

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**

**Fakulta tropického zemědělství**



**Fakulta tropického  
zemědělství**

*In vitro* indukovaná polyploidie hrachu setého

(*Pisum sativum* L.)

**Bakalářská práce**

Praha 2023

**Vypracoval:**

Jozef Andel

**Vedoucí práce:**

prof. Dr. Ing. Eloy Fernández Cusimamani



## Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma *In vitro indukovaná polyploidie hrachu setého Pisum sativum L.* vypracoval samostatně, veškerý text je v práci původní a originální a všechny použité literární prameny jsem podle pravidel Citační normy FTZ řádně uvedl v referencích.

V Praze dne .....

.....  
Jozef Andel

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat prof. Dr. Ing Eloyi Fernández Cusimamanimu za předání odborných znalostí, konzultace, jeho odborné vedení a veškerou pomoc při výzkumu a zpracovávání této práce. Dále bych chtěl poděkovat Lukášovi Jandovi za pomoc při experimentu v laboratoři rostlinných explantátů. Rád bych poděkoval také Fakultě tropického zemědělství, která mi umožnila provést výzkum a zpracovat bakalářskou práci v laboratoři rostlinných explantátů. Ale především bych rád poděkoval své rodině a přítelkyni za plnou podporu při psaní této práce a mém celkovém studiu na České zemědělské univerzitě.



## Abstrakt

### *In vitro* indukovaná polyploidie Hrachu setého (*Pisum sativum* L.)

*Pisum sativum*, v českém jazyce známý jako hrách setý je jednoletá vyšší rostlina z čeledi *Fabaceae* pěstovaná pro svá zralá i nezralá semena a je nejrozšířenější luštěninou mírného pásma. Semena hrachu mají vysoký obsah bílkovin (a to přibližně 2 krát více než v obilninách) minerálů, aminokyselin a vitamínů. I přes tyto výhody tvoří pouze cca 10 % lidské výživy. Ve větší míře je využíván jako krmivo v podobě siláže nebo směsí s obilninami.

Hlavním cílem práce bylo získat autopolyploidní rostliny *Pisum sativum* L. z diploidních rostlin ( $2n=2x=14$ ) pomocí *in vitro* indukované polyploidie.

Polyploidie byla indukována u nodálních segmentů pěstovaných na MS mediu (Murashige & Skoog 1962). Bylo použito antimitotické činidlo oryzalin v koncentraci 100  $\mu$ M po dobu 24 a 48 hodin. Úroveň ploidie byla určena pomocí průtokové cytometrie.

Celkem bylo získáno 8 tetraploidních rostlin. Z toho 5 rostlin po 48 hodinách a 3 rostliny po 24 hodinách působení oryzalinu.

Nové genotypy byly morfologicky rozdílné. Statisticky byl prokázán větší průměr stonku u tetraploidních rostlin. Dle dostupných zdrojů byla metoda *in vitro* indukované polyploidie u *P. sativum* použita poprvé.

#### **Klíčová slova:**

Hrách setý (*Pisum sativum* L.), mikropropagace, nodální segmenty, průtoková cytometrie, tetraploid, *Fabaceae*

## **Author's abstract**

### ***In vitro* induced polyploidy of pea (*Pisum sativum* L.)**

*Pisum sativum*, an annual plant of the *Fabaceae* family. It is grown for its ripe and unripe seeds and it is the most common legume of temperate climate. Pea seeds have high content of protein (cca twice as much as cereals), minerals, amino acids and vitamins. Despite these properties pea is only 10 % of human food. It is rather used as feed for animals.

Main goal of this paper was to gain autopolyploid plants of *Pisum sativum* L. from diploid plants ( $2n=2x=14$ ) using *in vitro* induced polyploidy.

Polyploidy was induced on nodal segments cultivated on MS medium (Murashige & Skoog 1962). Oryzalin was used as antimetabolic agent in concentration 100  $\mu$ M for 24 and 48 hours. Ploidy level was measured with flow cytometry.

A total of 8 tetraploid plants were obtained. Of which 5 plants after 48 hours and 3 plants after 24 hours of oryzalin exposure.

New genotypes were morphologically different. Larger stem diameter of tetraploids was statistically proved with Mann-Whitney U-test. According to available sources was the method of *in vitro* induced polyploidy on *P. sativum* never used before.

### **Key words:**

*Pisum sativum* L., micropropagation, nodal segments, flow cytometry, tetraploid, *Fabaceae*

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>2. Literární rešerše</b> .....	<b>- 2 -</b>
2.1 Morfologie .....	- 2 -
2.2 Taxonomie .....	- 4 -
2.2.1 Odrůdy .....	- 4 -
2.3 Genetika .....	- 5 -
2.4 Pěstování .....	- 6 -
2.4.1 Podmínky prostředí .....	- 6 -
2.4.2 Výživa a hnojení .....	- 7 -
2.4.3 Setí a příprava pozemku .....	- 7 -
2.4.4 Ochrana a ošetření porostu .....	- 7 -
2.4.5 Sklizeň .....	- 8 -
2.4.6 Pěstitelská rizika .....	- 8 -
2.5 Nutriční složení .....	- 9 -
2.6 Využití .....	- 9 -
2.7 Šlechtění .....	- 10 -
2.8 Indukovaná Polyploidie <i>in vitro</i> .....	- 11 -
<b>3. Cíle práce</b> .....	<b>- 12 -</b>
<b>4. Materiál a metodika</b> .....	<b>- 13 -</b>
4.1 Rostlinný materiál .....	- 13 -
4.2 Metodika .....	- 14 -
4.2.1 Indukce polyploidie .....	- 14 -
4.2.2 Stanovení úrovně ploidie .....	- 15 -
4.2.3 Morfologické hodnocení polyploidů .....	- 15 -
4.2.4 Statistické hodnocení .....	- 15 -
<b>5. Výsledky a diskuze</b> .....	<b>- 16 -</b>
5.1 Indukce polyploidie .....	- 16 -
5.2 Stanovení úrovně ploidie .....	- 17 -
5.3 Morfologické a statistické hodnocení polyploidů .....	- 19 -
5.3.1 Vliv polyploidie na výšku rostlin .....	- 20 -
5.3.2 Vliv polyploidie na počet nodů .....	- 22 -

5.3.3	Vliv polyploidie na délku internodií .....	- 23 -
5.3.4	Vliv polyploidie na počet a délku kořenů .....	- 24 -
<b>6.</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>- 25 -</b>
<b>7.</b>	<b>Reference</b> .....	<b>- 26 -</b>

## Seznam tabulek:

Tabulka 1: Vliv působení oryzalinu v koncentraci 100 $\mu$ M na nodální segmenty v <i>in vitro</i> podmínkách na míru přežití a počet polyploidů u <i>P. sativum</i> .....	17
Tabulka 2: Vliv polyploidie na regeneraci nodálních segmentů <i>Pisum sativum</i> L.....	19

## Seznam obrázků a grafů:

Obrázek 1: Rostlina <i>Pisum sativum</i> vlevo, vpravo plod, dole květ.....	3
Obrázek 2: Morfologické znaky hrachu popisované Gregorem Mendelem.....	6
Obrázek 3: Grafické schéma získávání autopolyploidních rostlin <i>P. sativum</i> L. v <i>in vitro</i> : a) diploidní rostlina ( $2n=2x=14$ ) pěstovaná <i>in vitro</i> b) získání nodálních segmentů (1-1,5 cm) c) kultivace nodálních segmentů d) aplikace oryzalinu – antimitotické činidlo (100 $\mu$ M po dobu 24 a 48 hodin) e) mytí nodálních segmentů sterilní destilovanou vodou f) kultivace tetraploidních nodálních segmentů ( $24n=4x=28$ ) h) úplná regenerace tetraploidní rostliny.....	14
Obrázek 4: vlevo tetraploidní rostlina, vpravo kontrolní diploidní rostlina <i>P. sativum</i> ..	21
Obrázek 5: rozdíl mezi internodií; vlevo polyploidní rostlina, vpravo diploidní.....	24
Graf 1: Histogram ukazující obsah DNA v buňkách u kontrolní rostliny PS2 – vrchol na kanálu 200 odpovídá jádrům kontrolní rostliny.....	18
Graf 2: Histogram ukazující DNA v buňkách u tetraploidní rostlin PS2 – vrchol na kanálu 400 odpovídá jádrům tetraploidní rostliny po působení oryzalinu.....	18
Graf 3: vliv polyploidie na výšku rostlin.....	20
Graf 4: vliv polyploidie na počet nodů.....	22
Graf 5: vliv polyploidie na délku internodií.....	23

# 1. Úvod

*Pisum sativum*, v českém jazyce známý jako hrách setý je jednoletá vyšší rostlina z čeledi *Fabaceae* pěstovaná pro svá zralá i nezralá semena a je nejrozšířenější luštěninou mírného pásma (Kočar 2009). Hrách je jedna z nejstarších domestikovaných plodin. Jeho existenci dokazují archeologické nálezy z blízkého východu z doby 10 000 let před našim letopočtem. Jako i jiné rostliny z čeledi *Fabaceae*, má hrách zásadní schopnost vázat vzdušný dusík. Tato schopnost snižuje nároky na hnojení a odběr dusíku z půdy. Hrách setý je také známý jako model genetických studií a jako model experimentální mutagenese (Graman, Čurn 1998). Ve svých studiích ho využil i tak zvaný otec genetiky Gregor Mendel.

Hrách je pěstován především na zrno. Semena hrachu mají vysoký obsah bílkovin (a to přibližně 2 krát více než v obilninách) minerálů, aminokyselin a vitamínů. I přes tyto výhody tvoří pouze cca 10 % lidské výživy, kde je konzumován jak za studena například v salátech, tak tepelně upraven v podobě různých příloh, polévek a podobně. Více je však využíván jako krmivo v podobě siláže nebo směsí s obilninami (Houba et al 2009).

Současný průměrný výnos hrachu se celosvětově pohybuje kolem 5459 kg/ha (FAO 2021). Snaha šlechtitelů je navýšit výnos a kvalitu zrna. Jsou různé metody šlechtění, jedna z nich je indukovaná polyploidie (*in vivo* a *in vitro*).

Indukovaná polyploidie je šlechtitelská metoda, při které se znásobí počet chromozomů v rostlině. Polyploidie může být vyvolána pomocí chemických a fyzických metod. V poslední době se nejvíce používá chemická metoda s pomocí antimitotických činidel jako je oryzalin, kolchicin a trifluralin. Polyploidní rostliny mají často vyšší výnos biomasy a lepší toleranci k abiotickým stresům, než rostliny diploidní (Rauf et al. 2021).

Cílem práce bylo získat z diploidní rostliny *Pisum sativum* autopolyploidní formu metodou *in vitro* indukované polyploidie za použití oryzalinu. U hrachu setého očekáváme, že by se pomocí indukované polyploidie mohly získat nové genotypy s vyšším výnosem a lepšími nutričními vlastnostmi.

## 2. Literární rešerše

### 2.1 Morfologie

Rostliny z rodu *Pisum* jsou jednoleté kvetoucí zelené byliny.

**Lodyha:** Vystoupavá, popínavá nebo přímá, na bázi méně či více větvená, rozdělena na internodia, která mají různou délku. Délka internodií je ovlivněna především geneticky.

**Kořeny:** Vřetenovité, zasahují hluboko do půdy. Na kořenech hrachu se shlukují kolonie symbiotických bakterií (*Rhizobium* spp.), které fixují plynný dusík do půdy a tvoří typické uzliny (Simpson 2010).

**Listy:** Sudozpeřené listy složené z jednoho nebo více párů lístků a z koncového úponku, který může být často rozvětvený. Mladé lístky jsou složené podél střední žilky. V úžlabí listů se nacházejí bylinné palisty, které bývají často větší než jednotlivé lístky.

**Květenství:** Úžlabní, na dlouhých stopkách jsou chudokvěté hrozny s 1–3 nápadnými květy. Motýlovité květy jsou bilaterálně souměrné. Kalich je zvonkovitého tvaru s šikmou trubicí a s nestejnými širokými zoubky, které jsou z vrchní strany kratší. Různě zbarvená koruna je tvořena obvejčitou až okrouhlou pavézou a dvěma vypouklými křídly přiléhajícími k člunku. Květ obsahuje 9 navzájem nitkami srostlých tyčinek a 1 volnou nebo jen z části srostlou s ostatními, dále je přítomen pestík, který je složen z přisedlého semeníku a z dorzálně zploštělé čnělky u vrcholu rozšiřující se v bliznu. Vnější strana čnělky je rýhovaná, na straně vnitřní je pod vrcholem chlupatá. (viz. obr.1)

**Plod:** Mnohosemenný, podlouhlý, šikmo zkrácený, zaškrcovaný nebo klenutý lusk na vrcholu zužující se v zobánek. Barvy zelené nebo žluté. (viz. obr.1)

**Semena:** Jsou většinou kulovitá (Chrtíková 1995; Ladizinsky & Abbo 2015), ale jejich tvar se může měnit v závislosti na formování škrobových zrn. Hrách setý obsahuje žluté, zelené a červené variety semene (Warkentin et. al 2015). Konkrétně pro *Pisum sativum* subsp. *sativum* je však typická žlutá a zelená barva.



**Obrázek 1:** rostlina *Pisum sativum* vlevo, vpravo plod, dole květ

**Autor:** Věra Dorušková (2009)



## 2.2 Taxonomie

Druh *Pisum sativum* L. patří do monofyletického rodu *Pisum* L., který je podle aktuálního řazení součástí čeledi *Fabaceae* (nom. alt.: Leguminosae, Papilionaceae) a podčeledi *Papilionoideae* (Simpson 2010).

Čeď *Fabaceae* obsahuje asi 720–730 rodů, ve kterých je přibližně 19 500 druhů. Součástí této čeledi jsou druhy v podobě stromů, bylin, keřů i lián. Čeď se dle tradiční taxonomie dále dělí na tři podčeledi *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* a *Papilionoideae* (Simpson 2010). Nejpříbuznější rody rodu *Pisum* L., které jsou také raženy do tribu *Fabeae*, jsou na příklad *Lathyrus* L., *Lens* Mill., *Vicia* L. a *Vavilovia* Al.Fed. (Schaefer et al. 2012).

Systematické zařazení druhu *P. sativum* L. podle ITIS (2011):

- říše: *Plantae*
- podříše: *Viridaeplantae*
- nadoddělení: *Embryophyta*
- oddělení: *Tracheophyta*
- pododdělení: *Spermatophytina*
- třída: *Magnoliopsida*
- nadřád: *Rosanae*
- řád: *Fabales*
- čeď: *Fabaceae*
- rod: *Pisum* L.
- druh: *Pisum sativum* L.

### 2.2.1 Odrůdy

Existuje velké množství poddruhů a odrůd *P. sativum* L. Mezi hospodářsky nejvýznamnější poddruhy můžeme zařadit hrách setý (*Pisum sativum*, subsp. *sativum*), hrách rolní (*Pisum sativum*, subsp. *arvense*). Tyto dva poddruhy mají velmi rozsáhlé množství genotypů. Ve Společném katalogu EU bylo uvedeno přes 400 odrůd hrachu rolního. V České republice je dle Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ 2022) v katalogu registrováno 41 odrůd *P. sativum* L.

Z důvodu velkého množství odrůd *Pisum sativum* subsp. *sativum* budou zmíněny pouze vybrané odrůdy ze Seznamu doporučených odrůd pro rok 2023, který vydal zmíněný ÚKZÚZ.

Odrůda ASTRONAUTE je poloraná žlutosemenná odrůda, jejíž semena jsou válcovitého tvaru. Její přednosti jsou velký výnos semena a žádné výrazné pěstitelské rizika. Udržována je ve Francii.

Odrůda IMPULS je středně ranná zelenosemenná odrůda s válcovitými semeny. Její přednosti jsou rychlost počátečního růstu a komplexní odolnost proti napadení kořenovými chorobami. Pěstitelské riziko je nízký výnos semen. Udržována v České republice.

Odrůda ESO je středně ranná žlutosemenná s oválnými semeny. Její hlavní předností je, že nemá žádné výrazné pěstitelské rizika (ÚKZÚZ 2023).

Podle zmiňovaného Seznamu doporučených odrůd jsou obecně žlutosemenné odrůdy odolnější vůči nepříznivým vlivům, často nemají výrazná pěstitelská rizika. Zelenosemenné odrůdy jsou v seznamu pouze 2 a vždy s sebou nesou alespoň jedno výrazné pěstitelské riziko.















## 2.3 Genetika

Počet chromozomů *P. sativum* L. je  $2n=14$  v sedmi vazbových skupinách. Geneticky je hrách dobře prostudován, je znám velký počet genů, z nichž je 300 identifikovaných a přes 170 lokalizovaných v chromozomech, je pořízený soupis mutací (Jaranowski 1976, Gottschalk 1980). Velikost genomu hrachu byla odhadována několika různými metodami. Nejspolehlivější výsledek byl 9.09 pg DNA/2C, což odpovídá 4.45 miliardám párů bází (Smýkal et al. 2012).

Mnohé geny vykazují genetickou vazbu a pleiotropní účinky. Pro velké množství genů budou zmíněny pouze některé šlechtitelsky významnější geny.

Na příklad gen *Af* podmiňuje tvorbu normálního listu a genotyp *afaf* podmiňuje přeměnu listů na úponky (bezlístkový, úponkový typ, *afila* typ), podobně gen *Leaf – leaf* s genem *Tl-tl* řídí tvorbu obvyklého tvaru a bez lístků. Ze šlechtitelského hlediska je zajímavý komplexní účinek alelického páru R-r (lokalizovaný na 7.chromozomu) na chemickou skladbu škrobu a formu škrobových zrn a následný vliv na morfologii semen (obr.2).

Většina hospodářsky významných kvantitativních znaků, jako např. doba květu, počet internodií, délka lodyhy, HTS je podmíněna polygenně. Výnos semen, obsah bílkovin a obsah methioninu a tryptofanu mají nízkou heritabilitu, prostředí má tedy velký vliv na tyto znaky. Heritabilita těchto znaků  $h^2$  se pohybuje v rozsahu 0,15 – 0,44 (Graman, Čurn 1998).

semeno		květ	plod		stonek	
tvar	dělohy	barva	tvar	barva	umístění květů	velikost
						
kulatý	žluté	bílá	klenutý	žlutý	úžlabní	vysoké rostliny
						
hranatý, svraskalý	zelené	fialová	zaškrcovaný	zelený	vrcholové	nízké rostliny
1	2	3	4	5	6	7

**Obrázek 2:** Morfologické znaky hrachu popisované Gregorem Mendelem

**Autor:** Mariana Ruiz (2006)

## 2.4 Pěstování

Podle FAO (2020) je v České republice hrách pěstován na ploše 34000 ha, to je přibližně 0,03 % plochy zemědělské půdy v ČR. Celosvětově je pěstován cca na 12 milionech ha, to je přibližně 0,08 % celosvětové zemědělské půdy (FAO 2020).

### 2.4.1 Podmínky prostředí

Pro pěstování hrachu jsou ideální neslévavé středně těžké písčitohlinité až hlinitopísčité půdy. Kyselost půdy se měla pohybovat mezi mírně kyselou a neutrální s dostatkem vápníku a fosforu. Není vhodné pěstovat hrách v půdách příliš zamokřených nebo kyselých.

V osevním postupu je vhodné hrách zařadit do třetí trati za plodinu organicky hnojenou. Hrách sám po sobě na jednom místě není dobré pěstovat dříve než po 4 letech. Ideální je alespoň po 6 letech, aby se předešlo výnosové depresi.

Důležité je respektovat požadavky určitých forem a odrůd hrachu. Především u forem listových, které jsou náchylné k poléhání, musí být povrch řádně urovnaný. Formy

úponkové a *afila* je třeba důsledně ochránit proti plevelům, které mají více světla pro svůj růst (Houba et al. 2009).

#### **2.4.2 Výživa a hnojení**

Díky hlízkovým bakteriím, které jsou schopné fixovat vzdušný dusík do půdy, není nutné hnojení dusíkem. Výjimečně se může aplikovat startovací dávka do 20kg N/ha, a to pouze do půd s velkým nedostatkem dusíku.

Důležité je však hnojení fosforem a draslíkem. Draslík i fosfor by se měli aplikovat do půdy již na podzim při přípravě půdy na jaro v dávkách cca 50kg P/ha a 70kg K/ha s ohledem aktuální obsah látek v půdě.

Půdní reakce by neměla přesahovat 7,0 pH. Pokud je však pH nižší než 6,2, je žádoucí hnojení vápencem a to na podzim v množství cca 2t/ha. Hnojení vápencem se však nesmí provádět zároveň s hnojením fosforem. Správná hodnota pH půdy je velmi důležitá pro správnou funkci hlízkových bakterií *Rhizobium* spp. (Houba et al. 2009).

#### **2.4.3 Setí a příprava pozemku**

Hrách se vysévá co nejdříve na jaře, protože hrách je schopný snést mráz až -6°C.

Optimální hloubka setí je 4-6 cm v závislosti na vlastnostech půdy. Čím lehčí půda, tím hlouběji se sází semeno.

Počet klíčivých semen na jeden hektar by měl být kolem 1 milionu. To je výsevek o hmotnosti přibližně 260 až 340 kg/ha v závislosti na klíčivosti a hmotnosti tisíce semen.

Běžná šíře řádku je 12, 5 cm s tím, že může být širší pro účely množitelské (Houba et al. 2009).

#### **2.4.4 Ochrana a ošetření porostu**

Základem obecné ochrany rostlin je dodržování zásad správné pěstitelské praxe jako je vhodná volba pozemku, správný osevní postup, použití správného osiva a správné odrůdy pro dané podmínky, příprava půdy a volení vhodných zásahů v reakci na aktuální stav porostu.

Po zasetí semen hrachu je vhodné půdu uválet, aby se zvýšila účinnost herbicidů a půdní kapilarita, díky které semena rychle klíčí a plynule vzchází. Mimo to je uválená

půda vhodnější pro sklizeň pomocí zemědělské techniky a snižuje ztráty poléhavých odrůd.

Před nebo po vzejití je vhodné užití herbicidů, především u *afila* a úponkových forem (viz. kapitola 2.4.5.). Místo použití herbicidů je také možné vykonat převláčení lehkými branami, což kromě likvidace vzházejících plevelů také rozruší půdní škraloup.

Z chemických postřiků se nejvíce využívá insekticidů proti škůdcům jako jsou kyjatka hrachová, třásněnka hrachová, obaleč nebo zrnokaz hrachový. Fungicidy se tolik nevyužívají z důvodu nízké účinnosti a zvýšení nákladů. Výjimkou jsou především roky s prognózou silného infekčního tlaku.

### **2.4.5 Sklizeň**

Před sklizní se často aplikují desikanty regulující dozrávání pomocí snižování vlhkosti semen. Tento zákrok se většinou provádí týden před sklizní při vlhkosti semen kolem 30 %.

Vzhledem k nerovnoměrnému dozrávání a poléhavosti rostlin hrachu je sklizeň značně komplikovaná. V praxi se většinou používá ke sklizni mlátička na obilí se sníženými otáčkami mlátícího bubnu a nainstalovanými zvedáky před lištou.

Optimálně by měla být vlhkost hrachu při sklizni vyšší než 15 %. Při vyšší vlhkosti může dojít ke značnému znehodnocení sklizně (viz kapitola 2.4.6.).

Samotná sklizeň hrachu by měla proběhnout přibližně 100 dní po sadbě.

Po sklizni musí bezprostředně následovat předčištění a dosušení na rošttech s vyšší vrstvou materiálu.

### **2.4.6 Pěstitelská rizika**

U hrachu obecně platí, že největším rizikem je konkurence plevelů a poléhavost. Konkrétně u *afila* a úponkových forem je větší problém s plevely, kvůli pronikání velkého množství světla mezi řádky a u listových forem je výrazně větší poléhání rostlin.

Dalším obecným rizikem jsou houbové infekce, obzvláště v půdách velmi zamokřených. Mezi nejčastější choroby v podmínkách České republiky patří komplex kořenových chorob hrachu (*Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp., *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium* spp., a další), komplex antraknóz hrachu (*Mycosphaella pinodes*, *Phoma*

*pinodella*, *Aschochyta pisi*), plíseň hrachová (*Perenospora pisi*) nebo na příklad rez hrachu (*Uromyces pisi*).

Mimo houbové infekce napadají rostliny hrachu také škůdci jako plodomorka hrachová (*Contarinia pisi*) nebo zrnokaz hrachový (*Bruchus pisorum*). Škůdci mohou přenášet určité virové infekce, mezi něž patří třeba výrůstková mozaika hrachu (PEMV) nebo virus semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV).

Rizikové jsou také příliš kyselé půdy, kdy může dojít k neschopnosti bakterií *Rhizobium* spp. fixovat vzdušný dusík do půdy a následnému snížení příjmu dusíkatých látek rostlinou

Obecně velké ztráty a znehodnocení semen může způsobit také sklizeň při nižší vlhkosti než 15 % (Houba et al. 2009).

Dále existují konkrétní rizika pro určité odrůdy. Na příklad zelenosemenná odrůda ATOLL může obsahovat příliš nízký obsah dusíkatých látek nebo žlutosemenná odrůda GAMBIT má nižší odolnost proti poléhání před sklizní, než ostatní doporučené odrůdy (ÚKZÚZ 2023).

## 2.5 Nutriční složení

Vzhledem k tomu, že je hrách sklizen především pro semena, bude tato kapitola věnována právě nutričnímu složení semen.

Podle databáze NutriPro (2020) obsahují zralá semena hrachu bez lusku průměrně 31 % bílkovin, z toho globuliny 60-70 %, albuminy 10-15 %, zbytek bílkovin tvoří gluteliny a prolaminy (Tříška 2016). Dále 54 % sacharidů a 10 % tuků.

Dle Laholy (2009) však semeno hrachu obsahuje průměrně 22 – 28 % dusíkatých látek (včetně bílkovin), 46 – 56 % škrobu, 5 – 7 % vlákniny a 3 % tuku.

Semena *P. sativum* jsou nejen významný zdroj bílkovin dosahující obsahu bílkovin v mase, ale také zdrojem vlákniny, vitamínů skupiny B a minerálů jako je zinek, vápník, fosfor, hořčík nebo železo (Houba 2009).

## 2.6 Využití

Nejvýznamnější využití luskovin obecně je výživa lidí a zvířat. Luskoviny mají vysoký obsah rostlinných bílkovin. V kombinaci s obilovinami je možné vytvořit

vyvážený komplex potřebných živin. Toho se často využívá k výrobě krmných směsí pro zvířata. Pro krmení zvířat se využívají jak zrna, tak celá nadzemní část rostliny.

Mimo krmné směsi se luskoviny včetně hrachu využívají také k pícním účelům, nebo jako zelené hnojivo.

V souvislosti s určitou tržní cenou masa, různými náboženskými pravidly, kulturami, dietami a podobně jsou často luskoviny hlavním zdrojem bílkovin nahrazující bílkoviny živočišné.

Luskoviny jsou také velmi významné z ohledu pěstitelského. Díky symbiotickým bakteriím *Rhizobium* spp. vzájemným vzdušný dusík výrazně snižují až úplně nahrazují čerpání půdy z dusíku a tím snižují nároky nadcházejících plodin na hnojení (Houba et al. 2009).

Svůj význam má *P. sativum* i v genetice, kde byla zkoumána dědičnost znaků Gregorem Mendelem na rostlinách hrachu (viz. kapitola 2.3.).

## 2.7 Šlechtění

Graman a Čurn (1998) ve své knize Šlechtění rostlin definují šlechtění jako cílevědomou lidskou činnost zabývající se vytvářením nových odrůd a zlepšováním již stávajících odrůd. Šlechtění také zahrnuje udržování odrůd, které svými znaky produkce, kvality a dalšími vlastnostmi splňují požadavky uživatelů.

Práce Gregora Mendela z 19. století a později sestavené Mendelovy zákony umožnili velký pokrok ve šlechtění rostlin pomocí vědomého kombinování určitých geneticky řízených znaků a aplikování selekce na požadované vlastnosti (Houba et al. 2009).

Nejen u hrachu setého jsou šlechtitelské cíle zaměřeny na zvýšení produkční schopnosti, odolnost vůči nepříznivým vlivům a patogenům, vhodnost k mechanizované sklizni a podobně (Graman, Čurn 1998).

V posledních letech se soustřeďuje šlechtění hrachu především na odolnost proti patogenům jako jsou padlí, rzi nebo komplex kořenových a krčkových chorob (viz. kapitola 2.4.6.). Mimo jiné můžou v některých sezónách hrách ohrožovat také virové choroby, proti kterým je podle současných poznatků jediná ochrana právě šlechtění na rezistenci (Houba et al. 2009).

Šlechtění však neznamena pouze selekci a křížení. Mezi moderní šlechtitelské metody patří taky na příklad nekonvenční šlechtitelské metody jako vnášení cizorodých genů do genomu rostlin nebo mutační a polyploidní šlechtění, kdy se využívá jak umělé tak přirozené mutace k dalšímu šlechtitelskému zpracování (Graham, Čurn 1998)

## 2.8 Indukovaná Polyploidie *in vitro*

Polyploidní organismy, které se vyskytují mezi různými životními formami jsou organismy, které mají více než pouze 2 základní sady chromozomů. Polyploidní organismy mohou mimo jiné sloužit také jako přenašeči resistantních genů z jejich mateřských druhů.

Polyploidie u rostlin může vést ke zvýšené expresi genu na příklad v podobě zvýšených výnosů nebo kvality produktů. U těchto rostlin se může vyskytovat tak zvaný „gigas“ efekt. Termínem „gigas“ efekt je označováno zvětšení buněk rostlin a díky tomu i orgánů rostlin v souvislosti se zvýšeným množstvím DNA (Becker 2021). „Gigas“ efekt byl potvrzen na příklad u *Raphanus sativus* L. (Rauf et al. 2021).

Na rozdíl od spontánní polyploidie vzniklé přirozeným výběrem, se indukovaná polyploidie dosahuje většinou pomocí působení chemických nebo fyzických mutagenů. Mezi nejčastěji používané chemické mutageny patří antimitotická činidla jako kolchicin, oryzalin nebo acetamid. Tato činidla jsou schopná inhibovat tvorbu dělicích vřetének chromozomů, což může vést ke zdvojení chromozomu. Spontánní zdvojení chromozomů může proběhnout taky v somatických buňkách rostlin, což může vést ke vzniku vegetativně množeného polyploidního organismu v přírodě.

U rostliny bobu (*Vicia faba*) z čeledi *Fabaceae* již bylo úspěšně dosaženo polyploidie, konkrétně tetraploidie (4n) s frekvencí 50 %, proto můžeme předpokládat, že u hrachu setého bude indukce polyploidie také úspěšná (Rauf et al 2021).

„Metoda *in vitro* propagace může být využita k rychlému klonování hodnotných genotypů a mutací“ (Griga et al 1986), je tak vhodná jak pro mikropropagaci kontrolních (2n) rostlin hrachu, tak pro množení polyploidních forem. Mikropropagace rostlin probíhá na kultivačním médium MS ve sterilním prostředí.

Technika *in vitro* meristémové kultivace pro *P. sativum* byla poprvé použita pro množení hrachu v roce 1974. Byla využita na příklad v boji proti zárodečným virům hrachu a studii kryokonzervaci zárodečné plazmy hrachu (Griga et. al 1986).



### 3. Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo získat autopolyloidní rostliny z diploidních rostlin ( $2n=2x=14$ ) pomocí *in vitro* indukované polyploidizace u *Pisum sativum* L.

Cíl práce byl stanoven dle následujících hypotéz:

**H1:** Oryzlin je účinné antimitotické činidlo pro polyploidizaci *P. sativum*.

**H2:** Pomocí polyploidie lze v *in vitro* kulturách získat nové genotypy *P. sativum* s rozdílnými morfologickými znaky.

## **4. Materiál a metodika**

### **4.1 Rostlinný materiál**

Jako výchozí materiál byly použity rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* L.) pocházejícího z Bolívie udržovaného v *in vitro* podmínkách v laboratoři rostlinných explantátů fakulty tropického zemědělství. Byly vybrány dva kultivary, které byly pro pokus označeny PS1 a PS2.

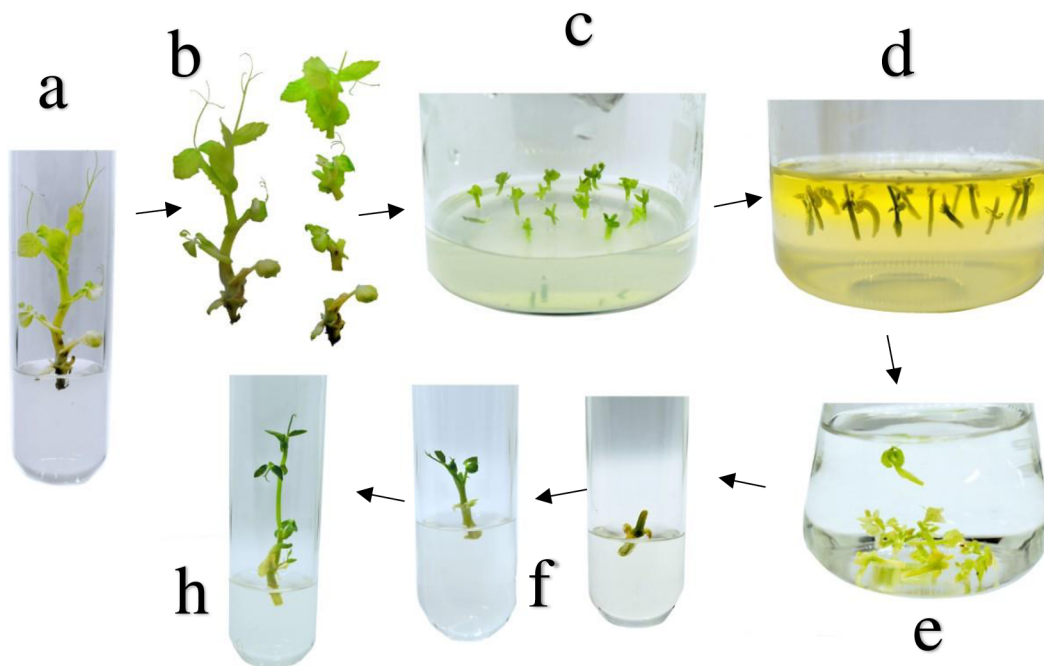
Pokus byl proveden na *P. sativum*, protože plní důležitou roli ve výživě lidí a zvířat, především díky vysokému obsahu bílkovin a vitamínů. Pomocí *in vitro* kultivace a biotechnologických metod lze zkoumat a ovlivnit vlastnosti jako výnos, morfologii, fyziologii rostliny a další.

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Indukce polyploidie

Pro indukci polyploidie u nodálních segmentů v podmínkách *in vitro* bylo použito antimitotické činidlo oryzalin. Oryzalin je dostupné a účinné antimitotické činidlo. Spolu s kolchiacinem a dalšími je v poslední době často úspěšně využíván k účelu indukce polyploidie (viz. kapitola 2.8). K přípravě bylo naváženo 0,0345 g oryzalinu a rozpuštěno v 10 ml rozpouštědla dimethylsulfoxidu (DMSO) ve sterilní zkumavce.

Z aseptických kultur PS1 a PS2 byly tedy odebrány nodální segmenty a ty byly vystaveny působení oryzalinu. Po té byly tyto nodální segmenty opláchnuty ve sterilní destilované vodě a vloženy do kultivačního MS media, aby zregenerovaly.



**Obrázek 3:** Grafické schéma získávání autopolyploidních rostlin *P. sativum* L. v *in vitro*: a) diploidní rostlina ( $2n=2x=14$ ) pěstovaná *in vitro* b) získání nodálních segmentů (1-1,5 cm) c) kultivace nodálních segmentů d) aplikace oryzalinu – antimitotické činidlo ( $100 \mu\text{M}$  po dobu 24 a 48 hodin) e) mytí nodálních segmentů sterilní destilovanou vodou f) kultivace tetraploidních nodálních segmentů ( $24n=4x=28$ ) g) úplná regenerace tetraploidní rostliny h) úplná regenerace tetraploidní rostliny

#### 4.2.2 Stanovení úrovně ploidie

Úroveň polyploidie byla stanovena pomocí průtokové cytometrie. Po té co rostliny ovlivněné působením oryzalinu zregenerovaly, byly pasážovány a po cca třech kultivace na MS mediu byl odebrán vzorek z listu ovlivněných rostlin. Vzorek byl dále nasekán žiletkou za účelem rozrušení buněčné stěny a vložen do Petriho misky obsahující 500  $\mu\text{M}$  Ottova I pufru (0,1 M  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  0,5 % Tween 20). Tyto vzorky obsahující izolovaná jádra byly dále přefiltrovány přes 50  $\mu\text{M}$  sítku do zkumavek. Do těchto zkumavek byl přidán 1 ml Ottova II pufru (0,4 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 12 \text{H}_2\text{O}$ ), který obsahoval fluorescenční barvivo DAPI v koncentraci 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Měření míry ploidie probíhala za relativní intenzity fluorescence alespoň 3000 jader a byla zaznamenána pomocí průtokového cytometru Partec PAS vybaveného obloukovou vysokotlakou rtuťovou lampou. Získané histogramy byly vyhodnoceny pomocí softwarového balíku Flomax.

#### 4.2.3 Morfologické hodnocení polyploidů

Z důvodu lepší regenerace při mikro propagaci byly hodnoceny pouze genotypy získané z rostliny PS1. Byly hodnoceny morfologické rozdíly na úrovni *in vitro* mezi rostlinami polyploidními a diploidními. Sledované vlastnosti byly výška rostlin (resp. délka nejdelšího výhonu), počty nodů a délky internodií. Mimo to byly sledovány také délka a počet kořenů. Po ukončení kultivace byly rostliny vyjmuty ze zkumavek a ještě kontrolně změřeny všechny parametry a průměru stonku.

Data byla získávána po dobu 40 dní v intervalech 10 dní ( $\pm 1$  den). Výsledky byly poté zpracovány pomocí tabulkového procesoru Microsoft Excel do grafů a tabulek.

#### 4.2.4 Statistické hodnocení

Za pomoci programu Statistica byla hodnocena data nasbíraná při posledním měření mimo zkumavky statistickou operací Mann-Whitney U-test na hladině významnosti  $p=0,05$ . Bylo určeno zda jsou morfologické rozdíly mezi tetraploidními a diploidními rostlinami statisticky významné.

## 5. Výsledky a diskuze

Při mikropropagaci byly na úrovni *in vitro* hodnoceny následující parametry; výška rostliny, počet nodů, délka internodií, počet a délka kořenů. Po té byly vyjmuty z *in vitro* prostředí a byl změřen ještě průměr stonku. Mimo to bylo hodnoceno také procento regenerace po moření oryzalinem a úspěšnost indukce polyploidie. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulkách 1, a grafech

Protože není mnoho dostupných studií o indukci polyploidie nebo morfologii a růstu *P. sativum* v *in vitro*, nebylo možné u některých výsledků provést diskuzi, nebo byla provedena s jiným druhem.

### 5.1 Indukce polyploidie

Dohromady bylo oryzalinu vystaveno 120 rostlin, z nichž regenerovalo 44 (56,7 %). Celkem bylo získáno 8 polyploidních rostlin (úspěšnost 6,7 %), které byly dále množeny, měřeny a porovnávány s diploidními rostlinami. Výsledky indukce polyploidie jsou shrnuty v tabulce 1.

Rauf et al. (2021) ve své práci uvádí, že u rostliny bobu (*Vicia faba*) z čeledi *Fabaceae* již bylo úspěšně dosaženo polyploidie, konkrétně tetraploidie ( $24n=4x=28$ ) s frekvencí 50 %. Což je mnohem vyšší úspěšnost, než jaká byla dosažena u *P. sativum*. Důvodem může být jiný postup při indukci polyploidie a to konkrétně vystavení semen rostliny působení kolchicinu v koncentraci 0.005 % po 8 hodin. Dalším důvodem mohl být i fakt, že rostliny bobu nebyly pěstovány *in vitro*, ale v květináčích se substrátem.

Ve stejné práci (Rauf et al. 2021) je také uveden případ *Pennisetum purpureum* × *Pennisetum glaucum*, kde byla provedena indukce pomocí 0.1 % roztoku kolchicinu v podmínkách *in vitro* s úspěšností indukce u 17 rostlin ze 480, což je blíž k výsledku i podmínkám této práce.

**Tabulka 1:** Vliv působení oryzalinu v koncentraci 100 $\mu$ M na nodální segmenty v *in vitro* podmínkách na míru přežití a počet polyploidů u *P. sativum*

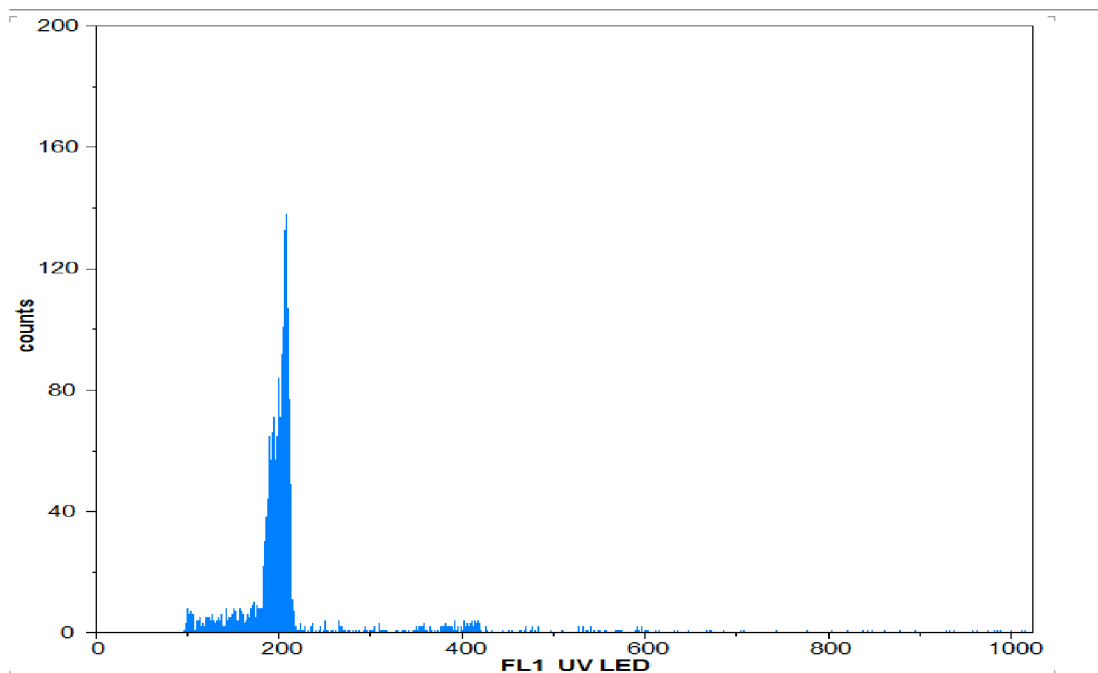
Genotyp	Doba působení (hodin)	Počet rostlin	Počet rostlin po ukončení pokusu	Míra přežití (%)	Počet tetraploidních rostlin	Účinnost polyploidizace (%)
PS1	24	40	23	57,5	1	2,5
	48	40	18	45,0	2	5
PS2	24	40	21	52,5	2	5
	48	40	15	37,5	3	7,5
<b>celkem</b>		120	68	56,7	8	6,7

**Autor:** Vlastní zpracování autora (2023)

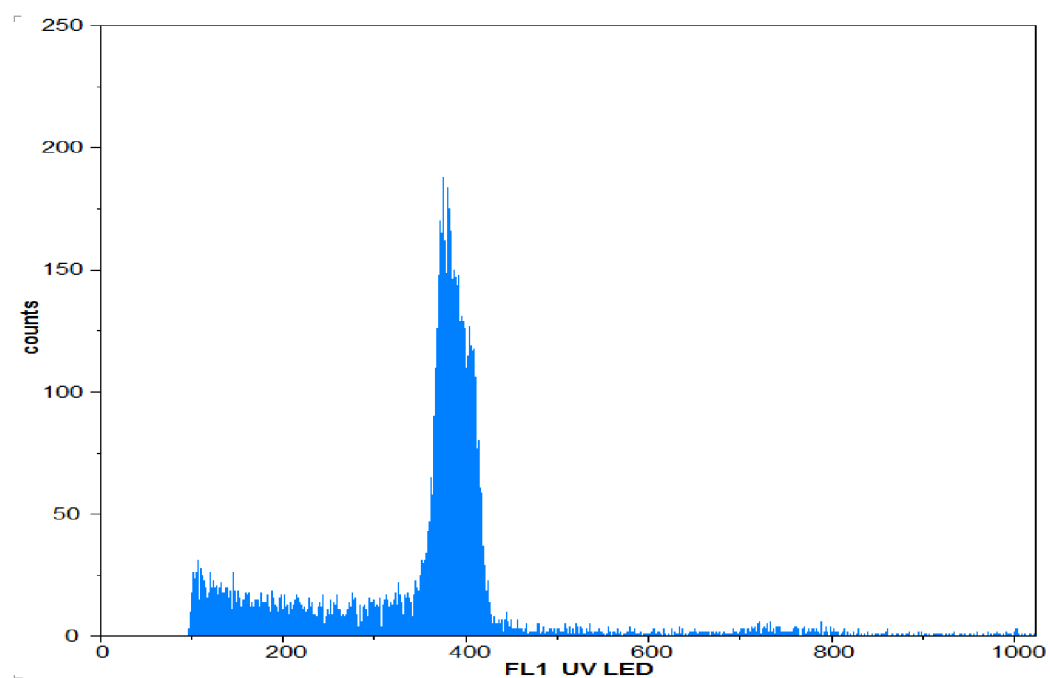
## 5.2 Stanovení úrovně ploidie

Úroveň ploidie byla stanovena pomocí průtokové cytometrie. K zobrazení bylo využito fluorescenční barvivo DAPI v koncentraci 2 $\mu$ g/ml a měření probíhala za relativní intenzity fluorescence alespoň 3000 jader. Získaná data byla vyhodnocena pomocí softwarového balíku flowmax.

U tetraploidních rostlin zobrazil histogram dvojnásobnou hustotu DNA (graf 1) než u kontrolních diploidů (graf 2).



**Graf 1:** Histogram ukazující obsah DNA v buňkách u kontrolní rostliny PS2 – vrchol na kanálu 200 odpovídá jádrům kontrolní rostliny



**Graf 2:** Histogram ukazující DNA v buňkách u tetraploidní rostlin PS2 – vrchol na kanálu 400 odpovídá jádrům tetraploidní rostliny po působení oryzalinu

### 5.3 Morfologické a statistické hodnocení polyploidů

Z důvodu lepší regenerace při mikro propagaci byly hodnoceny pouze genotypy získané z rostliny PS1. 40 nodálních segmentů bylo kultivováno na MS mediu bez růstových regulátorů. Při kultivaci bylo prováděno pravidelné měření jednou za 10 dní ( $\pm 1$  den). Z naměřených dat v průběhu růstu byly sestaveny grafy 1, 2 a 3. Rostliny byly kultivovány po dobu 40 dní. Následně byly vyjmuty ze zkumavek, fotograficky zdokumentovány a morfologicky hodnoceny.

Při závěrečném měření byly vyřazeny extrémní rostliny pro zvýšení síly statistických testů. Vyřazena byla rostlina, která jako jediná zakořenila a prosperovala nesrovnatelně lépe vůči zbytku. Dále byly vyřazeny rostliny, které po zahájení pokusu nezregenerovaly.

Výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí Mann-Whitneyových U-testů na hladině významnosti  $p=0,05$  a jsou shrnuty v tabulce 2.

**Tabulka 2:** vliv polyploidie na regeneraci nodálních segmentů *Pisum sativum* L.

Genotyp	Výška rostliny [mm] $p=0,2949$	Počet nodů $p=0,7934$	Délka snodí [mm] $p=0,1064$	Průměr stonku [mm] $p=0,000017$
Tetraploid	$32,87 \pm 7,45^a$	$3,27 \pm 0,7^a$	$5,47 \pm 1,68^a$	$1,48 \pm 0,149^a$
Diploid	$38,79 \pm 12,54^a$	$3,57 \pm 0,64^a$	$7,43 \pm 2,82^a$	$1,2 \pm 0,114^b$

Hodnoty, které se od sebe podle Mann-Whitney U-testu průkazně neliší jsou označeny stejným písmenem <sup>a</sup>

**Autor:** Vlastní zpracování autora (2023)

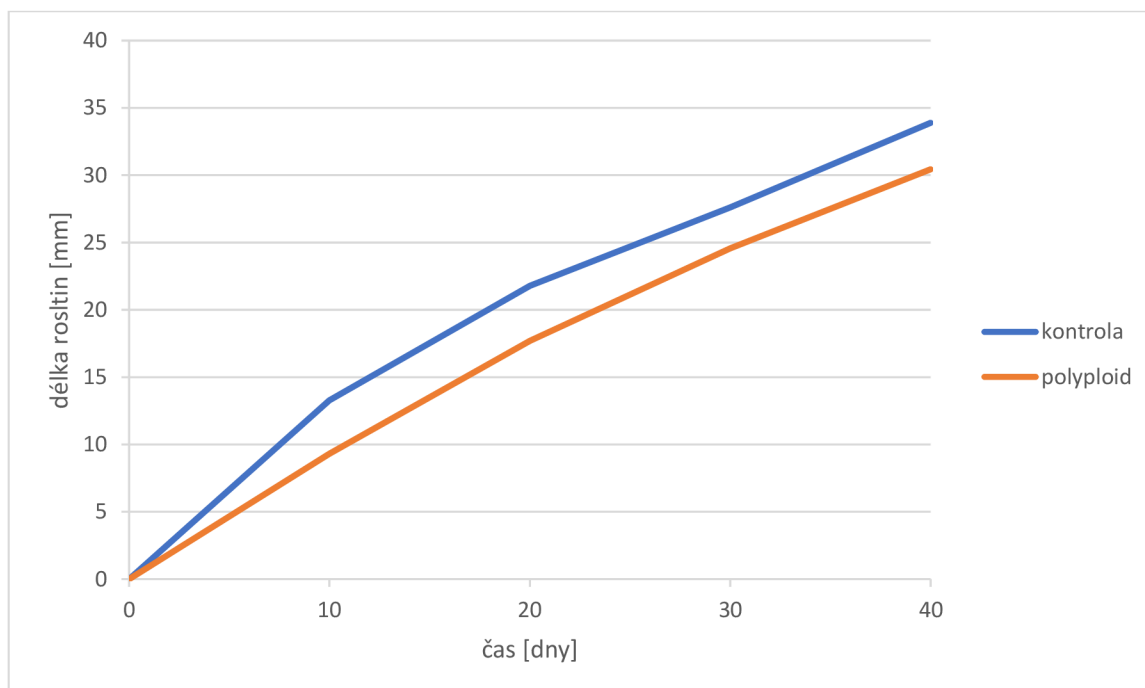


### 5.3.1 Vliv polyploidie na výšku rostlin

Vyšší průměrná výška byla zaznamenána u kontrolních rostlin ( $38,79\text{mm} \pm 12,54$ ). Při prvních měřeních byl rozdíl nepatrný, ale během posledních měření již bylo znát, že diploidní rostliny rostou více do délky proti tetraploidním, které měli tendenci být robustnější (viz. graf 3). Byl také zpozorován jev, při kterém spodní listy diploidních rostlin s rostoucí výškou rostliny začaly strádat. Tento jev se u polyploidních rostlin se stejným počtem nodů téměř nevyskytoval (viz obrázek č. 3). Rozdíl však nebyl prokázán dle Mann-Whitney U-testu. Hladina významnosti byla na hodnotě  $p=0,29$ .

Howell a Skoog (1955) při výzkumu vlivu přídavku adeninu do kultivačního media pěstovali hrách v *in vitro* podmínkách. Při dosažení 40 dní však dosahovali výrazně nižších průměrných hodnot výšky rostlin (8.1 mm po 60 dnech). To bylo pravděpodobně dáno použitím Whiteova media jako základního živného media. Toto medium obsahuje méně dusíkatých látek a tím pádem nestimuluje růst jako MS medium. Dalším důvodem mohlo být také použití *P. sativum* var. 'Alaska'. Mimo to je důležité zohlednit stáří práce. Sám autor Skoog je jedním z vynálezců MS (Murashige and Skoog) media, které bylo použito v této práci o polyploidizaci.

**Graf 3: vliv polyploidie na výšku rostlin**



**Autor:** Vlastní zpracování autora (2023)



**Obrázek 4:** vlevo tetraploidní rostlina, vpravo kontrolní diploidní rostlina *P. sativum*

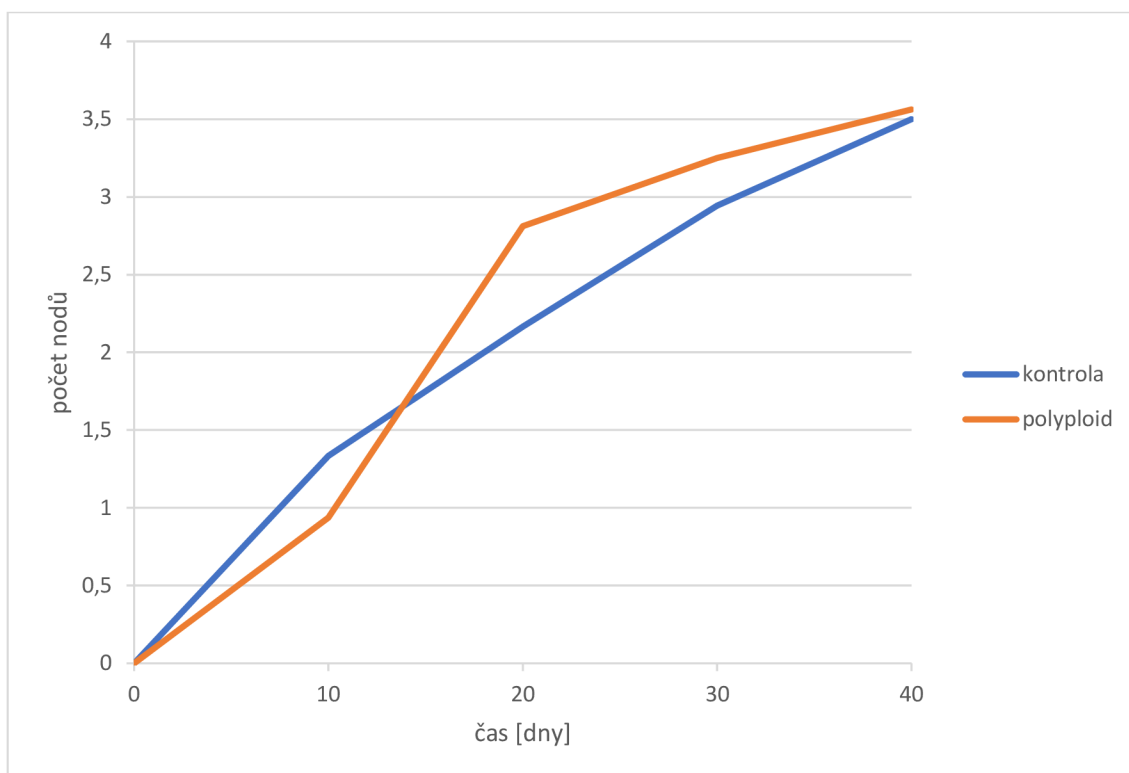
**Autor:** Vlastní zpracování autora (2023)

### 5.3.2 Vliv polyploidie na počet nodů

Vyššího průměrného počtu nodů dosáhly rostliny kontrolní ( $3,57 \pm 0,63$ ). Rozdíl byl však nepatrný a statisticky neprůkazný ( $p = 0,7934$ ). Statistické šetření však bylo oslabeno z důvodu pouze 3 vyskytujících se hodnot (2, 3 a 4). Medián jak polyploidů, tak kontrolních rostlin byl 3, což podporuje neprůkaznost testu. Žádný výrazný rozdíl nebyl ani znatelný během růstu. Je však možné, že při rozsáhlejší výzkumu by se rozdíl mohl prokázat.

Protože neexistují studie zabývající se polyploidní formou *P. sativum*, nebylo možné provést diskuzi na toto téma. Bohužel nejsou ani dostupné studie o měření počtu nodů *P. sativum* v *in vitro*.

**Graf 4: vliv polyploidie na počet nodů**



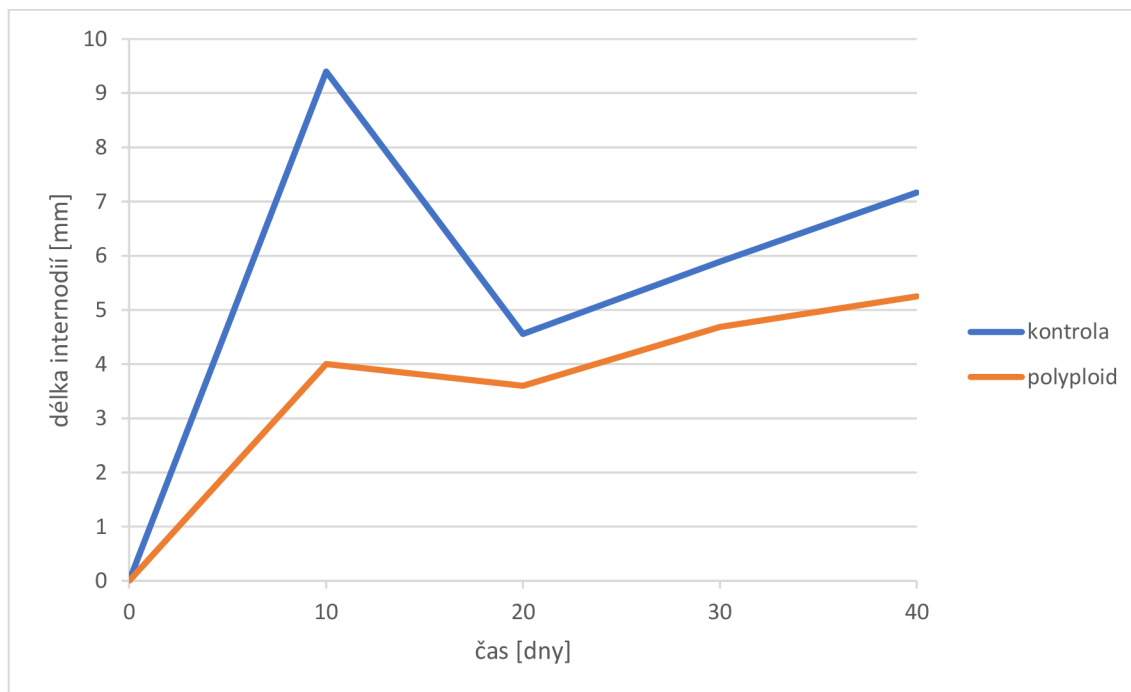
**Autor:** Vlastní zpracování autora (2023)

### 5.3.3 Vliv polyploidie na délku internodií

Vyššího průměru dosáhly rostliny kontrolní ( $7,43 \text{ mm} \pm 2,82 \text{ mm}$ ). Na začátku měření byly hodnoty obou genotypů značně vyšší, protože pokud rostlina měla alespoň 2 nody, byly značná část celé délky rostliny (viz. graf 5). Po asi dvou týdnech kultivace *in vitro* měla už většina rostlin více než 2 nody. V takovém případě byly měřeny ty internodia, která nejlépe reprezentovala průměrnou délku internodií konkrétní rostliny. Statistický test sice neprokázal rozdíl mezi rostlinami kontrolními a polyploidními, ale hodnota  $p = 0,1064$  se velmi přiblížila hladině významnosti  $p = 0,05$ . Přestože statistický test nebyl průkazný, rozdíly byly zřejmé; kontrolní rostliny měly výrazně delší internodia (viz. obrázek č. 4).

Protože neexistují studie zabývající se polyploidní formou *P. sativum*, nebylo možné provést diskuzi na toto téma. Bohužel nejsou ani dostupné studie o měření internodií *P. sativum* v *in vitro*.

**Graf 5: vliv polyploidie na délku internodií**



**Autor:** Vlastní zpracování autora (2023)



**Obrázek 5:** rozdíl mezi internodii; vlevo polyploidní rostlina, vpravo diploidní

**Autor:** Vlastní zpracování autora (2023)

#### 5.3.4 Vliv polyploidie na počet a délku kořenů

Při kultivaci hrachu na MS mediu bylo obecně neobvyklé, že by rostliny zakořenily. Během pokusu se tak stalo pouze u jedné kontrolní diploidní rostliny, to je však statisticky nevýznamné a nemůžeme z takového výsledku dělat závěry o rozdílech mezi polyploidními a diploidními rostlinami.

## 6. Závěr

Předložení práce byla věnována indukci polyploidie *Pisum sativum* L. a hodnocení morfologických rozdílů mezi tetraploidními a diploidními rostlinami *in vitro*.

Metoda *in vitro* indukované polyploidie byla dle dostupných zdrojů použita poprvé u *P. sativum* a její pomocí byly získány autotetraploidní rostliny.

Oryzalin se jeví jako vhodné antimitotické činidlo pro indukci polyploidie u *P. sativum* v *in vitro* podmínkách. Přesto bude potřeba otestovat jiné koncentrace oryzalinu pro zvýšení efektivity indukce polyploidie. *In vitro* hodnocení dokázalo morfologické rozdíly mezi diploidními a tetraploidními rostlinami, což potvrzuje hypotézu H2.

Nově získané genotypy bude nutné převést do *ex vitro* a v těchto podmínkách je dále sledovat. Také bude za potřebí hodnotit jejich morfologické a nutriční vlastnosti.

Nově získané genotypy zvyšují variabilitu *P. sativum* a mohou být použity jako nový genetický materiál k dalším šlechtitelským účelům.

## 7. Reference

- Kočař F. 2009. Srovnání biologické hodnoty bílkovin u vybraných luštěnin [diplomová práce]. Univerzita Tomáše Bati, Zlín.
- Graman J, Čurn V. 1998. Šlechtění zemědělských plodin (obilobí, luskoviny). Jihočeská univerzita, České Budějovice.
- Tvrzníková E. 2014. Polyploidie v evoluci rostlin a její důsledky [bakalářská práce]. Masarykova univerzita, Brno.
- Griga M, Tejklová E, Novák F J, Kubalíková M. 1986. In vitro clonal propagation of *Pisum sativum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **6**:95-104
- Rauf S, Ortiz R, Malinowski D, Clarindo W, Kainat W, Shahzad M, Waheed, U, Hassan S. (2021). Induced Polyploidy: A Tool for Forage Species Improvement.
- ITIS**. 2011. ITIS results of search. Available from <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt> (accessed January 2023)
- Warkentin T D et al. 2015. Pea. Pages 37-83 in De Ron A M. Grain Legumes. Springer New York, New York.
- Simpson M G. 2010. Plant systematics. Elsevier Academic Press, Burlington
- FAO. 2021. FAOSTAT: Production – Crop production. FAO, Rome. Available from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (accessed January 2023)
- Schaefer H, Hechenleitner P, Santos-guerra A, Menezes De Sequeira M, Pennington R T, Kenicer G, Carine M A. 2012. Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabeae with special focus on the middle-Atlantic island lineages. BMC Evolutionary Biology, **12**: 250.
- Chrtíková A. 1995. Pisum L. - hrách. Pages 437-438 in Slavík B editors. Květena České republiky 4. Academia, Praha.
- Ladizinsky G, Abbo S. 2015. The Search for Wild Relatives of Cool Season Legumes. Springer, Heidelberg.
- Houba M, Dostálová R, Hýbl M. 2009. Luskoviny: pěstování a využití. Kurent, České Budějovice.
- ÚKZÚZ. 2022. ÚKZÚZ: Seznam registrovaných odrůd 2022. Available from <https://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/odrudy/informace-o-odrudach/odrudy-registrovane-v-cr/seznam-odrud/> (accessed January 2023)

ÚKZÚZ. 2023. ÚKZÚZ: Seznam registrovaných odrůd 2022. Available from <https://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/odrudy/seznam-doporucenych-odrudy/x2023/listovky/> (accessed January 2023)

Smýkal P et al. 2012. Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era. *Agronomy*. **2**(2): 74-115.

NutriPro. 2020. Databáze potravin. Available from <https://nutridata.cz/potravin/> (accessed February 2023)

Graman J, Čurn V. 1998. Šlechtění rostlin. Jihočeská univerzita, České Budějovice.

Becker F W. 2021. The gigas effect: A reliable predictor of ploidy? Case studies in Oxalis. [MSc. Thesis]. Stellenbosch University, Stellenbosh.

Howell R W, Skoog F. 1955. Effect of Adenine and Other Substances on Growth of Excised *Pisum* Epicotyls Cultured *in Vitro*. *American Journal of Botany* **42**(4):356-360. Available from <https://www.jstor.org/stable/2438740> (accessed March 2023).



