

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ  
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**BRNO 2015**

**DENISA HAMPLOVÁ**



**Agronomická  
fakulta**

**Mendelova  
univerzita  
v Brně**



**Analýza genové exprese během vývoje plodů planého  
a kulturního hrachu**

Diplomová práce

*Vedoucí práce:*

Ing. Pavel Hanáček, Ph.D.

*Konzultant:*

Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

*Vypracovala:*

Denisa Hamplová

---

Brno 2015

## ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci:

Analýza genové exprese během vývoje plodů planého a kulturního hrachu

vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:

.....  
podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Pavlu Hanáčkovi, Ph.D., za pomoc a odborné rady při zpracování práce, také za ochotu a vřelý přístup mi vše vysvětlit. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za cenné rady a Ing. Lence Procházkové za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě patří veliké díky mé rodině, která mě při studiu vždy podporovala.

## **ABSTRAKT**

Studium domestikovaných znaků hospodářsky důležitých plodin je hlavní náplní této diplomové práce. Identifikace genů domestikovaných znaků má velký potenciál pro šlechtění rostlin. Experimentální část byla věnována studiu znaku pukavosti lusku, domestikovanému znaku hrachu (*Pisum sativum* L.). Cílem práce bylo vyhodnotit expresi kandidátních genů pukavosti lusků u hrachu (*Pisum sativum* L.). Pro tento experiment byly použity linie hrachu JI64 (*Pisum sativum* ssp. *elatius* L.) a JI92 (afghánský typ kulturního hrachu *Pisum sativum* ssp. *sativum* L.) a jejich rekombinantní inbrední linie (RILs), vzniklých recipročním křížením. Pomocí metody qRT-PCR (Quantitative reverse transcription PCR) byly analyzovány kandidátní geny *IDEH*, *SHAT*, *bZIP*, *SPT*, *NAC* a porovnány s expresí referenčního genu  $\beta$ -*TUB*.

**Klíčová slova:** Domestikace, hrách, lusk, qRT-PCR, pukavost, kandidátní geny

## **ABSTRACT**

The main focus of this thesis has been to study of domestication traits. Identification of genes of domestication traits has a huge potencial for plant breeding. The experimental part has been devoted to the study of pod dehiscence as a domestication trait in pea (*Pisum sativum* L.). The goal of this work has been to evaluate the expression of candidate genes of pod dehiscence in pea (*Pisum sativum* L.). For this experiment was used JI64 line pea (*Pisum sativum* ssp. *elatius* L.) and JI92 (Afghan cultural type of pea *Pisum sativum* ssp. *sativum* L.) and recombinant inbred lines (RILs) arising from reciprocal crossing. Using the method of qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcription PCR) have been analyzed candidate genes *IDEH*, *SHAT*, *bZIP*, *SPT*, *NAC* and compared with the expression of the reporter gene *β-TUB*.

**Key words:** Domestication, pea, pod, qRT-PCR, dehiscence, candidate genes

## OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Cíl práce</b> .....	<b>11</b>
<b>2 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Historie domestikace plodin</b> .....	<b>12</b>
2.1.1 Genová centra vzniku kulturních rostlin .....	<b>14</b>
2.1.2 Význam a ochrana genetické diverzity.....	<b>18</b>
2.1.3 Původ a domestikace pšenice seté ( <i>Triticum aestivum</i> L.).....	<b>19</b>
<b>2.2 Domestikace rostlin z čeledi bobovitých (<i>Fabaceae</i>)</b> .....	<b>22</b>
2.2.1 Domestikace hrachu ( <i>Pisum sativum</i> L.).....	<b>22</b>
2.2.1.1 Znaky domestikovaného hrachu ( <i>Pisum sativum</i> L.).....	<b>23</b>
2.2.1.2 Geny ovlivňující znaky domestikačního syndromu.....	<b>24</b>
2.2.2 Domestikace sóji ( <i>Glycine max</i> L.) .....	<b>27</b>
2.2.3 Domestikační geny dalších významných leguminóz .....	<b>28</b>
2.2.3.1 Domestikace cizrny ( <i>Cicer</i> L.).....	<b>29</b>
2.2.3.2 Domestikace čočky ( <i>Lens</i> L.).....	<b>29</b>
2.2.3.3 Domestikace fazolu ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	<b>30</b>
<b>2.3 Fylogeneze a diverzita hrachu (<i>Pisum sativum</i> L.)</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4 Genová exprese u hrachu (<i>Pisum sativum</i> L.)</b> .....	<b>33</b>
<b>2.5 Kandidátní geny ovlivňující pukavost lusku hrachu (<i>Pisum sativum</i> L.)</b> .....	<b>35</b>
<b>3 MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>36</b>

3.1 Rostlinný materiál .....	36
3.2 Izolace RNA .....	37
3.3 Reverzní transkripce RNA na cDNA.....	38
3.4 Návrh primerů pro geny <i>IDEH</i> , <i>SHAT</i> , <i>bZIP</i> , <i>SPT</i> , <i>NAC</i> , $\beta$ - <i>TUB</i> ..	40
3.5 Kvantitativní Real-Time PCR.....	41
3.6 Ověření specifity amplifikace cDNA.....	42
4 VÝSLEDKY .....	43
4.1 Ověření specifity primerů .....	43
4.2 Exprese genů u planých a kulturních forem hrachu ( <i>Pisum sativum</i> L.) .....	44
4.3 Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR.....	53
5 DISKUZE.....	56
6 ZÁVĚR .....	57
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	58
8 SEZNAM OBRÁZKŮ .....	69
9 SEZNAM TABULEK .....	71
10 SEZNAM ZKRATEK .....	72



# 1 ÚVOD

Hrách setý (*Pisum sativum* L.) je jedna z nejdůležitějších a nejstarších pěstovaných plodin na světě. Obecně jsou bobovité (*Fabaceae*) druhou nedůležitější čeledí pokrývající zhruba 27% celkové světové produkce plodin. Luskoviny jsou pěstované na píci, ale hlavně pro nutričně bohatá semena využívaná jako potravina a krmivo pro zvířata. Hrách i další pěstované plodiny byly postupem času domestikovány do dnešní podoby (Zohary et al., 2012). Jinými slovy, člověk vybíral plodiny s nejvýhodnějšími pěstitelskými vlastnostmi, které nejvíce vyhovovaly jeho potřebám, a ty přeséval, čímž vznikaly domestikované plodiny z původně planých forem až do nynějších kulturních odrůd, kultivarů a variet. (Doebley et al, 2006). Hrách byl domestikován před více než deseti tisíci lety v době kamenné a bronzové a nyní je třetí nejpěstovanější luskovinou mírného pásu (Harlan, 1975). Bílkovinná část semene pokrývá 25%, což je jeden z hlavních důvodů oblíbenosti této hospodářské plodiny (Zohary a Hopf, 2000).

Domestikované druhy rostlin byly pomocí selekce člověkem geneticky pozměněny tak, že dnes tyto druhy téměř nepřežijí ve volné přírodě bez lidského zásahu. Běžné znaky kultivarů zahrnují například větší plody, s tím spojený vyšší výnos, dále mají pozměněnou chuť a další agronomicky výhodné znaky, jako je ztráta či potlačení dormance semen, zkrácená doba kvetení, nepukavé plody či tenčí obalové vrstvy semen pro snadnější a rychlejší klíčení (Diamond, 2002).

Zemědělství je však nyní závislé na poměrně malém množství domestikovaných plodin, které udržují narůstající světovou populaci lidí. Z více než 275 000 druhů kvetoucích rostlinných druhů je méně než 1% domestikováno. Z toho tři druhy z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), konkrétně pšenice setá (*Triticum aestivum* L.), kukuřice (*Zea mays* L.) a rýže setá (*Oryza sativa* L.), poskytují více než 60% celosvětových kalorií. Výzkum důsledků domestikace a studium znaků domestikačního syndromu, jsou důležité pro moderní rostlinnou vědu a šlechtění rostlin.

Domestikační syndrom označuje rozdíly mezi domestikovanými rostlinami a jejich předky. Kulturní rostliny jsou dynamické entity, proto ne všechny parametry odlišující kulturní rostliny od planých druhů jsou výsledkem domestikace. Výsledky studia domestikačních znaků poskytují zásadní informace pro budoucí šlechtění plodin jak pro

potravu, krmivo, tak i pro farmaceutické účely či výrobu bioplynu a bioplastů (Flint-Garcia, 2013).

Hrách je samosprašná rostlina a jeho genetická diverzita, tedy druhová rozmanitost, je určována mírou cizosprášení a četností výskytu mutací. Diverzita je z velké části také ovlivňována odrůdou, proto se šlechtitelé v dnešní době snaží najít agronomicky cenné znaky v planých formách hrachu a zvýšit tak genetickou diverzitu, tedy celkovou plasticitu rostliny, která byla domestikací značně ochuzena. Jedná se například o zanesení genů rezistence vůči chorobám a škůdcům či jiných významných genů, které byly bezděčně vyselektovány během domestikace (Heslop-Harrison a Schwarzacher, 2007).

Obsahem této práce je literární přehled o domestikaci plodin a experimentální část je zaměřena na testování kandidátních genů ovlivňujících pukavost zralých lusků hrachu za použití moderních technik molekulární biologie. Identifikace genu pro pukavost a jeho lokalizace je důležitá pro šlechtění nových odrůd hrachu. Tento znak způsobuje výnosové ztráty jako je tomu i u jiných předků kulturních plodin, například u sóji luštinaté (*Glycine max* L.), kde je již tento gen identifikován (Dong et al., 2014). Znalost genetických mechanismů usnadňuje šlechtitelský proces, tedy urychluje vnesení zemědělsky výhodných vlastností z planých druhů do elitních šlechtitelských linií. Dále obohacují fakta o evoluci šíření semen a celkové domestikaci plodin.

## 1.1 Cíl práce

Cílem této práce je provedení a vyhodnocení analýzy genové exprese kandidátních genů, které mohou souviset se ztrátou pukavosti zralých lusků hrachu, jedním z hlavních domestikčních znaků, kterým se od sebe odlišuje kulturní hrách (*Pisum sativum* ssp. *sativum* L.) a planý hrách (*Pisum sativum* ssp. *elatius* L.). Exprese kandidátních genů je sledována během vývoje plodů jak planých, tak kulturních linií hrachu a jejich kříženců, pomocí metody kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR).

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Historie domestikace plodin

Termínem domestikace rozumíme proces zvyšování vzájemné závislosti mezi lidskou společností a rostlinnými a živočišnými populacemi. Je to základní proces biologické a kulturní evoluce, kdy lidé modifikují genetické vlastnosti cílových populací tím, že zasahují do životního cyklu a umožňují tak jejich množení a expanzi na místa vzdálená od jejich planých předků (Zeder et al., 2006). Jak již bylo zmíněno, nejstarší kulturní plodiny pocházejí z původních planých druhů. Člověk ovlivňoval fenotypové variace během domestikace, která započala již v době neolitu, tedy mladší době kamenné, často také označována jako neolitická zemědělská revoluce. Tehdy člověk přešel od lovu k chovu zvířete a plánovanému pěstování rostlin a začal tak vývoj člověka zemědělce, který se usadil v místech s hojnějším výskytem potřebných plodin. Změna člověka z lovce a sběratele na zemědělce, tedy zemědělská revoluce, umožnila vznik lidských sídel, pak měst, států a dnešní civilizace. (Harlan, 1975).

Domestikace není okamžitý jev, kdy by se z planého druhu náhle transformovala domestikovaná forma, ale spíše jde o kumulativní proces, kdy dochází k postupným změnám mutualistického vztahu a po čase jsou obě strany na sobě závislé (Zeder et al., 2006). Domestikace zvířat a promyšlené pěstování užitečných plodin začalo asi před deseti tisíci lety v lokalitách „úrodného půlměsíce“. Tedy v Přední Asii, od Izraele přes Libanon, Irák až po Turecko. Euroasijský kontinent poskytl nejlepší možnosti pro vznik a rozvoj civilizace (Harlan, 1975; Smirnov, 1989). Plané druhy člověk ovlivňoval tím, že je sklízel, doséval a odstraňoval konkurenční druhy. Zemědělsky využívané rostliny člověk rozšířil na velké plochy po celém světě a tím se diferencovaly krajové odrůdy.

Domestikační znaky mohou být morfologické, biochemické či vývojové znaky určující odlišný fenotyp od svých předků (Meyer a Purugganan, 2013). Z planých forem rostlin se staly rostliny lišící se od svých předků v různých morfo-fyziologických znacích, například současným klíčením semen, ztrátou dormance, rychlejším růstem, zbarvením plodů, dále nepukáním lusků, nerozpadavostí klasů či synchronizovaným zráním všech plodenství na rostlině. Dále se domestikované rostliny liší zesílením některých pletiv a orgánů, včetně zásobních orgánů (hlíz, semen, cibulí) a nadměrným zvýšením obsahu zásobních látek,

jako jsou cukry a tuky v semenech, kořenech a hlízách či ztrátou hořkosti plodu. Ekonomicky důležité orgány domestikovaných plodin jsou mimo jiné také lépe stravitelné pro člověka (Sakuma et al., 2011). Tyto změny mnohdy zamezily planému růstu, jako například u kukuřice (*Zea mays*), jejíž velká palice znemožňuje vývin jednotlivých obilek. Pokud by z palice vyklíčily všechny obilky, rostlinky by se navzájem utlačily a žádná z nich by nevyrostla do reprodukční fáze. Během domestikace totiž došlo k morfologické změně klasu, kdy se z původně prstovité rozvětveného klasového větene vyvinula dnešní palice (Doebly et al., 1996).

Domestikace plodin je oblast zájmu genetiky a také archeologie. Genetikové hledají genetické markery domestikace v genomu domestikovaných druhů a archeologové testují archeologické záznamy s komplementárními markery, jako důkaz lidského chování, které zapříčinilo genetické a morfologické změny spojené s domestikací v cílových organismech. Expanze genetických studií domestikace plodin nastala díky zdokonalení technik extrakce, amplifikace a sekvenace DNA a nových metod pro fylogenetickou analýzu. Také vývoj dokonalejších technik mikroskopování zvýšil schopnost archeologů detekovat a datovat důkazy domestikace rostlin a zvířat (Zeder et al., 2006).

Mezi archeologické markery pro rozlišení plané a domestikované formy patří morfologické změny. Heiser (1988) identifikoval několik morfologických změn semen, které nevznikly záměrně, ale v důsledku výběru, tedy nevědomé selekce vyplývající z lidské činnosti. Když lidé začali sklízet a skladovat rostliny a semena po delší období, nevědomky vytvořili nové a výrazně selektivní prostředí a rostliny se postupně adaptovaly. Jedna z nejdůležitějších změn je současné dozrání semen, dále ztráta přirozeného disperzního mechanismu semen, větší velikost semene a současné klíčení semen v souvislosti se ztrátou dormance klíčení a redukcí tloušťky obalových vrstev semene. Záměrná selekce specifických parametrů, jako je velikost plodů, barva či tvar rostliny, způsobuje také morfologické změny, které jsou často pozorované v archeologických záznamech.

Genetické markery domestikace jsou rozdíly v DNA, které hrají důležitou roli při genetickém studiu domestikace. Jednoleté rostliny a plodiny s krátkým životním cyklem se vyvíjejí rychleji než vytrvalé rostliny či zvířata, reagují tedy rychleji na měnící se selektivní tlaky během domestikace. Ploidita DNA plodin je výrazným rozdílem v rámci genetického

studia rostlin a živočichů a zároveň značnou překážkou při studiu genomu z hlediska objemné velikosti.

Jaderný, mitochondriální a chloroplastový genom se vyznačuje výraznými rozdíly v rychlosti evoluce, které jsou využívány při studiu původu plodin či zvířat. Například mtDNA má až desetkrát vyšší rychlost evoluce u zvířat, proto je ideální pro studium genetických rozdílů mezi domestikovanou a divokou zvěří. Méně variabilní je u zvířat nDNA, nicméně mikrosatelity jsou také často využívány (Purugganan a Fuller, 2009).

U rostlin se mitochondriální genom vyvíjí pomaleji ve srovnání s chloroplastovým genomem, v důsledku nižší mutační rychlosti. Nejrychleji se však vyvíjí jaderný genom, proto se při studiu domestikace rostlin využívá právě nDNA, kde je vysoký počet polymorfních markerů. Výhodou je univerzálnost, protože rDNA je u všech rostlin. Další výhodou jsou nekódující oblasti rDNA, protože jsou velmi variabilní. Také se geny rDNA vyskytují v mnoha kopiích, pro analýzu tedy stačí i malé množství vzorku DNA. Jaderná DNA se dědí po obou rodičích, lze tedy sledovat otcovskou i mateřskou linii (Coulibaly, 2002).

Mezidruhové křížení rostlin je časté, stejně tak je častý tok genů mezi kulturními plodinami a planými druhy. Pro testování těchto genů je využíváno vysoce variabilních markerů, které nejsou ovlivněny prostředím. Přenos genů z planých do kulturních forem rostlin, byl nalezen na základě morfologických znaků a následně potvrzen molekulárními markery u slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) bavlníku (*Gossypium* sp.) a kukuřice (*Zea mays*). Tok genů v opačném směru, tedy z kulturních rostlin do planých druhů byl nalezen u dýně obecné (*Cucurbita pepo* L.) a fazolí (*Phaseolus* sp.). Tento fakt je důležitý v souvislosti s hodnocením rizik úniku genů z geneticky modifikovaných rostlin (Papa a Gepts, 2003) a především znemožňuje analýzu původu plodin a oblasti domestikace (Coulibaly, 2002).

### **2.1.1 Genová centra vzniku kulturních rostlin**

V roce 1859 publikoval Charles Darwin, významný přírodovědec a zakladatel evoluční biologie, práci „O původu druhů přírodním výběrem“, která je postavena na poznacích z plavby kolem světa na slavné lodi Beagle. Popsal zde proces domestikace rostlin i živočichů a především podstatu přirozeného výběru. Darwin sledoval, že se rodové znaky

domestikovaných plodin objevují často i v potomstvu odlišných druhů a to ho dovedlo k myšlence, že vlivem lidské selekce pochází domestikované druhy z planých druhů (Costa a Wallace, 1963). Skutečnost, že v této době ještě nebyly položeny základní kameny genetiky, tedy Mendelovy zákony, je pozoruhodná. I přestože Darwin nebyl obeznámen s prací Mendela, popisoval různost živých forem jako důsledek přírodního výběru z variability populace druhu. Darwinova teorie evoluce popisuje, že všechny druhy pochází ze společného předka. Tato teorie nebyla potvrzena, protože v jejich srovnávání hrály důležitou roli pouze morfologické znaky. Avšak nyní, v době využívání metod molekulární biologie, byla teorie téměř potvrzena podobností funkčních bílkovin mezi odlišnými druhy. Fakt evoluce je potvrzen objektivními testy, čerpající z mnoha srovnávacích analýz bílkovinných sekvencí i sekvencí nukleových kyselin, jejichž bohatým zdrojem jsou bioinformatické databáze (Larson a Brauer, 2009).

Další významnou osobností byl Nikolaj Ivanovič Vavilov, jehož největším přínosem do historie kulturních plodin byla charakterizace a stanovení tzv. genových center kulturních rostlin (obr. 1). Vavilov byl světově známý ruský badatel, vědec, genetik, šlechtitel a botanik, který se tímto nesmrtelně zapsal do historie šlechtění zemědělských plodin. Organizoval a vedl vědecké expedice po celém světě, které mu umožnily popsat původ některých důležitých plodin. Vavilov osobně nasbíral přes šedesát tisíc vzorků rostlin, z toho téměř tři tisíce vzorků kukuřice. Vavilova práce byla popsána v díle nazvaném *Origine and Geography of Cultivated Plant* z roku 1926. Anglická verze byla vydána až po jeho smrti, v roce 1992 (Savage et al., 1992).

Počátkem 20. století Vavilov formuloval zákon homologických řad v dědičné proměnlivosti spolu s teorií o centrech původu kultivovaných plodin. Zabýval se řešením mobilizace rostlinných zdrojů pro potřeby lidstva. Vavilov zaměřil svoji pozornost především na kultivované rostliny a jejich příbuzné druhy, které se nachází ve volné přírodě. Hlavním cílem bylo identifikovat geografické oblasti s největší genetickou diverzitou jednotlivých druhů a rodů kultivovaných rostlin a využít je jako zdroj užitečných vlastností pro šlechtění nových kultivarů a hybridů. Vavilov přijal Darwinovu myšlenku, že maximum druhů a variet s různými znaky jsou koncentrovány v oblastech původu rodů (Kuptsov et al., 1989). Vavilov pozoroval flóru kultivovaných rostlin ve více než 60 zemích světa a s pomocí dalších vědců shromáždil unikátní soubor rostlin, asi 400 000

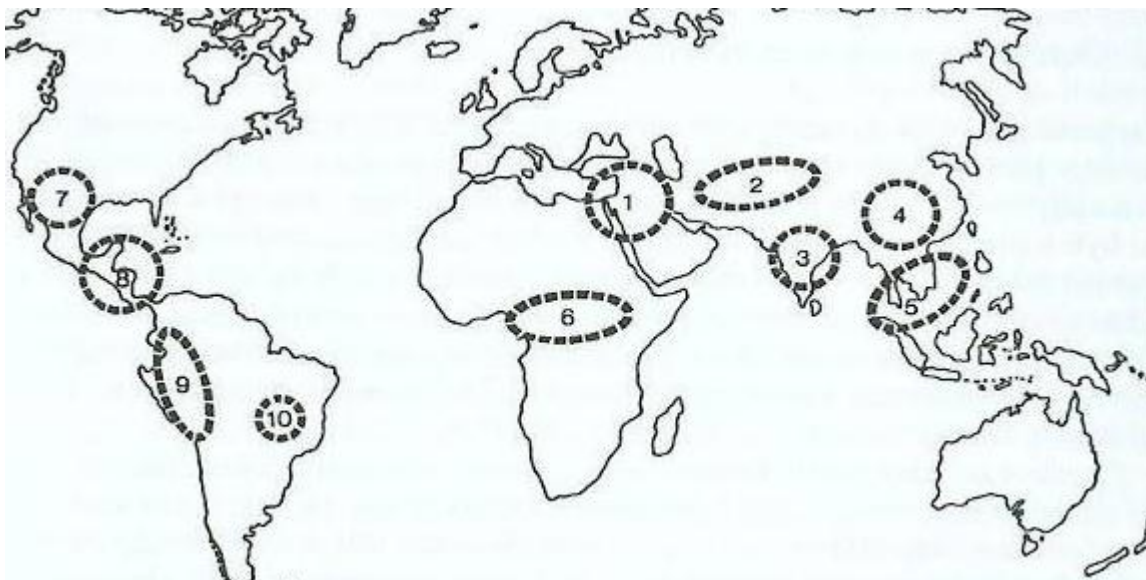
druhů, vhodných jako výchozí materiál pro budoucí šlechtění. V roce 1926 byly výsledky zveřejněny v knize *Origine and Geography of Cultivated Plant* a v roce 1940 byla dokonce vydána i rozpracovanější verze. Další autoři se poté podíleli na rozšíření geografických center z původně sedmi na deset oblastí.

Objev ovlivnil mnoho dalších odvětví vědy, především šlechtění rostlin a také studium evoluční genetiky. Vernadsky také věnoval pozornost srovnávání evoluce a šlechtitelského procesu a věřil, že šlechtění rostlin i živočichů je produktem lidské aktivity po mnoho tisíc let (Miroyan, 2006).

Vavilova kolekce kultivovaných rostlin a jejich příbuzných, byla prvním světovým pokusem o zachování maxima genetické diverzity. Jeho cílem bylo zvýšení efektivity využívání globálních biologických zdrojů v oblasti šlechtění. Zvláště se zaměřil na 8 druhů obilovin a shromáždil všechny možné genetické varianty pro rozšíření výchozího materiálu pro šlechtění. Světová vědecká komunita oprávněně jmenovala Vavilova za zakladatele teoretického základu rostlinného šlechtění. Dodnes je v Institutu rostlinné výroby N. I. Vavilova v Petrohradě jedna z největších kolekcí rostlinného genetického materiálu v podobě semen, kořenů a vegetativních částí rostlin. V porovnání s mírou diverzity pozorovanou Vavilovem před 100 lety se celková genetická diverzita v dnešní době značně zúžila.

Druhý zákon, již zmíněný, o homologických řadách v dědičné proměnlivosti, byl formulován Vavilovem v roce 1922. Již v této době zřetelně viděl fenotypovou podobnost různých rostlinných druhů, která ho navedla na formulaci zákona o homologních sériích dědičné proměnlivosti. Vavilův zákon se okamžitě stal základem pro nové odvětví vědy, tedy komparativní genetiky (Smirnov, 1989). S využitím molekulární biologie a studia odlišností na genetické úrovni u různých taxonů, byla tato teorie potvrzena. Genomové sekvenování mnoha rostlinných i živočišných druhů a jejich srovnávání potvrdilo základní homologii genů metabolických drah, z čehož plyne, že se dvouděložné a jednoděložní rostliny od sebe oddělily od společného předka asi před 135 – 200 miliony lety.





**Obr. 1** Oblasti původu a první domestikální oblasti kulturních rostlin a domácích zvířat (Chloupek, 2000)

1. Blízký východ. Před 7000 př. Kr.: pšenice, ječmen, hrách, čočka; ovce, koza. Kolem 5000 př. Kr.: vikev, len; skot, prase. Kolem 2000 př. Kr.: palma datlová, smokvoň, cibule, hrušeň, jabloň; velbloud jednohrbý, osel, kachna, husa, včela. Kolem 500 př. Kr.: artyčok; kočka.
2. Střední východ a centrální Asie. Před 4000 př. Kr.: réva vinná, oliva; velbloud dvouhrbý. Bez známého data: pohanka, vojtěška, konopí, čirok, vikev, zelí, mrkev, oves; kůň, jak.
3. Indie. Před 3000 př. Kr.: palma datlová, mango. Bez známého data: čajovník, lilek, tykev; vodní buvol, kur domácí.
4. Čína. Před 4000 př. Kr.: sója, rýže, čirok; prase, kur domácí, kachna. Kolem 1000 př. Kr.: pomerančovník, broskvoň, cibule, zelí; bourec morušový.
5. Jihovýchodní Asie. Bez známého data: třtina cukrová, rýže, banánovník, citrus, čajovník, palma kokosová.
6. Afrika. Kolem 2000 př. Kr.: vodní meloun, čirok, skočec (*Ricinus sp.*); osel, husa.
7. Severní Amerika. 5000 př. Kr.: fazol, tykev, slunečnice, jahodník; pes, krůta.
8. Střední Amerika. Kolem 6000 př. Kr.: kukuřice, tykev, fazol; Bez známého data: rajče, bavlník, avokádo, papája, slunečnice, kakao, maniok; krůta.

9. *Andské oblasti Jižní Ameriky. Kolem 2500 př. Kr.: brambor, batáty; lama, alpaka. Bez známého data: podzemnice olejná, fazol.*
10. *Jižní Amerika. Bez známého data: podzemnice olejná, ananas, jam, bavlník, kakaovník, tabák, paprika (Chloupek, 2000).*

Geografická centra původu se vyznačují různorodými podmínkami prostředí, které se často mění, proto jednostranná selekce není možná. Jedná se o podhůří Himalájí, Hindúkuše, Blízkého východu, Balkánu, Apenin a And. Pohoří umožnila vznik různých forem rostlin v jednotlivých údolích, díky lokální izolaci. Velké výkyvy teplot a ultrafialové záření v horských polohách způsobily mutace a daly vznik křížencům i u samosprašných rostlin. Znaky řízené dominantní alelou se nachází u rostlin, které rostou v samotných středech genových center, zatímco znaky řízené recesivní alelou se nachází v rostlinách rostoucích na periferních oblastech. Dominantní alela je většinou původnější. S větší vzdáleností od původních center klesá variabilita druhu. Nicméně později bylo zjištěno, že se nemusí shodovat oblasti s vysokou variabilitou s centry původu. Příkladem je pšenice setá (*T. aestivum*), která má vysokou variabilitu v Etiopii, ale předek v této oblasti nebyl nalezen, pravděpodobně zde došlo k procesu introdukce (Harlan, 1975; Smirnov, 1989).

### **2.1.2 Význam a ochrana genetické diverzity**

U domestikovaných rostlin či zvířat došlo k redukci diverzity, tzv. efektu hrdla láhve. Jedná se o typ genetického driftu, což je náhodná změna frekvence alel v populaci, která se dědí z generace na generaci, způsobená mechanismem pohlavního rozmnožování. Genetický drift má výrazné následky v populaci s nízkým počtem jedinců, postupně může dojít k absenci jedné z alel, tedy fixaci alely jiné. Efekt hrdla láhve se vyskytuje u populace, která prošla silným snížením početnosti, ale přežila a později se její početnost opět zvýšila. Genetická variabilita byla však tímto procesem snížena, neboť některé alely vymřely spolu se svými nositeli v průběhu snížení početnosti (Cox a Moore, 1999). Rozsah snížení rozmanitosti závisí na časovém úseku a počtu jedinců v populaci. Vyšší redukce diverzity může nastat ve specifických oblastech genomu, které jsou spojeny s cílovými místy intenzivní selekce, kdy dochází v populaci k fixaci určité alely, přičemž mohou být

fixovány i jiné přilehlé lokusy, čímž je diverzita snižována v tzv. selektivním cyklu. Efekt hrdla láhve byl popsán u několika plodin, například u prosa (*Panicum* sp.), bavlníku (*Gossypium* sp.), bramboru (*Solanum* sp.) a fazolu (*Phaseolus* sp.) (Iqbal, 2001, Zeder et al., 2006).

Další důležitý faktor domestikace je introgrese, což je vnášení a následná exprese genů určitého druhu do jiného genomu, například mezidruhovým křížením a následným zpětným křížením. V průběhu domestikace hrají důležitou roli i mutace a rekombinace, nicméně s vývojem moderního šlechtění dochází k ochuzování diverzity, tzv. genetické erozi, v důsledku pěstování nižšího počtu druhů a vzájemně příbuzných odrůd (Papa a Gepts, 2003).

Ochrana genetické diverzity je velmi důležitá a již v Bibli najdeme zmínku o této záležitosti. Botanické zahrady byly první místa, kde byla shromažďována sbírka okrasných a ovocných stromů. Jedna z nejvýznamnějších botanických zahrad je v Kew u Londýna s padesáti tisíci druhy. V současné době se provádí polní sběry pro vědecké účely v oblastech výskytu rostlin s vysokou genetickou diverzitou a v oblastech s výrazným prostředím, kde by mohly být přítomny jedinečné genotypy. Také se sbírají plané i plevelné druhy (Holden et al., 1993).

Rostliny byly rozděleny z hlediska potencionálního obohacení rozmanitosti na tzv. primární gene-pool, který zahrnuje pěstované druhy i druhy příbuzné, z nichž je možno získat geny pro šlechtění. Dále sekundární-gene pool, který zahrnuje druhy, jejichž přenos genů je komplikovaný, například jsou potomci  $F_1$  generace sterilní. Do třetí kategorie patří rostliny terciálního gene-poolu, u kterých je vyžadováno speciálních postupů pro přenos genů, jako jsou například explantátové kultury či genetické modifikace.

Samotnou ochranou diverzity se rozumí konzervace rostlinného materiálu a jeho udržování. Uskutečňuje se buď *in situ*, tedy v místech přirozeného vývoje, ale také *ex situ*, tedy v genových bankách. V genových bankách se často využívají techniky explantátových kultur, tedy uchovávání v *in vitro* podmínkách (Harlan, 1975).

### **2.1.3 Původ a domestikace pšenice seté (*Triticum aestivum* L.)**

Jak již bylo zmíněno, pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) s genomem AABBDD patří mezi tři nejpěstovanější plodiny světa, proto je třeba uvést domestikační proces této

důležité plodiny. Pšenice poskytuje důležitý zdroj energie, obsahuje proteiny a vlákninu a je nezbytnou součástí několika pokrmů, jako je chléb či těstoviny.

Hexaploidní pšenice pochází ze spontánního křížení tří homologních genomů, A, B, D, z nichž každý obsahuje sedm párů chromozomů ( $2n = 6x = 42$ ). Již Vavilov rozpoznal, že každý genom pšenice má vlastní geografické centrum rozmanitosti a z toho odvodil, že i místa původu jednotlivých genomů jsou tedy odlišná.

Donorem genomu A byla diploidní pšenice jednozrnka (*Triticum monococcum* L.), jež má původ v Malé Asii (Dvořák et al., 1998). Jiní autoři se přiklánějí k tomu, že genom A pochází z *Triticum uratu* L., která má vyšší sekvenční podobnost s hexaploidní pšenicí (Petersen et al., 2006). Donor genomu B není zcela objasněn, protože v experimentech nedošlo ke kompletnímu párování chromozomů k žádnému planému druhu pšenice. Nejvyšší stupeň podobnosti genomu B však měla pšenice *Triticum villosum* L., která vykazuje podobnost izoenzymů s *T. aestivum*. (Heider, 2013). Shu et al. (1993) však tuto pravděpodobnost vyvrátil svými výsledky restriční analýzy, které odhalily četné rozdíly v ctDNA a mtDNA posuzovaných druhů.

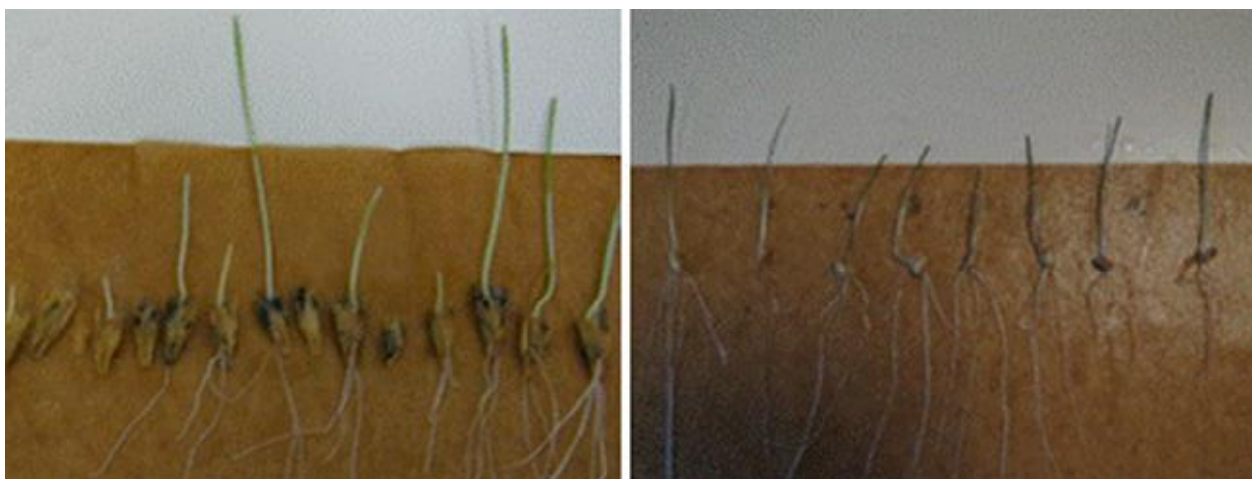
Tetraploidní pšenice tvrdá (*Triticum turgidum* ssp. *durum* L.) s genomem AABB pochází z východního Středomoří a severovýchodní Afriky a hexaploidní pšenice setá s genomem AABBDD se původně vyskytovala v oblastech Afganistánu a Turkmenistánu (Vavilov, 1926). Původ plané dvouzrnky (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* L.) se nachází v lokalitách úrodného půlměsíce, tedy oblastech od Izraele až po západní Írán (Savage et al., 1992). Vavilovy závěry byly potvrzeny díky molekulárním technikám, tedy jihovýchod Turecka byl určen jako původní lokalita diploidní jednozrnky, východ Středomoří a severovýchod Afriky jako původní oblast výskytu pšenice tvrdé (*T. turgidum* ssp. *durum*) a severozápadní Írán původní lokalitou pro hexaploidní pšenicí (Dvořák et al., 2011).

Po důkladném studiu geografické diverzity a domestikace se však ukázalo, že se mohou místa původu plodin lišit od lokalit s vysokou genetickou diverzitou daných plodin, jak je tomu právě u domestikované pšenice. Předpokládalo se, že pšenice byla domestikovaná na cípu úrodného půlměsíce, ale dle publikace z roku 2009 byly první známky domestikace v Diyarbakiru v jihovýchodním Turecku (Luo et al., 2009). Vavilov došel k závěru, že *T. aestivum* má nejvyšší diverzitu v horských oblastech Afganistánu,

Turkmenistánu a Íránu, ale předek hexaploidní pšenice *Aegilops tauschii* L., donor genomu D, se v těchto lokalitách nevyskytuje, což vyvrací teorii o evoluci *T. aestivum* v těchto místech (Dvořák et al., 1998). K objasnění těchto nesrovnalostí bylo využito rozdílu v sekvenci nukleotidů a RFLP ve vzorcích plané a domestikované. Výsledky ukázaly, že nejvyšší stupeň diverzity plané pšenice je v severozápadní části Izraele, Libanonu a jihozápadní Sýrii. Naopak diverzita klesá v severních a východních oblastech úrodného půlměsíce, včetně Turecka, Iráku a Íránu (Akhunov et al., 2010). Nejvyšší diverzita domestikované pšenice byla stanovena v oblasti Středomoří a nejnižší ve východním Turecku (Luo et al., 2009).

Existuje několik rozdílů mezi domestikovanou a planou pšenicí, některé byly již zmíněny v obecném přehledu o domestikaci plodin. Například u plané pšenice dvouzrnky (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides*) dochází po dozrání obilek k rozpadu klasu, zatímco u domestikované formy nikoliv (*T. turgidum* ssp. *dicoccum*, *T. turgidum* ssp. *durum*). Byla provedena kvantitativní analýza špičky klasu u několika zástupců planých a domestikovaných genotypů, ale fenotypová spojitost s rozpadavostí nebyla potvrzena (Tzarfati et al., 2013).

Dalším znakem domestikované pšenice je mnohonásobně vyšší klíčivost. Již před více než sto lety bylo publikováno, že zralé zrno domestikovaných rostlin, tedy tradičních i moderních kultivarů, má klíčivost až 95 % (obr. 2), jak je tomu u domestikované pšenice dvouzrnky (*T. dicoccum*), zatímco planá pšenice má klíčivost pouze 55 % (Cook, 1913).



**Obr. 2** Test klíčivosti plané pšenice dvouzrnky (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides*) a domestikované pšenice tvrdé (*T. turgidum* ssp. *durum*) (Cook, 1913)

## 2.2 Domestikace rostlin z čeledi bobovitých (*Fabaceae*)

Čeď bobovitých (*Fabaceae*) patří do jedné z početně nejbohatších čeledí vůbec, hned po vstavačovitých (*Orchidaceae*) a hvězdicovitých (*Asteraceae*). Zahrnuje 730 rodů a 19400 druhů. Mnoho druhů této čeledě má velice důležitý hospodářský význam, domestikovaných je přibližně 41 druhů. Již po tisíciletí jsou tyto druhy využívány jako krmivo pro zvířata, příkladem je tolíce vojtěška (*Medicago sativa* L.) a jetel (*Trifolium* sp.). Jsou oblíbenými plodinami pro svá vysoce výživná semena, která tvořila významnou složku potravy již mnoha raných civilizací. Neopomenutelnou vlastností této čeledě je schopnost přirozeně fixovat vzdušný dusík, čehož se využívá pro tzv. zelené hnojení (Weeden, 2007).

Mnoho tradičních plodin z čeledi bobovitých, jako je cizrna (*Cicer arietinum* L.), čočka (*Lens culinaris* L.) a vikev (*Vicia sativa* L.) pochází původně z Blízkého východu. Zde má také hrách primární centrum diverzity, zatímco Středomoří a Afrika jsou považována za sekundární centra diverzity, tedy planého předka zde nenajdeme, pouze příbuzné introdukované druhy. (Zeven a Zhukovsky, 1975; Ljuština a Mikić, 2010).

V Sýrii byly nalezeny důkazy o pěstování leguminóz již z doby deset tisíc let př. n. l., konkrétně semena čočky (*Lens* sp.), cizrny (*Cicer* sp.), hrachoru (*Lathyrus* sp.) a bobu (*Vicia* sp.) (Tanno a Willcox, 2006).

### 2.2.1 Domestikace hrachu (*Pisum sativum* L.)

Semena hrachu (*Pisum sativum* L.) se řadí mezi historicky první nálezy kultivovaných plodin. Hrách byl součástí každodenního jídelníčku evropských lovců již na konci doby ledové, o čemž svědčí i nálezy v Santa Marii ve Španělsku z doby 12000 – 9000 př. n. l. (Aura et al., 2005). Hrách se rozšiřoval do Evropy z jihovýchodu a pokračoval podél řeky Dunaje. Rozšiřování hrachu bylo velmi rychlé, existují totiž důkazy o výskytu hrachu ze stejného časového období na různých místech. Dokonce i lingvistický důkaz potvrzuje přítomnost hrachu ve všech regionech Evropy, protože většina Evropanů má vlastní název pro označení hrachu, stejně tak je to i u čočky. (Mikić et al., 2006).

V oblasti jihovýchodního Bulharska byla nalezena čočka, hrachor, vikev a hrách a také obilniny z doby 5790 – 5630 př. n. l. (Marinova a Popova, 2008). Více než 100 archeobotanických nálezů z jihozápadního Německa z doby 5600 – 4300 př. n. l. nasvědčují tomu,

že hrách byl běžně pěstován jak v neolitu, tedy mladší době kamenné, tak v době bronzové, železné a raném středověku. U Bodamského jezera byla nalezena zuhelnatělá semena z doby 3900 př. n. l. Dále existují důkazy o pěstování hrachu ve Francii již z doby 5000 – 4800 př. n. l. až 600 n. l. a pravděpodobně to byla i zde jedna z prvních pěstovaných plodin spolu s čočkou a obilninami (Bakels, 1999). Dle důkazů z Turecka z rané doby bronzové, tedy 2750 – 2500 př. n. l., se pěstovala více cizrna v porovnání s hrachem, zatímco čočka se pěstovala ve stejné míře jako hrách (Sadori et al., 2006). V Rakousku byl hrách hlavní plodinou každodenní výživy horníků v době 700 – 200 př. n. l.

Hojný výskyt planých forem hrachu v lokalitách Blízkého východu je důkazem toho, že právě zde byl původní výskyt hrachu. Příkladem je červeno-žlutá forma hrachu *Pisum fulvum* Sibth. a Sm. či *Vavilovia formosa* Stev., což je nejbližší příbuzný druh rodu *Pisum* a *Lathyrus*. (Kenicer et al., 2009). Pukavost lusku s doletem semene až dva metry od mateřské rostliny, výrazně přispěla k rozšíření těchto rodů do ostatních oblastí. V Evropě byly nalezeny pouze plané či poloplané formy vysokého hrachu *P. sativum* subsp. *elatius*, které se vyskytují v jižních oblastech na Balkáně a na pobřeží Černého moře v Řecku, Bulharsku a Srbsku (Mikić et al., 2009).

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

Mezi hlavní kritéria určení domestikované formy hrachu (*Pisum sativum*) patří nepukavost lusků, větší velikost semen a hladký povrch osemení, tedy obalová vrstva semene, což je nejspolehlivější znak pro identifikaci domestikované formy (Butler, 1998). Planý hrách vykazuje pukavost lusku po dozrání semen, zatímco domestikovaný hrách má lusky nepukavé, stejně jako krajové odrůdy, například endemický druh z Etiopie *Pisum abyssinicum* A. Br. Tento druh se vyznačuje nerovnoměrným klíčením, ale i přesto je hlavní pěstovanou plodinou v Etiopii. Dalším znakem planého hrachu je velmi silná fenotypová dormance semen způsobená silnou obalovou vrstvou, která je nepropustná pro vodu. Mezi další indikátor domestikovaného hrachu patří apikální dominance s výrazně nižší frekvencí tvorby postranních větví a neutrální fotoperiodická reakce a vyšší kvalita semene (Weeden et al., 2007).

Domestikované odrůdy hrachu mají jak ozimé formy vyžadující vernalizaci, tak i jarní formy. Požadavky na vernalizaci jsou různé. Bylo potvrzeno, že u domestikovaného hrachu

získaného z Izraele, jsou požadavky na vernalizaci mnohem výraznější, než u planého hrachu pocházejícího z oblastí s mírnou zimou (Abbo et al., 2014).

### 2.2.1.2 Geny ovlivňující znaky domestikálního syndromu

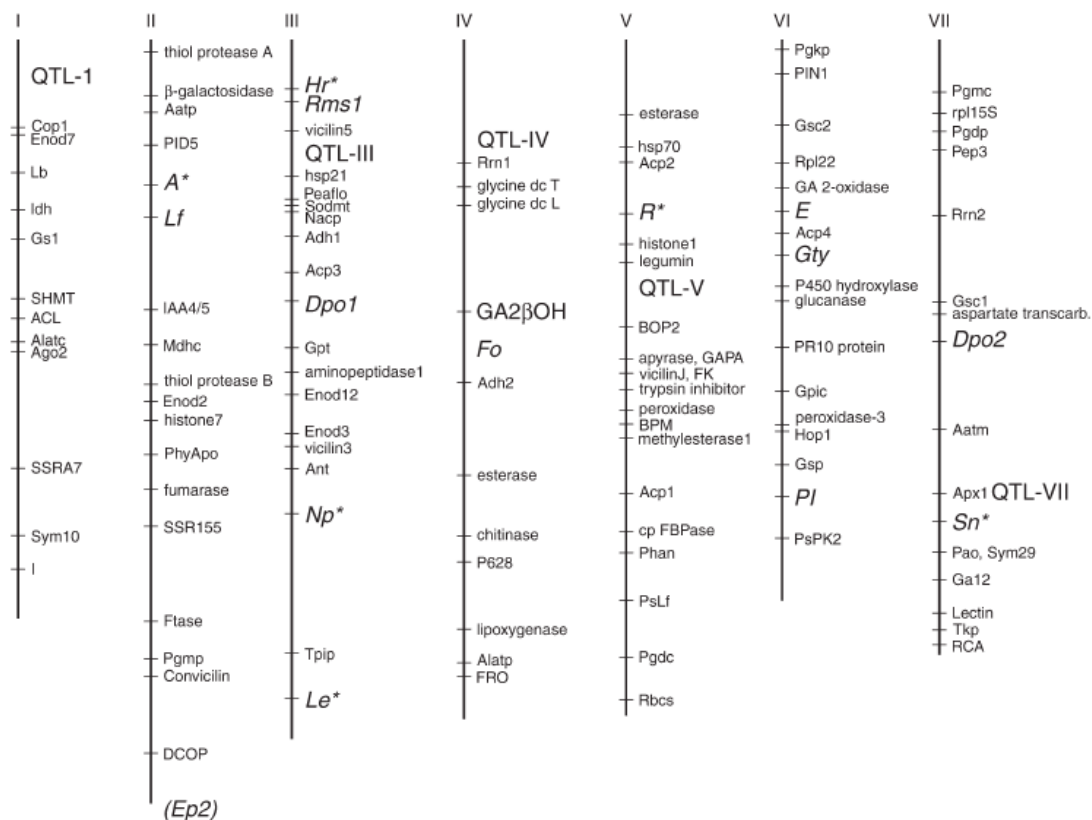
Weeden et al. publikovali v roce 2002 teorii, že lokus *DpoI* prošel během domestikace mutacemi, které daly vznik nepukavým genotypům hrachu. Oblast v genomu, která je zodpovědná za pukavost lusku byla však identifikována již dříve, touto problematikou se zabýval Blixt v roce 1972. Od tohoto roku bylo identifikováno 11 lokusů zodpovědných za znaky domestikálního syndromu u hrachu (Tab. 1). Lokus *A* je zodpovědný jak za dormanci semen, tak za kvalitu semene, proto je v tabulce zobrazen dvakrát. *DpoI* lokus byl identifikován jako primární faktor kontrolující pukavost lusků (Blixt, 1972). Kvetení je kontrolováno nejméně šesti lokusy (Murfert a Reid, 1985), ačkoli ne všechny z nich jsou důležité z hlediska domestikálního procesu. Geny domestikálního syndromu ovlivňují i vzhled rostliny a také velikost a kvalitu semene (Weeden et al., 2007).

**Tab. 1** Výsledky genetických studií znaků hrachu zodpovědných za domestikální syndrom (Weeden et al., 2007)

Fenotyp plané formy	Fenotyp kultivované formy	Počet identifikovaných lokusů	Symbol lokusů
Pukavé lusky	Nepukavé lusky	1	<i>Dpo</i>
Dormance semen	Absence dormance semen	1	<i>A</i>
Vysoká rostlina	Nízká rostlina	1	<i>Le</i>
Více bazálního větvení	Méně bazálního větvení	1 (minimum)	<i>Rms</i> series
Malá semena	Velká semena	několik	<i>QTL</i>
Nízká kvalita semene	Vyšší kvalita semene	4 (minimum)	<i>R, A, Pl, Gty</i>
Kvetení za dlouhého dne	Kvetení nezávislé na délce dni	4	<i>Sn, Hr, Lf, E</i>



Novější studie potvrdily další seznam genů ovlivňujících znaky domestikačního syndromu a pomocí molekulárních technik byly identifikovány kódující sekvence těchto genů. Výsledky ukázaly, že se hrách původně vyskytoval mezi Tureckem a Irákem. *Pisum sativum* ssp. *elatius* L. je popisován jako původní planý druh, nicméně není zcela vyloučeno, že by někdy nebyl člověkem kultivován. Jeho vlastnosti jsou však dostačující pro analýzu rozdílů mezi původní a domestikovanou formou. Domestikované znaky, jako jsou nepukavé lusky a tenké osemení, jsou charakteristické pro *P. abyssinicum* A. Br., který má výrazně nízkou genetickou diverzitu (Vershinin et al., 2003) a pravděpodobně byl zavlečen do Etiopie před 4000 – 5000 lety. Lze předpokládat, že tento druh byl izolovaný v důsledku zániku obchodních cest spojených se zánikem Egyptského království. Existuje řada dalších krajových odrůd v různých zemích, nejvýrazněji se liší druhy nalezené v podhůří a vyšších svazích v Afganistánu, Nepálu, Iránu a Pákistánu. Tyto druhy byly popsány jako tzv. „afgánský typ“ (Weeden a Wolko, 1988). Poslední etapou domestikačního procesu jsou nynější komerční kultivary hrachu.



**Obr. 3** Vazebné skupiny *P. sativum* ( $n = 7$ ). Velkými písmeny jsou vyznačeny relativní pozice lokusů a QTLs ovlivňující morfologické a fyziologické změny, které nastaly během domestikace. Původní markery jsou vyznačeny malými písmeny. Hvězdičkou jsou značeny lokusy, které mají pleiotropní efekt, jsou tedy zodpovědné za několik znaků, které byly modifikovány během domestikace (Weeden et al., 2007).

Přibližně 20 genů je zodpovědných za různé domestikační modifikace hrachu. Srovnatelný počet genů ovlivňuje domestikační znaky u fazolu, kukuřice a rýže (Li et al, 2006). Například u slunečnice jich je však podstatně více (Burke et al., 2002). Většina identifikovaných genů jsou dobře charakterizované a identifikují pleiotropní interakce. Například substituce alely *A* místo recesivní alely *a* způsobila lepší kvalitu semen a sníženou dormanci semen. Delece genu *Np* způsobila větší velikost semene, ale také nižší toleranci k napadení hmyzími škůdci. Gen zodpovědný za nízký vzrůst může v homozygotním stavu zvýšit objem kořenového systému, který je dále ovlivněn geny *Sn* a

*Hr*, jež ovlivňují i citlivost k fotoperiodě (Weeden, 2007). Za tvorbu postranních větví je zodpovědný gen *Rms1* (Li et al., 2006).

### 2.2.2 Domestikace sóji (*Glycine max* L.)

Sója (*Glycine max* L.) poskytuje rostlinné oleje a proteiny lidské populaci a hospodářským zvířatům již po staletí, proto probíhá intenzivní výzkum této plodiny. Domestikace sóji probíhala asi před 3000 lety v oblasti východní Asie, konkrétně v severovýchodní Číně (Hymowitz, 1970). Planým předkem sóji *Glycine max* L. byla *Glycine soja* Sieb. a Zucc. Během domestikace člověk zaměřil svoji pozornost na pukavost lusku, klíčový agronomický znak ovlivňující výnos. Postupem času, vlivem procesu selekce, byl tento nežádoucí znak eliminován.

Cílem výzkumu bylo najít konkrétní pletivo a genetický mechanismus přispívající k rezistenci pukavosti lusků u kulturní sóji (Christiansen et al., 2002). Pomocí QTL mapování bylo úspěšně nalezeno několik genů zodpovědných za domestikační syndromy u několika plodin včetně sóji (Mauricio, 2001). Geny byly identifikovány u rýže (*Oryza sativa* L.), kukuřice (*Zea mays* L.) a rajčete (*Lycopersicon esculentum* L.), konkrétně geny zodpovědné za architekturu rostliny (*TEOSINTE*, *BRANCHED 1*), velikost plodů (*fw2.2*) a pukavost semen (*sh4*) (Li et al., 2006).

Obecně platí, že plané druhy často nesou významné geny rezistence k biotickým a abiotickým stresovým faktorům, proto jsou vhodným donorem pro šlechtění nových odrůd. Nicméně, dominantní znak pukavosti u sóji je nežádoucí, proto je vývoj vhodných genetických markerů pro detekci tohoto znaku velmi důležitý.

U sóji byly pomocí QTL identifikovány oblasti genomu související s pukavostí lusku. Tyto oblasti jsou rozptýlené po genomu v několika skupinách. Nedávno bylo nalezeno deset kandidátních genů, bohužel bylo následně zjištěno, že ani jeden z nich není regulátorem genu rezistence k pukavosti lusku (Suzuki et al., 2009).

Publikace z roku 2013 popisuje mapování lokusu *qPDH1*, který reguluje pukavost lusku u sóji. Lokus *qPDH1* je velký 47 kb a nachází se na chromozomu 16 (Suzuki et al., 2009; Suzuki et al., 2010; Gao a Zhu, 2013). Novější studie popisuje regulační gen *Pdh1*, který podporuje pukavost lusku ovlivněním fyzikálních vlastností vnitřní sklerenchymatické vrstvy, konkrétně se jedná o vysokomolekulární komponenty buněčné

stěny, jako je lignin. Existují důkazy, že během domestikace sója prošla změnami, které daly vznik odrůdám se sníženou frekvencí genu *Pdh1*, tedy rezistentním k pukavosti lusků. Vzorky analyzované z krajových odrůd z Japonska a jihovýchodní Asie potvrdily vysokou frekvenci zastoupení genu *Pdh1*, zde probíhala sklizeň za vlhkých klimatických podmínek, proto byla téměř nulová rezistence k pukavosti lusků dostačující. S rozšířením sóji do sušších oblastí Asie, došlo k selekci genotypů s rezistencí k pukavosti (Funatsuki et al., 2014).

V roce 2014 došlo k významnému objevu buněčného mechanismu a genů, které ovlivňují znak pukavosti lusků u této významné plodiny. Hlavní buněčný mechanismus je tvorba ligninové vrstvy s odlučovací vrstvou na ventrálním švu lusku, což zabraňuje puknutí lusku u nepukavých odrůd. Bylo potvrzeno, že gen *NAC* a geny *SHATTERING1-5* (*SHATI-5*), homologní s genem *AtNST1/2 Arabidopsis thaliana* L., funkčně aktivují geny pro tvorbu sekundární buněčné stěny a významně podporuje tloušťku FCC buněk sekundární buněčné stěny, tedy sklerenchymatická vlákna ventrálního cévního svazku. Míra exprese genu *NAC* je 15krát vyšší než exprese wt alely, tedy standardní alely, čemuž je přisuzováno funkční narušení represoru (Dong et al., 2014). Tento mechanismus je zcela odlišný od mechanismu rozpadavosti klasu, který byl popsán u obilnin, kde je ztráta tohoto znaku způsobena absencí odlučovací vrstvy na bázi klasu (Li et al., 2006). Regulace tohoto mechanismu může být klíčovým faktorem pro šlechtění budoucích variet a kultivarů leguminóz (Dong et al., 2014).

### **2.2.3 Domestikační geny dalších významných leguminóz**

Studie z roku 2013 srovnávala domestikační znaky blízkce příbuzných i méně příbuzných plodin, které podléhají domestikačnímu syndromu. Existují rozdíly genetických změn, které vznikly důsledkem domestikace a pozdější diverzifikace. Nicméně, pro toto třídění neexistují jasná kritéria. Záleží na rozlišení pojmů „domestikace rostlin“ a „evoluce rostlin“ (Larson a Burger, 2013). Mnoho znaků domestikačního syndromu je kódováno jedním či dvěma geny a kultivovaná forma je často podmíněna recesivní alelou (Kaga et al., 2008) Proto jsou jedinečné vlastnosti domestikačního syndromu v populaci divokých předků většinou monomorfní, i když s alternativní alelou fenotypu příslušného genofondu (Abbo et al., 2014).

### 2.2.3.1 Domestikace cizrny (*Cicer L.*)

Vlastnosti, které jsou monomorfní ve volné přírodě, ale polymorfní v domestikovaném genofondu, byly pravděpodobně vyvinuty vlivem domestikace, jako například tvar a velikost semen cizrny (*Cicer L.*), jak je patrné na obr. 4. Tvar semene plané cizrny je hranatý, zatímco domestikované formy mají tvar zaoblenější (Tanno a Willcox, 2006). Evoluce velikosti semen však není jednosměrná, u domestikované odrůdy pšenice *Triticum parvicoccum L.*, která již zanikla, byla zrna menší než u planých druhů (Kinslev, 2009). U znaků, které mají rovnocenný polymorfismus jak v domestikované, tak v plané formě, je nepravděpodobné, že by v genetických změnách hrála důležitou roli domestikace (Russel et al., 2011).

Domestikovaná cizrna má nepukavé lusky, nicméně jistý stupeň pukavosti může nastat za vyšších teplot a sucha. Planá cizrna (*Cicer reticulatum L.*) se vyznačuje také nepukavými lusky, což naznačuje preadaptaci k domestikaci (Ladizinsky, 1979). Dále se planá cizrna odlišuje od domestikovaných forem vysokým stupněm fenotypové dormance díky odolným obalovým vrstvám semene. Také vyžaduje vernalizaci, protože pochází z jihovýchodního Turecka, kde klesají zimní teploty pod bod mrazu. To je hlavní nevýhoda domestikované cizrny, protože se jedná o jarní plodinu (Abbo et al., 2003).



**Obr. 4** Příklad fenotypového vývoje plané cizrny (*Cicer reticulatum L.*) – nahoře, a domestikované formy (*Cicer arietinum L.*) - dole (Abbo et al., 2014)

### 2.2.3.2 Domestikace čočky (*Lens L.*)

Domestikace čočky (*Lens L.*) probíhala v oblastech Blízkého východu. Dle morfologických a molekulárních důkazů je planým předkem dnešní čočky *Lens culinaris ssp. orientalis L.* (Havey a Muehlbauer, 1989). Plané druhy čočky se vyznačují úplnou pukavostí lusků v době zralosti, stejně jako plané druhy hrachu. Domestikované druhy čočky mají pukavost lusků neúplnou, proto musí být sklizeny ještě před úplným dozráním a

vyžadují chemickou desikaci před mechanickou sklizní pro minimalizaci ztrát (Ladizinsky, 1993). Co se týče klíčivosti, u planých druhů je výrazně nižší než u domestikovaných druhů, protože planá forma vykazuje přítomnost vodě odolných obalových vrstev. Při experimentu z roku 1985 vyklíčilo pouze ~10% semen plané čočky (Ladizinsky, 1985). Domestikované kultivary čočky tvoří dvě kategorie semen, a to malá a velká, s průměrnou hmotností 0.01 – 0.08 g (Ladizinsky, 1979).

### 2.2.3.3 Domestikace fazolu (*Phaseolus vulgaris* L.)

Fazol (*Phaseolus vulgaris* L.) je jedna z nejdůležitějších leguminóz na světě. Tato plodina představuje bohatý zdroj proteinů, vlákniny, minerálních látek a vitamínů pro miliony lidí již po mnoho let (Broughton et al. 2003). Na základě morfologických znaků a molekulárních markerů byly stanoveny místa domestikace fazolu v Centrální Americe a Andách, což jsou i místa s nejvyšší diverzitou této plodiny (Gepts a Debouck, 1991).

Redukce pukavosti lusků u fazolu je klíčovou součástí domestikačního syndromu. Pokusy k objasnění genetické kontroly tohoto procesu vedly k identifikaci lokusu (*St*), který ovlivňuje pukavost, nicméně sekvence konkrétního genu je zatím neznámá (Koinange et al. 1996). Studie z roku 2013 se zabývala identifikací kandidátního genu pro *St* (Gioia et al., 2013). Pro vyhodnocení bylo využito genu *INDEHISCENT* (*IDEH*), což je primární transkripční faktor u *Arabidopsis thaliana* L., regulující pukavost šesulí (Liljegren et al., 2004). U fazolu byla amplifikována homologní sekvence a na základě toho byla pomocí inberdních linií sestavena genetická mapa s lokalizací genu *IDEH*. Výsledky byly sporné, pukavý a nepukavý fenotyp nekoreloval přímo s tímto genem, proto byla vyloučena přímá souvislost pro pukavost, spíše se jedná o regulační gen lokusu *St*, který ale dosud nebyl identifikován (Gioia et al., 2013). Plané druhy fazolu pukají z důvodu přítomnosti vláknitých struktur v luscích, které v průběhu domestikace vymizely. Proto dnešní kultivary nepukají a ztratily tak disperzní mechanismus ve fázi plné zralosti (Koinange et al. 1996).

U *A. thaliana* bylo již identifikováno 5 transkripčních faktorů, ovlivňujících pukavost šesule. Jedná se o *FRUITFULL* (*FUL*), *SHATTERPROOF1* (*SHP1*), *SHATTERPROOF2* (*SHP2*), *INDEHISCENT* (*IDEH*), a *ALCATRAZ* (*ALC*). *IDEH* je exprimovaný v úzkých prouzcích pletiv blízko švů šesule a společně s geny *SHATTERPROOF1-2* jsou hlavními regulátory pukavosti. Gen *FUL* expresi těchto genů potlačuje, fenotypovým projevem je

pak pukavost šesule. Interakce genů *IND*, *ALC*, *SHP*, a *FUL* umožňuje diferenciaci lignifikované vrstvy, která podporuje otevření šesule (Ferrándiz, 2002; Liljegren et al., 2004). Nicméně ne všechny tyto geny mají přímou spojitost s pukavostí lusku fazolu, jde spíše o komplexní úlohu v rozšiřování semen, *A. thaliana* patří do čeledě *Brassicaceae* a *P. vulgaris* do čeledě *Fabaceae* (Gioia et al., 2013).

### 2.3 Fylogeneze a diverzita hrachu (*Pisum sativum* L.)

Rod hrách *Pisum* má tři druhy *Pisum sativum*, *Pisum fulvum* a *Pisum abyssinicum*. Do planých forem patří *Pisum sativum* ssp. *elatius*, *Pisum fulvum* a *Pisum abyssinicum*. *P. fulvum* a *P. abyssinicum* se liší od hrachu setého chromozomovými přestavbami, které způsobují částečnou reprodukční izolaci. Dále existuje antagonistický vztah mezi jadernými a plastidovými genomy *P. fulvum* a *P. sativum*. Jiné dělení, z hlediska hospodářského, uznává rozdělení hrachu pouze na hrách setý polní (*P. s.* subsp. *sativum*) se třemi varietami a hrách rolní peluška (*P. s.* subsp. *arvense*). Tři variety hrachu polního jsou hrách setý polní, dřeňový (var. *medullare*) a cukrový (var. *saccharatum*) (Smýkal et al., 2012).

RBIP analýza z roku 2010 srovnávala retrotranspozony genotypů planých forem (407 vzorků), kulturních forem (1021 vzorků), šlechtitelských linií (61 vzorků) a krajových odrůd (564 vzorků) hrachu. Byla využita TAM technologie, která umožňuje srovnávat kodominantní polymorfni inzerce transpozonů pomocí mikročipů či gelové elektroforézy. Jako reprezentační materiál plané formy hrachu byl vybrán genofond hrachu JIC *Pisum*. Korelace mezi genetickou diverzitou a fenotypovými znaky domestikace a geografickými centry původu odhalila nový pohled na vznik a vývoj rodu *Pisum*. Nejstarší volně žijící plané druhy jsou *P. fulvum* Sibth. a Sm. a *P. elatius*. Výsledky potvrdily již dříve predikovaný fakt, že druh *P. abyssinicum* A. Br. vznikl křížením *P. fulvum* a *P. elatius*. Planý *P. elatius* byl pěstován v oblastech úrodného půlměsíce, později byl domestikován a rozšířen do oblastí jižní Eurasie a dále se diferencoval do dvou ekotypů. První rozšíření bylo směrem na východ do Indie a Himalájí, zde vznikly afghánské ekotypy. Druhá diverzifikace hrachu vedla ke kultivovaným odrůdám hrachu, jak je známe dnes (Jing et al., 2010).



## 2.4 Genová exprese u hrachu (*Pisum sativum* L.)

Studium exprese genů je klíčová metoda k urychlení šlechtitelského procesu. Genová exprese se během vývoje plodů tradičně studovala pomocí Northern hybridizace. Sledovala se tak přítomnost či nepřítomnost transkriptů. Jedná se o hybridizační analýzu RNA, která je analogická k Southern hybridizaci (analýza DNA). Princip Northern hybridizace je přenos RNA na membránu, poté značená sonda hybridizuje s určitou sekvencí, která je komplementární k sondě. Detekce hybridizované sondy se provádí autoradiograficky, v případě radioaktivního značení nebo chemickou reakcí, v případě připojení molekuly, která může působit jako antigen a být rozpoznána protilátkami. Výhodou radioaktivity je vysoká citlivost, ale vyžaduje speciální a vybavení a bezpečnostní opatření. Výsledek poskytne specifický vzor proužků odpovídající restričním fragmentům obsahujícím komplementární sekvenci k použité sondě (Kuthan, 2009). Tato metoda však byla příliš zdoluhavá a náročná, proto se přešlo k analýze EST a kvantitativní real time qRT-PCR.

EST markery jsou krátké sekvence cDNA, které identifikují určitý transkript. Výhodou je rychlost provedení této metody a také fakt, že počet sekvencí v databázích neustále přibývá, což umožňuje detekci podobnosti i mezi taxonomicky vzdálenými organismy (Jing et al., 2007). V roce 2010 bylo publikováno 26 kodominantních a 19 dominantních SSR markerů hrachu odvozených od EST. Nejhojnější SSR byly trinukleotidové repeticce, konkrétně GAA mikrosatelity (Gong et al., 2010).

qRT-PCR je vysoce přesná metoda pro stanovení exprese genů v biologických systémech. Data jsou analyzována prostřednictvím procesu tzv. normalizace, která je zprostředkována pomocí vnitřního standardu. Je to nezbytné pro stanovení relativní exprese genu v různých vzorcích. Za tímto účelem jsou vybrány referenční geny na základě konstitutivní exprese ve všech vzorcích. V současné době zatím nebyl identifikován univerzální referenční gen, který by byl exprimován ve všech biologických vzorcích bez ohledu na zdravotní stav vzorku (Die et al. 2010). Ačkoliv je tato metoda hojně využívána, má několik úskalí, jako například možnou variabilitu v extrakci RNA, nízkou efektivitu reverzní transkripce a nízkou specifitu primerů při PCR. Důležitou roli hraje také přesnost pipetování. Pro správné vyhodnocení analýzy by okolní podmínky neměly ovlivnit expresi referenčního genu (Nolan et al., 2006).

Pomocí qRT-PCR byly identifikovány geny ovlivňující proces kvetení u hrachu, lokus *LONG1*, který má důležitou roli při zprostředkování efektů světla na biosyntézu giberelinu (Weller et al., 2009). Novější studie z roku 2011 popisuje identifikaci lokusu GIGAS, zodpovědného za kvetení, který byl popsán na základě porovnání s kandidátním genem z *M. truncatula* (Hecht et al., 2011).

Pro přesné stanovení exprese genů může být použita celogenomová analýza pomocí masivního sekvenování transkriptomu. Jednou z metod využívající tento systém je MACE (Massive Analysis of cDNA Ends), která využívá digitální profilování genové exprese. Výhodou je, že metoda poskytuje expresní profily všech zahrnutých transkriptů ve vysokém rozlišení (Zajac et al., 2015). Každá cDNA molekula je reprezentována jedním cDNA fragmentem o velikosti 94 bp, který pochází z oblasti 100-500 bp polyadeninového 3' konce transkriptu. Metoda odhaluje i rozdíly v expresi transkriptů, které se vyskytují v nepatrném množství. Navíc, metoda TrueQuant eliminuje PCR kopie a zajišťuje tak správnou kvantifikaci (Zawada et al., 2014).

## 2.5 Kandidátní geny ovlivňující pukavost lusku hrachu (*Pisum sativum* L.)

Weeden et al. publikovali v roce 2007 studii o 3 oblastech genomu, které ovlivňují pukavost lusku u hrachu. Vazebná skupina III nese oblast *Dpo1*, u které je předpoklad výskytu genu zodpovědného za pukavost lusků. Dalším lokusem ovlivňující tento znak je ve vazebné skupině V, ačkoliv na fenotypový projev má menší vliv než lokus na třetím chromozomu. Třetí oblast byla sledována pouze u jednoho křížení a byla označena jako žlutá alela *Gp* lokusu (Weeden et al., 2007).

Publikace o tolici vojtěšce *Medicago truncatula* Gaertn. z roku 2013 potvrzuje, že během evoluce došlo k mutaci genu *SHATTERPROOF* (*SHAT*), která zajišťuje lignifikaci lusků a tedy i následné puknutí. Gen *SHAT* byl již popsán i u *Arabidopsis thaliana*, kde kontroluje ukládání ligninu během dozrávání plodu (Fourquin et al., 2013). Společně s *INDEHISCENT* (*IDEH*) jsou hlavními regulátory tvorby lignifikované vrstvy, která způsobuje puknutí lusku. Mezi další geny ovlivňující vývoj plodu patří *FRUITFULL* (*FUL*), který je nezbytný pro růst zárodečného vaku (Liljegren et al., 2004). qRT-PCR však nepotvrdila přímou korelaci mezi znakem pukavosti a vyšší expresí těchto genů u *Medicago truncatula* Gaertn. Zdá se, že pro tento proces jsou klíčové regulační mechanismy zmíněných genů (Fourquin et al., 2013).

Bylo vybráno pět kandidátních genů pro analýzu hrachu ovlivňujících pukavost lusků. Jedná se o gen *NAC*, *SHATTERING1-5* popsané v kapitole o domestikaci sóji (Dong et al., 2014), dále gen *INDEHISCENT* (*IDEH*), ovlivňující pukavost šesulí u *A. thaliana* (Liljegren et al., 2004). Třetí kandidátní gen *bZIP*, jde o transkripční faktor genu *HY5*, byl odvozen také z *A. thaliana* a ovlivňuje biosyntézu giberelinu (Weller et al., 2009). Poslední kandidátní gen je *SPATULA* (*SPT*), kódující bHLP protein. Byl popsán u *A. thaliana* a ovlivňuje vývoj plodolistů (Heisler et al., 2001). Jako referenční gen pro standardizaci byl použit housekeeping gen  $\beta$ -*TUBULIN*, který byl popsán jako velice stabilní housekeeping gen (Die et al., 2010).

## **3 MATERIÁL A METODIKA**

### **3.1 Rostlinný materiál**

Pro analýzu exprese genů během vývoje plodů bylo použito linií JI64 (*P. s. ssp. elatius* L.) a JI92 (afghánský typ kulturního hrachu *P. s. ssp. sativum* L.) a jejich rekombinantních inbredních linií (RILs), vzniklých recipročním křížením. JI64 vykazuje pukavost zralých lusků, zatímco kulturní druh JI92 nikoliv (Domoney et al., 1994). Pro samotnou izolaci RNA byly skalpelem vyříznuty pletiva z oblasti ventrálního švu o délce 1 – 2 cm z vývojově mladších (zelená a žlutá zralost) i vývojově starších lusků (plná zralost).

### 3.2 Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena pomocí komerčního kitu NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plant firmy Macherey-Nagel, Düren, Německo.

1. Homogenizace rostlinného materiálu (100 mg) tekutým dusíkem.
2. Poté přidáno 350  $\mu$ l Lysis Buffer RA1 a 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanolu a promícháno pomocí vortexu.
3. Následně byla směs nanášena na kolonu (NucleoSpin<sup>®</sup> Filter), poté centrifugace 1 min. při 11 000 g. NucleoSpin<sup>®</sup> Filter separován a odstraněn a filtrát transferován pomocí pipety do nové zkumavky.
4. Poté bylo přidáno 350  $\mu$ l ethanolu (70 %) a promícháno pipetou 5x násátím a vysátím.
5. Lyzát přenesen na kolonu NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plant Column, poté centrifugace 30 sekund při 11 000 g.
6. Kolona byla přemístěna do nové zkumavky a poté přidáno 350  $\mu$ l Membrane Desalting Buffer, dále centrifugace 1 min. při 11 000 g.
7. Pro odstranění DNA přidáno 95  $\mu$ l DNase reaction mixture. Poté inkubace 15 min. při laboratorní teplotě.
8. Následně přidáno 200  $\mu$ l promývacího pufru Buffer RAW2, poté centrifugace 30 sekund při 11 000 g.
9. Kolona opět přemístěna do nové zkumavky, následně nanášeno 600  $\mu$ l promývacího pufru Buffer RA3, poté centrifugace 30 sekund při 11 000 g. Filtrát odstraněn a krok opakován s 250  $\mu$ l promývacího pufru Buffer RA3 a centrifugací po dobu 2 min. při 11 000 g.
10. Kolona přemístěna do nové zkumavky NucleaseFree a promyta 40  $\mu$ l RNase-free H<sub>2</sub>O. Následovala centrifugace 1 min. při 11 000 g.

### 3.3 Reverzní transkripce RNA na cDNA

Pro reverzní transkripci RNA byly vybrány vzorky s nejvyšší koncentrací (tab. 2), která byla změřena pomocí spektrofotometru Picodrop (Hinxton, Spojené království). Následně byla provedena dvoukroková reverzní transkripce s oligodT primery, které hybridizují na všechny mRNA se stejnou pravděpodobností. Pro práci byly použity chemikálie od firmy Promega (Madison, USA).

**Tab. 2** Koncentrace RNA v pukavých i nepukavých vzorcích (*A = JI64 x JI92; B = JI92 x JI64; R = rodiče; M = mladý lusk*)

Vzorek (pracovní název)	Koncentrace RNA (ng.µl-1)
1-B21M-n	174,3
2-B29M-n	167,4
3-B67S-n	126,8
4-B93M-n	165,5
5-B36M-p	271,0
6-B44M-p	277,9
7-A93M-p	292,2
8-A98M-p	442,2
9-R92M-n	176,6
10-R64S-p	100,5

Reverzní transkripce je enzymová reakce, při níž dochází k přepisu genetické informace z molekuly RNA do cDNA. Tato reakce je katalyzována enzymem reverzní transkriptázou, která se vyskytuje u mnoha typů retrovirů (Tamarin, 2002). V prvním kroku byla namíchána reakční směs Premix I pro 10 vzorků RNA (Tab. 3). Následovala inkubace při 75°C po dobu 5 min., potom byla reakční směs přenesena na led. Následně byla přidána reakční směs Premix II s komponenty RT-PCR Buffer, dNTP, RNasin® Plus RNase Inhibitor a AMV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA) (Tab. 4). Následně byla směs inkubována 60 min. při 37°C.

**Tab. 3** Složení reakční směsi pro RT-PCR (Premix I)

	Množství na reakci (μl)
Ultračistá H <sub>2</sub> O	9,0
Primer 1 OligodT (0,5 μM)	1,0
RNA	3,0
Celkem	13

**Tab. 4** Složení reakční směsi pro RT-PCR (Premix II)

	Množství na reakci (μl)
Ultračistá H <sub>2</sub> O	16,0
RT-PCR Buffer	8,0
dNTP (500 μM )	2,0
Ribonuclease	2,0
AMVReverse	3,0
Celkem	27

### 3.4 Návrh primerů pro geny *IDEH*, *SHAT*, *bZIP*, *SPT*, *NAC*, *β-TUB*

V programu Primer 3 byly navrženy detekční primery pro geny zájmu, jejichž exprese byly následně sledovány při qRT-PCR. Primery byly navrženy tak, aby se amplifikovala oblast v blízkosti polyadeninové sekvenci exonové oblasti genů o délce 100 – 150 bp. Primery byly poté nasyntetizovány firmou IDT (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgie) (tab. 5).

**Tab. 5** Sekvence primerů pro geny *IDEH*, *SHAT*, *bZIP*, *SPT*, *NAC*, *β-TUB*

Název	Sekvence primeru
qNACf	5' TGA CCC CAC AAT GGG ATA TT 3'
qNACr	5' GAT CGA GCG AAG TTC CAA AG 3'
qSHATf	5' GGA GTT CAT GCA AAA GCG GG 3'
qSHATr	5' ACT CAC ACA TTG TTT CCG GC 3'
qbZIPf	5' CGC TGG GAG GTG AGA ATC G 3'
qbZIPr	5' ATG TGT ATC CGT CGT GAA TGT 3'
qIDEf	5' ACT CCT CCT CCT AAT GCT TTG T 3'
qIDEr	5' TGA GAA TGT TCT CCG GCG TT 3'
qSPTf	5' TTT GCG GTG GAA TCC CGA AT 3'
qSPTr	5' TCG ACA CCT TGA GAA CCA CC 3'
qβ-TubulinF	5' GCT CCC AGC AGT ACA GGA CTC T 3'
qβ-TubulinR	5' TGG CAT CCC ACA TTT GTT GA 3'



### 3.5 Kvantitativní Real-Time PCR

qRT-PCR monitoruje fluorescenci emitovanou v průběhu reakce jako indikátor tvořeného amplikonu v každém cyklu PCR v reálném čase. Termocyklery jsou speciálně obohacené o detektory pro kvantifikaci v reálném čase, přičemž fluorescence se uvolňuje v přímé úměře na množství amplifikované DNA při použití fluorescenčního substrátu v PCR reakci. V reakci bylo použito barvivo DNA SYBR® Green, které fluoreskuje po navázání na dsDNA. Pokud je dsDNA denaturovaná na ssDNA, dochází také k uvolnění látky z DNA, proto dochází v průběhu reakce k opakujícímu nárustu a poklesu fluorescence, to jak se reakce dostává do fáze extenze či denaturace. Existují i další metody pro detekci amplikonu, využívající fluorescenčně značené sondy vázající se na střední část produktu či fluorescenčně značené primery.

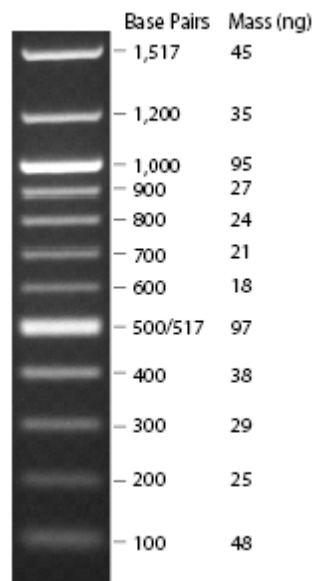
Při relativní kvantifikaci je nutné vyhodnotit kontrolu, tedy referenční gen, který nám určí, do jaké míry bylo u testovaných vzorků použito srovnatelné množství vstupního materiálu (Zvárová a Mazura, 2012). V této práci byl použit „housekeeping“ gen pro  $\beta$ -tubulin, jehož transkripce či počet kopií v genomu je stejný u všech testovaných vzorků (Die et al., 2010). Reakční směs pro qRT-PCR byla namíchána dle tab. 6. Bylo použito komerčního kitu LC 480 SYBR Green I Master (Roche, Bazilej, Švýcarsko) a následujícího PCR programu: 95°C, 10 min.; 39x (95°C, 10 s; 57°C, 30 s; 72°C, 10 s) s následnou analýzou HRM (High-resolution Melt Analysis). Pro analýzu byl použit termocykler BioRad C1000 s real-time systémem CFX96 (BioRad, Hercules, USA).

**Tab. 6** Složení reakční směsi pro Real-Time PCR

	Množství na reakci (µl)
Ultračistá H <sub>2</sub> O	1,4
Primer F	0,8
Primer R	0,8
MasterMix (Syber Green)	5,0
DNA	2,0
Celkem	10

### 3.6 Ověření specifity amplifikace cDNA

Pro ověření specifity amplifikované cDNA byla použita horizontální agarózová elektroforéza. Pro ověření velikosti amplifikovaných produktů bylo využito velikostního markeru - 100 bp Quick load DNA ladder od firmy NEB (New England BioLabs, Ipswich, Anglie) (obr. 5).

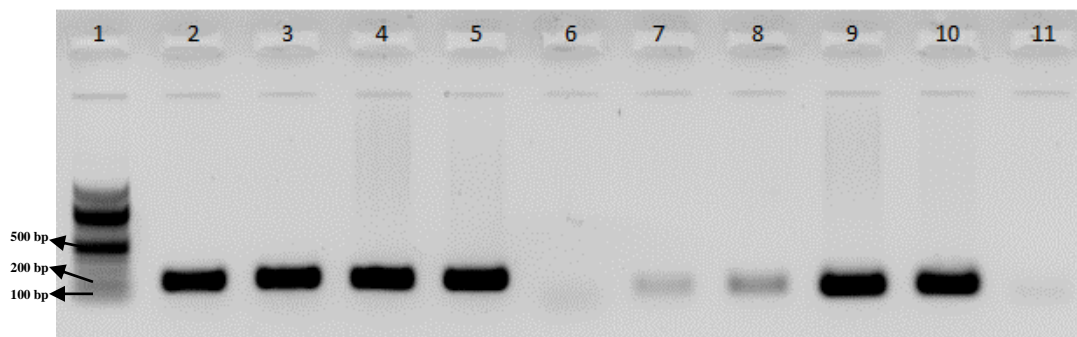


**Obr. 5** Velikostního marker - 100 bp Quick load DNA ladder

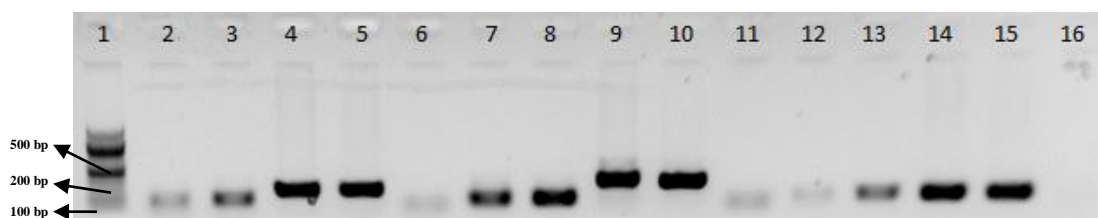
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Ověření specifity primerů

Specifita primerů byla ověřena pomocí standardní PCR a elektroforetickou separací v agarózovém gelu. Jak je patrné na obr. 6 a 7, primery jsou specifické, tvoří vždy pouze jeden produkt.



**Obr. 6** Test specifity primerů pro geny *NAC* a *bZIP* na DNA hrachu. Jamky: 1. 100 bp Quick load DNA Ladder, 2. B21M (nepukavý) s primery *qNACf*, *qNACr*, 3. A98M (pukavý) s primery *qNACf*, *qNACr*, 4. R64S (pukavý) s primery *qNACf*, *qNACr*, 5. R92M (nepukavý) s primery *qNACf*, *qNACr*, 6. kontrola, 7. B21M (nepukavý) s primery *qbZIPf*, *qbZIPr*, 8. A98M (pukavý) s primery *qbZIPf*, *qbZIPr*, 9. R64S (pukavý) s primery *qbZIPf*, *qbZIPr*, 10. R92M (nepukavý) s primery *qbZIPf*, *qbZIPr*, 11. kontrola



**Obr. 7** Test specifity primerů pro geny *SPT*, *SHAT*, *IDEH* na DNA hrachu. Jamky: 1. 100 bp Quick load DNA Ladder, 2. B21M (nepukavý) s primery *qSPTf*, *qSPTr*, 3. A98M (pukavý) s primery *qSPTf*, *qSPTr*, 4. R64S (pukavý) s primery *qSPTf*, *qSPTr*, 5. R92M (nepukavý) s primery *qSPTf*, *qSPTr*, 6. Kontrola, 7. B21M (nepukavý) s primery *qSHATf*, *qSHATr*, 8. A98M (pukavý) s primery *qSHATf*, *qSHATr*, 9. R64S (pukavý) s primery *qSHATf*, *qSHATr*, 10. R92M (nepukavý) s primery *qSHATf*, *qSHATr*, 11. kontrola, 12.

*B21M (nepukavý) s primery qIDEf, qIDEr, 13. A98M (pukavý) s primery qIDEf, qIDEr, 14. R64S (pukavý) s primery qIDEf, qIDEr, 15. R92M (nepukavý) s primery qIDEf, qIDEr, 16. kontrola*

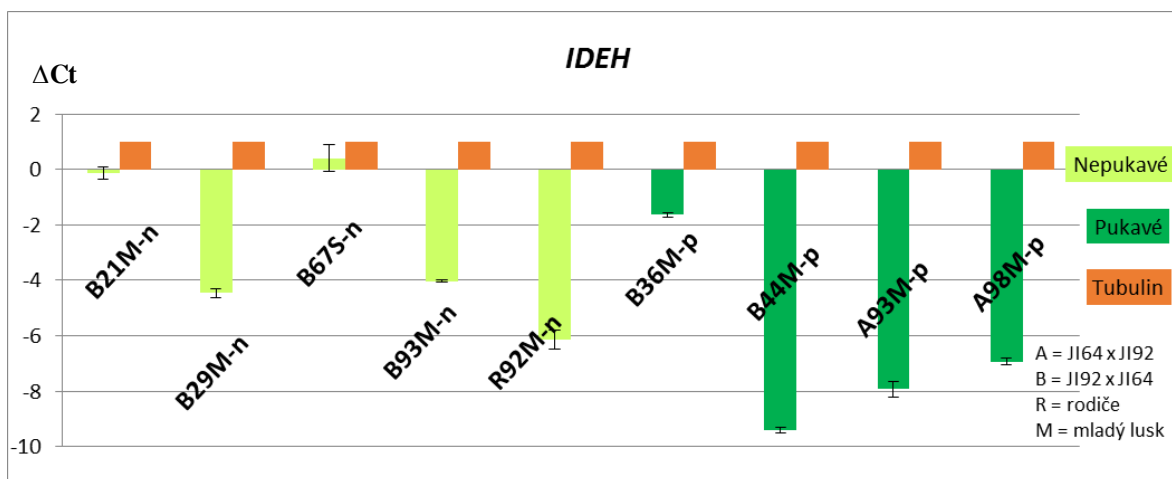
#### **4.2 Exprese genů u planých a kulturních forem hrachu (*Pisum sativum* L.)**

Byla provedena relativní kvantifikace, kdy se množství fluorescence testovaného vzorku porovnávala s množstvím fluorescence referenčního vzorku, tedy vnitřní kontroly. Pro zajištění co největší přesnosti, byly vzorky analyzovány v triplicátech, tedy ve třech opakováních. Při rozptylu vyšším než 0,7 cyklu nebyly hodnoty do výsledků zahrnuty, tyto nepřesnosti vznikly pravděpodobně nepřesným pipetováním.

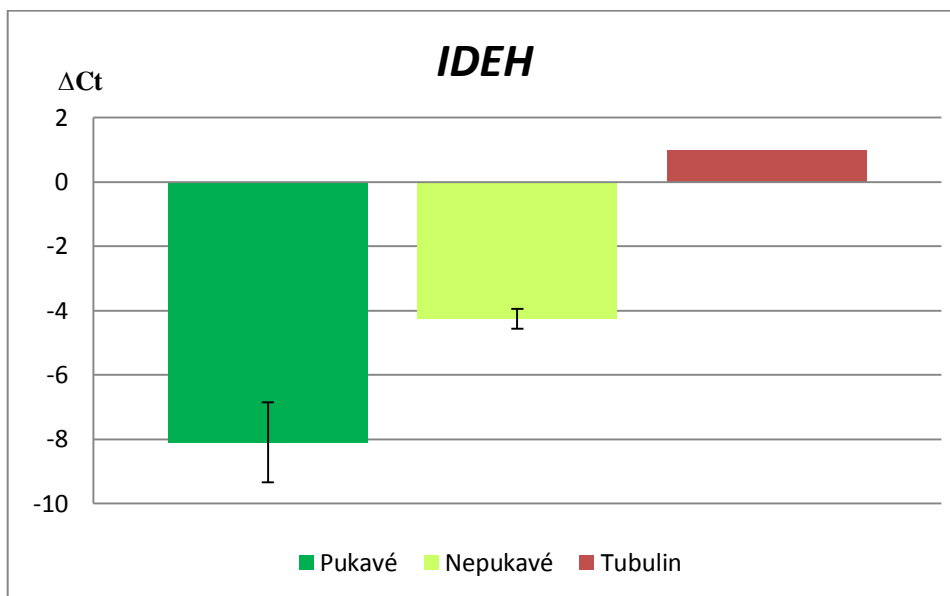
Výsledky kvantitativní qRT-PCR byly vyhodnoceny metodou  $\Delta Ct$ . Hodnota Ct udává počet cyklů, při kterých protne křivka produktu práh citlivosti. Čím je tato hodnota nižší, tím více bylo na počátku v reakční směsi u dané amplifikované oblasti templátové DNA, tedy exprese genu byla ve vzorku vyšší. Hodnota  $\Delta Ct$  byla vypočtena jako rozdíl Ct hodnoty genu zájmu a Ct hodnoty referenčního genu. Do grafu byla zanesena převrácená hodnota  $\Delta Ct$  pro vyjádření exprese daného genu a hodnota 1 pro gen referenční. Relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a standardu (referenčního genu) se vypočítá jako násobek  $2^{\Delta Ct}$ .

**Tab. 7** Hodnoty  $\Delta Ct$  pro gen *IDEH* z qRT-PCR a relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a referenčního genu ( $2^{\Delta Ct}$ )

Vzorek (pracovní název)	$\Delta Ct$ <i>IDEH</i>	$2^{\Delta Ct}$
1-B21M-n	0,137	1,100
2-B29M-n	4,467	22,116
3-B67S-n	-0,412	0,752
4-B93M-n	4,032	16,359
5-R92M-n	6,125	69,792
6-B36M-p	1,638	3,112
7-B44M-p	9,41	680,287
8-A93M-p	7,927	243,369
9-A98M-p	6,928	121,769



**Obr. 8** Vyhodnocení qRT-PCR: exprese genu *IDEH* (*INDEHISCENT*) u testovaných vzorků hrachu



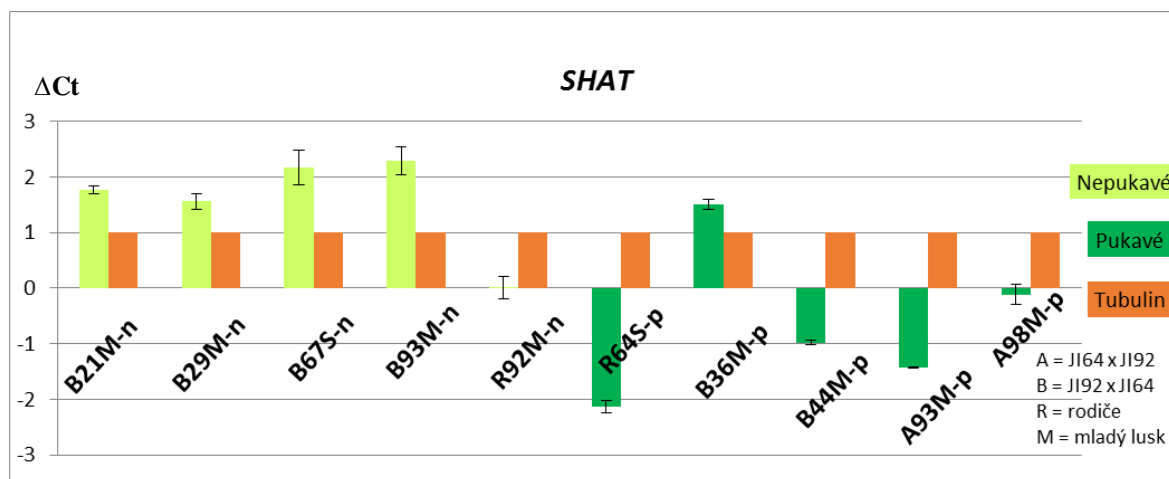
**Obr. 9** Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu *IDEH* (*INDEHISCENT*) testovaných vzorků hrachu

Jak je patrné z obr. 8 a 9, u genu *INDEHISCENT* byla naměřena nízká exprese v porovnání s referenčním genem pro housekeepingový gen  $\beta$ -tubulin, tedy tzv. downexprese, u všech testovaných vzorků. Jinými slovy, množství molekul mRNA daného

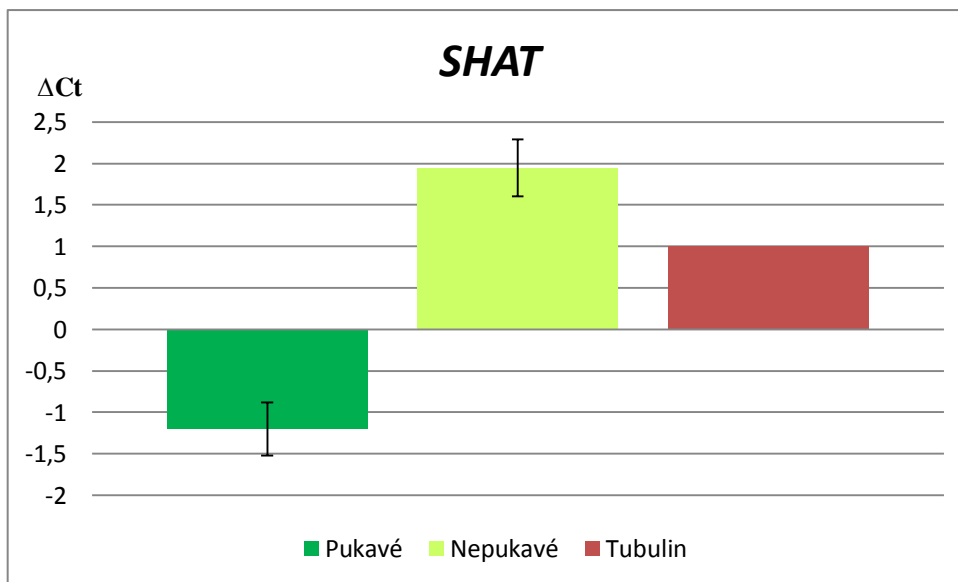
genu bylo ve vzorku velmi nízké. Avšak u vzorků s pukavými lusky je downexprese téměř dvojnásobná v porovnání se vzorky s lusky nepukavými.

**Tab. 8** Hodnoty  $\Delta Ct$  pro gen *SHAT* z *qRT-PCR* a relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a referenčního genu ( $2^{\Delta Ct}$ )

Vzorek (pracovní název)	$\Delta Ct$ <i>SHAT</i>	$2^{\Delta Ct}$
1-B21M-n	-1,767	0,294
2-B29M-n	-1,557	0,340
3-B67S-n	-2,172	0,222
4-B93M-n	-2,29	0,204
5-R92M-n	-0,013	0,991
6-R64S-p	2,135	4,392
7-B36M-p	-1,507	0,352
8-B44M-p	0,977	1,968
9-A93M-p	1,433	2,700
10-A98M-p	0,117	0,294



**Obr. 10** Vyhodnocení *qRT-PCR*: exprese genu *SHAT* (*SHATTEPROOF*) u testovaných vzorků hrachu

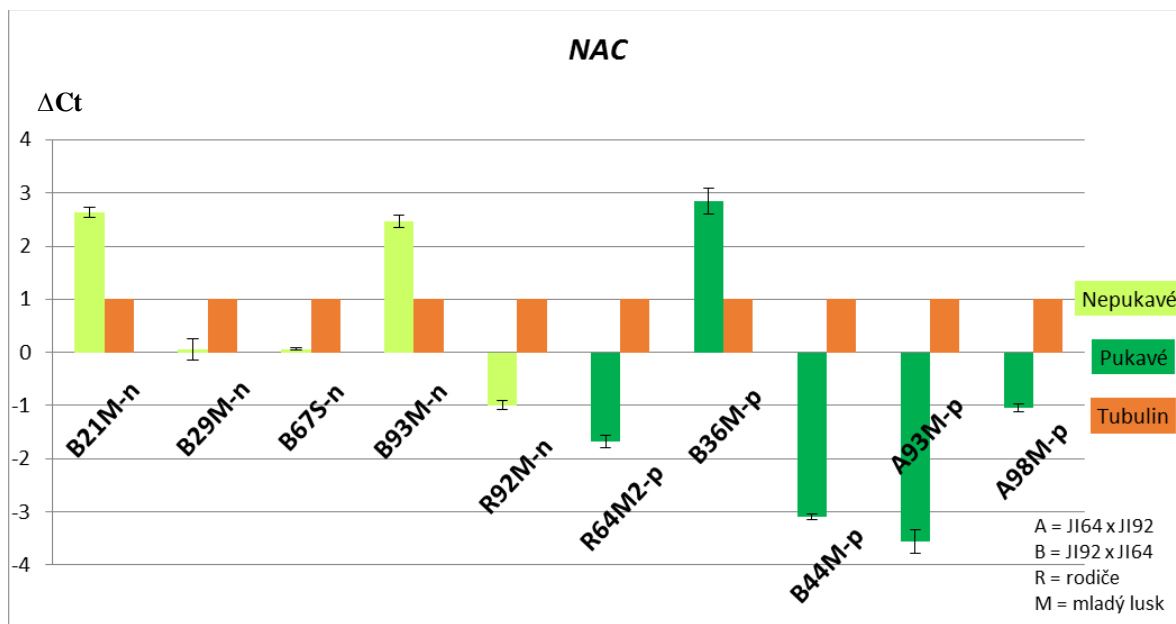


**Obr. 11** Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu *SHAT* (*SHATTERPROOF*) testovaných vzorků hrachu

Gen *SHATTERPROOF* je u nepukavých vzorků téměř dvojnásobně exprimován ve srovnání s referenčním genem, zatímco u pukavých je downexprese (obr. 10, 11). Mezi hodnotami pukavých a nepukavých testovaných vzorků je tedy značný rozdíl.

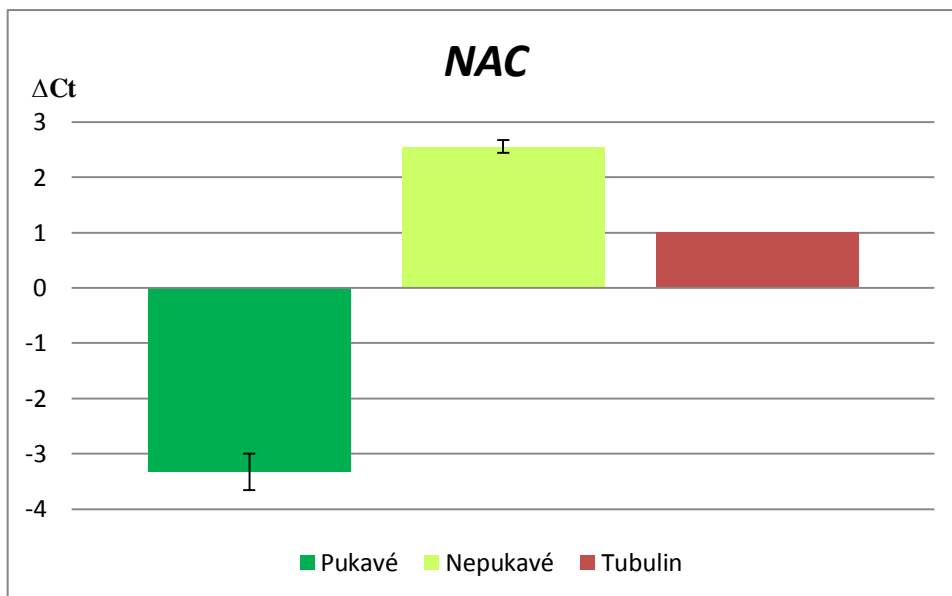
**Tab. 9** Hodnoty  $\Delta Ct$  pro gen NAC z qRT-PCR a relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a referenčního genu ( $2^{\Delta Ct}$ )

Vzorek (pracovní název)	$\Delta Ct$ NAC	$2^{\Delta Ct}$
1-B21M-n	-2,637	0,161
2-B29M-n	-0,057	0,961
3-B67S-n	-0,065	0,956
4-B93M-n	-2,477	0,180
5-R92M-n	0,991	1,988
6-R64S-p	1,678	3,200
7-B36M-p	-2,843	0,139
8-B44M-p	3,097	8,556
9-A93M-p	3,562	11,811
10-A98M-p	1,051	0,161



**Obr. 12** Vyhodnocení qRT-PCR: exprese genu NAC u testovaných vzorků hrachu



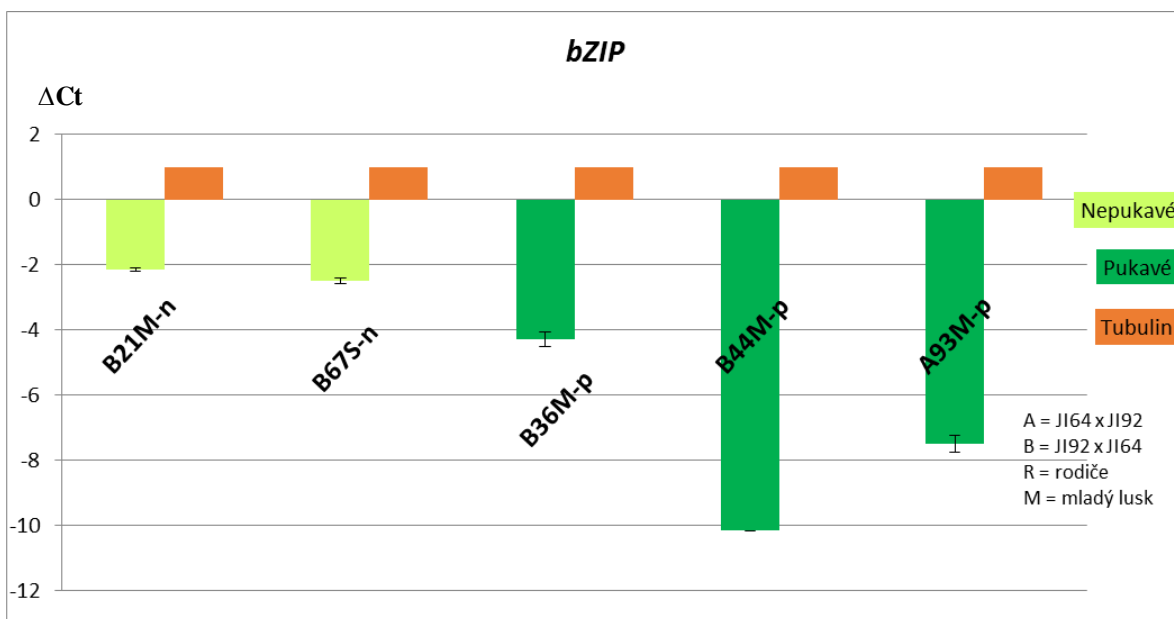


**Obr. 13** *Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu NAC testovaných vzorků hrachu*

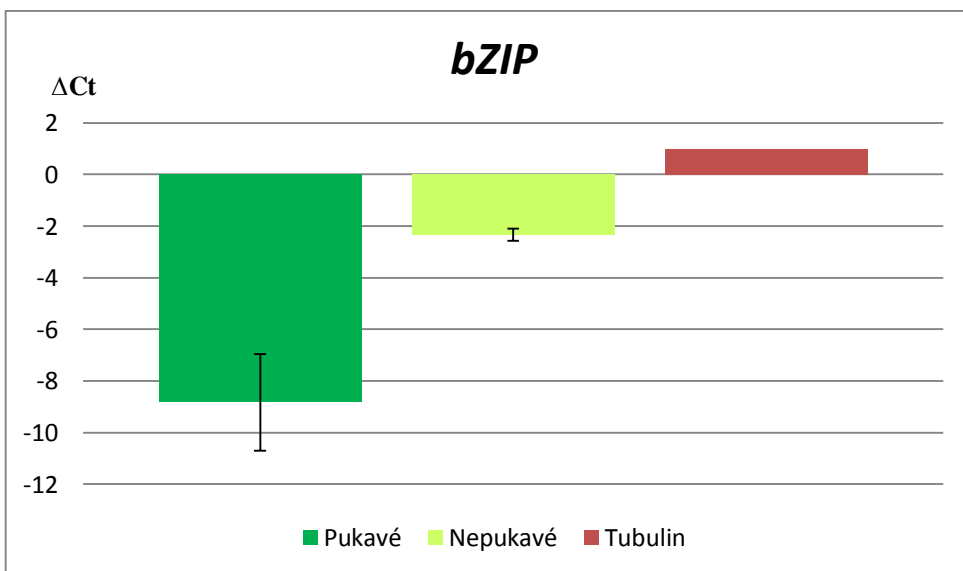
Z obr. 12, 13 můžeme vyčíst, že pukavé vzorky testované pro expresi genu *NAC* vykazují downexpresi. Opačný případ byl však pozorován u nepukavých vzorků, kde je exprese genu *NAC* téměř 3x vyšší v porovnání s expresí referenčního genu.

**Tab. 10** *Hodnoty  $\Delta C_t$  pro gen bZIP z qRT-PCR a relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a referenčního genu ( $2^{\Delta C_t}$ )*

Vzorek (pracovní název)	$\Delta C_t$ bZIP	$2^{\Delta C_t}$
1-B21M-n	2,162	4,475
2-B67S-n	2,491	5,622
3-B36M-p	4,273	19,333
4-B44M-p	10,165	1148,074
5-A93M-p	7,507	181,899



**Obr. 14** Vyhodnocení qRT-PCR: exprese genu *bZIP* u testovaných vzorků hrachu



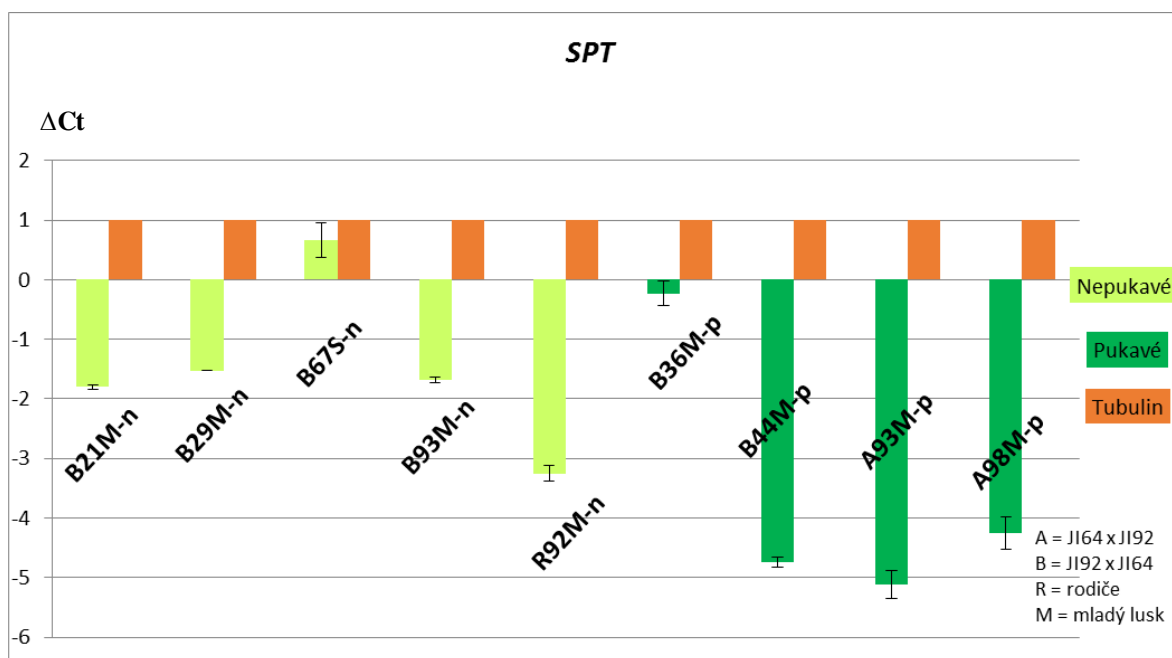
**Obr. 15** Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu *bZIP* testovaných vzorků hrachu

Expresa genu *bZIP* je velmi nízká u všech vzorků, jedná se o downexpresi v porovnání s housekeepingovým genem pro  $\beta$ -tubulin. Pukavé vzorky však vykazují výrazně nižší

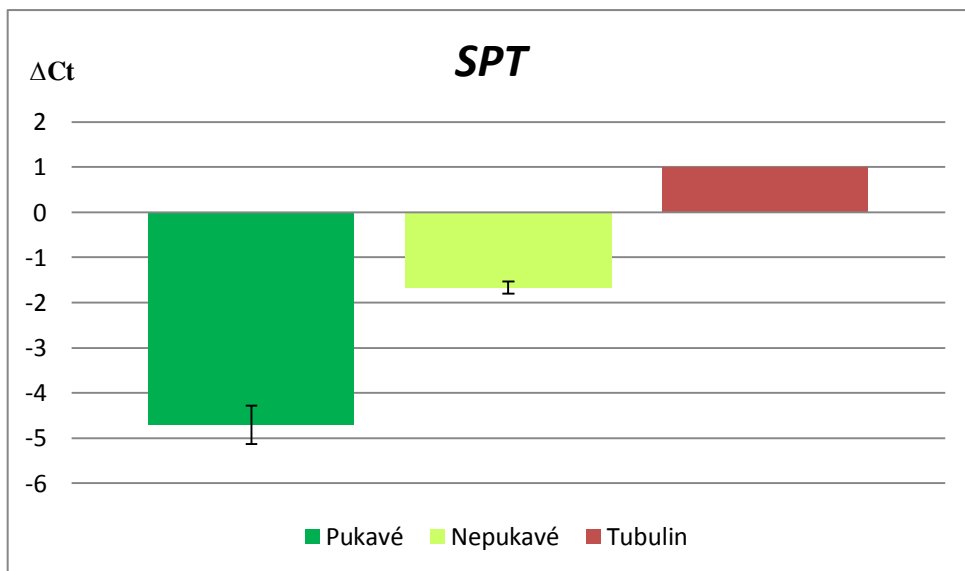
hodnoty exprese než nepukavé vzorky. Například pukavý vzorek 4-B44M-p má expresi 10x nižší v porovnání genem referenčním (obr. 14, 15).

**Tab. 11** Hodnoty  $\Delta Ct$  pro gen *SPT* z qRT-PCR a relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a referenčního genu ( $2^{\Delta Ct}$ )

Vzorek (pracovní název)	$\Delta Ct$ <i>SPT</i>	$2^{\Delta Ct}$
1-B21M-n	1,802	3,487
2-B29M-n	1,527	2,882
3-B67S-n	-0,661	0,632
4-B93M-n	1,681	3,207
5-R92M-n	3,257	9,560
6-B36M-p	0,228	1,171
7-B44M-p	4,741	26,741
8-A93M-p	5,121	34,800
9-A98M-p	4,261	19,173



**Obr. 16** Vyhodnocení qRT-PCR: exprese genu *SPT* (*SPATULA*) u testovaných vzorků hrachu

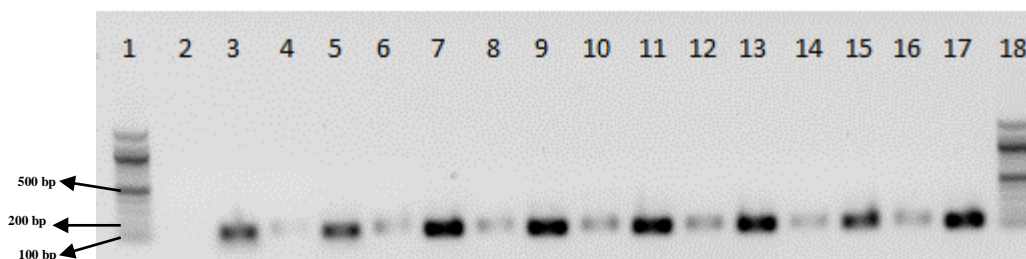


**Obr. 17** Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu *SPT* (*SPATULA*) testovaných vzorků hrachu

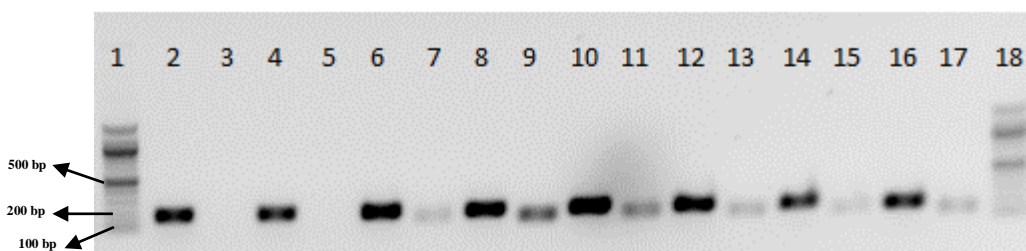
Z obr. 16, 17 lze vyčíst downexpresi genu *SPT* u všech sledovaných vzorků v porovnání s referenčním genem. Obr. 17 však zobrazuje rozdíl mezi expresí daného genu u pukavých a nepukavých vzorků, kdy pukavé mají expresi téměř 2x nižší než vzorky nepukavé.

### 4.3 Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR

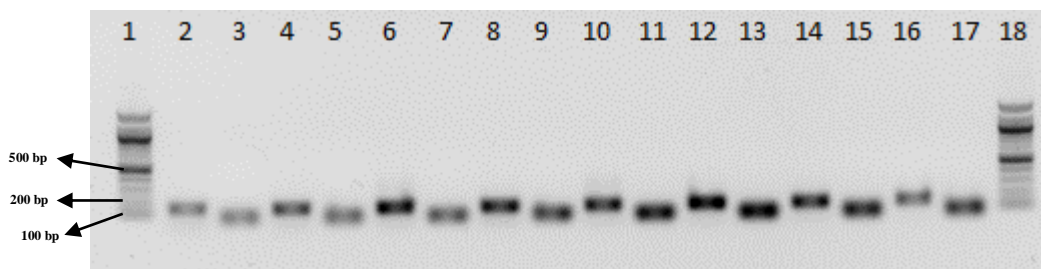
Produkty z qRT-PCR byly vizualizovány na agarózové elektroforéze pro vyloučení amplifikace nespecifických produktů. Jak je patrné z obr. 18 – 23, amplifikovány byly pouze specifické fragmenty z cDNA testovaných vzorků hrachu.



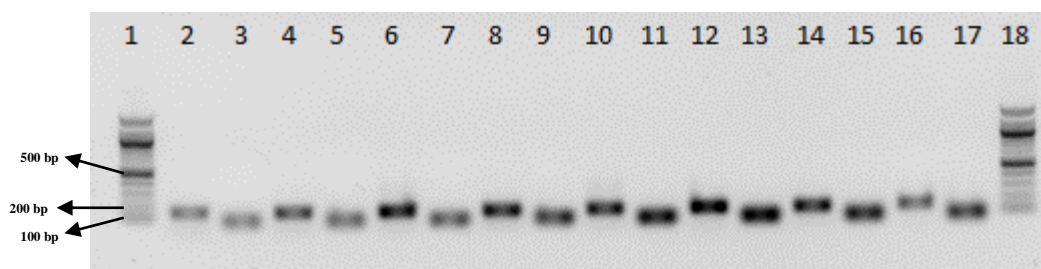
**Obr. 18 A:** *Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qIDEf, qIDER a qSHATf, qSHATr. Jamky: 1. 100 bp Quick load DNA Ladder, 2. - 9. Produkty s použitými primery qIDEf, qIDER, 3. 10. – 17. Produkty s použitými primery qSHATf, qSHATr, 18. 100 bp Quick load DNA Ladder*



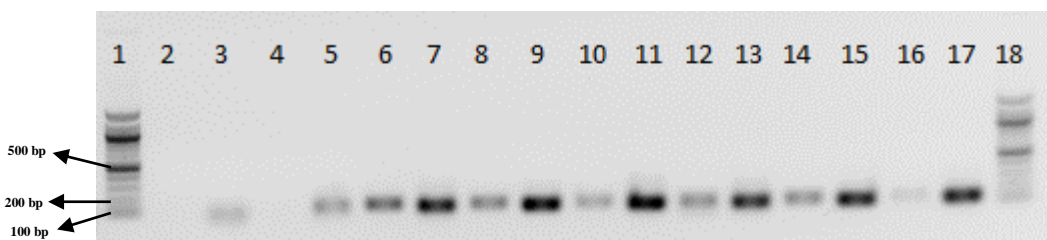
**Obr. 19 A:** *Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qNACf, qNACr a qbZIPf, qbZIPr. Jamky: 1. 100 bp Quick load DNA Ladder, 2. - 9. Produkty s použitými primery qNACf, qNACr, 10. – 17. Produkty s použitými primery qbZIPf, qbZIPr, 18. 100 bp Quick load DNA Ladder*



**Obr. 20 A:** *Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qSPTf, qSPTr a qβ-TubulinF, qβ-TubulinR. Jamky: 1. 100 bp Quick load DNA Ladder, 2. - 9. Produkty s použitými primery qSPTf, qSPTr 10. – 17. Produkty s použitými primery qβ-TubulinF, qβ-TubulinR, 18. 100 bp Quick load DNA Ladder*



**Obr. 21 B:** *Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qIDEf, qIDER a qSHATf, qSHATr. Jamky: 1. 100 bp Quick load DNA Ladder, 2. - 9. Produkty s použitými primery qIDEf, qIDER, 3. 10. – 17. Produkty s použitými primery qSHATf, qSHATr, 18. 100 bp Quick load DNA Ladder*



**Obr. 22 B:** *Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qNACf, qNACr a qbZIPf, qbZIPr. Jamky: 1. 100 bp Quick load DNA Ladder, 2. - 9. Produkty s použitými primery qNACf, qNACr, 10. – 17. Produkty s použitými primery qbZIPf, qbZIPr, 18. 100 bp Quick load DNA Ladder*



**Obr. 23 B:** *Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qSPTf, qSPTr a q $\beta$ -TubulinF, q $\beta$ -TubulinR. Jamky: 1. 100 bp Quick load DNA Ladder, 2. - 9. Produkty s použitými primery qSPTf, qSPTr 10. – 17. Produkty s použitými primery q $\beta$ -TubulinF, q $\beta$ -TubulinR, 18. 100 bp Quick load DNA Ladder*

## 5 DISKUZE

Identifikace nových markerů pro domestikační znaky je v zájmu šlechtitelů již po mnoho let. Důvodem je možné využití potenciálu planých forem rostlin, které ve svém genomu nesou například různé geny rezistence. Na druhé straně plané formy kulturních plodin často nesou znaky pro pěstování nevhodné. Tato práce byla zaměřena na testování kandidátních genů pro pukavost lusku u hrachu, jejichž identifikace přispěje při tvorbě nových odrůd bobovitých rostlin. Znak pukavosti je při tvorbě nových odrůd nežádoucí z hlediska případné ztráty výnosu (Dong et al., 2014).

V posledních letech došlo ve výzkumu domestikačních znaků k několika klíčovým objevům, například publikace o tolici vojtěšce *Medicago truncatula* Gaertn. z roku 2013 potvrzuje, že během evoluce došlo k mutaci genu *SHATTERPROOF* (*SHAT*), která zajišťuje lignifikaci lusků a tedy i následné puknutí. Tento gen byl identifikován již i u *Arabidopsis thaliana*, kde kontroluje ukládání ligninu během dozrání plodu. Dále byl identifikován gen *INDEHISCENT* (*IDEH*), který patří také do regulátorů tvorby tvorbou lignifikované vrstvy (Fourquin et al., 2013).

U sóji (*Glycine max* L.) jsou geny *NAC* a *SHATTERING1-5* (*SHAT1-5*) zodpovědné za domestikaci, tedy za nepukavý fentyp. Tento objev byl publikovaný v roce 2014 a bylo potvrzeno, že geny funkčně aktivují tvorbu sekundární buněčné stěny a významně podporují tloušťku FCC buněk sekundární buněčné stěny, tedy sklerenchymatická vlákna ventrálního cévního svazku (Dong et al., 2014).

Testování kandidátních genů *IDEH*, *SHAT*, *NAC*, *bZIP* a *SPT* bylo provedeno technikou qRT-PCR. Pro tento účel byly použity JI64 (*P. s. ssp. elatius* L.) a JI92 (afghánský typ kulturního hrachu *P. s. ssp. sativum* L.) a jejich rekombinantních inbredních linií (RILs), vzniklých recipročním křížením.

Vyhodnocení exprese kandidátních genů bylo stanoveno dle metody  $\Delta$ Ct. Jako vnitřní kontrola hodnoty exprese byl využit housekeepingový genu  $\beta$ -tubulin (Die et al., 2010). Z výsledků je patrné, že gen *NAC* je silně exprimován u nepukavých vzorků hrachu, což potvrzuje studii o klíčové funkci genu *NAC* pro syntézu FCC buněk, které zabraňují puknutí lusku u sóji (*Glycine max* L.). Obdobné výsledky vyšly u kandidátního genu *SHAT* (Dong et al., 2014). Dalším kandidátním genem této studie byl transkripční faktor *bZIP* ovlivňující gen *Pdh1*, kontrolující pukavost lusku sóji (*Glycine max* L.) (Gao a Zhu, 2013).



V našem případě byla výsledná exprese tohoto genu u hrachu velice nízká, jednalo se o downexpresi u všech testovaných vzorků. Kandidátní gen *IDEH* vykazoval nízkou expresi u testovaných vzorků, nicméně u nepukavých vzorků byla exprese vyšší než u pukavých vzorků. Tyto hodnoty jsou v souladu s faktem, že gen *FUL* u pukavých odrůd potlačuje expresi genu *IDEH*, výsledným fenotypovým projevem je tedy pukavost šešule u houseníčku (Ferrándiz, 2002; Liljegren et al., 2004).

## 6 ZÁVĚR

V této práci byly studovány domestikační znaky plodin se zaměřením na hrách (*Pisum sativum* L.). Hlavní experiment spočíval v analýze exprese kandidátních genů pro pukavost lusků hrachu v průběhu dozrávání lusků. Podařilo se analyzovat expresní profily kandidátních genů pro pukavost lusku hrachu pomocí metody qRT-PCR u JI64 (*P. s. ssp. elatius* L.) a JI92 (afghánský typ kulturního hrachu *P. s. ssp. sativum* L.) a jejich rekombinantních inbredních linií (RILs), vzniklých recipročním křížením. Nejvýraznější rozdíl v expresi u vzorků s pukavými a nepukavými lusky hrachu vzorků hrachu, vykazoval gen *NAC*, který je zodpovědný za nepukavost lusků u kulturní sóji.

Paralelně s tímto experimentem probíhá metoda MACE (Massive Analysis of cDNA Ends). Izolace RNA vzorků pro tuto analýzu byla součástí této práce, kdy byly vytvořeny směsné vzorky JI64 a JI92 a jejich rekombinantních linií (RILs). Jedná se celogenomovou analýzu pomocí masivního sekvenování, které probíhá ve firmě GenXPro (Frankfurt nad Mohanem, Německo). Analýza MACE však nebyla do uzávěrky této práce dokončena. Výstupem této metody bude expresní profil všech zahrnutých transkriptů ve vysokém rozlišení (Zajac et al., 2015).

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABBO S., OSS R.P., GOPHER A., SARANGA Y., OFNER I., PELEG Z. (2014) Plant domestication versus crop evolution: a conceptual Framework for cereals and grain legumes. *Trends in plant science* 19 (6): 351-360.

ABBO S., SHTIENBERG D., LICHTENZVEIG J., LEV-YADUN S., GOPHER A. (2003) The chickpea, summer cropping, and a new model for pulse domestication in the ancient Near East. *Q. Rev. Biol.* 78: 435–448.

AKHUNOV E.D., AKHUNOVA A.R., ANDERSON O.D., ANDERSON J.A., BLAKE N., CLEGG M.T., COLEMAN-DERR D., CONLEY E.E., CROSSMAN C.C., DUBCOVKY J., GILL B.S., GU Y.Q., HADAM J., HEO H.Y., HUO N., LAZO G., LUO M.C., MA Y.Q., MATTHEWS D.E., MCGUIRE P.E., MORRELL P.L., QUALSET C.O., RENFRO J., TABANAO D., TALBERT L.E., TIAN C., TOLENO D.M., WARBURTON M.L., YOU F.M., ZHANG W.J., DVOŘÁK J. (2010): Nucleotide diversity maps reveal variation in diversity among wheat genomes and chromosomes. *BMC Genomics*, 11: 702.

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

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

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

BROUGHTON W.J., HERNANDEZ G., BLAIR M., BEEBE S., GEPTS P., VANDERLEYDEN J. (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil.* 252: 55–128.

BURKE J.M., TANG S., KNAPP S.J., RIESEBERG L.H. (2002) Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics* 161: 1257–1267.

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

CHLOUPEK O. (2000) *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*, Academia, Praha, ISBN:80-200-0779-2, 311 s.

CHRISTIANSEN L.C., DEGAN D., ULVSKOV P., BORKHARDT B. (2002) Examination of the dehiscence zone in soybean pods and isolation of a dehiscence-related endopolygalacturonase gene. *Plant Cell Environ.* 25: 479–490.

COOK O.F. (1913) *Wild Wheat in Palestina*: U.S. Department of Agriculture Bureau of Plant Industry, Bulletin No. 274, U.S. Government Printing Office.

COSTA J., WALLACE T. (1963) *Darwin and the origin of species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 2014, 331 s. ISBN 978-0-674-72969-8.

COULIBALY S. (2002) AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L.Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. *Theor. Appl. Genet.* 104: 358–366.

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

DIAMOND J. (2002) Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418: 700–707.

DIE J.V., ROMÁN B., NADAL S., GONZÁLEZ-VERDEJO C.I. (2010) Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions, *Planta*, 232 (1): 145–153.

DOEBLEY J.F., GAUT B.S., SMITH B.D. (2006) The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127: 1309-1321.

DOMONEY C., WEHLAM T., ELLIS N., HELLENS R. (1994) Inheritance of qualitative and quantitative trypsin inhibitor variants in *Pisum*. *Theor Appl Genet* 89: 387-391.

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

DVOŘÁK J., LUO M.CH., AKHUNOV E.D. (2011) N.I. Vavilov's Theory of Centres of Diversity in the Light of Current Understanding of Wheat Diversity, Domestication and Evolution. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 47: 20-27.

DVOŘÁK J., LUO M.CH., YANG Z.L., ZHANG H.B. (1998) The structure of the *Aegilops tauschii* gene pool and the evolution of hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 657–670.

FERRÁNDIZ C. (2002) Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *Exp Bot.* 53: 2031–2038.

FLINT-GARCIA S.A. (2013) Genetics and Consequences of Crop Domestication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (35): 8267–8276.

FOURGUIN CH., CERRO C., VICTORIA F.C., VIALETTE-GUIRAUD A., OLIVEIRA A.C., FERRÁNDIZ C. (2013) A Change in SHATTERPROOF Protein Lies at the Origin

of a Fruit Morphological Novelty and a New Strategy for Seed Dispersal in *Medicago* Genus, *Plant Physiology*, 162: 907-917.

FUNATSUKI H., SUZUKI M., HIROSE A., INABA H., YAMADA T., HAJIKA M., KOMATSU K., KATAYAMA T., SAYAMA T., ISHIMOTO M., FUJINO K. (2014) Molecular basis of a shattering resistance boosting global dissemination of soybean, *Cross Mark*, University of California, *PNAS* 111 (50), 17797–17802.

GAO M., ZHU H. (2013) Fine mapping of a major quantitative trait locus that regulates pod shattering in soybean, *Mol.Breeding*, 32: 485-491.

GEPTS P., DEBOUCK D.G. (1991) Origin, domestication, and evolution of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. In Voysest O, VanSchoonhoven A, eds. *Common beans: research for crop improvement*. Wallingford, UK: CAB, 7–53.

GONG Y., XU S., MAO W., HU Q., ZHANG G., DING J., LI Y. (2010) Developing new SSR markers from ESTs of pea (*Pisum sativum* L.), *Journal of Zhejiang University – SCIENCE B*: 1673–1681.

GIOIA T., LOGOZZO G., KAMI J., ZEULI P.S., GEPTS P. (2013) Identification and Characterization of a Homologue to the *Arabidopsis* INDEHISCENT Gene in Common Bean. *Journal of Heredity* 104(2), 273–286.

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

HAVEY M.J., MUEHLBAUER F.J. (1989) Variability for restriction fragment lengths and phylogenies in lentil. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 839–843.

HECHT V., LAURIE R.E., VANDER SCHOOR J.K., RIDGW S., KNOWLES C.L., LIEW L.C., SUSSMILCH F.C., MURFET I.C., MACKNIGHT R.C., WELLER J.L.

(2011) The pea GIGAS gene is a FLOWERING LOCUS T homolog necessary for graft-transmissible specification of flowering but not for responsiveness to photoperiod. *Plant Cell* 23: 147 – 161.

HEISER C. (1988) Aspects of unconscious selection and the evolution of domesticated plants. *Euphytica* 37: 77–85.

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

HESLOP-HARRISON J.S., SCHWARZACHER T. (2007) Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of Botany* 100(5): 1073-1084.

HOLDEN J., PEACOCK J., WILLIAMS T. (1993) *Genes, crops and the environment*. Cambridge University Press, 162 s.

HYMOWITZ T. (1970) On the domestication of the soybean. *Econ. Bot.* 24: 408–421.

IQUAL M.J. (2001) A genetic bottleneck in the ‘evolution under domestication’ of upland cotton *Gossypium hirsutum* L. examined using DNA fingerprinting. *Theor. Appl. Genet.* 103: 547–55.

JING R., JOHNSON R., SERES a., KISS G., AMROSE M.J., KNOX M.R., ELLIS T.H.N., FLAVELL A.J. (2007) Gene-based sequence diversity analysis of field pea (*Pisum*). *Genetics*, 177: 2263–2275.

JING R., VERSHININ A., GRZEBYTA J., SHAW P., SMÝKAL P., MARSHALL D., AMBROSE M.J., ELLIS T.N., FLAVELL A.J. (2010) The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evolutionary Biology* 10:44, 1–20.

- KAGA A., ISEMURA T., TOMOOKA N., VAUGHAN D.A. (2008) The genetics of domestication of azuki bean (*Vigna vulgaris*). *Genetics* 178: 1013-1036.
- KENICER G., SMÝKAL P., VISNHAKOVA M., MIKIĆ A. (2009) *Vavilovia formosa* – an intriguing *Pisum* relative. *Grain Legum.* 51: 8.
- KINSLEV M.E. (2009) Reconstructing the ear morphology of ancient small-grain wheat (*Triticum turgidum* ssp. *parvicoccum*). *From Foragers to Farmers*, Oxbow Books: 235-238.
- KOINANGE E.M.K., SINGH S.P., GEPTS P. (1996). Genetic control of the domestication syndrome in common bean. *Crop Science* 36: 1037–1045.
- KUPTSOV A.I., RAMENSKAYA M.E., VAVILOV N.I. (1989) Vavilov Geographic Concept and Modern Times, in *Vavilovskoe nasledie v sovremennoi biologii* (Vavilov Heritage in Modern Biology), Moscow: Nauka, pp. 147–154.
- KUTHAN M. (2009) Hybridizační metody studia nukleových kyselin, *Živa*, 1: 44–45.
- LADIZINSKY G. (1985) The genetics of hard seed coat in the genus *Lens*. *Euphytica* 34: 539–543.
- LADIZINSKY G. (1993) Lentil domestication: on the quality of evidence and arguments. *Econ. Bot.* 47: 60–64.
- LADIZINSKY G. (1979) Seed dispersal in relation to the domestication of Middle East legumes. *Econ. Bot.* 33: 284–289.
- LARSON B., BRAUER F. (2009) *The art of evolution: Darwin, Darwinisms, and visual culture*. Hanover, N.H.: Published by University Press of New England, ix, 332 p. *Interfaces, studies in visual culture*. ISBN 1584657758.

LARSON G., BURGER J. (2013) A population genetics view of animal domestication. *Trend Genet.* 29: 197-205.

LI C., ZHOU A., SANG T. (2006) Rice domestication by reducing shattering. *Science* 311: 1936–1939.

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

LJUŠTINA M., MIKIĆ A. (2010) A brief review on the early distribution of pea (*Pisum sativum* L.) in Europe, *Field Veg. Crop Res.* 47: 457–460.

LUO M.C., DEAL K.R., AKHUNOV E.D., AKHUNOVA A.R., ANDERSON O.D., ANDERSON J.A., BLAKE N., CLEGG M.T., COLEMAN-DERR D., CONLEY E.E., CROSSMAN C.C., DUBCOVKY J., GILL B.S., GU Y.Q., HADAM J., HEO H.Y., HUO N., LAZO G., MA Y.Q., MATTHEWS D.E., McGUIRE P.E., MORRELL P.L., QUALSET C.O., RENFRO J., TABANAO D., TALBERT L.E., TIAN C., TOLENO D.M., WARBURTON M.L., YOU F.M., ZHANG W.J., DVOŘÁK J. (2009): Genome comparisons reveal a dominant mechanism of chromosome number reduction in grasses and accelerated genome evolution in *Triticeae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 15780–15785.

MARINOVA E., POPOVA T. (2008) *Cicer arietinum* (chick pea) in the Neolithic and Chalcolithic of Bulgaria: implications for cultural contacts with the neighbouring regions? *Veget. Hist. Archaeobot.* 17: 73-80.

MAURICIO R. (2001) Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nat. Rev. Genet.* 2: 370–381.



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

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

MIKIĆ A., CUPINA B., KATIĆ S., KARAGIĆ D. (2006) Importance of annual forage legumes in supplying plant proteins. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo / A Periodical of Scientific Research on Field and Vegetable Crops* 42: 91-103.

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

MUQIANG G., HONGYAN Z. (2013) Fine mapping of a major quantitative trait locus that regulates pod shattering in soybean. *Mol.Breeding.*32: 485-491.

MURFERT I.C., REID J.B. (1985) The control of flowering and internode length in *Pisum*. In: Hebblethwaite PD, Heath MC, Dawkins TCK, eds. *The pea crop*. London: Butterworths, 67–80.

NOLAN T., HANDS R.E., BUSTIN S.A. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1: 1559–1582.

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

PURUGGANAN M.D., FULLER D.Q. (2009) The nature of selection during plant domestication. *Nature* 457: 843–848.

RUSSEL J., DAWSON I.K., FLAVELL A.J. (2011) Analysis of > 1000 single nucleotide polymorphisms in geographically matched samples of landrace and wild barely indicates secondary contact and chromosome-level differences in diversity around domestication genes. *New Phytol.* 191: 564-578.

SADORI L., SUSANNA F., PERSIANI C. (2006) Archaeobotanical data and crop storage evidence from an early Bronze Age 2 burnt house at Arslantepe, Malatya, Turkey. *Veget. Hist. Archaeobot.* 15: 205-215.

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

SAVAGE M., VAVILOV N.I., LOVE D. (1992). *Origin and Geography of Cultivated Plants*. [online]. [cit. 2015-03-03]. DOI: 10.2307/215338.

SHU G., MUTHUKRIHNNAN S., LIANG G.H., PAULSEN G.M. (1993) Restriction Fragment Patterns of Chloroplast and Mitochondrial DNA of *Dasypyrum villosum* (L.) Candargy and Wheats, *Theor. Appl. Genet.*, 87: 44–48.

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

SMÝKAL P., AUBERT G., BURSTIN J., COYNE C.J., ELLIS N.T., FLAVELL A.J., FORD R., HÝBL M., MACAS J., NEUMANN P., MCPHEE K.E., REDDEN R.J., RUBIALES D., WELLER J.L., WARKENTIN T.D. (2012) Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era, *Agronomy* 2: 74-115.

SUZUKI M., FUJINO K., FUNATSUKI H. (2009) A major soybean QTL, qPDH1, controls pod dehiscence without marked morphological change. *Plant Prod. Sci.* 12: 217–223.

SUZUKI M., FUJINO K., NAKAMOTO Y., ISHIMOTO M., FUNATSUKU H. (2010) Finemapping and development of DNA markers for the qPDH1 locus associated with pod dehiscence in soybean. *Mol. Breeding* 25: 407–418.

TAMARIN R.H. (2002) *Principles of genetics*, McGraw-Hill Companies, USA, ISBN: 0-07-233419-3, 609s.

TANNO K.I., WILLCOX G. (2006) The origins of cultivation of *Cicer arietinum* L. and *Vicia faba* L.: early finds from Tell el-Kerkh, north-west Syria, late 10th milénium b.p.. *Veget.Hist. Archaeobot.* 15: 197-204.

TZARFATI R., SARANGA Y., BARAK V., GOPHER A., KOROL A.B., ABBO S. (2013) Threshing efficiency as an incentive for rapid domestication of emmer wheat. *Ann. Bot.* 112 (5): 829–837.

VAVILOV N.I. (1926): *Studies on the origin of cultivated plants.* (Russian) *Bulletin of Applied Botany and Plant Breeding*, 14: 1–245.

VERSHININ A.V., ALLNUTT T.R., KNOX M.R., AMROSE M.J., ELLIS T.H.N. (2003) Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in *Pisum* diversity, evolution, and domestication. *Molecular Biological Evolution* 20: 2067–2075.

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

WEEDEN N.F., BRAUNER S., PRZYBOROWSKI J.A. (2002) Genetic analysis of pod dehiscence in pea (*Pisum sativum* L.). Cell. Mol. Biol. Lett. 7(2B): 657-663.

WEEDEN N.F., WOLKO B. (1988) Measurement of genetic diversity in pea accessions collected near the center of origin of domesticated pea. Applied Botany and Plant Breeding, 16: 3-18

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

ZAWADA A.M., ROGACEV K.S., MULLER S., ROTTER B., WINTER P., FLISER D., HEINE G.H. (2013) Massive analysis of cDNA Ends (MACE) and miRNA expression profiling identifies proatherogenic pathways in chronic kidney disease, Epigenetics, 9(1): 161–172.

ZAJAC B.K., AMENDT J., HORRES R., VERHOFF M.A., ZEHNER R. (2015) De novo transcriptome analysis and highly sensitive digital gene expression profiling of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) pupae using MACE (Massive Analysis of cDNA Ends), Forensic Sci. Int. Genet., 15: 137-146.

ZEDER M.A., EMSHWILLER E., SMITH B.D., BRADLEY D.G. (2006) Documenting domestication: the intersection of genetics and archeology, Trends in genetics, 22(3): 139-155.

ZEVEN A.C., ZHUKOVSKY P.M. (1975) Dictionary of Cultivated Plants and Their Centres of Diversity. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.

ZOHARY, D., HOPF M. (2000) Domestication of Plants in the Old World; Oxford University Press: Oxford, UK.

ZOHARY, D., HOPF M., WEISS E. (2012) Domestication of Plants in the Old World: The origin and Spread of Domesticated Plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin. (4th edn), Oxford University Press, 316 s.

ZVÁROVÁ J., MAZURA I. (2012) Metody molekulární biologie a bioinformatiky. 1. vyd. Praha: Karolinum, 343 s. Biomedicínská informatika. ISBN 9788024621500.

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1</b>	<i>Oblasti původu a první domestikační oblasti kulturních rostlin a domácích zvířat</i>	17
<b>Obr. 2</b>	<i>Test klíčivosti plané pšenice dvouzrnky (<i>T. turgidum</i> ssp. <i>dicoccoides</i>) a domestikované pšenice tvrdé (<i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i>)</i>	21
<b>Obr. 3</b>	<i>Vazebné skupiny <i>P. sativum</i> (n = 7).</i>	26
<b>Obr. 4</b>	<i>Příklad fenotypového vývoje plané cizrny (<i>Cicer reticulatum</i> L.) – nahoře, a domestikované formy (<i>Cicer arietinum</i> L.)</i>	29
<b>Obr. 5</b>	<i>Velikostního marker - 100 bp Quick load DNA ladder</i>	42
<b>Obr. 6</b>	<i>Test specifity primerů pro geny NAC a bZIP na DNA hrachu.</i>	43
<b>Obr. 7</b>	<i>Test specifity primerů pro geny SPT, SHAT, IDEH na DNA hrachu</i>	43
<b>Obr. 8</b>	<i>Vyhodnocení qRT-PCR: exprese genu IDEH (INDEHISCENT) u testovaných vzorků hrachu</i>	45
<b>Obr. 9</b>	<i>Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu IDEH (INDEHISCENT) testovaných vzorků hrachu</i>	45
<b>Obr. 10</b>	<i>Vyhodnocení qRT-PCR: exprese genu SHAT (SHATTEPROOF) u testovaných vzorků hrachu</i>	46
<b>Obr. 11</b>	<i>Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu SHAT (SHATTERPROOF) testovaných vzorků hrachu</i>	47

<b>Obr. 12</b>	<i>Vyhodnocení qRT-PCR: exprese genu NAC u testovaných vzorků hrachu</i>	48
<b>Obr. 13</b>	<i>Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu NAC testovaných vzorků hrachu</i>	49
<b>Obr. 14</b>	<i>Vyhodnocení qRT-PCR: exprese genu bZIP u testovaných vzorků hrachu</i>	50
<b>Obr. 15</b>	<i>Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu bZIP testovaných vzorků</i>	50
<b>Obr. 16</b>	<i>Vyhodnocení qRT-PCR: exprese genu SPT (SPATULA) u testovaných vzorků hrachu</i>	51
<b>Obr. 17</b>	<i>Vyhodnocení qRT-PCR: průměrné hodnoty exprese genu SPT (SPATULA) testovaných vzorků hrachu</i>	52
<b>Obr. 18</b>	<i>A: Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qIDEf, qIDEr a qSHATf, qSHATr.</i>	53
<b>Obr. 19</b>	<i>A: Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qNACf, qNACr a qbZIPf, qbZIPr.</i>	53
<b>Obr. 20</b>	<i>A: Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qSPTf, qSPTr a qβ-TubulinF, qβ-TubulinR.</i>	54
<b>Obr. 21</b>	<i>B: Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qIDEf, qIDEr a qSHATf, qSHATr.</i>	54
<b>Obr. 22</b>	<i>B: Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qNACf, qNACr a qbZIPf, qbZIPr.</i>	54
<b>Obr. 23</b>	<i>B: Ověření specifické amplifikace produktů qRT-PCR s použitými primery qSPTf, qSPTr a qβ-TubulinF, qβ-TubulinR.</i>	55

## 9 SEZNAM TABULEK

<b>Tab. 1</b>	<i>Výsledky genetických studií znaků hrachu zodpovědných za domestikální syndrom (Weeden et al., 2007)</i>	24
<b>Tab. 2</b>	<i>Koncentrace RNA v pukavých i nepukavých vzorcích (A = JI64 x JI92; B = JI92 x JI64; R = rodiče; M = mladý lusk)</i>	38
<b>Tab. 3</b>	<i>Složení reakční směsi pro RT-PCR (Premix I)</i>	39
<b>Tab. 4</b>	<i>Složení reakční směsi pro RT-PCR (Premix II)</i>	39
<b>Tab. 5</b>	<i>Sekvence primerů pro geny IDEH, SHAT, bZIP, SPT, NAC, β-TUB</i>	40
<b>Tab. 6</b>	<i>Složení reakční směsi pro Real-Time PCR</i>	41
<b>Tab. 7</b>	<i>Hodnoty <math>\Delta C_t</math> pro gen IDEH z qRT-PCR a relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a referenčního genu (<math>2^{\Delta C_t}</math>)</i>	44
<b>Tab. 8</b>	<i>Hodnoty <math>\Delta C_t</math> pro gen SHAT z qRT-PCR a relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a referenčního genu (<math>2^{\Delta C_t}</math>)</i>	46
<b>Tab. 9</b>	<i>Hodnoty <math>\Delta C_t</math> pro gen NAC z qRT-PCR a relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a referenčního genu (<math>2^{\Delta C_t}</math>)</i>	48
<b>Tab. 10</b>	<i>Hodnoty <math>\Delta C_t</math> pro gen bZIP z qRT-PCR a relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a referenčního genu (<math>2^{\Delta C_t}</math>)</i>	49
<b>Tab. 11</b>	<i>Hodnoty <math>\Delta C_t</math> pro gen SPT z qRT-PCR a relativní rozdíl v počtu kopií amplikonu vzorku a referenčního genu (<math>2^{\Delta C_t}</math>)</i>	51

## 10 SEZNAM ZKRATEK

<b>ALC</b>	gen <i>ALCATRAZ</i>
<b>bZIP</b>	Basic-leucin zip (gen pro transkripční faktor <i>bZIP</i> )
<b>cDNA</b>	complementary DNA
<b>ctDNA</b>	chloroplastová DNA
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>Dpo</b>	locus pod dehiscence
<b>EST</b>	Expressed sequence tag
<b>FCC</b>	Fibre Cap Cells
<b>FUL</b>	gen <i>FRUITFULL</i>
<b>HRM</b>	High-resolution Melt Analysis
<b>IDEH</b>	gen <i>INDEHISCENT</i>
<b>mtDNA</b>	mitochondriální DNA
<b>NCBI</b>	National Centre for Biotechnology Information
<b>nDNA</b>	jaderná DNA
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative reverse transcription - PCR
<b>QTL</b>	Quantitative Trait Locus
<b>RBIP</b>	retrotransposon based insertion polymorphism
<b>rDNA</b>	ribozomální DNA
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RILs</b>	Recombinant Inbred Line
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid
<b>SHAT 1-5</b>	gen <i>SHATTERPROOF 1-5</i>
<b>SNP</b>	Single Nucleotid Polymorfism
<b>SSR</b>	simple sequence repeat
<b>TAM</b>	Tagged Microarray Marker
<b>Wt</b>	wild type