

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav Biologie rostlin



**Molekulární fylogeneze a genetická diverzita
nejbližších příbuzných rodu *Pisum***
Bakalářská práce

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

Vypracovala:
Nela Bačovská

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci Molekulární fylogeneze a genetická diverzita nejbližších příbuzných rodu *Pisum* 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 *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....
podpis

Poděkování

V první řadě děkuji své mamě za podporu při studiu, dále vedoucímu své bakalářské práce, Ing. Pavlu Hanáčkovi, PhD. a konzultantovi Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za ochotu a cenné rady a také Bc. Václavu Bačovskému za výpomoc při práci.

ABSTRAKT

Vědecký obor fylogenetika lidstvu v průběhu let poskytl jedinečnou možnost poznat historii vývoje druhů a jejich vzájemnou provázanost na planetě. Dřívější spoléhání se pouze na vnější morfologické znaky pro roztřídění taxonů je v současné době pro zpřesnění doplňováno a nahrazováno molekulárně biologickými studii. Naše poznatky je možno využít i při pátrání po geografickém původu daných organismů, jejich následném rozšíření a změně genetické informace, což jsou potřebné podklady pro diverzifikaci druhu. V této práci bylo pro bližší seznámení s problematikou vývojové genetiky a genetické diverzity využito čeledi *Fabaceae*. Z ní poté byl vybrán druh *Lathyrus neurolobus* a na něm zkoumána možnost využití SSR a iPBS markerů pro další možné studium detailní příbuznosti s rodem *Pisum*.

Klíčová slova: fylogenetika, bobovité, Lathyrus neurolobus, hrách, iPBS, SSR

ABSTRACT

Phylogenetics has given us a unique possibility to learn the history of species evolution and their interconnection on the planet. Our earlier reliance only on outer morphological features for taxon classification is now being completed and even replaced by molecular-biological studies for clarification. It is possible to use our knowledge when searching for geographical origins of organisms, their expansion and change of genetic information, which are all the needed foundations for species diversification. In this work we used the family *Fabaceae* for the study of evolutionary genetics. Then we chose *Lathyrus neurolobus* for further examination of the potential use of SSR and iPBS markers for *Pisum* intergenus studies.

Key words: phylogenetics, legume, Lathyrus neurolobus, pea, iPBS, SSR

Obsah

Obsah.....	5
1 ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	7
1.1 Úvod.....	7
1.2 Cíl práce.....	8
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	9
2.1 Čeleď <i>Fabaceae</i>	9
2.1.1 Obecná charakteristika a genetická diverzita.....	9
2.1.2 Rod <i>Pisum</i>	11
2.1.3 Rod <i>Lathyrus</i>	12
2.1.4 Rod <i>Vicia</i>	14
2.2 Genetická diverzita.....	14
2.3 Fylogenetika.....	15
2.4 Molekulární fylogenetika.....	16
2.4.1 Molekulární fylogenetika čeledi <i>Fabaceae</i>	18
2.5 Transponovatelné elementy.....	18
2.6 Metody molekulární fylogenetiky.....	20
2.6.1 SSR markery.....	20
2.6.2 iPBS.....	20
3 MATERIÁL A METODIKA.....	22
3.1 DNA izolace.....	22
3.2 SSR analýza.....	23
3.3 iPBS analýza.....	25
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	27
5 ZÁVĚR.....	32
6 LITERATURA.....	33
7 SEZNAM OBRÁZKŮ.....	41

8	SEZNAM ZKRATEK.....	42
9	PŘÍLOHY	43
9.1	Seznam příloh.....	43

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

1.1 Úvod

Rod hrách náleží do čeledi bobovité (*Fabaceae* Lindl.), která patří bezesporu mezi nejdůležitější rostlinné čeledi na Zemi z hlediska výživy pro člověka i pro chovaná zvířata. Archeologické nálezy indikují, že pěstování těchto polních plodin je možno datovat již do doby před deseti tisíci lety. Domestikace bobovitých je spojena s centry jejich genetické diverzity, jež zahrnují oblasti Blízkého východu, východní Afriky a Středozeří.

Pro zařazení organismů do taxonomických jednotek a popsání jejich vývoje bylo od dob Linného využíváno hlavně fenotypových znaků. S postupným rozvojem vědy a získáním nesčetných poznatků z oborů chemie, biochemie, biologie a především genetiky se fylogenetické analýzy stávají mnohem komplikovanější než je pouhé popsání vnějších projevů, ale především se i stále zpřesňuje zařazení druhů do systému. Tato skutečnost nám dává možnost poznat postupný vývoj života na naší planetě, naučit se mnoho z vlastní historie, využít znalosti pro současnou žijící populaci a dokonce i nahlédnout do budoucnosti a předpovědět či simulovat další možné scénáře zastoupení druhů na zemi.

Zelené rostliny představují jednu z nejdůležitějších komponent podmínek života na planetě, protože získaly schopnost fotosyntézy. Díky práci na fylogenetické analýze čeledi *Fabaceae* se pro studium jejich vývoje začaly využívat specifické barkódující sekvence v chloroplastech, jež umožňují jednoduchou rutinní činností obdržet velké množství dále využitelných dat.

Ovšem kromě těchto oblastí se ve fylogenetice lze spolehnout i na řadu dalších genomových oblastí, například nesčetné množství DNA markerů jako jsou krátké opakující se sekvence (SSR) nebo transponovatelné elementy. Práci s nimi je vhodné nejprve optimalizovat pro dosažení kvalitních výsledků.

1.2 Cíl práce

Cílem práce bylo blíže se seznámit s vybranými druhy čeledi bobovité (*Fabaceae* Lindl.). Konkrétně byli zvoleni zástupci rodů hrách, vikev a hrachor. Další část literární rešerše představovala ucelení představy a popsání molekulární fylogeneze této čeledi společně s odkazy na vzájemné vztahy jednotlivých druhů. Důraz byl kladen i na popis genetické diverzity jednotlivých rodů, tak i celé čeledi.

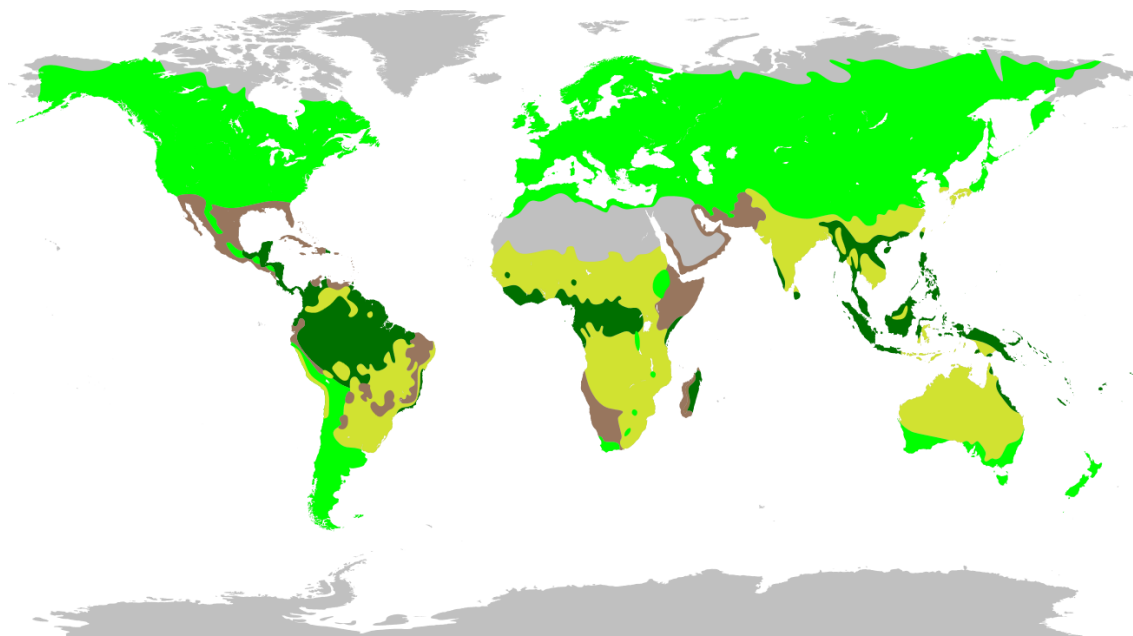
V praktické části bylo provedeno testování použitelnosti metod SSR a iPBS, původně použitých pro hrách, na druhu *Lathyrus neurolobus* Boiss. & Heldr. s cílem navržení vhodných markerů pro genetické analýzy stanovení míry příbuznosti hrachu a *L. neurolobus*, předpokládaného velmi blízkého příbuzného.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Čeleď *Fabaceae*

2.1.1 Obecná charakteristika a genetická diverzita

Čeleď bobovité (*Fabaceae*, *Leguminosae*) je třetí nejpočetnější skupinou kvetoucích rostlin na planetě s více než 18 000 druhy a 650 rody. (KASS, 1997). Tradičně se dělí na tři podčeledi: sapanovité (*Caesalpinioideae* DC.), citlivkovité (*Mimosoideae* DC.), což jsou převážně keře a stromy nebo liány v případě druhé podčeledě, a motýlokvěté (*Papilionoideae* DC.), již tvoří keře, stromy, ale i vytrvalé a jednoleté byliny (RACHIE, 1979). Celosvětově patří všechny mezi velice významné plodiny i planě rostoucí rostliny s širokou škálou využití (SMÝKAL et al., 2014). Je součástí kmene *Fabeae* Rchb., jenž pochází pravděpodobně z východního Středozeří, kde se poprvé objevil v miocénu (před 23 – 16 miliony let). Odtud se postupně rozšířil přes Eurasii do rovníkové Afriky a obou Amerických kontinentů (SCHAEFER et al., 2012).



Zdroj:

http://cs.wikipedia.org/wiki/Bobovit%C3%A9#/media/File:Legume_Biogeography.svg

Obr. 1: Geografické rozložení čeledi *Fabaceae*. Světle zelená značí mírné klima, tmavě zelená deštný prales, žlutá savany, hnědá sukulenty.

Některé druhy této třetí nejpočetnější čeledi kvetoucích rostlin byly prvními pěstovanými plodinami v historii. Jako příklad lze uvést sóju, fazoli, bob nebo hrách (SMÝKAL et al., 2014). Důkazy o využití hrachu v zemědělství je možno datovat do doby před zhruba 10 000 lety na Blízkém východě (ZOHARY et al., 2012).

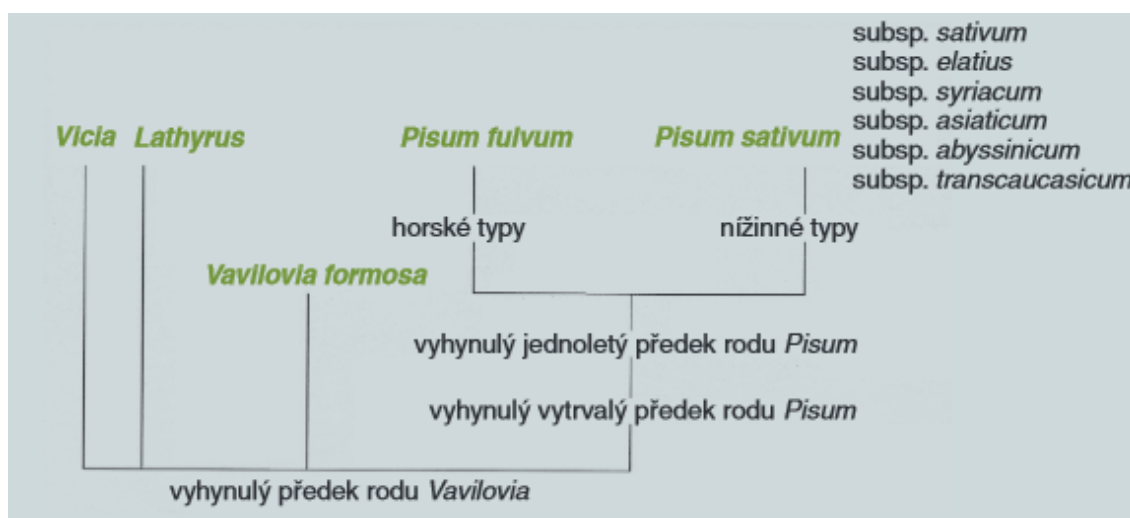
Mezi *Fabaceae* řadíme byliny, keře, stromy a liány. Listy mohou být jednoduše nebo dvojitě složené, dlanitě složené, trojčetné nebo jednoduché, případně palistnaté. Někdy se lístky přeměňují v listové úponky, trny mohou být přítomny. Květenství je téměř výlučně hroznovité a květy oboupohlavné. 5 kališních lístků bývá nejčastěji srostlých, vzácněji jsou oddělené. Stejný počet okvětních plátků může být také srostlý nebo jednotlivě rostoucí. Zástupci podčeledě bobovité (*Faboideae* Rudd) mají charakteristicky členěný květ na pavězu, křídla a člunek. Tyčinky (nejčastěji 10) bývají srostlé, prašník se v květech nachází téměř výlučně pouze jeden. Plodem je obvykle lusk (JUDD et al., 1999; NOVÁK & SKALICKÝ, 2008).

Tato čeleď je na prvním místě mezi pěstovanými plodinami, a to především díky vysokému obsahu proteinů a v některých případech i lipidů. Díky tomu má výborné nutriční vlastnosti, které nacházejí své uplatnění jednak jako potrava pro dobytek i jako součást vyvážené stravy lidí. Nevýhodou konzumace většiny jedlých zástupců bobovitých je obsah inhibitorů trypsinu, které způsobují špatné vstřebávání živin, a dále cukrů a oligosacharidů v buněčné stěně semen. Lidé postrádají schopnost je trávit, na rozdíl od střevních bakterií, jež ovšem při tomto procesu uvolňují různé plyny, např. metan, oxid uhličitý nebo vodík a tím způsobují nadýmání (HATCHER & BATTEY, 2011).

Mezi důležitou charakteristiku většiny zástupců čeledi *Fabaceae* patří schopnost fixace dusíku symbiotickými bakteriemi rodu *Rhizobium* sp. a *Bradyrhizobium* sp. (NOVÁK & SKALICKÝ, 2008; CREWS, 1999), které, díky enzymu nitrogenáze, mohou snadno konvertovat atmosférický N_2 na rostlinami využitelnou formu NH_4^+ . (SEEFELDT et al., 2009). Bakterie indukují tvorbu specifických orgánů na kořenech rostliny, tzv. nodů. Ty jsou dále osídlovány bakteriemi, které se změní v charakteristický druh buňky zvaný bakteroid. Další formování a pozměňování buněk je determinováno hostitelskou rostlinou a existuje jej tudíž vícero druhů (OKE & LONG, 1999). Vzhledem k tomu, že zemědělství se v dnešní době potýká s ekologickým problémem používání umělých hnojiv a s potřebou vysokého výnosu, zdá se výhodné a logické tuto jedinečnou vlastnost dále zkoumat. Jako možnost se jeví

využití biotechnologií při modifikaci obilovin na potenciální symbiózu s hlízkovitými bakteriemi, případně vložení samotného enzymu nitrogeinázy do rostliny (OLDROYD & DIXON, 2014).

Do podčeledi *Papilionoideae* patří mimo jiné i tři vývojově velice blízké rody, a to hrách (*Pisum*), vikev (*Vicia*) a hrachor (*Lathyrus*), u kterých se na základě tradiční taxonomie (podle morfologických a ekologických znaků) předpokládá vývoj z již vyhynulého předka rodu *Vavilovia*.



Zdroj: SMÝKAL, 2011

Obr. 2: Hypotetické schéma evoluce rodu *Pisum* považující druhem *Vavilovia formosa* jako možného předka rodu *Pisum*, *Lathyrus* a *Vicia*.

2.1.2 Rod *Pisum*

Rod hrách tvoří jednoleté byliny se sudozpeřenými listy zakončenými úponkem a s nápadnými palisty. Květenství je úžlabní, květy mají charakteristický vzhled. Plody, podlouhlé lusky, se otevírají v obou švech a jsou mnohosemenné. Hrách je velice významný nejen jako celosvětově rozšířená plodina, a to díky vysokému obsahu nutričních látek, která byla pěstována již v raných dobách kulturního zemědělství (SMÝKAL, 2011), ale i díky skutečnosti, že na základě jeho pozorování a následném statistickém vyhodnocení, byl J. G. Mendel schopen položit základy celé vědní disciplíny, genetiky. Řadíme sem dva druhy, prvním z nich je *Pisum fulvum* Sm. přirozeně rostoucí na Blízkém východě, v Sýrii, Libanonu, Izraeli a Jordánsku (ITIS,

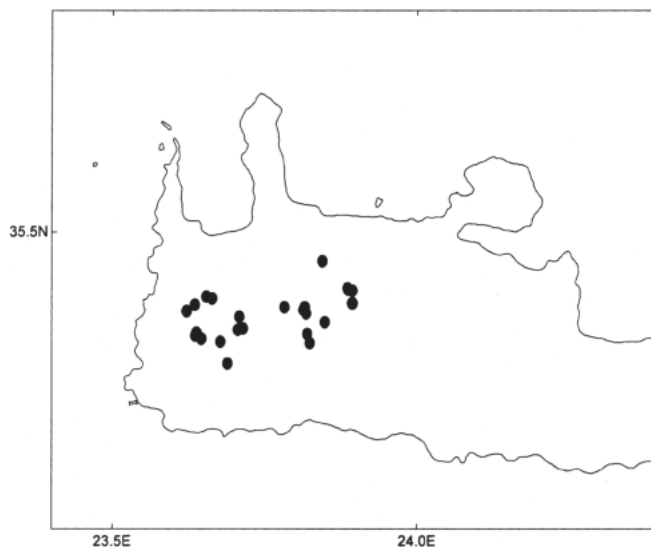
2011; MAXTED & AMBROSE, 2001). Jedná se pouze o planou formu, která je ovšem nositelkou významných zdrojů rezistencí k houbovým chorobám, což se uplatňuje ve šlechtění. Druhým je planý hrách setý (*Pisum sativum* L.), dělený na 2 resp. 3 podruhy, jako je *Pisum sativum* subsp. *sativum* (starší syn. *P. Humile* Boiss. & Noe), *Pisum sativum* subsp. *elatus* (M.Bieb.) Asch. & Graebn. a *P. sativum* subsp. *abyssinicum* (někdy na úrovni druhu jako *P. Abyssinicum* A.Baun) (SMÝKAL, 2011). Tento druh se ve volné přírodě vyskytuje se pouze na Blízkém východě, případně ve Středozeří (ITIS, 2011; MAXTED & AMBROSE, 2001). Centrum genetické diversity hrachu náleží zemím jako Turecko, Sýrie, Irák, Izrael a Libanon a dále centrální Asii a Středomoří (SMÝKAL et al., 2014).

2.1.3 Rod *Lathyrus*

Zástupci tohoto rodu jsou jednoleté nebo vytrvalé byliny se sudozpeřenými listy zakončenými úponkem nebo hrotem. Někdy jsou listy redukovány na fylodium nebo úponek. Hroznovité květenství roste v úžlabí a později tvoří lusky otevírající se v obou švech (SLAVÍK, 1995). Hrachor (*Lathyrus* L.) má mnoho zástupců a nejvíce je rozšířen v Evropě, Asii a Severní Americe. Většina se adaptovala na klima mírného pásu. Mezi jednotlivými druhy najdeme mnoho endemitů, např. *Lathyrus neurolobus* Boiss. & Heldr. (SMÝKAL et al., 2014; SCHAEFER et al., 2012). Jedná se především o diploida ($x = 7$), s pár hexaploidními či tetraploidními druhy (*L. palustris* L., *L. vernus* (L.) Bernh.) (SMÝKAL et al., 2014). Tento rod má široké spektrum využití, mnoho druhů se pěstuje za účelem lidské potravy (*L. sativus* L.), jako píce (*L. cicera* L.), pro dekorativní účely (*L. odoratus* L.) a dále též pro snížení eroze, na zelenou píci a v medicíně (OSKOUEIYAN et al., 2014).

Za zmínku stojí nemoc zvaná lathyrismus vyvolaná požitím většího množství hrachoru setého (*Lathyrus sativus*). V rozvojových zemích, jako je Etiopie, Indie nebo Bangladéš, se často z nedostatku jiných zdrojů pěstuje jako náhražka ostatních obilovin a luskovin. Beta-N-oxalyl-diaminopropionová kyselina nacházející se v tomto druhu je toxin zodpovědný za vyvolávání částečného ochrnutí dolních končetin. Kupříkladu v roce 2005 bylo v severní Etiopii zaznamenáno přes 400 případů této nemoci (HAIMANOT et al., 2006).

Lathyrus neurolobus



Zdroj vlevo: http://farm3.static.flickr.com/2037/2246223150_797c53a9e9.jpg

Zdroj vpravo: (BERMEIER & STEFAN, 2007)

Obr. 3 vlevo *Lathyrus neurolobus* Boiss. & Heldr.; vpravo mapa výskytu *L. neurolobus* na ostrově Kréta

Lathyrus neurolobus je endemitní druh rostoucí v západní části ostrova Kréta, kde byl objeven až v roce 1994 Nickem Turlandem. Tato vytrvalá rostlina menšího vzrůstu je samosprašná, na jejích stoncích vyrůstají maximálně jeden až dva modrofialové květy. Kvete od května do července. Listy u báze jsou oválného tvaru a bez úponku, na rozdíl od listů apikálních, zakončených úponkem (KENICER & NORTON, 2008). Lusk je hnědý, bez trichomů a obsahuje obvykle 3–6 hladkých semen. Jako stanoviště preferuje močály, vodní toky a prameny, ve vlhkých a stinných kamenitých údolích v nadmořské výšce 160–800 m. V nepříznivých obdobích vytváří pupeny chráněné nadzemní listovou růžicí, jedná se tedy o hemikryptofytní druh (BERGMEIER & STEFAN, 2007)

2.1.4 Rod *Vicia*

Tyto jednoleté i vytrvalé byliny mají obvykle tenké větvené stonky. Listy bývají sudozpeřené s několika páry lístků a zakončené úponkou nebo hrotem. Květenství bez listenů, případně s opadavými listeny může mít různé odstíny modré, červené, bílé či žluté a často je dvoubarevné. Lusk obsahuje dvě až osm semen (SLAVÍK, 1995). Jednotliví zástupci rodu mají $x = 6$ a chromosomy jsou ve své velikosti velice variabilní. (BAIRIGANJAN, a další, 1989).

Vikve (*Vicia* L.) rostou převážně v mírném pásu severní polokoule, ale menší centra můžeme najít i na Hawai, Kanárských ostrovech, centrální Africe a jižní Americe, z nichž mnohé jsou endemické (GUNN, 1979).

Kromě bobu (*V. faba* L.) vikve v našich podmínkách není zvykem pěstovat pro lidskou výživu, ale spíše jako potravu pro dobytek. Za tímto účelem se u nás využívají druhy vikev setá (*V. sativa* L.), vikev panonská (*V. pannonica* Crantz) a vikev huňatá (*V. villosa* Roth) (HOUBA et al., 2009). Druh *V. faba* je též oblíbený při studiu chromozomů, protože díky své velikosti jsou tyto dobře pozorovatelné pod mikroskopem (HANELT & METTIN, 1989). V syrovém stavu rostlina obsahuje látky vicin a konvicin, jež mohou u pacientů trpících dědičným nedostatkem glukóza-6-fosfát dehydrogenázy způsobovat po požití hemolytickou anémii, odborně nazývanou favismus (PAVLÍK et al., 2002).

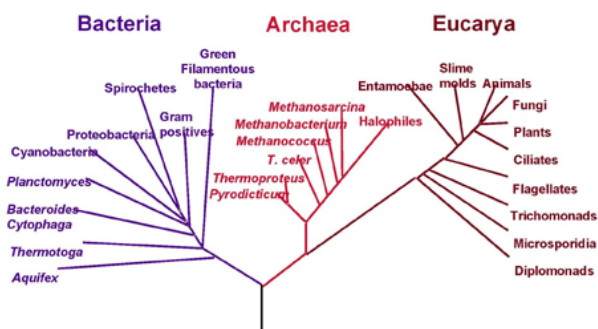
2.2 Genetická diverzita

Původ genetické diverzity druhů lze spatřovat v adaptaci na různé ekologické podmínky. Co se týče diverzity mezidruhové, ta souvisí s geografickým původem jednotlivých zástupců. Lze tedy spatřovat souvislost mezi místem vývoje určitého organismu a jeho nynějším vzhledem a vlastnostmi. Pro popis původu a následné migrace rostlin se zavedly pojmy genová centra a centra diverzity. Genové centrum je určitá geografická oblast, v jejímž středu se vyskytuje vyšší podíl geneticky původnější dominantní alely daného genu. Naproti tomu centrem diverzity je myšleno místo s nejvariabilnějšími formami určitého druhu. Zvýšení genetické diverzity u plodin lze dosáhnout různými způsoby, jako například křížením rostlin z různých genových center, mutací, domestikací, rekombinací, genetickým driftem aj. Na druhou stranu ke snížení dochází při výběru nejlepších odrůd a jejich neustálým pěstováním (CHLOUPEK,

2008). Co se týče vlastní domestikace rostlin člověkem, ta se projevuje výběrem především jedinců s více květy, které dávají vzniknout větším nerozpadavým plodům, preferuje se určitý habitus rostliny, dormance je kratší a vytrvalé rostliny se často nahrazují jednoletými (HATCHER & BATTEY, 2011).

2.3 Fylogenetika

Fylogenetika je obor systematické biologie snažící se najít evoluční vztahy mezi skupinami organismů. Kromě pouhého přiřazení posloupnosti a času speciace rozličných organismů má díky zobrazení historie přenosu genetické informace jedinečnou schopnost třídit naše poznatky o organismech, genomech a molekulách (LINDER & RIESEBERG, 2004).



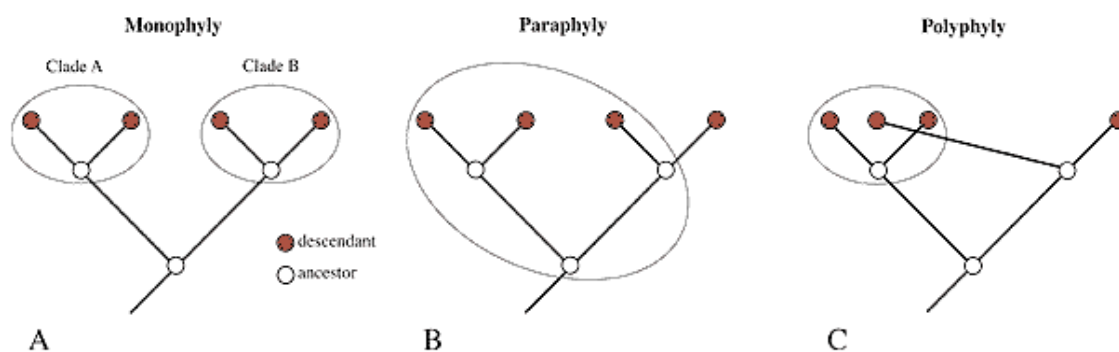
Zdroj: http://plus.maths.org/issue46/features/phylogenetics/modern_tree.jpg

Obr. 4: Fylogenetický strom založený na analýze rRNA

Data jsou získávána z morfologického výzkumu a z molekulární analýzy (především analýza DNA). Po DNA analýze jednotlivých druhů jsou pak vztahy mezi nimi přehledně znázorněny pomocí fylogenetického stromu (EDWARDS & LANGE, 2009). Často používanou metodou je analýza rRNA, jež se vyskytuje u všech eukaryotních organismů, je funkčně stálá, její sekvence se mění jen velice pomalu a experimentálně se dá snadno zjistit její přítomnost. S rozmachem nových technologií se tak podařilo zrekonstruovat univerzální fylogenetický strom. Zahrnuje nejenom veškeré nyní žijící druhy, ale jeho kořen a počáteční větvení i fáze evolučního procesu předcházející moderním buněčným strukturám. Primitivní buněčné celky byly mnohem jednodušší než ty později vyvinuté, které známe dnes a převládaly u nich postupné změny hlavně díky horizontálnímu genovému transferu na rozdíl od dnešních eukaryotních buněk, u nichž evoluce probíhá téměř výlučně vertikálně, neboli z rodiče

na potomka. Kořen stromu reprezentuje první fázi vývoje, kdy jednoduché struktury začaly být natolik stabilní, aby odolaly erozivnímu efektu horizontálního genového transferu (WOESE, 2000).

Genealogie všech kopií určité oblasti genomu daného druhu může být klasifikována do dvou kategorií. Linie mohou být buď monofyletické, tzn. že zahrnují všechny zdokumentované potomky nejbližšího společného předka, nebo monofyletické nejsou. V takovém případě je možno ve vývojovém stromě nalézt skupiny parafyletické, tzn. pocházející ze společného předka, avšak neobsahující všechny potomky. Dalším případem jsou skupiny polyfyletické, které postrádají společného předka. Pro tyto je typický výskyt homoplasie, fenotypového znaku na první pohled stejného ale z evolučního hlediska vzniklého nezávisle na sobě (ROSENBERG, 2003; FLEGR, 2009, SMÝKAL, 2011).



Zdroj: <http://www.ucmp.berkeley.edu/IB181/VPL/Phylo/PhyloD/PhyloD4.gif>

Obr. 5: Grafické znázornění jednotlivých kategorií klasifikace genealogie.

2.4 Molekulární fylogenetika

Molekulární fylogenetika využívá molekulárně biologických metod pro zjištění příbuznosti a mechanismu evoluce druhů. Díky těmto metodám lze zjistit molekulární znaky, tedy pořadí monomerů v řetězcích a chemické a fyzikální vlastnosti biopolymerů. Využití molekulárních znaků nabízí několik výhod oproti metodám klasické fylogenetiky, která je založena na popisu morfologických znaků. Předně se jedná o téměř neomezené množství znaků, které můžeme vybrat k analýze, lze ji tedy několikrát opakovat pro porovnání výsledků. Dále je možno konstatovat, že sekvence nukleotidů v DNA je nezávislá, s výjimkou genů ve vazbě. Tak se odstraní obtíže

spojené s určováním hranice mezi morfologickými znaky. Jednotlivé molekulární znaky je možno přesně popsat pomocí několika písmen, respektive A (adenin), T (tymin), C (cytosin), G (guanin), jsou tak čitelné pro kohokoliv. Na rozdíl od klasických znaků kvantitativního charakteru mají tedy povahu kvalitativního charakteru. Nespornou výhodou je i univerzálnost molekulárně biologických dat, jež nám umožňují porovnávat mezi sebou i vzájemně nepříbuzné a tudíž odlišné organismy s minimem společných znaků. Při použití morfologických znaků se vyskytuje problém s jejich vzájemným vážením, tzn. s přisouzením relativního významu při jejich absenci nebo přítomnosti. Tato analýza je proto zatížena subjektivní chybou při posuzování. V případě molekulárně biologických znaků tato chyba odpadá díky využívání matematických algoritmů pro porovnání znaků, kterým byla předem přiřazena stejná váha (FLEGR, 2009; NEI & KUMAR, 2000).

Pro studium rostlin se často využívá porovnání chloroplastové a nukleární DNA. Kvůli rychlé strukturní a naopak pomalé sekvenční evoluci se u rostlin příliš nevyžívá mitochondriální DNA pro systematické studie (SMALL et al., 2004).

Jaderná DNA se u eukaryot vyskytuje ve formě různého počtu lineárních chromozomů v nejdůležitější organelle buňky. Kvůli její velikosti je práce s ní komplikovaná a je třeba dodržovat určitá kritéria. Zprv musí být vymezené úseky určené k porovnání evolučně stálé, rychlost jejich změny a bodové mutace by měly být srovnatelné s chloroplastovou, dále by měly dovolit zjištění událostí vedoucích ke speciaci druhu, neboli být fylogeneticky konzervativní. Zatřetí by se s nimi mělo lehce pracovat v laboratoři a nakonec by DNA mělo být dostatečné množství (BALDWIN, 1992).

Chloroplastová DNA se vyskytuje především ve formě lineární, méně často pak jako cirkulární molekula (BENDICH, 2004). Obsahuje geny kódující proteiny využitelné pouze v chloroplastech. Pro správnou funkci těchto organel je ovšem zapotřebí i proteinů pocházejících z jaderné DNA (ALBERTS, 2008). V každé fotosyntetizující buňce je možno najít 10-100 chloroplastů, každý z nich obsahuje 50-100 molekul dědičné informace. Toto dohromady představuje asi 15% celkové DNA buňky. Chloroplastová DNA je oproti genomu eukaryotních organismů více zahuštěná, její geny přerušují pouze kratší nekódující sekvence (CLEGG et al., 1994). Tyto jsou pak oblíbeným nástrojem fylogenetiky s cílem zjistit evoluční vztahy mezi rostlinami. Jako příklad lze uvést dvě invertované repetice dlouhé asi 25 kb a oddělené od sebe

velkou a malou oblastí v jedné kopii. Studie prokázaly, že v těchto oblastech dochází k rychlejší nukleotidové substituci než v invertovaných repeticích, využívají se například oblasti *matK* pro maturázu K (SMÝKAL, 2011), *rbcL* pro velkou podjednotku ribulóza bisfosfát karboxylázy (SHAW et al., 2007; HASEBE et al., 1994; KASS, 1997), *atpB* pro beta podjednotku ATPázy (OESSNER et al., 1986) nebo *trnL-trnF* a *trnSG* pro mezigenovou nekódující oblast (DRÁBKOVÁ et al., 2004).

2.4.1 Molekulární fylogenetika čeledi *Fabaceae*

Na základě molekulární studie rodů hrách (*Pisum* L. sp.), tolíce (*Medicago* L. sp.) a lupina (*Lupinus* L.) byla zjištěna přítomnost charakterických strukturních změn v chloroplastové DNA. Mezi tyto náleží inverze 50 kb sledu nukleotidů a jeho ztráta. Velmi oblíbeným markerem cpDNA je 1420 nt dlouhý gen *rbcL*, který kóduje velkou podjednotku ribulóza bisfosfát karboxylázy (HASEBE, 1994; KASS, 1997). Dále se využívá například ITS různých chloroplastových a jaderných genů (WATSON et al., 2000). Tyto nekódující sekvence se nachází mezi geny pro malou a velkou podjednotku rRNA na chromozomu nebo v odpovídajícím polycistronovém prekurzoru transkriptu rRNA (ROCAP et al., 2002).

Kladistická analýza čeledi *Fabaceae* založená především na okvětních, vegetativních a generativních morfologických znacích naznačuje monofyletický vývoj celé čeledi a podčeledí *Mimosoideae* a *Papilionoideae*. *Ceasalpinioideae* pravděpodobně netvoří klad kvůli nedostatku apomorfních znaků (TUCKER & DOUGLAS, 1994). Další studie obohacené o molekulární analýzu toto tvrzení podpořily, pouze s výjimkou, že *Ceasalpinioideae* jsou parafyletickou skupinou s bází v podčeledi *Mimosoideae* (SULAIMAN et al., 2003). Klad tvořený kmenem *Fabeae* je považován za nejmladší z leguminóz obecně a na základě genu *matK* je jeho stáří odhadováno na 17,5 milionů let, tedy pochází pravděpodobně ze středního miocénu (SMÝKAL, 2011).

2.5 Transponovatelné elementy

Transponovatelné elementy jsou největší samostatnou částí eukaryotních genomů. V rostlinách, kde byly poprvé nalezeny, stále aktivně mění složení celých genomů, díky skutečnosti, že tvoří jeho velkou část, jako například u některých druhů trav, kde

zaujímají 50 – 80% genomu (FESCHOTTE et al., 2002). Objevila je Barbara McClintocková u různě pigmentovaných zrn kukuřice (*Zea mays*), u níž popsala aktivitu především *Ds* a *Ac* elementů (MCCLINTOCK, 1950). V eukaryotním genomu existují jako reverzně inaktivované, geneticky nedetekovatelné elementy, jež se nyní označují jako epigeneticky umlčené. Dle jejich replikačního mechanismu je dělíme na transpozony třídy I, které se pohybují po genomu přímo vystřížením a opětovným vložením (tzv. cut-and-paste mechanismus) a na retrotranspozony třídy II využívající ke svému nakopírování reverzní transkripci (FEDOROFF et al., 2012). Ve svém hostiteli vyvolávají mutace především negativního typu, a to jak v místě vložení, tak i v oblasti, z níž se vystřihují. Jestliže v organismu způsobí evolučně důležitou změnu, pak tato většinou potřebuje dlouhý čas, aby se rozvinula ve významnou funkci (KIDWELL et al., 1997). Bylo zjištěno na kukuřici, že i když v rodičovských rostlinách transpozony postrádaly fenotypový projev, znovu se objevil u potomků, pokud byly rodiče vystaveny genomickému stresu, například zlomení chromozomu po expozici ionizujícího záření nebo porušení dicentrického chromozomu během procesu breakage-fusion-bridge v anafázi, kdy dojde ke splynutí konců sesterských chromatid v důsledku ztráty jejich telomer (MCCLINTOCK, 1950; DÖRING et al., 1984).

Nejčteněji zastoupené elementy v genových oblastech rostlinného genomu zaujímají tzv. MITE (miniature inverted-repeat transposable elements), neautonomní, asi 600 bp dlouhé repetice z třídy I transpozonů. Naproti tomu intergenovým oblastem a zároveň i celému genomu dominují LTR (long terminal repeats) elementy tvořící jeho největší samostatnou jednotku. Společně s retroviry, LINE a SINE elementy je řadíme do třídy II retrotranspozonů (FESCHOTTE et al., 2002). Přejít mezi retroviry a retroelementy představuje rodina *Gypsy* elementů, také bohatě zastoupena v rostlinách. Odlišnost je dána přítomností *env* domény, která kóduje virový obal. V experimentálních podmínkách může být i *Gypsy* rodina infekční (SCHULMAN et al., 2004).

LTR retrotranspozony patří do rodiny s nižším až středním počtem opakování na rozdíl od zbytku třídy II mající na svědomí velmi nestabilní mutace. Bylo prokázáno, že tyto elementy způsobují tzv. paradox hodnoty C u hospodářsky významných druhů čeledi lipnicovité, což znamená, že neexistuje vztah mezi velikostí genomu a komplexitou daného organismu (FESCHOTTE et al., 2002). Jejich vnitřní kódující oblast je obklopena právě dlouhými terminálními repeticemi různé délky, od sta párů

bazí až po několik kilobazí. Všechny LTR obsahují dva geny, a to *gag*, důležitý pro sbalení retrotransposomální RNA a *pol* kódující enzymatickou aktivitu potřebnou pro životní cyklus elementu (CASACUBERTA et al., 2003).

LINE (*long interspersed elements*) jsou autonomní elementy disponující vnitřním promotorem pol II pro RNA polymerázu II, jedním nebo dvěma otevřenými čtecími rámci (ORF1 a ORF2) a polyadenylovaným 3' koncem. ORF1 zatím nebyla zcela uspokojivě přiřazena funkce, ORF2 kóduje protein s aktivitou reverzní transkriptázy a zároveň DNA endonukleázy (WEINER, 2002; MARTIN, 2006).

SINE (*shot interspersed elements*) představují kratší a jednodušší elementy závislé na LINE reverzní transkriptáze a DNA endonukleáze. Mají vnitřní promotor pol III pro reverzní transkriptázu III a na 3' konci sekvenci bohatou na adenin (WEINER, 2002).

2.6 Metody molekulární fylogenetiky

Pro stanovení příbuznosti a vývoje organismů je v rámci fylogenetiky využívána řada metod. V experimentální části této práce byly použity pouze analýza mikrosatelitů (SSR a metoda iPBS).

2.6.1 SSR markery

Jedná se o mikrosatelity neboli krátké tandemově se opakující sekvence 1-6 nukleotidů charakteristické vysokou frekvencí mutací a mnohočetným výskytem v genomu (JONES et al., 1997; THIEL et al., 2003). Předpokládá se, že nejčastěji se nacházejí na chromozomech v okolí centromer a výjimečně v euchromatinu ramen (SONG et al., 2005). Díky svému multialelismu a kodominanci jsou hojně využívány při mapování genomu. Jejich vysoká frekvence mutací je zase neocenitelná při stanovování příbuznosti druhů a ve fylogenetických studiích (MCCOUCH, 2002). Mikrosatelity jsou amplifikovány během PCR za pomoci primerů navržených dle sekvencí, které je obklopují (THIEL et al., 2003).

2.6.2 iPBS

iPBS představuje velice mladou metodu, která je schopna identifikovat různé LTR (*long terminal repeats*) sekvence a tím zobrazit jednotlivé polymorfismy mezi odrůdami

(MONDEN et al., 2014). Tato skupina retrotranspozonů využívá pro svoji replikaci tzv. copy and paste mechanismus, tudíž nedochází k delecí původního elementu, což ji činí bohatě zastoupenou napříč celým genomem. iPBS amplifikace je založena na přítomnosti tRNA vlákna, jehož využívají LTR retrotranspozony jako primeru pro reverzní transkripci během své reprodukce. Obrovskou výhodou lze spatřovat v univerzálnosti této metody a ve faktu, že pro její použití není třeba dopředu znát sekvence DNA (KALENDAR et al., 2010).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 DNA izolace

Izolace genomické DNA byla provedena pomocí DNeasy® Plant mini kitu QiaGen (Valencia, USA):

- Na analytických vahách bylo odváženo 200 mg listů a vzorek nadrcen a přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky
- K homogenátu bylo přidáno 800 μ l pufru AP1 a 2 μ l RNázy pomocí mikropipety
- Mikrozkušavky byly uzavřeny, zvortexovány a směs inkubována po dobu 10 minut, během inkubace byla 2-3 promíchána
- Bylo přidáno 130 μ l pufru AP2, zvortexováno a inkubováno při 0°C
- Obsah mikrozkušavky byl přemístěn do speciální fialové mikrozkušavky s kolonou a centrifugován po dobu 2 min při 18 000 otáčkách za minutu
- Oddělená kapalná frakce byla přenesena do nové 1,5 ml mikrozkušavky bez porušení peletu (pevná fáze) pomocí mikropipety
- Bylo přidáno 600 μ l AP3/E pufru a promícháno pomocí mikropipety
- 650 μ l směsi bylo přeneseno na bílou kolonu mikrozkušavky a centrifugováno po dobu 1 min při 6000 otáčkách za minutu
- Tekutý podíl pod kolonou byl odstraněn a na kolonu přidáno 350 μ l zbylé směsi a centrifugováno po dobu 1 min při 6000 otáčkách za minutu
- Tekutý podíl pod kolonou byl odstraněn a kolona přenesena do nové 2 ml zkumavky
- Do kolony bylo přidáno 400 μ l pufru AW a centrifugováno po dobu 1 min při 6000 otáčkách za minutu, poté znovu 400 μ l pufru a centrifugováno po dobu 2 min při 18 000 otáčkách za minutu
- Kolona byla přemístěna do nové 1,5 ml mikrozkušavky a napipetováno 100 μ l předehřátého AE pufru, inkubováno 5 min při laboratorní teplotě a centrifugováno po dobu 1 min při 6000 otáčkách za minutu
- Znovu bylo přidáno 50 μ l AE pufru na kolonu, tekutý podíl pod kolonou ponechán, inkubováno 5 min při laboratorní teplotě a centrifugováno po dobu 1 min při 6000 otáčkách za minutu

- Bílá kolona byla odstraněna a mikrozkumavka uzavřena
- Vzorek byl uchováván pro další zpracování při 4°C.

DNA byla izolována ze vzorku mladých výhonů jedince *Lathyrus neurolobus* získaného z Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci původně pocházejícího ze sběrů na ostrově Kréta.

3.2 SSR analýza

Primery pro SSR analýzu

Testováno bylo 51 mikrosatelitních lokusů (LORIDON et al., 2005)

Příprava vzorku pro analýzu

Příprava jedné mikrozkumavky:

- 17,1 µl deionizovaná voda
- 5 µl pufr
- 0,2 µl dNTPs
- 1,5 µl primer
- 1 µl DNA
- 0,2 µl polymeráza

Směs byla promíchána pomocí vortexu a vložena do termocykleru s programem:

<i>Cyklus č.</i>	<i>Počet opakování</i>	<i>Teplota (°C)</i>	<i>Čas (m:s)</i>
1	1	94	4:00
2	32	94	0:30
		55	0:30
		72	0:40
3	1	72	10:00
		4	∞

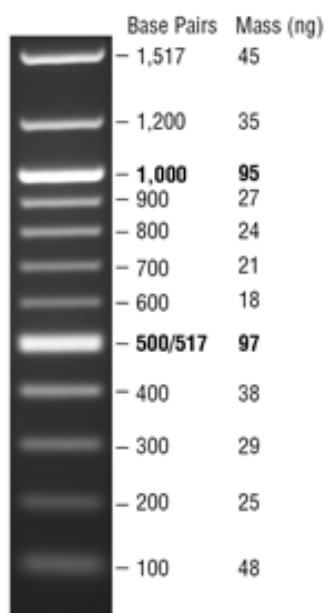
Po vyjmutí z termocykleru byla reakční směs aplikována na agarózový gel v objemu 5 µl a separována pomocí horizontální elektroforézy.

HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA

Příprava 1% agarózového gelu

- Bylo naváženo příslušné množství agarózy [pro střední gel (40 ml) 0,4 g agarózy].

- Navážená agaróza byla vsypána do erlenmayerovy baňky.
- A doplněna do příslušného objemu (40 ml) 1x TAE pufrem. Alternativně lze použít 1x TBE pufř.
- Poté bylo vše v mikrovlnné troubě uvedeno do varu.
- Dále byla směs zchlazena na cca 60 °C (vodní lázeň, nebo nechat odstát).
- Bylo přidáno 1/500 000 objemu zásobního roztoku ethidium bromidu (1,0 µl do 100 ml).
- Směs byla promíchána na magnetické míchačce.
- Tekutý gel byl vylit do uzavřené vany a do gelu umístěny hřebínky.
- Gel byl nechán min. 30 minut vychladnout.
- Hřebínky byly vyňaty z gelu.
- Gel byl umístěn do elektroforézy.
- Gel byl zalit 1x TAE pufrem tak, aby byl těsně ponořen – cca 1 mm pod hladinu (v případě TBE gelu zalit 1x TBE pufrem).



Zdroj: https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/E25DB484E9FD40D0AD4D1315C6347D6B/Gel%20Photos/N0468_thumb.gif

Obr. 6: Quick-Load 100bp ladder, New England Biolabs

VERTIKÁLNÍ ELEKTROFORÉZA

Příprava PAA gelu

Příprava 50 ml polyakrylamidového gelového roztoku:

- 34,65 ml destilovaná voda
- 5 ml 10x TBE (pufr složený z Triss báze, kyseliny borité, EDTA)
- 10 ml zásobní roztok akrylamidu/bisakrylamidu
- 334 μ l 10% roztoku persíranu amonného (APS)
- 334,5 μ l N, N, N, N – tetramethylethylen diamine (TEMED)

Směs na míchačce byla krátce promíchána a poté nalita mezi skleněné desky. Pro vytvoření nanášecích jamek byl vložen do prostoru mezi desky hřeben. Polymerace gelu trvala cca 20 minut. Po ztuhnutí gelu byl hřeben opatrně vyjmut.

Vlastní průběh elektroforézy a její ukončení

Byla provedena kontrola sestavení elektroforetické aparatury. Následně byla nastavena na elektroforetickém zdroji hodnota 100 V pro rovnoměrné zahájení separace po dobu 15 minut. Poté bylo zvýšeno napětí na 310 V. Doba běhu elektroforézy je závislá na velikosti očekávaného produktu v bp. Pohybuje se v rozpětí 2 (150 - 300 bp) až 3 hodin (400 bp). Po ukončení elektroforetické separace byl vypnut zdroj napětí, opatrně sňato bezpečnostní víko elektroforézy a odsát pufr.

Barvení produktů PCR reakce stříbrem

PAA gel byl opatrně sňat ze skleněných desek a přenesen do nádoby s fixačním roztokem a za mírného třepání na třepačce inkubován po dobu 3 minut. Následně byl gel přenesen do nové nádoby z roztokem 0,2% dusičnanu stříbrného a za mírného třepání inkubován 5 minut. Následně byl gel opatrně promyt destilovanou vodou (3x) a po promytí umístěn gel do nové nádoby s vývojkou a za mírného třepání inkubován 15 minut. Zastavení barvení je možné promytím gelu v 10% kyselině octové. Obarvené gely byly zataveny do eurofolie a vyhodnoceny.

3.3 iPBS analýza

Primery pro iPBS

Pro práci bylo použito 31 vybraných primerů podle KALENDAR et al., 2010.

Příprava vzorku pro analýzu

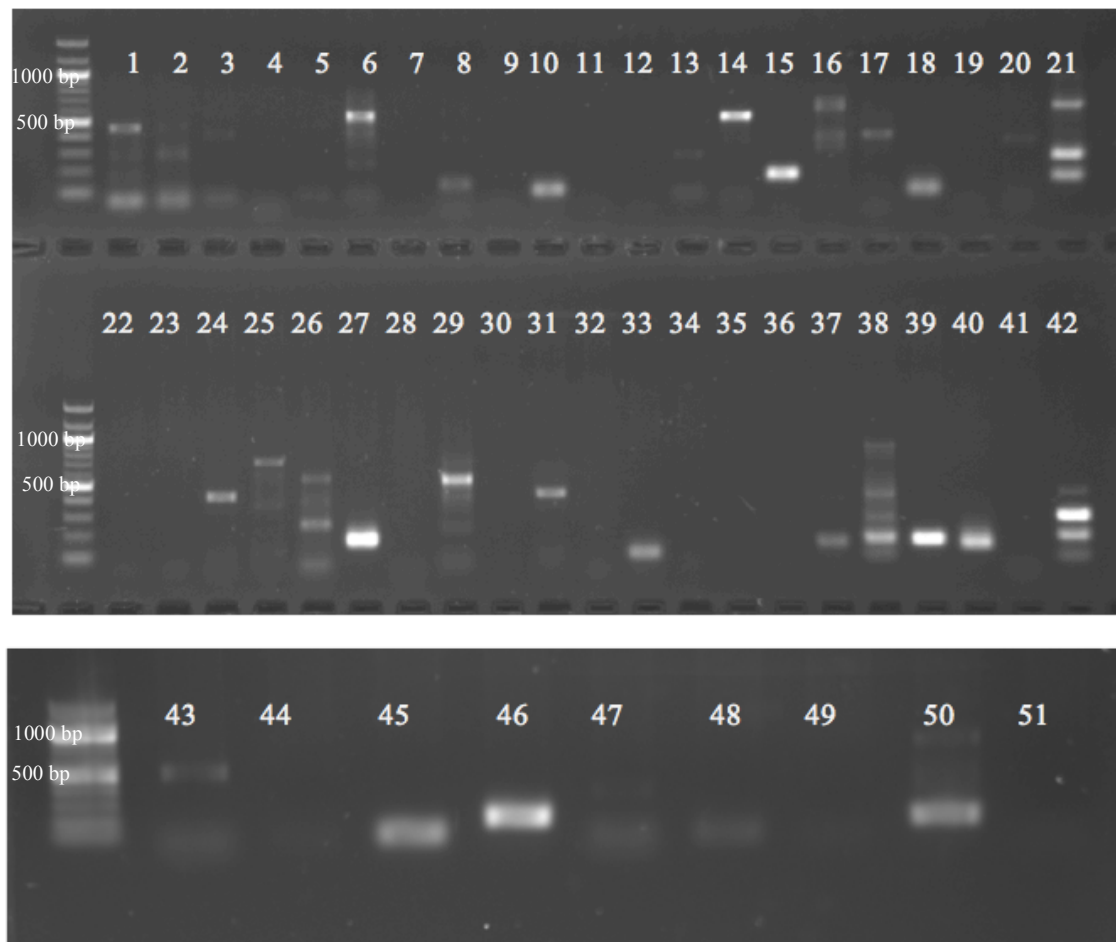
Příprava jedné mikrozkušavky:

- 18 μ l deionizovaná voda
- 5 μ l pufr
- 0,3 μ l dNTPs
- 1 μ l primer
- 0,5 μ l DNA
- 0,2 μ l polymeráza

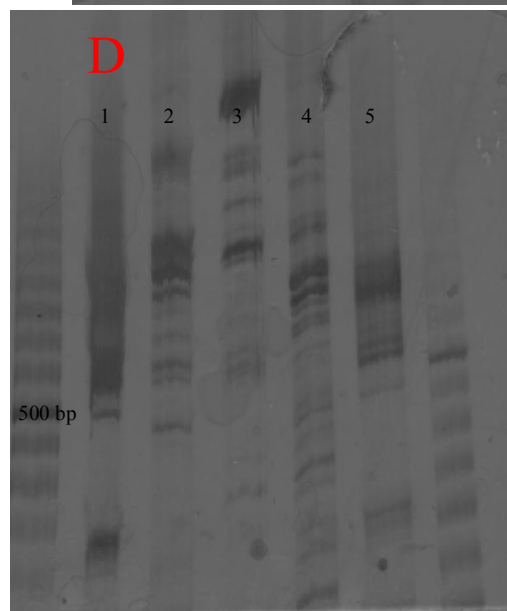
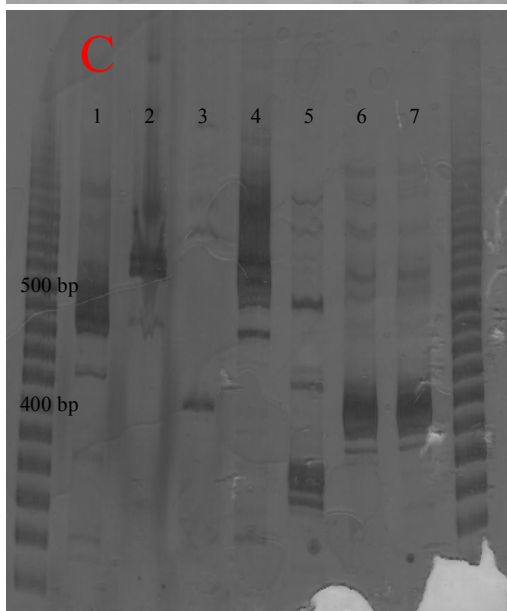
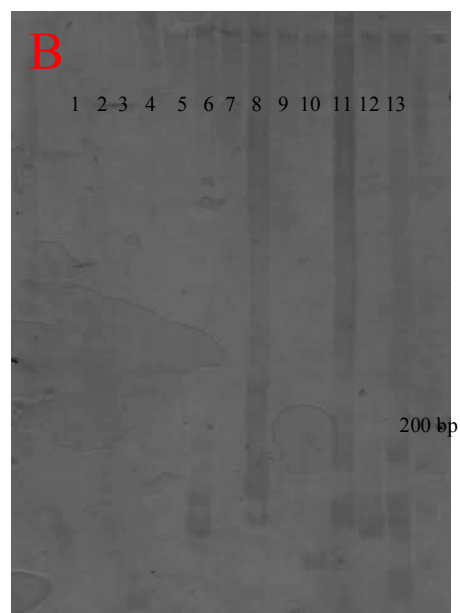
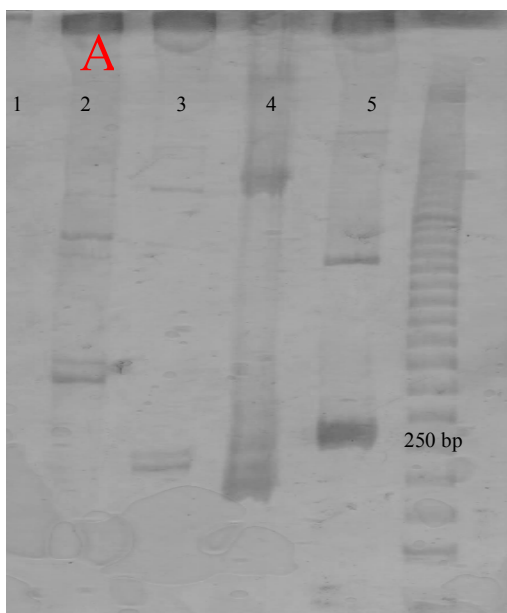
Bylo namícháno celkem 31 reakčních směsí s různými primery (viz příloha, tab. 4) a následně provedena PCR dle schématu: 1 cyklus při 95°C po dobu 3 min; 28-30 cyklů při 95°C po dobu 15s, 50°C nebo 55°C nebo 60°C (viz příloha, tab. 4) po dobu 60s, 68°C po dobu 60s, 72°C po dobu 5 min. Amplifikace byla provedena v termocykleru TProfessional Basic (Biometra, Goettingen, Německo). Produkty byly analyzovány pomocí horizontální elektroforézy (OmniBio, Brno, Česká republika).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

SSR analýza



Obr. 7: Elektroforetogram z horizontální elektroforézy SSR analýzy druhu *L. neurolobus*.



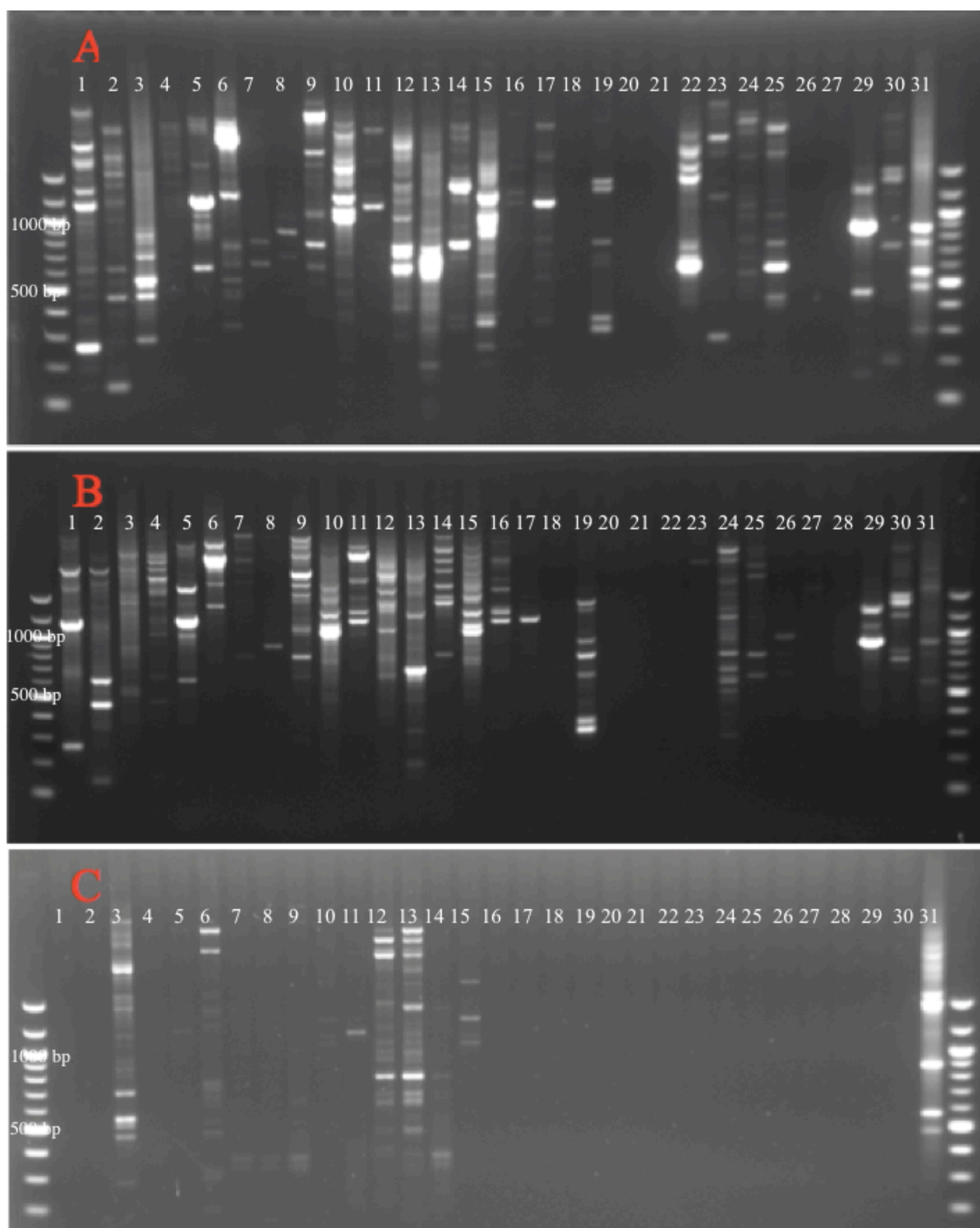
Obr. 8: SSR markery druhu *Lathyrus neurolobus*, vertikální elektroforéza, a) produkty o velikosti 250-350 bp, b) produkty o velikost 150-250 bp, c) produkty o velikosti 350-500 bp, d) produkty o velikosti 500-750 bp.

Experimentální část práce se zabývala testováním dvou metod pro stanovení rozdílů na úrovni DNA u blízce příbuzných genotypů založených na analýze repetitivních sekvencí. Ty jsou obecně považovány za vhodné pro stanovení rozdílů mezi velmi blízkými genotypy, a to díky vyšší frekvenci mutací a tím k rychlejším evolučním změnám. Cílem této práce bylo navržení vhodných molekulárních markerů pro fylogenetickou studii *Lathyrus neurolobus* ve vztahu tohoto druhu k hrachu. Byla testována analýza mikrosatelitů metodou SSR a analýza retrotranspozonů metodou iPBS.

Celkem bylo analyzováno 51 různých SSR lokusů (původně navržených pro hrách) pro druh *L. neurolobus* (viz příloha, tab. 1). Výsledky PCR byly nejdříve vizualizovány za použití horizontální elektroforézy, kdy 20 z nich nebylo dle výsledků z elektroforetogramu u tohoto druhu amplifikováno. Poté byly přítomné amplikony rozříděny dle velikosti a pro zpřesnění analýzy vyhodnoceny vertikální elektroforézou na polyakralamidovém gelu, díky čemuž bylo možno přesněji určit velikost výsledných produktů (viz příloha, tab. 2 a tab. 3). V sedmi případech nebyl podruhé identifikován žádný produkt, a to pro lokus AA-321, A9, SAT-5, BLOX-2, 321, 8 a AD-141. V případě přítomnosti dvou alel byly jejich velikosti zprůměrovány a následně byl určen rozdíl jejich velikosti. Neamplifikované alely byly ze statistiky vyňaty, protože pro druhé stanovení byly vybrány i velice slabé pruhy, tudíž mohlo dojít ke zkreslení. Maximální odchylka v počtu bází byla tedy 190 bp, minimální 10 bp, průměrně se však pohybovala okolo 75 bp.

Z výsledků lze dále usuzovat o heterozygotnosti daného druhu a tedy i o jeho cizosprašnosti. Dvě alely značící heterozygota se vyskytly pouze v šesti případech, konkrétně v lokusu A9, 16, 17, 100, 456 a AB-36.

iPBS analýza



Obr. 9: Elektroforetogramy iPBS analýzy různých markerů při T_a 50°C (A), 55°C (B) a 60°C (C) druhu *Lathyrus neurolobus*.

Na základě iPBS analýzy provedené při třech různých teplotách nasedání primerů lze usuzovat, že neoptimálnější teplota annealingu je pro vybrané primery obecně 50°C. Teplota 60°C se zdá být dle výsledků příliš vysoká a obdržených produktů je z takovéto analýzy jen minimum. Vhodná se ovšem zdá být pro primery 2395 a 2078, jimž vyhovuje stejně i teplota 50°C, dále pak pro 2247 a 2249, které se zdají být nejuniverzálnější, jelikož poskytují viditelný výrazný produkt při všech třech teplotách. Při 50°C ale na druhé straně došlo v několika případech k jednoznačnějšímu a výraznějšímu oddělení produktů, konkrétně v případě primerů 2077, 2078, 2221, 2241, 2277.

Touto metodou není možno rozlišit homozygotnost či heterozygotnost *L. neurolobus*.

5 ZÁVĚR

V této práci byla popsána čeleď bobovité a její fylogenetický vývoj se zaměřením na tři vybrané rody. Experimentální část práce byla zaměřena na vyhledání vhodných DNA markerů pro budoucí práci s druhem *Lathyrus neurolobus* jako potenciálně velmi příbuzného rodu hrách. Tato část práce byla zaměřena na testování vhodných SSR markerů odvozených pro hrách setý a jejich použitelnost pro druh *L. neurolobus*. Z 51 testovaných SSR lokusů bylo jako vhodných vyhodnoceno 21.

Metoda iPBS pro analýzu retrotranspozonů byla posuzována z hlediska vhodných teplot annealingu pro jednotlivé primery. Na základě výsledků byla jako obecně nejvhodnější teplota nasedání primerů vybrána 50°C, kdy docházelo v případě templátové DNA *Lathyrus neurolobus* k nejrobustnější amplifikaci PCR produktů. Pro některé primery je však optimálnější teplota annealingu 55 či 60°C.

Srovnáním těchto dvou metod se jako vhodnější pro studium *L. neurolobus* jeví iPBS, jež poskytla více amplikonů pro analýzu, ikdyž při jejím použití není možno rozlišit heterozygotního jedince a tudíž cizosprašnost.

Obdržené výsledky mohou být v budoucnu použity ve fylogenetické studii pro blízké příbuzné rodu hrách se záměrem přesného posouzení genetické příbuznosti stejně jako pro populační studii *Lathyrus neurolobus*, ohroženou endemitní rostlinu z ostrova Kréty.

6 LITERATURA

ALBERTS B. 2008: *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, 1268 s. ISBN 08-153-4106-7.

BAIRIGANJAN G. C. & PATNAIK S.N., 1989: *Chromosomal evolution in Fabaceae*. CYTOLOGIA. 54(1): 51-64. DOI: 10.1508/cytologia.54.51.

BALDWIN B.G., 1992: *Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae*. Molecular Phylogenetics and Evolution. 1(1): 3-16. DOI: 10.1016/1055-7903(92)90030-k.

BENDICH A. J., 2004: *Circular Chloroplast Chromosomes: The Grand Illusion*. The Plant Cell Online. 16(7): 1661-1666. DOI: 10.4159/harvard.9780674729902.c14.

BERGMEIER E. & STEFAN S., 2007: *Ecology and distribution of the Aegean wetland endemics Carex cretica and Lathyrus neurolobus*. Beiheft Nova Hedwigia. 131: 207–219.

CASACUBERTA J.M., SANTIAGO N., WATERBURY J.B. & CHISHOLM S.W., 2003: *Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes*. Gene. 311(3): 1-11. DOI: 10.1016/s0378-1119(03)00557-2.

CLEGG M. T., GAUT B.S., LEARN G.H. & MORTON B.R. 1994: *Rates and patterns of chloroplast DNA evolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 91(15): 795-6801. DOI: 10.1073/pnas.91.15.6795.

CREWS T.E., 1999: *The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations*. Biogeochemistry. 46(1-3): 233-246. DOI: 10.1007/978-94-011-4645-6_11.

DÖRING H. P. & STARLINGER P., 1984: *Barbara McClintock's controlling elements: now at the DNA level*. Cell. 39: 253-259.

DRÁBKOVÁ L., KIRSCHNER J., VLČEK Č. & PAČES V., 2004: *TrnL–trnF Intergenic Spacer and trnL Intron Define Major Clades Within Luzula and Juncus (Juncaceae): Importance of Structural Mutations*. Journal of Molecular Evolution. 59(1): 1-10. DOI: 10.1007/s00239-004-2598-7.

EDWARDS, A. W. F. & LANGE K., 2009: *Statistical Methods for Evolutionary Trees*. Genetics. 183(1): 281-297. DOI: 10.1007/978-0-387-21750-5_13.

FEDOROFF N. V., JURKA J., KAPITONOV V.V., BIÉMONT C., VIEIRA C., BORIE N., LEPETIT D., DABOUSSI M.J., KIDWELL M.G., MCDONALD J.F., SHAPIRO J.A., LERAT E., BRUNET F., BAZIN C., CAPY P., PARDUE M.L., DEBARYSHE P.G., HALL B.G., KAPITONOV V.V., JURKA J. & NUZHDIK S.V., 2012: *Transposable Elements, Epigenetics, and Genome Evolution: the case of Drosophila simulans*. Science. 338(6108): 129-137. DOI: 10.1007/978-94-011-4156-7_15.

FESCHOTTE C., JIANG N., WESSLER S.R., PARISOD C., SENERCHIA N., PÉLISSIER T., MATHIEU O. & WICKER T., 2002: *Plant Transposable Elements: Where Genetics Meets Genomics*. Nature Reviews Genetics. 3(5): 1-15. DOI: 10.1007/978-3-642-31842-9_1.

FLEGR J. 2009: *Evoluční biologie*. 2. vyd. Praha: Academia. 569 s. ISBN 978-80-200-1767-3.

GUNN C. E., 1979: *Genus Vicia with notes about tribe Viciae (Fabaceae) in Mexico and Central America*. U.S. Department of Agriculture, Technical Bulletin., 1601: vol. 1601, 41 s.

HAIMANOT R.T., FELEKE A. & LAMBEIN F., 2006: *Is lathyrism still endemic in northern Ethiopia? – The case of Legambo Woreda (district) in the South Wollo Zone*,

Amhara National Regional State. Ethiopian Journal of Health Development. 19(3): 230-236. DOI: 10.4314/ejhd.v19i3.10003.

HANELT P. & METTIN D., 1989: *Biosystematics of the Genus Vicia L. (Leguminosae)*. Annual Review of Ecology and Systematics. 20(1): 199-223.

HASEBE M., OMORI T., NAKAZAWA M., SANO T., KATO M. & IWATSUKI K., 1994: *RbcL gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 91(12): 5730-5734. DOI: 10.1073/pnas.91.12.5730.

HATCHER P. & BATTEY N., 2011: *Biological Diversity: Exploiters and exploited*. Wiley-Blackwell. 436 s. ISBN 978-0470778067.

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

CHLOUPEK O., 2008: *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. 3. vyd. Praha: Academia ČMT, 307 s. ISBN 978-802-0015-662.

ITIS Report: *Pisum L.*, 2001: In: Integrated Taxonomic Information System, Databáze online [cit.: 18. 3. 2015]. Dostupné z <http://www.itis.gov>.

JONES C.J., EDWARDS K.J., C ASTAGLIONE S., WINFIELD M.O., SALA F., van de WIEL C., KARP A., 1997: *Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories*. *Molecular breeding*. 3: 381-390.

JUDD W.S., CAMPBELL C.S., KELLOGG E.A., STEVENS P.F. & DONOGHUE M.J., 1999: *Plant systematics: a phylogenetic approach*. *Ecologia mediterranea*. 25(2): 215. ISBN 978-0878934072.

KALENDAR R., ANTONIUS K., SMÝKAL P., SCHULMAN A.H. & HO S.H.: 2010, *iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation*. Theoretical and Applied Genetics. 121(8): 1419-1430. DOI: 10.5353/th_b3121528.

KASS E., 1997: *Phylogenetic Relationships in the Papilionoideae (Family Leguminosae) Based on Nucleotide Sequences of cpDNA (rbcL) and ncDNA (ITS 1 and 2)*. Molecular Phylogenetics and Evolution. 8(1): 65-88. DOI: 10.1006/mpev.1997.0410.

KENICER G. & NORTON S., 2008: *631. LATHYRUS NEUROLOBUS*. Curtis's Botanical Magazine. 25(4): 310-316. DOI: 10.1007/springerreference_68822.

KIDWELL M.G., LISCH D., MILLER W.J., KRUCKENHAUSER, L., PINSKER W., PÉLISSIER T., MATHIEU O., SCHWARZ-SOMMER Z., SAEDLER H., HOEN D.R., BUREAU T.E., GALUN E. & VERNON H.M., 1997: *Transposable elements as sources of variation in animals and plants: Epigenetic Means for Controlling Transposable Elements in Plants*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 94(14): 219-251. DOI: 10.5962/bhl.title.29869.

LINDER C. R. & RIESEBERG L.H., 2004: *Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants*. American Journal of Botany. 91(10):1700-1708. DOI: 10.3732/ajb.91.10.1700.

LORIDON K., MCPHEE K., MORIN J., DUBREUIL P., PILET-NAYEL M.L., AUBERT G., RAMEAU C., COYNE C., LEJEUNE-HENAUT I., BURSTIN J., 2005: *Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (Pisum sativum L.)*. Theor Appl Genet. 111:1022 – 1031

MARTIN S.L., 2006: *The ORF1 Protein Encoded by LINE-1: Structure and Function During L1 Retrotransposition*. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2006: 1-6. DOI: 10.1155/JBB/2006/45621.

MAXTED N. & AMBROSE M., 2001: *Peas (Pisum L.), Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. 39: 181-190.

MCCLINTOCK, B., 1950: *The origin and behavior of mutable loci in maize*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 36(6): 344-355. DOI: 10.1073/pnas.36.6.344.

MCCOUCH S.R., 2002: *Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (Oryza sativa L.)*. DNA Research. 9(6): 199-207. DOI: 10.1093/dnares/9.6.199.

MONDEN Y., YAMAGUCHI K. & TAHARA M., 2014: *Application of iPBS in high-throughput sequencing for the development of retrotransposon-based molecular markers*. Current Plant Biology. 1: 40-44. DOI: 10.1016/j.cpb.2014.09.001.

NEI M. & KUMAR S., 2000: *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, 333 s. ISBN 978-01-99881-22-2.

NOVÁK J. & SKALICKÝ M., 2008: *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika organologie a systematika*. Poweprint, 344 s. ISBN 978-80-904011-1-2.

OESSNER J.P., GILLHAM N.W. & BOYNTON J.E., 1986: *The sequence of the chloroplast atpB gene and its flanking regions in Chlamydomonas reinhardtii*. Gene. 44(1): 17-28. DOI: 10.1016/0378-1119(86)90038-7.

OKE V. & LONG S.R., 1999: *Bacteroid formation in the Rhizobium-legume symbiosis*. Current Opinion in Microbiology. 2(6): 641-646. DOI: 10.1016/s1369-5274(99)00035-1.

OLDROYD G.E.D. & DIXON R., 2014: *Biotechnological solutions to the nitrogen problem*. Current Opinion in Biotechnology. 26: 19-24. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.08.006.

OSKOU EIYAN R., OSALOO S.K. & AMIRAHMADI A., 2014: *Molecular Phylogeny of the Genus Lathyrus (Fabaceae-Fabeae) Based on cpDNA matK Sequence in Iran*. Iranian Journal of Biotechnology. 12(2). DOI: 10.5812/ijb.10315.

PAVLÍK M., VÁŇOVÁ M., LAUDO V. & HARMATHA J., 2002: *Fungitoxicity of natural heterocycle glucoside vicine obtained from Vicia faba L. against selected microscopic filamentous fungi*. Rostlinná výroba. 48(12): 543-547.

ROCAP G., DISTEL D.L., WATERBURY J.B. & CHISHOLM S.W., 2002: *Resolution of Prochlorococcus and Synechococcus Ecotypes by Using 16S-23S Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequences: Importance of Structural Mutations*. Applied and Environmental Microbiology. 68(3): 1180-1191. DOI: 10.1128/aem.68.3.1180-1191.2002.

ROSENBERG N.A. 2003: *The Shapes of Neutral Gene Genealogies in Two Species: Probabilities of Monophyly, Paraphyly and Polyphyly in a Coalescent Model*. Evolution. 57(7): 1465-1477. DOI: 10.1554/03-012.

SEEFELDT L.C., HOFFMAN B.M., DEAN D.R., 2009: *Mechanism of Mo-dependent nitrogenase*. Annual review of biochemistry 78: 701-722. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812

SHAW J., LICKEY E.B., SCHILLING E.E. & SMALL R.L., 2007: *Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III*. American Journal of Botany. 94(3): 275-288. DOI: 10.3732/ajb.94.3.275.

SCHAEFER H., HECHENLEITNER P., SANTOS-GUERRA A., de SEQUEIRA M.M., PENNINGTON R.T., KENICER G. & CARINE M.A., 2012: *Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabeae with special focus on the middle-Atlantic island lineages*. BMC Evolutionary Biology. 12(1): 1-19. DOI: 10.1186/1471-2148-12-250.

SCHULMAN A.H., FLAVELL A.J., PAUX E & Noel ELLIS T.H.N., 2004: *The Application of LTR Retrotransposons as Molecular Markers in Plants*. *Methods of Molecular Biology*. 260: 73-245. DOI: 10.1007/978-1-61779-603-6_7.

SLAVÍK B., 1995: *Květena České republiky 4*. Academia, 530 s. ISBN 80-200-0384-3.

SMALL R.L., CRONN R.C., WENDEL J.F., DOYLE J. & JOHNSON L.A.S. 2004: *Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants*. *Australian Systematic Botany*. 17(2): 229-254. DOI: 10.1201/9781439833278.ch12.

SMÝKAL P., COYNE C.J., AMBROSE M.J., MAXTED N., SCHAEFER H., BLAIR M.W., BERGER J., GREENE S.L., NELSON M.N., BESHARAT N., VYMYSLICKÝ T., TOKER C., SAXENA R.K., ROORKIWAL M., PANDEY M.K., HU, J., LI Y.H., WANG, L.X., GUO Y., QIU L.J., REDDEN R.J., VARSHNEY R.K., TESHOME A., BROWN A.H.D. & HODGKIN T., 2014: *Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding*. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 34(1-3): 221-261. DOI: 10.1002/9780470650196.ch6.

SMÝKAL, P., 2011: *Fylogeneze, biogeografie a genetická diverzita rodu hrách*. *Živa*. 4: 151-154.

SONG Q. J., SHI J.R., SINGH S., FICKUS E.W., COSTA J.M., LEWIS J., GILL B.S., WARD R. & CREGAN P.B., 2005: *Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat*. *Theoretical and Applied Genetics*. 110(3): 550-560. DOI: 10.1007/s00122-004-1871-x.

SULAIMAN S.F., CULHAM A., HARBORNE J.B., 2003: *Molecular phylogeny of Fabaceae based on rbcL sequence data: with special emphasis on the tribe Mimosoideae (Mimosoideae)*. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 11(1): 9-35.

THIEL T., MICHALEK W., VARSHNEYR. & GRANER A., 2003: *Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in*

barley (Hordeum vulgare L.). Theoretical and Applied Genetics. 106(3): 411-422. DOI 10.1007/s00122-002-1031-0.

TUCKER S.C., DOUGLAS A.W., 1994: *Ontogenetic evidence and phylogenetic relationships among basal taxa of legumes*. In: Ferguson, I, K., Tucker, S ed (s). *Advances in legume systematics*. 6: 11-32.

WATSON L.E., SAYED-AHMED H. & BADR A., 2000: *Molecular phylogeny of Old World Trifolium (Fabaceae), based on plastid and nuclear markers*. *Plant Systematics and Evolution*. 224(3-4):153-171. DOI: 10.1007/bf00986340.

WEINER A.M., 2002: *SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you*. *Current Opinion in Cell Biology*. 14(3): 343-350. DOI: 10.1016/s0955-0674(02)00338-1.

WOESE C.R., 2000: *Interpreting the universal phylogenetic tree*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(15): 8392-8396. DOI: 10.1073/pnas.97.15.8392.

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*. Oxford University Press, 264 s. ISBN 978-0-19-954906-1

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Geografické rozložení čeledi *Fabaceae*. Světle zelená značí mírné klima, tmavě zelená deštný prales, žlutá savany, hnědá sukulenty.

Obr. 2: Hypotetické schéma evoluce rodu *Pisum* považující druhem *Vavilovia formosa* jako možného předka rodu *Pisum*, *Lathyrus* a *Vicia*.

Obr. 3 vlevo *Lathyrus neurolobus* Boiss. & Heldr.; vpravo mapa výskytu

Obr. 4: Fylogenetický strom založený na analýze rRNA

Obr. 5: Grafické znázornění jednotlivých kategorií klasifikace genealogie.

Obr. 7: Quick-Load 100bp ladder, New England Biolabs

Obr. 7: Elektroforetogram z vertikální elektroforézy SSR analýzy druhu *L. neurolobus*.

Obr. 8: SSR markery druhu *Lathyrus neurolobus*, a) produkty o velikosti 250-350 bp, b) produkty o velikost 150-250 bp, c) produkty o velikosti 350-500 bp, d) produkty o velikosti 500-750 bp.

Obr. 9: Elektroforetogramy iPBS analýzy různých markerů při Ta 50°C (A), 55°C (B) a 60°C (C) druhu *Lathyrus neurolobus*.

8 SEZNAM ZKRATEK

A	adenin
<i>atpB</i>	gen pro beta podjednotku ATPázy
bp	base pair
C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>Ds/Ac</i>	dissociation/activator gen
<i>env</i>	gen pro virový obal
G	guanin
iPBS	inter-primer binding site
ITS	internal transcribed spacer
kb	kilo báze
LINE	long interspersed element
LTR	long terminal repeat
<i>matK</i>	gen pro maturázu K
MITE	miniature inverted-repeat transposable element
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
<i>pol</i>	gen pro enzymatickou aktivitu
<i>rbcL</i>	gen pro ribulóza bisfosfát karboxylázu
RNA	ribonukleová kyseliny
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
SINE	short interspersed element
SSR	simple sequence repeats
T	tymin
<i>trnL-trnF, trnSG</i>	mezigenová nekódující oblast v chloroplastové DNA

9 PŘÍLOHY

9.1 Seznam příloh

Tab. 1: Přehled SSR markerů a počet jejich alel u druhu *Lathyrus neurolobus*, horizontální elektroforéza.

Tab. 2: Podrobná SSR analýza vertikální gelovou elektroforézou *L. neurolobus*.

Tab. 3: Srovnání horizontální a vertikální elektroforézy SSR markerů.

Tab. 4: Výsledné produkty a jejich velikost po nasedání primerů při různých teplotách pro druh *L. neurolobus*, stanovení metodou iPBS.

Tab. 1: Přehled SSR markerů a počet jejich alel u druhu *Lathyrus neurolobus*, horizontální elektroforéza.

Pořadí	Název	Počet alel	Velikost (bp)	Int. signálu
1	B4	1	450	1
2	AD-270	1	300	1
3	37	1	400	1
4	175	0	0	0
5	355	0	0	0
6	237	1	600	2
7	67	0	0	0
8	174	1	150	1
9	122	0	0	0
10	BLOX-2	1	150	2
11	146	0	0	0
12	186	0	0	0
13	476	1	150	1
14	134	1	650	2
15	164-2	1	250	2
16	100	2	500, 700	1
17	A1	1	500	1
18	321	1	150	1
19	31	0	0	0
20	206	0	0	0
21	16	2	200, 300	2
22	473	0	0	0
23	374	0	0	0
24	278	1	400	1
25	456	2	350, 750	1
26	AB-36	2	250, 600	1

Pořadí	Název	Počet alel	Velikost (bp)	Int. signálu
27	85	1	200	2
28	99	0	0	0
29	6	1	600	1
30	4	0	0	0
31	5	1	450	2
32	3	0	0	0
33	8	1	150	1
34	9	0	0	0
35	10	0	0	0
36	19	0	0	0
37	20	1	200	1
38	13	1	200	1
39	21	1	200	2
40	14	1	200	2
41	15	0	0	0
42	17	2	200, 300	2
43	AD-134	2	100 - 600	3
44	AA-473	0	0	0
45	AA-321	1	150	2
46	AD-95	1	250	3
47	A9	2	100 - 400	2
48	AD-141	1	150	1
49	A-278	0	0	0
50	SAT-5	1	150	2
51	A7	0	0	0

Tab. 2: Podrobná SSR analýza vertikální gelovou elektroforézou *L. neurolobus*.

Gel (bp)	Marker	Počet alel	Velikost produktu (bp)
A: 150-250	AA-321	0	0
	A9	0	0
	SAT-5	0	0
	174	1	127
	BLOX-2	0	0
	164-2	2	165,155
	321	0	0
	85	2	167,157
	8	0	0
	20	1	141
	13	1	159
	21	1	152
	14	2	155,135
B: 250-350	AD-141	0	0

Gel (bp)	Marker	Počet alel	Velikost produktu (bp)
B: 250-350	AD-270	1	245
	476	2	255,245
	16	1	230
	17	1	265
C: 350-500	AD-134	1	465
	B4	2	540,525
	37	1	410
	134	2	535,525
	A1	2	375,365
	278	1	410
D: 500-700	206	1	410
	327	2	540,520
	100	2	600,585
	456	1	720
	AB-36	2	560,540
	6	1	540

Tab. 3: Srovnání horizontální a vertikální elektroforézy SSR markerů.

Gel (bp)	Pořadí	Marker	Počet alel	Velikost produktu (bp)	Pův. poč. alel	Pův. velikost (bp)	Rozdíl
B: 150-250	1	AA-321	0	0	1	150	x
	2	A9	0	0	2	400,150	x
	3	SAT-5	0	0	1	150	x
	4	174	1	127	1	150	23
	5	BLOX-2	0	0	1	150	x
	6	164-2	2	165,155	1	250	90
	7	321	0	0	1	150	x
	8	85	2	167,157	1	200	38
	9	8	0	0	1	150	x
	10	20	1	141	1	200	59
	11	13	1	159	1	200	41
	12	21	1	152	1	200	48
	13	14	2	155,135	1	200	55
A: 250-350	1	AD-141	0	0	1	150	x
	2	AD-270	1	245	1	300	55
	3	476	2	255,245	1	150	100
	4	16	1	230	2	300,200	20
	5	17	1	265	2	300,200	15
C: 350-500	1	AD-134	1	465	1	600	135

Gel (bp)	Pořadí	Marker	Počet alel	Velikost produktu (bp)	Pův. poč. alel	Pův. velikost (bp)	Rozdíl
	2	B4	2	540,525	1	450	122
	3	37	1	410	1	400	10
	4	134	2	535,525	1	650	120
	5	A1	2	375,365	1	500	130
	6	278	1	410	1	400	10
	7	206	1	410	1	600	190
D: 500-700	1	327	2	540,520	1	600	70
	2	100	2	600,585	2	700,500	10
	3	456	1	720	2	750,350	170
	4	AB-36	2	560,540	2	600,250	175
	5	6	1	540	1	600	60
Průměr							75
Maximum							190
Minimum							10

Tab. 4: Výsledné produkty a jejich velikost po nasedání primerů při různých teplotách pro druh *L. neurolobus*, stanovení metodou iPBS.

Pořadí	Marker	Ta (°C)	Počet fragmentů	Přibližná velikost (bp)	Int. signálu
1	2076	50	16	150 - 2500	3
	2076	55	9	250 - 2800	3
	2076	60	0	0	0
2	2077	50	13	150 - 2000	2
	2077	55	13	150 - 2200	3
	2077	60	0	0	0
3	2078	50	8	300 - 800	3
	2078	55	15	200 - 2500	1
	2078	60	19	250 - 2500	3
4	2221	50	7	500 - 2000	1
	2221	55	13	450 - 2800	2
	2221	60	0	0	0
5	2228	50	9	600 - 2000	3
	2228	55	8	600 - 2600	3
	2228	60	2	1200 - 2300	1
6	2229	50	10	300 - 2000	3
	2229	55	5	1300 - 2600	3
	2229	60	10	300 - 2300	2
7	2230	50	2	650 - 800	2
	2230	55	9	800 - 2800	2

Pořadí	Marker	Ta (°C)	Počet fragmentů	Přibližná velikost (bp)	Int. signálu
	2230	60	2	300 - 400	1
8	2231	50	3	700 - 1000	3
	2231	55	4	900 - 2800	1
	2231	60	2	300 - 400	1
9	2232	50	12	600 - 2500	3
	2232	55	16	600 - 2800	3
	2232	60	4	300 - 2600	1
10	2239	50	15	350 - 2200	3
	2239	55	8	500 - 2600	3
	2239	60	5	700 - 1800	1
11	2241	50	6	1200 - 2200	2
	2241	55	8	1000 - 2700	3
	2241	60	1	1200	1
12	2247	50	13	300 - 2200	3
	2247	55	10	600 - 2700	3
	2247	60	16	1400 - 2500	3
13	2249	50	13	200 - 2200	3
	2249	55	10	150 - 1900	3
	2249	60	18	300 - 2500	3
14	2251	50	13	350 - 2300	3
	2251	55	11	800 - 2800	3
	2251	60	6	250 - 1200	1
15	2271	50	20	250 - 2300	3
	2271	55	12	700 - 2700	3
	2271	60	4	1100 - 1600	1
16	2272	50	7	250 - 2500	1
	2272	55	7	1200 - 2600	3
	2272	60	0	0	0
17	2273	50	8	400 - 2300	2
	2273	55	1	1200	3
	2273	60	0	0	0
18	2276	50	0	0	0
	2276	55	0	0	0
	2276	60	0	0	0
19	2277	50	7	350 - 2500	2
	2277	55	7	300 - 1200	3
	2277	60	0	0	0
20	2279	50	0	0	0
	2279	55	0	0	0
	2279	60	0	0	0
21	2295	50	0	0	0

Pořadí	Marker	Ta (°C)	Počet fragmentů	Přibližná velikost (bp)	Int. signálu
	2295	55	0	0	0
	2295	60	0	0	0
22	2278	50	12	300 - 2200	3
	2278	55	0	0	0
	2278	60	0	0	0
23	2273	50	6	300 - 2500	2
	2273	55	2	2000 - 2800	1
	2273	60	0	0	0
24	2274	50	10	500 - 2500	1
	2274	55	14	2500 - 2100	2
	2274	60	0	0	0
25	2283	50	8	200 - 2000	3
	2283	55	6	600 - 2100	2
	2283	60	0	0	0
26	2285	50	0	0	0
	2285	55	1	950	1
	2285	60	0	0	0
27	2286	50	0	0	0
	2286	55	1	1550	1
	2286	60	0	0	0
28	2287	50	ch	0	
	2287	55	0	0	0
	2287	60	0	0	0
29	2390	50	4	150 - 1200	3
	2390	55	3	900 - 1300	3
	2390	60	0	0	0
30	2394	50	8	200 - 2500	2
	2394	55	9	650 - 2100	3
	2394	60	0	0	0
31	2395	50	6	300 - 1500	3
	2395	55	6	550 - 2000	1
	2395	60	9	450 - 2300	3