

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Svatopluk Skoupý

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Hrách jako model pro studium molekulárních
mechanismů jaderně cytoplasmatického konfliktu
jako procesu speciace u rostlin**

Bakalářská práce

**Svatopluk
Skoupý**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně, za pomoci vedoucího práce doc. Ing. Petra Smýkala Ph.D. a zdrojů v ní uvedených.

V Olomouci:

.....

Svatopluk Skoupý

Souhrn:

Tato bakalářská práce s názvem „Hrách jako model pro studium molekulárních mechanismů jaderně cytoplasmatického konfliktu jako procesu speciace u rostlin“ se skládá ze dvou hlavních částí, a to teoretické rešerše a praktické části. Teoretická rešerše se zaměřuje se na speciaci rostlin, konkrétněji na prezygotické a postzygotické reprodukční bariéry, roli jaderně cytoplasmatické inkompatibility ve speciaci a využití hrachu (*Pisum spp.*) jakožto modelu pro studium inkompatibility.

Cílem praktické části této práce byla analýza konkrétních forem genů *accD* a *Bccp3* asociovaných s inkompatibilitou u vybraných linií planého hrachu (*Pisum sativum sp. elatisu*) z jihovýchodního Turecka. V praktické části byly využity znalosti botaniky, metody molekulární genetiky a bioinformatické analýzy.

Summary:

This bachelor thesis titled „Pea as model to study molecular mechanisms of nucleo-cytoplasmic conflict as a plant speciation process“ is divided into two distinct parts, the theoretical research and the practical part. The theoretical research focuses on plant speciation, with emphasis on the prezygotic and postzygotic reproductive barriers, the role of nucleo-cytoplasmic incompatibility in speciation and the use of pea (*Pisum spp.*) as a model for study of the incompatibility.

The aim of the practical part was to analyze specific forms of *accD* and *Bccp3* genes associated with incompatibility in selected wild pea (*Pisum sativum* sp. *elatius*) lines from southeast turkey. In practical research, knowledge of botany, methods of molecular genetics and bioinformatic analysis were used.

Poděkování:

Děkuji panu doc. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za odborné vedení při vypracovávání této bakalářské práce, za věcné rady, vstřícnost a zejména trpělivý přístup. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Lence Zablatzké za nedocenitelné rady a pomoc při práci v laboratoři.

Obsah

Cíle Práce	9
1. Úvod	10
2. Prezygotické a postzygotické reprodukční bariéry	12
2. 1. Ekogeografická izolace a další prezygotické RIM	12
2. 1. 1. Gametofytická a sporofytická self-incompatibilita	13
2. 2. Postzygotické RIM	16
3. Inkompatibilita na úrovni genů	18
3. 1. Letalita hybridů	20
4. Jaderně cytoplasmatická inkompatibilita	20
4. 1. Samčí cytoplasmatická sterilita	21
4. 2. Jaderně cytoplasmatická inkompatibilita na modelu <i>Pisum sativum</i>	22
4. 2. 1. <i>Pisum sativum</i> , jeho evoluce a využití	22
4. 2. 2. Studium jaderně-cytoplasmatické inkompatibility	24
5. Materiál a Metody:	27
5. 1. Rostlinný materiál:	27
5. 2. Odběr vzorků:	27
5. 3. Laboratorní vybavení:	29
5. 4. Izolace RNA:	30
5. 5. Měření koncentrace RNA:	31
5. 6. Přepis RNA do cDNA:	31
5. 6. 1. Odstranění zbytkové DNA	31
5. 7. Izolace genomové DNA:	32
5. 8. PCR amplifikace:	33
5. 9. Gelová elektroforéza:	34
5. 10. Sekvencování:	35
5. 11. Bioinformatická analýza:	35
6. Výsledky:	36
6. 1. Izolace DNA a RNA a RT-PCT	36
6. 2. PCR amplifikace a analýza pomocí elektroforézy na agarosovém gelu:	38
6. 3. Sekvence a bioinformatická analýza:	41
6. 3. 1. Analýza DNA sekvencí	41
6. 3. 2. Analýza proteinových sekvencí	48
6. 3. 3. Srovnání haplotypů pro lokusy <i>accD</i> a <i>Bccp3</i>	57

7. Diskuze.....	61
8. Závěr	64
9. Použité zkratky.....	65
10. Literatura a reference	66

Cíle Práce

Teoretická část: Cílem teoretické části bakalářské práce bylo sestavit literární rešerše na téma jaderně-cytoplasmatické inkompatibility u rostlin.

Praktická část: Cílem praktické části bakalářské práce bylo provést sekvenační analýzy vybraných linií hrachu (*Pisum sp.*) pro jaderné i chloroplastové geny zodpovídající za jaderně-cytoplasmatickou inkompatibilitu.

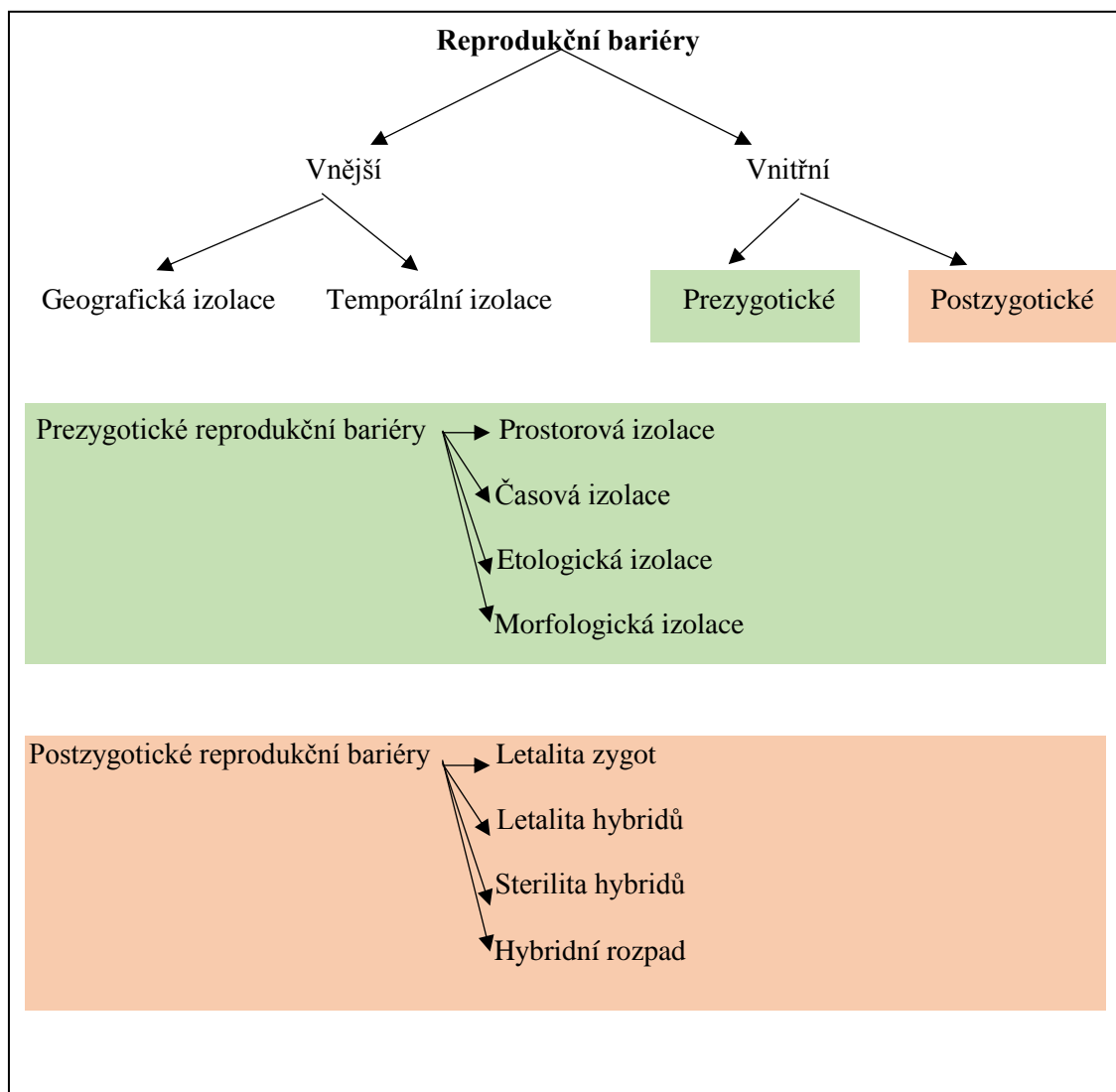
1. Úvod

Speciace je proces, při kterém dochází ke vzniku nových biologických druhů. Definovat a diskrétně určit biologický druh může být však značně obtížné, jelikož, zejména u rostlin existují kromě klasických reprodukčně izolovaných linií také interspecifiční hybridy, klonální a apomiktické komplexy, polyploidní linie aj. Na základní úrovni rozlišujeme dle mechanismu působení speciace alopatickou, sympatickou a peripatickou (Flegr, 2005). O speciaci alopatickou se jedná v případě, že dojde k rozdělení původního areálu druhu zpravidla geografickou bariérou, čímž dojde k omezení migrace mezi takto vzniklými populacemi a vlivem genetického driftu k hromadění změn a výsledné diverzifikaci. Sympatická speciace, na rozdíl od speciace alopatické nevyžaduje přítomnost geografické bariéry, jedná se o vznik nových druhů z druhu původního ve stejném areálu výskytu vlivem rozdílné adaptace části populace, např. na jiného opylovače. Peripatickou speciaci můžeme pozorovat, dojde-li k rozdělení původního areálu druhu na větší množství izolovaných populací, které rychle procházejí změnami, příkladem peripatické speciace je např. adaptivní radiace rodu *Argyroxiphium*, čeledi *Asteraceae*. Tento rod se skládá z cca 50 popsáných druhů endemických na havajských ostrovech. Všechny tyto druhy, ač mnohdy výrazně morfologicky odlišné, jsou si velmi blízké příbuzné a mají pravděpodobně jedinou společnou ancestrální linii. (Riesberg *et* Willis, 2007; Kepler, 1998)

Dle Darwinovy teorie evoluce, byl hlavním hybatelem speciace přírodní výběr, tedy selekce podmíněná prostředím a kompeticí a reprodukční bariéry byly pouze jakýmsi vedlejším produktem či průvodním jevem speciace (Kutschera *et* Niklas, 2004). Až Dobzhansky a Mayr rozpoznali, že evoluční bariéry, které brání toku genů mezi populacemi, u kterých docházelo k volnému křížení, jsou jak u živočišných druhů, tak u rostlinných jedním z klíčových procesů speciace. Samy reprodukční bariéry, či reprodukční izolační mechanismy (Dále v textu RIM) netvoří genetickou variabilitu a nejsou hlavním hybnou silou diversifikace, těmi jsou genetický drift a selekce, způsobují ale akumulaci genetických rozdílů mezi populacemi a posilují další diverzifikaci těchto linií, což ve výsledku vede k posílení určitých adaptivních znaků a k výsledné speciaci. RIM často působí mechanismem *FEED-BACK LOOP* (Flegr, 2005) kdy i malá počáteční změna či přesněji restrikce v migračním toku mezi populacemi může vést ke hromadění

změn a dalšímu snižování migračního toku což ve výsledku může vést k úplné reprodukční izolaci. U rostlin rozlišujeme celou škálu těchto bariér s rozdílnými principy funkce. Na základní úrovni rozlišujeme prezygotické a postzygotické reprodukční bariéry, tedy mechanismu bránící vzniku hybridního jedince před a po vzniku samotné zygoty. Prezygotické mechanismy je i rostlin třeba rozlišovat na prepolinační, které zpravidla brání vzniku zygoty tím, že nedochází ke styku pohlavních buněk, tj pylové zrno se nedostane do styku se samičím pohlavním orgánem rostliny a postpolinační mechanismy, kdy dochází k opylení, ale nedochází ke splnutí pohlavních buněk, v tomto případě generativní buňky pylového zrna a vaječné buňky (Flegr, 2005). Častou prezygotickou bariérou, kterou lze běžně pozorovat je ekogeografická izolace.

Obr. č. 1: Schéma klasifikace základních vnějších a vnitřních reprodukčně izolačních bariér



2. Prezygotické a postzygotické reprodukční bariéry

2. 1. Ekogeografická izolace a další prezygotické RIM

Ekogeografická izolace, řadící se v kontextu pre-RIM mezi prepollinační izolační mechanismy, je podmíněna změnou prostředí, ve kterém se daná populace vyskytuje. Takovouto změnou může být kupříkladu vznik geografické překážky či změna prostředí vlivem změn klimatu či jako následek přírodní či ekologické katastrofy. Vlivem rozdělení přirozeného prostředí populace, kupříkladu vlivem vzniku nové geografické překážky, jakou může být stavba dálnice, lidská aglomerace, vodní plocha či skalní masiv, dojde k omezení genového toku mezi populacemi vlivem omezení migrace (Flegr, 2005).

Další důležitou prezygotickou bariérou je fenologická izolace, kterou můžeme také rozdělovat na izolaci mechanickou a časovou, a která působí, mají-li i velmi blízké příbuzné linie odlišnou dobu kvetení (časová izolace) takže přestože obývají stejnou ekologickou niku, nedochází ke kontaktu pohlavních buněk těchto linií, popřípadě mají-li odlišnou květní morfologii (mechanická izolace) vlivem adaptace na jiného opylovače (Rieseberg *et Willis*, 2007). Výborným příkladem tohoto jevu jsou stromové orchideje rodu *Phalaenopsis* či *Dendrobium*, jelikož se jedná o rody pocházející z tropických oblastí, zejména pak z deštných a mlžných lesů s velkou druhovou diverzitou možných opylovačů, adaptovaly se různé linie těchto rodů na různé opylovače, což způsobilo rapidní diferenciaci, co se týče celkové morfologie květu. Květy těchto orchidejí, respektive květy cca třetiny všech druhů orchidejí (30 000 druhů) jsou často deceptivní a neprodukují nektar, kterým by odměňovaly opylovače. Lákají je tedy tím, že napodobují svým tvarem a mnohdy, vlivem produkce specifických látek napodobujících feromony (jako je tomu například u orchideje *Dendrobium sinense*, která produkuje analog feromonu včely druhu *Vespa bicolor*, který slouží k nalákání trubců) i vůní, samičky svých opylovačů (Brodmann, 2009).

Jelikož se jedná o relativně spolehlivý druhově specifický mechanismus a šance zavlečení pylu cizího druhu orchideje stejným opylovačem je malá, nevyvinuly se u velké části těchto orchidejí postzygotické bariéry, což kupříkladu umožňuje šlechtitelům orchidejí pěstovat velké množství hybridů i z morfologicky a geneticky relativně vzdálených linií. Tento mechanismus má však i své podstatné nevýhody, jelikož adaptace na jednoho specifického opylovače může ve výsledku vést ke zvýšení náchylnosti daného druhu ke změnám prostředí, jelikož se stává přímo závislým na schopnosti svého

opylovače těmto změnám se přizpůsobit (Rieseberg *et Willis*, 2007; Baack *et al.* 2015).

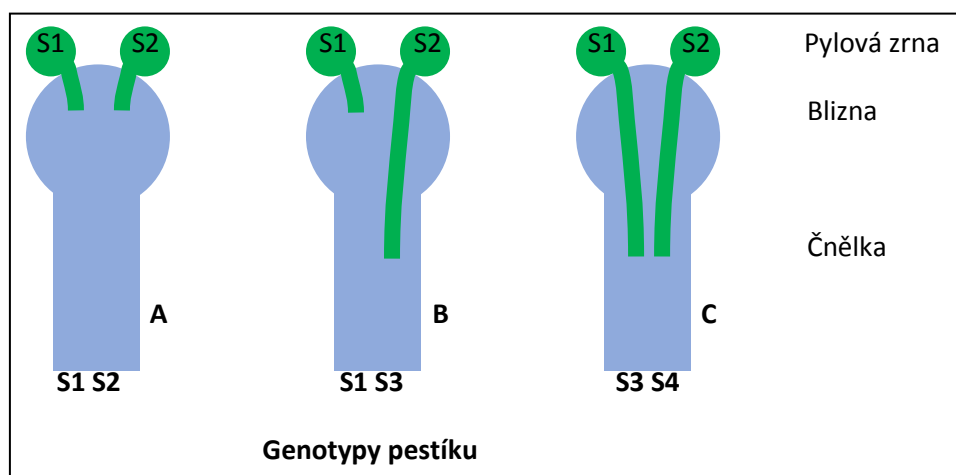
Mezi prezygotické RIM se řadí také postpollinační bariéry, které působí již po opylení, tedy po nasednutí pylového zrna na bliznu, ale před oplozením (nejedná se tedy o mechanismy postzygotické). Postpollinační bariéry jsou důležitou součástí pylové self-incompatibility kvetoucích rostlin. Rozlišujeme gametofytickou (GSI) a sporofytickou (SSI) self-incompatibilitu (Flegr, 2005).

2. 1. 1. Gametofytická a sporofytická self-incompatibilita

Pylová self-incompatibilita (dále v textu PSI) zajišťuje, že u rostliny nedojde k samooplození. Na rozdíl od výše zmíněných mechanismů tedy působí zejména proti pohlavním buňkám daného jedince či jedinců klonálních, blízké příbuzných či náležících do stejného apomiktického komplexu, a ne proti pohlavním buňkám jiných linií. Pylová self-incompatibilita se však výrazně podílí na evoluci linií, zejména co se týče introdukce nových či vzácných alel a může, vlivem genetického driftu, podpořit diverzifikaci a výslednou reprodukční izolaci (Šafářová *et al.* 2015). S ohledem na to, zdali za inkompatibilitu pylu odpovídá genotyp pohlavní buňky nebo genotyp rostliny (nesoucí samičí pohlavní orgány) rozlišujeme self-incompatibilitu gametofytickou a sporofytickou (dále v textu GSI a SSI).

GSI je v přírodě pozorována např. u čeledí *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Liliaceae*, *Poaceae*, *Ranunculaceae*, *Plantaginaceae* aj. a je celkově rozšířenější, ač méně popsanou, formou PSI prokázanou u více než poloviny čeledí krytosemenných rostlin. Základem GSI je existence S lokusu (Self-incompatibility Locus), který je vysoce variabilní, tj. v populaci existuje velké množství alel tohoto lokusu. Inkompatibilita je v tomto případě podmíněna jedinou alelou tohoto lokusu přítomnou v genotypu pylového zrna, tj. pylové zrno je kompatibilní, pokud má jakoukoli jinou alelu S lokusu, než je ta přítomná v genotypu pestíku. Pokud má tedy rostlina nesoucí samičí pohlavní orgány alely S1 a S2, pylová zrna mající S1 nebo S2 nebudou kompatibilní (McCubbin *et Kao*, 2000).

Obr. č. 2: Schéma kompatibility pylových zrn a láčky na základě alely S lokusu v případě gametofytické self-incompatibility



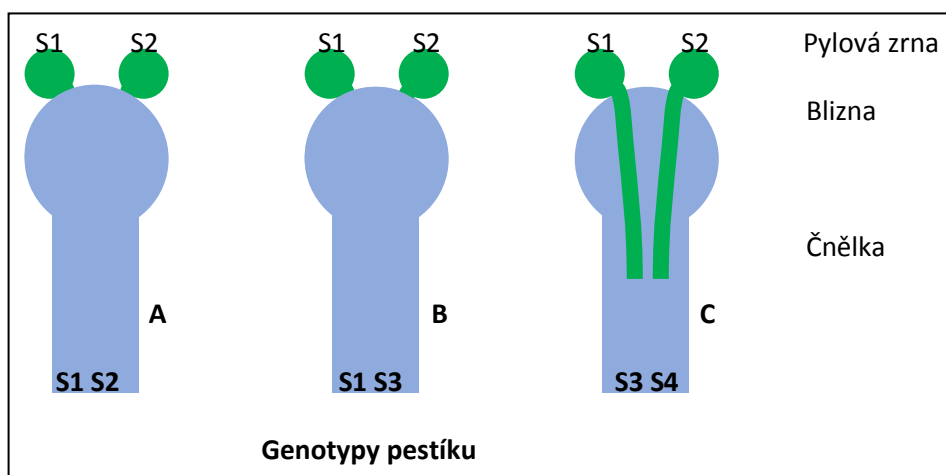
Legenda: S1 – S4: alely S lokusu

Jak je patrné na schématu (Obr. č. 1), dojde k vyklíčení pylového zrna i v případě že není kompatibilní (Obr. č. 1A), při růstu pylové láčky čnělkou však dojde ke kontaktu s RNAsami rostliny kódovanými S-lokusem, které jsou exprimovány v buňkách pletiva čnělky. Tyto RNAsy pronikají do láčky pylového zrna kde, dojde k degradaci pylových RNA molekul, což vede k zastavení růstu pylové láčky. RNAsy produkované rostlinou mají vysoce variabilní úsek určený formou alely S-lokusu, což vede k jejich vysoké specificitě. Kompatibilní pyl (Obr. č. 1B, C) exprimuje SCF protein, který iniciuje degradaci rostlinných Ras v proteasomu, což umožňuje pylové láčce dále růst směrem k vaječné buňce. I v tomto případě však mohou být aktivní postzygotické RIM (McCubbin *et* Kao, 2000).

SSI můžeme v přírodě pozorovat například u čeledi *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Betulaceae*, *Steruliaceae* aj. a nejlépe byl tento mechanismus prozkoumán právě na čeledi *Brassicaceae*. V tomto případě zodpovídá za rozpoznání a odmítnutí vlastního pylu diploidní genotyp sporofytu. I v tomto případě je základem této interakce S lokus (jedná se ve skutečnosti o shluk tří těsně provázaných lokusů a to S-Locus Glycoprotein, SLG, kódující podjednotku receptoru přítomného v buněčné stěně buněk blizny, S-Receptor Kinase, SRK, kódující druhou podjednotku daného receptoru s kinázovou aktivitou, a S-Locus Cystein-Rich protein, SCR, kódující ligand pro stejný receptor exprimovaný

v pylové buňce) který je, jak již bylo zmíněno v souvislosti s GSI, vysoce polymorfní a existuje ve velkém množství alel. Tyto alely se liší díky specifickému hypervariabilnímu regionu S receptoru (lze zde pozorovat analogii s hypervariabilním úsekem na molekule protilátky) (McCubbin *et* Kao, 2000).

Obr. č. 3: Schéma kompatibility pylových zrn a láčky na základě alely S lokusu v případě sporofytické self-incompatibility



Legenda: S1 – S4: alely S lokusu

V tomto případě vyklíčí pylové zrno pouze v případě, má-li odlišnou alelu S lokusu, než je kterákoli z dvojice alel sporofytu. (Obr. č. 2C) Tedy v případě, že má pylové zrno alelu S1, a sporofyt rostliny alely S1S2 (Obr. č. 2A), pylové zrno vůbec nevyklíčí, na rozdíl od inkompability gametofytické, kdy pylové zrno v případě, že jeho alela je shodná s jednou z alel rostliny sice vyklíčí, ale jeho růst je inhibován. Buňky blizny exprimují ve své buněčné stěně v případě, že mají alely S1S2 receptory pro SCR1 a SCR2 a v případě že dojde k aktivaci kteréhokolik z těchto receptorů, spustí podjednotka receptoru s kinázovou aktivitou sérii reakcí vedoucí k inhibici interakce mezi bliznou a pylovým zrnem, které tak nevyklíčí. V případě, že k aktivaci SCR receptorů nedojde, pylové zrno vyklíčí (McCubbin *et* Kao, 2000).

Kromě nejčastěji rozeznávaných GSI a SSI mechanismů PSI (také označovaných jako mechanismy homomorfní self-incompatibility) existuje také Heteromorfní self-incompatibilita. V tomto případě však není self-incompatibilita podmíněná genomovou interakcí, ale květovou polymorfií a má pravděpodobně odlišný evoluční původ než homomorfní PSI. Heteromorfní self-incompatibilitu můžeme pozorovat například u distylických linií, tedy linií majících dva květní morfotypy lišící se délkou čnělky. K oplození dojde pouze v případě, že pyl pochází z květu s jiným morfotypem. Kromě těchto mechanismů PSI, existují také kryptická self-incompatibilita (CSI), late-acting self-incompatibilita (LSI) a jiné, které jsou ale málo rozšířené a nejsou tak detailně prozkoumané jako GSI a SSI (Baack *et al.* 2015).

2. 2. Postzygotické RIM

Studium jak pre, tak postzygotických bariér u rostlin je podstatně složitější než u živočichů, jelikož je potřeba brát v potaz také existenci tzv. ekotypů, tedy populací náležících ke stejnému druhu ale určitým způsobem adaptovaných na specifický habitat. Dalším důležitým aspektem speciace rostlin je polyploidie (Baack *et al.* 2015).

Studium reprodukčních bariér je zatíženo také tím, že u většiny zkoumaných druhů rostlin nejsou popsány či brány v potaz všechny reprodukční bariéry. V současnosti se klade mnohem větší důraz na postzygotické reprodukční bariéry než na bariéry prezygotické, jako je ekogeografická izolace, které ale mohou v mnoha případech (Lowry *et al.* 2008) hrát při reprodukční izolaci dané linie větší roli než prezygotické RIM, jako je tomu například u orchidejí rodu *Chilloglottis*, kdy se adaptace na různé opylovače podílí na izolaci linií až z 80 % a postzygotické izolační bariéry mají výrazně slabší účinek (Whitehead *et Peakall*, 2014). V mnoha případech je při studiu reprodukčních bariér také preferován určitý druh či rod, př. *Mimus*, *Iris*, což způsobuje abundanci dat o těchto liniích ale nedostatek dat v širším kontextu, což ve výsledku vede k opakovaným analýzám dat z relativně malé cílové skupiny. Nelze obecně tvrdit, že prezygotické RIM mají u všech linií silnější účinek, jsou však z evolučního hlediska výhodnější než postzygotické RIM, jelikož jedinec nemusí investovat energii do samotného pohlavního aktu a popřípadě produkce potomků. Z tohoto hlediska jsou tedy prezygotické RIM výhodnější, jelikož eliminují takovéto plýtvání energií. Vznik prezygotických RIM však může být přímo indukován postzygotickými RIM. Vznikne-li mezi určitými liniemi postzygotická reprodukčně izolační bariéra, například vlivem mutace, výskytem nové formy alely a

inkompatibility na úrovni genů (viz. C.1.), vzniká selekční tlak na vytvoření bariér prezygotických, v případě rostlin zejména morfologických či ekogeografických bariér (Baack *et al.* 2015). V případě vzniku těchto bariér získá reprodukčně izolovaná linie výhodu, jelikož se sníží pravděpodobnost křížení s inkompatibilními jedinci, což zvýší celkovou fitness takto reprodukčně izolované linie. Tento jev je vysvětlován *modelem posílení* (Noor, 1999), který lze úspěšně aplikovat zejména na vznik reprodukčních bariér při alopatrické speciaci. V případě, že v populaci již existuje genetická variabilita v preferenci pohlavních partnerů, zejména vlivem sekundárního styku dvou populací, které se po určitou dobu vyvíjely oddělené, ale došlo k jejich opětovnému styku po vymizení této bariéry, může vlivem mechanismu posílení dojít k rychlému vzniku prezygotických RIM a tím komplexních mezidruhových reprodukčních bariér. V případě, že ke vzniku postzygotických RIM došlo mezi populacemi sympatricky, vlivem mutace či chromozomové přestavby, má mechanismus Modelu posílení menší účinek, jelikož v případě sympatrické evoluce se zpravidla postzygotické a prezygotické RIM vyvíjejí simultánně, jelikož v případě kdy v populaci vznikne nová, málo početná forma, je její reprodukční zdatnost od počátku nižší, než zdatnost v populaci majoritní formy, jelikož jedinci méně početné formy mají velkou pravděpodobnost kontaktu s nekompatibilním jedincem při pohlavním rozmnožování, což dále snižuje fitness těchto jedinců (Flegr, 2005). U linií, které se takto odděl od majoritní populace tedy musí dojít k co nejrychlejšímu vzniku prezygotických bariér, aby se snížila pravděpodobnost kontaktu s jedinci nekompatibilními a posílila se tak fitness této linie, pokud by ke vzniku prezygotických bariér nedošlo, mohlo by to vést k úpadku a vymizení této linie. Mezi druhy vzniklými sympatrickou evolucí existují obecně lépe vyvinuté a silnější prezygotické bariéry než mezi druhy vzniklými speciací alopatrickou. Příkladem tohoto jevu mohou být ostrovní populace (Baack *et al.* 2015; Noor, 1999; Whitehead *et al.* 2015).

Za klíčové post-zygotické reprodukčně izolační mechanismy lze považovat letalitu zygot, částečnou či plnou sterilitu hybridů a částečnou či úplnou letalitu hybridů. Při vzniku těchto post-zygotických RIM hraje klíčovou roli inkompatibilita na úrovni genů.

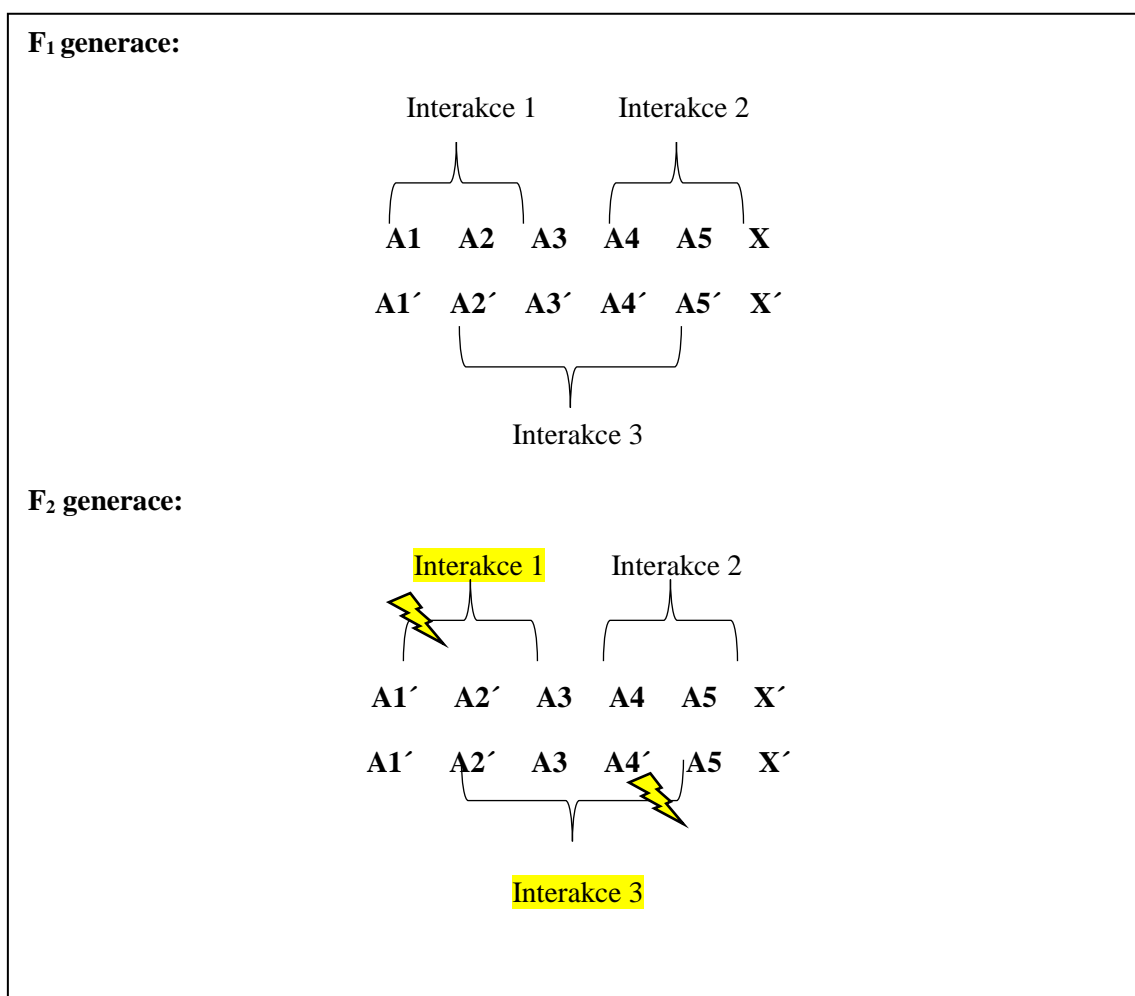
3. Inkompatibilita na úrovni genů

V okamžiku rozdělení genofondu druhu do dvou či více populací, například vlivem geografické izolace může v jednotlivých populacích docházet ke hromadění nových alel v jednotlivých lokusech daných genů v jedné i druhé takto izolované populaci. Tyto alely jsou zpravidla kompatibilní s alelou (alelami) původní ancestrální populace, jinak by jedinci, u kterých došlo k výskytu nové alely, měli snížené fitness a k fixaci těchto nových alely a následně k hromadění nových alel v populaci by nemohlo dojít. Nové formy alel však nemusí být kompatibilní mezi sebou, tj. dceřiné populace vzniklé oddělením od populace původní, ancestrální, nemusí být kompatibilní. Jsou-li populace ve kterých dochází k takovému hromadění nových alel odděleny, kupříkladu geografickou bariérou, po dostatečně dlouhou dobu, může dojít ke vzniku velmi účinných postzygotických reprodukčně izolačních bariér, které mohou účinkovat a dále přispívat k reprodukční izolaci populace i po vymizení původní geografické bariéry (Flegr, 2005).

Obecně lze v případě inkompatibility genů říci, že nejsilněji bývají ovlivněny reprodukční schopnosti hybridů, tj. následkem postzygotických RIM na úrovni genové inkompatibility dochází ke vzniku hybridů a částečnou či úplnou sterilitou. Tento jev je pravděpodobně způsoben skutečností, že geny pro pohlavní rozmnožování, tj. produkci gamet, jsou konstantně pod silným selekčním tlakem a podléhají v rámci evoluce rychlým změnám. Nejsilnějšími katalyzátory těchto změn jsou právě intersexuální kompetice a pohlavní výběr. Sterilita hybridů je v přírodě obecně častější než letalita, neboť geny pro správný růst, vývoj a fyziologickou funkci organismu bývají zpravidla stabilnější a nepodléhají v rámci evoluce tak rychlým změnám (Flegr, 2005).

Účinek genové inkompatibility nemusí být okamžitý, tj. nemusí se projevit u hybridů F1 generace, ale až u generací dalších. Tento jev je způsoben tím, že genom hybridů F1 generace obsahuje kompletní chromozomovou sadu obou rodičovských linií, a kromě nefunkčních hybridních produktů inkompatibilních genů mohou vznikat i plně funkční produkty složené pouze z molekul jedné či druhé ancestrální linie (alely). Pokud se však tyto hybridy kříží dále mezi sebou, popřípadě se některou z ancestrálních linií, projeví se genová inkompatibilita a nastává tzv. hybridní rozpad (Flegr, 2005).

Obr. č. 4: Schématické znázornění mechanismu hybridního rozpadu v F₂ generaci



Legenda: Genotyp hybridu v F₁ generaci obsahuje plné chromosomové sady obou druhů (F₁ generace, označeno A1-A5 a A1'-A5'). Mezi produkty některých chromozomů náležících téže chromosomové sadě může docházet k interakci, tj. například k interakci při tvorbě strukturních či funkčních produktů, molekulárních komplexů apod. V F₁ generaci jsou tedy jedinci stále viabilní, jelikož mají kompletní chromosomové sady tvořící funkční produkty. V F₂ generaci je však již velká pravděpodobnost, že potomek získá určité dvojice chromosomů od jednoho rodičovského druhu a jiné dvojice chromosomů od druhého rodičovského druhu, tj. tyto jedinci nemají kompletní chromosomovou sadu ani jednoho z rodičovských druhů. Chromosomy pocházející od rozdílných rodičovských druhů nemusí být kompatibilní a k některým intrachromozomovým interakcím, které mohly probíhat u jedinců F₁ generace tedy nemůže docházet (narušená interakce vyznačená „bleskem“). Tyto interakce by měly za následek vznik aberantních produktů, popřípadě by ke vzniku daných molekulárních komplexů vůbec nedošlo. Jedinci F₂

generace, u kterých došlo k takovému narušení intrachromosomální interakce bývají letální (Flegr, 2005).

Dalšími možnými následky genové inkompatibility, kromě výše zmíněného hybridního rozpadu jsou také hybridní letalita a letalita zygot, které patří mimo jiné mezi významné post-zygotické bariéry.

3. 1. Letalita hybridů

Letalita hybridů, jakožto následek inkompatibility, může být pozorována jak v případě outbredního, tak v případě inbredního křížení, a to jak u rostlin, tak u živočichů. Jedním z modelů vysvětlujících letalitu hybridů je model autoimunitní reakce, kdy dochází k aktivaci genů asociovaných s reakcí na patogeny. K aktivaci těchto genů může dojít v reakci na vznik aberantních proteinových komplexů. Tato autoimunitní reakce následkem inkompatibility byla pozorována například u *Arabidopsis thaliana* (Bomblies *et al.* 2007), kdy docházelo k interakci alel genu pro rezistenci vůči patogenům NB-LRR. V případě, že při křížení došlo ke styku dvou odlišných alel pro tento lokus, docházelo ke vzniku autoimunitní reakce vlivem exprese genů asociovaných s reakcí na napadení patogenem (Flegr, 2005; Bomblies *et al.* 2007).

4. Jaderně cytoplasmatická inkompatibilita

Jaderně cytoplasmatická inkompatibilita je často následkem inkompatibility na úrovni genů, v tomto případě konfliktu mezi geny kódovanými jaderně a cytoplasmaticky. V průběhu evoluce vznikly mezi jaderným a cytoplasmatickým, tj. mitochondriálním a plastidovým genomem regulační dráhy zajišťující správnou funkci a koexistenci těchto genomů. Tyto regulační dráhy zajišťují správnou funkci plastidů, regulují expresi některých jaderných genů asociovaných s funkcí plastidů apod. (Greiner, 2011). Kompatibilita jaderného a cytoplasmatického genomu je pro správné fungování buňky kritická, může však být narušena v případě introdukce inkompatibilního genomu při hybridizaci. V případě takovéto hybridizace může dojít k narušení regulačních drah a narušení správné jaderně cytoplasmatické interakce. Lze obecně říci, že čím rozdílnější je cytoplasmatický genom, tím větší je šance narušení správné interakce mezi tímto genomem a genomem jaderným. Častými následky jaderně cytoplasmatické inkompatibility jsou

například narušený vývoj rostliny, chlorotická či zcela albinotická asimilační pletiva v případě jaderně-plastidové inkompatibility a samčí cytoplasmatická sterilita (CMS) v případě inkompatibility jaderně-mitochondriální (Greiner, 2011). Jaderně cytoplasmatická inkompatibilita byla mimo jiné pozorována také u somatických hybridů, tj. hybridů vzniklých indukovanou fúzí protoplastů, rostlin z čeledi Solanaceae. V případě somatických hybridů tabáku (*Nicotiana tabacum*) a rulíku (*Atropa* spp.) došlo ke vzniku jaderně-cytoplasmatické inkompatibility podmíněné absencí genu pro editaci plastidově kódované mRNA pro alfa-podjednotku ATPasy v jaderném genomu rulíku, což mělo za následek narušení správné funkce tabákového chloroplastu (Hanson *et* Bentolila, 2004; Bogdanova *et al.* 2015).

4. 1. Samčí cytoplasmatická sterilita

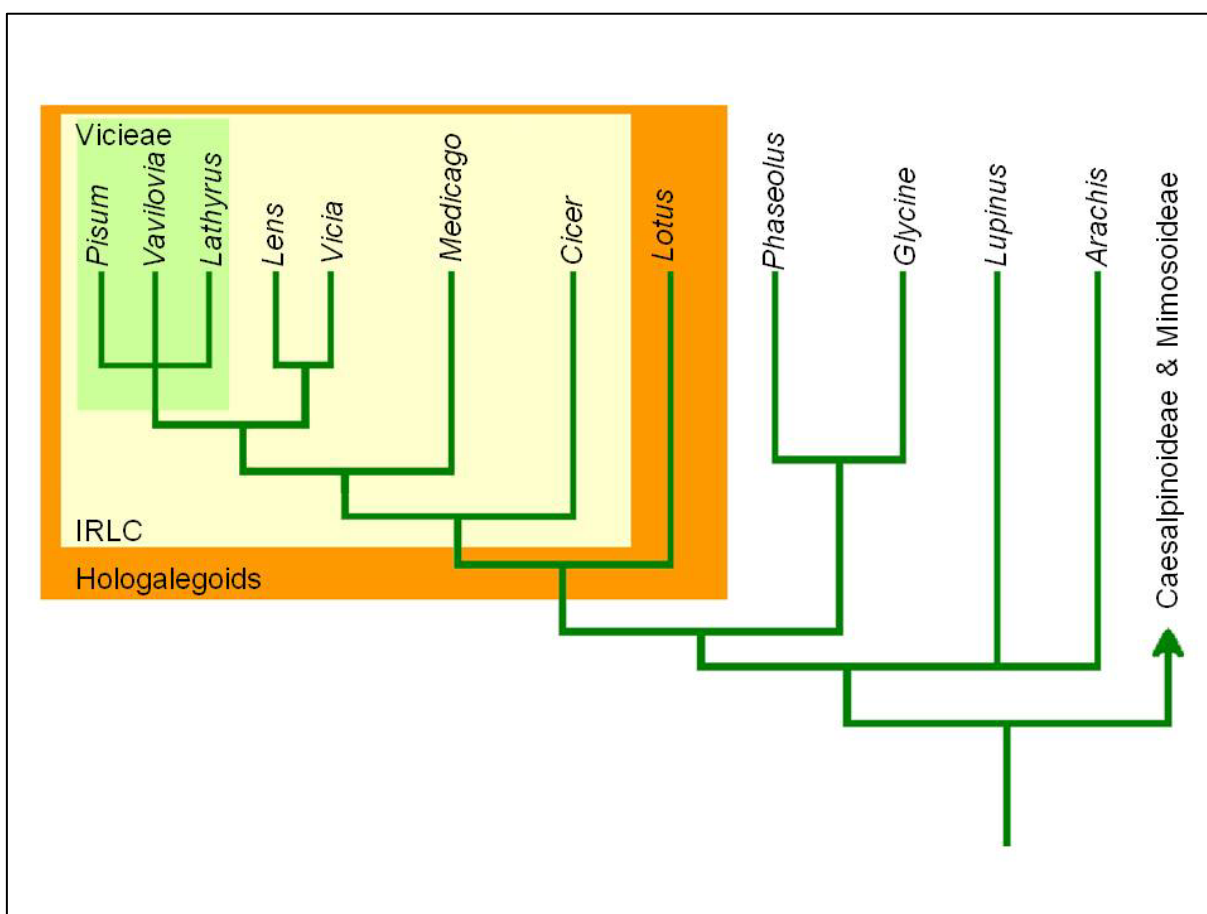
Samčí cytoplasmatická sterilita je jedním z nejlépe prostudovaných projevů jaderně-mitochondriální inkompatibility u rostlin. CMS se často vyskytuje u hybridních rostlin a projevuje se sníženou samčí fertilitou, popřípadě plnou samčí sterilitou. CMS je častější než samičí cytoplasmatická sterilita (CFS), jelikož CMS je maternálně děděná a je často následkem vzniku nefunkčních hybridních komplexů mitochondriálních genů (viz. Inkompatibilita na úrovni genů), nebo genů kódujících aberantní transkripty nesoucí dodatečný čtecí rámec. Rozlišujeme tedy CMS čistě cytoplasmatickou, tedy způsobenou výhradně cytoplasmaticky kódovanými faktory a CMS jaderně cytoplasmatickou, způsobenou narušenou interakcí jaderného a cytoplasmatického genomu. Častým viníkem ve vzniku CMS jsou otevřené čtecí rámce (ORFs, Open Reading Frames), které mohou vznikat mutací nebo přirozenou selekcí, mohou kódovat aberantní, či cytotoxické produkty a například u *Brassicaceae* byly prokázány jako hlavní příčina CMS u hybridů (Donnelly *et al.* 2015). Tento proces byl studován například u rýže, jelikož potlačení vzniku CMS při křížení vybraných linií by mohlo výrazně usnadnit produkci nových viabilních hybridních linií s požadovanými vlastnostmi. U hybridní linie rýže vykazující CMS byl identifikován aberantní mitochondriální gen *apt6* (Iwabuchi *et al.* 1993) který kódoval transkript obsahující dodatečný ORF, označený *orf79*, který kódoval aberantní transmembránový protein, který narušoval správnou funkci buněčné membrány a byl příčinou CMS (Eckardt, 2006; Aalto *et al.* 2013).

4. 2. Jaderně cytoplasmatická inkompatibilita na modelu *Pisum sativum*

4. 2. 1. *Pisum sativum*, jeho evoluce a využití

Hrách setý (*Pisum sativum*) je pro studium evolučních procesů a speciace vhodný hned z několika hledisek. Rod hrachu (*Pisum*) náleží do čeledi bobovitých (*Fabaceae*) a tato čeleď je jednou z nejdůležitějších čeledí zemědělských rostlin a zahrnuje rody jako hrách (*Pisum*), sója (*Glycine*), fazol (*Phaseolus*), čočka (*Lens*) apod. Zejména zástupci kmene *Fabeae*, (dříve *Vicieae*) zahrnujícího 5 rodů, kterými jsou hrách (*Pisum*), hrachor (*Lathyrus*), bob (*Vicia*), čočka (*Lens*) a vavilovie (*Vavilovia*), patří mezi nejstarší zemědělsky využívané plodiny světa a kmen *Fabeae* tedy patří mezi relativně důkladně zkoumané kmene a to jak na úrovni genetické, tak fylogenetické (Smýkal *et al.* 2015).

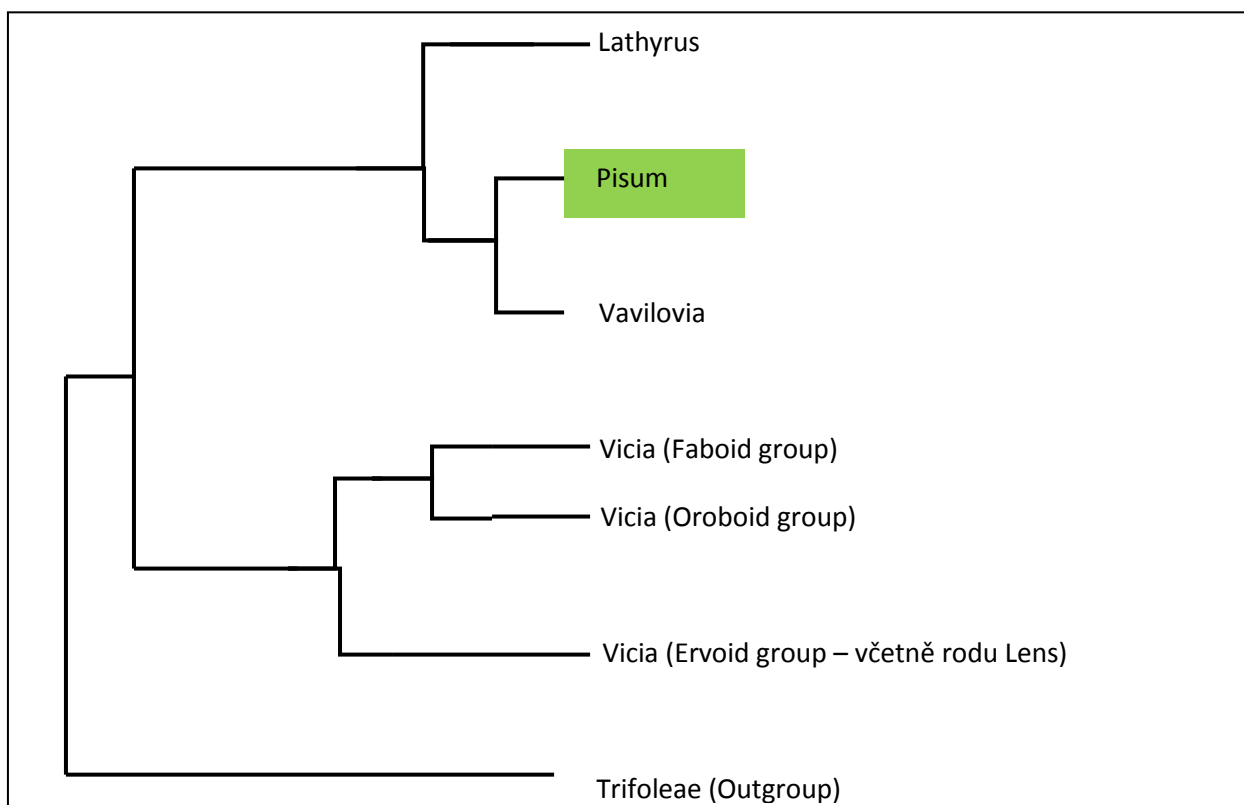
Obr.č.5: Kmen *Fabeae* a rod *Pisum* v rámci *Fabaceae* (převzato z Ellis, 2011)



Legenda: Kmen *Fabeae*, dříve též označovaný *Vicieae*, je v tomto schématu označen zeleně. Tento kmen je součástí skupiny IRLC neboli Inverted-Repeat lacking clade. Tato

monofyletická skupina je charakterizována ztrátou dvou invertovaných repetitivních sekvencí dlouhých 25 kb v plastidovém genomu, které jsou společné pro většinu suchozemských rostlin s výjimkou této skupiny. IRLC skupina zahrnuje kromě rodu *Pisum* a *Lens* také rody *Medicago* a *Cicer*, jejichž zástupci patří mezi významné zemědělské plodiny.

Obr. č. 6: Fylogeneze kmenu *Fabeae*

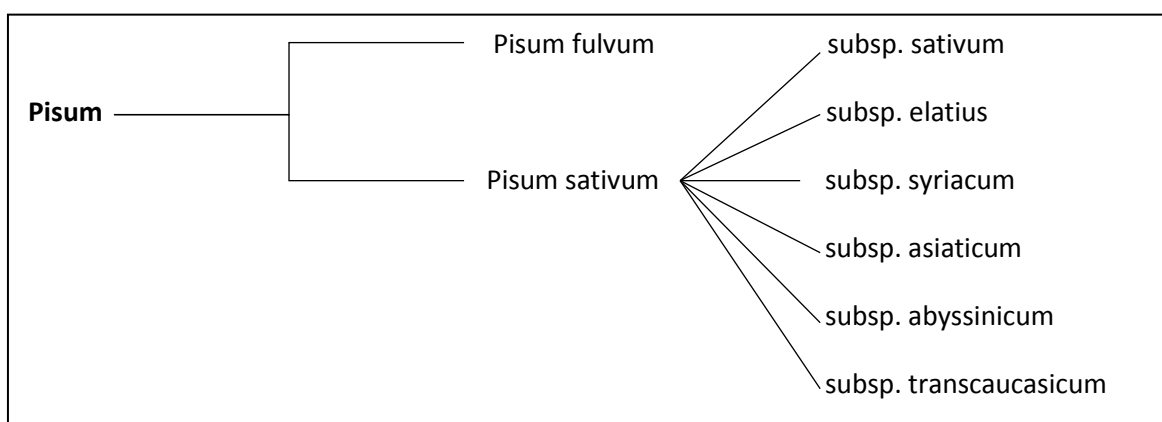


Legenda: Fylogeneze kmene Fabeae, sestavená na základě sekvence chloroplastové a jaderné DNA (Smýkal *et* Kenicer, 2010). Nejbližším příbuzným rodu *Pisum* je rod *Vavilovia*, mající jediného žijícího zástupce, kterým je *Vavilovia formosa*, rostoucí ve vysokohorských oblastech Turecka, Iránu a Libanonu. Dříve byl *Vavilovia formosa* řazena do rodu *Pisum*, jakožto *Pisum formosum*. Dalším blízkým příbuzným je rod *Lathyrus*, zatímco rody *Vicia* a *Lens* tvoří společnou vývojovou větev.

Hrách, respektive Hrách setý (*Pisum sativum* L.) je jednou z nejstarších zemědělsky využívaných plodin světa a je (spolu se sójou a čočkou) jednou z nejčastěji pěstovaných luštěnin na světě, jelikož jeho plody mají vysoký obsah bílkovin a slouží jako důležitý zdroj potravy jak pro lidi, tak pro dobytek. K domestikaci hrachu a k počátku jeho pěstování došlo zřejmě již před 10 000 lety (Ambrose, 1995) na území tzv. Úrodného

půlměsíce, což je oblast zahrnující dnešní Irán, Irák, Libanon a Sýrii, a jedna z prvních lokalit kde, dle archeologických nálezů, během neolitické revoluce došlo ke vzniku zemědělství a k prvnímu využívání zemědělských rostlin. Současná genetika a molekulární biologie stojí právě na základech vybudovaných na zkoumání hrachu, a to již od dob Mendela (1866), jelikož však má hrách relativně velký genom, byl v genetických studiích během dvacátého a jednadvacátého století nahrazen jinými modelovými rostlinami s malými, lépe zkoumatelnými genomy, zejména pak *Arabidopsis*, stále však zůstává důležitou modelovou rostlinou (Smýkal, 2014; Smýkal *et al.* 2016).

Obr. č. 7: Fylogeneze rodu *Pisum* (dle Makasheva, 1979)



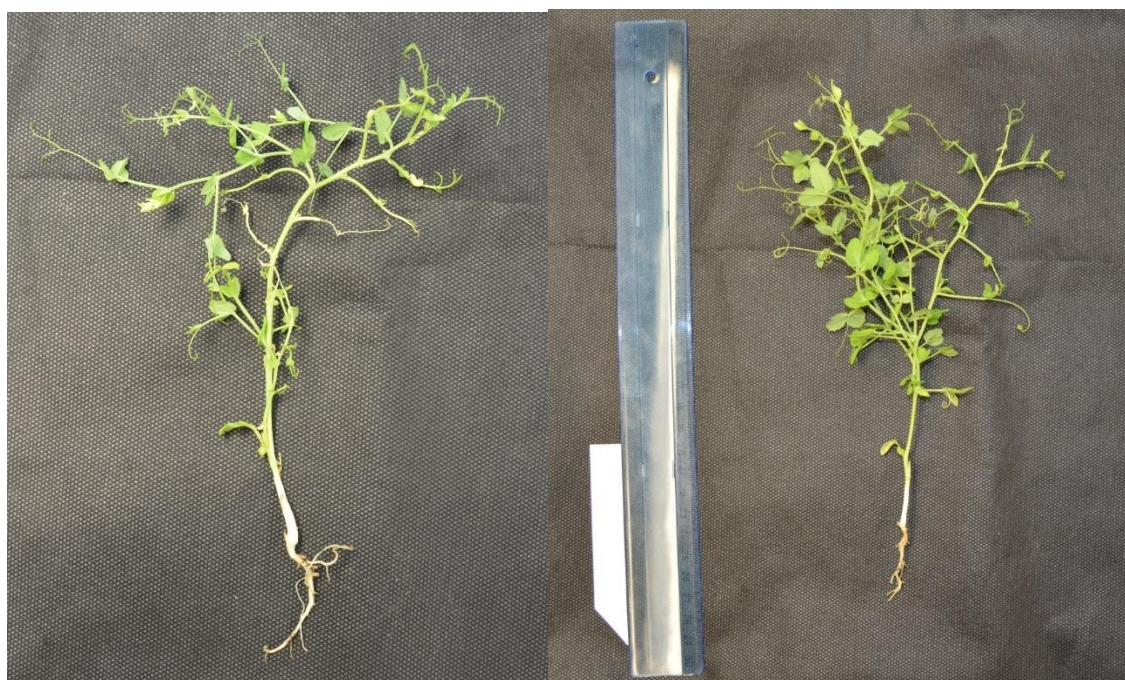
Legenda: Toto rozdělení rodu *Pisum* je stále diskutované, neboť některé studie (Knox *et* Ellis 2001) uvádějí kupříkladu *Pisum sativum subsp. abyssinicum* jakožto samostatný druh, *P. abyssinicum*, na základě mikrosatelitového polymorfismu.

4. 2. 2. Studium jaderně-cytoplasmatické inkompatibility

Na modelu *Pisum sativum* byla jaderně-cytoplasmatická inkompatibility popsána například v případě interakce jaderných genů *Scs1* a *Scs2* s plastomem (Bogdanova *et al.* 2015). Geny *Scs1* a *Scs2* (Supressor of Choline Sensitivity 1, 2), respektive jejich produkty, se podílejí na metabolismu fosfolipidů v buňce a podílejí se na tvorbě buněčných membrán (Hosaka, 1994). Hybridní rostliny vzniklé křížením kulturních rostlin s planou formou (VIR320) jakožto donorem cytoplasmy vykazovaly heterozygotní rostliny, tj. rostliny heterozygotní jak pro lokus *Scs1*, tak *Scs2*, výrazně nižší fitness než rostliny homozygotní. Heterozygotní rostliny měly malý vzrůst, mozaikovou chlorofylovou deficienci, drobné, špatně vyvinuté listy, slabé a špatně vyvinuté kořeny a nízkou fertilitu.

V případě, že byly rostliny heterozygotní jen pro jeden z těchto lokusů, tj. *Scs1* nebo *Scs2*, měly tyto rostliny pouze částečně oslabenou produkci chlorofylu a vykazovaly normální produkci semen, kdežto pyl produkovaný těmito rostlinami byl a až ze 70 % sterilní, což bylo způsobeno samčí cytoplasmatickou sterilitou (CMS) která je jedním z nejčastějších důsledků konfliktu jaderného a cytoplasmatického genomu (Hanson, 1991). Rostliny heterozygotní pro *Scs1* vykazovaly slabší produkci chlorofylu a světlejší zbarvení než rostliny heterozygotní pro *Scs2*, gen *Scs1* se tedy na inkompatibilitě podílel silněji než gen *Scs2*.

Obr. č. 8: Ukázky hybridních rostlin (F₂ generace *P. sativum* subsp. *elatius* L100 x *P. sativum* cv. Cameor), u nichž se projevila inkompatibilita (zdroj: Ing. L. Zablatzká)



Legenda: Na fotografiích jsou patrné rostliny vzniklé křížením inkompatibilních linií. Rostliny mají malý vzrůst, malé, chlorotické listy, stonky jsou tenké a křehké, kořenová soustava slabě vyvinutá.

Jako geny vhodné pro studium jaderně cytoplasmatické inkompatibility u hrachu se jeví také chloroplastově kódovaný gen *accD*, tj. gen kódující Acetyl Co-A karboxyláza beta-podjednotku a jaderně kódovaný gen *Bccp3*, tj. gen kódující Biotin-karboxyl carrier protein pro acetyl Co-A karboxylázu, a který je na stejném úseku chromosomu jako gen *Scs1*. Produkt genu *accD*, beta-podjednotka Acetyl Co-A karboxylázy tvoří heteromerní

funkční komplex s alfa-podjednotkou Acetyl Co-A karboxylázy, Biotin-karboxyl carrier proteinem a Biotin-karboxylázou. Tento heteromerní plastidový komplex tvoří Acetyl Co-A karboxylázu (Bogdanova *et al.* 2015).

Acetyl Co-A karboxyláza (Dále v textu ACC) je biotin-dependentní enzym katalyzující ireverzibilní karboxylaci acetyl Co-A na malonyl Co-A a je nezbytnou součástí metabolismu mastných kyselin, kde se podílí zejména na jeho regulaci. Pro zkoumání jaderně-cytoplasmatické inkompatibility se jako vhodné jeví právě strukturní geny kódující proteiny tvořící komplexy jako ACC, tj. komplexy tvořené jaderně a chloroplastově kódovanou podjednotkou, jelikož změna struktury proteinu vlivem mutace kódujícího genu, například vlivem inserce, delece, nebo jedno-nukleotidového polymorfismu (Dále v textu SNP, tj. Single Nucleotide Polymorphism) při kterém dojde ke změně aminokyselinového kodonu a tím k aminokyselinové substituci (Bogdanova *et al.* 2015), což může narušit interakci mezi proteinovými podjednotkami komplexu a může docházet ke vzniku zcela či částečně nefunkčního produktu.

5. Materiál a Metody:

5. 1. Rostlinný materiál:

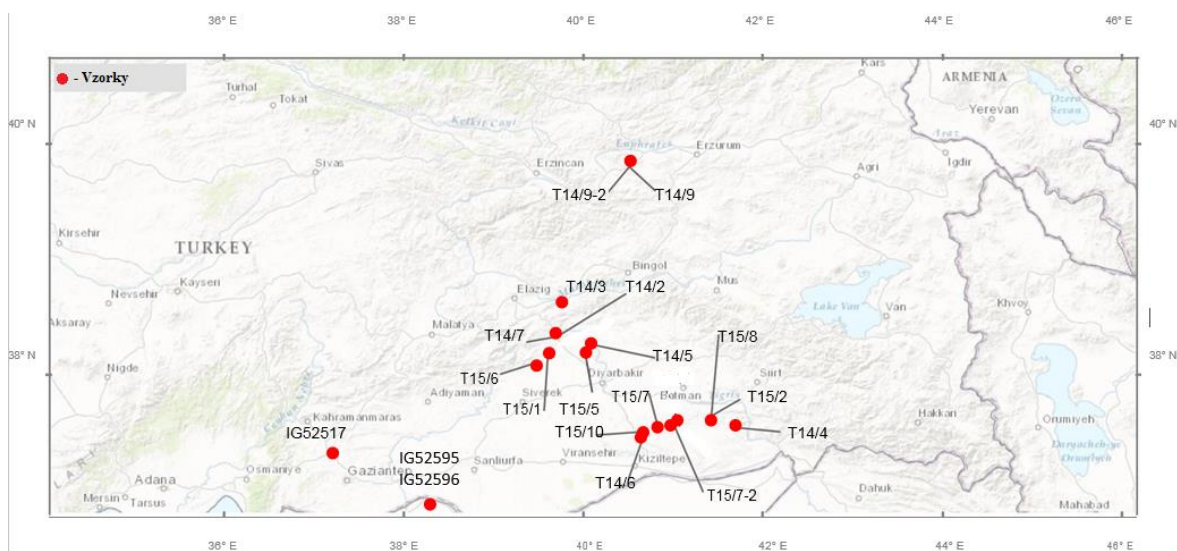
V rámci bakalářské práce proběhla analýza 19 vybraných linií planého hrachu (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) pro určení konkrétní formy alely genu chloroplastově kódovaného genu *accD*, tj genu pro Acetyl Co-A karboxyláza beta-podjednotku, a jaderně kódovaného genu *Bccp3*, tj genu kódujícího Biotin-karboxyl carrier protein pro acetyl Co-A karboxylázu. Rostlinný materiál pro analýzu DNA byl odebrán *in-situ* (viz. geografická lokace a odběr vzorků) a zamrazen pro analýzu v laboratoři. Rostlinný materiál pro izolaci a analýzu RNA pochází z rostlin pěstovaných ve sklenicích katedry botaniky Univerzity Palackého v Olomouci. Rostliny byly pěstovány po 3-4 v nádobách o objemu 3 l na substrátu PROFI (Florcom, ČR) v průběhu roku 2015-2016.

5. 2. Odběr vzorků:

Z rostlin, z nichž byly vzorky odebírány *in-situ*, byly pro analýzu odebrány mladé listy o hmotnosti cca 0,5 g, z rostlin vypěstovaných ve sklenicích byly odebrány pro účely analýzy a izolace RNA/DNA mladé listy o hmotnosti cca 0,3-0,5 g.

Rostlinný materiál: sběry Turecko (prof. C. Toker, Akdeniz Univerzity, Antalya, Turecko) – vypěstované rostliny, zdroj P. Smýkal, katedra botaniky, Př UPOL. IG52517, 52595, IG52596 (ICARDA genová banka).

Obr. č. 9: Lokalizace vzorků odebraných *in-situ*



Legenda: Vzorky byly odebrány v jihovýchodním Turecku, místa odběru označeny červeně. GPS souřadnice odběru uvedeny v Tab. č. 1.

Tab.č.1: Rostlinný materiál

1	Vzorek	Původ vzorku	GPS lokalizace
1	T15/1	Turecko	38°00'96.0298 N, 39°29'62.1799 E
2	T15/2	Turecko	38°00'96.1203 N, 39°29'61.2696 E
3	T15/5	Turecko	37°61'65.17 N, 37°07'96.67 E
4	T15/6	Turecko	37°63'87.4299 N, 37°64'69.397 E
5	T15/7-1	Turecko	37°83'91.4583 N, 38°31'78.9901 E
6	T14/5	Turecko	37°55'56.2703 N, 42°42'56.0404 E
7	T15/7-2	Turecko	37°83'91.4583 N, 38°31'78.9901 E
8	T14/3	Turecko	37°56'46.8301 N, 43°52'92.1303 E
9	T14/4	Turecko	37°56'47.6699 N, 43°52'92.2401 E
10	T14/2	Turecko	37°26'66.7 N, 44°65'E
11	T14/6	Turecko	37°53'48.5 N, 40°89'56 E
12	T14/7 *	Turecko	38°35'N, 43°03'33.3 E
13	IG52517	Turecko	36°25'N, 35°66'66.7 E
14	IG52595	Alžírsko	36°35'N, 37°44'14.13 E
15	IG52596	Alžírsko	36°35'N, 37°44'14.13 E
16	T14/9	Turecko	39°77'25.8889 N, 40°33'98.3889 E
17	T14/9-1	Turecko	39°77'25.8889 N, 40°33'98.3889 E
18	T15/10	Turecko	37°92'82.0699 N, 39°00'89.0697 E
19	T15/8	Turecko	37°91'47.5898 N, 38°98'06.3104 E
20	VIR320	NCBI accession number: LK056919	
21	L100	NCBI accession number: LK056920	
22	721	NCBI accession number: LK056921	
23	WL1238	NCBI accession number: LK056923	
24	VIR2759	NCBI accession number: LK056922	
25	J11794	NCBI accession number: LK056924	

Legenda: Vzorky VIR320, L100, 721, WL1238, VIR2759 a JI1794 byly použity jakožto referenční sekvence pro analýzu *Bccp3* genu, původ reference: Bogdanova, Kosterin 2015.

* Vzorek T14/7 byl zařazen pouze pro analýzu *Bccp3* genu.

5. 3. Laboratorní vybavení:

Homogenizace vzorků: Homogenizátor FastPrep-24 (MP Biolmedicals), homogenizační keramické kuličky (Ceramic Sphere 1/4“, zirkonium oxide, Life Science, MP Bio), homogenizační zkumavky (1,5 ml)

Příprava vzorků: Stolní centrifuga MCF 2360, centrifuga Eppendorf 5415

Analýza: spektrofotometr (NanoDrop 200 Spectrophotometer, Thermo Scientific), elektroforetická komůrka (Widi Mini Sub; Bio Rad, V= 60 ml), V= 80 ml a V= 250 ml), zdroje stejnosměrného napětí (Power Basic; Bio-Rad), UV transiluminátor (FireReader; Uvitec Cambridge)

PCR: Termocyklér (MJ Research)

Uchování vzorků: Mrazicí box Sanyo-Ultra Low -86 °C

Chemikálie a roztoky: Komerční kit pro izolaci RNA NucleoSpin RNA (Macherey – Nagel, Německo), komerční kit pro izolaci DNA INVITEK (Thermo Fisher Scientific), deionizovaná voda, voda ošetřená DEPC (diethyl pyrokarbonát), Tris/borate/EDTA pufr, agarosa (SERVO), MyTaq RED 5x pufr, Taq polymeráza (5U/μl), barvivo GelRed™ (Biotium, USA), Barvivo EurEX (PROMEGA, USA), standard molekulové hmotnosti GeneRuler™ (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder – 0,5 μg/μl, Thermo Scientific USA), dNTP (10 nM, KAPA BIOSYSTEMS), primery (5 μM, Generi Biotech, ČR)

5. 4. Izolace RNA:

Pro izolaci RNA byl použit komerční kit NucleoSPin RNA (Macherey – Nagel, Německo)

Pro izolaci bylo odebráno 100 mg (+/- 10%) rostlinného pletiva (z mladých listů).

Postup izolace RNA na komerčním kitu NucleoSPin RNA:

1. Připravit zásobní roztok: Pro 1 vzorek= 10 μ l rDNase + 90 μ l pufru pro rDNase
2. Odebrané rostlinné pletivo (100 mg) vložit do homogenizační zkumavky, přidat +350 μ l Buffer R A1, přidat 3,5 μ l β – mercaptoethanol, zkumavku co nejtěsněji uzavřít.
3. Homogenizovat po dobu 1 min, maximum otáček.
4. Homogenát přelít do kolony na fialový filtr (prefiltr).
5. Kolonu uzavřít víčkem, vložit do centrifugy a centrifugovat po dobu 1 min, 11 000 x g.
6. Vyjmout fialový filtr z kolony, přidat do kolony 350 μ l 70% ethanolu, lehce vortexovat.
7. Přelít roztok do nové kolony na modrý filtr (RNA vazebný filtr).
8. Kolonu uzavřít, vložit do centrifugy, centrifugovat po dobu 30 s, 11 000 x g.
9. Vylít obsah kolony, filtr vrátit do kolony a napipetovat 350 μ l MDB roztoku.
10. Kolonu uzavřít, vložit do centrifugy, centrifugovat po dobu 30 s, 11 000 x g.
11. Vylít obsah kolony, filtr vrátit do kolony, napipetovat 96 μ l připraveného mixu – inkubace 15 min v laboratorní teplotě.
12. Přidat 200 μ l roztoku RAW 2.
13. Kolonu uzavřít, vložit do centrifugy, centrifugovat po dobu 30 s, 11 000 x g.
14. Vylít obsah kolony, filtr vrátit zpět, napipetovat 600 μ l RA 3.
15. Kolonu uzavřít, vložit do centrifugy, centrifugovat po dobu 30 s, 11 000 x g.
16. Vylít obsah kolony, filtr vrátit zpět, napipetovat 250 μ l RA 3.
17. Kolonu uzavřít, vložit do centrifugy, centrifugovat po dobu 2 min, 11 000 x g.
18. Vylít obsah kolony, filtr vrátit zpět, kolonu uzavřít a vložit do centrifugy. Centrifugovat po dobu 2 min, 12 000 rpm.
19. Eluce RNA – přesunout modrý filtr do sterilní 1,5ml zkumavky, přidat 60 μ l RNase- free H₂O.
20. Zkumavku uzavřít, vložit do centrifugy, centrifugovat po dobu 1 min, 11 000 x g.
21. Vyjmout filtr, zkumavku uzavřít, vzorek uchovávat při -80°C.

5. 5. Měření koncentrace RNA:

Koncentrace vyizolované RNA byla měřena na spektrofotometru NanoDrop.

Postup:

1. Odklopit víko spektrofotometru, kolonku pro vzorek očistit ethanolem.
2. Na kolonku nakápnou 1 μ l deionizované H₂O, proměřit absorbanci.
3. Odklopit víko spektrofotometru, kolonku očistit buničitou vatou a ethanolem.
4. Odebrat 1 μ l vzorku, vzorek nakápnout na kolonku, uzavřít víko spektrofotometru, proměřit absorbanci vzorku.
5. Odklopit víko spektrofotometru, kolonku očistit buničitou vatou a ethanolem.

5. 6. Přepis RNA do cDNA:

5. 6. 1. Odstranění zbytkové DNA

Před provedením reverzní transkripce vyizolované RNA do cDNA je potřeba degradovat balastní DNA, která může být ve vzorku obsažena a která by v dalších krocích mohla poskytovat nespecifickou reakci, popřípadě inhibovat průběh reakce.

Postup:

1. Napipetovat 65 μ l vzorku (roztoku vyizolované RNA) do PCR mikrozkušavek (V= 200 μ l) přidat 7,6 μ l reakčního pufru a 3,8 μ l rDNase.
2. Inkubovat 20 min při 37 °C.
3. Do zkumavky napipetovat 7,6 μ l STOP roztoku, inkubovat 10 min při 65 °C.

5. 6. 2. Reverzní transkripce (RT- PCR)

Před provedením samotné reverzní transkripce z RNA do cDNA bylo potřeba naředit vzorky tak aby do reakce vstupovalo odpovídající množství RNA. Ředění probíhalo na základě koncentrace RNA ve vzorku naměřené pomocí spektrofotometru NanoDrop. Po naředění vzorků probíhala jejich inkubace s oligo DT primery a následně samotná RT-PCR. Po provedení RT-PCR byly vzorky naředěny v poměru 1:1 vodou ošetřenou DEPC. Přípravu roztoků a práci se vzorky je třeba provádět ve sterilním flow-boxu, aby nedošlo k degradaci vzorku RNasami z prostředí.

Postup:

A) Inkubace vzorků s oligo DT primerem:

1. Do PCR mikrozkušavek ($V = 200 \mu\text{l}$) napipetovat $9 \mu\text{l}$ deionizované vody, $5 \mu\text{l}$ naředěného vzorku a $1 \mu\text{l}$ oligo DT primeru.
2. Zkušavku uzavřít, inkubovat v termocykléru předehřátém na 70°C po dobu 5 min.
3. Po ukončení inkubace vzorek umístit do ledové lázně.

B) Reverzní transkripce

1. Připravit reakční směs: pro 1 vzorek = $12,5 \mu\text{l}$ vody ošetřené DEPC, $8 \mu\text{l}$ pufru, $2,5 \mu\text{l}$ DNTP, $1 \mu\text{l}$ inhibitoru ribonukleáz, $1 \mu\text{l}$ AMV reverzní transkriptázy.
2. Přidat $25 \mu\text{l}$ reakční směsi ke vzorku z kroku A.3.
3. Vzorky vložit do termocykléru předehřátého na teplotu 42°C po dobu 60 min.

5. 7. Izolace genomové DNA:

Genomová DNA byla izolována z odebraného rostlinného materiálu pomocí komerčního kolonkového kitu INVITEK.

Postup:

1. Odebraný rostlinný materiál (cca 100 mg listu) zhomogenizovat a vložit do $1,5 \text{ ml}$ mikrozkušavky.
2. Přidat $400 \mu\text{l}$ lyzačního pufru P a $20 \mu\text{l}$ Proteinase K, krátce vortexovat.
3. Vzorek inkubovat po dobu 30 min při 65°C .
4. Centrifugovat při $14\,000 \text{ rpm}$ po dobu 15 min.
5. Odebrat supernatant do nové $1,5 \text{ ml}$ mikrozkušavky.
6. Přidat $10 \mu\text{l}$ RNase A roztoku, inkubovat při pokojové teplotě po dobu 15 min.
7. Přidat $200 \mu\text{l}$ Binding buffer P, krátce vortexovat.
8. Roztok napipetovat na kolonku, nechat inkubovat cca 2 min.
9. Kolonku uzavřít, centrifugovat při $12\,000 \text{ rpm}$ po dobu 1 min.
10. Vylít co proteče kolonkou, kolonku vrátit zpět, napipetovat $550 \mu\text{l}$ Wash Buffer I.
11. Kolonku uzavřít, centrifugovat při $12\,000 \text{ rpm}$ po dobu 1 min.
12. Vylít co proteče kolonkou, kolonku vrátit zpět, napipetovat $550 \mu\text{l}$ Wash Buffer II.

13. Kolonku uzavřít, centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min.
14. Vylít co proteče kolonkou, kolonku vrátit zpět, centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 2 min, poté přesunout kolonku do nové mikrozkuhavky.
15. Eluce DNA – Napipetovat do kolonky 2x po sobě 150 µl roztoku Elution Buffer D předeřátého na 65 °C, inkubovat po dobu 3 min.
16. Centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min.

5. 8. PCR amplifikace:

Pro amplifikaci zkoumaných genů byla využita polymerázová řetězová reakce (PCR). Pro PCR reakci byly použity různé kombinace specifických primerů (Tab. č. 7) kvůli vysoké variabilitě zkoumaného genu. Pro amplifikaci byla použita Taq polymeráza.

Postup:

Připravit reakční směs dle následujícího schématu:

Tab. č. 2: Příprava reakční směsi pro PCR reakci

	Koncentrace	Objem (µl) pro 1 reakci	Výsledný objem
Reakční pufr	10x	4	18 µl
Primer Forward	10 µmol/l	0,5	
Primer Reverse	10 µmol/l	0,5	
dNTps	20 µmol/l	0,9	
Deionizovaná voda	/	13	
Taq DNA Polymeráza	5 U/µl	0,1	

Tab. č. 3: Nastavení programu termocykléru

Fáze	Teplota (°C)	Počet cyklů	Doba trvání (min)
Denaturace	95	1	4
Syntéza	95	35	0,5
	55		0,5
	72		1,5
Dosyntetizování	72	1	8
Udržování	15	1	-

5. 9. Gelová elektroforéza:

Po provedení PCR amplifikace bylo třeba ověřit, jestli došlo k amplifikaci požadované sekvence, tedy ke vzniku požadovaných produktů. Produkty PCR reakce byly separovány v 1,5 – 2% agarosovém gelu, pro vizualizaci PCR produktů bylo využito barvivo EurEX (Promega), barvivo GelRedTM (Biotium, USA) a UV transiluminátor. Elektroforéza byla v závislosti na množství vzorků prováděna v objemech agarosového gelu 60, 80 a 250 ml.

Příprava elektroforézy pro objem gelu 250ml:

Postup:

1. Navážit 3,75 g agarosy, přidat 250 ml TBE pufu, rozvařit v mikrovlnné troubě.
2. Gel nechat chladnout na magnetické míchačce, po zchladnutí na cca 50 °C přidat cca 5 µl barviva a gel přelít do elektroforetické komůrky.
3. Vložit hřebínky a nechat gel tuhnout po dobu nejméně 30 min.
4. Gel vložit do elektroforetické komůrky naplněné TBE pufrem, vyjmout hřebínky.
5. Do první jamky každé řady napipetovat cca 3 µl standardu molekulové hmotnosti.
6. Do dalších jamek nanášet 4-8 µl vzorku.
7. Připojit Elektroforetickou komoru ke zdroji elektrického napětí, nastavit na 120 V po dobu 45 min.

- Po ukončení separace odpojit zdroj stejnosměrného napětí, vyjmout gel z elektroforetické komůrky, výsledek vyhodnotit pomocí UV transiluminátoru a zaznamenat.

5. 10. Sekvencování:

Vzorky, které byly úspěšně amplifikovány byly následně sekvencovány po ošetření Exo-Sap IT fosfatázou pro degradaci primerů a dNTP po PCR amplifikaci. https://www.fimm.fi/sites/default/files/SeqLab_Exosap_USB.pdf

A) Exo-Sap IT PCR CLEAN-UP

Postup:

- K 5 μ l vzorku přidat 2 μ l roztoku Exo-Sap IT.
- Reakční směs inkubovat po dobu 15 min při 37°C.
- Inhibovat Exo-Sap IT zahřátím reakční směsi na 80 °C po dobu 15 min.

B) Sekvencování

Postup:

Do jamek bylo napipetováno vždy 5 μ l PCR produktů s 5 μ l sekvenačního primeru (5 pmol/ μ l). Vzorky byly odesílány na sekvenační analýzu pomocí BigDye Terminator kit (Thermo Fisher Scientific) do Laboratoře sekvenace DNA, PřF UK Praha nebo Macrogen, Amsterdam, Nizozemí.

5. 11. Bioinformatická analýza:

Sekvence nukleotidů byly analyzovány pomocí softwaru pro editaci a DNA – alignment Genious a MEGA6. Cílem bioinformatické analýzy bylo zaznamenat jedno nukleotidový polymorfismus v sekvencích nukleotidů, sestavit translatované sekvence aminokyselin a na základě těchto sekvencí sestavit haplotypy pro *accD* a *Bccp3* lokusy a sestavit fylogenetickou analýzu.

6. Výsledky:

6. 1. Izolace DNA a RNA a RT-PCT

Prvním krokem praktické části této bakalářské práce byla izolace RNA z pletiv vybraných linií hrachu pomocí komerčního kitu NucleoSPin RNA. Po odebrání pletiv a provedení samotné izolace byl měřen obsah RNA pomocí spektrofotometru NanoDrop. Stanovení koncentrace RNA bylo důležité pro určení vhodného ředícího poměru pro každý vzorek před dalším krokem, tj. před provedením reverzní transkripce, přestože jsme neprováděli kvantitativní měření. Koncentrace RNA ve vzorcích zjištěné pomocí spektrofotometru NanoDrop uvedeny v Tab. č. 4. Koncentrace RNA se u různých vzorků výrazně lišily, a pohybovaly se v rozmezí 5,5 – 180,6 µg/ml, což bylo s největší pravděpodobností způsobeno rozdílným stářím listů a také množstvím výchozího rostlinného materiálu. U některých vzorků byla koncentrace velmi nízká (viz Tab. č. 4, Vzorek č. 9), tyto vzorky nebyly pro účely RT-PCR dále ředěny. Nízká koncentrace RNA ve vzorku mohla být způsobena špatnou kvalitou odebraného pletiva, popřípadě kontaminací RNAsami z prostředí.

Tab. č. 4: Koncentrace RNA ve vzorcích po izolaci

	Vzorek	Koncentrace RNA (µg/ml)	A (260)/A (280)
1	T15/1	72,0	2,16
2	T15/2	22,1	2,15
3	T15/5	6,8	2,31
4	T15/6	43,3	2,18
5	T15/7	12	2,25
6	T14/5	9,2	2,25
7	T17/2	32	2,21
8	T14/3	180,6	2,19
9	T14/4	5,5	2,45
10	T14/2	8,6	2,24

11	T14/6	53,3	2,15
12	T14/7	53,4	2,20

Po izolaci a stanovení koncentrace RNA, byly vzorky pomocí RT-PCR transkribovány na cDNA, pomocí protokolu RT-PCR PROMEGA. Získaná cDNA byla dále spolu s DNA izolovanou přímo ze vzorků zamrazeného rostlinného pletiva odebraného *in-situ* analyzována pomocí PCR amplifikace a elektroforézy v agarosovém gelu.

Tab.č.5: Příprava reakčních směsí pro RT-PCR

	Vzorek	Deionizovaná voda (μl)	Oligo dt. (μl)	RNA templát	Výsledný objem
1	T15/1	7	1	7	15 μl
2	T15/2	1,5	1	12,5	
3	T15/5	0	1	14	
4	T15/6	4	1	10	
5	T15/7	0	1	14	
6	T14/5	0	1	14	
7	T17/2	0	1	14	
8	T14/3	12	1	2	
9	T14/4	0	1	14	
10	T14/2	0	1	14	
11	T14/6	4	1	10	
12	T14/7	0	1	14	

Vzorky s koncentrací RNA nižší než 30 μg/ml nebyly pro účely RT-PCR dále ředěny, pouze vzorky s vyšší koncentrací byly ředěny deionizovanou vodou ošetřenou proti RNAsám. Příliš vysoká koncentrace RNA by mohla reakci inhibovat, popřípadě může docházet ke vzniku nespecifických produktů.

DNA byla izolována z pletiva rostlin odebraných *in-situ* pomocí komerčního kitu INVITEK. Vyizolovaná DNA byla dále použita spolu s cDNA získanou pomocí RT-PCR z RNA vyizolované z rostlin vypěstovaných. Čistota vyizolované DNA i RNA byla měřena na základě absorbance při 230, 260 a 280 nm. Poměr absorbancí při 260 a 280 nm pro čistou NK by se měl pohybovat v rozmezí 1,7 – 2,0, hodnoty nižší než 1,7 indikují kontaminaci balastními látkami, kupříkladu proteiny, polyfenoly či polysacharidy, hodnoty vyšší než 2,0 indikují přítomnost volných nukleotidů či hybridních molekul NK, neindikují však přímo kontaminaci. Hodnota poměru absorbancí při 260 a 230 nm. by se měla u čistých NK pohybovat v rozmezí 2,0 – 2,2, hodnoty nižší než 2,0 indikují kontaminaci sacharidy ze vzorku, popřípadě kontaminaci guanidiny z izolačních kolonek. V tomto případě je hodnota 260/230 u vzorků velmi nízká, v optimálním rozmezí hodnot 2,0 – 2,2 se pohybuje pouze u vzorků č. 13 a 14 (vzorky 52517 a 52595), vzorky byly tedy zřejmě silně kontaminovány balastními sacharidy.

Tab. č. 6: Vzorky použité v izolaci DNA

	Vzorek		Vzorek
1	IG52517	5	T14/10
2	IG52595	6	T15/10
3	IG52596	7	T15/8
4	T14/9		

6. 2. PCR amplifikace a analýza pomocí elektroforézy na agarosovém gelu:

Vzorky vyizolované DNA a cDNA, získané pomocí reverzní transkripce z vyizolované RNA, byly analyzovány pomocí PCR reakce se specifickými primery a následně separovány pomocí elektroforézy v agarosovém gelu. Vzhledem k vysoké variabilitě cílových úseků DNA, zejména v případě genu *Bccp3*, bylo nutné použít relativně velké množství různých specifických primerů a jejich kombinací, aby došlo k efektivní amplifikaci cílových genů. Gen *Bccp3* se jevil, oproti genu *accD*, jehož amplifikace byla u všech vzorků relativně snadná, jako výrazně variabilnější a jeho amplifikace vyžadovala využití v některých případech i opakované (2 stupňové) PCR reakce, aby došlo k dostatečné detekovatelné amplifikaci. Po PCR amplifikaci byly vzorky

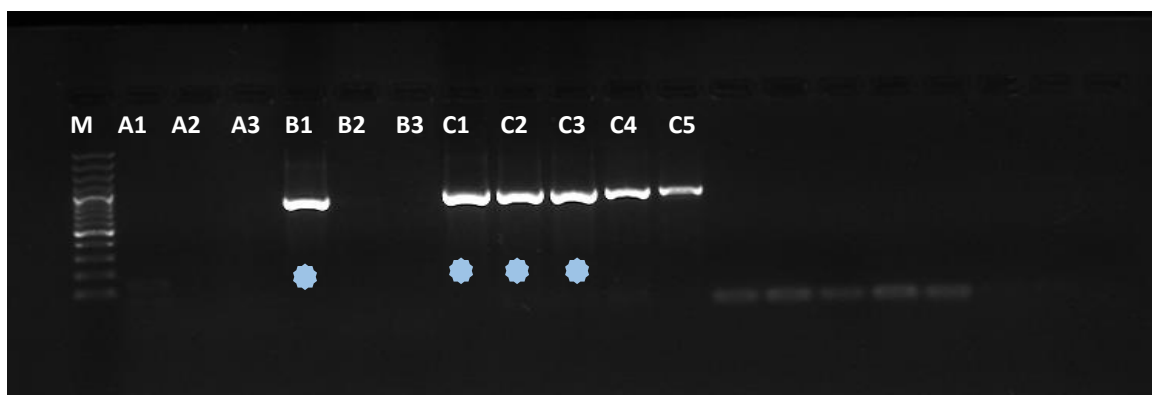
separovány pomocí elektroforézy v agarosovém gelu, jako optimální se jevila koncentrace gelu v rozmezí 1,5 – 2 %, výsledky byly zaznamenávány pomocí trans iluminátoru. S ohledem na množství provedených elektroforetických analýz (z důvodu výše zmíněných problémů s PCR amplifikací cílových úseku DNA), nebudou v této práci uvedeny všechny zaznamenané výsledky elektroforetické analýzy, ale pouze jejich reprezentativní ukázka. Na Obr. č. 10 jsou patrné produkty PCR reakce o velikosti cca 1000 bp, což odpovídá velikosti produktu genu *accD*, označené vzorky, tj. B1, C1, C2 a C3 jsou vzorky které byly dále využity pro sekvenaci a bioinformatickou analýzu. Na elektroforetogramu produktů PCR reakce pro amplifikaci genu *Bccp3* (Obr. č. 11) jsou patrné produkty o velikosti cca 1000 bp, které odpovídají velikosti požadovaného produktu. Označené vzorky, tj. A3, A4, a A5 jsou vzorky, které byly dále využity pro sekvenaci a následnou bioinformatickou analýzu.

Tab. č. 7: Primery použité pro PCR amplifikaci

Název	Typ	Sekvence	Cílový gen
<i>accD-Fatg</i>	Forward	CTCGGATTGGATCTCGTCA	<i>accD</i> Accession number: HG966673.1 (Bogdanova <i>et al.</i> 2015)
<i>accD-TrnQ</i>	Reverse	TGCAAAGAAAGTGGTTCAATTC	
<i>accD-F1</i>	Forward	GCATTAGTTTTTCATTTTCAGTCC	
<i>accD-F2</i>	Forward	TTCTCACCCACTACGCATCC	
<i>accD-R2</i>	Reverse	GAGCAGTTCAGATAGAATCGACC	
<i>accD-F3</i>	Forward	GAATCAAATTTAATGGGATCCAC	
<i>accD-R3</i>	Reverse	CGTTGCATTGAGAGTTATCTTCG	
<i>accD-R4</i>	Reverse	CTTTAATAGGGGTTTAGAATACA	
<i>accp3-F2</i>	Forward	CTAATGAAAGTGGCGGAAATC	<i>Bccp3</i> Accession number: LK056924.1 (Bogdanova <i>et al.</i> 2015)
<i>Bccp3-F4</i>	Forward	GAGACTGAAATCGCTGAACTG	
<i>Bccp3-R3</i>	Reverse	CCACCAACATCATCTCCAGAAAAAGCC	
<i>Bccp3-R4</i>	Reverse	GGCTTCTGGTATCAATACATA	
<i>Bccp3-R2</i>	Reverse	CCTTATTACGCGTCTTAGTGAATG	
<i>Bccp3-F33</i>	Forward	TTTCACAACTATAACCACCACC	
<i>Bccp3-R1113</i>	Reverse	ATGCTTCCTCCTAACTGTAAAGAG	

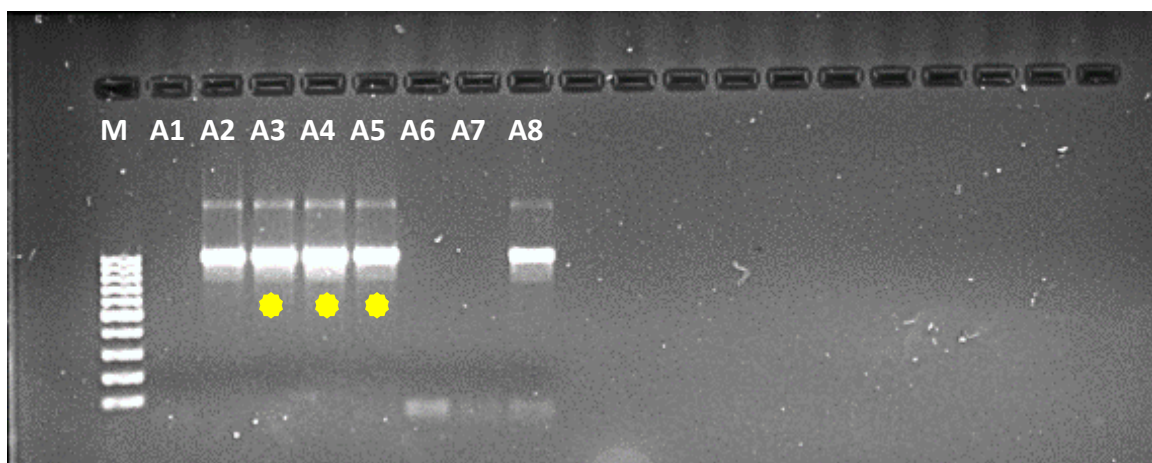
Legenda: Pro PCR amplifikaci byly použity i další primery, které však nejsou uvedené v této práci, jelikož jejich použití nevedlo k detekovatelné amplifikaci cílového genu.

Obr. č. 10: Elektroforetogram produktů PCR reakce pro amplifikaci části genu *accD*



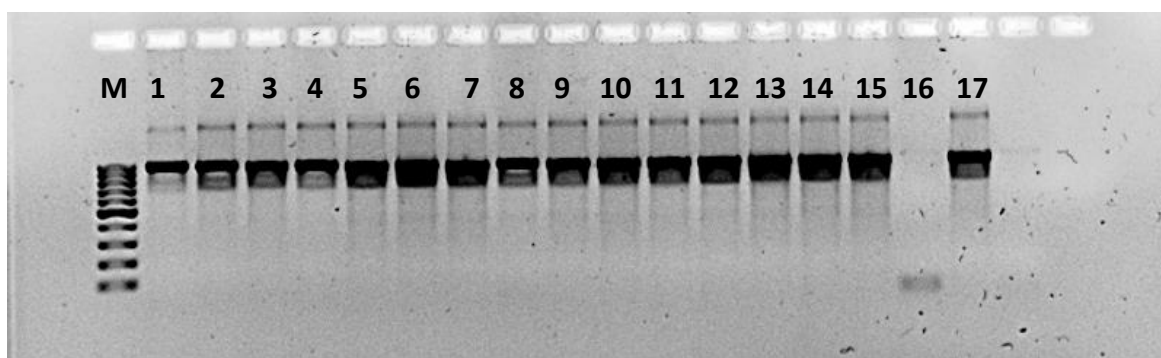
Vzorky: B1= T14/2, C1= T15/7, C2= T14/5, C3= T15/6, Použité primery: B1: Fatg/F3, C1-C3: F1/R2

Obr. č. 11: Elektroforetogram produktů PCR reakce pro amplifikaci genu *Bccp3*



Vzorky: A3= T15/10, A4= IG52596, A5= IG52595, použity primery F33/R1113

Obr. č. 12: Elektroforetogram produktů PCR reakce pro amplifikaci genu *Bccp3*



Vzorky: 1= T15/1, 2= T15/2, 5= T15/5, 6= T15/6, 7= T15/7, 8= T17/2, 9= T14/2, 10= T14/3, 11= T14/4, 12= T14/5, 13= T14/6, 15= T14/7, 16= T14/9, 17= T14/10, použity primery F33/R1113

Vzorek č. 16, tj. T14/9, se v této použité kombinaci primerů neamplifikoval, bylo tedy potřeba využít kombinaci jinou.

6. 3. Sekvence a bioinformatická analýza:

Vzorky byly po amplifikaci pomocí PCR se specifickými primery a po ověření amplifikace metodou elektroforetické separace na agarosovém gelu sekvencovány. Sekvence proběhla pomocí BigDye Terminator kit (Thermo Fisher Scientific) v Laboratoři sekvenace DNA, PřF UK Praha nebo Macrogen, Amsterdam, Nizozemí. Získané sekvence nukleotidů byly podrobeny bioinformatické analýze pomocí softwaru MEGA6 a Genious.

6. 3. 1. Analýza DNA sekvencí

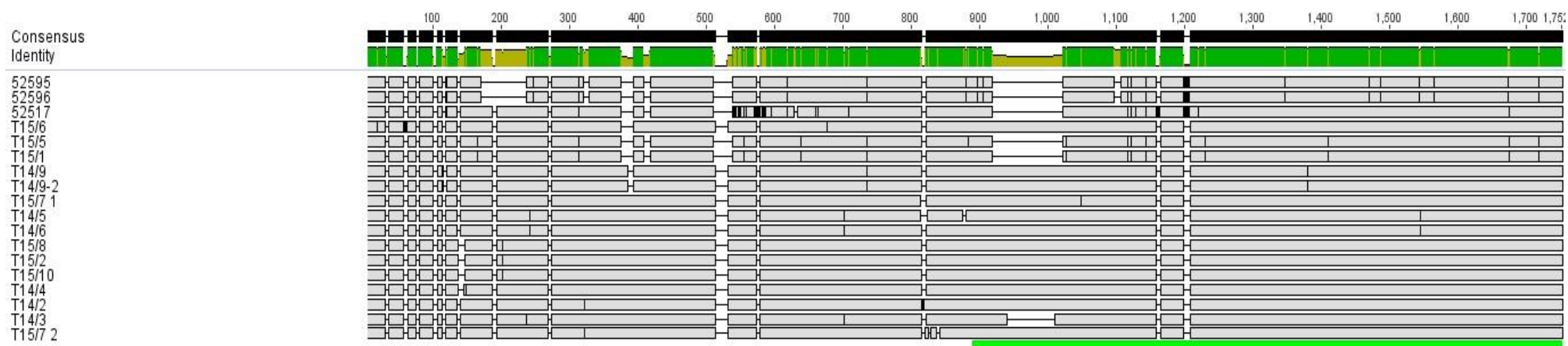
DNA sekvence byly analyzovány pomocí softwaru Genious a MEGA6, byl proveden jejich alignment, metodou multiple-alignmentu, a následná analýza jedno-nukleotidových polymorfismů (Single Nukleotide Polymorphism, dále v textu SNPs). Byl zaznamenán počet SNPs pro jednotlivé vzorky a na základě porovnání s translatovanou sekvencí aminokyselin (Viz Analýza proteinových sekvencí) byly určeny synonymní a nesynonymní mutace. Na základě variability nukleotidové sekvence byl dále sestaven UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) strom, tedy strom sestavený pouze na základě podobnosti nukleotidové sekvence.

6. 3. 1. 1. Analýza nukleotidových sekvencí pro gen *accD*

Nukleotidová sekvence genu *accD* získaná sekvenací byla analyzována pomocí programu Genious a MEGA6. Gen *accD*, se i přes relativně jednoduchou amplifikaci, ukázal jako extrémně variabilní. Sekvence chloroplastově kódovaného genu *accD* obsahovaly velké množství inzercí/deleci, např. u sekvencí IG52595, IG52596, IG52517, T15/1 a T15/5 je velká inzerce/delece v oblasti 900-1050 nt. Další výraznou inzercí/deleci můžeme pozorovat u vzorků IG52595, IG52596, IG52517, T15/1, T15/5 a T15/6 v oblasti 380-400 nt, popřípadě u vzorků IG52595 a IG52596 v oblasti cca 160-250 nt, či u vzorku T14/3 v oblasti 950-1020 nt.

Různě dlouhé inzerce/delece byly přítomny u všech zkoumaných linií, a to ve velikostech od jednoho či několika nukleotidů po desítky nukleotidů. K vysoké variabilitě sekvencí těchto linií přispívají také SNPs, tedy jedno-nukleotidové polymorfismy, které můžeme, také v různém počtu, pozorovat u všech sekvencí. S ohledem na vysokou variabilitu, zejména způsobenou velkým množstvím inzercí/deleci v sekvencích (Obr. č. 13) a vzhledem k délce cílové sekvence (téměř 1800 nukleotidů) byly haplotypy pro lokus *accD* na základě nukleotidové sekvence určeny pomocí Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, neboli UPGMA stromu. Tato metoda, zjednodušeně Shlukovací analýza, je nejjednodušší algoritmickou metodou pro konstrukci fylogenetického stromu, sestaveného na základě podobnosti sekvencí.

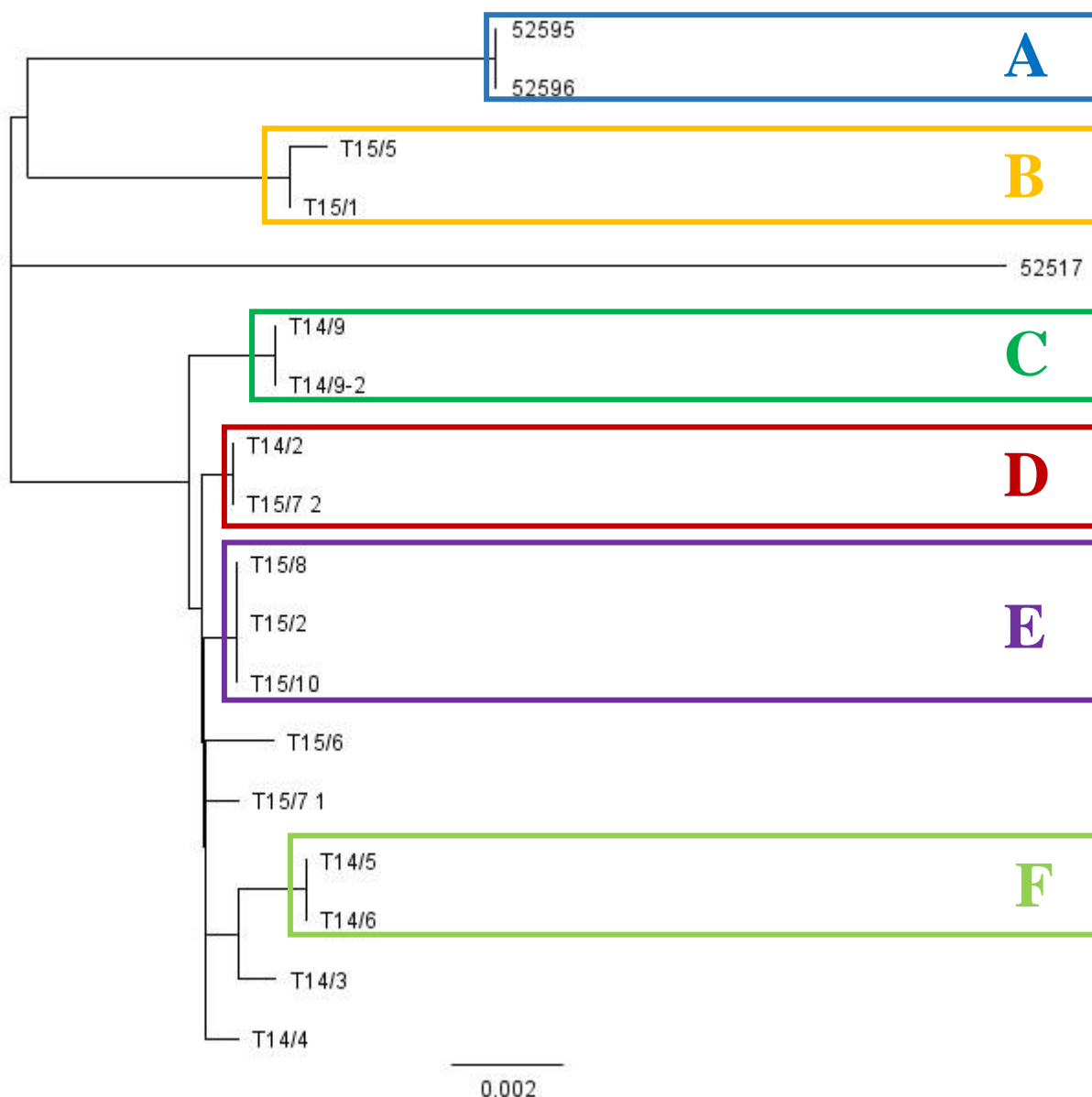
Obr. č. 13: Nukleotidové sekvence pro cpDNA gen *accD*



Legenda: Variabilita cílových sekvencí pro lokus *accD*, v sekvencích jsou patrné mezery vzniklé při alingmentu pomocí softwaru Genious následkem přítomnosti inzercí/delecí. Každý řádek představuje komprimovanou sekvenci nukleotidů, přičemž znázorněny jsou pouze inserce/delece, znázorněny prázdnými úseky, v případě předpokládaných delecí, a černými úseky v případě předpokládaných inzercí, a SNPs, tedy jedno-nukleotidové polymorfismy, znázorněny svislými liniemi v sekvencích, např. SNPs v pozici cca 1550 nt, v sekvencích IG52595, IG52596, T14/5 a T14/6.

Na základě podobnosti sekvencí nukleotidů byl sestaven UPGMA strom. Dle dendrogramu byly sekvence zařazeny do haplotypů. Kritériem pro zařazení do haplotypů byla pouze podobnost sekvencí, tj podobnost sekvencí, co se týče přítomnosti inzercí/delecí a SNPS, nebyla zohledněna synonymita/nesynonymita SNPs. Vzhledem k vysoké variabilitě jsou do stejného haplotypu řazeny i sekvence podobné, přestože nevykazují kompletní identitu. Jako průkazné byly považovány haplotypy mající alespoň dva členy (A–F), ostatní sekvence jsou řazeny do samostatných haplotypů (Obr. č. 14).

Obr. č. 14: Dendrogram pro lokus *accD*



Legenda: Sekvence byly na základě podobnosti sekvencí zařazeny do šesti hlavních haplotypů, označených A–F, majících alespoň dva členy a pěti samostatných haplotypů, majících pouze jednoho člena. Samostatnými haplotypy jsou linie IG52517, T15/6, T15/7, T14/3 a T14/4. Vzorky byly zařazeny do stejného haplotypu, i pokud nevykazovaly úplnou identitu, jak tomu bylo kupříkladu u vzorků T15/5 a T15/1, které byly zařazeny do haplotypu B, přestože nejsou identické, ale vykazují vysokou podobnost. Vzorek T14/3 by bylo možné zařadit, na základě relativní blízkosti v rámci dendrogramu, do haplotypu F, jelikož však vzorky T14/5 a T14/6 vykazují identitu, byly zařazeny do haplotypu F a vzorek T14/3 byl zařazen do haplotypu samostatného.

Vzorky byly na základě podobnosti sekvence nukleotidů pro lokus *accD* zařazeny do těchto haplotypů:

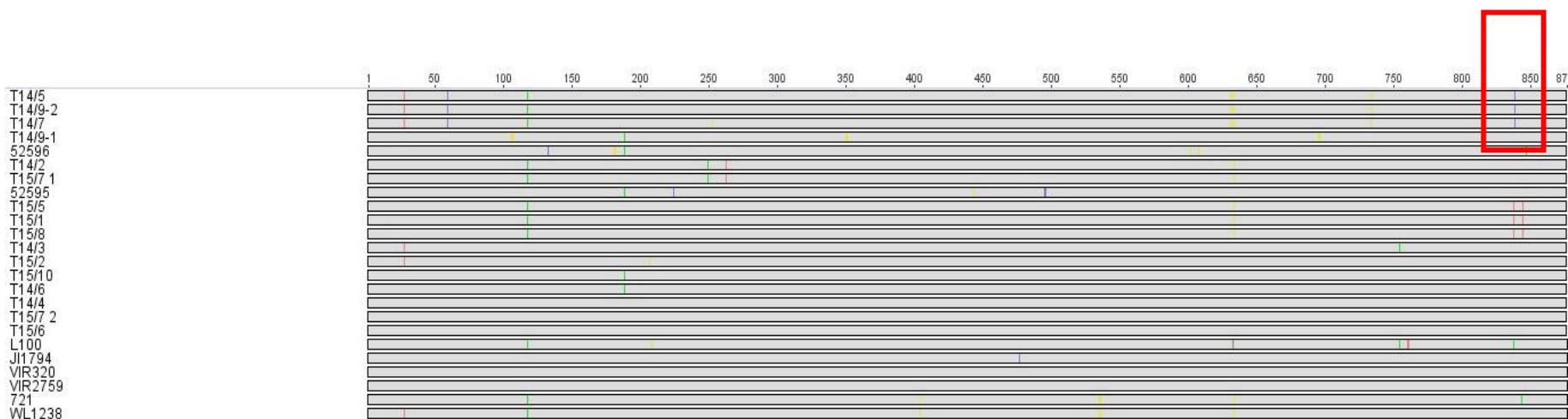
Tab. č. 8: Haplotypy pro lokus *accD*

	Haplotypy						Samostatné haplotypy
	A	B	C	D	E	F	
Vzorky	IG52595	T15/5	T14/9	T14/2	T15/8	T14/5	1. IG5251 7
	IG52596	T15/1	T14/9-2	T15/7-2	T15/2	T14/6	2. T15/6 3. T15/7-1 4. T14/3 5. T14/4
					T15/10		

6. 3. 1. 2. Analýza nukleotidových sekvencí pro gen *Bccp3*

Nukleotidové sekvence genu *Bccp3* byly podrobeny bioinformatické analýze pomocí softwaru Genious, na základě alignmentu těchto sekvencí byl sestaven dendrogram vyjadřující podobnost nukleotidových sekvencí. Gen *Bccp3* se na nukleotidové úrovni jevil, obdobně jako gen *accD*, jako vysoce variabilní. Vzhledem k přítomnosti intronů a možné přítomnosti homologních sekvencí v genomu hrachu, jsme použili izolaci mRNA a přepisu do cDNA. PCR amplifikace jaderně kódovaného genu *Bccp3*, kódujícího Biotin-karboxyl carrier protein pro acetyl Co-A karboxylázu, byla proto komplikovanější, než v případě genu *accD* a bylo zapotřebí využít i vícestupňové PCR reakce, aby došlo k detekovatelné amplifikaci cílového genu (Viz kapitola G.). Gen *Bccp3* oproti genu *accD* vykazuje nižší variabilitu, zejména co se týče přítomnosti inzercí/delecí v sekvenci. Gen *Bccp3* však vykazuje velké množství různých SNPs, tedy jedno-nukleotidových polymorfismů, které jsou vyznačeny (Obr. č. 15) barevnými svislými liniemi, a jsou přítomny téměř u všech vzorků. Pro analýzu nukleotidové sekvence genu *Bccp3* byly zařazeny i referenční linie JI1794, VIR320, VIR2759, 721 a WL1238 (Bogdanova *et al.* 2015).

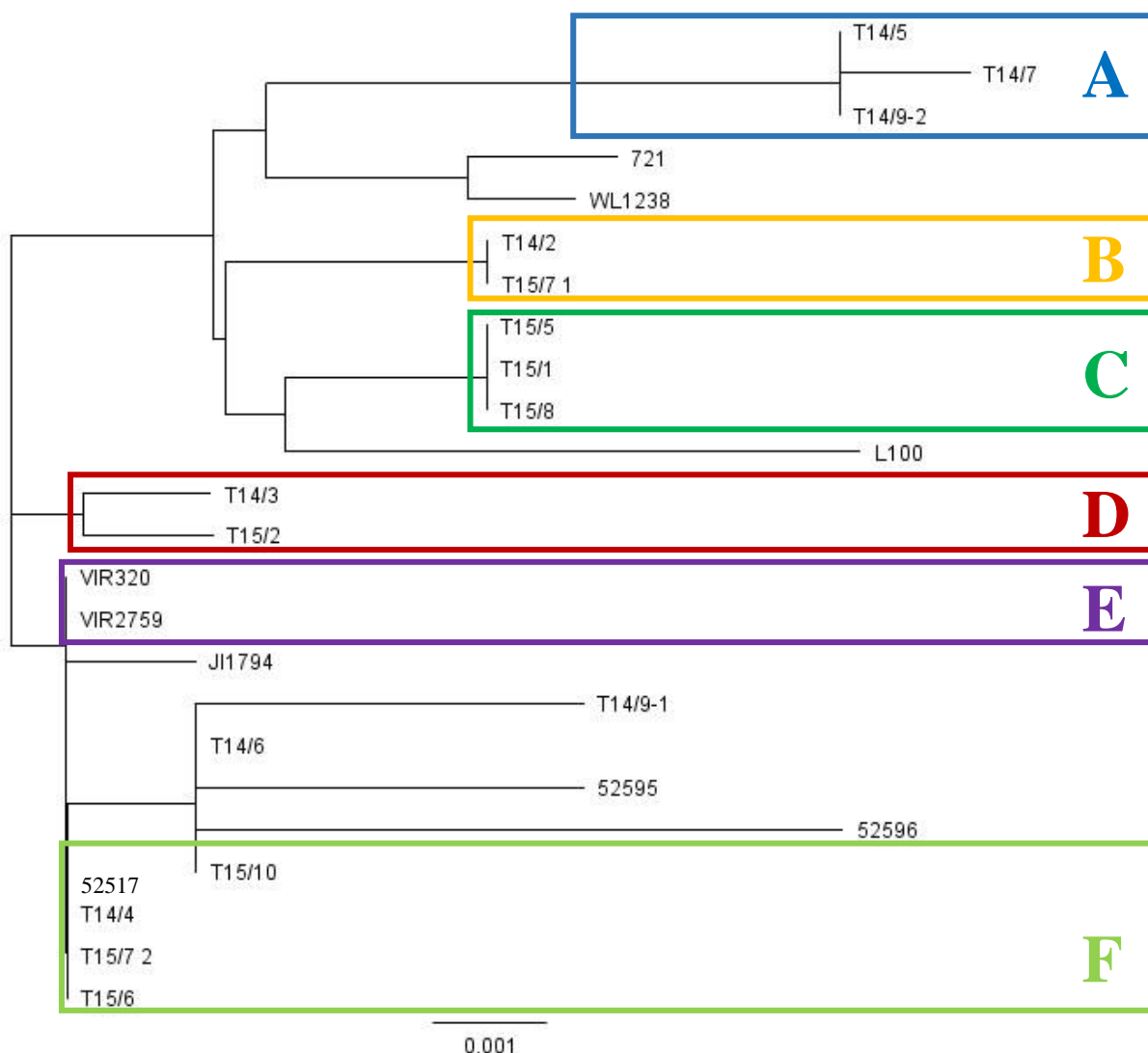
Obr. č. 15: Nukleotidové sekvence pro gen *Bccp3*



Legenda: Komprimované sekvence nukleotidů pro lokus *Bccp3*. Sekvence jsou dlouhé 870 nukleotidů, pro analýzu byly zahrnuty i referenční sekvence (JI1794, VIR320, VIR2759, 721, WL1238, L100). Jedno-nukleotidové polymorfismy v sekvencích jsou patrné jakožto barevné svíslé linie, například SNPs v pozici cca 840 nt, u vzorků T14/5, T14/9-2 a T14/7 (Vyznačeno červeným rámečkem).

Na základě podobnosti sekvencí nukleotidů byl sestaven dendrogram. Pomocí dendrogramu byly vzorky zařazeny do haplotypů pro lokus *Bccp3*. Jako průkazné byly považovány haplotypy mající alespoň dva členy, tyto haplotypy jsou označeny A–F (Obr. č. 16) ostatní vzorky byly považovány za samostatné haplotypy. Vzorky byly tedy rozděleny do šesti průkazných haplotypů: A, B, C, D, E a F a devíti samostatných haplotypů: 721, WL1238, L100, JI1794, T14/9-1, T14/6, IG52595, IG52596 a T15/10 (1–9). Vzorky T14/9-1, T14/6, IG52595, IG52596 a T15/10 obsazují na kladogramu společnou větev, ale jsou, na základě délky větví považovány za samostatné haplotypy.

Obr. č. 16: Dendrogram pro lokus *Bccp3*



Vzorky byly na základě podobnosti nukleotidových sekvencí rozděleny do těchto haplotypů pro lokus *Bccp3*:

Tab. č. 9: Haplotypy pro lokus *Bccp3*

Vzorky	Haplotypy						Samostatné haplotypy	
	A	B	C	D	E	F		
	T14/5	T14/2	T15/5	T14/3	VIR320	T14/4	1.	IG52595
	T14/7	T15/7-1	T15/1	T15/2	VIT2759	T15/7-2	2.	IG52596
	T14/9-2		T15/8			T15/6	3.	721
						IG52517	4.	WL1238
							5.	T14/6
							6.	L100
							7.	JI1794
							8.	T14/9-1
							9.	T15/10

Legenda: Vzorky byly rozděleny do 6 haplotypů majících alespoň dva členy (A-F) a devíti haplotypů samostatných (1-9)

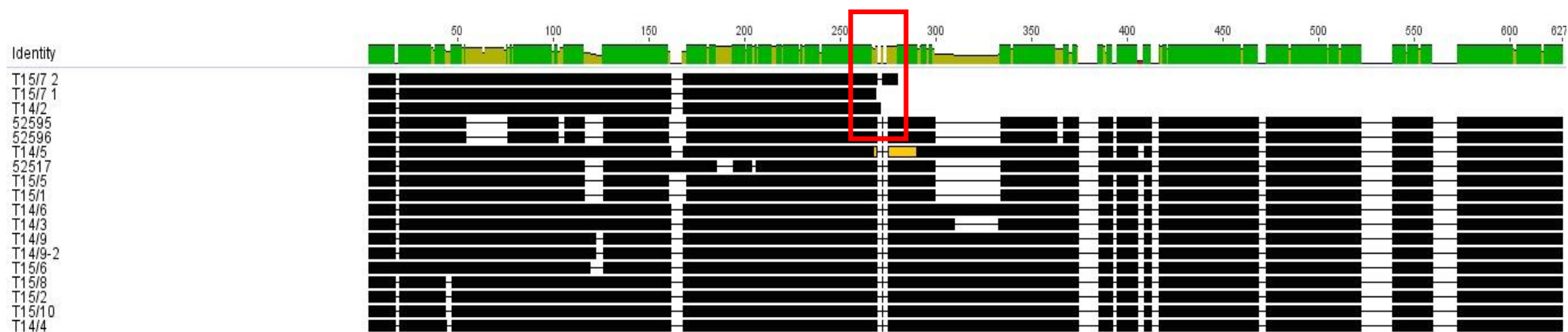
6. 3. 2. Analýza proteinových sekvencí

Sekvence DNA pro gen *accD* a *Bccp3* byly dále pomocí softwaru (Genious) translatovány do sekvence aminokyselin. Tyto aminokyselinové sekvence byly dále analyzovány a na základě variability a aminokyselinových záměn klasifikovány, jak pro lokus *accD*, tak pro lokus *Bccp3*, do haplotypů a porovnávány s referenčními sekvencemi (Tab. č. 8, Tab. č. 10). Jako referenční byly použity sekvence označené L100, 721, WL1238, VIR320, VIR2759. Sekvence aminokyselin byly dále využity pro sestavení fylogenetického stromu na základě sekvenční podobnosti.

6. 3. 2. 1. Analýza proteinových sekvencí pro gen *accD*

Chloroplastově kódovaný gen *accD*, tedy gen kódující Acetyl Co-A karboxyláza beta-podjednotku, se jevil jako extrémně variabilní, a to jak na úrovni nukleotidové, tak na úrovni aminokyselinové sekvence. Sekvence aminokyselin obsahovaly velké množství inzercí/delecí a netranslatovaných úseků, jak je patrné například u vzorků IG52595, IG52596, T15/6, T15/1 a T14/3 v oblasti cca 300–340 AA. V případě sekvencí vzorků T15/7-1, T15/7-2 a T14/2 byl v pozici kódující cca 270 AA (Obr. č. 17, oblast vyznačena červeně) stop kodon, sekvence se tedy dále netranslatovaly. Není zcela jasné, zdali se tento stop-kodon v sekvenci přirozeně vyskytuje, tedy jedná-li se o přirozenou mutaci, případně zdali vznikl chybou při PCR amplifikaci. Přítomnost stop-kodonu komplikuje další fylogenetickou analýzu a konstrukci dendrogramu na základě podobnosti sekvencí, jelikož díky přítomnosti stop-kodonu jsou sekvence aminokyselin vzorků T15/7-1, T15/7-2 a T14/2 výrazně kratší než sekvence vzorků ostatních, při konstrukci dendrogramu se tedy budou jevit jako velmi vzdálené. Aminokyselinová sekvence, získaná translací nukleotidové sekvence, byly na základě podobnosti zařazeny do několika haplotypů

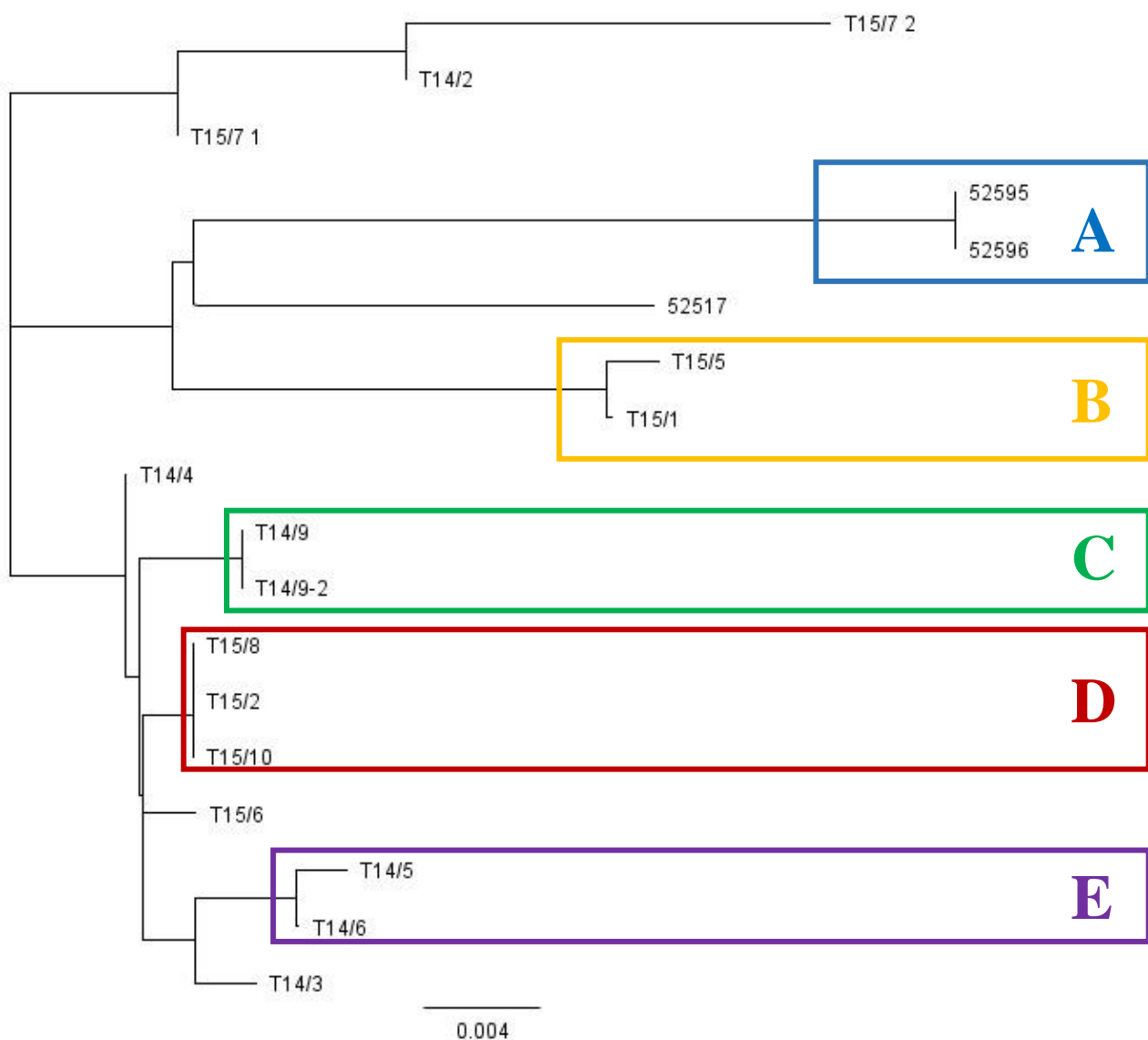
Obr. č. 17: Aminokyselinové sekvence pro gen *accD*



Legenda: Komprimované sekvence nukleotidů pro lokus *accD*, sekvence mají délku 623 AA, s výjimkou vzorků T15/7-1, T15/7-2 a T14/2, které mají délku okolo 270 AA, vlivem přítomnosti stop-kodonu. Na sekvencích jsou patrné inserce/delece a netranslatované úseky (vyznačeny bíle).

Na základě podobnosti aminokyselinových sekvencí pro lokus *accD* byl sestaven dendrogram. Pomocí dendrogramu byly vzorky zařazeny do haplotypů pro lokus *accD* na úrovni proteinu. Do společných haplotypů byly řazeny i sekvence nevykazující plnou identitu. Za průkazné byly považovány haplotypy mající alespoň dva členy, tyto haplotypy jsou označeny A-E (Obr. č. 18) ostatní vzorky byly zařazeny do samostatných haplotypů. Na základě podobnosti proteinové sekvence pro lokus *accD* byly tedy vzorky zařazeny do pěti haplotypů, majících alespoň dva členy a do sedmi haplotypů samostatných. Samostatné haplotypy jsou T15/7-1, T15/7-2, T14/2, IG52517, T14/4, T15/6 a T14/3. Vzorky T15/7-1, T15/7-2 a T14/2 vykazují vysoký stupeň odlišnosti od ostatních vzorků, což je však dáno délkou aminokyselinové sekvence, která je v případě těchto vzorků o více než polovinu kratší, což je způsobeno s největší pravděpodobností přítomností stop-kodonu v pozici pro cca 270. AA v těchto sekvencích. Na základě těchto sekvencí nelze určit, zdali je přítomnost tohoto stop-kodonu přirozená, popřípadě zdali se jedná o chybu při sekvenaci. Vzorek T14/3 vykazuje *podobnost* ke vzorkům T14/5 a T14/6, tyto vzorky však vykazují vyšší *podobnost* mezi sebou a jsou tedy považovány za společný haplotyp E, zatímco vzorek T14/3 náleží do haplotypu samostatného. Vzorky T15/5 a T15/1 jsou řazeny do společného haplotypu B, přestože nevykazují kompletní identitu, stejně tak vzorky T14/5 a T14/6 jsou řazeny do společného haplotypu E.

Obr. č. 18: Dendrogram pro lokus *accD* na úrovni proteinu



Vzorky byly na základě podobnosti aminokyselinových sekvencí rozděleny do těchto haplotypů pro lokus *accD*:

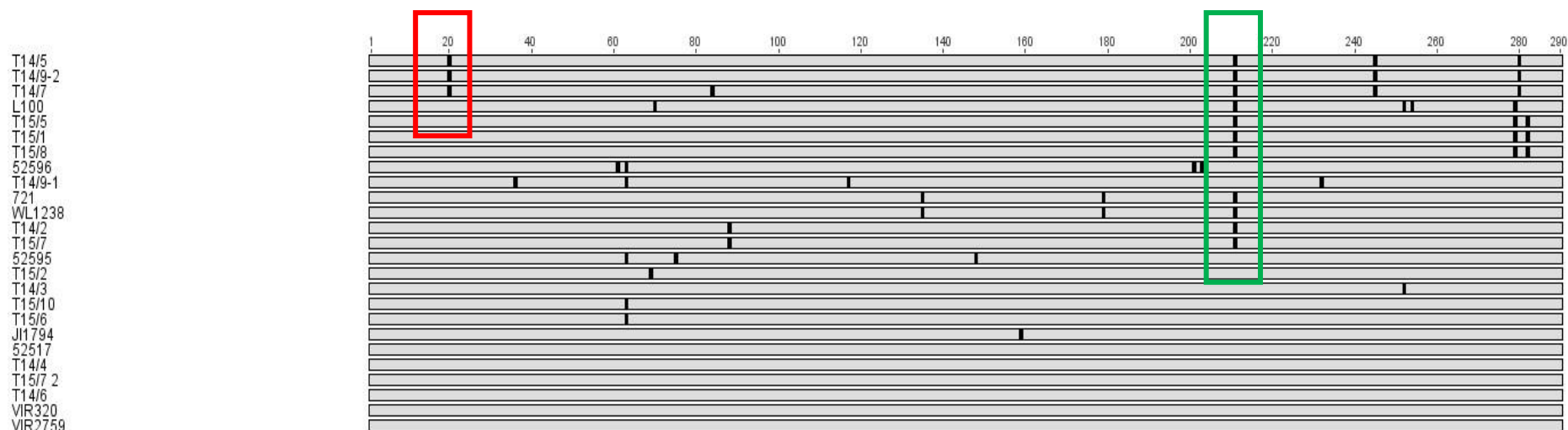
Tab. č. 10: Haplotypy pro lokus *accD* na úrovni aminokyselinové sekvence

Haplotypy		A	B	C	D	E	Samostatné haplotypy
Vzorky	IG52595	T15/5	T14/9	T15/8	T14/5		1. T15/7-2
	IG52596	T15/1	T14/9-2	T15/2	T14/6		2. T14/2
				T15/10			3. T15/7-1
							4. IG52517
							5. T14/4
							6. T15/6
							7. T14/3

6. 3. 2. 2. Analýza proteinové sekvence pro gen *Bccp3*

Protein kódovaný genem *Bccp3*, tedy Biotin-karboxyl carrier protein pro acetyl Co-A karboxylázu, je nezbytný pro správné fungování rostlinného metabolismu, projevuje však u vybraných linií vysokou variabilitu, přestože funkce proteinu zřejmě zůstává nadále nezměněná. Vzorky byly na základě aminokyselinové variability zařazeny do několika haplotypů, při této analýze byly využity i referenční sekvence (vzorky L100, 721, W11238, Vir320, Vir2579, JI1794, Bogdanova *et al.* 2015).

Obr. č. 19: Aminokyselinové sekvence pro gen *Bccp3*



Legenda: Na obrázku jsou patrné komprimované sekvence aminokyselin pro lokus *Bccp3*, tyto sekvence mají délku 290 aminokyselin. Na sekvencích jsou patrné aminokyselinové záměny, vyznačeny černě, například aminokyselinová záměna v pozici 20 u vzorků T14/5, T14/9-2 a T14/7 (vyznačeno červeným rámečkem), nebo záměna v pozici 211, u vzorků T14/5, T14/9-2, T14/7, L100, T15/5, T15/1, T15/8, 721, WL1238, T14/2 a T15/7-1 (vyznačeno zeleným rámečkem).

Tab. č. 11: Aminokyselinové záměny pro gen *Bccp3*

			Pozice aminokyselinové záměny v řetězci																									
	Vzorky	HAPLOTYP	20	36	45	61	63	69	70	75	84	88	117	135	148	159	179	201	203	211	232	245	252	254	268	279	280	282
1	T14/5	E	A	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	V	E	V	H	V	D	M	L	V
2	T14/9-2	E	A	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	V	E	V	H	V	D	M	L	V
3	T14/7	E1	A	R	Q	K	T	K	T	N	E	Q	E	N	Q	M	T	I	T	V	E	V	H	V	D	M	L	V
4	L100	L100	V	R	Q	K	T	K	A	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	T	E	L	Y	I	D	I	V	V
5	T15/5	D	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	M	E	L	H	V	D	I	V	I
6	T15/1	D	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	M	E	L	H	V	D	I	V	I
7	T15/8	D	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	M	E	L	H	V	D	I	V	I
8	IG52596	52596-Algeria	V	R	Q	E	I	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	V	A	I	E	L	H	V	D	M	V	V
9	T14/9-1	T14/9-1	V	G	Q	K	I	K	T	N	D	Q	G	N	Q	M	T	I	T	I	G	L	H	V	D	M	V	V
10	721	F	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	S	Q	M	A	I	T	M	E	L	H	V	D	M	V	V
11	WL1238	F	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	S	Q	M	A	I	T	M	E	L	H	V	D	M	V	V
12	T14/2	C	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	K	E	N	Q	M	T	I	T	M	E	L	H	V	D	M	V	V
13	T15/7-2	C	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	K	E	N	Q	M	T	I	T	M	E	L	H	V	D	M	V	V
14	IG52595	52595-Algeria	V	R	Q	K	I	K	T	T	D	Q	E	N	R	M	T	I	T	I	E	L	H	V	D	M	V	V
15	T15/10	B	V	R	Q	K	I	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	I	E	L	H	V	D	M	V	V
16	T14/6	B	V	R	Q	K	I	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	I	E	L	H	V	D	M	V	V
17	T15/2	T15/2	V	R	Q	K	T	R	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	I	E	L	H	V	D	M	V	V
18	T14/3	T14/3	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	I	E	L	Y	V	D	M	V	V
19	IG52517	A	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	I	E	L	H	V	D	M	V	V
20	T14/4	A	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	I	E	L	H	V	D	M	V	V
21	T15/7-1	A	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	I	E	L	H	V	D	M	V	V
22	T15/6	A	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	I	E	L	H	V	D	M	V	V
23	VIR320	A	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	I	E	L	H	V	D	M	V	V
24	VIR2759	A	V	R	Q	K	T	K	T	N	D	Q	E	N	Q	M	T	I	T	I	E	L	H	V	D	M	V	V

Legenda: Číslo v 1. řádku udává pozici aminokyselinové záměny v řetězci. Aminokyselinová sekvence se jevila jako velmi variabilní, bylo zaznamenáno 26 různých aminokyselinových záměn a jedna Inzerce/Delece v pozici 81-83, rozdělení do jasně ohraničených haplotypů je tedy obtížné, jak je patrné v případě vzorku T14/7, zařazeného spolu se vzorky T14/5 a T14/10 do haplotypu E. Proteinová sekvence vzorku T14/7 je se vzorky T14/5 a T14/10 shodná s výjimkou aminokyselinové záměny v pozici 84. I přes tuto záměnu jsou tyto tři sekvence (T14/7, T14/5 a T14/9-2) zařazeny do jednoho haplotypu. V případě vzorků T15/2 a T14/3 není jejich náležitost k určitému haplotypu jasná, jelikož se sekvencí blíží haplotypu A, u každého z těchto vzorků se však vyskytuje jiná aminokyselinová záměna, v pozici 69 pro vzorek T15/2, v pozici 252 pro vzorek T14/3, v případě těchto sekvencí tedy nelze určit, jestli do haplotypu A náleží či nikoli. Vzorky T14/8, T14/9-1 a L100 nelze, na základě odlišnosti AA sekvence, zařadit do žádného z výše zmíněných haplotypů, jsou tedy považovány za haplotypy samostatné. Vzorky IG52595 a IG52596 byly zařazeny jakožto outgroup, s ohledem na geografickou vzdálenost od ostatních vzorků (Viz. geografická lokalizace testovaných linií). Na základě AA záměn byly vzorky rozděleny do šesti haplotypů majících alespoň dva členy (Viz. Tab. č. 12: Rozdělení vzorků na základě haplotypů pro lokus *Bccp3*, označeny A-F) a do šesti haplotypů samostatných, majících pouze jednoho člena (1-6).

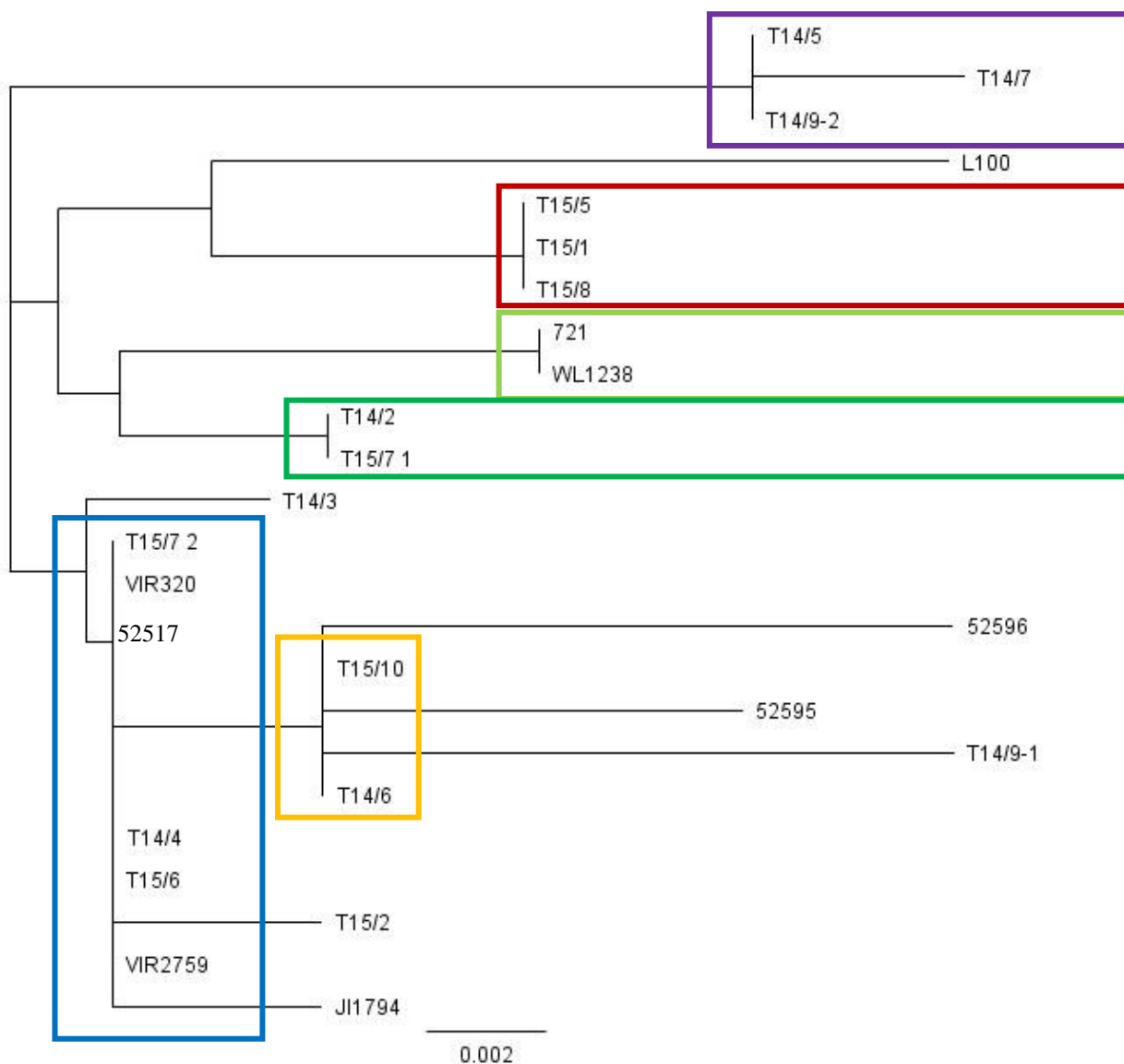
Tab. č. 12: Rozdělení vzorků na základě haplotypů pro lokus *Bccp3*

Vzorky	Haplotypy						Samostatné haplotypy	
	A	B	C	D	E	F		
IG52517	T15/10	T14/2	T15/5	T14/5	721		1.	L100
T14/4	T14/6	T15/7-2	T15/1	T14/7	WL1238		2.	T14/9-1
T15/7-1			T15/8	T14/9-2			3.	T15/2
T15/6							4.	T14/3
VIR320							5.	IG52595
VIR2759							6.	IG52596

Vzorky zařazené do kategorie **Samostatné haplotypy** nemohou být na základě odlišnosti v AA sekvenci jednoznačně zařazeny do žádného z výše zmíněných haplotypů, jsou proto považovány za samostatné haplotypy, pro účely této analýzy byly jakožto průkazné haplotypy považovány skupiny mající alespoň dva členy (např. haplotyp B, označen oranžově).

Na základě podobnosti sekvencí byl sestaven dendrogram pro lokus *Bccp3*, ilustrující variabilitu tohoto genu na úrovni aminokyselinové sekvence. Na dendrogramu jsou vyznačeny haplotypy určené na základě podobnosti aminokyselinových sekvencí (Tab. č. Tab. č. 11) v odpovídajících barvách. Haplotypy určené na základě podobnosti sekvencí aminokyselin (Tab. č. 12) indikují, v rámci dendrogramu, i příslušnost samostatných haplotypů, kupříkladu IG52595, IG52596 a T14/9 zřejmě vycházejí z haplotypu B, což je zřejmě způsobeno tím, že tyto linie mají společnou AA záměnu, v pozici 63, která se v jiných liniích nevyskytuje.

Obr. č. 20: Dendrogram pro lokus *Bccp3* ilustrující variabilitu na úrovni proteinové sekvence



Legenda: Modrá= haplotyp A, Oranžová= haplotyp B, Zelená= haplotyp C, Červená= haplotyp D, Fialová= haplotyp E a Světlá zelená= haplotyp F

6. 3. 3. Srovnání haplotypů pro lokusy *accD* a *Bccp3*

Vzorky byly na základě podobnosti sekvencí zařazeny do haplotypů pro lokus *accD* na úrovni nukleotidů a na úrovni proteinu a pro lokus *Bccp3*, na úrovni nukleotidové a proteinové sekvence. Haplotypy pro lokusy *accD* a *Bccp3* přítomné u jednotlivých linií byly následně porovnávány (Tab. č. 13).

Tab. č. 13: Srovnání haplotypů pro lokusy *accD* a *Bccp3*

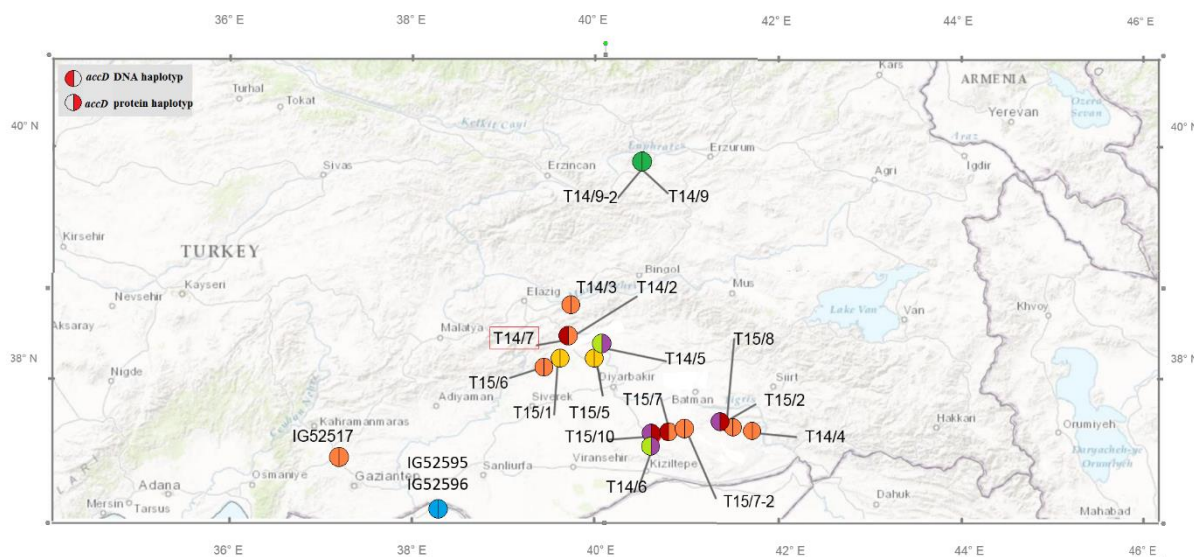
		Haplotypy			
	Vzorky	<i>accD</i> DNA	<i>accD</i> Protein	<i>Bccp3</i> DNA	<i>Bccp3</i> Protein
1	T15/5	B	B	C	D
2	T15/1	B	B	C	D
3	T15/8	E	D	C	D
4	T15/2	E	D	D	G
5	T15/10	E	D	G	B
6	T14/6	F	E	G	B
7	T14/5	F	E	A	E
8	T14/9-2	C	C	A	E
9	T14/9-1	C	C	G	G
10	IG52596	A	A	G	G
11	IG52595	A	A	G	G
12	T14/2	D	G	B	C
13	T15/7-2 (K)	D	G	F	C
14	T15/7-1	G	G	B	A
15	T15/6	G	G	F	A
16	T14/4	G	G	G	A
17	T14/3	G	G	D	G
18	IG52517	G	G	F	A
19	T14/7	N	N	F	E
20	L100	N	N	G	G
21	721	N	N	G	F
22	WL1238	N	N	G	F
23	VIR320	N	N	E	A
24	VIR2759	N	N	E	A
25	IG1794	N	N	G	G

Legenda: Vzorky byly zařazeny do haplotypů majících alespoň dva členy, označených A-F. Samostatné haplotypy byly pro zjednodušení shrnuty do společného haplotypu G (označen oranžově). Vzorek T14/7 a referenční sekvence L100, 721, WL1238, VIR320, VIR2759 a IG 1794 nebyly zahrnuty do analýzy pro gen *accD*, jsou tedy v tabulce v odpovídajících sloupcích označeny N, tedy Nezařazeno. Vzorky jsou v tabulce seskupeny dle odpovídajících haplotypů.

Vzorky T15/7-1, T15/7-2 a T14/2 mají pro lokus *accD* na úrovni proteinu samostatné haplotypy, aminokyselinová sekvence těchto vzorků však byla výrazně kratší než sekvence vzorků ostatních, tyto vzorky se tedy při konstrukci dendrogramu jeví jako velmi vzdálené (Obr. č. 17) Dle podobnosti sekvencí pro lokus *accD* na úrovni DNA však lze předpokládat, že vzorky T15/7-2 a T14/2 jsou si blíže příbuzné, zatímco T15/7-1 je více vzdálený. Vzorky T15/5, T15/1 a T15/8 sdílejí pro lokus *Bccp3* stejný haplotyp, a to jak na úrovni DNA (Haplotyp C) tak na úrovni proteinu (Haplotyp D). Vzorek T15/8 se však od vzorků T15/5 a T15/1 liší v haplotypu pro lokus *accD*. Vzorky T15/5 a T15/1 spadají do haplotypu B, jak pro *accD* na úrovni DNA, tak na úrovni proteinové, zatímco vzorek T15/8 spadá do haplotypu E pro *accD* na úrovni DNA a do haplotypu D na úrovni proteinu. Pro lokus *accD* tedy vzorek T15/8 vykazuje vyšší příbuznost se vzorky T15/2 a T15/10 než se vzorky T15/5 a T15/1. Vzorky IG52595 a IG52596 mají společný haplotyp pro *accD*, jak pro DNA, tak pro protein a samostatné haplotypy (G) pro *Bccp3*. Vzorky T14/9-1 a T14/9-2 sdílejí stejné haplotypy pro lokus *accD*, mají však rozdílné haplotypy pro lokus *Bccp3*, kdy vzorek T14/9-1 má haplotyp samostatný a vzorek T14/9-2 haplotyp A pro *Bccp3* DNA a E pro *Bccp3* na úrovni proteinu, tento vzorek by tedy pro lokus *Bccp3* vykazoval vyšší příbuznost se vzorkem T14/5 než se vzorkem T14/9-2. Zajímavý je případ vzorků T14/2, T15/7-2, T15/7-1 a T15/6. Vzorky T14/2 a T15/7-1 by dle podobnosti sekvencí pro *Bccp3* DNA měly spadat do haplotypu B a vzorky T15/7-2 a T15/6 do haplotypu F. Pro *Bccp3* na úrovni proteinu však spadají vzorky T14/2 a T15/7-2 do haplotypu C, zatímco vzorky T15/7-1 a T15/6 spadají do haplotypu A, společně se vzorky IG25217, T14/4 a referenčními liniemi VIR320 a VIR2759. Ostatní referenční linie, tj. L100, 721, WL1238 a IG1794 mají pro *Bccp3* DNA haplotypy samostatné a taktéž, s výjimkou linií 721 a WL1238 které mají společný haplotyp F, pro *Bccp3* na úrovni proteinu. Toto rozdělení na základě haplotypů pro dané lokusy opět ilustruje extrémní variabilitu těchto genů.

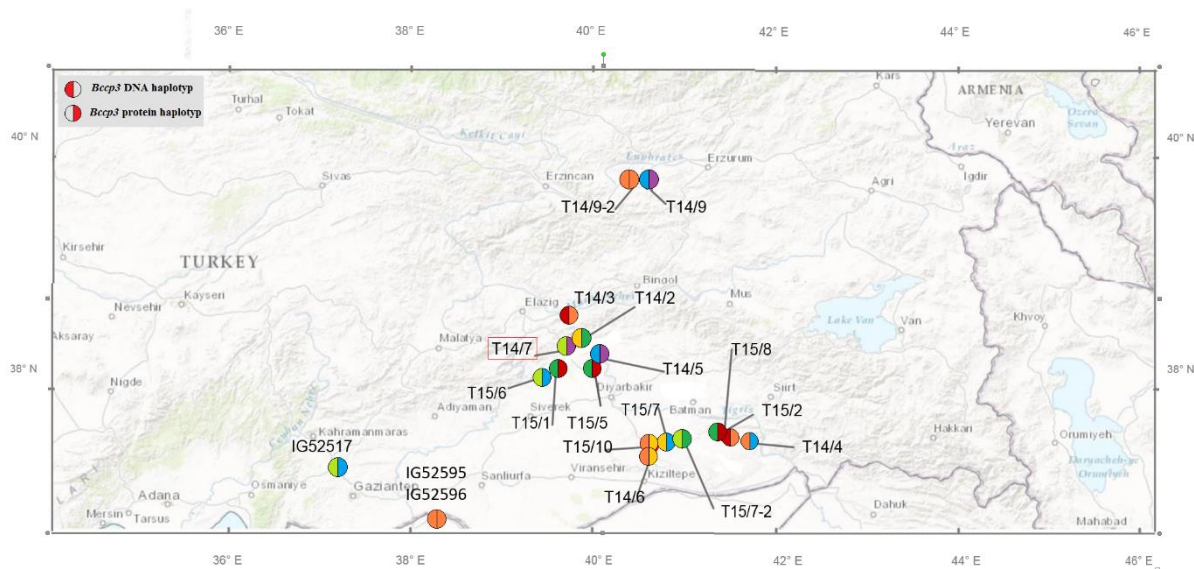
Vzorky a jejich odpovídající haplotypy pro lokus *accD* na úrovni DNA/proteinu a pro lokus *Bccp3* na úrovni DNA/proteinu byly vyneseny do mapy (Obr. č. 21 a Obr. č. 22)

Obr. č. 21: Mapa haplotypů pro lokus *accD*



Legenda: Mapa zobrazuje jihovýchodní Turecko v okolí města Diyarbakir, kde byly vzorky odebrány. Vzorky jsou barevně označeny, barvy odpovídají barevnému označení haplotypů v Tab. č. 14. Vzorek T14/7 nebyl pro analýzu lokusu *accD* zařazen (označen červeně).

Obr. č. 22: Mapa haplotypů pro lokus *Bccp3*



Legenda: Mapa zobrazuje jihovýchodní Turecko v okolí města Diyarbakir, kde byly vzorky odebrány. Vzorky jsou barevně označeny, barvy odpovídají barevnému označení haplotypů v Tab. č. 14. Pro analýzu lokusu *Bccp3* byl zařazen i vzorek T14/7 (označen červeně).

Na mapkách je patrné, jak variabilní je populace hrachu v jihovýchodním Turecku pro lokusy *accD* a *Bccp3*. I vzorky odebrané na stejné lokalitě (například T14/9-1 a T14/9-2) mají pro lokus *Bccp3* zcela odlišné haplotypy, a to jak na úrovni DNA, tak na úrovni proteinu, a naopak i vzorky geograficky poměrně vzdálené (například vzorky T14/2 a T15/7 pro lokus *accD*) sdílejí stejný lokus. Variabilita alel těchto genů v populaci je tak vysoká, že nelze jednoznačně určit případné trendy genového toku v populacích dané lokality

7. Diskuze

V této bakalářské práci byla provedena analýza nukleotidových a aminokyselinových sekvencí vybraných linií hrachu setého (*Pisum sativum*) pro *accD* lokus, tj. chloroplastově kódovaný gen kódující β podjednotku Acetyl Co-A karboxylázy a lokus *Bccp3*, tj. jaderně kódovaný gen kódující Biotin-karboxyl carrier protein pro acetyl Co-A karboxylázu. Tyto geny byly pro analýzu vybrány z důvodu asociace s jaderně-cytoplasmatickou inkompatibilitou (Bogdanova *et al.* 2015). Analýza byla provedena na 19 liniích planého hrachu původem z východního Turecka, z oblasti v okolí města Diyarbakir (37° 55' 29.903" N 40° 12' 39.539" E), pro analýzu lokusu *Bccp3* byly zařazeny také referenční linie L100, 721, VIR320, VIR2759, JI1794 a WL1238.

Prvním krokem analýzy byla izolace chloroplastové DNA pro analýzu lokusu *accD* a mRNA pro analýzu lokusu *Bccp3*. Mediátorová RNA byla pro účely analýzy genu *Bccp3* vybrána, jelikož se jedná o jaderný gen a pro účely bioinformatické analýzy podobnosti sekvencí bylo výhodnější získat sekvenci bez intronů přepisem vyizolované RNA do DNA.

Po izolaci DNA reverzní transkripci RNA do cDNA proběhla amplifikace cílových genů pomocí PCR. Amplifikace genu *accD* se jevila jakožto relativně snadná, ač se tento gen, jak na úrovni nukleotidové, tak na úrovni proteinové, jeví jako extrémně variabilní. Amplifikace genu *Bccp3* byla oproti amplifikaci genu *accD* velmi obtížná, bylo potřeba využít velkého množství různých kombinací primerů. V některých případech došlo k detekovatelné amplifikaci až po dvojitém PCR, popřípadě vznikaly během amplifikace nespecifické produkty. Tyto komplikace při amplifikaci genu *Bccp3* mohly být způsobeny vysokou variabilitou v oblasti vazby primerů, popřípadě vlivem kontaminace cizorodými nukleovými kyselinami v průběhu přepisu vyizolované RNA do cDNA.

Vzorky byly po sekvenaci podrobeny bioinformatické analýze. Vzorky byly, na základě podobnosti nukleotidových a aminokyselinových sekvencí zařazeny do haplotypů. Gen *accD* se jevil jakožto extrémně variabilní, obsahoval velké množství inzercí/deleci různých délek, v rozsahu od jednotek až po desítky nukleotidů a velké množství různých jedno-nukleotidových polymorfismů. Tato variabilita se projevila i v translatované aminokyselinové sekvenci, která taktéž obsahovala inserce/delece a netranslatované úseky. Produkt kódovaný genem *accD*, tj. β podjednotka acetyl Co-A karboxylázy, je pro správnou funkci rostliny klíčový. Acetyl Co-A karboxyláza, lokalizovaná v chloroplastu

roślin, se podílí na syntéze mastných kyselin (Bogdanova *et al.* 2015). Gen *Bccp3* taktéž vykazoval vysokou variabilitu, jak na úrovni nukleotidové, tak na úrovni aminokyselinové sekvence, způsobenou zejména přítomností velkého množství různých SNPs v DNA sekvenci a přítomností aminokyselinových záměn v sekvenci proteinové. Gen *Bccp3* nevykazoval, oproti genu *accD* přítomnost výrazných inzercí/delecí, což může být dáno tím, že se jedná o gen kódovaný jaderně, je tedy možné, že kódující úseky tohoto genu jsou více konzervované než v případě chloroplastově kódovaného genu *accD*. Gen *Bccp3* kóduje Biotin-karboxyl carrier protein pro acetyl Co-A karboxylázu, který je součástí multi-podjednotkové Acetyl Co-A karboxylázy a slouží jako nosič pro biotin a karboxybiotin v průběhu ATP-dependentní karboxylace acetyl Co-A na malonyl Co-A. Produkty genů *accD* a *Bccp3* se výrazně podílejí na regulaci metabolismu buňky (Bogdanova *et al.* 2015). Takovéto regulační geny bývají často konzervované, jako je tomu například u AMP dependentní protein kinázy, která má důležitou roli při regulaci buněčné homeostázy a vykazuje vysokou konzervovanost (Chen *et al.* 2013). Geny *accD* a *Bccp3* jsou však vysoce variabilní.

Vlivem této vysoké variability bylo obtížné určit příbuznost vybraných linií pouze na základě podobnosti nukleotidových a aminokyselinových sekvencí. Vzorky byly pomocí UPGMA dendrogramů rozděleny do haplotypů na základě podobnosti nukleotidové a aminokyselinové sekvence. Variabilita těchto genů je však tak vysoká, že v případě genu *accD* bylo určeno 11 rozdílných haplotypů na úrovni DNA a 12 haplotypů na úrovni proteinu. Toto číslo je však pravděpodobně reálně nižší, jelikož u některých vzorků nedošlo ke kompletní translaci sekvence DNA do sekvence AK, vlivem přítomnosti stop-kodonu, tyto sekvence se tak jeví během fylogenetické analýzy jako linie vzdálené a pro *accD* protein vykazovaly samostatné haplotypy. Referenční sekvence pro gen *Bccp3* byly rozděleny do pěti haplotypů na úrovni DNA a čtyř na úrovni proteinu (Bogdanova *et al.* 2015). Vzorky použité v této analýze byly rozděleny do 11 rozdílných haplotypů pro lokus *Bccp3* na úrovni DNA a do 11 haplotypů pro *Bccp3* na úrovni proteinu. Metoda UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), tedy Shlukovací analýza, která byla použita pro konstrukci dendrogramů, na základě, kterých byly, v případě analýzy *accD* genu a analýzy nukleotidových sekvencí pro *Bccp3* gen, určovány haplotypy, pracuje pouze s podobností sekvencí a nezohledňuje přítomnost synonymních a nesynonymních mutací a pravděpodobnost transverze/tranzice. Reálné fylogenetické vztahy a haplotypy se tedy mohou do jisté míry lišit, faktem však zůstává, že variabilita těchto genů je, a to i

v případě relativně malého souboru vzorků, čítajícího pouze 19 vybraných linií, velmi vysoká.

Geny *accD* a *Bccp3* jsou součástí komplexu tvořícího multi-podjednotkovou Acetyl Co-A karboxylázu, která je klíčová pro regulaci buněčného metabolismu mastných kyselin, a jsou to geny podílející se na vzniku jaderně-cytoplasmatické inkompability. Takovéto regulační genové komplexy, které jsou tvořeny jaderně a chloroplastově, popřípadě mitochondriálně, kódovanými podjednotkami, mají zřejmě velký vliv na inkompabilitu, jelikož v případě vzniku nové alely, vlivem mutace, ať už v jaderně kódovaném genu nebo jeho cytoplasmaticky kódovaném protějšku, může dojít k narušení interakce mezi těmito geny a k projevu inkompability (Bogdanova *et al.* 2009). Při vzniku inkompability vlivem narušení interakce mezi geny *accD* a *Bccp3* se však zřejmě podílejí i jiné faktory, v případě *Medicago truncatula* byl pozorován i vliv genu *hcs2* (Bogdanova *et al.* 2015), kódujícího holokarboxylázu syntetázu, nesoucí Biotin (Acetyl Co-A karboxyláza) ligásovou doménu, která je také součástí multipodjednotkové Acetyl Co-A karboxylázy. Tento gen se nachází u *M. truncatula* na chromozomu 3 ve vzdálenosti zhruba 500 000 bp od genu *Bccp3*, jeho vliv na vznik inkompability je však menší, než vliv genu *Bccp3* (Bogdanova *et al.* 2015, Bogdanova 2007).

Jaderně – cytoplasmatická inkompabilita hraje důležitou roli v evoluci rostlin a je jednou z významně působících post-zygotických reprodukčních bariér (Aalto *et al.* 2013). U linií vybraných pro tuto studii je vysoká pravděpodobnost vzniku jaderně cytoplasmatické inkompability při křížení. Tato inkompabilita již byla pozorována, při křížení rostlin pěstovaných ve skleníku, kdy se skutečně u některých rostlin projevíly typické příznaky inkompability, jako malý vzrůst, drobné chlorotické listy, redukovaná kořenová soustava apod. Tyto rostliny zpravidla nebyly schopny tvořit květy ani plody a v některých případech byla inkompabilita natolik výrazná, že rostliny byly téměř albinotické a prakticky neživotné, analýza DNA těchto rostlin však nebyla do této práce zahrnuta. Vzhledem k vysoké variabilitě zkoumaných genů lze usuzovat, že populace planého hrachu v jihovýchodním Turecku, odkud byly odebrány vzorky pro tuto analýzu, je stále po evoluční stránce velmi aktivní. Geny *accD* a *Bccp3* zřejmě podléhají selekci a tato selekce může časem přispět k postupné reprodukční izolaci těchto linií a, potenciálně, ke vzniku nových reprodukčně izolovaných populací či poddruhů v dané lokalitě.

8. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo provést analýzu konkrétních forem genů *accD* a *Bccp3* ve vybraných liniích hrachu *Pisum sativum* původem z jihovýchodního Turecka. Chloroplastový gen *accD*, kódující β podjednotku Acetyl Co-A karboxylázy a jaderný gen *Bccp3*, kódující Biotin-karboxyl carrier protein pro acetyl Co-A karboxylázu, jsou součástí komplexu genů kódujících multipodjednotkový enzym Acetyl Co-A karboxylázu, a podílejí se na vzniku jaderně-cytoplasmatické inkompability, která je jednou z významných post-zygotických bariér při hybridizaci rostlin. Z pěstovaných rostlin a z rostlinného materiálu odebraného *in-situ* v jihovýchodním Turecku byla izolována RNA a genomová DNA. Po reverzní transkripci RNA do cDNA byly cílové geny amplifikovány pomocí PCR, získané produkty byly sekvencovány a podrobeny bioinformatické analýze.

Bioinformatickou analýzou bylo zjištěno, že geny *accD* a *Bccp3* jsou vysoce variabilní, a to jak na úrovni DNA sekvence, tak na úrovni sekvence aminokyselinové. Gen *accD* obsahoval velké množství inzercí/deleci a velké množství SNPs, obdobně jako gen *Bccp3*. Tyto geny se významně podílejí na vzniku jaderně-cytoplasmatické inkompability, což je zřejmě způsobeno jejich vysokou variabilitou v rámci populací, a jsou to tedy vhodné kandidátní geny pro studium vlivu jaderně-cytoplasmatické inkompability jakožto významného faktoru v sympatrické speciaci rostlin.

9. Použité zkratky

AA – Aminokyselina

ACC – Acetyl Co-A karboxyláza

cDNA – komplementární DNA

CMS – Cytoplasmatická samčí sterilita

CpDNA – Chloroplastová DNA

CSI – Kryptická self-inkompatibilita

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

GSI – Gametofytická self-inkompatibilita

IRLC – Inverted-Repeat lacking clade

LSI – Late-acting self-inkompatibilita

mRNA – mediátorová RNA

NB-LRR – Nukleotide Binding site Leucin Rich Repeats

ORF – Otevřený čtecí rámeček

PSI – Pylová self-inkompatibilita

RNA – Ribonukleová kyselina

SCR – S-Receptor Cystein Rich Protein

SLG – S-Locus Glycoprotein

SNP – Jedno-nukleotidový polymorfismus

SRK – S-Receptor Kinase

SSI – Sporofytická self-inkompatibilita

UPGMA – Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

10. Literatura a reference

Aalto A E, Koelewijn H P, Savolainen O, (2013) Cytoplasmic Male Sterility Contributes to Hybrid Incompatibility Between Subspecies of *Arabidopsis lyrata*. G3: Genes, Genomes, Genetics 3: 1727 -1740

Baack E, Melo M, Rieseberg L, Ortiz-Barrientos D, (2015) Tansley review, The origins of reproductive isolation in plants. New Phytologist 207/4:968-984

Bogdanova V, (2007) Inheritance of organelle DNA markers in a pea cross associated with nuclear-cytoplasmic incompatibility. Theor Appl Genet 114(2):333-339

Bogdanova V, (2007) Inheritance of organelle DNA markers in a pea cross associated with nuclear-cytoplasmic incompatibility. Theor Appl Genet 114:333–339

Bogdanova V, (2012) Inheritance and genetic mapping of two nuclear genes involved in nuclear–cytoplasmic incompatibility in peas (*Pisum sativum* L.) Theor Appl Genet 124: 1503-1512

Bogdanova V, Zaytseva O, Mglinets A, Shatskaya N, Bogdanova V, Galieva E, Kosterin O, (2009) Genetic analysis of nuclear-cytoplasmic incompatibility in pea associated with cytoplasm of an accession of wild subspecies *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmalh. Theor Appl Genet 118(4):801-809

Bomblies K, Lempe J, Epple P, Warthmann N, Lanz C, Dangl J L, Weigel D, (2007). Autoimmune Response as a Mechanism for a Dobzhansky-Muller-Type incompatibility Syndrome in Plants. PLoS Biol 5(9): e236

Bomblies K, Lempe J, Epple P, Warthmann N, Lanz C, (2007) Autoimmune response as a mechanism for a Dobzhansky-Muller-type incompatibility syndrome in plants. PLoS Biol 5(9): e236

Bomblies K, Weigel D, (2007) Hybrid necrosis: Autoimmunity as a potential gene-flow barrier in plant species. Nat. Rev. Genet. 8: 382–393

Brodmann J, Twele R, Francke W, Yi-bo L, Xi-qiang S, Ayasse M, (2009) Orchid mimics honey bee alarm pheromone in order to attract hornets for pollination, Current Biology 19(16):1368-1372

Eckardt N, (2006) Cytoplasmic Male Sterility and Fertility Restoration. The Plant Cell 18(3): 515–517

Eckardt N, (2006) Cytoplasmic Male Sterility and Fertility Restoration, Review, The Plant Cell 18(3): 515–517

Flegr J, (2009) *Evoluční Biologie* – 2. opravené a rozšířené vydání, Academia. ISBN 987-80-200-1767-3

Greiner H, Herrmann R G, (2011) The role of plastids in plant speciation. *Molecular Ecology* 20: 671–691

Greiner S, Rauwolf U, Meurer J, Herrmann R, (2011) INVITED REVIEW. The role of plastids in plant speciation, *Molecular Ecology* 20(4):671-91

Hanson M R, Bentolila S, (2004), Interactions of Mitochondrial and Nuclear Genes That Affect Male Gametophyte Development, *The Plant Cell*, vol. 16 no. suppl 1 S154-S169

Hosaka K, (1994) Cloning and characterization of the SCS1 gene required for the expression of genes in yeast phospholipid synthesis. *J Biochem (Tokyo)*, 115(1):131-136

Chen L, Xin F, Wang J, Hu J, Zhang Y, Wan, Cao L, Lu C, Li P, Frank S, Yan D, Neumann D, Schlattner U, Xia B, Wang Z, Wu J, (2013) Conserved regulatory elements in AMPK, *Nature* 498:8-10

Iwabuchi M, Kyojuka J, Shimamoto K, (1993). Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial apt6 RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *EMBO J.* 12, 1437–1446

Kepler A, (1998) *Hawaiian Heritage Plants: Revised Edition*, Hawaiian University Press. ISBN 978-0-8248-1994-1

Kosterin O, Vasiliev G, (2015) Nuclear-Cytoplasmic Conflict in Pea (*Pisum sativum* L.) Is Associated with Nuclear and Plastidic Candidate Genes Encoding Acetyl-Co-A Carboxylase Subunits *PLOS ONE* 10(3): e0119835

Kutschera U, Niklas K, (2004) The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis, *Naturwissenschaften* 91:255

Li X, Donnely D J, Jensen T G, (2015) *Somatic Genom Manipulation*. ISBN: 978-1-4939-2389-2

Lowry D B, Modliszewski J L, Wright K M, Wu C A, Willis J H, (2008) Review. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants, *Philosophical Transactions of the Royal Society* 363:3023-3036

McCubbin A, Kao T, (2000) Molecular Recognition and Response in Pollen and Pistil Interaction. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16:333-364

Moison M, Roux F, Quadrado M, Duval R, Ekovich M, Le D H, Verzaux M, Budar F, (2010) Cytoplasmic phylogeny and evidence of cyto-nuclear co-adaptation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 63: 728–738

Noor M A F, (1999) Reinforcement and other consequences of sympatry Review, *Heredity* 83, 503–508

Rieseberg L, Willis J, (2007) Plant Speciation. *Science* 317(5840):910-914

Smýkal P, Kenicer G, Flavell A, Corander J, Kosterin O, Redden J, Ford R, Coyne C J, Maxted N, Ambrose M, Ellis N, (2011) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 9(1):4–18

Šafářová D, Smýkal P, Šafář J, (2015) Konzervační genetika, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta ISBN 987-80-244-4698-1

Whitehead M R, Linde C L, Peakall R, (2015) Pollination by sexual deception promotes outcrossing and mate diversity in self-compatible clonal orchids. *Journal of Evolutionary Biology*, 28: 1526-1541

Whitehead M R, Peakall R, (2014) Strong prepollination reproductive isolation in sympatric sexually deceptive orchids is driven by floral scent. *Evolution* 86:1561-1575

Widmer A, Lexer C, Cozzolino S, (2009) Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity* 102: 31–38