (<i>ApoI</i> -SA+NN) koncentraci 5 pmol·μl ⁻¹
0,6	μl	Primer 2 (<i>MseI</i> + NN), 50 ng·μl ⁻¹ (VBC – Biotech)
1,5	μl	10× PCR buffer (Fynzymes)
0,12	μl	dNTPs (25 mM) (Promega)
1	μl	Taq-Polymeráza (Dynazyme II; 2 U·μl ⁻¹) (Fynzymes)
6,03	μl	HPLC vody

- Celkový objem vzorku po smíchání činil 15 μl.
- Těchto 15 μl bylo v 200 μl mikrozkušavkách umístěno do termocykleru, na kterém byl nastaven tzv. „touchdown“ program pro selektivní amplifikaci:

- 1) 10 cyklů o těchto krocích

denaturace	94 °C	30 s
hybridizace při snížení o 0.7 °C v každém cyklu		
hybridizace	65 – 56 °C	30 s
prodlužování	72 °C	60 s

- 2) následováno: 24 cyklů o těchto krocích

denaturace	94 °C	30 s
hybridizace	56 °C	30 s
prodlužování	72 °C	60 s

- Primery:

Apo-SA+NN: 5' – GACTGCGTACCAATTNN – 3'

kde NN byly tyto dvojkombinace:

CG, GT, CA + fluorescenční značka FAM – modrá (VBC – Biotech)

GC, AG, TG + fluorescenční značka JOE – zelená (VBC – Biotech)

CC, GA, GG + fluorescenční značka NED – žlutá (Applied Biosystems)

Mse-SA+NN: 5' – GATGAGTCCTGAGTAANN – 3' (VBC – Biotech)

- Kde NN byly tyto dvojkombinace: AG, AC, GG, CC, CG, CT, GC tabulka č. 6 (přílohy str. 12).
- U všech 15 zkoumaných vzorků ve variantách A a B (celkem tedy 30 vzorků), byla provedena selektivní amplifikace s celkem 63 primerovými kombinacemi.

4.2.6.9 Analýza na genetickém analyzátoru ABI-PRISM 310

- Nejprve byl připraven master mix pro ABI-PRISM 310 (Applied Biosystems) s 10% rezervou pro jeden vzorek.

- S formamidem bylo nutno pracovat velmi opatrně a v digestoři, protože se jedná o teratogenní látku.

- Master mix pro jeden vzorek – celkem 12,5 μ l – obsahoval:

12 μ l Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems)

0,5 μ l GeneScan™ -500 ROX™ STANDARD (Applied Biosystems)

- Po přípravě master mixu byly připraveny mikrozkušavky bez víčka (vhodné pro genetický analyzátor ABI-PRISM 310).

- Tyto mikrozkušavky byly z boku popsány označením vzorku a římským číslem primerové kombinace (tab. 6, přílohy str. 12).

- Do připravených mikrozkušavek bylo rozpipetováno 12,5 μ l master mixu a následně 3 \times 1 μ l vzorku po selektivní amplifikaci – příslušná kombinace vzorků po amplifikaci s primery značenými FAM, JOE, NED (viz tab. 6, přílohy str. 12).

- Po uzavření speciálním septem byly vzorky denaturovány 5 minut při 95 °C, po denaturaci byly vzorky okamžitě převedeny na led nebo do vymrazovacích stojanů na dobu cca 10 minut.

- Takto připravené vzorky byly umístěny do genetického analyzátoru ABI-PRISM 310, kde byly zanalyzovány.

- Pro analýzu na genetickém analyzátoru byly přitom použity tyto podmínky:

filtr F (Filter Set F; Applied Biosystems)

velikostní standard – GeneScan™ – 500 ROX™ (Applied Biosystems)

POP-4™ Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems)

4.2.7 Vyhodnocení cDNA-AFLP analýzy

Výsledky analýzy cDNA-AFLP byly vyhodnoceny pomocí softwaru „Gene Scan analysis“ (Applied Biosystems). Pomocí tohoto softwaru byly vytvořeny transkripční profily, které byly vyhodnoceny dle předem zvolených schémat (viz níže).

System hodnotících schémat

System hodnotících schémat byl vytvořen pro hodnocení vzniklých transkripčních profilů a výběr ampliconů, které by na základě vývoje intenzity v jednotlivých termínech mohly výstup z endogenní dormance ovlivňovat. Takovými genům byly přiřazeny 4 možné teoretické scénáře vývoje jejich exprese. Fragmenty odpovídající některému z těchto scénářů byly podle těchto schémat vybrány pro následnou sekvenaci, a tím pádem také identifikaci a zhodnocení jejich případné spoluúčasti na výstupu z endogenní dormance. Identifikace sekvenovaných fragmentů byla provedena pomocí jejich srovnávání s informacemi o nukleotidových sekvencích v elektronických databázích: NCBI („National Center for Biotechnology Information“; pomocí funkce databáze – „nucleotideblast“) a TIGR („TIGR Plant Transcript Assemblies“). Identifikace genů, jejich funkce a biologického procesu, proběhla v rámci příslušných aplikací jednotlivých databází. Níže uvedená schémata hodnotí vývoj intenzity produktu v jednotlivých termínech odběru vzorku.

Hodnotící schéma – A

V případě hodnotícího schématu A se během sledovaného období čtyř termínů intenzita výskytu produktu snižuje, až v posledním termínu tento produkt zcela chybí. Produkt s vývojem podle schématu A by mohl být fragmentem genu souvisejícího s udržováním květních pupenů v endogenní dormanci. V tomto schématu byly vybírány pouze produkty, které se vyskytly u dvou odrůd meruněk v jejich duplicitním opakování (varianta A a B). Toto je znázorněno (tab. 7, přílohy str. 13) píkem, který je složen ze čtyř překrývajících se píků.

Hodnotící schéma – B

V případě hodnotícího schématu B se jedná o tři varianty vývoje intenzity píků v termínu jeden týden před výstupem z endogenní dormance a ve výstupu z endogenní dormance. V tomto případě by mohlo jít o fragmenty genů aktivovaných pouze v termínu výstupu z endogenní dormance nebo o fragmenty genů aktivovaných velice blízko před výstupem z endogenní dormance. V tomto hodnotícím schématu bylo hodnocení na základě vyskytujících se případů rozděleno do tří podskupin – B1, B2 a B3.

B1 – pík vyskytující se v termínu týden před výstupem z endogenní dormance a v termínu výstupu z endogenní dormance s opakování u více než jedné odrůdy.

B2 – pík vyskytující se jeden týden před výstupem z endogenní dormance u obou opakování (opakování A a B) jedné odrůdy.

B3 – pík vyskytující se v termínu výstupu z endogenní dormance u obou opakování (opakování A a B) jedné odrůdy.

Pík, který se vyskytl u více než jedné odrůdy, byl složen ze čtyř překrývajících se píků (vrcholů). Pík, který se vyskytl jen u jedné odrůdy, ale v obou jejích opakováních, byl ve schématu znázorněn píkem složeným ze dvou překrývajících se píků (vrcholů) (tab. 8, přílohy str. 14).

Hodnotící schéma C

V případě hodnotícího schématu C se jedná o fragmenty, které se v termínu dva týdny před výstupem z endogenní dormance nevyskytují. V ostatních třech termínech se jejich intenzita zvyšuje. V tomto případě by se mohlo jednat o fragmenty genů, jejichž exprese se v blízkém okolí výstupu květních pupenů z endogenní dormance zvyšuje. V tomto případě byly pro sekvenaci vybrány fragmenty, které se vyskytly u více než jedné odrůdy v obou jejích opakováních. Toto je ve schématu znázorněno píkem složeným ze čtyř překrývajících se píků (vrcholů; viz tab. 9, přílohy str. 15).

4.2.8 Sekvence vybraných fragmentů

4.2.8.1 Separace produktů vybraných vzorků na PAGE

Vzorky obsahující vybrané fragmenty genů byly nadávkovány na polyakrylamidový gel (příprava gelu viz kapitola 4.2.6.5) a elektroforeticky separovány. Barvení pro vizualizaci produktů separace na transluminátoru bylo prováděno pomocí barviva SybrGold ředěného 10 000×. Vzorky byly dávkovány tak, aby mezi nimi byla vždy prázdná komora, aby se usnadnilo následné vyřezávání fragmentů z gelů. Dále, pokud to bylo možné, byly dávkovány vzorky tak, aby vedle vzorku obsahujícího vybraný fragment byl nadávkován vzorek, který daný fragment neobsahoval. Takto bylo dosaženo

jednoduššího nalezení vybraných produktů pro vyřezávání z gelu. Příklad je uveden na obrázku č. 11 (přílohy str. 112).

4.2.8.2 Vyřezání vybraných produktů z polyakrylamidového gelu a eluce vzorku z gelu

Vybrané fragmenty byly nalezeny na gelu a pomocí skalpelu vyřezány a umístěny do mikrokumavek vhodných do homogenizéru FastPrep (ThermoSavant), ve kterých bylo 200 μ l HPLC vody. V homogenizéru byly části gelu rozmělněny pomocí přidáných drcených granátů, při rychlosti homogenizace zadané na č. 6 po dobu 40 sec. Tento postup byl opakován 2 \times . Tímto způsobem došlo k vymytí požadované DNA z gelu do vodné fáze. Vzorky byly dále odstředěny při 10 000 g po dobu 3 minut. Supernatant byl následně převeden do 0,5 ml mikrokumavek. Takto připravený vzorek se použil jako templát pro re-amplifikaci a v případě potřeby byl skladován při - 20 °C.

4.2.8.3 Re-amplifikace vzorku

- Pro re-amplifikaci byly využity primery ze selektivní amplifikace.
- Mse primer (5' – GATGAGTCCTGAGTAANN – 3', kde NN jsou tyto dvojkombinace: AG, AC, GG, CC, CG, CT, GC) bez fluorescenční barvy.
- Apo preamplifikační primer (5' – CTCGTAGACTGCGTACCAATT – 3').
- Složení směsi pro PCR amplifikaci bylo následovné:

3	μ l	roztoku amplikonu (templátové DNA)
0,5	μ l	PrimerApo-Preamp (100 ng $\cdot\mu$ l ⁻¹ ; VBC – Biotech)
0,5	μ l	PrimerMse-SA + NN (50 ng $\cdot\mu$ l ⁻¹ ; VBC – Biotech)
2,5	μ l	PCR buffer (10 \times) (Fynzymes)
0,25	μ l	dNTPs (25mM) (Promega)
0,5	μ l	Taq-Pol (Dynazyme II DNA Polymerase; 2U $\cdot\mu$ l ⁻¹ ; Fynzymes)
17,75	μ l	HPLC vody

- Výsledná směs o objemu 25 μl ve 200 μl mikrozkušavkách byla umístěna do termocykleru (Biometra) a byl spuštěn re-amplifikační program:

počáteční denaturace	94 °C	120 s
cyklování 35x		
denaturace	94 °C	45 s
hybridizace	52 °C	45 s
prodlužování	72 °C	45 s
finální prodlužování	72 °C	5 min

4.2.8.4 Čištění vzorků

Po re-amplifikaci následovalo odstranění primerů, nukleotidů, polymerázy a dalších zbytkových solí ze vzorku pomocí MinElute PCR Purification Kitu (Qiagen), přičemž bylo postupováno dle návodu výrobce. Neodstraněné primery a další složky PCR mixu by totiž mohly inhibovat následnou sekvenační reakci.

4.2.8.5 Měření koncentrace získané DNA a její ředění

Následné měření koncentrace re-amplifikované a přečištěné DNA bylo prováděno na přístroji ModulusTM Single Tube Fluorometer 9200-000 od firmy TURNER BIOSYSTEMS. Pro měření koncentrace byl použit 1 μl vzorku ředěný 50 \times . Po zjištění koncentrace DNA a jejím přepočítání na $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ bylo provedeno ředění vzorku DNA pro sekvenační reakci. Vzhledem k používanému reakčnímu objemu 20 μl byla používána koncentrace DNA templátu taková, aby dosahovala 10 ng na 100 párů bází sekvenovaného produktu (tab. 10, přílohy str. 16-21).

4.2.8.6 Sekvenační reakce

- Sekvenační reakce byla prováděna dva až čtyřikrát z jednoho vyřezaného fragmentu.

- Byla prováděna pomocí ABI PRISM Big Dyeterminator v 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kitu (Life Technologies) a s příslušným primery odpovídajícím adaptorům přilehlým k rozeznávací sekvenci *Apo I* a *Mse I*.
- Konkrétně byl pro *Apo I* použit primer o délce a sekvenci 12 bp (5' – GACTGCGTACCA – 3' při teplotách hybridizace 22 °C nebo 30 °C).
- Pro *MseI* přilehlá místa byly použity primery o délce 13 bp (5' – GATGAGTCCTGAG – 3'; hybridizace primeru při 18 °C) a 16 bp (5' – GATGAGTCCTGAGTAA – 3'; nasedání primeru při 22 °C).
- Nejprve byla provedena sekvenační reakce s primery *Apo* 12 bp a *Mse* 16 bp (obě při teplotě nasedání primeru 22 °C).
- Pokud nebyly tyto dvě sekvenační reakce po vyhodnocení výsledků z genetického analyzátoru úspěšné, byly provedeny další 2 sekvenační reakce – *Apo* 12 bp (nasedání primeru při 30 °C) a *Mse* 13 bp (nasedání primeru při 18 °C).
- Reakční směs:

13,6	μl	ředěného templátu (viz tab. 10, přílohy str. 16-21)
2	μl	Ready Reaction Cycle Sequencing mix
4	μl	„Sequencing buffer“
0,4	μl	příslušného primeru (10 μM)

- Výsledná směs o objemu 20 μl ve 200 μl mikrozkuvkách byla umístěna do termocykleru (Biometra) a byl spuštěn sekvenační program:

počáteční denaturace	96 °C	60 s
cyklování 30x		
denaturace	96 °C	20 s
hybridizace	18, 22, 30 °C	45 s (viz výše)
prodlužování	60 °C	4 min

4.2.8.7 Čištění vzorku a jeho příprava k analýze

Všechny vzorky po sekvenační reakci byly jednotlivě přečištěny od zbytků Big Dye chemie pomocí Big Dye Xterminator Purification Kit (Life Technologies). 15 μ l přečištěného vzorku bylo převedeno do 0,5 ml analyzačních mikrozkuvek.

Protokol:

- Po skončení „Cycle sequencing“ reakce byly vzorky odstředěny po dobu 1 minuty (1000 g).
- Po odstředění byl vzorek převeden do 1,5 ml mikrozkuvky a byl k němu přidán roztok SAM obsažený v kitu a to v objemu 90 μ l (v případě, že se stane, že roztok SAM obsahuje sraženiny, je nutné je před použitím rozpustit při 37 °C; před vlastním použitím je pak nutné nechat roztok vychladnout na pokojovou teplotu).
- Xterminátor byl před použitím homogenizován na minitřepače po dobu 10 sec.
- Tuto homogenizaci je nutné opakovat cca po každém 5. vzorku, záleží na rychlosti pipetování, pevné částice v roztoku nesmí sedimentovat, roztok při použití musí být homogenní.
- Do vzorku bylo přidáno 20 μ l roztoku Xterminátoru špičkou s ustřiženým koncem (roztok je i po homogenizaci hustý).
- V případě většího počtu vzorků pro čištění je vhodné připravit směs roztoku SAM a Xterminátor v příslušném poměru, tato směs se lépe pipetuje a je možné použít špičky bez ustřiženého konce.
- Tento mix je ovšem také potřeba stále třepat a přidávat do jednotlivých vzorků homogenizovanou směs.
- Po přidání obou roztoků do vzorku bylo víčko mikrozkuvky zabezpečeno parafilmem a vzorek byl třepán v horizontální poloze po dobu 30 minut při rychlosti 1800 rpm.
- Po ukončení třepání byl vzorek odstředěn po dobu 2 minut při 1000 g.
- 15 μ l supernatantu bylo přímo přepipetováno do 0,5 ml mikrozkuvky vhodné pro genetický analyzátor ABI PRISM 310.

- Takto připravený vzorek byl bez dalších kroků přímo analyzován na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310.

4.2.8.8 Analýza vzorku na genetickém analyzátoru ABI-PRISM 310

- Následně byly vzorky analyzovány na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310 za následných podmínek:

filtr E (Filter Set E; Applied Biosystems)

POP-6™ Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems)

- Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru „Sequencing analysis“ (Applied Biosystems).

4.2.9 Zpracování získaných sekvencí

Z několika získaných sekvencí pro jeden vzorek byl utvořen konsenzuální řetězec pomocí software „Geneious“, popřípadě „CLC Sequence Viewer 6“. Tento konsenzuální řetězec byl následně srovnán s již popsány nukleotidovými sekvencemi v elektronické databázi nukleotidových sekvencí NCBI („National Center for Biotechnology Information“; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a elektronické databázi TIGR („TIGR Plant Transcript Assemblies“; <http://plantta.jcvi.org/index.shtml>).

Informace o úspěšně sekvenovaných vzorcích, pro které byly získány informace z databází, byly zpracovány do tabulky číslo 11 a jsou uvedeny v přílohách.

4.2.10 Real-Time PCR

Z výsledných sekvenovaných fragmentů a informací obdržených z elektronických databází bylo vybráno 7 fragmentů genů (tab. 12, přílohy str. 43-44) s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů meruněk z endogenní dormance. Pro tyto fragmenty byly navrženy specifické primery a vyzkoušena metoda Real-Time PCR na vybraných vzorcích se záměrem ověření vývoje exprese pozorované metodou cDNA-AFLP.

4.2.10.1 Návrh primerových párů pro vybrané fragmenty

Primery byly navrhovány v programu CLC „Main Work bench 5.0“ (CLC Bio, Aarhus, Dánsko; tab. 13, přílohy str. 45). Při designu primerů byly dodržovány základní pravidla pro navrhování primerů: délka primeru 18-25 nukleotidů, obsah dusíkatých bází G/C – 40 až 60 %, rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry, rovnoměrná distribuce nukleotidů – neměly by se vyskytovat za sebou více než 4 stejné nukleotidy, teplota T_m mezi 50 °C až 70 °C, obdobná T_m u obou primerů z primerového páru ± 5 °C, vysoká specifčnost primerů k detekované oblasti. V primeru se nesmí nacházet nesespecifická vazebná místa, která by snižovala specifčnost primeru. Dále se v primeru nesmí vyskytovat komplementární místa v rámci primeru, která by způsobovala tvorbu komplementárních vazeb v rámci primeru (vlásenek, vlastních dimerů), nebo v rámci primerového páru (vznik dimerů mezi přímým primerem a zpětným primerem).

4.2.10.2 Příprava RNA pro syntézu ss cDNA

Ošetření RNA enzymem DNázou k odstranění genomické DNA

K 8 μ l celkové RNA izolované z květních pupenů meruněk byl přidán 1 μ l enzymu „RQ1RNase-Free DNase“ (Promega) a 1 μ l příslušného pufru (Promega). Směs byla inkubována v 200 μ l mikrozkušavkách v termocykleru (Biometra) při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Po inkubaci byl do každého vzorku ihned přidán 1 μ l roztoku „Stop solution“ (Promega) a směs byla inkubována v termocykleru při 65 °C po dobu 10 minut.

Měření koncentrace RNA

Koncentrace RNA (ředění 200 \times) byla změřena fluorometricky. Postup měření byl popsán v kapitole 4.2.5.3.2. Následně byla koncentrace RNA u všech vzorků sjednocena na 100 ng $\cdot\mu$ l⁻¹ (tab. 14, přílohy str. 45-46).

4.2.10.3 Příprava ss cDNA

- Nejprve proběhlo připravení vlákna RNA pro činnost reverzní transkriptázy, kde byla připravena směs:

2	μl	RNA (100 ng·μl ⁻¹)
0,5	μl	primer („random primer“ – náhodný primer – p(dN) ₆ ; Roche)
12	μl	DEPC voda

- Přípravená směs byla inkubována při 95 °C po dobu 5 minut v termocykleru (Biometra).
- Po inkubaci proběhlo okamžité zchlazení na ledu ve vymražovacím stojánku.
- Při vlastní reverzní transkripci bylo do každé mikrokumavky přidáno 10 μl reakční směsi:

3,25	μl	DEPC voda
5	μl	RT pufr 5× (pufr k reverzní transkriptáze, Fermentas)
1,25	μl	dNTP (10 mM)
0,5	μl	reverzní transkriptáza MMLV (200 U·μl ⁻¹ , Fermentas)

- Reverzní transkripce proběhla při 42 °C po dobu 60 minut v termocykleru (Biometra).
- Tato ss cDNA byla připravena ve stejnou dobu jako ds cDNA pro cDNA-AFLP analýzu.
- Jednovláknová komplementární DNA (ss cDNA) byla zamražena v - 20 °C a skladována do doby použití.
- Následně byla použita jako templát do specifické PCR reakce pro detekci sedmi vybraných fragmentů genů s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů meruněk z endogenní dormance.

4.2.10.4 Ověření funkčnosti navržených specifických PCR reakcí

Funkčnost nově navržených systémů pro Real-Time PCR byla nejdříve ověřena klasickou PCR. Ověřování probíhalo na vzorcích odvozených z odrůdy, T, u které byl

vybraný fragment nalezen. U každé specifické PCR bylo vyzkoušeno několik teplot pro hybridizaci primerů. Jako vnitřní pozitivní kontrola byl vyzkoušen gen AT5G12240 (Jiménez *et al.*, 2010a; viz obr. 14, přílohy str. 114).

Dále byla na námi testovaných vzorcích vyzkoušena amplifikace genů spojovaných s dormantním obdobím u druhu *Prunus persica* (L.) – DAM3, DAM5, DAM6 (Jiménez *et al.*, 2010a) a gen používaný jako vnitřní pozitivní kontrola u révy vinné – gen enzymu malátdehydrogenáza – MDH (Nassuth *et al.*, 2000; obr. 15 a 16, přílohy str. 115 a 116). Z důvodu malých očekávaných produktů amplifikace, které jsou vhodné pro Real-Time PCR, byla elektroforetická separace provedena na 2% agarózovém gelu za použití MetaPhor® Agarose (Lonza Rockland, USA).

AT5G12240 (NCBI – Gene bank accession: DY652828)

primer přímý: 5' – AGTCAGCCCAGTACGAAGAGG – 3'

primer zpětný: 5' – TGCTTCTGCTTCACCCACCT – 3'

DAM3 (NCBI – Gene bank accession: DQ863256)

primer přímý: 5' – ACCAGCTAAGGCAGACGATGA – 3'

primer zpětný: 5' – GAGGGAGAGAGACTGAGAGCA – 3'

DAM5 (NCBI – Gene bank accession: DQ863251)

primer přímý: 5' – GTCTCTCAAACCTGGGGCGTTA – 3'

primer zpětný: 5' – GATACAACACACAGTCACCCTCCC – 3'

DAM6 (NCBI – Gene bank accession: DQ863252)

primer přímý: 5' – CCAACAACCAGTTAAGGCAGAAGA – 3'

primer zpětný: 5' – GGAAGCCCCAGTTTGAGAGA – 3'

MDH (NCBI – Gene bank accession: NM_001281166.1)

primer přímý: 5' – GCATCTGTGGTTCTTGCAGG – 3'

primer zpětný: 5' – CCTTTGAGTCCACAAGCCAA – 3'

- PCR master mix byl o objemu celkem 23 μ l:

18,75 μ l	voda HPLC
2,5 μ l	pufir 10 \times (Finnzyme)
0,5 μ l	dNTP (10 mM; Inviek)
0,5 μ l	primer 1 (10 μ M; VBC – Biotech)
0,5 μ l	primer 2 (10 μ M; VBC – Biotech)
<u>0,25 μl</u>	<u>Polymeráza (2 U$\cdot$$\mu$l⁻¹; Finnzyme)</u>
2 μ l	templátu (ss cDNA)

- Program:

počáteční denaturace	95 °C	3min
cyklování 40x		
denaturace	95 °C	30 s
hybridizace	X °C	30 s
prodlužování	72 °C	45 s
finální prodlužování	72 °C	10 min

X – teplota hybridizace:

fragment 13 – 33 °C, 35 °C, 39 °C, 41 °C, 43 °C

fragment 14 – 35 °C, 38 °C, 39 °C, 41 °C

fragment 44 – 39 °C, 41 °C, 43 °C

fragment 78 – 31 °C, 33 °C, 35 °C, 39 °C

fragment 105 – 39 °C, 41 °C, 43 °C

fragment 111 – 39 °C, 41 °C, 43 °C

fragment 133 – 39 °C, 41 °C, 43 °C

vnitřní kontrola – AT5G12240 – 60 °C

DAM3, DAM5, DAM6 – 60 °C

- Program pro MDH:

počáteční denaturace	94 °C	5 min
cyklování 40x		
denaturace	94 °C	30 s
hybridizace	54 °C	45 s
prodlužování	72 °C	60 s
finální prodlužování	72 °C	5 min

4.2.10.5 Real-Time PCR reakce

Metoda Real-Time PCR byla vyzkoušena na fragmentu číslo 111, vzorcích 4/5, 4/6 a 4/7. Byla vyzkoušena varianta s nespecifickým barvivem SYBR Green (Life Technologies; obr. 24, přílohy str. 124). U této analýzy byla provedena i analýza křivky tání (obr. 25, přílohy str. 125). Dále byla vyzkoušena varianta s kitem Fast SYBR Green (Applied Biosystems). Každý vzorek byl namíchán v triplicátu a ve třech variantách: neředěný, ředěný HPLC vodou 1:3 a ředěný HPLC vodou 1:2. Reakce proběhla v rotačním termocykleru Rotor-Gene 3000 (Corbett).

- PCR master mix se SYBR Green (Life Technologies), celkem 23 μl :

18,125	μl	voda HPLC
2,5	μl	pufr 10 \times (Finnzyme)
0,5	μl	dNTP (10 mM; Inviek)
0,5	μl	primer 1 (10 μM ; VBC –Biotech)
0,5	μl	primer 2 (10 μM ; VBC – Biotech)
0,25	μl	Polymeráza (2 U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$; Finnzyme)
<u>0,625</u>	<u>μl</u>	<u>SYBRGreen (Life Technologies)</u>
2	μl	templátu (ss cDNA)

– neředěný/ ředěný 1:3/ ředěný 1:2

- Program:

počáteční denaturace	95 °C	3 min
cyklování 40x		
denaturace	95 °C	30 s
hybridizace	41 °C	30 s
prodlužování	72 °C	45 s

- PCR master mix s kitem Fast SYBR Green (Applied Biosystems), celkem 17 μl :

10	μl	Fast SYBR Green Master Mix (2 \times)
6	μl	HPLC vody
0,5	μl	primer 1 (10 μM ; VBC – Biotech)
<u>0,5</u>	<u>μl</u>	<u>primer 2 (10 μM; VBC – Biotech)</u>
3	μl	templátu (do 20 ng na reakci)

- Program:

počáteční denaturace	95 °C	20 sec
cyklování 40x		
denaturace	95 °C	3 s
hybridizace	41 °C	30 s
prodlužování	60 °C	30 s

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení výstupu z dormance květních pupenů meruněk různými metodami

5.1.1 Metoda počtu vykvetlých květních pupenů

V tabulce č. 15 (přílohy str. 47) jsou zapsány výsledky pozorování a počítání vykvetlých květních pupenů meruněk v různých termínech. V této tabulce je v procentech zapsán celý průběh nakvétání květních pupenů v termínech odběrů daných vzorků a termín výstupu z dormance je zvýrazněn červeně. První termín s počtem vykvetlých květních pupenů nad 50 % se stanovuje jako termín výstupu z dormance. V sezóně 2007/2008 byly stanoveny termíny výstupu pro jednotlivé odrůdy takto: 'Sundrop' – 13. 12. 2007; SEO – 17. 1. 2008; 'Vestar' – 27. 12. 2007; 'Betinka' – 10. 1. 2008. V sezóně 2008/2009 byly stanoveny termíny výstupu pro jednotlivé odrůdy takto: 'Sundrop' – 5. 1. 2009; SEO – 2. 2. 2009; 'Vestar' – 19. 1. 2009; 'Betinka' – 26. 1. 2009. Sledované odrůdy vystupují z endogenní dormance ve stejném pořadí v obou sledovaných letech.

Tabulka je také doplněna o sumy hodin při teplotách mezi 0-7 °C. Tyto teploty a kumulace hodin chladového působení při těchto teplotách mají vliv na výstup květních pupenů meruněk z endogenní dormance (Crabbe et Barnola, 1996; Yamane *et al.*, 2006). Procenta počtu vykvetlých květních pupenů a sumy teplot 0-7 °C jsou zaneseny v grafu č. 1 (přílohy str. 77) pro sezónu odběrů vzorků 2007/2008 a v grafu č. 2 (přílohy str. 78) pro sezónu odběru vzorků 2008/2009. Z grafů je patrné, že květní pupeny meruněk nerozkvetou dřív, než je dosaženo časově nezbytně nutné, v literatuře uváděné (Crabbe et Barnola, 1996; Yamane *et al.*, 2006), minimální (900 hodin) sumy nízkých teplot – opět ve stejném odrůdovém pořadí ve dvouletém opakování ('Sundrop' cca 1048, 'Vestar' cca 1060, 'Betinka' cca 1100 a SEO cca 1230).

5.1.2 Metoda stanovení produkce etylénu, CO₂ a etanu

Výsledky stanovení produkce etylénu, CO₂ a etanu byly zpracovány do tabulky č. 16 (přílohy str. 47-51) pro sezónu 2007/2008 a do tabulky č. 17 (přílohy str. 51-55) pro sezónu 2008/2009. V obou tabulkách se nacházejí naměřené hodnoty etylénu, etanu a CO₂ po 24 hod. od uzavření odměrných válců pro jednotlivé zkoumané odrůdy s vypočítanou střední chybou pro jednotlivé hodnoty. Dále se v tabulce nachází část s hodnotami etylénu

naměřenými po 7 dnech od odběru vzorků. Odměrné válce byly, před tímto druhým měřením, rovněž uzavřeny na 24 hod. Pro tyto hodnoty byly v tabulce rovněž vypočítány střední chyby. Ve zbývající části této tabulky jsou uvedeny počty vykvetlých květních pupenů a narašených listových pupenů v jednotlivých odměrných válkách po 7 dnech. Výše uvedená data jsou dále zpracována do grafů (grafy č. 3 až 10, přílohy str. 79-86 a grafy č. 13 až 20, přílohy str. 89-96). Tyto grafy jsou doplněny o průběhy teplot (maximální, minimální a průměrné teploty) v období před odběrem vzorků (graf č. 12, přílohy str. 88 a 22, přílohy str. 98) a v období odběru vzorků (graf č. 11, přílohy str. 87 a 21, přílohy str. 97).

V grafu č. 3 (přílohy str. 79) jsou uvedeny výsledky měření etanu v sezóně 2007/2008 u všech čtyř zkoumaných odrůd. Hodnoty naměřeného etanu u jednotlivých odrůd v jednotlivých termínech rostou a klesají bez zjevné korelace se stanoveným termínem výstupu jednotlivých odrůd z dormance. U odrůdy 'Sundrop' dochází k pokračování nárůstu obsahu etanu v měřené atmosféře odměrného válce mezi termíny č. 1 a 3, přičemž jako termín výstupu květních pupenů z endogenní dormance byl stanoven termín č. 2. U odrůdy 'Vestar' je termínem výstupu z dormance termín č. 4, kdy oproti termínu č. 3 dochází k poklesu naměřeného obsahu etanu ve zkoumané atmosféře. Následně v termínu č. 5 dochází ke stagnaci naměřených hodnot, což dále pokračuje mírným nárůstem naměřené hodnoty v termínu č. 6. U odrůdy 'Betinka' je termínem výstupu z dormance termín č. 6, kdy dochází od termínu č. 5 až k termínu č. 7 k poklesu naměřených hodnot etanu. U odrůdy SEO byl stanoven výstup z dormance na termín č. 7, kdy na rozdíl od termínů č. 6 a 8 je hodnota naměřená pro tento termín nižší (dochází ke zjevnému poklesu), ale nejedná se o významný pokles dosahující minima naměřených hodnot za celé sledované období.

V grafu č. 4 (přílohy str. 80) je znázorněn průběh měření etylénu v sezóně 2007/2008 u všech čtyř zkoumaných odrůd. U odrůdy 'Sundrop' je možné pozorovat pokles hodnot od termínu č. 2 označeného za výstup z dormance, od termínu č. 5 ovšem dochází k opětovným nárůstům a poklesům hodnot. U odrůdy 'Vestar' je za termín výstupu z dormance označen 4. termín. Průběh naměřených hodnot etylénu, má klesající tendenci od 3. termínu až do termínu č. 6. Následně ovšem dochází k opětovnému nárůstu hodnot a poklesu hodnot. U odrůdy 'Betinka' naměřené hodnoty etylénu v jednotlivých termínech sledování opakovaně stoupají a klesají. V termínu č. 6 stanoveném pro tuto odrůdu za termín výstupu z dormance došlo k poklesu, který započal již v termínu č. 5 a

pokračuje až k termínu č. 7. U odrůdy SEO došlo v termínu č. 6 k razantnímu zvýšení produkce etylénu pletivy. U tohoto termínu jde o jeden týden před stanoveným výstupem z dormance u této odrůdy. Následně ovšem došlo k opětovným nárůstům a poklesům naměřených hodnot etylénu.

V grafu č. 5 (přílohy str. 81) je znázorněn průběh měření CO₂ v sezóně 2007/2008 u všech čtyř zkoumaných odrůd. Průběh naměřených hodnot, zaznamenaných v grafu ve vztahu k termínu výstupu z endogenní dormance pro odrůdu 'Sundrop' (výstup z dormance – 2. termín), je takový, že od 2. termínu začínají hodnoty klesat, ale následně opět opakovaně rostou a klesají. U odrůdy 'Vestar' je výstupovým termínem termín č. 4, přičemž od termínu č. 3 k termínu č. 5 dochází k poklesu hodnot, ale následně dochází opět k významnému nárůstu hodnot. Průběh křivky pro odrůdu 'Betinka' je okolo výstupového termínu č. 6, tzn. v termínech č. 5-7 klesající, ale následně znovu významně rostoucí. Průběh křivky pro odrůdu SEO okolo jejího výstupového termínu č. 7, tzn. v termínech č. 6-8 pozvolna rostoucí a následně k termínu č. 9 významně rostoucí.

V grafu č. 6 (přílohy str. 82) je znázorněn průběh hodnot produkce etanu, etylénu i CO₂ u odrůdy 'Sundrop' v sezóně 2007/2008. V grafu je možné vidět, že produkce etanu je nižší než produkce etylénu. Dále je patrné, že jednotlivé poklesy či nárůsty hodnot mají podobný průběh u všech tří měřených látek, a že k nejvyššímu nárůstu hodnot dochází ve 12. termínu.

V grafu č. 7 (přílohy str. 83) je znázorněn průběh hodnot produkce etanu, etylénu i CO₂ u odrůdy SEO v sezóně 2007/2008. Průběh křivky etanu je bez velkých výkyvů a naměřené hodnoty etanu jsou nižší než naměřené hodnoty etylénu. Hodnoty etylénu dosahují svého maxima v 6. termínu a hodnoty CO₂ v 9. termínu. Všechny křivky vykazují střídavý nárůst a pokles hodnot v průběhu sledovaných termínů.

V grafu č. 8 (přílohy str. 84) je znázorněn průběh hodnot produkce etanu, etylénu i CO₂ u odrůdy 'Vestar' v sezóně 2007/2008. V tomto grafu je možné vidět, že všechny tři křivky mají obdobný průběh, k prvnímu vyššímu nárůstu hodnot dochází v termínu č. 3, následně dochází k poklesu hodnot a k dalšímu nárůstu dochází v termínu č. 9. Od termínu č. 9 až do termínu č. 12 je možné pozorovat zvýšené hodnoty u všech tří měřených látek.

V grafu č. 9 (přílohy str. 85) je znázorněn průběh hodnot produkce etanu, etylénu i CO₂ u odrůdy 'Betinka' v sezóně 2007/2008. U tohoto grafu mají všechny tři křivky obdobný průběh, nejprve dochází ke zvýšení hodnot, pak ke snížení v termínu č. 4 u všech

látek současně. K dalším společným zvýšením hodnot všech tří látek dochází v termínech č. 5, 9, a 12, mezi těmito termíny dochází ke snížení hodnot.

V grafu č. 10 (přílohy str. 86) je znázorněno množství naměřeného etylénu v odebraných vzorcích v jednotlivých termínech odběrů v sezóně 2007/2008. Hodnoty etylénu byly v tomto případě naměřeny po sedmi dnech od umístění výhonů do odměrných válců a po opětovném uzavření na 24 hod. Graf je doplněn o počty vykvetlých květních pupenů a narašených listových pupenů pro jednotlivé odrůdy v jednotlivých termínech odběrů výhonů. Vykvetlé pupeny a narašené listové pupeny byly hodnoceny po sedmi dnech od umístění výhonů do odměrných válců. Z grafu je patrné, že od 1. do 6. termínu bylo množství etylénu i počty vykvetlých pupenů a narašených pupenů u všech odrůd nízké a od 6. termínu začalo vše, jak naměřené hodnoty etylénu, tak i množství jednotlivých pupenů, narůstat.

V grafu č. 11 (přílohy str. 87) je znázorněn průběh maximálních, minimálních a průměrných teplot v období odběru vzorků v sezóně 2007/2008. Jednotlivá data v grafu odpovídají termínům odběru vzorků, tzn. 6. 12. 2007 je termín č. 1. a 28. 2. 2008 je termín č. 13., tedy poslední. V grafu je možné pozorovat pokles průměrných teplot pod 0 °C ve 3., 4. a 5. termínu a těsně před a po 11. termínu. Naopak k nárůstu teplot nad 7 °C dochází mezi 7. a 8. termínem.

V grafu č. 12 (přílohy str. 88) je znázorněn průběh maximálních, minimálních a průměrných teplot v říjnu a listopadu roku 2007, což je období před odběrem vzorků. Průběh teplot v tomto období má rovněž vliv na průběh endogenní dormance květních pupenů merunek (Procházka *et al.*, 2003).

V grafu č. 13 (přílohy str. 89) je znázorněn průběh měření etanu v sezóně 2008/2009 u všech čtyř zkoumaných odrůd. U odrůdy 'Sundrop' byl stanoven termín výstupu z dormance v termínu č. 6, hodnoty naměřeného etanu okolo termínu výstupu z dormance postupně mírně stoupají od termínu č. 4 po termín č. 7. K velkému nárůstu hodnoty naměřeného etanu u této odrůdy dochází v termínu č. 10, kdy hodnota dosahuje 14 nl·l-1. V tomto případě je nutné zvážit i chybu v měření, jelikož u ostatních odrůd nepřesahují maximální naměřené hodnoty etanu 6 nl·l-1, a to ani v sezóně 2007/2008 u žádné ze 4 odrůd. U odrůdy 'Vestar' byl stanoven termín výstupu z dormance na 8. termín. V 8. termínu dochází k nárůstu hodnoty etanu oproti termínům č. 7 a 9. U odrůdy 'Betinka' byl stanoven termín výstupu z endogenní dormance na 9. termín odběru vzorků. U této

odrůdy dochází ke kontinuálnímu nárůstu hodnot naměřeného etanu od 4. do 10. termínu. U odrůdy SEO byl stanoven termín výstupu z dormance na 10. termín. Průběh hodnot naměřeného etanu má od 9. do 11. termínu klesající tendenci.

V grafu č. 14 (přílohy str. 90) je znázorněn průběh měření etylénu v sezóně 2008/2009 u všech čtyř zkoumaných odrůd. U odrůdy 'Sundrop' (termín výstupu z dormance č. 6) dochází okolo termínu výstupu z dormance k nárůstu hodnot etylénu od 5. do 7. termínu. U odrůdy 'Vestar' (termín výstupu z dormance č. 8) dochází od termínu č. 7 ke kontinuálnímu nárůstu hodnot naměřeného etylénu až do konce období odběru vzorků. U odrůdy 'Betinka' (termín výstupu z dormance č. 9) dochází oproti termínu č. 8 k mírnému poklesu naměřené hodnoty u termínu č. 9 a následně k prudkému vzestupu naměřené hodnoty v termínu č. 10. U odrůdy SEO (termín výstupu z dormance – termín č. 10) dochází ke kontinuálnímu poklesu naměřených hodnot od 8. termínu až po 11. termín.

V grafu č. 15 (přílohy str. 91) je znázorněn průběh měření CO₂ v sezóně 2008/2009 u všech čtyř zkoumaných odrůd. U odrůdy 'Sundrop' (termín výstupu z dormance – termín č. 6) dochází od 5. do 7. termínu k nárůstu naměřených hodnot CO₂. U odrůdy 'Vestar' (termín výstupu z dormance č. 8) dochází oproti termínu č. 7 k mírnému poklesu naměřené hodnoty u termínu č. 8, ale následně k opětovnému zvýšení naměřené hodnoty množství vyprodukovaného CO₂ vzorkem u termínu č. 9. U odrůdy 'Betinka' (termín výstupu z dormance – termín č. 9) dochází k nárůstu hodnot od 8. do 10. termínu. U odrůdy SEO (termín výstupu z dormance – termín č. 10) dochází k nárůstu naměřené hodnoty oproti termínu č. 9 a k následnému prudkému poklesu naměřené hodnoty v termínu č. 11.

V grafu č. 16 (přílohy str. 92) je znázorněn průběh hodnot produkce etanu, etylénu i CO₂ u odrůdy 'Sundrop' v sezóně 2008/2009. U odrůdy 'Sundrop' je stanoven termín výstupu květních pupenů z dormance na 6. termín. V tomto termínu nedochází ani u jedné měřené látky k významné změně průběhu naměřených hodnot. Etan dosahuje své maximální hodnoty v 10. termínu, což, jak již bylo komentováno, nasvědčuje spíše na chybu v měření. CO₂ dosahuje maximálních zvýšení v termínech č. 7 a č. 10 a etylén v termínu č. 12.

V grafu č. 17 (přílohy str. 93) je znázorněn průběh hodnot produkce etanu, etylénu i CO₂ u odrůdy SEO v sezóně 2008/2009. U této odrůdy byl stanoven jako termín výstupu z dormance termín č. 10. V tomto termínu nedochází u etanu a etylénu k významným změnám v průběhu hodnot, dochází u nich k poklesu hodnot od předešlého k následnému

termínu. U CO₂ je naměřená hodnota v 10. termínu na vrcholu nárůstu od 5. termínu. V 11. termínu dochází opět k prudkému poklesu naměřené hodnoty.

V grafu č. 18 (přílohy str. 94) je znázorněn průběh hodnot produkce etanu, etylénu i CO₂ u odrůdy 'Vestar' v sezóně 2008/2009. U této odrůdy byl stanoven termín výstupu z dormance na 8. termín odběru vzorků. U tohoto termínu nedochází u sledovaných látek k významným změnám v naměřených hodnotách. U tohoto grafu je zajímavé, že průběh naměřených hodnot etylénu a CO₂ má obdobný charakter.

V grafu č. 19 (přílohy str. 95) je znázorněn průběh hodnot produkce etanu, etylénu i CO₂ u odrůdy 'Betinka' v sezóně 2008/2009. U této odrůdy byl stanoven termín výstupu z dormance na 9. termín odběru vzorků. U tohoto termínu nedochází u sledovaných látek k významným změnám v naměřených hodnotách. Naměřené hodnoty etylénu a CO₂ mají opět obdobný průběh a od 9. termínu mají stejný průběh i s hodnotami etanu.

V grafu č. 20 (přílohy str. 96) je znázorněno množství naměřeného etylénu v odebraných vzorcích v jednotlivých termínech odběrů v sezóně 2008/2009. Hodnoty etylénu byly v tomto případě naměřeny po sedmi dnech od umístění výhonů do odměrných válců a po opětovném uzavření před samotným měřením na 24 hod. Graf je doplněn o počty vykvetlých květních pupenů a narašených listových pupenů pro jednotlivé odrůdy v jednotlivých termínech odběrů výhonů. Vykvetlé pupeny a narašené listové pupeny byly hodnoceny po sedmi dnech od umístění výhonů do odměrných válců. Z grafu je patrné, že od 1. do 5. termínu bylo množství etylénu i počty vykvetlých pupenů a narašených pupenů u všech odrůd nízké. Od 6. termínu se začalo zvyšovat u některých odrůd množství vyprodukovaného etylénu výhony a také množství vykvetlých a narašených pupenů.

V grafu č. 21 (přílohy str. 97) je znázorněn průběh maximálních, minimálních a průměrných teplot v období odběru vzorků v sezóně 2008/2009. Jednotlivá data v grafu odpovídají termínům odběru vzorků, tzn. 1. 12. 2008 je 1. termín a 16. 2. 2009 je 12. termín, tedy poslední. V grafu je možné pozorovat pokles průměrných teplot pod 0 °C v 5., 6., 7., 8. a 12. termínu a těsně před 10. termínem. Naopak k nárůstu teplot nad 7 °C dochází v termínu č. 4 a před 11. termínem.

V grafu č. 22 (přílohy str. 98) je znázorněn průběh maximálních, minimálních a průměrných teplot v říjnu a listopadu roku 2008, což je období před odběrem vzorků. Průběh teplot v tomto období má rovněž vliv na průběh endogenní dormance květních pupenů meruněk (Procházka *et al.*, 2003).

5.1.3 Metoda stanovení hladiny kyseliny abscisové (ABA)

K analýze množství obsahu kyseliny abscisové ve vzorcích byly, vzhledem k finanční náročnosti analýz, použity pouze vzorky květních pupenů z vybraných termínů odběrů vzorků. Tyto testované termíny byly vybrány okolo termínu, který byl stanoven za termín výstupu pupenů z endogenní dormance u jednotlivých odrůd.

V grafu č. 23 (přílohy str. 99) je možné vidět průběh naměřených hodnot kyseliny abscisové u vzorků testovaných termínů v sezóně 2007/2008. Křivky pro odrůdy SEO, 'Vestar' a 'Betinka' mají klesající charakter. Křivka pro odrůdu 'Sundrop' má klesající charakter v termínu č. 3, ale následně jsou patrné opět rostoucí hodnoty. Všechny odrůdy vykazují od stanoveného termínu výstupu z dormance ('Sundrop' – 2. termín, SEO – 7. termín, 'Vestar' – 4. termín, 'Betinka' – 6. termín) mírný pokles naměřených hodnot, což ale vykazují i hodnoty v jiných termínech odběrů vzorků.

V grafu č. 24 (přílohy str. 100) je možné vidět průběh naměřených hodnot kyseliny abscisové u vzorků z testovaných termínů v sezóně 2008/2009. Křivky odrůd SEO a 'Betinka' vykazují od stanoveného termínu výstupu z dormance (SEO – 10. termín, 'Betinka' – 9. termín) klesající tendenci až do konce sledovaného období. U odrůdy 'Vestar' dochází po 8. termínu, stanoveném jako termín výstupu z dormance, k výraznému poklesu hladiny ABA ve vzorku k termínu č. 9. Od termínu č. 9 k termínu č. 10 ovšem došlo k opětovnému nárůstu hodnoty ABA ve zkoumaných pletivech květních pupenů.

5.1.4 Metoda stanovení hmotnosti květních pupenů

V obou sledovaných sezónách byla také hodnocena váha květních pupenů. U žádné odrůdy, ani v jedné z testovaných sezón, ovšem nebyla pozorována výrazná změna v hmotnosti pupenů v termínu stanoveném jako výstup z endogenní dormance nebo v termínech blízkých.

V grafu č. 25 (přílohy str. 101) je možné pozorovat průměrnou váhu květních pupenů ve sledovaném období odběrů vzorků v sezóně 2007/2008. Z grafu je patrné, že do 7. termínu se váha pupenů všech odrůd pohybuje přibližně na stejné hladině, a to okolo 0,01 g. Od 7. termínu začíná průměrná váha u všech odrůd stoupat až do konce sledovaného období, kdy je u všech odrůd nejvyšší (termín č. 13).

V grafu č. 26 (přílohy str. 102) je možné pozorovat průměrnou váhu květních pupenů ve sledovaném období odběrů vzorků v sezóně 2008/2009. Váha pupenů odrůd 'Sundrop', SEO a 'Betinka' se pohybovala okolo 0,01 g, u odrůdy 'Sundrop' v 2. a 6. termínu vzrostla na 0,012 g a od 7. termínu začala stoupat až do konce sledovaného období. U odrůdy SEO začala váha stoupat rovněž od 7. termínu až do konce sledovaného období. Váha květních pupenů odrůdy 'Vestar' se pohybovala okolo 0,007 g a na své maximum stoupla v 11. termínu. Odrůda 'Betinka' rovněž dosáhla své maximální průměrné hmotnosti v 11. termínu.

5.2 Optimalizace syntézy ds cDNA pro následnou cDNA AFLP analýzu

V rámci optimalizace syntézy ds cDNA bylo nutné eliminovat několik kritických kroků, které v předešlé práci (Čechová, 2007) pravděpodobně způsobovaly částečnou degradaci RNA a tím i nepříliš kvalitní výsledky z metody cDNA-AFLP.

Prvním z těchto problémů byl zvolený způsob izolace RNA z pletiv květních pupenů meruněk, který si vyžadoval dlouhý čas přípravy dostatečného množství květních pupenů pro izolaci. V předcházející práci s květními pupeny byla pro izolaci RNA použita metoda založená na extrakci na oxidu křemičitém dle upraveného protokolu Foissac *et al.* (2001). Pro tento protokol izolace RNA i bylo potřeba připravit cca 1 g pletiv. Příprava vzorku a vlastní izolace RNA proto trvala dlouho, což pravděpodobně bylo jednou z příčin částečné degradace izolované RNA (obr. 3, přílohy str. 105). Z tohoto důvodu byl hledán vhodný komerční kit pro izolaci RNA z problematických pletiv, jakými jsou květní pupeny meruněk. Nakonec byl zvolen komerční kit Spectrum™ Plant Total RNA Kit od firmy Sigma, u kterého je doporučováno připravit pro izolaci maximálně 100 mg pletiv. Potřebné množství pletiv pro izolaci RNA je ve srovnání s původním protokolem desetkrát menší a tím pádem i příprava vzorku pro izolaci je mnohem rychlejší, proto pravděpodobně nedochází k degradaci RNA v takovém rozsahu jako u předešlého přístupu izolace RNA (obr. 4, přílohy str. 105).

Dalším optimalizačním krokem pro přípravu ds cDNA byla otázka skladování pletiv před izolací RNA. Jelikož byl v sezóně 2007/2008 plánován odběr poměrně vysokého počtu vzorků (konečný počet odběrů vzorků pro všechny čtyři odrůdy byl 34), bylo otázkou, jak vzorky před vlastní izolací RNA skladovat. K následné analýze metodou cDNA-AFLP měly být totiž z celkové skupiny odběrů vybrány pouze vzorky ze čtyř

termínů pro každou odrůdu (tento byl zvolen hlavně z ekonomických důvodů). Proto byla před vlastním odběrem vzorků vyzkoušena účinnost komerčního přípravku RNAlater®Solution od firmy Ambion®. Přípravek je dle výrobce vhodný ke stabilizaci RNA v odebraných rostlinných pletivech. Tento přípravek byl úspěšně vyzkoušen i na květních pupenech meruněk, kdy RNA izolovaná ze skladovaných pupenů, oproti RNA izolované z čerstvě odebraných dormantních pupenů, nevykazovala po kontrole na agarózovém gelu (obr. 2, přílohy str. 104) žádné kvalitativní rozdíly. Kvalitní izolovaná RNA se projevila u všech 4 vzorků na gelu (2 vzorky RNA ze skladovaných pletiv a 2 vzorky RNA z čerstvých pletiv) dvěma zřetelně viditelnými produkty (28S a 18S – části rRNA).

Dalším optimalizačním krokem byl přepis mRNA na ds cDNA pomocí MINT cDNA synthesis kitu (fa EVROGEN). Tento přepis byl za použití celkové RNA, bez potřeby separace mRNA, což jako krok navíc rovněž ohrožuje kvalitu připravované ds cDNA. V prvním kroku protokolu pro tento přepis došlo k syntéze prvního řetězce cDNA a začlenění tzv. „Plug Oligo“ adaptéru k syntetizované cDNA vycházející z mRNA. Následně došlo k syntéze druhého řetězce cDNA pomocí PCR amplifikace, u které bylo v počátečním testu potřeba vybrat optimální počet PCR cyklů. Na základě srovnání obrázku č. 6 (obrázek dodaný výrobcem jako vzor pro stanovení optimálního počtu PCR cyklů) s obrázkem č. 7 (přílohy str. 107, test optimálního počtu PCR na vlastních vzorcích z květních pupenů meruněk), bylo nakonec zvoleno 21 PCR cyklů jakožto optimální počet PCR cyklů pro syntézu ds cDNA z RNA vyizolované z květních pupenů meruněk. Těchto 21 PCR cyklů bylo použito k amplifikaci všech vzorků přepisovaných na ds cDNA. Výsledek úspěšné amplifikace druhého řetězce cDNA byl ověřen na 1,2% agarózovém gelu (obr. 8, 9a, 9b, přílohy str. 108, 109 a 110).

5.3 Metoda cDNA-AFLP

Po přípravě kvalitní ds cDNA byla provedena vlastní metoda cDNA-AFLP, při níž byly použity restriční enzymy *Mse* I a *Apo* I. Po preamplifikaci byla provedena kontrola výsledku pre-amplifikace na polyakrylamidovém gelu, protože na agarózovém gelu nebyly výsledné směry směsi DNA molekul viditelné. Příklad slabě viditelných signálů (směrů) při kontrole po pre-amplifikaci je uveden na obrázku č. 10 (přílohy str. 111). Po selektivní amplifikaci byly vzorky připraveny k analýze na genetickém analyzátoru, po kterém byly

výsledky vyhodnoceny pomocí softwaru „Gene Scane analysis“. Pomocí výše uvedeného softwaru bylo vytvořeno 63 transkripčních profilů. Transkripční profily byly následně sloučeny tak, aby v prvním řádku byly soustředěny profily všech zkoumaných odrůd v termínu 2 týdny před stanoveným výstupem z endogenní dormance a v druhém řádku profily 1 týden před stanoveným výstupem z endogenní dormance. Do třetího řádku byly přidány profily ze vzorků odebraných v týdnu výstupu z endogenní dormance a ve čtvrtém řádku profily získané 1 týden po výstupu z endogenní dormance. Příklady částí transkripčních profilů jsou uvedeny na obrázcích č. 17 až 23 (přílohy str. 117 až 123), které jsou umístěny v přílohách. Konkrétně tyto části transkripčních profilů byly vloženy do práce z důvodu ukázky 7 produktů, které byly vzhledem k zajímavému průběhu jejich intenzity v různých termínech vybrány k sekvenaci.

Transkripční profily byly srovnávány se třemi teoretickými hodnotícími schémata pro výběr píků (fragmentů genů) s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů z endogenní dormance. Bylo vytvořeno hodnotící schéma A (tab. 7, přílohy str. 13), u kterého se během sledovaného období čtyř termínů (čtyř řádků v profilu) intenzita sledovaného produktu (píku) snižuje, až v posledním termínu zcela chybí. Podle tohoto hodnotícího schématu by se mohlo jednat o fragment genu s potencionálním účinkem potlačení výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance. Dále bylo vytvořeno hodnotící schéma B (tab. 8, přílohy str. 14), které bylo dále rozděleno na schéma B1, B2 a B3. V případě schématu B1 jde o pík (fragment genu), který se vyskytuje týden před výstupem z dormance a v týdnu výstupu z dormance. U schématu B2 jde o pík vyskytující se týden před výstupem z dormance a u schématu B3 jde o pík vyskytující se jen v termínu výstupu z dormance. U schématu B by mohlo jít o fragmenty genů aktivovaných v termínu výstupu z endogenní dormance nebo v těsné blízkosti před výstupem z endogenní dormance. Jako poslední bylo vytvořeno hodnotící schéma C (tab. 9, přílohy str. 15), které vypadalo zcela opačně než hodnotící schéma A, takže v prvním řádku profilu (termín 2 týdny před výstupem z endogenní dormance) se produkt nevyskytoval a v dalších třech řádcích profilu jeho intenzita rostla. V tomto případě by se mohlo jednat o fragmenty genů, jejichž aktivita v těsné blízkosti termínu výstupu květních pupenů z endogenní dormance začíná a postupně se zvyšuje.

Na základě hodnocení transkripčních profilů bylo vybráno celkem 147 fragmentů genů k sekvenování. Z těchto vybraných bylo nejvíce a to 52 % vybráno na základě podobnosti s hodnotícím schématem B.

5.4 Sekvence vybraných fragmentů

Fragmenty vybrané podle hodnotících schémat byly očíslovány a postupně sekvenovány. Vzorky obsahující vybrané produkty určené k sekvenaci byly separovány na polyakrylamidovém gelu tak, aby vybrané produkty z transkripčních profilů mohly být z gelu vyřezány. Příklad takovéto separace je uveden na obrázku č. 11 (přílohy str. 112). Na obrázku je možné vidět produkty označené číslem (číslo přidělené produktu pro sekvenaci) a za pomlčkou číslem označujícím délku produktu v párech bází. Informace o délce produktu je rovněž podstatná pro nastavení protokolu pro následnou sekvenaci. Takto byly separovány všechny vybrané vzorky a vyřezány pro následnou sekvenaci všechny vybrané produkty.

Takto vytipovaných 147 fragmentů bylo vyřezáno ze vzorků odvozených ze 4 pokusných odrůd s následným rozložením: 43,5 % fragmentů ze vzorků odrůdy SEO, 22,5 % ze vzorků odrůdy 'Betinka', 21 % ze vzorků odrůdy 'Vestar' a 13 % ze vzorků odrůdy 'Sundrop'.

U všech 147 vyřezaných produktů z gelu byla provedena eluce, re-amplifikace, vyčištění a měření koncentrace z důvodu následného ředění vzorku pro sekvenační reakci (tab. 10, přílohy str. 16-21). U pěti produktů nebylo dostatečné koncentrace pro sekvenaci dosaženo, proto ani nebyly sekvenovány. Výsledný počet sekvenovaných produktů byl tedy 142. Po sekvenační reakci proběhlo čištění vzorků od případných zbytků chemie používané v rámci kitu „Big Dye Terminator“ a příprava vzorků k analýze na jedno-kapilárním genetickém analyzátoru ABI-PRISM 310. Výsledná konsensuální nukleotidová sekvence byla srovnána s již popsanými nukleotidovými sekvencemi v elektronické databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information) a v elektronické databázi TIGR (TIGR Plant Transcript Assemblies). Výsledky srovnání 73 úspěšně sekvenovaných fragmentů s informacemi v elektronických databázích byly zpracovány do tabulky č. 11 (přílohy str. 21-42).

V tabulce č. 11 (přílohy str. 21-42) jsou zapsány obecné informace o fragmentech a informace získané z elektronické databáze TIGR (černá barva), zeleně jsou v tabulce zapsány informace získané z elektronické databáze NCBI. Dále se v tabulce nachází informace o hodnotícím schématu, podle kterého byly fragmenty vybrány z transkripčních profilů jako fragmenty genů s potencionální souvislostí s výstupem květních pupenů

meruněk z endogenní dormance. Dále jsou zde umístěny informace o odrůdě meruněk, ze které byly odebrány květní pupeny v této části popisované. V tabulce jsou také uvedeny informace o primerové kombinaci použité k amplifikaci následně úspěšně sekvenovaného fragmentu (v tabulce jsou jen poslední 2 selektivní báze příslušných primerů) a informace o délce sekvenovaného produktu v párech bází (více informací viz tab. 6, přílohy str. 12). Součástí tabulky je také informace o tzv. skóre, kdy skóre „a“ je informace o srovnání vložené sekvence do databáze a referenční sekvence nacházející se v databázi TIGR (detailně vysvětleno u tab. 11, přílohy str. 21-42) a skóre „b“, což je informace o srovnání vložené sekvence do databáze a referenční sekvence nacházející se v databázi NCBI, rovněž detailně vysvětleno u tabulky. Dále se v tabulce nachází sloupec s kvalitativními parametry srovnávacího procesu vlastní nukleotidové sekvence a referenční nukleotidové sekvence (sekvence, která se již nachází v elektronické databázi). Jedná se vlastně o vyčíslení náhodné shody při srovnávání dvou sekvencí. Hodnota P (N) pochází z elektronické databáze TIGR a hodnota E pochází z elektronické databáze NCBI. Charakteristiky obou těchto hodnot jsou detailně popsány pod tabulkou č. 11 (přílohy str. 21-42). Dále se v tabulce nachází sloupec „Accession“ – udávající přístupové číslo k referenční sekvenci v elektronické databázi TIGR (černě) a přístupové číslo k referenční sekvenci v elektronické databázi NCBI (zeleně). Dále se v tabulce nachází sloupec s názvem referenční sekvence (černě název referenční sekvence z databáze TIGR a zeleně název referenční sekvence z databáze NCBI). Dále sloupec s biologickým procesem, kterého se referenční položka zúčastňuje, opět černě informace k referenční položce z databáze TIGR a zeleně z databáze NCBI. A v posledním sloupci v tabulce je uvedena molekulární funkce referenční položky (černě informace související s referenční položkou z databáze TIGR, zeleně z databáze NCBI).

Jednotlivé položky jsou v tabulce řazeny tak, že nejprve je oddíl položek s úspěšným srovnáním v obou elektronických databázích (TIGR i NCBI). V této části jsou nejprve seřazeny položky od nejmenšího čísla po největší (vzestupně) pro schéma A, dále schéma B s položkami opět seřazenými vzestupně a schéma C s položkami také vzestupně uspořádanými. Dále následuje oddíl položek, které byly úspěšně srovnány s referenčními sekvencemi pouze v databázi TIGR. V oddílu je řazení položek opět stejným způsobem, tzn. nejprve sekvence odpovídající svým průběhem výběrovému schématu A, následně pro schéma B a nakonec schéma C, vždy seřazenými vzestupně. V posledním oddílu tabulky jsou položky, které byly úspěšně srovnány s referenčními sekvencemi v elektronické

databázi NCBI. V tomto oddílu jde pouze o 4 položky seřazené vzestupně a všechny jsou vyhodnoceny ve schématu B. Na základě vysoké podobnosti námi sekvenovaných fragmentů s referenčními sekvencemi je při další interpretaci výsledků předpokládáno, že úspěšně sekvenované fragmenty zapsané v tabulce č. 11 (přílohy str. 21-42), je možné považovat za identifikované.

Interpretace získaných výsledků byla v první fázi provedena prostřednictvím vyhodnocení charakteru získaných sekvencí z hlediska jejich biologické funkce. To je shrnuto v grafu č. 27 (přílohy str. 103), který zahrnuje všech 73 identifikovaných genů.

První skupinu tvoří geny související s fotosyntézou a fotomorfogenezí, kam patří 6 genů. Jedná se o položky z tabulky č. 11 (přílohy str. 21-42) označené čísly: 4, 5, 23, 35, 70 a 138.

Druhou skupinu tvoří geny související s transportem (např. iontů, elektronů, hexasylových skupin, proteinů, lipidů), kam patří 10 genů. Jedná se o položky z tabulky č. 11 (přílohy str. 21-42) označené čísly: 12, 14, 22, 37, 43, 78, 79, 86, 131 a 145.

Třetí skupinu tvoří geny související s procesem realizace a regulace genové exprese, kam patří 12 genů. Jedná se o položky z tabulky č. 11 (přílohy str. 21-42) označené čísly: 17, 24, 33, 65, 67, 92, 102, 104, 105, 120, 139 a 142.

Čtvrtou skupinu tvoří geny související s energetickými procesy a metabolismem sacharidů, kam patří 7 genů. Jedná se o položky z tabulky č. 11 (přílohy str. 21-42) označené čísly: 32, 45, 51, 84, 114, 118 a 133.

Pátou skupinu tvoří geny související s biosyntézou proteinů a jejich modifikacemi, kam patří 13 genů. Jedná se o položky z tabulky č. 11 (přílohy str. 21-42) označené čísly: 13, 16, 21, 25, 40, 41, 44, 60, 64, 71, 90, 134 a 136.

Šestou skupinu tvoří geny související s biosyntézou aminokyselin, kam patří 7 genů. Jedná se o položky z tabulky č. 11 (přílohy str. 21-42) označené čísly: 3, 19, 68, 98, 130, 132 a 137.

Sedmou skupinu tvoří geny související s replikací a regulací buněčného cyklu, kam patří 3 geny. Jedná se o položky z tabulky č. 11 (přílohy str. 21-42) označené čísly: 72, 100 a 111.

Osmou skupinu tvoří geny související s oxidačními a redukčními procesy, kam patří 5 genů. Jedná se o položky z tabulky č. 11 (přílohy str. 21-42) označené čísly: 11, 27, 30, 75 a 77.

Poslední skupinu tvoří ostatní geny, kam patří 10 genů. Jedná se o položky z tabulky č. 11 (přílohy str. 21-42) označené čísly: 7, 8, 9, 18, 28, 36, 42, 57, 63 a 73.

5.5 Výběr genů s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů meruněk z endogenní dormance

Na základě zjištěných informací o 73 identifikovaných fragmentech genů z databází, bylo vybráno 7 kandidátních genů s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů meruněk z endogenní dormance. V tabulce č. 12 (přílohy str. 43-44) jsou vypsány vybrané fragmenty genů. U každého z nich je uvedeno číslo fragmentu, které mu bylo přiděleno pro sekvenaci, dále celá sekvence a několik informací o příslušných genech vycházejících z informací v tabulce č. 11 (přílohy str. 21-42; přístupové číslo referenční sekvence z příslušné databáze, název referenční sekvence a biologický proces).

Konkrétně se jedná o vzorek č. 13 (na obr. 17, přílohy str. 117, je transkripční profil, ze kterého byl produkt vybrán), s u něj nalezeným biologickým procesem v elektronické databázi NCBI – inhibitor růstu 2 (ING2). Tento vzorek byl vybrán podle hodnotícího schématu A, tzn. v průběhu 4 zkoumaných termínů odběrů jeho aktivita klesá, až v posledním termínu (týden po výstupu z endogenní dormance) zcela pík (produkt) chybí.

Dále se jedná o vzorek č. 14 (na obr. 18, přílohy str. 118, je transkripční profil, ze kterého byl produkt vybrán) s u něho nalezeným biologickým procesem v elektronické databázi NCBI – membránové kanály, které selektivně transportují vodu, malé neutrální molekuly a ionty z buňky a mezi buňkami. Tento vzorek byl vybrán podle hodnotícího schématu B, přičemž se vyskytl v obou opakováních u odrůdy SEO v třetím termínu (tj. termín výstupu květních pupenů z endogenní dormance).

Dalším vzorkem je vzorek č. 44 (na obr. 19, přílohy str. 119, je transkripční profil, ze kterého byl produkt vybrán) s těmito nalezenými biologickými procesy v elektronické databázi TIGR: metylace aminokyselin proteinu na jeho C – terminálu; vývoj květů; negativní regulace signalizace zprostředkované kyselinou abscisovou; vývoj výhonků. Tento vzorek byl vybrán podle hodnotícího schématu B – tzn., že se vyskytl v obou

opakováních u odrůdy SEO v třetím termínu (tj. termín výstupu květních pupenů z endogenní dormance).

Dalším vzorkem je vzorek č. 78 (na obr. 20, přílohy str. 120, je transkripční profil, ze kterého byl produkt vybrán) s u něj nalezeným biologickým procesem v obou elektronických databázích (TIGR i NCBI): transport lipidů. Tento vzorek byl vybrán podle hodnotícího schématu C, konkrétně v průběhu 3 zkoumaných termínů odběrů jeho aktivita roste (nejvyšší je v posledním zkoumaném termínu – týden po výstupu z dormance). V prvním termínu (dva týdny před výstupem z endogenní dormance) zcela pík (produkt) chybí.

Dalším vzorkem je vzorek č. 105 (na obr. 21, přílohy str. 121, je transkripční profil, ze kterého byl produkt vybrán) s u něj nalezeným biologickým procesem v elektronické databázi TIGR: ukončování vývoje embrya v průběhu dormance semen, valyl-tRNA aminoacylace. Tento vzorek byl vybrán podle hodnotícího schématu B, konkrétně se vyskytl v obou opakováních u odrůdy 'Sundrop' ve třetím termínu (tj. termín výstupu květních pupenů z endogenní dormance).

Dalším vzorkem je vzorek č. 111 (na obr. 22, přílohy str. 122, je transkripční profil, ze kterého byl produkt vybrán) s u něho nalezeným biologickým procesem v obou elektronických databázích (TIGR i NCBI): buněčný cyklus (cyklin). Tento vzorek byl vybrán podle hodnotícího schématu B, konkrétně se vyskytl v obou opakováních u odrůdy 'Betinka' ve třetím termínu (tj. termín výstupu květních pupenů z endogenní dormance).

Dále se jedná o vzorek č. 133 (na obr. 23, přílohy str. 123, je transkripční profil, ze kterého byl produkt vybrán) s u něho nalezenými biologickými procesy v elektronické databázi NCBI: podílí se na regulaci vývoje plodů, metabolismu sacharidů a zesilování buněčné stěny. Tento vzorek byl vybrán podle hodnotícího schématu B, konkrétně se vyskytl v obou opakováních u odrůdy 'Vestar' ve třetím termínu (tj. termín výstupu květních pupenů z endogenní dormance) a v termínu jeden týden před výstupem z endogenní dormance.

5.6 Ověření specifických primerů pro amplifikaci vybraných fragmentů

5.6.1 Návrh specifických primerů

Pro potenciální amplifikaci výše uvedených vybraných fragmentů byly navrženy specifické primery. Primery (tab. 3, přílohy str. 9) byly navrženy jakožto komplementární k námi osekvenovaným fragmentům (sekvence fragmentů – tab. 12, přílohy str. 43-44) a dále testovány u vzorků získaných ve všech termínech odběrů vzorků pro danou odrůdu v sezóně 2007/2008 a následně i u odebraných vzorků v sezóně 2008/2009. V tabulce č. 13 (přílohy str. 45) je k jednotlivým vzorkům s jejich příslušným číslem zapsána příslušná primerová kombinace a délka očekávaného amplikonu v párech bází (pb). Pro vzorek č. 13 byly navrženy 2 zpětné primery a pro vzorek č. 44 dva přímé primery. Dva primery byly u těchto dvou vzorků navrženy a nasyntetizovány z důvodu, že při návrhu programem „CLC Main Work bench 5.0“ byly jejich kvalitativní parametry srovnatelné a nebylo možné odhadnout, který bude pro reálnou amplifikaci vhodnější.

5.6.2 Testování a optimalizace specifických PCR reakcí

Pro vlastní metodu Real-Time PCR byly u všech odebraných vzorků v sezóně 2007/2008 sladěny koncentrace celkové RNA na $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (tab. 14, přílohy str. 45-46), aby mohlo dojít k následné relativní kvantifikaci amplifikovaných produktů oproti referenčnímu genu. Sladěná RNA byla následně použita pro syntézu ss cDNA. Následně bylo provedeno testování funkčnosti specifických reakcí a jejich optimalizace (obr. 12, 13, přílohy str. 113, 114). Na obrázku č. 12 (přílohy str. 113) je možné vidět úspěšně amplifikované produkty u vzorku č. 111, 133 a 105. Na obrázku č. 13 (přílohy str. 114) je možné vidět úspěšně amplifikované produkty u vzorků č. 13, 14 a 78. U vzorku č. 44 se nezdařilo dosáhnout úspěšně amplifikovaných produktů ani jedním primerovým párem. U vzorku č. 13 se prvním testovaným primerovým párem nepodařilo získat úspěšně amplifikované produkty, ale druhým primerovým párem se amplifikace zdařila (použité primery: přímý $5' \text{GTTGTAATCTGCATGTTGG3}'$; zpětný $5' \text{CTGCGTTACCAATTGCCA3}'$). Další informací, kterou nám obrázky č. 12 a 13 (přílohy str. 113 a 114) poskytly, je to, že u všech očekávaných amplikonů se vyskytují s vyšší či nižší intenzitou viditelnosti i dimery primerů a u vzorku č. 78 dokonce i nespecifické produkty. To je nepříznivé pro další využití tohoto primerového páru pro Real-Time PCR amplifikaci při použití nespecifického barviva Syber Green. Jako

optimální se u většiny vzorků jevila teplota hybridizace 41 °C. Jako vnitřní pozitivní kontrola byl použit gen AT5G12240 (obr. 14, přílohy str. 114).

Dále byla na námi testovaných vzorcích vyzkoušena amplifikace produktů genů spojovaných v jiných literárních zdrojích (citace) s dormancí u druhu *Prunus persica* (L.). Jednalo se primerové kombinace zaměřené na geny DAM3, DAM5, DAM6 (viz obr. 15, přílohy str. 115).

5.6.3 Real-Time PCR – test na fragmentu č. 111

Výsledky amplifikace fragmentu č. 111 s nespecifickým barvivem SYBR Green (Life Technologies) jsou znázorněny na obrázku č. 24 (přílohy str. 124). U této analýzy byla provedena i analýza křivky tání a její výsledky jsou znázorněny na obrázku č. 25 (přílohy str. 125). Z těchto dvou obrázků je patné, že k amplifikaci a vzniku ds DNA došlo. Z křivky tání je ovšem zjevné, že došlo i k amplifikaci nespecifických produktů. Při použití nespecifického barviva Syber Green tedy není možné tento protokol použít ke kvantifikaci exprese. Dále byla vyzkoušena varianta s kitem Fast SYBR Green (Applied Biosystems), která neposkytla žádné výsledky.

S ohledem na získané výsledky u fragmentu č. 111 a s ohledem na vlastní náročnosti metody Real-Time PCR, nebylo v těchto pokusech dále pokračováno.

6 DISKUZE

6.1 Stanovení výstupu z dormance květních pupenů meruněk

Stanovení výstupu květních pupenů meruněk se běžně provádí metodou počtu vykvetlých květních pupenů (Albuquerque *et al.*, 2008; Cooke *et al.*, 2012; Laušman, 2007). Výsledky měření tímto přístupem odrážejí reálný stav a potenciál pro kvetení v pupenech, v rámci předkládané práce proto byly použity jako referenční při hodnocení dalšími metodami resp. přístupy. Mezi tyto ověřované metody patří stanovení produkce etylénu, CO₂ a etanu (Alsalihi *et al.*, 2004; Celikel *et Vandoorn*, 1995; Coleman, 1998; Fišerová *et al.*, 2006; Kumerová *et al.*, 2010; Prokeš *et al.*, 2006; Schuch *et al.*, 1992). Dále bylo provedeno stanovení hladiny kyseliny abscisové (Fišerová *et al.*, 1996; Fišerová *et al.*, 2001) v květních pupenech meruněk a stanovení hmotnosti květních pupenů.

Podle stanovení počtu vykvetlých květních pupenů od fenofáze butonizace do fenofáze kvetení, tedy květní pupeny ve stádiu 'D' až 'F' dle Fleckingera a Grisvarda (Vachůn, 2003), byl termín výstupu květních pupenů z endogenní dormance v obou letech stanoven ve stejném pořadí odrůd: 1. – 'Sundrop' (13. 12. 2007 a 5. 1. 2009), 2. – 'Vestar' (27. 12. 2007 a 19. 1. 2009), 3 – 'Betinka' (10. 1. 2008 a 26. 1. 2009) a 4. – 'Stark Early Orange' (SEO; 17. 1. 2008 a 2. 2. 2009). Spolu s počítáním počtu vykvetlých květních pupenů byl zkoumán vztah k sumě hodin při teplotách 0-7 °C, které jsou v literatuře uváděny jako zásadní a jejich hodnota se uvádí na 900 hodin (Crabbe *et Barnola*, 1996; Yamane *et al.*, 2006). Grafy č. 1 a 2 (přílohy str. 77 a 78) znázorňují vztah počtu rozkvetlých pupenů k sumě hodin při teplotách od 0-7 °C. Z grafů je patrné, že květní pupeny meruněk nerozkvetou dříve, než je dosaženo časově nezbytně nutné minimální (900 hodin) sumy nízkých teplot – opět ve stejném odrůdovém pořadí ve dvouletém opakování ('Sundrop' cca 1048, 'Vestar' cca 1060, 'Betinka' cca 1100 a SEO cca 1230 hod.).

Měření produkce etylénu v prvním roce hodnocení naznačovalo, že by jeho produkce mohla souviset s termínem výstupu pupenů z endogenní dormance stanoveným metodou počítání květních pupenů. Výsledné hodnoty produkce etylénu v jednotlivých termínech odběrů výhonů zaznamenané v grafu č. 4 (přílohy str. 80) ukazují, že v případě odrůdy 'Sundrop' je dle střední chyby statisticky průkazný nárůst mezi prvním a druhým termínem a pokles mezi druhým a třetím termínem v produkci etylénu. Druhý termín byl

přítom označen jako termín výstupu z endogenní dormance dle kvetení. U zbylých tří odrůd je statisticky průkazný nárůst a následný pokles zaznamenán vždy o jeden termín dříve před stanoveným termínem výstupu z endogenní dormance. Bohužel se tyto slibné výsledky v druhém roce sledování produkce etylénu nepotvrdily. Navíc je nutné produkci etylenu vzorky odebranými z přirozených podmínek vždy srovnat s klimagramy, neboť etylén je i stresovým hormonem a může reagovat na náhlý pokles či vzestup teplot (Fišerová *et al.*, 1999). V obou letech sledování produkce etylénu ukázalo, že nakvétání jednotlivých odrůd je v přímé úměře provázáno zvýšenou produkcí etylénu u skupiny vzorků měřených až 7. den od odběru rostlinného materiálu (měřeno po 24 hodinách od uzavření odměrných válců; viz grafy č. 10 a 20, přílohy str. 86 a 96). V obou letech sledování produkuje v absolutních hodnotách více etylénu odrůda 'Sundrop', která také vystupuje z dormance jako první ze čtyř sledovaných odrůd. Dále v pořadí následuje odrůda 'Vestar' až do 9. odběru 'Betinka' a SEO. V posledních odběrech však SEO svou produkci etylenu oproti odrůdě 'Betinka' zvýší. Celkově je z grafu č. 14 (přílohy str. 90) patrná nízká produkce etylenu u všech odrůd v období dormance, tedy stejně jak uvádí Šebánek (Šebánek in Procházka *et al.*, 2003).

V případě hodnot etanu a CO₂ (grafy č. 3, 5, 13 a 15, přílohy str. 79, 81, 89 a 91) již není tak zřetelný nárůst či pokles naměřených hodnot v termínech okolo zjištěného výstupu jednotlivých odrůd z endogenní dormance. Lze ale zaznamenat podobný charakter průběhu produkce CO₂ a etylénu.

Hodnoty obsahu kyseliny abscisové mají u většiny zkoumaných odrůd v obou letech klesající tendenci, což souvisí s výstupem rostlin z endogenní dormance (Ghassemian *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2015). Absolutní hodnoty ABA se však mezi odrůdami liší, a navíc nelze zaznamenat žádný zlomový bod, který by mohl fungovat jako signální znak pro termín výstupu květních pupenů z endogenní dormance. Meziodrůdové rozdíly v obsahu kyseliny abscisové jsou v obou letech obdobné a patrné z grafů číslo 23 a 24 (přílohy str. 99 a 100).

Poslední sledovanou položkou, s ohledem na stanovení výstupu květních pupenů merunek z endogenní dormance, byla váha květních pupenů v jednotlivých termínech odběrů vzorků. V prvním sledovaném období se váha květních pupenů do 7. termínu odběru pohybovala okolo 0,01 g a následně u všech odrůd začala růst. Ve druhém sledovaném období váha pupenů střídavě klesala a rostla. Ani v jednom ze sledovaných

období nebylo možné vypořádat jasnou souvislost s termínem výstupu květních pupenů stanoveným metodou počítání vykvetlých pupenů.

6.2 Optimalizace syntézy ds cDNA

Získání kvalitní ds cDNA v dostatečném množství je zásadní pro následnou validní analýzu transkriptomu metodou cDNA-AFLP. V pokusech v rámci diplomové práce – Genetická determinace dormance a kvetení u meruněk (Čechová, 2007), na kterou tato disertační práce navazuje, bylo vytipováno několik kritických bodů, při kterých může docházet k degradaci RNA (Štípek, 1998), potažmo mRNA, jejíž kvalita je pro syntézu ds cDNA podstatná. Z tohoto důvodu bylo potřeba před započítím analýz metodou cDNA-AFLP tato problematická místa z protokolu syntézy ds cDNA odstranit.

Okamžitá stabilizace a ochrana molekul RNA před RNázami RNA byla zajištěna uskladněním odebraných květních pupenů v roztoku *RNAlater*[®] Solution. RNázy jako enzymy štěpící řetězce RNA způsobují její nespecifickou degradaci (Sambrook *et* Russell, 2001) a tím zásadně zhoršují její kvalitu a možnost dalšího využití zvláště pro metodu cDNA-AFLP, která ve svém postupu zahrnuje specifické štípání restrikními endonukleázami. Při skladování pupenů výše uvedeným způsobem bylo možné nejdříve stanovit výstup květních pupenů z endogenní dormance a podle těchto informací vybrat pro izolaci RNA pouze vzorky potřebné pro následnou analýzu (2 týdny před výstupem, 1 týden před výstupem, vzorky odebrané ve stanoveném termínu výstupu z endogenní dormance a 1 týden po výstupu z dormance), což přineslo i finanční úsporu.

Dalším optimalizačním krokem byla změna způsobu izolace RNA. Izolace RNA na základě extrakce na oxidu křemičitém dle upraveného protokolu Foissac *et al.* (2001), která vyžaduje 1 g vstupního materiálu, byla nahrazena izolací pomocí komerčního kitu Spectrum[™] Plant Total RNA Kit od firmy Sigma. Pro tento kit je potřeba jen desetina vstupního materiálu (100 mg) oproti výše uvedenému postupu a je vhodný pro izolaci RNA z rostlinných pletiv s vysokým obsahem sekundárních metabolitů, a zároveň s očekávaným nízkým výtěžkem RNA. Právě dormantní pupeny jsou problematické z hlediska izolace RNA, jelikož jsou chráněny tuhými šupinami, často s obsahem vosku. Celkově jen malá část pletiv z květních pupenů v dormanci poskytuje materiál vhodný pro izolaci RNA. Jak dokládá obrázek č. 2 (přílohy str. 104), proběhla izolace RNA výše uvedeným kitem u dlouhodobě skladovaných pletiv v *RNAlater*[®] Solution srovnatelně

s čerstvými pletivy. Kvalita i kvantita vyzolované RNA byla ve srovnání s izolací pomocí upraveného protokolu Foissac *et al.* (2001) mnohonásobně vyšší (obr. 3 a 4, přílohy str. 105).

Dalším cílem bylo snížení počtu kroků manipulace s RNA. Oproti protokolu, použitým v práci Čechová (2007), byl pro přepis RNA na ds cDNA použit komerční kit MINT cDNA synthesis kit od firmy EVROGEN. Při tomto způsobu přepisu bylo možné vypustit krok separace mRNA z celkové RNA, jelikož syntéza prvního řetězce cDNA v rámci kitu začíná za účasti 3' primeru, který obsahuje oligo (dT) sekvence komplementární k poly A⁺ konci RNA. Následná sekvenace vybraných fragmentů potvrdila, že sekvenované produkty vycházejí převážně z mediátorové RNA (mRNA).

6.3 Metoda cDNA-AFLP

Z technik dostupných k analýze transkriptomu na základě hybridizačních technik, nebo technik založených na RT-PCR, má metoda cDNA-AFLP výhodu v tom, že nevyžaduje znalost sekvence analyzovaného genomu, může tedy pracovat s různými, i méně popsanými rostlinnými druhy. Dále je možné touto metodou nalézt a identifikovat nové, dosud nepopsané geny. Obvykle jde o metodu relativně technicky jednoduchou, která vyžaduje malé množství vstupní mRNA (Baisakh *et al.*, 2006). Výše uvedené aspekty byly důvodem k výběru metody cDNA-AFLP jakožto nástroje pro studium transkriptomu dormantních květních pupenů merunek. Dalším důvodem výběru metody cDNA-AFLP bylo v době zpracování výsledků práce to, že rozvíjející se metody studia transkriptomu pomocí NGS (sekvenování nové generace) byly cenově nedostupné, tzn. velmi drahé. Tato metoda byla vybrána i přes to, že je u ní nutné provést velké množství selektivních PCR reakcí (v našem případě 63), aby byla prostudována co možná největší část transkriptomu. Přes velký rozsah experimentu tu však dále existuje teoretické omezení spočívající v tom, že při PCR reakcích jsou amplifikovány pouze fragmenty, které byly štípány oběma použitými restričními enzymy (*Mse* I a *Apo* I). Neobsahuje-li gen našeho zájmu rozeznávací místo obou použitých restričních endonukleáz zároveň, nebude tedy v získaných spektrech detekován. Toto omezení metody, cDNA-AFLP, jsme se snažili zmírnit, použitím restričního enzymu *Apo* I, který má ve své šesti-nukleotidové rozeznávací sekvenci dvě degenerované pozice. Tímto se u něj zvyšuje teoretická četnost štípání oproti standardním šesti-nukleotidovým štěpicím enzymům bez degenerovaných

pozic na četnost 1× za 1024 bp místo 1× za 4096 bp. Z tohoto důvodu by, vzhledem k obvyklé délce transkripční jednotky, mělo být toto štěpící místo ve vysokém procentu genových transkriptů. Xiao *et al.* (2009) ve své práci zkoumali četnost štípání enzymů se šesti nukleotidy v rozeznávací sekvenci v rámci protokolu cDNA-AFLP. Test prováděli na cDNA z genomu *Hevea brasiliensis* Willd. dostupné z elektronické databáze. Výsledky prokázaly, že sekvence, které obsahovaly restriční místo enzymu *Apo I*, byly četnější. Tyto restriční místa se vyskytly u 88,9 % testovaných cDNA sekvencí. Dalším omezením je, že metoda cDNA-AFLP je náchylná k výskytu falešně pozitivních výsledků. O eliminaci tohoto problému jsme se pokusili tím, že jsme pro sekvenaci vybírali pouze fragmenty, které svůj průběh exprese (dle hodnotících schémat) projevily zároveň u více odrůd, nebo v obou opakováních u jedné odrůdy. (Bachem *et al.*, 1998; Breyne *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2001).

6.4 Sekvence vybraných fragmentů

Fragmenty genů s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů z endogenní dormance byly vybrány na základě podobnosti průběhu vývoje jejich exprese s jedním z pěti teoretických schémat hodnocení (tab. 7, 8 a 9, přílohy str. 13, 14, 15). Hodnotící schémata znázorňují teoreticky možný vývoj exprese genů s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů meruněk z endogenní dormance. První hypotetickou možností průběhu exprese genů souvisejících s endogenní dormancí pupenů je ta, že jejich exprese probíhá v období před výstupem z endogenní dormance. V těsné blízkosti termínu výstupu květních pupenů dormance klesá, až zcela ustává v termínu po výstupu z endogenní dormance. V tomto případě by se mohlo jednat o potencionální inhibitory výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance, jejichž aktivita ustává v období výstupu květních pupenů z endogenní dormance. Tento průběh znázorňuje schéma A (tab. 7, přílohy str. 13). Schéma B (tab. 8, přílohy str. 14) zachycuje průběh exprese genů, které se při analýze transkripčního profilu vyskytly pouze v těsné blízkosti termínu výstupu z endogenní dormance, tzn. týden před výstupem nebo v termínu výstupu květních pupenů z endogenní dormance. Posledním hodnotícím schématem bylo schéma C (tab. 9, přílohy str. 15) v němž se jednalo o geny, jejichž exprese začíná v období výstupu květních pupenů z endogenní dormance a následně roste.

Na základě podobnosti průběhu exprese s výše popsanými hodnotícími schémata bylo z transkripčních profilů vybráno, 147 fragmentů genů k jejich sekvenování. Jejich distribuce mezi čtyřmi zvolenými odrůdami byla následovná: 43,5 % odrůda SEO, 22,5 % odrůda 'Betinka', 21 % odrůda 'Vestar' a 13 % odrůda 'Sundrop'. Nejvíce osekvenovaných fragmentů, a to 52 %, bylo vybráno k sekvenování na základě podobnosti s hodnotícím schématem B.

Nukleotidové sekvence úspěšně osekvenovaných fragmentů byly srovnány s referenčními sekvencemi ve dvou elektronických databázích (TIGR a NCBI). Výsledky srovnávání byly zpracovány do tabulky č. 11 (přílohy str. 21-42) umístěné v přílohách. Shoda s některými geny byla u několika fragmentů nalezena opakovaně. Tento opakovaný výskyt platil například pro geny: ribozomální protein, proteinový sběrný komplex světla fotosystému II (z anglického „light harvesting chlorophyll a /b binding protein of PSII“) a gen pro aspartát-aminotransferázu. U genů s nalezenou podobností s námi sekvenovanými fragmenty byly v databázi NCBI a dalších odkazech, které tato databáze poskytuje, vyhledány biologické procesy a molekulární funkce těchto identifikovaných genů. Následně byly hledány spojitosti těchto mnohdy obecně popsaných biologických funkcí s výstupem květních pupenů z endogenní dormance.

Rozdělení identifikovaných genů znázorňuje graf č. 27 (přílohy str. 103) umístěný v přílohách. Nejčastěji se vyskytovaly geny zařazené do skupiny genů souvisejících s biosyntézou proteinů a jejich modifikacemi, následované geny souvisejícími s procesem realizace a regulace genové exprese a geny související s transportem. Dalšími skupinami identifikovaných genů byly: geny související s energetickými procesy a metabolismem sacharidů, geny související s biosyntézou aminokyselin, geny související s fotosyntézou a fotomorfogenezí, geny související s oxidačními a redukčními procesy a geny související s replikací a regulací buněčného cyklu. Většinu z těchto procesů je u květních pupenů vystupujících z endogenní dormance možné očekávat. Pro zlepšení interpretace získaných výsledků byly funkce jednotlivých genů nebo skupin genů dále zkoumány z pohledu jejich souvislosti s dormantními pletivy. Geny identifikované v této práci, u nichž byla jejich funkce spojena s dormancí i v další dostupné literatuře, jsou diskutovány v následující kapitole.

6.5 Identifikované geny s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů meruněk z endogenní dormance

V závorce za diskutovanými geny je vždy uvedeno číslo příslušné položky, které jí bylo přiřazeno v rámci **tabulky č. 11** (přílohy str. 21-42). Vzhledem k zachování autentičnosti a snadnému kontrolnímu vyhledávání v použitých databázích byly diskutovaným genům ponechány názvy používané v příslušných databázích, čili jsou uváděny v anglickém jazyce.

6.5.1 Geny související s fotosyntézou a fotomorfogenezí

Některé ze sekvenovaných fragmentů genů vykazovaly podobnost s geny souvisejícími s fotosyntézou a fotomorfogenezí. K obdobným závěrům došel i Horvath *et al.* (2006), který při svém studiu genové exprese u pryšce (*Euphorbia esculenta* Marloth) pozoroval, že geny podílející se na fotomorfogenezi jsou spojeny s endodormancí. Z námi identifikovaných genů do této skupiny patří například: „light harvesting chlorophyll a /b binding protein“ (sekvenovaný fragment č. 23), cytochrome b5 domain-containing protein (položka č. 4), nebo XAP-5 protein (položka č. 70). Například XAP-5 protein je odpovědný za regulaci cirkadiánního rytmu a regulaci fotomorfogeneze, což může hrát roli při koordinaci růstu v reakci na světelné podmínky. Působí jako senzor kvality osvětlení ve smyslu regulace transkripce, jak pozitivní, tak i negativní, a inhibuje časování genové exprese v denních cyklech (Tryon *et Harmer*, 2008).

6.5.2 Geny související s transportem

Membránový transport vody, cukrů a dalších sloučenin je s dormancí dřevitých rostlin úzce spojen (Yooyongwech *et al.*, 2009). Několik námi sekvenovaných fragmentů vykazuje podobnost s geny spojenými s membránovým transportem „encoding aquaporin“ (sekvenovaný fragment č. 14); „peroxisomal voltage-dependent anion-selective channel protein“ (sekvenovaný fragment č. 22); „proline dehydrogenase“ (sekvenovaný fragment č. 68); „GTP-binding nuclear protein Ran1“ (položka č. 86), „proline-rich protein 1“ (položka č. 78), „geranylgeranylated protein ATGP4“ (položka č. 79), „cation transport protein chaC“ (položka č. 37)].

Z této skupiny genů souvisejících s membránovým transportem se souvislost s pletivou vystupujícími z dormance nejvíce diskutuje u akvaporinů. Předpokládá se, že

dormance je úzce spojena se změnami transportu vody v rostlinných pletivech (Welling *et al.*, 2006). A právě akvaporiny jsou membránové proteiny, které vytvářejí v buněčných membránách vodní kanály, a proto vytvářejí hlavní cesty pro průchod vody přes buněčnou membránu (Johanson *et al.*, 2000). Exprese genů kódujících akvaporiny, v souvislosti s dormancí, byla studována v práci Yooyongwech *et al.* (2009). V této práci studovali stav vody v květních pupenech broskvoní za pomoci magnetické rezonance a genovou expresi akvaporinů. Přitom zjistili, že některé druhy akvaporinů mohou hrát významnou roli při procesu výstupu květních pupenů broskví z endogenní dormance.

Zajímavá je také shoda námi sekvenovaného fragmentu s genem pro jaderný protein vázající GTP („GTP-binding nuclear proteins“). Tyto proteiny jsou nezbytné pro transport mezi jádrem a cytoplazmou. Vyšší míra exprese genů kódujících tyto proteiny byla pozorována u semen *Arabidopsis thaliana* L. ukončujících dormanci (Colucci *et al.*, 2002). Kromě toho je v práci Visser (1999) uvedeno, že GTP vazebné proteiny mohou v procesu klíčení embryí ječmene působit proti účinku hormonu kyseliny abscisové (ABA; v minulosti nazývaná dormin). Tyto výsledky naznačují, že by GTP vazebné proteiny mohly být zapojeny v procesu snižování hladiny kyseliny abscisové v květních pupenech meruněk, což následně vede k výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance. Jedná se však pouze o hypotézu, kterou je nutné v dalších studiích ověřit.

6.5.3 Geny související s procesem realizace a regulace genové exprese

Další skupina námi sekvenovaných fragmentů vykazuje podobnost s geny souvisejícími s genovou expresí, tzn. s geny účastnícími se transkripce, translace a posttranslačních modifikací [„encoding elongation factor 1-alpha“ (eEF1A) (položka č. 33), „60S ribosomal protein L10“ (položka č. 104), „nucleosome/chromatin assembly factor group A“ (položka č. 100), „Valyl-tRNA synthetase“ (položka č. 105), „60S acidic ribosomal protein P0“ (položka č. 139), „40S ribosomal protein S12“ (položka č. 24), a *Prunus persica*/AML1 (položka č. 142)]. Vysoké zastoupení exprimovaných genů kódujících některé ribozomální proteiny bylo pozorováno během začátku rašení pupenů také u smrku ztepilého v práci Yakovlev *et al.* (2006). Zvýšení exprese těchto genů, byla pozorována i v této práci. Zaznamenání exprese genů z této skupiny není překvapivé vzhledem k tomu, že se dá předpokládat, že se biologická aktivita v dormantních pupenech

v průběhu času zvyšuje a s tím také souvisí zvýšená aktivita buněčného aparátu zajišťujícího expresi genů.

Dalším genem z této skupiny genů je gen pro elongační faktor 1 alfa („elongation factor 1-alpha“), jehož exprese byla v dormantních semenech rýže pozorována na nízké úrovni. Po začátku klíčení těchto semen rýže však byla pozorována zvýšená transkripce těchto genů (Kidou *et* Ejiri, 1998). Role elongačních faktorů byly studovány také za použití mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* L.. Tyto rostliny měly v podstatě normální vývoj, ale kvetly o něco dříve než kontrolní rostliny a vykazovaly kratší období semenné dormance (Grasser *et al.*, 2009). Toto naznačuje, že zvýšená genová exprese genu pro elongační faktor 1 alfa během období výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance může být tímto výstupem z endogenní dormance spojena.

ARABIDOPSIS MEI2 LIKE1 (AML1) je dalším genem s možnou souvislostí s výstupem květních pupenů meruněk z endogenní dormance. V práci Horvath *et al.* (2008) byly sledovány rozdíly v expresi tohoto genu u *Euphorbia esula* L. během sezónních přechodů mezi jednotlivými typy dormance (predormance, endodormance, postdormance) za použití metody DNA čipů. Z 22 000 rozdílných unikátních sond bylo mezi jednotlivými typy dormance během sezónních přechodů rozdílně exprimováno téměř 1 000 genů. Z tohoto počtu genů bylo pouze 16 přednostně exprimováno v období endogenní dormance (endodormance). Mezi těmito 16 geny se nacházel i gen *ARABIDOPSIS MEI2 LIKE1 (AML1)*. Průběh exprese fragmentu č. 142, který vykazoval sekvenční podobnost po srovnání s referenčními sekvencemi v databázi TIGR s genem *AML1*, byl vyhodnocen podle hodnotícího schématu A. Znamená to, že vykazoval ukončování své exprese v období výstupu květních pupenů z endogenní dormance a v posledním analyzovaném termínu odběru vzorků (1 týden po výstupu z dormance) se již nevyskytoval. Z výše uvedeného vyplývá, že by se mohlo jednat o vhodný marker termínu ukončení endogenní dormance a přechodu do dormance exogenní, tedy dormance regulované vnějšími podmínkami.

6.5.4 Geny související s energetickými procesy a metabolismem sacharidů

Přechod pupenů z období dormance do období aktivního růstu pupenů je doprovázen četnými molekulárními a biochemickými změnami, které rovněž zahrnují změny v metabolismu sacharidů (Maurel *et al.*, 2004). Mezi námi identifikovanými geny

se rovněž nacházejí takové, které byly do této skupiny zařazeny [„encoding fructose-bisphosphate aldolase-like“ (položka č. 118); „xyloglucan endotransglycosylase hydrolase“ (položka č. 84); „beta-1,3-glucanase, acidic“ (položky č. 32 a 114); EXGT-A1 (položka č. 18); „acetolactatesynthase“ (položka č. 90); „ripening-related protein“ – „pectinesterase aktivity“ (položka č. 133); „ribulosebisphosphate carboxylase /oxygenase activase 1“ (položka č. 45)] a mohly by být spojeny s výstupem květních pupenů meruněk z endogenní dormance.

Role enzymu aldolázy štěpící fruktózu-1,6-bisfosfát v rámci dormance pletiv byla diskutována v publikacích Pawlowski (2007; 2009). Během výstupu semen ze semenné dormance pozoroval akumulaci tohoto typu proteinu spojeného s metabolismem sacharidů.

Yooyongwech *et al.* (2009) prokázali, že procesy v dormantních pletivech jsou spojeny s charakteristickými změnami v membránovém transportu, které jsou obvykle regulovány modifikacemi buněčné stěny. K vlastním změnám ve struktuře buněčné stěny může dojít na základě několika typů modifikací. Mezi tyto typy modifikací patří štěpení páteře polymerní matrice, oslabení nekovalentních vazeb mezi polysacharidy a poškození příčných vazeb mezi polymerní maticí (Cosgrove, 1999). Xyloglukan-endo-transglykosylázy (*XET*) patří do skupiny proteinů, které katalyzují jak vnitřní rozdělení molekuly xyloglukanu, tak i propojení nově vytvořeného redukováného konce s neredukovaným koncem další molekuly xyloglukanu nebo oligosacharidu (Fry *et al.*, 1992; Nishitani *et Tominaga*, 1992). Toto prodloužení a přeskupení xyloglukanů může uvolnit napětí v buněčné stěně a přizpůsobit ji při jejím rozpínání. Výrazná genová exprese xyloglukan-endo-transglykosylázy byla pozorována jak v procesu růstu pletiv, tak i v procesu zrání plodů (Rose *et Bennett*, 1999). Vztah související s procesy probíhajícími v dormantních pletivech byl prokázán v publikaci Chen *et al.* (2002), kde geny pro xyloglukan endotransglykosylázu/ hydrolázu (*XTH*) byly exprimovány v mikropilárním endospermu (kořenové čepičce) a kořínku klíčících semen rajčat po výstupu semen ze semenné dormance. Proto není překvapivé, že jsme pozorovali silnou expresi genu pro xyloglukan endotransglykosylázu/ hydrolázu (*XTH*) a EXGT-A1 (endoxyloglukan transferázu), vyhodnocenou podle hodnotícího schématu B, konkrétně jeden týden před výstupem z endogenní dormance a v týdnu výstupu z dormance.

ATP (adenosintrifosfát) je obecně považován za hlavní zdroj energie v biologických procesech, mezi které patří i výstup semen z dormance a klíčení semen. Například Zhang *et al.* (2004) u ječmene a Krawiarz *et Szczotka* (2000) u semen javoru

mléč uvedli, že období výstupu semen ze semenné dormance bylo doprovázeno akumulací ATP v analyzovaných pletivech, pravděpodobně k zajištění dostatečného množství energie pro celý tento proces. V souvislosti s ATP platí, že mnohé z námi identifikovaných genů se změnou jejich exprese ve sledovaném období výstupu květních pupenů z endogenní dormance obsahují vazebné místo pro ATP. Námi získané výsledky naznačují nárůst poptávky po energii v pletivech květních pupenů meruněk v období výstupu z endogenní dormance, nepřímo potvrzuje naše výsledky.

6.5.5 Geny související s biosyntézou proteinů a jejich modifikacemi

Do této skupiny patří nejvíce námi sekvenovaných a identifikovaných fragmentů genů (viz graf č. 27, přílohy str. 103). Jako nejzajímavější z této skupiny ve vztahu s endogenní dormancí se jeví geny řídící funkčnost ubikvitinu [„proteasome subunit alpha type 3 for ubiquitin dependent protein catabolic proces“ (položka č. 41); „ubiquitin-conjugating enzyme with ligase activity“ (položka č. 21)]. Hlavní funkcí ubikvitinu je označování proteinů určených pro degradaci proteinů pomocí proteazomů. V rámci pokusů analyzujících období ukončování dormance u *Helianthus tuberosus* L. (Scoccianti *et al.*, 1997) bylo zjištěno, že na ATP závislá ubikvitin-proteazomová cesta („ATP-dependent ubiquitin proteolytic pathway“) je zapojena do dediferenciačního procesu, který je iniciován po umělém přerušení dormance, přičemž buňky získávají vlastnosti spojené s vlastnostmi meristematických buněk. V rámci této práce bylo sledováno zvýšení exprese fragmentu genu pro proteazómovou podjednotku alfa typ 3, která je přímo spojena s ubikvitin-proteazomovou cestou (Pawłowski, 2007; 2009).

6.5.6 Ostatní geny

V této práci byly identifikovány další geny, u kterých je možné (ať už přímo či nepřímo) si představit jejich účast v procesu výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance. Tyto geny byly ještě rozděleny podle svého charakteru do dalších tří pojmenovaných skupin. Jednu z těchto skupin tvoří geny související s biosyntézou aminokyselin. Biosyntéza aminokyselin neodmyslitelně předchází biosyntéze proteinů. Dále je to skupina genů související s replikací a regulací buněčného cyklu, což souvisí s dělením buněk v pletivech, které vystoupily z endogenní dormance. Poslední pojmenovanou skupinou dle charakteru genů je skupina genů související s oxidačními a redukčními procesy.

Posledních 10 fragmentů genů, které svým charakterem nezapadaly jednoznačně do žádné z 8 výše uvedených skupin, byly v grafu č. 27 (přílohy str. 103) označeny jako „Ostatní geny“. Do této poslední skupiny genů patří např. „RNA binding protein“ (položka č. 63); „monooxygenase, phosphono pyruvate decarboxylase“ (položka č. 7); „acyl-CoAsynthetase“ (položka č. 73); „calmodulin binding (NPGR2) mRNA, completecds“ (položka č. 8). Podrobné informace o těchto genech nepřímě spojených s výstupem květních pupenů z endogenní dormance je možné nalézt v tabulce č. 11 (přílohy str. 21-42).

V práci Hedley *et al.* (2010) byly studovány exprimované geny v průběhu endogenní dormance a výstupu z ní u listových pupenů černého rybízu. V této práci byly jakožto kandidátní geny související s výstupem pupenů rybízu z dormance nakonec označeny tři geny. Jedním z těchto kandidátních genů byl „calmodium binding protein“. Fragment vykazující podobnost s tímto (položka č. 8) byl vybrán z transkripčních profilů květních pupenů meruněk a úspěšně sekvenován. Vzhledem ke shodné informaci o vztahu tohoto genu k endogenní dormanci ve dvou provedených studiích by se tedy mohlo jednat o významný kandidátní gen.

Je důležité zmínit, že i ostatní identifikované geny mohou hrát významnou úlohu v procesu výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance, i když jejich úloha nebyla dosud podložena další literaturou. Zde je potřebné zdůraznit jednu z výhod metody cDNA-AFLP k analýze transkriptomu, která umožňuje identifikaci i nových genů, které při použití např. čipových technologií nejsou na čípech přítomny.

Jak je z výsledků práce patrné, je proces výstupu pletiv z dormance složitou problematikou, která vyžaduje součinnost a regulaci exprese celé řady genů. Hlubší pochopení genetické regulace výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance je zapotřebí k následnému cílenému výběru genotypů použitelných pro další šlechtění meruněk. Tyto vybrané genotypy by měly mít výhodnější fenotypové vlastnostmi ve vztahu ke klimatickým podmínkám střední Evropy a především k mrazuodolnosti květních pupenů, což je důležitou vlastností meruněk pěstovaných v těchto podmínkách (Blažek *et al.*, 1998; Hannerz, 1999; Nečas *et al.*, 2004). Několik genů identifikovaných v této studii by mohlo být kandidátními markery pro zjišťování načasování výstupu pupenů z endogenní dormance.

6.6 Metoda Real-Time PCR

Selekce genů, které by mohly sloužit jako markery výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance, poskytují dobrý výchozí bod pro další výzkum, který však již nebyl obsahem této disertační práce. Vhodné použití získaných informací si lze představit prostřednictvím aplikace metody Real-Time PCR k ověření vývoje exprese vybraných fragmentů genů u vzorků v delší časové škále, než tomu bylo u metody cDNA-AFLP. Právě relativní kvantifikace pomocí metody Real-Time PCR je velmi vhodná k analýze změn exprese genů. Tato metoda je založena na srovnávání počtu kopií cílové cDNA k počtu kopií cDNA referenčního genu (vnitřní kontroly) (Jain *et al.*, 2006; Livak *et Schmittgen*, 2001). Vzorky Analyzované touto metodou by pokrývaly celé období výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance, po které byly květní pupeny odebírány.

Prvním krokem pro použití této metody je návrh vhodných primerů, které jsou schopny vybrané geny, respektive jejich úseky, amplifikovat prostřednictvím PCR. U šesti navržených primerových párů ze sedmi byla amplifikace fragmentů vybraných genů úspěšná (obr. 12, 13, přílohy str. 113, 114). Problematickým krokem byl výběr referenčního genu s konstantní expresí u všech zkoumaných vzorků. Dalším problémem byl při reálném testování jedné vybrané primerové kombinace výskyt nespecifických produktů při použití nespecifického barviva „SYBRgreen“, což je pro případnou kvantifikaci nevhodné.

Z výše uvedených informací vyplývá, že pro získání kvalitních výsledků za použití metody Real-Time PCR by bylo potřeba několik dalších, časově náročných optimalizačních kroků. S velkou pravděpodobností by také bylo nutné zvýšení specifity signálu použitím fluorescenčně značených sond. K těmto krokům již v rámci této práce nedošlo z finančních důvodů a také proto, že skladovaná RNA již nebyla dostatečně kvalitní pro prepis na ss cDNA a následnou analýzu metodou Real-Time PCR.

7 ZÁVĚR

Na základě sledování termínu výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance bylo metodou počítání vykvetlých pupenů v laboratorních podmínkách zjištěno, že v sezóně 2007/2008 rozkvetlo padesát procent květních pupenů u všech zkoumaných odrůd dříve, než v sezóně 2008/2009. Pro srovnání, v sezóně 2007/2008 vystoupila z dormance nejpozdnější odrůda 'Stark Early Orange' 17. ledna 2008, přičemž v sezóně 2008/2009 rozkvetla stejná odrůda až 2. února 2009. Pořadí odrůd vystupujících z dormance zůstalo v obou sledovaných sezónách stejné. Z ostatních metod použitých pro zjišťování výstupu květních pupenů z endogenní dormance se jevílo v první sezóně 2007/2008 jako nejvhodnější měření produkce etylénu. Výsledky v druhé sezóně toto pozorování ovšem nepotvrdilo. U produkce etylénu je nutné brát v potaz, že zvyšující se produkce etylenu ihned po odběru materiálu může být ovlivňována i aktuální venkovní teplotou před odběrem větví. Lépe vykresluje stav endogenní dormance měření etylénu po 7 dnech od odběru vzorků, což ale může negativně ovlivnit stav rostlinného materiálu v odměrném válci (rašící listové pupeny, nakvétající květní pupeny, plíseň). Na základě zjištěných výsledků tedy není možné doporučit měření produkce etylénu jako vhodnou metodu ke stanovování výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance. Stejně tak není možné doporučit k těmto účelům měření produkce etanu a CO₂, u kterých nebyla zjištěna a ve druhé sledované sezóně potvrzena souvislost s výstupem pupenů z dormance. Za vhodný fyziologický marker výstupu květních pupenů z endogenní dormance není možné považovat ani hladinu kyseliny abscisové v květních pupenech. Naměřené hodnoty kyseliny abscisové měly sice u všech sledovaných odrůd mírně klesající tendenci v termínu výstupu pupenů z dormance stanoveného počítáním rozkvetlých pupenů, ale koncentrace ABA nevykazovala žádnou zásadní změnu či zlom, který by na výstup z dormance ukazoval. Hmotnost květních pupenů rovněž průkazně nekorespondovala se stanoveným termínem výstupu květních pupenů z dormance.

Analýza transkriptomu, která byla v této práci provedena metodou cDNA-AFLP, patří k jedněm z prvních studií transkriptomu květních pupenů meruněk v období jejich výstupu z endogenní dormance. Získané transkripční profily byly hodnoceny na základě srovnání se zvolenými hodnotícími schémata, přičemž bylo vybráno 147 fragmentů genů, které vykazovaly změny ve své expresi v průběhu sledovaného období. Úspěšně sekvenované fragmenty byly srovnány s referenčními nukleotidovými sekvencemi

v elektronických databázích. Výsledky srovnání ukázaly, že se jednalo o fragmenty mRNA, tzn. o exprimované geny, u kterých se ve velké míře podařilo prokázat podobnost s již popsanými geny. Tyto výsledky ukazují na vhodnost použití metody cDNA-AFLP k identifikaci kandidátních genů a nastínění hlavních molekulárních mechanismů odehrávajících se v období výstupu květních pupenů z endogenní dormance. Vhodnost použitého postupu v práci potvrzuje shoda části sekvenovaných genů s geny, které byly popsány v souvislosti s procesy souvisejícími s výstupem rostlin z endogenní dormance i v další literatuře. Jedná se například o gen kódující akvaporin, GTP-vazebné proteiny, elongační faktor 1 alfa, ubikvitin a xyloglukan endotransglykosyl hydrolázu (EXGT-A1). Vzhledem k bouřlivému rozvoji v oblasti metod dostupných pro transkriptomiku je však nutné konstatovat, že v současné době výhody metody cDNA-AFLP začínají za některými přístupy pokulhávat, hlavně pak v oblasti metod označovaných jako NGS.

Jak je patrné z výsledků, načasování výstupu pletiv z dormance je velmi složitým procesem, který zahrnuje širokou škálu různých fyziologických pochodů řízených funkcí a regulací odpovědných genů. Výsledky této práce měly za úkol přispět k hlubšímu pochopení genetické determinace výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance. Pochopení tohoto procesu je nutným prvním krokem pro případnou možnost cíleného výběru genotypů použitelných pro další šlechtění meruněk s výhodnějšími fenotypovými vlastnostmi ve vztahu ke klimatickým podmínkám střední Evropy a především k mrazuodolnosti květních pupenů.

Několik genů identifikovaných v této studii by mohlo představovat kandidátní markery pro zjišťování načasování výstupu pupenů z endogenní dormance a poskytují dobrý výchozí bod pro další vědecký výzkum.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ABELES, F. B. *et al.* *Ethylene in plant biology*, 2nd edn. San Diego: Academic Press, 1992. ISBN 978-0-08-091628-6.
2. ALBURQUERQUE, N. *et al.* Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. In: *Environmental and Experimental Botany*. 2008, 64, 162-170. ISSN 0098-8472.
3. ALONSO, J. M. *et al.* Determination of endodormancy break in almond flower buds by a correlation model using the average temperature of different day intervals and its application to the estimation of chill and heat requirements and blooming date. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2005, 130, 308-318. ISSN 0003-1062.
4. ALSALIHY, A. W. *et al.* The effect of growth regulators on the rooting of shoots of the peach rootstock Ishtara in *in vitro* conditions. In: *Horticultural Science (Prague)*. 2004, 31, 124-131.
5. ANON. Analýza genové exprese [online]. Masarykova univerzita v Brně, 2008 [cit. 2015-01-28]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2008/Bi6400/um/genova_exprese_1.txt
6. ANON. Betinka & Co, Specially bred apricot varieties with Plum Pox Virus resistance, excellent tasting large fruit. Mendel University in Brno, Faculty of Horticulture.
7. ARORA, R. *et al.* Induction and release of bud dormancy in woody perennials: A science comes of age. In: *Horticultural Science*. 2003, 38 (5), 911-921. ISSN 0862-867X.
8. ARUMUGANATHAN, K., EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. In: *Plant Molecular Biology Reporter*. 1991, 9, 208-218. ISSN 0735-9640.
9. BACHEM, C. W. B. *cDNA-AFLP a tool for transcriptome analysis* [online]. Wiley-WCH, 2004 [cit. 2007-05-02]. Dostupné z: <http://www.dpw.wageningen-ur.nl/PV/aflp/cDNA-AFLP%20Protocol.htm>.

10. BACHEM, C. W. B. *et al.* Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protokol. In: *Plant Molecular Biology*. 1998, 16, 157-173. ISSN 0167-4412.
11. BAISAKH, N. *et al.* cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in a halophyte *Spartina alterniflora* Loisel. In: *Plant Science*. 2006, 170, 1141-1149. ISSN 0168-9452.
12. BARAKAT, A. *et al.* Genome wide identification of chilling responsive microRNAs in *Prunus persica*. In: *BMC Genomics*. 2012, 13, 481. ISSN 1471-2164.
13. BAŽANT, Z. *et al.* *Pěstujeme meruňky*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. 108s. ISBN 80-247-0873-6.
14. BHARGAVA, V. *et al.* Quantitative Transcriptomics using Designed Primer-based Amplification. In: *Scientific Reports*, 2013; 3. ISSN 2045-2322.
15. BLÁHA, J. *et al.* *Broskvoňe, meruňky a mandloně*. Praha: Academia, 1966. 443s.
16. BLAŽEK, J. *et al.* *Ovocnictví*. Praha: Květ, 1998. ISBN 80-85362-33-3.
17. BÖHLENIUS, H. *et al.* CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. In: *Science*. 2006, 312, 1040-1043. ISSN 1750-3841.
18. BREYNE, P. *et al.* Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. In: *Molecular Genetics and Genomics*. 2003, 269, 173-179. ISSN 1617-4615.
19. BREYNE, P. *et al.* Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *MGG*. In: *Molecular genetics and genomics*. 2003, 269, 173-179. ISSN 1617-4615.
20. BUFLER, G. Exogenous ethylene inhibits sprout growth in onion bulbs. In: *Annals of Botany*. 2009, 103, 23-28. ISSN 0305-7364.
21. CELIKEL, F. G., VANDOORN, W. G. Solute leakage lipid-peroxidation and protein-egradation during the senescence of *Iris* tepals. In: *Physiologia Plantarum*. 1995, 94, 515-521. ISSN 1399-3054.
22. CIFRANIČ, P. *Marhule*. Bratislava: Príroda, 1986. 115s.
23. COLEMAN, W. K. Carbon dioxide, oxygen and ethylene effect on potato tuber dormancy release and sprout growth. In: *Annals of Botany*. 1998, 82, 21-27. ISSN 0305-7364.

24. COLUCCI, G. *et al.* GCR1, the putative *Arabidopsis* G protein-coupled receptor gene is cell cycle-regulated, and its overexpression abolishes seed dormancy and shortens time to flowering. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, 99 (7), 4736-4741. ISSN 0027-8424.
25. COOKE, J. E. K. *et al.* The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. In: *Plant, Cell and Environment*. 2012, 35, 1707-1728. ISSN 1365-3040.
26. CORTÉS, T. *et al.* Sex versus parthenogenesis: A transcriptomic approach of photoperiod response in the model aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). In: *Gene*. 2008, 408, 146-156. ISSN 0378-1119.
27. COSGROVE, D. J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. In: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1999, 50, 391-417. ISSN 1543-5008.
28. COUVILLON, G. A., HENDERSHOTT, C. H. A characterization of the “after-rest” period of flower buds of two peach cultivars of different chilling requirements. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1974, 99, 23-26. ISSN 0003-1062.
29. CRABBE, J., BARNOLA, P. A new conceptual approach to bud dormancy in woody plants. In: LANG, G. A. *Plant Dormancy*. Wallingford: CAB International, 1996, 83-113. ISBN 0-85198-978-0.
30. ČECHOVÁ, J. *Genetická determinance dormance a kvetení u meruněk*. Lednice, 2007. Diplomová práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Fakulta zahradnická, Mendeleum, Ústav genetiky.
31. DELLA STRADA, G. *et al.* *Monografia di cultivar di Albicocco*. Roma: Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, 1989. 355s.
32. DIATCHENKO, L. *et al.* Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissuespecific cDNA probes and libraries. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1996, 93, 6025-6030. ISSN 1091-6490.
33. DIAZ-RIQUELME, J. *et al.* Genome-wide analysis of MIKCC-type MADS box genes in grapevine. In: *Plant Physiology*. 2009, 149, 354-369. ISSN 0032-0889.

34. DOWNS, R. J., BORTHWICK, H. A. Effect of photoperiod on growth of trees. In: *Botanical Gazette*. 1956, 117, 310-326. ISSN 1058-5893.
35. DURÍČ, B. The length of winter dormancy of flower buds and flowering time of some apricot cultivars. In: *Journal of Yugoslav Pomology*. 1980, 53-54. ISSN 1820-5054.
36. EAGLES, C. F., WAREING, P. F. Role of growth substances in regulation of bud dormancy In: *Physiologia Plantarum*. 1964, 17 (3), 697-709. ISSN 1399-3054.
37. EGEE, J. *et al.* Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. In: *Environmental and Experimental Botany*. 2003, 50, 79-85. ISSN 0098-8472.
38. FIŠEROVÁ, H. *et al.* Estimation of ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in plants by means. In: *Plant, Soil and Environment*. 2008, 54 (2), 55-60. ISSN 1214-1178.
39. FIŠEROVÁ, H. *et al.* Formation of ethylene, ethane and abscisic acid content in relation to dormancy of spring barley (*Hordeum vulgare* L) kernels. In: *Rostlinná Výroba*. 1996, 42 (6), 245-248. ISSN 0370-663X.
40. FIŠEROVÁ, H. *et al.* Fyziologická reakce břízy na stres a odolnost pupenů břízy k mrazu. In: *Sborník konference. Problematika zachování porostů náhradních dřevin v imisní oblasti Krušných hor*. Most: Ministerstvo zemědělství ČR - odvětví lesního hospodářství, 1999, s. 140. ISBN 80-238-3900-4.
41. FIŠEROVÁ, H. *et al.* Phytohormones as indicators of the degree of damage in birch (*Betula pendula*). In: *Biologia*. 2001, 56 (4), 405-409. ISSN 0006-3088.
42. FIŠEROVÁ, H. *et al.* Role of cytokinins in growth correlation between roots and stems in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. In: *Plant, Soil and Environment*. 2006, 52, 159-163. ISSN 1214-1178.
43. FIŠEROVÁ, H., HRADILÍK, J. Produkce etylénu a etanu při tvorbě adventivních kořenů na stonkových segmentech révy vinné. (Ethylene and ethane production during adventitious root formation on vine stem segments). In: *Rostlinná Výroba*. 1994, 40, 755-762. ISSN 0370-663X.
44. FOISSAC, X. *et al.* Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). In: *Acta Horticulturae*. 2001, 550 (1), 37-44. ISSN 0567-7572

45. FRY, S. *et al.* Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. In: *Biochemical Journal*. 1992, 282, 821-828. ISSN 0264-6021.
46. FUCHIGAMI, L. H. *et al.* A degree growth stage (°GS) model and cold acclimation in temperate woody plants. In: LI, P. H., SAKAI, A. (eds) *Plant cold hardiness and freezing stress mechanisms and crop implication*. New York: Academic, 1982. 93-116. ISBN 0-12-447602-3.
47. GARG, R. *et al.* Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.). In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, 396 (2), 283-288. ISSN 0006-291X.
48. GHASSEMIAN, M. *et al.* Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. In: *Plant Cell*. 2000, 12, 1117-1126. ISSN 1040-4651.
49. GRASSER, M. *et al.* Transcript elongation factor TFIIS is involved in *Arabidopsis* seed dormancy. In: *Journal of Molecular Biology*. 2009, 386 (3), 598-611. ISSN 0022-2836.
50. GRINDBERG, R. V. *et al.* RNA-sequencing from single nuclei. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110 (49), 19802-19807. ISSN 1091-6490.
51. HABJØRG, A. Photoperiodic ecotypes in Scandinavian trees and shrubs. In: *Report No. 71, Agricultural university of Norway*. 1978, 67, 1-20.
52. HANNERZ, M. Evaluation of temperature models for predicting bud burst in Norway spruce. In: *Canadian Journal of Forest*. 1999, 29, 9-19. ISSN 0045-5067.
53. HÄNNINEN, H., TANINO, K. Tree seasonality in a warming climate. In: *Trends in Plant Science*. 2011, 16, 412-416. ISSN 1360-1385.
54. HEDLEY, P. E. *et al.* Candidate genes associated with bud dormancy release in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). In: *BMC Plant Biology*. 2010, 10, 202. ISSN 1471-2229.
55. HEID, CH. A. *et al.* Real Time quantitative PCR. In: *Cold spring harbor laboratory press*. 1996, 6 (10), 986-994, ISSN 1054-9803.

56. HEIDE, O. M. Growth and dormancy in Norway spruce ecotypes (*Picea abies*). I. Interaction of photoperiod and temperature. In: *Physiologia Plantarum*. 1974, 30, 1-12. ISSN 1399-3054.
57. HEIDE, O. M. Interaction of photoperiod and temperature in the control of growth and dormancy of *Prunus species*. In: *Scientia Horticulturae*. 2008, 115, 309-314. ISSN 0304-4238.
58. HEIDE, O. M. Temperature rather than photoperiod controls growth cessation and dormancy in *Sorbus species*. In: *Journal of Experimental Botany*. 2011, 62, 15, 5397-5404. ISSN 0022-0957.
59. HEIDE, O. M., PRESTRUD, A. K. Low temperature, but not photoperiod controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. In: *Tree Physiology*. 2005, 25, 109-114. ISSN 0829-318X.
60. HENZELL, R. F. *et al.* Improving kiwifruit vine productivity with plant growth regulators. In: *Acta Horticulturae*. 1991, 297, 345-350. ISSN 0567-7572.
61. HLADÍK, F. *et al.* *Meruňky, broskve, mandle, ořechy vlašské a lískové*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1966. 320s.
62. HORVATH, D. P. *et al.* Transcriptome analysis identifies novel responses and potential regulatory genes involved in seasonal dormancy transitions of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). In: *BMC Genomics*. 2008, 9 (1), 536. ISSN 1471-2164.
63. HORVATH, D. P. *et al.* Transcriptome analysis of leafy spurge (*Euphorbia esula*) crown buds during shifts in well-defined phases of dormancy. In: *Weed Science*. 2006, 54, 821-827. ISSN 1939-747X.
64. HORVATH, D. P. *et al.* Knowing when to grow: Signals regulating bud dormancy. In: *Trends in Plant Science*. 2003, 8, 534-540. ISSN 1360-1385.
65. CHEN, F. *et al.* A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. In: *Journal of Experimental Botany*. 2002, 53, 215-223. ISSN 0022-0957.
66. CHENG, W. H. Antagonism between abscisic acid and ethylene in *Arabidopsis* acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism and signaling pathways. In: *Plant molecular biology*. 2009, 71 (1-2):61-80. ISSN 0167-4412.
67. CHINNUSAMY, V. *et al.* Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant. In: *Journal of Integrative Plant Biology*. 2008, 50 (10), 1187-1195. ISSN 1744-7909.

68. CHOUARD, P. Vernalization and its relations to dormancy. In: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1960, 11, 191-238. ISSN 1543-5008.
69. IBÁÑEZ, C. *et al.* Circadian clock components regulate entry and affect exit of seasonal dormancy as well as winter hardiness in *Populus* trees. In: *Plant Physiology*. 2010, 153, 1823-1833. ISSN 0032-0889.
70. IVANOVA, N. B., BELYAVSKY, A. V. Identification of differential expressed by restriction endonuclease-based gene expression fingerprinting. In: *Nucleic Acids Research*. 1995, 23 (15), 2954-2958. ISSN 1362-4962.
71. JAIN, M. *et al.* Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative Real-Time PCR. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006, 345, 646-651. ISSN 0006-291X.
72. JAN, T. *Peckoviny*. Olomouc: Vydavatelství Petr Baštan, 2011, 230s. ISBN 978-80-87091-18-0.
73. JANSSEN, B. J. *et al.* Global gene expression analysis of apple fruit development from the floral bud to ripe fruit. In: *BMC Plant Biology*. 2008, 8, 16. ISSN 1471-2229.
74. JIA, Y. *et al.* Subtractive cDNA libraries identify differentially expressed genes in dormant and growing buds of leafy spurge (*Euphorbia esula*). In: *Plant molecular biology*. 2006, 61, 329-344. ISSN 0167-4412.
75. JIMÉNEZ S, *et al.* Phylogenetic analysis and molecular evolution of the dormancy associated MADS-box genes from peach. In: *BMC Plant Biology*. 2009, 9 (1), 81. ISSN 1471-2229.
76. JIMÉNEZ, S. *et al.* Gene expression of DAM5 and DAM6 is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate. In: *Plant Molecular Biology*. 2010a, 73, 157-167. ISSN 0167-4412.
77. JIMÉNEZ, S. *et al.* Identification of genes associated with growth cessation and bud dormancy entrance using a dormancy-incapable tree mutant. IN: *BMC Plant Biology*. 2010b, 10, 25. ISSN 1471-2229.
78. JOHANSON, U. *et al.* Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. In: *Science*. 2000, 290, 344-347. ISSN 1750-3841.

79. JONKERS, H. Biennial bearing in apple and pear: a literature survey. In: *Scientia Horticulturae*. 1979, 11, 303-317. ISSN 0304-4238.
80. JULIAN, C. *et al.* Flower bud drop and pre-blossom frost damage in apricot (*Prunus armeniaca* L.). In: *Journal of Applied Botany and Food Quality-Angewandte Botanik*. 2007, 81, 21-25. ISSN 1613-9216.
81. JULIAN, C. *et al.* Stamen development and winter dormancy in apricot (*Prunus armeniaca*). In: *Annals of Botany*. 2011, 108 (4), 585-587. ISSN 0305-7364.
82. KALÁŠEK, J., RICHTER, M. *Meruňky, broskvoňe na zahrádce*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989, 48s.
83. KARIEV, B. A. Organic dormancy period in apricot. Sbornik Nauchnykh Trudov Tadzhičskogo Nauchno-Issledo-vatel'skogo Instituta Sadovodstva, Vinogradarstva i Ovoshčevodstva. In: *Referativnyi Zhurnal*. 1987, 3, 46-48. ISSN 0034-2467.
84. KATO, K. RNA fingerprinting by molecular indexing. In: *Nucleic Acids Research*. 1996, 24, 394-395. ISSN 1362-4962.
85. KAWABATA, S. *et al.* Identification of differentially expressed genes during flower opening by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray analysis in *Eustoma grandiflorum*. In: *Scientia Horticulturae*. 2009, 122, 129-133. ISSN 0304-4238.
86. KEILIN, T. *et al.* Digital expression profiling of a grape-bud EST collection leads to new insight into molecular events during grape-bud dormancy release. In: *Plant Science*. 2007, 173 (4), 446-457. ISSN 1212-2580.
87. KESTER, D. E. *et al.* Size, shape, and weight relationship in almond kernels. In: *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*. 1965.
88. KEVIL, C. G. *et al.* An Improved, Rapid Northern Protocol. In: *Biochemical and biophysical research communications*. 1997, 238, 277-279. ISSN 0006-291X.
89. KIDOU, S., EJIRI, S. Isolation, characterization and mRNA expression of four cDNAs encoding translation elongation factor 1A from rice (*Oryza sativa* L.). In: *Plant Molecular Biology*. 1998, 36, 137-148. ISSN 0167-4412.
90. KIVIOJA, T. *et al.* Optimization of cDNA-AFLP experiments using genomic sequence data. In: *Bioinformatics*. 2005, 21 (11), 2573-2579. ISSN 1460-2059.
91. KOČÁREK, E., PÁNEK, M. *Klinická cytogenetika I: úvod do klinické cytogenetiky*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1880-7.

92. KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy – výkladový slovník*. Praha: Vydavatelství VŠCHT. 2004. ISBN 80-7080-551-X
93. KRAMER, P. J. Effects of variation in length of day on growth and dormancy of trees. In: *Plant Physiology*. 1936, 11, 127-137. ISSN 1543-5008.
94. KRAWIARZ, K., SZCZOTKA, Z. Activity of ATPases during dormancy breaking in Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds. In: *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 2000, 69, 119-121. ISSN 0001-6977.
95. KRŠKA, B. *et al.* Genetic Resources of *Prunus armeniaca* L. in the Czech Republic. In: *Acta Horticulturae*. 2004, 663 (1), 589-591. ISSN 0567-7572.
96. KRŠKA, B. The evaluation of deep dormancy of two apricot progenies. In: *Acta horticulturae n°488*. 1999. ISBN 90-6605-891-9.
97. KUMEROVÁ, M. *et al.* Understanding the effect of organic pollutant fluoranthene on pea *in vitro* using cytokinins, ethylene, ethane and carbon dioxide as indicators. In: *Plant Growth Regulation*. 2010, 61, 161-174. ISSN 0721-7595.
98. LANG, G. A. *et al.* Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. In: *Horticultural Science*. 1987, 22, 371-377. ISSN 0862-867X.
99. LANG, G. A. Dormancy: a new terminology. In: *Horticultural Science*. 1987, 22, 817-820. ISSN 0862-867X.
100. LAUŠMAN, F. *Hodnocení délky dormance květních pupenů meruněk*. Lednice, 2007. Diplomová práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Fakulta zahradnická, Ústav ovocnictví.
101. LEIDA, C. *et al.* Identification of genes associated with bud dormancy release in *Prunus persica* by suppression subtractive hybridization. In: *Tree Physiology*. 2010, 30 (5), 655-666. ISSN 0829-318X.
102. LI, Z. G. *et al.* Dormancy-associated MADS genes from the EVG locus of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. In: *Journal of Experimental Botany*. 2009, 60 (12), 3521-3530. ISSN 0022-0957.
103. LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. In: *Methods*. 2001, 25 (4), 402-408. ISSN 1046-2023.

104. MAŇÁKOVÁ, E., SEICHERTOVÁ, A. *Metody v histologii*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0230-X.
105. MAUREL, K. *et al.* Sorbitol uptake is regulated by glucose through the hexokinase pathway in vegetative peach-tree buds. In: *Journal of Experimental Botany*. 2004, 55, 879-888. ISSN 0022-0957.
106. MAZZITELLI, L. *et al.* Co-ordinated gene expression during phases of dormancy release in raspberry (*Rubus idaeus* L.) buds. In: *Journal of Experimental Botany*. 2007, 58 (5), 1035-1045. ISSN 0022-0957.
107. MIČUDA, S. *et al.* *Molekulárně biologické metodiky ve farmakologii* [online]. Ústav farmakologie, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, 2006 [cit. 2015-01-28]. Dostupné z: <http://web.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/1.htm>
108. MORAVCOVÁ, K. *Vytvoření metodiky identifikace odrůd révy vinné pomocí molekulárně genetických metod*. Lednice 2005. Disertační práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Fakulta zahradnická, Mendeleum, Ústav genetiky.
109. NASSUTH A. *et al.* Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. In: *Journal of Virological Methods*. 2000, 90, 37-49. ISSN 0166-0934.
110. NEČAS, T. *et al.* *Dormance u meruněk* [online]. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2004 [cit. 2004-03-21]. Dostupné z: http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/eltronic_ovoc/_private/ovoc_1/ovoc_1.htm
111. NISHITANI, K., TOMINAGA, R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. In: *Journal of Biological Chemistry*. 1992, 267, 21058-21064. ISSN 0021-9258.
112. NITRANSKÝ, Š. Ukončovanie hlbkej dormancie generatívnych púčikov vybraných kultivarov marhúl' v podmienkach stredného povážia (SSR). In: *Pol'nohospodárstvo*, 1981. 27 (7). ISSN 0551-3677.
113. NITRANSKÝ, Š. Ukončovanie hlbkej dormancie generatívnych púčikov širšej kolekcie marhúl'. In: *Zahradníctví*, 1993. 20 (1). ISSN 1211-0922.

114. NITSCH, J. P. Photoperiodism in woody plants. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1957, 70, 526-544. ISSN 0003-1062.
115. OR, E., *et al.* Dormancy in grape buds: isolation and characterization of catalase cDNA and analysis of its expression following chemical induction of bud dormancy release. In: *Plant Science*. 2002, 162 (1), 121-130. ISSN 0168-9452.
116. OZSOLAK, F. *et al.* Direct RNA sequencing. In: *Nature*. 2009, 461, 814-818. ISSN 0028-0836.
117. PARTANEN, J. *et al.* Effects of photoperiod and temperature on the timing of bud burst in Norway spruce (*Picea abies*). In: *Tree Physiology*. 1998, 18, 811-816. ISSN 0829-318X.
118. PAWŁOWSKI, T. A. Proteome analysis of Norway maple (*Acer platanoides* L.) seeds dormancy breaking and germination: influence of abscisic and gibberellic acids. In: *BMC Plant Biology*. 2009, 9, 48. ISSN 1471-2229.
119. PAWŁOWSKI, T. A. Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: Influence of abscisic and gibberellic acids. In: *Proteomics*. 2007, 7, 2246-2257. ISSN 1615-9861.
120. PÉREZ, F. J., BURGOS, B. Alternations in the pattern of peroxidase isoenzymes and transient increases in its activity and H₂O₂ levels take place during the dormancy cycle of grapevine buds: the effect of hydrogen cyanamide. In: *Plant growth regulation*. 2004, 43 (3), 213-220. ISSN 0176-6903.
121. PÉREZ, F. J., LIRA, W. Possible role of catalase in post-dormancy bud break in grapevines. In: *Journal of Plant Physiology*. 2005, 162 (3), 301-308. ISSN 0176-1617.
122. PROCHÁZKA, S. *et al.* *Botanika, morfologie a fyziologie rostlin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1999. ISBN 80-7157-313-2.
123. PROCHÁZKA, S. *et al.* *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 2003. ISBN 80-200-0586-2.
124. PROKEŠ, J. *et al.* Význam oxidu uhličitého a ethylenu v procesu sladování. In: *Kvasný průmysl*. 2006, 52 (11-12), 349-352. ISSN 0023-5830.
125. QIN, L. *et al.* GenEST, a powerful bidirectional link between cDNA sequence data and gene expression profiles generated by cDNA-AFLP. In: *Nucleic Acids Research*. 2001, 29 (7), 1616-1622. ISSN 0305-1048.

126. QUARRIE, S. A. *et al.* A monoclonal antipody to (S)-abscisic: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in trude extracts of ceresû and lupin leaves. In: *Planta*. 1988, 183, 330-339. ISSN 0032-0935.
127. RABBANI, M. A. *et al.* Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA Gel-Blot analyses. In: *Plant Physiology*. 2003, 133 (4), 1755-67. ISSN 0032-0889.
128. REHDER, A. *Manual of cultivated trees and shrubs: hardy in North America exclusive of the subtropical and warmer temperate regions*. New York (USA): The Blackburn Press, 2nd edition 2001. 996s. ISBN 13 978-1930665323.
129. RINNE, P. L. H. *et al.* *Genetics and Genomics of Populus: Perennial life style of Populus: dormancy cycling and overwintering*. Heidelberg: Springer, 2010. 171-200s. ISBN 978-1-4419-1541-2.
130. RINNE, P. L. H. *et al.* Chilling of dormant buds hyperinduces *FLOWERING LOCUS T* and recruits GA-Inducible 1,3-b-Glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. In: *The Plant Cell*. 2011, 23 (1), 130-146, ISSN 1040-4651.
131. ROHDE, A. *et al.* The ABSCISIC ACID – INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is expressed during vegetative quiescence processes in *Arabidopsis*. In: *Plant Cell and Environment*. 1999, 22, 261-270. ISSN 1365-3040.
132. ROHDE, A., BHALERAO, R. P. Plant dormancy in the perennial context. In: *Trends in Plant Science*. 2007, 12, 1360-1385. ISSN 1360-1385.
133. ROSE, J. K. C., BENNETT, A. B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. In: *Trends in Plant Science*. 1999, 4, 176-183. ISSN 1360-1385.
134. RUHLAND, W. *Handbuch der pflanzenphysiologie, Encyclopedia of plant physiology*. Heidelberg: Springer, 1961. ISBN 978-3-662-11209-0
135. RUIZ, D. *et al.* Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. In: *Environmental and Experimental Botany*. 2007, 61, 254-263. ISSN 0098-8472.
136. RUONALA, R. *et al.* CENL1 Expression in the Rib Meristem Affects Stem Elongation and the Transition to Dormancy in *Populus* W OA. In: *The Plant Cell*. 2008, 20 (1), 59-74. ISSN 1040-4651.

137. RUTTINK, T. *et al.* A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. In: *Plant Cell*. 2007, 19, 2370-2390. ISSN 1040-4651.
138. RYLSKI, I. *et al.* Dual effects of ethylene on potato dormancy and sprout growth. In: *Plant Physiology*. 1974, 53, 658-662. ISSN 0032-0889.
139. SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3. vyd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN 0-87969-576-5.
140. SAMISH, R. M. Dormancy in woody plants. In: *Annual Review of Plant Biology*. 1954, 5, 183-204. ISSN 1040-2519.
141. SANTAMARÍA, M. E. *et al.* Transcriptome analysis of chestnut (*Castanea sativa*) tree buds suggests a putative role for epigenetic control of bud dormancy. In: *Annals of Botany*. 2011, 108, 485-498. ISSN 0305-7364.
142. SASAKI, R. *et al.* Functional and Expressional Analyses of PmDAM Genes Associated with Endodormancy in Japanese Apricot. In: *Plant Physiology*. 2011, 157 (1), 485-497. ISSN 0032-0889.
143. SCOCCIANTI, V. *et al.* Ubiquitin conjugation to endogenous proteins in the dormant tuber of *Helianthus tuberosus* and during the first cell cycle. In: *Physiologia Plantarum*. 1997, 101, 77-85. ISSN 1399-3054.
144. SCHENK, P. M. *et al.* Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, 97 (21), 11655-11660. ISSN 1091-6490.
145. SCHUCH, U. K. *et al.* Flowering, ethylene production, and ion leakage of coffee in response to water-stress and gibberellic-acid. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1992, 117 (1), 158-163. ISSN 0003-1062.
146. SILLER-CEPEDA, J. H. *et al.* Glutathione content in peach buds in relation to development and release of rest. In: *Plant and Cell Physiology*. 1992, 33, 867-872. ISSN 0032-0781.
147. SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. 825. ISBN 978-80-210-4852-2.
148. SUMITOMO, K. *et al.* Involvement of the ethylene response pathway in dormancy induction in chrysanthemum. In: *Journal of Experimental Botany*. 2008, 59 (15), 4075-4082. ISSN 0022-0957.
149. SUTTLE, J. C. Involvement of ethylene in potato microtuber dormancy. In: *Plant Physiology*. 1998, 118, 843-848. ISSN 0032-0889.

150. SYLVÉN, N. Lang-och kortdagstyper av de svenska skogstraden, Longday and shortday types of Swedish forest trees. In: *Svensk Papperstidning*. 1940, 43, 317-24, 332-42.
151. ŠEBÁNEK, J. Dormance a senescence. In: PROCHÁZKA, S. *et al. Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 2003, 388-400. ISBN 80-200-0586-2.
152. ŠEBÁNEK, J., KOCOUREK, R. Dormance. In: *Zahradnický slovník naučný díl 2*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1996. 139-141s. ISBN 80-85120-51-8
153. ŠMARDA, J. *et al. Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194. ISBN 80-210-3841-1.
154. ŠTÍPEK, S. *Stručná biochemie: Uchování a exprese genetické informace*. 1. vydání. Bethesda: MedPrint, 1998. ISBN 80-902036-2-0.
155. TABUENCA, M. C. Duración del periodo de reposo a distintas temperaturas y evaluación de las necesidades de frío en variedades de albaricoquero y almendro. In: *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*. 1979, 14, 519-531. ISSN 0365-1800.
156. TABUENCA, M. C. Necesidades de frío invernal en variedades de albaricoquero. In: *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*. 1968, 9, 10-24. ISSN 0365-1800.
157. TETERA, V. Odrůdová testace genetických zdrojů pomocí historických metod bádání, ochrana biodiversity rostlin. In: *Sborník referátů z vědecké conference*. 1995, 81-82.
158. TOPP, B. L. Low-chill cultivar development. In: LAYNE, D. R., BASSI, D. *The peach – Botany, production and uses*. CAB International. 2008, 107-133. ISBN 978-1-84593-386-9.
159. TRYON, M. E. L., HARMER, S. L. “XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER” coordinates light signals for proper timing of photomorphogenesis and the circadian clock in *Arabidopsis*. In: *Plant Cell*. 2008, 20, 1244-1259. ISSN 1040-4651.
160. VACHŮN, Z. *et al.* Výzkum ukončování hlubokého vegetačního klidu u 12 odrůd meruňek (*Prunus armeniaca* L. geotyp *occidentalis*). In: *Acta universitatis agriculturae*. 1984, 4. ISSN 0524-7403.

161. VACHŮN, Z. *Ovocnictví. Pěstování meruňek*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1999. ISBN 80-7157-393-0.
162. VACHŮN, Z. Phenophases of blossoming and picking maturity and their relationships in twenty apricot genotypes for a period of six years. In: *Horticultural science* (Prague). 2003, 30 (2), 43-504. ISSN 0862-867X.
163. VACHŮN, Z., HUDÝ, I. Vegetační klid hlavních genotypů meruňek (*Armeniaca vulgaris* Lam.) v podmínkách jižní Moravy (ČSSR). In: *Acta universitatis agriculturae*. 1974, 1. ISSN 1211-8516.
164. VACHŮN, Z., HUDÝ, I. Vegetační klid hlavních genotypů meruňek (*Armeniaca vulgaris* Lam.) v podmínkách jižní Moravy (ČSSR). In: *Acta universitatis agriculturae*. 1975, 1. ISSN 0524-7403.
165. VACHŮN, Z., HUDÝ, I. Výsledky průzkumu vegetačního klidu u meruňkových odrůd 'Velkopavlovická', 'Rakovského', 'Bredská'. In: *Acta universitatis agriculturae*. 1971, 1. ISSN 0524-7403.
166. VELCULESCU, V. E. *et al.* Serial analysis of gene expression. In: *Science*. 1995, 270 (5235), 484-7. ISSN 1750-3841.
167. VISSER, K. GTP binding activity of membrane proteins in isolated barley embryo is enhanced by abscisic acid. In: *Plant Science*. 1999, 148, 139-145. ISSN 1360-1385.
168. VUYLSTEKE, M. *et al.* AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. In: *Nature Protocols*. 2007, 2, 1399-1413. ISSN 1754-2189.
169. VYSLOUŽIL, J., NEČAS, T. *Databáze odrůd ovocných plodin* [online]. Mendelova univerzita v Brně, 2010 [cit. 2011-10-17]. Dostupné z: http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/eltronic_ovoc/_private/datab_odrud/index.html.
170. WALTON, E. F. A rapid transcriptional activation is induced by the dormancy-breaking chemical hydrogen cyanamide in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) buds. In: *Journal of Experimental Botany*. 2009, 60 (13), 3835-3848. ISSN 0022-0957.
171. WANG, S. Y. *et al.* Changes in metabolic enzyme activities during thidiazuron-induced lateral budbreak of apple. In: *Journal of Horticultural Science*. 1991, 26, 171-173. ISSN 0862-867X.

172. WANG, Z. *et al.* RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. In: *Nature Reviews Genetics*. 2009, 10, 57-63. ISSN 1471-0056.
173. WAREING, P. F. Photoperiodism in woody plants. In: *Annual Review of Plant Biology*. 1956, 7, 191-214. ISSN 0066-4294.
174. WEISER, C. J. Cold resistance and injury in woody plants. In: *Science*. 1970, 169, 1269-1278. ISSN 1750-3841.
175. WELLING, A., PALVA, E. T. Molecular control of cold acclimation in trees. In: *Plant Physiology*. 2006, 127, 167-181. ISSN 0032-0889.
176. WU, R. M. *et al.* Conservation and divergence of four kiwifruit SVP-like MADS-box genes suggest distinct roles in kiwifruit bud dormancy and flowering. In: *Journal of Experimental Botany*. 2012, 63 (2), 797-807. ISSN 0022-0957.
177. XIAO, X. *et al.* A silver-staining cDNA-AFLP protocol suitable for transcript profiling in the latex of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). In: *Molecular Biotechnology*. 2009, 42, 91-99. ISSN 1073-6085.
178. YAKOVLEV, I. A. *et al.* Analysis of gene expression during bud burst initiation in Norway spruce via ESTs from subtracted cDNA libraries. In: *Tree Genetics & Genomes*. 2006, 2, 39-52. ISSN 1614-2942.
179. YAMANE, H. *et al.* Differential expression of dehydrin in flower buds of two Japanese apricot cultivars requiring different chilling requirements for bud break. In: *Tree Physiology*. 2006, 26, 1559-1563. ISSN 0829-318X.
180. YAMANE, H. *et al.* Expressional regulation of PpDAM5 and PpDAM6, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment. In: *Journal of Experimental Botany*. 2011, 62 (10), 3481-3488. ISSN 0022-0957.
181. YAMANE, H. *et al.* Suppression subtractive hybridization and differential screening reveals endodormancy-associated expression of an SVP/AGL24-type MADSbox gene in lateral vegetative buds of japanese apricot. In: *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2008, 133, 708-716. ISSN 0003-1062.
182. YOOYONGWECH, S. *et al.* Differential adaptation of high- and low-chill dormant peaches in winter through aquaporin gene expression and soluble sugar content. In: *Plant Cell Reports*. 2009, 28, 1709-1715. ISSN 0721-7714.

183. ZHANG, G. *et al.* Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome. In: *Genome research*. 2010, 20 (5), 646-654. ISSN 1088-9051.
184. ZHANG, H. *et al.* Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequence tags. In: *Plant Journal*. 2004, 40, 276-290. ISSN 1365-313X.
185. ZHAO, Z. S. *et al.* Pheromone signalling in *Saccharomyces cerevisiae* requires the small GTP-binding protein Cdc42p and its activator CDC24. In: *Molecular and Cellular Biology*. 1995, 15 (10), 5246-57. ISSN 0270-7306.
186. ZHENG, C. L. *et al.* Abscisic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism. In: *Journal of Experimental Botany*. 2015, 66 (5), 1527-1542. ISSN 0022-0957.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A/T</i>	dusíkaté báze adenin/thymin
ABA	kyselina abscisová
AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragment z anglického „Amplified Fragment Length Polymorphism”
AML1	gen pro <i>ARABIDOPSIS MEI2 LIKE1</i>
Angl.	anglický
ANT	gen „AP2-like ethylene-responsive transcription factor“
<i>Apo I</i>	restrikční enzym izolovaný z <i>Arthrobacter citreus</i>
<i>Apo-AD-H</i>	horní řetězec <i>Apo</i> adaptoru. <i>Apo</i> adaptor je komplementární k lepivému konci DNA řetězce, který vznikl po štípání restrikčním enzymem <i>Apo I</i>
<i>Apo-AD-S</i>	spodní řetězec <i>Apo</i> adaptoru. <i>Apo</i> adaptor je komplementární k lepivému konci DNA řetězce, který vznikl po štípání restrikčním enzymem <i>Apo I</i>
atd.	a tak dále
ATGP4	protein „geranylgeranylated protein“
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry bází
CDKB	gen „CYCLIN-DEPENDENT KINASE B“
cDNA	kyselina deoxyribonukleová komplementární
cDNA-AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů při použití komplementární DNA
CENL 1	gen „CENTRORADIALIS-LIKE1“
CO ₂	oxid uhičitý
CU	chladové jednotky z anglického „cilling units“
CYC	gen pro cyclin
č.	číslo

DAM	označení genů vycházející z anglického „dormancy-associated MADS-box“
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidintrifosfát
DD	diferenční display z anglického „differential display“
DEPC	dietylpyrokarbonát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DNA	kyselina deoxyribonukleová z anglického „deoxiribonucleic acid“
DNase	enzyme, který štěpí molekuly deoxyribonukleové kyseliny (DNA)
dNTP	deoxiribonukleotidtrifosfát (směs dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
DRSTM	metoda přímého sekvenování z anglického „Direct RNA sequencing“
ds cDNA	z anglického “double-strand cDNA” – dvouvláknová komplementární DNA
dT	deoxythymidin
DTT	dithiothreitol
dTTP	deoxythymidintrifosfát
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová / Chelaton III
eEF1A	elongační faktor „encoding elongation factor 1-alpha“
ESFY	fytoplazma Evropské žloutenky peckovin – „European Stone Fruit Yellows Phytoplasma“
EST	sekvenování exprimovaných sekvencí z anglického „expressed sequence tag“
<i>et al.</i>	z latinského „et alii“ – a jiní
Evg	stálezelený z anglického „evergreen“
EXGT-A1	gen pro xyloglucan endotransglykosylázu hydrolázu
FAM	fluorescenční značka / barvivo – modrá
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FT	gen „FLOWERING LOCUS T“
G/C	dusíkaté báze guanin/cytosine

GC-MS	metoda kombinující plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií
GCN5L	gen pro histon acetyltransferázu
GPI	kotva, která umožňuje připojení bílkoviny na buněčnou membránu
GST	gen pro glutathion S-transferázu
GTP	protein účastnící se vnitrobuněčné signalizace
HC	hydrogen cyanamide
hnRNA	primární transkript, též heterogenní nukleární RNA
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. „high-performance liquid chromatography”)
http://	zkratka pro: Hypertext Transfer Protocol
HUB2	gen pro mono-ubiquitinázu
ISH	metoda <i>in situ</i> hybridizace z anglického „ <i>in situ</i> hybridization“
JOE	fluorescenční značka / barvivo – zelená
MADS-box	proteiny tvoří rodinu transkripčních faktorů
MDH	enzym malát dehydrogenáza
MENDELU	Mendelova univerzita v Brně
miRNA	mikro RNA
mj.	mimo jiné
MMLV	z anglického „Moloney murine leukemia virus” – reverzní transkriptáza z Moloneyho myšního leukemického viru
mRNA	kyselina ribonukleová mediátorová
<i>Mse</i> I	restrikční enzym izolovaný z <i>Micrococcus</i> species
<i>Mse</i> -AD-H	horní řetězec <i>Mse</i> adaptoru. <i>Mse</i> adaptor je komplementární k lepivému konci DNA řetězce, který vznikl po štípání restrikčním enzymem <i>Mse</i> I
<i>Mse</i> -AD-S	spodní řetězec <i>Mse</i> adaptoru. <i>Mse</i> adaptor je komplementární k lepivému konci DNA řetězce, který vznikl po štípání restrikčním enzymem <i>Mse</i> I
např.	například

NCBI	zkratka názvu elektronické databáze z anglického „National Center for Biotechnology Information”
NED	fluorescenční značka / barvivo – žlutá
NGS	sekvenování nové generace z anglického „next generation sequencing“
NPGR2	gen pro „calmodulin binding protein“
obr.	obrázek
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	z anglického “Polymerase Chain Reaction” – polymerázová řetězová reakce
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
poly A+	je konec mRNA, na kterém se nachází sekvence asi 40-250 adeninových (A) nukleotidů. Primery komplementární k tomuto konci mRNA selektivně amplifikují mRNA, tzn. exprimované geny
popř.	popřípadě
PPV	virus šarky švestky – „Plum pox virus“ – též nazývaný: virové neštovice švestky
PSII	protein fotosystému II
PttLHY1	gen „LATE ELONGATED HYPOCOTYL1“
PVP	polyvinylpyrolidon
QTL	lokusy kvantitativních znaků z anglického „quantitative trait loci“
Real-Time	(PCR) v reálném čase
RIA	radioimunoanalytická metoda
RM	rib zóna meristému z anglického „ribmeristem“
RNA seq	metoda sekvenování transkriptomu
RNA	kyselina ribonukleová
RNase	enzym, který štěpí řetězce ribonukleové kyseliny (RNA)
RNáza	enzym, který štěpí řetězce ribonukleové kyseliny (RNA)
rpm	otáčky za minutu z anglického “rotation per minute”

<i>Rsa</i> I	restrikční enzym izolovaný z <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
RT	reversní transkripce
RT-PCR	reversní transkripce – polymerázová řetězová reakce
SAGE	řadové analýzy genové exprese „serial analysis of gene expression“
SDS	sodium dodecyl sulfát
SEO	odrůda meruněk ‘Stark Early Orange’
siRNA	krátké interferující RNA
SLS	sodium laury sarkosyl
SOLiD	sekvenace pomocí ligace a detekce oligonukleotidů z anglického „Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection“
spp.	subspecies
ss cDNA	z anglického “single-strand cDNA” – jednovláknová komplementární DNA
SSH/MOS	supresivní subtraktivní hybridizace se zrcadlovou orientací výběru z anglického „suppression subtractive hybridization with mirror orientation selection“
str.	strana
SVP	krátká vegetativní fáze z anglického „short vegetative phase“
tab.	tabulka
TAE	elektroforetický pufr obsahující Trizma bázi, kyselinu octovou a EDTA
Taq-Pol	enzym DNA polymeráza izolovaný z <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	elektroforetický pufr obsahující Trizma bázi, kyselinu boritou a EDTA
TE	pufr obsahující Trizma bázi a EDTA
TEMED	Tetrametyletylendiamin – katalyzátor polymerizační reakce
TIGER	elektronická databáze – „TIGR Plant Transcript Assemblies“
tj.	to je
Tm	melting temperature – teplota tání
tRNA	transferová RNA

tzn.	to znamená
USA	spojené státy americké z anglického „United States of America”
UV	ultrafialové záření
UVC7	enzym „putative E2 ubiquitin-conjugating enzyme“
viz	zkrácené latinské „videre licet“ (licet – lze, doslova „lze vidět“)
XAP-5	jaderný protein s DNA vazebnou aktivitou
XTH	gen pro xyloglukan endotransglykosylázu / hydrolázu
ZF	Zahradnická fakulta

10 SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ A SPOLUAUTORSTVÍ

Publikace související s tématem disertační práce

Abstrakt ve sborníku

1. ČECHOVÁ, J., BARÁNEK, M., KRŠKA, B., PIDRA, M. Sequencing of genes correlated with the exit of apricot flower buds from endogenous dormancy. In: *Sborník – New developments in green gene technology*. 1. vyd. Szeged, Hungary: Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, 2009.

Článek ve sborníku

2. ČECHOVÁ, J., BARÁNEK, M., KRŠKA, B., PIDRA, M. Analýza transkripční aktivity genů v květních pupenech meruněk v závěru endogenní dormance. In: *Sborník – Veda mladých*. Nitra, 2007.
3. ČECHOVÁ, J., BARÁNEK, M., KRŠKA, B., PIDRA, M. Nové možnosti stanovení výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance. [CD-ROM]. In: *Sborník – Trendy a tradice 2010*. Technologické trendy a kvalita zahradnické produkce. ISBN 978-80-7375-437-2.

Článek v odborném periodiku

4. ČECHOVÁ, J., BARÁNEK, M., PIDRA, M. Optimization of the Preparation of ds cDNA from Flower Buds of Apricot for the cDNA-AFLP Analysis. In: *Acta Horticulturae*. 2009, 839, 537-544. ISSN 0567-7572.
5. ČECHOVÁ, J., FIŠEROVÁ, H., KLEMŠ, M., KRŠKA, B., PIDRA, M. Fyziologické markery pro stanovení výstupu květních pupenů meruněk z endogenní

- dormance. In: *Acta Horticulturae et Regiotecturae*. 2009, 12, 59-62. ISSN 1335-2563.
6. ČECHOVÁ, J., BARÁNEK, M., PIDRA, M. Potencionální inhibitory výstupu květních pupenů meruněk z endogenní dormance. In: *Úroda*. 2012, 60, 9, 130-135. ISSN 0139-6013.
 7. ČECHOVÁ, J., BARÁNEK, M., KRŠKA, B., PIDRA, M. Screening of differentially expressed genes during the end of endogenous dormancy of flower buds in *Prunus armeniaca* L. In: *Plant Growth Regulation*. 2012, 67, 2, 141-150. ISSN 0167-6903.

Ostatní publikace a spoluautorství

Abstrakt ve sborníku

8. ONDRUŠIKOVÁ, E., SASKOVÁ, H., ČECHOVÁ, J., KŘIŽAN, B. The effect of genotype on sanitation of garlic plants (*Allium sativum* L.). In: *Sborník – New developments in green gene technology*. 1. vyd. Szeged, Hungary: Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, 2009.
9. BARÁNEK, M., ČECHOVÁ, J., RADDOVÁ, J., HOLLEINOVÁ, V. Zigzag growth of grapevine nodes and the role of phytoplasma diseases in this syndrome. In: *Sborník – 2ND EUROPEAN BOIS NOIR WORKSHOP 2011*. 1. vyd. Via G. Belzoni, Padova, Libreria Editrice Università di Padova. 2011, 55-56. ISBN 978-88-97081-06-7.
10. KUDĚLKOVÁ, M., ČECHOVÁ, J., SASKOVÁ, H. Comparison of test results of garlic plants for presence Carlaviruses by different method. In: *Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin a Fyziologické sekce Slovenské botanické společnosti*. 1. vyd. Praha: 2012, 73. ISSN 1213-6670.
11. EICHMEIER, A., PEŇÁZOVÁ, E., ČECHOVÁ, J. Genetic diversity of partial hrpF and Zur genes in populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica oleracea* convar. *capitata* L. in the Czech Republic. In: *Proceeding of abstracts from IHC 2014*. 1. vyd. Brisbane: 2014.

12. KUDĚLKOVÁ, M., ČECHOVÁ, J., BARÁNEK, M. Using of Antivirals for Onion Yellow Dwarf Virus Elimination. In: *The 8th Scandinavian Plant Physiology Society PhD Students Conference*. Conference Book. 1. vyd. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2014, 50. ISBN 978-91-576-9212-2.
13. KUDĚLKOVÁ, M., EICHMEIER, A., BARÁNEK, M., ČECHOVÁ, J. Development of RT-PCR Method for Detecting GCLV by Specific Primers. In: *Proceeding of abstracts from IHC 2014*. 1. vyd. Brisbane: 2014.

Článek ve sborníku

14. PIDRA, M., BARÁNEK, M., ČECHOVÁ, J. cDNA-AFLP as a Tool for Transcriptome analysis in Perennial Vegetative Propagated Plant Species. In: ŘEHOUT, V. *Biotechnology 2008*. 1. vyd. České Budějovice: Scientific Pedagogical Publishing, 2008, 205-209. ISBN 80-85645-58-0.
15. ČECHOVÁ, J., HOLLEINOVÁ, V., RADDOVÁ, J. Svinutka révy 1 (GLRaV-1) v České republice a její detekce. [CD-ROM]. In: *Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin zborník zo 17. vedeckej konferencie*. 74-75. ISBN 978-80-89417-23-0.
16. KUDĚLKOVÁ, M., ČECHOVÁ, J., SASKOVÁ, H. Srovnání výsledků testování *in vitro* rostlin česneku kuchyňského na přítomnost virů odlišnými metodami. In: *18. Nove poznatky z genetiky a slachtenia polnohospodarskych rastlin*. 1. vyd. Piestany, Slovensko: Centrum vyskumu rastlinnej výroby Piestany, 2011, 130-132. ISBN 978-80-89417-29-2.
17. KAFFKOVÁ, K., ČECHOVÁ, J. Možnosti overenia druhovej pravosti taxónov rodu *Mentha* L. In: NEUGEBAUEROVÁ, J., KAFFKOVÁ, K. *18. odborný seminár s mezinárodní účastí Aktuální otázky pěstování léčivých, aromatických a kořeninových rostlin*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2012, 62-69. ISBN 978-80-7375-670-3.

Článek v odborném periodiku

18. ČECHOVÁ, J., HOLLEINOVÁ, V., RADDOVÁ, J. Svinutka révy 1 (GLRaV-1) v České republice a optimalizace její detekce. In: *Úroda*. 2010. 12, 12, 235-238. ISSN 0139-6013.
19. HOLLEINOVÁ, V., ČECHOVÁ, J. Vliv virových patogenů a fytoplazem na zakrslost letorostů révy vinné. In: *Zahradnictví*. 2010. 12, 12, 22-23. ISSN 1213-7596.
20. RADDOVÁ, J., PTÁČKOVÁ, H., ČECHOVÁ, J., ONDRÁŠEK, I. Genetic analysis of the genus *Diospyros* ssp. using RAPD and i-PBS methods. In: *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2012, 60, 8, 205-216. ISSN 1211-8516.
21. HOLLEINOVÁ, V., ČECHOVÁ, J. The detection of viruses and phytoplasmas in dwarfed shoots of grapevine varieties Aurelius and Neuburger. In: *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2012, 60, 8, 73-78. ISSN 1211-8516.
22. ONDRUŠIKOVÁ, E., ČECHOVÁ, J., KŘÍŽAN, B. Ozdravování odrůd meruněk 'Lescora' a 'Bergeron' od virů PPV a PNRSV pomocí chemoterapie. In: *Úroda*. 2012, 60, 9, 64-67. ISSN 0139-6013.
23. BARÁNEK, M., MÉSZÁROS, M., SOCHOROVÁ, J., ČECHOVÁ, J., RADDOVÁ, J. Utility of retrotransposon-derived marker systems for differentiation of presumed clones of the apricot cultivar Velkopavlovická. In: *Scientia Horticulturae*. 2012, 143, 143, 1-6. ISSN 0304-4238.
24. ŠINKO, M., UHER, J., ČECHOVÁ, J. Fylogenetické vztahy u netřesků (*Sempervivum* L., *Jovibarba* Opiz) a jim blízkých rozchodníků (*Petrosedum* Grulich) ve světle molekulárních dat z AFLP analýzy. In: *Acta Pruhoniciana*. 2013, 103, 1, 109-119. ISSN 0374-5651.
25. ODUWAYE, O., OJO, D., POPOOLA, A., ISAAC, D., BARÁNEK, M., ČECHOVÁ, J. Genetic diversity assessment in Amaranth germplasm using AFLP and ISSR markers. In: *Journal of Crop Improvement*. 2014, 28, 4, 518-529. ISSN 1542-7528.
26. EICHMEIER, A., KISS, T., ČECHOVÁ, J. Evaluation of three approaches for the measurement of RNA integrity, concentration and purity in tissues of apricot flower

- buds. In: *International Journal of Scientific Research*. 2014 3 3, 157-160. ISSN 2277-8179.
27. ODUWAYE, O., BARÁNEK, M., ČECHOVÁ, J., RADDOVÁ, J. Reliability and comparison of the polymorphism revealed in amaranth by amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) and inters simple sequence repeats (ISSRs). In: *Journal of Plant Breeding and Crop Science*. 2014, 6, 4, 48-56. ISSN 2006-9758.

Výsledky s právní ochranou – užitný vzor

28. MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ. *Reakční směs pro molekulární detekci fytoplazem na révě vinné*. ČECHOVÁ, J., RADDOVÁ, J., BARÁNEK, M., HOLLEINOVÁ, V. 23346, Úřad průmyslového vlastnictví, Česká republika.

11 PŘÍLOHY

Z důvodu přehlednosti práce byly všechny – tabulky, grafy i obrázky, umístěny do příloh. Z důvodu lepší orientace a součinnosti při čtení práce, byly přílohy očíslovány a svázané samostatně