

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
**Ústav biologie rostlin**

---



**Genetické aspekty domestikčního znaku pukavosti lusku u  
hrachu**

Diplomová práce

Vedoucí práce:  
Ing. Pavel Hanáček, Ph.D.

Vypracoval:  
Bc. Lucie Čevelová

---

Brno 2017



## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Genetické aspekty domestikačního znaku pukavosti lusku u hrachu** vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

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

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

V Brně dne:.....

.....

podpis

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Pavlu Hanáčkovi, PhD., za pomoc, trpělivost a cenné rady při vypracování této práce. Mé poděkování patří také Ing. Lence Procházkové a Ing. Lence Prokešové za pomoc v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi Ing. Petru Smýkalovi, PhD. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a příteli za podporu a zázemí. Experimentální část diplomové práce byla součástí projektu 14-11782S GA ČR s názvem Dormance semen a pukavost lusků jako klíčové domestikační znaky luskovin, díky tomu mohla tato práce vzniknout. Díky projektu OP VaVpI CZ.1.05/4.1.00/04.0135 Výukové a výzkumné kapacity pro biotechnologické obory a rozšíření infrastruktury, mohla být část experimentu provedena na pavilonu M.

## **Abstrakt**

Cílem diplomové práce je studium genetické podstaty významného domestikačního znaku pukavosti lusku. Analyzovány byly dva druhy hrachu, kulturní hrách s nepukavými lusky JI92 (*Pisum sativum* subsp. *sativum*) a planý hrách s pukavými lusky JI64 (*Pisum sativum* subsp. *elatius*). Reciprokým křížením těchto dvou linií byly vytvořeny rekombinantní inbrední linie (RILs), z celkových 134 RILs linií bylo vybráno 9 kontrastních linií. V rámci služby jsme využili masivně paralelní sekvenování 3' konců cDNA, získaná reverzní transkripcí mRNA, která byla izolována ze švů lusků. Díky této metodě byly vygenerovány 3 kandidátní geny. Následně jsme zjišťovali expresi těchto tří kandidátních genů pro pukavost pomocí kvantitativní Real-Time PCR (RT-qPCR). Amplifikační křivky a hodnody  $C_t$  vygenerované z průběhu RT-qPCR byly následně použity pro vytvoření grafů, které slouží pro zobrazení míry exprese kandidátních genů. Jako nejvhodnější kandidát byl zvolen gen Ps15, který je u hrachu přítomen v LGIII v oblasti *Dpo1*, a proto by mohl být zodpovědný za pukavost lusku.

**Klíčová slova:** *Pisum sativum* L., pukavost, domestikace, kandidátní geny, RT-qPCR,

## **Abstract**

The aim of this thesis is the study of the genetic substance of the important domestication sign pod dehiscence. Two types of pea were analyzed, with indehiscence pods JI92 (*Pisum sativum* subsp. *sativum*) and wild field pea with dehiscent pods JI64 (*Pisum sativum* subsp. *elatius*). By reciprocal crossbreeding of these two lines, were created recombinant inbred lines (RILs), of a total of 134 RILs lines were selected with 9 contrast lines. We utilized the massive parallel sequencing of the 3'ends of the cDNA, obtained by reverse transcription of mRNA isolated from the seam. Thanks to this method, 3 candidate genes were generated. Subsequently, we determined the expression of these three candidate genes for the using quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR). Amplification curves and  $C_t$  values generated from the RT-qPCR were subsequently used to generate graphs to show the degree of expression of the candidate genes. The most suitable candidate was the Ps15 gene, which is present in LGIII in the *Dpo1* region, and therefore could be responsible for pod dehiscence.

**Key words:** *Pisum sativum* L., pod dehiscence, domestication, candidate gene, RT-qPCR,

## **OBSAH**

1 ÚVOD .....	9
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	10
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
3.1 Domestikace rostlin.....	11
3.1.1 Domestikační syndrom u rostlin .....	11
3.1.2 Genová centra kulturních plodin .....	12
3.1.3 Domestikované druhy rostlin .....	14
3.1.4 Význam genetické diverzity.....	16
3.1.5 Ochrana genetické diverzity.....	16
3.2 Hrách ( <i>Pisum L.</i> ).....	17
3.2.1 Fylogeneze tribu Fabeae.....	18
3.2.2 Systematické zařazení rodu <i>Pisum</i> .....	19
3.2.3 Botanická charakteristika .....	21
3.2.4 Domestikace hrachu .....	22
3.3 Znaky domestikovaného hrachu ( <i>Pisum sativum L.</i> ).....	23
3.3.1 Geny ovlivňující domestikační znaky u hrachu .....	23
3.3.2 Geny spojené s pukavostí plodů u rostlin.....	24
3.3.3 Geny pukavosti u hrachu.....	25
4 MATERIÁL A METODIKA .....	26
4.1 Rostlinný materiál .....	26
4.2 Metoda MACE .....	27
4.3 Izolace RNA.....	28
4.4 Reverzní transkripce RNA na cDNA .....	30
4.5 Navržení primerů.....	30
4.6 Kvantitativní Real-time PCR (RT-qPCR).....	31
5 VÝSLEDKY .....	34
5.1 Výběr vhodných vzorků RNA.....	34
5.2 Výsledky MACE analýzy.....	35

5.3 Výsledky RT-qPCR.....	36
5.4 Exprese kandidátních genů.....	37
5.5 Ověření specifity primerů.....	39
6 DISKUZE.....	41
7 ZÁVĚR.....	44
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	45
9 SEZNAM TABULEK.....	54
10 SEZNAM OBRÁZKŮ .....	55
11 SEZNAM ZKRATEK.....	56
12 PŘÍLOHY.....	57
12.1 Seznam příloh .....	57



# 1 ÚVOD

Vznik a vývoj zemědělství je jedním z mezníků v dějinách lidstva. Lidé z kočovného způsobu života přesedlali na život usedlejší a začali pěstovat užitečné plodiny. Díky tomu se postupně začaly vyvíjet nové formy rostlin procesem zvaným domestikace. Domestikace způsobuje u planých druhů rostlin genetické změny. Příčinou těchto změn je nejčastěji antropogenní vliv neboli vliv člověka, který vybírá genotypy s lepšími užitkovými vlastnostmi. Díky tomu se domestikované rostliny liší od planých druhů genetickými, morfologickými a fyziologickými vlastnostmi, které jsou spojeny s klíčením, růstem, velikostí semene a barvou (Ladizinsky 1998, Sakuma 2011).

Hrách setý (*Pisum sativum* L.) je jedna z nejstarší pro lidstvo velmi důležitých zemědělských plodin, kterou řadíme do čeledi bobovitých. Díky jeho vlastnostem je využíván v potravinářství i jako krmivo pro zvířata. Tak jako ostatní kulturní plodiny si procesem domestikace prošel i hrách. Domestikovaný hrách se od planého předka liší nepukavostí lusku, nedormantními semeny, s kratším stonkem a vyšší kvalitou semen. Planý hrách se vyznačuje pukavostí lusků při dozrání, zatímco domestikovaný hrách má nepukavé lusky a semena zůstávají uvnitř i v době zralosti. Tato diplomová práce se věnuje studiu genetické podstaty ztráty pukavosti lusku u hrachu během domestikace. Pomocí metody kvantitativní Real-Time PCR byly testovány kandidátní geny, které byly vytipované jako možné zodpovědné za pukavost lusku. I přes dlouhou historii pěstování hrachu je o jeho domestikaci velmi málo známo. Podstata pukavosti byla lokalizována na LGIII v *Dpo1* (Weeden 2007, Bordat et. al., 2011), ale konkrétní geny nebyly doposud identifikovány a publikovány.

## **2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE**

- Studium genové exprese kandidátních genů pro pukavost lusku u hrachu.
- Experimentální část práce byla součástí řešení projektu GAČR 14-11782S Dormance semen a pukavost lusků jako klíčové domestikační znaky luskovin.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Domestikace rostlin

Počátek domestikace rostlin sahá až do mladší doby kamenné (Harlan, 1992, Smith, 1995). Před 12 000 lety začala většina lovců a sběračů měnit svůj kočovný životní styl na usedlý způsob života a díky tomu se začalo rozvíjet zemědělství (Půtová, 2015; Zohary & Hopf, 1988; Sakuma et al., 2011). K domestikaci přispěla i změna klimatu, ustoupila doba ledová a Země se začala postupně oteplovat (Tasel et. al., 2010). Pěstování užitkových plodin a domestikace zvířat započala v lokalitách Přední Asie, Izrael, Libanon, Irák a Turecko, v oblastech „úrodného půlměsíce“. Tato oblast poskytovala vhodné podmínky pro vznik a vývoj civilizace (Harlan, 1975; Smirnov, 1989). Důkazy o domestikaci nám přináší archeologické nálezy v tropických a subtropických oblastech Střední Ameriky, jihozápadní a jižní Asie a střední Afriky (Gupta, 2014). Mezi prvními plodinami v období neolitu byla tetraploidní pšenice dvouzrnka (*Triticum diccocom* Schrank.), diploidní pšenice jednozrnka (*T. monoccocom* L.), hrách (*Pisum sativum* L.), čočka (*Lens culinaris* Medik.), ječmen (*Hordeum vulgare* L.), cizrna (*Cicer arietinum* L.), len (*Linum usitatissimum* L.) a vikev setá (*Vicia sativa* L.) (Zohary & Hopf, 1988).

Domestikace je dlouhodobý proces, při kterém dochází k postupným genetickým a morfologickým přeměnám planých rostlin na kulturní plodiny. Nejprve šlo o neuvědomělý proces, avšak s postupem času docházelo k záměrnému výběru semen z rostlin, které disponovaly výhodnými vlastnostmi (Allaby, 2008). Při domestikaci je vývojová linie formována faktory chování daného druhu a biologickými faktory. Velice významným faktorem je faktor antropogenní. Člověk ovlivňoval plané druhy tím, že o ně pečoval, sklízel, odstraňoval nežádoucí rostliny a doséval (Zeder et al., 2006). Díky tomu se domestikované rostliny od svých planých předků morfologickými, biochemickými nebo vývojovými znaky (Meyer & Purugganan, 2013).

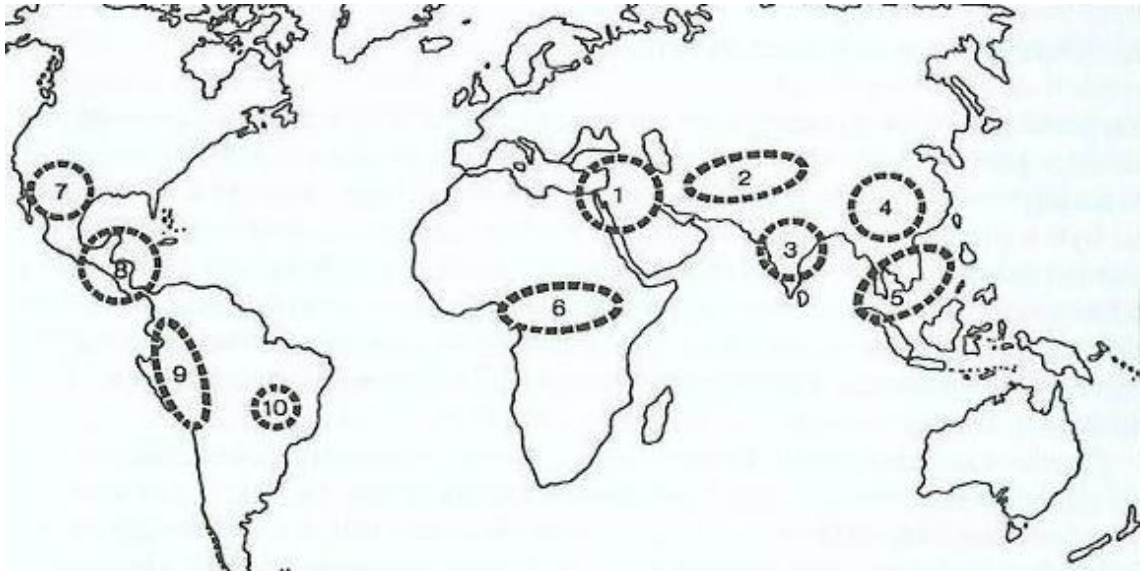
#### 3.1.1 Domestikační syndrom u rostlin

Proces domestikace můžeme rozdělit do tří fází (Harris, 1989). První fáze zahrnuje sběr volně rostoucích jedlých plodů, druhou fází je tzv. pre-domestikace neboli pěstování volně rostoucích rostlin. Poslední fází je fixace domestikačního syndromu (Allaby, 2010).

Pod pojmem domestikační syndrom si tedy můžeme představit trvalou fenotypovou změnu, která odlišuje planý druh od druhu kulturního souborem vlastností. Domestikované rostliny se nejvíce liší v morfo-fyziologických znacích, například ztrátou dormance, zbarvením plodů, nepukáním lusků, nerozpadavostí klasů či současným klíčením semen. Díky domestikaci u některých rostlin došlo k zesílení pletiv a orgánů (včetně zásobních orgánů), ke zvýšení zásobních látek cukrů a tuků v kořenech a hlízách, ke ztrátě hořkosti plodů a některé důležité orgány domestikačních rostlin jsou lépe stravitelné pro člověka (Sakuma et al., 2011). Pro úspěšné pěstování byly klíčové dva znaky, a to zamezení vypadávání semen z klasů, lusků a různých plodů a odstranění dormance semen (Hillu, 1993). V některých případech nastaly změny, kdy docházelo ke ztrátě přirozené schopnosti rozmnožovat se a rostliny jsou tedy zcela závislé na člověku, například kukuřice (*Zea mays* L.) a banánovník (*Musa* L.) (Smýkal, 2009; Cacas et al., 1996). Naopak rostliny, které jsou méně domestikované mají sklon vracet se k původním planým druhům, například mrkev (*Daucus carota* L.), konopí (*Canabis* Roth.) a locika setá (*Lactuca sativa* L.) (Cacas et al., 1996).

### 3.1.2 Genová centra kulturních plodin

Velmi významný ruský biolog, badatel, šlechtitel a genetik Nikolaj Ivanovič Vavilov se zasloužil o charakterizaci a určení tzv. genových center kulturních plodin (Savage et al., 1994). Vavilov je autorem nejvýznamnějšího díla „Centers of origin of Cultivated Plants”, která byla vydána v roce 1926. V této publikaci rozdělil svět do deseti center podle původu kulturních druhů (obrázek č. 1). Nejvýznamnějším centrem z hlediska důležitosti domestikovaných rostlin je Blízký východ (Myroyan, 2006). Centra se dále rozdělují na primární a sekundární (Vavilov, 1992). Primární centra zahrnují oblasti místa výskytu planých druhů plodin a zároveň kulturních druhů, které se oddělily od planého předka. Proto se mohou v této oblasti vyskytovat vedle sebe kulturní a plané formy. Naopak v sekundárních centrech se plané druhy vyskytovat nemusí a proces tvorby nových forem proběhl nebo ještě probíhá. Objevují se zde formy a druhy, které jsou velmi geneticky různorodé a do oblasti byly zavlečeny introdukcí (Vavilov, 1992). Jedná se například o rod pšenice (*Triticum* L.), která má místo s nejvyšší variabilitou v Etiopii, ale předek se v této oblasti nevyskytuje (Harlana, 1975; Smirnov, 1989).



**Obrázek č. 1** - Oblasti původu a první domestikace oblastí kulturních rostlin a domácích zvířat (Chloupek, 2000)

1. Blízký východ. Před 7000 př. Kr.: pšenice, ječmen, hrách, čočka; ovce, koza. Kolem 5000 př. Kr.: vikev, len; skot, prase. Kolem 2000 př. Kr.: palma datlová, smokvoň, cibule, hrušeň, jablůň; velbloud jednohrbý, osel, kachna, husa, včela. Kolem 500 př. Kr.: artyčok; kočka.

2. Střední východ a centrální Asie. Před 4000 př. Kr.: réva vinná, oliva; velbloud dvouhrbý. Bez známého data: pohanka, vojtěška, konopí, čirok, vikev, zelí, mrkev, oves; kůň, jak.

3. Indie. Před 3000 př. Kr.: palma datlová, mango. Bez známého data: čajovník, lilek, tykev; vodní buvol, kur domácí.

4. Čína. Před 4000 př. Kr.: sója, rýže, čirok; prase, kur domácí, kachna. Kolem 1000 př. Kr.: pomerančovník, broskvoň, cibule, zelí; bourec morušový.

5. Jihovýchodní Asie. Bez známého data: třtina cukrová, rýže, banánovník, citrus, čajovník, palma kokosová.

6. Afrika. Kolem 2000 př. Kr.: vodní meloun, čirok, skočec (*Ricinus sp.*); osel, husa.

7. Severní Amerika. 5000 př. Kr.: fazol, tykev, slunečnice, jahodník; pes, krůta.

8. Střední Amerika. Kolem 6000 př. Kr.: kukuřice, tykev, fazol; Bez známého data: rajče, bavlník, avokádo, papája, slunečnice, kakao, maniok; krůta

9. Andské oblasti Jižní Ameriky. Kolem 2500 př. Kr.: brambor, batáty; lama, alpaka. Bez známého data: podzemnice olejná, fazol.

10. Jižní Amerika. Bez známého data: podzemnice olejná, ananas, jam, bavlník, kakaovník, tabák, paprika (Chloupek, 2000).

Kvůli různorodým podmínkám prostředí, kterými se vyznačují jednotlivá geografická centra původu, není možná jednostranná selekce. Hovoříme tedy o podhůří Himalájí, Blízkého Východu, Balkánu, And, Apenin a Hindúkuše. Pohoří díky lokální izolaci, umožnila vznik různých forem rostlin. V horských oblastech díky výkyvům teplot a působení ultrafialového záření došlo ke vzniku mutací, které zapříčinily vznik kříženců i u samosprašných druhů rostlin (Harlan, 1975; Smirnov, 1989). U rostlin nacházejících se ve středu genového centra se vyskytuje vyšší podíl znaků řízených dominantní alelou, která je většinou původnější (Chloupek, 2008). Naopak u rostlin rostoucích v periferních oblastech převažují znaky řízené recesivními alelami (Harlan, 1975; Smirnov, 1989).

### 3.1.3 Domestikované druhy rostlin

V rámci procesu moderního šlechtění se člověk snažil přiblížit k tzv. ideotypu. Ideotyp představuje ideální formu rostliny, která má maximální výnos vůči svému genetickému potenciálu. Během domestikacích a šlechtitelských kroků dochází ke změně genofondu (Abbo et al., 2011). Užší rozsah diverzity mají více původní genofondové rezervy. Kultivary ve vztahu k méně domácím krajovým odrudám mají užší fenotypovou rozmanitost, příkladem je kukuřice (*Zea mays* L.). V některých případech však může dojít k rozšíření fenotypové rozmanitosti například velikost, tvar a barva plodů u rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Prvotní zemědělci využívali pro budoucí generaci malý počet vybraných jedinců. Díky tomu dnes pěstované plodiny mají malou genetickou diverzitu. Mnoho genetického potenciálu bylo nevyužito nebo i ztraceno během procesu šlechtění (Smýkal, 2009).

Rostliny se dělí podle potenciálního využití na primární gene pool, sekundární a terciální gene pool. Primární gene pool – do této skupiny jsou zahrnuty druhy pěstované a druhy příbuzné, ze kterých lze získat užitečné geny pro šlechtění. Druhy v této skupině lze s příbuznými kulturními druhy křížit a je možné získat F1 a F2 generaci. Po tomto křížení je segregace genů převážně normální. Sekundární gene pool – do této kategorie zahrnujeme pěstované druhy, ze kterých lze přenášet geny do pěstovaných druhů, přesto s určitými komplikacemi. Při křížení se sice získají semena, ale rostliny F1 jsou často sterilní. Potomstvo nemívá normální segregaci genů, to znamená, že potomstvo je výrazně podobné jednomu z rodičů. Terciální gene pool-pro přenos genů do pěstovaných druhů je za potřebí speciálních postupů nebo není možný. Hybridní rostliny hynou nebo jsou sterilní.

Díky speciálním postupům, například roubování, techniky explantátových kultur, vektory přenášené geny v plazmidech nebo virových částicích mohou tyto rostliny zachránit (Harlan, 1975).

**Tab. 1** Čeledi s nejvýznamnějšími zástupci domestikovaných plodin (upraveno podle Smýkal, 2009)

<b>Bobovité</b> (Fabaceae)	hrách ( <i>Pisum sativum</i> ), cizrna ( <i>Cicer sp.</i> ), fazol ( <i>Phaseolus sp.</i> ), bob ( <i>Vicia faba</i> ), čočka ( <i>Lens culinaris</i> )
<b>Brukvovité</b> (Brassicaceae)	řepka ( <i>Brassica napus</i> ), brukev ( <i>Brassica napa</i> ), hořčice ( <i>Sinapis</i> ) mnoho zeleniny
<b>Hvězdicovité</b> (Asteraceae)	slunečnice ( <i>Helianthus annuus</i> ), čekanka ( <i>Cichorium endivia</i> ), salát ( <i>Lactuca sativa</i> )
<b>Lilkovité</b> (Solanaceae)	brambory ( <i>Solanum tuberosum</i> ), rajče ( <i>Solanum lycopersicum</i> ), paprika ( <i>Capsicum annuum</i> )
<b>Lipnicovité</b> (Poaceae)	pšenice ( <i>Triticum aestivum</i> ), ječmen ( <i>Hordeum vulgare</i> ), žito ( <i>Secale cereale</i> ), oves ( <i>Avena sativa</i> ), kukuřice ( <i>Zea mays</i> ), rýže ( <i>Oryza sativa</i> ), proso ( <i>Panicum miliaceum</i> )
<b>Okurkovité</b> (Cucurbitaceae)	okurka ( <i>Cucumis sativus</i> ), tykev ( <i>Cucurbita pepo</i> ), meloun ( <i>Cucumis melo</i> )
<b>Pryšcovité</b> (Euphorbiaceae)	maniok ( <i>Manihot esculenta</i> ), skočec ( <i>Rieinus communis</i> ), kaučukovník ( <i>Hevea brasiliensis</i> )
<b>Routovité</b> (Rutaceae)	pomerančovník ( <i>Citrus sinensis</i> ), mandarinka ( <i>Citrus reticulata</i> ), citroník ( <i>Citrus limon</i> )
<b>Růžovité</b> (Rosaceae)	jabloň ( <i>Malus domestica</i> ), hrušeň ( <i>Pyrus communis</i> ), slivoň ( <i>Prunus domestica</i> ), meruňka ( <i>Prunus armeniaca</i> ), jahody ( <i>Fragaria vesca</i> )
<b>Slézovité</b> (Malvaceae)	bavlník ( <i>Gossypium</i> ), ibišek ( <i>Hibiscus cannabinus</i> ), okra ( <i>Belmoschus esculentum</i> )

### 3.1.4 Význam genetické diverzity

Na domestikaci má svůj podíl genetický drift. Jedná se o náhodné změny četnosti alel určité populace. Tyto změny se spíše objevují u menších populací, například při introdukci alely. Dokonce se může stát, že některé alely se mohou ztratit - rostliny s nimi vyhynou. Podíl na redukcii diverzity rostlin i zvířat má také tzv. efekt hrdla láhve. Jedná se o druh genetického driftu, který se vyskytuje u populace se silným snížením početnosti, populace přežije, zotaví se a postupně se její početnost opět zvyšuje. Tento efekt však způsobuje snížení genetické variability, protože kvůli snižování početnosti některé alely zanikly spolu se svými nositeli. (Chloupek, 2008; Cox & Moore, 1999). Efekt hrdla láhve byl popsán např. u bramboru (*Solanum L.*), fazolu (*Phaseolous L.*), bavlníku (*Gossypium L.*) a prosa (*Panicum L.*) (Zeder et al., 2006; Iqbal, 2001).

Důležitým faktorem domestikace je introgrese, tj. vnesení a exprese genů určitého druhu do genomu jiného. Jedná se například o mezidruhové křížení a následné zpětné křížení. Introgrese se často ve spojení s polyploidizací považuje za základní činitel evoluce. Genetická diverzita tedy vznikla a stále vzniká v důsledku introdukce do pěstování, v důsledku mutací, rekombinací, genetického driftu aj. (Chloupek, 2008; Papa & Gepts, 2003).

### 3.1.5 Ochrana genetické diverzity

Ochrana genetické diverzity je velmi významná, jelikož se z naší planety denně ztrácí stovky druhů nejen rostlin (Pim et al., 1995). Řada odborníků tedy požaduje ochranu genetické diverzity za nutnou, jelikož nedostatečná ochrana může vést ke genetické zranitelnosti. Z toho důvodu se provádějí sběry rostlin, které se nacházejí v oblastech s vysokou diverzitou a s výrazným prostředím, kde je možné objevit unikátní genotypy (Holden et al., 1993). Pro sběr vzorků rostlin se také využívají oblasti s vysokým selekčním tlakem na určitý znak, např. suché nebo chladné oblasti (Pratap & Kumar, 2012). Kromě toho se sbírají i druhy plevelné i plané v oblastech narušených člověkem nebo v nenarušených nalezištích (Holden et al., 1993).

V rámci enviromentálního programu OSN, byla v roce 1992 vypracována Úmluva o biologické diverzitě. V roce 1994 ji podepsala i Česká republika. Principem této úmluvy je zodpovědnost každého státu za vlastní genetické zdroje. Ochrana genetické diverzity se uskutečňuje dvěma způsoby. První způsob je konzervace *in situ*, která se snaží o uchování určité populace v podmínkách jeho přirozeného výskytu.



Tento způsob vyžaduje konzervaci celého ekosystému daného druhu. Druhým způsobem je konzervace *ex situ*, která využívá hospodářsky významných druhů a druhů, které jsou ohrožené vymizením. V průběhu 20. století se díky systematickému uchovávání genetického materiálu začaly zřizovat genové banky, které pro uchování genetického materiálu využívají techniky explantátových kultur (Harlan, 1975; Chloupek, 2008; Pratap & Kumar, 2012).

V genofondových kolekcích hrachu se uchovává zhruba 98 tisíc položek, některé však jsou zastoupeny vícenásobně. V těchto kolekcích jsou nedostatečně zastoupeny plané druhy, tvoří pouze 2% z uchovaných položek, což je přibližně 1900 položek. Zbývající položky jsou převážně tvořeny kulturními formami hrachu. K uchovávání se také využívají krajové odrůdy, kříženci, zástupci šlechtitelských materiálů a jedinci s různými mutacemi (Smýkal et al., 2013).

### **3.2 Hrách (*Pisum L.*)**

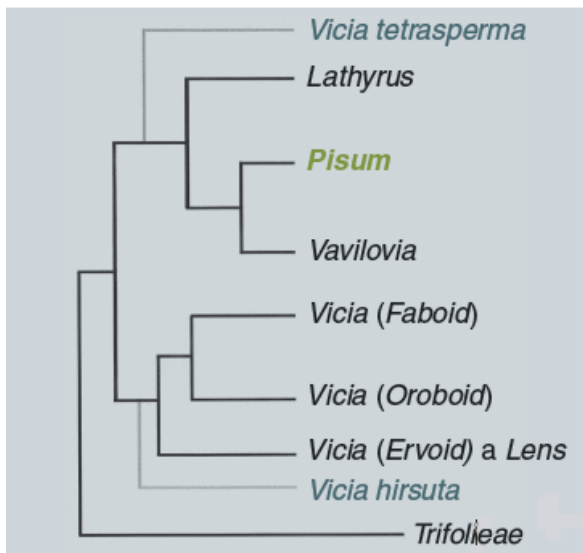
Hrách setý (*Pisum sativum L.*) (obrázek č. 2) se řadí do čeledi bobovitých a je považován za velmi důležitou zemědělskou plodinu. Hráč důležitou roli i v historii jako model pro genetiku. Jeho vlastností využil i Johan Gregor Mendel, který definoval zákony dědičnosti (Smýkal et al., 2015). Díky bohatému zastoupení prospěšných látek má hrách široké využití v potravinářství, jako krmivo pro zvířata, siláž, píče a také zelené hnojení (Tayeh et al, 2015). Hrách také zlepšuje půdní vlastnosti díky fixaci vzdušného dusíku. Zemědělci hrách využívají jako meziplodinu, která zvyšuje úrodnost půdy a snižuje potřebu použití pesticidů (Sindhu et al., 2014).



**Obrázek č. 2** – Hrách (*Pisum sativum* L.) (Polívka, 1900)

### 3.2.1 Fylogeneze tribu Fabeae

Tribus Fabeae zahrnuje 5 rodů: hrachor (*Lathyrus* L.), čočka (*Lens* Mill.), hrách (*Pisum* L.), vikev (*Vicia* L.) a *Vavilovia* Fed., některé z nich patří mezi významné luskoviny pěstované na zrna (Schaefer et al., 2012). Podčeleď *Fabeae* je charakteristická několika morfologickými znaky, zpeřenými listy, které jsou často zakončené úponky. Jedním z hlavních diagnostických znaků mezi rody *Fabeae* je tvar čnělky a uspořádání trichomů na čnělce (Kupicha, 1981; Endo et al., 2008). Studium chloroplastových jaderných genů vedly k závěru, že rody hrachor (*Lathyrus* L.) a vikev (*Vicia* L.) nejsou monofyletické. Rody hrách (*Pisum* L.) a *Vavilovia* byly vnořeny do rodu hrachor (*Lathyrus* L.) a rod čočka (*Lens* Mill.) by zanořen do rodu vikev (*Vicia* L.) (Smýkal et al., 2015) (obrázek č.3).



**Obrázek č. 3 - Schématické znázornění fylogenetických vztahů podčeledi Fabae (Smýkal, 2011).**

### 3.2.2 Systematické zařazení rodu *Pisum*

V současné době botanická společnost nemá jednotný názor na zařazení jednotlivých druhů. Můžeme se proto setkat s různými zařazeními v závislosti na autorech a typu studií. Rod hrách (*Pisum* L.) společně s rodem čočka (*Lens* Mill), hrachor (*Lathyrus* L.) a vikev (*Vicia* L.) řadíme do tribu *Fabae* (Maxted & Ambrose, 2001, Smýkal et al., 2011).

#### Systematické zařazení rodu *Pisum* L. dle ITIS (2011)

Říše: *Plantae*

Podříše: *Viridaeplantae*

Oddělení: *Tracheophyta*

Pododdělení: *Spermatophytina*

Třída: *Magnoliopsida*

Nadřád: *Rosanae*

Řád: *Fabales*

Čeleď: *Fabaceae*

Rod: *Pisum* L.

Podle některých autorů se rod *Pisum* dělí na dva druhy *Pisum fulvum* Sibth. & Sm. a *P. sativum*. *P. sativum* se dále člení na morfologicky rozdílné druhy *P. elatius* a *P. humile*. Druhy *P. elatius*, *P. sativum* a *P. humile* byly mezi sebou vzájemně křížitelné až na *P. fulvum*, který je od těchto druhů více reprodukčně izolován (Ben Ze'ev & Zohary, 1973). Některé novější studie dělí rod *Pisum* na druhy *P. sativum*, *P. fulvum* Sibth. & Sm a *P. abyssinicum* A. Br. (Maxted & Ambrose, 2001). *P. sativum* se od ostatních druhů liší v důsledku častých chromozomových aberací, které jsou příčinou reprodukční izolovanosti. *P. fulvum* je planý druh, který je spíše homogenní a znatelně ohraničen. Naopak *P. abyssinicum* se morfologicky podobá *P. sativum* avšak jeho kulturní formy byly domestikovány nezávisle na domestikaci kulturních forem *P. sativum* (Jing et al., 2010). *P. sativum* subsp. *elatius* a subsp. *sativum* se vyskytuje v Evropě, v oblasti Blízkého východu, v severozápadní Indii a v mírném pásu Afriky. Druh *P. fulvum* se vyskytuje pouze v oblasti Blízkého východu a endemitní druh *P. abyssinicum* se vyskytuje v Etiopii (Maxted & Ambrose, 2001; Konečná et al., 2014).

Za nejbližšího příbuzného rodu hrách (*Pisum* L.) je považována vytrvalá *Vavilovia formosa* (Steven) Fed., která se řadí do rodu *Vavilovia*. V historii byl tento cizosprašný druh označován jako druh *Pisum formosum* (Stev.) Alef. Díky fylogenetickým analýzám byl rod *Vavilovia* určen jako samostatný (Smýkal et al., 2013; Mikič et al., 2013).

### 3.2.3 Botanická charakteristika

Hrách je dvouděložná, jednoletá bylina z čeledi bobovitých (*Fabaceae*), rostliny rodu *Vavilovia* jsou vytrvalé byliny. Rozmnožuje se generativně, samosprašením. Samosprašení probíhá dvěma způsoby, kleistogamií (opylení proběhne přímo v neotevřeném květu) a proteogynií (blizna dozrává dříve než prašníky, cizosprašením). Genom hrachu je velký 4 300 Mb, obsahuje 7 párů chromozomů, má vysoký sekvenční polymorfismus s průměrnou frekvencí 1 záměna na 15 nukleotidů. Genom také obsahuje vysoké množství repetitivních sekvencí (Macas et al., 2007; Mikič et al., 2013). Hrách žije v symbióze s bakteriemi rodu *Rhizobium*, které na kořenech hrachu tvoří hlízky. Díky tomu je hrách schopen fixovat vzdušný dusík a zajišťovat přísun přijatelné formy tohoto prvku.

Rod *Pisum* L. se vyznačuje různě dlouhými, dutými a popínavými lodyhami. Kořeny jsou dlouhé a větvenité a zasahují hluboko do půdy. Listy jsou přisedlé, oválné nebo vejčité, jsou sudozpeřené a zakončeny úponky, v juvenilních stádiích jsou jednotlivé žilky složeny podél střední žilky. V úžlabí listů se nachází dlouhé a stopkaté květenství s chudokvětými hrozny. Kalich je zvonkovitý a nasedá na něj bílá nebo různě zbarvená koruna. Koruna se skládá z pavézy, dvou křídel a člunku. V květu je 10 tyčinek, které jsou uspořádány: devět srostlých a jedna volná. Pestík je složen z přisedlého semeníku a z dorzálně zploštělé čnělky. Čnělka je na vnější straně rýhovaná, na vnitřní straně pod vrcholem je chlupatá a na vrcholu rozšířená (Ambrose & Maxted, 2001; Smýkal et al., 2015).

Plodem hrachu je lusk, který je mnohosemenný, podlouhlý, nezaškrcovaný a na vrcholu zúžený v zobánek (Chrtková, 1995). Lusk se skládá ze dvou chlopní a otevírá se dvěma švy. Tloušťka stěny lusu je v průměru 1 mm v závislosti na druhu a stavu oplodí. Oplodí tvoří tři vrstvy: exokarp, mezokarp a endokarp. Exokarp tvoří vnější povrch lusu a je tvořen vnější epidermis. Epidermis zabírá asi 3% tloušťky perikarpu a skládá se z buněk izodiametrického tvaru, které jsou silně kutinizovány, obsahují průduchy a jsou bez trichomů (Pate & Kuo, 1981). Mezokarp je složen z tenkostěnných parenchymatických buněk s velkými vakuolami. Zaujímá až 84% tloušťky perikarpu. Vnitřní vrstvy mezokarpu obsahují škrob, naopak vrstvy buněk, které jsou blíže epidermis, obsahují spíše chlorofyl. Díky tomu je tato vrstva fotosynteticky aktivní.

Průduchy, které se nacházejí ve vnitřní epidermis, spolu s touto vrstvou mezokarpu asimilují CO<sub>2</sub> z vnější atmosféry. V průběhu dozrání luskou obsah chlorofylu ve vnější vrstvě postupně klesá. Endokarp je tří až pětivrstevný a je tvořen převážně z vláknitého sklerenchymatického pletiva, které zabírá asi 13% tloušťky oplodí. Vnitřní epidermis je tvořena tenkostěnným parenchymem, který neobsahuje průduchy a má hydrofilní kutikulu. Ve vnitřní epidermis se také nacházejí chloroplasty, které jsou však mnohem menší než chloroplasty mezokarpu. Epidermis má také vypouklé kontury, díky kterým se zvětší povrch pro asimilaci CO<sub>2</sub>, který se uvolňuje ze semene v luskou, který byl vystaven slunečnímu záření (Atkins et al., 1977).

Semena hrachu jsou kulatá nebo svrasklá s podlouhlým hilum (Chrtková 1995). Semena jsou hlavním zdrojem rostlinných bílkovin pro lidi i zvířata, obsahují také velké množství škrobu, který se využívá v potravinářství. Škrob je významný pro vysoký obsah amylózy, která u některých genotypů hrachu tvoří 80-90 % škrobu. Amylóza se využívá pro výrobu biopolymerů, které mají podobné vlastnosti jako polyetylén (Houba et al., 2009). Semena hrachu mimo jiné obsahují proteiny, vlákninu, sacharózu, olej, vitamíny, minerální látky a fytové kyseliny (Tayeh et al., 2015).

### **3.2.4 Domestikace hrachu**

Archeologické nálezy z doby 12000 – 9000 př. n. l. svědčí o tom, že hrách byl zdroj obživy již před zemědělskou revolucí (Gorman, 1971; Aura et al., 2005). Hrách je tedy považován za jednu z nejstarších kulturních plodin. První záznamy o výskytu luskovin pocházejí z Blízkého východu a Středomoří. Hrách se dále šířil na sever do oblastí dnešního Ruska a přes starověké Řecko a Řím do Evropy. Šířil se také východně do oblastí Persie, Indie a Číny (Maxted & Ambrose, 2001; Konečná et al., 2014). V průběhu 16. století byl hrách zavlečen také do Ameriky (Pratap & Kumar, 2012). Další nálezy z období 5600-4300 př. n. l. v oblasti jihozápadního Německa ukazují, že hrách byl běžně pěstován v mladší době kamenné, bronzové, železné a v raném středověku. Důležitou roli hrál hrách i v období novověku, kdy díky šlechtění vzniklo několik různých variant rostlin, které byly využívány pro různé účely (Bakels, 1999). K rozšíření hrachu výrazně přispěla explozivní pukavost luskou s doletem semen až 2 metry a velká dormance semen (Mikić et al., 2009).

Další znaky, které byly v průběhu vývoje změny, jsou výška rostliny, velikost a kvalita semen, větvení stonku, obsah toxických látek a vliv délky dne na kvetení (Pratap & Kumar, 2012).

### 3.3 Znaky domestikovaného hrachu (*Pisum sativum* L.)

Pro spolehlivou identifikaci domestikované formy hrachu slouží několik znaků, např. větší velikost semen, nepukavost lusků a hladký povrch obalové vrstvy semene (Butler, 1998). U planého hrachu se pukavost lusku projevuje po úplném dozrání semen, naopak u hrachu domestikovaného jsou lusky nepukavé, příkladem je endemický druh *Pisum abyssinicum*. U rostlin z rodu *Pisum* se vytvořil balistický způsob šíření semen do okolního prostředí. Proces zajišťující pukání lusku se odehrává v tzv. zóně dehiscence, která se nachází podél ventrálního a dorzoventrálního švu. V této zóně jsou buňky exokarpu zesíleny a v endokarpu jsou sklerenchymatické vrstvy uspořádány šikmo v rovinách kolmých na sebe. Stěny lusku postupně sesychají, zmenšují se a stáčí v opačném směru. Po dosažení největšího pnutí dochází k oddělení chlopní a vystřelení semen do okolí. Ambrose a Ellis ve své studii ukazují, že semena mohou být rozptýlena až do vzdálenosti tří metrů od mateřské rostliny (Ambrose & Ellis, 2008).

Dalším ukazatelem planého hrachu je silná dormance semen, která je zapříčiněna silnou obalovou vrstvou, nepropustnou pro vodu. Pouze malé procento těchto semen nabobtná. Plané druhy tímto způsobem působí na klíčivost semen ve volné přírodě, a tím zachovávají svůj druh v případě nepříznivých podmínek (Nelson et al., 2006). Domestikovaný hrách se dále vyznačuje vyšší kvalitou semene, apikální dominancí se sníženou frekvencí tvorby laterálních větví a neutrální fotoperiodickou reakcí (Weeden et al., 2007).

#### 3.3.1 Geny ovlivňující domestikační znaky u hrachu

Doposud bylo poznáno 11 lokusů, které jsou odpovědné za domestikační znaky. Za dormanci a kvalitu semen je zodpovědný lokus *A*. Úkolem lokusu *Dpo1* je kontrola pukavosti lusků (Blixt, 1972). Weeden et al. v roce 2002 ve své publikaci uvedl teorii, že lokus *Dpo1* během procesu domestikace prošel řadou mutací, které zapříčinily vznik nepukavého genotypu hrachu (*Pisum sativum* L.). Za velikost a kvalitu semen odpovídá hned několik lokusů, např. lokusy *R*, *A*, *Pl*, *Gty* (Weeden et al., 2007).

### 3.3.2 Geny spojené s pukavostí plodů u rostlin

Nedávno byly objeveny homologní geny pukavosti. Tyto geny zařazujeme do skupiny MAD-boxových genů, které mají řadu funkcí, např. tvorba květů, kontrolu kvetení a u huseníčku (*Arabidopsis thaliana* Schur.) se podílejí na pukavosti šešule (Liljegren et al., 2000). Huseníček řadíme do čeledi brukvovité, které jsou charakteristické suchým, pukavým plodem (šešule), který puká čtyřmi švy v tzv. zóně dehiscence (DZ= dehiscence zone). Zóna dehiscence je složena z odlučovací vrstvy, ke které přiléhají lignifikované buňky. Šešule postupně ztrácí vodu a zasychá, díky tomu se uvnitř plodu vytváří napětí, které následně způsobí puknutí chlopní (Ferrándiz & Fourquin, 2014).

U huseníčku (*Arabidopsis thaliana* Schur.) byl popsán gen *SHATERPROOF 1 a 2* (SHP1,2), který se podílí na ukládání ligninu v průběhu zrání plodu (Fourquin et al., 2013). Expresí genů *SHP 1/2* je lokalizována v DZ během pozdního vývoje plodu (Liljegren et al., 2000; Colombo et al., 2009). Gen, který se spolu s genem *SHAT* podílí na regulaci tvorby lignifikované vrstvy je gen *INDEHISCENT (IDEH)* a u huseníčku ovlivňuje pukavost šešulí. Na vývoji plodu se podílí i gen *FRUITFULL (FUL)*, který je nutný pro vývoj zárodečného vaku. Expresí genu *FUL* je iniciována v pestíku na počátku vývoje květu (Gu et al., 1998). Všechny tyto geny se podílejí na tvorbě zóny pukavosti, ovlivňují lignifikaci určitých buněk podél zóny pukavosti a diferencují odlučovací vrstvu (Liljegren et al., 2004). U planého druhu standartního typu, gen *FUL* omezuje expresi genů *SHP*, *IND* a *ALCATRAZ (ALC)* což způsobuje pukavost šešule. Dvojití mutanti *shp 1* a *shp 2* netvoří funkční zonu dehiscence a plody jsou nepukavé, protože nedochází k lignifikaci (Ferrándiz & Fourquin, 2014).

Gen *SHATTERING 1-5* byl popsán u sóji a nachází se na jejím šestnáctém chromozomu. Jeho funkcí je aktivace sekundární biosyntézy buněčné stěny a napomáhá k sekundárnímu tloušťnutí buněčných stěn v pruhu sklerenchymatických vláken (Dong et al., 2014; Liljegren et al., 2004). Pomocí kvantitativní real-time PCR byl stanoven expresní profil genu *SHATI-5* a následně pomocí specifické protilátky byla vykonána detekce *SHATI-5* proteinů. Bylo prokázáno, že proteiny jsou nejvíce zastoupeny v buňkách pruhu sklerenchymatických vláken a ve fázi dozrávání u ventrálního švu.



V *Arabidopsis thaliana* Schur., byl také popsán gen *bZIP*, jedná se o transkripční faktor, který ovlivňuje biosyntézu giberelinu (Weller et al., 2009). Další je gen *SPATULA* (*SPT*), který kóduje protein *bHLP*. Tento gen byl rovněž popsán u *A. thaliana* a podílí se na vývoji plodolistů (Heisler et al., 2001).

Funatsuki et al., v roce 2014 publikovali, že gen, který řídí pukavost lusku je gen *Pdh1*, který zároveň kóduje dirigent-like protein patřící do DIR superrodiny. Genotypy, které jsou pukavé, vykazují vyšší expresi genu *Pdh1* v lusku. Zvýšená exprese je především ve sklerenchymatické vrstvě endokarpu a to v období, kdy dochází k ukládání ligninu do buněčných stěn. Pokud jsou genotypy nepukavé je gen *Pdh1* defektní (Funatsuki et al., 2014).

### 3.3.3 Geny pukavosti u hrachu

Existuje několik genů, které svým způsobem řídí tvar lusku, avšak nebyly zatím identifikovány (Sinjushin, 2013). Geny *P* a *V* se podílejí na utváření lignifikované vrstvy, která se nachází na vnitřní straně zralého lusku. Mutace těchto dvou genů mohou být příčinou vzniku nelignifikovaného lusku (Reid & Ross, 2011). Např. u čočky (*Lens culinaris*) je pukavost regulována jedním lokusem (Ladizinski, 1998), naopak u vigny zlaté (*Vigna radiata* (L.) Wilezek) je pukavost řízena dvěma lokusy. Jeden lokus má na starosti otevírání lusků a druhý řídí počet ohybů po délce lusku (Isemura et al., 2012). U hrachu je pukavost řízena dvěma lokusy. Weeden et al., ve své studii v roce 2007 popsali 3 oblasti genomu, které řídí pukavost lusku u hrachu. Lokus *Dpo1* je semidominantní a monogenní nachází se ve vazebné skupině LGIII. Oblast *Dpo1* je pravděpodobně místem výskytu genu, který je odpovědný za pukavost lusků. Druhý lokus, který také ovlivňuje pukavost, se nachází ve vazebné skupině V, avšak jeho vliv na fenotypový projev je oproti *Dpo1* menší. Poslední oblastí je alela lokusu *Gp*, která však byla pozorována pouze u některých kříženců (Weeden et al., 2007; Weeden et al., 2002).

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Rostlinný materiál

V experimentu byly použity dvě linie hrachu získané z John Innes Centre, Norwich Research Park (zkratka JI). Linie JI64 (*Pisum sativum* subsp. *elatius* L.) je planý hrách, který pochází z Turecka, jeho lusky jsou pukavé a má dormantní semena. Linie JI 92 (*Pisum sativum* subsp. *sativum* L.) je kulturní hrách, krajová odrůda pocházející z Afghánistánu, jeho lusky jsou nepukavé a má nedormantní semena. Dále bylo použito potomstvo kříženců, vzniklých vzájemným křížením rodičovských linií zvané RILs, což jsou rekombinantní imbrední linie. Celkem bylo pěstováno 134 linií. Pro tuto studii byla použita jejich sedmá generace JI92 x JI64 a reciproké křížení JI92 x JI64. Tyto linie byly pěstovány ve skleníku pavilonu M (MENDELU) (obrázek č.4).

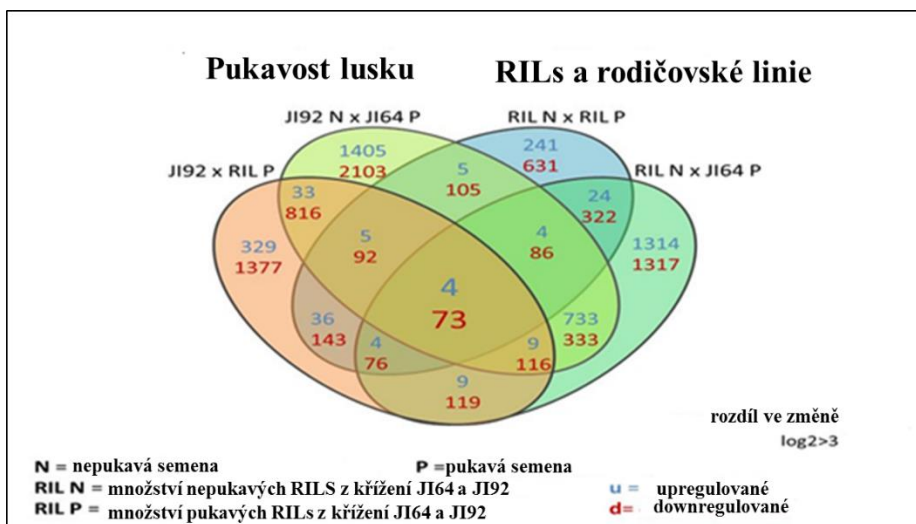


Obrázek č. 4 – Pěstované rostliny ve skleníku (Pavilon M)

## 4.2 Metoda MACE

Součástí našeho výzkumu bylo masivně paralelní sekvenování 3' konců cDNA (metoda MACE). MACE knihovny byly vytvořeny v rámci služby firmou GenXPro (GenXPro GmbH, Frankfurt, Německo). cDNA která byla získána reverzní transkripcí z RNA byla náhodně fragmentována a na 3' konce byly zachyceny po navázání streptavidinové matrice. Takto vytvořené knihovny byly připraveny pro vysoce výkonné sekvenování s použitými adaptory TrueQuant. Knihovna se skládala z 50-700 bp dlouhých fragmentů, které obsahovaly fragmenty 3' konců cDNA.

Díky této metodě byla analyzována mRNA izolovaná z pletiv švů dozrávajících lusků. Pomocí MACE analýzy bylo generováno 10 mil. čtení a identifikováno celkem 7 tis. genů, ze kterých bylo 77 vykazující v rámci pukavých/nepukavých genotypů rozdíl ve změně exprese hodnotu, jejíž dekadický logaritmus dvou je větší než tři (fold change  $\log_2 > 3$ ) (obrázek č. 5).



Obrázek č. 5 – Vennův diagram exprimovaných genů

Při analýze genové exprese hrachu byla použita mRNA z pletiv švu lusků odebraná během dozrávání. Srovnávány byly genotypy plané s pukavými lusky, genotypy kulturní s nepukavými lusky a vybrané RILs, soubory s pukavými i nepukavými lusky. Z množství 77 genů byly do této práce vybrány pouze tři geny - Ps04, Ps09, Ps15.

### 4.3 Izolace RNA

Pro analýzu byly použity švy lusků (obrázek č.6). Jsou to pletiva, která přímo souvisejí s pukavostí. Z těchto částí lusků byla izolována mRNA, ze které byla získána pomocí reverzní transkripce cDNA.

RNA byla izolována jak od rodičů, tak i u vybraných RILs. RNA byla izolována ze švů, které byly ve třech různých stádiích, desetidenní lusk po odkvetení, patnáctidenní a dvacetidenní. Byl izolován dorsální a ventrální šev samostatně. Celkem bylo tedy získáno 6 vzorků od každého rodiče. Švy, pomocí skalpelu byly nařezány na fragmenty o šířce 1 -2 mm, délce kolem 1 cm a hmotnost vzorku zhruba 100 mg. Bohužel se nepodařilo u všech získat potřebné množství RNA.

Odebrané vzorky byly zmrazeny při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . Izolace byla provedena kitem NucleoSpin®RNA Plant firmy Macherey-Nagel, Düren, Německo. Pro izolaci bylo z celkových 134 RILs vybráno 9 kontrastních linií (**Tab.2**).



**Obrázek č. 6** - linie JI92 s nepukavými lusky a linie JI64 s pukavými lusky.

**Tab. 2** Seznam vzorků RILs pro analýzu – rozdělení podle fenotypu

nepukavé linie	pukavé linie
16 64x92	23 64x92
45 64x92	42a 64x92
61 64x92	60 64x92
63 64x92	93 64x92
	99 64x92

### Návod:

1. Rostlinný materiál byl homogenizován (100 mg) v tekutém dusíku.
2. Po přidání 350  $\mu$ l Lysis Buffer RA1 byla tekutina přelita do zkumavky a přikápnuto 3,5  $\mu$ l  $\beta$  – merkaptoetanolu a promícháno pomocí vortexu.
3. Směs byla přenesena na kolonu NucleoSpin® Filter (fialová), poté centrifugace 1 min. při 11 000 g. NucleoSpin® Filter separován a odstraněn. Filtrát transferován pomocí pipety do nové zkumavky.
4. Dále bylo přidáno 350  $\mu$ l 70% ethanolu a promícháno pipetou (5x nasátím a vypuštěním).
5. Lyzát byl přenesen na kolonu NucleoSpin® RNA Plant Column (modrá), následně centrifugace 30 sekund při 11 000 g.
6. Kolona byla přemístěna do nové zkumavky a přidáno 350  $\mu$ l Membrane Desalting Buffer, centrifugace 1 min. při 11 000 g.
7. Následně bylo přidáno 95  $\mu$ l DNase reaction mixture. Poté inkubace 15 min. při laboratorní teplotě.
8. Dále přidáno 200  $\mu$ l promývacího pufru Buffer RAW2, centrifugace 30 sekund při 11 000 g.
9. Kolona opět umístěna do nové zkumavky, následně nanese 600  $\mu$ l promývacího pufru Buffer RA3, centrifugace 30 sekund při 11 000 g. Filtrát byl odstraněn a krok opakován s 250  $\mu$ l promývacího pufru Buffer RA3 a centrifugace po dobu 2 min. při 11 000 g.
10. Kolona byla přemístěna do nové zkumavky NucelaseFree 40  $\mu$ l RNasefree H<sub>2</sub>O. Následovala centrifugace 1 min při 11 000 g.

#### 4.4 Reverzní transkripce RNA na cDNA

RNA, s vyhovující koncentrací byla následně přepsána na cDNA ve dvou krocích. Při reverzní transkripci byly použity chemikálie od společnosti Promega (Promega, Madison, USA). Nejdříve byla připravena reakční směs dle **Tab.3** a následně proběhla inkubace 5 min. při 70°C, pak chlazení na ledu po dobu 5 min. Následně byla namíchána druhá reakční směs podle **Tab.4**, která byla přimíchána do premixu 1 a inkubována při teplotě 42°C 60 min.

**Tab. 3** Složení reakční směsi (premix 1)

	Množství na 1 reakci
Ultračistá H <sub>2</sub> O	9,5μl
Primer (oligo dT)	0,5μl
RNA vzorek (cca100ng/μl)	5μl
<b>Celkem</b>	<b>15μl</b>

**Tab. 4** Složení reakční směsi (premix 2)

	Množství na 1 reakci
Ultračistá H <sub>2</sub> O	13 μl
RT-pufr	8 μl
dNTPs (12,5 mM)	2 μl
Ribonuclease inh (40U/μl)	1 μl
RT-polymerase (200U/μl)	1 μl
<b>Celkem</b>	<b>25 μl</b>

#### 4.5 Navržení primerů

Pro navržení primerů byla využita plná verze software Oligo 7.0 (Molecular Biology Insights, Colorado Springs, USA). Tento software umožňuje identifikaci potenciálních dimerů a duplexů v rámci jednoho nebo i více primerů a jejich grafické zobrazení. Díky výsledkům MACE (Massive Analysis of cDNA Ends) analýzy, která byla provedena firmou GenXpro (Frankfurt am Main, Německo) byly pro návrh vybrány odpovídající sekvence. Avšak úseky pořizené z paralelního MACE sekvenování byly pro navržení příliš krátké, pro návrh primerů byly využity odpovídající homologní sekvence (ortology) z databáze GenBank a z databáze The Pea RNA-Seq gene atlas (INRA, Paris, Francie).

Ve finále bylo vybráno 20 kandidátních genů. V této práci se věnujeme třem genům, pro které byly navrženy páry primerů amplifikující úsek o délce 100-130 párů bází (Tab. 5).

**Tab. 5** Primerové kombinace pro kandidátní geny

	<b>Primery</b>	<b>Poznámky</b>
<b>Kandidátní gen 4</b>	Ps04F: GCTGGATGGACCCAAGTA	Produkt: 174 bp, T <sub>m</sub> = 82,4 °C, 3x3' dimer AT, vnitřní dimery nízké
	Ps04R: CGAAGTGAGCCCTTTCTTA	
<b>Kandidátní gen 9</b>	Ps09F: ATTATAAGAGAGGTGTCCGA	Produkt: 120 bp, T <sub>m</sub> = 61 °C
	Ps09R: GACAACATTTGGTGCAGA	
<b>Kandidátní gen 15</b>	Ps15F: CACCGTCATCTACCACA	Produkt: 132 bp, T <sub>m</sub> = 65 °C
	Ps15R: CACCGACCAAATTGTAATGGA	

#### 4.6 Kvantitativní Real-time PCR (RT-qPCR)

Kvantitativní Real-Time PCR (RT-qPCR) je modifikací klasické PCR, která slouží ke kvantifikaci templátové DNA. Principem kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase je emise světla fluorescenčního barviva. Fluorescenční barviva se využívají, jelikož samostatné produkty nejsou schopné fluorescence a zároveň žádným způsobem neovlivňují průběh reakce. V našem případě bylo použito barvivo SYBR Green, které bylo navázáno na dvouvláknovou DNA. Emise fluorescenčního záření vzniká po navázání dvouvláknové DNA po každém cyklu PCR. Intenzita fluorescenčního záření je přímo úměrná množství produktu. Každý cyklus PCR je zaznamenáván v reálném čase, a to vede k detekci množství dsDNA a vytvoření amplifikačních křivek.

Vyšší koncentrace templátové cDNA do reakce oproti kontrole značí vyšší expresi příslušného genu a naopak. Kontrolu v tomto případě představuje provozní (tzv. housekeeping) gen, který je v průběhu ontogeneze zhruba stejně exprimován. Jako provozní gen byl použit  $\beta$ -tubulin, který byl amplifikovaný podle publikovaných specifických primerů pro hrách (Die et al., 2010).

Pro RT-qPCR byla namíchána reakční směs podle **Tab 6**. a byl použit komerční kit LC 480 SYBR Green I Master (Roche, Bazilej, Švýcarsko). Připravená reakční směs byla následně rozpipetována do Real-Time PCR desky (obrázek č.7) Všechny vzorky byly nanášeny ve třech opakováních v tzv. triplikátech. Poté byla destička vložena do termocykleru BioRad C1000 s real-time systémem CFX96 (BioRad, Hercules, USA) a zahájen PCR program (obrázek č. 8) s následným vygenerováním křivky tání (tzv. melting curve křivky).

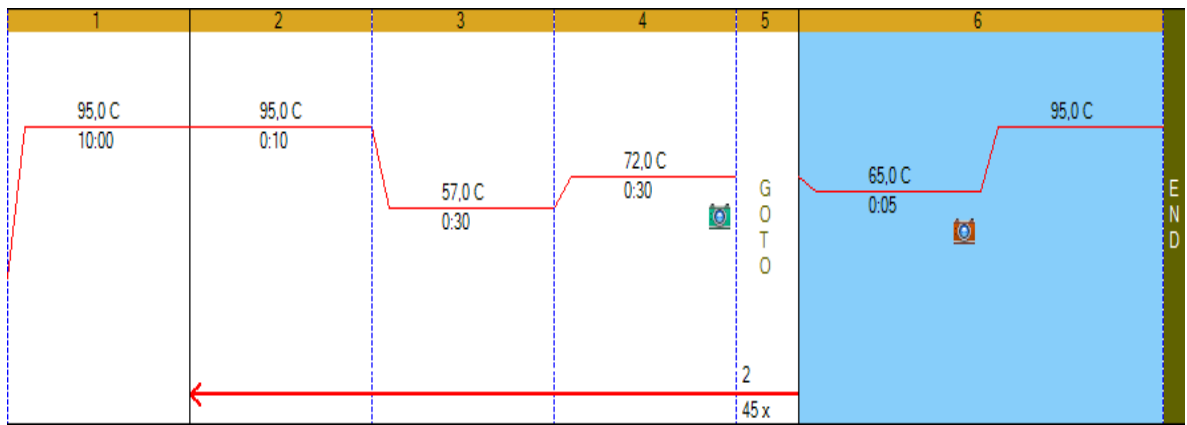
**Tab. 6** Složení reakční směsi pro RT-qPCR

	Množství na 1 reakci
Ultračistá H <sub>2</sub> O	1,4 µl
Primer F	0,8 µl
Primer R	0,8 µl
Sybr Master mix	5 µl
DNA vzorek	2 µl
<b>Celkem</b>	<b>10 µl</b>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT
	VIR320	VIR320	VIR320	34 92X64	34 92X64	34 92X64	56a 92X64	56a 92X64	56a 92X64	93 64X92	93 64X92	93 64X92
B	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB
	VIR320	VIR320	VIR320	34 92X64	34 92X64	34 92X64	56a 92X64	56a 92X64	56a 92X64	93 64X92	93 64X92	93 64X92
C	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT
	Cam	Cam	Cam	41 92X64	41 92X64	41 92X64	60 64X92	60 64X92	60 64X92	99 64X92	99 64X92	99 64X92
D	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk
	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB
	Cam	Cam	Cam	41 92X64	41 92X64	41 92X64	60 64X92	60 64X92	60 64X92	99 64X92	99 64X92	99 64X92
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	NTC	NTC	NTC
	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT
	16 64X92	16 64X92	16 64X92	42a 64X92	42a 64X92	42a 64X92	61 64X92	61 64X92	61 64X92	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
F	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	NTC	NTC	NTC
	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	EXT	EXT	EXT
	16 64X92	16 64X92	16 64X92	42a 64X92	42a 64X92	42a 64X92	61 64X92	61 64X92	61 64X92	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
G	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	NTC	NTC	NTC
	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	EXT	TUB	TUB	TUB
	23 64X92	23 64X92	23 64X92	45 64X92	45 64X92	45 64X92	63 64X92	63 64X92	63 64X92	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
H	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	NTC	NTC	NTC
	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB	TUB
	23 64X92	23 64X92	23 64X92	45 64X92	45 64X92	45 64X92	63 64X92	63 64X92	63 64X92	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

**Obrázek č. 7** Rozložení vzorků na RT-qPCR desce





**Obrázek č. 8** – Schéma průběhu RT-qPCR reakce

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Výběr vhodných vzorků RNA

Pro další analýzu byly vybrány vhodné koncentrace RNA, které byly změřeny pomocí PicoDrop spektrofotometru (Hinxton, Spojené království). Jako vhodné byly zvoleny vzorky RNA s koncentrací nad 100 ng/μl (**Tab.7 a 8**).

**Tab. 7** Vybrané hodnoty koncentrací RNA rodičovských linií

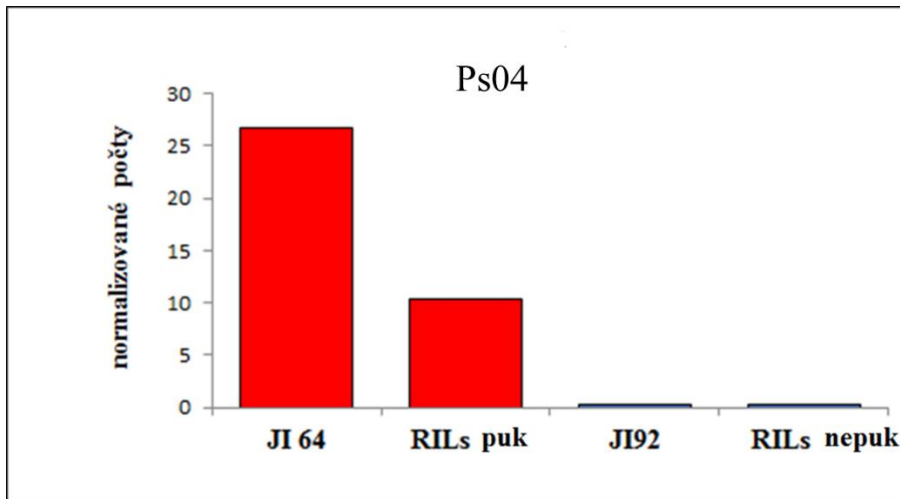
vzorek	koncentrace RNA ng/μl
Jl64 D I. Stadium	179,9
Jl64 V I. Stadium	669,6
Jl92 D I. Stadium	190,5
Jl92 V I. Stadium	179,6
Jl92 D II. Stadium	202,3
Jl64 D II. Stadium	586,4
Jl64 V II. Stadium	483,2
Jl64 D III. Stadium	195,7
Jl64 V III. Stadium	182
Jl92 V II. Stadium	121,7

**Tab. 8** Vybrané hodnoty koncentrace RNA RILs linií

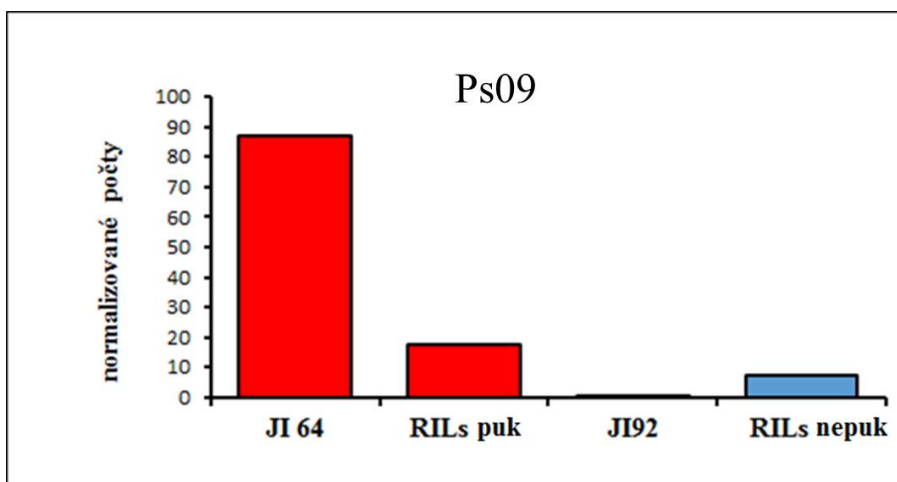
vzorek	koncentrace RNA ng/μl
linie 16	102,62
linie 23	30,60
linie 42a	47,00
linie 45	56,50
linie 60	36,30
linie 93	151,40
linie 99	281,60
linie 61	127,90
linie 63	137,10

## 5.2 Výsledky MACE analýzy

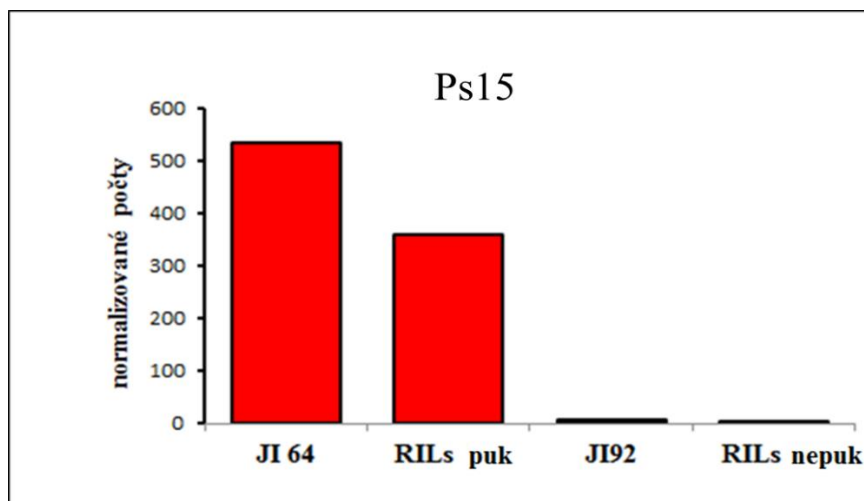
Na následujících grafech (obrázek č.9,10,11) lze sledovat vysokou expresi tří sledovaných genů u linie JI64 s pukavým typem lusku a u směsí linií RILs, které byly vyhodnoceny jako pukavé. Kandidátní gen Ps15 vykazuje nejvyšší expresi linií s pukavými lusky naopak kandidátní gen Ps04 nejnižší. Ve všech případech je exprese kandidátních genů u linií s pukavými lusky vyšší než u linií s lusky nepukavými.



**Obrázek č. 9** - Výsledky MACE masivního paralelního sekvenování 3' konců cDNA - normalizované počty (přepočítané podle koncentrací vstupních vzorků), kandidátní gen Ps04



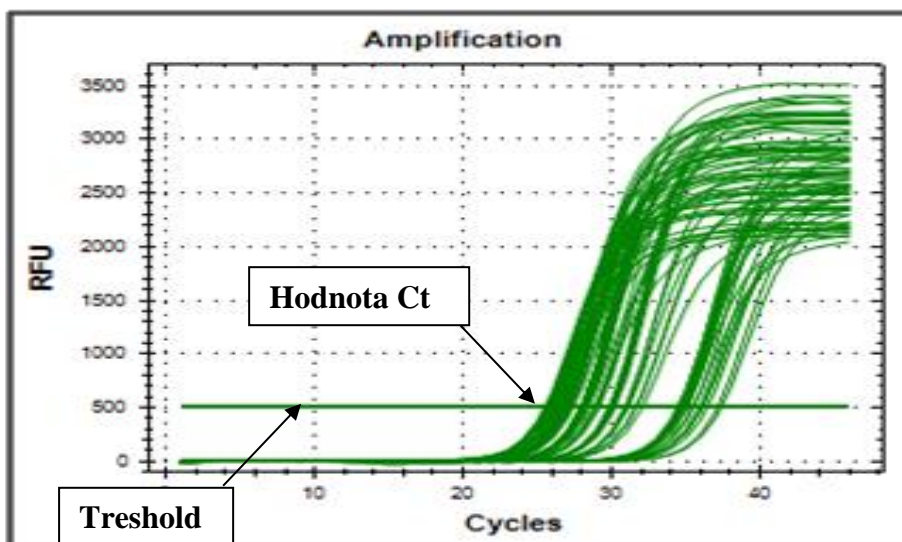
**Obrázek č. 10** - Výsledky MACE masivního paralelního sekvenování 3' konců cDNA - normalizované počty (přepočítané podle koncentrací vstupních vzorků), kandidátní gen Ps09



**Obrázek č. 11** - Výsledky MACE masivního paralelního sekvenování 3' konců cDNA-normalizované počty (přepočítání podle koncentrací vstupních vzorků), kandidátní gen Ps15

### 5.3 Výsledky RT-qPCR

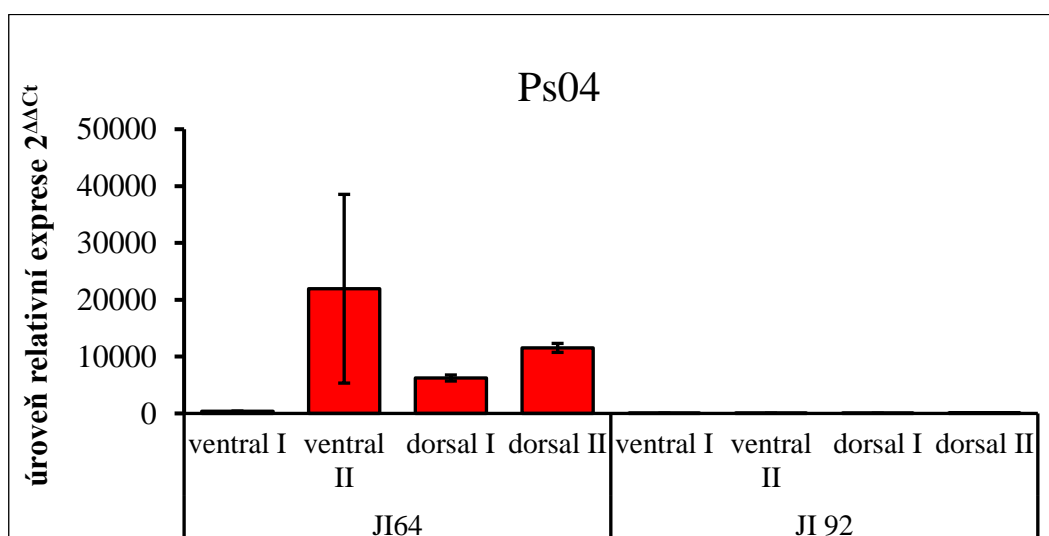
Díky RT-qPCR za použití Termocycler BioRad byly vygenerovány amplifikační křivky a hodnoty  $C_t$  (obrázek č. 12) pomocí kterých byly posuzovány výsledky RT-qPCR.  $C_t$  hodnota (cycle of treshold) určuje počet cyklů, kdy hodnota fluorescence překoná prahovou hodnotu citlivosti (treshold). Pokud je tato prahová hodnota překročena dochází k amplifikaci produktu v reakci. Čím menší hodnota  $C_t$ , tím vyšší počáteční množství amplifikované cDNA a tím i vyšší exprese genů. Byly získány hodnoty  $C_t$  zkoumaného genu a hodnoty  $C_t$  provozního genu. Z rozdílu těchto hodnot byly vypočítány hodnoty  $\Delta C_t$ , které byly dále normalizovány k hodnotě exprese linie JI92 za vzniku  $\Delta\Delta C_t$ . Hodnota  $\Delta\Delta C_t$  vznikla rozdílem hodnoty  $\Delta C_t$  vzorku a  $\Delta C_t$  hodnoty kontrolního genu. Posledním krokem byl výpočet normalizovaného expresního poměru  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , který udává relativní množství cílové molekuly s kalibrátorem. Tyto hodnoty byly vneseny do grafu spolu s chybovými úsečkami pro střední chybu průměru.



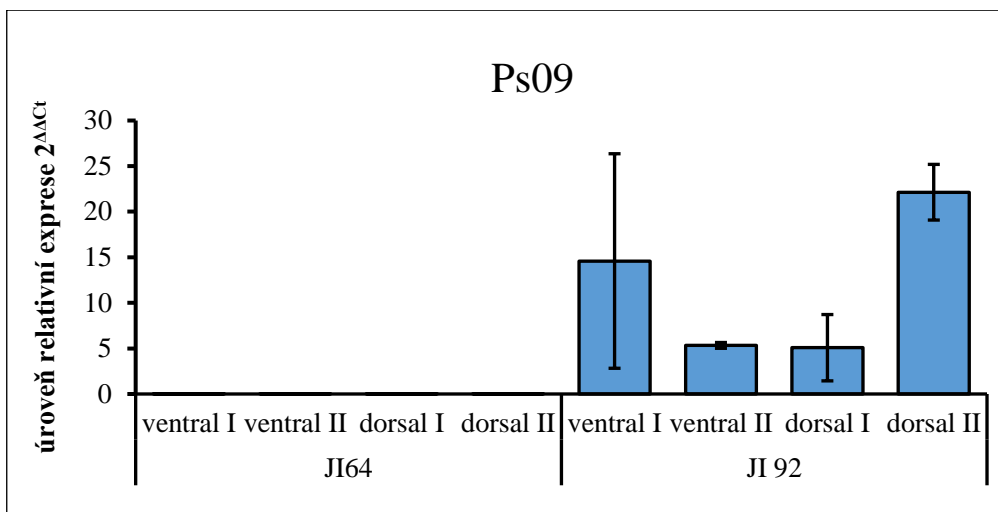
Obrázek č.12 - Amplifikační křivky průběhu PCR reakcí z termocycleru BioRad

#### 5.4 Expresse kandidátních genů

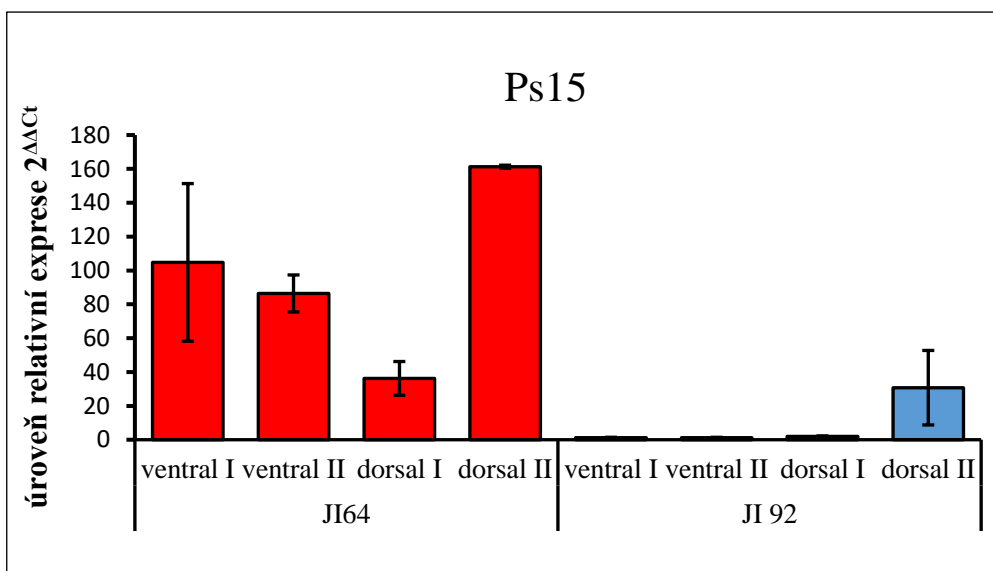
V první fázi experimentů byly testovány exprese kandidátních genů pouze u rodičovských linií. Následující grafy (obrázek č.13,14,15) normalizovaných relativních expresí znázorňují exprese hodnocených kandidátních genů. mRNA pro qPCR byla izolována z dorzálního a ventrálního švu rodičů u mladých a starších lusků. U genů Ps04 a Ps15 lze vysledovat vyšší expresi u linie s pukavým typem lusku. Naopak u genu Ps09 byla exprese vyšší u linie s nepukavým typem lusku.



Obrázek č. 13 - Expresse kandidátního genu Ps04



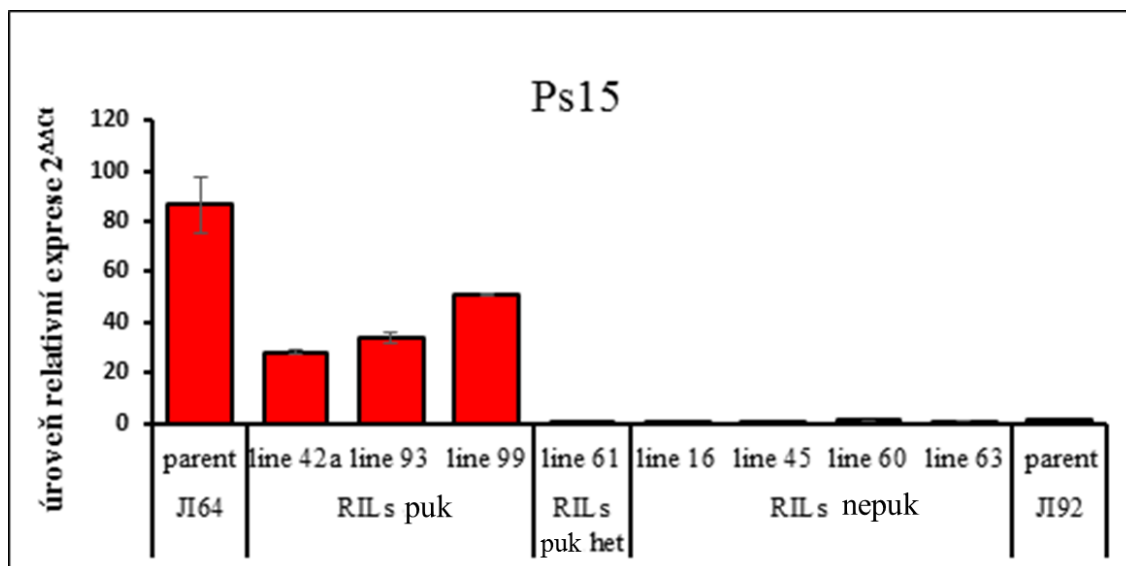
Obrázek č. 14 - Expese kandidátního genu Ps09



Obrázek č. 15 - Expese kandidátního genu Ps15

Ve druhé fázi experimentů bylo pracováno jednak s rodičovskými liniemi a dále s vybranými kontrastními RILs v sedmé generaci s jednoznačně identifikovaným fenotypem (pukavý či nepukavý lusk). Na rozdíl od kandidátních genů Ps04 a Ps09 jejichž zvýšené nebo snížené exprese neodpovídaly v části případů fenotypu v porovnání s fenotypem rodičovských linií, v případě kandidátního genu Ps15 byla identifikována shoda. Na obrázku č. 16 můžeme sledovat rozdíly v expresi u hodnocených linií pro kandidátní gen Ps15. Nejvyšší exprese dosáhla rodičovská linie JI 64 s pukavým typem lusků. Další linie s vysokou expresí můžeme zařadit linie 42a, 93. 99.

Tyto linie byly fenotypově vyhodnoceny jako pukavé. Naopak rodičovská linie JI92 spolu s liniemi 16, 45, 61 a 63 vykazovala nízkou expresi sledovaného genu. Fenotypově byly vyhodnoceny jako nepukavé. U jediné linie (61) s fenotypově pukavým typem lusku, byla úroveň exprese odpovídající nepukavému typu lusku. Pomocí PCR a elektroforézy (není součástí této práce) bylo díky délkovému polymorfismu alel odhaleno, že se v tomto případě jedná o heterozygota, přestože se jedná o imbrední linii v sedmé generaci. Tento fakt by mohl vysvětlit rozdíl u fenotypového a genotypového hodnocení.

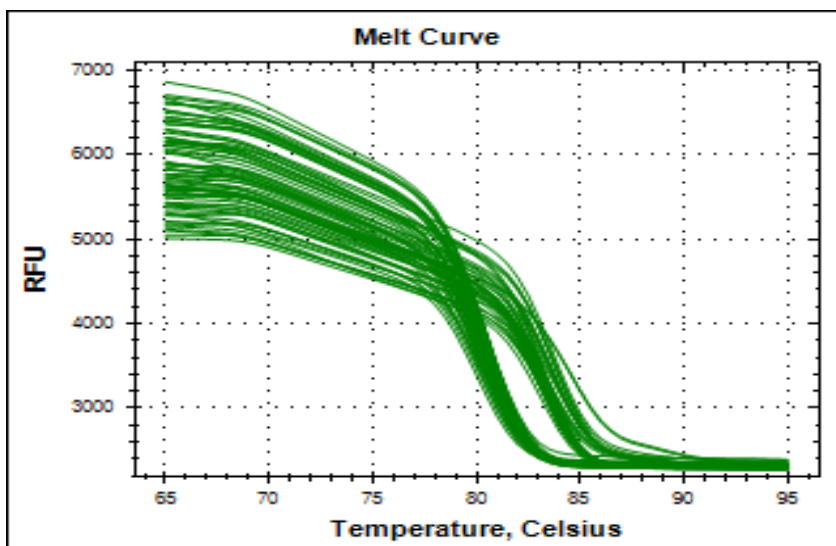


Obrázek č. 16 – Rozdíly v expresi u hodnocených linií

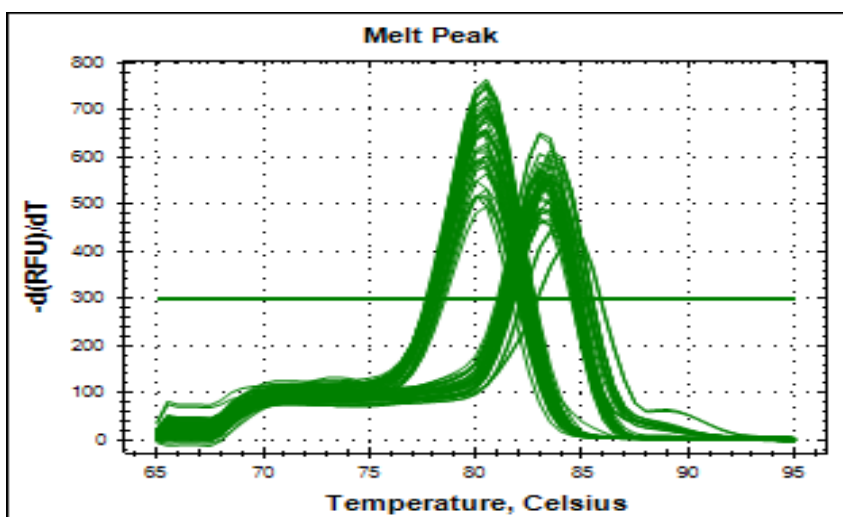
## 5.5 Ověření specifity primerů

V případě Real-Time PCR jsme použili barvivo SyberGreen. Díky tomu je možné snadno kontrolovat, zda v průběhu reakce vznikají nespecifické produkty. K tomu slouží křivka tání (tzv. melting curve křivka), která představuje změnu intenzity fluorescence v závislosti na změně teploty (obrázek č. 17). Na obrázku č. 18 můžeme pozorovat vrcholy křivek tání. Jedná se o vrcholy dvou typů křivek pro kandidátní gen Ps15 a rovněž provozní gen ( $\beta$ -tubulin). Ve všech případech křivky vykazují jediný vrchol, což naznačuje specifické PCR produkty.

Vzorky z PCR desky byly po ukončení RT-qPCR smíchány spolu s nanášecím pufrům a naneseny na agarózový gel. Po horizontální elektroforéze byly vzorky z jamek desky pomocí UV záření vizualizovány a takto byla rovněž vyhodnocena specifita PCR reakcí (obrázek č. 19, Příloha).



Obrázek č. 17 – Výstup z RT-qPCR – křivky tání



Obrázek č. 18 – Výstup z RT-qPCR – vrcholy křivek tání



## 6 DISKUZE

Zrání plodů rostlin je často ukončeno rozpadem a rozšířením semen do okolí. U planých druhů se jedná o důležitý znak, avšak u kulturních plodin je to nežádoucí vlastnost (Fuller & Allaby, 2009). Semena hrachu se šíří balistickým způsobem, který je řízen zónou dehiscence. Centrální šev lusku podstupuje explozivní protržení podél zóny dehiscence, díky tomu lusk praskne a semena se rozptýlí do okolí (Ambrose & Ellis, 2008). Během rozptýlení plodů se dvě poloviny lusku od sebe oddělí v důsledku kombinace snížení adheze buněk stěn zóny dehiscence a napětí stanovené specifickými mechanickými vlastnostmi buněk endokarpu a exokarpu. Tyto dva hlavní aspekty se objevují u čeledí *Fabaceae* a *Brassicaceae*, které vytvářejí suché pukavé plody (Grant, 1996; Dong & Wang, 2015). Stěny lusku postupně sesychají, dochází k smršťování endokarpu a vnější části exokarpu (Armon et al., 2011). Rozhodující faktory pro vytvoření napětí v lusku v čeledi *Fabaceae* jsou vlastnosti lignifikovaného sklerenchymu a exokarpu bohatého na pektin. Regulátory, které jsou klíčové pro vytváření požadovaného napětí, jsou ovlivňovány geometrickým uspořádáním vrstev a jejich histologickými vlastnostmi (tloušťka a složení buněčné stěny, lignifikace a hydratace). Složení a vlastnosti buněčných stěn lusků korelují u vigny zlaté (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) a vigny čínské (*Vigna unguiculata* var. *sesquipedalis* Bertoni.) (Suanum et al., 2016).

Hlavní QTL kontrolující pukání lusků u sóji (*Glycine max* (L.) Merr.) je qPDH1 (QTL for Pod Dehiscence 1). qPDH1 byl nedávno klonován a prokázalo se, že kóduje dirigent-like protein exprimovaný 3 dny po opylení, v době, kdy dochází k uložení ligninu do buněk endokarpu. Biosyntéza ligninu je s největší pravděpodobností ovlivněna qPHD1 (Suzuki et al, 2010; Funatsuki et. al, 2014). U *Arabidopsis* jsou pro diferenciaci sklerenchymu a lignifikaci endokarpu a buněk chlopní klíčové geny *NST1* (NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR 1) a *SDN1* (SECONDARY WALL ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN 1), které jsou identifikovány jako hlavní regulátory jejich exprese (Zhong et al., 2010). Lignifikace endokarpu a buněk chlopní je ztracena spolu s pukavostí u dvojitého mutantu *nst1sdn1* (Mitsuda & Ohme-Takagi, 2008). Další rozhodující bod pukavosti je mechanická stabilita/nestabilita zóny dehiscence, která by mohla být aktivována explozivním napětím švů (Grant, 1996). Snížená adheze buněčné stěny může být způsobena působením endo 1,4 glukánasy nebo endopolygalakturonazy, rozkládající střední lamelu v separační

vrstvě (Christiansen et al., 2002). Za domestikaci sóji (*Glycine max* (L.) Merr.) je zodpovědný gen *SHATTERING1-5*, který patří do rodiny *NAC* a indukuje sekundární tloušťnutí buněčné stěny a přispívá k tloušťnutí buněk v pruhu sklerenchymatických vláken (FCC – fiber cap cells) ve vnější části švu lusku sóji (*Glycine max* (L.) Merr.) (Dong et al., 2014).

U *Arabidopsis thaliana* Schur. byly objeveny MAD box geny *SHATTERPROOF 1* (*SHP1*) a *SHATTERPROOF 2* (*SHP2*), které se podílejí na specifikaci zóny dehiscence (Liljegren et al., 2000). Gen *SHATTERPROOF* spolu s genem *INDEHISCENT* (*IDEH*) jsou hlavními regulátory vytvoření lignifikované vrstvy, která způsobuje pukavost. Další MAD box geny, které jsou zapojeny do tvorby zóny dehiscence je *FRUITFULL* (*FUL*). *FUL* potlačuje expresi *SHP* i *IND* což způsobuje vytvoření funkční zóny dehiscence a lignifikaci buněk. Díky tomu je zajištěna pukavost šešule (Ferrándiz & Fourquin, 2014).

Homologní geny definující identitu zóny dehiscence jsou *INDEHISCENT*, *SPATULA*, *SHATTERPROOF*, *bZIP* a *SHATTERING* (Ferrándiz et al., 2000; Girin et al., 2011; Dong et al., 2014), byly identifikovány v genomu *Pisum* L. a jejich výskyt byl testován v RNA, která byla izolována ze švů lusku planého a domestikovaného hrachu, jako kontrast byly použity RILs, které vznikly křížením domestikovaného a planého rodiče s pukavými a nepukavými lusky. V případě homologních genů *SHATTERPROOF* a *SHATTERING* byly zjištěny rozdíly v expresi mezi rodičovskými liniemi hrachu. Ostatní homologní geny (*INDEHISCENT*, *SPATULA*, a *bZIP*) vykazovaly významnou diferenciaci v expresi mezi pukavými a nepukavými fenotypy. U luštěnin je rozpadavost plodů řízeno jedním nebo dvěma dominantními geny nebo QTL. Jeden kontrolní lokus byl nalezen u čočky (*Lens culinaris* Medik.) (Ladizinsky, 1998), zatímco 2 lokusy u vigny zlaté (*Vigna radiata* (L.) R. Willczek.) (Isemura et al., 2012) vigny čínské (*Vigna unguiculata* var. *sesquipedalis* Bertoni) (Kongjaimun et al., 2012), u hrachu (*Pisum* L.) byly nalezené 2 lokusy (Weeden et al., 2002; Weeden, 2007), podobně tak i u fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris* L.). Bordat et al., ve své publikaci v roce 2011 lokalizoval lokus *Dpo1*, který je zodpovědný za ztrátu pukavosti u lusku hrachu na LGIII.

Základní elementy rozpadání plodů byly popsány u *Arabidopsis thaliana*, v poslední době byly identifikovány homologní geny i u jiných druhů rostlin, např. kukuřice seté (*Zea mays* L.), pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), rýže seté (*Oryza sativa* L.), sóji luštinaté (*Glycine max* (L.) Merr.), čiroku dvoubarevného (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), nebo rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* L.) (Dong & Wang, 2015; Ballester & Ferrandiz, 2016).

V naší studii byla pomocí metody MACE vytvořena skupina genů, ze které byly pro tuto diplomovou práci zvoleny 3 kandidátní geny. Expres těchto genů byla postupně testována pomocí RT-qPCR. Pracovali jsme s pletivou švů lusků, které přímo souvisejí s jeho pukavostí po dozrání (zóna dehiscence). Z těchto částí byla izolována mRNA, ze které byla odvozena cDNA. Do této práce byly vybrány dvě linie, linie JI64 (*Pisum sativum* subsp. *elatius*, planý druh, s pukavými lusky) a linie JI92 (*Pisum sativum* subsp. *sativum*, kulturní hrách s nepukavými lusky). Dále byly použity RILs v sedmé generaci, vzniklé vzájemným křížením rodičovských linií. Z celkových 134 RILs bylo vybráno 9 kontrastních linií s jasným fenotypem (pukavé nebo nepukavé lusky). Pomocí Termocycler BioRad byly vygenerovány amplifikační křivky a hodnoty  $C_t$  podle kterých byla vyhodnocena exprese jednotlivých kandidátních genů. Jako provozní gen byl použit  $\beta$ -tubulin (Die et al., 2010). Jak už bylo zmíněno, práce se zaměřila na tři kandidátní geny, Ps04, Ps09 a Ps15. V případě kandidátních genů Ps04 a Ps15 byla vysoká exprese u rodičovské linie s pukavým typem lusku, naopak u kandidátního genu Ps09 byla exprese vyšší u rodičovské linie s nepukavým typem lusku. Při porovnání expresí kandidátních genů u rodičovských linií a kontrastních RILs se ve výsledku jeví Ps15 jako nejvhodnější kandidátní gen, jehož míra exprese se shoduje u rodičovských linií u kontrastních RILs. Gen Ps15, který je s vysokou pravděpodobností odpovědný za ztrátu pukavosti lusku u kulturního hrachu (*Pisum sativum* L.) vykazoval nízkou expresi, ale vysokou expresi u hrachu planého. Na základě syntenie se známým genomem *Medicago truncatula* a SNP mapou (Tayeh et al., 2015) bylo prokázáno, že kandidátní gen Ps15 je přítomen u hrachu v LGIII v oblasti *Dpo1*. V této oblasti je znak pro pukavost lusku hrachu předpokládán, a proto by gen Ps15 mohl být za pukavost u lusku zodpovědný.

## 7 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium genetické podstaty pukavosti lusku, která je považována za jeden z hlavních domestikčních znaků u hrachu (*Pisum sativum* L.). Bylo pracováno s rodičovskými liniemi JI64 a JI92 a s rekombinantními inbredními liniemi, které vznikly reciprokým křížením rodičovských linií. Práce byla zaměřena na analýzu tří kandidátních genů Ps04, Ps09 a Ps15. Pomocí RT-qPCR byla zjištěna jejich exprese v pletivech švů dozrávajících lusků u rodičovských linií a vytipován nejvhodnější kandidát, kterým je gen Ps15. Dále byla detekována genová exprese u vybraných kontrastních RILs s pukavými a nepukavými lusky. U kandidátního genu Ps15 byla prokázána rozdílná exprese u linií s pukavým a nepukavým fenotypem. Dále bylo prokázáno, že kandidátní gen Ps15 je lokalizován u hrachu v LGIII, v oblasti *Dpo1*, tedy oblasti, který byla na základě předchozích prací identifikována jako zodpovědnou za ztrátu pukavosti lusku hrachu během domestikace. Pro potvrzení našeho předpokladu by byla vhodná analýza exprese dalších RILs, stejně jako zpřesnění lokalizace *Dpo1* oblasti, ke kterému by mohlo pomoci plánované brzké zveřejnění genomu hrachu.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABBO, S., RACHAMIN, E., ZEHAVIL, Y., ZEZEK, I., LEV YADUNS., GOPHER, A., 2011: Experimental growing of wild pea in Israel and its bearing on Near Eastern plant domestication. *Annals of Botany* 107, 1399–1404. ISSN 0305-7364

ALLABY, R. G., 2008: The rise of plant domestication: life in the slow lane. *University of Warwick, UK Biologist* 55(2), 94–99. ISSN 0006-3347

ALLABY R. G., 2010: Integrating the processes in the evolutionary system of domestication. *Journal of Experimental Botany* 61, 935–944. ISSN 0022-0957

AMBROSE, M. J., ELLIS, T. H. N., 2008: Ballistic seed dispersal and associated seed shadow in wild *Pisum* germplasm. *Pisum Genet* 40, 5–10. ISSN : 1320-2510

ARMON, S., EFRATI, E., KUPFERMAN, R., SHARON, E., 2011: Geometry and mechanics in the opening of chiral seed pods. *Science* 333, 1726–1730. doi: 10.1126/science.1203874

ATKINS, C. A., KUO, J., PATEJ, S., 1977: Photosynthetic pod wall of pea (*Pisum sativum* L.) Distribution of Carbon Dioxide-fixing Enzymes in Relation to Pod Structure. *Plant Physiology* 60, 779–786. ISSN 0032-0889.

AURA, J. E., CARRIÓN, Y., ESTRELLES, E., JORDÁ, G. P., 2005: Plant economy of hunter-gatherer groups at the end of the last Ice Age: plant macroremains from the cave of Santa Maira (Alacant, Spain) ca. 12000–9000, *B.P. Veget. Hist. Archaeobot.* 14: 542-550. ISSN 0939-6314

BAKELS, C., 1999: Archaeobotanical investigations in the Aisne valley, northern France, from the Neolithic up to the early Middle Ages. *Veget. Hist. Archaeobot.* 8: 71-77, ISSN 0939-6314.

BALLESTER, P., FERRANDIZ, C., 2016: Shattering fruits: variations on a dehiscent theme. *Curr. Opin. Plant Biol.* 35, 68–75., ISSN 13695266

BEN ZE'EV, N., ZOHARY, D., 1973: Species relationship in the genus *Pisum* L. *Israel Journal of Botany*, 22: s. 73–91.

BLIXT, S., 1972: Mutation genetics in *Pisum*. *Agri Hort. Genetica* 30: 1–293.

BORDAT, A., SAVOIS, V., NICOLAS, M., SALSE, J., CHAUVEAU, A., BOURGEOIS, M., et al. 2011: Translational genomics in legumes allowed placing in silico 5460 unigenes on the pea functional map and identified candidate genes in *Pisum sativum* L. *G3* 1, 93–103. ISSN 2160-1836

BUTLER, A., 1998: Grain legumes: Evidence of these important ancient food resources from early pre-agrarian and agrarian sites in southwest Asia. In: DAMANIA A B, VALKOUN J, WILLCOX, G, QUALSET C O (eds.), *Origins of Agricultural and Crop Domestication*. Aleppo, Syria, 102–117. ISBN 9291270849.

CACAS, A., DEL CARMEN VÁZQUEZ, M., VIVEROS, J. L., CABALLERO, J., 1996: Plant management among the Nahua and the Mixtec in the Balsas River Basin, Mexico: an ethnobotanical approach to the study of plant domestication. *Human Ecology*, 24(4): 455–478. ISSN 0300-7839.

COLOMBO, M., BRAMBILLA, V., MARCHESELLI, R., CAPORALI, E., KATER, M. M., COLOMBO, L., 2009: A new role for the SHATTERPROOF genes during *Arabidopsis* gynoecium development. *Dev. Biol*, 337, 294–302. ISSN 00121606. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160609013359>

COX, B. C., MOORE, P. D., 1999: *Biogeography: an ecological and evolutionary approach*. 6th edition. *Oxford: Blackwell Science*. 298 s. ISBN 086542778X.

DIE, J.V., ROMAN, B., NADAL, S., GONZALES VERDEJO, C., 2010: Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta*, 232: 145–153. DOI: 10.1007/s00425-010-1158-1

DONG, Y., YANG, X., LIU, J., WANG, H., LIU, B.L., WANG, Y.Z, DREA, S., KOURMPETLI, S., 2014: Pod shattering resistance associated with domestication is mediated by a NAC gene in soybean. *Nature communication* 5:3352, 1–11. DOI: 10.1038/ncomms4352

DONG, Y., WANG, Y. Z., 2015: Seed shattering: from models to crops. *Front. Plant Sci.* 6:476. ISSN 1664-462x

ENDO, Y., CHOI, B.H., OHASHI, H., DELGADO-SALINAS, A., 2008: Phylogenetic relationships of New World *Vicia* (*Leguminosae*) inferred from nrDNA internal transcribed spacer sequences and floral characters. - *Systematic Botany*. 33: 356–363. ISSN 03636445.

FERRÁNDIZ, C., FOURQUIN, CH., 2014: Role of the *FUL–SHP* network in the evolution of fruit morphology and function. *Journal of Experimental Botany* 65(16): 4505-4513., 2–9. DOI: 10.1093/jxb/ert479

FERRÁNDIZ, C., LILJEGREN, S. J., YANOFSKY, M. F., 2000: Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. *Science* 289, 436–438. ISSN 00368075

FOURQUIN, CH., DEL CERRO, C., VICTORIA, F.C., VIALETTE GUIRAUD, A., DE OLIVEIRA, A. C., FERRÁNDIZ, C., 2013: A Change in *SHATTERPROOF* Protein Lies at the Origin of a Fruit Morphological Novelty and a New Strategy for Seed Dispersal in *Medicago* Genus. *Plant Physiology* 162, 907–917. ISSN 0032-0889.

FULLER, D. Q., ALLABY, R. G., 2009: Seed dispersal and crop domestication: shattering, germination and seasonality in evolution under cultivation. *Ann. Plant Rev.* 38, 238–295. doi: 10.1002/9781444314557.ch7

FUNATSUKI, H., SUZUKI, M., HIROSE, A., INABA, H., YAMADA, T., HAJIKA, M., KOMATSU, K., KATAYAMA, T., SAYAMA, T., ISHIMOTO, M., FUJINO, K., 2014: Molecular basis of a shattering resistance boosting global dissemination of soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 111 (50), 17797–17802. DOI: 10.1073/pnas.1417282111. ISSN 0027-8424.

GIRIN, T., PAICU, T., STEPHENSON, P., FUENTES, S., KORNER, E., O'BRIEN, M., et al., 2011: *INDEHISCENT* and *SPATULA* interact to specify carpel and valve margin tissue and thus promote seed dispersal in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 3641–3653. ISSN 1040-4651

GORMAN, CH., 1971: The Hoabinhian and after: Subsistence patterns in Southeast Asia during the late Pleistocene and early recent periods. *World Archaeology*, 2 (3): s. 300–320. ISSN 0043-8243.

GRANT, W. F., 1996: Seed pod shattering in the genus *Lotus* (*Fabaceae*): a synthesis of diverse evidence. *Can. J. Plant Sci.* 76, 447–456. ISSN 0008-4220

GU, Q., FERRÁNDIZ, C., YANOFSKY, M. F., MARTIENSSEN, R., 1998: The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* 125, 1509–1517. ISSN 0950-1991

GUPTA, A. K., 2004: Origin of agriculture and domestication of plants and animals lin- ked to early Holocene climate amelioration. *Current Science*, Vol. 87 (1): 54-59. ISSN 0011-3891

HARLAN, J. R., 1975: Crops and man. Madison, WI: *American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin*, 395 s. ISBN 0891181075

HARLAN, J. R., 1992: Origin and processes of domestication. Chapman, G.P. Grassevolution and domestication. *Cambridge University Press*, New York, 390 s., 159–175. ISBN 052141654X

HARRIS, D. R., 1989: An evolutionary continuum of people–plant interaction. 11–26. Harris, D. R, Hillman GC. Foraging and farming: the evolution of plant exploitation. *Unwin Hyman, London*, 733 s. ISBN 9781138799714

HEISLER, M. G. B., AKTINSON, A., BYLSTRA, Y. H., WALSH, R., SMYTH, D. R., 2001: *SPATULA*, a gene that controls development od carpel margin tissues in *Arabidospsis*, encodes a *bHLH* protein, *Development* 128(7): 1089-1098. ISSN 14779129

HILU, K. W., 1993: Polyploidy and the Evolution of Domesticated Plants. *American Journal of Botany* 80(12), 1494–1499. ISSN 0002-9122

HOLDEN, J., PEACOCK, J., WILLIAMS, T., 1993: Genes, crops and the environment. *Cambridge University Press*, 162 s. ISBN 0521437377

HOUBA, M., HOCHMAN, M., HOSNEDL., V., 2009: Luskoviny: pěstování a užití. 1. vyd. *České Budějovice: Kurent*, , 133 s. ISBN 978-80-87111-19-2.

CHLOUPEK, O., 2008: Genetická diverzita, šlechtění a semenářství, *Academia, Praha*, 311 s. ISBN:978-80-200-1566-2

CHRISTIANSEN, L. C., DAL DEGAN, F., ULVSKOK, P., BORKHARDT, B., 2002: Examination of the dehiscence zone in soybean pods and isolation of a dehiscence-related endopolygalacturonase gene. *Plant Cell Environ.* 25, 479–490. ISSN 0140-7791

CHRTKOVÁ, A., 1995: *Pisum L.* – hrách, s. 437–438. In SLAVÍK B. (ed.), Květena České republiky: 4. díl. *Praha: Academia*, 529 s. ISBN 80-200-0384-3.



IQUAL, M. J., 2001: A genetic bottleneck in the 'evolution under domestication' of upland cotton *Gossypium hirsutum* L. examined using DNA fingerprinting. *Theor. Appl. Genet.* 103: 547–55. ISSN 0040-5752.

ISEMURA, T., KAGA, A., TABATA, S., SOMTA, P., SRINIVES, P., 2012: Construction of a Genetic Linkage Map and Genetic Analysis of Domestication Related Traits in Mungbean (*Vigna radiata*). *PLOS ONE* 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0041304

JING, R., VERSHININ, A., GRZEBYTA, J., SHAW, P., SMYKAL, P., MARSHALL, D., AMBROSE, M. J., ELLIS, T. H. N., FLAVELL, J., 2010: The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 10 (1): 44. ISSN 1471-2148.

KONEČNÁ, E., ŠAFÁŘOVÁ, D., NAVRÁTIL, M., HANÁČEK, P., COYNE, C., FLAVELL, A., VISHNYAKOVA, M., AMBROSE, M., REDDEN, R., SMÝKAL, P., 2014: Geographical Gradient of the eIF4E Alleles conferring resistance to potyviruses in pea (*Pisum*) germplasm. *Plos One*, Vol. 9 (3): 1-11. ISSN: 1932-6203

KONGJAIMUN, A., KAGA, A., TOMOOKA, N., SOMTA, P., VAUGHAN, D. A., SRINIVES, P., 2012: The genetics of domestication of yardlongbean, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *unguiculata* cv. *gr. sesquipedalis*. *Ann. Bot.* 109, 1185–1200. ISSN 0305-7364

KUPICHA, F. K., 1981: VICIEAE (ADANS.) DC. (1825) NOM CONSERV PROP. IN: POLHILL R.M. & RAVEN P.H. (eds) *Advances in Legume Systematics 1. Kew: Royal Botanical Gardens: 377–381. ISBN 9780855212247.*

LADIZINSKI, G., 1998: *Plant Evolution under Domestication. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. ISBN 0412822105*

LILJEGREN, S., DITTA, G., ESHED, Y., SAVIDGE, B., BOWMANAND, J., YANOFSKY, M., 2000: Control of fruit dehiscence in *Arabidopsis* by the *SHATTERPROOF* MADS-box genes. *Nature* 404, 766–769. ISSN 00280836

LILJEGREN, S.J., ROEDER, A. H. K., KEMPIN, S. A., GREMSKI, K., ØSTERGAARD, L., GUIMIL, S., REYES, D. K., YANOFSKY, M. F., 2004: Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell* 116, 843–853. ISSN 00928674.

MACAS, J., NEUMANN, P., NAVRÁTILOVÁ, A., 2007: Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*, 8 (1): 427. ISSN 1471-2164.

MAXTED, N., AMBROSE M., 2001: Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean. *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers*, 378 s. ISBN 07-923-6707 3.

MAXTED, N., AMBROSE, M., 2001: PEAS (*PISUM* L). IN MAXTED, N., BENNET., S. J, Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean. Chapter 10. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*. ISBN 0792367073

MEYER, R. S., PURUGGANAN, M. D., 2013: Evolution of crop species: genetic of domestication and diversification. *Nat. Rev. Genet.* 14: 840-852. DOI: 10.1038/nrg3605

MIKIĆ, A., ANGELOVA, S., BURSTIN, J., DURIĆ, B., CUPINA, B., LEJEUNE, I., SABEVA, M., VISHNYAKOVA, M., DUC, G., 2009: The pea genetic resources of the Balkans, to represent the first cultivated peas of Europe. *Grain Legum.* 52: 16-17.

MIKIĆ, A., SMÝKAL, P., KENICER, G., et al., 2013: The bicentenary of the research on 'beautiful' vavilovia (*Vavilovia formosa*), a legume crop wild relative with taxonomic and agronomic potential. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 172(4), 524., ISSN 00244074.

MIKOYAN, E. N., 2006: Vavilov and the Theoretic Biology, in *Etyudy po istorii teoreticheskoi biologii (Sketches on the History of Theoretic Biology)*, *Moscow: Nauka*, pp. 207–222.

ITSUDA, N., OHME-TAKAGI, M., 2008: NAC transcription factors NST1 and NST3 regulate pod shattering in a partially redundant manner by promoting secondary wall formation after the establishment of tissue identity. *Plant J.* 56, 768–778. ISSN 09607412

NELSON, M. N., HUYEN, T. T., PHAN, S. R., ELLWOOD., et al., 2006: The first gene-based map of *Lupinus angustifolius* L.-location of domestication genes and conserved synteny with *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics*, , 113(2), 225-238 ISSN 0040-5752.

PAPA, R., GEPTS, P., 2003: Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theor. Appl. Genet.* 106: 239–250. ISSN 0040-5752.

PATE, J. S., KUO, J., 1981: Anatomical studies of legume pods – A possible tool in taxonomic research. 903–912. POLHILL, R., RAVEN, P., In *Advances in legume systematic. MAFF, England.* ISBN 0855212241

PIM, S. L., RUSSEL, G. J., GITTETLMAN, J. L., BROOKS, T. M., 1995: The future of biodiversity. *Science* 269: 347-349. ISSN 0036-8075

POLÍVKA, F., 1900: Názorná květena zemí koruny české obsahující též čtenější rostliny cizozemské, pěstované u nás pro užitek a okrasu. *Olomouc: R. Promberger, Online.* Dostupné na: <http://botanika.wendys.cz/kvetena/kvetena.php?dil=2&page=346>

PRATAP, A., KUMAR, J., 2012: Biology and breeding of food legumes. *Cambridge, CABI*, 418 s. ISBN 9781845937669.

REID, J. B., ROSS, J. J., 2011: Mendel's genes: toward a full molecular characterization. *Genetics*, Vol. 189 (1): 3-10. ISSN 0016-6731.

SAKUMA, S., SALOMON, B., KOMATSUDA, T., 2011: The domestication syndrome genes responsible for the major changes in plant form in the Triticeae crops. *Plant Cell Physiol.* 52: 738-749. ISSN 0032-0781.

SAVAGE, M., VAVILOV, N. I., LOVE, D., 1994: Origin and Geography of Cultivated Plants., 84(2), 231- [cit. 2017-04-02], DOI: 10.2307/215338., ISSN 00167428. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/215338?origin=crossref>

SCHAEFER, H., HECHENLEITNER, P., SANTOS-GUERRA, A., DE SEQUEIRA, M. M., PENNINGTON, R. T., KENICER, G., CARINE, M. A., 2012: Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe *Fabeae* with special focus on the middle-Atlantic island lineages. *BMC Evolutionary Biology*, , 12(1), 250. ISSN 1471-2148.

SINDHU, A., RAMSAY, L., SANDERSON, L. A., STONEHOUSE, R., LI, R., CONDIE, J., SHUN-MUGAM, A. S. K., LIU, Y., JHA, A. B., DIAPARI, M., BURSTIN, J., AUBERT, G., TAR'AN, B., BETT, K. E., WARKENTIN, T. D., SHARPE, A. G., 2014: Gene-based SNP

discovery and genetic mapping in pea. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 127: 2225-2241. ISSN: 1432-2242. ISSN 0040-5752.

SINJUSHIN, A., 2013: Mutation Genetics of Pea (*Pisum sativum* L.): What Is Done and What Is Left to Do. *Ratarstvo i povrtarstvo*, Vol. 50 (2): 36-43. ISSN 1821-3944. ISSN 1821-3944.

SMIRNOV, V. G., 1989: Analysis of Parallelism Genetic Nature in Heredity and Variation, in *Vavilovskoe nasledie v sovremennoi biologii* (Vavilov Heritage in Modern Biology), Moscow: Nauka: 15–26. DOI: 10.1134/S1022795407110014

SMITH, B. D., 1995: The emergence of agriculture. New York: Distributed by W.H. Freeman, ISBN 0716750554

SMÝKAL P., 2009: Domestikace rostlin z pohledu současné genetiky. *Živa*, Vol. 1: 6-9. ISSN: 0044-4812

SMÝKAL P., COYNE C.J., AMBROSE M.J., MAXTED N., SCHAEFER H., BLAIR M.W., BERGER J., GREENE S.L., NELSON M.N., BESHART N., VYMYSLICKÝ, T., TOKER, C., SAXENA, R. K., ROORKIWALL, M., PANDEY, M. K., HU, J., LI, Y.H., WANG, L. X., GUO, Y., QIU, L. J., REDDEN, R. J., VARSHNEY, R. K., 2015: Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* 34(1-3), 43–104.. ISSN 0735-2689.

SMÝKAL, P., KENICER, G., FFLAVELL, A., CORANDER, J., KOSTERIN, O., REDDEN, R. J., FORD, R., COYNE, C. J., MAXTED, N., AMBROSE, M. J., ELLIS, N. T. H., 2011: Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*, 9(01), 4–18. ISSN 1479-2621.

SUZUKI, M., FUJINO, K., NAKAMOTO, Y., ISHIMATO, M., FUNATSUKI, H., 2010: Fine mapping and development of DNA markers for the qPDH1 locus associated with pod dehiscence in soybean. *Mol. Breed.* 25, 407–418. ISSN 1380-3743

TASSEL, D. L. V, DEHANN, L. R., COX, T. S., 2010: Missing domesticated plant forms: can artificial selection fill the gap? *Blackwell Publishing Ltd* 3, 434–452. ISSN 17524571.

TAYEH, N., AUBERT, G., PILET-NAYEL, M. L., LEJEUNE-HÉNAUT, I., WARKENTIN, T. D., BURSTIN, J., 2015: Genomic tools in pea breeding programs: status and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 6: 1-13 ISSN: 1664-462X

TAYEH, N., ALUOME, C., FALQUE, M., JACQUIN, F., KLEIN, A., CHAUVEAU, A., et al., 2015: Development of two major resources for pea genomics: the GenoPea 13.2K SNP Array and a high density, high resolution consensus genetic map. *Plant J.* 84, 1257–1273. doi: 10.1111/tpj.13070

VAVILOV, N. I., 1992: Origin and geography of cultivated plants. *Cambridge University Press*, U.K. 498 s. ISBN 0521404274.

WEEDEN, N. F., BRAUNER, S., PRZYBOROWSKI, J. A., 2002: Genetic analysis of pod dehiscence in pea (*Pisum sativum* L.) *Cellular and Molecular Biology Letters* 7, 657–663. ISSN :1425-8153

WEEDEN, N. F., 2007: Genetic changes accompanying the domestication of *Pisum sativum*: Is there a common genetic basis to the ‘Domestication Syndrome’ for legumes? *Ann. Bot.* 100: 1017–1025. ISSN 0305-7364.

WELLER, J. L., HECHT, V., SCHOOR, J. K. V., DAVIDSON, S. E., ROSS, J. J., 2009: Light Regulation of Gibberellin Biosynthesis in Pea Is Mediated through the COP1/HY5 Pathway. *The Plant Cell.* 21(3): 800-813. ISSN 1040-4651.

ZEDER, M. A., EMSHWILLER, E., SMITH, B. D., BRADLEY, D. G., 2006: Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. *Trends in genetic*, Vol. 22 (3): 139-155. ISSN: 0168-9525

ZHONG, R., LEE, C., YE, Z., 2010: Evolutionary conservation of the transcriptional network regulating secondary cell wall biosynthesis. *Trend Plant Sci.* 15, 625–632. ISSN 13601385.

ZOHARY, D., HOPF, M., 1988: Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley. *Oxford University Press*, 316 s. ISBN 0-19-854198-8..

## 9 SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Čeledi s nejvýznamnějšími zástupci domestikovaných plodin (upraveno podle Smýkal,2009).....	15
Tab. 2 Seznam vzorků RILs pro analýzu – rozdělení podle fenotypu.....	28
Tab. 3 Složení reakční směsi (premix 1) .....	30
Tab. 4 Složení reakční směsi (premix 2) .....	30
Tab. 5 Primerové kombinace pro kandidátní geny .....	31
Tab. 6 Složení reakční směsi pro RT-qPCR .....	32
Tab. 7 Vybrané hodnoty koncentrací RNA rodičovských linií .....	34
Tab. 8 Vybrané hodnoty koncentrace RNA RILs linií .....	34

## 10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 - Oblasti původu a první domestikální oblasti kulturních rostlin a domácích zvířat (Chloupek, 2000).....	13
Obrázek č. 2 – Hrách ( <i>Pisum sativum</i> L.) (Polívka, 1900).....	18
Obrázek č. 3 - Schématické znázornění fylogenetických vztahů podčeledi Fabeae (Smýkal, 2011).....	19
Obrázek č. 4 – Pěstované rostliny ve skleníku (Pavilon M).....	26
Obrázek č. 5 – Vennův diagram exprimovaných genů.....	27
Obrázek č. 6 - linie JI92 s nepukavými lusky a linie JI64 s pukavými lusky.....	28
Obrázek č. 7 Rozložení vzorků na RT-qPCR desce .....	32
Obrázek č. 8 – Schéma průběhu RT-qPCR reakce .....	33
Obrázek č. 9 - Výsledky MACE masivního paralelního sekvenování 3' konců cDNA - normalizované počty (přepočítání podle koncentrací vstupních vzorků), kandidátní gen Ps04.....	35
Obrázek č. 10 - Výsledky MACE masivního paralelního sekvenování 3' konců cDNA - normalizované počty (přepočítání podle koncentrací vstupních vzorků), kandidátní gen Ps09.....	35
Obrázek č. 11 - Výsledky MACE masivního paralelního sekvenování 3' konců cDNA - normalizované počty (přepočítání podle koncentrací vstupních vzorků), kandidátní gen Ps15.....	36
Obrázek č.12 - Amplifikační křivky průběhu PCR reakcí z termocycleru BioRad .....	37
Obrázek č. 13 - Expres kandidátního genu Ps04 .....	37
Obrázek č. 14 - Expres kandidátního genu Ps09 .....	38
Obrázek č. 15 - Expres kandidátního genu Ps15 .....	38
Obrázek č. 16 – Rozdíly v expresi u hodnocených linií .....	39
Obrázek č. 17 – Výstup z RT-qPCR – křivky tání .....	40
Obrázek č. 18 – Výstup z RT-qPCR –vrcholy křivek tání .....	40

## 11 SEZNAM ZKRATEK

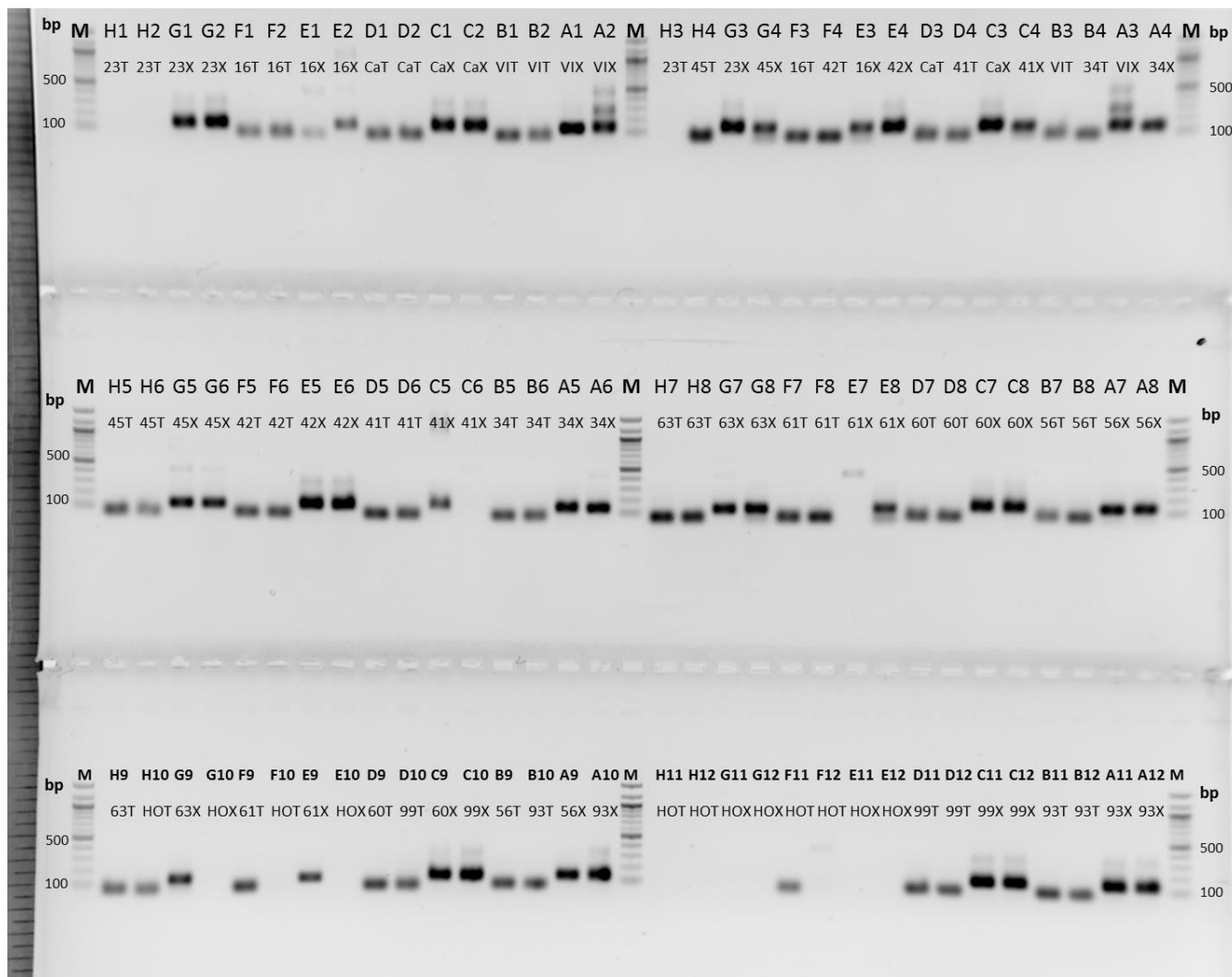
<b><i>ALC</i></b>	gen ALCATRAZ
<b><i>bZIP</i></b>	Basic-leucin zip (gen pro transkripční faktor bZIP)
<b><i>cDNA</i></b>	complementary DNA
<b><i>DNA</i></b>	Deoxyribonucleic Acid
<b><i>Dpo</i></b>	locus pod dehiscence (lokus pukavosti)
<b><i>DZ</i></b>	Dehiscence Zone (zóna pukavosti)
<b><i>FCC</i></b>	Fiber Cap Cells
<b><i>FUL</i></b>	gen FRUITFULL
<b><i>IDEH</i></b>	gen INDEHISCENT
<b><i>ITIS</i></b>	Integrated Taxonomic Information System
<b><i>JI</i></b>	John Innes Centre
<b><i>LGIII</i></b>	Linkage Group III (vazebná skupina III)
<b><i>MACE</i></b>	massive analysis of cDNA ends cDNA
<b><i>mRNA</i></b>	mediátorová RNA
<b><i>PCR</i></b>	Polymerase Chain Reaction
<b><i>RILs</i></b>	rekombinantní imbreďní linie
<b><i>RNA</i></b>	Ribonucleic Acid
<b><i>RT-qPCR</i></b>	Quantitative reverse transcription – PCR
<b><i>SHAT 1-5</i></b>	gen SHATTERING 1-5
<b><i>SHP</i></b>	gen SHATTERPROOF
<b><i>SPT</i></b>	gen SPATULA
<b><i>QTL</i></b>	Quantitative Trait Locus



## **12 PŘÍLOHY**

### **12.1 Seznam příloh**

Obrázek č. 19.....Vizualizace produktů RT-qPCR



### P160808ab qPCR Ps15

Na gel naneseny 2  $\mu$ l PCR vzorku a 1  $\mu$ l nanášecího pufu

M - Quick load 100 bp ladder (NEB) 100 ng

X – Ps15 (GOI)

T –  $\beta$ -tubulin (provozní gen)

Vzorky:

23 – 23 (64x92) pukavý lusk

42 – 42a (64x92) pukavý lusk

45 – 45 (64x92) nepukavý lusk

60 – 60 (64x92) nepukavý lusk

93 – 93 (64x92) pukavý lusk

99 – 99 (64x92) pukavý lusk

16 – 16 (64x92) nepukavý lusk

61 – 61 (64x92) nepukavý lusk - heterozygot

63 – 63 (64x92) nepukavý lusk

56 – 56a (92x64) nepukavý lusk

34 – 34 (92x64) nepukavý lusk

41 – 41 (92x64) pukavý lusk

Ca – Cameor

VI – VIR320

Obrázek č. 19 – Vizualizace produktů RT-qPCR