

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2016

ANNA JÁNOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav biologie rostlin



Biologické aspekty domestikace kulturních plodin
Bakalářská práce

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

Vypracovala:
Anna Jánová

Brno 2016

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: „*Biologické aspekty domestikace kulturních plodin*“ 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 vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

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

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Pavlu Hanáčkovi, Ph.D. za veškerou pomoc při psaní této práce a velikou snahu mi být vždy a ve všem nápomocen. Mé velké poděkování patří též Ing. Lence Procházkové za pomoc při práci v laboratoři potřebné k mé experimentální části. Také bych ráda poděkovala konzultantovi mé práce Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. Tato práce vznikla za finanční podpory projektu 14-11782S GA ČR s názvem Dormance semen a pukavost lusků jako klíčové domestikační znaky luskovin, za tuto možnost bych též chtěla poděkovat.

ABSTRAKT

Předmětem této práce je studium genetické podstaty jednoho z klíčových domestikčních znaků u hrachu, pukavosti lusku. Práci předcházelo masivně paralelní sekvenování 3' konců cDNA (metoda MACE), díky kterému byla analyzována mRNA izolovaná ze švů lusků. Byly použity dvě rodičovské linie JI64 (*Pisum sativum* ssp. *elatius* L.) – planý hrách s pukavými lusky, JI92 (*Pisum sativum* ssp. *sativum* L.) – kulturní hrách s nepukavými lusky a dále rekombinantní inbrední linie (RILs), které vznikly recipročním křížením obou rodičovských linií. Pomocí MACE analýzy bylo generováno 10 mil. čtení a identifikováno celkem 7 tis. genů, ze kterých bylo jen 77 se statisticky průkazným rozdílem mezi vzorky s pukavými a nepukavými lusky. Z nich byly do této práce vybrány pouze tři. Expres těchto tří kandidátních genů pro pukavost lusku byla stanovena pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR). Na základě průběhu qRT-PCR byly vypočteny hodnoty ΔC_t . Výsledkem je grafické znázornění míry exprese těchto kandidátních genů obou studovaných linií hrachu v průběhu dozrávání lusků.

Klíčová slova: *Pisum sativum* L., pukavost lusku, domestikace, qRT-PCR

ABSTRACT

The theme of this work is the examining of one of the key genetic principles in domestication traits in pea – pod dehiscence. First, this work was preceded by the employment of the method called MACE (Massive Analysis of cDNA Ends). The method analyzed the mRNA which was isolated from pod sutures. The two parental lines were used JI64 (*Pisum sativum* ssp. *elatius* L.) – wild field pea with dehiscent pods, JI92 (*Pisum sativum* ssp. *sativum* L.) – landrace with indehiscent pods and RILs (Recombinant inbred lines) of reciprocal hybridization of both. As a result of the MACE analysis ten million reads were generated and seven thousand genes were identified – only seventy seven genes differed with statistical significance in the samples with dehiscent and indehiscent pods. For the purpose of this work only three of them were used. Expression of these three candidate genes were assigned using Real-Time qRT-PCR for pod dehiscence. Base on qRT-PCR process the ΔC_t values were calculated. The result of this work is the graphical view of expression volume of these candidate genes for both field pea lines during pod maturation.

Key words: *Pisum sativum* L., pod dehiscence, domestication, qRT-PCR

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL PRÁCE.....	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
3.1	Domestikace rostlin.....	11
3.1.1	Domestikační syndrom.....	11
3.1.2	Využití ve šlechtění rostlin.....	12
3.1.3	Využití v genomice.....	12
3.2	Luskoviny.....	13
3.2.1	Domestikace luskovin.....	13
3.2.2	Fylogeneze tribu <i>Fabeae</i>	14
3.3	Hrách (<i>Pisum sativum</i> L.).....	15
3.3.1	Centra domestikace hrachu.....	15
3.3.2	Genomika hrachu.....	16
3.3.3	Repetitivní sekvence v genomu hrachu.....	17
3.3.4	Geny spojené s domestikací hrachu.....	17
4	MATERIÁL A METODIKA.....	19
4.1	Rostlinný materiál.....	19
4.2	Izolace RNA.....	20
4.3	Reverzní transkripce RNA na cDNA.....	22
4.4	Navržení primerů pro kvantitativní Real-Time PCR.....	23
4.5	Kvantitativní Real-Time PCR.....	24
5	VÝSLEDKY.....	26
5.1	Výběr vzorků RNA.....	26
5.2	Výsledky kvantitativní Real-Time PCR.....	27
5.3	Expresse kandidátních genů.....	28
5.4	Ověření specifity primerů.....	30
6	DISKUSE.....	31
7	ZÁVĚR.....	32
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	33
9	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	38
10	SEZNAM TABULEK.....	38

11	SEZNAM ZKRATEK	39
12	PŘÍLOHY	40
12.1	Seznam příloh	40

1 ÚVOD

Hrách setý je stará kulturní rostlina, pěstovaná v mírném klimatu po celém světě. Původem je z východního Středomoří. Jako plodina se začal pěstovat před deseti tisíci lety, kde tvořil důležitou součást jídelníčku prvních civilizací a to hlavně kvůli svým výživným semenům bohatým na proteiny. V současnosti je člověkem využíván nejen pro přímou konzumaci jako luštěnina či zelenina, ale rovněž i jako pícnina. Sloužil také Gregoru Mendelovi jako modelová rostlina, pomocí které demonstroval a formuloval objev základů dědičnosti. Jako modelová rostlina v rostlinné biologii je hrách stále používán například pro studium apikální dominance.

Proces domestikace rostlin je tématem aktivního výzkumu pro vědce nejrůznějších oborů již řadu let. Otázky týkající se geografického původu plodin, míry nezávislé domestikace pro daný druh plodin, specifických molekulárních změn ovlivňující domestikací znaky a povahy umělého výběru během domestikace a následné šlechtění rostlin nejsou ještě zcela zodpovězeny (Gross a Olsen, 2010).

Hrách setý je ukázkovým příkladem kulturní plodiny, která prošla procesem domestikace. Nepukavost lusku, nedormatní semena, semena se slabší testou, semena bez toxických látek atd. jsou domestikační znaky, kterými se liší od planých druhů hrachů. Tato práce se zabývá genetickou podstatou pukavosti lusku u hrachu (*Pisum sativum* L.). Pro testování kandidátních genů, které jsou pravděpodobně za pukavost lusku u hrachu zodpovědné, bylo použito metody kvantitativní Real-Time PCR. Plané druhy ale nesou i řadu výhodných vlastností jako geny rezistence pro nejrůznější stresové faktory, proto je také genetické pozadí těchto znaků u hrachu cílem výzkumných zájmů. Využití těchto poznatků hraje důležitou roli při novošlechtění.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je přispění k objasnění genetické podstaty ztráty pukavosti lusků hrachu během jeho domestikace pomocí analýzy exprese kandidátních genů během dozrání lusků u planého a kulturního hrachu.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Domestikace rostlin

Proces domestikace rostlin ale také zvířat začal přibližně před 10 000 lety, kdy lidé vyměnili svůj kočovný způsob života za usedlý. Z lovců se postupně stávali pastevci a ze sběračů zemědělci (Sakuma a kol., 2011), čemuž napomohla i změna klimatu v období holocénu tzn. výrazné oteplení. Nejstarší archeologické záznamy, které znamenaly důkazy o domestikaci, byly nalezeny v tropických a subtropických oblastech jihozápadní a jižní Asie, severní a střední Afriky a Střední Ameriky (Gupta, 2004).

Domestikace je unikátní formou mutualismu, který se vyvinul mezi lidskými populacemi a cílovou rostlinou. Domestikace není krátkodobá událost, ve kterém by rostlinný nebo živočišný druh byl náhle přizpůsoben potřebám člověka. Spíše se jedná o souhrnný proces vyznačující se změnami na obou stranách mutualistického vztahu, tedy lidská a rostlinná populace se na sobě stávají závislými v průběhu času. To přináší silně selektivní výhody pro obě strany. Kromě toho domestikační proces nenásleduje stále stejnou vývojovou linii, ale je diferencovaně formována jednotlivými biologickými faktory a faktory chování daného druhu a kulturním kontextem lidské společnosti. Zde je velmi důležitý antropogenní faktor, tím je myšleno dlouhodobé lidské působení a péče o rostlinu, kterým se domestikace liší od ostatních mutualistických vztahů (Zeder a kol., 2006).

Lidé zvyšovali genetickou kondici cílové populace zasahováním do jejich životních cyklů, čímž je množili a rozšiřovali jejich místa výskytu oproti jejich planým předkům. Avšak domestikace mohla zpočátku hrát jen malou roli v hospodaření lidské rasy, větší část byla zajištěna lovením a sběrem, které byly jakousi základnou jejich živobytí a tolik nepodléhaly vlivu prostředí jako pěstování plodin (Zeder a kol., 2006).

3.1.1 Domestikační syndrom

Nejprve byl proces domestikace neuvědomělý, teprve později lidé sbírali cíleně semena rostlin s nejvýhodnějšími vlastnostmi, čímž se postupně z planého druhu dosáhlo produktivní kulturní plodiny. Všechny změny, které se formovaly po mnohé generace, jsou souborně nazývány domestikační syndrom. Můžeme sem zařadit znaky jako

zvýšení počtu semen, změny velikosti a tvaru semen, zlepšení fertility a klíčivosti, zkrácení dormance, omezení vypadávání semen, změny v době kvetení, změny v architektuře rostlin, eliminaci toxických látek nebo inhibujících, pigmentů semen a mechanických ochranných orgánů jako chlupů nebo trnů. Genetické modifikace planých druhů dosahují někdy až takových změn, že ztratily přirozenou schopnost rozmnožovat se a tím jsou zcela závislé na člověku (Smýkal, 2009).

3.1.2 Využití ve šlechtění rostlin

Později modernější šlechtění využívalo technik křížení nejlepšího s nejlepším a snahy o zvyšování výnosu a výkonu, což se převážně nese až do dnešní doby. Tento silný selekční tlak zužuje genetickou diverzitu kultivovaných genových zdrojů některých druhů (Jing a kol., 2010).

Pro mnohé plodiny stále ještě existují plané formy, které představují geneticky blízké modely. Předci a jejich domestikované formy mohou proto být přímo porovnávání a experimentálně křížení, přičemž se nám dostává přiblížení molekulárního, vývojového a fyziologického vlivu výběru během domestikace. Společně tyto vlastnosti vytváří vysoce tvárný modelový systém pro studium genomické a fenotypové evoluce během domestikace (Olsen a Wendel, 2013).

3.1.3 Využití v genomice

Metody jako mapování kvantitativních znaků a sekvenování celých genomů identifikovaly geny, které jsou spojeny s domestikací a následnou diverzifikací plodin. Tyto studie odkrývají funkce genů, které jsou zapojeny v evoluci rostlin pod vlivem domestikace, dále typy mutací, paralelismus mutací a také proteiny. Genetická struktura a přírodní výběr domestikovaných druhů byly hlavním cílem molekulární genetiky posledních dvou dekad. Největší množství domestikačních genů bylo nalezeno a izolováno pomocí metod kandidátních genů, quantitative trait locus (QTL), genome-wide association studies (GWASs), mapování, klonování a poslední dobou i sekvenování (Meyer a Perugganan, 2013).

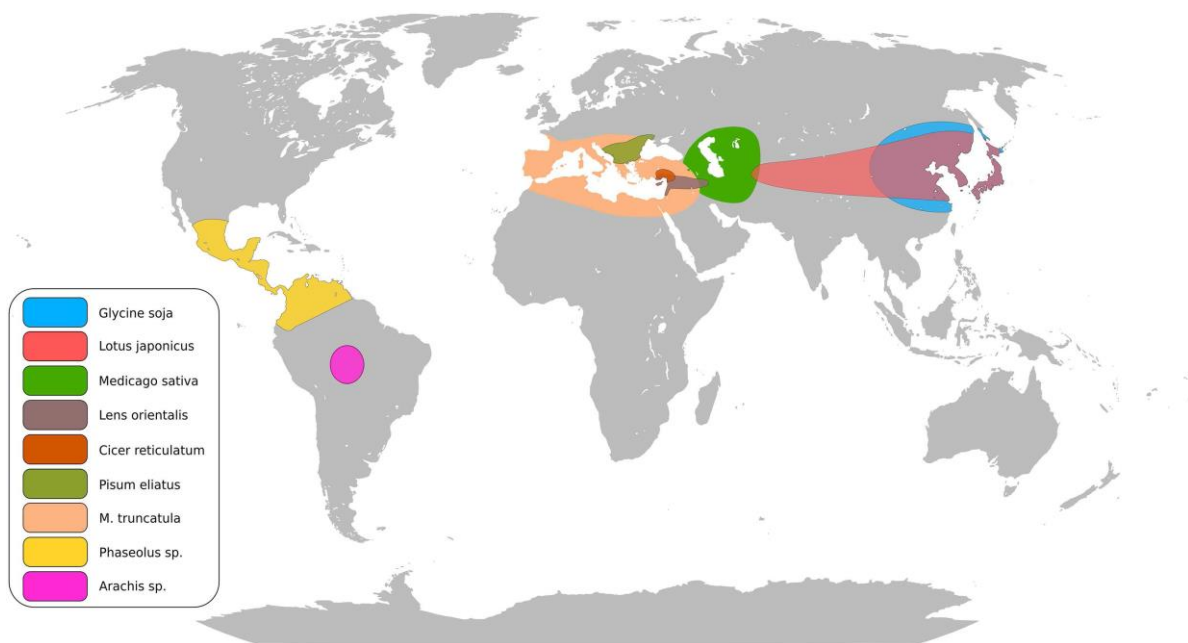
3.2 Luskoviny

Luskoviny jsou hned po obilninách druhou nejdůležitější skupinou plodin, poskytují v průměru 33 % přijímaného dusíku z potravy, v rozvojových zemích je to až 60 %. Celkem luskoviny pokrývají asi 115 milionů ha a obsahují přibližně 20 000 druhů. Luskoviny jsou často pionýrskými druhy zlepšující úrodnost půdy. Luskoviny vytváří symbiózu s hlízkovými bakteriemi rodu *Rhizobium* a s arbuskulárními mykorhizními houbami, které váží vzdušný dusík a zároveň získávají dostupný fosfát z půdy. Tyto vlastnosti hrají podstatnou roli v ekosystémech a rostlinné produkci, což vede ke snahám snižovat závislost na komerčních hnojivech a snaze nahradit dovážená proteinová krmiva za vyprodukované luskoviny (Gentzittel a kol., 2015).

3.2.1 Domestikace luskovin

Luskoviny patří mezi první domestikované rostlinné druhy na světě. Jejich první archeologické nálezy, pocházející hlavně ze Sýrie, jsou asi 10 000 let staré. Tyto původně euroasijské rostliny se postupně rozšířily po celém světě (Mikić, 2014). Tribus *Fabeae* čeledi bobovitých dvouděložných rostlin zahrnuje celkem pět rodů *Vicia* L. (216 druhů), *Lathyrus* L. (150 druhů), *Lens* Medik. (4-8 druhů), *Pisum* L. (2 druhy s několika podruhy) a *Vavilovia* Al.Fed. (1-2 druhy). *Vicia* a *Lathyrus* jsou rozšířeny velmi rozmanitě, nalezneme je ve východním Středozeří, Asii, severní Africe, Severní a Jižní Americe. *Vicia* také kolonizovala Havaj a střední Atlantik jako souostroví Kanárských ostrovů, Madeira a Azory. *Lens* a *Pisum* jsou rozšířeny ve východním Středozeří a *Vavilovia* na západě asijských hor (Schaefer a kol., 2012).

Bobovité rostliny mají největší počet domestikovaných druhů. Některé druhy mohly být domestikovány pro krmivářské využití, ale většina byla vyprodukována za účelem vysokých výživových hodnot semen. Ty tvořily důležitou složku výživy prvních civilizací. Právě u luskovin může být očekáván projev modifikace typický pro domestikační syndrom. Bobovité mohou být excelentním předmětem pro zkoumání paralelních změn v morfologii, které jsou dány paralelními mutacemi genotypu (Weeden, 2007).

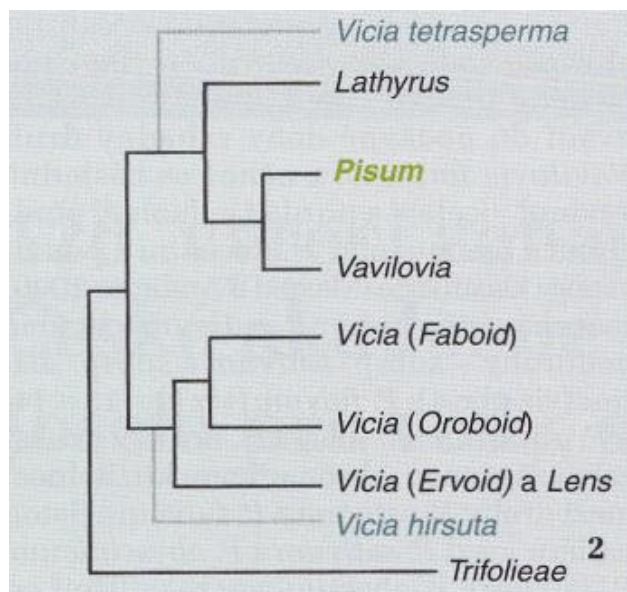


Obr. 1 Předpokládaná centra původu důležitých luskovin
(Gentzbittel a kol. 2015)

Za domestikační syndrom můžeme považovat například klíčení rostlin, kdy luskoviny rostoucí volně v přírodě potřebují k vyklíčení překonat dormanci, kdežto kulturní luskovinu stačí vystavit správné vlhkosti. Tyto změny poukazují na domestikaci způsobenou lidským faktorem. Některé druhy luskovin mají u semen vyvinutu voděodolnou vrstvu, která je impregnována fenoly a suberinem. Tento jev se nazývá fyzická dormance. (Smýkal a kol., 2014).

3.2.2 Fylogeneze tribu *Fabeae*

Fylogenetická studie podle Steeleho a Wojciechowského (2003) naznačuje, že *Fabeae* je monofyletická skupina sesterská k *Trifolieae*. Přestože odběr vzorků *Fabeae* byl v této práci limitován, data ukazují, že sekvence plastidové DNA nesouhlasí identifikačními morfologickými znaky v tribu a že rod vikev (*Vicia*) může být parafyletický. Nejnovější poznatky o fylogenezi bobovitých a jejich genetické diverzitě se zvláštním zaměřením na zemědělsky využitelné druhy se zabývá studie Smýkala a kol. (2015).



Obr. 2 Schématické znázornění fylogenetických vztahů tribu Fabeae na základě chloroplastové DNA a jaderně kódovaných oblastí vnitřního transkribovaného mezerníku ribozomové DNA (ITS) Smýkal a kol. (2011)

3.3 Hrách (*Pisum sativum* L.)

Hrách (*Pisum sativum* L.) patří do čeledi bobovitých a stejně jako sója, čočka, cizrna, vojtěška a fazol je důležitou zemědělskou plodinou (Smýkal a kol., 2012). Semena hrachu jsou bohatým zdrojem proteinů a poskytují obzvláště pestrý výživový profil. Semeno hrachu obsahuje škrob (18,6-54,1%), proteiny (15,8-32,1%), vlákninu (5,9-12,7%), sacharózu (1,3-2,1%) a olej (0,6-5,5%). Semena též obsahují minerály, vitaminy a mikronutrienty jako polyfenoly, saponiny, α -galaktosidázy a fytové kyseliny (Tayeh a kol., 2015). Díky tomu má široké využití např. lidská potrava, krmivo pro zvířata, píče, siláž a zelené hnojení. Stejně jako ostatní luskoviny tak i hrách fixuje vzdušný dusík, což vede ke zlepšení půdních vlastností. Též může být hrách využit jako meziplodina, která snižuje potřebu použití pesticidů (Sindhu a kol., 2014).

3.3.1 Centra domestikace hrachu

Hrách je starobylá luskovina pocházející z Blízkého východu a Středomoří, odkud se dále šířila na sever do oblastí dnešního Ruska a západně přes starověké Řecko a Řím do Evropy. Hrách byl rovněž šířen i východně do Persie, Indie a Číny. Nejstarší archeologické nálezy hrachu datujeme 8000 př. n. l. Plané druhy *Pisum sativum* subsp. *elatius* a subsp. *sativum* se přirozeně vyskytují v Evropě, severozápadní Asii a v mírném pásu

Afriky. Avšak *P. fulvum* přirozeně roste jen v oblastech Středního východu a *Pisum abyssinicum* zase jen v Etiopii a Jemenu (Konečná a kol., 2014).

Na naše území se hrách dostal v již období pravěku. V České republice byla nalezena svrasklá a kulatá semena hrachu z období mladší doby bronzové, což je důkazem existence hrachu v několika morfologických typech, některé byly určeny k vyloupávání jiné ke sklizni za zelena (Kočár a Dreslerová, 2010).

3.3.2 Genomika hrachu

Genom hrachu je složen ze sedmi párů chromozomů ($2n = 14$). Jeho haploidní délka je odhadována na 4,45 Gb (Dolezel a Greilhuber, 2010). Takto rozsáhlý genom je překážkou genomickému zkoumání. Jelikož je čeleď bobovitých důležitou skupinou obzvláště kvůli symbiotické fixaci vzdušného dusíku, byly hledány další modelové rostliny z této čeledi. Jako vhodné kandidáti byly shledány štírovník japonský (*Lotus japonicus*) a vojtěška (*Medicago truncatula*), kteří mají až 10x menší genom než hrách (Smýkal, 2006).

Hrách setý se od druhů *P. fulvum* a *P. abyssinicum* liší několika chromozomovými přestavbami. Křížení mezi druhy *P. sativum* a *P. fulvum* je do jisté míry omezené a mezi druhy *P. fulvum* a *P. abyssinicum* skoro nemožné. Přestože rod *Pisum* čítá jen 2-3 druhy a je omezen v počtu definovaných taxonů, má obrovskou diverzitu v závislosti na geografickém původu, taxonomické příbuznosti a šlechtitelských genových zdrojích (Smýkal, 2011).

Genové banky po celém světě mohou nabídnout kolem 20 tisíc položek hrachu. Plané druhy jsou oproti kulturním zastoupeny v malé míře. V české národní kolekci, která patří k 10 největším světovým sbírkám, nalezneme přes 2200 genotypů (Smýkal, 2011).

Rozsáhlá velikost genomu a vysoká četnost transpozonů nepochybně představují překážku k použití genomických nástrojů u hrachu. Nedávné studie objevily nejruznější cenné genomické zdroje využitím nejmodernějšího sekvenování a genotypových technologií. Tyto programy směřují k rychlému pokroku v cíleném a účinném molekulárním křížení využívající bohatou diverzitu hrachových genových zdrojů a jejich planých příbuzných druhů. Veškeré snahy vedou k jedinému cíli a to vyobrazit všechny sekvence genomu hrachu (Madoui a kol., 2015).

3.3.3 Repetitivní sekvence v genomu hrachu

Genom hrachu obsahuje až 60 % repetitivní DNA. V nejpočetnějších koncentracích se objevují Ty3/gypsy retroelementy, v menších koncentracích Ty1/copia retroelementy a poté ještě spousta dalších, ale ty už nedosahují počtu tisíců kopií, proto představují pouze minoritní část genomu. Genetickou variabilitu je možné analyzovat právě pomocí retrotraspozonů. Jejich výhodou je obrovský počet kopií v genomu a na rozdíl od klasických transpozonů zůstává na původním místě na chromozomu. Lze je tedy využít jako skvělé molekulární markery (Smýkal, 2006).

Komparativní analýza repetitivních sekvencí *P. sativum* a *Medicago truncatula* ukázala, že oba druhy mají podobné repetitivní elementy i když v jiných koncentracích. Následně byly *P. sativum* a *M. truncatula* porovnány se sójou (*Glycine max*), se kterou sdílely jen několik repetitivních sekvencí. Tyto satelitní sekvence na mitotických chromozomech pomáhají identifikovat jejich příbuzenské specifické hybridizační znaky, které jsou cytogeneticky přínosné pro mapování chromozomů (Macas a kol., 2007).

3.3.4 Geny spojené s domestikací hrachu

O genetické podstatě formování lusku a embryogenezi hrachu není dostatek přístupných informací. Je známa řada genů, které nějakým způsobem regulují tvar lusku, ale nejsou identifikovány (Sinjushin, 2013). Nejméně dva geny P a V přispívají k formování lignifikované vrstvy na vnitřní straně zralého lusku. Mutace těchto genů způsobí tvorbu nelignifikovaného lusku, což má důležitý význam pro šlechtění zeleninových kultivarů s jedlými lusky (Reid a Ross, 2011).

Genetická kontrola pukavosti lusku je středem zájmu jako nepukavost lusku představující jeden ze základních požadavků kulturních luskovin. Kulturní hrách má plod (lusk) po dozrání odolný k pukání a rovněž nese další starobylé mutace, které jsou uchovávané v genofondu od dob raného zemědělství (Weeden a kol., 2002).

Ačkoli nebyl hrách vystaven podrobným analýzám genetických změn během domestikace, mnoho znaků typicky modifikovaných jako domestikační syndrom bylo analyzováno alespoň částečně a nejméně 11 lokusů bylo identifikováno. Lokus A ovlivňuje dormaci semen a také jejich kvalitu (**Tab. 1**). Například oblast *Dpo1* (**Příloha 1**) byla identifikována celkem brzy jako primární faktor kontrolující pukavost lusku. Doba kve-

tení je kontrolována alespoň 6 lokusy, avšak ne všechny byly důležité pro domestikaci. Mnoho genů nebo QTL bylo identifikováno vlivem rostlinného habitu, velikosti semen a kvality semen (Blixt, 1972).

Tab. 1 Výsledky genetických studií znaků tvořící syndrom domestikaci hrachu (Weeden, 2007)

Fenotyp planého druhu	Fenotyp kulturního druhu	Počet identifikovaných lokusů	Symbol lokusu
Pukavé lusky	Nepukavé lusky	1	<i>Dpo</i>
Dormantní semena	Nedormantní semena	1	<i>A</i>
Vysoký vzrůst	Nízký vzrůst	1	<i>Le</i>
Více bazálního větvení	Méně bazálního větvení	1 (minimum)	<i>Rms series</i>
Malá semena	Velká semena	několik	<i>QLT</i>
Špatná kvalita semen	Dobrá kvalita semen	4 (minimum)	<i>R, A, Pl, Gty</i>
Stimulace kvetení dlouhým dnem	Vykvetení nezáleží na délce dne	4	<i>Sn, Hr, Lf, E</i>

Přibližně 20 genů a QTL je odpovědných za modifikace rostlinných forem a funkcí, které provázely domestikace hrachu. Toto číslo je srovnatelné s odhadu počtu genů podílejících se na domestikaci fazolu, kukuřice a rýže (Li a kol., 2006).

Mnoho genů v hrachu je dobře charakterizováno, je tedy možné identifikovat pleiotropní efekt těchto genů. Je známo, že substituce *a* za *A* u hrachu zlepšuje kvalitu semen a redukuje dormanci semen. Ztráta *Np* přispívá ke zvětšení semen, ale zároveň snižuje toleranci k zrnokazům. Recesivní alela *r* zvyšuje kvalitu semene (semena jsou sladší), ale objevují se malá semena (Weeden, 2007).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Rostlinný materiál

Byly použity dvě linie hrachu získané z John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, UK (proto zkratka JI). Linie JI64 (*Pisum sativum* ssp. *elatius* L.) je planý hrách původem z Turecka, má pukavé lusky a dormantní semena. Linii JI92 (*Pisum sativum* ssp. *sativum* L.) řadíme mezi kulturní hrách a to jako krajovou odrůdu původem z Afghánistánu, má nepukavé lusky a nedormantní semena.

Dále bylo pracováno s kříženci a jejich liniemi tzv. RILs, což jsou rekombinantní imbrední linie. Dosud byla vypěstována sedmá generace JI92 x JI64 a reciprokého křížení JI64 x JI92, dohromady celkem 134 linií.

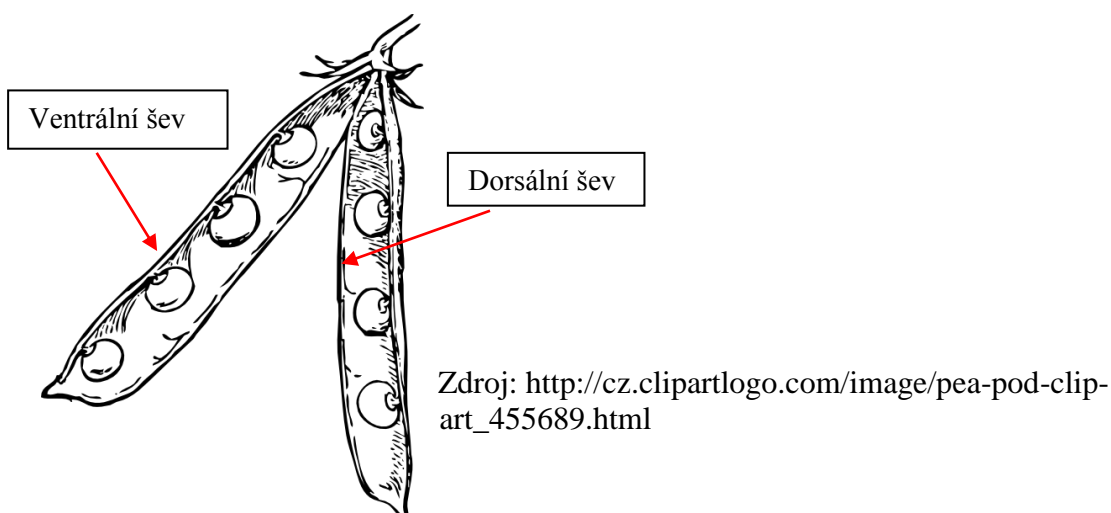


Obr. 3 Zralý lusk linie JI64 a JI92

4.2 Izolace RNA

Pro experimentální práci byla použita pletiva, která bezprostředně souvisejí s pukavostí lusků (švy lusků). Předpokládá se, že genetická podstata pukavosti lusků souvisí s expresí zodpovědného genu (genů). Z těchto pletiv byla izolována a analyzována mRNA (respektive cDNA získaná z mRNA).

RNA byla izolována ze švů lusků tří stadií (desetidenní lusk po odkvetení, patnáctidenní a dvacetidenní), byl izolován jak šev břišní (ventrální) tak hřbetní (dorsální), celkem tedy od každého rodiče 6 vzorků (ne u všech se podařilo izolovat dostatečné množství RNA). Švy byly nařezány skalpelem na kousky o šířce 1-2 mm a délce cca 1 cm, hmotnost vzorku cca 100 mg. Po odebrání byly zamrazeny na -80 °C až do izolace RNA. Izolace byla prováděna kitem NucleoSpin[®]RNA Plant firmy Macherey-Nagel, Düren, Německo (viz manuál).



Obr. 4 Dorsální a ventrální šev lusků

Manuál:

1. Homogenizace rostlinného materiálu (100 mg) v tekutém dusíku.
2. Po přidání 350 μ l Lysis Buffer RA1 se tekutina přelije do zkumavky, v digestoři přikápnuto 3,5 μ l β -merkaptetanolu a promícháno pomocí vortexu.

3. Následně byla směs nanášena na kolonu NucleoSpin® Filter (fialová), poté centrifugace 1 min. při 11 000 g. NucleoSpin® Filter separován a odstraněn a filtrát transferován pomocí pipety do nové zkumavky.
4. Poté bylo přidáno 350 µl ethanolu (70 %) a promícháno pipetou 5x násátím a vypuštěním.
5. Lyzát přenesen na kolonu NucleoSpin® RNA Plant Column (modrá), poté centrifugace 30 sekund při 11 000 g.
6. Kolona byla přemístěna do nové zkumavky a poté přidáno 350 µl Membrane Desalting Buffer, dále centrifugace 1 min. při 11 000 g.
7. Přidáno 95 µl DNase reaction mixture. Poté inkubace 15 min. při laboratorní teplotě.
8. Následně přidáno 200 µl promývacího pufru Buffer RAW2, poté centrifugace 30 sekund při 11 000 g.
9. Kolona opět přemístěna do nové zkumavky, následně nanášeno 600 µl promývacího pufru Buffer RA3, poté centrifugace 30 sekund při 11 000 g. Filtrát odstraněn a krok opakován s 250 µl promývacího pufru Buffer RA3 a centrifugací po dobu 2 min. při 11 000 g.
10. Kolona přemístěna do nové zkumavky NucelaseFree a promyta 40 µl RNase-free H₂O. Následovala centrifugace 1 min. při 11 000 g.

4.3 Reverzní transkripce RNA na cDNA

Práce s cDNA probíhá z důvodu nízké stability RNA a rovněž polymerázová řetězová reakce může pracovat jen s DNA templáty.

RNA o vyhovující koncentraci byla následně přepsána na cDNA ve dvou krocích. K reverzní transkripci byly využity chemikálie od firmy Promega (Promega, Madison, USA). Nejprve byla namíchána reakční směs dle **Tab. 2**, dále proběhla inkubace 5 min. při 70 °C, poté chlazení 5 min. na ledu. Ve druhém kroku byla namíchána druhá reakční směs dle **Tab. 3**, která byla přidána do premixu 1 a následně inkubována 60 min. při 42 °C.

Tab. 2 Složení reakční směsi (premix 1)

	Množství na 1 reakci
Ultračistá H ₂ O	9,5 µl
Primer (oligo dT)	0,5 µl
RNA vzorek (cca 100ng/µl)	5 µl
celkem	15 µl

Tab. 3 Složení reakční směsi (premix 2)

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

4.4 Navržení primerů pro kvantitativní Real-Time PCR

K navržení primerů byla použita plná verze software Oligo 7.0 (Molecular Biology Insights, Colorado Springs, USA), která umožňuje identifikaci možných dimerů a duplexů v rámci jednoho i mezi páry primerů a jejich grafické znázornění. Předlohou pro návrh byly sekvence odpovídající vybraným výsledkům MACE (Massive Analysis of cDNA Ends) analýzy provedená firmou GenXpro (Frankfurt am Main, Německo).

Jelikož úseky z paralelního MACE sekvenování byly pro navržení primerů krátké, jako matrice pro návrh posloužily odpovídající sekvence z databáze GenBank a především z nově zpřístupněná databáze The Pea RNA-Seq gene atlas (INRA, Paris, Francie). Celkem bylo vybráno 20 kandidátních genů. Tato práce se zabývala třemi z nich, na které byly navrženy páry primerů amplifikující úsek o délce 100-130 párů bazí.

Tab. 4 Primerové kombinace pro kandidátní geny

	primery	poznámky
Kandidátní gen 1	Ps02F: GCTGGATGGACCCAAGTA	Produkt: 174 bp, T _m = 82,4 °C 3x 3' dimer AT, vnitřní dimery nízké
	Ps02R: CGAAGTGAGCCCTTTCTTA	
Kandidátní gen 2	Ps09F: ATTATAAGAGAGGGTGTCCGA	Produkt: 120 bp, T _m = 61 °C
	Ps09R: GACAACATTTGGTGCAGA	
Kandidátní gen 3	Ps15F: CACCGTCATCTACTACCACA	Produkt: 132 bp, T _m = 65 °C
	Ps15R: CACCGACCAAAATTGTAATGGA	

4.5 Kvantitativní Real-Time PCR

Kvantitativní Real-Time PCR (qRT-PCR) má schopnost kvantifikace templátové DNA (respektive cDNA). Princip metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase je založen na emisi světla fluorescenčního barviva, v našem případě SYBR Green, vázícího se na dvouvláknovou DNA, které je přímo úměrná amplifikaci templátové cDNA. Emitovaná fluorescence SYBR Green, která nastává po navázání na dsDNA po každém cyklu PCR, je zaznamenávána v reálném čase, což vede k detekci množství dsDNA po každém cyklu a vytvoření amplifikačních křivek.

Vyšší koncentrace vstupní (templátové) cDNA do reakce oproti kontrole (referenční gen tzv. housekeeping gen, který je exprimován v průběhu ontogeneze přibližně konstantně) značí vyšší expresi příslušného genu a naopak. Jako referenční gen byl použit β -tubulin amplifikovaný podle publikovaných specifických primerů (Die a kol., 2010).

Reakční směs pro qRT-PCR byla namíchána dle **Tab. 5**, byl použit komerční kit LC 480 SYBR Green I Master (Roche, Bazilej, Švýcarsko). Reakční směs byla rozpietována do Real-Time PCR destičky (**Tab. 6**). Každý vzorek byl nanášen ve třech opakováních tzv. triplikátech. Následně byla destička vložena do termocykleru BioRad C1000 s real-time systémem CFX96 (BioRad, Hercules, USA) a spuštěn PCR program s následnou analýzou HRM (High Resolution Melt). Schéma průběhu PCR je znázorněno na **Obr. 5**.

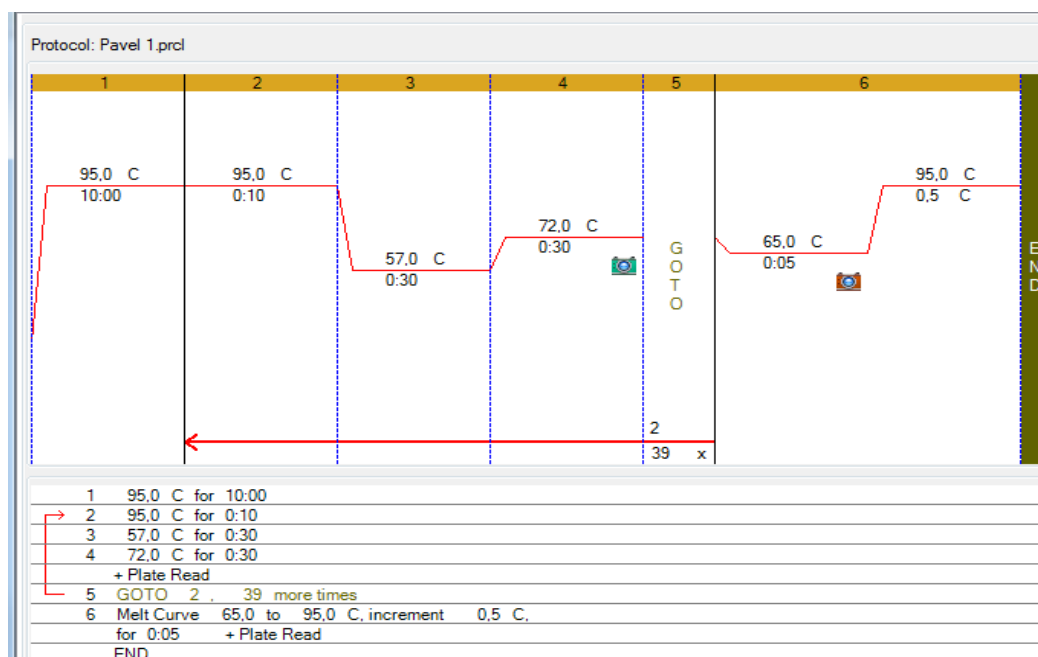
Tab. 5 Složení reakční směsi pro Real-Time PCR

	Množství na 1 reakci
Ultračistá H ₂ O	1,4 μ l
Primer F	0,8 μ l
Primer R	0,8 μ l
Sybr Master mix	5 μ l
DNA vzorek	2 μ l
celkem	10 μ l

Tab. 6 Rozmístění vzorků a primerů na qRT-PCR destičce

(P = primer)

P1 JI64_V_II.st	P2 JI64_V_II.st	P3 JI64_V_II.st	P4 JI64_V_II.st	P5 JI64_V_II.st	P6 JI64_V_II.st	P7 JI64_V_II.st	P8 JI64_V_II.st	P9 JI64_V_II.st	P10 JI64_V_II.st	P11_tub JI64_V_II.st
P1 JI64_V_II.st	P2 JI64_V_II.st	P3 JI64_V_II.st	P4 JI64_V_II.st	P5 JI64_V_II.st	P6 JI64_V_II.st	P7 JI64_V_II.st	P8 JI64_V_II.st	P9 JI64_V_II.st	P10 JI64_V_II.st	P11_tub JI64_V_II.st
P1 JI64_V_II.st	P2 JI64_V_II.st	P3 JI64_V_II.st	P4 JI64_V_II.st	P5 JI64_V_II.st	P6 JI64_V_II.st	P7 JI64_V_II.st	P8 JI64_V_II.st	P9 JI64_V_II.st	P10 JI64_V_II.st	P11_tub JI64_V_II.st
P1 JI92_V_II.st	P2 JI92_V_II.st	P3 JI92_V_II.st	P4 JI92_V_II.st	P5 JI92_V_II.st	P6 JI92_V_II.st	P7 JI92_V_II.st	P8 JI92_V_II.st	P9 JI92_V_II.st	P10 JI92_V_II.st	P11_tub JI92_V_II.st
P1 JI92_V_II.st	P2 JI92_V_II.st	P3 JI92_V_II.st	P4 JI92_V_II.st	P5 JI92_V_II.st	P6 JI92_V_II.st	P7 JI92_V_II.st	P8 JI92_V_II.st	P9 JI92_V_II.st	P10 JI92_V_II.st	P11_tub JI92_V_II.st
P1 JI92_V_II.st	P2 JI92_V_II.st	P3 JI92_V_II.st	P4 JI92_V_II.st	P5 JI92_V_II.st	P6 JI92_V_II.st	P7 JI92_V_II.st	P8 JI92_V_II.st	P9 JI92_V_II.st	P10 JI92_V_II.st	P11_tub JI92_V_II.st



Obr. 5 Schéma programu pro qRT-PCR na cycleru BioRad C1000

5 VÝSLEDKY

5.1 Výběr vzorků RNA

Po izolaci RNA byla změřena její koncentrace pomocí PicoDrop spektrofotometru (Hinxton, Spojené království). Byly vybrány pouze RNA s koncentrací nad 100 ng/μl (**Tab. 7**).

Tab. 7 Hodnoty koncentrací RNA

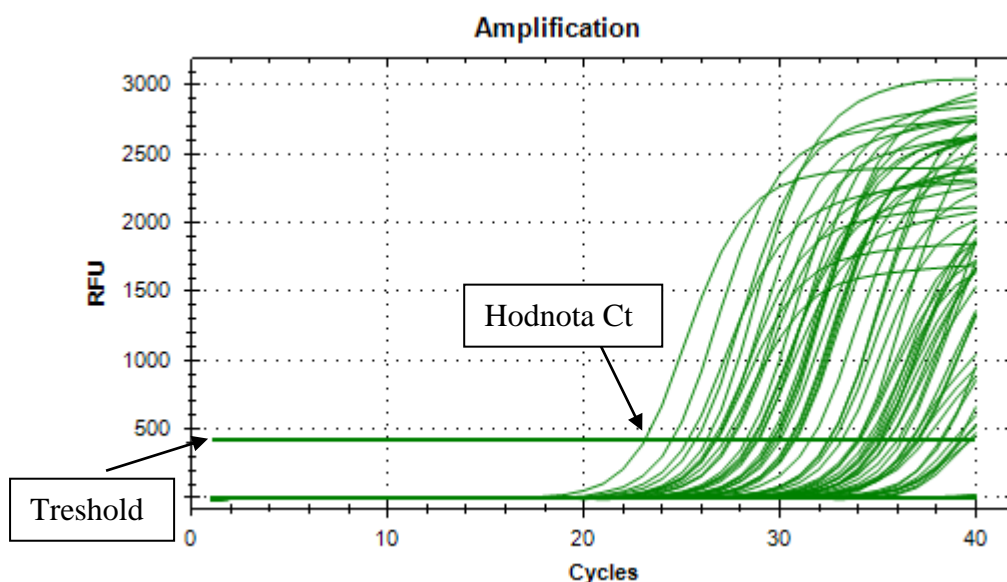
(D = dorsální šev, V = ventrální šev)

č.	vzorek	Koncentrace RNA ng/μl
43	Jl64 D I. stadium	179,9
44	Jl64 V I. stadium	669,6
45	Jl92 D I. stadium	190,5
46	Jl92 V I. stadium	179,6
47	Jl92 D II. stadium	202,3
49	Jl64 D II. stadium	586,4
50	Jl64 V II. stadium	483,2
53	Jl64 D III. stadium	195,7
54	Jl64 V III. stadium	182,0
58	Jl92 V II. stadium	121,7

5.2 Výsledky kvantitavní Real-Time PCR

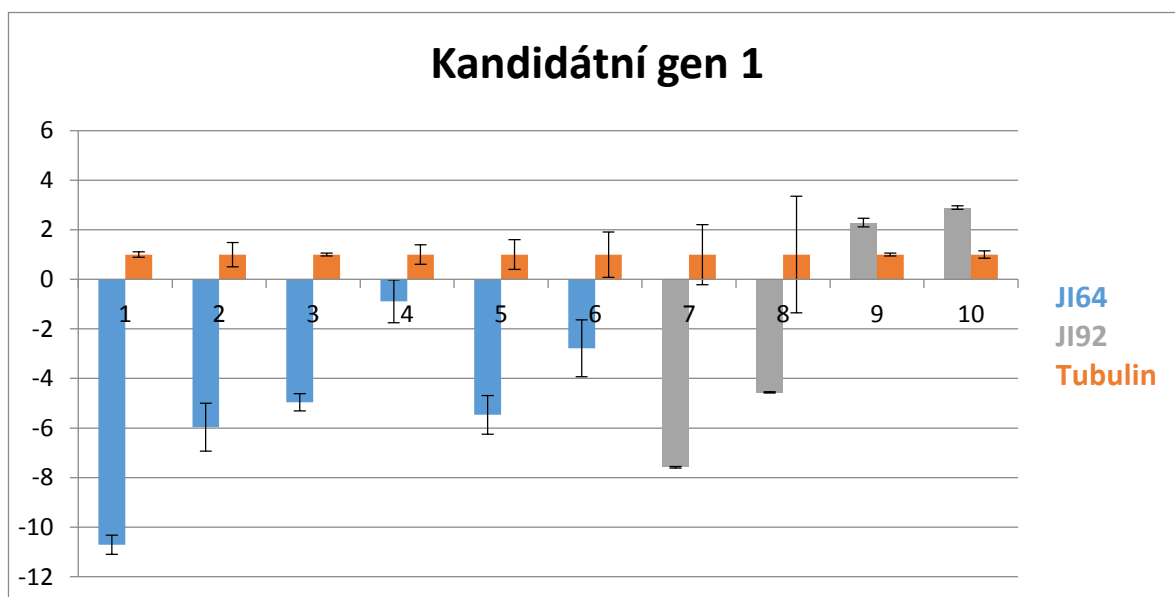
Termocycler BioRad vygeneroval amplifikační křivky (**Obr. 6**) a hodnoty C_t , na jejichž základě byly výsledky qRT-PCR posuzovány.

Hodnota C_t (cycle of treshold) nám udává počet cyklů, kdy intenzita fluorescence dosáhne prahu citlivosti (treshold). Čím je hodnota C_t nižší, tím více bylo templátové cDNA ve vzorku a tím byla vyšší i exprese genů. Dále byly vypočteny hodnoty ΔC_t , jako rozdíl hodnoty C_t zkoumaného genu a hodnoty C_t referenčního genu. Hodnota ΔC_t respektive její převrácená hodnota byla nanášena do grafu spolu s hodnotou 1, která byla určena pro referenční gen β -tubulin.



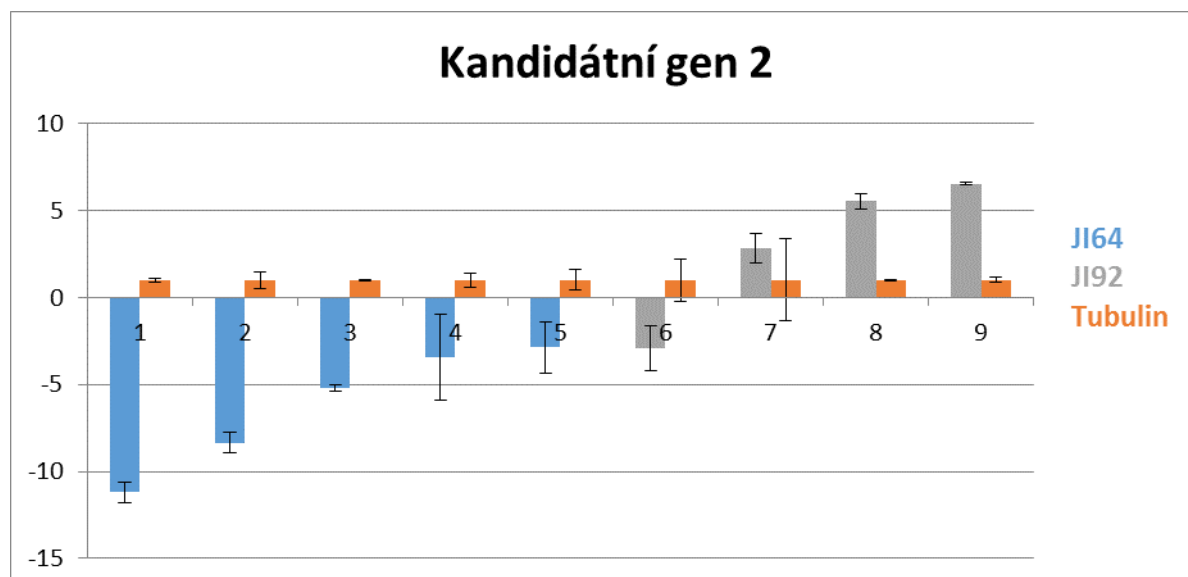
Obr. 6 Výstup z Termocycleru BioRad C1000: Amplifikační křivky

5.3 Expresa kandidátních genů



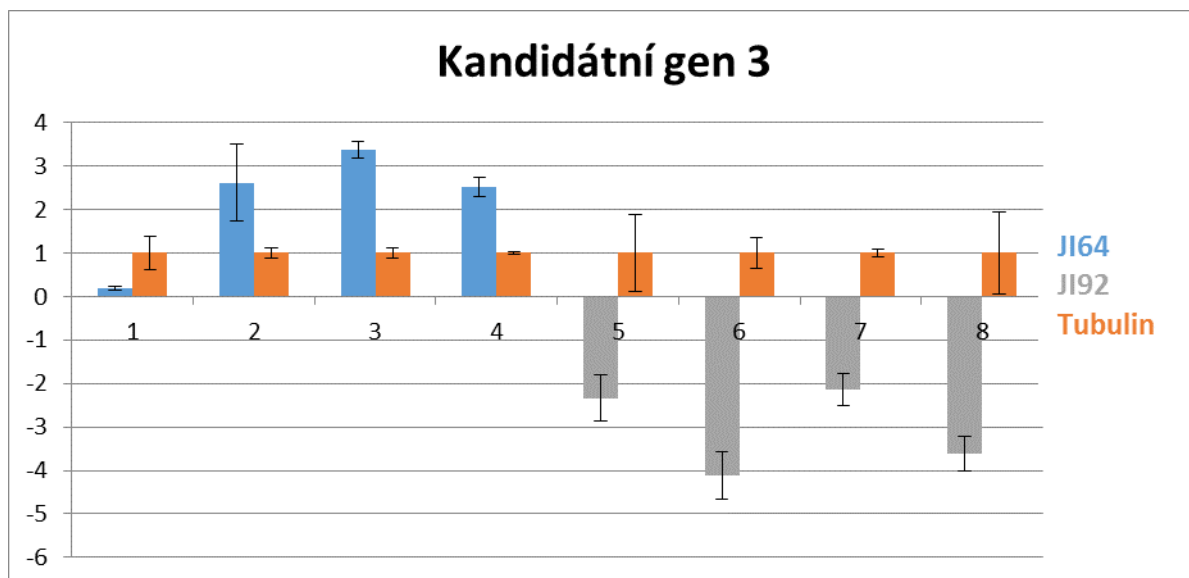
Obr. 7 Grafické znázornění vyhodnocení exprese kandidátního genu 1

primerová kombinace č. 2 (1 = dorsální šev I. stadia, 2 = ventrální šev I. stadia, 3 = dorsální šev II. stadia, 4 = ventrální šev II. stadia, 5 = dorsální šev III. stadia, 6 = ventrální šev III. stadia, 7 = dorsální šev I. stadia, 8 = ventrální šev I. stadia, 9 = dorsální šev II. stadia, 10 = ventrální šev II. stadia)



Obr. 8 Grafické znázornění vyhodnocení exprese kandidátního genu 2

primerová kombinace č. 9 (1 = dorsální šev I. stadia, 2 = ventrální šev I. stadia, 3 = dorsální šev II. stadia, 4 = ventrální šev II. stadia, 5 = dorsální šev III. stadia, 6 = dorsální šev I. stadia, 7 = ventrální šev I. stadia, 8 = dorsální šev II. stadia, 9 = ventrální šev II. stadia)



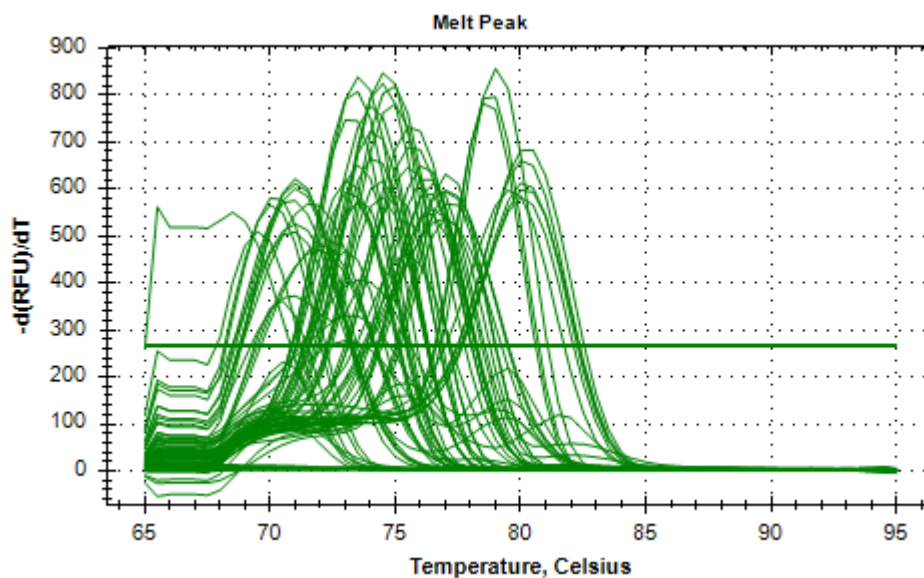
Obr. 9 Grafické znázornění vyhodnocení exprese kandidátního genu 3

primerová kombinace č. 15 (1 = dorsální šev I. stadia, 2 = ventrální šev I. stadia, 3 = dorsální šev II. stadia, 4 = ventrální šev II. stadia 5. = dorsální šev I. stadia, 6 = ventrální šev I. stadia, 7 = dorsální šev I. stadia, 8 = ventrální šev II. stadia)

5.4 Ověření specifity primerů

Pomocí křivek HRM (High Resolution Melt), které byly vygenerovány termocycle-rem BioRad C1000 společně s amplifikačními křivkami, bylo ověřeno, zda se v qRT-PCR netvořily nespecifické produkty. Křivka HRM ukazuje závislost teploty a intenzity fluorescence, kdy při vysoké teplotě dochází k rozvolnění dsDNA a tím tedy klesá intenzita fluorescence. Jak je na **Obr. 10** vidět většina křivek HRM tvoří pouze jeden vrchol, což je dokazuje tvorbu specifického produktu.

Po skončení qRT-PCR byly vzorky z PCR destičky smíchány s nanášecím pufrem a naneseny na agarózový gel, po proběhnutí horizontální elektroforézy, byly pod UV zářením vizualizovány vzorky ze všech jamek PCR destičky (**Přílohy 2, 3**), ve většině případů byl též identifikován jeden, tedy specifický produkt.



Obr. 10 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HMR)
vzorek č. 44 a 46, primery 1-10

6 DISKUSE

Objasnění genetické podstaty klíčových domestikačních znaků zemědělských plodin je v posledních desetiletích těžištěm zájmu šlechtitelů. Jedním z důvodů je usnadnění využití potenciálu planých forem rostlin pro novošlechtění. Plané druhy ve svém genomu nesou důležité geny rezistence, ale na druhé straně také pro šlechtění nežádoucí vlastnosti jako je vyšší obsah antinutričních látek, dormance semen nebo rozpadavost plodů. V případě luskovin je jedním z nežádoucích znaků planých zástupců pukavost dozrálých lusků.

Genetická podstata ztráty pukavosti lusku během domestikace bobovitých byla recentně objasněna například u sóji (Dong a kol., 2014). Zodpovědným byl v tomto případě identifikován gen *SHATI-5* domény *NAC* transkripčních faktorů. Předpokládaná funkce tohoto genu je v ovlivnění procesu sekundárního tloustnutí buněčné stěny. V případě hrachu je u kulturních forem pravděpodobný obdobný mechanismus ztráty pukavosti lusku ovšem s odlišnou genetickou podstatou. Již dříve byl znak pukavosti lusku lokalizován na LGIII v oblasti *Dpo* (Weeden, 2007; Bordat a kol., 2011), ale konkrétní gen nebyl dosud publikován.

Tato práce se zabývala testováním genových kandidátů generovaných na základě výsledků MACE (Massive Analysis of cDNA Ends) analýzy. Metoda masivní analýzy cDNA konců byla v nedávné minulosti úspěšně použita ke studiu genové exprese Zajacem a kol. (2015), nebo Fondevillovou a kol. (2015). V případě analýzy genové exprese hrachu byla použita mRNA z pletiv švů lusků během dozrávání. Srovnávány byly genotypy plané (pukavé lusky), kulturní (nepukavé lusky) a dále RILs kříženců obou v F6, soubory s pukavými a nepukavými lusky. V 10 milionech čtení bylo u těchto skupin identifikováno 7 tisíc genů, z nichž 77 bylo v rámci pukavých/nepukavých genotypů vyhodnoceno s minimálním rozdílem ve změně, jejíž dekadický logaritmus dvou je větší než tři (fold change $\log_2 > 3$).

Pro tuto práci byli z této skupiny vybráni tři kandidáti. Testování těchto kandidátních genů bylo provedeno pomocí qRT-PCR. Jako templát byla použita cDNA z genotypů JI64 (planý hrách *Pisum sativum* ssp. *elatius*, lusky pukavé) a JI92 (afghánský typ kulturního hrachu *P. sativum* ssp. *sativum*, lusky nepukavé) získaná přepisem mRNA z pletiv švů lusků v různých stádiích dozrávání.

Vyhodnocení exprese kandidátních genů bylo stanoveno dle metody ΔC_t . Jako vnitřní kontrola hodnoty exprese byl využit referenční gen pro β -tubulin (Die a kol., 2010).

V případě kandidátního genu č. 1 míry exprese nejsou jednoznačné mezi jednotlivými vzorky. Především u nepukavého kulturního hrachu, kdy graf ukázal v některých případech silnou a v některých slabou expresi. Gen č. 1. byl tedy jako vhodný kandidát zamítnut. U kandidátního genu č. 2 byly prokázány jednoznačné výsledky. Na druhé straně genotyp s pukavými lusky vykazoval nižší expresi tohoto genu a genotyp s nepukavými lusky vyšší. V tomto případě ale nastává nesoulad s předpokladem, že domestikované geny v plodině bývají obvykle exprimovány v nižší míře než identické geny v plané rostlině. V analýze MACE k takto diferencované expresi došlo též v relativně malém počtu případů. Naopak většina genů, které vykazovaly rozdílnou expresi mezi pukavými a nepukavými genotypy, byla exprimována ve vyšší míře u genotypů pukavých (73 oproti 4). Jako nejvhodnější kandidátní gen zodpovědný za ztrátu pukavosti lusku se jeví gen č. 3 z důvodu silnější exprese v případě planého hrachu a naopak slabší exprese u hrachu kulturního. Tento výsledek koresponduje s faktem, že homolog genového kandidáta č. 3 byl na základě mapy SNPs u *Medicago truncatula* (nejbližším příbuzným druhem k hrachu s úplně přečteným genomem) lokalizován na LG II v místě u hrachu translokovaném na LG III a to přibližně v oblasti *Dpo*, tedy lokusu, který je pro zodpovědnost za pukavost lusku u hrachu předpokládán (Weeden, 2007; Bordat a kol., 2011).

7 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala domestikačními znaky rostlin. Konkrétně byla práce zaměřena na identifikaci genetické podstaty ztráty pukavosti lusku u hrachu.

Z vybraných tří genových kandidátů byl pomocí qRT-PCR identifikován jako nejvhodnější kandidát č. 3. Pro potvrzení tohoto předpokladu, je třeba ještě provést následující kroky: sekvenování odpovídajícího úseku DNA včetně promotorů u rodičovských genotypů a zjištění rozdílů na úrovni DNA, následné porovnání těchto výsledků s hodnocením fenotypu u RILs (pukavost/nepukavost lusku). V případě shody se bude jednat o silnou indicii, že daný kandidátní gen je zodpovědný za ztrátu pukavosti lusku u domestikovaného hrachu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BLIXT S., 1972: Mutation genetics in *Pisum*. Agri Hort. Genetica, Vol. 30: 1–293. ISSN: 1573-6857

BORDAT A., SAVOIS V., NICOLAS M., SALSE J., CHAUVEAU A., BOURGEOIS M., POTIER J., HOUTIN H., ROND C., MURAT F., MARGET P., AUBERT G., BURSTIN J., 2011: Translational genomics in legumes allowed placing in silico 5460 unigenes on the pea functional map and identified candidate genes in *Pisum sativum* L.

G3: Genes, Genomes, Genetics, Vol. 1 (2): 93-103. ISSN: 2160-1836

DIE J. V., ROMAN B., NADAL S., GONZALEZ-VERDEJO C., 2010: Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. Planta, Vol. 232: 145–153. ISSN: 1432-2048

DOLEZEL J., GREILHUBER J., 2010: Nuclear genom size: are we getting closer? Cytometry A, Vol. 77A: 635-642. ISSN: 1552-4930

DONG Y., YANG X., LIU J., WANG B.-H., LIU B.-L., WANG Y.-Z., 2014: Pod shattering resistance associated with domestication is mediated by a NAC gene in soybean. Nature Communications, Vol. 5: art. no. 3352. ISSN: 2041-1723

FONDEVILLA S., KREZDORN N., ROTTER B., KAHL G., WINTER P., 2015: In planta identification of putative pathogenicity factors from the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* by De novo transcriptome sequencing using RNA-Seq and massive analysis of cDNA ends. Frontiers in Microbiology, Vol. 6 (DEC): art. no. 01329. ISSN: 1664-302X

GENTZBITTEL L., ANDERSEN S. U., BEN C., RICKAUER M., STOUGAARD J., YOUNG N. D., 2015: Naturally occurring diversity helps to reveal genes of adaptive importance in legumes. Frontier in Plant Science, Vol. 6: 1-8. ISSN: 1664-462X

GROSS B. L., OLSEN K. M., 2010: Genetic perspectives on crop domestication. Trends Plant Science, Vol. 15(9): 529–537. ISSN: 1878-4372

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

JING R., VERSHININ A., GRZEBYTA J., SHAW P., SMÝKAL P., MARSHALL D., AMBROSE M. J., ELLIS TH N., FLAVELL A. J., 2012: The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evolutionary biology*, Vol. 10 (44): 1-20. ISSN: 1471-2148

KOČÁR P., DRESLEROVÁ D., 2010: Archeobotanické nálezy pěstovaných rostlin v pravěku České republiky. *Památky archeologické CI*, Vol. 1: 203-242. ISSN: 0031-0506

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

LI C, ZHOU A, SANG T., 2006: Genetic analysis of rice domestication syndrome with the wild annual species, *Oryza nivara*. *New Phytologist*, Vol. 170: 185–194. ISSN: 1469-8137

MACAS J., NEUMANN P., NAVRÁTILOVÁ A., 2007 Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*, Vol. 8: Art. no. 427. ISSN: 1471-2164

MADOU. M. A., LABADIE K., AURY J. M., COYNE C. J., WARKENTIN T., KREPLAK J., LICHTENZVEIG J., DOLEZEL J., AUBERT G., BERGÈS H., WINCKER P., BURSTIN J., 2015: The international pea genome sequencing project: sequencing and assembly progresses.

In PLANT and ANIMAL genome XXIII [on-line]. San Diego, CA [vid. 29. 3. 2016].
Dostupné z: <https://pag.confex.com/pag/xxiii/webprogram/Paper14072.html>

MEYER R. S., PURUGGANAN M. D., 2013: Evolution of crop species: Genetics of domestication and diversification. *Nature*, Vol. 14: 840-853. ISSN: 1476-4687

MIKIĆ A., 2014: Grain legume crop History among Slavic nations traced using linguistic evidence. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, Vol. 50: 65-68. ISSN 1212-1975

OLSEN K. M., WENDEL J. F., 2013: Crop plants as model for understanding plant adaptation and diversification. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 4: 1-16. ISSN: 1664-462X

REID J. B., ROSS J. J., 2011: Mendel's genes: toward a full molecular characterization. *Genetics*, Vol. 189 (1): 3-10. ISSN: 1943-2631

SAKUMA S., SALOMON B., KOMATSUDA T., 2011: The domestication syndrome genes responsible for the major changes in plant form in the *Triticeae* crops. *Plant and Cell Physiology*, Vol. 52(5): 738-749. ISSN: 1471-9053

SCHAEFER H., HECHENLEITNER P., SANTOS-GUERRA A., MENEZES DE SEQUEIRA 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*, Vol. 12 (250): 1-19. ISSN: 1471-2148

SINDHU A., RAMSAY L., SANDERSON L. A., STONEHOUSE R., LI R., CONDIE J., SHUNMUGAM A. S. K., LIU Y., JHA A. B., DIAPARI M., BURSTIN J., AUBERT G., TAR'AN B., BETT K. E., WARKENTIN T. D., SHARPE A. G., 2014: Gene-based SNP discovery and genetic mapping in pea. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 127: 2225-2241. ISSN: 1432-2242

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

Smýkal P., 2006: Hrách v genomickém věku – 140 od Mendelova objevu. *Živa*, Vol. 4: 149-151. ISSN: 0044-4812

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

SMÝKAL P., 2011: Fylogeneze, biogeografie a genetická diverzita rodu hrách. *Živa*, Vol. 4: 151-154. ISSN: 0044-4812

SMÝKAL P., AUBERT G., BURSTIN J., COYNE C., ELLIS N., FLAVELL A., FORD R., MACAS J., NEUMANN P., MCPHEE K., REDDEN R., RUBIALES D., WARKENTIN T. D., 2012: Pea (*Pisum sativum* L.) in the genomic era. *Agronomy*, Vol. 2: 74-115. ISSN: 2073-4395

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., 2015: Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Vol. 34: 43–104. ISSN: 1549-7836

SMÝKAL P., VERNOUD V., BLAIR M. W., SOUKUP A., THOMPSON R. D., 2014: The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 5 (351): 1-19. ISSN: 1664-462X

STEELE K. P., WOJCIECHOWSKI M. F., 2003: Phylogenetic analyses of tribes Trifolieae and Vicieae, based on sequences of the plastid gene matK (Papilionoideae: Leguminosae), s. 355–370. In: Klitgaard B. B., Kew B. A., (Eds): *Advances in Legume Systematics 10: The Royal Botanic Gardens*. ISBN: 9781842460542

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

WEEDEN N. F., BRAUNER S., PRZYBOROWSKI J. A., 2002: Genetic analysis of pod dehiscence in pea (*Pisum sativum* L.). Cellular and Molecular Biology Letters, Vol. 7 (2B): 657-663. ISSN: 1689-1392

WEEDEN N. F., 2007: Genetic changes accompanying the domestication of *Pisum sativum*: Is there a common genetic basis to the 'domestication syndrome' for legumes? Annals of Botany, Vol. 100: 1017-1025. ISSN: 1095-8290

ZAJAC B. K., AMENDT J., HORRES R., VERHOFF M. A., ZEHNER R., 2015: De novo transcriptome analysis and highly sensitive digital gene expression profiling of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) pupae using MACE (Massive Analysis of cDNA Ends). Forensic Science International, Vol. 15: 137-146. ISSN: 0379-0738

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

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Domnělá centra původu důležitých luskovin</i>	14
<i>Obr. 2 Schématické znázornění fylogenetických vztahů tribu Fabeae</i>	15
<i>Obr. 3 Zralý lusk linie JI64 a JI92</i>	19
<i>Obr. 4 Dorsální a ventrální šev lusku</i>	20
<i>Obr. 5 Schéma programu pro qRT-PCR na cycleru BioRad C1000</i>	25
<i>Obr. 6 Výstup z Termocycleru BioRad C1000: Amplifikační křivky</i>	27
<i>Obr. 7 Grafické znázornění vyhodnocení exprese kandidátního genu 1</i>	28
<i>Obr. 8 Grafické znázornění vyhodnocení exprese kandidátního genu 2</i>	28
<i>Obr. 9 Grafické znázornění vyhodnocení exprese kandidátního genu 3</i>	29
<i>Obr. 10 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HMR)</i>	30

10 SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Výsledky genetických studií znaků tvořící syndrom domestikaci hrachu</i>	18
<i>Tab. 2 Složení reakční směsi (premix 1)</i>	22
<i>Tab. 3 Složení reakční směsi (premix 2)</i>	22
<i>Tab. 4 Primerové kombinace pro kandidátní geny</i>	23
<i>Tab. 5 Složení reakční směsi pro Real-Time PCR</i>	24
<i>Tab. 6 Rozmístění vzorků a primerů na qRT-PCR destičce</i>	25
<i>Tab. 7 Hodnoty koncentrací RNA</i>	26

11 SEZNAM ZKRATEK

cDNA	complementary DNA
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	deoxynucleoside triphosphates
dsDNA	Double-Stranded DNA
Dpo	locus pod dehiscence
GWASs	genome-wide association studies
HMR	High-resolution Melt Analysis
MACE	massive analysis of cDNA ends
mRNA	mediátorová Ribonucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
QLT	Quantitative Trait Locus
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription - PCR
RILs	Recombinant Inbred Line
RNA	Ribonucleic Acid
SNP	Single Nucleotid Polymorfism

12 PŘÍLOHY

12.1 Seznam příloh

- | | |
|------------------|--|
| Příloha 1 | Genová mapa chromozomů <i>Pisum sativum</i> L. (Bordat, 2011) |
| Příloha 2 | Vizualizace qRT-PCR pomocí elektroforézy na agarozovém gelu
(primery 1-10, vzorky č. 44, 46) |
| Příloha 3 | Vizualizace qRT-PCR pomocí elektroforézy na agarozovém gelu
(primery 11-20, vzorky č. 44, 46) |