

Mendelova univerzita v Brně
Zahradnická fakulta v Lednici

**HODNOCENÍ GENETICKÉ DIVERZITY GENOVÝCH ZDROJŮ
ROSTLIN; PROGRAMY, MODELÝ, VYUŽITÍ**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce

Ing. Miroslav Vachůn, Ph.D.

Vypracovala

Denisa O'Shea

Lednice 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci: Hodnocení genetické diverzity genových zdrojů rostlin; programy, modely, využití, vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny 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 o tom, 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 29.4.2015

.....
podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce panu Ing. Miroslavu Vachůnovi, Ph.D., za odborné vedení, za pomoc, za rady a za vstřícnost při konzultacích a při vypracování této práce. Dále bych ráda poděkovala paní Mgr. Janě Raddové, Ph.D., za provedení laboratoří a seznámení s některými technikami. Paní Ing. Janě Čehové za ochotnou konzultaci správnosti překladů z anglických zdrojů. Chtěla bych také poděkovat dalším, kteří mi při přípravě práce pomohli, mezi nimi zejména panu Dr. Kamalu Sharmovi za poskytnutí velkého množství literárních materiálů.

OBSAH:

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	9
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
3.1	Genetická diverzita.....	10
3.1.1	Genetická diverzita a její význam	10
3.1.2	Původ genetické diverzity, genetická centra, centra původu	12
3.1.3	Ochuzování genetické diverzity, genetická eroze	15
3.1.4	Ochrana genetické diverzity.....	16
3.1.5	Následky nedostatečné genetické diverzity.....	21
3.2	Molekulární hodnocení genetické diverzity	22
3.2.1	Biochemické markery	23
3.2.2	Molekulární markery.....	24
3.2.3	Metody nevycházející z PCR (nonPCR).....	25
3.2.3.1	Restričně hybridizační metody.....	25
3.2.4	Markery založené na amplifikačních metodách (odvozeny od PCR).....	26
3.2.4.1	Polymorfismus délky náhodně amplifikovaných fragmentů (RAPD)	27
3.2.4.2	Polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů (AFLP).....	28
3.2.4.3	Markery specifické sekvence na základě PCR.....	29
3.2.4.4	Markerová metoda na základě mikrosatelitů	30
3.2.5	Jednonukleotidový polymorfismus (SNP)	31
3.2.6	Markery založené na jiné než genomové DNA	31
3.2.7	Molekulární markery založené na transpozonech.....	33
3.2.8	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR v reálném čase)	33
3.2.9	Technologie DArT (Diversity Arrays Technology).....	34
3.3	Metody nové generace sekvenování	35
3.4	Bioinformatika	36
3.4.1	European Vitis Database	37
3.4.2	GDR (Genome Database for Rosaceae).....	39
3.4.3	EVIGEZ	40
4	VLASTNÍ KOMENTÁŘ K ŘEŠENÉ PROBLEMATICE	41

5	ZÁVĚR	44
6	SOUHRN A RESUME	47
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
8	PŘÍLOHY	56

1 ÚVOD

Různorodost živých organismů je geneticky podmíněná a je přirozenou vlastností přírody vznikající samovolně v důsledku mutací, rekombinací, genetického driftu a domestikace. Více geneticky variabilní populace lépe přežívají a vyvíjejí se. Díky genetické variabilitě se vyvíjejí nové druhy rostlin, které jsou schopné přizpůsobit se měnícím se podmínkám prostředí.

Rostlinná rozmanitost tvoří důležitou složku jakéhokoliv zemědělského výrobního systému. Současný stav genetické variability plodin významných v zemědělství je výsledkem přirozené evoluce a vlivu člověka. Porozumění molekulárním základům biologických jevů u rostlin je proto rozhodující pro efektivní ochranu, správu a účinné využití genetických zdrojů rostlin. Zejména pak odpovídající znalost genetické rozmanitosti populací a toho, jak ji nejlépe využít, má zásadní význam pro efektivní správu genetických zdrojů plodin.

Způsobů hodnocení genetické variability se v dnešní době nabízí mnoho, mezi sebou se však výrazně liší např. cenou a přesností. Hodnocení genetické variability podle morfologických charakteristik nevyžaduje nákladné technologie, ale je náchylné k ovlivnění působením vnějších vlivů. Biochemické analýzy jsou rychlým způsobem vyžadujícím pouze malé množství biologického materiálu, ale jsou omezeny pouze skromným počtem specifických enzymů. Nejen proto v posledních letech došlo k výraznému nárůstu při používání molekulárních metod pro posuzování, zachování a využití genetických zdrojů rostlin. Molekulární metody také již zcela převzaly hlavní roli ve studiu fylogeneze a evoluce druhů a byly použity ke zvýšení objemu našich znalostí o rozložení a rozsahu genetických variací uvnitř v jednotlivých druzích a mezi nimi. Hodnocení genetické rozmanitosti v rámci a mezi populacemi se již běžně provádí na molekulární úrovni s využitím různých laboratorních technik, například alozymové nebo DNA analýzy, které přímo měří úroveň variability. Používají se molekulární analýzy obsahující velké množství DNA markerů, které jsou stabilní a detekovatelné ve všech tkáních, analýzy tak nejsou zkreslovány vlivy vnějšího prostředí. Nevýhodou molekulárních metod je zcela jistě cena.

Ideální technika používaná pro studium genetické diverzity by tedy měla splňovat následující kritéria: měla by být levná a časově nenáročná; měla by generovat mnohočetné, v genomu rovnoměrně rozptýlené a nezávislé markery; měla by

poskytovat opakovatelné produkty; měla by mít nízkou spotřebu DNA a pokud možno i nízkou citlivost na její mírnou degradaci; neměla by být příliš náročná na laboratorní vybavení a neměla by vyžadovat předchozí informace o sledovaném genomu. Žádná ze známých a používaných technik v současné době nespĺňuje všechna výše zmíněná kritéria současně (Baránek et al., 2006), nicméně dochází k neustálému vývoji nových a modernějších technik pro hodnocení genetické diverzity.

Předkládaná bakalářská práce se zprvu věnuje genetické diverzitě z obecného hlediska, její historii a ochraně. Dále se zaměřuje na popsání technik jejího hodnocení, zejména molekulárních a nakonec popisuje některé příklady databází genových zdrojů.

2 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je sepsat literární rešerši vysvětlující pojem genetické diverzity. Dále porovnat různé přístupy v hodnocení genových zdrojů rostlin, od klasických popisných metod po nejnovější molekulární metody a popsat některé databáze genových zdrojů.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Genetická diverzita

3.1.1 Genetická diverzita a její význam

Genetická diverzita neboli různorodost je důležitou vlastností rostlin, která je spojená s jejich adaptací na nejrůznější podmínky. Na schopnosti adaptace je závislé přežívání populací a druhů v neustále se měnícím prostředí. Ukazuje se, že jistá míra genetické variability je potřebná pro stabilitu systému. Jestliže dojde ke krizi (např. napadení patogenem) v uniformním systému, většinou totiž kolabuje celý. Naopak v různorodém systému prochází krizí často jen některé z jeho částí, a jako celek tak zůstává stále funkční.

Úloha genetické variability je zásadní. Její ztráty mohou značně snižovat schopnost přizpůsobení se novým ekologickým podmínkám, v malých populacích (např. vyvolané příbuzenským křížením) mají obecně nepříznivé důsledky, které se bezprostředně projevují inbrední depresí, což označuje pokles zdraví v důsledku inbreedingu spojeného s expresí množství škodlivých alel v homozygotním stavu, a dlouhodobě vedou ke ztátě schopnosti adaptivní odpovědi. Tím se zvyšuje pravděpodobnost vymírání druhů.

Genetická diverzita je také nezbytná pro udržitelnou produkci plodin, protože větší ztráty charakteristik u kterékoliv populace mohou omezit její šance na přežití a pro úspěšnou produkci, a zvýšit tak požadavky na lidskou práci (Rauf a Silva, 2010).

Zvýšení míry genetické diverzity je důležité pro ovlivňování reakce rostlin na škůdce a nemoci a poskytuje příležitost pro další zlepšování druhů. Kromě těchto příkladných aspektů je genetická diverzita na bázi molekulárních markerů nezbytná pro genetické mapování a výběr za pomoci markerů ve šlechtění (Rauf a Silva, 2010).

Genetická diverzita je v přírodě uspořádána hierarchicky. Jednotlivé populace, druhy či vyšší taxony se od sebe geneticky různou měrou liší a tyto odlišnosti jsou efektivně využívány při výzkumu volně žijících organismů. Mezidruhové genetické odlišnosti jsou již zahrnuty v konceptu druhové diverzity. O úroveň níže pak stojí mezipopulační vnitrodruhové rozdíly neboli populační struktura vrámci druhu. Poznání fylogenetických vztahů mezi populacemi druhu umožňuje rekonstruovat centra a cesty šíření druhů (fylogeografie), a sledovat tak historické změny rozšíření, které probíhaly

na pozadí posunů areálů a demografických změn. To umožňuje pochopit dnešní charakter genetické variability a diferenciací populací druhů a jiných fylogenetických linií. Na ještě nižší úrovni pak stojí genetická diverzita v rámci populace (Bryja et al., 2010).

Za jeden z prvních zaznamenaných následků omezené genetické diverzity je považováno zhroucení civilizace Mayů v Mexiku v desátém století našeho letopočtu vlivem problémů způsobených monokulturním pěstováním kukuřice na terasách podléhajících značné půdní erozi a vlivem rozšíření chorob a škůdců. Dalším z příkladů nedostatečné genetické variability plodin je hladomor v Irsku, kde v roce 1846 došlo kvůli napadení plísní bramborovou ke ztrátě poloviny úrody brambor, jelikož se pěstovalo jen několik jejich odrůd, což vedlo ke smrti jednoho až dvou milionů lidí a masivní emigrační vlně. V jihoamerických Andách k takové katastrofě dojít nemohlo, jelikož tam byl brambor domestikován nejméně před osmi tisíci lety v mnoha krajových odrůdách. Mezidruhovú genetická diverzita, tj. genetická různorodost plodin, je v podstatě dána původem jednotlivých druhů (Chloupek, 2008).

Schopnost adaptace populace určitého druhu k environmentálním vlivům je umožněna nashromážděním (akumulací) genetické proměnlivosti. Ztráta genetické diverzity se považuje za největší problém ze současných nejzávažnějších ekologických problémů (ukládání toxických látek, znečišťování vzduchu, kyselá dešť, eroze půdy, zvyšování obsahu CO₂ ve vzduchu), protože je nenahraditelná (Ehrlich a Ehrlich, 1983). Genetickou diverzitu však nelze rozšířit tak, že by se lidská společnost vrátila ke způsobu života v minulém století, protože má již jiné stravovací návyky, a proto byly vyvinuty jiné strategie jejího uchování.

Genetická diverzita může být posuzována různými způsoby: na úrovni genových rezerv (gene-pool), na úrovni populací, individuí, genomu, lokusu nebo na úrovni sekvence bází DNA (Kresovich a Mcferson, 1992). Většinou se definuje frekvencí (četností) genů, ale určuje se z frekvence genotypů a závisí na způsobu rozmnožování populace (Weir, 1990).

Tak byla genetická proměnlivost studována na úrovni druhové (tj. mezi jednotlivými druhy), uvnitř populací a mezi populacemi určitého druhu. Bylo prokázáno (Hamrick a Godt, 1990), že asi 50 % lokusů rostlinných druhů bylo polymorfních.

Genetická diverzita sestávala ze 78 % z diverzity uvnitř populací a jen z 22 % z diverzity mezi populacemi.

Největším zdrojem genetické diverzity na druhové úrovni byl geografický výskyt (původ populace). Dalším významným zdrojem byl systém šlechtění. U samosprašných druhů připadalo 51 % z celkové genetické diverzity na rozdíly mezi populacemi, kdežto u cizosprašných jen 10 % a zbytek, tj. 49 % a 90 %, připadal na diverzitu uvnitř populací. Uvedené výsledky prokázaly, že genetická diverzita na úrovni populace poměrně přesně charakterizuje druhovou diverzitu a že i druhy málo rozšířené, které mají menší genetickou diverzitu, ji mají v podstatě stejně strukturovanou jako druhy geograficky široce rozšířené. Většina rozdílů v diverzitě může být proto vysvětlena podílem polymorfních lokusů a méně rozdíly na individuálním polymorfním lokusu (Chloupek, 2008).

3.1.2 Původ genetické diverzity, genetická centra, centra původu

Promyšlené pěstování plodin neboli zemědělství začalo asi na deseti různých místech naší planety, ale nejlepší možnosti pro vznik a rozvoj civilizace byly na euroasijském kontinentu. Nepříhodnější podmínky pro zemědělství měly Blízký východ od Egypta až po Sýrii, Střední východ a Čína. Tam vyskytující se rostliny bylo totiž možné nejlépe a nejsnáze pěstovat a šlechtit a lidé si tam navíc mohli ochočit zvířata.

Každý z nesmírného počtu rozmanitých druhů je adaptován k zaplnění svého místa ve zdánlivě nekonečné škále nelesišť. Uvnitř každého druhu existuje jemnější, citlivější stupeň adaptace populací na menší rozdíly mezi podobnými lokalitami. Tyto adaptované populace uvnitř druhu jsou známy jako ekotypy. I rostliny mají schopnost, jak reagovat na pomalé přírodní změny, tj. produkují v každé generaci individua s geny v nové sestavě (rekombinaci), a tudíž s různou ekologickou preferencí pro nové prvky prostředí. Vlivem explozivního nárůstu lidské populace v posledních dvou až třech tisíciletích došlo k velmi rychlým změnám přírodního prostředí, a tak se některé druhy nestačí adaptovat a vyhynou. Rostliny využívané v zemědělství se vyvíjely souběžně s lidskými společnostmi a většinu z nich rozšířil člověk na velké plochy po celém světě. Tak se diferenciovaly do velkého počtu krajových odrůd, což jsou zemědělské ekvivalenty ekotypů planých rostlin.

Vznik kulturních rostlin je spjat s vývojem člověka – zemědělce, tj. člověka usídleného v blízkosti využívaných kultur, jelikož je ovlivňoval pomocí jejich sklizení, dosévání a odstraňování konkurenčních druhů. Tak se staly z planých rostlin plodiny, které se liší od svých předků například hromadným klíčením semen, současným zráním všech rostlin i všech plodenství na rostlině, nerozpadavostí klasů, nepukáním lusků, zvětšením některých orgánů (dužiny plodů viz. , zesílením některých pletiv, nadměrným zvýšením obsahu zásobních látek (cukrů a tuků v semenech, kořenech, hlízách), neúměrným zvětšením zásobních orgánů (hlíz, cibulí, semen). U některých rostlin došlo ke znemožnění růstu planých druhů, u jiných ke ztrátě možnosti generativního množení. Zemědělská revoluce umožnila vznik sídlišť, měst, států a následně moderní kultury.

Původní druhy a variety plodin se podle Vavilova vyskytují v centrech původu plodin. Jsou to zejména podhůří Himaláje, Hindúkuše, Blízkého východu, Balkánu, Apenin a And, vyznačují se silně různorodými podmínkami prostředí, které se často mění (např. v důsledku různého průběhu počasí), takže neumožňují jednostrannou selekci na určité znaky. Pohoří byla i bariérou vedoucí k lokální izolaci, a umožnila vznik různých forem v jednotlivých údolích. Horské polohy se vyznačovaly velkými výkyvy teplot a silným ultrafialovým zářením, což umožnilo vznik mutací a kříženců i u samosprašných druhů. Takové oblasti jsou podle Vavilova nejen centry původu plodin, ale i mnohotvárnosti lidských společenstev. V každém centru se totiž vedle obilnin domestikovaly i luskoviny, což zabezpečilo vyváženou výživu lidských populací. Jednalo se o těchto osm center (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**):

- I. Čína (víceřadý, nahý a bezosinkatý ječmen, čirok, pohanka, sója, ředkev, konopí, hrušeň, jabloň, meruňka, fazol)
- II. Indie, včetně Barmy, Pákistánu a Indonésie (rýže, cukrová třtina, fazol, okurka, citrusy, kokosová palma, brukvovité, bavlník, banánovník)
- III. Centrální Asie (pšenice, hrách, čočka, bob, některé druhy fazolu, len, meloun, ředkvička, cibule, špenát, meruňka, mandloň, hrušeň, jabloň, oliva, vinná réva, vlašský ořešák)
- IV. Blízký východ (pšenice, žito, ječmen, cibule, salát, salátová řepa, zelí, mrkev, len, meloun, okurka, tykev, vojtěška, jetel perský, vičenec, vikev, lupina, vinná réva, hrušeň, třešeň, mandloň, smokvoň, vlašský ořešák)

- V. Středozeří (pšenice, ječmen, brambory, hrachy, jetel alexandrijský, inkarnát, vikev, len, hořčice, brukvovité, řepa, oliva)
- VI. Etiopie (pšenice, ječmen, len, hrách, čočka, bob)
- VII. Jižní Mexiko a Střední Amerika (fazol, dýně paprika, kakao, bavlník, tabák)
- VIII. Jižní Amerika (brambor, kukuřice, fazol, rajče, dýně, bavlník, podzemnice olejná, ananas, kakao)

Oblast, kde se kulturní druh oddělil od planých forem, je jeho primárním centrem původu. Oblast, kde u nového druhu proběhl, nebo stále ještě probíhá, proces vzniku nových forem (poddruhy, kultivary), ale nemusí se zde již vyskytovat jeho plané formy, se nazývá druhotným (sekundárním) centrem původu.

Genová centra jsou geografické oblasti vzniku určitého rostlinného druhu, kde je velká fenotypová rozmanitost forem podložená rozmanitostí alel. Ve středu genových center se většinou nacházejí rostliny se znaky řízenými dominantní alelou, která je původnější, zatímco na okrajích (periferiích) genových center častěji rostliny s recesivní alelou, která je progresivnější. Mimo genová centra, tj. na periferiích, bývají populace kulturních druhů již málo geneticky variabilní (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).

Užitkové druhy rostlin vykazují v určitých oblastech světa vysokou genetickou variabilitu, a to nejčastěji tam, kde byl druh poprvé domestikován nebo je stále pěstován v tradičních zemědělských podmínkách (Anonym, 2011), viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**

Později bylo zjištěno, že oblasti s maximální variabilitou uvnitř druhů nemusí být identické s centry původu. Například v Etiopii se nacházejí geneticky nejrozmanitější druhy a formy rodu *Triticum* (pšenice), ale nebyl zde nalezen žádný z primitivních předků, a proto je pravděpodobné, že byl tento rod do Etiopie introdukovan. V této oblasti vykazuje velkou diverzitu celá řada plodin z Blízkého východu, jako ječmen, len, oves, hrách i pšenice. Takové oblasti se nazývají centra diverzity.

Centra původu plodin jsou zeměpisné oblasti, odkud druhy pocházejí, kdežto centra diverzity jsou charakterizována rozsáhlou genetickou variabilitou mezi genotypy pěstovaných plodin a příbuzných druhů. Centra původu a diverzity mohou a nemusí být identická (Chloupek, 1995).

Důležitým faktorem domestikace rostlin a zvířat, která probíhala v neolitu (mladší době kamenné) v tzv. „úrodném půlměsíci“ a ve stepích Předního východu – od Izraele přes Libanon, Írák a Turecko, byla introgrese, tj. vnesení a exprese genů jednoho druhu do genomu jiného, například mezidruhovým křížením a následným zpětným křížením. Introgrese je považována za základního činitele evoluce, často ve spojení s polyploidizací. Rostliny zavedené do kultury se mění rychleji než rostliny plané. Tak se i z mnoha plevelů staly kulturní rostliny.

Proměnlivost každého znaku lze pozorovat v řadě variant. Pokud je tato proměnlivost kontinuální, jedná se podle Vavilova o homologické řady. V nich lze zjistit znaky vývojově starší, primitivnější, i znaky mladší, modernější, a tak je možné sledovat i průběh domestikace, např. u znaků klasu obilnin. V oblastech, kde vývoj druhu trval dlouho, existují úplné homologické řady (Chloupek, 2008).

Dalším z mechanismů evoluce zemědělských plodin je genetický drift. Jedná se o neřízené změny v četnosti alel určité populace, které se projeví především u menších populací, například při introdukci plodiny. Může dojít ke ztrátě některých alel tak, že rostliny s nimi vyhynou. Díky tomu se introdukované plodiny mohou značně lišit od výchozí populace. V malých populacích byl například do Evropy introdukován brambor, kultura kaučukovníku v Asii pochází z 2793 semenáčů, plantáže sisalu v Africe z 62 rostlin dovezených z Floridy.

V důsledku zkulturnění se mohly uchovat i spontánní mutace, či rekombinace, které by nebyly v plané populaci schopné života. Příkladem jsou zdužnatělé květenství u kvěťáku, růžičková kapusta a ztlustlý hypokotyl u ředkvičky.

Genetická diverzita tedy vznikla a vzniká dosud díky původu z odlišných genových center, v důsledku domestikace, tj. introdukce do pěstování, v důsledku mutací, rekombinací, genetického driftu aj. (Chloupek, 2008).

3.1.3 Ochuzování genetické diverzity, genetická eroze

Začátkem minulého století v době rozvoje moderního šlechtitelství paradoxně došlo k ochuzování genetické diverzity vlivem pěstování nejlepších, tedy většinou nejvýnosnějších odrůd, často vzájemně příbuzných, například u sladovnického ječmene. Bylo to nezbytné pro rychle rostoucí lidskou populaci. Pěstovalo se stále méně druhů

a odrůd na stále se zvětšujících plochách, což vedlo ke genetické erozi, spolu s ničením nalezišť v důsledku rozšiřování orné půdy.

Tím, že zákazník preferuje určité odrůdy a formy plodin, například odrůdy obilnin s vysokou pekařskou a sladovnickou hodnotou, také přispěl a stále přispívá ke genetické erozi. U mrkve dříve existovaly i odrůdy s bílým, žlutým a červeným kořenem (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**), které tak vymizely. Dalšími, kdo přispívají ke genetické erozi, jsou pěstitelé, kteří preferují odrůdy efektivně reagující na pěstitelská opatření, například na aplikaci hnojiv a pesticidů.

3.1.4 Ochrana genetické diverzity

Genetická diverzita v mnohých případech představuje základní pilíř udržující stabilitu populací v čase, a tím i přežívání druhů a stabilitu ekosystémů. Nové informace jasně ukazují velký význam genetické diverzity pro přežívání přirozených populací mnoha organismů a tato data dokládají potřebu implementace pojmu ochrany genetické diverzity do celkové koncepce ochrany přírody.

Význam genetické variability pro udržitelnost biologické diverzity a evolučních procesů je ve vědě znám již několik desetiletí. Záměrná ochrana genetické diverzity začala vlastně v botanických zahradách, které původně měly (Prest, 1981) napodobovat biblický ráj a shromážděné rostliny měly i medicínské použití. Již v pátém století v Číně za dynastie Sun, měly všechny rostliny v botanické zahradě jmenovky. V roce 1447 zřídil sbírku léčivých rostlin ve Vatikánu papež Mikuláš VIII. V dnešních asi tisíci botanických zahradách rostou desetitisíce rostlin a dvě stě z nich již založilo systematické sbírky mizejících druhů flóry. S padesáti tisíci uchovávanými druhy je nejvýznamnější botanická zahrada v Kew u Londýna.

Sběratelé či „lovci“ rostlin v neznámých krajích přispěli k šíření rostlin zejména tím, že je vysazovali v botanických zahradách, studovali na univerzitách a ve výzkumných ústavech a některé z nich introdukovali do kultury. Již asi dva a půl tisíce let př. n. l. se vypravila expedice Sumerů do Malé Asie, kde hledala vinnou révu, smokvoň a růže. Vedle profesionálních sběratelů přispěli k obohacování botanických zahrad i misionáři, zejména jezuité. Jedním z celé řady významných sběratelů rostlin byl i Humboldt (1769 – 1858), Vavilov (1887 – 1942) a mnoho dalších. Vavilov osobně nasbíral přes šedesát tisíc vzorků rostlin, z toho téměř tři tisíce vzorků kukuřice (Chloupek, 2008).

Podle současné legislativy je zakázáno získávání a držení jakékoliv rostliny z naleziště bez patřičného povolení, pokud je uvedena v seznamu IUCN (International Union for the Conservation of Nature), jedná se tak zejména o ohrožené druhy.

V dnešní době jsou polní sběry pro vědecké účely prováděny v oblastech výskytu rostlin s vysokou genetickou diverzitou a v oblastech s výrazným prostředím (sucho, mráz), kde se mohly přírodní selekcí vyvinout jedinečné genotypy, zejména krajové odrůdy pro dlouhou dobu pěstování. Sbírají se plané druhy rostoucí v neporušených nalezištích, i plevelné, dosud nepěstované druhy, rostoucí v oblastech narušených člověkem. Cílem je získat maximální genetickou diverzitu s únosnou velikostí a počtem vzorků. Sbírá se z více populací, z každé z nich semena asi z 50–100 náhodně vybraných rostlin, bez ohledu na „užitečnost“ (Holden *et al.*, 1993). Stále více se pozornost přesunuje od výběru populací nebo ekotypů s projevem specifických genů ke sběru vzorků reprezentujících celkovou současnou genetickou variabilitu. Přednost se dává druhům ohroženým a druhům vyskytujícím se v odlehlých a nepřístupných oblastech.

Druhy rostlin byly z hlediska potenciálního využití rozděleny (Harlan, 1975) na:

1. *Primární gene-pool*, který zahrnuje pěstované druhy a druhy příbuzné, z nichž je možné získat užitečné geny pro šlechtění. Druhy zde zařazené se dají s příbuznými kulturními druhy křížit, je možné získat generaci F1 a F2 a segregace genů po tomto křížení je převážně normální.
2. *Sekundární gene-pool* zahrnuje druhy, ze kterých lze přenést geny do pěstovaných druhů, ale ne bez určitých potíží. Při křížení s pěstovanými plodinami se sice získají semena, ale je obtížné dopěstovat rostliny F1, které často bývají sterilní. Potomstvo hybridních rostlin nemívá normální segregaci genů, tj. potomstvo bývá výrazně podobné jednomu z rodičů.
3. *Terciární gene-pool*, který zahrnuje druhy, z nichž přenos genů do pěstovaných druhů vyžaduje speciální postupy, nebo není možný. Hybridní embryo je ale někdy možné zachránit. Získá-li se hybridní rostlina, často hyne, nebo bývá sterilní. Roubování, techniky rostlinných explantátů, vektory přenášené geny v plazmidech či virových částicích ji však mohou zachránit.

Zejména pro rezistenci ke škůdcům a chorobám i pro toleranci k nepříznivým růstovým podmínkám představují zdroj genů plané druhy, jelikož byly ve svém vývoji

neustále vystaveny jejich tlaku. Ve srovnání s příbuznými plodinami mají také mnoho nepříznivých vlastností.

Důležitost ochrany genetické úrovně biodiverzity byla deklarována také mezinárodní Úmluvou o biologické rozmanitosti, která má za jeden ze základních cílů ochranu genetické diverzity spolu s ochranou diverzity druhů a ekosystémů. Kromě vlastního významu pro přírodní stabilitu, má právě genetická složka biodiverzity velký význam pro člověka a jeho hospodářskou činnost, neboť genetická diverzita představuje přirozenou zásobárnu variabilních genotypů pro případné využití ve šlechtitelství a biotechnologiích (Bryja *et al.*, 2010).

Úmluva o biologické rozmanitosti (Convention on Biological Diversity, CBD) byla poprvé vystavena k podpisu v brazilském Rio de Janeiru na Konferenci OSN o životním prostředí a rozvoji (UNCED) v červnu 1992. V platnost vstoupila 29. prosince 1993. Česká republika podepsala Úmluvu již v roce 1993 a v březnu 1994 u nás vstoupila v platnost. Obsah Úmluvy se neustále přizpůsobuje novým poznatkům a aktuálním požadavkům.

Článek 6 Úmluvy ukládá, aby státy v souladu se svými specifickými podmínkami a národními možnostmi vytvořily národní strategie, plány a programy pro ochranu a udržitelné využívání biodiverzity nebo přizpůsobily k těmto strategickým cílům již existující dokumenty. Ve stručnosti je možno shrnout, že Česká republika se zavázala, za účelem ochrany biodiverzity *in situ* (na původních nalezištích, této ochraně je nutné dávat přednost), *ex situ* (mimo naleziště, většinou v genových bankách) a udržitelného využívání rozmanitosti, indentifikovat složky biodiverzity, které jsou klíčové nebo významné pro její ochranu a udržitelné využívání a tyto složky monitorovat s důrazem na aktuální potřebu ochrany. Dohledem nad plněním požadavků Úmluvy bylo pověřeno Ministerstvo životního prostředí ČR a Ministerstvo zemědělství ČR. Jejich zástupci se zúčastňují konferencí smluvních stran.

Naplnění konečného záměru Úmluvy je nepochybně namířeno na dlouhodobý horizont a ani nejbohatší státy světa nejsou schopny dosáhnout stanovených cílů v blízké budoucnosti. Na základě výše zmíněných závazků a dalších skutečností byla ministerstvem životního prostředí zpracována Strategie ochrany biologické rozmanitosti (Brožová *et al.*, 2005). Jedná se o první dokument, který navrhuje základní plán postupu v ochraně biodiverzity a byl schválen vládou ČR dne 25. května 2005. Důležitost

znalosti, ochrany a udržitelného využívání bohatství biodiverzity v České republice je dána její geografickou polohou.

Konzervace *in situ* vytváří základní podmínky pro formování a zachování přirozené genetické diverzity populací a druhů v podmínkách jejich přirozeného výskytu. Jde o konzervaci celého ekosystému, jehož je součástí. Zvláštním způsobem konzervace *in situ* je tzv. *on farm* konzervace. Je to konzervace při hospodaření na farmě, která využívá krajové a tradiční odrůdy. Tyto odrůdy jsou totiž produktem dlouhodobého vzájemného působení prostředí a selekce a tento způsob má ono působení zachovat a umožnit tak další dynamický vývoj jejich diverzity.

U hospodářsky významných druhů a často i odrůd ohrožených vymizením se používá konzervace *ex situ*. Uchování diverzity mimo původní stanoviště v přírodě je významnou a legitimní metodou zejména ve dvou typech případů. První z nich zahrnuje situace, kdy je genetická proměnlivost dotčeného taxonu/skupiny omezena umělým výběrem, a nebo když je přirozeně nízká. Druhým typem je situace, kdy je organismus v přírodě na pokraji vyhynutí, a uchování *ex situ* je posledním východiskem. Z hlediska šlechtitelského využití má u nás význam hlavně u píceň a léčivých rostlin.

V seznamu ohrožených druhů (Červená kniha ohrožených druhů) u nás původně se vyskytujících rostlin bylo koncem sedmdesátých let uvedeno již asi 50 % druhů v různém stupni ohrožení (Holub *et al.*, 1979). Podle aktuálních červených seznamů je v České republice ohroženo 60 % druhů vyšších rostlin a 43 % druhů mechorostů. Seznam ohrožených druhů organismů uvedených v červených seznamech u nás byl, a stále ještě ve většině případů je, podkladem historicky tradičního přístupu k druhové ochraně biodiverzity *in situ*. Nejlepší možnost jejich ochrany představují národní parky, ochranná pásma vodních zdrojů, pastviny hor, kde je povolena jen extenzivní pastva aj.

Nedávno byl zpracován kvalitní přehled nepůvodních druhů na našem území (Mlíkovský a Stýblo, 2006). Biologické invaze, tj. pasivní zavlékání i aktivní introdukce nepůvodních druhů organismů, výrazné hlavně u rostlin a živočichů, jsou v současnosti důležitým problémem. Invazní druhy často úspěšně konkurují původním druhům, které mohou lokálně zcela vytěsnit. Toto nebezpečí je aktuální i v chráněných územích.

Konzervace genetické diverzity *in situ* v přirozených společenstvech je kompatibilní a vzájemně se podporuje s ochranou přírody, i když nejsou identické. Ochrana přírody

je zaměřena především na ohrožené nebo téměř vyhynulé druhy a děje se na úrovni ekosystémů či společenstev. Uchovávání vnitrodruhové genetické diverzity a populační struktury jednotlivých druhů je věnována menší pozornost.

Ochrana planých druhů, příbuzných pěstovaným plodinám, se děje:

(1) integrací ochrany genetických zdrojů a ochrany přírody v rostlinných společenstvech a ekosystémech;

(2) vytvořením speciálních genetických rezerv nebo genových parků mimo uvedené oblasti (Marshall, 1990).

Uvědomění si významu genetické variability u hospodářsky významných živočichů a rostlin vedlo k vytváření genových a semenných bank v zahraničí i České republice. Nicméně tyto aktivity jsou omezeny především na druhy s hospodářským významem a systematické shromažďování materiálu, především pak výzkum a monitoring genetické variability u volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin většinou chybí.

Na celém světě je asi 1300 genových bank a uchovávají asi 90 % z celkového počtu 6,1 milionu vzorků (Stehno a Škaloud, 1998), z nichž asi polovina může být duplicitní (Holden *et al.*, 1993).

Ochranu genetické diverzity u nás má zabezpečit Národní program konzervace a využití genofondu rostlin. V roce 1988 byla k tomuto účelu otevřena Národní genová banka ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby (VÚRV) v Praze-Ruzyni (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) s kapacitou 100–120 tisíc vzorků. Je zde uloženo přes 80 tisíc vzorků. V České republice je shromážděno asi 46 tisíc vzorků rostlin na čtrnácti pracovištích (VÚRV Praha-Ruzyně, Zemědělský VÚ Kroměříž, Agritec Šumperk, VÚ bramborářský Havlíčkův Brod, Chmelařský institut Žatec, Genová banka VÚRV v Olomouci, VÚ ovocných dřevin Holovousy, VÚ okrasné zahradnictví Průhonice, VÚ pícninářský Troubsko, Výzkumná stanice travinářská Zubří, VÚ olejnin Opava, Výzkumná stanice vinařská Karlštejn, MZLU-ZF Lednice, Vinařská stanice Znojmo).

Genetické banky se mohou sdružovat do sítí, v rámci kterých si pak recipročně poskytují svoje vzorky. Naléhavost konzervace genetické diverzity je menší u druhů, u kterých se vyskytuje více planých příbuzných druhů (např. u ova, ječmene, pšenice,

kukuřice, sóji), u cizosprašných (u řepy, žita, kukuřice, píce) a u částečně cizosprašných plodin (u bobu a řepky). Naléhavá je však u druhů, jejichž odrůdy jsou typu hybridů, klonů, linií a u nichž nejsou známy plané příbuzné druhy nebo jsou ohrožené vyhubením (hrách, čočka aj.). Nejvhodnější je ovšem konzervace *in situ*, kdy se uchovávají populace, které se samy reprodukují v přírodních či zemědělských ekosystémech (Chloupek, 2008).

Obecné zásady genetické konzervace (konzervace genetické diverzity) spatřují Mooney a Fowler (1991) v tom, že:

1. Zemědělská různorodost může být zajištěna jen různorodými strategiemi.
2. Genetická konzervace musí být záležitostí obecnou, ne jen záležitostí odborníků.
3. Zemědělská různorodost se nedá uchovat, pokud se nebude využívat, poněvadž hodnota různorodosti spočívá v jejím používání.
4. Zemědělská různorodost se nedá zachránit, pokud nebudou zachráněna vesnická společenství.
5. Potřeba různorodosti je trvalá, vždyť vyhubení každého druhu je definitivní (nedá se změnit).

Ochrana genetické diverzity je jedním z cílů Úmluvy o biologické rozmanitosti. Přesto však většinou chybí aktivity k ochraně genetické diverzity v České republice i v zahraničí.

3.1.5 Následky nedostatečné genetické diverzity

Následky omezené genetické diverzity se projevují až v delším časovém horizontu, a to zejména (Chloupek, 2008):

- Genetickou zranitelností, což je možnost, že neočekávaný problém může způsobit velké ztráty u většiny nebo u všech druhů určité plodiny (např. helmintospiróza kukuřice v sedmdesátých letech vlivem používání texaského typu pylové sterility, obilní rzi nebo pravé plísně bramboru, okurky, aj).

Genetickou zranitelnost je možné zmenšit:

- Šlechtěním odrůd s větší genetickou diverzitou, tj. nepříbuzných odrůd, které pak budou méně ohroženy potenciálním problémem.

- Monitorováním chorob, škůdců i jiných možných stresů, které mohou ohrozit produktivitu plodin a včasným šlechtěním (např. na očekávané sucho při globálním oteplování).
- Omezením genetického pokroku u kvantitativních znaků při šlechtění, což se ale obtížně dokazuje a ještě obtížněji překonává. Nevíme totiž, zda bylo u určité plodiny dosaženo výnosového maxima; vždyť často není patrný žádný pokrok a pak dojde náhle a neočekávaně k velkému pokroku.

3.2 Molekulární hodnocení genetické diverzity

Z počátku se pro studium vazby a jako markery používaly morfologické znaky, barva, charakteristiky výnosu, monogenní rezistence aj. Jejich použití je velmi staré a používají se pro posuzování odrůd na základě zřetelného, jednotného a stabilního testování (Ardley a Hoptroff 1996). Již v devatenáctém století Gregor Mendel použil fenotypové genetické markery ve svých experimentech. Později vedly fenotypové genetické markery pro *Drosophila melanogaster* ke zrození teorie genetické vazby.

Morfologické markery mají v porovnání s ostatními třídami markerů jednodušší využití, jsou snadno sledovatelné, ale mohou být ovlivněny vnějším prostředím. Jsou omezeny počtem a některé z nich (např. barva květů) se objevují až v závěrečných fázích vývoje rostlin, takže je u nich nemožné časné vyhodnocování. Mezi tyto markery patří například pigmentace rostlin, vernalizace nebo odpověď na patogen.

Morfologická charakteristika nevyžaduje nákladné technologie. Často jsou ale pro tyto experimenty potřebné velké plochy půdy, díky čemuž mohou ve výsledku být dražší než molekulární hodnocení. Posuzované vlastnosti jsou navíc často náchylné k fenotypové plasticitě; naproti tomu umožňují posoudit variabilitu v přítomnosti změn životního prostředí.

Hlavní nevýhodou morfologických markerů je jejich nedostatek a častá, již zmiňovaná, závislost na vnějším prostředí. V důsledku toho nejsou za pomoci morfologických markerů proveditelné kompletní genomové testy, které jsou požadovány pro analýzu lokusu kvalitativního znaku (QTL – quantitative trait loci). Podobné omezení platí pro použití izozymových markerů (Poehlman, J.M. and Sleper, 1995). Omezení fenotypových genetických markerů vedla k vývoji DNA markerů, tj. molekulárních markerů.

Analýzy genetické rozmanitosti jsou obvykle založeny na posouzení rozmanitosti jedince s využitím buď allozymů (tj. různé formy enzymu, které jsou kódovány podle různých alel na stejném lokusu) nebo molekulárních markerů, které mají tendenci být selektivně neutrální.

Proteinové metody, jako alozymová elektroforéza (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) a molekulární metody, jako analýza DNA, přímo měří genetickou variabilitu a poskytují jasnou představu o úrovni genetické variability přítomné v druhu nebo populaci (Karp, 1996), bez přímého ovlivnění faktory životního prostředí. Mají však tu nevýhodu, že jsou poměrně nákladné, časově náročné a pro analýzu vyžadují vysokou úroveň odborných znalostí a materiálu.

3.2.1 Biochemické markery

Použití biochemických markerů zahrnuje analýzu zásobních proteinů semen a izoenzymů. Tato technika využívá enzymatických funkcí a je relativně levným, ale účinným způsobem měření frekvence alel pro specifické geny. Alozymy, které jsou alelické varianty enzymů, poskytují odhad genových a genotypových frekvencí uvnitř populací a mezi nimi.

Proteinové markery se používají nejen k hodnocení genetické variability, ale také například k charakteristice odrůd při registračním řízení; identifikaci izolátů patogenů, avšak se střídavými úspěchy; stanovení podílu cizoopylení; selekci podle markerovacích genů, např. na rezistenci k virózám; kontrole introgrese genů z příbuzných planých druhů nebo primitivních forem, např. při mezidruhovém křížení, somatické hybridizaci atd. a hodnocení hybridnosti.

Hlavní výhody těchto typů markerů spočívají v posuzování kodominance, absenci epistatických a pleiotropických účinků, snadnosti použití a nízkých nákladech. Nevýhody izoenzymů zahrnují:

(1) existenci jen mála isozymových systémů na druh (ne více než 30), s několika odpovídajícími markery, proto je rozlišení diverzity omezeno, ale pro praktické účely to postačuje;

(2) k dispozici je omezený počet polymorfních enzymatických systémů a enzymatické lokusy představují jen malou a nelibovolnou část genomu (vyjádřenou část), a proto pozorovaná variabilita nemusí být typická pro celý genom;

(3) i když tyto markery povolují velké množství vzorků, které mají být analyzovány, srovnání vzorků z různých druhů, lokusů, a laboratoří je problematické, protože jsou ovlivněny extrakčními metodami, rostlinnými tkáněmi, a stádiem, ve kterém se rostlina nachází (Mondini *et al.*, 2009).

Takové markery se dědí jako jednoduché Mendelovy faktory a heterozygoty většinou vykazují kodominanci.

K identifikaci těchto izoenzymů se využívá častá odlišnost jejich izoelektrického bodu. Biochemická analýza je založena na separaci proteinů do specifických pruhových šablon. Jedná se o rychlý způsob, který vyžaduje pouze malé množství biologického materiálu. Biochemické markery mohou být používány stejně jako DNA-markery, ale jsou méně spolehlivé, jelikož je jejich výskyt někdy ovlivňován vývojovým stádiem rostliny (liší se v jednotlivých orgánech), napadením viry, hladinou růstově aktivních látek apod.

3.2.2 Molekulární markery

Molekulární markery pracují tak, že zvýrazní rozdíly (polymorfismy) v rámci nukleové sekvence mezi různými jednotlivci. Tyto rozdíly zahrnují inserce, delece, translokace, duplikace a bodové mutace. Nezahrnují však aktivitu specifických genů.

Kromě toho, že jsou relativně odolné proti faktorům prostředí, mají molekulární markery tu výhodu, že: (1) se vztahují na všechny části genomu (introny, exony a doprovodné oblasti); (2) nevykazují pleiotropické nebo epistatické účinky; (3) jsou schopny rozlišit polymorfismy, které neprodukují fenotypové rozdíly a konečně, (4) některé z nich jsou kodominantní (Mondini *et al.*, 2009).

Různé použité metody jsou založeny buď na omezení hybridizace nukleových kyselin nebo na bázi polymerázové řetězové reakce (PCR), nebo obojím (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** pro seznam hlavních molekulárních metod analýzy). Kromě toho mohou různé techniky posuzovat buď markery multilokusu, nebo singlelokusu. Markery multilokusu umožňují souběžné analýzy několika genomových lokusů, které jsou založeny na principu amplifikace náhodných chromozomových vlastností pomocí oligonukleotických primerů s libovolnými sekvencemi. Tyto typy markerů jsou také definovány jako dominantní, neboť je možné pozorovat přítomnost nebo absenci pásma pro jakýkoliv lokus, ale není možné to rozlišit v heterozygotních (a/-) a homozygotních

podmínkách pro stejné alely (a/a). Naopak singlelokus markery využívají sondy nebo primery specifické pro genomové lokusy a jsou schopny hybridizovat nebo amplifikovat chromozomové vlastnosti se známými sekvencemi. Jsou definovány jako kodominantní, neboť umožňují rozlišování mezi homozygotními a heterozygotními lokusy (Mondini *et al.*, 2009).

Molekulární markery mohou nebo nemusí souviset s fenotypovou expresí genomových vlastností. Oproti konvenčním, fenotypovým alternativám nabízejí mnoho výhod, protože jsou stabilní a detekovatelné ve všech tkáních bez ohledu na růst, diferenciaci, vývoj nebo obranný stav buňky. Kromě toho nejsou zkreslovány životním prostředím, pleiotropními a epistatickými účinky.

Oproti morfologickým markerům mají molekulární tyto výhody (Chloupek, 2008):

- Lze identifikovat mnoho markerů,
- lze použít poměrně velký počet alel,
- molekulární markery se většinou dědí kodominantně, což umožňuje rozlišení homozygotů a heterozygotů,
- neovlivňují je vlivy prostředí,
- vytvářejí poměrně hustý rastr (sít') lokusů, rovnoměrně rozdělený v genomu.

Molekulární analýzy obsahují velké množství DNA molekulárních markerů, které mohou být použity pro analýzu variability. Různé markery mají různé genetické vlastnosti (mohou být dominantní nebo kodominantní, mohou zesilovat neznámý nebo charakterizovaný lokus, mohou obsahovat vyjádřené nebo nevyjádřené sekvence, atd.).

Základní markerové metody mohou být rozděleny do dvou kategorií:

- (1) metody nevycházející z PCR (nonPCR) nebo metody na základě hybridizace;
- (2) metody na základě PCR. Viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** pro srovnání nejpoužívanějších markerů.

3.2.3 Metody nevycházející z PCR (nonPCR)

3.2.3.1 Restričně hybridizační metody

Molekulární markery na bázi restričně hybridizačních metod byly použity pro studium rostlin relativně brzy a kombinovaly použití restričních endonukleáz a metod hybridizace (Southern, 1975). Restriční endonukleázy jsou bakteriální enzymy schopné rozstříhat DNA, identifikovat konkrétní sekvence palindromů a vyrábět polynukleotické fragmenty s variabilními rozměry (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Jakékoli změny v sekvencích (tj. bodové mutace), mutace mezi dvěma polohami (tj. delece a translokace), nebo mutace uvnitř místa enzymu, mohou generovat odchylky v délce restričního fragmentu získaného po enzymatickém štěpení.

RFLP markery a markery variabilního množství tandemových repetitiv (VNTRs) jsou příklady molekulárních markerů založených na restričně hybridizačních metodách. U RFLP je polymorfismus DNA detekován hybridizací chemicky označené DNA sondy na Southern blot DNA štěpené restričními endonukleázami, což vede k rozdílnému profilu DNA fragmentu. RFLP markery jsou relativně vysoce polymorfní, kodominantně dědičné, vysoce replikovatelné a umožňují současný screening mnoha vzorků. Znaky DNA mohou být analyzovány opakovaně stripováním a přesondováním (obvykle osm až deset krát) s různými RFLP sondami (sondou se rozumí úsek jednořetězcové DNA, který má sekvenci jako detekovaný gen, je obvykle označena radioizotopem fosforu, který ji umožňuje detekovat). Nicméně tato technika není velmi často používána, protože je časově náročná, vyžaduje drahá a radioaktivní/toxická činidla a velké množství vysoce kvalitní genomové DNA. Kromě toho přispívá ke složitosti metodiky předpoklad znalosti předchozí sekvencí informace pro stavbu sondy (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Tato omezení vedla k vývoji nového souboru méně technicky složitých postupů známých jako technik založených na PCR (Mondini *et al.*, 2009).

3.2.4 Markery založeny na amplifikačních metodách (odvozeny od PCR)

Použití tohoto typu markeru bylo exponenciální, následující vývoj polymerázové řetězové reakce (PCR) od Mullis *et al.* (Mullis *et al.*, 1986). Tato metoda spočívá v amplifikaci několika jednotlivých produktů DNA vyplývajících z oblastí DNA, které jsou lemované oblastmi s vysokou shodností s primery. Tyto oblasti musí být dostatečně blízko u sebe, aby umožnily fázi prodloužení.

Použití náhodných primerů překonalo omezení předchozí znalosti sekvence pro PCR analýzu a je použitelné pro všechny organismy, usnadnilo vývoj genetických markerů pro různé účely. Metody založené na PCR mohou být dále rozděleny do dvou podkategorií:

(1) metody náhodného použití primeru na základě PCR nebo sekvence pro nespecifické metody;

(2) sekvenčně cílené metody založené na PCR. Na základě toho byly vyvinuty dva různé typy molekulárních markerů: RAPD a AFLP (Mondini *et al.*, 2009).

3.2.4.1 Polymorfismus délky náhodně amplifikovaných fragmentů (RAPD)

Jednou z aplikací využívající polymerázové řetězové reakce je RAPD metoda (z anglického „Random Amplified Polymorphic DNA“). Poprvé byla tato metoda popsána v roce 1990. RAPD markery byly první molekulární markery na základě PCR pro použití k analýzám genetické rozmanitosti (Welsh a McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1991).

Oproti klasické PCR používá pouze jeden primer a hlavní výhodou je, že pro její použití není potřeba znát konkrétní sekvence cílových oblastí DNA. RAPD markery jsou generovány prostřednictvím náhodné amplifikace genomové DNA za použití krátkých primerů (dekamerů), dochází k oddělení získaných fragmentů na agarózovém gelu v přítomnosti ethidiumbromidu a nakonec vizualizaci pod ultrafialovým světlem (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** a **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Vytváření RAPD markerů je založeno na pravděpodobnosti, že sekvence DNA komplementární k použitému krátkému primeru (obvykle 10-mer) se v templátové DNA na obou řetězcích vzájemně vyskytují v takových vzdálenostech, které jsou pomocí PCR reakce ještě amplifikovatelné (Baránek *et al.*, 2006). Použití krátkých primerů je nutné pro zvýšení pravděpodobnosti, tzn., že i když jsou sekvence náhodné, jsou schopné najít homologní sekvence vhodné pro popisování.

Jelikož tento přístup nevyžaduje žádné předchozí znalosti analyzovaného genomu, může být použit u všech druhů za použití univerzálních primerů. Hlavní nevýhodou této metody je, že profilování je závislé na reakčních podmínkách, které se mohou měnit mezi laboratořemi; i rozdíl stupně teploty je dostačující k vytvoření různých modelů. Většina RAPD markerů vykazuje v diploidních organismech

dominantně/recesivní charakter, to znamená, že fragment DNA o jisté molekulární hmotnosti je u některých jedinců amplifikován a u některých ne. RAPD markery jsou tedy děděny v rámci mendelistických pravidel, a proto obvykle není možné rozlišovat heterozygotní organismy od homozygotních.

RAPD analýzy zachycují mutace v mnohem větší oblasti, než kterou pokrývají samotná místa komplementarity DNA a primeru. Při RAPD jsou poměrně často zaznamenávány u většiny organismů polymorfnní signály (Baránek *et al.*, 2006).

Libovolně primerovaná polymerázová řetězová reakce (AP-PCR) a DNA Amplification Fingerprinting (DAF), jsou nezávisle na sobě vyvinuté metody, které jsou variantami RAPD. Pro AP-PCR (Welsh a McClelland, 1990), se používá jediný primer, 10-15 nukleotidů dlouhý a zahrnuje amplifikaci dvou počátečních cyklů PCR při nízké náročnosti. Zbývající cykly jsou potom prováděny za vyšší náročnosti zvýšením teploty při popisování.

3.2.4.2 Polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů (AFLP)

K překonání omezení reprodukovatelnosti spojené s RAPD byla vyvinuta metoda AFLP holandskou společností Keygene (Vos *et al.*, 1995; Zabeau a Vos, 1992). Jedná se o alternativu RAPD na bázi DNA fingerprintingu. Tato metoda je založena na kombinaci hlavních technik analýz: štěpení DNA pomocí restričních endonukleázových enzymů a technologie PCR pro získání specifických selektovaných restričních fragmentů celkové DNA jakéhokoliv jedince, tedy napříč genomem, za vysoké míry opakovatelnosti pokusu. Lze ji považovat za přechod mezi RFLP a RAPD markerovými metodami, neboť v sobě spojuje výkon RFLP s flexibilitou technologie na bázi PCR (Mondini *et al.*, 2009).

Multilokusová analýza AFLP má mnohem vyšší schopnost rozlišení polymorfismu alel než metoda RFLP (Baker *et al.*, 1999) a je velice vhodnou metodou pro studium genetické variability na úrovni druhů či populací u široké škály organismů (Uthicke a Conand, 2005).

Páry primerů použité pro AFLP obvykle produkují 50-100 pásem v jednom testu. Počet amplifikačních produktů na AFLP testu je funkcí počtu selektivních nukleotidů v kombinaci AFLP primerů, motivů selektivního nukleotidu, obsahu GC, a velikosti a složitosti fyzického genomu. AFLP generuje fingerprinting jakékoliv DNA bez ohledu

na její zdroj a bez jakékoli předchozí znalosti sekvence DNA. Většina fragmentů AFLP odpovídá jedinečným pozicím na genomu, a proto mohou být využívány jako orientační body při genetickém a fyzickém mapování. Tato technika může být použita k rozlišení blízce příbuzných jedinců na úrovni poddruhů (Althoff *et al.*, 2007) a může také mapovat geny.

Zdroje polymorfismů AFLP jsou různorodé a mohou být způsobeny:

- (1) mutacemi restrikčního místa, které vytvářejí nebo odstraňují restrikční místo;
- (2) mutacemi sekvencí obklopujících restrikční místo, komplementárních s prodloužením selektivních primerů, umožňujících případné popisování primeru;
- (3) inzercí, duplikací nebo delecemi uvnitř amplifikovaných fragmentů. Tyto mutace mohou způsobit výskyt/zmizení fragmentu nebo jeho změny (zvýšení, nebo snížení) amplifikovaného fragmentu (Mondini *et al.*, 2009).

AFLP je finančně náročnější metoda. Její nevýhodou je, že se jedná o dominantní marker s občas nejistým původem a homologií fragmentů.

3.2.4.3 Markery specifické sekvence na základě PCR

Odlišný přístup k libovolné PCR amplifikaci spočívá v amplifikaci cílových oblastí genomu pomocí specifických primerů. S příchodem sekvenační techniky s vysokou propustností bylo generováno velké množství informací o DNA pro genomy mnoha druhů rostlin (Yu *et al.*, 2002). Byly vytvořeny Expressed sequence tags (EST) mnoha druhů plodin a tisíce sekvencí byly zaznamenány jako domnělé funkční geny pomocí výkonných nástrojů bioinformatiky. EST jsou jednoduše čitelné sekvence získané z částečného sekvenování hromadných mRNA poolů, které byly reverzně přepsány do cDNA. ESTové knihovny poskytují snímky genů vyjádřených v tkáni v době a za podmínek, ve kterých byly odebrány vzorky (Bouck a Vision, 2007). Navzdory těmto výhodám však EST-SSR nejsou bez nevýhod. Jedním z problémů s SSR obecně je možnost výskytu nulových alel, které se nedaří amplifikovat kvůli různé poloze primeru, a tak nevytvářejí viditelný amplikon, protože cDNA, ze které jsou odvozené EST, postrádá introny. Dalším problémem je, že nerozpoznaná místa sestřihu intronu by mohla narušit místa navázání primeru, což by mělo za následek selhání amplifikace. A konečně, jelikož jsou EST-SSR umístěny v genech, a tak u všech druhů více konzervovány, mohou být méně polymorfní než neznámé SSR. Ačkoli

použití EST má tato omezení, několik funkcí knihoven sekvencí EST z nich dělá cenný zdroj pro zachování a vývoj genetiky. EST jsou levným zdrojem pro identifikaci genově propojených markerů s vyšší úrovní polymorfismu, které mohou být také použity v mnoha případech úzce příbuzných druhů (Karaiskou *et al.*, 2008). ESTové knihovny jsou také dobrým výchozím bodem pro vývoj nástrojů pro studium genové exprese, jako jsou DNA čipy nebo kvantitativní PCR test (Goff *et al.*, 2002).

3.2.4.4 Markerová metoda na základě mikrosatelitů

Mikrosatelity nebo repetece jednoduchých sekvencí (SSR) jsou sady opakovaných sekvencí nalezené v rámci eukaryotických genomů (Bell a Ecker, 1994) a v některých genomech prokaryot. Skládají se z mnohokrát se opakujících jednoduchých motivů o délce obecně mezi 2 až 6 nukleotidy jako jsou např. (A/T)_n, (AG/CT)_n, (GATA/TATC)_n. Tyto opakující se motivy jsou nazývány jednotky repetece (Rosypal a kolektiv, 2001). Jejich celková délka obvykle nepřesahuje 100 pb.

Mikrosatelity jsou obvykle rovnoměrně rozmístěny napříč genomem a vykazují relativně vysokou míru polymorfismu mezi jednotlivými genotypy. Polymorfismy spojené s konkrétním lokusem jsou způsobeny rozdíly v délce mikrosatelitu, která zase závisí na počtu opakování základního motivu. Rozdíly v počtu tandemově opakovaných jednotek jsou zejména v důsledku proklouznutí standardu v průběhu replikace DNA, kde opakování umožňují párování pomocí odstranění nebo přidání opakování (Schlötterer a Tautz, 1992). Jelikož je prokluzování při replikaci pravděpodobnější než bodové mutace, mikrosatelitové lokusy bývají hypervariabilní. Mikrosatelitové testy ukazují rozsáhlé meziindividuální délky polymorfismu během PCR analýzy unikátních lokusů pomocí diskriminačních primerových sad (Mondini *et al.*, 2009).

Ve srovnání s RFLP technikou kladou mikrosatelity menší nároky na laboratorní vybavení, vyžadují mnohem menší množství izolované DNA, vykazují vyšší polymorfismus a jsou potenciálně automatizovatelné. Jelikož je každý lokus definován konkrétní primerovou sekvencí, mohou být výsledky SSR analýz snadno porovnávány mezi různými pracovišti, narozdíl od metod AFLP a RAPD. Je ovšem třeba brát v potaz možné problémy se správným určením velikosti výsledných produktů, kdy se určená délka alel může mezi různými experimenty i v rámci jednoho pracoviště mírně měnit (Baránek *et al.*, 2006).

Mikrosatelity jsou velmi populární genetické markery, neboť mají: kodominantní dědičnost, vysokou hojnost, obrovský rozsah alel diverzity, jednoduchost posuzování SSR velikosti variability prostřednictvím PCR s páry doprovodných primerů a vysokou reprodukovatelnost. Nicméně vývoj mikrosatelitů vyžaduje rozsáhlé znalosti sekvencí DNA a někdy podceňuje měření genetické struktury, a proto byly vyvinuty především pro zemědělské druhy, spíše než pro volně žijící druhy. Původní metody byly založené hlavně na hybridizačních technikách, přičemž novější jsou založeny na PCR (Gupta a Varshney, 2000). Hlavní molekulární markery založené na posouzení variability sekvencí vytvořené mikrosatelity jsou (Mondini *et al.*, 2009): STMSs (Sequence Tagged Microsatellite Site), SSLPs (Simple Sequence Length Polymorphism), SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), SCARs (Sequence Characterized Amplified Region) and CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences).

3.2.5 Jednonukleotidový polymorfismus (SNP)

Změny jednotlivých nukleotidů sekvence genomu jedinců populací jsou známé jako SNP markery, někdy také nazývané jako genetický marker nové generace, vyskytující se ve formě jednonukleotidových bodových mutací - inserce/delece (tzv. InDels). SNP jsou nejhojnějšími molekulárními markery v genomu. Jsou široce rozptýleny po celém genomu s proměnlivým rozdělením mezi druhy. SNP jsou obvykle převládající v nekódujících oblastech genomu. Když je SNP přítomen v rámci kódujících oblastí, je možné vytváření buď nesynonymních mutací, které vedou ke změně sekvence aminokyselin (Sunyaev *et al.*, 1999), nebo synonymních mutací, které nemění sekvenci aminokyselin. Synonymní změny mohou ovšem měnit sestřih mRNA, což vede k fenotypovým rozdílům (Richard a Beckman, 1995). SNP jako markery méně podléhají mutacím než mikrosatelity a jejich detekce je relativně snadná. Zlepšení v technologiích sekvenování a zvýšení dostupnosti rostoucího počtu EST (Expressed sequence tag) sekvencí přispělo analýzami možné genetické variability přímo na úrovni DNA.

Většina SNP genotypových anlyz je založena na: alelově specifické hybridizaci, oligonukleotidové ligaci, prodloužení primeru nebo invazivním štěpení (Sobrino *et al.*, 2005). Metody genotypizace, včetně DNA čipů, alelově specifické PCR a metody prodloužení primeru založené na SNP jsou obzvláště atraktivní pro jejich vysokou datovou propustnost a jejich vhodnost pro automatizaci. Používají

se pro širokou škálu účelů, včetně rychlé identifikace odrůd plodin a výstavbu ultra vysoce hustých genetických map (Mondini *et al.*, 2009).

3.2.6 Markery založené na jině než genomové DNA

Hlavním rysem eukaryotických buněk ve srovnání s prokaryotickými je přítomnost různých vnitrobuněčných organel. Organely jako mitochondrie a chloroplasty mají svůj původ v symbióze s primitivními buňkami a narozdíl od dalších organel mají vlastní genetickou informaci.

Existují proto i vysoce informativní přístupy ke studiu genetické variability založené na detekci mikrosatelitních sekvencí organel; ve skutečnosti, vzhledem k jejich uniparentálnímu režimu přenosu, chloroplastové (cpDNA) a mitochondriální genomy (mtDNA) vykazují různé vzory genetické diference v porovnání s jadernými alelami (Provan *et al.*, 1999). V důsledku toho byly, kromě jaderných mikrosatelitů, rovněž vyvinuty markerové metody založené na chloroplastových a mitochondriálních mikrosatelitech.

CpDNA., která je mateřsky zděděná ve většině rostlin, se ukázala být účinným nástrojem pro fylogenetické studie. Vzhledem ke zvyšujícímu se počtu aktuálních případů vnitrodruhových odchylek pozorovaných v cpDNA, existuje další možnost analýzy genetické variability v rámci jednoho druhu (Ali *et al.*, 1991; McCauley, 1994). CpDNA byla dobře zachována v genomu, a v důsledku toho byla široce využívána pro studium populací rostlin pomocí PCR-RFLP a metod sekvenování (McCauley, 1994). Jsou také používány při analýze genetické rozmanitosti (Clark *et al.*, 2000) a při získání fylogeografie rostlinných populací (Shaw *et al.*, 2005).

Naopak mitochondriální DNA u rostlin není vhodným nástrojem pro studium fylogeneze a genetické rozmanitosti, jelikož je kvantitativně vzácná. Analyzovat strukturu rostlinných mitochondriálních genomů je obtížné částečně proto, že se jejich struktura rychle mění (Řepková, 2013).

Na jaderné úrovni je dalším typem sekvence, často používané pro studium genetické diverzity, ribozomální RNA (rRNA). Ribozomální RNA geny jsou umístěny na specifických chromozomálních lokusech *Nor* a organizovány v tandemových repetičích, které lze opakovat až tisíckrát. Vzhledem k tomu, že některé oblasti rRNA jsou dobře zachovalé u eukaryot, představuje jejich zkoumání velmi užitečný

fylogenetický nástroj. Naopak, ostatní oblasti, jako jsou "Internal Transcriber Spacers" (ITS) jsou tak variabilní, že mohou být použity k analýze polymorfismu na vnitrodruhové úrovni (Mondini *et al.*, 2009).

3.2.7 Molekulární markery založené na transpozonech

Přestože vložení transpozonu může mít škodlivé účinky na hostitelské genomy, transpozóny jsou považovány za důležité pro adaptivní evoluci a mohou být nástrojem pro získávání nových znaků (Gray, 2000). Transpozony (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) neboli mobilní genetické elementy tvoří pravidelnou součást genomů rostlin. Často navozují mutace genů, jsou odpovědné za přestavby chromozomů a mohou přenášet nové znaky (horizontální genový transfer), viz. Čegan *et al.* (nedatováno). Jsou to sekvence DNA schopné transpozice (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**), tedy přemístění z jednoho místa genomu do jiného místa. Způsobují změny genetické informace a významně se podílejí na tvorbě architektury genomu. Repetitivní DNA v genomech rostlin je většinou tvořena transpozony. Rozlišujeme dva typy transpozonů: DNA transpozony a retrotranspozony.

Retrotranspozony kódují reverzní transkriptázu, která vytváří DNA kopie RNA transkriptů, které se integrují do různých míst genomu (Navrátil, nedatováno). Dosud obdržely malou pozornost při hodnocení genetické rozmanitosti, a to i přes jejich přínos do struktury genomu, velikost a variace (Gynheung *et al.*, 2005). Navíc, jejich rozptyl (Katsiotis *et al.*, 1996), všudypřítomnost (Flavell *et al.*, 1992) a převládání v rostlinných genomech poskytují vynikající základ pro vytvoření souboru markerových systémů, které mají být použity samostatně nebo v kombinaci s dalšími markery, jako jsou například AFLP a SSR.

Molekulární analýza na základě retrotranspozonů spoléhá na amplifikaci používající primer odpovídající retrotranspozonu a primer vhodný pro sousední úsek genomu. K tomuto typu třídy molekulárních markerů patří (Mondini *et al.*, 2009): Sequence-Specific Amplified Polymorphism (S-SAP), Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP), Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP), Retrotransposon-Based Amplified Polymorphism (RBIP) a nakonec Transposable Display (TD).

3.2.8 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (PCR v reálném čase)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (označovaná jako RT-PCR nebo qPCR) je laboratorní metoda založená na polymerázové řetězové reakci, amplifikující a současně kvantifikující cílovou molekulu DNA (Heid *et al.*, 1996). To umožňuje jak detekci, tak kvantifikaci specifické sekvence ve vzorku DNA. Principem je rychlé a přesné zaznamenávání produktů PCR bezprostředně po jejich vzniku. RT-PCR monitoruje fluorescenci emitovanou v průběhu reakce jako indikátor tvořeného amplikonu v průběhu reakce v každém jednotlivém cyklu PCR v reálném čase (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).

Dvě obvyklé metody kvantifikace jsou:

- (1) použití fluorescenčních barviv, které se interkalují do dvoušroubovice DNA,
- (2) sondy modifikovaného oligonukleotidu DNA, které fluoreskují, když jsou hybridizovány s komplementární DNA.

Hlavní výhoda této techniky spočívá v její citlivosti a rychlosti díky systému detekce (spektrofotometrická citlivost k ethidium bromidu) a rychlé změny teploty. Kvantitativní PCR je proto vhodná zejména pro molekulární markery na bázi PCR amplifikace. Ve skutečnosti řada konzervačních a fylogenetických studií nyní stále více využívá kvantitativní PCR pro stanovení genetické variability (Pagnotta *et al.*, 2009).

Předpokladem RT-PCR analýz je dostupnost termálních cyklerů, které jsou vybaveny zařízením pro monitorování fluorescence v jednotlivých cyklech RT-PCR. Dalším požadavkem je dostupnost reakčních směsí vhodných pro amplifikaci DNA fragmentů a přítomnosti fluorescenčního DNA barviva nebo sondy, které umožňují kvantifikaci DNA (Anonym, 2015).

3.2.9 Technologie DArT (Diversity Arrays Technology)

DArT je obecná a nákladově efektivní metoda stanovení genotypu. Byla vyvinuta k překonání některých omezení jiných markerových technologií, jako RFLP, AFLP a SSR (Akbari *et al.*, 2006). Je v podstatě variací metody RFLP s prvky AFLP. DArT je alternativní metodou časově náročných metod založených na hybridizaci, zaznamenávající současně několik tisíc lokusů v jednom testu. Jako výchozí krok využívá štěpení DNA, restriční endonukleázy jsou zde však dvě. Narozdíl od metody RFLP se polymorfnní fragmenty nedetekují hybridizací na mebráně, ale na speciálním

čipu obsahujícím genomovou reprezentaci studovaného druhu. Vývoj čipu pro nový druh je však poměrně finančně náročný, stejně jako analýza v případě, že máme zájem o studium pouze malého počtu vzorků. Je vhodná zejména pro stanovení genotypu polyploidních druhů s velkými genomy, jako je pšenice. Tato technologie vytváří celogenomové fingerprints vyhodnocováním přítomnosti, či nepřítomnosti fragmentů DNA v genomových zástupcích získaných ze vzorků genomové DNA (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**).

DArT se skládá z několika kroků: (1) snížení složitosti (naštípání) DNA; (2) vytváření knihovny; (3) mikrotesty knihoven na sklíčka; (4) hybridizace fluoro- značené DNA na sklíčka; (5) snímání snímků pro hybridizační signál; (6) extrakce a analýzy dat. DArT působí tak, že snižuje složitost vzorku DNA pro získání "reprezentace" z tohoto vzorku. Hlavní použitá metoda pro snížení složitosti závisí na kombinaci štěpení restrikcí enzymem a adaptéru ligace, následnou amplifikací. Nicméně může být použita nekonečná řada alternativních metod pro přípravu genomových zobrazení pro analýzu DArT. Markery DArT pro nové druhy se objevují screeningem knihovny několika tisíc fragmentů z genomové reprezentace připravené ze vzorků poolu DNA, které zahrnují rozmanitost druhů. Platforma mikrořady činí proces zjišťování efektivní, protože všechny markery na konkrétní DArT řadě jsou hodnoceny současně. Pro každou metodu redukce složitosti, může být sestavena nezávislá kolekce markerů DArT na samostatné DArT řadě. Počet markerů pro daný druh proto závisí pouze na:

(1) úrovni genetické variability v rámci druhu (nebo genovém poolu);

(2) počtu detekčních metod snižování složitosti. DArT markery jsou dominantní, což může být jejich nevýhodou.

3.3 Metody nové generace sekvenování

Nedávný vývoj metod "vysoce propustného sekvenování", provádí obzvláště důležité sekvenování DNA pro ochranu biologie. Tyto technologie mají potenciál odstranit jednu z hlavních překážek k provádění genomických postupů u nevorových organismů, včetně mnoha významů zachování, tedy nedostatku rozsáhlé informace genomové sekvence. Tyto technologie se ve skutečnosti vyvarují nákladům, komplikacím a předsudkům spojeným s tradičním sekvenováním na základě klonu pomocí přímé amplifikace DNA šablon (Holt a Jones, 2008). Tři prvotřídní technologie,

kteře mají být uváděny na trh, jsou 454 (Roche), Solexa (Illumina), a SOLiD (Applied Biosystems). Sekvenování 454 je metoda založená na pyrosekvenování, která využívá emulzní PCR pro dosažení vysoké propustnosti, paralelně se sekvenováním (Margulies *et al.*, 2005). Metoda Solexa sekvenování syntézou (SBS) je založena na zjednodušeném způsobu výstavby knihovny a reverzibilním ukončení chemie fluorescence v sekvenační reakci, která produkuje čtení 35pb (Bentley, 2006). Sekvenování podporou ligace a detekce oligonukleotidu (SOLiD) má některé vlastnosti společné s dalšími dvěma technologiemi, ale na rozdíl od ostatních dvou technologií využívá metody sekvenování na základě ligace (Shendure *et al.*, 2005) krátkých oligo sond, které jsou fluorescenčně značeny.

Tyto nové přístupy k sekvenování DNA umožňují tvorbu 0,1-4 giga bází sekvence DNA za jeden až sedm dní s náklady na činidlo mezi 3400 a 8500 amerických dolarů. Vzhledem k rozdílům ve čtení délek fragmentu sekvenování se cíl každé z těchto technologií liší: kratší délka a nižší cena za bazi u Solexa a SOLiD. To dělá tyto metody vhodné pro re-sekvenování celého genomu, kde může být sestavena nová sekvence genomu a pak srovnána se vzorovou sekvencí, jestliže sekvence genomu druhu již existuje. Na druhé straně, sekvenování 454, s delším čtením délek (brzy bude vzhůru na 400pb na sekvenci), může být také použito pro získání prvního záblesku genomu druhu nebo transkriptomu (Mondini *et al.*, 2009).

3.4 Bioinformatika

Bioinformatika má své kořeny neurčitě usazené na začátku osmdesátých let 20. století, v době, kdy se osobní počítače začaly objevovat ve výzkumných laboratořích a vědci začali poznávat, že tyto počítače by mohly být použity jako nástroje pro organizaci, analýzu a vizualizaci dat. Použití výpočetních nástrojů genomové anotace a komparativní genomiky je nutné k získání užitečného pochopení jakéhokoliv genomu.

Rozvoj vysoce výkonné technologie by byl k ničemu bez schopnosti analyzovat exponenciálně rostoucí množství biologických dat. Ta musí být uložena v elektronických databázích v souvislosti se specifickým softwarem navrženým tak, aby umožňoval aktualizace dat, dotazování a vyhledávání. Informace musí být snadno přístupné a k dotazování flexibilní, umožňující zpřístupnění informací, které mohou být analyzovány, aby odhalily metabolické dráhy a role proteinů a účastníků se genů.

Bioinformatika je zásadní pro kombinaci informací z různých zdrojů a vytváření nových poznatků z již existujících dat. Má také potenciál simulovat strukturu, funkci a dynamiku molekulárních systémů, a proto je užitečná při formulování hypotéz a řízení experimentální činnosti (Rischkowsky a Pilling, 2007).

Metody analýzy dat se také vyvíjí. Nové metody umožňují studium diverzity bez apriorních předpokladů týkajících se struktury populací v rámci výzkumu; zkoumání diverzity k identifikaci adaptivních genů (například s využitím populační genomiky); a integrace informací z různých zdrojů, včetně sociálně-ekonomických a ekologických parametrů, pro stanovení priorit zachování. Přijetí správné strategie odběru vzorků a systematického sběru fenotypových údajů a údajů o životním prostředí zůstávají klíčovými požadavky na využití plného potenciálu nových technologií a přístupů.

Příklady některých databází rostlinných genomů jsou:

- 1) European Vitis Database – genetické zdroje rodu *Vitis* (<http://www.eu-vitis.de/index.php>).
- 2) GDR (Genome Database for Rosaceae) – genomové, genetické a šlechtitelské zdroje pro Rosaceae (<http://www.rosaceae.org/>).
- 3) EVIGEZ – Evidence genetických zdrojů rostlin v ČR – pasportní data genetických zdrojů zemědělsky využívaných rostlin v českých kolekcích (<http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/>).
- 4) Weath Pedigree and Identified Allels og Genes On Line - rodokmeny a identifikovatelné alely u 74 527 kultivarů pšenice získané z 3 261 literárních zdrojů (<http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/>).
- 5) EWDB – European Wheat Database (Evropská databáze pšenice ECP/GR) – Centrální evropská databáze pšenice začleněná do Evropského kooperativního programu pro genetické zdroje (ECP/GR) (<http://genbank.vurv.cz/ewdb/>)
- 6) FLAGdb++ (<http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/HTML/index.shtml>)
- 7) CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb>) - kolekce transkriptomických dat rostlin, nejprve věnována expresi genů rodu huseníček (*Arabidopsis*) a pak rozšířena na 20 jiných rodů.
- 8) UTiLLdb, URGV Tilling Database - platforma se 4 sbírkami mutantů: hrách, rajče, válečka a novou kolekcí pro len (<http://urgv.evry.inra.fr/UTiLLdb>)

Databáze 6-8 byly vytvořeny skupinou „Bioinformatics for predictive genomics“.

3.4.1 European Vitis Database¹

Kvalita a správa dlouhodobého uchování genových zdrojů závisí na několika faktorech, jako např. údržbě ve sbírkách, hygienických podmínkách a výběru cenných a unikátních genotypů. Předpokladem pro druhý je správnost druhu. Proto v European Vitis Database byla přisuzována vysoká priorita přesné dokumentaci kritérií týkajících se správnosti druhu.

European Vitis Database (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) zahrnuje 3 úrovně přístupu (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**):

- (1) přístup veřejnosti,
- (2) přístup všech partnerů,
- (3) zvláštní přístup partnerů.

Cestou veřejného přístupu má uživatel přístup k datům položek révy vinné existujících v evropských sbírkách révy vinné. Přes Login (uživatelské jméno a heslo) vstoupí partneři European Vitis Database do partnerské úrovně přístupu, která je rozdělena na přístup všech partnerů a zvláštní přístup partnerů. Toto je pracovní plocha pro partnery z GrapeGen 06 respektive Cost action FA1003. Zde se nacházejí možnosti nahrávání a stahování dat. Z úrovně zvláštního přístupu partnerů lze importovat data. Programy importu byly vytvořeny pro nahrávání dat MCPD, SSR-markerů, popisů, virů, populací a fotografií *Vitis sylvestris*.

Na internetových stránkách této databáze se nachází seznam 58 přispěvatelů z 28 zemí světa včetně jejich kontaktních údajů. Dále kódy institutů uvedených v údajích MCPD. Důležité odkazy (např. na GrapeGen06 nebo český EVIGEN, aj.). Požadavky stanovené pro formáty deskriptorů, které se doporučují partnerům této databáze dodržovat.

Přístup k datům SSR-markerů je možný jen na základě předplatného. Pro přihlášení se musí kontaktovat příslušná osoba, jak je uvedeno v textu na internetových stránkách. Předplatiteli bude poskytnuto uživatelské jméno a heslo.

¹ Celá tato kapitola vychází z informací uvedených na webových stránkách European Vitis Database (The European Vitis Database, 2007).

V databázi jsou k dispozici údaje většiny charakterizovaných položek virů. Existují dvě možnosti vyhledávání: "A" pro získání všech položek (údaje všech položek popsaných virů); "B" pro konkrétní vyhledávání (za pomoci zvolení kritérií vyhledávání).

Katalog odrůd nabízí uživatelům jednostránkový popis položky ke stažení jako PDF dokument (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** a **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Popis zahrnuje morfologické a agronomické charakteristiky a fotky vrcholu výhonu, listů a hroznů. Součástí databáze je také katalog národně registrovaných odrůd s přílohami. Příloha 1A obsahuje seznam odrůd révy registrovaných v členských státech EU a oficiální názvy registrace pro každou zemi; příloha 1B obsahuje stejný seznam pro členy EU a třetích zemí účastnících se programu GrapeGen06. Příloha 2A obsahuje index oficiálních názvů odrůd registrovaných v členských státech EU a jejich společný "hlavní název" podle VIVC; příloha 2B tentýž index pro členy EU a třetí země účastnící se programu GrapeGen06. Obsahem přílohy 3A jsou oficiální národní katalogy odrůd révy vinné pro každý členský stát Evropské unie; obsahem přílohy 3B jsou stejné oficiální národní katalogy odrůd révy vinné členských zemí EU a třetích zemí účastnících se programu GrapeGen06.

Přesný postup, jak s databází pracovat, je ke stažení na internetových stránkách European Vitis Database.

3.4.2 GDR (Genome Database for Rosaceae)²

Genomová databáze pro *Rosaceae* (GDR) byla spuštěna v roce 2003. Jedná se o organizovanou a integrovanou webovou databázi poskytující centralizovaný přístup ke genomickým, genetickým a šlechtitelským údajům *Rosaceae* (mandloně, jabloně, ostružiníky, třešně, broskvoně, hrušně, slivoně, maliníky, růže a jahodníky (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**)) a analytickým nástrojům s cílem usnadnit základní, translační a aplikovaný výzkum *Rosaceae*. GDR je podporována dotacemi z různých amerických programů. Obsahuje celé sekvence genomu jabloně, broskvoně a jahodníku, které jsou k dispozici pro procházení nebo stahování s řadou poznámek, včetně modelových prognóz genu, uspořádaných transkriptů, opakujících se prvků, polymorfismů, mapovaných genetických markerů, aj.

² Celá tato kapitola vychází z informací uvedených na webových stránkách GDR (GDR, 2002).

Vyhledávací stránky jsou k dispozici pro geny, sekvence, markery, lokusy znaku, hodnocení rysů, genetickou rozmanitost a publikace. Nové nástroje vyhledávání pro šlechtitele umožňují srovnávací výběr a pomoc při rozhodování u šlechtění. GDR také poskytuje on-line analytické nástroje, jako je například NCBI BLAST a Batch BLAST, primer3 a nástroj vyhledávající sekvence.

Do této databáze přispívá kolem 34 přispěvatelů ze 23 institucí z 9 zemí světa. V roce 2014 měla NDR 42.707 návštěv od 16.992 návštěvníků ze 152 zemí, kteří navštívili 192.330 stran (jak je zaznamenáno v Google Analytics).

3.4.3 EVIGEZ³

Informační systém EVIDence GEnetických Zdrojů rostlin (EVIGEZ) byl vyvíjen od roku 1984 ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze jako speciální uživatelský program pro dokumentaci genetických zdrojů zemědělsky využívaných rostlin (GZR) v bývalém Československu. Od roku 1992 je systém využíván v České republice v síti 12 spolupracujících institucí (lokalizovaných na 15 pracovištích), které se podílejí na Národním programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiversity (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Databáze GZR sestává ze tří základních informačních okruhů:

- Pasporní data - základní informace o genetickém zdroji
- Popisná data - charakterizace a vlastní hodnocení (podrobné hodnocení morfologických, fenologických, biologických a hospodářských znaků ve stupních 1 - 9, na základě národních klasifikátorů, které jsou v současnosti vypracovány pro 28 plodin)
- Skladová dokumentace genové banky VÚRV, v.v.i.

Centrálně je informace shromažďována v genové bance VÚRV, v.v.i., v Praze a dílčí informace týkající se jednotlivých kolekcí jsou distribuovány na jednotlivé spolupracující ústavy. Data jsou pravidelně obousměrně vyměňována. Struktura informací je kompatibilní s mezinárodními standardy. Pasporní data jsou součástí většiny mezinárodních plodinových databází. Pasporní informace je volně dostupná ve verzi on-line a nahrazuje dříve publikované katalogy GZR.

³ Celá tato kapitola vychází z informací uvedených na webových stránkách EVIGEZ (Faberová, 2014).

Na internetových stránkách EVIGEZ je možné rychlé vyhledávání dat podle ústavu řešitele, skupiny plodin (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) nebo rodu, druhu. Dále jsou zde vyhledávací formuláře pro pasportní a popisné údaje.

4 VLASTNÍ KOMENTÁŘ K ŘEŠENÉ PROBLEMATICE

Genetická diverzita je hodnocena, o níž je třeba obzvlášť v dnešní době pečovat. Genetická variabilita je nutnou podmínkou pro stabilitu ekosystémů, uniformní populace může být totiž zcela fatálně zasažena pouze jednou nákazou či malou změnou podmínek okolního prostředí. Následky takových událostí mohou být nedozírné, jak ukazuje historický příklad velkého hladomoru v Irsku v roce 1846 způsobený ztrátou poloviny úrody brambor v důsledku jejich napadení plísní bramborovou.

Rozmanitost genetické informace populace však není nutná jen pro bezprostřední přežití. Ještě důležitější se ukazuje být pro druh v dlouhodobém horizontu, druh se totiž potřebuje neustále vyvíjet, aby se mohl úspěšně adaptovat na nové podmínky. Tak se ale může dít jen tehdy, pokud je v populaci akumulována dostatečná genetická proměnlivost, která umožní převládnutí nových, nyní výhodných znaků druhu. Navíc potomci geneticky velmi příbuzných rodičů jsou mnohem častěji geneticky defektní a projevují se u nich nepříznivé vlastnosti silněji než u rodičů.

Udržování genetické rozmanitosti má velkou cenu i pro zemědělskou činnost člověka, díky ní může šlechtit stále lepší a na specifické podmínky adaptované druhy, představuje totiž zásobárnu velmi variabilních genotypů. V nynější době však paradoxně dochází k výraznému ochuzování genetické diverzity nejvýznamnějších zemědělských plodin, děje se tak v důsledku silných ekonomických preferencí jak producentů, kteří preferují plodiny nejlepší ve smyslu nízké náročnosti pro pěstování, tak konzumentů dávajících přednost jen určitým odrudám. Vhodným příkladem tohoto je mrkev, jejíž odrůdy v minulosti existovaly i s bílým, žlutým či červeným kořenem, tyto však prakticky vymizely.

Problémy s genetickou erozí se však netýkají pouze intenzivně zemědělsky využívaných druhů, ale zcela všech. Mezi současnými ekologickými problémy považují odborníci právě ztrátu genetické rozmanitosti za problém zcela nejvýznamnější proto, že genetická variabilita je zcela nenahraditelná. Není přílišných pochyb o tom, že ztrácející se genetická diverzita je způsobena velikostí a způsobem života lidské populace. Ochrana genetické diverzity je tedy implementována do koncepce celkové ochrany přírody, i když záměrná ochrana diverzity je mnohem starší. O jejím významu pak svědčí například mezinárodní Úmluva o biologické rozmanitosti, uzavřená v roce 1992 pod patronátem OSN.

Diverzitu se obecně snažíme chránit a zachovat různými způsoby zejména však ochranou ohrožených druhů (in situ), která se překývá s dalšími oblastmi ochrany, a přímou konzervací genetického bohatství žijících či přežívajících druhů, sběrem a uchováním jejich vzorků v genetických bankách (ex situ). Cílem tohoto sběru vzorků je také samotné mapování a hodnocení genetické diverzity na různých místech, přičemž pozornost není již věnována jen ohroženým a hospodářsky významným druhům a druhům vyskytujícím se v odlehlých a nedostatečně prozkoumaných oblastech, ale také planým, plevelným a dosud nevyužívaným druhům. Cílem je získat a uchovat maximální genetickou diverzitu za cenu udržitelných počtů vzorků.

Například v České republice zabezpečuje ochranu genetické diverzity rostlin Národní program konzervace a využití genofondu rostlin a v Národní genové bance ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni je již uloženo přes 80 tisíc vzorků, stále se ovšem omezujeme spíše jen na druhy s hospodářským významem, přičemž by bylo velmi vhodné se zaměřit i na druhy volně žijící.

Naše představy a znalosti o genetické diverzitě nejsou zdaleka dokonalé, a nevím tedy, zdali nemůžeme opomenout nějaký z klíčových druhů v našem úsilí o zachování genetické diverzity. Toto je dáno tím, že hodnocení genetické diverzity prozatím není zároveň nenákladné a přesné.

Jako první se nabízí velmi snadné posuzování genetické variability pomocí morfologických znaků, jako jsou např. barva, charakteristiky výnosu, monogenní rezistence. Jejich použití je velmi staré, své pokusy pomocí nich hodnotil již Johann Gregor Mendel a na jejich jednotném základě a stabilním testování jsou posuzovány i odrůdy. Jednotlivé druhy však nevykazují mnoho morfologických markerů, mnohé se projeví až v pozdním stádiu života rostliny a většina z nich navíc výrazně závisí na vnějších podmínkách.

Genetickou diverzitu je také možné hodnotit podle biochemických markerů, kterými jsou nejčastěji zásobní proteiny semen a izoenzymy. Přestože hodnocení genetické diverzity podle těchto markerů je snadné, levné a relativně přesné, používá se tak například při registračním řízení odrůd, má jejich použití také řadu nevýhod. Jednotlivé druhy rostlin jich nevykazují dostatek, částečně mohou být ovlivněny vnějšími vlivy jak na rostliny, odkud pocházejí, tak při procesu jejich extrakce pro zkoumání.

Jako nejpřesnější se tedy ukazují molekulární markery, které zvýrazní rozdíly (polymorfismy) v rámci nukleové sekvence mezi různými jednotlivci. Tyto rozdíly zahrnují inserce, delece, translokace, duplikace a bodové mutace. Nezahrnují však aktivitu specifických genů. Mohou se vztahovat k celému genomu a jsou schopny rozlišit polymorfismy bez fenotypové exprese. Navíc jsou stabilní vůči vlivům vnějšího prostředí, nejsou jimi nijak zkreslovány a jsou stejné a stejně přítomné ve vzorcích odebraných z různých tkání jedné rostliny, bez ohledu na růst, diferenciaci, vývoj, nebo obranný stav buňky. Markerů lze navíc identifikovat velmi mnoho a jsou univerzální.

Metod založených na posuzování molekulárních markerů existuje celá řada, mohou být založeny na omezení hybridizace nukleových kyselin nebo na bázi polymerázové řetězové reakce (PCR), nebo obojím, některé metody umožňují souběžné analýzy několika genomových lokusů, mohou být také prováděny na nejaderné DNA nebo například na RNA ribozomů. Moderní metody navíc dovolují vysoce propustné sekvenování dlouhých úseků DNA, což otevírá možnosti pro snadnější analýzy celých genomů jednotlivých rostlin. Snad jediným problémem těchto metod zůstávají značné náklady, které jsou oproti morfologickým a biochemickým markerům stále ještě nesrovnatelné. Ovšem vývoj v oblasti výzkumu nových molekulárních metod postupuje tak překotně, že se brzy budou moci tyto metody cenou vyrovnat nyní méně nákladným metodám.

5 ZÁVĚR

Výzkumy i historická zkušenost ukazují, že role genetické diverzity je důležitou vlastností rostlin umožňující jejich adaptaci na měnící se podmínky prostředí. Dostatečná genetická variabilita druhu či populace je nutnou podmínkou pro krátkodobé přežití druhu. Krátkodobé proto, že geneticky uniformní populace jsou výrazně náchylnější k nepříznivým vnějším vlivům, které pro ně mohou mít fatální následky, v generaci potomků geneticky příbuzných rodičů se projevuje inbrední deprese a tyto generace ztrácejí možnost adaptivní odpovědi, která je nutnou podmínkou pro dlouhodobé přežití druhu, jelikož ten se musí neustále přizpůsobovat stále novým vnějším podmínkám.

Ztrátě genetické diverzity nyní čelíme i u důležitých hospodářských plodin. Už totiž samotná kultivace těchto plodin je zbavuje genetické diverzity, protože jsou při ní vybírání pouze v jistých ohledech optimální jedinci. Mimo centra původu, která se výrazně překrývají s místy vzniku prvních civilizací, je tedy genetická diverzita zemědělsky využitelných plodin velmi nízká. Některé zemědělské plodiny byly dokonce mimo svá obvyklá místa výskytu introdukovány jen v několika desítkách jedinců. Přitom rozsáhlá genetická diverzita hospodářsky využitelných plodin a jejich planých odrůd představuje genetickou základnu pro jejich další šlechtění, které se může ukázat jako nutné. Jistou odpovědnost za genetickou erozi zemědělských plodin nesou také spotřebitelé, kteří dávají přednost jen několika málo určitým odrůdám.

Genetická eroze však neohrožuje jen intenzivně zemědělsky využívané plodiny, dotýká se nyní všech druhů. Mnohými je tak považována za nejvýznamnější ekologický problém, kterému lidstvo dnes čelí. Ztráta genetické diverzity je totiž nenahraditelná. Význam toho potvrzuje v roce 1992 uzavřená mezinárodní Úmluva o biologické rozmanitosti. Její signatářské státy, mezi nimiž je i Česká republika, se zavazaly se zasazovat o zachování diverzity na svém území. Diverzitu se snažíme chránit jak *in situ*, tak také *ex situ* uchováváním vzorků významných či ohrožených druhů. V České republice již od konce 80. let minulého existuje Národní genová banka, která v dnešní době chrání přes 80 tisíc vzorků.

Genetickou diverzitu můžeme hodnotit podle několika tříd ukazatelů, markerů. Nejdostupnějšími, ovšem nedostatečně přesnými, jsou morfologické markery, mezi nimiž jsou např. barva, charakteristiky výnosu, monogenní rezistence. Jejich použití je staré a pro účely dnešní vědy již zdaleka nepostačují, jednotlivé druhy jich mají málo a jsou ovlivnitelné prostředím.

Podobně nedostatečné se již ukazují být i biochemické markery, jimiž jsou např. zásobní proteiny semen a izoenzymy. Pomocí nich jsou sice vedena registrační řízení odrůd, ovšem biochemických markerů se pro účely moderní vědy ukazuje být málo, přitom také nejsou příliš stabilní, což se týče jistých vlivů vnějšího prostředí, ale také např. postupu extrakce.

Naproti těmto sice nepřilíživě nákladným, zato však nedostatečně přesným markerům stojí molekulární markery. Posuzování genetické diverzity pomocí nich může být nákladné, ovšem je výrazně přesnější a univerzálnější, jednou metodou můžeme hodnotit vzorky odebrané z různých tkání jednoho jedince, můžeme zanedbat vliv prostředí, ve kterém se vyvíjel, navíc se nemusíme omezovat na jedince jednoho druhu. Jedna metoda bude fungovat pro jakýkoliv vzorek nukleové kyseliny.

Metody založené na posuzování molekulárních markerů můžeme rozdělit podle několika hledisek. Mohou být založeny na omezení hybridizace nukleových kyselin nebo na bázi polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo kombinaci obojího. Restriktivně hybridizační metody, které byly používány v praxi již velmi brzy, sice jsou velmi přesné, ovšem velmi náročné na provedení, vyžadují radioaktivní činidla a velké množství klativní genomové DNA. Proto byly vyvíjeny metody na bázi PCR. Pomocí metod na bázi PCR je možné detekovat polymorfismy částí DNA lišících se jak délkou, tak funkcí. Metody založené na posuzování molekulárních markerů mohou analyzovat single- nebo naopak multilokus, tedy několik genových lokusů souběžně. Navíc není nutné se omezit na jadernou DNA, některé metody využívají např. ribozomální RNA. Stále jsou vyvíjeny nové levnější a výkonnější metody, které by v budoucnu mohly umožnit provádění analýz celého genomu za rozumných nákladů.

Při studiu diverzity různých druhů, zejména hospodářsky významných, jako jsou réva vinná či rostliny čeledi Rosacea, je generováno značné množství dat, tato data jsou

organizována v databázích rostlinných genomů na úrovni České republiky, Evropy i světa.

6 SOUHRN A RESUME

Hodnocení genetické diverzity genových zdrojů rostlin; programy, modely, využití

První část bakalářské práce je věnována genetické diverzitě z obecného hlediska, jejímu významu, historii a ochraně. Druhá část shrnuje a popisuje metody hodnocení genetické diverzity od základních morfologických po molekulární a v poslední části práce je popsáno několik příkladů genových databází.

Klíčová slova: Genetická diverzita, centra původu, hodnocení diverzity, molekulární markery, genové databáze

Genetic diversity assessment of plant gene resources; programes, models, utilization

First part of the bachelor thesis is devoted to genetic diversity in general terms, it's significance, history and protection. Second part summarizes and describes methods of genetic diversity assessment from basic morphological to molecular and in the last part of the thesis are described some samples of gene databases.

Keywords: Genetic diversity, centers of origin, assessment of diversity, molecular markers, gene databases

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AKBARI, M., P. WENZL, V. CAIG, J. CARLING, *et al.* Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. 2006 [cit. 2015-01-20]. roč. 113, č. 8, s. 1409–1420. ISSN 00405752. Dostupné z:

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.476.8087&rep=rep1&type=pdf>.

ALI, I. F., D. B. NEALE a K. A. MARSHALL. Chloroplast DNA restriction fragment length polymorphism in *Sequoia sempervirens* D. Don Endl., *Pseudotsuga menzipsii* (Mirb.) Franco, *Calocedrus decurrens* (Ton), and *Pinus taeda* L. *Theor. Appl. Genet.* roč. 81, 1991, s. 83–89.

ALTHOFF, D. M., M. A. GITZENDANNER a K. A. SEGRAVES. The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. *Systematic biology* [online]. 2007 [cit. 2015-01-23]. roč. 56, č. 3, s. 477–484. ISSN 1063-5157. Dostupné z:

<http://sysbio.oxfordjournals.org/content/56/3/477.full>.

ANONYM. *Aplikovaná botanika ABP / BOT Téma 1 : Biodiverzita, rostliny planě rostoucí, rostliny pěstované, vzájemné vztahy, ochrana - instituce, zákony* [online]. 2011 [cit. 2015-01-17]. Dostupné z: http://isb-up.cz/data/PDF/ABP/ABP_ZS2011_2.pdf.

ANONYM. Hybridisation. *Diversity Arrays Technology* [online]. 2014 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.diversityarrays.com/dart-application-microarray-process-hybridisation>.

ANONYM. GMO Investigator™ Real-Time PCR Starter Kit. *BIO-RAD* [online]. 2015 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-us/product/gmo-investigator-real-time-pcr-starter-kit>.

ANONYM. Transposon. *Broad Institute* [online]. 2015 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: https://www.broadinstitute.org/files/news/stories/full/transposons_720x720_v2.jpg.

ANONYM. Ekogenetika. *Slideshare* [online], Nedaťováno [cit. 2015-03-27]. Dostupné z: <http://www.slideshare.net/medik.cz/ekogenetika-bak-06>.

ANONYM. *Molekulární markery PCR, RAPD, RFLP, AFLP, mikrosatelity, sekvenace* [online]. Nedaťováno. [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: http://isb-up.cz/data/PDF/MMSR/MMSR_LS_2012_02_markery.pdf.

ANONYM. Real Time PCR. *Top-Bio* [online] Nedaťováno [cit. 2015-03-29]. Dostupné z: <http://www.top-bio.cz/qpcr-master-mixy-14.html>.

ARDLEY, J. a C. G. M. HOPTROFF. Protecting plant „invention”: The role of plant variety rights and patents. *Trends in Biotechnology*. roč. 14(3), s. 67–69.

BAKER, J. H., M. MATTHES, G. M. ARNOLD, K.J. EDWARDS, I. AHMAN, S. LARSSON a A. KARP, 1999. Characterization of genetic diversity in potential biomass willows (*Salix* spp.) by RAPD and AFLP analyses. *Genome*, 1996. roč. 42, s. 173–183.

BARÁNEK, M., K. MORAVCOVÁ a M. PIDRA. *Biotechnologie v zahradnictví (návody pro praktická laboratorní cvičení)*. 1. vyd. Brno: Ediční středisko MZLU, 2006. ISBN 80-7157-937-8.

BELL, C. J. a J. R. ECKER. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics* [online]. 1994 [cit. 2015-03-29]. roč. 19, č. 1, s. 137–144. ISSN 0888-7543. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8188214>.

BENTLEY, D. R., 2006. *Whole-genome re-sequencing* [online]. 2006 [cit. 2015-03-29]. ISBN 0959-437X (Print). Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.391.9500&rep=rep1&type=pdf>.

BOUCK, A. a T. VISION, 2007. *The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags* [online]. 2007 [cit. 2015-01-20]. ISBN 1365-294X. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.2006.03195.x/full>.

BROŽOVÁ, J., J. STAŇKOVÁ a D. VAČKÁŘ. *Strategie ochrany biologické rozmanitosti České republiky* [online]. 2005 [cit. 2015-01-20]. Dostupné z: <http://www.ochranaprirody.cz/res/data/107/014760.pdf?seek=1>.

BRYJA, J., P. HÁJKOVÁ, P. JANŠTA, J. KIRSCHNER, M. VINKLER, B. ZEMANOVÁ a J. ZIMA. *Koncepce ochrany genetické diverzity planě rostoucích rostlin a volně žijících živočichů v České republice* [online]. 2010 [cit. 2015-01-20]. Dostupné z: http://www.tuzvo.sk/files/LF-KF/koncepce_ochrany_geneticke_diverzity_plane_rostoucich_rostlin_a_volne_zijicich_zivocichu_final-version.pdf.

BURIANOVÁ, T. *Genová banka. Český rozhlas* [online]. 2012 [cit. 2005-04-16] Dostupné z: <http://www.radio.cz/cz/rubrika/udalosti/genova-banka>.

CLARK, C. M., T. R. WENTWORTH a D. M. O'MALLEY. Genetic discontinuity revealed by chloroplast microsatellites in eastern north American *Abies* (Pinaceae). *American Journal of Botany* [online]. 2000 [cit. 2005-03-29] roč. 87, č. 6, s. 774–782. ISSN 00029122. Dostupné z: <http://www.amjbot.org/content/87/6/774.long>.

ČEGAN, R., R. HOBZA, J. MRÁ, E. KEJNOVSKÝ, A. WIDMER a B. VYSKOT. *PLANT TRANSPOSABLE ELEMENTS AS A TOOL FOR LOCALIZATION* [online]. Nedatováno [cit. 2005-02-18] Dostupné z: https://mnet.mendelu.cz/mendelnet08agro/files/articles/biolrost_cegan.pdf.

DIETRICH, W., H. KATZ, S. E. LINCOLN, H. S. SHIN, J. FRIEDMAN, N. C. DRACOPOLI a E. S. LANDER. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* [online]. 1992 [cit. 2005-01-28]. roč. 131, č. 2, s. 423–447. ISSN 00166731. Dostupné z: <http://www.genetics.org/content/131/2/423.long>.

- EHRlich, P. a A. EHRlich. *Extinction: the causes and consequences of the disappearance of species*. New York: Ballantine Books, 1983. ISBN 03-452-8895-5.
- FABEROVÁ, I. Plant Genetic Resources Documentation in the Czech Republic. *EVIGEZ – Evidence genetických zdrojů rostlin v ČR* [online]. 2014 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/>.
- FLAVELL, A. J., D. B. SMITH a A. KUMAR. Extreme heterogeneity of Ty1-copia group retrotransposons in plants. *MGG Molecular & General Genetics* [online]. 1992 [cit. 2015-03-21]. roč. 231, č. 2, s. 233–242. ISSN 00268925. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334012/pdf/nar00225-0095.pdf>.
- FREEMAN, S. How DNA Profiling Works. *howstuffworks* [online]. Nedatováno [cit. 2015-02-19] Dostupné z: <http://science.howstuffworks.com/dna-profiling1.htm>.
- GDR, 2002. Genomic, Genetic, and Breeding Resources for Rosaceae Crop Improvement. *GDR - Genome Database for Rosaceae* [online] [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.rosaceae.org/>.
- GOFF, S. A., D. RICKE, T. H. LAN, G. PRESTING, *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*. 2002. s. 296, 92–100.
- GRAY, Y. H. M. *It takes two transposons to tango: Transposable-element-mediated chromosomal rearrangements* [online]. 2000 [cit. 2015-04-02]. ISBN 0168-9525 (Print)n0168-9525 (Linking). Dostupné z: http://www.ufv.br/DBV/PGFVG/BVE684/htms/pdfs_revisao/mutagenese_transposon/transposable-element-mediated%20chromosomal.pdf.
- GUPTA, P. K. a R. K. VARSHNEY. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Molecular Biology* [online]. 2000 [cit. 2015-04-02]. roč. 113, č. Table 1, s. 163–185. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/GV745577614827K0.pdf>.
- GYNHEUNG, A., J. DONG-HOON, J. KI-HONG a L. SICHUL. *Reverse genetic approaches for functional genomics of rice* [online]. 2005 [cit. 2015-03-02]. ISBN 0167-4412 (Print)r0167-4412 (Linking). Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.379.2503&rep=rep1&type=pdf>.
- HAMRICK, J. L. a M. J. W. GODT. *Allozyme diversity in plant species*. In: *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Ass. Inc., 1990.
- HARLAN, J. R. *Crops and man*. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy. 1975.
- HEID, C. A., J. STEVENS, K. J. LIVAK a P. M. WILLIAMS. Real time quantitative PCR. *Genome research* [online]. 1996 [cit. 2015-03-24]. roč. 6, č. 10, s. 986–994. ISSN 1088-9051. Dostupné z: <http://genome.cshlp.org/content/6/10/986.long>.

- HOLDEN, J., J. PEACOCK a T. WILLIAMS. *Genes, crops and the environment*. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.
- HOLT, R. A. a S. J. M. JONES. The new paradigm of flow cell sequencing. *Genome Research* [online]. 2008 [cit. 2015-03-24] roč. 18, č. 6, s. 839–846. ISSN 10889051. Dostupné z: <http://genome.cshlp.org/content/18/6/839.long>.
- HOLUB, J. Et Al. *Seznam vyhynulých endemických a ohrožených taxonů vyšších rostlin květeny ČR*. Praha: Preslia, 1979.
- CHHABRA, Ashok K. Randomly Amplified Polymorphic DNA. *authorSTREAM* [online]. Nedatováno [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.authorstream.com/Presentation/chhabra61-594095-randomly-amplified-polymorphic-dna/>.
- CHLOUPEK, O. *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. 1. vyd. Praha: Academia, 1995. ISBN 80-200-0207-3.
- CHLOUPEK, O. *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. vyd. 3. Praha: Academia ČMĚ, 2008.
- KARAIKOU, N., L. BUGGIOTTI, E. LEDER a C. R. PRIMMER. High degree of transferability of 86 newly developed zebra finch EST-linked microsatellite markers in 8 bird species. *Journal of Heredity* [online]. 2008 [cit. 2015-04-19]. roč. 99, č. 6, s. 688–693. ISSN 00221503. Dostupné z: <http://jhered.oxfordjournals.org/content/99/6/688.long>.
- KARP, A. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* [online]. 1996 [cit. 2015-03-15]. roč. 78, č. 2, s. 143–149 EP –. ISSN 03057364. Dostupné z: ftp://ftp.ufv.br/DBG/Filogenia_molecular/usuarios/karla/Lyderson/2010/artigos/Met%20Filogeneticos/Karp1996.pdf.
- KATSIOTIS, A., T. SCHMIDT a J. HESLOP-HARRISON. Chromosomal and genomic organization of Ty1copia-like retrotransposon sequences in the genus *Avena*. *Genome*, 1996. roč. 39, s. 410–417.
- KRESOVICH, S. a J. R. MCFERSON. Assessment and management of plant genetic diversity – considerations of intraspecific and interspecific variation. *Field Crop Research*, 1992 roč. 29, s. 185–204.
- MARDIS, E. R. *The impact of next-generation sequencing technology on genetics* [online]. 2008 [cit. 2015-03-12]. ISBN 0168-9525 (Print)r0168-9525 (Linking). Dostupné z: <http://bio.lmu.de/~parsch/evogen/NextGenSeq2008.pdf>.
- MARGULIES, M., M. EGHOLM, W. E. ALTMAN, S. ATTIYA, *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 2005. roč. 437, s. 376–380.

- MARSHALL, D. R. *Crop genetic resources: Current and emerging issues. In.: Plant population genetics, breeding and genetic resources.* Sunderland, Massachusetts: Sinauer Ass. Inc., 1990.
- MCCAULEY, D. E. Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: implications for studies of gene flow in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1994 [cit. 2015-02-20]. roč. 91, č. 17, s. 8127–8131. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://msu.edu/course/plb/849/Conner/McCauley94PNAS.pdf>.
- MIHULKA, S. Velkolepý genomový příběh rajčete. *Gate2Biotech* [online]. 2014 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/velkolepy-genomovy-pribeh-rajcete/>.
- MLÍKOVSKÝ, J. a P. STÝBLO. *Nepůvodní druhy fauny a flóry České republiky.* 2006. Praha: ČSOP.
- MONDINI, L., A. NOORANI a M. PAGNOTTA. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity* [online]. 2009 [cit. 2015-01-22]. roč. 1, č. 1, s. 19–35. ISSN 14242818. Dostupné z: www.mdpi.com/1424-2818/1/1/19/pdf.
- MOONEY, P. a C. FOWLER. *Die Saat des Hungers.* Hamburg: Rowholt, 1991.
- MORGANTE, M. a A. M. OLIVIERI. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant journal : for cell and molecular biology* [online]. 1993 [cit. 2015-03-27]. roč. 3, č. 1, s. 175–182. ISSN 0960-7412. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-313X.1993.t01-9-00999.x/epdf>.
- MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.*, 1986. roč. 51, s. 263–273.
- NAVRÁTIL, M. *Transpozóny* [online]. Nedatováno [cit. 2015-01-25]. Dostupné z: http://inovace-mbb.upol.cz/files/vyukovy-portal/molekularni_biologie_1/kbb-mbio_09.pdf.
- NORRIS, J.. Gene Invaders Are Stymied by a Cell's Genome Defense. *UCSF* [online]. 2013 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <https://www.ucsf.edu/news/2013/02/13535/gene-invaders-are-stymied-cells-genome-defense>.
- ONTO, S., N. LAOSAT, W. SUKSAWAT, *et al.* Phylogenetic Analysis of *Cucumis sativus* Using RAPD Molecular Markers. *Journal of Plant Sciences* [online]. 2008 [cit. 2015-04-19]. roč. 3, s. 105–110. Dostupné z: <http://scialert.net/fulltext/?doi=jps.2008.105.110&org=10>.
- PAGNOTTA, M. A., L. MONDINI a E. PORCEDDU. Real-time PCR and IRAP: tools for assessing genetic variability and quantitation of WIS 2-1A and BARE-1 retrotransposons in hulled wheat. *Mol. Gen. Genom.* [online]. 2009. Dostupné z: doi:10.1007/s00438-009-0462-6 (in press).

POEHLMAN, J. M. a D. A. SLEPER. *Breeding Field Crops. Iowa State University Press*, 1995.

PREST, J. *The garden of Eden: The botanic garden and the re-creation of paradise*. New Haven, Connecticut: Yale University Press, 1981.

PROVAN, J., J. R. RUSSELL, A. BOOTH a W. POWELL. Polymorphic chloroplast simple sequence repeat primers for systematic and population studies in the genus *Hordeum*. *Molecular Ecology* [online]. 1999 [cit. 2015-02-13]. roč. 8, č. 3, s. 505–511. ISSN 09621083. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-294X.1999.00545.x.

RAUF, S. a J. DA SILVA. Consequences of plant breeding on genetic diversity. *Int J Plant Breed* [online]. 2010 [cit. 2015-02-25]. roč. 4, č. Troyer 1996, s. 1–21. Dostupné z: [http://globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/IJPB_4\(1\)1-21o.pdf](http://globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/IJPB_4(1)1-21o.pdf).

RICHARD, I. a J. S. BECKMAN. How neutral are synonymous codon mutations? *Nat. Genet.*, 1995. roč. 10, s. 259.

RISCHKOWSKY, B. a D. PILLING. *The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture Molecular markers – a tool for exploring genetic diversity* [online]. 2007 [cit. 2015-03-14]. Rome: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 978-92-5-105762-9. Dostupné z: <http://www.fao.org/docrep/010/a1250e/a1250e00.htm>.

ROSYPAL, S. a KOLEKTIV. *Terminologie molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc, 2001. ISBN 80-902562-3-6.

ŘEPKOVÁ, J. Struktura rostlinného genomu. *GENETIKA ROSTLIN* [online]. 2013 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/01-struktura-rostlinneho-genomu.html>.

SHAW, J., E. B. LICKY, J. T. BECK, S. B. FARMER, *et al.* The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* [online]. 2005 [cit. 2015-03-14]. roč. 92, č. 1, s. 142–166. ISSN 00029122. Dostupné z: <http://www.amjbot.org/content/92/1/142.long>.

SHENDURE, J., G. J. PORRECA, N. B. REPPAS, *et al.* Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2005 [cit. 2015-02-17]. roč. 309, č. 5741, s. 1728–1732. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi: <http://genetics.wustl.edu/rmlab/files/2012/09/Accurate-multiplex-polony.pdf>.

SCHLÖTTERER, C. a D. TAUTZ. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic acids research* [online]. 1992 [cit. 2015-03-15] roč. 20, č. 2, s. 211–215. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310356/pdf/nar00076-0049.pdf>.

SOBRINO, B., M. BRIÓN a A. CARRACEDO. *SNPs in forensic genetics: A review on SNP typing methodologies* [online]. 2005 [cit. 2015-02-11]. ISBN 0379-0738 (Print)n0379-0738 (Linking). Dostupné z: <http://www.sjsu.edu/people/steven.lee/courses/JS111FLUOR/s0/SNP%20Review%20Article.pdf>.

SOUTHERN, E.. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 1975. roč. 98, s. 503.

STEHNO, Z. a V. ŠKALOUD. *Technologické postupy uchování semenných vzorků v genových bankách (Technological Procedures of Seed Samples Maintenance in Gene Banks)*, 1998.

SUNYAEV, S., J. HANKE, A. AYDIN, *et al.* Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human disease-associated genes. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* [online]. 1999 [cit.2015-03-05] roč. 77, č. 11, s. 754–760. ISSN 0946-2716. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s001099900059>.

SUONIEMI, A., K. ANAMTHAWAT-JÓNSSON, T. ARNA a A. H. SCHULMAN. Retrotransposon BARE-1 is a major, dispersed component of the barley (*Hordeum vulgare* L.) genome. *Plant molecular biology* [online]. 1996 [cit. 2015-03-22] roč. 30, č. 6, s. 1321–1329. ISSN 0167-4412. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00019563>.

THE EUROPEAN VITIS DATABASE. Genetic resources of grapes. *The European Vitis Database* [online]. 2007 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: <http://www.eu-vitis.de/index.php>.

UTHICKE, S. a C. CONAND. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis indicates the importance of both asexual and sexual reproduction in the fissiparous holothurian *Stichopus chloronotus* (Aspidochirotida) in the Indian and Pacific Ocean. *Coral Reefs*, 2005 roč. 24, s. 103–111.

VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research* [online]. 1995 [cit. 2015-02-16]. roč. 23, č. 21, s. 4407–4414. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC307397/pdf/nar00021-0189.pdf>.

WEIR, B. S.. *Sampling properties of gene diversity. In: Plant population genetics, breeding and genetic resources.* Sunderland, Massachusetts: Sinauer Ass. Inc., 1990.

WELSH, J. a M. MCCLELLAND. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research* [online]. 1990 [cit. 2015-03-20]. roč. 18, č. 24, s. 7213–7218. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC332855/pdf/nar00208-0011.pdf>.

WERLING, B. There's more to carrots than meets the eye. *Michigan State University Extension* [online]. 2013 [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: http://msue.anr.msu.edu/news/theres_more_to_carrots_than_meets_the_eye.

WILLIAMS, J. G., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* [online]. 1991 [cit. 2015-03-17]. roč. 18, č. 22, s. 6531–6535. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC332606/pdf/nar00206-0065.pdf>.

YU, J., S. HU, J. WANG, G. K. WONG, *et al.* A draft sequence of the rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 2002. s. 296, 79–92.

ZABEAU, M. a P. VOS. *Selective Restriction Fragment Amplification: a General Method for DNA Fingerprinting*. 1992.

8 PŘÍLOHY

Seznam příloh:

Seznam použitých zkratk

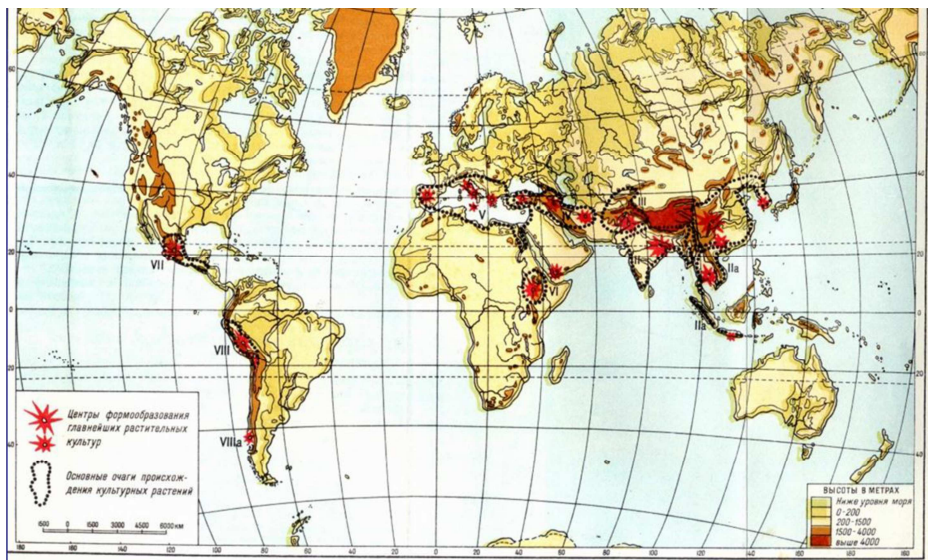
- Obr. 1 Vývoj plodu rajčete (Mihulka, 2014)
Obr. 2 Centra původu podle Vavilova (Anonym, 2011)
Obr. 3 Užitkové druhy rostlin (Primack *et al.*, 2006 dle Anonym, 2011)
Obr. 4 Vybarvení mrkve vlivem genetické diverzity (Werling, 2013)
Obr. 5 Genová banka Praha-Ruzyně (Burianová, 2012)
Obr. 6 Aloxymová analýza - příprava vzorku (Anonym, 2015)
Obr. 7 Restrikční fragmenty (Anonym, 2015)
Obr. 8 Postup metody RFLP (Freeman, nedatováno)
Obr. 9 Postup metody RAPD (Chhabra, nedatováno)
Obr. 10 Vzhled RAPD spektra na příkladu *Cucumis sativa* (Onto *et al.*, 2008)
Obr. 11 Transpozon (Norris, 2013)
Obr. 12 Dvě metody transpozice (Anonym, 2015)
Obr. 13 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Anonym, 2015)
Obr. 14 Schéma DArT testu (Anonym, 2014)
Obr. 15 Hlavní stránka The European Vitis Database (The European Vitis Database, 2007)
Obr. 16 Tři možnosti přístupu do databáze The European Vitis Database (The European Vitis Database, 2007)
Obr. 17 Jednostránkový pdf dokument popisu odrůdy (The European Vitis Database, 2007)
Obr. 18 Katalog odrůd (The European Vitis Database, 2007)
Obr. 19 Druhy obsažené v databázi GDR (GDR, 2002)
Obr. 20 Síť specializovaných institucí zapojených do Národního programu (Faberová, 2014)
Obr. 21 Rychlé vyhledávání podle skupiny plodin (Faberová, 2014)
- Tab. 1 Klasifikace plodin podle rozšíření v gencentrech (Anonym 2011)
Tab. 2 Běžně používané zkratky pro různé molekulární markery (Mondini *et al.*, 2009)
Tab. 3 Srovnání nepoužívanějších markerů (Mondini *et al.*, 2009)

Seznam použitých zkratek:

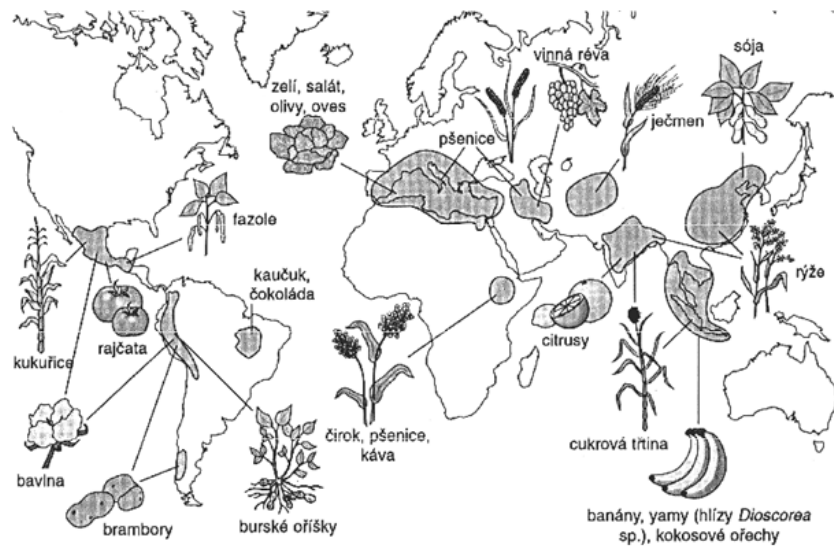
AP-PCR	Náhodná PCR
cDNA	Komplementární (Complementary) DNA
cpDNA	Chloroplastová DNA
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EST	Expressed sequence tag
F1 a F2	První Filiální generace a druhá Filiální generace
GC	Guanin, Cytosin
GZR	Genové zdroje rostlin
MCDP	Multi-Crop Passport Descriptors
mRNA	Messenger RNA (také je známa jako informační/mediátorová)
mt DNA	Mitochondriální DNA
pb	Párů bází
PCR	Polymerázová řetězová reakce
qPCR	Quantitative PCR
RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální RNA
RT-PCR	Real-time PCR
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
SSR	Repetice jednoduchých sekvencí
VIVC	Vitis International Variety Catalogue
VÚ	Výzkumný ústav
VÚRV	Výzkumný ústav rostlinné výroby



Obr. 1 Vývoj plodu rajčete (Mihulka, 2014)



Obr. 2 Centra původu podle Vavilova (Anonym, 2011)



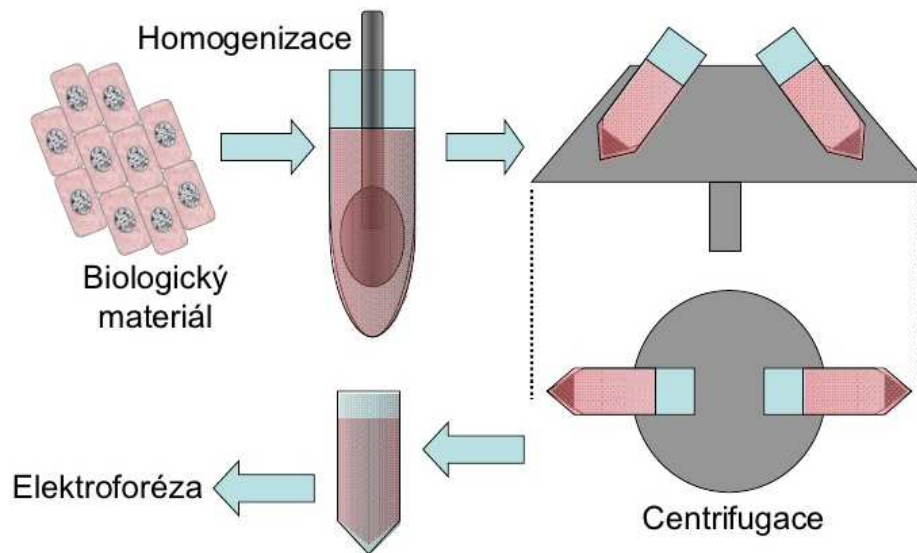
Obr. 3 Užitéčné druhy rostlin (Primack *et al.*, 2006 dle Anonym, 2011)



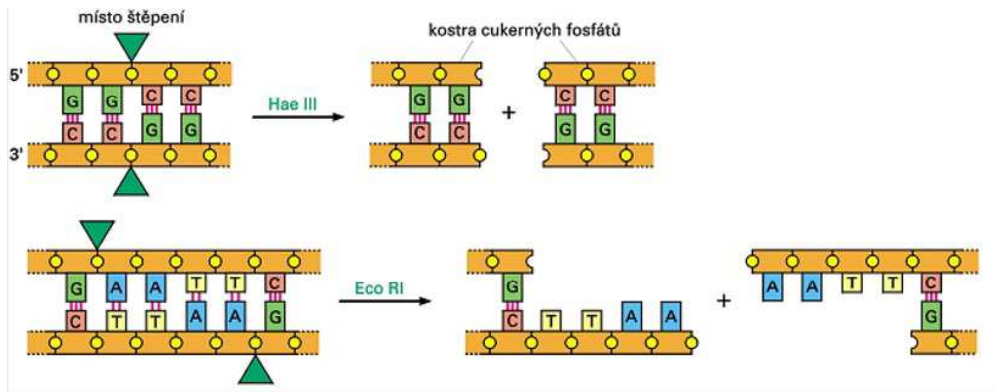
Obr. 4 Vybarvení mrkve vlivem genetické diverzity (Werling, 2013)



Obr. 5 Genová banka Praha-Ruzyně (Burianová, 2012)

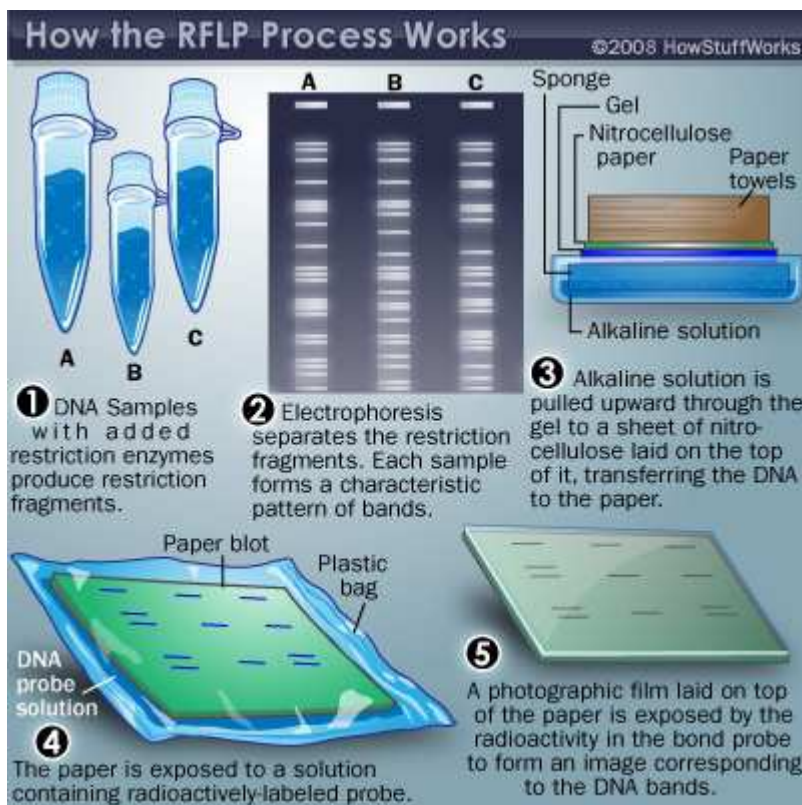


Obr. 6 Alozymová analýza - příprava vzorku (Anonym, 2015)



Restrikční fragmenty jsou úseky molekul DNA, které vznikají enzymatickou aktivitou **restrikčních endonukleáz**, které rozpoznávají specifické sekvence, kde „přestřihnou“ molekulu DNA.

Obr. 7 Restrikční fragmenty (Anonym, 2015)



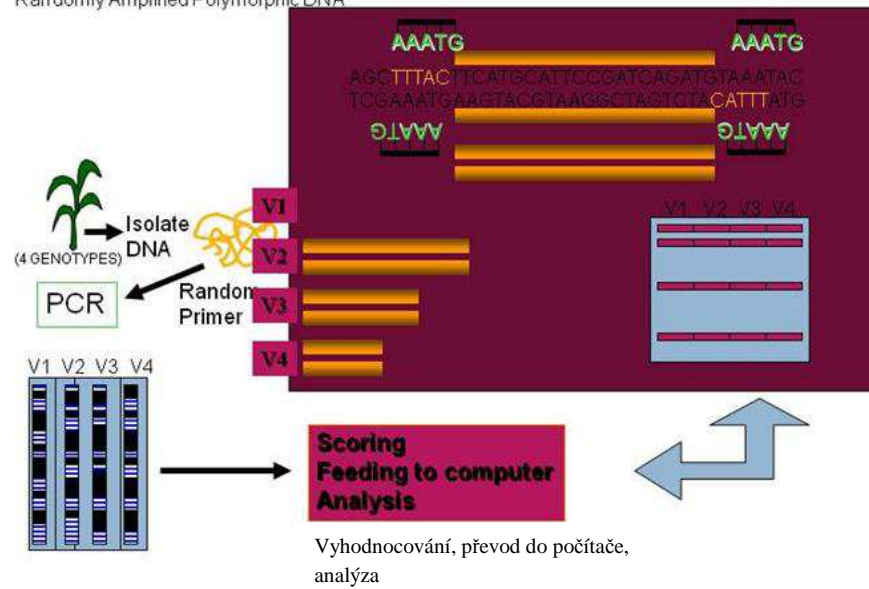
Obr. 8 Postup metody RFLP (Freeman, nedatováno)

1. DNA vzorky s přidanými restrikčními enzymy produkují restrikční fragmenty.
2. Elektroforéza odděluje restrikční fragmenty. Každý vzorek tvoří charakteristický vzor pásem.
3. Alkalický roztok je přes gel vytažen nahoru na list nitrocelulózy položené na jeho horní části a převádí DNA na papír.
4. Papír je vystaven roztoku, který obsahuje radioaktivně značené sondy
5. Fotografický film položený na horní části papíru je vystaven radioaktivitě navázané sondy pro vytvoření obrazu odpovídajícímu DNA pásmům.

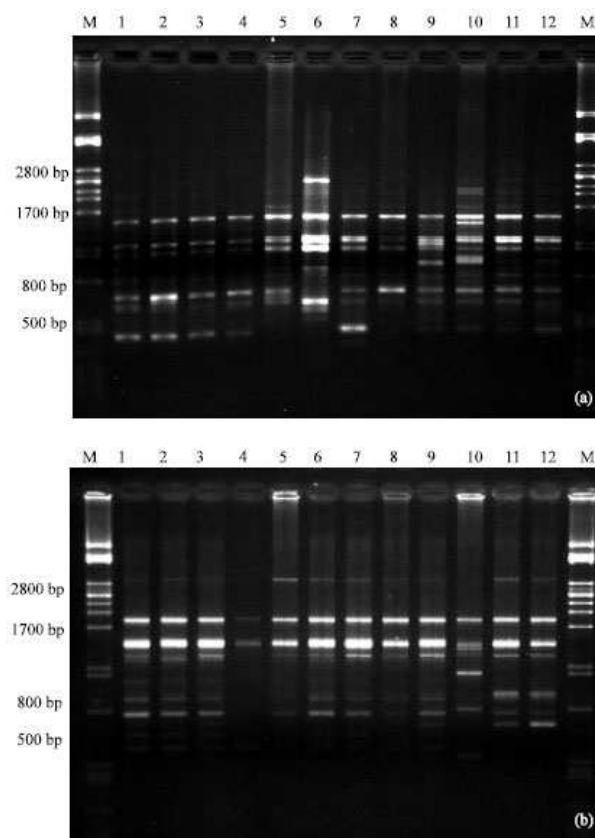
RAPD

Ran domly Amplified Polymorphic DNA

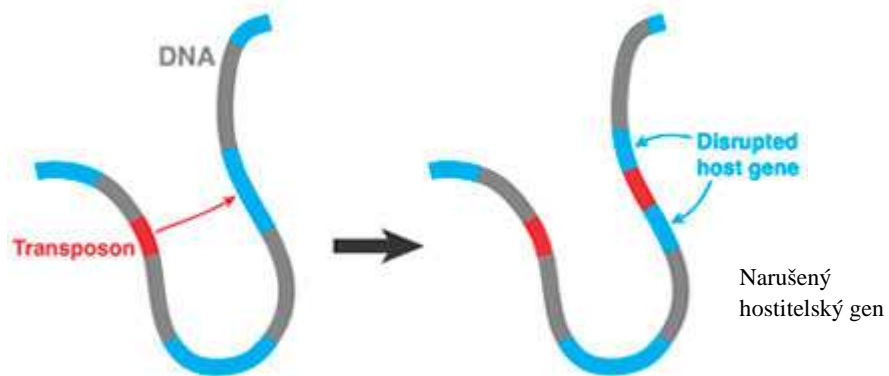
Principle



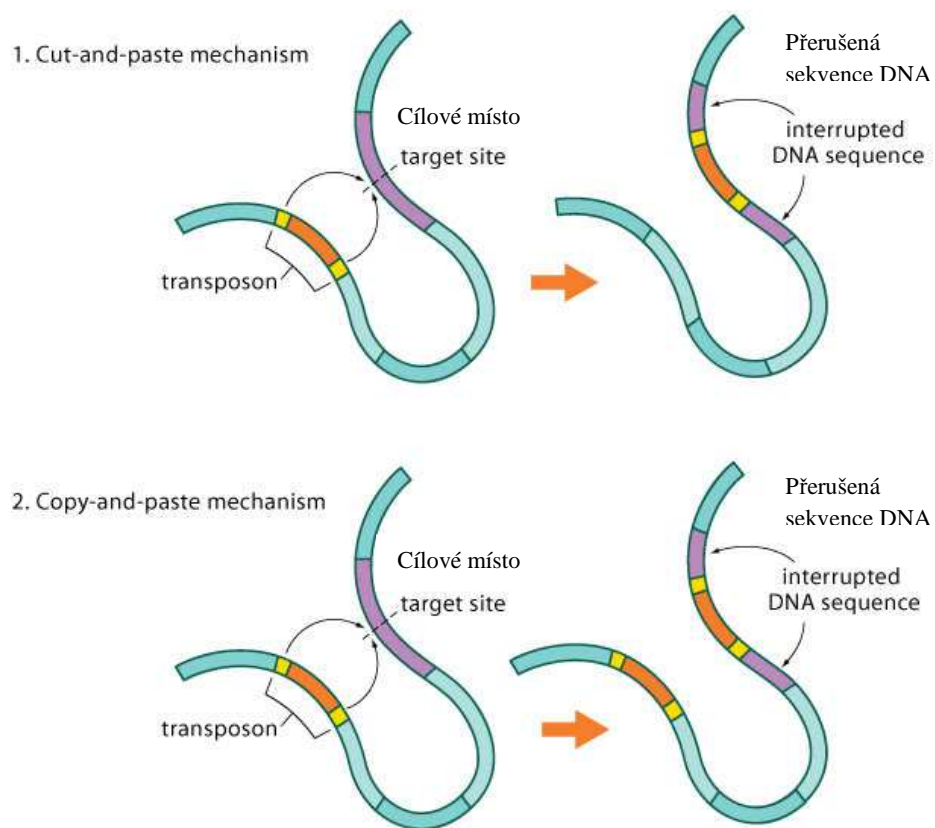
Obr. 9 Postup metody RAPD (Chhabra, nedatováno)



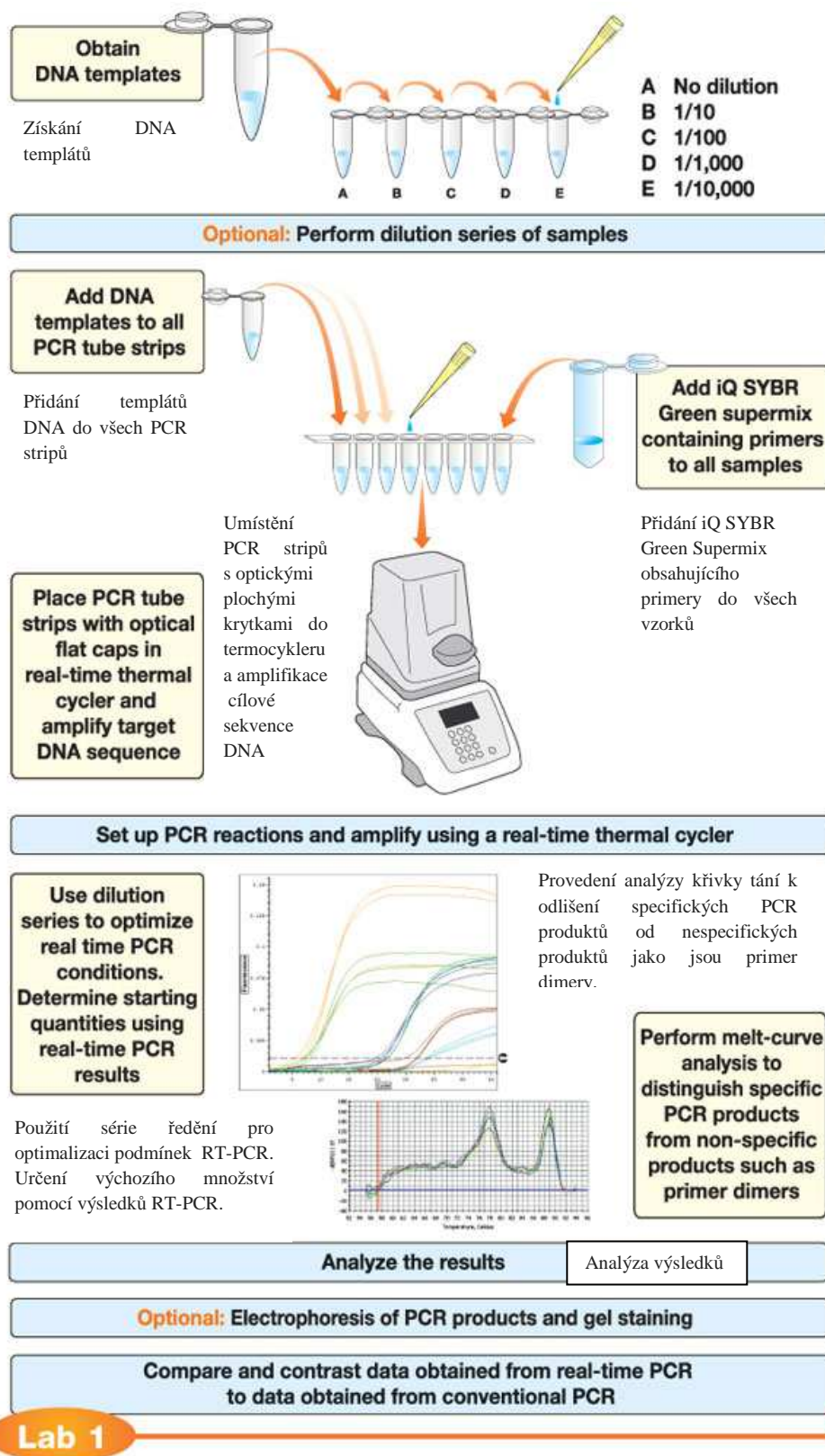
Obr. 10 Vzhled RAPD spektra na příkladu *Cucumis sativa* (Onto *et al.*, 2008)



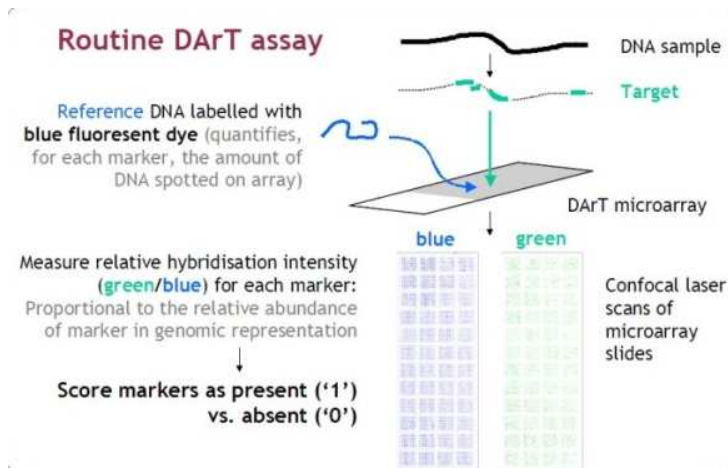
Obr. 11 Transpozon (Norris, 2013)



Obr. 12 Dvě metody transpozice (Anonym, 2015)



Obr. 13 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Anonym, 2015)



Obr. 14 Schéma DArT testu (Anonym, 2014)

Referenční DNA značená **modrým** fluorescenčním barvivem (vymezuje množství DNA spatřené na testu pro každý marker)

Měření relativní intenzity hybridizace (**zelená / modrá**) pro každý marker: Úměrně relativní hojnosti markeru v genomové reprezentaci.

Zaznamenává markery jako přítomné ('1') tak nepřítomné ('0')

The European Vitis Database

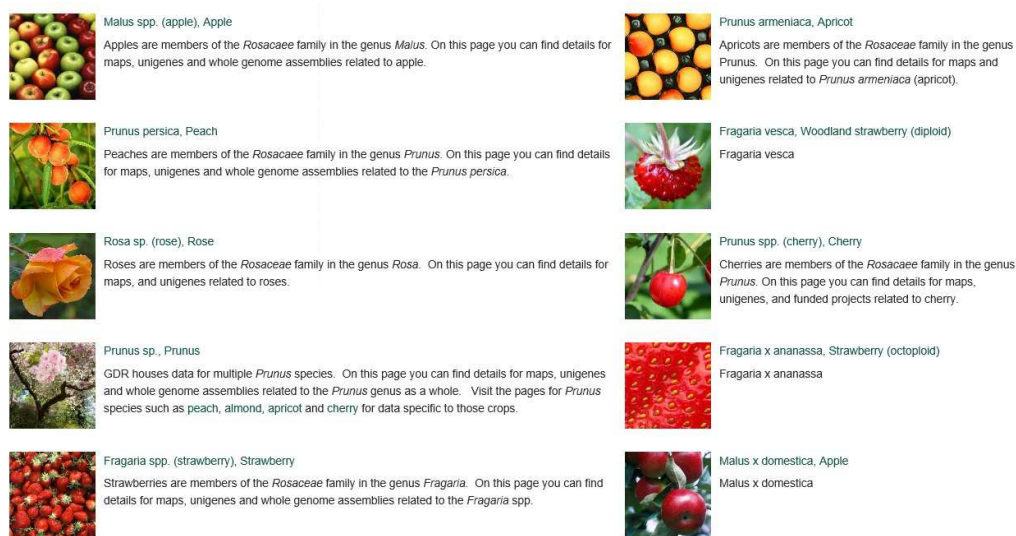
Genetic resources of grapes

Register for SSR-marker data admission via public access

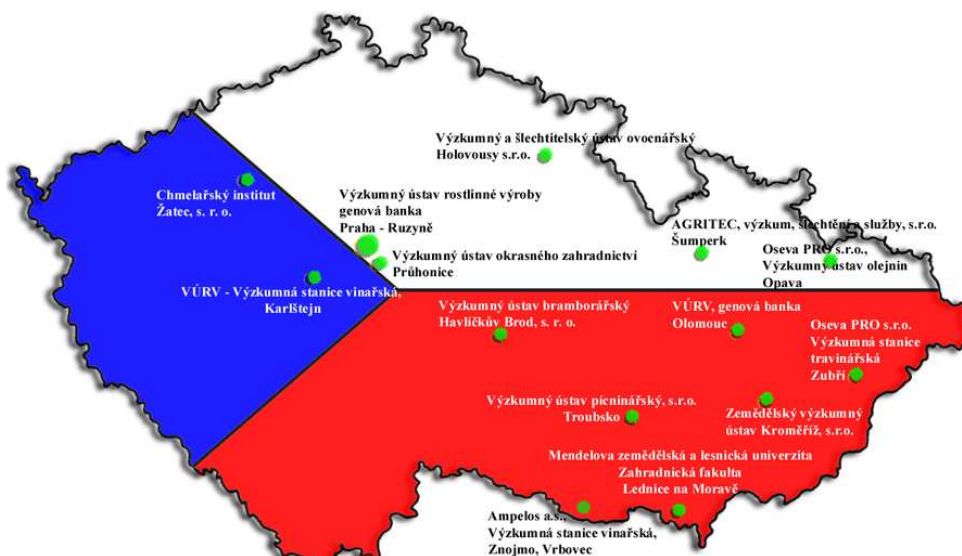
The European Vitis Database is being maintained since 2007 by the ©Julius Kühn-Institut - Federal Research Centre for Cultivated Plants (JKI), Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof, Siebeldingen, Germany. The establishment of the European Vitis Database with free access via Internet has been carried out in the scope of the European Project Genes081. The follow up and enlargement will be accomplished within GrapeGen06 and by the European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR,).

Members of the European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources (ECPGR) Vitis Working Group ©JKI 2007
Last modified: April, 2015

Obr. 15 Hlavní stránka The European Vitis Database (The European Vitis Database, 2007)



Obr. 19 Druhy obsažené v databázi GDR (GDR, 2002)



Obr. 20 Síť specializovaných institucí zapojených do Národního programu (Faberová, 2014)



Zadaná kritéria:

Záznam: 1 až 17 z 17

Str. 1/1

Skupina plodin	Počet záznamů
Aromatické a léčivé rostliny	1107
Brambor	2497
Kukuřice, alternativní obilniny	1340
Květiny	1804
Luskoviny	4890
Obilniny	20674
Okrasné dřeviny listnaté	58
Olejniny	1515
Ovočné dřeviny	3078
Pěníšník, růže sadové	652
Picniny	2064
Réva	797
Různé, druhy květnatých luk	102
Řepa, semenné okopaniny	211
Technické plodiny	2746
Trávy	2386
Zeleniny	7026

Obr. 21 Rychlé vyhledávání podle skupiny plodin (Faberová, 2014)

Tab. 1 Klasifikace plodin podle rozšíření v gencentrech (Anonym, 2011)

Endemité	Domestikovaný druh zaujímá dobře definovanou oblast (<i>Solanum andigenum</i> = poddruh lilku bramboru, <i>Panicum sonorum</i> = proso sonorské), centrum původu a centum variability je totžné.
Semiendemité	Centrum variability částečně přeasahuje centrum původu (<i>Oxalis tuberosa</i> = šťavel hlíznatý), centrum variability je jasné, domestikace v rámci kontinentu.
Monocentristé	Kávovník, kakaovník; centrum původu a centum variability je totožné, široká domestikace, víme, kde vznikaly a jak se šířily, ale nemají sekundární genová centra
Oligocentristé	Pšenice, oves, ječmen, kukuřice, hrách, čočka; široký areál rozšíření, vedle hlavního mají ještě 1-2 sekundární gencentra.
Noncentristé	Domestikace proběhla ve velkém areálu, ale není zcela přesně dáno centrum diverzifikace.
Polycentristé	Sekundární gencentra vznikají tam, kde se člověk usadil a vznikl velký tok genů (<i>Brassica</i>).

Tab. 2 Běžně používané zkratky pro různé molekulární markery (Mondini *et al.*, 2009)

AFLP	Polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism)
AP-PCR	Náhodná PCR (Arbitrarily primed PCR)
ARMS	PCR s alelově specifickými primery (Amplification Refractory Mutation System)
ASAP	Arbitrary Signatures from Amplification
ASH	Allele-Specific Hybridization
ASLP	Amplified Sequence Length Polymorphism
ASO	Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy (Allele Specific Oligonucleotide)
CAPS	Cleaved Amplification Polymorphic Sequence
CAS	Coupled Amplification and Sequencing
DAF	DNA Amplification Fingerprint
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
GBA	Genetic Bit Analysis
IRAO	Inter-Retrotrasposon Amplified Polymorphism
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeats
ISTR	Inverse Sequence-Tagged Repeats
MP-PCR	Microsatellite-Primed PCR
OLA	Oligonukleotid-ligační test (Oligonucleotide Ligation Assay)
RAHM	Randomly Amplified Hybridizing Microsatellites
RAMPs	Randomly Amplified Microsatellite Polymorphisms
RAPD	Polymorfismus délky náhodně amplifikovaných fragmentů (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
RBIP	Retrotrasposon-Based Insertion Polymorphism
REF	Restriction Endonuclease Fingerprinting

REMAP	Retrotrasposon-Microsatellite Amplified Polymorphism
RFLP	Polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)
SAMPL	Selective Amplification of Polymorphic Loci
SCAR	Sequence Characterised Amplification Regions
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus (Single Nucleotide Polymorphism)
SPAR	Single Primer Amplification Reaction
SPLAT	Single Polymorphic Amplification Test
S-SAP	Sequence-Specific Amplification Polymorphisms
SSCP	Polymorfismus konformace jednořetězců (Single Strand Conformation Polymorphism)
SSLP	Single Sequence Length Polymorphism
SSR	Repetice jednoduchých sekvencí (Simple Sequence Repeats)
STMS	Sequence-Tagged Microsatellite Site
STS	Sequence-Tagged-Site
TGGE	Teplotní gradientová gelová elektroforéza (Thermal Gradient Gel Electrophoresis)
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
RAMS	Randomly Amplified Microsatellites

Tab. 3 Srovnání nejpoužívanějších markerů (Mondini *et al.*, 2009)

Molekulární markery	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	CAPS	SCAR	IRAP/ REMAP	RAMP	SSCP	SNP
Stupeň polymorfismu	M	M	M	M	L	M	M	M	L	H
Účinek lokusu	Y	N	N	N	Y	y	Y	Y	Y	Y
Dominance (D)/Co-dom. (C)	C	D	D	C	C	C	D	D	C	C
Snadnost replikace	H	L	H	M	H	H	H	M	M	H
Hojnost	H	H	H	M	L	L	H	M	L	H
Sekvence požadované informace	Y	N	N	N	Y	Y	Y	N	Y	Y
Množství požadované DNA	H	L	M	L	L	L	L	L	L	L
Automatizace	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y
Náklady na test	H	L	M	L/M	M	L	L	M	H	L
Technické požadavky	H	L	M	L/M	H	M	H	H	H	M

Legenda: H = vysoké; M = střední; L = Nízké; Y = Ano; N = Ne