

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Genotypizace a fenotypizace důležitých agronomických znaků sóji *Glycine max* [L.] Merr.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Ivana Kaňovská
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala své vedoucí Mgr. Márii Škrabišové, Ph.D. za její odborné vedení, rady, pomoc a čas, který mi věnovala při psaní a při experimentálním řešení této bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Ivana Kaňovská
Název práce	Genotypizace a fenotypizace důležitých agronomických znaků sóji <i>Glycine max</i> [L.] Merr.
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá sledováním důležitých agronomických znaků sóji *Glycine max*, konkrétně fenotypovou rozmanitostí trichomů – délkou trichomů, přilehlostí trichomů k listu a jejich hustotou. V teoretické části se zabývá vznikem, vývojem a morfologií trichomů a jejich důležitostí pro rostlinu. Praktická část si klade za cíl fenotypizaci a genotypizaci variet za účelem ověření kandidátního genu odpovědného za variety sóji s fenotypem bez trichomů. Bylo použito PCR pro amplifikaci genu *Glyma.09G278000*, který byl dále sekvenován Sangerovou metodou sekvenování DNA. Byla ověřena přítomnost jednonukleotidového polymorfismu kandidátního genu odpovědného za variety s fenotypem bez trichomů, kde mutací adeninu za guanin dochází k záměně alaninu za threonin. Bylo tak potvrzeno, že protein kódovaný genem *Glyma.09G278000* se může podílet na vzniku a vývoji trichomů.

Klíčová slova	Sója, <i>Glycine Max</i> , trichomy, genetická variabilita, genotypizace, fenotypizace
Počet stran	53
Počet příloh	2
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Ivana Kaňovská
Title	Genotypization and phenotypization of important agronomical traits of soybean <i>Glycine max</i> [L.] Merr.
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

This bachelor thesis deals with a study of important agronomical traits of soybean *Glycine max*, specifically with the phenotypic diversity of trichomes - the length of trichomes, pubescence formation and density. The theoretical part deals with the formation, development and morphology of trichomes and their importance for the plant. The practical part aims at the phenotypization and genotypization of varieties in order to verify a candidate gene responsible for glabrous phenotype. PCR was used to amplify the candidate gene *Glyma.09G278000*, which was then sequenced by the Sanger DNA sequencing method. A single nucleotide polymorphism in the candidate gene responsible for glabrous phenotype was verified – the mutation of adenine to guanine replaces alanine with threonine. Thus, it was confirmed that the protein encoded by the gene *Glyma.09G278000* is possibly involved in the formation and development of trichomes.

Keywords	Soybean, <i>Glycine max</i> , genotypization, phenotypization
Number of pages	53
Number of appendices	2
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	9
2	Současný stav řešené problematiky	11
2.1	Sója luštinatá	11
2.2	Trichomy	13
2.2.1	Morfologie trichomů	13
2.2.2	Vliv hustoty trichomů na napadení škůdci	15
2.2.3	Vliv trichomů na odraz světla listovou plochou	17
2.2.4	Ostatní morfologické znaky trichomů	18
2.2.5	Vznik trichomů a jejich regulace	18
2.2.6	Orthologní gen <i>CPR5</i>	22
2.3	Protein podílející se na přenosu lipidů 1 (LTP1)	22
2.4	Whatman® FTA® karty	25
2.5	Endpoint PCR	26
2.5.1	Jednotlivé kroky PCR	26
2.6	Agarasová elektroforéza	27
2.7	Sangerova metoda sekvenování DNA	27
2.8	Metoda asociace fenotypu na genotyp (GWAS)	27
3	Experimentální část	29
3.1	Materiál a chemikálie	29
3.1.1	Použité chemikálie	29
3.1.2	Použité přístroje a vybavení	29
3.1.3	Použité roztoky	29
3.1.4	Reagencie pro molekulární biologii	29
3.1.5	Použitý biologický materiál	30
3.2	Experimentální metody	30
3.2.1	Pozorování trichomů	30
3.2.2	Sběr vzorků DNA	31
3.2.3	Příprava vzorků pro endpoint PCR	31
3.2.4	Endpoint PCR	31
3.2.5	Elektroforéza v agarosovém gelu	33
3.2.6	Přečištění produktu PCR	34
3.2.7	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	35
3.2.8	Sekvenování Sangerovou metodou	35
3.2.9	Analýza výsledků pomocí programu BioEdit	35
4	Výsledky a diskuze	36
4.1	Ověření fenotypu variet s trichomy	36
4.2	Délka trichomů	37
4.3	Pozorování krátkých trichomů u variet s fenotypem bez trichomů	39
4.4	Ověření amplifikace části genu <i>Glyma.09G278000</i>	41

4.5	Koncentrace vzorků	42
4.6	Sekvenace genu <i>Glyma.09G278000</i>	42
5	Závěr	45
6	Literatura	46
7	Seznam použitých zkratk	51
8	Přílohy	53

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

Vypracování literární rešerše na téma významnosti různých fenotypů trichomů v přípravě nových kultivarů.

Praktická část:

Ověření fenotypu a genotypu vybraných kultivarů sóji:

- kultivace rostlin
- klasifikace trichomů pomocí mikroskopie
- izolace a následná sekvenace genomové DNA (gDNA)

Ověření kandidátních genů podmiňujících daný fenotyp.

- identifikace přirozených genetických variant – jednonukleotidových polymorfismů (SNP)

1 ÚVOD

Sója patří do čeledi bobovité (*Fabaceae*) a rodu *Glycine*, který se dělí na dva podrody – divoká sója *Glycine soja* Sieb. and Zucc., ze které byla kultivovaná sója luštinatá *Glycine max* (L.) Merr. (Lee *et al.*, 2010; Hymowitz, 2008).

Agronomické znaky je možné dělit na kvalitativní nebo kvantitativní, přičemž např. morfologické znaky mohou spadat do obou kategorií. Důležitými agronomickými znaky jsou obsah a složení proteinů a olejů, množství lusků na jednu rostlinu, hmotnost semen, doba dozrávání, výška rostliny, průměrná délka a šířka listu, počet nodů na hlavním stonku a větvení rostliny (Chen *et al.*, 2007). Trichomy a jejich vlastnosti jako je délka a hustota mají velký vliv na více agronomických znaků sóji současně, jelikož se uplatňují při ochraně rostliny před patogeny, škůdci, přehřátím a ztrátami vody.

Díky svému vysokému obsahu proteinů (40-42%) a olejů (18-22%) se sója řadí mezi nejvýznamnější luštěniny, využívá se v potravinářském průmyslu (např. sójový proteinový izolát, sójový lecitin, výroba sójové omáčky, masa, mléka nebo tofu), jako krmivo pro zvířata a při výrobě bionafty (Pagano a Miransari, 2016). Sójové oleje se využívají například pro výrobu inkoustů, které jsou ekologičtější než inkousty vyráběné z ropy (Erhan *et al.*, 1992).

Jelikož sója nemůže být díky své citlivosti na světlo a podmínky pěstována po celém světě, ale zároveň je o ni velký zájem, je snaha o přípravu nových kultivarů, které by se lépe přizpůsobovaly podmínkám podnebí, měly větší výnos, vyšší obsah mastných kyselin a proteinů v semenech a byly odolnější vůči škůdcům. Nové kultivary mohou být připravovány klasickým šlechtěním, přičemž je třeba znát konkrétní geny způsobující fenotyp daného agronomického znaku. V posledních letech se pro hledání genů způsobujících daný fenotyp začala využívat metoda asociace fenotypu na genotyp (Genome-Wide Association Study, GWAS) – statistická metoda, která se využívá k identifikaci kandidátních genů. Klasickými metodami křížení a přípravy isogenních linií s následnou detekcí lokusů asociovaných se studovaným fenotypem pomocí genetických markerů lze získat pouze hrubou představu o pozici genů zodpovědných za fenotypový projev (v řádech milionů párů bází). Pomocí metod GWAS je možné velikost asociovaných oblastí limitovat až na konkrétní jednonukleotidové změny v asociovaných genech. Jakmile jsou známy kandidátní geny, je mnohem jednodušší provést sekvenování DNA a zjistit konkrétní mutaci. Poté se navrhne marker, DNA

próba, kterou se pak při křížení rozliší, které rostliny nesou sledovanou vlastnost ve svém genomu a které ne.

Pomocí metody GWAS byla u sóji na chromosomu 9 identifikována oblast, která obsahuje celou řadu potenciálních genů, které by mohly být zodpovědné za variety s fenotypem bez trichomů (Bandillo *et al.*, 2017). Doposud identifikovaná alela zodpovědná za variety s fenotypem bez trichomů se nazývá *PI/p1*. Na základě GWAS-to-Genes analýzy (Škrabišová *et al.*, 2020) byl navržen kandidátní gen variet s fenotypem bez trichomů, jehož genetická variace byla v této práci identifikována u vybraných variet bez trichomů genotypizací pomocí Sangerova sekvenování.

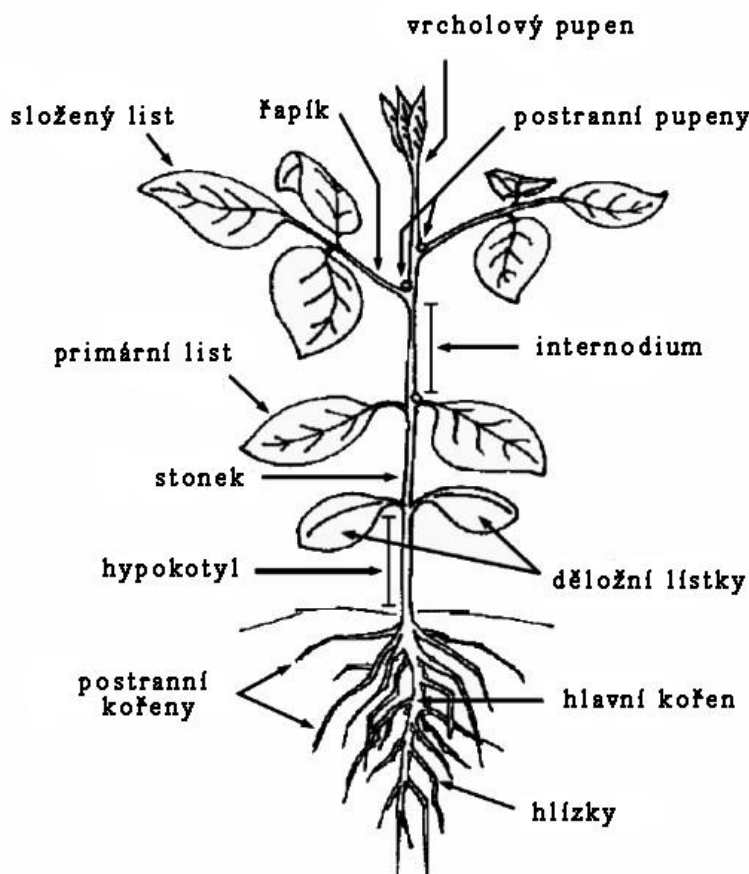
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Sója luštinatá

Sója luštinatá (*Glycine max*) je původem z jihovýchodní Asie, Evropa se o její existenci dozvěděla v 17. století díky německému botanikovi Engelbertovi Kaempferovi, který pobýval po určitou dobu v Japonsku, a od 18. století se šíří v Evropě její pěstování. Je to jednoletá rostlina krátkého dne.

Genom sóji je diploidní ($2n=40$) a je nejspíše odvozen od dávného diploidního předka sóji ($n=11$), u kterého došlo k aneuploidii ($n=10$), polyploidizaci ($2n=20$) a následně k návratu do diploidního stavu (Lackey, 1980).

Na sóji je možné pozorovat děložní lístky, primární lístky a sekundární složené listy, které jsou ve většině případů trojčetné. Kořen sóji je tvořen hlavním kořenem a postranními kořeny a nachází se na něm hlízky s bakteriemi fixujícími vzdušný dusík. (Morse *et al.*, 1949) (Obr. 1, Obr. 2). Barva květů může být od bílé po různé odstíny fialové (Obr. 3).



Obr. 1 Schéma sóji (Převzato z Muredzi *et al.*, 2013)

Původní fenotyp rostliny je pokryt trichomy na většině orgánů (vyjma květů), existuje však i malé množství kultivarů, které jsou zcela bez trichomů (Obr. 2).

Variety bez trichomů se s oblibou pěstují v asijských zemích a tyto rostliny často dorůstají do menší výšky, mají méně semen než běžné kultivary s trichomy a jejich rozšíření je limitované náchylností k nižší odolnosti proti savým škůdcům a požerovému hmyzu (Morse *et al.*, 1949).



Obr. 2 Detail rostlinných částí (orgánů) sóji. A: stonk variant s fenotypem s trichomy, B: stonk variant s fenotypem bez trichomů, C: detail složeného listu, D: detail kořene s hlízkami (Převzato z databáze GRIN/U.S. National Germplasm System)



Obr. 3 Květy sóji s různými barevnými fenotypy (Převzato z databáze GRIN/U.S. National Germplasm System)

Doba kvetení původních poddruhů se v průběhu jejich domestikace přizpůsobovala jejich adaptaci na zeměpisné šířky. Díky odlišnosti doby kvetení se liší i doba dozrávání, podle které se dnes poddruhy sóji dělí do 13 skupin. (Bandillo *et al.*, 2017; Hartwig, 1973). Doba dozrávání může být různá v období od 75 dnů (velmi brzké) po 200 dnů (pozdní) (Morse *et al.*, 1949).

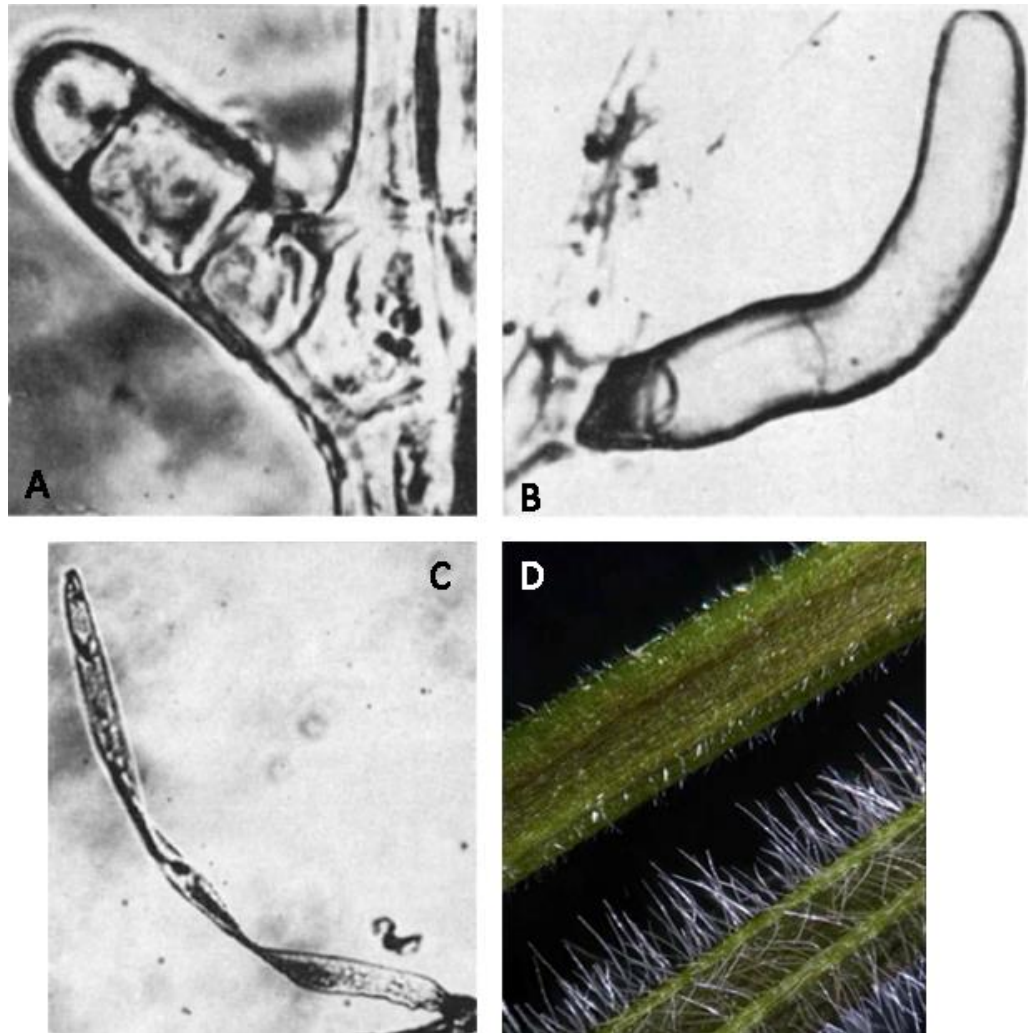
2.2 Trichomy

2.2.1 Morfologie trichomů

Na morfologii trichomů se podílí celá řada znaků, např. sklon trichomů vůči epidermis, barva, délka, zakřivení a jejich hustota.

U sóji byly doposud identifikovány dvě alely zodpovědné za morfologii sklonu trichomů vůči epidermis – *Pal/pal* a *Pal/pa2* (chromosomy 12 a 13), jejichž interakcí vzniká 5 fenotypů: vzpřímené (erect; E), téměř vzpřímené (near-erect; nE), částečně přilehlé (semi-apressed; SA), téměř přilehlé (near-apressed; nA) a přilehlé (appressed; A) trichomy (Bernard, 1975a). Nicméně fenotypy téměř vzpřímený a téměř přilehlý se příliš neliší od fenotypu částečně přilehlého, proto jsou ve většině případů popisovány jen 3 typy fenotypů – vzpřímený, přilehlý a částečně přilehlý (Bandillo *et al.*, 2017; Gilbert, 2017).

Další dva méně časté fenotypy jsou pubertální typ, který je charakterizován trichomy tvořenými jednou prodlouženou buňkou o velikosti 0,1 mm, a kudrnatý typ trichomů, které se zpočátku podobají normálním trichomům, později však začínají být ploché a stáčet se a postupně odpadávat (Singh *et al.*, 1971). (Obr. 4)



Obr. 4 Fenotypy trichomů. A: krátké trichomy na varietách bez trichomů, B: pubertální fenotyp, C: kudrnatý fenotyp (Převzato z Singh *et al.*, 1971); D: srovnání krátkých trichomů a normálně dlouhých trichomů (Převzato z Campbell *et al.*, 2019)

Trichomy můžeme nalézt na listech, stonku i na povrchu lusků. Na listech se trichomy utváří v první fázi morfogeneze listu. Jsou tvořeny 1-3 dlouhými apikálními buňkami a 1-3 buňkami bazálními, které zajišťují vzpřímenost trichomu. U přilehlých trichomů dochází k poruše při vývoji bazálních buněk nebo se tyto buňky nevyvinou vůbec, v důsledku toho pak trichom přiléhá k listu. (Levin, 1973)

U variet bez trichomů je možné pozorovat krátké a široké trichomy („pahýly“) sestávající se z jedné až sedmi stejně velkých buněk (Obr. 4) (Singh *et al.*, 1971; Bernard a Singh, 1969). Doposud byla identifikována jedna alela odpovídající za variety s fenotypem bez trichomů – *PI/pI* nacházející se na chromosomu 9, přičemž dominantní alela *PI* podmiňuje variety s fenotypem bez trichomů a recesivní alela *pI* odpovídá za fenotyp normální (Bandillo *et al.*, 2017; Bernard a Singh, 1969; Hunt *et al.*, 2011).

2.2.2 Vliv hustoty trichomů na napadení škůdci

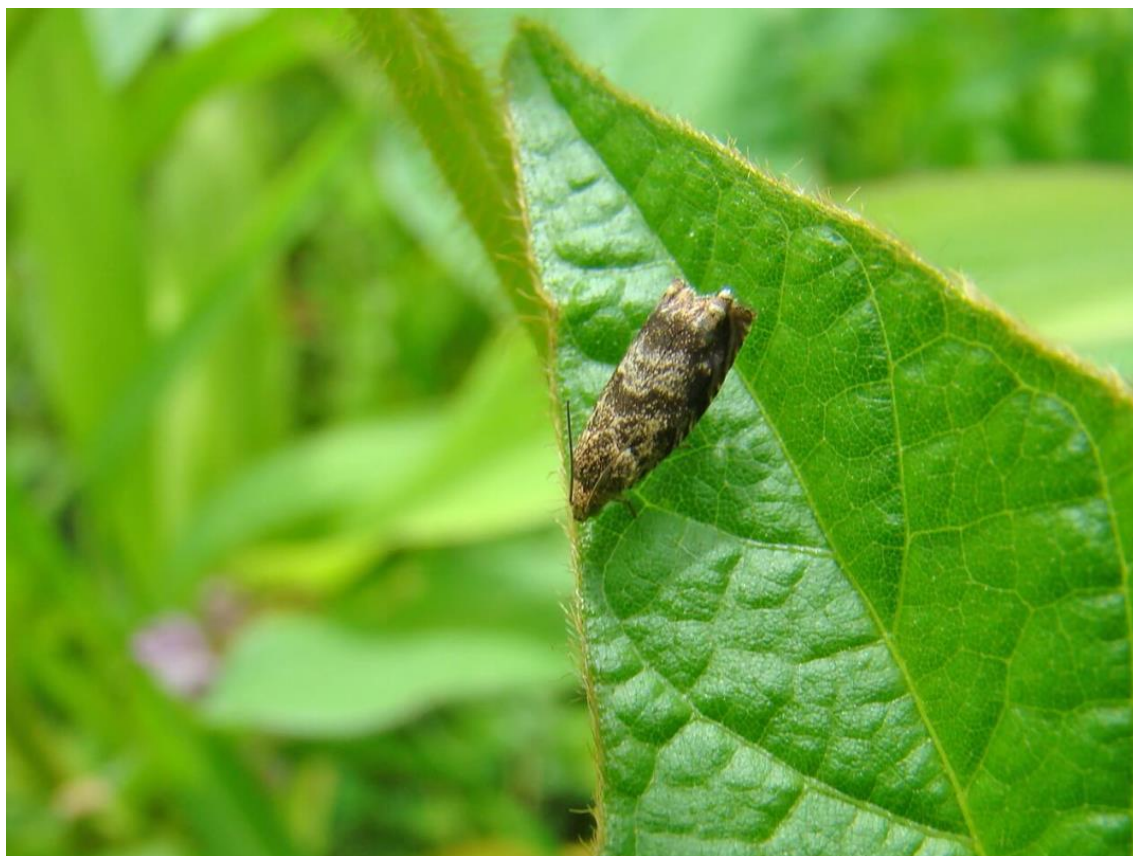
Singh *et al.* (1971) pozorovali hustotu trichomů u 5 téměř isogenních linií (nearly-isogenic lines/NILs) s původem Harosoy a Clark a jejich vliv na napadení housenkou *Empoasca fabae* (Obr. 5). Při výzkumu používali variety s hustým (31 trichomů/mm² u Harosoy a 29,7 trichomů/mm² u Clark), normálním (8,1 trichomů/mm² u Harosoy a 6,1 trichomů/mm² u Clark) a řídkým (2,6 trichomů/mm² u Harosoy a 1,7 trichomů/mm² u Clark) porostem vzpřímených trichomů, dále variety bez trichomů (varieta USB-251) a variety s přilehlým typem trichomů (7,9 trichomů/mm² u Harosoy a 5,8 trichomů/mm² u Clark).



Obr. 5 Škůdce *Empoasca fabae*. (Převzato z Calderwood *et al.*, 2015)

Nejmenší počet škůdců byl pozorován u variet s největší hustotou trichomů, následován ve vzestupném pořadí varietami s normální a malou hustotou. Největší počet škůdců byl pozorován variet s přilehlými trichomy a u variet bez trichomů. Tato skutečnost je nejspíše způsobena tím, že přítomnost většího množství trichomů nedovoluje škůdcům proniknout až k povrchu listu a způsobit tak poškození. Rozsah napadení škůdci se dále odráží i v samotném výnosu rostliny, ve výšce rostliny, době dozrávání plodů a hmotnosti semen. (Singh *et al.*, 1971; Kilen a Lambert, 1993)

V Japonsku bylo naopak pozorováno, že variety bez trichomů a variety s přilehlým typem trichomů jsou vysoce rezistentní vůči housence *Laspeyresia glycinivorella* Mats. (Obr. 6) Tento škůdce klade relativně málo vajíček na listy rostlin bez trichomů nebo s přilehlými trichomy, což vede k menšímu poškození rostliny. (Singh *et al.*, 1971) U jedné z variet bez trichomů (spolu s dalšími dvěma varietami s trichomy pocházejícími z Japonska) byla také zjištěna větší rezistence vůči hnilobě způsobené houbou *Macrophomina phaseolina* (Pawlowski *et al.*, 2015).



Obr. 6 Škůdce *Laspeyresia glycinivorella* Mats. (Převzato z Avgust)

2.2.3 Vliv trichomů na odraz světla listovou plochou

Zhoršující se globální oteplování vede k neustálému hledání a vytváření nových průmyslových odvětví ve snaze zmírnit změny klimatu. Vliv na globální oteplování má především uvolňování skleníkových plynů, SO₂ a síry do ovzduší (Crutzen, 2006), v důsledku toho je velká snaha právě o snížení jejich produkce. Byly navrženy různé strategie pro zvýšení planetárního albeda, tedy odrazivosti slunečního záření planetou, například využití orbitálních slunečních clon (Angel, 2003), vstřikování reflektivního aerosolu do stratosféry (Crutzen, 2006; Wigley, 2006). Mnohem menší pozornost je však věnována vlivu zemědělských plodin na klima, který může být stejně důležitý jako vliv skleníkových plynů a může vést k efektivnímu snížení teploty ovzduší. Oproti přírodní vegetaci a půdě mají zemědělské rostliny mnohem větší albedo (Monteith a Unsworth, 2013). Na albedo rostliny mají vliv například lesk listu, přítomnost trichomů a jejich morfologie (Ridgwell *et al.*, 2009)

Se zvyšujícím se albedem rostliny je více energie krátkovlnného záření odráženo, čímž je dostupné méně energie pro její pohlcení planetou. Doughty *et al.* (2011) využili software Community Atmosphere Model (CAM 3.0) spolu s Community Land Model (CLM 3.0) pro simulaci vlivu různých zemědělských plodin na klima. Srovnání variet bez trichomů a variet sóji s trichomy vedlo ke zjištění, že variety s trichomy účinněji odráží záření a zároveň méně propouští záření než variety bez trichomů. Ve viditelné části světla (400-700 nm) nebyly pozorovány velké rozdíly v odrazivosti, signifikantní nárůst odrazivosti byl ovšem pozorován v oblasti blízkého infračerveného záření (700-1 400 nm) a menší nárůst v oblasti nad 1 400 nm.

U variet sóji s trichomy bylo důležité rozlišovat jejich barvu, postavení vůči listu a hustotu trichomů na listovou plochu, jelikož všechny znaky ovlivňují odrazivost. Variety s kudrnatým typem trichomů, žlutohnědými trichomy a linie s malou hustotou trichomů na plochu odrážely záření více než variety se vzpřímenými či přilehlými trichomy, šedými trichomy a větší hustotou trichomů. Pokud by všechny variety sóji v zemědělských oblastech ve vyšších nadmořských výškách byly nahrazeny varietami bez trichomů, mohlo by dojít ke snížení maximální denní teploty o přibližně 0,41 °C, což však není dostatečné snížení teploty ke kompenzaci předpokládaného zvyšování teplot vlivem globálního oteplování. (Doughty *et al.*, 2011) Zároveň je však nutné diskutovat, že fenotyp bez trichomů může přispět k celkovému efektivnějšímu snížení teploty

v kombinaci s dalšími k tomuto přispívajícími fenotypy jako výše zmíněná světlejší barva listu.

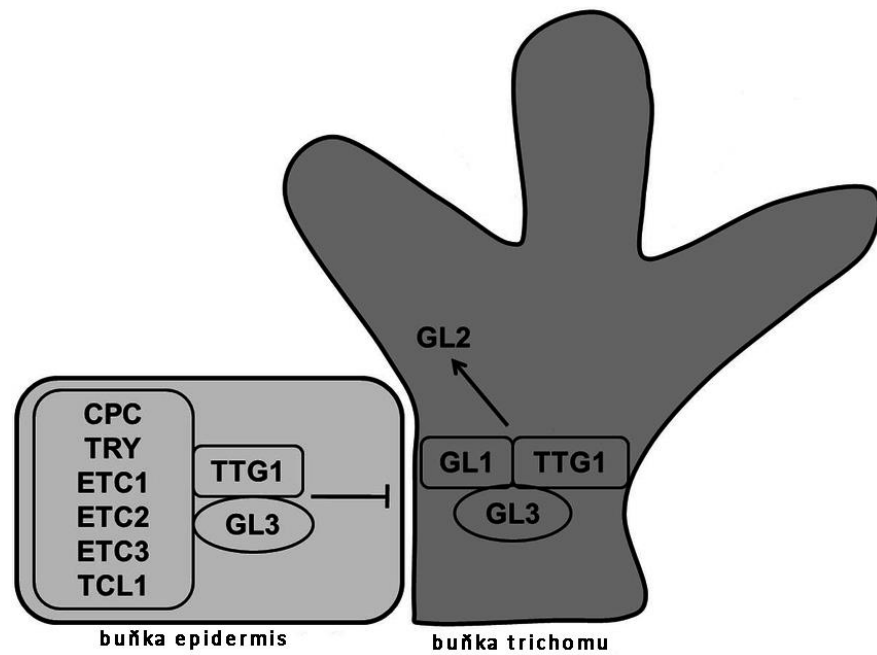
2.2.4 Ostatní morfologické znaky trichomů

Za pigmentaci trichomů odpovídá lokus *T/t* nacházející se na 6. chromosomu (Song *et al.*, 2012), ovlivňující kromě pigmentace trichomů také pigmentaci semen a pupku. Dominantní *T* alela odpovídá za syntézu pigmentů (anthocyanin, proanthocyanin), při jejichž akumulaci mají trichomy žlutohnědou až hnědou barvu, naopak rostliny s recesivní *t* alelou mají šedé trichomy. (Zabala a Vodkin, 2003). Dominantní alela *T* dále odpovídá za černou a hnědou barvu semen a pupku, recesivní alela za žlutohnědou a za nedokonalou černou (nenachází se na celém povrchu semene nebo pupku). Druhým lokusem, který odpovídá za barvu trichomů, je lokus *Td/td*, který nejspíše kontroluje světlejší a tmavší žlutohnědou barvu. (Bernard, 1975b).

2.2.5 Vznik trichomů a jejich regulace

Vznik trichomů je velmi dobře popsán u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Buňky trichomů vznikají z buněk epidermis, které prochází třemi stupni vývoje: determinace, specifikace a morfogeneze (Hülkamp *et al.*, 1994). K iniciaci přeměny buňky epidermis na buňku trichomu je zapotřebí proteinu GL2 (GLABRA2) (Rerie *et al.*, 1994), jehož transkripci spouští MBW (MYB-bHLH-WD40) komplex.

MBW komplex je tvořen: GLABRA1 (GL1) patřící do rodiny R2R3 MYB proteinů (Oppenheimer *et al.*, 1991), GLABRA3 (GL3), který patří mezi bHLH proteiny (zásadité helix-otočka-helix proteiny), jeho zesilovač EGL3 (Payne *et al.*, 2000) a TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1), který patří mezi WD-opakující se proteiny, tedy proteiny sestávající se z 44-60 aminokyselinových zbytků a mající na C-konci dimer tryptofan-aspartát (Galway *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999) (Obr. 7).



Obr. 7 Regulace diferenciacie trichomů. MBW komplex je tvořen: GLABRA1 (GL1), GLABRA3 (GL3), jeho zesilovač EGL3 a TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1), Po navázání jednoho některého z negativních regulátorů (CPC, TRY, ETC1, ETC2, ETC3, TCL1 – popsány dále v textu) na GL3 nebo TTG1, není umožněno navázání GL1 a transkripce GL2 (negativní regulace – šipka s rovnou koncovkou) a přeměna buňky epidermis v buňku trichomu. Pokud je naopak umožněno navázání GL1 a vznik komplexu, dojde k transkripci GL2, což způsobí přeměnu buňky epidermis na buňku trichomu (pozitivní regulace – šipka). (převzato z Kalve *et al.*, 2014)

Negativní regulátory (inhibitory) ovlivňují kromě vzniku trichomů také hustotu. Při jejich nadměrné expresi dochází ke snížení počtu trichomů na listovou plochu, naopak při jejich inaktivaci se hustota zvyšuje. (Wang *et al.*, 2007).

Mezi negativní regulátory se řadí TRIPTYCHON (TRY) a CAPRICE (CPC), oba patřící do rodiny R3 MYB proteinů, a jejich zesilovače – ETC1, ETC2, ETC3. Dalším negativním regulátorem vzniku trichomů jsou TRICHOMELESS1 a 2 (TCL1, TCL2), které také patří do rodiny R3 MYB transkripčních faktorů (Wang *et al.*, 2007). Inhibice těmito faktory je způsobena jejich navázáním na GL3, popřípadě na EGL3 a TTG1, tím je znemožněno navázání GL1 a vznik MBW komplexu, který nemůže aktivovat gen *GL2* a spustit transkripci proteinu. (Hülkamp *et al.*, 1994).

Mnoho inhibitorů je aktivováno samotným aktivačním komplexem (MBW komplexem) (Morohashi *et al.*, 2007), avšak ETC1, TCL1 a TCL2 jsou aktivovány dalšími transkripčními faktory jako jsou například TCP (Vadde *et al.*, 2019) a SPL (*SQUAMOSA* promoter binding protein-like/transkripční faktory, které se vážou na promotor genu *SQUAMOSA*) (Yu *et al.*, 2010).

Do dnešní doby nebylo publikováno mnoho o transkripčních faktorech ovlivňujících vznik trichomů u sóji. Studie zabývající se tímto tématem tak většinou využívají znalostí o *A. thaliana*, který slouží jakožto modelová rostlina a jejíž transkripční faktory ovlivňující růst a vývoj trichomů jsou velmi dobře prostudovány a popsány, a uvádí také možnost kontroly vzniku a vývoje trichomů u jiných rostlin stejným nebo podobným mechanismem jako u *A. thaliana*.

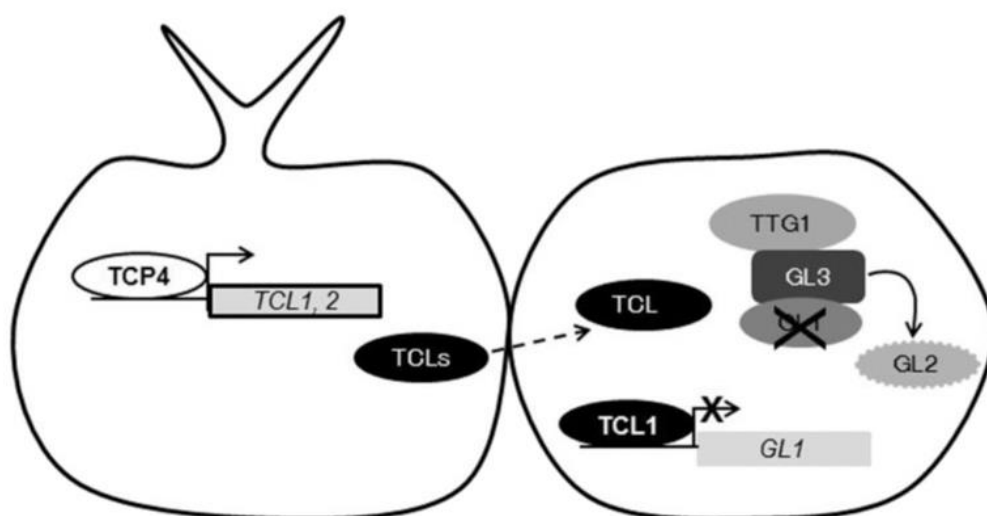
Např. Xun *et al.* (2018) použili sekvenci aminokyselin TRICHOMELESS1 (popsán níže) a v databázi proteinů sóji našli celkem šest genů (*GmTCL1-GmTCL6*) kódujících proteiny R3 MYB rodiny. Při zkoumání jejich nadexpresi u transgenních rostlin sóji nebyl zaznamenán žádný vliv na vznik trichomů, u transgenních rostlin *A. thaliana* s *GmTCL1-GmTCL6* došlo k výrazné inhibici vzniku trichomů. Je možné, že *GmTCL* odpovídají za vznik a vývoj trichomů i u sóji, ale mohou být maskovány epistatickým efektem jiných genů, proto nebylo možné pozorovat jejich projev ve fenotypu.

2.2.5.1 *TCL1* a *TCL2* a jejich regulace

TCL1 a *TCL2* patří mezi důležité inhibitory vzniku trichomů především na stonku květenství a byly také nalezeny v listové růžici. Při jejich nadexpresi dochází až k úplnému potlačení vzniku trichomů. (Wang *et al.*, 2007)

Vadde *et al.* (2019) předpokládali, že díky přítomnosti TCL1 a TCL2 v listech by mohly být tyto transkripční faktory regulovány rodinou transkripčních faktorů TCP, které se nachází v listech během jejich morfogeneze. V mladých listech TCP regulují velikost a tvar listu (Palatnik *et al.*, 2003), prodlužování buněk hypokotylu (Challa *et al.*, 2016) a větvení trichomů. (Vadde *et al.*, 2018)

Jeden z TCP transkripčních faktorů, TCP4, dokáže přímo aktivovat transkripci TCL1 a TCL2 tak, že se naváže v jejich upstream regulační oblasti a stimuluje jejich expresi (Obr. 8). (Vadde *et al.*, 2019)



Obr. 8 Schéma regulace TCL1, 2 pomocí TCP4. TCP4 se váže na upstream regulační oblast TCL a aktivuje jejich transkripci. TCL se následně váže na GL1, čímž znemožní navázání GL1 na iniciační komplex (MBW komplex) a nedojde tak k transkripci proteinu GL2. (Převzato z Vadde *et al.*, 2019)

2.2.6 Orthologní gen *CPR5*

CPR5, známý také pod názvem *HYS1*, je gen rostliny *Arabidopsis thaliana* kódující membránový protein, který hraje roli při odpovědi rostliny na patogeny, proliferaci buňky, růstu a smrti buňky (Perazza *et al.*, 2011; Kirik *et al.*, 2001).

Campbell *et al.* (2019) využili neutronového záření pro vnesení nové mutace do genomu za účelem získání fenotypu s krátkými trichomy a mohli tak dále najít gen zodpovědný za tento fenotyp. Genom mutantních rostlin byl následně mapován pomocí čipu SoySNP6k (Song *et al.*, 2013) obsahujícím 755 genů z genomu sóji získaných z referenční rostliny Williams 82 a2.v1, díky čemuž byly nalezeny delece způsobené ozářením v genomu pozorovaných rostlin. Kandidátním genem, jehož ztráta funkce by mohla způsobovat krátké trichomy, byl předpovězen gen nacházející se na chromozomu 6 – *Glyma.06g145800*, ortholog genu *CPR5* *A. thaliana*. (Campbell *et al.*, 2019)

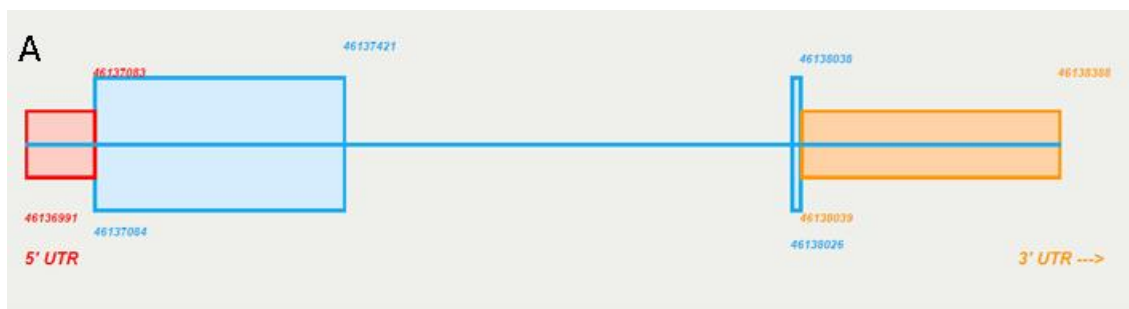
Pro ověření, zda daný gen skutečně ovlivňuje růst trichomů, byla provedena metoda CRISPR/Cas9. Jedná se o metodu genového inženýrství, díky které je možné modifikovat konkrétní geny u téměř jakéhokoliv organismu. (Cong *et al.*, 2013).

Campbell *et al.* (2019) za pomoci CRISPR/Cas9 ověřili, že gen *Glyma.06g145800* (nazvaný *GmCPR5*) se podílí na správném růstu a vývoji trichomů u sóji.

2.3 Protein podílející se na přenosu lipidů 1 (LTP1)

Předmětem této bakalářské práce je gen *Glyma.09G278000* (Obr. 9), který byl na základě podobnosti s geny *A. thaliana* anotován jako gen kódující nespecifický protein podílející se na přenosu lipidů 1 (LTP1) rodiny LTP (databáze SoyBase) a jeho 3D struktura byla predikována pomocí webové aplikace Phyre2 (Obr. 10). Podle databáze SoyBase by také tento gen mohl být inhibítorem proteas nebo proteinem, který se vyskytuje ve vyvíjejícím se semínku a slouží jako zásoba uhlíku, dusíku a síry (Krishnan a Coe, 2001).

Mutace genu *Glyma.09G278000* by mohla způsobovat variety s fenotypem bez trichomů, jelikož byla asociována pomocí metody GWAS-to-Genes (Škrabišová *et al.*, 2020). Tato mutace byla identifikována u variety bez trichomů USB-251 (PI 548178), jediné variety bez trichomů s celosekvenovaným genomem. V porovnání s referenční sekvencí genomu kultivaru sóji Williams 82 a2.v1 se na chromosomu 9 na nukleotidu 49336581 nachází mutace GCC>ACC, která způsobuje záměnu aminokyseliny alaninu na threonin (A25T).



B

```

ACCACATTCCAAAACACAAACACATACATTGTAGTACTCTTTGTCTCGGAATTTGTTCTTTGAGTTATGGCAAGCTTAAAGGTTGCATGTGTGGTTT
TGATGTGCATGGCTGTGATGAGTGCACCAATGATGGTGAAGCCGTGTCATGCAATGATGTTTCTGTGAACCTAGCACCGTGCCATCTTACCTGATGCA
GGGTGGAGATGTTCCAGAATCGTGCTGTAGCGGAGTGAGGAACATCTGGGTTCTGCCAGCACCACCTTGGACAAACAAACCCTGTGCAAAATGTCTTCAG
CAAGCTGCTAATAACTATGGCATCAACGACGAATACGCTCAGGCACCTCCCGCCCGCTGCAATGTCAGCGTCCCTTACAAGATCAGCCGATCCACCAACT
GCGACTCGTACGTTATTTTTTTCTATAAAACATTAATAATCTGACGAAATAATTTATATGTAATTTTAAAAAACATATCACATAAAATTCAGTGACACC
AGAATTAGTGAAGAAAAACAATTTTTTCTCACCAAATCAACATCTTGAATTTTTCACTTCATAATGTCATGTAGTAACAGCAAAAGCTATATTGGTAC
CTATAACTACCTTTTACCAAAAGTTACGTATGAATGATTTTAACTTTTAAATTGAGATGCTTTGGATTACAATTACATCTAACTTAATCCACGTTAAA
ATCAATTTACCATTCTCATGAGTTTTCGGTTTGTGAGATTGAAATTTGTAATTTACATTTTAAATGATTTTCAGTGCCTATCCAAACACAATCTAAGCA
ATCGGGTATAAGTACACAAAGAGAAGAGGCTAAAATAACCATATAAATCTTCGTATAATTCAAATTTATTTATTTTTTCGCTCTTGTGATAGAATTTAT
ATCTGTATATAAACGTTTATTAGCTGTGTTAAGAGAGAAAAACAATAGTGACAGATCGAAATGGTGATTATATGTTGAACCTTCGCGTGTGTTTTTTG
TAATGTTGACGATCAAGTTC TAAAGGAGCGGGTAGCTTTGCCAATTTCTCCGCGGGATAATGAGGCAACGTATGCTGTAACACTTGTATCGTTATCA
TTAAAATAAAAGAAAGCGAGTGTGACTCGGGTTCCACTCATGTGAGCCTGTTATTGATTAGTTTCTGTTTCAGATACTCTAGTCTTTGTGTTTTCGG
TGTGATTAATGATCTTAGTTGATTGTTGCTCGCAACAATTAATCACGTATTTGATATAATAAATCCAAGTACTTTGATTGTTGCATACCTTGTCTC
AAATCGTGTATTTATTTTCCAATATATTAGCTTATAAGAAAAAAAATCAATCTACTTTCATTTT

```

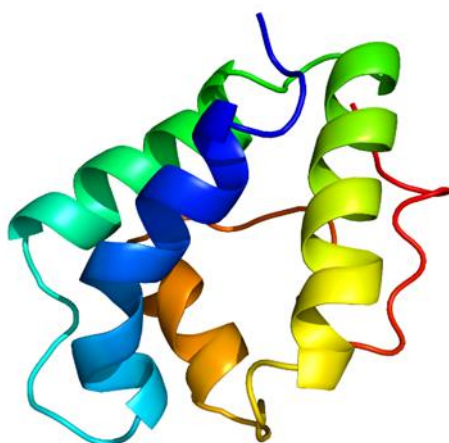
C

```

ATGGCAAGCTTAAAGGTTGCATGTGTGGTTTTGATGTGCATGGCTGTGATGAGTGCACCAATGATGGTGCAAG
CCGTGTCATGCAATGATGTTTCTGTGAACCTAGCACCGTGCCATCTTACCTGATGCAGGGTGGAGATGTTCCA
GAATCGTGCTGTAGCGGAGTGAGGAACATCTGGGTTCTGCCAGCACCACCTTGGACAAACAAACCCTGTGCA
AATGTCTTCAGCAAGCTGCTAATAACTATGGCATCAACGACGAATACGCTCAGGCACTCCCGCCCGCTGCAAT
GTCAGCGTCCCTTACAAGATCAGCCGATCCACCAACTGCGACTCCATCAAGTCTAA

```

Obr. 9 A: Schéma genu *Glyma.09G278000*. Červeně je zobrazena nepřekládaná 5' oblast (5' UTR), oranžově 3' nepřekládaná oblast (3' UTR), 2 modré rámečky označují exony (protein kódující oblast genu) a oblast mezi nimi je intron. (Převzato z SoyKB: Soybean Knowledge Base) B: Sekvence genu, první část (zelené zvýraznění) je nepřekládaná 5' oblast (5' UTR), modře (tmavě 1. exon, světle 2. exon) je zvýrazněna kódující oblast genu, bíle je zobrazen intron, fialově je zvýrazněna 3' nepřekládaná oblast (3' UTR). C: Kódující oblast genu (Coding Sequence, CDS), červeně je zobrazeno místo, kde mutací guaninu za adenin dochází k záměně alaninu za threonin.



Obr. 10 Schéma předpovězené 3D struktury proteinu podílejícího se na přenosu lipidů 1 (LTP1) kodovaného genem *Glyma.09G278000*. Predikce pomocí webové aplikace Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0, Kelley LA et al., 2015)

LTP jsou proteiny vyšších rostlin, u jednotlivých rostlin vykazují podobné vlastnosti. Jsou to rozpustné, bazické molekuly velké přibližně 9 kDa. Mají vysoký izoelektrický bod a jsou schopny vázat mastné kyseliny a přenášet fosfolipidy přes membrány *in vitro*. (Kader, 1975; Arondel a Kader, 1990)

Původně bylo předpokládáno, že se LTP nachází v cytoplazmě (Arondel a Kader, 1990), ovšem Thoma *et al.* (1993) lokalizovali LTP v buněčné stěně a kutikule všech typů buněk. U *A. thaliana* byl LTP nalezen ve všech buňkách epidermis: v květech, listech, stonku a řápíku; v buňkách epidermis kořene je také přítomen, ale v nižší koncentraci. V pozdějších studiích byl tento protein lokalizován jak v buněčné stěně, tak v cytoplazmě. Intracelulárně se protein nachází poblíže endoplazmatického retikula, dále ve vakuolách a vezikulách, což naznačuje možnost, že tyto proteiny jsou transportovány vně buňky právě pomocí vezikul. (Potocka *et al.*, 2012)

Bernhard *et al.* (1991) dále objevili signální sekvenci LTP o velikosti 26 aminokyselinových zbytků, která se ve finálním proteinu nevyskytuje, což je vlastnost příslušící právě membránovým proteinům a sekrečním proteinům.

Díky jejich zapojení do signálních drah se LTP uplatňují i v obraně a odpovědi rostliny na různé patogeny (Maldonado *et al.*, 2002; Sarowar *et al.*, 2009), při adaptaci rostliny na stresové podmínky, např. při nedostatku vody (Cameron *et al.*, 2006), při vysokých koncentracích kyseliny abscisové, salicylové a solí (Kim *et al.*, 2006).

Jeden z nespecifických LTP, AtLtpI-4I, je klíčový pro růst nádorů způsobovaných *Agrobacterium tumefaciens* u *A. thaliana*, jelikož usnadňuje přenos mastných kyselin s dlouhým řetězcem přes membránu a podílí se tak na formování suberinu, látky podobné vosku, který chrání nádory a zabraňuje ztrátám vody. (Deeken *et al.*, 2016; Efetova *et al.*, 2007).

LTP1 také hraje důležitou roli při ethylenové signalizaci – dokáže interagovat s jedním z pozitivních regulátorů (RTE1) receptoru pro ethylen, jednoho z fytohormonů, který je u rostlin zapojen do různých procesů během jejich růstu a vývoje. Samotný ethylen nebo jeho prekurzor, ACC (1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina), u etiolizovaných klíčících rostlin způsobuje inhibici růstu hypokotylu, prodlužování kořene, zvětšený apikální háček a silnější hypokotyl a kořen. Rostliny s inaktivovaným genem kódujícím LTP1 vykazují mnohem větší senzitivitu vůči ACC než rostliny normálně funkčním LTP1. (Wang *et al.*, 2016)

I přesto, že *Glyma.09G278000* byl díky podobnosti označen za LTP1, je také možné polemizovat nad jeho podobností s LTP6 *A. thaliana*, který je specificky exprimován v trichomech mladých listů (Chae *et al.*, 2010).

2.4 Whatman® FTA® karty

Whatman® FTA® karty slouží k rychlému a efektivnímu zachycení nukleových kyselin a jejich následnému skladování. Karty mohou být skladovány při pokojové teplotě po dobu několika let, aniž by došlo k poškození zachycené DNA. FTA karty jsou impregnovány chemikáliemi (společnost vyrábějící FTA karty, GE Healthcare, nezveřejňuje použité chemikálie), které způsobují lýzi buněk a denaturaci proteinů. Nukleové kyseliny jsou tak zachyceny a imobilizovány na kartě, jsou chráněny před UV zářením, nukleasami, oxidací, poškozením mikroorganismy. (de Vargas Wolfgramm *et al.*, 2008)

Po zachycení vzorku DNA (např. krev, sliny, pletivo rostlin) jsou karty ponechány při pokojové teplotě, aby došlo k zaschnutí vzorku a následně mohou být uchovány, přepraveny nebo zpracovány. Při využití vzorků pro PCR je z karet vyříznut malý disk se vzorkem a je promyt v mikrozkumavce dvěma pufrů – FTA čistícím činidlem, které může být nahrazeno TENT pufrém (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 12 mM NaCl, 2,5% Triton X-100, pH 8) a TE pufrém (10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, pH 8). Po uschnutí jsou k disku přidány roztoky pro PCR a provedena samotná PCR. (Thompson a Hrabak, 2018)

2.5 Endpoint PCR

Polymerasová řetězová reakce (PCR) je metoda, která se využívá k amplifikaci (vytvoření mnoha kopií) fragmentu DNA. Pro provedení PCR je potřeba templát DNA (fragment DNA pro amplifikaci), termostabilní DNA polymerasa, čtyři deoxyribonukleotidy (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 2 primery (krátké sekvence o velikosti přibližně 20 nukleotidů, které jsou komplementární k nukleotidovým řetězcům v i proti směru templátové DNA a fungují jako počátek syntézy DNA) a pufr pro zachování stabilního pH během reakce. (Boyer, 2012)

Při endpoint PCR dochází pouze k amplifikaci genu a následně je nutné provést elektroforézu pro analýzu produktu. (Schmittgen *et al.*, 2000)

2.5.1 Jednotlivé kroky PCR

PCR probíhá v mnoha cyklech, kdy každý z cyklů sestává ze tří fází – denaturace, annealing a elongace.

Ještě před prvním krokem dochází k tzv. iniciační denaturaci, která probíhá pouze před prvním cyklem po dobu 3-4 minut a zvyšuje efektivitu reakce. Pokud je termostabilní DNA polymerasa přidána do reakční směsi až po iniciační denaturaci, zvyšuje se tak její životnost. (Simon *et al.*, 1990)

Prvním krokem je denaturace, probíhá obvykle za teplot cca 95 °C po dobu 15 s až jedné minuty. Vysoká teplota způsobí rozpad vodíkových vazeb mezi vlákny DNA a vlákna se oddělí.

V druhém kroku je teplota snížena na přibližně 37-55 °C, což umožňuje nasednutí primerů na 3' konce vláken DNA dle komplementarity bází. Simon *et al.* (1990) uvádí možné použití až 72 °C při annealing fázi. Větší teploty zajistí větší specifitu primerů a sníží možnost navázání na špatný region DNA. Do reakční směsi se přidává nadbytek primerů, aby byla podpořena hybridizace a nedošlo k opětovnému spojení jednotlivých vláken DNA.

Třetím krokem je elongace, kdy dochází k syntéze nových, komplementárních vláken DNA. Reakce je katalyzována enzymem DNA polymerasa, který zajišťuje přidávání jednotlivých nukleotidů k primerům na základě komplementarity s původním vláknem. Teplota při této fázi je zvýšena na 72 °C a obvykle probíhá po dobu 30 s.

Dané tři kroky jsou opakovány v několika cyklech (obvyklý počet cyklů je 20-30) a na závěr je provedena finální elongace, která trvá přibližně 5 minut a umožňuje

dokončení syntézy nekompletních amplikonů. (Lorenz, 2012; Boyer, 2012; Mullis *et al.*, 1986)

2.6 Agarosová elektroforéza

Elektroforéza je analytická metoda, která umožňuje zkoumat pohyb nabitých molekul v elektrickém poli a jejich separaci. Pro separaci proteinů a nukleových kyselin se nejvíce využívají gely tvořené makromolekulárními látkami, např. agarosou. (Boyer, 2012)

Gel je připraven rozpuštěním agarosy v zahřátém elektroforetickém pufru. Nejčastěji se připravují gely s obsahem agarosy 0,5-2 %. Po jeho ztuhnutí jsou do jamek, připravených hřebínkem, napipetovány vzorky a gel je vložen do elektroforetické cely a přidán pufr. Pro vizualizaci nukleových kyselin se používá barvivo (např. ethidiumbromid, GelRed a GelGreen), do kterého může být gel ponořen po proběhnutí elektroforézy nebo může být barvivo přidáno do samotného gelu. Migrace nukleových kyselin v agarosovém gelu závisí na procentuálním obsahu agarosy v gelu, na přidaných barvivech, na velikosti a konformaci fragmentu DNA a na použitém napětí. (Boyer, 2012; Aaij a Borst, 1972)

2.7 Sangerova metoda sekvenování DNA

Sekvenování DNA slouží ke zjištění pořadí nukleotidů ve vláknech DNA. Pro účely této bakalářské práce byla využita Sangerova metoda sekvenování DNA, která k terminaci řetězce využívá dideoxynukleotidů (ddNTP).

V reakční směsi jsou kromě ddNTP přítomny také jednotlivé deoxyribonukleotidy (dNTP), DNA polymerasa a primery. Po navázání primerů na templát DNA polymerasa syntetizuje nové vlákno přidáváním dalších dNTP dokud nedojde k přidání ddNTP. Jelikož ddNTP neobsahují ani jednu hydroxy skupinu, není možné navázání dalšího nukleotidu, proto dojde k ukončení řetězce. Výsledkem reakce jsou různě dlouhé oligonukleotidové řetězce, lišící se velikostně jedním nukleotidem, které jsou poté analyzovány pomocí PAGE (elektroforéza na polyakrylamidovém gelu) nebo kapilární gelové elektroforézy. Fragmenty jsou značeny chemiluminiscenčně nebo ^{32}P . (Boyer, 2012; Sanger *et al.*, 1977; Dovichi, 1997)

2.8 Metoda asociace fenotypu na genotyp (GWAS)

GWAS je statistická analýza využívající se k detekci asociace mezi genetickou variabilitou a fenotypy zkoumaného znaku v populaci. Nejčastěji se používá za účelem

identifikace jednonukleotidových polymorfismů (SNPs), které vznikají mutací jednoho nukleotidu a můžou být zodpovědné za variabilitu ve funkčnosti proteinů podmiňující určitý fenotyp.

V této bakalářské práci bylo pracováno s daty z celogenomového sekvenování (WGS, whole-genome sequencing), což znamená, že pokud se v genomu nachází SNP, je možno jej díky sekvenování nalézt.

Pomocí této metody již byly asociovány SNP s několika lidskými chorobami, např. diabetes II. typu, Parkinsonova choroba, revmatoidní artritida, schizofrenie, ale využívá se i u rostlin pro hledání genů způsobujících různé fenotypové varianty. (Farrell, 2017; Visscher *et al.*, 2017) U sóji bylo touto metodou identifikováno mnoho fenotypů agronomicky důležitých znaků (například Bandillo *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2017).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Použité chemikálie

- Ethylendiamintetraoctová kyselina (Fluka, Česká republika)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, Německo)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2 Použité přístroje a vybavení

- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Digitální pH metr (InoLab, Německo)
- Elektroforetická cela (Bio-Rad USA)
- Elektromagnetická míchačka (Biosan, Lotyšsko)
- Gel Doc EZ systém (BioRad, Německo)
- Chlazená centrifuga 5424 R (Eppendorf, Německo)
- Mikrodestičkový spektrofotometrický reader Synergy H1 (Biotek, USA)
- Mikroskop Olympus BX50 (Olympus Optical, Japonsko)
- Předvážky (KERN, Německo)
- Stereomikroskop STM PRO (BEL Engineering, Itálie)
- Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

3.1.3 Použité roztoky

- Tris-acetát-EDTA (TAE) pufr (0,04 M Tris-kyselina octová, 0,001 M EDTA, pH 8,3).
- TENT pufr (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 12 mM NaCl, 2,5% Triton X-100, pH 8)
- TE pufr (10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, pH 8)

3.1.4 Reagencie pro molekulární biologii

- 5mM dNTP (Thermo Scientific, USA)

- Barvivo GelRed® (Biotinum, USA)
- Hmotnostní standard GeneRuler 1kb DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
- iProof™ High-Fidelity DNA polymerasa (BioRad, Německo)
- iProof™ High-Fidelity pufr (BioRad, Německo)
- Nanášecí pufr – 6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific, USA)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Německo)
- Primery Gm09G278000fw a Gm09G278000fw (Sigma-Aldrich, USA)
- Whatman® FTA® Cards (Sigma-Aldrich, USA)
- Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systém (Promega, USA)

3.1.5 Použitý biologický materiál

Při experimentech bylo používáno 147 variet sóji luštinaté (*Glycine max (L.) Merr.*) z kolekce USDA Soybean Germplasm Collection (GRIN, Urbana, IL), přičemž 56 variet bylo v databázi uvedeno jako variety bez trichomů a 91 variet s trichomy. Semínka všech variet byla vysázena do květináčů se standardním výsevným substrátem a kultivována ve fytotronu při intenzitě osvětlení 16 hodin při 24 °C/25 °C a 8 hodin ve tmě při 18 °C.

Rostliny byly zalévány 3x do týdne po dobu dvou týdnů, následně byly odebrány vzorky DNA pomocí Whatman® FTA® karet a rostliny byly přeneseny do laboratoře, kde byly dále kultivovány za standardních laboratorních podmínek a dále použity pro další experimenty.

3.2 Experimentální metody

3.2.1 Pozorování trichomů

U variet bez trichomů (24 dní po výsevu) byla nejprve odstraněna kutikula listu pomocí lepící pásky, poté byl list pozorován pod mikroskopem Olympus BX50 s digitální kamerou DP-70 za účelem zjištění, zda se pod kutikulou nachází malé trichomy. Byly použity objektivy 10x a 20x, výsledné zvětšení 100x a 200x. Za pomoci softwaru DP Controller v. 2.3.1 (Olympus Optical, Japonsko) byly pořízeny fotografie.

Dále byl také ověřen fenotyp u variet s trichomy a pozorována hustota trichomů. Informace byly zaznamenány do tabulky a srovnány s fenotypy uvedenými v databázi U.S. National Plant Germplasm System. Následně byl fenotyp ověřen za využití stereomikroskopu STM PRO s digitální kamerou, zvětšení 25x. Za pomoci software WaveImage (BEL Engineering, Itálie) byly pořízeny fotografie a posléze určena

průměrná délka trichomů jednotlivých kultivarů pomocí měřítka. Na základě zjištěného fenotypu variet s trichomy bude v další práci provedena GWAS analýza za účelem identifikace kandidátních genů.

3.2.2 Sběr vzorků DNA

Ke sběru DNA byly použity FTA karty. Od všech kultivarů sóji byl odebrán list a byl vložen na filtrační papír v FTA kartě tak, aby spodní strana listu směřovala nahoru. Karta byla uzavřena a bylo na ni z horní strany přitlačeno, aby biologický materiál přešel do filtračního papíru. Zbytek listu byl odstraněn za pomoci pinzety, která byla mezi jednotlivými odběry očištěna, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Získané vzorky byly poté ponechány uschnout a byly skladovány v papírových sáčcích po celou dobu experimentu při teplotě přibližně 22 °C.

3.2.3 Příprava vzorků pro endpoint PCR

Z FTA karet byl skalpelem vyříznut disk o průměru přibližně 1 mm. Disk byl vložen do mikrozkuhavky a za pomoci automatické pipety byl promyt 3x 100 µl TENT pufru a 2x 100 µl TE pufru, přičemž po každém promytí byl použitý roztok vylit do odpadu. Disk byl následně ponechán v digestoři schnout po dobu 30 minut až jedné hodiny.

3.2.4 Endpoint PCR

K suchému disku v mikrozkuhavce byly přidány roztoky pro endpoint PCR pro amplifikaci genu *Glyma.09G278000* (očekávaná délka produktu PCR daná použitými primery – 1072 bp) podle tabulky 2, použité primery jsou uvedeny v tabulce 1. Na obrázku 11 je zobrazeno schéma genu s vyznačenými místy, kde nasedají primery.

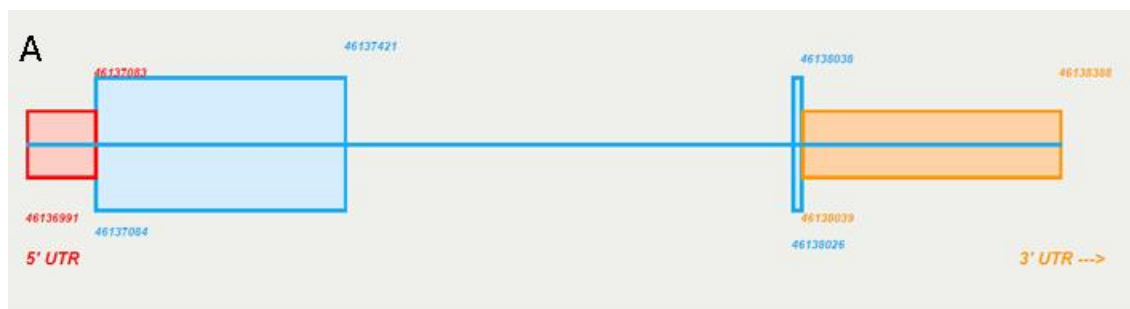
Připravená reakční směs v mikrozkuhavkách byla vložena do přístroje, na kterém byly nastaveny parametry uvedené v tabulce 3 a byla spuštěna reakce. Počet cyklů PCR byl 30.

Tab. 1 Primery použité při PCR, jejich sekvence, teplota tání (T_m), délka primeru (NTP) a obsah guaninu a cytosinu (GC)

Primer	Sekvence (5' → 3')	T _m (°C)	Délka (NTP)	Obsah GC (%)
Gm09G278000fw	CCACATTCCAAAA CACAAACACATA	58,95	25	36,00
Gm09G278000rev	ACGTTGCCTCATT ATCCCGC	60,81	20	55,00

Tab. 2 Objemy jednotlivých roztoků použitých v reakční směsi pro endpoint PCR

Roztok	Objem (μl)	Výsledná koncentrace
iProof High-Fidelity pufr	10	1x
Mix dNTP	2	200 μM (každý dNTP)
Fw primer	1	0,5 μM
Rev primer	1	0,5 μM
Sterilní diH ₂ O	35,75	
iProof High-Fidelity DNA polymerasa	0,25	0,02 U/μl
Celkový objem	50	



B

```

ACCACATTCCCAAAACACAAAACACATACATTGTAGTATCACTTTTGTCTCGGAATTTGTTCTTTTGAGTTAT
GGCAAGCTTAAAGGTTGCATGTGTGGTTTTGATGTGCATGGCTGTGATGAGTGCACCAATGATGGTGCAAG
CCGTGTCATGCAATGATGTTTCTGTGAACCTAGCACCGTGCCTATCTTACCTGATGCAGGGTGGAGATGTT
CCAGAATCGTGCTGTAGCGGAGTGAGGAACATTCTGGGTTCTGCCAGCACCACTTTGACAAAACAAACCGT
GTGCAAATGTCTTCAGCAAGCTGCTAATAACTATGGCATCAACGACGAATACGCTCAGGCACTCCCCGCC
GCTGCAATGTCAGCGTCCCTTACAAGATCAGCCGATCCACCAACTGCGACTCGTACGTTATTTTTTTCTTA
TAAAACATTAAAATTACTGACGAAATAATTTATATGTAATTTTAAAAACATATCACTAAAATTCAGTGAC
ACCAGAATTAGTGAAAGAAAAACAATTTTTTCTCACCAATCAACATTCTTGAATTTTTCACTTCATAAT
GCATGTAGTAACCAGCAAAGCTATATTGGTACCTATAACTACCTTTTACCAAAGTGTACGTATGAATGA
TTTTAACTTTTAAFTGAGATGTCTTTGGATTACAATTACATCTAACTTAATCCACGTTAAAATCAATTTAC
CATTCTCATGAGTTTTCGGTTTGTGAGATTGAAATTTGTAATATTACATTTTAAATGTATTTTTCAGTGCCTA
TCCAAACACAATCTAAGCAATCGGGTATAAGTACACAAAGAGAAGAGGCTAAAATAACCATATATAATCTT
CGTATAATTCAAATTTATTTATATTTTTCGCTCTTGTGATAGAATTATTATCTGTATATAAACGTTTATTAG
CTGTGTTAAGAGAGAAAAACAATAGTGACAGATCGAAAATGGTGATTATATGTTGAACTTCGCGTGCTTGT
TTTTTGTAATGTTGCAGCATCAAGTTCTAAAGGAGCGGGTAGCTTTGCCAATTTCTTCCGCGGGATAATGA
GGCAACCGTATGCTGTAACACTTGTATCGTTATCATTAAAATAAAAGAAAGCGAGTGTGACTCGGGTTCCA
CTCATGTGAGCCTGTTATTGTATTAGTTTCTGTTTCAGATACTCTCTAGTCTTTGTTGTTTCGGTGTGATT
AAATGTATCTTAGTTGATTGTTGCTCGCAACAATTAATCACGATTTTGATATAATAATCCAAGCTACTTT
GATTGTTGCATACCTTGTCTCAAATCGTGTTATTTTTATTTTCCAATATATTTAGCTTATAAGAAAAAAA
AATCAATTCTACTTTCATTTT

```

Obr. 11 Schéma genu *Glyma.09G278000*. A: Červeně je zobrazena nepřekládaná 5' oblast (5' UTR), oranžově 3' nepřekládaná oblast (3' UTR), 2 modré rámečky označují exony (protein kódující oblast genu) a oblast mezi nimi je intron. (Převzato z SoyKB: Soybean Knowledge Base) B: Sekvence genu, první část (zelené zvýraznění) je nepřekládaná 5' oblast (5' UTR), modře (tmavě 1. exon, světle 2. exon) je zvýrazněna kódující oblast genu, bíle je zobrazen intron, fialové je zvýrazněna 3' nepřekládaná oblast (3' UTR), žluté jsou zvýrazněna místa, kde nasedají primery, tučně červeně je zobrazeno místo mutace.

Tab. 3 Použité teploty a časy při jednotlivých fázích Endpoint PCR

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Iničiační denaturace	98	30	1
Denaturace	98	10	
Annealing	67	20	30
Elongace	72	30	
Finální elongace	72	300	1

3.2.5 Elektroforéza v agarosovém gelu

Byla provedena elektroforéza v 0,8% agarosovém gelu pro ověření amplifikace genu *Glyma.09G278000* (velikost 1072 bp).

Gel byl připraven rozpuštěním 0,8 g agarosy ve 100 ml Tris-acetát-EDTA (TAE) pufru (0,04 M Tris-kyselina octová, 0,001 M EDTA, pH=8,3), pro vytvoření jamek byl použit hřebínek. Po ztuhnutí byl gel přenesen do vodivostní cely, ta byla následně naplněna TAE pufrem a do jamek na gelu byly nanесeny vzorky amplifikované DNA smíchané s nanášecím pufrem (6x DNA Gel Loading Dye) v poměru 5:1 (5 µl vzorku a 1 µl nanášecího pufru). Jako hmotnostní standard byl použit GeneRuler 1kb DNA ladder. Vodivostní cela byla připojena ke zdroji napětí a byla zahájena elektroforéza, která probíhala po dobu 40 minut při 80 V.

Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen do barviva GelRed® a ponechán na třepačce po dobu 15 minut. Gel byl poté vizualizován pomocí přístroje Gel Doc™ EZ Imager (BioRad) za použití programu Image Lab Software.

3.2.6 Přečištění produktu PCR

Pro přečištění amplifikované DNA byly použity 2 sety. První set (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) byl použit na přečištění 25 vzorků a po jeho spotřebě byl používán set Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up. Veškeré roztoky, kolony a mikrozkuřavky byly součástí setu. Centrifuga byla nastavena na teplotu -4 °C.

3.2.6.1 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

K produktu PCR bylo přidáno stejné množství roztoku Membrane Binding Solution (MBS). Do mikrozkuřavky byla vložena kolonka se silikátovým nosičem a byl do ní napipetován PCR produkt s přidáním roztokem. Směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty. Následně byla kolonka v mikrozkuřavce vložena do centrifugy a centrifugována při 16 000 g 1 minutu. Filtrát byl z mikrozkuřavky odlit do odpadu. Do kolonky s DNA navázanou na silikátový nosič bylo poté přidáno 700 µl promývacího roztoku Membrane Wash Solution (MWS) a opět byla centrifugována při 16 000 g 1 minutu. Filtrát byl vylit, bylo přidáno 500 µl promývacího roztoku a centrifugováno při 16 000 g po dobu 5 minut. Filtrát byl opět vylit a byla provedena poslední centrifugace, aby byly odstraněny zbytky promývacího roztoku. Kolonka byla poté přenesena do mikrozkuřavky (1,5 ml) a bylo do ní napipetováno 50 µl vody neobsahující nukleasu. Po inkubaci trvající 1 minutu byla provedena centrifugace při 16 000 g po dobu 2 minut. Kolonka byla vyhořena a přečištěný PCR produkt byl uchován v mikrozkuřavce.

3.2.6.2 Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up

Ke každému vzorku byl přidán roztok NT1 ve dvojnásobném množství. Vzorky s roztokem byly následně přepipetovány do kolonky, která byla vložena do mikrozkušavky. Byla provedena centrifugace (11 000 g, 30 s), filtrát byl vylit a do kolonky bylo přidáno 700 µl roztoku NT3 a znovu centrifugováno jako v předchozím kroku. Po vylití druhého filtrátu byla provedena znovu centrifugace po dobu 1 minuty, aby došlo k odstranění zbytků NT3 roztoku. V dalším kroku byla kolonka vložena do čisté mikrozkušavky a bylo do ní napipetováno 15 µl NE pufru. Po inkubaci po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě byla provedena centrifugace 1 minutu (11 000 g), kolonka byla vyhozena a přečištěný PCR produkt byl uchován v mikrozkušavce.

3.2.7 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Pro sekvenaci genu *Glyma.09G278000* Sangerovou metodou bylo třeba nejprve určit koncentraci DNA ve vzorku. Pro změření koncentrace bylo použito mikrodestičkového readeru Synergy H1 a softwaru Gen5 3.06 (Biotek, USA), ve kterém byl zvolen program kvantifikace nukleových kyselin pro dvouvláknovou DNA.

Do jamek na destičce bylo napipetováno po 1 µl vzorku a byla měřena absorbance vzorků proti blanku (destilovaná voda).

3.2.8 Sekvenování Sangerovou metodou

Po zjištění koncentrace byly vzorky připraveny na sekvencování, které bylo provedeno firmou SEQme (SEQme s.r.o., Dobříš, Česká Republika). Bylo odebráno 5 µl vzorku a přidáno 5 µl 5 µM roztoku forward primeru, přičemž množství PCR produktu v 5 µl vzorku muselo být přibližně 200 ng. Pokud se množství lišilo, byl upraven poměr vzorek:primer. Takto připravené vzorky byly odeslány na sekvenování.

3.2.9 Analýza výsledků pomocí programu BioEdit

Sekvence všech vzorků byly vloženy do programu BioEdit v. 7.2.5 (Hall *et al.*, 1999) a porovnány pomocí algoritmu ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), který seřadil všechny sekvence dle podobnosti a díky použití referenční sekvence (kultivar Williams 82 a2.v1) bylo možné detekovat mutaci Chr09: 49336581 GCC>ACC (A25T) identifikovanou u variet s fenotypem bez trichomů USB-251 (PI 548178).

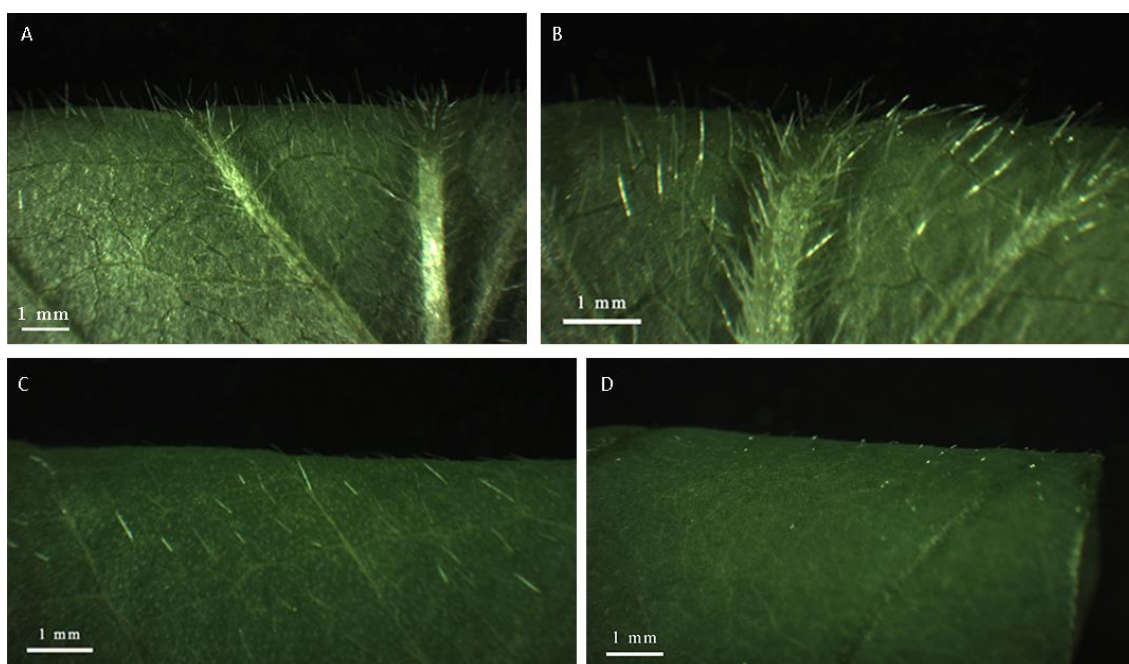
Predikovaná 3D struktura byla dodána vedoucí práce.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

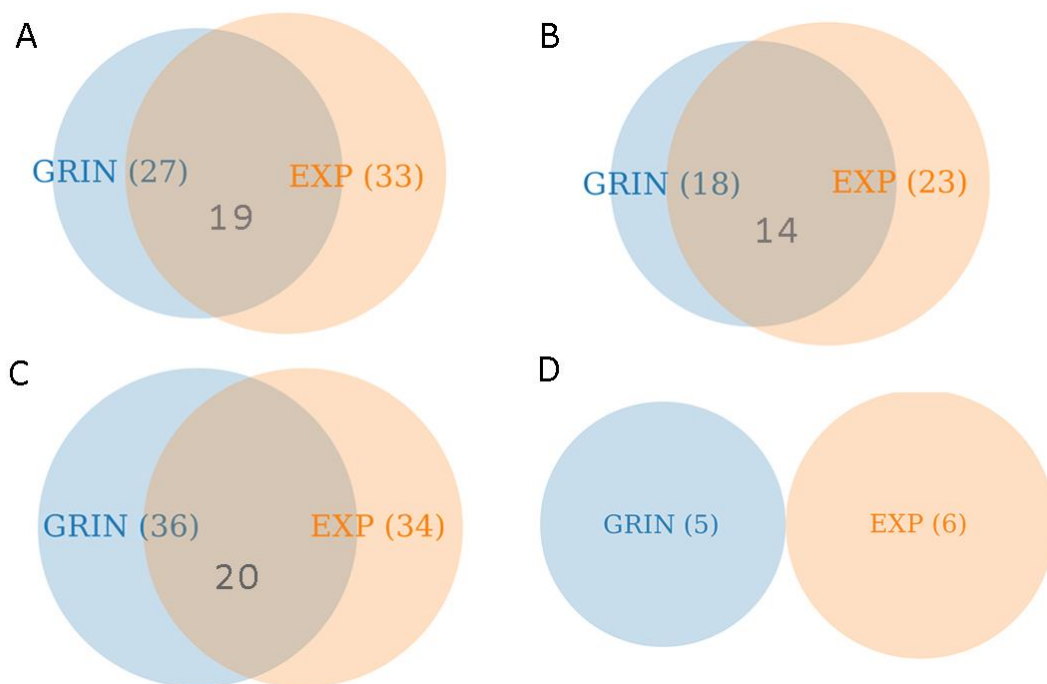
4.1 Ověření fenotypu variet s trichomy

U vybraných variet s trichomy byl ověřen fenotyp (Obr. 12; Příloha 2) a porovnán s údaji uvedenými v databázi GRIN (Obr. 13). U 5 kultivarů nebyl v databázi uveden fenotyp, u všech pěti se však povedlo fenotyp experimentálně zjistit. Nebylo možné ověřit fenotyp u 6 kultivarů z důvodu, že se nepodařilo tyto rostliny vypěstovat ani po opakovaném nasazení. Fenotypy všech kultivarů jsou uvedeny v Příloze 1.

V kolekci USDA Soybean Germplasm Collection se nachází variety, který mají sekvenovaný již celý genom, tudíž s využitím těchto dat a experimentálně zjištěných fenotypů bude v návaznosti na tuto bakalářskou práci provedena GWAS a budou tak správně asociovány regiony v genomu ke správným fenotypům.



Obr. 12 Fenotypy trichomů. A: vzpřímený fenotyp, B: částečně přilehlý fenotyp, C: přilehlý fenotyp, D: krátké trichomy. Zvětšení 25x. Fotografie všech variet jsou uvedeny v Příloze 2.



Obr. 13 Grafické porovnání fenotypů uvedených v databázi (GRIN) a experimentálně zjištěných fenotypů (EXP). A: vzpřímené trichomy, B: přilehlé trichomy, C: částečně přilehlé trichomy, D: nebyl zjištěn fenotyp.

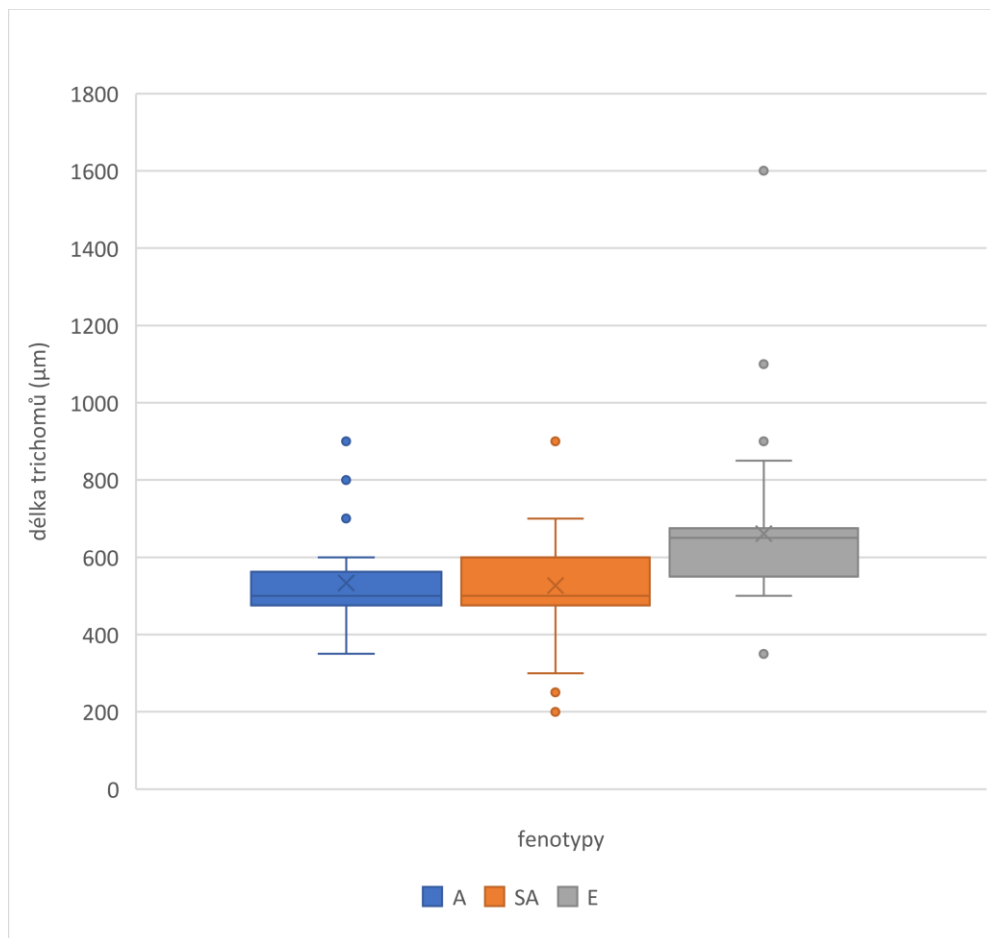
V kategorii variet se vzpřímenými trichomy bylo špatně charakterizováno 22,2% variet, pro kategorii variet s přilehlými trichomy byl procentuální podíl špatně charakterizovaných variet také 22,2%. Pro kategorii s částečně přilehlými trichomy bylo špatně charakterizováno 44,4%, což je skoro polovina pozorovaných variet. Tato skutečnost může být dána tím, že částečně přilehlý fenotyp je často zaměňován za fenotyp vzpřímený nebo přilehlý. Chyby v charakterizaci fenotypu pak měly nejspíš za následek chyby v asociaci, které byly doposud provedeny a u kterých byly použity informace právě z databáze GRIN (Bandillo *et al.*, 2017).

Alely, které jsou momentálně asociované se sklonem trichomů se nachází na chromosomu 12 (alela *Pal/pal*) a na chromosomu 13 (alela *Pa2/pa2*) (Bandillo *et al.*, 2017; Gilbert, 2017).

4.2 Délka trichomů

Průměrná délka trichomů u kultivarů s přilehlými trichomy byla $0,53 \pm 0,14$ mm, u částečně přilehlého fenotypu $0,52 \pm 0,14$ mm a u vzpřímeného fenotypu $0,65 \pm 0,22$ mm. Nejdelší trichomy byly pozorovány u kultivaru PI 548520 se vzpřímeným typem trichomů, jejichž délka byla v průměru 1,6 mm. Naopak nejkratší trichomy byly pozorovány u kultivaru PI 342434 s částečně přilehlým typem trichomů. Obecně byly

kratší trichomy pozorovány u přilehlého a částečně přilehlého fenotypu. Pro lepší zobrazení zastoupení délek trichomů byl vytvořen krabicový graf (Obr. 14) Kromě délky trichomů byla dále pozorována jejich hustota (hustý, normální a řídký porost trichomů), tato pozorování spolu s délkami trichomů pro každou varietu jsou uvedeny v Příloze 1.



Obr. 14 Krabicový graf zobrazující délku trichomů u variet s trichomy pro přilehlé trichomy (A), částečně přilehlé trichomy (SA) a vzpřímené trichomy (E). Křížek v grafu značí průměrnou hodnotu, čára střední hodnotu, samostatné body jsou odlehle hodnoty.

4.3 Pozorování krátkých trichomů u variet s fenotypem bez trichomů

Pod mikroskopem byly u 35 variet původně označených jako bez trichomů pozorovány velmi krátké trichomy (velikost přibližně 0,1 mm – vzorek č. 36, PI 547502), které byly tvořeny 1-2 buňkami a pouhým okem byly sotva viditelné (Obr. 15).

Campbell *et al.* (2019) našli na chromosomu 6 gen *GmCPR5*, který se podílí na správném růstu a vývoji trichomů u sóji a při jeho mutaci měly rostliny fenotyp s krátkými trichomy. Tato mutace byla však do genomu vnesena ozářením a nevyskytuje se u přirozených variet.

Singh *et al.* (1971) pozorovali u variety s fenotypem bez trichomů USB-251 (PI 548178), který byl připraven uměle mutagenézí, „pahýly“, které byly tvořeny 1-7 stejně velkými buňkami, po čase ale tyto trichomy odpadly. Zároveň také pozorovali pubertální typ trichomů, které odpadají později a jsou delší než „pahýly“ u variet bez trichomů.

V této bakalářské práci však byly pozorovány veškeré možné přirozené variety původně označené jako variety bez trichomů. Krátké trichomy, které byly pozorovány u 35 variet původně označených jako bez trichomů, se podobaly spíše právě pubertálnímu typu trichomů, které pozorovali Singh *et al.*, (1971). Jelikož byl tento fenotyp pozorován na více varietách, není možné, že by došlo k omylu. U variety USB-251 (PI 548178) nebyly v této bakalářské práci experimentálně pozorované žádné trichomy, je tedy možné, že v době pozorování již došlo k jejich odpadnutí, což mohl být i případ zbylých variet, u kterých žádné trichomy pozorovány nebyly. Na druhou stranu, tato pozorování byla prováděna u mladých rostlin, u kterých by se trichomy v této době stále ještě vyskytovat měly, otázkou tedy je, jak brzy tyto trichomy odpadají, pokud vůbec vyrostou.

Rostliny nebyly kultivovány až do doby jejich kvetení, je proto možné, že později mohlo dojít k odpadnutí trichomů i u variet, u kterých byly krátké trichomy pozorovány.

62,5% procent z variet, které byly označeny za variety bez trichomů, tak ve skutečnosti trichomy měly a toto nesprávné zařazení mohlo mít za následek chyby v asociaci pomocí GWAS (Bandillo *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2017). Kromě USB-251 nebyla doposud sekvenována žádná z variet bez trichomů, jejich sekvenování je však v přípravě a v budoucnu bude provedena asociace pomocí GWAS s nově charakterizovanými fenotypy.

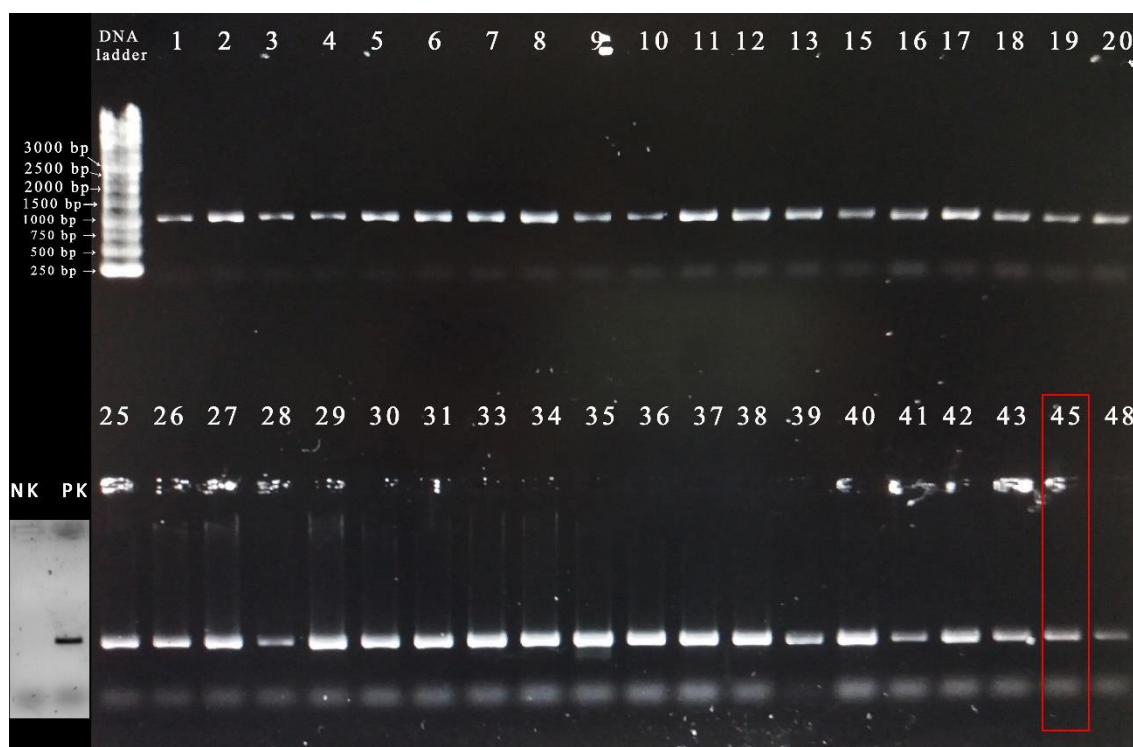


Obr. 15 Detail krátkých trichomů pod mikroskopem. A: pozorování dvou buněk, použité zvětšení 200x. (Varieta č. 40, PI 547738) B: Pozorování jedné buňky, použité zvětšení 100x a 200x. (Varieta č. 22, PI 437733)

4.4 Ověření amplifikace části genu *Glyma.09G278000*

Pro ověření identifikované mutace u variety bez trichomů USB-251 (PI 548178) a také u ostatních variet s fenotypem bez trichomů bylo třeba nejprve amplifikovat oblast genu obsahující mutaci. Byla provedena PCR a vzorky byly analyzovány pomocí elektroforézy na agarosovém gelu. Podle výsledků elektroforézy odpovídaly amplifikované fragmenty jednotlivých variet bez trichomů očekávané velikosti PCR produktu dané použitými primery (cca 1000 bp) (Obr. 16).

Amplifikované fragmenty jednotlivých variet bez trichomů měli podle výsledku elektroforézy stejnou velikost, stejně jako pozitivní kontrola s normální délkou trichomů (varieta č. 79, FC 33243), z čehož vyplývá, že u variet bez trichomů nedošlo v této oblasti genu k větším insercím nebo delecím. Variety, se kterými bylo pracováno, pocházeli z různých geografických míst (viz Příloha 1: Tab. 2), existovala tedy možnost, že při jejich zdomácnění se mohlo vytvořit a zafixovat více různých mutací způsobujících daný fenotyp.



Obr. 16 Výsledek elektroforézy na agarosovém gelu pro 39 vzorků variet bez trichomů. U standardu (DNA ladder) jsou vyznačeny velikosti jednotlivých fragmentů DNA, čísla jsou označeny jednotlivé vzorky (příslušná PI čísla vzorků jsou uvedena v Příloze 1). V červeném rámečku (vzorek č. 45) je vyznačen výsledek pro variety bez trichomů USB-251 (PI 548178). Vzorky, u kterých nebyly pozorovány krátké trichomy: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 16, 18, 34, 41, 48. U ostatních vzorků byly experimentálně pozorovány krátké trichomy. NK značí negativní kontrolu (namísto gDNA byla použita voda) a PK pozitivní kontrolu (varieta č. 79 s normální délkou trichomů, FC 33243)

4.5 Koncentrace vzorků

Vzorky byly následně přečištěny od PCR reagensí pomocí kitů Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systém a Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up a byla změřena koncentrace pomocí mikrodestičkového readeru. Koncentraci bylo nutno znát pro přípravu roztoků k sekvenování.

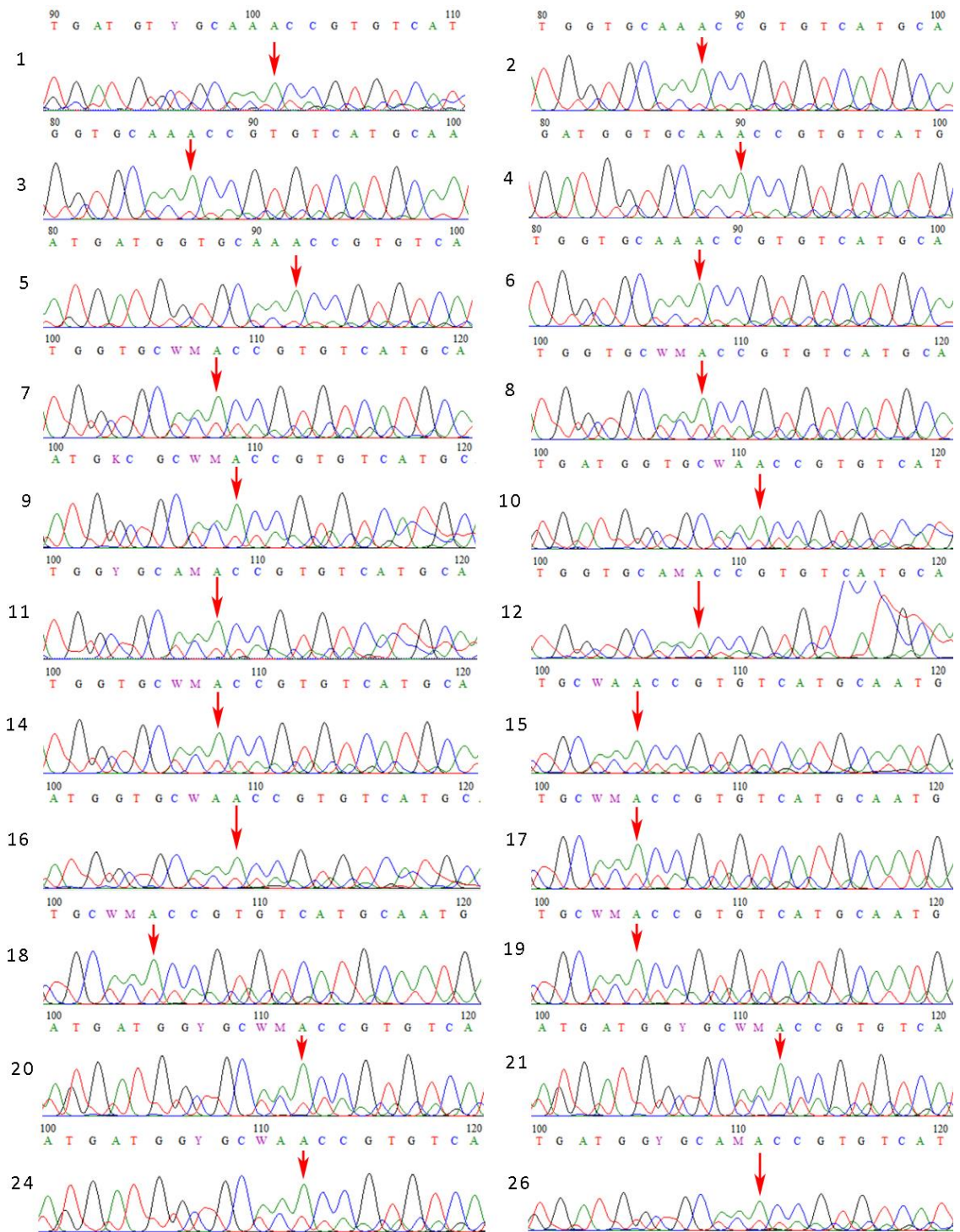
Mezní koncentrace pro PCR produkt o velikosti >1000 bp byla 200 ng v celkovém objemu 10 μ l, průměrná koncentrace naměřená pomocí mikrodestičkového readeru byla 55,77 ng/ μ l. Po naředění vzorků odpovídajícím množstvím forward primeru byly vzorky sekvenovány u firmy SEQme.

4.6 Sekvence genu *Glyma.09G278000*

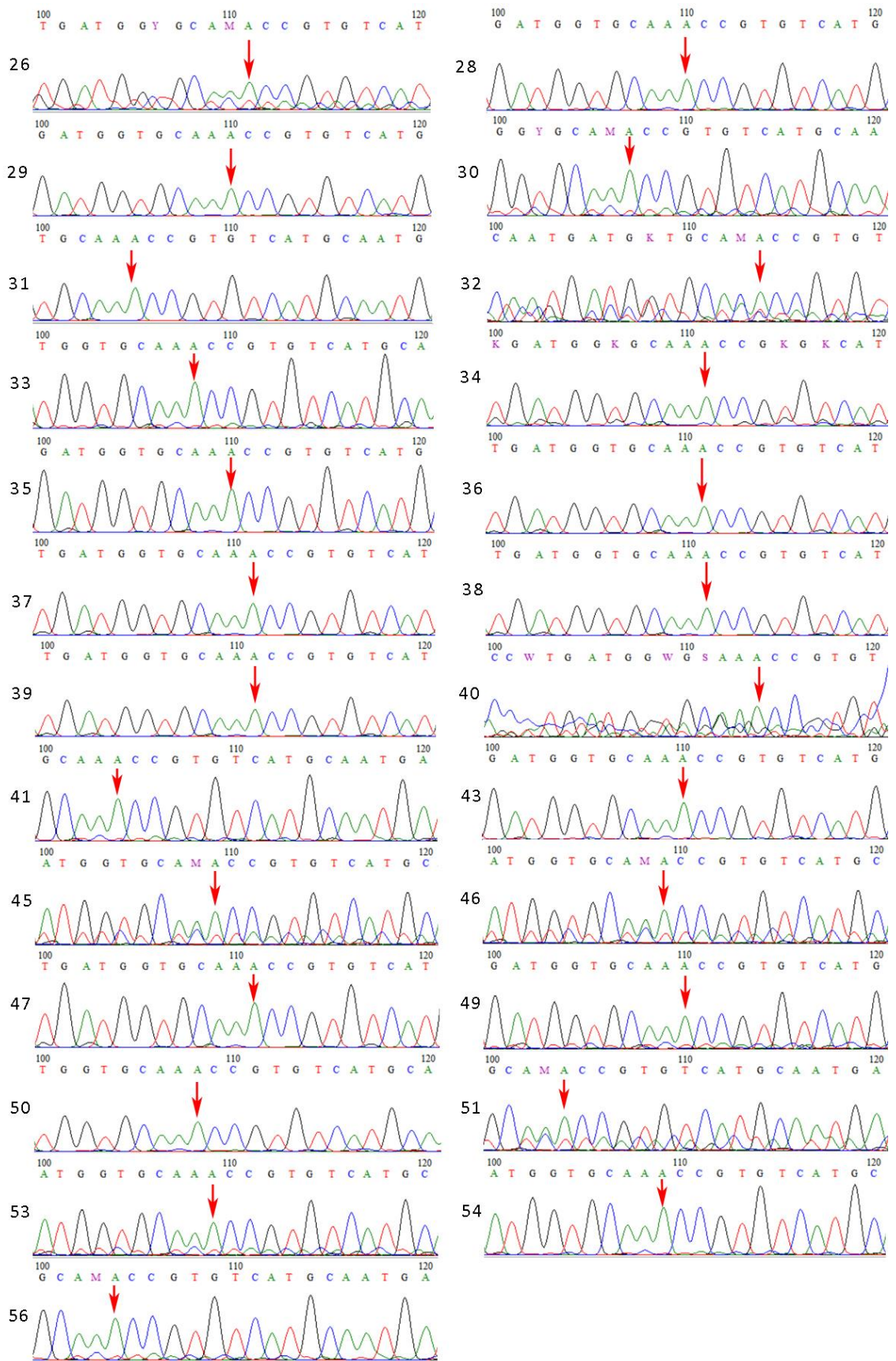
Pro potvrzení mutace GCC>ACC (A25T) genu *Glyma.09G278000* na chromosomu 9 bylo třeba provést sekvenování, které zajistila firma SEQme z poskytnutých PCR produktů. U 48 z 56 vzorků sóji (Obr. 17, Obr. 18) byla potvrzena přepokládaná mutace GCC>ACC na 25. kodonu genu *Glyma.09G278000*, která byla již v předchozích studiích nalezena u variety sóji bez trichomů USB-251 (PI 548178). U ostatních kultivarů nebyly výsledky sekvenace přesné, a proto se nedalo s jistotou říci, že u těchto rostlin došlo k mutaci. Tyto variety však byly sekvenovány opakovaně nad rámec této práce a byla u nich potvrzena přítomnost stejné mutace.

Bandillo *et al.* (2017) našli pomocí metody GWAS možnou mutaci (SNP) na chromosomu 9, která korespondovala s umístěním alely *Pl/p1*, kterou Bernard a Singh (1969) označili za alelu způsobující variety s fenotypem bez trichomů. Při porovnání výsledků sekvenování nebyla nalezena žádná jiná mutace (SNP), která by se vyskytovala u více variet. Dá se tak s jistotou říci, že tato mutace GCC>ACC (A25T) je odpovědná za variety s fenotypem bez trichomů, otázkou ovšem zůstává, jakým způsobem dochází k inhibici růstu trichomů.

Po mutaci se v peptidickém řetězci se namísto alaninu nachází threonin, který má ve svém řetězci oproti alaninu hydroxy skupinu, na které může dojít například k O-glykosylaci sacharidem nebo mohou vznikat nové vodíkové můstky, což by ve výsledku mohlo způsobit odlišné skládání proteinu, jeho inaktivaci či změnu funkce a lokalizace a může tak ovlivnit mechanismus vzniku trichomů.



Obr. 17 Chromatogram sekvenování pro vzorky 1-26 (chybí vzorky 13, 23), červená šipka ukazuje na místo mutace



Obr. 18 Chromatogram sekvenování pro vzorky 26-56 (chybí vzorky 27, 42, 44, 48, 52, 55), červená šipka ukazuje na místo mutace.

5 ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše na téma významnosti různých fenotypů trichomů v přípravě nových kultivarů sóji.

Variety sóji s trichomy a variety bez trichomů byly úspěšně kultivovány a následně byla provedena klasifikace fenotypů trichomů (s trichomy a bez trichomů, krátké, standardní délky – přilehlé, vzpřímené, částečně přilehlé) a pozorována jejich hustota pro další studie, které budou provedeny v budoucnu. V rámci této práce byl při ověřování variet bez trichomů odhalen nový fenotyp – tzv. krátké trichomy. Ty mohou poukazovat na rozdílnou regulaci tvorby trichomů a budou součástí dalšího zkoumání.

Odebrané vzorky jednotlivých variet byly následně použity pro izolaci gDNA pro amplifikaci v PCR genu *Glyma.09G278000* za účelem potvrzení mutace GCC>ACC (A25T). Tato mutace byla experimentálně potvrzena u všech variet sóji, se kterými bylo pracováno – u variet bez trichomů i variet, u kterých byly pozorovány velmi krátké trichomy. Ať už je fenotyp variet s krátkými trichomy součástí fenotypu bez trichomů či nikoli, tato mutace je nadřazena oběma fenotypům. Dá se tedy s jistotou říci, že protein kódovaný tímto genem se podílí na vzniku trichomů. Znalost mutace způsobující variety bez trichomů může být přínosná při šlechtění nových kultivarů.

6 LITERATURA

- Aajj C., Borst P. (1972): The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* **269**, 192-200.
- Accessions – GRIN-Global Web: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx?> (2. 5. 2020)
- Arondel V., Kader J.-C. (1990): Lipid transfer in plants. *Experientia* **46**, 579-585.
- Avgust (АО Фирма «АВГУСТ» - лидер российского рынка химических средств защиты растений.): <https://www.avgust.com/> (14. 5. 2020)
- Bandillo N. B., Lorenz A. J., Graef G. L., Jarquin D., Hyten D. L., Nelson R. L., Specht J. E. (2017): Genome-wide Association Mapping of Qualitatively Inherited Traits in a Germplasm Collection. *The Plant Genome* **10**, 1-18.
- Bernard R. L., Singh B. B. (1969): Inheritance of Pubescence Type in Soybeans: Glabrous, Curly, Dense, Sparse, and Puberulent1. *Crop Science* **9**, 192-197.
- Bernard R.L. (1975a): The inheritance of appressed pubescence. *Soybean Genetics Newsletter* **2**, 34-36.
- Bernard R.L. (1975b): The inheritance of near-gray pubescence color. *Soybean Genetics Newsletter* **2**, 31-33.
- Bernhard W. R., Thoma S., Botella J., Somerville C. R. (1991): Isolation of a cDNA Clone for Spinach Lipid Transfer Protein and Evidence that the Protein Is Synthesized by the Secretory Pathway. *Plant Physiology* **95**, 164-170.
- Boyer R. F. (2012): *Biochemistry laboratory: modern theory and techniques*. 2nd ed., Pearson Education, Boston, 362 stran.
- Calderwood L. B., Lewins S. A., Darby H. M. (2015): Survey of Northeastern Hop Arthropod Pests and Their Natural Enemies. *Journal of Integrated Pest Management* **6**:18. <https://academic.oup.com/jipm/article/6/1/18/2936985>
- Cameron K. D., Teece M. A., Smart L. B. (2006): Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of Lipid Transfer Protein in Response to Periodic Drying Events in Leaves of Tree Tobacco. *Plant Physiology* **140**, 176-183.
- Campbell B. W., Hoyle J. W., Bucciarelli B., Stec A. O., Samac D. A., Parrott W. A., Stupar R. M. (2019): Functional analysis and development of a CRISPR/Cas9 allelic series for a CPR5 ortholog necessary for proper growth of soybean trichomes. *Scientific Reports* **9**:14757. <https://www.nature.com/articles/s41598-019-51240-7>.
- Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X., Jiang W., Marraffini L. A., Zhang F. (2013): Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* **339**, 819-823.
- Crutzen P. J. (2006): Albedo Enhancement by Stratospheric Sulfur Injections: A Contribution to Resolve a Policy Dilemma? *Climatic Change* **77**, 211-220.
- Deeken R., Saupe S., Klinkenberg J., Riedel M., Leide J., Hedrich R., Mueller T. D. (2016): The Nonspecific Lipid Transfer Protein AtLtpI-4 Is Involved in Suberin Formation of *Arabidopsis thaliana* Crown Galls. *Plant Physiology* **172**, 1911-1927.
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z. A., Eckert M. R., Vogel J., Charpentier E. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**, 602-607.
- Doughty C. E., Field C. B., McMillan A. M. S. (2011): Can crop albedo be increased through the modification of leaf trichomes, and could this cool regional climate?: A letter. *Climatic Change* **104**, 379-387.
- Dovich N. J. (1997): DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **18**, 2393-2399.
- Efetova M., Zeier J., Riederer M., Lee C.-W., Stingl N., Mueller M., Hartung W., Hedrich R., Deeken R. (2007): A Central Role of Abscisic Acid in Drought Stress Protection of *Agrobacterium* -Induced Tumors on *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **145**: 853-862.
- Erhan S. Z., Bagby M. O., Cunningham H. W. (1992): Vegetable oil-based printing inks. *Journal of the American Oil Chemists Society* **69**, 251-256.

- Farrell R. E. (2017): Functional Genomics and Transcript Profiling. In: *RNA Methodologies*, 5th ed., (Robert E. Farrell, Jr. ed.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 685-695.
- Galway M. E., Masucci J. D., Lloyd A. M., Walbot V., Davis R. W., Schiefelbein J. W. (1994): The TTG Gene Is Required to Specify Epidermal Cell Fate and Cell Patterning in the Arabidopsis Root. *Developmental Biology* **166**, 740-754.
- Gilbert E. F.-L. (2017): *A Genomewide Analysis of the USDA Soybean Collection*. Master thesis, University of Minnesota, Minneapolis, USA.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98
- Hartwig, E. E. (1973): Varietal development. In: *Soybeans: Improvement, Production and Uses*. (Caldwell B. E. ed.), American Society of Agronomy, Madison, WI, 187-207.
- Hülkamp M., Miséra S., Jürgens G. (1994): Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis. *Cell* **76**, 555-566.
- Hunt M., Kaur N., Stromvik M., Vodkin L. (2011): Transcript profiling reveals expression differences in wild-type and glabrous soybean lines. *BMC Plant Biology* **11**:145. <http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-11-145>
- Hymowitz T. (2008): The History of the Soybean. In: *Soybeans*, (Galloway R., Johnson L. A., White P. J. eds.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1-31.
- Chae K., Gonong B. J., Kim S.-C., Kieslich C. A., Morikis D., Balasubramanian S., Lord E. M. (2010): A multifaceted study of stigma/style cysteine-rich adhesin (SCA)-like Arabidopsis lipid transfer proteins (LTPs) suggests diversified roles for these LTPs in plant growth and reproduction. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4277-4290.
- Challa K. R., Aggarwal P., Nath U. (2016): Activation of *YUCCA5* by the Transcription Factor TCP4 Integrates Developmental and Environmental Signals to Promote Hypocotyl Elongation in Arabidopsis. *Plant Cell* **28**, 2117-2130.
- Chen Q., Zhang Z., Liu C., Xin D., Qiu H., Shan D., Shan C., Hu G. (2007): QTL Analysis of Major Agronomic Traits in Soybean. *Agricultural Sciences in China* **6**, 399-405.
- Jeppson J. O., Laurell C. B., Franzén B. (1979): Agarose gel electrophoresis. *Clinical Chemistry* **25**, 629-638.
- Kader J. C. (1975): Proteins and the intracellular exchange of lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Lipids and Lipid Metabolism* **380**: 31-44.
- Kalve S., De Vos D., Beemster G. T. S. (2014): Leaf development: a cellular perspective. *Frontiers in Plant Science* **5**:362 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00362/full>
- Kelley, L., Mezulis, S., Yates, C., Wass M., Sternberg M. (2015): The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* **10**, 845-858
- Kilen T. C., Lambert L. (1993): Registration of Three Glabrous and Three Dense Pubescent Soybean Germplasm Lines Susceptible (D88-5320, D88-5295), Moderately Resistant (D88-5328, D88-5272), or Resistant (D90-9216, D90-9220) to Foliar-Feeding Insects. *Crop Science* **33**, 215-215.
- Kim T. H., Kim M. C., Park J. H., Han S. S., Kim B. R., Moon B. Y., Suh M. C., Cho S. H. (2006): Differential expression of rice lipid transfer protein gene (LTP) classes in response to abscisic acid, salt, salicylic acid, and the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Plant Biology* **49**, 371-375.
- Kirik V., Bouyer D., Schöbinger U., Bechtold N., Herzog M., Bonneville J.-M., Hülkamp M. (2001): CPR5 is involved in cell proliferation and cell death control and encodes a novel transmembrane protein. *Current Biology* **11**, 1891-1895.
- Krishnan H. B., Coe E. H. (2001): Seed Storage Proteins. In: *Encyclopedia of genetics*. (Brenner S., Miller J. H., Broughton W., eds.) Academic Press, San Diego, 1782-1787.
- Lackey J. A. (1980): Chromosome Numbers in the Phaseoleae (Fabaceae: Faboideae) and their Relation to Taxonomy. *American Journal of Botany* **67**, 595-602.
- Lee J.-D., Shannon J. G., Vuong T. D., Moon H., Nguyen H. T., Tsukamoto C., Chung G. (2010): Genetic diversity in wild soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) accessions from southern

- islands of Korean peninsula: Genetic diversity of island wild soybeans. *Plant Breeding* **129**, 25-263.
- Levin D. A. (1973): The Role of Trichomes in Plant Defense. *The Quarterly Review of Biology* **48**, 3-15.
- Lorenz T. C. (2012): Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments* **63**:3998. <https://www.jove.com/video/3998/polymerase-chain-reaction-basic-protocol-plus-troubleshooting>
- Maldonado A. M., Doerner P., Dixon R. A., Lamb C. J., Cameron R. K. (2002): A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature* **419**, 399-403.
- Monteith J. L., Unsworth M. H. (2013): *Principles of environmental physics: plants, animals, and the atmosphere*. 4th ed., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 423 stran.
- Morohashi K., Zhao M., Yang M., Read B., Lloyd A., Lamb R., Grotewold E. (2007): Participation of the Arabidopsis bHLH Factor GL3 in Trichome Initiation Regulatory Events. *Plant Physiology* **145**, 736-746.
- Morse W. J., Cartter J. L., Williams L. F. (1949): *Soybeans: culture and varieties*. U.S. Dept. of Agriculture, Washington D.C., 37 stran.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986): Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263-273
- Muredzi P. (2013): *Soybean Nature, Processing and Utilisation*. LAP Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Německo, 272 stran.
- Oppenheimer D. G., Herman P. L., Sivakumaran S., Esch J., Marks M. D. (1991): A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. *Cell* **67**, 483-493.
- Pagano M. C., Miransari M. (2016): The importance of soybean production worldwide. In: *Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production*. (Miransari M. ed.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1-26.
- Pawlowski M. L., Hill C. B., Hartman G. L. (2015): Resistance to Charcoal Rot Identified in Ancestral Soybean Germplasm. *Crop Science* **55**, 1230-1235.
- Payne C. T., Zhang F., Lloyd A. M. (2000): GL3 Encodes a bHLH Protein That Regulates Trichome Development in Arabidopsis Through Interaction With GL1 and TTG1. *Genetics* **156**, 1349-1362.
- Perazza D., Laporte F., Balagué C., Chevalier F., Remo S., Bourge M., Larkin J., Herzog M., Vachon G. (2011): GeBP/GPL Transcription Factors Regulate a Subset of CPR5 - Dependent Processes. *Plant Physiology* **157**, 1232-1242.
- Potocka I., Baldwin T. C., Kurczynska E. U. (2012): Distribution of lipid transfer protein 1 (LTP1) epitopes associated with morphogenic events during somatic embryogenesis of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Reports* **31**, 2031-2045.
- Rerie W. G., Feldmann K. A., Marks M. D. (1994): The GLABRA2 gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in Arabidopsis. *Genes & Development* **8**, 1388-1399.
- Ridgwell A., Singarayer J. S., Hetherington A. M., Valdes P. J. (2009): Tackling Regional Climate Change By Leaf Albedo Bio-geoengineering. *Current Biology* **19**, 146-150.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463-5467.
- Sarowar S., Kim Y. J., Kim K. D., Hwang B. K., Ok S. H., Shin J. S. (2009): Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. *Plant Cell Reports* **28**, 419-427.
- Schmittgen T. D., Zakrajsek B. A., Mills A. G., Gorn V., Singer M. J., Reed M. W. (2000): Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. *Analytical Biochemistry* **285**, 194-204.

- Simon C., Franke A., Martin A. (1991): The Polymerase Chain Reaction: DNA Extraction and Amplification. In: *Molecular Techniques in Taxonomy*. (Hewitt G.M., Johnston A.W.B., Young J.P.W. eds.), Springer, Berlin, 329-355.
- Singh B. B., Hadley H. H., Bernard R. L. (1971): Morphology of Pubescence in Soybeans and Its Relationship to Plant Vigor1. *Crop Science* **11**, 13-16.
- Smith T. F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E. J. (1999): The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 181-185.
- Song J., Guo Y., Yu L.-J., Qiu L.-J. (2012): Progress in genes related to seed-coat color in soybean. *Hereditas (Beijing)* **34**, 687-694.
- Song Q., Hyten D. L., Jia G., Quigley C. V., Fickus E. W., Nelson R. L., Cregan P. B. (2013): Development and Evaluation of SoySNP50K, a High-Density Genotyping Array for Soybean. *PLoS One* **8**:54985. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0054985>
- SoyBase: https://www.soybase.org/sbt/search/search_results.php?category=FeatureName&search_term=Glyma.09G278000.1 (1. 5. 2020)
- SoyKB: Soybean Knowledge Base: http://soykb.org/gene_card.php?gene=Glyma09g41460.1 (1. 5. 2020)
- Škrabišová M, Dietz N, Zeng S, Miranda C, Culp C, Hyun J, Combs R, Kim JH, Travers C, Grace C, Joshi T, Bilyeu KD (manuscript in preparation) “GWAS to Genes” pipeline identifies causative genes underlying phenotypes of important soybean traits.
- Thoma S., Kaneko Y., Somerville C. (1993): A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *The Plant Journal* **3**, 427-436.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Thompson M. M., Hrabak E. M. (2018): Capture and storage of plant genomic DNA on a readily available cellulose matrix. *BioTechniques* **65**, 285-287.
- U.S. National Plant Germplasm System: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx?> (1. 5. 2020)
- Vadde B. V. L., Challa K. R., Nath U. (2018): The TCP 4 transcription factor regulates trichome cell differentiation by directly activating *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **93**, 259-269.
- Vargas Wolfgramm E. de, Carvalho F. M. de, Costa Aguiar V. R. da, De Nadai Sartori M. P., Hirschfeld-Campolongo G. C. R., Tsutsumida W. M., Louro I. D. (2009): Simplified buccal DNA extraction with FTA® Elute Cards. *Forensic Science International: Genetics* **3**, 125-127.
- Visscher P. M., Wray N. R., Zhang Q., Sklar P., McCarthy M. I., Brown M. A., Yang J. (2017): 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *The American Journal of Human Genetics* **101**, 5-22.
- Wang H., Sun Y., Chang J., Zheng F., Pei H., Yi Y., Chang C., Dong C.-H. (2016): Regulatory function of *Arabidopsis* lipid transfer protein 1 (LTP1) in ethylene response and signaling. *Plant Molecular Biology* **91**, 471-484.
- Wang S., Kwak S.-H., Zeng Q., Ellis B. E., Chen X.-Y., Schiefelbein J., Chen J.-G. (2007): TRICHOMELESS1 regulates trichome patterning by suppressing GLABRA1 in *Arabidopsis*. *Development* **134**, 3873-3882.
- Wigley T. M. L. (2006): A Combined Mitigation/Geoengineering Approach to Climate Stabilization. *Science* **314**, 452-454.
- Xun H., Zhang Z., Zhou Y., Qian X., Dong Y., Feng X., Pang J., Wang S., Liu B. (2018): Identification and Functional Characterization of R3 MYB Transcription Factor Genes in Soybean. *Journal Plant Biology* **61**, 85-96.
- Yang Y., Wang L., Zhang D., Cheng H., Wang Q., Yang H., Yu D. (2020): GWAS identifies two novel loci for photosynthetic traits related to phosphorus efficiency in soybean. *Molecular Breeding* **40**:29. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11032-020-01112-0>

- Yu N., Cai W.-J., Wang S., Shan C.-M., Wang L.-J., Chen X.-Y. (2010): Temporal Control of Trichome Distribution by MicroRNA156-Targeted *SPL* Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 2322-2335.
- Zabala G., Vodkin L. (2003): Cloning of the Pleiotropic *T* Locus in Soybean and Two Recessive Alleles That Differentially Affect Structure and Expression of the Encoded Flavonoid 3' Hydroxylase. *Genetics* **163**, 295-309.
- Zeng A., Chen P., Korth K., Hancock F., Pereira A., Brye K., Wu C., Shi A. (2017): Genome-wide association study (GWAS) of salt tolerance in worldwide soybean germplasm lines. *Molecular Breeding* **37**:30. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11032-017-0634-8>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	Apressed (přilehlý fenotyp)
ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
AtLtp-4I	Nespecifický LTP u <i>Arabidopsis thaliana</i>
bHLH	Zásadité helix-otočka-helix proteiny
CAM	Community Atmosphere Model
Cas9	Endonukleasa imunitního systému prokaryot 9
CLM	Community Land Model
CPC	CAPRICE
CPR5/HYS1	Protein konstitutivní exprese patogeneze příbuzných genů 5
CRISPR	Nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromatické repetice
ddNTP	dideoxyribonukleosidtrifosfát
diH ₂ O	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
E	Erect (vzpřímený fenotyp)
EGL3	Zesilovač GL3
ETC1, ETC2	Zesilovače TRY a CPC
gDNA	Genomová DNA
GL1	GLABRA1
GL2	GLABRA2
GL3	GLABRA3
<i>GmCPR5</i>	Ortholog genu <i>CPR5</i> u sóji
<i>GmTCL</i>	Gen TCL u sóji
GRIN	Germplasm Repository Information Network
GWAS	Genome-wide association study (Metoda asociace fenotypu na genotyp)
LTP	Lipidy transferující protein
MBS	Membrane Binding Solution
MBW	MYB-bHLH-WD40 (MYB proteiny-zásadité helix otočka helix-tryptofan aspartát opakující se proteiny) komplex

MBW	MYB-bHLH-WD40 aktivační komplex
MWS	Membrane Wash Solution
MYB proteiny	Rodina transkripčních faktorů
nA	Near-apressed (téměř přilehlý fenotyp)
nE	Near-erect (téměř vzpřímený fenotyp)
NIL	Nearly isogenic line (téměř isogenní linie)
NTP	Nukleosidtrifosfát
PCR	Polymerase chain reaction (polymerasová řetězová reakce)
RTE1	Pozitivní regulátor receptoru pro ethylen
SA	Semi-apressed (částečně přilehlý)
SNP	Single nucleotide polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)
SO ₂	Oxid siřičitý
SPL	Transkripční faktory, které se vážou na promotor genu <i>SQUAMOSA</i>
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
TCL1, TCL2	TRICHOMELESS1 a 2
TCP	Rodina transkripčních faktorů TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA a PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN FACTOR1 a 2
TE	Tris-EDTA pufr
TENT	Tris-EDTA-NaCl-Triton X-100 pufr
TRY	TRIPTYCHON
TTG1	TRANSPARENT TESTA GLABRA1
WGS	Whole-genome sequencing (celogenomového sekvenování)

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Tabulky variet s trichomy a variet bez trichomů

Příloha 2: Fotografie variet