

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Michala Chaloupská

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Morfologické a molekulární studium fylogeneze a
genetické diverzity druhů *Vicia tetrasperma*, *Lathyrus
ochrus* a *Lathyrus clymenum*, nejbližších příbuzných
rodu *Pisum***

Bakalářská práce

Michala Chaloupská

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Petra Smýkala, Ph.D. a jen s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci 6.5. 2013

podpis

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Michala Chaloupská

Název práce: Morfologické a molekulární studium fylogeneze a genetické diverzity druhů *Vicia tetrasperma*, *Lathyrus ochrus* a *Lathyrus clymenum*, nejbližších příbuzných rodu *Pisum*

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP

Vedoucí práce: Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt: Poznání fylogenetických vztahů v rámci čeledi bobovitých (*Leguminosae*), je velmi důležité pro porozumění původu a rozrůznění této ekologicky a ekonomicky důležité čeledi. Tato třetí nejrozsáhlejší čeleď vyšších rostlin, zahrnuje více než 850 rodů s přibližně 20 tisíci druhy, včetně domestikovaných druhů. Bakalářská práce si klade za cíl, literární rešerši rozsáhlého dostupného materiálu a syntézu dostupných poznatků na téma využití DNA a morfologických znaků pro účely taxonomických a fylogenetických studií rostlin čeledi *Leguminosae* se zaměřením na podčeď *Fabeae/Vicieae*.

Bude studována morfologická variabilita a genetická diverzita pomocí DNA sekvencí tří vybraných druhů, identifikovaných v předchozím studiu jako fylogeneticky nejbližších příbuzných rodu *Pisum*.

Klíčová slova: genetická diverzita, molekulární fylogeneze, morfologie, *Vicia*, *Pisum*, *Lathyrus*

Počet stran: 53

Počet příloh: 4

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Michala Chaloupská

Title: Morphological and molecular analysis of phylogeny and genetic diversity of *Vicia tetrasperma*, *Lathyrus ochrus* and *Lathyrus clymenum*, the *Pisum* genus closest relatives.

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

The year of representation: 2013

Abstract: Knowledge of phylogenetic relationships within the legume family (*Leguminosae*) is very important for understanding the origin and diversification of this ecologically and economically important family. This is the third largest family of vascular plants, including more than 850 genera with about 20 thousand species, including domesticated species. Bachelor thesis aims, an extensive literature review and synthesis of available material available knowledge about the use of DNA and morphological characters for taxonomic and phylogenetic studies of plants of the family Leguminosae subfamily focusing on *Fabeae* / *Vicieae*.

Morphological variability and genetic diversity was studied using DNA sequences of three selected species identified in previous studies as phylogenetically closest relatives of the genus *Pisum*.

Keywords: genetic diversity, molecular phylogeny, morphology, *Vicia*, *Pisum*, *Lathyrus*

Number of pages: 53

Number of appendices: 4

Language: Czech

Obsah:

1	ÚVOD.....	1
1.1	Čeď Leguminosae.....	1
1.2	Podčeď <i>Fabeae</i>	3
1.3	Molekulární markery.....	5
1.4	Morfologické znaky.....	7
1.5	Popis jednolivých rodů podčeďi <i>Fabeae</i>	8
1.5.1	Rod <i>Vicia</i> (vikev).....	8
1.5.2	Rod <i>Lathyrus</i> (hrachor).....	9
1.5.3	Rod <i>Pisum</i> (hrách).....	11
1.5.4	Rod <i>Vavilovia</i> / druh <i>Vavilovia formosa</i>	13
1.6	Popis druhů použitých ve vlastní práci.....	13
1.6.1	<i>Vicia tetrasperma</i> (L). Schreber.....	13
1.6.2	<i>Lathyrus ochrus</i> (L). DC.....	14
1.6.3	<i>Lathyrus clymenum</i> L.....	14
2	METODIKA.....	16
2.1	Rostlinný material.....	16
2.1.1	Podmínky pěstování.....	18
2.1.2	Herbarizace.....	18
2.2	Skenování, stereomikroskopie- fotografická dokumentace.....	18
2.3	Morfometrické hodnocení.....	18
2.4	Analýza DNA.....	20
2.4.1	Isolace DNA.....	20
2.4.2	PCR amplifikace.....	21
2.4.3	Sekvenační a biostatické analýzy.....	25
3	VÝSLEDKY:.....	26
3.1	Výsledky z molekulární části práce.....	27
3.2	Vyhodnocení morfometrické části.....	34
4	DISKUSE:.....	37
5	ZÁVĚR:.....	42
6	PŘÍLOHY:.....	43
7	CITACE:.....	47

Poděkování:

Největší díky patří mému školiteli Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D., který mi vždy ochotně pomáhal a zasvěcoval do problematiky související s touto prací. Naučil mě orientaci v laboratoři a práci potřebné k vykonávání experimentů. Během naší spolupráce jsme sice narazili na nějaké překážky, ale vše jsme vždy vyřešili - dá se říci s úsměvem.

Dále bych chtěla poděkovat všem lidem se kterými jsem se během mé práce setkávala v laboratoři. Přestože jsme se právě v laboratoři viděli poprvé, kdykoliv jsem něco potřebovala a Dr. Smýkal nebyl na dohled, rádi mi pomohli.

Za měření morfometrických částí mé práce vděčím paní Ing. Ivě Smýkalové, Ph.D., které bych alespoň touto cestou chtěla poděkovat.

Jedno obrovské díky patří také rodině a přátelům, kteří tolerovali mé výkyvy nálad během psaní.

Děkuji Vám.

1 ÚVOD

1.1 Čeleď Leguminosae

Taxonomie této čeledi je dosud ne zcela jednotná a existující tři alternativní možnosti zařazení: 1) *Leguminosae* je chápána jako čeleď a *Mimosoideae* a *Caesalpinioideae* jako podčeledi, nebo 2) *Leguminosae* = *Fabaceae*, zahrnující tři podčeledi: *Faboideae* (= *Papilionoideae*), *Mimosoideae* a *Caesalpinioideae* a nebo 3) *Fabaceae* (= *Papilionaceae*) je chápána jako čeleď stejně jako *Mimosaceae* a *Caesalpiniaceae* (Lewis et al. 2005).

Čeleď *Leguminosae* zahrnuje byliny a dřeviny, s výjimkou rostlin adaptovaných na vodní prostředí. Tato čeleď má hned několik zajímavostí. Rostliny patřící do *Leguminosae* (*Fabaceae*) rostou na půdách ochuzených o dusík, proto na svých kořenech mají speciální útvary - hlízky, které jim vyrůstají po infekci nitrogenními bakteriemi rodu *Rhizobium*. Jedná se o symbiózu, kde bakterie metabolizují atmosférický dusík na amonný iont, který využívá hostitelská rostlina, za úplatek v podobě jednoduchých cukrů, které si naopak bakterie berou od rostliny. Rostliny čeledi *Leguminosae* mají listy střídavé, nejčastěji složené, jednoduše zpeřené nebo dlanitě složené, vzácněji jednoduché, palistnaté, výjimečně palisty chybějí. Květenství je hroznovité (rod *Vicia*), méně často jsou květy jednotlivě (rody *Lathyrus*, vzácněji *Vicia* nebo *Pisum*). Květy jsou oboupohlavné, souměrné, kalich srůstá z pěti lístků, korunu tvoří pět lístků volných rozlišených na pavézu, křídla a člunek, kde pavéza je v rovině souměrnosti. V pupenu pavéza obaluje ostatní části květu (sestupná estivace). Dva sousedící lístky - křídla, a člunek srůstající ze dvou zbylých lístků. Tyčinek bývá 10 v kruhu, buď 10 nitkami srostlých nebo 9 srostlých a jedna volná pod pavézou. Vzácněji jsou volné všechny. Pylová zrna mají samostatně, trikolpátní výjimečně tetrakolpátní. Mají apokarpní gyneceum tvořeno jedním plodolistem, semeník svrchní, vajíčka četná nebo pouze jedno, příčná, s jedním až dvěma integumenty, čnělka terminální, vyrůstající na břišním švu. Plodem je lusk (legume) pukající v jednom nebo ve dvou švech, lusk ve většině případů postrádá přepážky, vzácně se vyskytuje s podélnou přepážkou. Může být nepukavý jako obdoba nažky, s jedním nebo více semeny, nebo zaškrcovaný a lámavý na jednosemenné díly (obdoba struku). Semena bez endospermu nebo s endospermem nepatrně vyvinutým jsou často se strofiolou (masitý výrůstek na bázi

poutka). Embryo této čeledi má velmi mohutně vyvinuté dělohy bohaté na škrob (30-60%) a bílkoviny (20-40%). Klíčení je epigeické (děložní lístky jsou vynášeny nad povrch jen u některých rostlin např. *Phaseolus*) nebo hypogeické (děložní lístky zůstávají pod zemí, např. *Pisum*) (Skalická & Skalický 1995). Čeleď zahrnuje 850 rodů, a 24 tisíc druhů rozšířených téměř po celém světě (Lewis *et al.* 2005). Dřeviny rostou spíše v teplejších oblastech, bylinné a vývojově starší dřeviny v meridionálním až temperátním pásu (Skalická & Skalický 1995).

Tabulka č. 1: Hlavní diagnostické znaky podčeledí.

Caesalpionideae	Mimosoideae	Papilionoideae
stromy, keře, liány	stromy, keře, liány, zřídka vodní byliny	byliny, keře, stromy, liány
relativně velké květy	malé květy uspořádané do hlávky nebo klasu	Typické hráškovité (motýlokvěté) květy
zygomorfni květy	aktinomorfni, radiálně souměrné	zygomorfni květy
okvětní lístky v poupěti střechovité	okvětní lístky se v poupěti nepřekrývají, ale jen dotýkají	okvětní lístky v poupěti střechovité
pokud je střední okvětní lístek přítomen překrývá ostatní	střední lístek nepřekrývá ostatní, je ve stejném tvaru a velikosti	střední okvětní lístek (klasická pavéza nebo prapor) přečnívá ostatní (ty občas chybí)
kališní lístky obvykle volné	kališní lístky (a okvětní) na bázi spojené	kališní lístky srostlé v kalich
semena bez pleurogramu (pokud je uzavřený) postrádá také hilum	semena s otevřeným pleurogramem	u tvrdých semen pupek (hilum) přítomno, pleurogram chybí
klíček rovný	klíček rovný	klíček zakřivený
listy dvakrát zpeřené, vzácně jednoduché nebo složené	listy dvakrát zpeřené často se specializovanými žlázami, australské akáty mají phylloides	listy jednoduché nebo, jednou zpeřené, některé zakončené úponkem, pouze některé druhy dvakrát zpeřené
tyčinky (1-) 10 a více, někdy dimorfické nebo heteromorfické	tyčinky (3-) 10 a více někdy přes 100	tyčinky (9-) 10 a více, někdy dimorfické
nejvíce nápadnou částí jsou okvětní lístky	nejvíce nápadnou částí jsou tyčinky	nejvíce nápadnou částí jsou okvětní lístky
polyads vzácně	polyads běžně	pyl je v samostatných zrnkách
hlízky na kořenech méně časté, ale často v	hlízky na kořenech přítomny	hlízky na kořenech přítomny

symbióze s houbami		
--------------------	--	--

(dle Lewis *et al.* 2005).

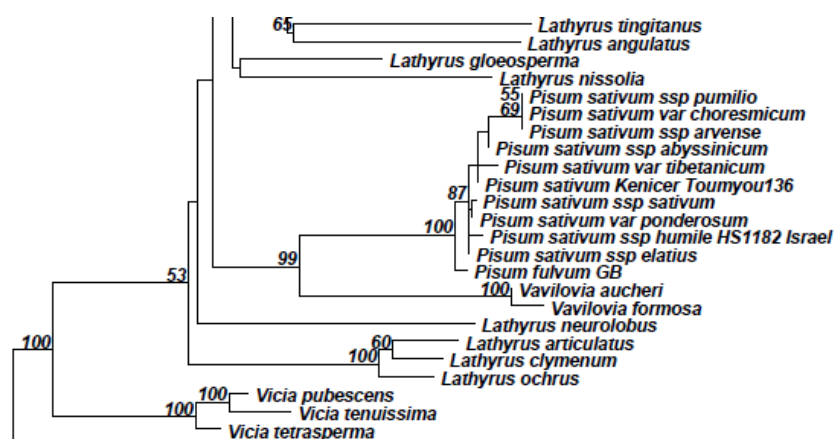
1.2 Podčeleď *Fabeae*

Podčeleď *Fabeae* (*syn. Viciae*) zahrnuje pět rodů z nichž některé patří mezi ekonomicky významné luskoviny pěstované na zrnno: *Lathyrus* (160 druhů), *Lens* (4 druhy), *Pisum* (2-3 druhy) a *Vicia* (140 druhů). Zbývající monotypický rod je *Vavilovia formosa* (Smýkal *et al.* 2009). Podčeleď je morfologicky charakterizována zpeřenými listy, často ukončenými úponkem, a čnělkou zakončenou kartáčkem. Tvar čnělky a uspořádání chloupků na čnělce jsou jedním z hlavních diagnostických znaků mezi rody *Fabeae* (Kupicha 1981, Endo *et al.* 2008). Tato podčeleď pravděpodobně vznikla ve východním Středomoří v období Miocénu. Během doby své existence se minimálně 39 krát rozšířila na území Eurasie, 7krát do Ameriky, 2 krát do tropické Afriky a 4 krát na území Makaronésie (Schaefer *et al.* 2012).

Taxonomicky je podčeleď *Fabeae* velmi zajímavou skupinou, kde díky modernějším metodám bylo postupně zjištěno několik zajímavostí. Podčeleď *Fabeae* byla v rámci čeledě *Leguminosae* považována za monofyletickou větev a vložena do podčeledi *Trifoleae* (Kupicha 1981, Wojciechowski *et al.* 2004, Steele & Wojciechowski 2003, Lock & Maxted 2005). V rámci *Fabeae*, rod *Vicia* je kladisticky vložený do rodů *Pisum*, *Lens* a *Lathyrus* takže je k nim parafyletický (Steele & Wojciechowski 2003, Endo *et al.* 2008). Fylogenetické vztahy podčeledi nejsou dosud uspokojivě vyřešeny, především vzhledem k nedostatečnému počtu analyzovaných druhů. Nedávno však byla publikována práce (Schaefer *et al.* 2012) s molekulární analýzou 262 druhů tj. 70% druhů z této podčeledi. Tato studie nám mnohé objasnila - prokázala, že rody *Vicia* a *Lathyrus* nejsou monofyletické: rody *Pisum* a *Vavilovia* byly zahrnuty do rodu *Lathyrus* a rod *Lens* byl zahrnut do rodu *Vicia*. Dále bylo zjištěno, že *Vicia hirsuta*, *Vicia sylvatica* a další především endemické druhy (*V. capreolata*, *V. costae*, *V. ferreirensis* a další) Makaronésie (tj. Kanárských, Azorských ostrovů a Madeiry) jsou zahrnuty v malém, ale dobře podporovaném sesterském kládu všech ostatních rodů v podčeledi. Komerční význam domestikovaných zástupců podčeledi *Fabeae* i rozmanitost volně žijících druhů zajišťuje poměrně stálý taxonomický výzkum. Za posledních 50 let byla použita celá řada molekulárních markerů k odvození fylogenetických vztahů ve skupině. Rané dílo zahrnovalo chemotaxonomickou práci badatele jako je Simola

(1966), který se zaměřil na aminokyseliny a flavony jako případné markery. Aktuálnější výzkum navázal na tento přístup (Jaaska 2005), ale také ukázal na potenciál využití analýzy DNA. První studie analyzující DNA využívaly RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Croft *et al.* 1999) a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Asmussen & Liston 1998).

Několik rodů z podčeledi bylo studováno pomocí sekvenační analýzy chloroplastového genu pro ribulózu bisfosfát karboxylázu (*rbcL*) (Kass & Wink, 1996, Doyle *et al.* 1997) a později pomocí chloroplastového genu pro maturázu K (*matK*) (Wojciechowski *et al.* 2004). Tyto dvě oblasti chloroplastových (cpDNA) genů jsou běžně používány pro rekonstrukci fylogeneze na vyšší taxonomické úrovni, jako je mezi rody v čeledi. Steele & Wojciechowski (2003) prokázali využitelnost *matK* při studiu fylogeneze jednotlivých druhů podčeledí *Trifolieae* a *Fabeae*. V této práci vytváří *Lathyrus* a *Pisum* jednu skupinu, zatímco *Vicia* není formulována jako monofyletická skupina, ale byla označena za parafyletickou s rody *Lathyrus*, *Pisum* a *Lens*, které jsou vloženy do ní. Další velmi populární částí chloroplastu je oblast pro tRNA, jako je *trnL-F*, tato oblast se ukázala být informativní pro rod *Vicia* (Fennel *et al.* 1998), a v kombinaci s *trnS-G* oblastí i u rodu *Lathyrus* (Kenicer *et al.* 2005). Jaderně kódovaný Internal Transcribed Spacer (*ITS*) rDNA byl použit v mnoha studiích podčeledi, včetně rodu *Lens* (Mayer & Bagga 2002), *Pisum L.* (Polans & Saar 2002), *Vicia* (Endo *et al.* 2008), a v kombinaci s oblastmi cpDNA, u rodu *Lathyrus* (Kenicer *et al.* 2005, Kenicer 2007).



Obrázek č. 1: Fylogenetická příbuznost druhů vybraných pro tuto bakalářskou práci. (dle Schaefer *et al.* 2012)

1.3 Molekulární markery

Molekulární markery používáme jako nástroj na přesné zhodnocení variability rostlin na molekulární úrovni. Dříve musela postačit pouze odlišná morfologie, ale postupem času, zhruba od druhé poloviny 20. století studujeme rostliny za pomoci různých molekulárních metod, kde velmi podstatnou část informací poskytují markery. Při charakteristice podčeledi *Fabeae* používáme například tyto:

1) **Metody využívající anonymního fingerprintingu** jako jsou například RFLP, RAPD, (Amplified Fragment Length Polymorphism) AFLP či (Inter - Retrotrasposone Amplified Polymorphism) IRAP, nebo lokus specifických mikrosatelitních repetitiv (Simple Sequence Repeats) SSR jsou informativní jen pro řešení vnitrodruhové variability, a to vzhledem k vysoké homoplasii, tj. Nelze určit zda-li fragment o stejné velikosti, je také stejného fylogenetického původu (V současné době jsou využívány metody AFLP, SSR a analýzy pomocí retrotranspozónových sekvencí pro studium vnitrodruhové variability).

a) **RFLP** využívá délkového polymorfismu restričních fragmentů analyzované DNA, který je, po provedení elektroforetické separace a přenosu fragmentů z gelu na pevný nosič (membránu), detekován pomocí hybridizace s homologním fragmentem DNA – specifickou sondou (Botstein *et al.* 1980). Dnes se nejčastěji používají neradioaktivní sondy značené fluorescenčně, digoxigeninem nebo biotinem a detekce se provádí autoradiograficky – fluorescenčně. Vzhledem k náročnosti na množství a kvalitu potřebné DNA a zdlouhavému metodickému postupu je v současnosti již nepoužívanou technikou.

b) **RAPD** metoda je založena na amplifikaci fragmentů DNA za použití pouze jednoho oligonukleotidového primeru. Primery mají obvykle délku 10 bazí. Vzhledem k nesespecifickému cílení primerů produkty amplifikace mohou odpovídat oblastem geneticky aktivní templátové DNA, stejně tak mohou odpovídat opakujícím se motivům. Nevýhodou je nízká opakovatelnost získaných výsledků, vzhledem k nízké teplotě nasednutí primerů (Williams *et. al.* 1990).

c) **AFLP** je metoda založena na selektivní amplifikaci restričních fragmentů celého genomu. Nejdříve dochází k rozštěpení genomické DNA na fragmenty, na něž se

naligují specifické adaptory, následně sloužící k selektivní amplifikaci fragmentů pomocí speciálních primerů a k elektroforéze produktů (Vos *et al.* 1995). Výhodou je vyšší specificita amplifikace a následně tak reprodukovatelnost. Nevýhodou je potřeba kvalitní DNA a množství metodických kroků.

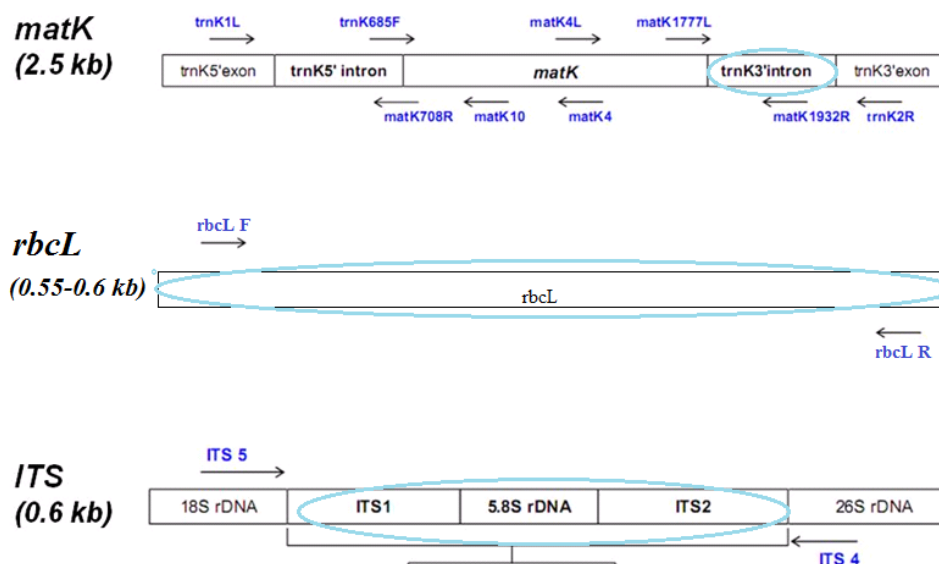
d) **IRAP** představuje markerovou techniku pro zjištění genetického profilu, fingerprintingu dané odrůdy, s potenciálem detekce změn genetické struktury studované populace. Spočívá ve využití dominujících repetitivních sekvencí, především LTR retrotransposonů, od jejichž koncových repetitiv (LTR) jsou odvozeny primerové sekvence (Smýkal 2006).

e) **SSR** znamená tandemové opakování krátkých oligonukleotidů v sekvenci DNA. Tyto úseky mají obvykle 2-6 bází a jsou náchylnější k mutacím, změnám počtu opakování během procesu replikace (Kypr 1999).

2) **Chloroplastová (cpDNA)** je uniparentálně (vzácně biparentálně) děděná, a následně tak nerekombinující. Díky tomuto je fylogeneticky stabilnější, než jaderně kódované části genomu. Vzhledem k většímu zastoupení (až stovky kopií na buňku) a cirkulární molekule DNA jsou analyzovatelné i z herbářových historických položek. Díky vysoké homologii umožňující aplikovatelnost univerzálních primerů, byly vybrány následující oblasti: *rbcL*, *matK*, *trnL/trnL-trnF* a *trnS-trnG*. Tyto oblasti jsou důležité pro tzv. DNA barcoding. Cílem DNA barcoding je vytvořit společný zdroj sekvencí DNA pro snadnější a přesnější taxonomickou identifikaci (Hollingsworth *et al.* 2011).

3) **Jaderně kódované** – nejčastěji používané *ITS* (Internal Transcribed Spacer). Jedná se o část sekvence mezi 18S a 26S RNA, vyskytující se v tisících kopiích v daném genomu. Vzhledem k univerzálnosti primerů a vysoké sekvenační homologii je *ITS* část využitelná pro studium fylogenetických vztahů mezi druhy i rody. Představuje doplňující marker pro barcoding, umožňující detekci možných hybridů.

4) **Jednotlivé kódující geny**, především pak jejich vysoce polymorfní intronové části – zatím spíše ojediněle používané, vzhledem k obtížnějšímu využití primerů mezi rody. Navíc jednotlivé geny vykazují individuální evoluční vztahy. Budoucnost je však ve využití stovek, tisíců genů paralelně (včetně kompletních genomů popř. plastomů) díky pokrokům v sekvenačních technologiích.



Obrázek č.2: Schéma *ITS*, *matK* a *rbcL* a jejich vyznačené části (modré elipsy) a primery použité v práci (dle Kenicer 2007).

1.4 Morfologické znaky

Morfologie je věda zabývající se odlišnými tvary. Představuje tvarovou rozmanitost, kterou používal již Johann Wolfgang Goethe koncem 18. století. Ten pracoval na morfologii struktur rostlinného těla a jejich transformací (*Metamorphosis of Plants* 1790). V 19. století byla označena za základní biologický obor a na jejích poznacích byl postaven systém organismů. Morfologické znaky byly vybírány na základě zkušeností přírodovědce, jak se mu osvědčily. V případě rostlin se nejčastěji jednalo o typ listu, květu, kořene a podobně. Po objevení molekulárních metod, v druhé polovině 20. století morfologie jako věda zůstává opomenuta (Neustupa 2006). Pomocí molekulárních znaků, se v některých případech zjistilo, že vzhledem k časté apomorfii, je systém založený pouze na morfologii je chybný. Ukázalo se, že morfologicky podobní jedinci nemusí být fylogeneticky příbuzní a naopak. Navíc nově objevené metody zjednodušily práci a tak se pro mnohé taxonomy staly atraktivnější. Po období úpadku, kdy studium DNA bylo preferováno, nastala renezanze využití a metodický rozvoj morfologie a dnes tak používáme

pokročilejších morfologických metod, které s molekulárními metodami velmi úspěšně spolupracují (dle Neustupa 2006). Dnešní morfologie nejčastěji používá jednu ze svých specializací a to morfometriky. Principem je měření mnoha veličin a objektů, například listů 500 jedinců druhu a jejich statistické zpracování. Různě velké odchylky pak poukazují na poddruh nebo jiný druh rostliny. Problémem však bylo, vedle určité jednotvárnosti (měření jednotlivých délek, počtů či úhlů) to, že špatně vypovídá o zákonitostech vývoje a přeměn tvarů jako takových. Tento problém se jako první pokusil vyřešit D. Thompson v díle *On growth and form* (O růstu a tvaru) poprvé vydané v roce 1917. Thompson se pokusil vysvětlit obrovské množství a rozmanitost tvarů pomocí matematických zákonitostí. Jeho nejznámějším a často citovaným objevem se staly transformační mřížky. S jejich pomocí poukázal na to, že různé tvary (např. u lebek obratlovců) je možné chápat jako transformace souřadnicových mřížek. Deformace (odchylky) je pak možné matematicky popsat. Vzhledem k náročnosti potřebného matematického aparátu a neexistenci počítačů, to bylo často velmi složité a tak se Thompsonův nápad neujal. Až práce amerického biologa a matematika Freda Booksteina v roce 1991, *Geometric Tools for Morphometric Data* (Geometrické metody pro morfometrická data: geometrie a biologie) umožnila plné využití potenciálu morfometrie. Toto dílo a některé publikace amerického biostatistika Jamese Rohlfha přispělo následně ke vzniku nového oboru - geometrické morfometriky. Bookstein vytvořil teoretický rámec, který umožňuje znázornění a modelování morfologických přeměn pomocí Thompsonových transformovacích mřížek. Během této metody analyzujeme tj. landmarkery – body, které můžeme na všech srovnávacích objektech najít a počítačově digitalizovat polohu ve 2D či 3D (Neustupa 2006). Morfometrických metod bylo částečně použito i v této práci.

1.5 Popis jednotlivých rodů podčeledi *Fabeae*

1.5.1 Rod *Vicia* (vikev)

Vikve patří mezi jednoleté nebo vytrvalé byliny s dlouhými větvenými kořeny. Oddenky často plazivé nebo chybí. Lodyhy přímé, poléhavé, vystoupavé nebo popínavé, jednoduché nebo větvené. Listy jsou střídavé, sudozpeřené, vřetenolistu zakončené úponkou nebo hrotem. Palisty jsou celistvé, polostřelovité nebo zubaté, často s nektáriem, lístky pak celokrajné, vzácněji zubaté. Květenství je

hroznovité nacházející se v úžlabí podpůrných listů, výjimečně redukované na jeden květ (*Vicia tetrasperma*), někdy stopky květenství zkráceny natolik, že vypadají jako úžlabní. Listeny jsou malé dlouhé 1 - 2 mm a opadavé. Květy jsou odstálé nebo nící, v různých odstínech modré, červené, fialové, žluté nebo bílé barvy, často mohou být i dvoubarevné. Kalich je zvonkovitý nebo trubkovitý, kališní cípy stejně dlouhé nebo horní kratší. Počet tyčinek je 9 + 1, tedy devět srostlých nitkami a jedna volná, trubka nitek uzavřená, pouze na bázi na svrchní straně s otvorem k nektáriu, šikmo od spodu zahnutá. Semeník je na bázi s nektáriem. Průřez čnělky je okrouhlý, téměř smáčklý, pod bliznou s věnečkem nebo jen s kartáčkem chlupů na spodní straně. Plodem je neopadavý lusk, suchý, bez přepážek a přihrádek, otevírá se oběma švy. Semena jsou hladká vzácně bradavičnatá. Hilum podlouhlé až čárkovité. Radikula je nezřetelná nebo jen slabě jako barevně odlišený klín. Vikve klíčí hypogeicky. Rod *Vicia* zahrnuje okolo 140 druhů vyskytující se převážně v Evropě, Asii a Severní Americe, méně v mírném pásu Jižní Ameriky nebo v severní Africe a tropické východní Africe (Chrtíková 1995).

Rod *Vicia* se dělí na základě morfologických znaků na tři podrody, na podrod *Vicia* zahrnující sekce *Sepium*, *Vicia*, *Lathyroides*, *Peregrinae*, *Hypechusa* a *Narbonensis*, na podrod *Cracca* se sekcemi *Vicilla*, *Cassubicae*, *Cracca*, *Variegatae*, *Panduratae*, *Volutae*, *Trigonellopsis* a *Pedunculatae* a na podrod *Ervum* se sekcemi *Ervum*, *Ervilia*, *Ervoides* a *Lentopsis* (Leht 2009a). V této práci zkoumaná *Vicia tetrasperma* patří do sekce *Ervum* (Leht 2009a).

1.5.2 Rod *Lathyrus* (hrachor)

Hrachory patří mezi jednoleté, dvouleté nebo vytrvalé byliny s dlouhými, silnými, rozvětvenými kořeny. U jednoletých je kořen kulový, dlouhý s krátkými postranními kořeny. Lodyhy jsou plazivé, vystoupavé až přímé nebo popínavé. Listy jsou sudozpeřené s 1 - 5 páry lístků, včetně zakončené úponkou nebo hrotem. Někdy listy redukované na fylodium nebo úponku. Palisty jsou bylinné. Květenství v podobě úžlabního hroznu, často zredukované na jeden květ. Listeny opadavé. Květy stopkaté, bílé nebo v různých odstínech a kombinací žluté, růžové, červené, fialové, vzácně modré. Kalich souměrný a vytrvalý. Koruna je opadavá. Počet tyčinek je 10, devět srostlých nitkami a jedna volná. Semeník s mnoha vajíčky. Čnělka nejčastěji pod vrcholem ze hřbetu zploštělá, často rozšířená, v horní části chlupatá nebo se

dvěma řadami chlupů, blizna je kulovitá. Plodem je lusk, otevírající se oběma švy, výjimečně se neotevírají, lusk je bez přepážek na vrcholu se zužuje v zobánek. Plody jsou neopadavé a na bázi bez gynepodia. Semena jsou nezploštělá nebo mírně, hladká nebo bradavičnatá, u některých druhů vzhledem k obsahu lektinů a především neproteinových aminokyselin dokonce jedovatá (lathyrismus). Radikula je většinou nezřetelná. Existuje přes 150 druhů vyskytující se převážně v Evropě, Asii a Severní Americe, méně v mírném pásu Jižní Ameriky nebo v tropické východní Africe (Chrtíková & Bělohlávková 1995).

Kupicha (1983) se domnívá, že *Lathyrus* je kompaktní rod, dobře strukturovaný do dílčích úrovní, ale ne do silně polarizovaných jednotek, které vyžadují subgenerické uznání. Tento úhel pohledu zastává dnes většina taxonomů, kteří zkoumali průřezové klasifikace rodu *Lathyrus* pomocí morfologických, molekulárních znaků nebo na základě karyotypu (El-Shanshoury 1997; Asmussen & Liston 1998, Arevschatian 2002; Seijo & Fernandez 2003; Kenicer *et al.* 2005). Czefranova (1971) a také Dogan *et al.* (1992) zjistili, že rod lze rozdělit do dvou podrodů. Nejpodrobnější a nejuznávanější analýza (Kupicha 1983) uznává 13 sekcí (*Orobus*, *Orobon*, *Lathyrostylis*, *Pratensis*, *Aphaca*, *Lathyrus*, *Cicerula*, *Gorgonia*, *Clymenum*, *Linearicarpus*, *Neurolobus*, *Nissolia*, *Orobastrum*).

Grenier & Godron (1848)	Boissier (1872)	Czefranova (1971)	Kupicha (1983)	Asmussen & Liston (1998)	Kenicer (2007)
			Notolathyrus	Orobus	Notolathyrus
Orobus	<i>Orobus</i>	Lathyrobus	Orobus		Orobus
	Orobastrum	Orobus	Lathyrostylis	Lathyrostylis	Lathyrostylis
		Pratensis	Pratensis	Pratensis	Pratensis
		Eurytrichon			
Aphaca	Aphaca	Aphaca	Aphaca	Aphaca	Aphaca
Orobus	Orobastrum	Neurolobus	Neurolobus	Neurolobus	Neurolobus*
		Orobon	Orobon	Lathyrus	
Eulathyrus	Eulathyrus	Lathyrus	Lathyrus		Lathyrus
Cicerula	Cicerula	Cicerula		Cicerula	
				Orobastrum	
Orobus	Orobastrum	Orobastrum	Orobastrum	<i>L. sphaericus</i>	<i>L. sphaericus</i>
			Linearicarpus	<i>L. angulatus</i>	<i>L. angulatus</i>
			Viciopsis		
Nissolia	Nissolia	Nissolia	Nissolia	Nissolia	Nissolia*
Clymenum	Clymenum	Clymenum	Clymenum	Clymenum	Clymenum*
				<i>L. gloeospermus</i>	<i>L. gloeospermus</i>

Obrázek č. 3: Znázornění sekcí rodu *Lathyrus* v průběhu let (dle Kenicer 2007).

Hlavní rozdíl mezi klasifikací dle Kupicha (1983) a klasifikací jejích předchůdců spočívá v dělení sekce *Orobastrum*, rozpoznává tři monotypické sekce (*Orobastrum*, *Linearicarpus* a *Viciopsis*), další rozdíly najdeme v zařazení sekce *Cicerula*, která je v sekci *Lathyrus* stejně jako sekce *Eurytichon* v *Pratensis*. Dále přidala novou sekci *Notolathyrus* obsahující druhy z Jižní Ameriky. Podle Kupicha (1983) vyplynulo, že euroasijské druhy byly zařazeny zhruba podobným způsobem již od předchozích autorů. A to do pěti skupin, *Clymenum*, *Aphaca*, *Nissolia*, *Cicerula* a *Lathyrus*. Leht (2009a) souhlasí se sekční klasifikací podle Kupicha (1983), ale navrhla sloučení sekcí *Orobon* a *Orobastrum* v sekci *Lathyrus* a *Notholathyrus* v sekci *Orobus*. Výsledky podporují blízký vztah mezi sekce *Pratensis* a *Aphaca*. Podle výsledků Kupicha (1983) jsou druhy *Lathyrus clymenum*, *L. articulatus* a *L. ochrus* (druhy jimiž se zabývám ve své bakalářské práci) velmi blízce příbuzné, patřící do sekce *Clymenum*. Tyto dva druhy mají pravděpodobného společného předka druh *L. setifolius* patřící do sekce *Orobastrum*.

Kenicer *et al.* (2005) se s názorem Kupicha (1983) neztotožňuje, ze sekce *Clymenum* odebrali *Lathyrus ochrus* a přeřadili jej na základě sekvencí *ITS* a *cpDNA* do sekce *Cicerula*. Dále se tento kolektiv shodl na tom, že části sekce *Clymenum*, stejně jako části sekcí *Linearicarpus*, *Nissolia* a *Neurolobus*, jsou fylogeneticky složité a potřebují další přezkoumání.

Nedávno vydaná práce (Schaeffer *et al.* 2012) spojuje poznatky z taxonomie obou rodů - rod *Lathyrus* i rod *Vicia*. Zjistili například, že sekce *Neurolobus*, *Nissolia*, *Orobon*, *Orobastrum*, a *Viciopsis* jsou monotypické. Kromě jedné sekce se podařilo sestavit taxonomickou váhu na základě pokusů: jako monofyletické se ukázaly sekce *Notolathyrus*, *Pratensis* a *Aphaca*. Sekce *Orobon* a *Orobastrum* jsou vnořené do sekce *Lathyrus*. Sekce *Linearicarpus* je polyfyletická - *L. hygrophilus* a *L. inconspicuus*. Je možné, že zaniklá sekce *Azorian* je vnořena do sekce *Cracca*.

1.5.3 Rod *Pisum* (hrách)

Jedná se jednoleté byliny s přímými lodyhami. Kořeny jsou vřetenovité a dlouhé. Sudozpeřené listy jsou zakončeny úponkou, v mládí složené podle středové žilky. Palisty jsou bylinné a velké. Úžlabní květenství je dlouhé a stopkaté s

chudokvětými (1 - 2 kvěťmi) hrozny. Kalich je zvonkovitý. Koruna bílé barvy často naružovělá, namodralá nebo 2–3 barevná. Pavéza a křídla mají velkou čepel. Tyčinky jsou stejně uspořádané jako u dvou předcházejících rodů - devět srostlých a jedna volná. Semeník je přisedlý, čnělka dorzoventrálně zploštělá a na vrcholu rozšířená, na vnější straně rýhovaná a na vnitřní straně pod vrcholem chlupatá. Plodem je lusk otevírající se v obou švech, mnohosemenné, podlouhlé, na vrcholu zúžené v zobánek, nezaškrcované. Semena kulovitá až zaobleně mnohohranná s podlouhlým hilum. Asi 2 - 3 druhy s rozšířením po jižní Evropě, Středozeří, jihovýchodní Asii, severní Africe včetně Etiopie (*P. abyssinicum*) (Chrtíková 1995).

Na základě morfologických charakteristik bylo určeno nejdříve pět druhů rodu *Pisum* (Gorovov 1937), později byli tyto označeny jako poddruhy podle (Makasheva 1979). Karyologická bariéra pro přechod k *P. sativum* a jednoznačné fenotypové rozdíly podporují teorii druhů (Lamprecht 1963). Centrum genetické rozmanitosti hrachu je široká oblast vedoucí přes Turecko, Sýrii, Irák, Izrael a Libanon. Rozšiřuje se dále na východ do střední Asie, především (Írán, Afghánistán, Pákistán a Turkmenistán) (Smýkal *et al.* 2011). Etiopie je považována za sekundární centra diverzity (van der Maesen *et al.* 1998). Podle Vavilova (1949) naopak patří Etiopie společně se Středomořím a střední Asii do primárních center, zatímco Blízký východ jako sekundární. Fylogeneticky, existují dvě volně žijící populace popsané jako poddruhy *P. sativum* nebo jako druhy *P. sativum subsp. elatius* Bieb. a *P. humile* Boiss a Noe (syn. *P. syriacum* (Berger) Lehm. (Ben-Ze'ev & Zohary, 1973). Tyto dvě plané skupiny jsou morfologicky, ekologicky a také geneticky odlišné. Pomocí křížení prováděné Ben-Ze'ev & Zohary (1973) zahrnující genotypy *P. sativum subsp. elatius*, *P. humile*, *P. fulvum* a *P. sativum*, můžeme tyto druhy definovat jako primární genofond *P. sativum* shromážděné včetně volně žijících *P. sativum SUBP. elatius*. Sekundární genofond je pak uložen v *P. fulvum* a do terciárního genetického fondu spadá pouze *Vavilovia formosa*. Domestikace kultivovaného hrachu z tzv. severních populací byla navržena Ben-Ze'ev & Zohary (1973), ale zdroj by být rovněž "severní *P. elatius*" (Kosterin *et al.* 2010; Smýkal *et al.* 2011).

P. sativum L.

- subsp. *sativum* (zahrnuje var. *sativum* and var. *arvense*)
- subsp. *elatius* (Bieb). Aschers. & Graebn

(zahrnuje var. *elatius*, var. *brevipedunculatum* and var. *pumilio*)

- *P. fulvum* Sibth. & Sm.
- *P. abyssinicum* A.Br.
- *Vavilovia formosa* (*P. formosum*) (Stev).Fed.

1.5.4 Rod *Vavilovia* / druh *Vavilovia formosa*

Vavilovia je vytrvalá bylina s dlouhými podzemními oddenky. Podzemní oddenky jsou pro rostlinu velmi podstatné, umožňují ji přežít na kamenných půdách, pohyblivých sutích nebo přežít spásání herbivorů. Stonky jsou 5 - 15 cm dlouhé, poléhavé, štíhlé, neokřídlené a lysé. List je složený s malým semisagitálním palistem, má jeden pár lístků klínovitý až obvejčitý. Listy jsou zakončené zřetelnou špičkou, na stonek nasedají přímo. Květ je velký, fialové nebo růžové barvy. Lusky jsou čárkovitě podlouhlé, 20 - 35 mm dlouhé. Semena bývají po 3 - 5 (Davies 1970). Semena jsou kulovitá nebo oválná s tmavými skvrnami na povrchu. Geografické rozšíření je omezeno ekologií - preferuje vysokohorské suť. Centrum biodiverzity je střední a východní část Kavkazu (Arménie, Gruzie, Rusko), Taurus (Turecko, Irák), Irán a Libanon (Akopian 2010).

1.6 Popis druhů použitých ve vlastní práci

1.6.1 *Vicia tetrasperma* (L). Schreber

Jedná se o jednoleté až ozimé byliny s tenkými kořeny. Lodyhy jsou popínavé často poléhavé, tenké, slabě chlupaté a čtyřhranné. Listy mají 2 - 4 páry lístků, většinou je zakončené úponkou nebo hrotem. Květy jsou šikmo odstálé po 1 - 2 květech vzácněji po čtyřech (Chrtíková 1995). Korunní cípy jsou nestejně, dolní jsou šídlovité horní spíše trojúhelníkovité. Lusky nejčastěji se semeny po čtyřech (Kubát 2002). Semena jsou kulovitá hladká a zbarvena do šedo zelené barvy. Proměnlivá je především ve velikosti lodyh nebo v počtu květenství, proto byla dříve často zaměňována s *Vicia tenuissima*. Roste na loukách v křovinách, často lemují lesy nebo břehy vod. Dostí rozšířená v okolí vozovek. Dnes se vyskytuje převážně v planárním a submontánním stupni. Do hor je zavlečena spíše druhotně. Původní je ve velké části Evropy, v západní Asii po oblast Jeniseje, Čínu a Korej a v severní Africe v Maroku. Byla zalečena do Austrálie a Ameriky. $2n=14$ (Chrtíková 1995).

1.6.2 *Lathyrus ochrus* (L). DC

Jednoleté byliny s 20 - 60 cm lodyhami. Lodyhy jsou popínavé nebo poléhavé a křídlaté. Na křídlech bývají drsně chlupaté. Dolní a střední listy jsou redukované a rozšířené, horní listy 1 - 2 páry obvejčitých lístků. Listy má zakončené větvenou úponkou. Celá rostlina má sivě zelenou barvu. Palisty u dolních listů chybí, u horních jsou tvaru kopinatě vejčitého až střelovitého. Květy jsou po jednom s kalichem široce zvonkovitým a s nafouklou trubkou. Kališní cípy jsou stejně dlouhé jako kališní trubka. Koruna má světle žlutou barvu. Pavéza obvejčitá a tupá. Křídla jsou přibližně stejně dlouhá jako pavéza, ale člunek je kratší tupě zakončený. Lusky jsou podlouhlé, lysé se 4 - 6 semeny maximálně 60 mm dlouhé. Semena jsou kulovitá, slabě zploštělá a asi 6 mm velká, světle hnědé až červenohnědé barvy. V České republice je zdomácnělý. Roste u železničních tratí. K nám byl zavlečený pravděpodobně ze Středozeří. Přirozeně se vyskytuje v severní Africe, Středomoří a v jihovýchodní Asii, kde se občas ještě pěstuje jako pícnina nebo luštěnina. $2n=14$ (Chrtíková A. & Bělohávková R. 1995).

1.6.3 *Lathyrus clymenum* L.

Stejně jako u předcházejícího druhu se jedná o jednoletou bylinu s popínavými nebo poléhavými křídlatými lodyhami. Vysoká je od 20 - 100 cm. Dolní listy jsou redukované na čárkovitě kopinaté fylodium. Horní listy mají 2 - 4 páry čárkovitě kopinatých až eliptických lístků a jsou zakončené větvenou úponkou. Palisty u spodních listů chybí, u středních mají kopinatý tvar a u horních jsou střelovité. Květenství tvořeno nejčastěji 2 - 4 květy. Kalich je zvonkovitý a lysý, kališní cípy kratší než kališní trubka. Koruna nejčastěji červenofialová, křídla bývají modrá s dvěma oušky, často kratší než pavéza. Člunek je zahnutý a pavéza má krátkou špičku. Lusky jsou podlouhlé a lysé do 70 mm dlouhé, po 5 - 7 semenech. Semena vejcovitého tvaru, zploštělá, hladká, šedohnědé barvy a skvrnitá. Tento druh se dá snadno zaměnit s *Lathyrus articulatus* se kterým je i velmi blízce příbuzný, případně v některých pracech se klasifikuje jako poddruh *L. clymenum subsp. articulatus*. Rozdíly mezi těmito druhy najdeme na listech, kde *L. articulatus* má drobnější a užší lístky nebo na pavéze - *L. clymenum* má pavézu s krátkou špičkou zatímco *L. articulatus* má pavézu tupě zakončenou. Také křídla nabývají odlišných barev. Na semeni zabírá u *L. clymenum* hilum $1/7$ až $1/6$ obvodu, u *L. articulatus* je

to pouze 1/10. U nás se *L. clymenum* vzácně vyskytuje jako plevel na polích. Je to další zdomácnělý druh původně ze Středozeří. Další místa výskytu tohoto druhu jsou severní Afrika a jihozápadní Asie. $2n=14$ (Chrtíková & Bělohlávková 1995).

2 METODIKA

Tato práce se týká třech fylogeneticky velmi blízkých druhů: *Lathyrus ochrus*, *Lathyrus clymenum* a *Vicia tetrasperma*. Na prozkoumání těchto druhů bylo vybráno několik položek původem z genofonodových kolekcí reprezentující materiál z odlišných koutů světa, pro získání větší variability rostlinných druhů. Tato vnitrodruhová variabilita byla analyzována pomocí morfometrické měření semen, listů a květů, z molekulárních metod pak sekvence *ITS*, *rbcL* a *matK*.

2.1 Rostlinný materiál

Tabulka č. 2: Rostlinný materiál použitý při práci

Identifikační číslo	Druh	Stát
PI494694	<i>Vicia tetrasperma</i>	Rumunsko
PI420173	<i>Vicia tetrasperma</i>	Francie
13L1800524	<i>Vicia tetrasperma</i>	CZE, Havraníky (ZN), Devět mlýnů
13L1800011	<i>Vicia tetrasperma</i>	CZE, NP Podyjí, Havraníky, Šobes
13L1800484	<i>Vicia tetrasperma</i>	CZE, NP Podyjí, Onsov
Arménie	<i>Vicia tetrasperma</i>	Arménie, Sinjuk
V. Losiny	<i>Vicia tetrasperma</i>	CZE, Velké Losiny
Olomouc	<i>Vicia tetrasperma</i>	CZE, Olomouc-Holice
PI283503	<i>Lathyrus clymenum</i>	Portugalsko
PI255367	<i>Lathyrus clymenum</i>	Srbsko - Montenegro
PI237561	<i>Lathyrus clymenum</i>	Itálie
PI344076	<i>Lathyrus clymenum</i>	Turecko, Marmaris
PI283519	<i>Lathyrus clymenum</i>	Kypr
ATC 81087	<i>Lathyrus clymenum</i>	Řecko
ATC 80923	<i>Lathyrus clymenum</i>	Itálie
ATC 80921	<i>Lathyrus clymenum</i>	Portugalsko
ATC 80922	<i>Lathyrus clymenum</i>	Jugoslávie
RBGE 541	<i>Lathyrus clymenum</i>	Sýrie
NS 01	<i>Lathyrus clymenum</i>	Libanon
RBGE 532	<i>Lathyrus clymenum</i>	Turecko, Antalya
PI358851	<i>Lathyrus clymenum</i>	Španělsko
PI283538	<i>Lathyrus ochrus</i>	Portugalsko
PI283534	<i>Lathyrus ochrus</i>	Portugalsko
PI206373	<i>Lathyrus ochrus</i>	Kypr
ATC 80096	<i>Lathyrus ochrus</i>	Irán, Bushehr
ATC 80131	<i>Lathyrus ochrus</i>	Česká republika
ATC 81371	<i>Lathyrus ochrus</i>	Alžírsko

ATC 80528	<i>Lathyrus ochrus</i>	Německo
ATC 80432	<i>Lathyrus ochrus</i>	Sýrie
ATC 80125	<i>Lathyrus ochrus</i>	Řecko, Kréta
NS 02	<i>Lathyrus ochrus</i>	Izrael, Haifa

Semena vybraných druhů byla získána z kolekcí genových bank (USDA, ICARDA, ATFC, RBGE, EVIGEZ). Informace o lokalitách byly získány na stránkách:

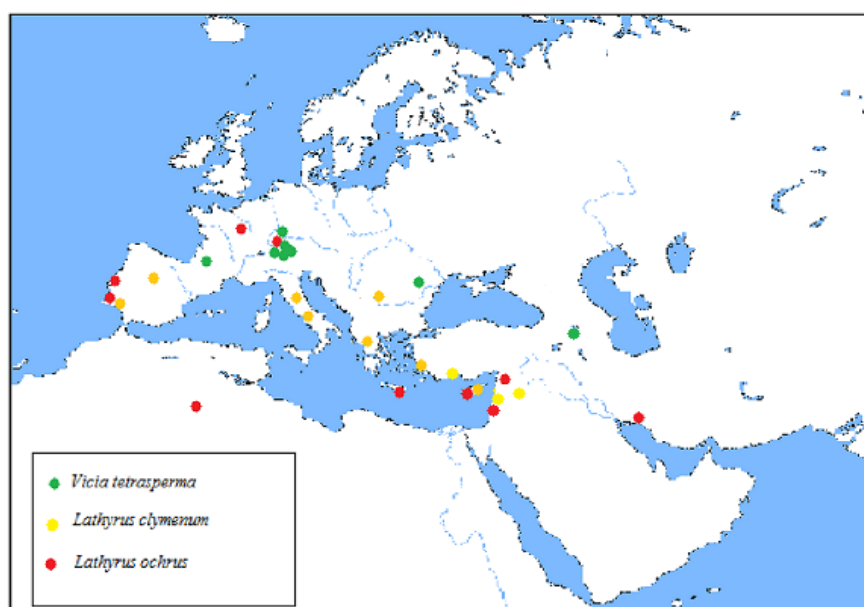
USDA (Plant Germplasm Introduction and Testing Research Station, Pullman, USA)
<http://www.ars-grin.gov>

ATFC (Australian Temperate Field Crop Collection, Horsham, Australia)
<http://www2.dpi.qld.gov.au>

ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria) <http://www.icarda.cgiar.org>

EVIGEZ (CZE Plant Genetic Resources Documentation in the Czech Republic, Praha) <http://genbank.vurv.cz>

RBGE (UK): Royal Botanic Garden Edinburgh, <http://www.rbge.org.uk/>



Obrázek č. 4: Mapa s areálem původu vzorků použitých v práci.

Z tohoto materiálu byla vyizolována genomová DNA, která byla dále používána v molekulárních analýzách.

2.1.1 Podmínky pěstování

Rostliny byly vysety do zahradnického substrátu namíchaného v poměru 1:1 s ornici, do 3l květináče o průměru 30-35 cm (u rodu *Vicia* po 15 a u rodu *Lathyrus* po 6 semenech na květináč). Rostliny byly kultivovány ve sklenících katedry botaniky, PřF UPOL, Olomouc Holice, v období duben – červen 2012.

2.1.2 Herbarizace

V druhé polovině května byla odebrána z každého květináče jedna rostlina pro následnou herbarizaci - jako příkladná dokumentace a podklady pro morfometrii listů. Herbarizace proběhla pouze rodu *Lathyrus*.

2.2 Skenování, stereomikroskopie- fotografická dokumentace

Součástí morfologického hodnocení byly i informace o postavení blizny v květech zkoumaných rostlinných druhů. Během kultivace ve skleníku se veškeré květy sbíraly a uložily do lednice na 2-3 dny do FAA (Formalin-Acetic-Alcohol) (100 ml). Roztok se skládá ze čtyř složek.

Ethanol ----- 50 ml

Kyselina octová(ledová, 96%) ----- 5 ml

Formaldehyd (37-40%) ----- 10 ml

Destilovaná H₂O ----- 35 ml

A poté se skladovaly v 70% ethanolu pro následnou analýzu. Po odpreparování pomocí binokulární lupy okvětních lístků a tyčinek se blizna vyfotografovala v mikroskopické laboratoři botanické fakulty pomocí fluorescečního mikroskopu Olympus BX60/Stereomikroskop Olympus SZ40.

2.3 Morfometrické hodnocení

V květnu 2012 bylo provedeno u druhu *Lathyrus clymenum* počítání morfologických znaků. Hodnoceno bylo počet internodií do prvního květu, počet

květů, počet internodií do prvního složeného listu, větvení stonku. Na listu se počítaly páry lístků. Na lusku bylo pozorováno jeho pozice (horizontální, vzpřímená nebo svěšená), přítomnost či nepřítomnost pigmentace, délka stopky a délka lusku (viz soubor na CD - LATHYRUS-morfologie-final.xls). Toto pak posloužilo k sestavení pomyslné matice.

Na základě herbářových položek rodu *Lathyrus* se pomocí sceneru (EPSON EXPRESSION 10000 XL) provedly snímky, které se pak vyhodnocovaly pomocí programu NIS-ELEMENTS (LIM, Laboratory Imaging Prague, ČR). Měření bylo zaměřeno na poměr šířky a délky listu, tedy na jeden z důležitých rozdílů mezi *Lathyrus clymenum* a *L. articulatus*.

Zkoumána byla i semena rodu *Lathyrus*. K tomu byl použit scener (Hewlett Packard 3050J), černý rámeček s vyměnitelnou deskou (nepropustný pro světlo, výška 1-2 cm podle velikosti semen), deska oboustranná – černá a bílá pro dosažení dvou odlišných pozadí pro 1 vzorek. Softwarem sceneru byl software PhotoStudio v. 5.5. Vyhodnocení proběhlo pomocí programu NIS-ELEMENTS (LIM, Laboratory Imaging Prague, ČR).

U semen byly měřeny následující veličiny:

Area (plocha) jako hlavním kritériem velikosti, v případě kalibrovaného systému udává reálnou plochu.

Perimetr (obvod) je mírou celkové hranice, počítá se ze čtyř projekcí ve směrech 0, 45, 90 a 135o pomocí Croftonovy rovnice: $\pi \cdot (Pr0 + Pr45 + Pr90 + Pr135) / 4$.

EqDiameter (ekvivalentní průměr) je kritériem velikosti odvozeným z plochy a určuje průměr kruhu, která má stejnou plochu jako objekt: $(4 \cdot \text{Plocha} / \pi)^{1/2}$.

MaxFeret, MinFeret (maximální/minimální Feretův průmět) je maximum/minimum z Feretových průmětů, kdy při úhlu α se rovná délce projekce objektu při úhlu α , $\alpha = \{0, 10, 20, \dots, 180\}$.

Elongation (protáhlost) se určuje jako poměr MaxFeret/MinFeret, je to užitečná charakteristika tvaru.

Circularity (kruhovitost) 1 pouze pro kruh a všechny ostatní tvary jsou charakterizovány kruhovostí < 1 . Odvozená míra tvaru počítaná z plochy a obvodu: $4 \cdot \pi \cdot \text{plocha} / \text{obvod}^2$ (Smýkalová & Vinklárková 2011).

2.4 Analýza DNA

2.4.1 Isolace DNA

Isolace se provádí různými způsoby, ale vždy je založena na stejném principu. Základem je lýze buňky například z listů ze semen nebo z herbářových položek. To se provádí mechanicky - v třecí misce s tloučkem nebo pomocí chemických látek. Následně se kontroluje inhibice aktivity nukleáz, eliminují se proteiny, polysacharidy, pigmenty apod. Isolace byla prováděna v laboratoři molekulárních markerů, katedry botaniky PřF v Olomouci. Genomová DNA byla vyzolována z přibližně 300 mg rostlinného materiálu uchovávaného při -80°C . Izolace byla provedena pomocí kitu-kolonek INVITEK (firma Invitex, Německo).

Návod dle protokolu výrobce:

1. Lyze materiálu: (K listu) přidat 400 μl Lysis buffer P + 20 μl Proteinase K (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
2. Krátce vortexovat (MS2 Minishaker).
3. Inkubace 30 min (nebo i déle – lépe) při 65°C (Termo Block MB - 102, BIOER) – občas promíchat na vortexu.
4. Přepipetovat/přelít homogenit na kolonku – PREFILTR.
5. Centrifugace (Eppendorf 5415 R) 1 min při 12.000 rpm.
6. Přidat 10 μl RNAase A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ponechat při pokojové teplotě přibližně 10-15 min.
7. Přidat 200 μl Binding Buffer P, vortexovat.
8. Napipetovat/přelít do kolonky SPIN FILTR, nechat stát 1–2 min.
9. Centrifugace 12.000 rpm/1 min.
10. Vyhodit co proteče, vrátit zpět kolonku – napipetovat 550 μl Wash Buffer I.
11. Centrifugace 12.000 rpm/1 min.
12. Vyhodit co proteče, vrátit zpět kolonku – napipetovat 550 μl Wash Buffer II.
13. Centrifugace 12.000 rpm/1 min.
14. Vyhodit co proteče, vrátit zpět kolonku – napipetovat 550 μl Wash Buffer II.

15. Centrifugace 12.000 rpm/1 min.
16. Vyhodit co proteče, vrátit zpět kolonku, centrifugace 12.000 rpm/2 min.
17. Eluce DNA – dát 2x (po sobě) 100 µl předehřátého (65 °C) Elution Buffer D, inkubovat 3 min.
18. Centrifugace 12.000 rpm/1 min.
19. Vzorek je připraven k použití – možnost krátkodobého (několik dní) skladování v lednici (4 °C) nebo dlouhodobě při –20 °C.

Pozn.: Veškeré zkumavky je potřeba označit popisem pro identifikaci vzorku!

2.4.2 PCR amplifikace

Jedná se o enzymatické namnožení určitého úseku DNA. Program využívá rozdílných teplot a načasování, které napomáhají správnému nasednutí dvou primerů - 4min se denaturuje při teplotě 95 °C, následuje 35 cyklů po 30 s při teplotě 95 °C, poté 30 s při 50 °C a 90 s při teplotě 72 °C. Doběhnutí reakce probíhá po dobu 10 min při stejné teplotě. Běžně jsou to sekvence dlouhé 100 - 300 bp bází, ale s úspěchem byly namnoženy úseky o velikosti 6000 bp. Výsledky PCR se dají ověřit pomocí elektroforézy na agarovém gelu a následně zviditelnit UV zářením.

Chemikálie potřebné k PCR:

- a) Termostabilní Taq DNA polymeráza (např. Dream Taq Green, Fermentas).
- b) Směs nukleotidů dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Fermentas).
- c) 10x koncentrovaný pufr pro PCR (dle výrobce).

10 x TBE (na 1 litr)

- 108 g TRIS báze
- 55 g kyseliny borité (např. Sigma B6778)
- 40ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)

d) Primery (Generi-Biotech, CZ)

Tabulka č. 3: Příklady použitých primerů.

Primer	Sekvence (3'-5')	Velikost PCR p. (bp)
<i>ITS-5F</i>	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	500 - 550
<i>ITS-4R</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>ITS-Legumes-F</i>	GTTTGAACACATACGGCGGGCTTGAG	550 - 600
<i>ITS-Legumes-R</i>	CGCCTGACCTGAGGTCTCATCACGAG	
<i>rbcL-F</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	550 - 600
<i>rbcL-R</i>	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	
<i>matK1777L</i>	TTCAGTGGTACGDAGTCAAATG	680 - 720
<i>trnK2R</i>	AACTAGTCGGATGGAGTA	

Primery jsou podstatnou částí PCR. Zvolenými primery přesně definujeme oblast DNA, kterou chceme zkoumat a to jak velikostně tak pozičně. Pro každou oblast existuje několik primerů. V této práci byly prozkoumány oblasti *ITS*, *rbcL* a *mat K* pomocí těchto primerů (viz tabulka, Kenicer *et al.* 2005, Kenicer 2007 a Schaeffer *et al.* 2012). *ITS* bylo vybráno z důvodu výskytu možné variability. Ostatní, tedy cpDNA (*rbcL* a *matK*) bylo vybráno pro srovnání variability v jaderné a plastidové DNA.

Průběh PCR reakce:

1. Chemikálie pro PCR po rozmrznutí umístit do chladicího stojánu.
2. Připravit potřebné množství reakční směsi (v pořadí voda-pufr-nukleotidy-primery-polymeráza) dle tabulky č. 4.
3. Do označených 0,2 ml mikrozkuvek se rozpipetovat reakční směs po 13 μ l.
4. Do reakční směsi v mikrozkuvkách napipetovat 2 μ l testovaného vzorku DNA.
Pozn.: Kroky 2 - 4 probíhají ve sterilním boxu (TelSTAR PV - 102) z důvodu zabránění možné kontaminace vzorků.
5. Mikrozkuvky s reakční směsí vložit do PCR termocykleru (MJ Resaerch PTC - 200) a spustit teplotní program (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** 5).
6. Po ukončení teplotního programu lze vzorky krátkodobě uchovávat v lednici, nebo i dlouhodobě zamražené při -20 °C.

Tabulka č. 4: Rozpis pro PCR mix

Složení PCR reakční směsi dle standardního protokolu výrobce např. s využitím MyTaq^{RED} polymerázy (Bioline).

(v μ l)	1x	10x	20x	30x
10x pufr (Bioline)	1,50	15,00	30,00	45,00
Voda	9,60	96,00	192,00	288,00
10 mM dN TP	0,30	3,00	6,00	9,00
Primer mix (5mM F/R)	1,53	15,30	30,60	45,90
Taq (MyTaq RED)	0,08	0,80	1,60	2,40
Mix	13,00			
DNA vzorek	2,00			
Celkem	15,00			

Tabulka č. 5: Teplotní program PCR

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
Denaturace DNA	1x	95 °C	4 min
Denaturace DNA	35x	95 °C	30 s
Nasednutí primerů		55 °C	30 s
Syntéza DNA		72 °C	90 s
Syntéza DNA	1x	72 °C	10 min

PCR amplifikace je provedena v 15 μ l objemu v 0,2 ml zkumavkách nebo 8 zkumavkových stripech (Trefflab, Switzerland), s využitím PCR termocykleru (PTC-200, MJ Research).

Elektroforetická separace PCR produktů

Rozdělení PCR produktů je prováděno horizontální gelovou elektroforézou (BIO-RAD). Získané PCR byly separovány na 1,5% agarózovém gelu s obsahem barviva GelRED v 0,5x TBE pufru při napětí 2 V/cm. Separace probíhá po dobu přibližně 45-60 minut při 75-120 V, poté je gel dokumentován pomocí UV

transluminátoru (vlnové délky 280-302 nm) a digitálního fotoaparátu s oranžovým filtrem (Kodak EDAS 290).

Výsledný snímek je zpracován v PC v jakémkoliv vhodném grafickém programu (např. IrfanView, Photoshop, PowerPoint apod).

Chemikálie pro elektroforézu:

- a) Agaróza pro elektroforézu (např. Agarose Molecular Grade, BIOLINE).
- b) Standard (marker) pro určení velikosti DNA fragmentů na gelu (100bp DNA Ladder, kat. číslo SM0241, Fermentas).
- c) 10 x TBE (na 1 litr)
 - 5,40 g TRIS báze
 - 2,75 g kyseliny borité (např. Sigma B6778)
 - 2,00ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)

Příprava agarózového gelu:

Dle velikosti používané elektroforetické vany navážíme 1,5g agarózy (např. BIOLINE, BIO-41025). Naváženou agarózu přesypeme do 250 ml Erlenmayerovy baňky (Simax láhve) obsahující 100 ml pufru a umístíme do mikrovlnné trouby. Nastavíme stupeň ohřevu na střední a dobu na 2 minuty. Láhve nesmí být neprodyšně uzavřené (nebezpečí exploze)! Poté láhev vyjmeme a promícháme opatrně krouživým pohybem. Dáme zpět na 1 minutu a zahříváme, dokud není agaróza úplně rozpuštěná. Po vychladnutí přidáme kapku (5 μ l) zásobního roztoku barviva GelRED (Biotium) a nalijeme agarózu do připravené elektroforetické vany. Umístíme hřebeny a necháme minimálně 30 min ztuhnout. Po ztuhnutí vyjmeme hřebeny a vložíme do elektroforetické vany s 0,5x pufrem TBE. Do vzniklých jamek napipetujeme vzorky a marker ke změření počtu bazí.

Přečištění PCR produktu- SureClean (Bioline):

1. K 15 μ l PCR produktu přidat stejný objem SureClean roztoku.
2. Po důkladném promíchání nechat inkubovat 10 min při pokojové teplotě.
3. Centrifugovat (Eppendorf Centrifuge 5415 R) 10 min při (14,000 rpm).

4. Odpipetovat veškerý supernatant a vysráženou DNA promýt 2 násobným objemem 70% etanolu.
5. Vortexovat (MS2 Minishaker) a opět centrifugovat (10/14,000 rpm).
6. Supernatant odpipetovat a pellet nechat vyschnout. Poté rozpustit v demineralizovaná H₂O. (Získaný objem je 20-40 µl).

Po přečištění byly u vzorků změřeny koncentrace a čistota na Spektrofotometru Bio (Eppendorf, Německo).

2.4.3 Sekvenační a biostatické analýzy

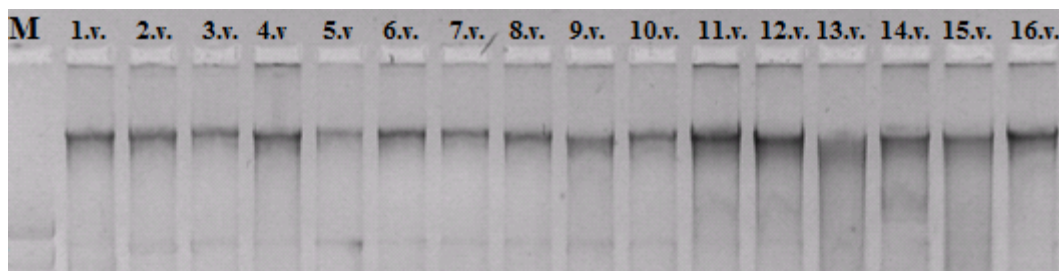
Sekvence byla prováděná v servisní laboratoři PřF UK, Praha dle protokolu AppliedBiosystems na sekvenátoru ABI Prism 3130 Genetic Analyzer. Následně byly sekvence manuálně upravovány v programu SequenceScanner ve verzi 1.0 a alignment za pomoci webově dostupného rozhraní (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html). Sekvence byly porovnány se sekvencemi získaných pomocí BLAST (Altschul *et al.* 1997) analýzy, která byla provedena na stránkách NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pomocí programu **NTsys pc** - numerická taxonomie morfologických znaků a měřených veličin, byly vytvořeny fylogramy příbuznosti u měřených druhů a jejich položek. Jako vstupní data posloužila zhotovená matice morfologických znaků či výsledky měření na semenech (viz soubor na CD - Semena DIA.xls).

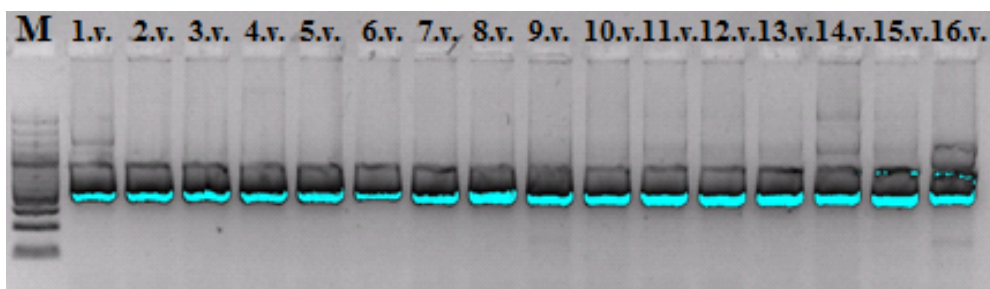
MEGA 5.1 byl použit pro vytvoření fylogramů ze sekvenačních dat (Tamura *et al.* 2011) s použitím parametru maximum-likelihood.

3 VÝSLEDKY:

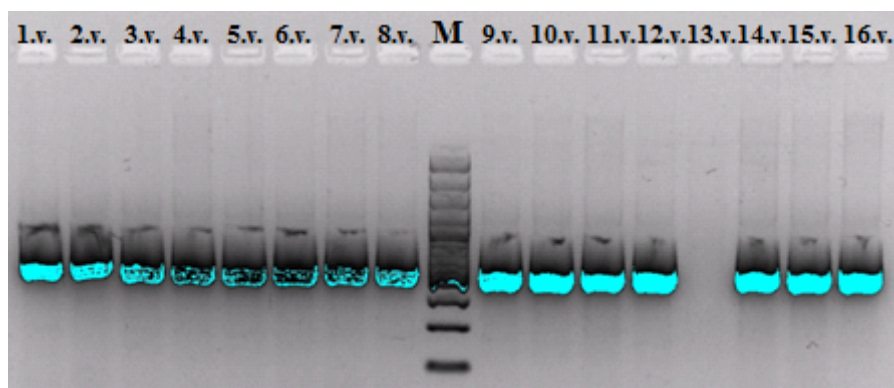
Pomocí isolačního kitu Invitem Plant DNA, byla vyisolována genomová DNA z celkem 31 vzorků, představujících jednotlivé rostliny. Její kvalita a částečně i množství bylo zkontrolováno pomocí elektroforetické analýzy na agarózovém gelu. Následně byla provedena PCR amplifikace vybraných cpDNA a ITS segmentů a výsledky opět analyzovány pomocí elektroforézy.



a)



b)



c)

Pozn: M = molekulární DNA žebřík 100 bp Fermentas (silnější pruh je 500 bp), 1.v - 16.v. = jednotlivé vzorky.

Obrázek č. 5: Ukázka výsledných fotografií elektroforézy - **a)** izolovaná genomová DNA (poslední marker v žebříku je 3 kb a intaktní gDNA musí být kolem 20 kb), **b)** amplifikovaný *ITS* fragment (velikost produktu okolo 500 párů bází) a **c)** *rbcL* (velikost produktu okolo 500 párů bází).

3.1 Výsledky z molekulární části práce

Po úspěšné amplifikaci ověřené elektroforetickou seprací 5 µl PCR produktu, byla zbývající část přečištěna pomocí SureClean a po změření koncentrace byla namíchána sekvenační reakce obsahující 500 ng PCR produktu a 5 pmol sekvenačního primeru v celkem 14 µl a odeslána k sekvenaci. Získané sekvence byly analyzovány pomocí softwaru, včetně případné editace. Následně byla u části provedena analýza shody s databázovými sekvencemi pomocí BLAST vyhledávání. Polymorfní pozice byly identifikovány pomocí softwaru MEGA 5.1 a následně převedeny do Excell tabulky.

Celkem byl zjištěn polymorfismus v 32 pozicích ve fragmentech genu *ITS*.

Tabulka č. 6: Vyhodnocení *ITS* pro *Vicia tetrasperma*.

Vzorek	Pozice									
	417	418	419	420	421	422	470	473	491	492
13L1800484	T	T	T	C	G	T	G	G	C	A
V. Losiny	T	T	T	C	G	T	G	G	C	A
Arménie	G	T	C	G	G	T	G	T	C	C
PI494694	G	T	C	T	C	A	T	T	G	A
PI420173	G	T	C	T	C	A	T	T	G	A
13L1800524	G	T	C	T	C	A	T	T	G	A
13L1800011	G	T	C	T	C	A	T	T	G	A
Olomouc	G	T	C	T	C	A	T	T	G	A

Podle zřejmých výsledků v tabulce č. 6 můžeme říci, že sekvence *ITS* vykazují určitou variabilitu a to hned v několika blocích nukleotidů (417, 419, 420, 422, 470, 491, 492).

Tabulka č. 7: Vyhodnocení *rbcL* *Vicia tetrasperma*.

Vzorek	Pozice							
	545	546	547	548	549	550	551	552
PI420173	T	C	T	C	C	G	C	G
PI494694	T	C	T	C	C	G	T	G
13L1800524	T	C	T	C	C	G	T	G
13L1800011	T	C	T	C	C	G	T	G
13L1800484	T	C	T	C	C	G	T	G
Arménie	T	C	T	C	C	G	T	G
V. Losiny	T	C	T	C	C	G	T	G
Olomouc	T	C	T	C	C	G	T	G

V cp DNA - *rbcL* druhu *Vicia tetrasperma* se ukázala pouze jedna rozdílná sekvence a to vzorku PI420173 pocházejícího z Francie. Při porovnávání výsledků *matK* se žádná variabilita neprokázala.

Tabulka č. 8: Vyhodnocení ITS u *Lathyrus clymenum*.

	Pozice																										
	48	60	81	120	123	125	127	146	161	341	358	368	376	378	448	465	466	473	485	498	544	545					
PI283503	T	T	G	A	T	G	T	T	C	A	G	G	A	C	C	A	C	G	A	T	A	C					
ATC80921	T	T	G	A	T	G	T	T	C	A	G	G	A	C	C	A	C	G	A	T	A	C					
RBGE532	T	T	G	A	T	G	T	T	C	A	G	G	A	C	C	A	C	G	A	T	A	C					
PI358851	T	T	G	A	T	G	T	T	C	A	G	G	A	C	C	C	G	T	C	T	C	T					
PI237561	C	G	A	G	C	T	C	A	T	T	A	T	C	T	A	A	T	T	G	C	A	T					
PI344076	C	G	A	G	C	T	C	A	T	T	A	T	C	T	A	A	T	T	G	C	A	T					
ATC81087	C	G	A	G	C	T	C	A	T	T	A	T	C	T	A	A	T	T	G	C	A	T					
ATC80923	C	G	A	G	C	T	C	A	T	T	A	T	C	T	A	A	T	T	G	C	A	T					
RBGE541	C	G	A	G	C	T	C	A	T	T	A	T	C	T	A	A	T	T	G	C	A	T					
PI255367	C	G	A	G	C	T	C	A	T	T	A	T	A	T	A	A	T	T	G	C	A	T					
PI283519	C	G	A	G	C	T	C	A	T	T	A	T	A	T	A	A	T	T	G	C	A	T					
ATC80922	C	G	A	G	C	T	C	A	T	T	A	T	A	T	A	A	T	T	G	C	A	T					
NS 01	C	G	A	G	C	T	C	A	T	T	A	T	A	T	A	A	T	T	G	C	A	T					

Přestože byly získány vzorky pouze druhu *L. clymenum*, bylo očekáváno že se mezi těmito objeví i druh, popř. poddruh *L. articulatus*, což se potvrdilo u položek (PI283503, PI358851, ATC80921 a RBGE532). Toto přiřazení bylo možné pomocí srovnání sekvencí uložených v databázi NCBI popř. díky přímé komunikaci s autorem H. Schaeferem.

Podle sekvencí *ITS* vidíme jasnou variabilitu u rodu *Lathyrus clymenum*, mezi vzorky bude pravděpodobně skryt *Lathyrus articulatus*, který je často definován jako subspecie *L. clymenum*.

Tabulka č. 9: Vyhodnocení *rbcL* u *Lathyrus clymenum*.

Vzorek	Pozice				
	547	548	549	550	551
PI344076	C	G	T	G	G
PI255367	C	G	T	G	G
PI237561	T	G	G	T	G
PI283503	T	G	G	T	G
PI283519	T	G	G	T	G
ATC 81087	T	G	G	T	G
ATC 80923	T	G	G	T	G
ATC 80921	T	G	G	T	G
ATC 80922	T	G	G	T	G
RBGE 541	T	G	G	T	G
NS 01	T	G	G	T	G
RBGE 532	T	G	G	T	G
PI358851	T	G	G	T	G

Podle tabulky č. 9 sledujeme variabilitu pouze u dvou položek (PI344076 z Turecka z obl. Marmaris a PI255367 ze Srbska z obl. Montenegro) a to ve třech nukleotidech.

Tabulka č. 10: Vyhodnocení *matK* u *Lathyrus clymenum*.

Vzorek	Pozice				
	42	81	514	568	659
PI283503	A	A	G	G	T
ATC 80921	A	A	G	G	T
RBGE 532	A	A	G	G	T
PI344076	C	G	A	A	G
PI255367	C	G	A	A	G

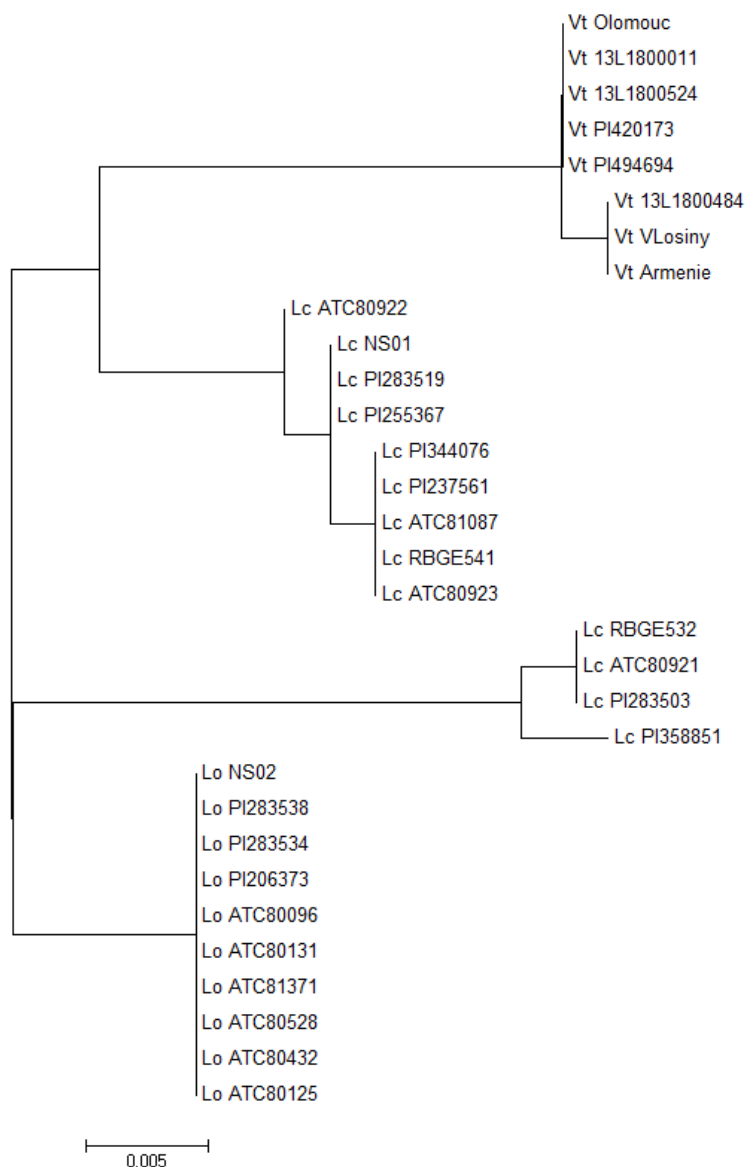
ATC 80922	C	G	A	A	G
NS 01	C	G	A	A	G
PI237561	C	G	A	A	G

U cp DNA - *matK* se variabilita objevuje častěji než u *rbcL*. Variabilita se vyskytuje u stejných položek jako při *ITS* narozdíl od *rbcL*.

Tabulka č. 11: Vyhodnocení *matK* u *Lathyrus ochrus*.

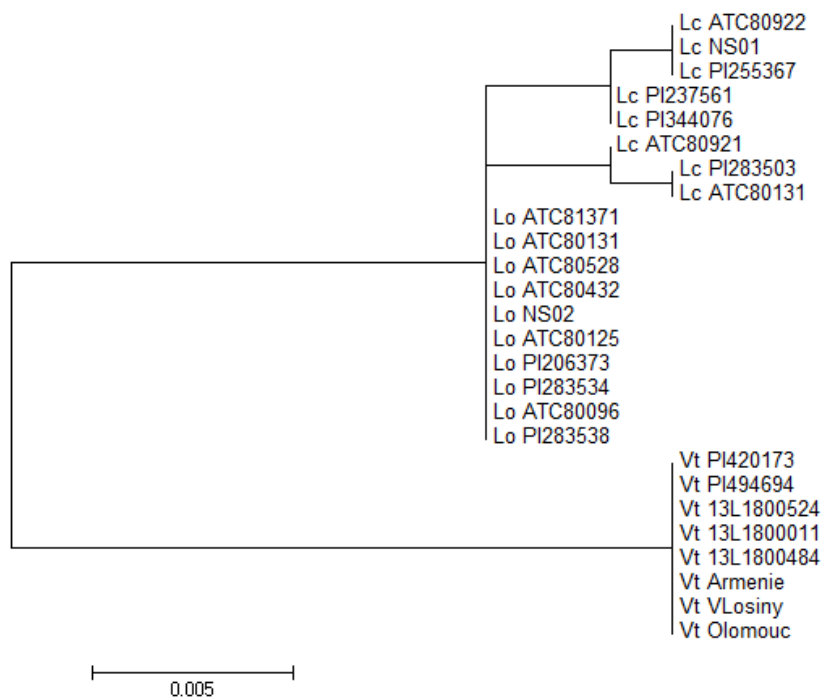
Vzorek	Pozice				
	677	678	679	680	681
PI206373	C	T	A	T	C
PI283534	C	T	A	C	T
PI283538	C	T	A	C	T
ATC 80096	C	T	A	C	T
ATC 80131	C	T	A	C	T
ATC 81371	C	T	A	C	T
ATC 80528	C	T	A	C	T
ATC 80432	C	T	A	C	T
ATC 80125	C	T	A	C	T
NS 02	C	T	A	C	T

ITS u rodu *L. ochrus* nevykazovalo žádnou variabilitu. Z chloroplastové DNA se sekvencovaly u tohoto druhu pouze *matK* lišící se 2 nukleotidy pouze u položky PI206373 z Kypru (Tabulka č. 11), variabilita je nízká.



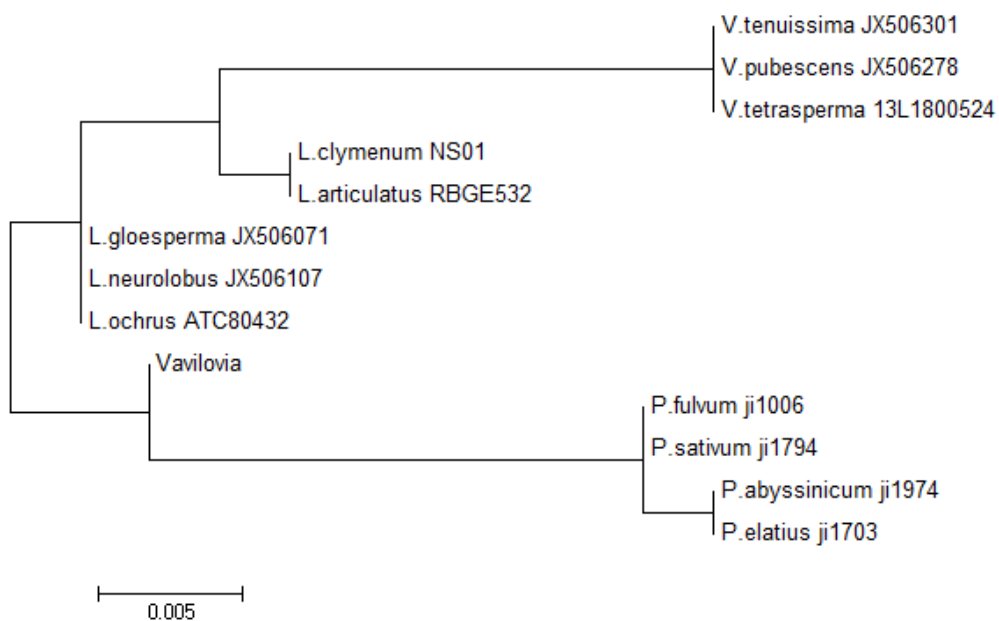
Obrázek č. 6: Znárodnění přibuznosti analyzovaných položek jednotlivých druhů zvolených pro tuto práci podle sekvencí *ITS*.

Na fylogramu vidíme nejvíce členěné položky *L. clymenum* a 4 položky tohoto druhu více separovaného od ostatních odpovídající *L. articulatus*. *Vicia tetrasperma* vykazuje malou variabilitu a všechny analyzované položky *L. ochrus* jsou identické.



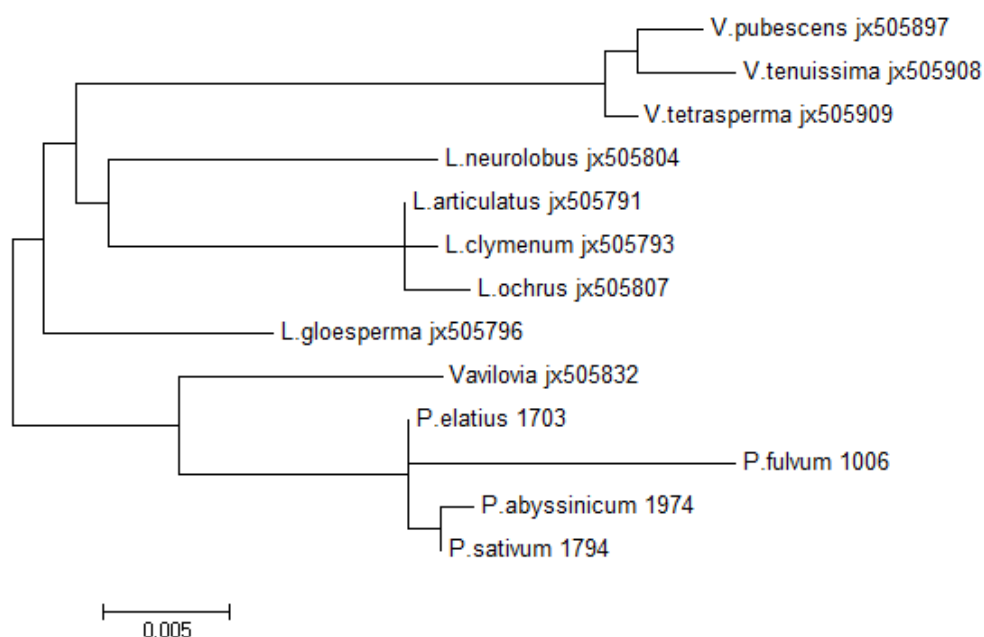
Obrázek č. 7: Znárodnění příbuznosti druhů zvolených pro tuto práci podle sekvencí *matK*.

Fylogram ukázal na identičnost vzorků druhů *V. terasperma* a *L. ochrus*. Nejvíce variability vykazoval *L. clymenum*.



Obrázek č. 8: Fylogeneze dle sekvencí ITS dalších příbuzných druhů k druhům *V.tetrasperma*, *L. clymenum* a *L. ochrus*.

Pro srovnání svých sekvencí s ostatními druhy (*Vicia tenuissima*, *V. pubescens*, *Lathyrus gloesperma*, *L. neurolobus*, *Vavilovia*, *Pisum fulvum*, *P. elatius*, *P. sativum*, *P. abyssinicum*) byly použity sekvence z práce (Schaefer et al. 2012).



Obrázek č. 9: Fylogeneze dle sekvencí *matK* dalších příbuzných druhů k druhům *V.tetrasperma*, *L. clymenum* a *L. ochrus*.

3.2 Vyhodnocení morfometrické části

Pro vyhodnocení morfometrického měření, byly použity tyto znaky: počet internodií do 1. květu, počet internodií do 1. složeného listu, větvení, počet párů lístků, postavení lusku, pigmentace, délka stopky, délka lusku, počet květů, poměr šířky/délce listů. Znárodnění výsledné analýzy dat (viz soubor na CD - morfometrie). Toto hodnocení bylo možné provést jen u položek druhu *L. clymenum* (včetně *L. articulatus*), které byly získány v podmínkách pěstování, neboť druhy *L. ochrus* a především pak *Vicia tetrasperma* podlely vysokému tlaku hmyzích škůdců, kteří se ve sklenících vyskytly i navzdory pesticidnímu ošetření. Muselo tak být ustoupeno od původní záměru detailnějšího morfologického hodnocení vnitrodruhové variability a jejímu srovnání s variabilitou detekovanou pomocí DNA analýzy.

Původní semena byla získaná z různých genofondových bank. Po změření byly hodnoceny vybrané charakteristiky (viz tabulka 12 a 13). Z nich je patrné, že velké odchylky od jednotlivých položek nejsou. Jsou téměř neinformativní, proto tyto výsledky nebyly zapracovány do výsledného fylogramu morfologických znaků. Jelikož bylo měřeno vždy celkem 10-20 semen na danou položku (vzorek) byla získána také směrodatná odchylka (viz soubor na CD - LATHYRUS-morfologie-final).

Tabulka č. 12: Výsledky měření semen *Lathyrus ochrus*.

	Plocha	Vnější obvod	Max. průměr	Min. průměr	Kruhovitost
	Průměr	Průměr	Průměr	Průměr	Průměr
PI283538	92,75	35,10	11,69	10,25	0,941
PI283534	95,46	36,10	11,74	10,11	0,948
PI206373	101,08	37,61	12,36	11,02	0,942
ATC 80096	102,90	34,09	13,49	10,81	0,738
ATC 80131	96,23	32,73	10,74	10,23	0,946
ATC 81371	98,62	30,30	10,98	9,97	0,934
ATC 80528	97,35	33,20	10,88	9,67	0,922
ATC 80432	95,48	31,45	10,41	9,38	0,940
ATC 80125	98,45	34,19	10,88	10,05	0,922
NS02	93,24	32,86	10,88	9,83	0,942

Tabulka č. 13: Výsledky měření semen *Lathyrus clymenum*.

	Plocha	Vnější obvod	Max. průměr	Min. průměr	Kruhovitost
	Průměr	Průměr	Průměr	Průměr	Průměr
ATC80922	82,93	34,66	10,84	9,94	0,865
ATC81087	85,15	34,12	10,96	10,00	0,919
PI283519	92,29	35,17	11,46	10,45	0,936
PI358851	74,64	31,86	10,12	9,48	0,923
PI283503	79,88	32,86	10,66	9,47	0,922
PI344076	81,66	33,20	10,88	9,67	0,928
ATC80923	82,36	31,45	10,41	9,38	0,921
ATC80921	82,64	33,07	10,92	9,78	0,948
PI255367	80,23	32,73	10,93	9,65	0,939
RBGE532	75,95	32,27	10,41	9,52	0,917
RBGE541	82,64	33,07	10,92	9,78	0,948
NS01	89,60	34,19	11,20	10,32	0,960
PI237561	88,03	34,00	11,22	10,11	0,955

Měření bylo prováděno na více semenech daného druhu. Na vybraných veličinnách je minimum odchylek. Příklady fotografií (viz příloha č. 2).

Z fotografií postavení blizen a rozmístění chloupků na kartáčku - typ (ab/ad-axilarity), pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX60/Stereomikroskop Olympus SZ40, nebyla v rámci jedinců žádná variabilita. Z fotografií lze pouze určit o jaké rody se jedná. Rod *Pisum* by se dal identifikovat na úroveň druhu. Příklady fotografií (viz příloha č. 4).

Vybrané nasnímané herbářové položky, použité k morfometrii listů (viz příloha č. 3) a další fotografie z místa pěstování ve sklenicích (viz příloha č. 1).

4 DISKUSE:

Ve své práci jsem sledovala vnitrodruhovou variabilitu dvou vybraných druhů hrachoru (*L. ochrus* a *L. clymenum*). Tyto druhy jsou ve fylogeneticky důležité pozici k rodům *Pisum*, *Lathyrus* a *Vavilovia*. Z podobného důvodu byla vybrána vikev (*Vicia tetrasperma*) jako dostupný zástupce fylogenetické větve spojující rody *Lathyrus* a *Vicia*.

Velmi blízká příbuznost mezi rody *Lathyrus* a *Vicia* je známá. Už dle Kupicha (1981) byly hranice mezi těmito rody hodně diskutovány a to nejen kvůli sekci *Oroboid*, která tvoří most mezi oběma rody.

Cílem vlastní práce však nebylo zjistit vnitrodruhovou variabilitu jako takovou, což by vyžadovalo použití jiných technik (např. AFLP, IRAP, nebo mikrosatelitních markerů (Almeida *et al.* v tisku) umožňující odlišení až do úrovně jedinců, ale použít právě jen fylogeneticky informativních a široce využívaných markerů jako je *ITS* a cpDNA (*matK* a *rbcL*). Právě tyto sekvence byly a jsou využívány pro fylogenetické studie, včetně tribu *Fabeae* (Schaefer *et al.* 2012).

Přestože pokrok sekvenačních technologií a související snížení finanční náročnosti umožňují analýzu i více jedinců pro daný druh, ve většině dosud publikovaných fylogenetických studií se vyskytuje jen jeden „reprezentativní“ zástupce pro daný druh. Vzhledem k očekávané existenci proměnlivosti (sekvenčnímu polymorfismu) je však možné, že fylogeneticky informativní nukleotidové záměny, mohou být často ve skutečnosti menší/větší právě díky výskytu vnitrodruhové proměnlivosti.

Analýza zastoupení jednotlivých haplotypů (ať již definovaných na základě jaderných genů, jako je *ITS*, nebo častěji pomocí cpDNA) se využívá při studiu populací – např. (viz práce na *L. pannonicus*, Schlee *et al.* 2011). V této práci bylo pomocí *ITS* (internal transcribed spacers *ITS1/ITS2* a 5' external transcribed spacer, ETS) zjištěno, že genetická diverzita se spíše odráží od ekologické diverzity než od biogeografie a tradičního dělení subspecií (Schlee *et al.* 2011). *ITS* bylo použito v práci týkající se intraspecifické variability druhu *Lathyrus japonicus* (Asmussen *et al.* 1998). *ITS* je u některých druhů problematická a to kvůli duplikaci genů a přítomnosti pseudogenů či paralogů (Chase *et al.* 2007).

Z mé fylogenetické analýzy *ITS* vybraných druhů pro tuto práci vyplývá, že je u těchto druhů velmi slabá variabilita a to i přes rozsáhlý areál sběru jednotlivých populací, ze kterých byl materiál odebrán. Nejvíce variabilní byl druh *Lathyrus clymenum*, kde se objevilo několik bloků sekvencí odpovídající u 3-4 položek (vzorků) druhu *Lathyrus articulatus*. U sekvencí *rbcL* velká variabilita nebyla. Většinou se jednalo o pouze 1-3 nukleotidové záměny, což se vzhledem ke kódujícímu charakteru daného fragmentu lze očekávat. Přesto je tato sekvence stále používána ve fylogenetických studiích a to vzhledem k její univerzálnosti (jak fylogenetické, tak z pohledu PCR amplifikovatelnosti). *MatK* dopadla z tohoto pohledu obdobně. Při porovnávání mých sekvencí a sekvencí dalších druhů rodu *Lathyrus*, *Vicia*, ale i *Pisum* a *Vavilovia* použitých v práci (Schaefer *et al.* 2012), byla zřetelná fylogenetická příbuznost. Větší pak u rodu *Lathyrus* a *Vicia*, *Pisum* a *Vavilovia*.

Zjištění míry této variability je rovněž důležité pro zavedení tzv. barcoding (Hollingsworth *et al.* 2011), sloužící i k možné zpětné identifikaci analyzovaných vzorků (Madesis *et al.* 2012), což má využití v různých oborech, jako je farmakologie, foresní botanika-genetika apod.

Dle studie Schaefer *et al.* (2012) je v současné době diskutována nová delimitace rodů *Pisum*, *Vicia* a *Lathyrus*, kde právě mnou analyzované druhy budou nově přeřazeny, tak aby byla dosažena monofylie. Navrhované řešení je buď převedení druhů *L. ochrus*, *L. clymenum* a *L. articulatus* do rodu *Pisum* Sp. Pl. 729 (Linne 1753), (společně s druhy *L. neurolobus*, *L. nissolia* a *L. gloeosperma*) nebo nejlépe a nejpravděpodobněji naopak začlenění rodů *Pisum* a *Vavilovia* do rodu *Lathyrus*, pod jmény *Lathyrus oleraceus* (Lamarck 1778) a *Lathyrus formosus*.

V této práci analyzované položky *Vicia tetrasperma* nevykazuovaly žádnou variabilitu na úrovni *ITS* a jen na úrovni sledovaných cpDNA, a to navzdory poměrně širokému geografickému záběru. Toto zjištění kontrastuje s prací (Huh & Huh 2001), kteří však použili izozymových markerů pro studium diverzity druhu na Korejském poloostrově a Japonsku, a zjistili 50% polymorfismus mezi 17 analyzovanými populacemi. V závěru a mimo původní rámec práce byla testována metoda IPBs (Kalendar *et al.* 2010) což je univerzální amplifikace retrotransponových sekvencí, podobně jako u původní IRAP. Testované primery zjistili vnitrodruhovou variabilitu i u cpDNA popř. *ITS* identických položek. Těmito

postupy by bylo možné zjistit vnitrodruhovou variabilitu případně až na úrovni jedinců, což však nebylo cílem mé práce.

Podobně v případě druhu *L. ochrus* se ukázala stabilita (neproměnlivost) *ITS* sekvencí, a stejně tak i použitá *matK* byla odlišná pouze (ve 2 SNPech) a to jen v případě položky PI206373 původem z Kypru.

Naopak u druhu *L. clymenum*, kde získaný materiál pocházející z genových bank, nebyl a priori taxonomicky rozlišený na druhy *L. clymenum* a *L. articulatus* (resp. *L. clymenum subsp. articulatus*), molekulární a částečně i morfologická analýza poměrně jasně ukázala odlišnost obou druhů (poddruhů), s tím že v případě *matK* se jednalo o 5 nukleotidových záměn, které se vyskytovaly u 3 položek, jedna položka odpovídající pravděpodobně *L. articulatus* se špatně naamplifikovala během PCR. V případě *matK* nebyla použita celá část (2.5 kb dlouhá), ale byl použit jen koncový trnK intron, který je nejvariabilnější (Schaefer *et al.* 2012), na rozdíl od protein kódující sekvence jako je *rbcL*, která odlišnost vzorků odpovídajících *L. articulatus* nepotvrdila. Zajímavý je rozdíl mezi položkami *L. clymenum* odlišenými pomocí *rbcL* a *matK* a to přesto, že oba geny se nacházejí v těsném sousedství u kompletních sekvencí chloroplastové DNA publikované u *L. sativus* a *P. sativum* (Magee *et al.* 2010). Tyto výsledky jsou rozdílné ve srovnání s daty pro rod *Pisum* (Smýkal, nepublikováno), kdy haplotyp *matK*, odpovídá haplotypu *rbcL* i *trnSG*.

V rámci rodů *Lathyrus*, *Pisum* a *Vicia*, byla vnitrodruhová variabilita studována nejvíce u kulturních druhů, v rámci analýzy genetické diverzity uchovávané v genofondových kolekcích (např. Smýkal *et al.* 2011). Naopak v případě analýzy planých druhů bobovitých bylo publikováno jen minimum prací na úrovni populačních studií, jako např. analýza genetické diverzity druhu *Vicia cracca* (Trávníček *et al.* 2010) nebo zmíněná analýza *L. pannonicus* (Schlee *et al.* 2011). Podrobná multivariátní a kladistická analýza byla provedena analýzou 53 morfologických znaků, což vedlo k delimitaci 4 druhů a 6 poddruhů v rámci komplikovaného agregátu *Vicia sativa* (Van den Wouw *et al.* 2003).

Přestože anonymní markery především ve fingerprinting formátu jako je AFLP nejsou vhodné pro fylogenetické studium, jejich použití vedlo ke správnému přiřazení analyzovaných položek druhů *L. clymenum*, *L. articulatus*, *L. ochrus* a *L. gloeospermus* do sekce *Clymenum* (Shehadeh 2011), což naznačuje opět blízkou

fylogenetickou příbuznost a odpovídá jak výsledkům mé vlastní práce, tak podrobnější a rozsáhlejší studii (Schaefer *et al.* 2012). Stejná práce ukázala velmi blízkou příbuznost (až identitu) mezi *L. clymenum* a *L. articulatus*, podporující spíše podruhy než samostatné druhy, což odpovídá i výsledům této bakalářské práce. Genetická příbuznost těchto dvou druhů byla diskována v práci Burlayeva (2009), kde autorka cituje práci Trankovského (1967), jež pomocí křížení zjistila existenci reprodukční bariéry obou druhů, projevující se v nízké fertilitě pylu u získaných hybridů, což podporuje jejich samostatnou existenci. Zmíněna je také ne zcela spolehlivá morfologická odlišnost, založená především na délce resp. šířce fylodických listů, s tím, že především na ostrovech Egejského moře se často nacházejí přechodné typy, možného hybridního charakteru. K podobným závěrům pokud se týká morfologického hodnocení poměrů šířky a délky listů jsem dospěla i ve své práci, kdy jen část molekulárně identifikovaných položek *L. articulatus* vykazovala delší a užší listy, a naopak *L. clymenum* širší fylodické listy. Analýza DNA nepotvrdila možný hybridní charakter těchto položek ani na úrovni jaderně kódovaného *ITS* fragmentu, který se právě používá k těmto účelům. Možným vysvětlením by byla historicky dávná datace tohoto křížení, která by díky tzv. postupné homogenizaci rDNA lokusů setřela rozdíly mezi těmito původně hybridními jedinci. Genetická příbuznost *L. clymenum* a *L. ochrus* (ale ne již *L. gleospermus*) byla ukázána pomocí analýzy chloroplastové DNA Asmussen a Liston (1998). A stejně tak Davis (1970) konstatoval, že na základě morfologie nelze jednoznačně odlišit *L. clymenum* a *L. articulatus*.

Morfologická část práce byla prováděna především z důvodu „tréninku“ na případnou pozdější práci s větším počtem druhů. Práce byla zaměřena jak na fylogeneticky informativní znaky, jako byly charakteristiky květu a především blizny, ale rovněž i na mnohem proměnlivější znaky, do značné míry ovlivněné prostředím, jako je počet internodií, tvar listů, postavení lusků apod. Vzhledem k neočekávaným problémům s pěstováním ve skleníkových podmínkách, především vzhledem k negativnímu vlivu napadení hmyzími škůdci (svilušky a trásněnky) společně s vysokou teplotou, jsou získaná data značně zatížená chybou. Přesto jsem se pokusila tato data použít a vyhodnotit tak vnitrodruhovou variabilitu na úrovni jedinců.

Přestože byl sledován jen omezený počet jedinců (květů) je zřejmé, že právě květní charakteristiky jsou velmi stabilní a oprávněně využívané taxonomicky (Oskoueiyán *et al.* 2011).

Morfologické znaky použila rovněž (Lehte 2009a), pro fenetickou analýzu rodů *Vicia* a *Lathyrus*, zde však byly hodnoceny znaky jen jako průměr na jeden druh, resp. se jednalo o znaky hodnocené pomocí zjednodušené 2 - 5 bodové stupnice, často však binárně jako přítomnost/absenci daného znaku. Naopak ve vlastní práci jsem původně měla/chtěla využít přesnější morfometrické měření variabilních znaků pro postihu vnitrodruhové variability, tak jak je běžně využívána při studiu genofondových kolekcí (Smýkal *et al.* 2008).

5 ZÁVĚR:

Molekulární výsledky práce potvrdily velmi blízkou příbuznost mezi druhy *Lathyrus ochrus*, *Lathyrus clymenum* a *Lathyrus articulatus*, včetně jejich fylogenetického vztahu k rodům *Pisum* a *Vavilovia*.

Sekvence fylogenetických cpDNA (*matK* a *rbcL*) i jaderných markerů (*ITS*) prokázala, že vnitrodruhová variabilita sledovaných druhů se nepřekrývá s mezidruhovou popř. mezirodovou, a že tedy publikované výsledky (Schaefer et al. 2012) jsou dostatečně robustní a platné.

V případě druhu *Vicia tetrasperma* se zjistila minimální až nulová variabilita ve sledovaných sekvencích, což kontrastuje s vnitrodruhovou variabilitou příbuzných druhů *Pisum* a *Vavilovia*.

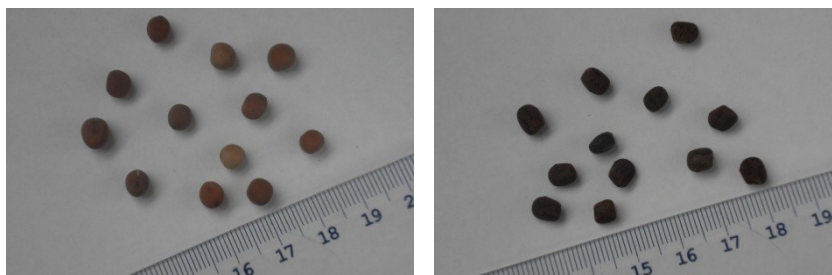
Sekvence *matK*, *ITS* a morfometrické měření listů prokázaly přítomnost *Lathyrus articulatus* v rámci druhu *L. clymenum*. A to i přes to, že semena byla uložena v genových bankách pod jedním druhem - tedy *L. clymenum*.

Měření morfologických znaků se ukázalo jako čístečně problematické jednak vzhledem k silnému vlivu podmínek pěstování, tak i díky časté vnitropoložkové variabilitě, která by vyžadovala větší počet sledovaných znaků a jedinců, tak aby umožnila potřebné statistické zpracování.

6 PŘÍLOHY:



Příloha č.1: Ukázka pěstování rostlin ve skleníku.



Příloha č. 2: Snímání semen - vlevo *Lathyrus ochrus* a vpravo *Lathyrus clymenum*.



Příloha č. 3a: Naskenovaná herbářová položka *Lathyrus ochrus*.



Příloha č. 3b: Naskenovaná herbářová položka *Lathyrus clymenum*.



Příloha č.4a: Vypreparovaná blizna se semeníkem druhu *Lathyrus ochrus*.



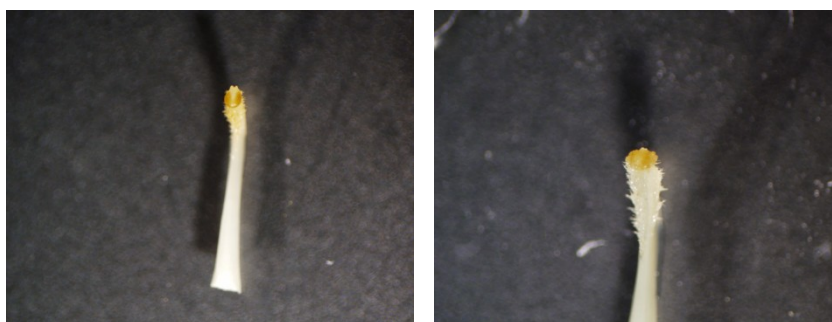
Příloha č.4b: Vypreparovaná blizna se semeníkem druhu *Lathyrus clymenum*.



Příloha č.4c: Vypreparovaná blizna se semeníkem druhu *Vicia tetrasperma*.



Příloha č.4d: Detail z blizen druhu *Pisum abyssinicum* (vlevo) a vpravo *Pisum sativum* subsp. *elatius*.



Příloha č.4e: Detail z blizen druhu *Pisum fulvum* (vlevo) a vpravo *Pisum sativum*.

7 CITACE:

- AKOPIAN J., SARUKHANYAN N., GABRIELIAN I. & et al.(2010): Reports on establishing an ex situ site for 'beautiful' *Vavilovia* (*Vavilovia formosa*) in Armenia. - Genetic Resources and Crop Evolution. 57: 1127-1134.
- ALMEIDA N. F., LEITÃO S. T., CAMINERO C., TORRES A. M., RUBIALES D. & VAZ PATTO M. C. (in press): Transferability of molecular markers from major legumes to *Lathyrus* spp. for their application in mapping and diversity studies. - Molecular Ecology.
- ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHAFFER A.A., ZHANG J.H., ZHANG Z, MILLER W., LIPMAN D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. - Nucleic Acids Research. 25: 3389-3402.
- AREVSHATIAN I. G. (2002): Genus *Lathyrus* L. (*Fabaceae*) in Southern Transcaucasia. – Flora, Rastitelnost, Rast. Res. Armenii. 14: 32–37.
- ASMUSSEN, C. B. & LISTON, A. (1998): Chloroplast DNA characters, phylogeny, and classification of *Lathyrus* (*Fabaceae*). – Amer. J. Bot. 85(3): 387–401.
- BEN-ZE'EV N. & ZOHARY D. (1973): Species relationship in the genus *Pisum* L. - Israel Journal of Botany. 22: 73–91.
- BOTSTEIN D., WHITE R. L., SKOLNICK M. & DAVIS R. W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. - Am. J. Hum. Genet. 32: 314–331.
- BURLAYEVA M. O. (2009): Regarding the volume of the species *L. clymenum* L. (*Fabaceae*) In. Genetic resources of cultivated plants. Problems of crop evolution and systematic. St Petersburg. 156-159.
- CROFT A.M., PANG P.C.K. & TAYLOR P.W.J. (1999): Molecular analysis of *Lathyrus sativus* L.(grasspea) and related *Lathyrus* species. - Euphytica. 107:167-176.
- CZEFRANOVA Z. (1971): Conspectus systematis generis *Lathyrus* L. – Nov. Syst. Pl. Vas. 8: 191–201.

- DAVIES P.H. (1970): *Vavilovia* A. Fed. In: Davies P.H. (ed) Flora of Turkey and East Aegean Islands 3. University of Edinburgh, Edinburgh: 44–45.
- DOGAN M., KENCE A. & TIGIN C. (1992): Numerical taxonomic study on Turkish *Lathyrus* (*Leguminosae*). – Edinb. J. Bot. 49(3): 333–341.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L., BALLENGER J.A., DICKSON E.E., KAJITA T. & OHASHI (1997): A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the *Leguminosae*: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. - American Journal of Botany. 84: 541–554.
- ENDO Y., CHOI B.H., OHASHI H. & DELGADO-SALINAS A. (2008) Phylogenetic relationships of New World *Vicia* (*Leguminosae*) inferred from nrDNA internal transcribed spacer sequences and floral characters. - Systematic Botany. 33: 356–363.
- FENNELL S.R., POWELL W., WRIGHT F., RAMSAY G. & WANGH R.(1998): Phylogenetic relationships between *Vicia faba* (*Fabaceae*) and related species inferred from chloroplast *trnL* sequences. - Plant Syst Evol. 212:247–259.
- Goethe J.W. (1790): The Metamorphosis of Plants. MIT 2009
- GOROVOV L.I. (1937): Gorooh (Peas). Kulturnaja Flora SSR. Moscow: State Printing Offic. 229–336.
- HOLLINGSWORTH P.M., GRAHAM S.W. & LITTLE P.D. (2011): Choosing ang Using a Plant DNA Barcode. - PloS ONE 6(5).
- HUH M. K. & HUH H. W. (2001): Genetic diversity and population structure of wild lentil tare. - Crop Sci. 41:1940–1946.
- CHASE, M. W., COWAN R. S., HOLLINGSWORTH P. M., VAN DEN BERG C., MADRIŃAN S., PETERSEN G., SEBERG O., JØRGENSEN T., CAMERON K.M., CARINE M., PEDERSEN N., HEDDERSON T. A. J., CONRAD F., SALAZAR G. A., RICHARDSON J. E., OLLINGSWORTH M. L., BARRACLOUGH T. G., KELLY L. & M.WILKINSON M. (2007):

- A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. - *Taxon* 56: 295–299.
- CHRTÍKOVÁ A. & BĚLOHLÁVKOVÁ R. (1995): *Lathyrus* L. - hrachor. - In: Slavík B. [edd.] *Květena České republiky*, 4: 416 - 437, Academia, Praha.
- CHRTÍKOVÁ A. (1995): *Pisum* L. - hrách. - In: Slavík B. [edd.] *Květena České republiky*, 4: 437 - 438, Academia, Praha.
- CHRTÍKOVÁ A. (1995): *Vicia* L. - vikev. - In: Slavík B. [edd.] *Květena České republiky*, 4: 386 - 414, Academia, Praha.
- JAASKA V. 2005: Isozyme variation and phylogenetic relationships in *Vicia* subgenus *Cracca* (*Fabaceae*). – *Ann. Bot.* 96: 1085–1096.
- KALENDAR R., ANTONIUS K., SMÝKAL P.; et al. (2010): iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. - *Theoretical and Applied Genetics*. 121: 1114-1120.
- KASS E. & WINK M. (1996): Molecular evolution of the *Leguminosae*: phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL*-sequences. - *Biochemical Systematics and Ecology*. 24: 365-378.
- KENICER G.J. (2007): Systematics and biogeography of *Lathyrus* L. (*Leguminosae*, *Papilionoideae*). PhD Thesis, Royal Botanical Garden Edinburgh.
- KENICER G.J., KAJITA T., PENNINGTON R.T. & MURATA J. (2005): Systematics and biogeography of *Lathyrus* (*Leguminosae*) based on internal transcribed spacer and cpDNA sequence data. - *American Journal of Botany*. 92: 1199–1209.
- KOSTERIN O.E., ZAYTSEVA O.O., BOGDANOVA V.S. & AMBROSE M. (2010): New data on three molecular markers from different cellular genomes in Mediterranean accessions reveal new insights into phylogeography of *Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Schmalh. - *Genetic Resources and Crop Evolution*. 57: 733–739.

- KUBÁT K., HROUDA L., CHRTEK J. jun., KAPLAN Z., KIRSCHNER J. & ŠTĚPÁNEK J. [eds.] (2002): Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha, 928 p.
- KUPICHA F. K. (1983): The infrageneric structure of *Lathyrus*. – Notes Roy. Bot. Gard. Edinb. 41(2):209–244.
- KUPICHA F. K. (1981): *Vicieae* (Adans.) DC. (1825) nom conserv prop. In: Polhill R.M. & Raven P.H. (eds) Advances in Legume Systematics 1. Kew: Royal Botanical Gardens: 377–381.
- KYPR J. (1999) Prodlužování DNA a mikrosatelity: Spínače, výplň nebo pouhý balast genetického textu?. - Vesmír. 78: 6: 328-329.
- LAMARCK J.-B. P. A. M. (1778): Flore française, ou descriptions succinctes de toutes les plantes qui croissent naturellement en France: 3v. 8°. Impr. Royale, Paris.
- LAMPRECHT H. (1963) Zur Kenntnis von *Pisum arvense* L. oect. *abyssinicum* Braun, mit genetischen und zytologischen Ergebnissen. - Agric Hort Genetics. 21: 35–55.
- LEHT M. (2009a): Phylogenetics of *Vicia* (*Fabaceae*) based on morphological data. - Feddes Repertorium. 120:379-393.
- LEHT M. (2009b): Phylogeny of Old World *Lathyrus* L. (*Fabaceae*) based on morphological data. - Feddes Repertorium. 120: 59-74.
- LINNE C. (1753): Species plantarum. - London.
- LOCK M. & MAXTED N. (2005): Tribe *Fabeae*. In: Lewis G., Schrire B., Mackinder B. and Lock M. (eds) Legumes of the World. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew.
- MADESIS P., GANOPOULOS I., RALLI P & TSAFTARIS A. (2012): Barcoding the major Mediterranean leguminous crops by combining universal chloroplast and nuclear DNA sequence targets. - Genetics and Molecular Research. 11: 2548-2558.

- MAGEE A. M., ASPINALL S., RICE D.W., CUSACK B.P., SÉMON M., PERRY A.S., STEFANOVIĆ S., MILBOURNE D., BARTH S., PALMER J.D., GRAY J.C., KAVANAGH T.A. & WOLFE K.H. (2010): Localized hypermutation and associated gene losses in legume chloroplast genomes. - *Genome Research* 20(12): 1700-1710.
- MAYER M.S. & BAGGA S.K. (2002): The phylogeny of *Lens* (*Leguminosae*): new insight from *ITS* sequence analysis. - *Plant Syst Evol.* 232:145-154.
- NEUSTUPA J. (2006): Co je geometrická morfometrika a morfologie znovu na scéně. - *Živa.* 2:54-56.
- OSKOUEIYAN R., KAZEMPOUR OSALOO S., MAASSOUMI A. A., NEJADSATTARI T. & MOZAFFARIAN V. (2011): Style micromorphology in the Tribe *Fabeae* (*Fabaceae*) with emphasis on *Lathyrus* in Iran and Turkey. - *J. Bot.* 17 (1): 81-87.
- SAAR D.E. & POLANS N.O. (2000): *ITS* sequence variation in selected taxa of *Pisum*. - *Pisum Genetics.* 109: 195–213.
- SEIJO J. G. & FERNANDEZ A. (2003): Karyotype analysis and chromosome evolution in South American species of *Lathyrus* (*Leguminosae*). – *Amer. J. Bot.* 90(7): 980–987.
- SHEHADEH A. A. (2011): Ecogeographic, genetic and taxonomic studies of the genus *Lathyrus* L. PhD thesis submitted to the University of Birmingham.
- SCHAEFER H., HECHENLEITNER P., SANTOS-GUERRA A. & et al.(2012): Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe *Fabeae* with special focus on the middle-Atlantic island lineages. - *BMC Evolutionary Biology.* 12:1-19.
- SCHLEE M., GÖKER M., GRIMM G. & HEMLEBEN V. (2011): Genetic patterns in the *Lathyrus pannonicus* complex (*Fabaceae*) reflect ecological differentiation rather than biogeography and traditional subspecific division. - *Botanical Journal of the Linnean Society.* 165 : 402–421.

- SKALICKÁ A. & SKALICKÝ V. (1995): *Fabaceae* LINDL. - bobovité. - In: Slavík B. [edd.] Květena České republiky, 4: 326 - 328, Academia, Praha.
- SMÝKAL P. (2006): Hrách v genomickém věku – 140 let od Mendlova objevu. - *Živa*. 4: 149-151.
- SMYKAL P., JING R., AMBROSE M. A., KNOX M. R., HYBL M; et al. (2008): Genetic diversity in European *Pisum* germplasm collections. - *Theoretical and Applied Genetics*. 125(2): 367-380.
- SMÝKAL P., KENICER G. J. & MIKIC A. (2009): 'Beautiful vavilovia' (*Vavilovia formosa*) and molecular taxonomy of tribe *Fabeae*. – In: Book of Abstracts IVth Congress of the Serbian Genetic Society. Tara. Jun. 1–5: 166.
- SMÝKAL P., KENICER G., FLAVELL A.; et al. (2011): Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. - *Plant Genetic Resources*. 9: 4-18.
- SMÝKALOVÁ I. & VINKLÁRKOVÁ P. (2011): Charakterizace odrůdy/položky v kolekcích genových zdrojů rostlin na základě obrazové analýzy korunních lístků a semen. - Agritec Plant Research, s.r.o., Šumperk
- STEELE K.P. & WOJCIECHWSKI M.F. (2003): Phylogenetic analyses of tribes *Trifolieae* and *Vicieae*, based on sequences of the plastid gene *matK* (*Papilionoideae: Leguminosae*). In: Klitgaard B.B. & Bruneau (eds) *Advances in Legume Systematics*. Kew: Royal Botanical Garden: 355–370.
- TRÁVNÍČEK P., ELIÁŠOVÁ A., SUDA J. (2010): The distribution of cytotypes of *Vicia cracca* in Central Europe: the changes that have occurred over the last four decades. *Preslia* 81: 149-163.
- VAN DEN WOUW. R., MAXTED N. & FORD-LLOYD B. V. (2003): A multivariate and cladistic study of *Vicia* L. ser. *Vicia* (*Fabaceae*) based on analysis of morphological characters. - *Plant Syst. Evol.* 237: 19–39.
- VAN DER MAESEN L.J.G. (1998): Wild plants as genetic resources for crop improvement. In. Mathew P., Sivadasan M. (Eds.) *Diversity and taxonomy of tropical flowering plants*. Calicut, Mentor Books: 93-112.

- VAVILOV N.I. (1949-1950). The phylogeographic basis of plant breeding. In. K. S. Chester (Trans.), The origin, variation, immunity, and breeding of cultivated plants. Waltham, MA: Chronica Botanica: 13-54.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. & ZABEAU M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. - Nucleic Acid Research. 23: 4407-4414.
- WILLIAMS G.K., KUBELIK AR., LIVAK K.L., Rafalski J.A. & Tingey S.V. (1990): DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. - Nucleic Acid Research. 18: 6531-6535.
- WOJCIECHOWSKI M.F., LAVIN M. & SANDERSON M.J. (2004): Aphylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. - American Journal of Botany. 91: 1846–1862.