

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2019

Bc. Lucie Smržová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Asociační mapování znaku
dormance semen *Pisum* sp.
a *Medicago truncatula***

Diplomová práce

Lucie Smržová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

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

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci na téma „Asociační mapování znaku dormance semen *Pisum* sp. a *Medicago truncatula*“ vypracovala samostatně pod vedením pana doc. Ing. Petra Smýkala, Ph.D. a s použitím uvedené literatury.

V Olomouci dne

Bc. Lucie Smržová

SOUHRN

Práce je zaměřena na dormanci semen, která ve velké míře ovlivňuje proces klíčení. Klíčení semen je pro rostliny velmi kritickým bodem, který je nutné naplánovat na období nejpříznivějších podmínek pro růst rostliny. Důležité adaptivní znaky u rostlin, jako je právě dormance semen, jsou obvykle kvantitativně podmíněné, tedy ovlivněny větším počtem genů a také faktory prostředí. V posledních letech se při zkoumání takových znaků ukázal jako přínosný přístup asociačního mapování, který hledá souvislosti mezi genetickým markrem (resp. genem, sekvencí DNA) a daným znakem.

Teoretická část práce se zabývá obecnou charakterizací dormance semen, popisem jednotlivých typů dormance, strukturou a vývojem semen a osemení. Další část je věnována různým faktorům ovlivňujícím dormanci a klíčení, dále pak je popsána dormance semen z hlediska adaptace a na závěr teoretické části je popsáno asociační mapování.

Praktická část obsahuje fenotypovou charakterizaci vybraných vzorků hrachu (*Pisum* sp.) a tolíce (*Medicago truncatula*), která zahrnuje především testování dormance/klíčení semen, dále také mikroskopickou analýzu osemení, měření tloušťky osemení či měření obsahu pigmentů (proanthokyanidinů). Další část je věnována sekvenčním analýzám vybraných kandidátních genů. U hrachu se jedná o tři kandidátní geny: PsCam035877 kódujícího bZIP transkripční faktor, PsCam048411 kódujícího protein fosfatázu (protein phosphatase 2C-like protein) a PsCam026975 kódujícího O-glykosyl hydrolázu (O-glycosyl hydrolase family 17 protein), které byly vybrány pomocí GWAS analýzy. Navíc také je součástí kandidátní gen PsCam036641, který kóduje polyfenol oxidasu (PPO) a byl vybrán na základě diferenciální exprese. U všech těchto genů následuje asociační analýza fenotypového projevu (dormance semen) a získaných genetických dat. V případě tolíce (*Medicago truncatula*) se práce věnuje asociační analýze u dvou homologních genů MTR_6g465430 a MTR_6g465420, které společně kódují CBF/DREB1 transkripční faktor.

SUMMARY

The work is focused on the dormancy of seeds, which largely influences the process of germination. Seed germination is a very critical point for plants, and it is important to plan this process to the most favorable conditions for the plant growth. Important adaptive features in plants such as seed dormancy are usually quantitative traits, that are influenced by multiple genes as well as environmental factors. In recent years, there is great interest to use the association mapping approach to dissect such traits, because it seeks for the link between some genetic marker (gene or DNA sequence) and the trait of interest.

The theoretical part deals with general characterization of seed dormancy, description of dormancy types, structure and development of seeds and seed coat. The next part is devoted to various factors influencing dormancy and germination, then the dormancy of seeds is described in terms of adaptation and the association mapping is described at the end of the theoretical part.

The practical part contains phenotypic characterization of selected samples of *Pisum* sp. and *Medicago truncatula*, which includes mainly testing seed dormancy/germination, microscopic analysis of the seed coat, measurement of seed coat thickness or pigment content (proanthocyanidins). The next part is devoted to sequential analyzes of selected candidate genes. There are three candidate genes for *Pisum* sp.: PsCam035877 encoding a bZIP transcription factor, PsCam048411 encoding a protein phosphatase 2C-like protein and PsCam026975 encoding an O-glycosyl hydrolase (O-glycosyl hydrolase family 17 protein), these genes have been selected by GWAS analysis. In addition, there is also candidate gene selected by differential expression PsCam036641, which encodes polyphenol oxidase (PPO). All these genes are followed by association analysis of phenotypic expression (seed dormancy) and genetic data. In the case of *Medicago truncatula*, the work deals with the association analysis of the two homologous genes MTR_6g465430 and MTR_6g465420, which encode CBF / DREB1 transcription factor.

Poděkování:

Mé poděkování patří především panu doc. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D., který mou práci vedl po odborné stránce. Děkuji mu za podporu při psaní této diplomové práce, velmi si vážím jeho laskavého přístupu a ochoty pomoci. Rovněž bych chtěla poděkovat za spolupráci panu Ing. Oldřichovi Trněnému (Zemědělský výzkum s.r.o., Troubsko) a panu RNDr. Aleši Soukupovi PhD. a jeho kolegům z katedry experimentální biologie rostlin, Univerzity Karlovy v Praze. Mé díky patří také všem pracovníkům katedry botaniky, PřF UP, se kterými jsem se během tvorby mé práce setkala. Práce byla částečně financována z projektu GAČR 16-21053S a také z interní grantové agentury Univerzity Palackého IGA 2018_001 a 2019_004.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Dormance semen	3
3.2	Typy dormance semen	4
3.2.1	Endogenní dormance	4
3.2.2	Exogenní dormance	5
3.3	Struktura a vývoj semene	6
3.4	Vývoj osemení	6
3.4.1	Role osemení v dormanci	8
3.5	Faktory ovlivňující dormanci a klíčení	10
3.5.1	Fytohormony a jejich funkce	11
3.5.2	Metabolismus lipidů	12
3.6	Dormance z hlediska adaptace	12
3.7	Asociační mapování	14
3.7.1	Vazebná nerovnováha (linkage disequilibrium, LD)	15
3.7.2	Metody asociačního mapování	16
3.7.3	Příklady asociačních mapovacích studií u rostlin	16
4	MATERIÁL A METODY	17
4.1	Biologický materiál	17
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	20
4.2.1	Použité chemikálie	20
4.2.2	Použité soupravy	20
4.2.3	Použité roztoky a jejich příprava	20
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	21
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	21
4.4.1	Spektrofotometrické měření DNA	22
4.4.2	GWAS analýza pro výběr kandidátních genů	22
4.4.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	23
4.4.4	Gelová elektroforéza	25
4.4.5	Sekvenování	25
4.4.6	Spektrofotometrická analýza rozpustných proanthokyanidinů v osemení	26
4.4.7	Spektrofotometrická analýza nerozpustných proanthokyanidinů v osemení	27
4.4.8	Měření tloušťky osemení pomocí mikrometru	28
4.4.9	Mikroskopická analýza řezů osemením	28

4.4.10	Testování dormance/klíčivosti	29
4.5	Použitý software.....	30
5	VÝSLEDKY	31
5.1	Fenotypová charakterizace u hrachu (<i>Pisum sp.</i>).....	31
5.1.1	Měření tloušťky osemení a množství pigmentů v osemení hrachu.....	34
5.1.2	Mikroskopická analýza osemení u hrachu	36
5.1.3	Průběh klíčení u vybraných vzorků hrachu.....	37
5.2	Sekvenční analýza a asociační mapování kandidátních genů u hrachu	39
5.2.1	Sekvenční analýza genu PsCam035877 kódujícího Bzip transkripční faktor	40
5.2.2	Asociační mapování u genu PsCam035877 kódujícího bZIP transkripční faktor.....	42
5.2.3	Sekvenční analýza genu PsCam048411 kódujícího protein podobný fosfatáze	44
5.2.4	Sekvenční analýza genu PsCam026975 pro O-glykosyl hydrolázu.....	46
5.2.5	Sekvenční analýza genu PsCam036641 kódující polyfenol oxidasu (PPO)	48
5.2.6	Asociační mapování u genu PsCam036641 kódujícího polyfenol oxidasu (PPO) ...	49
5.3	Fenotypová charakterizace u tolice (<i>Medicago truncatula</i>).....	52
5.4	Asociační mapování u tolice (<i>Medicago truncatula</i>).....	54
6	DISKUZE.....	56
7	ZÁVĚR	60
8	LITERATURA.....	61

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Příčný řez osemením hrachu (<i>Pisum</i> sp.), zvětšení 200x.	8
Obrázek č. 2: Pigmentace a povrch semen hrachu (<i>Pisum</i> sp.), zvětšení 20x.	9
Obrázek č. 3: Faktory ovlivňující dormanci semen.	10
Obrázek č. 4: Principy vazebné nerovnováhy a asociačního mapování.	15
Obrázek č. 5: Významné oblasti asociované s dormancí semen.	23
Obrázek č. 6: Klastrová analýza vzorků hrachu dle celkového klíčení.	33
Obrázek č. 7: Závislost poměru rozpustných/nerozpustných PA na celkovém množství PA v rámci kategorií dormance dle odezvy k teplotě 35/25 °C.	35
Obrázek č. 8: Mikroskopická analýza řezů osemením, zástupci z kategorie D, R a N.	37
Obrázek č. 9: Průběh klíčení u dormantních hrachů (celkem 14 vzorků).	38
Obrázek č. 10: Průběh klíčení u nedormantních hrachů (celkem 10 vzorků).	38
Obrázek č. 11: Pozice primerů a kandidátní sekvence genu PsCam035877 od ATG.	40
Obrázek č. 12: Zastoupení jednotlivých alel u genu PsCam035877.	42
Obrázek č. 13: Porovnání alel genu PsCam035877 dle celkového klíčení.	42
Obrázek č. 14: Pozice primerů a kandidátní sekvence genu PsCam048411 od ATG.	44
Obrázek č. 15: Pozice primerů a kandidátní sekvence genu PsCam026975 od ATG.	46
Obrázek č. 16: Klastrová analýza vzorků tolíce (<i>Medicago truncatula</i>) dle celkového klíčení a grafy kumulativních procent v jednotlivých teplotních režimech.	53
Obrázek č. 17: Zobrazení kandidátních SNP asociovaných s dormancí semen na genomu tolíce (<i>Medicago truncatula</i>), tzv. Manhattan plots.	54
Obrázek č. 18: Závislost pozorovaných P hodnot na očekávaných P hodnotách.	54

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Seznam vzorků <i>Pisum sp.</i>	18
Tabulka č. 2: Seznam vzorků <i>Medicago truncatula</i>	19
Tabulka č. 3: Seznam použitých primerů.....	23
Tabulka č. 4: Příprava reakční směsi s DNA Taq polymerázou (BIOLINE).....	24
Tabulka č. 5: Příprava reakční směsi s DNA Taq polymerázou (TaKaRa).....	24
Tabulka č. 6: Časový a teplotní průběh PCR reakce s DNA Taq polymerázou (BIOLINE).....	25
Tabulka č. 7: Časový a teplotní průběh PCR reakce s DNA Taq polymerázou (TaKaRa).....	25
Tabulka č. 8: Reakční směs pro purifikaci DNA.....	26
Tabulka č. 9: Fenotypová analýza <i>Pisum sp.</i> , vzorky vykazující dormanci semen.....	31
Tabulka č. 10: Fenotypová analýza <i>Pisum sp.</i> , vzorky bez dormance semen.....	32
Tabulka č. 11: Tloušťka osemení u hrachu (<i>Pisum sp.</i>).....	34
Tabulka č. 12: Obsah rozpustných a nerozpustných proanthokyanidinů (PA) u <i>Pisum sp.</i>	35
Tabulka č. 13: Kandidátní geny vybrané pomocí GWAS analýzy.....	38
Tabulka č. 14: Analýza polymorfismů u genu PsCam035877 porovnáním s referenční sekvencí s četností více než 10 %.....	40
Tabulka č. 15: Porovnání naměřených parametrů dle alelického zastoupení u kandidátního genu PsCam035877.....	42
Tabulka č. 16: Analýza polymorfismů u genu PsCam048411 porovnáním s referenční sekvencí s četností více než 10 %.....	44
Tabulka č. 17: Analýza polymorfismů u genu PsCam026975 porovnáním s referenční sekvencí s četností více než 10 %.....	46
Tabulka č. 18: Analýza polymorfismů genu PsCam036641, kódujícího polyfenol oxidasu (PPO), porovnáním s referenční sekvencí s četností více než 10 %.....	48
Tabulka č. 19: Asociace alel s dormancí a druhem hrachu u kandidátního genu PsCam036641 kódujícího polyfenol oxidasu (PPO).....	49
Tabulka č. 20: Asociace aminokyselinových sekvencí s dormancí a druhem hrachu u kandidátního genu PsCam036641 kódujícího polyfenol oxidasu (PPO).....	50
Tabulka č. 21: Aminokyselinová sekvenční shoda genotypů JI92 a JI64 u kandidátního genu PsCam036641 kódujícího polyfenol oxidasu (PPO).....	50
Tabulka č. 22: Příklad (20 z 146 vzorků) vyhodnocení celkového klíčení u tolice (<i>Medicago truncatula</i>), vyjádřeno v procentech pro jednotlivé teplotní režimy.....	51

1 ÚVOD

Rostliny se v průběhu miliónů let evoluce dokázaly přizpůsobit mnohým rozdílným přírodním podmínkám působícím na planetě Zemi. Rozšiřování druhů do jiných míst a změny klimatu nutí rostliny přivyknout si na rozdílné přírodní podmínky, které tak vytvářejí selekční tlak na geny podmiňující výhodné reprodukční znaky u rostlin. Důležitou adaptační reakcí je především správné načasování kvetení, tedy přechod z vegetativní do reproduktivní fáze, do doby, kdy jsou pro rostlinu optimální podmínky. Dalším důležitým adaptačním mechanismem je naplánování klíčení semen, a tedy načasování přechodu z embryonického do vegetativního stavu na období nejpříznivějších podmínek pro růst rostliny. Tento bod je velmi kritický, a aby bylo zabráněno klíčení v nesprávný čas, vyvinula se u semen schopnost dormance.

Dormance je klidový stav semene, kdy ačkoli jsou okolní podmínky příznivé, semeno nevyklíčí. Pro uvolnění tohoto klidového stavu je nutné, aby semeno prošlo po určitou dobu specifickými podmínkami, které umožní, aby semeno vyklíčilo. U druhů klíčících na jaře je například potřebné, aby semena prošla dlouhým obdobím nízkých teplot a dostatečné vlhkosti, které se objevují během zimních měsíců.

Dormance je tedy důležitým adaptačním krokem, který umožnil vznik nových druhů rostlin a jejich další rozšíření. Dříve se ke studiu adaptačních procesů využívaly pouze studie fenotypového projevu. Dnes je však již díky rozvoji molekulárně-genetických metod možné zkoumat důležité adaptační mechanismy, jako je dormance semen, na úrovni genomu. Přes velkou důležitost tohoto adaptačního znaku se však zdá, že s výjimkou modelových rostlin jako je především huseníček (*Arabidopsis thaliana*), se jedná o jeden z nejméně prostudovaných jevů u rostlin. Právě díky studiu mutantních linií huseníčku byla zjištěna především důležitá úloha některých fytohormonů, jako je kyselina abscisová či gibereliny, byla objevena souvislost mezi pigmentací semen a jejich dormancí a také byly identifikovány některé geny pomocí studia jejich exprese. Naopak velmi málo je toho zjištěno např. o regulaci vstupu vody do semen skrze osemení. Nejmodernější přístup, který je zaměřen především na genetickou podstatu dormance, zahrnuje genomické a proteomické metody, kdy je získáváno velké množství kandidátních sekvencí, které je potřeba dále analyzovat.

2 CÍLE PRÁCE

Teoretická část

- literární rešerše na téma dormance semen v kontextu adaptace k podmínkám prostředí

Praktická část

- sekvenční analýzy kandidátních genů identifikovaných pomocí GWAS analýzy na souboru vybraných geograficky a bioklimaticky strukturovaných vzorků *Pisum* a *Medicago truncatula*
- fenotypová charakterizace (mikroskopická analýza osemení, testování dormance/klíčivosti)
- asociační analýza fenotypového projevu (dormance semen) a genetických dat

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Dormance semen

Dormance (z lat. *dormans*) je obecným označením pro jev, kdy v organismu dojde k zastavení nebo dočasnému omezení fyziologických dějů. U rostlin se jedná o klidový stav, týkající se životaschopného semene, pupene nebo jiných rostlinných částí, který se projevuje absencí růstu či v případě semen absencí klíčení, ačkoli podmínky okolního prostředí jsou pro tyto děje příznivé. Dormance semen je důležitou adaptační reakcí rostlin. Jedná se o kvantitativní znak, na kterém se podílí řada genů a je ovlivňován mnohými faktory prostředí (Bradford *et al.*, 2007).

Je zřejmé, že dormance semen je velmi výhodnou vlastností rostlin a důležitým adaptačním znakem, který dovoluje, aby semeno vyklíčilo v nejvíce vhodnou dobu pro následný růst a vývoj rostlin a umožní rostlině, aby po fázi kvetení a dozrání semen završila svůj životní cyklus (Bradford *et al.*, 2007).

V průběhu evoluce byly u rostlin vytvořeny mechanismy, které jsou schopné rozeznat správný moment pro vyklíčení semen. Hlavními podmínkami u většiny druhů jsou především teplota a vlhkost prostředí. Rostliny však mohou být adaptovány také na velmi specifické podmínky, jako je tomu například u akácií (*Acacia* sp.) v Austrálii, které jsou přizpůsobeny pravidelně se zde vyskytujícím požárům a k prolomení dormance je nutná vyšší teplota a/nebo detekce kouře, resp. zplodin z požáru (Sabiiti *et* Wein, 1987).

O tom, zda semeno vyklíčí, rozhoduje celý komplex interakcí, které probíhají převážně mezi rostoucím embryem, ukrytým uvnitř semene, a překážkami v podobě pletiv, které jej obklopují a chrání v době nepříznivých podmínek. Právě z tohoto důvodu se při dormanci semen objevuje řada přechodných stavů, způsobených tím, jak se rozdílnou mírou podílí na dormanci semen především embryo a krycí vrstvy (osemení). Významně se může podílet taktéž endosperm, který rovněž obklopuje vyvíjející se embryo. U některých druhů semen, například většiny bobovitých, však endosperm v průběhu vývoje zaniká (Koornneef *et al.*, 2002).

Kvantitativní genetický přístup a studium mutantů umožňuje rozlišit jednotlivé interakce a zároveň identifikovat dříve neznámé látky, které se na dormanci a klíčení semen podílí. Tyto látky, mezi něž patří různé metabolity, ale také proteiny obvykle s enzymatickou aktivitou, mohou být importovány z mateřské rostliny při zrání semen nebo mohou být produkovány samotným embryem, příkladem mohou být některé rostlinné hormony jako je kyselina abscisová (ABA) (Koornneef *et al.*, 2002).

3.2 Typy dormance semen

Rozlišují se dva základní typy dormance semen, a to primární dormance neboli vrozená, kdy jsou semena neklíčivá ihned po dokončení vývoje na mateřské rostlině a jejich uvolnění do okolí, jedná se tedy o součást vývojového programu semen. V tuto chvíli semena ještě nejsou zcela zralá. K ukončení takového typu dormance je třeba vystavit semena po určitou dobu zvláštním podmínkám, které jsou potřeba pro překonání dormance. Na rozdíl od toho sekundární dormance vzniká u, již klíčících, zralých semen ležících v půdě jako reakce na určité, většinou nepříznivé, podmínky prostředí, které zabrání klíčení a v tomto stavu jsou semena udržována až do té doby, dokud na ně nepřestanou nepříznivé vnější podmínky působit (Amen, 1968).

Také je třeba rozlišovat, již dříve zmíněné dva hlavní mechanismy způsobující dormanci, tedy dormanci vyvolanou embryem (endogenní) nebo osemením (exogenní dormance) (Bradford *et al.*, 2007).

Dále klasifikační systém zahrnuje pět tříd dormance, a to dormanci fyziologickou (physiological dormancy - PD), morfologickou (morphological dormancy - MD), morfo-fyziologickou (morphophysiological dormancy - MPD), fyzickou (physical dormancy - PY) a kombinovanou dormanci (PY + PD), která se nachází u semen s fyzickou dormancí (nepropustných pro vodu) v kombinaci s fyziologickou dormancí (Baskin *et Baskin*, 2004).

3.2.1 Endogenní dormance

Pokud bychom chtěli přiřadit jednotlivé třídy dormance k mechanismům, které je způsobují, pak mezi endogenní bude patřit fyziologická dormance (PD), představená obvykle nějakým metabolickým blokem, morfologická dormance (MD), která je způsobená nevyvinutým embryem, které zatím není schopné růstu a kombinace obou tzv. morfo-fyziologická dormance (MPD) (Baskin *et Baskin*, 2004; Finch-Savage *et Leubner-Metzger*, 2006).

Fyziologický typ dormance (PD) je nejvíce fylogeneticky rozšířeným typem dormance semen, který lze najít u nahosemenných, bazálních krytosemenných až dvouděložných rostlin (Baskin *et Baskin*, 2004). Tento typ dormance zahrnuje metabolismus kyseliny abscisové (ABA) a giberelinů (GA). I když jsou molekulární mechanismy zatím ne zcela známe, zdá se, že jsou společné pro všechny rostliny. Důkazem může být skutečnost, že geny, regulující dormanci prostřednictvím interakce s ABA, např. *DOG1* (Delay Of Germination 1) a *MFT* (Mother of Flowering Time), mají homology napříč všemi studovanými krytosemennými rostlinami (Ashikawa *et al.*, 2010; Graeber *et al.*, 2010).

Fytohormon ABA způsobuje dormanci semen, zatímco gibereliny jsou dávány do spojitosti se začátkem klíčení. V semenech jsou obvykle přítomny oba tyto regulátory (GA i ABA) a to, zda semeno zůstane dormantní nebo začne klíčit, závisí na vzájemném koncentračním poměru těchto fytohormonů (více v kapitole Fytohormony a jejich funkce) (Baskin *et Baskin*, 2004).

Morfologická dormance (MD) se nachází u semen, které po opuštění mateřské rostliny nejsou ještě zcela zralá. Obsahují embrya, která jsou nevyvinutá, nediferenciovaná a potřebují určitý čas na růst a následné klíčení. Toto období, pokud jsou podmínky příznivé, trvá obvykle pouze několik dnů.

Morfo-fyziologická dormance (MPD) je kombinace předchozích dvou typů dormance a lze ji najít u semen, která mají nedostatečně vyvinutá embrya a zároveň také dormanci způsobují jejich fyziologické podmínky. Pro ukončení tohoto typu dormance je nutná skarifikace semen (narušení osemení) nebo aplikace GA a také je potřeba delší doba pro vývin (Baskin *et* Baskin, 2004).

3.2.2 Exogenní dormance

Mezi exogenní patří fyzická dormance zahrnující inhibici příjmu vody a plynů či filtraci světla, které prochází k embryu. Lze sem zařadit mechanickou dormanci, kdy v růstu embrya brání nějaká mechanická překážka v podobě krycích vrstev, které jej obklopují. A můžeme hovořit také o chemické dormanci, kdy jsou embryu z osemení dodávány inhibitory růstu.

Fyzická dormance (PY) je dávana do spojitosti s vývojem vrstev palisádových buněk osemení, které jsou nepropustné pro vodu, tzv. tvrdosemennost (Baskin *et al.*, 2000). U fyzického typu dormance (PY) je u semene potřebné, aby rostoucí embryo překonalo nějakou mechanickou překážku nebo aby tato mechanická překážka, způsobená osemením, byla nějakým způsobem oslabena či odstraněna. Typy a způsoby odstranění dormance se v tomto případě dělí na dva mechanismy, a to v závislosti na tom, zda jsou krycí vrstvy buněk živé nebo mrtvé. Živé obalové struktury obvykle samotné produkují enzymy, které pletivo naruší, jedná se především o vnitřní části osemení či případně endosperm. Mrtvé buněčné struktury musí před klíčením na určitých místech prasknout či být roztrženy, čemuž mohou napomoci enzymy produkované endospermem nebo rostoucím kořínkem embrya. Mezi tyto mrtvé buněčné struktury patří vnější části osemení či perikarp (Finch-Savage *et* Leubner-Metzger, 2006).

Nepropustnost může být narušena také mechanickou činností (např. ručním narušením semenných obalů, v přirozených podmínkách narušení pohybem v půdě) nebo chemickou cestou (např. působením koncentrovaných kyselin: HNO₃, H₂SO₄ nebo v přírodě to může být např. průchodem trávicím traktem živočichů). Tento jev se označuje jako tzv. skarifikace. V přírodních podmínkách je toto narušení pravděpodobně způsobeno prostřednictvím změn teploty a vlhkosti okolní půdy nebo působením hub a mikroorganismů. Tento typ fyzické dormance, tzv. tvrdosemennost, je typická především u většiny bobovitých rostlin (Smýkal *et al.*, 2014), u mnohých druhů kulturních bobovitých rostlin byla odstraněna v procesu domestikace a zůstává tak přítomná pouze u jejich planých předků (Hradilová *et al.*, 2017, 2019; Smýkal *et al.*, 2018).

3.3 Struktura a vývoj semene

U krytosemenných i nahosemenných rostlin se semeno vytváří z vajíčka (ovule), které obsahuje především zárodečný vak - nucellus (megasporangium) a obalové vrstvy, tzv. integumenty, z kterých se později, po oplození, vyvíjí osemení (Finch-Savage *et* Leubner-Metzger, 2006; Linkies *et al.*, 2010). U krytosemenných rostlin hovoříme o tzv. dvojitém oplození (Nawaschin, 1898). Jedná se o komplexní mechanismus, který zahrnuje dvě spermatické buňky obsažené v pylové láčce klíčího pylového zrna, vaječnou buňku a jádro zárodečného vaku. Z oplozené vaječné buňky se pak stává embryo a z oplozeného jádra zárodečného vaku se vyvíjí endosperm – živné pletivo, které chrání a vyživuje embryo a zprostředkovává komunikaci mezi mateřskou rostlinou a vyvíjejícím se embryem (Berger *et al.*, 2006). Zásobní látkou uloženou v endospermu je u většiny rostlin škrob, popř. olej. U bobovitých rostlin je endosperm spotřebován při vývinu (zrání) semene, u zralého semene zásobní funkci přebírají vyvíjející se dělohy embrya a jako zásobní látky jsou využívány proteiny, lipidy či také škrob (Baskin *et al.*, 2014).

Osemení (testa) se začíná vyvíjet ihned po oplození a vzniku embrya, avšak jeho vývoj probíhá nezávisle na vývoji embrya či endospermu (Chaudhury *et al.*, 2001). Osemení je mateřského původu a je složeno z několika vrstev specializovaných mateřských buněk, které vytváří důležitý přechod mezi embryem a vnějším prostředím, a to během samotného procesu embryogeneze, dále v období dormance a také během klíčení semene (Skinner *et al.*, 2004). Proces diferenciací osemení z obalových vrstev vajíčka zahrnuje aktivaci a koordinaci rozličných rozsáhlých buněčných změn, které jsou završeny buněčnou smrtí buněk náležejících k osemení. A ačkoli jsou tyto specializované buňky ve fázi zralého semene většinou mrtvé, zajišťují ochranu embrya, zlepšují dormanci, klíčení a také pomáhají v rozšiřování semene (Gasser *et al.*, 1998; Skinner *et al.*, 2004).

Pro šíření semen totiž není rozhodující pouze jejich velikost, ale také různé morfologické adaptace semen a plodů, které umožní rozšířit semena rozličnými přírodními cestami. Můžou to být tak prachovitá semena, která jsou rozšiřována větrem nebo plovoucí semena, která jsou roznášena pomocí vody. Speciální případ jsou však specifické struktury osemení, které umožní rozšiřování semen s pomocí zvířat. Semena tak mohou být přizpůsobena pro rozptýlení za pomoci ptáků, netopýrů, hlodavců, vody, větru, balistiky nebo jednoduché gravitace (Howe *et* Smallwood, 1982).

3.4 Vývoj osemení

Dobře prostudovaný je vývoj osemení u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). U této rostliny je vajíčko obaleno celkem pěti vrstvami, avšak u jiných druhů rostlin se počet vaječných obalů různě liší. Vnější vaječný obal je dvouvrstvý, a to v celé ploše od mikropylárního otvoru až po chalázní konec. Vnitřní obal je trojvrstvý, avšak prostřední vrstva se neobjevuje po celé délce semene, ale pouze částečně (Schneitz *et al.*, 1995).

Těchto pět vrstev je dobře patrných u nezralého vajíčka, avšak po oplození se z vaječných obalových vrstev stávají obaly semene a není je již možné anatomicky rozlišit (Debeaujon *et al.*, 2000). Po oplození se osemení začíná diferencovat primárně z buněk vnitřních i vnějších obalů vajíčka, a to po dobu několika týdnů (např. u huseničku dva až tři týdny), kdy dochází k dělení buněk a také jejich expanzi. Následně se pak některé buňky diferencují do specializovaných buněčných typů zahrnujících endothelium, palisádové buňky či epidermis nebo tyto buňky postupně degenerují, jako je tomu například u dvou vnitřních vrstev (Beeckman *et al.*, 2000).

Nejvnitřnější vrstva zrajícího semena (endothelium) produkuje proanthokynidiny (PA) a jejich polymery, flavonoidní sloučeniny známé také jako kondenzované taniny. Tyto sloučeniny jsou nejdříve bezbarvé a kumulují se ve vakuolách buněk. Později při dozrávání semene a jeho vysychání se oxidací mění na hnědé pigmenty, jsou ukládány společně s dalšími sloučeninami (především oligosacharidy) do sekundární buněčné stěny, a následně pak určují výslednou barvu zralého semene (Debeaujon *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2005).

Buňky vnějších vrstev naopak hromadí amyloplasty obsahující škroby. Subepidermální vrstva vytváří tvrdou nepropustnou stěnu na vnitřní straně buněk – palisádové buňky. Vnější epidermální buňky často vytváří velké množství slizu (pektinového charakteru) a ten pak plní apoplastický prostor v blízkosti radiálních a vnějších tangenciálních buněčných stěn, čímž se vytvoří kapsa ve tvaru koblíhy mezi membránou a stěnou buněk. Později se pod slizovou kapsou syntetizuje tlustá buněčná stěna bohatá na celulózu podél vnější tangenciální a radiální strany buňky, ta na závěr vývoje semene úplně vytěsňuje cytoplasmu a vytvoří sloupek z celulózy (columella) (Beeckman *et al.*, 2000; Haughn *et Chaudhury*, 2005; Haughn *et Western*, 2012).

Na konci vývoje semene buňky všech vrstev osemení většinou odumírají. Struktura epidermis zůstává zachována díky slizu a sloupku z celulózy a zbylé vrstvy jsou spojeny dohromady. Při dozrávání pak ještě dochází k úniku PA z endothelových buněk a tím je zajištěna impregnace vnitřních buněčných vrstev (Haughn *et Chaudhury*, 2005).

U bobovitých rostlin je vývoj osemení dosti odlišný. Vajíčko obsahuje pouze dva vaječné obaly, z čehož vnitřní obal během vývoje osemení mizí. Vnější obal vytváří specializovanou vrstvu buněk, prodloužených sklereid, které k sobě těsně přiléhají. Tyto buňky jsou často označovány jako makrosklereidy či palisádové buňky. Na povrchu těchto buněk se vytváří kutikula, která je považována za hlavní vnější bariéru nepropustnou pro vodu (Smýkal *et al.*, 2014). Tato kutikulární vrstva se však zdá být zásadní pro propustnost vody pouze v případě nedormantních semen. Pro dormantní semena se ukázala jako důležitá tzv. „světlá zóna“ (light line - LL), nacházející se mezi celulózními čepičkami makrosklereid a subkutikulární voskovou vrstvou, která nejspíše představuje jakýsi předěl dvou prostředí a prolomení dormance u dormantních semen hrachu tak nejspíše závisí na složení subkutikulární voskové vrstvy a jejím případném mechanickém poškození (Jánská *et al.*, 2018).

Co se týče subepidermální vrstvy buněk, ta se u luskovin přeměňuje na osteosklereidy s velkými mezibuněčnými prostory. Vnitřní část osemení pak tvoří parenchymatické buňky, které jsou napojené na vnitřní prostor semene. Na povrchu jsou důležitými částmi osemení chalázní oblast, kde je semeno napojeno na cévní svazky s mateřskou rostlinou a jizvička, tzv. hilum, která zůstává po odpojení poutka (Smýkal *et al.*, 2014).

Obrázek č. 1: Příčný řez osemením hrachu (*Pisum sp.*), zvětšení 200x (foto: autor).



3.4.1 Role osemení v dormanci

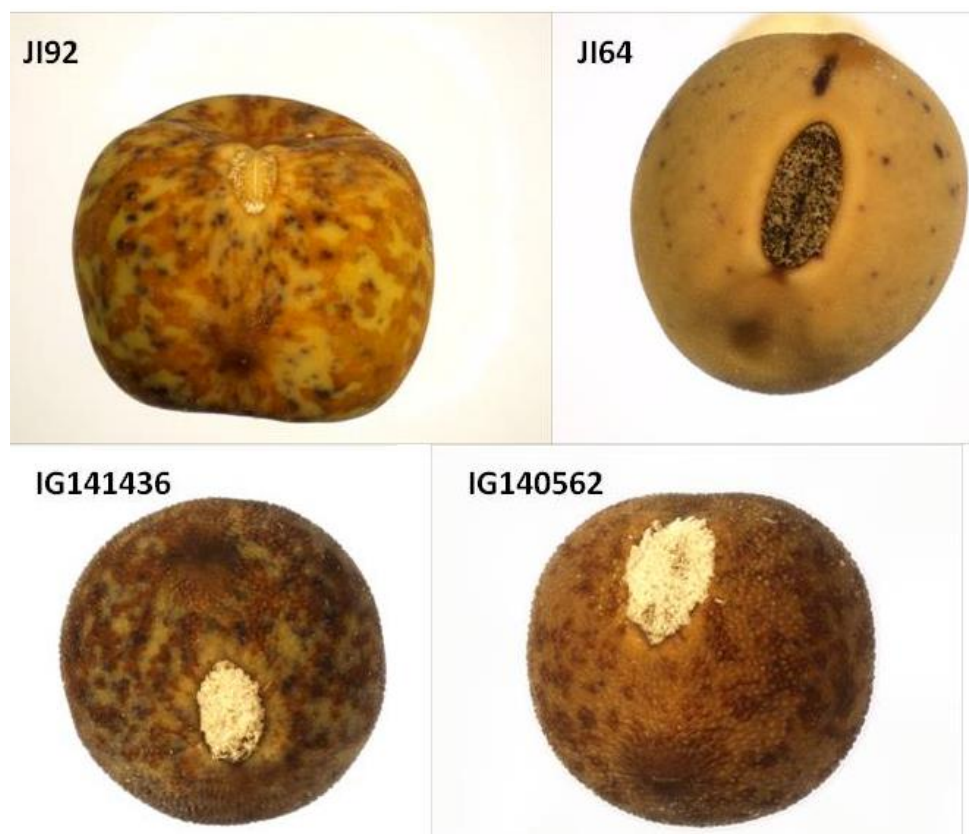
Hlavní úlohou osemení je především ochrana semene před vnějšími vlivy prostředí, hraje však také důležitou roli v řízení klíčení. Osemení se zásadním způsobem podílí na míře dormance, a to prostřednictvím regulace propustností pro vodu nebo plyny, např. pro kyslík nebo oxid uhličitý. Často také klíčení brání vytvářením mechanické překážky, kterou nemůže klíčící kořínek překonat (Debeaujon *et al.* 2000). Dalším nástrojem pro kontrolu klíčení osemením může být zadržování inhibitorů růstu embrya uvnitř semene nebo samotné osemení může obsahovat inhibitory růstu embrya (Kelly *et al.*, 1992). Důležitým faktorem, který hraje roli při klíčení semen některým druhů je také filtrace světla, která může být způsobena právě pigmenty a látkami obsaženými v osemení (Bradford *et al.*, 2007).

Zdá se, že mnoho z těchto mechanismů způsobujících dormanci má souvislost s barvou semen, která je dána množstvím fenolických sloučenin přítomných v osemení, především flavonoidů. U bobovitých bylo zjištěno, že semena bezbarvá bobtnají rychleji, než semena

s pigmentovaným osemením a následně u nich dochází k dřívějšímu klíčení. Semena bez pigmentu navíc během bobtnání více popraskají, což může ovlivňovat jejich životnost (Debeaujon *et al.*, 2000). Tato skutečnost, kdy flavonoidy, zejména polymerované proantokyanidiny, zvyšují nepropustnost osemení a tím ovlivňují dormanci semen je dobře popsána právě u rostlin z čeledi bobovitých (Wyatt *et al.*, 1977; Legesse *et Powell*, 1996), jejichž semena se vyznačují velkou tvrdostí a také fyzickým typem dormance (Paulsen *et al.*, 2013).

Například u semen, resp. osemení hrachu (*Pisum sp.*), u kterého byl zjištěn zvýšený obsah fenolických sloučenin a daleko větší enzymatická aktivita katechol oxidázy u planých hrachů (*P. elatius*), než tomu bylo u kulturní formy hrachů (*P. sativum*), u kterých je propustnost osemení větší. Zdá se tedy, že nepropustnost osemení výrazně koreluje s množstvím fenolických látek v osemení a se stupněm jejich oxidace (Marbach *et Mayer*, 1975; Werker *et al.*, 1979). Způsob, jakým flavonoidy ovlivňují dormanci semen, může být ten, že mění složení osemení a následně jeho mechanickou odolnost (Debeaujon *et al.*, 2000).

Obrázek č. 2: Pigmentace a povrch semen hrachu (*Pisum sp.*), zvětšení 20x (Smýkal P.).

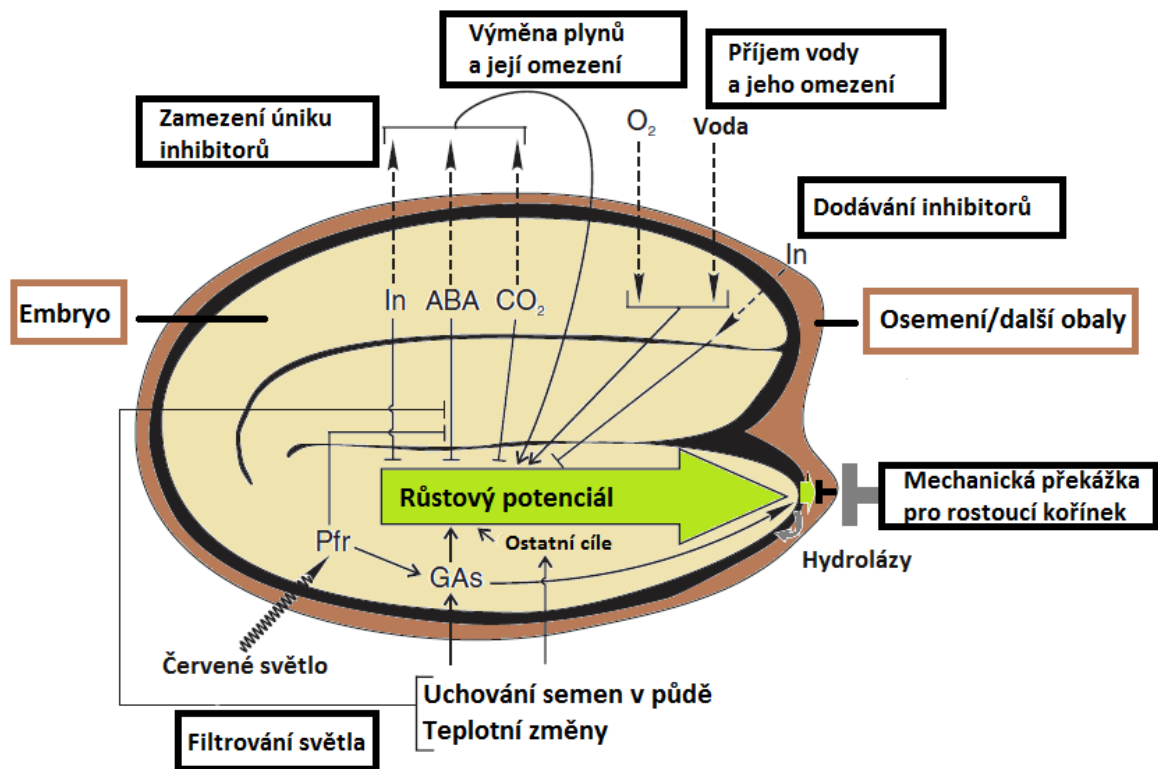


3.5 Faktory ovlivňující dormanci a klíčení

Jak již bylo zmíněno, dormance je kvantitativním znakem, který je ve velké míře ovlivňován vnějšími faktory prostředí. Mezi vnější faktory životního prostředí ovlivňující dormanci a rovněž klíčení patří především dostupnost vody, mění se teplota a světlo, ale také například doba, po kterou je zralé semeno uchováno v půdě či dostupnost dusičnanů (Koornneef *et al.*, 2002). Nelze opomenout ani biotické faktory prostředí, které taktéž ovlivňují dormanci semen. Jedná se především o rozklad osemení mikrobiálním působením nebo aktivitou půdních hub. Také mohou být semena významně narušena při požití a průchodu zaživacím traktem některých živočichů (Fenner *et Thompson*, 2005).

Důležitými faktory regulujícími dobu klíčení jsou však především vnitřní mechanismy a hormonální signalizace uvnitř semene, které odpovídají za překonání dormance a nastartování klíčení a které jsou geneticky podmíněné (Bradford *et al.*, 2007).

Obrázek č. 3: Faktory ovlivňující dormanci semen (převzato z Bradford *et al.*, 2007).



Popis k obrázku č. 3: Faktory ovlivňující dormanci semen, ABA – kyselina abscisová; GAs – gibereliny; In – inhibitory růstu; Pfr – phytochromy, receptory červeného světla (převzato z Bradford *et al.*, 2007).

3.5.1 Fytohormony a jejich funkce

Důležité fytohormony, které se přímo podílí na přechodu semen z dormantního stavu do fáze klíčení, jsou kyselina abscisová (ABA) a gibereliny (GA). Především studie prováděné na mutantních rostlinách huseníčku odhalily klíčovou roli ABA v dormanci semen a nezbytnou úlohu GA při klíčení (Debeaujon and Koornneef, 2000).

Studium ABA-deficientních a ABA-responzivních mutantních rostlin huseníčku (*A. thaliana*) a rýže (*Oryza sativa*) podalo jasný důkaz o tom, že se ABA v semeni podílí na přípravě semene na klidovou fázi (uchování zásob, tolerance k vysychání), brání předčasnému klíčení a indukuje samotnou dormanci semen (Finkelstein *et al.*, 2002). Hladina ABA v semeni v brzkých fázích dozrávání je nejdříve velmi nízká, avšak během vývoje obsah ABA v semeni stoupá a je nejvyšší v průběhu tvorby zásobních látek. V těchto fázích vývoje zřejmě zabraňuje předčasnému klíčení semene na mateřské rostlině. Poté opět množství ABA klesá při dozrávání a umožňuje tak po ukončení vývoje semeni klíčit (Berry *et al.*, 1992). Pro nastolení následné dormance semene po jeho dozrání, je nutné, aby samotné embryo začalo syntetizovat endogenní fytohormon ABA. V případě exogenně dodávané ABA je výsledek pouze částečný či dočasný (Corbineau *et al.*, 1991). Důležitost fytohormonu ABA v dormanci semen je tedy nesporná a je známo, že nejen pro nastolení ale také pro zachování dormance je nutná přítomnost a zachování vysoké hladiny ABA v semeni (Bradford *et al.*, 2007).

Naopak gibereliny se nejspíše přímo na regulaci dormance nepodílejí, jsou však potřebné pro zahájení a správný průběh klíčení. Úloha obou fytohormonů je propojena a pracují jako antagonisté, protože nízký stupeň dormance (a menší hladina ABA) je doprovázen menším požadavkem na obsah GA pro zahájení klíčení. A zase naopak pokud je v semeni v průběhu vývoje produkováno větší množství ABA, ke klíčení je pak zapotřebí také většího množství GA. (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996).

GA se objevuje v semeni již při jeho vývoji a zrání a zdá se, že celou dobu slouží jako antagonist ABA. Většina GA je však během vývoje deaktivována např. hydroxylací a akumulace jeho aktivní formy v pozdní fázi vývoje by nejspíše vedla k předčasnému klíčení. Aktivní GA se tak začíná uvolňovat až po nabobtnání semene (White *et al.*, 2000). Známa je také souvislost GA se světelnou signalizací, kdy je biosyntéza GA aktivovaná červeným světlem skrze zvýšenou expresi genů pro GA biosyntézu (Toyomasu *et al.* 1994; Ogawa *et al.*, 2003). Světlo však reguluje hladiny obou fytohormonů v semeni a podobná regulace se děje také například prostřednictvím teploty prostředí (Seo *et al.*, 2008).

V signalizaci pro dormanci a klíčení jsou zapojeny také další fytohormony, i když jejich role není dosud většinou zcela jasná. Jedním z nich je etylen, který zřejmě působí proti fytohormonu ABA a je tedy zapojen v uvolňování dormance a nastartování klíčení (Siriwitayawan *et al.*, 2003). Brassinosteroidy zase nejspíše působí synergisticky s GA (Bradford *et al.*, 2007).

3.5.2 Metabolismus lipidů

Je důležité si uvědomit, že ukončení dormance mohou ovlivňovat také některé děje uvnitř semene, které zdánlivě s dormancí nemusí přímo souviset. Všechna semena, krytosemenných a také nahosemenných rostlin, v průběhu svého vývoje a zrání ukládají zásoby bohaté na živiny, které následně spotřebovávají během klíčení. Těchto dějů se může účastnit řada enzymů nezbytných při klíčení, které mohou taktéž hrát roli v dormanci semen (Bradford *et al.*, 2007).

Mnoho semen ukládá zásobní látky v podobě mastných kyselin jako triacylglyceroly (TAG), které jsou následně spotřebovávány při β -oxidaci v peroxizomech a poskytují tak acetyl-CoA potřebný pro respiraci, glyoxalátový cyklus a glukoneogenezi. Bylo zjištěno, že β -oxidace je klíčovým dějem při ukončení dormance a navození klíčení. Její narušení může vést k trvalé dormanci semen, což je případ mutantních rostlin pro COMATOSE přenašeč (tzv. *cts* mutantů), které mají mutovaný gen pro tento přenašeč mastných kyselin a acetyl-CoA do peroxizomů, jenž je nezbytný pro proces β -oxidace (Footitt *et al.*, 2002).

Také narušení genů zapojených v glyoxalátovém cyklu a procesu glukoneogeneze může vést k narušení mobilizace rezerv lipidů během klíčení olejnatých semen, kam se řadí např. semena lnu (*Linum usitatissimum*) či sóji (*Glycine max*) a plodin rodu *Brassica* jako je brukev řepka olejka (*Brassica napus*). Podle výsledků studií na huseničku (*Arabidopsis thaliana*) předchází mobilizaci lipidových zásob koordinovaná regulace genové exprese a enzymových aktivit acyl-CoA oxidasy a 3-ketoacyl-CoA thiolasy v kroku β -oxidace, isocitrát lyasy a malát syntasy v průběhu glyoxalátového cyklu a fosfoenolpyruvát karboxykinasy při glukoneogenezi (Rylott *et al.*, 2001). Správná činnost těchto enzymů je tak esenciální pro klíčení.

3.6 Dormance z hlediska adaptace

Dormance se jako adaptivní znak zřejmě vyvinula jednou společnou evoluční cestou a později se rozrůznila do většího množství různých typů, a to následným přizpůsobením se k podmínkám daného prostředí. Není pravděpodobné, že vznikla vícero evolučními cestami, vzhledem k velké podobnosti jednotlivých typů dormance (Finch-Savage *et Leubner-Metzger*, 2006).

O evoluci dormance se toho však stále příliš mnoho neví, především je nejasné, který z typů dormance byl ten výchozí, z kterého se odvíjely další třídy. A přestože byly navrženy různé mechanismy, stále není zcela zřejmé, jakým způsobem se jednotlivé typy vzájemně odvozují. Fylogeneticky nejrozšířenějším typem je fyziologická dormance (PD), mohlo by se tedy jevit, že bude také evolučně nejstarší (Baskin *et Baskin*, 2004). Pravděpodobně se ale jedná pouze o jakýsi evolučně důležitý uzel, ze kterého byly opakovaně odvozovány ostatní třídy dormance. Taktéž ztráta dormance se nejpravděpodobněji odvíjí od fyziologické dormance (Willis *et al.*, 2014).

Podle studie, která u semen měřila poměr velikosti embrya k celému semeni (tedy poměr E:S; velikost embrya ku velikosti semene) a poté jej porovnávala u 179 charakteristických skupin rostlin, se zdá, že by původním typem mohla být morfologická dormance (MD). Předpokládá se totiž, že aby semeno mohlo vyklíčit, musí vyvinuté embryo zaplnit celý prostor semene (tedy poměr E:S = 1). Pokud jej nezaplní, embryo ještě není zcela vyvinuté, nemůže tedy prorazit osemení a začít klíčit. V rámci této studie byl u všech krytosemenných rostlin zjištěn zvyšující se poměr E:S mezi bazálními taxony a fylogeneticky odvozenými skupinami, což podporuje domněnku, že nevyvinuté embryo je primitivním znakem u semenných rostlin. Dalo by se tedy říci, že morfologická dormance (MD) způsobená nevyvinutým embryem je původním znakem a všechny ostatní typy dormance a také stav, kdy u semene schopnost dormance chybí, od něj byly odvozeny (Forbis *et al.*, 2002).

Nicméně je třeba vzít v potaz, že u některých taxonomických skupin se vyskytují velká semena s fyziologickou dormancí (PD), kdy sice embryo zaplňuje celý vnitřní prostor semene, avšak metabolický blok brání klíčení. Vzhledem k tomu se zdá, že nejpravděpodobnějším výchozím typem dormance u semenných rostlin je morfologicko-fyziologicky podmíněná dormance (MPD) (Baskin *et al.*, 2004). A podle nejnovější fylogenetické studie zkoumající vztahy mezi jednotlivými třídami dormance na velkém souboru vzorků zahrnujících více než 14 000 druhů, se ukázalo, že skutečně nejpravděpodobnějším výchozím ancestrálním typem dormance je morfo-fyziologická dormance (MPD), kdy fyziologická regulace vnějšími podmínkami prostředí je možná stejně stará jako samotná semena rostlin (Willis *et al.*, 2014).

Dormance z hlediska adaptace bývá spojována především s geografickým rozmístěním rostlin a měnícími se (sezónními) podmínkami přírodního prostředí. Indukce dormance i prolomení dormance jsou totiž jako adaptivní znaky pod silným selekčním tlakem, který závisí na geografickém umístění rostlin a období, kdy dojde k rozptýlení semen (Donohue *et al.*, 2005).

Ovšem dormance semen může souviset také s jiným společným adaptačním znakem rostlin, a tou je velikost semen. Velká semena totiž obvykle obsahují dostatek zásobních látek a jsou schopné dát vznik větším, silnějším klíčícím rostlinám, které si povedou lépe i za nepříznivých podmínek a nepotřebují tedy indukovat dormanci, aby se těmto podmínkám vyhnuly. Naopak je pro ně výhodnější časné klíčení a prodloužení vegetačního období, které jim umožní např. vytvořit lepší kořenový systém a obranné látky proti škůdcům, větší biomasu nadzemních částí, popř. více květů a semen (Kitajima *et al.*, 2000; Brunner *et al.*, 2015). Bylo zjištěno, že semena, která postrádají dormanci, jsou obvykle velká nebo se vyvinula v oblastech, kde se vyskytují dlouhá období klimatických podmínek vhodných k růstu, jako je tomu často v tropických oblastech. Tento stav, kdy semena postrádají dormanci, se zdá být odvozený z kteréhokoliv jiného typu dormance. Jedná se však zřejmě o evolučně efemérní stav, který může rychle vymizet (Willis *et al.*, 2014). Je častý u domestikovaných rostlin, kde je uměle udržován, u planě rostoucích druhů ale může snadno dojít k navrácení dormance (Ellstrand *et al.*, 2010).

Oproti tomu stav dormance je evolučně stabilní u rostlin, které jsou typické pro mírný pás, kdy přežívají v klimatu s často se měnícími podmínkami a jejich semena jsou obvykle malé velikosti. Zdá se tedy, že dormance a velikost semen fungují jako alternativní adaptivní strategie u rostlin, avšak v případě opravdu krátkých vegetačních období bývá mechanismus dormance zvýhodněn bez ohledu na velikost daných semen (Rubio de Casas *et al.*, 2017).

Velikost semen je ale kritická z hlediska predace. Čím větší jsou semena, tím menší počet je rostlina schopná produkovat a s větší velikostí stoupá riziko predace (Gómez *et Husband*, 2004). Zatímco velká semena se snadno stanou potravou zvířat, malá a suchá semena je těžké v půdě najít. A rozhodující není pouze velikost semen, ale také jejich tvrdost. Existuje předpoklad, že fyzická dormance tvrdých semen, se možná vyvinula jako adaptace před predátory. V pokusu s pouštními křečky byla použita semena dvou druhů rostlin z čeledi bobovitých s dimorfními semeny (tvrdé a měkké), a to trnovník akát (*Robinia pseudoacacia*) a vikev setá (*Vicia sativa*). Zatímco látky uvolněné z nabobtnalých semen křečky přilákaly, semena tvrdá nebo suchá měkká pohřbená v půdě zůstala před zvířaty skryta (Paulsen *et al.*, 2013).

3.7 Asociační mapování

Většina důležitých znaků u rostlin, které určují schopnost přežití jednotlivých druhů a také jejich zemědělský význam, je kvantitativně podmíněno. Podílí se na nich řada genů a jsou ovlivňovány faktory prostředí (Yu *et Buckler*, 2006). V posledních letech se při zkoumání těchto znaků ukazuje jako přínosný přístup asociačního mapování. Asociační mapování umožňuje identifikovat kvantitativní znakové lokusy (QTL) zkoumáním souvislostí mezi genetickým markrem (resp. genem, sekvencí DNA) a daným znakem. Na rozdíl od široce používaného mapování vazby má asociační mapování nesporné výhody, které se týkají většího mapovacího rozlišení díky mnohem většímu počtu rekombinací, dále detekce většího počtu alel a úspory času při mapování a aplikaci ve šlechtitelském programu (Flint-Garcia *et al.*, 2003).

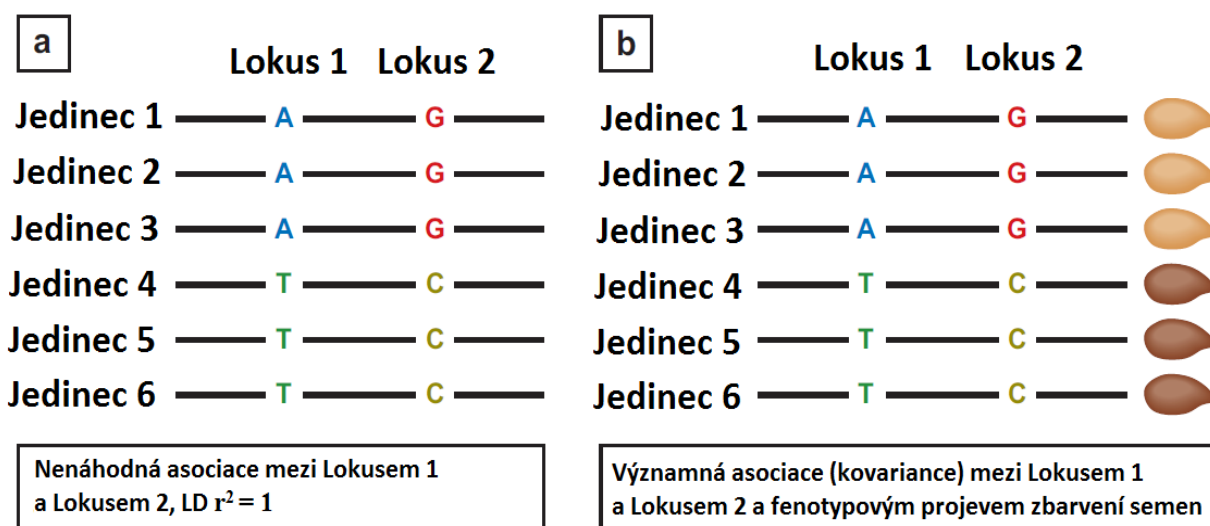
U rostlin je mapování vazby obvykle prováděno na experimentálních populacích, které vznikly křížením dvou homozygotních genotypů. Je tak možné sledovat pouze rekombinace vzniklé od založení mapovací populace, a i vzdálené markery zůstávají silně asociovány s daným znakem. Asociační mapování oproti tomu umožňuje sledovat vztah mezi funkčním polymorfismem a přílehlými molekulárními markery na souboru genotypů s neznámým původem (Stitch *et Melchinger*, 2010). Oba tyto přístupy mapování vazby a asociační mapování vychází ze stejného principu, jsou založeny na vazebné nerovnováze mezi molekulárním markrem a funkčními lokusy.

3.7.1 Vazebná nerovnováha (linkage disequilibrium, LD)

Vazebná nerovnováha je termín používaný především v populační genetice, který značí stupeň nenáhodných asociací mezi alelami umístěnými v odlišných lokusech. Obvykle je ve výpočtech značena písmenem D a kvantifikována jako rozdíl mezi pozorovanou frekvencí haplotypů a očekávanou frekvencí při rovnoměrném rozdělení alel (Lewontin, 1964). Matematicky vyjádřeno jako $D = P_{AB} - P_A P_B$, kdy P_{AB} značí pozorovanou frekvenci alel A a B ve dvou lokusech, zatímco P_A a P_B jsou výsledkem frekvencí očekávaných pro alelu A a alelu B (Zhu *et al.*, 2008). Nejběžnější metodami pro výpočet LD jsou pak absolutní hodnota D' (Lewontin, 1964) a korelační koeficient r^2 (Hill *et Robertson*, 1968). Absolutní hodnota D' je vypočítána jako podíl D a maximální možné hodnoty D , která je dána frekvencí alel ve dvou lokusech. Tedy $D' = |D| / D_{\max}$. Pokud je $D=1$, je mezi dvěma lokusy úplná vazebná nerovnováha.

Častěji je však LD popsána pomocí korelačního koeficientu r^2 mezi dvěma lokusy, který lépe odráží rekombinační a také mutační historii mezi lokusy. Oba tyto výpočty však počítají pouze s bialelickými lokusy, pokud by se jednalo o multialelické lokusy je třeba použít rozšiřující výpočty (Soto-Cerda *et Cloutier*, 2012).

Obrázek č. 4: Principy vazebné nerovnováhy a asociačního mapování (převzato ze Soto-Cerda *et Cloutier*, 2012).



Popis k obrázku č. 4: a) Vazebná nerovnováha b) Asociační mapování (převzato ze Soto-Cerda *et Cloutier*, 2012).

3.7.2 Metody asociačního mapování

Podle rozsahu a zaměření jednotlivých vědeckých studií je asociační mapování rozděleno do dvou širších kategorií. Existují tak studie asociačního mapování kandidátních genových sekvencí, které jsou zaměřeny na hledání vztahů mezi polymorfismem v daných kandidátních oblastech a jejich rolí na fenotypovém projevu specifického znaku. A potom jsou zde studie asociačního mapování celých genomů (Genome wide association mapping, GWAS), označované jako tzv. „skenování genomů“, kdy je genetická variabilita zkoumána v rámci celého genomu a jsou hledány asociace mezi polymorfismy a rozličnými komplexními znaky (Risch *et Merikangas*, 1996).

V případě asociačních mapovacích studií kandidátních genů je nutné znát lokaci a funkci genů zapojených do jednotlivých biochemických nebo regulačních drah podílejících se na projevu daného znaku. Proto se v dnešní době, spolu s možnostmi snadného a poměrně levného identifikování stovek jedno-nukleotidových polymorfismů pomocí sekvenačních a genotypovacích technologií, stává stále používanějším asociační mapování v rámci celých genomů (Zhu *et al.*, 2008).

3.7.3 Příklady asociačních mapovacích studií u rostlin

První asociační mapovací studie u rostlin byly provedeny na rýži (*Oryza sativa*) a kukuřici (*Zea mays*), kdy byla zjišťována asociace tehdy dostupných markerů v rámci celého genomu s kvantitativními znaky u těchto rostlin (Bar-Hen *et al.*, 1995; Virk *et al.*, 1996). U kukuřice například asociační mapovací studie objevila asociaci kandidátního genu Y1 se zbarvením endospermu semen u inbredních linií (Palaisa *et al.*, 2003). Asociační mapovací studie byly a jsou prováděny také na modelovém organismu huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*), kdy se pomocí těchto studií zkoumají kvantitativní znaky zahrnující například čas kvetení nebo rezistenci k patogenům (Aranzana *et al.*, 2005). První asociační mapovací studie na kandidátních sekvencích u této rostliny odhalila spojitost DNA polymorfismu v lokusu D8 s časem kvetení (Thornsberry *et al.*, 2001).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro fenotypovou analýzu a sekvenční analýzu vybraných kandidátních genů identifikovaných pomocí GWAS analýzy bylo vybráno celkem 48 vzorků hrachu (*Pisum* sp.), a to na základě jejich geografického a bioklimatického rozmístění a taktéž podle jejich fylogenetické příbuznosti (Smýkal *et al.*, 2017; Trněný *et al.*, 2018). Vzorky byly získány z následujících genových bank: John Innes Centre (JIC, UK); The Centre for Genetic Resources (CGN, The Netherlands); Nordic Gene Bank (Sweden); Cyprus Genebank, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK, Germany); United States Department of Agriculture (USDA, USA); International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA, Lebanon); Australian Grains Genebank (AGB, Australia); Vavilov Institute (VIR, Russia); CzechNPC, CZ; Israel Plant Gene Bank (IGB, Israel) a P. Smýkal, UPOL. Seznam vzorků viz Tabulka č. 1.

Pro fenotypovou analýzu a asociační mapování u *Medicago truncatula* bylo vybráno celkem 146 vzorků. Část vzorků byla získána z Národního institutu pro zemědělský výzkum INRA v Montpellier ve Francii a část pocházela z USDA (United States Department of Agriculture) v USA. Seznam vzorků viz Tabulka č. 2.

Rostliny, ze kterých byl získáván genetický materiál a semena, byly pěstovány v pětilitrových květináčích v substrátovém mixu rašelina-písek v poměru 90:10 (Florcom Profi, BB Com Ltd. CZ). Pěstování probíhalo ve sklenících v období leden až květen v roce 2016 a 2017. Pravidelně se střídaly denní/noční teploty v rozmezí 35–20 °C/15–12 °C. Rostliny byly pěstovány při fotoperiodě minimální délky dne 10 h až 14 h v areálu Univerzity Palackého v Olomouci, s použitím dodatečného osvětlení pomocí sodíkových výbojek (Hortilux Schreder, Holland, s výbojkou Sylvania GroLux 600 W). Po dozrání lusků, byly lusky se zralými semeny sklizeny. Předpokládá se, že vzorky z jedné rostliny jsou geneticky uniformní, vzhledem ke skutečnosti, že u hrachu dochází do značné míry k samoopylení (Smýkal *et al.*, 2018) a rostliny dané linie pocházely již po několik generací z jednoho semene (Single seed descent). Po sklizení byla semena z jednotlivých lusků vyloupána a usušena při pokojové teplotě (22–24 °C). Usušená semena byla skladována v temnu v papírových sáčkách rozdělených a označených dle genotypu. Test bobtnání a klíčení semen byl proveden 1–2 měsíce po sklizení semen.

Tabulka č. 1: Seznam vzorků *Pisum* sp.

Označení vzorku	Původ	Taxon	Zdroj
J11974	Etiopie	<i>Pisum abyssinicum</i>	JIC
IS18915	Izrael	<i>Pisum elatius</i>	IGB
J1262	Turecko	<i>Pisum elatius</i>	JIC
PI343975	Turecko	<i>Pisum elatius</i>	USDA
PI560039	Izrael	<i>Pisum elatius</i>	USDA
PIS7475	Makedonie	<i>Pisum elatius</i>	IPK
J1241	Izrael	<i>Pisum elatius</i>	JIC
Hungary - Balaton	Maďarsko	<i>Pisum elatius</i>	P. Smýkal, UPOL
PIS2850	Itálie	<i>Pisum elatius</i>	IPK
IS18908	Izrael	<i>Pisum elatius</i>	IGB
IG64350	Alžírsko	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
IG52517	Turecko	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
IG119794	Španělsko	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
IG52520	Turecko	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
J12546	Gruzie	<i>Pisum elatius</i>	JIC
JW1794	Izrael	<i>Pisum elatius</i>	JIC
IG108291	Tunisko	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
J1261	Turecko	<i>Pisum elatius</i>	JIC
PI344001	Turecko	<i>Pisum elatius</i>	USDA
PI344537	Itálie	<i>Pisum elatius</i>	USDA
IG141436	Arménie	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
Elmali (PS028)	Turecko	<i>Pisum elatius</i>	P. Smýkal, UPOL
IG140562	Arménie	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
PI343994	Turecko	<i>Pisum elatius</i>	USDA
J11030	Irán	<i>Pisum elatius</i>	JIC
J164	Izrael	<i>Pisum elatius</i>	JIC
IG52595	Alžírsko	<i>Pisum sativum</i>	ICARDA
IPK468	Pákistán	<i>Pisum sativum</i>	IPK
CGN3277	Pákistán	<i>Pisum sativum</i>	CGN
J186	Afghánistán	<i>Pisum sativum</i>	JIC
ATC1044	Indie	<i>Pisum sativum</i>	AGB
PI347422	Indie	<i>Pisum sativum</i>	USDA
ATC6973	Čína	<i>Pisum sativum</i>	AGB
ATC7121	Čína	<i>Pisum sativum</i>	AGB
ATC7086	Čína	<i>Pisum sativum</i>	AGB
ATC7021	Čína	<i>Pisum sativum</i>	AGB
J11086	Turecko	<i>Pisum sativum</i>	JIC
PI181958	Sýrie	<i>Pisum sativum</i>	USDA
PI181799	Libanon	<i>Pisum sativum</i>	USDA
J11071	Turecko	<i>Pisum sativum</i>	JIC
VIR2311	Gruzie	<i>Pisum sativum</i>	VIR
VIR1246	Tádžikistán	<i>Pisum sativum</i>	VIR
VIR1541	Rusko	<i>Pisum sativum</i>	VIR
J11525	Řecko	<i>Pisum sativum</i>	JIC
J11837	Španělsko	<i>Pisum sativum</i>	JIC
ARI00260	Kypr	<i>Pisum sativum</i>	Cyprus Genebank
PI357292	Makedonie	<i>Pisum sativum</i>	USDA
J192	Afghánistán	<i>Pisum sativum</i>	JIC

Tabulka č. 2: Seznam vzorků *Medicago truncatula*.

Označení vzorku	Původ	Taxon	Označení vzorku	Původ	Taxon
HM001	Sýrie	<i>Medicago truncatula</i>	HM096	Francie	<i>Medicago truncatula</i>
HM002	Kypr	<i>Medicago truncatula</i>	HM097	Francie	<i>Medicago truncatula</i>
HM003	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM098	Portugalsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM004	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM099	Kypr	<i>Medicago truncatula</i>
HM006	Francie	<i>Medicago truncatula</i>	HM103	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>
HM009	Řecko	<i>Medicago truncatula</i>	HM104	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM010	Itálie	<i>Medicago truncatula</i>	HM105	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM011	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM106	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>
HM012	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>	HM107	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM013	Francie	<i>Medicago truncatula</i>	HM108	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>
HM016	Francie	<i>Medicago truncatula</i>	HM109	Francie	<i>Medicago truncatula</i>
HM017	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>	HM110	Lybie	<i>Medicago truncatula</i>
HM018	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>	HM111	Itálie	<i>Medicago truncatula</i>
HM019	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>	HM112	Kypr	<i>Medicago truncatula</i>
HM021	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>	HM115	Kypr	<i>Medicago truncatula</i>
HM022	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>	HM116	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM023	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>	HM118	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM024	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>	HM120	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM025	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>	HM123	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM026	Francie	<i>Medicago truncatula</i>	HM129	Francie	<i>Medicago truncatula</i>
HM031	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM134	Řecko	<i>Medicago truncatula</i>
HM032	Francie	<i>Medicago truncatula</i>	HM135	Izrael	<i>Medicago truncatula</i>
HM033	Francie	<i>Medicago truncatula</i>	HM135	Izrael	<i>Medicago truncatula</i>
HM034	Francie	<i>Medicago truncatula</i>	HM141	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>
HM036	Řecko	<i>Medicago truncatula</i>	HM142	Lybie	<i>Medicago truncatula</i>
HM037	Řecko	<i>Medicago truncatula</i>	HM145	Turecko	<i>Medicago truncatula</i>
HM038	Portugalsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM146	Lybie	<i>Medicago truncatula</i>
HM039	Izrael	<i>Medicago truncatula</i>	HM147	Lybie	<i>Medicago truncatula</i>
HM040	Itálie	<i>Medicago truncatula</i>	HM150	Sýrie	<i>Medicago truncatula</i>
HM041	Lybie	<i>Medicago truncatula</i>	HM155	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>
HM042	Turecko	<i>Medicago truncatula</i>	HM173	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM043	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>	HM174	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM044	Jordánsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM175	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM046	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>	HM176	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM047	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM177	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM048	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM179	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM049	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM181	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM050	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM185	Francie	<i>Medicago truncatula</i>
HM053	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM189	Portugalsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM055	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM191	Portugalsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM056	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM192	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>
HM058	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM194	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>
HM060	Francie	<i>Medicago truncatula</i>	HM197	Itálie	<i>Medicago truncatula</i>
HM061	Řecko	<i>Medicago truncatula</i>	HM199	Kypr	<i>Medicago truncatula</i>
HM062	Řecko	<i>Medicago truncatula</i>	HM212	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>
HM063	Portugalsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM251	Kypr	<i>Medicago truncatula</i>
HM064	Portugalsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM260	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>
HM065	Portugalsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM264	Itálie	<i>Medicago truncatula</i>
HM066	Izrael	<i>Medicago truncatula</i>	HM266	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM067	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM267	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM068	Portugalsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM268	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM069	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>	HM271	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>
HM070	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>	HM273	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>
HM071	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>	HM276	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM073	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>	HM277	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM074	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM279	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>
HM076	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>	HM289	Řecko	<i>Medicago truncatula</i>
HM079	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM291	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>
HM080	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM292	Francie	<i>Medicago truncatula</i>
HM081	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM294	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM082	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM297	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM083	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM298	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM084	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM299	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>
HM085	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM301	Itálie	<i>Medicago truncatula</i>
HM086	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM303	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>
HM087	Alžírsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM304	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>
HM089	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM305	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>
HM090	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM306	Portugalsko	<i>Medicago truncatula</i>
HM091	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM308	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>
HM092	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM309	Maroko	<i>Medicago truncatula</i>
HM093	Španělsko	<i>Medicago truncatula</i>	HM310	Tunisko	<i>Medicago truncatula</i>
HM094	Francie	<i>Medicago truncatula</i>	HM314	Řecko	<i>Medicago truncatula</i>
HM095	Francie	<i>Medicago truncatula</i>	HM315	Francie	<i>Medicago truncatula</i>

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

Agaróza (SERVA, Německo, kat.č. 9012-36-6); Alkalická fosfatáza (1 U/μl, Thermo Scientific, kat.č. EN0362); Exonukleáza Exo I (4 U/μL, Thermo Scientific, kat.č. EN0581); Destilovaná voda; Fast AP/Fast Alkaline Phosphatase pufr (10x, Thermo Scientific, USA, kat.č. EF0654); RNáza A (Sigma-Aldrich, USA, kat.č. R6148), Marker molekulové hmotnosti - GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (0,5 μg/μl, Thermo Scientific, USA, kat.č. 10488058); Barvivo SimplySafe™ (1 ml, EURX, kat.č. E4600-01); Taq DNA polymeráza (5U/μl, MyTaq, Bioline, UK, kat.č. BIO-21105); Taq pufr (5x, MyTaq, Bioline, UK, kat.č. BIO-37112); TBE pufr (1x; Tris, kyselina boritá a EDTA; Sigma-Aldrich, ČR, kat.č. T4415); Procyanidin A2 (Sigma-Aldrich, CZ, kat.č. 41743-41-3); Aceton (VWR Chemicals, CZ, kat.č. 67-64-1); Ethanol (VWR Chemicals, CZ, kat.č. 64-17-5); Ledová kyselina octová (Lach-Ner, CZ, kat.č. 10047-A80); Butanol (Lach-Ner, CZ, kat.č. 20010-AT0); Kyselina chlorovodíková 35% (Lach-Ner, CZ, kat.č. 10033-ATX); DMACA (Sigma-Aldrich, CZ, kat.č. 6203-18-5); Kryo-gel (Cryomatrix Shandon, Thermo Scientific, UK, kat.č. 6769006); Sacharóza (Sigma-Aldrich, CZ, kat.č. 57-50-1); Barvivo Sudan Red 7B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, kat.č. 6368-72-5); Barvivo Tuluidine Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, kat.č. 89640); Glycerol (Sigma-Aldrich, CZ, kat.č. 56-81-5); Želatina (Lach-Ner, CZ, kat.č. 40174-AP0); Dodecylsulfát sodný SDS (Lach-Ner, CZ, kat.č. 40089-AP0); Fungicid obsahující 10 g metaxylylu a 25 g fludioxonilu (Syngenta, Maxim XL 035 FS, kat.č. A9638A).

4.2.2 Použité soupravy

- Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invisorb, Stratec, Německo, kat.č. 1037100200)
- PCR Amplification Kit with Takara Taq (Takara Bio Europe, kat.č. R011)
- BigDye Terminator kit (Thermo Fisher Scientific, kat.č. 4337455)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

- **Extrakční činidlo:** Smíchat 750 ml acetonu s 245 ml deionizované vody a 5 ml ledové kyseliny octové, důkladně promíchat.
- **Ethanolický roztok kyseliny chlorovodíkové (ERK):** Smíchat 125 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové se 125 ml deionizované vody a 750 ml ethanolu ve skleněné láhvi (např. Simax, 1 l), důkladně promíchat.

- **0,1% roztok 4-dimethylaminocinnamaldehydu, DMACA (RDMAC):** Navážit přesně 0,1 g DMAC do 100 ml odměrné baňky, přidat 10 ml ERK, kroužením promíchat a doplnit ERK po rysku.
- **Butanol-kyselina chlorovodíková (BHC):** Smíchá se 950 ml n-butanolu s 50 ml koncentrované HCl (35% vodný roztok).

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Homogenizátor (FastPrep-24; MP Biomedicals); Nanodrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific); Centrifuga (Centrifuge 5415 R, Eppendorf); Stolní centrifuga (MCF 2360, BDL); Elektroforéza (Widi Mini Sub; Bio-Rad); Zdroj stejnosměrného napětí (PowerPac Basic; Bio-Rad); UV transiluminátor (FireReader Platinum HD7; Uvitec Cambridge); Thermocycler (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research); Váha (572; Kern); Mrazicí box (Sanyo-Ultra Low -86 °C); Třmenový mikrometr, rozsah měření 0 – 25 mm, přesnost 0,01 mm (31502101, Hommel Hercules Werkzeughandel), Lázeň inkubační/dezaktivací (typ 1003, GFL), Lyofilizátor (Heto PowerDry PL3000, Thermo Fisher Scientific); Vakuová vývěva; Kryotom (Thermo Shandon SME, Astmoor, UK); Mikroskop (Olympus BX 51, Olympus Corp., Tokyo, Japan), Digitální kamera (Apogee U4000, Apogee Imaging Systems, Inc., Roseville, CA, USA); Laboratorní inkubátor (Laboratory Incubator ST4, BioTech, CZ).

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Izolace genomové DNA

Izolace genomové DNA byla provedena pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kitu (Invisorb). Tento komerčně vyráběný kit je vhodný pro izolaci buněčné DNA z rostlinného materiálu. Funguje na principu adsorpce DNA na silikát. Použitý rostlinný materiál byl však nejprve homogenizován v homogenizátoru FAST Prep (MP Biomedicals). Následný postup izolace se řídil návodem od výrobce.

Postup:

1. Homogenizovaný materiál (drcené listy) vložit do 1,5 ml mikrozkušavky typu Eppendorf.
2. Pro lyzi materiálu přidat 400 µl Lysis Buffer P + 20 µl Proteinase K.
3. Homogenizovat (FAST Prep, 2 min) a inkubovat 30 min při 65 °C, občas promíchat.
4. Centrifugovat při 14 000 rpm po dobu 15 min. Poté odebrat supernatant do nové 1,5 ml mikrozkušavky typu Eppendorf.
5. Následně přidat 10 µl RNAase A roztoku a ponechat při pokojové teplotě 10 až 15 min.
6. Přidat 200 µl Binding Buffer P a krátce vortexovat.
7. Pote napipetovat nebo přelít do popsané Spin Filter kolonky a nechat stát 1 až 2 min.
8. Centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min.

9. Odstranit, co proteče, vrátit zpět kolonku a napipetovat 550 µl Wash Buffer I.
10. Centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min.
11. Odstranit, co proteče, vrátit zpět kolonku a napipetovat 550 µl Wash Buffer II.
12. Centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min.
13. Odstranit, co proteče, vrátit zpět kolonku a napipetovat 550 µl Wash Buffer II.
14. Centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min.
15. Odstranit, co proteče, vrátit zpět kolonku a poté centrifugovat „nasucho“ při 12 000 rpm po dobu 2 min.
16. Pro eluci DNA přenést kolonku do čisté mikrozkušavky a napipetovat 2krát po sobě 150 µl předehřátého (65 °C) Elution Buffer D a inkubovat po dobu 3 min.
17. Nakonec centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min. Izolovanou DNA uschovat pro pozdější práci při 4 °C nebo -20 °C.

4.4.1 Spektrofotometrické měření DNA

Měření čistoty a koncentrace izolované DNA bylo prováděno spektrofotometricky na přístroji NanoDrop (Thermo Scientific). Přístroj proměřoval absorbanci v rozmezí 230 až 300 nm, přičemž při vlnové délce 260 a 280 nm byly měřeny hodnoty vyjadřující čistotu a koncentraci DNA.

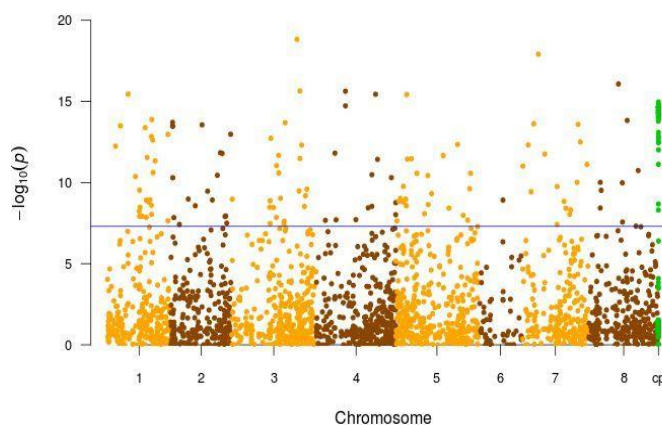
4.4.2 GWAS analýza pro výběr kandidátních genů

V rámci diplomové práce byly zkoumány kandidátní geny identifikované pomocí GWAS analýzy na souboru vybraných geograficky a bioklimaticky strukturovaných vzorků *Pisum* a *Medicago truncatula*. Genomická DNA hrachu byla podrobena DArTseq™ analýze na Diversity Arrays Technology Ltd. Canberra v Austrálii. Výsledkem sekvenování 300–700 bp fragmentů genomové DNA bylo nalezení celkem 75 862 polymorfních SNPs ve sledovaném souboru.

Použitím softwaru GAPIT byla provedena analýza dat získaných z DArTseq analýzy (Diversity Arrays Technology Ltd. Canberra v Austrálii), kdy byly porovnávány plané (dormantní) s primitivními kulturními (nedormantními) skupinami hrachů, celkem 228 vzorků. Bylo porovnáváno všech 75 862 DArTseq fragmentů a bylo získáno 0,9; 2,19; 1,24 a 0,02 milionů výsledků pro hodnotu -, 0, 1 a eventuálně 2. Hodnota “-” znamená, že chybí data (22 % z celkového objemu dat), “0” a “1” značí alternativní sekvence (SNP polymorfismus) pro daný fragment a hodnota “2” znamená, že byly detekovány zároveň hodnoty “0” a “1”, což by odpovídalo heterozygotnímu jedinci, ale lze spíše předpokládat, že tento výsledek značí chybu nebo paralogní sekvenci. Všech 75 862 DArTseq fragmentů bylo filtrováno podle podmínky, že maximum chybějících dat pro všechny vzorky, tzn. hodnoty “-” nebo “2”, je 20 %.

Bylo tak získáno 11 343 polymorfních SNP vysoké kvality, které byly přiřazeny k homologním oblastem na genom fylogeneticky blízké tolíce (*Medicago truncatula*), ve výsledku celkem 2 421 DArTseq sekvencí. Následně byla spočítána pravděpodobnost získaných hodnot a předpokládaných hodnot, s hranicí významnosti 5×10^{-8} . Tímto způsobem na základě P hodnot byly určeny významné oblasti (geny) asociované s dormancí, celkem 141 sekvencí, které se nacházely nad hranicí významnosti.

Obrázek č. 5: Významné oblasti asociované s dormancí semen.



4.4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) byly amplifikovány vždy určité úseky kandidátních genů PsCam035877, PsCam048411, PsCam026975 a PsCam036641 (PPO), které byly následně odeslány na sekvenaci. Primery použité na amplifikaci byly navrženy pomocí FAST PCR programu. Seznam použitých primerů je uveden v následující Tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Seznam použitých primerů.

Kandidátní gen	Použitý forward primer	Sekvence forward primeru	Použitý reverse primer	Sekvence reverse primeru
PsCam035877	PsCam035877-F202	5'-TGGGTTGCGCGCGTCAAGCT-3'	PsCam035877-R1729	5'-GCTTGGGAGAAGAAGCTCTACGA-3'
PsCam048411	PsCam048411G-F19	5'-GCTTTGTTGGAGAAGGTGACTCTT-3'	PsCam048411G-R1054	5'-TAGGTGAGTCATCAGTGACATGA-3'
PsCam026975	PsCam026975-F310	5'-AGGGCTTGGTGTGAACTGGGGAACACAAG-3'	PsCam026975-R2970	5'-CTTCTTCAGCGTCTTCTTCTATGCCCTC-3'
PsCam036641 (PPO)	PPO-F847	5'-GTTGATGGTGATGCAAGTGACCTA-3'	PPO-R1858	5'-AAGATCGAATCACCATAAACGCA-3'

Samotná PCR probíhala enzymaticky pomocí termostabilní DNA Taq polymerázy nebo v případě dlouhých amplifikovaných úseků pomocí TaKaRa Taq DNA polymerázy. Reakce probíhala v přístroji zvaném thermocycler. Příprava PCR reakční směsi byla přizpůsobena použitému typu DNA polymerázy. Pro přípravu reakční směsi s DNA Taq polymerázou (BIOLINE/ TaKaRa) byly použity následující složky (množství jednotlivých složek uvedeno pro jednu PCR reakci):

Tabulka č. 4: Příprava reakční směsi s DNA Taq polymerázou (BIOLINE).

Reakční složky	Objem pro jednu reakci [μl]
MyTaq pufr 5x (BIOLINE)	3
Voda pro PCR	9,23
Směs primerů Forward + Reverse (5 pmol/μl)	0,7
Taq polymeráza (5U/μl; BIOLINE)	0,07
Celkový objem	13
Vzorek - DNA templát (20-50 ng/μl)	2

Tabulka č. 5: Příprava reakční směsi s DNA Taq polymerázou (TaKaRa).

Reakční složky	Objem pro jednu reakci [μl]
10X PCR Buffer (TaKaRa)	5
Směs nukleotidů dNTP (10 nmol/μl)	2
Voda pro PCR	14,5
Směs primerů Forward + Reverse (5 pmol/μl)	1
Taq polymeráza (5U/μl; TaKaRa)	0,5
Celkový objem	23
Vzorek - DNA templát (20-50 ng/μl)	2

Jednotlivé složky PCR reakčních směsí byly podle počtu vzorků smíchány v dostatečném množství, důkladně zvortexovány a stočeny na minicentrifúze. Následně byla PCR reakční směs rozpipetována na desku pomocí dávkovací mikropipety, vždy tak aby v každé mikrozkušence bylo množství reakčních složek pro jednu reakci. Poté byly napipetovány jednotlivé vzorky. Po napipetování byla deska stočena na minicentrifúze a vložena do thermocycleru. Samotný průběh PCR reakce byl složen z pěti kroků - preinkubace, denaturace, annealingu, elongace a finální extenze, délka a nastavená teplota v jednotlivých krocích se lišila podle typu použité DNA polymerázy.

Tabulka č. 6: Časový a teplotní průběh PCR reakce s DNA Taq polymerázou (BIOLINE).

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Preinkubace	95	5	1
Denaturace	95	0,5	
Annealing	55	1	35
Elongace	72	3	
Finální extenze	72	5	1

Tabulka č. 7: Časový a teplotní průběh PCR reakce s DNA Taq polymerázou (TaKaRa).

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Preinkubace	95	5	1
Denaturace	98	0,5	
Annealing	56	4	35
Elongace	68	3	
Finální extenze	72	5	1

4.4.4 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza byla použita pro ověření vzniklých PCR produktů (amplifikovaných úseků kandidátních genů). Byla prováděna horizontální gelová elektroforéza na 1,5% agarózovém gelu (SERVA). Pro přípravu 80 ml 1,5% agarózového gelu bylo naváženo 1,3 g agarózy a přidán TBE pufr 80 ml. Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy, obvykle 2 až 3 minuty. Následně se nechala směs ochladit asi na teplotu 50 °C, bylo přidáno 1,5 µl barviva SimplySafe (EURX). Po nalití do připravené elektroforetické vany (Bio-Rad) se gel nechal ztuhnout (cca 15 až 20 minut). Po ztuhnutí byly vyjmuty hřebínky a gel byl vložen do elektroforézy s 0,5x TBE puřem. Následně byly do první jamky na gelu napipetovány 2 µl markeru molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp Plus, Thermo Scientific). Do ostatních jamek byly postupně pipetovány připravené PCR produktů s nanášecím puřem (5 µl PCR produkt + 2 µl nanášecí puř). Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji napětí (cca 100 až 120 V) a následná elektroforéza probíhala cca 30 min. Po ukončení elektroforézy byl gel zdokumentován na UV transluminátoru (FireReader; Uvitec Cambridge) pomocí programu UVITEC.

4.4.5 Sekvenování

Před odesláním amplifikovaných úseků kandidátních genů na sekvenování byla provedena tzv. purifikace PCR produktů. Jedná se o přečištění nukleových kyselin odveškerých nežádoucích látek. Je nutné odstranit nejruznější kontaminanty, jako jsou různé soli, nebo nežádoucí enzymy. Především je potřeba eliminovat přebytečné primery, aby následné sekvenování proběhlo s pouze jedním vybraným primerem. Přečištění PCR produktů může být prováděno pomocí komerčně dostupných kitů nebo také vyřiznutím a vyčištěním PCR produktů z gelu.

V našem případě bylo použito enzymatické odstranění přebytečných primerů pomocí enzymatické reakce. Při přípravě purifikační směsi byla použita Exonukleáza I (Thermo Scientific) a Alkalická fosfatáza (Thermo Scientific). Purifikační směs byla namíchána z následujících složek podle Tabulky č. 8 (množství jednotlivých složek uvedeno pro jednu reakci):

Tabulka č. 8: Reakční směs pro purifikaci DNA.

Reakční složky	Objem [μl]
Pufr (10x)	110
Voda	380
Exonukleáza Exo I (4 U/μl; Thermo Scientific)	44
Alkalická fosfatáza Fast AP (1 U/μl; Thermo Scientific)	16,5
Rozpipetováno po	5
Produkt PCR	5

Reakční směs byla rozpipetována po 5 μl na desku a bylo přidáno vždy 5 μl PCR produktů (vzorků). Po stočení desky na minicentrifúze následovalo vložení do thermocycleru, kde probíhala purifikační reakce 15 min při 37 °C a poté 1 min při 85 °C. Takto přečištěné PCR produkty se odesílaly na sekvenování.

Deska určená k odeslání na sekvenaci byla připravena vždy tak, že bylo do jamek napipetováno 5 μl PCR produktů s 5 μl sekvenačního primeru (5 pmol/μl). Vzorky byly poté odesílány na sekvenační analýzu pomocí BigDye Terminator kit (Thermo Fisher Scientific) do Laboratoře sekvenace DNA, PřF UK Praha nebo Macrogen, Amsterdam, Nizozemí.

4.4.6 Spektrofotometrická analýza rozpustných proanthokyanidinů v osemení

Při analýze rozpustných proanthokyanidinů v osemení hrachu bylo potřeba nejprve připravit osemení oloupáním vzorků semen a poté jej vysušit lyofilizací. Z vysušených vzorků bylo naváženo a odebráno vždy 5 mg do čisté mikrozkušavky a vzorky byly poté rozemlety na prášek pomocí homogenizátoru. Samotná extrakce probíhala přidávkem 2 ml extrakčního činidla (aceton + deionizovaná voda + ledová kyselina octová). Následovalo promíchání na třepačce (30 s, Vortex) a vzorky byly poté vloženy do ultrazvukové vany, kde probíhala sonifikace 1 hodinu při laboratorní teplotě. Zároveň byl zpracováván taktéž slepý vzorek (extrakční činidlo). Po ukončení sonifikace se vzorky nechaly centrifugovat.

Pro spektrofotometrické měření bylo nutné připravit si roztok standardu a kalibračních bodů. Do 10 ml odměrné baňky bylo naváženo 1 mg standardu procyanidinu A2 a doplněno ethanolom po rysku. Následně byl roztok důkladně promíchán. Tímto způsobem byl připraven

roztok o koncentraci 100 mg/l. Tento roztok se dále ředil do 10 ml odměrných baněk vždy 10x, čímž byly připraveny kalibrační body o koncentraci 10, 1 a 0,1 mg/l.

Samotnému měření předcházela příprava barevného derivátu. Do 2 ml mikrozkušavek bylo napipetováno 0,5 ml každého extraktu vzorku, do další zkumavky slepý vzorek a do dalších 0,5 ml každého kalibračního roztoku. Následně se do každé zkumavky přidalo 1,5 ml roztoku RDMAC, zkumavky byly uzavřeny a promíchány. Vzniklé zbarvení se měřilo spektrofotometricky po 10 a 25 minutách při vlnové délce 640 nm. Do Excelu byla poté vypsána absorbance každého kalibračního roztoku a naměřených vzorků. Od všech hodnot absorbancí se odečetla absorbance slepého vzorku (vypočítání korigované absorbance). Z koncentrace a korigované absorbance kalibračních bodů se následně zkonstruovala kalibrační přímka a vypočítala regresní rovnice (kalibrační závislost v jednotkách mg/l). Z regresní rovnice byla vypočítána koncentrace proanthokyanidinů v mg/l. Poté bylo potřeba trojčlenkou přepočítat koncentraci na hmotnost proanthokyanidinů v celém extraktu. Tato hmotnost se následně vydělila naváženým množstvím vzorku v gramech a byl získán výsledek množství rozpustných proanthokyanidinů v mg na g osemení.

4.4.7 Spektrofotometrická analýza nerozpustných proanthokyanidinů v osemení

Při analýze nerozpustných proanthokyanidinů v osemení se použil nerozpustný zbytek po extrakci vzorků pro analýzu rozpustných proanthokyanidinů. Tyto nerozpustné části vzorků se přímo v plastové zkumavce nechaly lyofilizovat přes noc. K lyofilizovaným vzorkům bylo poté přidáno 5 ml činidla Butanol-kyselina chlorovodíková (BHC). Vzniklá směs se poté nechala sonifikovat 1 hodinu v ultrazvukové lázni.

Následně se zkumavky se směsí nechaly centrifugovat (2500 g /10 min) a poté došlo k proměření absorbance supernatantu při 550 nm (odebrány vždy cca 3 ml). Změřené roztoky se po proměření absorbance vrátily zpět do plastových zkumavek. Současně byly proměřeny absorbance slepého vzorku (BHC činidlo) a kalibračních roztoků procyanidinu A2, které byly připraveny obdobným způsobem jako tomu bylo u analýzy rozpustných proanthokyanidinů.

Při přípravě kalibračních bodů bylo do 10 ml odměrné baňky naváženo 1 mg standardu procyanidinu A2 a doplněn BHC činidlem po rysku. Následně byl roztok důkladně promíchán. Tímto způsobem byl připraven roztok o koncentraci 100 mg/l. Tento roztok se dále ředil do 10 ml odměrných baněk vždy 10x, čímž byly připraveny kalibrační body o koncentraci 10, 1 a 0,1 mg/l. Takto připravené kalibrační roztoky se dále zpracovávaly spolu s analyzovanými vzorky.

Supernatant se vzorků byl poté převeden do cca 10 ml vialek z tlustého skla, které byly dobře uzavřeny uzávěrem s těsnícím septem. Uzavřené vialky se supernatantem (vč. vialek se slepým vzorkem a kalibračními standardy) byly poté vloženy do vodní lázně vyhřáté na 100°C. Takto byly vzorky vařeny přesně 1 hodinu. Poté se nechaly zchladit na laboratorní teplotu a znovu

byla proměřena absorbance všech vzorků, včetně slepého vzorku a kalibračních roztoků. Následným odečtením absorbancí naměřených za studena od absorbancí naměřených po zahřívání byly získány korigované hodnoty absorbancí. Do Excelu byly vypsány korigované absorbance každého kalibračního roztoku a vzorků. Z koncentrace a korigované absorbance kalibračních bodů byla zkonstruována kalibrační přímka a vypočítána regresní rovnice (kalibrační závislost v jednotkách mg/l). Z regresní rovnice byla následně vypočítána koncentrace nerozpustných kondenzovaných proanthokyanidinů v mg/l. Trojčlenkou bylo možné přepočítat koncentraci na hmotnost proanthokyanidinů v celkovém objemu. Tato hmotnost byla vydělena naváženým množstvím vzorku v gramech a tím byl získán výsledek množství nerozpustných proanthokyanidinů v mg na g osemení.

4.4.8 Měření tloušťky osemení pomocí mikrometru

Získané osemení oloupané ze semen hrachu bylo proměřováno pomocí třmenového mikrometru (Hommel Hercules Werkzeughandel, HM 0-25). Byly provedeny vždy tři měření tloušťky osemení u jednoho vzorku a následně byl vypočítán průměr. V dalším roce bylo celé měření zopakováno a výsledek z těchto dvou měření byl zprůměrován. Následně byla provedena statistická analýza závislosti tloušťky osemení na dormanci semen.

4.4.9 Mikroskopická analýza řezů osemením

Mikroskopická analýza osemení byla prováděna na příčných řezech osemení připravených pomocí kryomikrotomu (Shandon SME, Astmoor, UK), který se používá k přípravě velmi tenkých řezů tkání a pletiv v zamraženém stavu. Příprava i mikroskopická analýza řezů byla prováděna v laboratoři RNDr. Aleše Soukupa PhD. na katedře experimentální biologie rostlin, Univerzity Karlovy v Praze. Rostlinné vzorky určené k řezání byly fixovány (v roztoku 4 % formaldehydu s fosfátovým pufrům). Samotná příprava vzorků pro řezání na kryomikrotomu pak zahrnovala vyřezání malé části vzorku (požadovanou oblast), nasycení roztokem 2% sacharózy (2 ml, 5 min), infiltraci vakuem a přidání asi 0,5 ml kryogelu (Cryomatrix Shandon, Astmoor, UK). Vzorky se nechaly nasytit kryogelem přes noc. Následovalo namontování nasycených vzorků do kryogelu na kovovou destičku a zmrazení až na -20°C . Zmrazeného bločky byly připevněny do kryomikrotomu a následně byly prováděny příčné řezy 20 μm , které byly chytány na sklíčka potažená želatinou (Lach-Ner). Takto připravené řezy se dále barvily, a to barvivy Sudan Red (koncentrace 0,01 %, Sigma–Aldrich) a Toluidine Blue (koncentrace 0,05 %, Sigma–Aldrich). Barvivo Sudan Red se nechalo působit 1 hodinu, poté byly vzorky omyty 1% roztokem SDS a následně vodou. Obarvené vzorky byly uzavřeny krycím sklíčkem do 65% glycerolu. Při použití Toluidine Blue bylo barvení prováděno 2,5 minuty, následně byly vzorky omyty vodou a uzavřeny krycím sklíčkem do vody. Obarvené příčné řezy osemením byly analyzovány za pomoci světelné mikroskopie. Obvykle se používalo celkové zvětšení 200x nebo 400x, zřídka také 600x.

4.4.10 Testování dormance/klíčivosti

Pro testování dormance semen bylo sledováno jejich bobtnání a klíčení během různých teplotních režimů. Na 90 mm Petriho misky s navlhčeným filtračním papírem (Whatman, Grade 1) bylo vyskládáno vždy 25 semen od jednoho genotypu hrachu (*Pisum sativum* subsp. *elatus* a *P. s.* subsp. *sativum*), popř. 50 semen u tolíce (*Medicago truncatula*), byl přidán fungicid (1 ml na 1 l vody, Maxim XL 035 FS) pro zamezení růstu plísní a Petriho misky se semeny byly vloženy do laboratorního inkubátoru kontrolujícího teplotu. Semena byla sledována denně v oscilujícím teplotní režimu 25/15 °C a 35/15 °C (14/10 h) po dobu 28 dní pro hrách (*Pisum* sp.), v případě *Medicago* se jednalo o tři teplotní režimy 35/15 °C, 25/15 °C a konstantních 7 °C a semena byla sledována po dobu až 88 dní vzhledem k pomalému klíčení semen vojtěšky (*Medicago truncatula*), které také dosahuje menších procentických hodnot, než je tomu u hrachu (Bolingue et al., 2010). Byl zapisován počet nabobtnalých (viditelné zvětšení) a klíčících (s kořínkem proražejícím osemení) semen. V práci bylo použito procentické hodnoty bobtnání/klíčení v koncovém bodě 28 resp. 88 dní.

Celkový počet nabobtnalých a vyklíčených semen hrachu (*Pisum* sp.) za celý čas testování byl procenticky vyjádřen pro oba teplotní režimy, tato hodnota v teplotním režimu 25/15 °C byla poté dále používána jako míra klíčivosti jednotlivých vzorků, tzv. celkové klíčení. Vzorky byly také rozděleny do kategorií D značící dormanci semen, v případě, že celkové klíčení bylo nižší než 50 %, a N pro semena bez dormance, u kterých míra celkového klíčení přesahovala 80 %. Kromě těchto kategorií byla u semen vykazujících dormanci zavedena také kategorie R, která značí responzivitu ke zvýšení teploty a byla do ní zařezena semena, která v teplotním režimu 35/15 °C vykazovala zvýšení klíčivosti o 10 % a více.

V případě vojtěšky (*Medicago truncatula*) bylo celkové klíčení pro všechny tři teplotní režimy taktéž procenticky vyjádřeno a vzorky byly dle klíčení klastrovány do pěti, resp. šesti skupin dle dormance: skupina I - dormantní (bez odezvy); skupina II a III - středně responzivní na měnící se teploty; skupina IV a V – velmi responzivní a skupina VI – vysoce responzivní. S tímto rozdělením do skupin se dále pracovalo při asociačním mapování.

4.5 Použitý software

Software GAPIT (Genome Association and Prediction Integrated Tool 3.0, Zhiwu Zhang Laboratory)

Software GAPIT slouží pro GWAS analýzu a genomickou predikci, včetně komprimovaného smíšeného lineárního modelu (CMLM). Tento software byl použit k porovnání dat získaných z DARTseq analýzy, kdy byly porovnávány plané (dormantní) s primitivní kulturní (nedormantní) skupinami hrachů s cílem objevit oblasti asociované s dormancí. Software GAPIT byl použit ve spolupráci s Ing. Oldřichem Trněným. (<http://www.zzlab.net/GAPIT/>)

FastPCR

Program FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>) byl použit pro navrhování PCR primerů použitých na amplifikaci kandidátních genů.

Program Genious (verze 7.1.9)

Pro editaci, vizualizaci DNA sekvencí a rozřídění sekvencí do kategorií podle dormance byl použit program Genious (verze 7.1.9, Biomatters). Především byla použita funkce „multiple alignment“ a translace sekvencí do proteinu.

Program MEGA 7

Program MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net>) byl použit pro analýzu přirozené selekce kodon po kodonu metodou největší pravděpodobnosti „Maximum Likelihood Tree“ (Kumar *et al.*, 2016).

Program PAST 3.21

Program PAST 3.21 (<https://www.softpedia.com>) byl použit pro klastrovou analýzu vzorků, která byla provedena ve spolupráci s RNDr. Martinem Duchoslavem, Ph. D.

5 VÝSLEDKY

5.1 Fenotypová charakterizace u hrachu (*Pisum sp.*)

Vzhledem ke skutečnosti, že stav dormance semen je označován jako absence klíčení, je při zjišťování dormance semen nezbytné měřit jejich klíčení. Při testování dormance semen hrachu (*Pisum sativum* subsp. *elatius* a *P. s.* subsp. *sativum*) bylo denně sledováno bobtnání a klíčení semen v oscilujícím teplotní režimu 25/15 °C a 35/15 °C (14/10 h) po dobu 3 až 4 týdnů, a byla získána data pro celkem 97 vzorků. Ze získaných dat byla vybrána data pouze pro 48 vzorků hrachu (*Pisum sp.*) použitých v této diplomové práci, se kterými se dále pracovalo. Vzorky byly rozděleny do kategorií dormance dle odezvy v 25 °C. Ukázalo se, že celkem 21 vzorků vykazuje dormanci semen (celkové klíčení bylo nižší než 50 %) a 27 vzorků je bez dormance (celkové klíčení bylo vyšší než 80 %) semen, tedy celý soubor vzorků je rozdělen na dvě velké části 21 dormantní vzorků hrachu ku 27 nedormantním vzorkům hrachu (Tabulky č. 9, 10). Hrachy vykazující dormanci byly dále rozděleny do dvou kategorií dle odezvy k zvýšení teploty (35-25 °C). Semena kategorie R (responsive) vykazují odezvu na zvýšení teploty, do této kategorie byla řezena semena, která v teplotním režimu 35/15 °C vykazovala zvýšení klíčivosti o 10 % a více.

Tabulka č. 9: Fenotypová analýza *Pisum sp.*, vzorky vykazující dormanci semen (celkem 21).

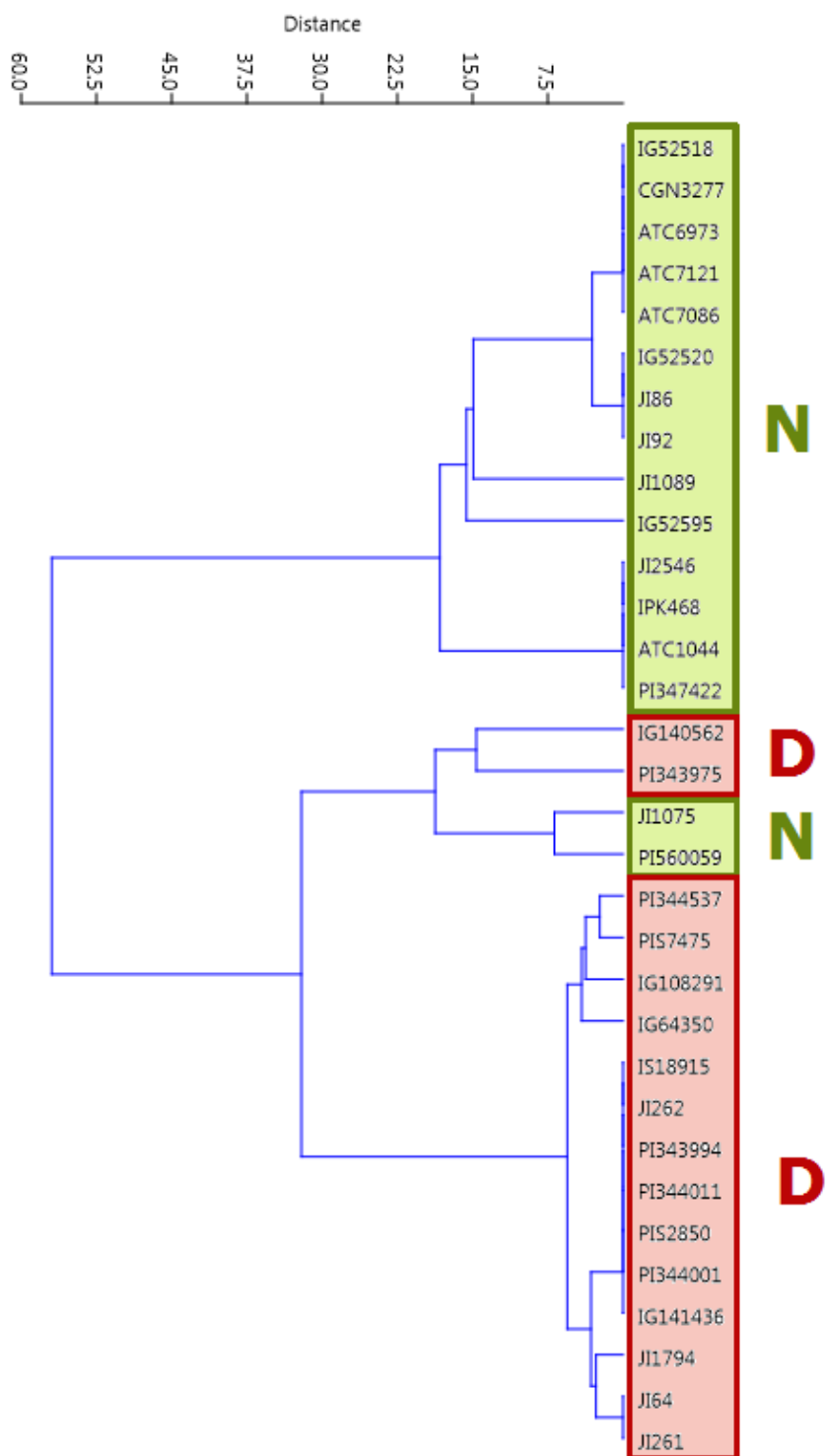
	Označení vzorku	Celkové klíčení ve 25°C/ 28d [%]	Kategorie dle klíčení v 25°C	Celkové klíčení ve 35°C/ 28d [%]	Kategorie dle odezvy k zvýšení teploty (35°C-25°C)
1	IS18915	0,00	D	4,00	D
2	J1262	0,00	D	4,00	D
3	Hungary - Balaton	0,00	D	20,00	R
4	PIS2850	0,00	D	4,00	D
5	IG119794	0,00	D	20,00	R
6	IG141436	0,00	D	20,00	R
7	PI343994	0,00	D	19,05	R
8	IG52517	4,00	D	32,00	R
9	JW1794	4,00	D	8,00	D
10	PI560039	8,00	D	20,00	R
11	IS18908	8,00	D	8,00	D
12	IG64350	8,00	D	8,00	D
13	J1261	8,00	D	8,00	D
14	PI344001	8,00	D	8,00	D
15	J164	8,00	D	20,00	R
16	IG108291	12,00	D	60,00	R
17	PIS7475	16,00	D	24,00	D
18	PI344537	16,00	D	80,00	R
19	Elmali	44,00	D	64,00	R
20	PI343975	48,00	D	60,00	R
21	IG140562	52,00	D	100,00	R

Tabulka č. 10: Fenotypová analýza *Pisum* sp., vzorky bez dormance semen (celkem 27).

	Označení vzorku	Celkové klíčení ve 25°C/ 28d [%]	Kategorie dle klíčení v 25°C	Celkové klíčení ve 35°C/ 28d [%]	Kategorie dle odezvy k zvýšení teploty (35°C-25°C)
1	IPK468	100,00	N	100,00	N
2	CGN3277	100,00	N	100,00	N
3	Jl86	100,00	N	100,00	N
4	Jl1030	100,00	N	100,00	N
5	ATC1044	100,00	N	100,00	N
6	PI347422	100,00	N	100,00	N
7	ATC6973	100,00	N	100,00	N
8	ATC7121	100,00	N	100,00	N
9	ATC7086	100,00	N	100,00	N
10	ATC7021	100,00	N	100,00	N
11	Jl1086	100,00	N	100,00	N
12	PI181958	100,00	N	100,00	N
13	PI181799	100,00	N	100,00	N
14	Jl1071	100,00	N	100,00	N
15	VIR2311	100,00	N	100,00	N
16	VIR1246	100,00	N	100,00	N
17	VIR1541	100,00	N	100,00	N
18	Jl1525	100,00	N	100,00	N
19	Jl1837	100,00	N	100,00	N
20	Jl1974	100,00	N	100,00	N
21	AR00260	100,00	N	100,00	N
22	PI357292	100,00	N	100,00	N
23	Jl92	100,00	N	100,00	N
24	IG52520	100,00	N	100,00	N
25	Jl2546	100,00	N	100,00	N
26	IG52595	100,00	N	100,00	N
27	Jl241	100,00	N	100,00	N

Na základě celkového klíčení v 25 °C po 28 dnech testování byla semena rozdělena do skupin dle dormance. Jedná se o klastrovou analýzu pomocí Eukleidových vzdáleností, která byla provedena ve spolupráci s RNDr. Martinem Duchoslavem, Ph. D. v programu PAST 3.21. Pro přehlednost nebyl použit celý soubor vzorků, ale bylo použito pouze 16 vzorků z kategorie dormance N a 16 vzorků z kategorie dormance D (Obrázek č. 6).

Obrázek č. 6: Klastrová analýza vzorků hrachu dle celkového klíčení.



Popis k obrázku č. 6: Písmeno D značí vzorky s dormancí semen, písmeno N vzorky bez dormance semen.

5.1.1 Měření tloušťky osemení a množství pigmentů v osemení hrachu

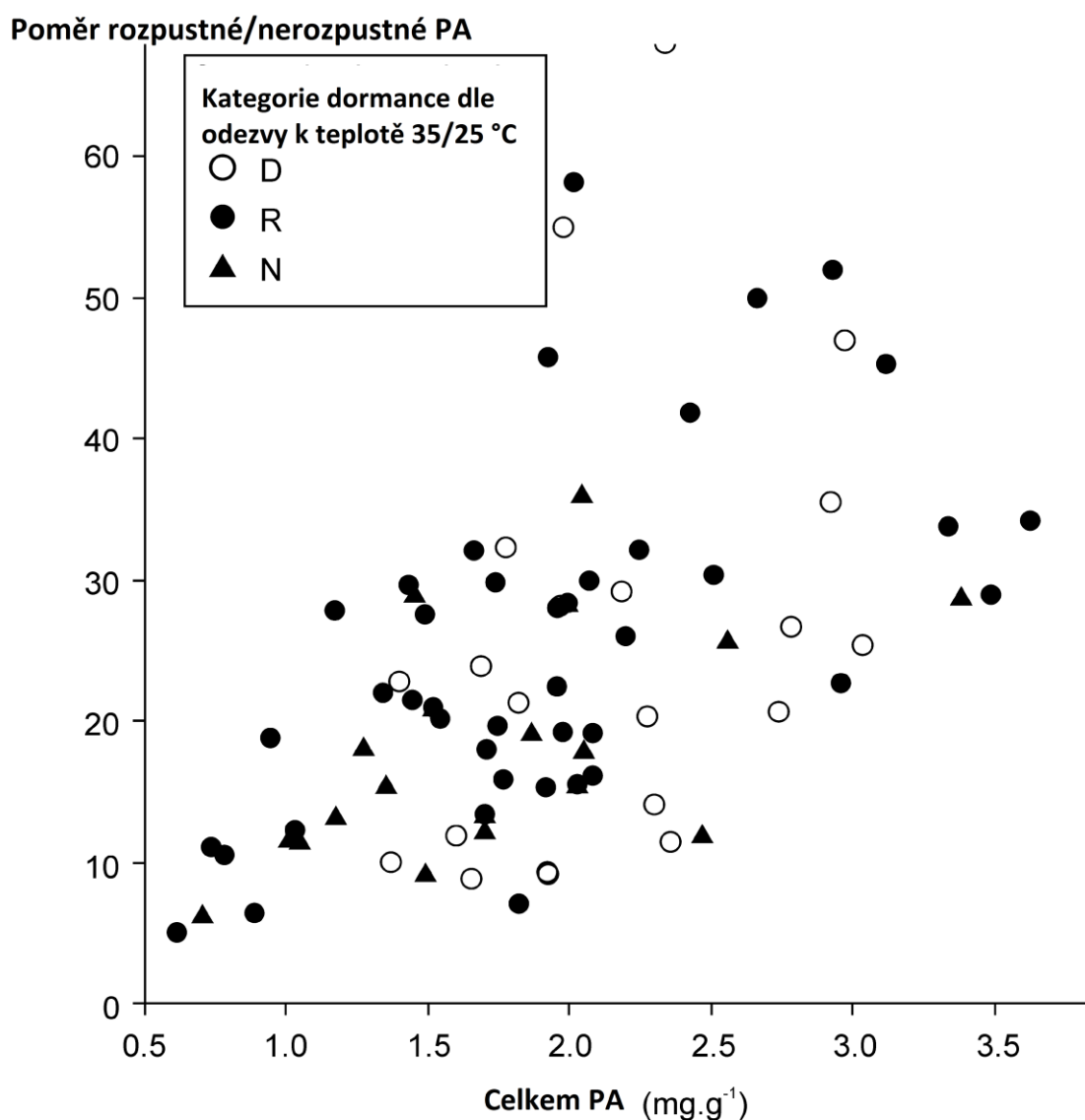
Měření tloušťky osemení ze semen hrachu bylo proměřováno pomocí třmenového mikrometru (Hommel Hercules Werkzeughandel, HM 0–25, rozsah 0–25 mm, přesnost měření 0,01 mm). Bylo provedeno na vzorcích semen sklizených v letech 2017-18 a ze získaných dat byl vypočítán průměr. Pomocí statistické analýzy závislosti tloušťky osemení na dormanci semen bylo zjištěno, že existuje asociace mezi tloušťkou osemení a dormancí semen. U semen s dormancí vykazovala získaná data vyšší hodnoty, jejich osemení tedy mělo větší tloušťku, než tomu bylo u semen bez dormance (Hradilová *et al.*, 2019). Naměřené tloušťky osemení pro vzorky použité v této diplomové práci jsou patrné v následující tabulce (Tabulka č. 11).

Tabulka č. 11: Tloušťka osemení u hrachu (*Pisum sp.*)

Označení vzorku	Celkové klíčení ve 25°C/ 28d [%]	Kategorie dle klíčení v 25°C	Kategorie dle odezvy k zvýšení teploty (35°C-25°C)	Tloušťka osemení [μm]
IG119794	0,00	D	R	129,75
IG141436	0,00	D	R	152,50
IS18915	0,00	D	D	98,33
PI343994	0,00	D	R	108,75
Jl262	0,00	D	D	128,33
PIS2850	0,00	D	D	170,83
IG52517	4,00	D	R	33,33
JW1794	4,00	D	D	137,50
IG64350	8,00	D	D	136,67
Jl64	8,00	D	R	143,33
PI344001	8,00	D	D	123,33
IG108291	12,00	D	R	125,00
PI344537	16,00	D	R	133,33
PIS7475	16,00	D	D	153,75
Elmali	44,00	D	R	182,50
PI343975	48,00	D	R	146,00
IG140562	52,00	D	R	170,00
Jl2546	100,00	N	N	45,00
IG52520	100,00	N	N	53,33
IG52595	100,00	N	N	76,50

Z dat získaných měření rozpustných a nerozpustných proanthokyanidinů (PA) v osemeni bylo zjištěno, že existuje souvislost s množstvím pigmentů v semenech a jejich dormanci. U semen vykazujících dormanci byl obecně zjištěn výskyt většího množství proanthokyanidinů (PA). Také bylo zjištěno, že poměr nerozpustných PA k celkové množství PA vykazuje souvislost s kategoriemi dormance, viz Obrázek č. 7 (Hradilová *et al.*, 2019). V následující tabulce jsou poté uvedeny hodnoty PA pro vzorky použité v této diplomové práci (Tabulka č. 12).

Obrázek č. 7: Závislost poměru rozpustných/nerozpustných PA na celkovém množství PA v rámci kategorií dormance dle odezvy k teplotě 35/25 °C (převzato z Hradilová *et al.*, 2019).



Tabulka č. 12: Obsah rozpustných a nerozpustných proanthokyanidinů (PA) u *Pisum sp.*

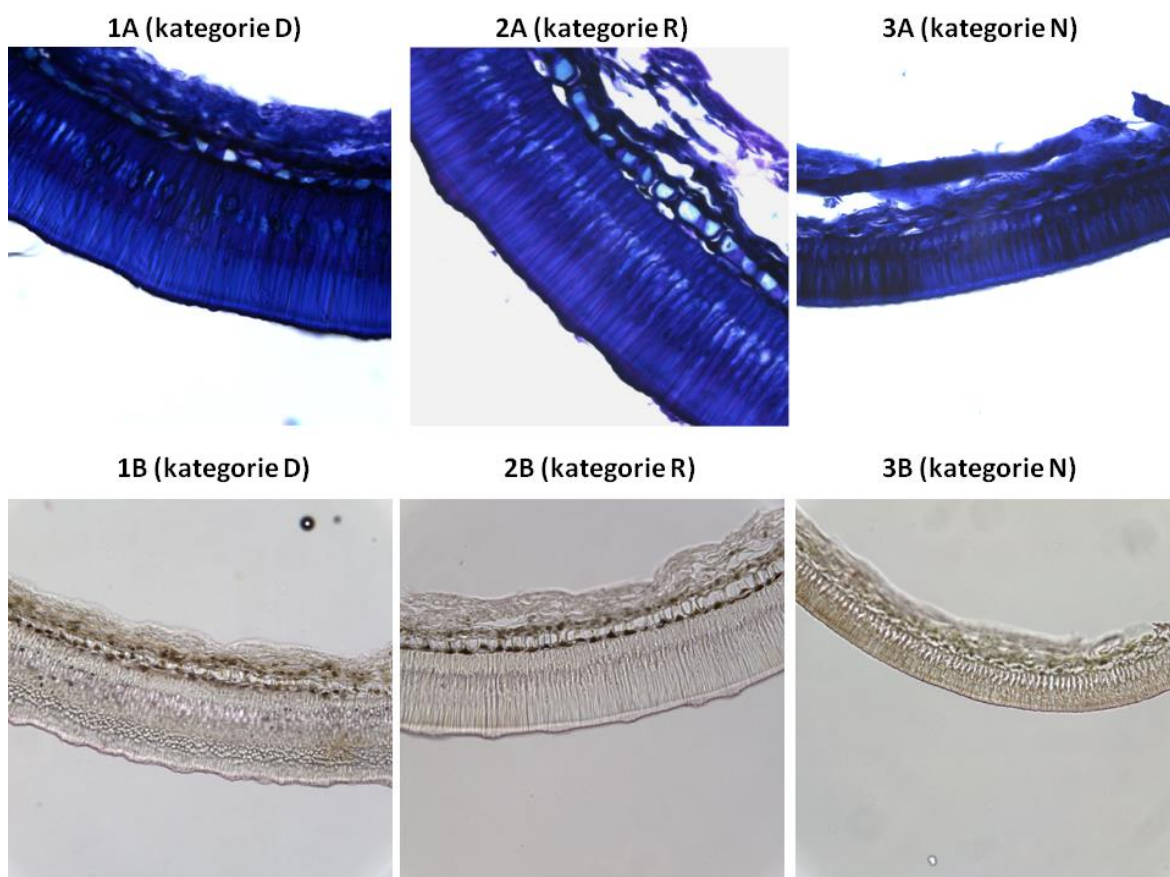
Označení vzorku	Celkové klíčení ve 25°C/ 28d [%]	Kategorie dle klíčení v 25°C	Kategorie dle odezvy k zvýšení teploty (35-25°C)	Rozpustné PA [mg]*	Nerozpustné PA [mg]*	Celkem PA [mg]*	Poměr rozpustné PA/celkem PA	Poměr nerozpustné PA/celkem PA
IS18915	0,00	D	D	2,942890443	0,04340425	2,9862947	0,9854655	0,0145345
JI262	0,00	D	D	1,726111259	0,03686897	1,7629802	0,9790871	0,0209129
PIS2850	0,00	D	D	1,1716429	0,04281377	1,2144567	0,9647466	0,0352534
PI343994	0,00	D	R	4,486492281	0,04570638	4,5321987	0,9899152	0,0100848
IG52517	4,00	D	R	0,066299098	1,20566002	1,2719591	0,947876393	0,052123607
JW1794	4,00	D	D	0,053271253	1,72148269	1,7747539	0,969983866	0,030016134
IG64350	8,00	D	D	1,25837704	0,05011989	1,3084969	0,9616966	0,0383034
JI64	8,00	D	R	1,87174227	0,08335969	1,955102	0,957362996	0,042637004
PI344001	8,00	D	D	0,058720461	1,33975424	1,3984747	0,958011067	0,041988933
IG108291	12,00	D	R	1,143526236	0,05086177	1,194388	0,957416045	0,042583955
PI344537	16,00	D	R	4,60919289	0,09041374	4,6996066	0,9807614	0,0192386
PIS7475	16,00	D	D	0,035313952	1,94272751	1,9780415	0,982147011	0,017852989
Elmali	44,00	D	R	1,136363636	0,01657636	1,15294	0,985622527	0,014377473
PI343975	48,00	D	R	0,052088638	1,43645337	1,488542	0,965006941	0,034993059
IG140562	52,00	D	R	1,714876033	0,03802917	1,7529052	0,9783051	0,0216949
IG52520	100,00	N	N	2,658806126	0,06468919	2,7234953	0,9762477	0,0237523
JI2546	100,00	N	N	1,959841629	0,08400658	2,0438482	0,9588978	0,0411022
IG52595	100,00	N	N	0,048351003	1,40431489	1,4526659	0,966715676	0,033284324

* Množství pigmentů je vyjádřeno v mg na g osemení.

5.1.2 Mikroskopická analýza osemení u hrachu

U tří vzorků hrachu, patřícím k této diplomové práci (IG64350, JI2546, PI344537), byla provedena mikroskopická analýza osemení na příčných řezech osemení připravených pomocí kryomikrotomu (Shandon SME, Astmoor, UK). Příprava i mikroskopická analýza řezů byla prováděna v laboratoři RNDr. Aleše Soukupa PhD. na katedře experimentální biologie rostlin, Univerzity Karlovy v Praze. Byl vybrán zástupce z každé kategorie dormance D (IG64350), R (PI344537) a N (JI2546) a jednotlivé řezy byly mezi sebou porovnány. Na příčných řezech je patrné, že se vzorky od sebe liší tloušťkou osemení a také povrchem osemení. Zatímco povrch osemení nedormantního semene je spíše hladký a elastický (viz obrázek č. 8 - 1A, 1B), u semene vykazujícího dormanci je osemení výrazně tlustší a více členité (viz obrázek č. 8 - 3A, 3B). U semene zařazeného do kategorie R je patrná výrazná tloušťka osemení a povrch podobající se spíše semeni s dormancí (viz obrázek č. 8 - 2A, 2B).

Obrázek č. 8: Mikroskopická analýza řezů osemením, zástupci z kategorie D, R a N.

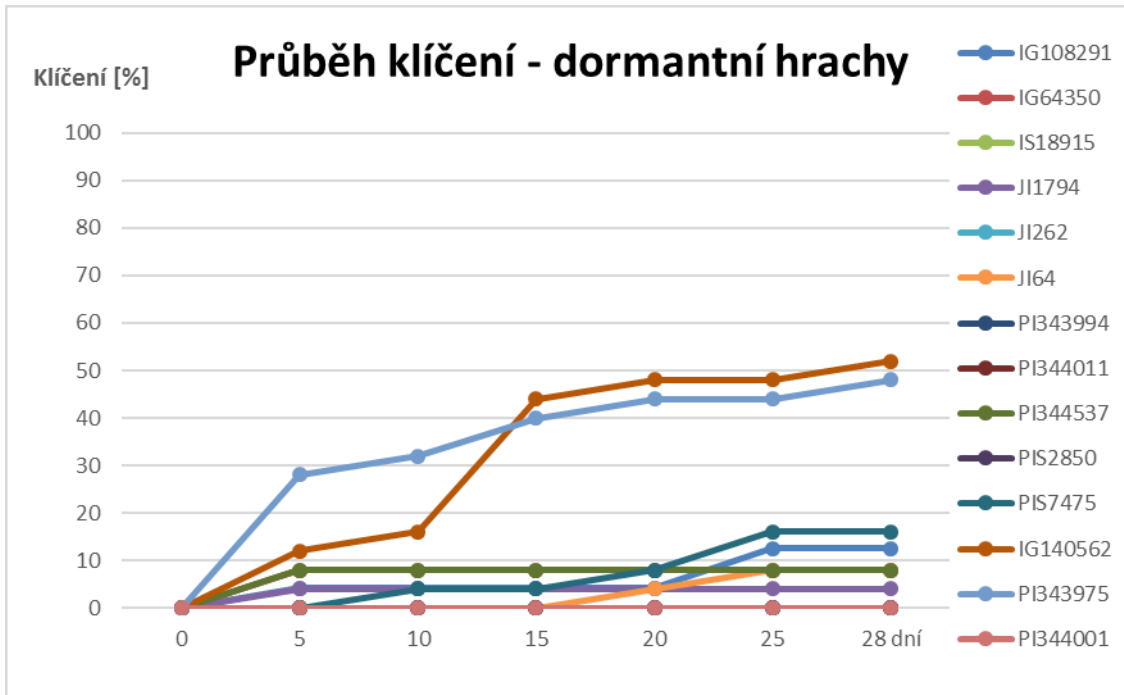


Popis k obrázku č. 7: **1A** – označení vzorku: IG64350, kategorie: D, barvení: TB (Toluidine Blue), zvětšení: 400x; **1B** – označení vzorku: IG64350, kategorie: D, barvení: S (Sudan), zvětšení: 200x; **2A** – označení vzorku: PI344537, kategorie: R, barvení: TB (Toluidine Blue), zvětšení: 400x; **2B** – označení vzorku: PI344537, kategorie: R, barvení: S (Sudan), zvětšení: 200x; **3A** – označení vzorku: JI2546, kategorie: N, barvení: TB (Toluidine Blue), zvětšení: 400x; **3B** – označení vzorku: JI2546, kategorie: N, barvení: S (Sudan), zvětšení: 200x

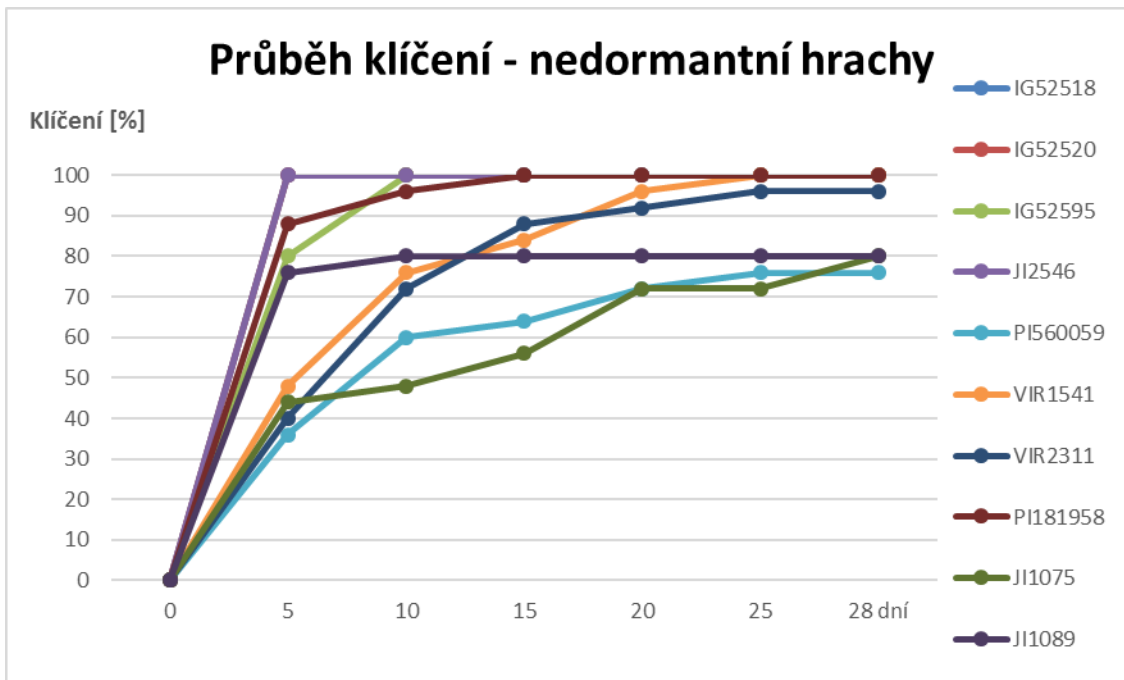
5.1.3 Průběh klíčení u vybraných vzorků hrachu

Dle hodnot klíčení zaznamenaných v jednotlivých dnech byl vytvořen graf zobrazující průběh klíčení u vybraných dormantních vzorků hrachu (14 vzorků) a zvláště byl tento graf vytvořen také pro průběh klíčení u nedormantních hrachů (10 vzorků). Z grafů je patrné, jak rozdílný průběh klíčení mohou vzorky vykazovat (Obrázek č. 9, 10). U dormantních hrachů se hodnoty celkového klíčení pohybovaly nejčastěji kolem 10 nebo 20 % a těchto hodnot bylo dosaženo obvykle v prvních dnech testování klíčení a poté se v následujících dnech již příliš stav neměnil. Zatímco u nedormantních hrachů hodnoty celkového klíčení dosahovaly 80 až 100 % a těchto hodnot bylo dosaženo s rozdílnou rychlostí během testovacích dní.

Obrázek č. 9: Průběh klíčení u dormantních hrachů (celkem 14 vzorků).



Obrázek č. 10: Průběh klíčení u nedormantních hrachů (celkem 10 vzorků).



5.2 Sekvenční analýza a asociační mapování kandidátních genů u hrachu

V rámci této diplomové práce byly provedeny sekvenční analýzy vybraných úseků tří kandidátních genů PsCam035877, PsCam048411, PsCam026975, které byly vybrány pomocí GWAS analýzy. Zkoumané kandidátní geny byly vybrány ze souboru 141 kandidátních sekvencí, které byly získány pomocí GAPIT analýzy ze 75 862 SNP identifikovaných na základě GWAS analýzy na souboru vybraných geograficky a bioklimaticky strukturovaných vzorků *Pisum* sp. Více viz kapitola Materiál a metodika.

Získané kandidátní sekvence u *Pisum* sp. byly analyzovány pomocí BLASTN ve veřejně dostupné databázi The Pea RNA-Seq gene atlas, obsahující cDNA z různých orgánů a vývojových stádií hrachu a došlo tak k určení kandidátních genů, ke kterým tyto sekvence náleží. Pomocí této databáze byly přiřazeny také hodnoty exprese těchto genů v semenech hrachu. Následně byly vyhledány pomocí NCBI BLAST homologní sekvence u příbuzných druhů *Medicago* nebo *Cicer*. Na základě zjištěných dat byly v rámci této diplomové vybrány k podrobnějšímu studiu již dříve zmíněné kandidátní geny - PsCam035877, PsCam048411, PsCam026975.

Tabulka č. 13: Kandidátní geny vybrané pomocí GWAS analýzy.

Označení kandidátního genu	Pozice SNP v sekvenci	CloneID	Kandidátní sekvence	<i>Medicago</i> homologní sekvence	Expres v semeni [RPKM]*	Expres v semenech [RPKM]*	P hodnota
PsCam035877	3642241 F 0-60:A>G-60:A>G	3642241	TGCAGCAGCGAAGG GATATGTTGCGGCA GTGGGGAAATCGAA ATCAGACGATGTGG CATCATCTTCGAC	XM_013593956.1 Medicago truncatula BZIP transcription factor bZIP80 mRNA	16,6	14,86	2,38332E-08
PsCam048411/ PsCam048384	5939572 F 0-12:T>G-12:T>G	5939572	TGCAGGAGGGCGTG TGATCTACTGGGAT GGACCAAGAGTGCT TGGTGTACTTGCCA TGTCTAGAGCAAT	XM_013605270.1 Medicago truncatula protein phosphatase 2C-like protein mRNA	73,66	20,01	6,68532E-07
PsCam026975	3564729 F 0-30:C>T-30:C>T	3564729	TGCAGGAGTATTTA GGCCTGATATCAAC GGCCTCATGACTCA GATGGTACAATTC TCAATAAGAATGC	XM_003624562.2 Medicago truncatula O-glycosyl hydrolase family 17 protein mRNA	10,56	28,93	1,18325E-06

* RPKM [Reads Per Kilobase Million] - Počet čtení (RNA-seq) na kilobázi na milión mapovaných readů.

Na základě diferenciální exprese u genotypů JI92 a JI64 byl později do studie dovybrán a zahrnut také kandidátní gen PsCam036641 kódující polyfenol oxidasu (PPO) (Hradilová *et al.*, 2017). Sestavení sekvencí genu bylo provedeno ve spolupráci s Ing. Oldřichem Trněným.

5.2.1 Sekvenční analýza genu PsCam035877 kódujícího Bzip transkripční faktor

Byla provedena PCR amplifikace vybraného úseku genu PsCam035877 z genomové DNA studovaného souboru vzorků planého i kulturního hrachu. Pro amplifikaci úseku o celkové získané délce 1 655 bp byly použity forward primer PsCam035877-F202 a reverse primer PsCam035877-R1729. Forward primer nasedá v pozici 1 až 23 od start kodonu (ATG). Reverse primer nasedá v oblasti 1527 až 1550 od ATG. Součástí amplifikovaného úseku je intron o délce 192 bp, který byl identifikován v průběhu práce díky porovnání amplifikované genomové a exprimované cDNA.

Po osekvenování bylo zjištěno, že v rámci amplifikovaného úseku se podařilo získat původní kandidátní sekvenci 5' TGCAGCAGCGAAGGGATATGTTGCGGCAGTGGGGAAATC GAAATCAGACGATGTGGCATCATCTTCGAC 3', která na pozici 60 nese původní polymorfni SNP získaný z DArTseq analýzy. Jedná se o záměnu dusíkaté báze adeninu (A) za guanin (G). Jak velký úsek kandidátního genu PsCam035877 byl získán, lze vidět na následujícím obrázku č. 11, kde jsou vyznačeny také pozice primerů a původní kandidátní sekvence na referenční sekvenci PsCam035877.

Obrázek č. 11: Pozice primerů a kandidátní sekvence genu PsCam035877 od ATG (zelená – F primer; červená – R primer; přerušovaná červená – kandidátní sekvence).

```
ATGGGTTGCGGGCGTGAAGCTAGAAAACGAAGACACTGTACGGGGTGTAAAGACCGTCG
CCGTCTCATGAAAGAAGCGTTTACGCGCGTCAACCATCTCGCAGCTGCACACTCTGACTACTG
TCGTTCACTTCGCCTCACC GGCTCTGTCTCTACATTCGCGCGGGTGAGCCTCTCTGTGTC
TCCGACAACACCCCGCGTATTCAACATAAAACAACCACCCCATCCCACCACCGCCA
CGAAAACGTTCCAACATCCACCAAAACCAACCACCGTCTGTCACACATTCCATCTCCTTCAAC
GTCTTCTTCCACCGTCCACCGCGGGCAACCGTTTCAACCTTCACTTCTCCACCATAACC
TCCTCAAACTCCCTCATATCTCTTTCATCCACTCCCTCCACAATCAACACCACAACGGCTC
GCCGCGTAAACCACGGCGCGGAAACTCCCTCACATTTCTCTCGATTCAAGCCCTTCTTCTAC
CCCTCGAAGCAACTTCTCCAACAATTTCCGCTCCCGTTTCTTCCCTACAGCAGCTTACATAC
TCTTCCACCCCTTCTCAAACCTTCTCCGTTTGGAAATGGGAAAATTTCTATCCTCCTCCTCCAC
CGCCACCGGGCTCCGATTACTTTCGACAGAGAGCATGAACATGAACATGACCAAGAAGATACTA
CTTCTCAATTCTCTTTTCAATTCACGAAATAGTGAAATTCCTTATTCCGACAACAACAGCAA
AACACAACAACAACAACCTCAACAACCACAAATACAAACATATCAACCACAACAGCAA
CAACAGCAACATCGATATCCTAATCCACAGCAGCATGAAAGTGGAAAGGCTTTGATTCTGAGAG
ATCAGATTACGATTTTCAACAGAAAGCTCGCAACTGTTTCAAGAAGAATCCTAGTCATCATCA
TTTGGATGAACAACACTGAGACGGAACGAGAGGAGGTTGAGTGTAGTGAATGGGAGATC
ACTACAGCACAAACGCTTCTCCGAGGAGGAGGATGAAGAGGATGAAGAGGAAGATGATGGG
GTTGATGGGGATGTTGAGTCAAGGCTGAGATTTGGACTAGATCGAATTTCCGGTCTCGTC
TGCAGCAGCGAAGGGATATGTTGCGGCAGTGGGAAATCGAAATCAGACCGATGTGGCATCAT
CTTCGACAGGCGAAGGTGTAATGGAGATGAAGATGGTGGTGAGACATAGAGATTTGAAGGAG
ATTGTGGATTGATGATAAAGGAGAAATTTGAAAAGCTGCTGTTGCTGGAGATCAAGTTTCTGA
GATGCTTGAGATTAGTAAAGCTCAGCTTGTATCGAAGTTTCAAGGCAATTAAGGAAAACCTGTGT
ATCACTCAAATAGTCTATTGAGCAGCTGAGCTCAACTTGGACATCAAAAACACCCCTGGCGG
TGAAGTACCGGCTCGAGCCAGGTTCTGTTGGATGAACCGGGCGGTCTGAAGAGTCTTTGCTCCT
CTTTGGAACGGCTTTTGCCTTGGGAGAAGAAGCTCTACGAAGAAGTCAAGTCTAGAGAAGGT
GTGAAGATTGAGCATGAAAAGAACTGTCAGCTTTCAGAGTCAGGAATACAAGGAGACGA
TGAAGCAAAGATATCAAAACCAAGACTTCCATAAATAGTTGAGTCACTAATCGTTGTTA
CATCACAAGCTGTGTCTACCACCTCGACCGCTATTGTTGGCCTTAGAGACTCCGATCTTGTTC
CTCAGCTTGTGAACTCTGTATGGAATGATGTACATGTGGAGATCAATGCATCAGTACCATG
AAGTCAAAGCAACATAGTTCAGCAAGTCCGCGGCTGGTGAATAGATCGGGAGGAGGGAT
TCAACTTCTGAACTGCACAGGCAAGCTCGTGACCTTGAATCTGTGTCTCGGCTTGGCAC
TCGAGTTTTTGTGCGCTTATAAAATTTCAACGAGACTTTATCTCTCCTTGCATGGTTGGTTT
AAGCTTAGTCTTATTCCGGTCGATAATGATAACGTCAACAGGATGGAACACTCCGACGGTAC
ATGTTTTTTGATGACTGGAAGCTTGCACTTGACCGGTGCTCCGTGATACCGTTGCGTCTGAAGCC
ATCAAAAGCTTTATCAATGTTGCCATGTGATATCTTCAAGCAAGCCGAAGAACAAGAT
AAAGAAGCGAACCAGAGAACGCGTCCAAGAACTCGAGAAAAAGGCTTCTGTACGGAATA
TAGAAAAGAAAGTTTTACAGCTCGTATTCTTTGGTAGGATTAGCCTTCCGACTCCGCGCTG
ATAACGCAAGGCTTAGACGCGCGGATCCACTCGCCGAGAAAAAACTAGAACTAGCTACCT
GCCAAAGACGCGTGAAGATGAAATGATGAAGCATTGAAAAGCCGTAGAGGTAACAAGAGCA
ATGACACTCAACAACCTACAGACAGGCTTGCCCGAGTCTTTCAAGCATTGACCAGTTTTTCCG
TCGTTGTTACCGAGGCTCTCGACTCGGTGTACTCGCTCGTACGCCATCAAATAG
```

Před samotnou úpravou byly získané sekvence nahrány do programu Genious, ve kterém došlo k jejich editaci, složení sekvenačních čtení a byl proveden tzv. „multiple alignment“. Seřazené sekvence byly dále upravovány, porovnávány s referenční sekvencí a také byl proveden jejich překlad do aminokyselinové sekvence. Byl zkoumán polymorfismus na nukleotidové úrovni a také na proteinové úrovni. Analýzou polymorfismu porovnáním s referenční sekvencí bylo nalezeno celkem 20 polymorfismů různého typu, s četností více než 10 % (Tabulka č. 14). Z tohoto čísla bylo vybráno 13 polymorfismů s největší četností, součástí byl i původní SNP zachycený v DArTseq analýze, který se nachází na pozici 1 197 bp od ATG. Vybrané polymorfismy byly převedeny do souboru Excel a ke vzorkům byly přiřazeny kategorie dormance z fenotypové charakterizace. Následně byly vzorky porovnány podle dormance a byla sledována asociace mezi jednotlivými alelami a kategoriemi dormance.

Tabulka č. 14: Analýza polymorfismů u genu PsCam035877 porovnáním s referenční sekvencí s četností více než 10 %.

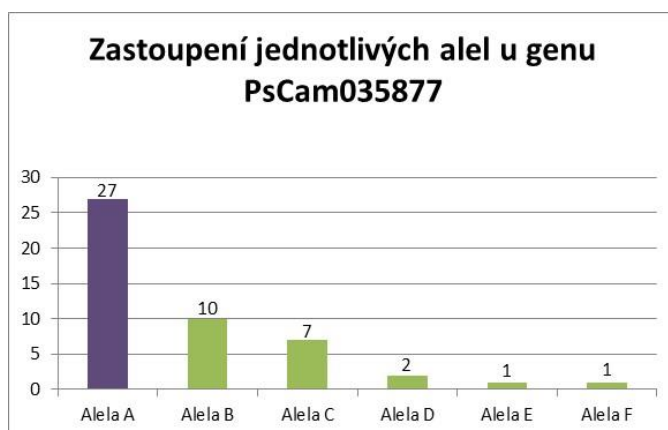
Číslo polymorfismu	Typ nukleotidů	Pozice od ATG (bp)	Délka (bp)	Záměna	Typ polymorfismu	Četnost výskytu v souboru 48 vzorků	Synonymní/nesynonymní záměna
1	CA	344	2	GG -> CA	Substitution	22.9%	nesynonymní
2	T	372	1	C -> T	SNP (transition)	20.8%	synonymní
3	C	399	1	T -> C	SNP (transition)	35.4%	synonymní
4	C	408	1	T -> C	SNP (transition)	35.4%	synonymní
5	A	414	1	C -> A	SNP (transversion)	35.4%	synonymní
6	C	439	1	A -> C	SNP (transversion)	39.6%	synonymní
7	C	624	1	T -> C	SNP (transition)	14.6%	nesynonymní
8	A	749	1	G -> A	SNP (transition)	14.6%	synonymní
9	ACA	758	0	(ACA)3 -> (ACA)4	Insertion (tandem repeat)	14.6%	-
10	ACAACA	758	0	(ACA)3 -> (ACA)5	Insertion (tandem repeat)	10.4%	-
11	G	761	1	A -> G	SNP (transition)	12.5%	synonymní
12	A	822	1	G -> A	SNP (transition)	20.8%	synonymní
13	CA	830	0	+CA	Insertion	18.8%	-
14	A	830	0	+A	Insertion	10.4%	-
15	ACAACA	830	0	(CAA)2 -> (CAA)4	Insertion (tandem repeat)	18.8%	-
16	C	837	1	T -> C	SNP (transition)	35.4%	synonymní
17	A	1 026	1	G -> A	SNP (transition)	35.4%	synonymní
18	C	1 044	1	G -> C	SNP (transversion)	39.6%	nesynonymní
19	G	1 197	1	A -> G	SNP (transition)	43.8%	synonymní
20	T	1 236	1	G -> T	SNP (transversion)	12.5%	synonymní

Upravené sekvence s odstraněnou intronovou oblastí byly dále analyzovány pomocí softwaru MEGA 7, kdy byla zjišťována přirozená selekce na úrovni kodónů pomocí metody největší pravděpodobnosti „Maximum Likelihood“. Celkově bylo v celém souboru sekvencí v kódujících oblastech nalezeno 31 synonymních a 14 nesynonymních záměn. Na úrovni proteinu bylo taktéž detekováno několik změn. V daném sekvenovaném úseku bylo objeveno 10 záměn aminokyselinového složení, které nemají vliv na délku proteinu. Avšak díky dvěma variabilním oblastem, obsahujících inzerci tandemové repetice CAA se jednotlivé proteinové sekvence liší počtem glutaminů. Celková délka proteinu daného osekvenovaného úseku se tak liší od počtu 477 aminokyselin, což je původní délka odpovídající referenční sekvenci, různým množstvím aminokyselin. Nejkratší protein má délku 476 a nejdelší 484 aminokyselin.

5.2.2 Asociační mapování u genu PsCam035877 kódujícího bZIP transkripční faktor

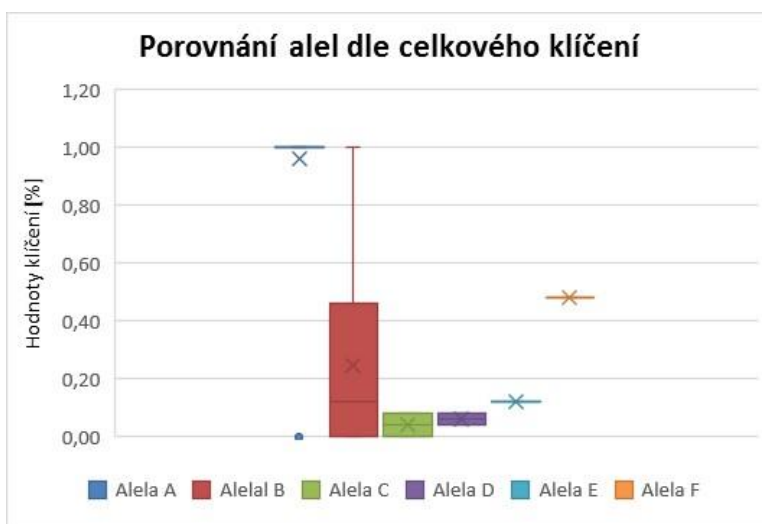
Po seřazení hlavních SNP jednotlivých sekvencí podle kategorie dormance byla zjištěna výrazná asociace některých SNP se stavem dormance. Vytvořily se výrazné haplotypové bloky, podle kterých byly SNP rozděleny do jednotlivých alel. Celkem bylo rozlišeno 6 různých alel, které byly pojmenovány písmeny A až F. Zastoupení jednotlivých alel je patrné z následujícího grafu na Obrázku č. 12. Alela A vykazovala zřetelnou asociaci s nedormantními vzorky. Ostatní alely odpovídaly vzorkům vykazujícím dormanci. Vzorky alely B, C, D, E a F byly především druhu *Pisum elatius*. Všechny analyzované vzorky druhu *Pisum sativum* byly řazeny k alele A. Do skupiny vzorků s alelou A však navíc bylo zařazeno také pět vzorků *Pisum elatius* a jeden vzorek *Pisum abyssinicum*.

Obrázek č. 12: Zastoupení jednotlivých alel u genu PsCam035877.



Dále byly k jednotlivým vzorkům dosazeny hodnoty vyjadřující status dormance. Jedná se o míru dormance vyjádřenou v procentech, která byla naměřena po 28 dnech sledování semen při teplotním režimu 25 °C. Pomocí programu Excel byl vytvořen graf, ve kterém jsou jednotlivé alely porovnány podle tohoto kritéria (Obrázek č. 13).

Obrázek č. 13: Porovnání alel genu PsCam035877 dle celkového klíčení.



Naměřené parametry fenotypové charakterizace byly porovnány podle alelického zastoupení jednotlivých vzorků. Bylo zjištěno, že alela A se vyskytuje převážně u nedormantních vzorků s výjimkou jediného vzorku IG141436, který se řadí mezi genotypy s dormancí. Výjimkou je také vzorek IG52595, který jako jediný vzorek bez dormance semen, nese jinou alelu než A.

Tabulka č. 15: Porovnání naměřených parametrů dle alelického zastoupení u kandidátního genu PsCam035877.

Alela	Označení vzorku	Taxon	dle odezvy v teplotě 25°C	odezvy k zvýšení teploty (35-25°C)	Celkové klíčení ve 25°C/28d
Alela A	IG141436	<i>Pisum elatius</i>	D	R	0,00
	J1241	<i>Pisum elatius</i>	N	N	100,00
	ATC7121	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	VIR1246	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	ATC6973	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	VIR2311	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	J12546	<i>Pisum elatius</i>	N	N	100,00
	PI347422	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	J11071	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	PI357292	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	IG52520	<i>Pisum elatius</i>	N	N	100,00
	ATC1044	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	PI181799	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	J11030	<i>Pisum elatius</i>	N	N	100,00
	PI181958	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	J11974	<i>Pisum abyssinicum</i>	N	N	100,00
	J186	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	J11086	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	J11837	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	CGN3277	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	ATC7021	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	J11525	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	IPK468	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
ATC7086	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00	
VIR1541	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00	
ARI00260	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00	
J192	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00	
Alela B	IG52595	<i>Pisum sativum</i>	N	N	100,00
	PI343994	<i>Pisum elatius</i>	D	R	0,00
	IG140562	<i>Pisum elatius</i>	D	R	52,00
	Elmali	<i>Pisum elatius</i>	D	R	44,00
	PIS7475	<i>Pisum elatius</i>	D	D	16,00
	PI344537	<i>Pisum elatius</i>	D	R	16,00
	J1262	<i>Pisum elatius</i>	D	D	0,00
	IS18915	<i>Pisum elatius</i>	D	D	0,00
	J164	<i>Pisum elatius</i>	D	R	8,00
PI560039	<i>Pisum elatius</i>	D	R	8,00	
Alela C	IG119794	<i>Pisum elatius</i>	D	R	0,00
	IG64350	<i>Pisum elatius</i>	D	D	8,00
	J1261	<i>Pisum elatius</i>	D	D	8,00
	IS18908	<i>Pisum elatius</i>	D	D	8,00
	IG52517	<i>Pisum elatius</i>	D	R	4,00
	Hungary_Balaton	<i>Pisum elatius</i>	D	R	0,00
	PIS2850	<i>Pisum elatius</i>	D	D	0,00
Alela D	JW1794	<i>Pisum elatius</i>	D	D	4,00
	PI344001	<i>Pisum elatius</i>	D	D	8,00
Alela E	IG108291	<i>Pisum elatius</i>	D	R	12,00
Alela F	PI343975	<i>Pisum elatius</i>	D	R	48,00

5.2.3 Sekvenční analýza genu PsCam048411 kódujícího protein podobný fosfatáze

Vybraný úsek kandidátního genu PsCam048411, který kóduje protein podobný fosfatáze (protein phosphatase 2C-like protein), byl amplifikován pomocí dvojice primerů forward PsCam048411G-F19 a reverse PsCam048411G-R1054. Forward primer nasedá v pozici 20 až 44 bp od ATG. Reverse primer nasedá 1032 až 1056 bp od start kodonu (ATG). Celková délka amplifikovaného úseku byla 913 bp, tato oblast obsahovala také intron o velikosti 96 bp, který nebyl součástí referenční cDNA sekvence.

Při sekvenování došlo k přečtení amplifikovaného úseku z obou stran. V případě kandidátního genu PsCam048411 se podařilo získat sekvenci amplifikovaného úseku u 46 vzorků. Součástí této sekvence byla částečně také původní kandidátní sekvence 5'TGCAGGAGGGCGTGTGATCTACTGGGATGGACCAAGAGTGCTTGGTGTACTTGCCATGTCTAGAGCAAT 3', která nese polymorfni SNP detekovaný při DArTseq analýze. Tento SNP je na pozici 12 bp a jedná o záměnu thyminu (T) za guanin (G). Rozsah získaných sekvencí lze porovnat na následujícím Obrázku č. 14.

Obrázek č. 14: Pozice primerů a kandidátní sekvence genu PsCam048411 od ATG

(zelená – F primer; červená – R primer; přerušovaná červená – kandidátní sekvence).

```
ATGGCTGGAATGTGCTGTG GCTTTGTTGGAGAAGGTGACTCTTGGCGAATTCACGTCCTTCTAGA
GCCGGAATTTGGACATGCTACCTTTCAAATACATCGCTGACATGACTGTTGCACCATCCGGAACCTT
ACGAAACGCCGTCAAGCGGATCTCAGCGGTAAGAAAGATTTTGAAAGCTGTGAGGGCTCAAACGG
TGACCGTGGAAACGAGAAGAGTAAGAAGAACAAGAACGAATCCTCCAAGGTTTCTGAAAATAAAC
TTCAACAGAAGGTAATTTGGAAGATGGAGAGTTCCCGAAGTTTGGAGTACTTCGGTTTGTGGTAG
AAGAAGAGACATGGAAGATTCTGTTTCCGTTCAAACCTTTCTACGAAGAACTGTTTCACTTTTT
GGTGTTCGACGGTCACGGCTGCTCTCATGTGCGTAAATATGAGTACTTTTGTAGTTAATCACTT
TGGTGGATCTGTCAATCTTTTGGGTGTTAATTTGTTTGTGTTACTTCAGGTTGCGACTAT
TGTAAGGAGAGACTCCATGAGATTCTGAAGGAACAGATCAATGAATCGCAAGAGAATTTGAGTGC
AACAGCACTATGCAACAAGGCTTTGCTCGCATGGATGACGAAGTGCAGAGATGGAATAGCAGCAGC
AACTGTTACTTGTAGGTGCGAGCTTCAAACCTCCTCACTGCGACGCAGTTGGATCTACTGCCGTGGT
TGCTGTTGTCACTCCTGACAAAATCATTGTCTCTAACTGCGGCGATTCTCGCGCTGTTCTCTGCCGT
ACGGCGTCGCCATCCCACTCTCCTTCGATCACAAGGTCATTTTCAAATTTATTTATTTTTTGAATTT
TTTATCTCATTTCTCGAGAAATTAACAAGTTTCTAACTGCTTTTGGATCGGTTTTTACAGCCGGAT
GACCAGACGAGTTGATCAGAGTCGAAGCTTGCAGGAGGGCGGGTGTACTACTGGGATGGACCAAGAG
TGCTTGGTGTACTTGCCATGTCTAGAGCAATAGGTGAGTCATCAGTGCACATGATAACTTAA
TTAAATTAAGTGCATTTTAGCATAGATGGTTT
```

Získané sekvence byly editovány v programu Genious. Došlo ke složení oboustraných sekvenačních čtení a byl proveden tzv. „multiple alignment“. Seřazené sekvence byly dále upravovány a také porovnávány s referenční sekvencí. Součástí získaných sekvencí byla také velmi variabilní oblast o velikosti zhruba 40 bp, která obsahovala jednonukleotidové repetice. Porovnáním získaných sekvencí s referenční sekvencí byla provedena analýza celkové variability sekvencí, která odhalila celkem 33 záměn, mezi něž patří také původní polymorfni SNP nalezený při DArTseq analýze. Jedná se zaměnu na pozici 871 bp, kdy je guanin (G) změněn na cytosin (C) nebo thymin (T). Podrobný přehled všech záměn je v Tabulce č. 16.

Celkem 18 nejčtenějších polymorfismů bylo převedeno do souboru Excel a ke vzorkům byly přiřazeny kategorie dormance z fenotypové charakterizace. Vzorky byly porovnány podle kategorií dormance. Výsledně však nebyla zjištěna žádná významná asociace mezi jednotlivými alelami a kategoriemi dormance. Sekvence byly taktéž translatovány do aminokyselinové sekvence, avšak ani na této úrovni nebyla zjištěna významná variabilita, která by souvisela s dormancí semen.

Tabulka č. 16: Analýza polymorfismů u genu PsCam048411 porovnáním s referenční sekvencí s četností více než 10 %.

Číslo polymorfismu	Typ nukleotidů	Pozice od ATG (bp)	Délka (bp)	Záměna	Typ polymorfismu	Četnost výskytu v souboru 46 vzorků	Synonymní/nesynonymní záměna
1	A	191	1	G -> A	SNP (transition)	54.3%	nesynonymní
2	T	243	1	C -> T	SNP (transition)	13.0%	synonymní
3	G	441	1	T -> G	SNP (transversion)	23.9%	synonymní
4	T	461	1	C -> T	SNP (transition)	13.0%	synonymní
5	-	696	1	(A)3 -> (A)2	Deletion (tandem repeat)	45.7%	-
6	-	756	1	(A)4 -> (A)3	Deletion (tandem repeat)	43.5%	-
7	-	769	1	-A	Deletion	45.7%	-
8	T	797	1	C -> T	SNP (transition)	45.7%	synonymní
9	T	827	1	C -> T	SNP (transition)	13.0%	synonymní
10	T	848	1	A -> T	SNP (transversion)	17.4%	nesynonymní
11	-	848	1	(A)3 -> (A)2	Deletion (tandem repeat)	17.4%	-
12	A	849	1	T -> A	SNP (transversion)	21.7%	nesynonymní
13	-	849	1	(T)3 -> (T)2	Deletion (tandem repeat)	10.9%	-
14	AA	850	2	TT -> AA	Substitution	21.7%	nesynonymní
15	T	852	1	A -> T	SNP (transversion)	23.9%	nesynonymní
16	ATTTAT	853	0	+ATTTAT	Insertion	13.0%	-
17	AA	853	2	TT -> AA	Substitution	21.7% -> 23.9%	nesynonymní
18	A	855	1	T -> A	SNP (transversion)	17.4%	nesynonymní
19	-	861	1	(T)6 -> (T)5	Deletion (tandem repeat)	15.2%	-
20	-	862	1	(T)6 -> (T)5	Deletion (tandem repeat)	21.7%	-
21	T	863	1	G -> T	SNP (transversion)	10.9%	nesynonymní
22	A	867	1	T -> A	SNP (transversion)	10.9%	nesynonymní
23	A	883	1	C -> A	SNP (transversion)	21.7%	nesynonymní
24	C	884	1	G -> C	SNP (transversion)	10.9%	nesynonymní
25	-	889	1	(A)3 -> (A)2	Deletion (tandem repeat)	17.4%	-
26	C	940	1	A -> C	SNP (transversion)	31.1%	nesynonymní
27	A	946	1	G -> A	SNP (transition)	15.6%	nesynonymní
28	A	962	1	G -> A	SNP (transition)	15.9%	nesynonymní
29	C	976	1	G -> C	SNP (transversion)	11.4%	nesynonymní
30	T	976	1	G -> T	SNP (transversion)	29.5%	nesynonymní
31	-	993	1	-G	Deletion	31.8%	-
32	GA	998	2	AG -> GA	Substitution	27.3%	nesynonymní
33	-	1,008	1	-G	Deletion	29.5%	-

5.2.4 Sekvenční analýza genu PsCam026975 pro O-glykosyl hydrolázu

U genu PsCam026975, kódujícího O-glykosyl hydrolázu (O-glycosyl hydrolase family 17 protein) došlo k amplifikaci žádoucího úseku genu pomocí primerů forward primer PsCam026975-F310 a reverse primer PsCam026975-R2970. Forward primer nasedá v pozici 62 až 91 od start kodonu (ATG). Reverse primer nasedá v oblasti 1366 až 1394 od ATG. Celková délka získaných sekvencí činila 1 250 bp.

Úspěšnost amplifikace PCR produktů byla hodnocena pomocí agarózové gelové elektroforézy. Při sekvenování došlo k přečtení amplifikovaného úseku z obou stran. Podařilo se získat celkem 46 sekvencí vybraného úseku kandidátního genu PsCam026975.

V rámci amplifikovaného úseku se podařilo získat také původní kandidátní sekvenci 5'TGCAGGAGTATTTAGGCCTGATATCAACGGCCTCATGACTCAGATGGTACAATT TCTCAATAAGAATGC 3', která nese polymorfni SNP detekovaný při DArTseq analýze. Tento SNP je na pozici 30 bp a jedná o záměnu cytosinu (C) za thymin (T). Rozsah získaných sekvencí lze porovnat na následujícím Obrázku č. 15.

Obrázek č. 15: Pozice primerů a kandidátní sekvence genu PsCam026975 od ATG

(zelená – F primer; červená – R primer; přerušovaná červená – kandidátní sekvence).

```
ATGAAAAAGCTTCGATTTTGGAGAATGGTGTAAATGTTAGGGTTGTTGGGTTTGTATGCCGAAGGGCTTG
GTGTGAACTGGGGAACACAAGCAACTCACAAAGTTGCCTCCAGAAAACGGTTGTTTCAGATGTTGAAGGATAAT
GGGATTCAAAAAGTTAAGCTTTTTGACGCAGATGATACTACAATGAGTGCCTTTGGCTGGGAGTGGAAATG
AAGTGATGGTTGCAATCCCTAATAATCAGCTTGTGATATGAATGATTATAAACGTGCTCAGCAATGGGTT
AGGAAGAATGTCACCTCGTTATAACTTCGATGGTGGCGTTAAGATCAAATATGTAGCAGTTGGGAATGAGC
CATTTTTGAATCCTACAACAATTCGTTCTTGAACATCACACTACCTGCAGTGCAGAACATTCAAAAATGCC
ATAAATGAAGCCGGTCTTGGAGACGCTGTTAAGCTACTGTGCCTTTAAATGCCGACGTGTATGAGTCTCC
GGTGGACAATCCTCTCCATCTGCAGGAGTATTTAGGCCTGATATCAACGGCCTCATGACTCAGATGGTAC
AATTTCTCAATAAGAATGCTGCACCAATTTACTGTCAACATTTACCCCTTCTTAAGTCTTTATGAAAACGAC
GATTTCCCTTCAACTACGCCTTCTTTGACGGGGTAGACAAACCGATAAACGATAACGGAATCCAATATAC
CAACGTCTTCGACGCAAATTTTCGATACATTGGTTTCTGCTCTCAAATCAGTCGGTTTTGGCGACACCCCAA
TTTTGGTAGGAGAAGTAGGATGGCCTACAGAAGGCGACAAGAGTGCCACCACCGGAAATGCAATAAGATT
CTACAACGGCCTCCTTTCAAGGCTCGCTGCGAACAAGGAACCCCTCGTCGCTCCTGGATTCATTGAAGTTT
ATCTCTTCGGATTCATCGACGAAGACGCAAAGAGCATCGTCCTGGTAACTTCGAGAGACTGGGGAATC
TTCCGATACGACGGACAGCCAAAGTTTACAATGGTTACAATGGATCTCTCAGGTCAAGGTCAAAAACAAGCT
TCTAATCGGTGCACAAAACGTGAAGTATCTTGATCAATCATGGTGGTGTAAATCCTGACGCTAAAGATC
TCAGCAAATTAACGACAATATCAATTACGCTTGACCTATGGAGATTGCACTGCAGTCCGATATGGATCT
TCTTGCAACAACCTTGATGCAATGAAAATGCTTCTTATGCATTCAACATGTACTACCAGGTACAGAATCA
GGATCATCAAGCTTGCAATTTCAAGGATTAGCTAAGATTACTACAGAGAATATTCATCACCTACTTGCA
ATTTCCCTCATTAGATTGTTCTTCTTTCAGCGTCTTCTTCTATGCCCTCATTTGCAGTTTTGTTGTTTCATTG
CTGCTTGTCTATGATTCTCTTGGCTTAGTATTTTATTATACATACATTAGAGAGATGGTTTCTTCAATTT
CATGGAGAAGTTTAGCTTATTTATGGTTTCAACATTTATTTGACCGGGTGATATTTAGTTTATTGACTTG
TTAATAAACAAAATTTCTTAGTTTGAGAGTTGTTTATTTTCATAGTAAAATTAGGCCTTGTAGCTATG
TATGTATGTATGA
```


Všech 46 získaných sekvencí přečtených z obou stran bylo nahráno do programu Genious, kde byly editovány. Došlo ke složení sekvenačních částí a byl proveden tzv. „multiple alignment“. Seřazené sekvence byly dále upravovány a také porovnávány s referenční sekvencí. Porovnáním získaných sekvencí s referenční sekvencí byla provedena analýza celkové variability sekvencí. Bylo objeveno celkem 11 záměn v sekvencích, mezi něž patří také polymorfni SNP detekovaný při DArTseq analýze. Tato záměna se nachází na pozici 546 bp od ATG, kdy je cytosin (C) změněn na thymin (T). Podrobný přehled všech záměn je v Tabulce č. 17.

Celkem 10 nejčtenějších polymorfismů bylo převedeno do souboru Excel a ke vzorkům byly přidány kategorie dormance z fenotypové charakterizace. Vzorky byly porovnány podle kategorií dormance, avšak nebyla zjištěna žádná významná asociace mezi jednotlivými alelami a kategoriemi dormance. Sekvence byly taktéž translatovány do proteinu, avšak ani na aminokyselinové úrovni nebyla nalezena žádná významná variabilita.

Tabulka č. 17: Analýza polymorfismů u genu PsCam026975 porovnáním s referenční sekvencí s četností více než 10 %.

Číslo polymorfismu	Typ nukleotidů	Pozice od ATG (bp)	Délka (bp)	Záměna	Typ polymorfismu	Četnost výskytu v souboru 46 vzorků	Synonymní/nesynonymní záměna
1	A	273	1	G -> A	SNP (transition)	37.0%	synonymní
2	G	393	1	A -> G	SNP (transition)	37.0%	synonymní
3	C	546	1	C -> T	SNP (transition)	85.0%	synonymní
4	T	686	1	A -> T	SNP (transversion)	19.6%	nesynonymní
5	A	757	1	G -> A	SNP (transition)	19.6%	nesynonymní
6	C	897	1	T -> C	SNP (transition)	54.3%	synonymní
7	C	903	1	T -> C	SNP (transition)	52.2%	synonymní
8	T	939	1	C -> T	SNP (transition)	43.5%	synonymní
9	C	1 125	1	T -> C	SNP (transition)	13.0%	synonymní
10	T	1 185	1	T -> C	SNP (transition)	63.0%	synonymní
11	T	1 302	1	A -> T	SNP (transversion)	60.9%	synonymní

5.2.5 Sekvenční analýza genu PsCam036641 kódující polyfenol oxidasu (PPO)

Kandidátní gen PsCam036641, který kóduje polyfenol oxidasu (PPO), byl vybrán na základě diferenciální exprese u genotypů JI92 a JI64 (Hradilová *et al.*, 2017). Byl zkoumán ve spolupráci s Ing. Oldřichem Trněným. Byla provedena amplifikace žádoucího úseku genu pomocí primerů forward primer PPO-F847 a reverse primer PPO-R1858. Forward primer nasedá v oblasti 807 bp až 831 bp od start kodonu (ATG). Reverse primer nasedá v pozici 1 855 až 1 878 od ATG. Celková délka získaných sekvencí činila 889 bp. Při sekvenování došlo k přečtení amplifikovaného úseku pouze z jedné strany, na což byl použit forward primer PPO-F847. Takto se podařilo získat celkem 80 sekvencí vybraného úseku kandidátního genu PsCam 036641, který kóduje polyfenol oxidasu (PPO). Jednalo se však pouze o jednu část genu. Sekvence druhé části genu byly získány od Ing. Oldřicha Trněného. Všechny získané sekvence, byly nahrány do programu Genious, kde byly editovány. Došlo ke složení obou částí genu a byl proveden tzv. „multiple alignment“. Seřazené sekvence byly dále upravovány a také porovnávány s referenční sekvencí. Celkem bylo takto získáno 37 sekvencí genu PPO pro tuto diplomovou práci, jejich následným porovnáním s referenční sekvencí byla provedena analýza celkové variability sekvencí v programu Genious.

Bylo zjištěno celkem 27 různých záměn s četností větší než 10 %. Součástí těchto záměn byl objeven také důležitý indel na pozici 234 od start kodonu ATG vedoucí následně k předčasnému stop kodonu, který vykazuje významnou asociaci s dormancí semen a druhem hrachu. Všechny získané polymorfismy objevené pomocí programu Genious jsou uvedeny v následující Tabulce č. 18.

Tabulka č. 18: Analýza polymorfismů genu PsCam036641, kódujícího polyfenol oxidasu (PPO), porovnáním s referenční sekvencí s četností více než 10 %.

Číslo polymorfismu	Typ nukleotidů	Pozice od ATG (bp)	Délka (bp)	Typ polymorfismu	Četnost výskytu jednotlivých variant v souboru 37 vzorků	Synonymní/nesynonymní záměna
1	T/-	234	1	Indel	57.9%/42.1%	T/-
2	T/C	372	1	SNP	84.2%/15.8%	T/C
3	T/C	627	1	SNP	84.2%/13.2%	T/C
4	G/C	628	1	SNP	84.2%/13.2%	G/C
5	C/T	630	1	SNP	84.2%/13.2%	C/T
6	T/C	633	1	SNP	68.4%/28.9%	T/C
7	T/C	637	1	SNP	84.2%/13.2%	T/C
8	A/G	651	1	SNP	84.2%/13.2%	A/G
9	A/T	654	1	SNP	55.3%/42.1%	A/T
10	C/T	682	1	SNP	52.6%/44.7%	C/T
11	G/A	703	1	SNP	81.6%/15.8%	G/A
12	C/T	705	1	SNP	52.6%/44.7%	C/T
13	G/A	729	1	SNP	84.2%/13.2%	G/A
14	C/T	738	1	SNP	81.6%/15.8%	C/T
15	C/T	741	1	SNP	84.2%/13.2%	C/T
16	G/A	793	1	SNP	84.2%/13.2%	G/A
17	C/G	840	1	SNP	84.2%/13.2%	C/G
18	G/T	1 290	1	SNP	78.9%/21.1%	G/T
19	G/A	1 323	1	SNP	68.4%/31.6%	G/A
20	T/A	1 344	1	SNP	52.6%/47.4%	T/A
21	G/T	1 530	1	SNP	81.1%/18.9%	G/T
22	G/A	1 581	1	SNP	73.0%/27.0%	G/A
23	T/C	1 683	1	SNP	78.4%/21.6%	T/C
24	T/G	1 692	1	SNP	75.7%/24.3%	T/G
25	T/C	1 699	1	SNP	86.1%/13.9%	T/C
26	A/G	1 762	1	SNP	72.2%/27.8%	A/G
27	A/T	1 836	1	SNP	75.0%/25.0%	A/T

Celkem 16 nejčetnějších polymorfismů bylo převedeno do souboru Excel a ke vzorkům byly přidány kategorie dormance z fenotypové charakterizace a také druhy hrachu. Byla hledána asociace mezi jednotlivými SNP a dormancí. Sekvence byly taktéž v programu Genious přetranslatovány do proteinů a byla tak zkoumána asociace s dormancí trojněž na úrovni aminokyselinové.

5.2.6 Asociační mapování u genu PsCam036641 kódujícího polyfenol oxidasu (PPO)

Vzorky byly porovnány podle hodnoty celkového klíčení v 25 °C. Byla nalezena velmi výrazná asociace mezi alelami a dormancí a taktéž se ukázala asociace mezi alelami a druhem hrachu. Jako významný se ukázal být především indel na pozici 234 od start kodonu ATG, který výrazně asociuje s kulturními hrachy bez dormance semen druhu *Pisum sativum*. Vzorky byly rozděleny do tří skupin dle druhu hrachu. Asociace jednotlivých alel s dormancí, a především významnost indelu na pozici 234 od start kodonu ATG je vidět na následující Tabulce č. 19.

Tabulka č. 19: Asociace alel s dormancí a druhem hrachu u kandidátního genu PsCam036641 kódujícího polyfenol oxidasu (PPO).

Označení vzorku	Druh	Celkové klíčení [%]	Pozice od ATG															
			indel 234	627	628	630	633	637	651	654	682	703	705	729	738	741	793	840
PI344537	<i>P. elatius</i>	16,00		C	C	T	T	C	G	T	T	A	T	G	C	C	G	C
J1261	<i>P. elatius</i>	0,00		C	C	T	T	C	G	T	T	A	T	G	C	C	A	G
J1262	<i>P. elatius</i>	0,00		C	C	T	T	C	G	T	T	G	T	G	C	C	A	G
JW1794	<i>P. elatius</i>	4,00		C	C	T	T	C	G	T	T	G	T	G	T	C	A	G
PI343975	<i>P. elatius</i>	48,00		C	C	T	T	C	G	T	T	G	T	G	C	C	A	G
PIS2850	<i>P. elatius</i>	0,00		T	G	C	C	T	A	T	T	G	T	G	C	C	A	G
IS18915	<i>P. elatius</i>	0,00		T	G	C	C	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C
IS18908	<i>P. elatius</i>	0,00		T	G	C	C	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C
IG119794	<i>P. elatius</i>	0,00		T	G	C	C	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C
IG64350	<i>P. elatius</i>	8,00		T	G	C	C	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C
IG52517	<i>P. elatius</i>	0,00		T	G	C	C	T	A	T	T	G	T	A	T	T	G	C
J164	<i>P. elatius</i>	8,00		T	G	C	C	T	A	T	C	G	C	G	C	C	G	C
IG108291	<i>P. elatius</i>	12,00		T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
PI57475	<i>P. elatius</i>	16,00		T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
PI343994	<i>P. elatius</i>	0,00		T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
J12546	<i>P. elatius</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
J1241	<i>P. elatius</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
IG52520	<i>P. sativum</i>	100,00		T	G	C	T	T	A	A	T	G	T	G	C	C	G	C
IG52595	<i>P. sativum</i>	100,00		T	G	C	T	T	A	A	T	G	T	G	C	C	G	C
ATC7086	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
PI181958	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
J11086	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
ATC1044	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
CGN3277	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
ARI00260	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
PI181799	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
VIR1541	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
VIR1246	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
J11030	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
IPK468	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
J11071	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
J11837	<i>P. sativum</i>	100,00	indel	T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
J192	<i>P. sativum</i>	100,00		T	G	C	T	T	A	A	C	G	C	G	C	C	G	C
J11525	<i>P. sativum</i>	100,00		T	G	C	C	T	A	T	T	A	T	G	C	C	G	C
J11974	<i>P. abyssinicum</i>	100,00		T	G	C	C	T	A	T	T	A	T	G	C	C	G	C
PI357292	<i>P. abyssinicum</i>	100,00		T	G	C	C	T	A	T	T	A	T	G	C	C	G	C
J11974	<i>P. abyssinicum</i>	100,00		T	G	C	C	T	A	T	T	A	T	G	C	C	G	C

Následně byla zjišťována asociace s dormancí na aminokyselinové úrovni, kdy byly vzorky seřazeny dle kategorie dormance v 25 °C a také podle přítomnosti indelu na pozici 234 od ATG, který jak bylo zjištěno vede k posunutí čtecího rámce a tvorbě stop kodonu. Tento stop kodon se vyskytuje pouze u vzorků druhu *Pisum sativum*, které postrádají dormanci semen (viz Tabulka č. 20). Bylo zjištěno, že genotypy J192 a J164, na základě jejichž diferenciální exprese byl gen vybrán jsou sekvenčně shodné. Jejich vzájemné porovnání je patrné na Tabulce č. 21.

Tabulka č. 20: Asociace aminokyselinových sekvencí s dormancí a druhem hrachu u kandidátního genu PsCam036641 kódujícího polyfenol oxidasu (PPO).

Označení vzorku	Druh	Kategorie dle klíčení v 25 °C	Pozice v proteinu					
			36	178	206	260	463	544
ARI00260	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
ATC1044	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
ATC7086	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
CGN3277	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
IPK468	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
J1241	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
J11030	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
J11071	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
J11086	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
J12546	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
PI181799	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
PI181958	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
VIR1246	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
VIR1541	<i>P.sativum</i>	N	1 bp delece vedoucí ke stop kodonu					
J11525	<i>P.sativum</i>	N	FA	V	T	D	E	E
J11974*	<i>P.abbyssinicum</i>	N	FA	V	T	D	E	E
J11974*	<i>P.abbyssinicum</i>	N	FA	V	T	D	E	K
PI357292	<i>P.sativum</i>	N	FA	V	T	D	E	K
IG52520	<i>P.sativum</i>	N	FA	V	A	D	E	K
J192	<i>P.sativum</i>	N	FA	V	A	D	E	K
PI344537	<i>P.elatius</i>	D	FA	L	T	D	E	E
J1261	<i>P.elatius</i>	D	FA	L	T	E	E	E
PI343975	<i>P.elatius</i>	D	FA	L	A	E	E	K
J1262	<i>P.elatius</i>	D	FA	L	A	E	D	E
JW1794	<i>P.elatius</i>	D	FA	L	A	E	D	K
PIS2850	<i>P.elatius</i>	D	FA	V	A	E	E	K
IG108291	<i>P.elatius</i>	D	FA	V	A	D	E	K
J164	<i>P.elatius</i>	D	FA	V	A	D	E	K
PI343994	<i>P.elatius</i>	D	FA	V	A	D	E	K
PIS7475	<i>P.elatius</i>	D	FA	V	A	D	E	K
IS18915	<i>P.elatius</i>	D	FA	V	A	D	D	K
IG52517	<i>P.elatius</i>	D	FA	V	A	D	D	K
IG119794	<i>P.elatius</i>	D	FA	V	A	D	D	K
IS18908	<i>P.elatius</i>	D	FA	V	A	D	D	E
IG64350	<i>P.elatius</i>	D	FA	V	A	D	D	E

* Stejné označení dvou vzorků J11974, existuje zde genetická heterogenita položky. Nejedná se o uniformní genotyp.

Tabulka č. 21: Aminokyselinová sekvenční shoda genotypů J192 a J164 u kandidátního genu PsCam036641 kódujícího polyfenol oxidasu (PPO).

Označení vzorku	Druh	Kategorie dle klíčení v 25 °C	Pozice v proteinu					
			36	178	206	260	463	544
J192	<i>P.sativum</i>	N	FA	V	A	D	E	K
J164	<i>P.elatius</i>	D	FA	V	A	D	E	K

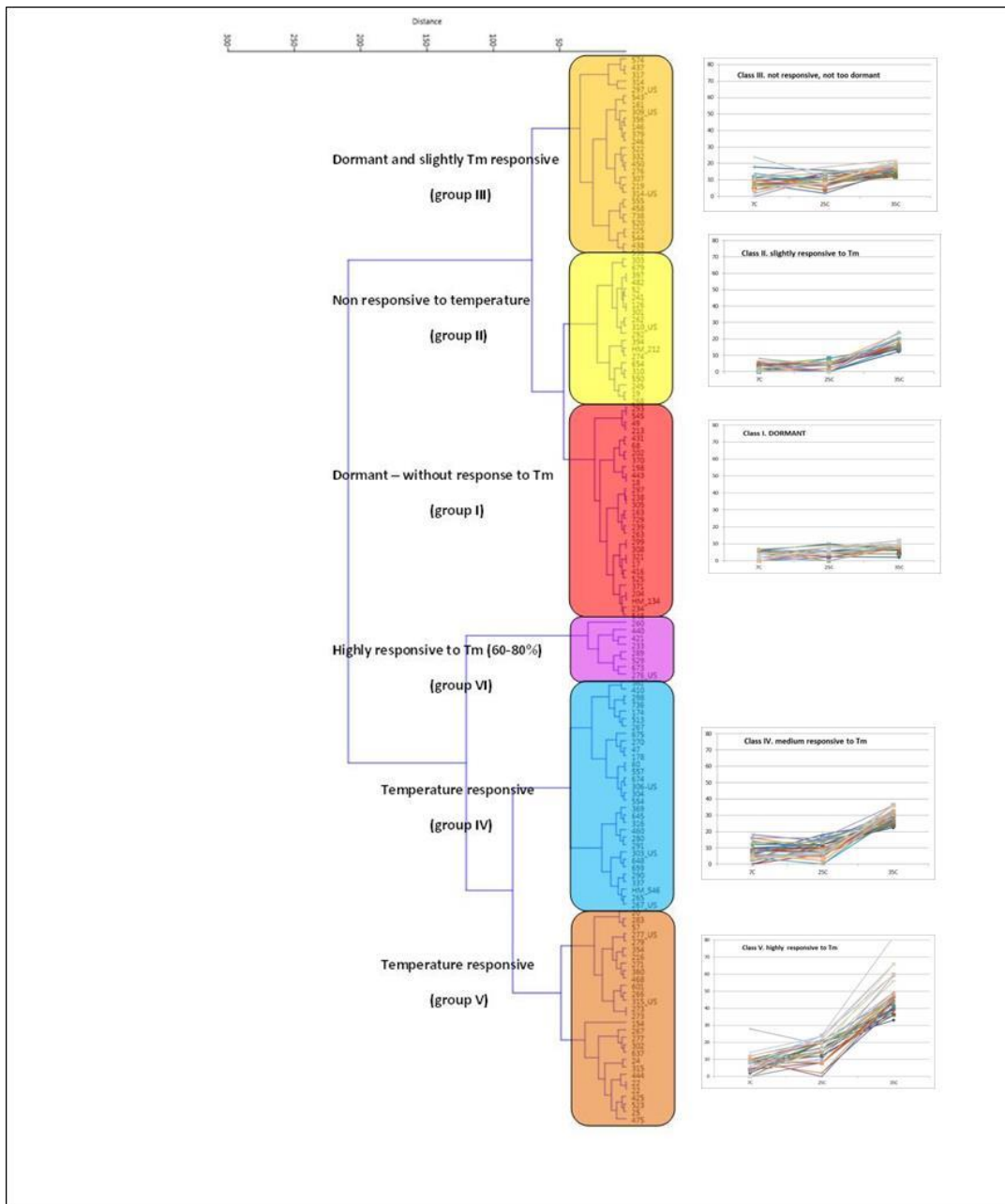
5.3 Fenotypová charakterizace u tolíce (*Medicago truncatula*)

U tolíce (*Medicago truncatula*) byla provedena fenotypová analýza a následná sekvenční analýza u celkem 146 vzorků. Pokud se týká testování dormance/klíčivosti semen, celkové klíčení pro všechny tři teplotní režimy bylo procenticky vyjádřeno (viz Tabulka č. 22) a vzorky byly dle klíčení klastrovány do pěti, resp. šesti skupin dle dormance: skupina I - dormantní (bez odezvy); skupina II a III - středně responzivní na měnící se teploty; skupina IV a V – velmi responzivní a skupina VI – vysoce responzivní. S tímto rozdělením do skupin se dále pracovalo při asociačním mapování. Klastrová analýza, vytvořená pomocí Eukleidových vzdáleností, byla provedena ve spolupráci s RNDr. Martinem Duchoslavem, Ph. D., katedra botaniky, Přf UP v programu PAST 3.21 (Obrázek č. 16).

Tabulka č. 22: Příklad (20 z 146 vzorků) vyhodnocení celkového klíčení u tolíce (*Medicago truncatula*), vyjádřeno v procentech pro jednotlivé teplotní režimy.

Označení vzorku	Celkové klíčení dle odezvy v 7 °C [%]	Celkové klíčení dle odezvy v 25 °C [%]	Celkové klíčení dle odezvy v 35 °C [%]
HM001	4,00	18,00	14,00
HM002	26,67	24,00	49,33
HM003	16,00	28,00	36,00
HM004	31,67	28,33	47,67
HM006	12,00	28,00	38,00
HM009	14,00	20,50	24,00
HM010	45,33	48,00	70,67
HM011	37,15	32,00	32,00
HM012	16,00	6,00	16,00
HM013	100,00	2,00	34,00
HM016	42,00	38,00	42,00
HM017	32,00	34,00	32,00
HM018	16,00	30,00	90,00
HM019	32,00	24,00	58,00
HM021	8,00	8,00	60,00
HM022	16,00	32,00	52,00
HM023	0,00	12,00	88,00
HM024	12,00	34,00	71,58
HM025	26,00	46,00	68,00

Obrázek č. 16: Klastrová analýza vzorků tolíce (*Medicago truncatula*) dle celkového klíčení a grafy kumulativních procent v jednotlivých teplotních režimech.



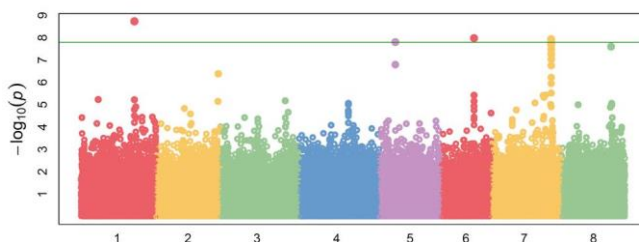
5.4 Asociační mapování u tolíce (*Medicago truncatula*)

Genomická data pro asociační mapování byla získána z projektu *M. truncatula* HapMap Project (MHP; <http://www.medicagohapmap.org>). V tomto projektu se nachází 262 položek tolíce (*M. truncatula*) z přirozeně se vyskytujícího prostředí tohoto druhu. Všechny položky byly osekvenovány pomocí sekvenační technologie Illumina a přiřazeny k referenčnímu genomu *M. truncatula* (Mt 3.5 release) (Young *et al.*, 2011) pro identifikaci jedonukleotidových záměn (SNP) v rámci vzorků.

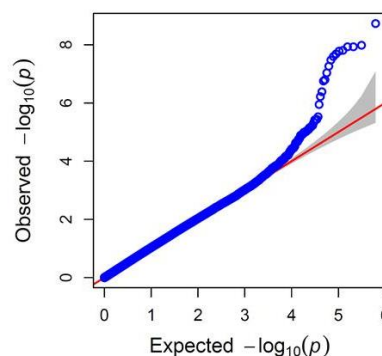
Pro další analýzu byla získaná SNP data filtrována a výsledkem byly pouze bialelické SNP se sekvenčním pokrytím alespoň 100 položek, u kterých byla nejméně čttná alela přítomná alespoň u 10 % zkoumaných vzorků (tzn. výskyt nejméně čttné alely je alespoň 0,10). Taktéž byla analyzována populační genetická struktura daného souboru vzorků. Pro tento účel byla využita spolupráce s ICRISAT, Hyderabad, Indie - bioinformatický tým Dr. A. Rathore.

Pro asociační mapování byl použit software GAPIT v2 SUPER a MLM s admixčním modelem Q matrice. Byla mapována souvislost s dormancí semen. Tímto přístupem bylo identifikováno 100 signifikantních loci ($-\log P$) asociovaných s dormancí semen. GWAS analýza tak odhalila několik genomických regionů, které mají souvislost s dormancí semen a byly navrženy k podrobnému zkoumání. K zobrazení kandidátních SNP byl použit graf tzv. Manhattan plots, který byl generován za použití SNP s P hodnotami menšími než 0,01. Bylo zjištěno, že identifikované SNP se nacházejí napříč všemi chromozómy tolíce (*Medicago truncatula*).

Obrázek č. 17: Zobrazení kandidátních SNP asociovaných s dormancí semen na genomu tolíce (*Medicago truncatula*), tzv. Manhattan plots.



Obrázek č. 18: Závislost pozorovaných P hodnot na očekávaných P hodnotách.



Pro jednotlivé kandidátní SNP byla zjišťována příslušnost k daným *Medicago* genům a exprese v jednotlivých částech rostlin, a to za použití veřejně dostupného atlasu genového exprese u *Medicago truncatula* (<http://bar.utoronto.ca/efpmedicago/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

V rámci této diplomové práce byla následně provedena asociační analýza pro geny kódující CBF/DREB1 transkripční faktor. Tyto geny byly prezentovány velmi významným píkem (s P hodnotami pohybujícími se od $1.72E^{-05}$ do $1.04E^{-08}$), který se nacházel u chromozomu šest s pěti kandidátními SNPs, identifikovanými v rámci genu MTR_6g465430 a přilehlého homologního genu MTR_6g465420, které společně kódují CBF/DREB1 transkripční faktor.

Sekvence genů kódujících CBF/DREB1 transkripční faktor byly získány z veřejně dostupné databáze, upraveny a celkem 136 položek bylo porovnáváno s fenotypovými daty v programu Excel. Z fenotypových dat byla použita skupina dormance dle klastrování a procentické vyjádření celkového klíčení dle odezvy v 25 °C a v 35 °C. Ani u jednoho z těchto genů však nebyla prokázána sekvenční variabilita asociovaná s dormancí semen.

6 DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo provést sekvenční analýzu kandidátních genů, které byly identifikovány pomocí GWAS analýzy na souboru vybraných geograficky a bioklimaticky strukturovaných vzorků *Pisum sp.* a *Medicago truncatula*. Následně pak provést asociační analýzu získaných genetických dat s fenotypovým projevem, konkrétně dormancí semen. Dormance semen byla testována a vyhodnocena jako procentické vyjádření celkového klíčení semen v určených teplotních režimech a dle tohoto kritéria byly vzorky řazeny do kategorií dormance. V rámci této diplomové práce nebyl brán příliš zřetel na průběh klíčení, pracovalo se především s výsledným procentickým vyjádřením klíčení, podle kterého byly vzorky řazeny do jednotlivých kategorií. Na základě GWAS analýzy byly v případě hrachu (*Pisum sp.*) k podrobnému genetickému studiu vybrány tyto kandidátní geny: PsCam035877, PsCam048411, PsCam026975.

Kandidátní gen PsCam048411 byl identifikován jako gen pro enzym proteinová fosfatáza 2C rodiny (PP2C), jehož homologní sekvence byla nalezena také u *Medicago truncatula*. Jedná se o serin/threoninovou fosfatázu, která je přítomná jak u rostlin, tak i živočichů, jelikož proteinová fosforylace je důležitým mechanismem, kterým organismy regulují buněčné procesy (Rodriguez *et al.*, 1998b). Biochemické a molekulárně-genetické studie u *Arabidopsis* ukázaly, že tento enzym PP2C hraje klíčovou roli v přenosu signálů. Především byla dokázána souvislost s ABA signalizací, která je velmi důležitá při dormanci semen (Bertauche *et al.*, 1996; Gaits *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 1998a). Kandidátní gen PsCam026975 byl na základě homologie identifikován jako glykosid hydroláza, z rodiny 17. Byla nalezena homologní sekvence u *Medicago truncatula*, která představuje protein O-glykosyl hydrolázu (O-glycosyl hydrolase family 17 protein). Jedná se o enzym, který hydrolyzuje glykosidovou vazbu mezi sacharidy nebo mezi sacharidy a jinými skupinami nesacharidové povahy (Davies *et Henrissat*, 1995). Rostlinné glykosid hydrolázy jsou enzymy podílející se na metabolismu různých sacharidů přítomných v rostlinných tkáních. Existuje celkem 29 proteinových rodin s rozdílnou funkcí v organismu (Minic, 2008). Ani u jednoho z těchto dvou genů však asociační analýza, spojující sekvenční data s fenotypovými daty (kategoriemi dormance), neprokázala souvislost s mírou dormance testovaných semen hrachu, a to na nukleotidové ani na aminokyselinové úrovni.

Asociace mezi získanými genetickými daty a fenotypovými projevem (dormancí semen) byla zjištěna u kandidátního genu PsCam035877 kódujícího bZIP transkripční faktor. Homologní sekvence tohoto genu byly nalezeny u tolice (*Medicago truncatula*), cizrny (*Cicer arietinum*) i huseníčku (*Arabidopsis thaliana*). Jedná se o bZIP transkripční faktor, který se váže na nukleové kyseliny. U *Medicago* byl tento gen na základě sekvenční homologie identifikován jako nitrační regulační gen 2 (nitrate regulatory gene 2 protein). Jeho přesná funkce je však zatím neznámá.

Na základě diferenciální exprese dvou genotypů hrachu JI92 a JI64 (Hradilová *et al.*, 2017) byl do studie zahrnut také kandidátní gen PsCam036641 kódující polyfenol oxidasu (PPO). Tento gen byl zkoumán ve spolupráci s Ing. Oldřichem Trněným (Zemědělský výzkum s.r.o., Troubsko) a byla u něj objevena významná asociace s dormancí semen.

Polyfenol oxidasa se zdá být velmi důležitým enzymem v semenech rostlin. Byla dokázána její funkce jako součást biochemického obranného mechanismu, který chrání zásoby uložené v semenech od býložravců a organismů způsobujících tlení rostlinných částí (Fuerst *et al.*, 2014). Polyfenol oxidasa využívá molekulární kyslík a katalyzuje proces hydroxylace a dehydrogenace fenolických sloučenin za vzniku reaktivních o-chinonů. Tyto o-chinony alkylují nukleofilní skupiny, které následně polymerizují, výsledkem čehož vzniká tmavě zbarvený polymerní pigment – melanin (Haruta *et al.*, 2001). Způsoby, jakými může enzym PPO přispívat k obraně semen jsou čtyři. Samotné produkty o-chinony jsou toxické a vykazují antimikrobiální aktivitu. Dále může PPO snižovat biologickou dostupnost některých proteinů a živin, podílet se na tvorbě fyzické bariéry semen podobné stěně tvořené z ligninu, a také se podílí na tvorbě reaktivního kyslíku (Constabel *et Barbehenn*, 2008). Nicméně, teoreticky také PPO lokálně snižuje množství kyslíku skrze redukci kyslíku za vzniku vody při tvorbě o-chinonů a zdá se, že se tedy chová jako antioxidant (Yoruk *et Marshall*, 2007). Některé studie navíc dokládají, že enzym PPO, který je u rostlin nejčastěji uložen v chloroplastech, se účastní odpovědi na abiotické podmínky přírodního prostředí. Může tak být zapojen při odezvě rostlin na stres způsobený abiotickými podmínkami jako je například teplotní stres (Mayer *et Harel*, 1979; Vaughn *et Duke*, 1984; Rivero *et al.*, 2001).

Objevení asociace s dormancí semen je u genu PPO velmi nadějně, byl objeven důležitý indel na pozici 234 od start kodonu ATG, který vykazuje významnou asociaci s dormancí semen a druhem hrachu. Indel na pozici 234 se zdá být významným na aminokyselinové úrovni, vede totiž k posunutí čtecího rámce a tvorbě stop kodonu, a tedy k zastavení tvorby proteinu. Tento stop kodon se vyskytuje pouze u vzorků druhu *Pisum sativum*, které postrádají dormanci semen. Bylo zjištěno, že genotypy JI92 a JI64, na základě jejichž diferenciální exprese byl gen vybrán (Hradilová *et al.*, 2017) jsou však, co se aminokyselinového složení týče, sekvenčně shodné a genotyp JI92, který přestože je řazen mezi nedormantní hrachy, tento indel vůbec neobsahuje. Exprese genu PPO se však u těchto genotypů liší, zdá se tedy, že v případě tohoto genu hrají na genetické úrovni roli také promotorové oblasti genu, či jiné regulační oblasti. Bez indelové oblasti byly také vzorky hrachu druhu *Pisum abyssinicum*, přestože tyto vzorky (JI1974 a PI357292) rovněž nevykazují stav dormance semen a jedná se o nezávisle domestikovaný druh. Zdá se ale, že odlišnost druhu *P. abyssinicum* je dána rozdílným původem tohoto kulturního hrachu, kdy došlo k odvození z jiného genetického poolu, než tomu je u druhu *Pisum sativum* (Trněný *et al.*, 2017).

U hrachu byly zjištěny zajímavé poznatky také na fenotypové úrovni. Jako významný se jeví fakt, že u semen hrachu, které vykazují především fyzický typ dormance, existuje souvislost mezi dormancí a tloušťkou osemení. Zdá se, že hrachy bez dormance semen mají daleko tenčí osemení, což bylo zjištěno, jak na základě měření pomocí mikrometru, tak také potvrzeno na mikroskopických řezech osemením. Existují ovšem výjimky a lze najít semena s tenkým osemením, které přesto vykazují stav dormance, v našem případě se jedná např. o vzorek IG52517. Tento jev byl rovněž zjištěn při pokusech s rekombinačními liniemi hrachu, kdy vzniklé linie vykazovali odlišné vlastnosti než jejich rodiče a taktéž byla u nich možná přítomnost dormance, přestože osemení bylo tenké (Hradilová *et al.*, 2017). V případě pigmentace semen se rovněž jeví, že existuje souvislost dormance semen hrachu s množstvím pigmentů v osemení (proanthokynidinů). V rámci našeho souboru vzorků, však asociace nebyla tak výrazná, jako tomu bylo v případě práce s daleko větším souborem 97 genotypů (Hradilová *et al.*, 2019).

V této diplomové práci bylo pro vyjádření fenotypové vlastnosti dormance semen využito procentické vyjádření celkového klíčení. Tento přístup ovšem neshrnuje celou dynamiku procesu klíčení, která může být velmi různorodá, jak je patrné v kapitole Průběh klíčení. V budoucnu tedy bude zapotřebí použít jiného matematického zpracování naměřených parametrů a využít např. spline koeficientů, které zohledňují celý proces klíčení, jako to bylo použito v práci s rozšířeným souborem 97 genotypů hrachu při mapování dormance semen (Hradilová *et al.*, 2019).

Dalším zkoumaným druhem v této diplomové práci byla tolíce vojtěška (*Medicago truncatula*), u které je velkou výhodou osekvenovaný genom. Genotypová data byla získána z projektu *M. truncatula* HapMap Project (MHP; <http://www.medicagohapmap.org>). V průběhu asociční mapovací studie byly vybrány a v rámci této práce zkoumány dva homologní geny MTR_6g465430 a MTR_6g465420, které společně kódují CBF/DREB1 transkripční faktor. Transkripční faktory s označením DREB (z angl. dehydration responsive element binding) hrají u rostlin důležitou roli v regulaci exprese mnoha genů aktivovaných během stresových událostí (Lata *et Prasad*, 2011). Hlavním stresovým fytohormonem u rostlin je kyselina abscisová (ABA), podle několika studií však bylo dokázáno, že DREB transkripční faktory mohou fungovat v rámci této signální dráhy, ale také naprosto nezávisle na ABA signalizaci (Yamaguchi-Schinozaki *et Schinozaki*, 1994; Liu *et al.*, 1998; Kizis *et Pagès*, 2002; Dubouzet *et al.*, 2003). DREB transkripční faktory fungují především v odpovědi rostlin na stresové faktory jako jsou vysoká salinita, nízká teplota a sucho (Yamaguchi-Schinozaki *et Schinozaki*, 1994; Dubouzet *et al.*, 2003; Behnam *et al.*, 2006; Bihani *et al.*, 2011). Vzhledem k těmto skutečnostem zde byl předpoklad, že DREB transkripční faktory by mohly být zapojeny také při dormanci semen. Dle výsledků v rámci této diplomové práce však nebyla prokázána sekvenční variabilita genů kódujících CBF/DREB1 transkripční faktor, která by byla asociovaná s dormancí semen. Je však pravděpodobné, že zde může být rozdílnost v expresi těchto genů daná genetickou variabilitou v promotorové oblasti.

Při asociačním mapování u obou zkoumaných druhů jak *Pisum* sp., tak také *Medicago truncatula* bylo objeveno více kandidátních oblastí a genů, které bude v budoucnu zapotřebí otestovat. V rámci této diplomové práce byly vybrány pouze některé z mnoha kandidátních oblastí, zjištěných během GWAS analýzy. Výběr byl proveden na základě zjištěné exprese daných oblastí v semenech z veřejně dostupných atlasů genové exprese. Kandidátní gen u hrachu PsCam036641 kódující polyfenol oxidasu (PPO) byl pak vybrán na základě diferenciální exprese dvou genotypů hrachu JI92 a JI64. Asociační analýzy byly prováděny na základě nukleotidových a aminokyselinových sekvencí v porovnání s fenotypovými daty (dormancí semen). Rozdílná exprese daných genů však může být ovlivněna promotorovými oblastmi, nacházejícími se mimo sekvence daných kandidátních genů. Vhodné kandidátní geny u hrachu pro další studium a podrobnější analýzy jsou především gen PsCam035877 kódující bZIP transkripční faktor a gen PsCam036641 kódující polyfenol oxidasu (PPO), u kterých byla zjištěna asociace s dormancí semen.

7 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byla provedena fenotypová analýza a následné asociační mapování dormance semen u dvou rostlinných druhů, a to u hrachu (*Pisum* sp.) a tolíce (*Medicago truncatula*). U hrachu byly provedeny sekvenční analýzy vybraných úseků tří kandidátních genů PsCam035877, PsCam048411, PsCam026975, které byly vybrány pomocí GWAS analýzy. Dále byl vybrán také kandidátní gen PsCam036641, který kóduje polyfenol oxidasu (PPO), a to na základě diferenciální exprese u genotypů JI92 a JI64 (Hradilová *et al.*, 2017). U kandidátních genů PsCam048411 (protein phosphatase 2C-like protein) a PsCam026975 (O-glycosyl hydrolase family 17 protein) nebyla objevena žádná asociace mezi genetickou variabilitou a dormancí semen. Asociace mezi získanými genetickými daty a fenotypovými daty pro dormanci semen byla zjištěna u kandidátního genu PsCam035877 kódujícího bZIP transkripční faktor. Nejvíce významná asociace s dormancí semen u hrachu však byla objevena u kandidátního genu PsCam036641, který kóduje polyfenol oxidasu (PPO). Zde byla zjištěna existence důležitého indelu na pozici 234 od start kodonu ATG, který na aminokyselinové úrovni, vede k posunutí čtecího rámce a tvorbě stop kodonu, a tedy k zastavení tvorby proteinu. Tento stop kodon se vyskytuje pouze u vzorků druhu *Pisum sativum*, které postrádají dormanci semen. U tolíce (*Medicago truncatula*) byly v průběhu asociační mapovací studie vybrány a v rámci této práce zkoumány dva homologní geny MTR_6g465430 a MTR_6g465420, které společně kódují CBF/DREB1 transkripční faktor. Dle výsledků však nebyla prokázána sekvenční variabilita genů kódujících CBF/DREB1 transkripční faktor, která by byla asociovaná s dormancí semen.

8 LITERATURA

- Amen, R. D. (1968): A model of seed dormancy. *Botanical Review*, 34: 1–31.
- Aranzana, M. J., Kim, S., Zhao, K., Bakker, E., Horton, M., Jakob, K., Lister, C., Molitor, J., Shindo, Ch., Tang, Ch., Toomajian, Ch., Traw, B., Zheng, H., Bergelson, J., Dean, C., Marjoram, P., Nordborg, M. (2005): Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLoS Genetics*, 1(5): e60.10.1371/journal.pgen.0010060.
- Ashikawa, I., Abe, F., Nakamura, S. (2010): Ectopic expression of wheat and barley DOG1-like genes promotes seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 179: 536–542.
- Bar-Hen, A., Charcosset, A., Bourgoin, M., Guiard, J. (1995): Relationship between genetic-markers and morphological traits in a maize inbred line collection. *Euphytica*, 84: 145–54.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C., Li, X. (2000): Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, 15(2): 139–152.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C. (2004): A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14: 1–16.
- Baskin, C., Baskin, J. M. (2014): *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego, 9780124166776.
- Beeckman, T., De Rycke, R., Viane, R., Inze, D. (2000): Histological study of seed coat development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 113: 139–148.
- Behnam, B., Kikuchi, A., Celebi-Toprak, F., Yamanaka, S., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Watanabe, K. N. (2006): The *Arabidopsis* DREB1A gene driven by the stress-inducible rd29A promoter increases salt-stress tolerance in proportion to its copy number in tetrasomic tetraploid potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Biotechnology*, 23: 169–177.
- Berger, F., Grini, P. E., Schnittger, A. (2006): Endosperm: an integrator of seed growth et development. *Current Opinion in Plant Biology* 2006, 9: 664–670.
- Berry, T., Bewley, J. D. (1992): A role for the surrounding fruit tissues in preventing the germination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. *Plant Physiology*, 100: 951–957.
- Bertauche, N., Leung, J., Giraudat, J. (1996): Protein phosphatase activity of abscisic acid insensitive1 (ABI1) protein from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*, 241: 193–200.
- Bihani, P., Char, B., Bhargava, S. (2011): Transgenic expression of sorghum DREB2 in rice improves tolerance and yield under water limitation. *Journal of Agricultural Science*, 149: 95–101.
- Bolingue, W., Ly Vu, B., Leprince, O., Buitink, J. (2010): Characterization of dormancy behaviour in seeds of the model legume *Medicago truncatula*. *Seed Science Research*, 20:97–107.
- Bradford, K. J., Hiroyuki, N. (2007): *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell Publishing Ltd, 13: 978-14051-3983-0.
- Brunner, I., Herzog, C., Dawes, M. A., Arend, M., Sperisen, C. (2015): How tree roots respond to drought. *Frontiers in Plant Science*, 6: 547.

- Constabel, C. P., Barbehenn, R. (2008): Defensive roles of polyphenol oxidase in plants, v Induced Plant Resistance to Herbivory, ed. A.Schaller. Dordrecht: Springer Science et Business Media B.V., 253–269, doi:10.1007/978-1-4020-8182-8_12.
- Corbineau, F., Poljakoff-Mayber, A., Côme, D. (1991): Responsiveness to abscisic acid of embryos of dormant oat (*Avena sativa*) seeds. Involvement of ABA-inducible proteins. *Physiologia Plantarum*, 83: 1–6.
- Davies, G., Henrissat, B. (1995): Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9): 853–859.
- Debeaujon, I., L'eon-Kloosterziel, K. M., Koornneef, M. (2000): Influence of the testa on seed dormancy, germination and longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 122: 403–414.
- Debeaujon, I., Koornneef, M. (2000): Gibberellin requirement for *Arabidopsis thaliana* seed germination determined both by testa characteristics and embryonic ABA. *Plant Physiology*, 122: 415–424.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P. (2003): Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *The Plant Cell*, 15: 2514–2531.
- Dixon, R. A., Xie, D. Y., Sharma, S. B. (2005) Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, 165: 9–28.
- Donohue, K., Dorn, L., Griffith, C., Kim, E., Aguilera, A., Polisetty, C. R., Schmitt, J. (2005): The evolutionary ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*: variable natural selection on germination timing. *Evolution*, 59(4): 758–770.
- Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003): OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt-, and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33: 751–763.
- Ellstrand, N. C., Heredia, S. M., Leak-Garcia, J. A., Heraty, J. M., Burger, J. C., Yao, L., Nohzadeh-Malakshah, S., Ridley, C. E. (2010): Crops gone wild: evolution of Leeds and invasives from domesticated ancestors. *Evolutionary Applications*, 3: 494–504.
- Fenner, M., Thompson, K. (2005): *The Ecology of Seeds*. Cambridge University Press, 10.1017/CBO9780511614101.
- Finch-Savage, W. E., Leubner-Metzger, G. (2006): Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171: 501–523.
- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. L., Rock, C. D. (2002): Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*, 14: 15–45.
- Flint-Garcia, S., Thornsberry, J., Bukler, E. (2003): Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review Plant Biology*, 54: 357-374.
- Footitt, S., Slocombe, S. P., Larner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A., Holdsworth, M. (2002): Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the *Arabidopsis* homologue of human ALDP. *EMBO Journal*, 21: 2912–2922.
- Forbis, T. A., Floyd, S. K., de Queroz, A. (2002): The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: Implications for the evolution of seed dormancy. *Evolution*, 56: 2112–2125.

- Fuerst, E. P., Okubara, P. A., Anderson, J. V., Morris, C. F. (2014): Polyphenol oxidase as a biochemical seed defense mechanism. *Frontiers in Plant Science*, 5:689.
- Gaits, F., Shiozaki, K., Russel, P. (1997): Protein phosphatase 2C acts independently of stress-activated kinase cascade to regulate the stress response in fission yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 17873–17879.
- Gasser, C. S., Broadhvest, J., Hauser, B. A. (1998): Genetic analysis of ovule development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 1–24.
- Gómez, J. M., Husband, B. (2004): Bigger is not always better: conflicting selective pressures on seed size in *Quercus ilex*. *Evolution*, 58: 71–80.
- Graeber, K., Linkies, A., Mueller, K., Wunchova, A., Rott, A., Leubner-Metzger, G. (2010): Cross-species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae DOG1 genes. *Plant Molecular Biology*, 73: 67–87.
- Haruta, M., Pedersen, J. A., Constabel, C. P. (2001): Polyphenoloxidase et herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates. *Physiologia Plantarum*, 112: 552–558.
- Haughn, G. W., Chaudhury, A. (2005): Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 10: 472–477.
- Haughn, G. W., Western, T. L. (2012): *Arabidopsis* Seed Coat Mucilage is a Specialized Cell Wall that Can be Used as a Model for Genetic Analysis of Plant Cell Wall Structure and Function. *Frontiers in Plant Science*, 3: 64.
- Hill, W., Robertson, A. (1968): Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 38(6): 226–231.
- Hradilová, I., Trněný, O., Válková, M., Cechová, M., Janská, A., Prokešová, L., Aamir, K., Krezdorn, N., Rotter, B., Winter, P., Varshney, R. K., Soukup, A., Bednář, P., Hanáček, P., Smýkal, P. (2017): A Combined Comparative Transcriptomic, Metabolomic, and Anatomical Analyses of Two Key Domestication Traits: Pod Dehiscence and Seed Dormancy in Pea (*Pisum* sp.). *Frontiers in Plant Science*, 8: 542.
- Hradilová, I., Duchoslav, M., Brus, J., Pechanec, V., Hýbl, M., Kopecký, P., Smržová, L., Štefelová, N., Vaclávek, T., Bariotakis, M., Machalová, J., Hron, K., Pirintsos, S., Smýkal, P. (2019): Variation in wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) seed dormancy and its relationship to the environment and seed coat traits. *PeerJ*, 7: e6263.
- Howe, H. F., Smallwood, J. (1982): Ecology of seed dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13: 201–228.
- Chaudhury, A. M., Koltunow, A., Payne, T., Luo, M., Tucker, M. R., Dennis, E. S., Peacock, W. J. (2001): Control of early seed development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17: 677–699.
- Janská, A., Pecková, E., Sczepaniak, B., Smýkal, P., Soukup, A. (2018): The role of the testa during the establishment of physical dormancy in the pea seed. *Annals of Botany*, XX: 1–15, www.academic.oup.com/aob.

- Kelly, K. M., Staden, J. V., Bell, W. E. (1992): Seed coat structure and dormancy. *Plant Growth Regulation*, 11: 201–209.
- Kitajima, K., Fenner, M. (2000): Ecology of seedling regeneration. M. Fenner (Ed.), *Seeds: ecology of regeneration in plant communities*. CAB Publishing, 10.1079/9780851994321.0331.
- Kizis, D., Pagès, M. (2002): Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *The Plant Journal*, 30: 679–689.
- Koornneef, M., Bentsink, L., Hilhorst, H. (2002): Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 33–36.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33:1870–1874.
- Lata, C., Prasad, M. (2011): Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(14): 4731-4748.
- Léon-Klosterziel, K. M., van de Bunt, G. A., Zeevaart, J. A., Koornneef, M. (1996): *Arabidopsis* mutants with reduced seed dormancy. *Plant Physiology*, 110(1): 233–240.
- Lewontin, C. (1964): The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics*, 49(1): 49-67.
- Linkies, A., Graeber, K., Knight, CH., Leubner-Metzger, G. (2010): The evolution of seeds. *New Phytologist*, 186: 817–831.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (1998): Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10: 391–406.
- Marbach, I., Mayer, A. M. (1975): Changes in catechol oxidase and permeability to water in seed coats of *Pisum elatius* during seed development and maturation. *Plant Physiology*, 56: 93–96.
- Mayer, A. M., Harel, E. (1979): Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18: 193–215.
- Minic, Z. (2008): Physiological role of plant glycoside hydrolases. *Planta*, 227(4): 723–740.
- Nawaschin, S. (1898): Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. *Bull. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg* 9: 377–382.
- Ogawa 2003 Gibberellin Biosynthesis and Response during *Arabidopsis* Seed Germination
- Palaisa, K. A., Morgante, M., Williams, M., Rafalski, A. (2003): Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. *Plant Cell*, 15: 1795–806.
- Paulsen, T. R., Colville, L., Kranner, I., Daws, M. I., Högstedt, G., Vandvik, V., Thompson, K. (2013): Physical dormancy in seeds: a game of hide and seek? *New Phytologist* (2013), 198: 496–503.
- Risch, N., Merikangas, K. (1996): The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 273: 1516–1517.

- Rivero, R. M., Ruiz, J. M., García, P. C., López-Lefebvre, L., Sánchez, E., Romero, L. (2001): Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, 160: 315–321.
- Rodriguez, P. L., Benning, G., Grill, E. (1998a): ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 421: 185–190.
- Rodriguez, P. L. (1998b): Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 38(6): 919–927.
- Rubio de Casas, R., Willis, C. G., Pearse, W. D., Baskin, C. C., Baskin, J. M., Cavender-Bares, J. (2017): Global biogeography of seed dormancy is determined by seasonality and seed size: a case study in the legumes. *New Phytologist* (2017), 214(4): 1527–1536.
- Sabiiti, E. N., Wein, R. W. (1987): Fire and Acacia seeds: a hypothesis of colonization success. *Journal of Ecology*, 74: 937–946.
- Seo, M., Nambara, E., Choi, G., Yamaguchi, S. (2008): Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology*, 69(4): 463–472.
- Schneitz, K., Hülskamp, M., Pruitt, R. E. (1995): Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *The Plant Journal*, 7(5): 731–749.
- Siriwitayawan, G., Geneve, R. L., Downie, A. B. (2003): Seed germination of ethylene perception mutants of tomato and *Arabidopsis*. *Seed Science Research*, 13: 303–314.
- Skinner, D. J., Hill, T. A., Gasser, Ch. S. (2004): Regulation of Ovule Development. *The Plant Cell*, 16: 32–45.
- 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* 2014; 5: 351.
- Smýkal, P., Nelson, M. N., Berger, J. D., Von Wettberg, E. J. B. (2018): The impact of genetic changes during crop domestication. *Agronomy*, 8: 119.
- Soto-Cerda, B. J., Cloutier, S. (2012): Association Mapping in Plant Genomes. Caliskan, M. (Ed.), *Genetic Diversity in Plants*. InTech, 10.5772/33005.
- Stich, B., Melchinger, A. (2010): An introduction to association mapping in plants. *CAB Reviews: Perspectives in agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 5(39): 1-9.
- Thornsberry, J. M., Goodman, M. M., Doebley, J., Kresovich, S., Nielsen, D., Buckler, E. S. (2001): Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics*, 28: 286–9.
- Toyomasu, T., Yamane, H., Murofushi, N., and Inoue, Y. (1994): Effects of exogenously applied gibberellin and red light on the endogenous levels of abscisic acid in photoblastic lettuce seeds. *Plant and Cell Physiology*, 35: 127–129.
- Trněný, O., Brus, J., Hradilová, I., Rathore, A., Das, R. R., Kopecký, P., Coyne, C. J., Reeves, P., Richards, Ch., Smýkal, P. (2018): Molecular Evidence for Two Domestication Events in the Pea Crop. *Genes*, 9(11): 535.
- Vaughn, K. C., Duke, S. O. (1984): Function of polyphenol oxidases in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 60: 106–112.

- Virk, P. S., Ford-Lloyd, B. V., Jackson, M. T., Pooni, H. S., Clemeno, T. P., Newbury, H. J. (1996): Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Heredity*, 76: 296–304.
- Wyatt, J. E. (1977): Seed coat and water absorption properties of seed of near-isogenic snap bean lines differing in seed coat color. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 102: 478–480.
- Werker, E., Marbach, I., Mayer, A. M. (1979): Relation between the anatomy of the testa, water permeability and the presence of phenolics in the genus *Pisum*. *Annals of Botany*, 43: 765–771.
- White, C. N., Proebsting, W. M., Hedden, P., Riven, C. J. (2000): Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiology*, 122: 1081–1088.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1994): A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6: 251–264.
- Yoruk, R., Marshall, M. R. (2007): Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 7: 361–422.
- Young, N. D., Debellé, F., Oldroyd, G. E. D., Geurts, R., Cannon, S. B., Udvardi, M. K., Benedito, V. A., Mayer, K. F. X., Gouzy, J., Schoof, H., Van de Peer, Y., Proost, S., Cook, D. R., Meyers, B. C., Spannagl, M., Cheung, F., De Mita, S., Krishnakumar, V., Gundlach, H., Zhou, S., Mudge, J., Bharti, A. K., Murray, J. D., Naoumkina, M. A., Rosen, B., Silverstein, K. A. T., Tang, H., Rombauts, S., Zhao, P. X., Zhou, P., Barbe, V., Bardou, P., Bechner, M., Bellec, A., Berger, A., Bergès, H., Bidwell, S., Bisseling, T., Choisne, N., Couloux, A., Denny, R., Deshpande, S., Dai, X., Doyle, J. J., Duzde, A.-M., Farmer, A. D., Fouteau, A. S., Franken, C., Gibelin, Ch., Gish, J., Goldstein, S., González, A. J., Green, P. J., Hallab, A., Hartog, M., Hua, A., Humphray, S. J., Jeong, D.-H., Jing, Y., Jöcker, A., Kenton, S. M., Kim, D.-J., Klee, K., Lai, H., Lang, C., Lin, S., Macmil, S. L., Magdelenat, G., Matthews, L., McCarrison, J., Monaghan, E. L., Mun, J.-H., Najjar, F. Z., Nicholson, Ch., Noirot, C., O’Bleness, M., Paule, Ch. R., Poulain, J., Prion, F., Qin, B., Qu, Ch., Retzel, E. F., Riddle, C., Sallet, E., Samain, S., Samson, N., Sanders, I., Saurat, O., Scarpelli, C., Schiex, T., Segurens, B., Severin, A. J., Sherrier, D. J., Shi, R., Sims, S., Singer, S. R., Sinharoy, S., Sterck, L., Viollet, A., Wang, B.-B., Wang, K., Wang, M., Wang, X., Warfsmann, J., Weissenbach, J., White, D. D., White, J. D., Wiley, G. B., Wincker, P., Xing, X., Yang, L., Yao, Z., Ying, F., Zhai, J., Zhou, L., Zuber, A., Dénarié, J., Dixon, R. A., May, G. D., Schwartz, D. C., Rogers, J., Quétier, F., Town, Ch. F., Roe, B. A. (2011): The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, 480: 520–524.
- Yu, J., Buckler, E. (2006): Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinions in Biotechnology*, 17(2): 155–160.
- Zhu, C., Gore, M., Buckler, E., Yu, J. (2008): Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome*, 1: 5–20.