

Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra buněčné biologie a genetiky



Geografická a genetická distribuce alel *accD/bccp* genů  
podmiňujících jaderně-cytoplazmatický konflikt  
u hrachu (*Pisum* sp.)

Diplomová práce

Bc. Eliška Nováková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

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

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů, pod vedením pana doc. Ing. Petra Smýkala, Ph.D.

V Olomouci .....

.....

Eliška Nováková

## SOUHRN

Teoretická část diplomové práce na téma „Geografická a genetická distribuce alel *accD/bccp* genů podmiňujících jaderně-cytoplazmatický konflikt u hrachu (*Pisum* sp.)“ se zabývá inkompatibilitou u rostlin. Nejprve je zmíněna autoinkompatibilita, kterou dělíme na homomorfickou a heteromorfickou a dále pak na sporofytickou a gametofytickou. Poté je popsána inkompatibilita u hybridů se zaměřením na jaderně-cytoplazmatický konflikt, a to především u hrachu (*Pisum* sp.)

Experimentální část se zaměřuje na analýzu alel genů *accD* a *bccp*, které souvisí s jaderně-cytoplazmatickým konfliktem u hrachu. Byla provedena izolace DNA a RNA, reverzní transkripce, PCR amplifikace, elektroforetická separace a sekvenační analýza. Byla zkoumána alelická diverzita obou genů, které kombinace se vyskytují v přírodě a jaká je jejich geografická distribuce.

## SUMMARY

The theoretical part of this master's thesis "Geographical and genetic distribution of *accD/bccp* genes involved in nucleo-cytoplasmic conflict in pea (*Pisum* sp.)" focuses on incompatibility in plants. Firstly, the self-incompatibility is mentioned, which can be divided into a homomorphic and a heteromorphic self-incompatibility and subsequently into a sporophytic and a gametophytic self-incompatibility. Then the issue of hybrid incompatibility is described focusing mainly on the nucleo-cytoplasmic conflict in pea (*Pisum* sp.).

In the experimental part, alleles of *accD* and *bccp* genes associated with the nucleo-cytoplasmic conflict were examined. DNA and RNA isolation, reverse transcription, PCR amplification and gel electrophoresis and sequencing analysis of both genes were performed. The allelic diversity was explored to determine which allelic combinations of *accD/bccp* genes occur in nature and to identify their geographic patterns.

### **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala doc. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D za jeho odborné vedení, trpělivost a cenné rady při vypracování této diplomové práce. Mé poděkování patří také ostatním pracovníkům Katedry botaniky PřF UP, se kterými jsem se během práce setkala. Práce byla částečně financována z projektu Interní grantové agentury Univerzity Palackého IGA 2018\_001 a IGA 2019\_004.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	CÍLE PRÁCE .....	3
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	4
3.1	Autoinkompatibilita .....	4
3.1.1	Heteromorfická a homomorfická inkompatibilita.....	5
3.1.2	Gametofytická inkompatibilita.....	5
3.1.3	Sporofytická inkompatibilita.....	7
3.2	Inkompatibilita hybridů .....	8
3.2.1	Sterilita hybridů.....	9
3.2.2	Letalita hybridů .....	9
3.3	Jaderně-cytoplazmatický konflikt.....	9
3.3.1	Cytoplazmatická samčí sterilita .....	10
3.3.2	Konflikt jaderného a plastidového genomu .....	11
3.4	Jaderně-cytoplazmatický konflikt u hrachu ( <i>Pisum</i> sp.).....	12
4	MATERIÁL A METODY .....	15
4.1	Biologický materiál.....	15
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	18
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení .....	20
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	21
4.4.1	Gen <i>accD</i> .....	21
4.4.1.1	Izolace genomové DNA .....	21
4.4.1.2	PCR amplifikace DNA .....	21
4.4.2	Gen <i>bccp</i> .....	23
4.4.2.1	Izolace RNA .....	23
4.4.2.2	Měření koncentrace RNA .....	24
4.4.2.3	Reverzní transkripce .....	24
4.4.2.4	PCR amplifikace cDNA .....	24
4.4.3	Elektroforetická separace .....	26
4.4.4	Sekvenování .....	27
4.4.5	Bioinformatická analýza .....	27
5	VÝSLEDKY .....	28
5.1	Izolace RNA a RT-PCR.....	28

5.2	Sekvenční a bioinformatická analýza .....	29
5.2.1	Analýza <i>accD</i> genu .....	29
5.2.2	Analýza <i>bccp</i> genu .....	33
5.2.3	Kombinace alel <i>accD/bccp</i> .....	36
5.2.4	Geografická distribuce alel <i>accD/bccp</i> .....	38
5.2.5	Analýza populací.....	39
6	DISKUSE.....	43
7	ZÁVĚR.....	46
8	LITERATURA.....	47
9	PŘÍLOHY.....	58

## **SEZNAM ZKRATEK**

ACC – acetyl-CoA karboxyláza

BC – biotin karboxyláza

BCC – biotin karboxyl carrier protein

cDNA – komplementární DNA

CMS – cytoplazmatická samčí sterilita

CoA – koenzym A

GSI – gametofytická autokompatibilita

mRNA – mediátorová RNA

ORF – otevřený čtecí rámec

PPR – pentatricopeptide repeat

rpm – otáčky za minutu

RT-PCR – reverzní transkripce

Rubisco – ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza

SCR – S lokus na cystein bohatý protein (S locus cysteine-rich protein)

SI – autoinkompatibilita

SNP – jednonukleotidový polymorfismus

sp. – druh (species)

SRK – S lokus receptor kináza

SSI – sporofytická autoinkompatibilita

var. – odrůda (variety)

$\alpha$ -CT –  $\alpha$ -podjednotka karboxyltransferázy

$\beta$ -CT –  $\beta$ -podjednotka karboxyltransferázy



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1:</b> Schématické rozdělení autoinkompatibility; uvedeny jsou čeledi rostlin, pro něž je daný druh inkompatibility typický. (Upraveno podle: Tao <i>et</i> Iezzoni, 2010).....	4
<b>Obr. 2:</b> Schématické znázornění postavené pestíků a tyčinek při distylii (A) a tristylii (B). (Upraveno podle: Barrett, 1990).....	5
<b>Obr. 3:</b> Schématické zobrazení gametofytické inkompatibilní reakce, která je řízena interakcí S alel pylového zrna a pestíku. (Upraveno podle: Silva <i>et</i> Goring, 2001) .....	6
<b>Obr. 4:</b> Schématické zobrazení sporofytické inkompatibilní reakce, která je řízena interakcí kodominantních S alel somatického pletiva tyčinky a pestíku. (Upraveno podle: Silva <i>et</i> Goring, 2001) .....	7
<b>Obr. 5:</b> Rostliny s příznaky odpovídajícími jaderně-cytoplazmatickému konfliktu. (Převzato z: Bogdanova <i>et al.</i> , 2009).....	12
<b>Obr. 6:</b> (A) Schéma heteromerní acetyl-CoA karboxylázy. (B) Schéma homomerní acetyl-CoA karboxylázy. (Upraveno podle: Nikolau <i>et al.</i> , 2003).....	14
<b>Obr. 7:</b> Alignment všech aminokyselinových sekvencí alel <i>accD</i> , znázorňující jejich variabilitu.....	32
<b>Obr. 8:</b> Fylogenetický konsenzuální strom pro <i>accD</i> gen. ....	32
<b>Obr. 9:</b> Alignment všech aminokyselinových sekvencí alel <i>bccp</i> , znázorňující jejich variabilitu.....	35
<b>Obr. 10:</b> Fylogenetický konsenzuální strom pro <i>bccp</i> gen. ....	36
<b>Obr. 11:</b> Všechny identifikované kombinace alel <i>accD</i> a <i>bccp</i> .....	37
<b>Obr. 12:</b> Výskyt kombinací alel v rámci jednotlivých druhů .....	38
<b>Obr. 13:</b> Mapa geografické distribuce <i>accD</i> a <i>bccp</i> alel sestavená s použitím vyšších skupin v oblasti okolo Středozemního moře .....	39
<b>Obr. 14:</b> Alignment všech nukleotidových sekvencí genu <i>accD</i> jednotlivých rostlin populací z východního Turecka a Maďarska .....	41
<b>Obr. 15:</b> Alignment všech aminokyselinových sekvencí genu <i>accD</i> jednotlivých rostlin populací z východního Turecka a Maďarska .....	41

## SEZNAM TABULEK

<b>Tab. 1:</b> Seznam vzorků, jejich taxonomické zařazení, země původu a zdroj I.....	15
<b>Tab. 2:</b> Seznam vzorků, jejich taxonomické zařazení, země původu a zdroj II .....	16
<b>Tab. 3:</b> Seznam vzorků, jejich taxonomické zařazení, země původu a zdroj III .....	17
<b>Tab. 4:</b> Seznam primerů použitých pro PCR amplifikaci genů <i>accD</i> a <i>bccp</i> .....	18
<b>Tab. 5:</b> Příprava reakční směsi pro PCR amplifikaci s Phire polymerázou.....	22
<b>Tab. 6:</b> Nastavení časového a teplotního průběhu PCR reakce s Phire polymerázou .....	22
<b>Tab. 7:</b> Příprava reakční směsi pro PCR amplifikaci s Taq polymerázou .....	25
<b>Tab. 8:</b> Nastavení časového a teplotního průběhu PCR reakce s Taq polymerázou.....	26
<b>Tab. 9:</b> Příprava reakční směsi pro purifikaci PCR produktu před sekvenováním.....	27
<b>Tab. 10:</b> Koncentrace vyizolované RNA a její ředění pro reverzní transkripci.....	28
<b>Tab. 11:</b> Rozdělení vzorků podle příslušnosti do <i>accD</i> alel .....	30
<b>Tab. 12:</b> Rozdělení vzorků podle příslušnosti do <i>bccp</i> alel .....	34
<b>Tab. 13:</b> Analýza jednonukleotidových polymorfismů pro vzorky z východního Turecka a Maďarska.....	40

# 1 ÚVOD

Pro zachování jakéhokoliv organismu je naprosto nezbytná schopnost rozmnožování. Rostliny jsou schopny pohlavního i nepohlavního rozmnožování. Většina vyšších rostlin se rozmnožuje pohlavně, přičemž je podstatné střídání pohlavního (haploidního) gametofytu a nepohlavního (diploidního) sporofytu. V diploidním sporofytu dochází za pomoci meiózy k produkci haploidních spor, ze kterých poté vyrůstá gametofyt. Na něm pak mitózou dochází k tvorbě gamet, které po splynutí tvoří diploidní zygotu, jež se vyvíjí v embryo uložené v semeni (Strasburger, 1894; Valero *et al.*, 1992; Holsinger, 2000). U rostlin může dojít buď k samosprášení, kdy splývají samčí a samičí gamety téže rostliny (Darwin, 1876; Campbell, 1986) což v důsledku vede geneticky k homozygotnosti, a nebo k cizosprášení podporující heterozygotnost a v důsledku pak větší variabilitu (Knight, 1799; Lloyd *et al.*, 1992). Pohlavní rozmnožování je důležité z důvodu rekombinace a náhodné segregace otcovských a mateřských chromozomů do pohlavních buněk (Holsinger, 2000).

Kromě pohlavního rozmnožování rostliny vykazují i rozmnožování nepohlavní, vegetativní. Takto se rostliny rozmnožují pomocí pupenů, šlahounů, oddenků či hlíz (Holsinger, 2000). Při nepohlavním rozmnožování dochází k vzniku nového jedince, který je genotypově shodný s jedincem, z něhož vznikl. Takto geneticky stejně vybaveného jedince pak můžeme nazývat klonem (De Meeûs *et al.*, 2007). Podobně funguje také apomixie, při které jsou sice vyvinuty pohlavní orgány rostlin, nicméně nedochází ke splynutí samčí a samičí gamety a nový organismus je identický s organismem mateřským (Richards, 2003). Protože při vegetativním rozmnožování nedochází ke splynutí gamet, je považováno za primitivnější. Genotypová variabilita populací, jejíž jedinci se takto rozmnožují, je nižší, než kdyby se rozmnožovali pohlavně (Holsinger, 2000).

Populace je definována jako skupina jedinců stejného druhu žijící a rozmnožující se na určitém území v určitém čase (Mayr, 1963; Tarsi *et al.*, 2012). Pokud dojde k rozdělení takovéto populace tak, že určitá skupina jedinců se začne vyvíjet samostatně a je reprodukčně oddělena, mluvíme o speciaci, tedy o vzniku nového biologického druhu. Nejčastěji rozlišujeme speciaci alopatickou, parapatrickou a sympatrickou (White, 1968; Bush, 1975). Při alopatické speciaci dochází k rozdělení populace geografickou bariérou, čímž je tok genů velmi limitován, nebo úplně omezen. Nově vzniklé populace se tak vyvíjejí samostatně, dochází v nich k odlišným mutacím a může dojít k vytvoření reprodukční izolace, přičemž je podstatné, po jakou dobu působí geografická bariéra (Dobzhansky, 1937). Naopak parapatrická speciace, představující mezistupeň mezi speciací alopatickou a sympatrickou, se

vyznačuje tím, že subpopulace spolu sousedí, geografické bariéry nejsou úplné a je mezi nimi v malé míře umožněn nerovnoměrný tok genů (Gavrilets *et al.*, 2000; Bank *et al.*, 2012).

O sympatrické speciaci mluvíme, pokud v rámci jedné populace dojde k vzniku nových druhů například prostřednictvím adaptace části jedinců na odlišnou ekologickou niku. Není nutná přítomnost žádné geografické bariéry (Mayr, 1947).

S procesem speciace a vznikem nových druhů úzce souvisí vznik reprodukčních bariér. Tyto bariéry znemožňují tok genů, zabraňují jedincům dvou různých druhů produkovat životaschopné potomstvo, čímž udržují integritu druhu (Mayr, 1942; Baack *et al.*, 2015). Na reprodukční izolaci rostlin se podílí větší množství bariér. V základu je můžeme dělit na prezygotické, působící před vznikem samotné zygoty, a postzygotické, jež se uplatňují po jejím vzniku (Rieseberg *et Willis*, 2007). Podle Baacka *et al.* (2015) je v souvislosti s rostlinami o něco přesnější používat termíny před a poopylovací bariéra. Předopylovací mechanismy brání přenesení pylového zrna k vaječné buňce, zatímco poopylovací se uplatňují až po opylení.

## **2 CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická část**

Cílem teoretické části diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši pojednávající o jaderně-cytoplazmatickém konfliktu u rostlin.

### **Praktická část**

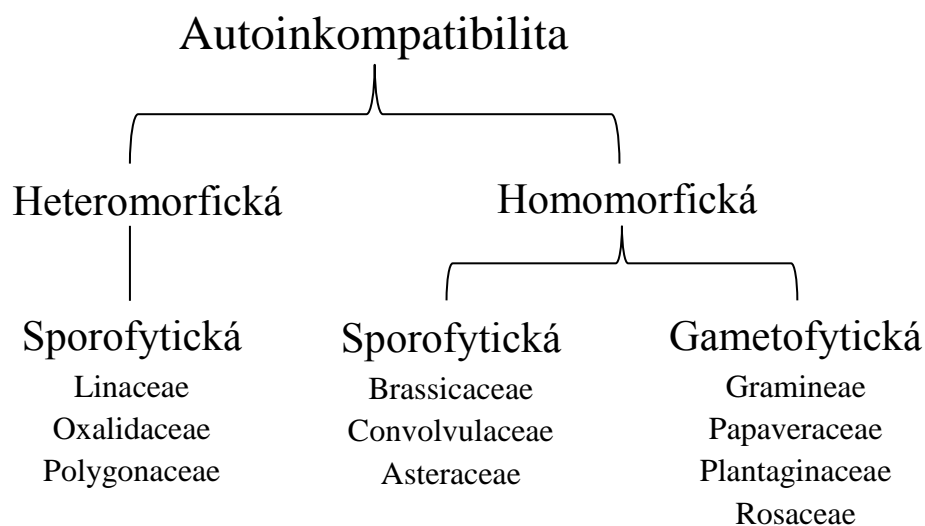
Cílem praktické části bylo provést sekvenační analýzu vybraných linií hrachu (*Pisum* sp.) pro chloroplastový gen *accD* a jaderný gen *bccp* odpovídající za jaderně-cytoplazmatický konflikt.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Autoinkompatibilita

Termín inkompatibilita u rostlin poprvé použil A. B. Stout v roce 1917 při studium fertility čekanky obecné (*Cichorium intybus* L.), kdy ji popsal jako vztah působící mezi pohlavními orgány a pohlavními buňkami rostlin (Stout, 1917). Pohlavní inkompatibilitu můžeme rozlišit na mezidruhovou, která působí v rámci odlišných druhů a vnitrodruhovou, jež se uplatňuje na úrovni jednoho druhu (Bernacchi *et* Tanksley, 1997).

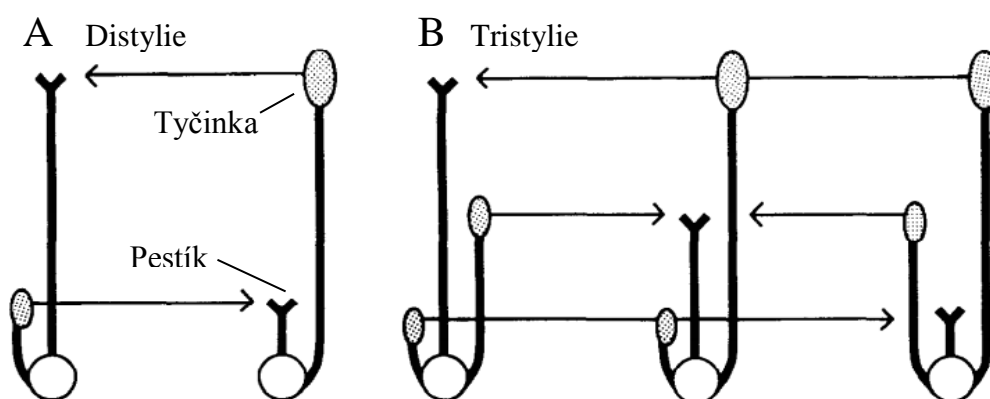
Během evoluce kvetoucích rostlin hrála velkou roli zejména autoinkompatibilita (*self-incompatibility*, SI). Jejím cílem je zabránit samosprášení rostlin, přestože produkují funkční samčí a samičí gamety (Brewbaker, 1957). Primárně autoinkompatibilitu rozdělujeme na dva druhy, a to inkompatibilitu homomorfickou a heteromorfickou, kde hlavní roli hraje morfologie květu. Při heteromorfii existují dva (dystilie), tři (tristylie) nebo více inkompatibilní morfologicky odlišné typy. Naopak u homomorfie je inkompatibilita řízena jedním nebo více S lokusem, zatímco morfologie květů je stejná (Charlesworth, 1982). Dále pak můžeme rozlišovat inkompatibilitu gametofytickou (GSI) a sporofytickou (SSI). Obě jsou vázané právě na interakci alel S lokusu (Brewbaker, 1957). Ke vzniku inkompatibilní reakce dochází, pokud spolu interaguje pylové zrno a pestík rostlin, které nesou stejnou alelu S lokusu (De Nettancourt, 1977; Dixit *et* Nasrallah, 2001).



**Obr. 1:** Schématické rozdělení autoinkompatibility; uvedeny jsou čeledi rostlin, pro něž je daný druh inkompatibility typický. (Upraveno podle: Tao *et* Iezzoni, 2010)

### 3.1.1 Heteromorfové a homomorfové inkompatibilita

O podstatě heteromorfové inkompatibilita, tedy odlišnostech ve stavbě květů rostlin stejného druhu, se zmiňoval již Darwin v roce 1877. Projevuje se především heterostylií, kdy tyčinky a pestíky jsou vzhledem k sobě jinak výškově postaveny, aby se zabránilo samooplození. Můžeme ji rozlišit na distylii (vyskytující se například u prvosenky *Primula veris* L.) a tristylii (vyskytující se například u vodního hyacintu *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms). Při prvním zmíněném případě (Obr. 2A) rostlina tvoří dva druhy květů – s dlouhým pestíkem a krátkými tyčinkami nebo dlouhými tyčinkami a krátkým pestíkem. Naopak při tristylii (Obr. 2B) mohou existovat tři druhy květů s různou kombinací postavení pestíku a tyčinek (Barrett, 1990).



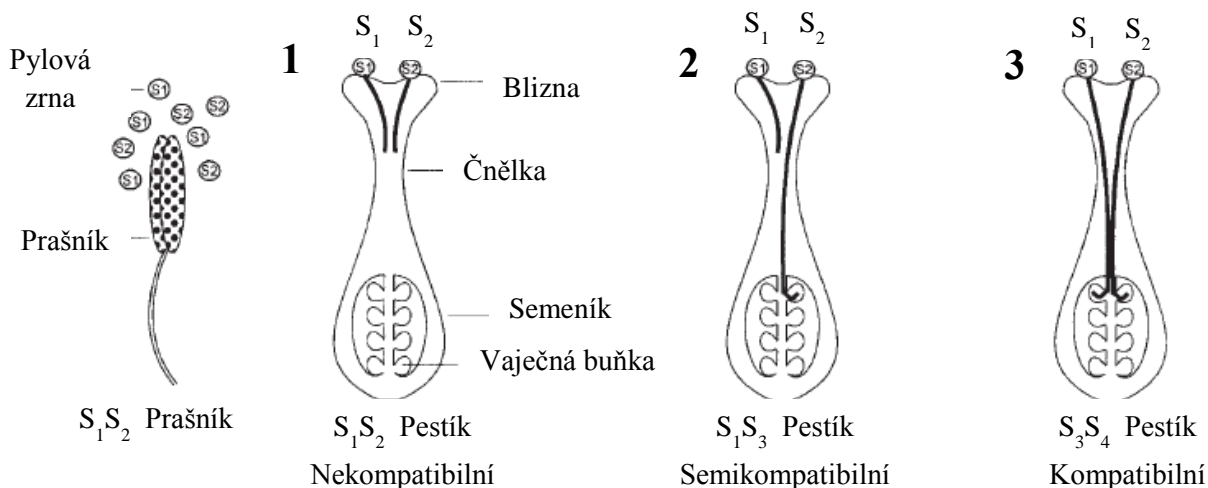
**Obr. 2:** Schématické znázornění postavení pestíků a tyčinek při distylii (A) a tristylii (B). (Upraveno podle: Barrett, 1990)

Při homomorfii nedochází k výskytu odlišných květů, jejich stavba je stejná. Samosprášení je předcházeno schopností samičího reprodukčního systému rozpoznat nekompatibilní pyl, tedy pyl vlastní nebo mu podobný. Inkompabilní reakce je řízena molekulárně, závisí na existenci S lokusu. K důležitým homomorfové inkompabilním systémům patří gametofytická a sporofytická inkompabilní (Charlesworth, 1982; Furstenu et Cartwright, 2017).

### 3.1.2 Gametofytická inkompabilní

K prvnímu objevu gametofytické inkompabilní došlo v roce 1925, když East et Mangelsdorf zkoumali sterilitu rostlin rodu *Nicotiana*. Inkompabilní reakce je řízena jedním multialelickým genem (S lokus, S alely) a je podmíněna interakcí haploidního pylu

a diploidního pestíku (čnělky; Vekemans *et* Slatkin, 1994). Při této reakci je důležité, aby došlo k rozpoznání (recognition) alelických variant a poté k případnému zabránění oplození a tvorby semene (inhibition). U GSI pylové zrna klíčí a pylová láčka začíná prorůstat čnělkou, až poté, je-li S alela pylu shodná s S alelou pestíku, je proces zastaven (Zavada *et* Taylor, 1986).



**Obr. 3:** Schématické zobrazení gametofytické inkompatibilní reakce, která je řízena interakcí S alel pylového zrna a pestíku. (Upraveno podle: Silva *et* Goring, 2001)

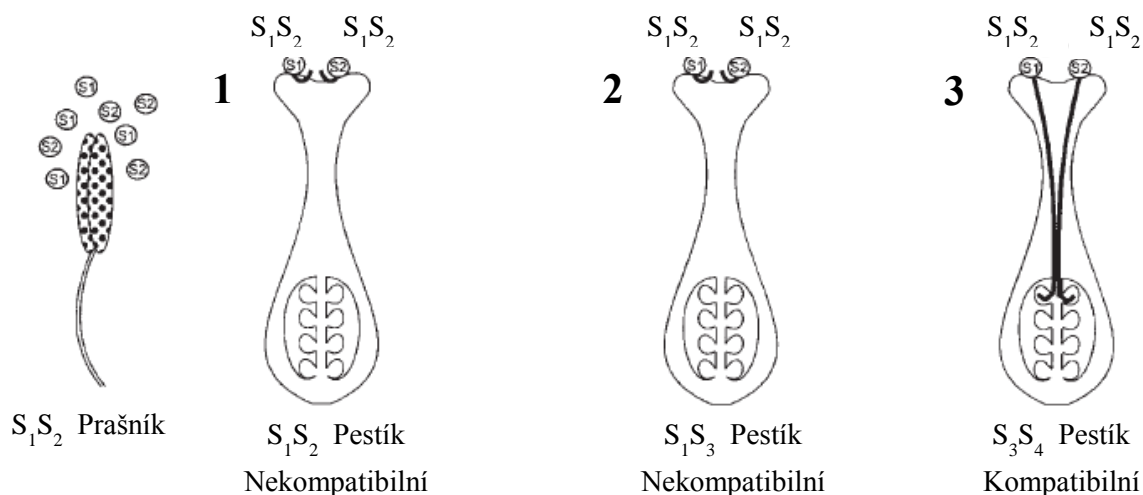
V prvním případě mají pylová zrna stejné S alely jako pestík, klíčení pylové láčky je tedy zastaveno. V případě druhém, kdy pestík nese alely S<sub>1</sub> a S<sub>3</sub>, může klíčit pylové zrna s alelou S<sub>2</sub>. V posledním případě inkompatibilní reakce nenastává, S alely pestíku a pylových zrn nejsou shodné.

V rámci GSI rozlišujeme dva základní molekulární mechanismy vzniku inkompatibilní reakce – popsané prvotně u rodů *Nicotiana* a *Papaver* (Franklin-Tong *et* Franklin, 1993). Mnoho studií bylo provedeno na čeledi Solanaceae, a to konkrétně na tabáku (*Nicotiana* sp.). Bylo zjištěno, že v pletivu čnělky dochází k expresi glykoproteinu, který působí jako ribonukleáza poté, co proniká do pylové láčky. Zde aktivně degraduje mRNA, čímž je růst pylové láčky zastaven (McClure *et al.*, 1989). U máku vlčího (*Papaver rhoeas* L.) pak došlo k objevu odlišného systému, kdy je v blizně produkován malý S protein, který však nemá ribonukleasovou aktivitu (Franklin-Tong *et al.*, 1991). Chová se jako ligand, váže se na receptory klíčícího pylového zrna a způsobuje uvolňování Ca<sup>2+</sup> iontů do cytoplazmy. Následně dochází k aktivaci kinázové kaskády, což vede k zastavení růstu pylové láčky (Franklin-Tong *et al.*, 1993; Franklin-Tong *et al.*, 2002).



### 3.1.3. Sporofytická inkompatibilita

Jako první se o sporofytické inkompatibilitě zmiňuje D. U. Gerstel při svých studiích na rostlině *Parthenium argentatum* A. Gray v roce 1950 a je bezprostředně následován Hughesem a Babcockem (1950), kteří se zabývali dalším zástupcem čeledi Asteraceae, a to rostlinou *Crepis foetida* L. Při SSI je reakce pylu určena diploidním genotypem somatického pletiva tyčinky (sporofytu), ve kterém pylové zrno vzniká, nikoliv vlastním genotypem. SSI je tedy dána interakcí dvou diploidních genotypů, tedy kombinací čtyř alel. Alely mohou vykazovat kodominanci, ale také dominanci (Schierup *et al.*, 1997). Na rozdíl od GSI je u SSI inkompatibilní reakce zahájena na blizně, k prorůstání pylové láčky čnělkou tak vůbec nedochází (Zavada *et Taylor*, 1986). Existují dva typy SSI: homomorfický, ale také heteromorfický (Stevens *et Murray*, 1982).



**Obr. 4:** Schématické zobrazení sporofytické inkompatibilní reakce, která je řízena interakcí kodominantních S alel somatického pletiva tyčinky a pestíku. (Upraveno podle: Silva *et Goring*, 2001).

K zahájení inkompatibility dochází vždy, když je alespoň jedna S alela pylového zrna (somatického pletiva prašníku) shodná s alespoň jednou S alelou pestíku. K prorůstání pylové láčky tedy dojde pouze ve třetím případě při křížení  $S_1S_2 \times S_3S_4$ .

V případě, že je jedna z alel dominantní nad druhou, je situace odlišná. Pokud je například alela  $S_1$  dominantní nad alelou  $S_2$ , při křížení  $S_1S_2 \text{♂} \times S_1S_3 \text{♀}$  k vylučení pylu nedojde, naopak při křížení  $S_1S_2 \text{♂} \times S_2S_3 \text{♀}$  může pylové zrno normálně klíčit (Hughes *et Babcock*, 1950; Hiscock *et McInnis*, 2003).

Při studiích na rostlinách rodu *Brassica*, bylo zjištěno, že na inkompatibilní reakci se podílí několik produktů S genů. V prašnicích a pylových zrnech se jedná o na cystein bohaté proteiny SCR (označován také jako SP11; Schopfer *et al.*, 1999; Shiba *et al.*, 2002), v pestících pak o transmembránové receptory s kinázovou aktivitou SRK (Stein *et al.*, 1991). Při samoopylení pak receptory SRK váží proteiny SCR a je zahájena sporofytická inkompatibilní reakce (Shimosato *et al.*, 2007).

### 3.2 Inkompatibilita hybridů

Kromě autoinkompatibility, kterou můžeme řadit mezi prezygotické reprodukční bariéry a jejíž hlavním cílem je zabránit samosprášení a tedy vytvoření zygoty, existuje i inkompatibilita na úrovni hybridů. Uplatňují se při ní postzygotické reprodukční bariéry, dojde tedy k opylení, oplození a až poté je zahájena inkompatibilní reakce, který může ústít ve snížení fitness potomstva nebo v jeho částečnou či celkovou sterilitu (Aalto *et al.*, 2013).

Reprodukční bariéry působí nejen mezi jedinci odlišných druhů, ale hrají významnou roli také při speciaci. Pokud nastane rozdělení populace, ať už geografickou bariérou nebo odlišně, může dojít k nezávislému vzniku nových alel. Nově vzniklé alely izolovaných populací mohou být kompatibilní s alelami původní populace, ze které vznikly, nikoliv však mezi sebou. Podle tzv. Bateson-Dobzhansky-Muller modelu (Dobzhansky, 1936; Muller, 1942) je potřeba změny alespoň ve dvou genech, aby nastala inkompatibilita a vzniklé potomstvo bylo sterilní, případně neschopné života. Pokud by změna nastala pouze v jednom genu, nebude to mít na potomstvo vliv (Dobzhansky, 1936; Orr, 1996). Dvě alopatrikové populace mají ze začátku identický genotyp *aabb*. V jedné z těchto populací dojde k objevení a zafixování alely *A* a mohou se v ní tedy vyskytovat genotypy *Aabb* i *AAbb*. V druhé populaci naopak dojde ke vzniku a zafixování alely *B* a objevují se tedy i genotypy *aaBb* a *aaBB*. Rostliny všech výše zmíněných genotypů životaschopné a mohou se rozmnožovat. Přestože alela *A* je kompatibilní s *b* a alela *B* s *a*, kombinace alely *A* s alelou *B* může představovat problém. Pokud dojde k hybridizaci mezi jedinci dvou takových populací, potomstvo *AaBb* může být sterilní nebo neschopné přežití (Dobzhansky, 1936; Orr, 1995).

Pro geny, které se takto podílejí na průběhu speciace, existuje mnoho označení. Orr (1992) používá termín speciační geny, zatímco Rieseberg *et al.* (2004) upřednostňují termín izolační geny. Noor *et Feder* (2006) je nazývají geny bariérovými. Takovýchto genů, nebylo doposud objeveno mnoho, jejich počet se však zvyšuje. Jedná se o „obyčejné geny“, které v rámci jednoho druhu fungují za běžných okolností normálně (Orr *et al.*, 2004; Wang *et Hahn*, 2018).

### 3.2.1 Sterilita hybridů

Jedním z nejčastějších projevů inkompatibility je právě sterilita hybridů, vyskytující se častěji a dříve než v případech, kdy dochází k úplné letalitě hybridů (Sasa *et al.*, 1998; Orr *et al.*, 2004). Sterilita byla pozorována u hybridů živočichů i rostlin. T. Dobzhansky (1936) prováděl studie na sesterských druzích *Drosophila pseudoobscura* Frolova a *Drosophila persimilis* Dobzhansky *et* Epling (též označení *D. pseudoobscura* rasa A a rasa B), při jejichž křížení docházelo ke vzniku sterilního potomstva. Chen *et al.* (2012) se zabývali křížením poddruhů rýže *Oryza sativa* L. var. *indica* a var. *japonica*, jejichž hybridy vykazovali částečnou sterilitu. Sterilita hybridů byla zaznamenána u mnoha dalších rostlin, například u brukve *Brassica* sp. (Zeng *et al.*, 2014), kejklířky *Mimulus* sp. (Sweigart *et al.*, 2006) a v neposlední řadě hrachu *Pisum* sp. (Bogdanova *et al.*, 2009). Hybridy nemusí sterilitu vykazovat hned v generaci F<sub>1</sub>, neschopné rozmnožování mohou být až generace následující (Chen *et al.*, 2016).

### 3.2.2 Letalita hybridů

Neschopnost přežití hybridních jedinců je dalším projevem postzygotické inkompatibility (Chen *et al.*, 2016). Letalita je způsobena především zastavením vývoje endospermu, který představuje výživné pletivo pro embryo (Johnston *et al.*, 1980; Dinu *et al.*, 2005). Křížením geograficky oddělených populací *Drosophila melanogaster* Meigen se zabývali Lachance *et* True (2010), kdy inkompatibilní reakce ústící v letalitu potomstva byla vázaná na chromozom X. Bomblies *et al.* (2007) se zabývali studiem postzygotické inkompatibility u linií huseníčku (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh). U hybridů byla pozorována nekróza, v některých případech končící odumřením organismu, související s geny imunitního systému rostlin. Letalitou u kejklířky (*Mimulus guttatus* DC.) spojenou s genem pro toleranci vysokých obsahů mědi se zabývali Wright *et al.* (2013).

### 3.3 Jaderně-cytoplazmatický konflikt

Pro správnou funkci buňky je často nezbytná vzájemná interakce genomů jádra, mitochondrie a plastidů (Maroof *et al.*, 1992). Nejznámějším příkladem může být enzym ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxyláza/oxygenáza (Rubisco), jehož větší podjednotky jsou kódovány chloroplastovou DNA v chloroplastu, zatímco menší podjednotky jadernou DNA v cytosolu (Blair *et* Ellis, 1973; Spreitzer, 2003). Mitochondriální i chloroplastová DNA obsahuje geny, jejichž produkty hrají důležitou roli v buněčném metabolismu a jsou s jaderným genomem provázány regulačními drahami (Roux *et al.*, 2016). Během evoluce

také došlo k přesunu mnoha cytoplazmatických genů do jádra, proto je nyní k správné funkci mitochondrií a chloroplastů vyžadován import jaderně kódovaných proteinů do organel (Levin, 2003).

Při hybridizaci může nastat případ, kdy dojde ke spojení navzájem nekompatibilního jaderného a cytoplazmatického genomu a narušení životních funkcí buňky, dochází tedy tzv. jaderně-cytoplazmatické inkompatibilitě (konfliktu; Bogdanova *et al.*, 2009). Jaderně-cytoplazmatický konflikt je pravděpodobně jedna z prvních genetických bariér, která se vyskytuje v průběhu speciace. Potvrdili to například Barnard-Kubow *et al.* (2016) při studiích na *Campanulastrum americanum* L., když pozorovali omezenou životaschopnost u F1 hybridů. Čím větší odlišnosti cytoplazmatické genomy vykazují od genomů původních, tím větší je pravděpodobnost, že při vnitrodruhovém křížení nastane jaderně-cytoplazmatický konflikt (Levin, 2003). Pokud dojde k takovému nekompatibilnímu spojení genomů, rostlina je menšího vzrůstu, má omezenou plodnost, tvoří menší listy i palisty, na kterých se objevují chlorotické skvrny (Bogdanova *et al.*, 2009; Yadrikhinskiy *et al.*, 2011). Dopadem jaderně-cytoplazmatického konfliktu na fitness hybridů se zabývali Roux *et al.* (2016) při studiích na *Arabidopsis thaliana* L.

### 3.3.1 Cytoplazmatická samčí sterilita

Cytoplazmatická samčí sterilita (CMS) je jedním z nejčastějších projevů jaderně-cytoplazmatického konfliktu. Jedná se o formu samčí sterility, která je důsledkem nekompatibilní reakce jaderného a mitochondriálního genomu. CMS je nejčastěji způsobena přeorganizováním mitochondriálních otevřených čtecích rámců (ORF; Aalto *et al.*, 2013). Rostliny nejsou následně schopny produkovat funkční pyl, což je způsobeno maternální dědičností mitochondriálního genomu (Weider *et al.*, 2009; Simon *et al.*, 2016). Produkty těchto genů se hromadí ve vnitřní mitochondriální membráně a dochází k programované buněčné smrti buněk tapeta a postupně i dalších buněk pletiv prašníků. Tento jev je spojen s uvolněním cytochromu c z mitochondrií do cytosolu tapetálních buněk (Balk *et al.*, 2001).

CMS je nejčastěji studována na gynodioecických populacích, tedy takových, v nichž se vyskytují samičí a hermafroditní rostliny. Protože jaderné geny jsou do další generace přenášeny pylem i vajíčky, ale cytoplazmatické převážně jen po mateřské linii, může dojít ke genomickému konfliktu, tedy narušení hermafroditní populace ve prospěch samičích rostlin (Cosmides *et al.*, 1981; Aalto *et al.*, 2013). Samčí fertilita však může být znovuobnovena pomocí genu obnovujícího fertilitu (*Rf*), který je lokalizován v jádře

hybridních rostlin (Aalto *et al.*, 2013). U petúnie (*Petunia* sp.; Bentolila *et al.*, 2002) a ředkve seté (*Raphanus sativus* L.; Brown *et al.*, 2003) *Rf* gen kóduje 35 aminokyselin dlouhou sekvenci (PPR; pentatricopeptide repeat), která patří mezi eukaryotní RNA vazebné proteiny nezbytné pro posttranskripční procesy v organelách (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2008). Z kukuřice (*Zea mays* L.) byl izolován gen obnovující fertilitu *rf2*, jež kóduje aldehyd dehydrogenázu podílející se na odbourávání aldehydu vzniklého alkoholovým kvašením při vývoji pylu (Cui *et al.*, 1996).

Jako první se o samčí sterilitě děděné maternálně zmiňují Bateson *et al.* (1921), kteří se zabývali lnem setým (*Linum usitatissimum* L.). Od té doby byl výskyt CMS zaznamenán u mnoha dalších rostlin. O výskytu samčí sterility u kukuřice (*Zea mays* L.) pojednává Rhoades (1931) a komerčně se jí využívá k produkci hybridních semen pro pěstování rostlin, u nichž bude zabráněno samosprašení (Dewey *et al.*, 1987). CMS u rýže (*Oryza sativa* L.) se zabývali Mignouna *et al.* (1987), u pšenice (*Triticum aestivum* L.) to byli Quetier *et al.* (1977), u brukve řepky (*Brassica napus* L.) Erickson *et al.* (1986) a u cukrové řepy (*Beta vulgaris* L.) Powling (1981).

### 3.3.2 Konflikt jaderného a plastidového genomu

Na inkompatibilní reakci se kromě mitochondriálního genomu může podílet i genom plastidový. Dobře prozkoumán je tento jev u druhu pupalka (*Oenothera* sp.). Stubbe *et al.* (1979) popisují, že určité kombinace jaderného a plastidového genomu nevedou k tvorbě normálně se vyvíjejících zelených rostlin. U takovýchto rostlin také může být inhibována produkce pylu a v menší míře také vajíček. Studium různých kombinací jaderného a plastidového genomu u *Oenothera* sp. se zabývali Greiner *et al.* (2008), kteří zjistili, že k vzniku inkompatibility může přispívat oblast mezi chloroplastovými geny *psbB* a *clpP*. Konflikt jaderného genomu a plastomu byl studován u somatických hybridů rostlin čeledi Solanaceae, konkrétně rulíku zlomocného (*Atropa belladonna* L.) a tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.), kteří vykazovali chlorofylové deficiencie (Kushnir *et al.*, 1991). Schmitz-Linneweber *et al.* (2005) zjistili, že jaderný genom rulíku postrádá gen, který by zodpovídal za úpravu ATPasové  $\alpha$ -podjednotky mRNA v chloroplastech tabáku.

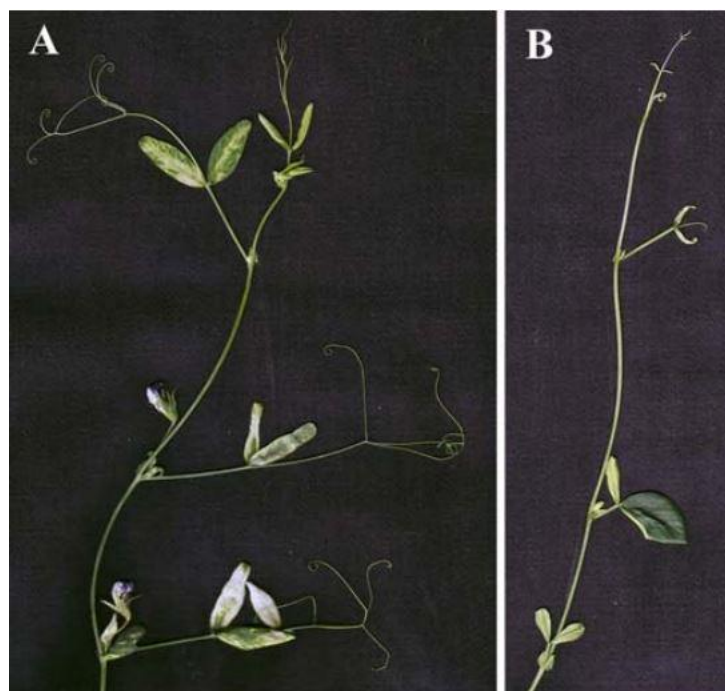
Konfliktu mezi jaderným a plastidovým genomem bylo věnováno méně pozornosti než tomu mezi genomem jaderným a mitochondriálním. Zeng *et al.* (2016) se věnovali výskytu inkompatibility jaderného genomu a plastomu u topolů (*Populus* sp.) a Zhang *et al.* (2015) u čeledi kakostovitých (Geraniaceae). Biparentální dědičnost chloroplastů, která snižuje projevy jaderně-cytoplazmatické inkompatibility, byla objevena u rostliny

*Campanulastrum americanum* L. (Barnard-Kubow *et al.*, 2017). Hodně bylo věnováno studiu jaderného a plastidového konfliktu u hrachu setého (*Pisum sativum* (L.) Merr., Bogdanova *et al.*, 2009), o čemž podrobněji pojednává následující kapitola.

### 3.4 Jaderně-cytoplazmatický konflikt u hrachu (*Pisum* sp.)

Hrách (*Pisum* sp.) patří do čeledi bobovitých (Fabaceae) představuje významný modelový organismus, jednu z nejstarších domestikovaných rostlin na světě a třetí nejčastěji pěstovanou luštěninu (Smýkal *et al.*, 2011). Podle posledních prací Smýkal *et al.* (2017) a Trněný *et al.* (2018) rozlišujeme druhy *P. fulvum* Sm., *P. sativum* (s poddruhy *sativum* a *elatius*) a *P. abyssinicum* A. Braun.

Inkompatibilita byla pozorována u hybridů vzniklých křížením s planou formou *P. sativum elatius* VIR320, ale pouze v případě, že tato forma byla použita jako donor samičích pohlavních buněk. Hybridní rostliny měly omezenou fertilitu nebo byly sterilní, jejich listy byly menší a objevovaly se na nich chlorotické skvrny (Bogdanova *et* Kosterin, 2006).



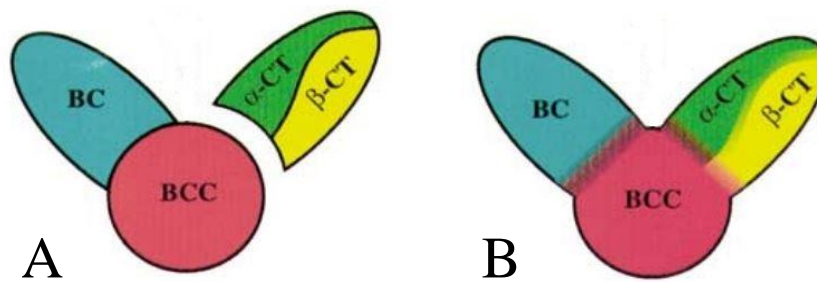
**Obr. 5:** Rostliny s příznaky odpovídajícími jaderně-cytoplazmatickému konfliktu. (A) Listy rostliny jsou menší a nesou chlorotické skvrny. (B) Počet listů rostliny je redukován, jsou menšího vzrůstu (Převzato z: Bogdanova *et al.*, 2009)

Později bylo určeno, že s inkompatibilní reakcí souvisí dva jaderné lokusy *Scs1* a *Scs2*. Tyto *Scs* lokusy (*species cytoplasm specific*) se podílejí na interakci s cytoplazmou (Maan, 1992). Jaderně-cytoplazmatické konflikt nastane, pokud planá forma (VIR320) figuruje jako donor cytoplazmy, zatímco obě alely *Scs1* i *Scs2* pochází z kulturní rostliny a jsou dominantní, rostlina je tedy pro oba geny heterozygotní. Bude-li jedna *Scs* alela pocházet z planého rodiče a druhá z kulturního, konflikt nenastane a hybridní rostliny nebudou vykazovat chlorofylovou deficienci (Bogdanova *et al.*, 2009).

Pokud tedy cytoplazma pochází z plané formy VIR320, *Scs1* alela děděná od kulturního rodiče působí letálně na gametofyt i sporofyt hybridní rostliny, zatímco *Scs2* alela kulturního rodiče snižuje životaschopnost samčího gametofytu. Pokud je rostlina homozygotní pro jeden z genů, fertilita jejího pylu je snižena, přestože její vzhled nevykazuje žádné známky inkompatibility. U heterozygotů se na snížení fertility pylu o 30–50 % podílejí *Scs1* i *Scs2* (Bogdanova *et al.*, 2012).

Jako další podílející se na jaderně-cytoplazmatické inkompatibilitě byl identifikován plastidový gen *accD*, kódující beta podjednotku karboxyltransferázy acetyl-CoA karboxylázy, a jaderný gen *Bccp3*, kódující biotin karboxyl carrier protein acetyl-CoA karboxylázy (Bogdanova *et al.*, 2015). Výsledným produktem je heteromerní plastidový enzym acetyl-CoA karboxyláza (ACC), složená z alfa a beta podjednotky karboxyltransferázy, biotin karboxyl carrier proteinu a biotin karboxylázy. Acetyl-CoA karboxyláza se podílí na biosyntéze mastných kyselin. Právě acetyl-CoA karboxyláza katalyzuje první krok, tedy karboxylaci acetyl-CoA na malonyl-CoA. Kromě *accD* genu jsou geny pro zbývající tři složky acetyl-CoA karboxylázy lokalizovány v jádře (Reverdatto *et al.*, 1999).

U rostlin byly popsány dva druhy acetyl-CoA karboxylázy (Reverdatto *et al.*, 1999). Kromě heteromerní (prokaryotické) acetyl-CoA karboxylázy vyskytující se v chloroplastech (Kannangara *et Stumpf*, 1972), také homomerní (eukaryotická) forma vyskytující se v cytoplazmě (Yanai *et al.*, 1995).



**Obr. 6:** (A) Schéma heteromerní acetyl-CoA karboxylázy. (B) Schéma homomerní acetyl-CoA karboxylázy. BC – biotin karboxyláza, BCC – biotin karboxyl carrier protein,  $\alpha,\beta$ -CT –  $\alpha,\beta$ -podjednotka karboxyltransferázy. Jednotlivé podjednotky jsou odděleny černou linií, mezera mezi nimi značí schopnost disociace (Upraveno podle: Nikolau *et al.*, 2003).

Plastidová acetyl-CoA karboxyláza se primárně podílí na *de novo* syntéze mastných kyselin, zatímco cytosolová acetyl-CoA karboxyláza mastné kyseliny prodlužuje a souvisí s biosyntézou polyketidů. Podjednotky ACC se organizují do dvou komplexů – biotin karboxyl carrier protein a biotin karboxyláza tvoří komplex zodpovídající za karboxylaci biotinu, alfa a beta podjednotka karboxyltransferázy zase komplex katalyzující karboxyltransferasovou reakci (Keereetaweeep *et al.*, 2018).

Jaderně-cytoplazmatický konflikt nastává, pokud při křížení dojde k interakci plastidového *accD* a jaderného *bccp3*, které nejsou vzájemně kompatibilní a nemohou tedy dát vznik funkční acetyl-CoA karboxyláze (Bogdanova *et al.*, 2015). Hybridní rostliny jsou pak menšího vzrůstu, jejich listy jsou redukovány, trpí nedostatkem chlorofylu a jsou částečně nebo zcela sterilní (Bogdanova *et al.*, 2009).



## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Pro analýzu bylo využito 104 vzorků hrachu (*Pisum* sp.), konkrétně 28 vzorků kulturního *P. sativum* (krajových odrůd, tzv. landraces), 22 vzorků kulturního *P. abyssinicum*, 46 vzorků planého *P. elatius* a 8 vzorků planého *P. fulvum* (viz Tab. 1 a 2). Dále pak 45 vzorků *P. elatius* z populací Turecka a Maďarska (viz Tab. 3). Rostliny byly pěstovány v květináčích o 5 l v substrátu složeném z rašeliny a písku v poměru 90:10 (Florcom Profi, BB Com) ve sklenících Katedry botaniky PřF UP v Olomouci.

**Tab. 1:** Seznam vzorků, jejich taxonomické zařazení, země původu a zdroj I

Vzorek	Taxonomická skupina	Země původu	Zdroj	Vzorek	Taxonomická skupina	Země původu	Zdroj
<b>ARI00989</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Kypr	GNGB	<b>PI181799</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Libanon	USDA
<b>ATC1044</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Indie	AGB	<b>PI181958</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Sýrie	USDA
<b>ATC6926</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Čína	AGB	<b>PI193835</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Etiopie	USDA
<b>ATC7021*</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Čína	AGB	<b>PI358608</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Etiopie	USDA
<b>IG52518</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Turecko	ICARDA	<b>PI560969</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Nepál	USDA
<b>IG52503</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Turecko	ICARDA	<b>VIR1246</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Tádžikistán	VIR
<b>IG52507</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Turecko	ICARDA	<b>VIR1541</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Rusko	VIR
<b>IG52595*</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Alžírsko	ICARDA	<b>VIR1587</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Rusko	VIR
<b>IG52596*</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Alžírsko	ICARDA	<b>VIR2311</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Gruzie	VIR
<b>IG65050</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Írán	ICARDA	<b>712</b>	<i>P. elatius</i>	Izrael	Novosibirsk
<b>JII086</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Turecko	JIC	<b>721</b>	<i>P. elatius</i>	Izrael	Novosibirsk
<b>JII108</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Nepál	JIC	<b>IG108291*</b>	<i>P. elatius</i>	Tunisko	ICARDA
<b>JII1834</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Španělsko	JIC	<b>IG119794</b>	<i>P. elatius</i>	Španělsko	ICARDA
<b>JII1853</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Izrael	JIC	<b>IG140971</b>	<i>P. elatius</i>	Arménie	ICARDA
<b>JII2602</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Libye	JIC	<b>IG25414</b>	<i>P. elatius</i>	Sýrie	IGB
<b>JII267</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Řecko	JIC	<b>IG52443</b>	<i>P. elatius</i>	Sýrie	ICARDA
<b>JII3554</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Itálie	JIC	<b>IG52532*</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	ICARDA
<b>JII86</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Afghánistán	JIC	<b>IS18909</b>	<i>P. elatius</i>	Izrael	IGB
<b>JII92</b>	<i>P. sativum</i> (landraces)	Afghánistán	JIC	<b>IS18911</b>	<i>P. elatius</i>	Izrael	IGB

**Tab. 2:** Seznam vzorků, jejich taxonomické zařazení, země původu a zdroj II

Vzorek	Taxonomická skupina	Země původu	Zdroj	Vzorek	Taxonomická skupina	Země původu	Zdroj
IS18915	<i>P. elatius</i>	Izrael	IGB	W6-2101*	<i>P. elatius</i>	Turecko	USDA
IS19864	<i>P. elatius</i>	Izrael	IGB	W6-26109*	<i>P. elatius</i>	Gruzie	USDA
IS22287	<i>P. elatius</i>	Izrael	IGB	W6-26112	<i>P. elatius</i>	Gruzie	USDA
IS24337	<i>P. elatius</i>	Izrael	IGB	IG112136	<i>P. fulvum</i>	Jordánsko	ICARDA
J11095	<i>P. elatius</i>	Řecko	JIC	J11006	<i>P. fulvum</i>	Izrael	JIC
J12546	<i>P. elatius</i>	Gruzie	JIC	J11010	<i>P. fulvum</i>	Izrael	JIC
J1261*	<i>P. elatius</i>	Turecko	JIC	J12517	<i>P. fulvum</i>	Sýrie	JIC
J1262	<i>P. elatius</i>	Turecko	JIC	PI595935	<i>P. fulvum</i>	Sýrie	USDA
J12629	<i>P. elatius</i>	Rusko	JIC	PI595944	<i>P. fulvum</i>	Izrael	USDA
J13557*	<i>P. elatius</i>	Portugalsko	JIC	PI595946	<i>P. fulvum</i>	Turecko	USDA
J13558*	<i>P. elatius</i>	Španělsko	JIC	PI595953	<i>P. fulvum</i>	Izrael	USDA
PI343972	<i>P. elatius</i>	Turecko	IGB	J1002	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	JIC
PI343978	<i>P. elatius</i>	Turecko	USDA	J10130	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	JIC
PI343996*	<i>P. elatius</i>	Turecko	USDA	J10226	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	JIC
PI344006*	<i>P. elatius</i>	Řecko	USDA	J10691	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	JIC
PI344537	<i>P. elatius</i>	Itálie	USDA	J11632	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	JIC
PI560057	<i>P. elatius</i>	Portugalsko	USDA	J11869	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	JIC
PI560058	<i>P. elatius</i>	Izrael	USDA	J11943	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	JIC
PI560059	<i>P. elatius</i>	Izrael	USDA	J11974	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	JIC
PI560069	<i>P. elatius</i>	Izrael	USDA	J12385	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	JIC
PI560071	<i>P. elatius</i>	Izrael	USDA	L02-0253	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	CzNGB
PI560072	<i>P. elatius</i>	Izrael	USDA	PI358607	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	USDA
PI639955	<i>P. elatius</i>	Izrael	USDA	PI358609	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	USDA
PI639959	<i>P. elatius</i>	Turecko	USDA	PI358610	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	USDA
PIS1675*	<i>P. elatius</i>	Itálie	IPK	PI358611	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	USDA
PIS2850*	<i>P. elatius</i>	Itálie	IPK	PI358612	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	USDA
PIS2853	<i>P. elatius</i>	Maďarsko	IPK	PI358613	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	USDA
T14/3*	<i>P. elatius</i>	Turecko	Smykal <i>et al.</i> 2018	PI358614	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	USDA
T14/5*	<i>P. elatius</i>	Turecko	Smykal <i>et al.</i> 2018	PI358615	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	USDA
T14/6*	<i>P. elatius</i>	Turecko	Smykal <i>et al.</i> 2018	PI358616	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	USDA
T14/9*	<i>P. elatius</i>	Turecko	Smykal <i>et al.</i> 2018	PI358617	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	USDA
T15/2*	<i>P. elatius</i>	Turecko	Smykal <i>et al.</i> 2018	PI358618	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	USDA
W6-19256	<i>P. elatius</i>	Bulharsko	USDA	VIR2759	<i>P. abyssinicum</i>	Etiopie	Novosibirsk

**Pozn.** Hvězdičkou (\*) jsou označeny vzorky poskytnuty vedoucím práce ve formě sekvencí.

**Tab. 3:** Seznam vzorků, jejich taxonomické zařazení, země původu a zdroj III

Vzorek	Taxonomická skupina	Země původu	Vzorek	Taxonomická skupina	Země původu
<b>1 (Olmerli)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Antalya_A1</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>5 (Olmerli)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Antalya_A2-1</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>7 (Olmerli)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Antalya_A3-1</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>11 (Besni)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Antalya_A4</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>13 (Besni)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Gurbuz_G1</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>19 (Besni)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Gurbuz_G12</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>22 (Buyvaktli)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Hisar_H4</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>29 (Buyvaktli)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Hisar_H7</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>30 (Buyvaktli)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Hisar_H18</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>34 (Kok)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Hisar_H19</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>35 (Kok)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Hungary-B_MCH-H2</b>	<i>P. elatius</i>	Maďarsko
<b>37 (Kok)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Hungary-B_MCH-H10</b>	<i>P. elatius</i>	Maďarsko
<b>42 (Kok)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Hungary-V_MCH-M2</b>	<i>P. elatius</i>	Maďarsko
<b>46 (Kok)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Hungary-V_MCH-M7</b>	<i>P. elatius</i>	Maďarsko
<b>51 (Midyat to Mt Gabriel)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Kebapcik_K2</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>67 (Kahraman-Maras)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Kebapcik_K3</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>68 (Kahraman-Maras)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Thermessos_T-1-3</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>75 (Kahraman-Maras)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Thermessos_T-1</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>83 (KM-West)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Thermessos_T-2</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>85 (KM-West)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Yesilkoy_Y3</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>86 (KM-West)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Yesilkoy_Y1C</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>91 (KM-3)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko	<b>Yesilkoy_Y2A</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko
<b>96 (Adyaman)</b>	<i>P. elatius</i>	Turecko			

Vzorky hrachu byly obdrženy z následujících genových bank: Australian Grains Genebank, Horsham, Austrálie (AGB); Czech National Genebank, Praha, Česká republika (CzNGB); International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Bejrút, Libanon (ICARDA); Israel Plant Genebank, Bet-Dagan, Izrael (IGB); Liebniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Německo (IPK); John Innes Center, Norwich, Velká Británie (JIC); Siberian Branch of Russian Academy of Science, Novosibirsk, Rusko (Novosibirsk); United States Department of Agriculture; Pullman, USA (USDA); Vavilov Institute, Petrohrad, Rusko (VIR); a sbírka dr. P. Smýkala – UPOL, CZ (Smýkal *et al.*, 2018).

## 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

### Použité chemikálie

- Phire Hot Start II DNA polymeráza (Thermo Scientific, kat. č. F122S)
- 5x Phire reakční pufr (Thermo Scientific, kat. č. F524L)
- 10 mmol·l<sup>-1</sup> KAPA dNTP mix (KAPA Biosystems, kat. č. KN1009)
- MyTaq DNA polymeráza (Bioline, kat. č. BIO-21105)
- 5x MyTaq RED reakční pufr (Bioline, kat. č. BIO-37112)
- Deionizovaná voda
- β-merkaptoethanol (MP Biomedicals, kat. č. 194834)
- Oligo(dT)18 primer mix (Bioline, kat. č. BIO-38029)
- AMV reverzní transkriptáza (Promega, kat. č. M510F)
- 5x AMV RT pufr (Promega, kat. č. M515A)
- RNasin Plus ribonukleázový inhibitor (Promega, kat. č. N261A)
- Agaróza (SERVA, kat. č. 11404)
- Barvivo SimplySafe (EURx, kat. č. E4600-01)
- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, kat. č. SM0321)
- 6x TriTrack DNA nanášecí pufr (Thermo Scientific, kat. č. R1161)
- Exonukleáza I (Thermo Scientific, kat. č. EN0581)
- FastAP termosenzitivní alkalická fosfatáza (Thermo Scientific, kat. č. EF0651)
- 10x FastAP pufr (Thermo Scientific, kat. č. EF0651)
- Primery:

**Tab. 4:** Seznam primerů použitých pro PCR amplifikaci genů *accD* a *bccp*

	Označení	Cílový gen	Sekvence (5' – 3')
Forward	F1	<i>accD</i>	GCATTAGTTTTTCATTTTCAGTCC
	F	<i>bccp</i>	CTAATGAAAGTGGCGGAAATC
	F33	<i>bccp</i>	CCATTCTCTGCACTCCCTTTCGCG
Reverse	R4	<i>accD</i>	CTTTAATAGGGGTTTAGAATACA
	R	<i>bccp</i>	CCTTATTACGCGTCTTAGTGAATG
	R1113	<i>bccp</i>	CAATTATTTCTCAATCTATTCAAACG

**Použité soupravy**

- NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel, kat. č. 740949.50)
- Invisorb Spin Plant Mini Kit (Stratec Molecular, kat. č. 1037100300)

**Použité roztoky a jejich příprava**

- 10x Tris-borát-EDTA (TBE) pufr: 108 g Tris base a 55 g kyseliny borité rozpustit v 900 ml ddH<sub>2</sub>O a 40 ml 0,5 mol·l<sup>-1</sup> EDTA (pH 8,0)

### 4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- homogenizátor FastPrep-24 (MP Biomedicals)
- centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- centrifuga 5415 D (Eppendorf)
- mikrocentrifuga MCF 2360 (LMS)
- vyhřívaná třepačka – Mixing Block MB-102 (BIOER)
- spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
- termocyklér PTC-200 Peltier (MJ Research)
- termocyklér Mastercycler X50 (Eppendorf)
- elektroforetická komora Widi Mini Sub (Bio-Rad)
- zdroj stejnosměrného napětí PowerPac Basic (Bio-Rad)
- UV transiluminátor FireReader (Uvitec Cambridge)
- mrazicí box Sanyo-Ultra Low -86 °C (Sanyo)
- laboratorní váha 572 (Kern)
- flow-box PV-100 (Telstar)
- vortex mixer Classic (Velp Scientifica)
- mikrovlnná trouba 3203 (ETA)

## 4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

### 4.4.1 Gen *accD*

#### 4.4.1.1 Izolace genomové DNA

Genomová DNA byla izolována pomocí komerčního kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit a k provedení izolace bylo odebráno 100 mg mladých listů z jednotlivých rostlin hrachu (*Pisum* sp.). Ty byly homogenizovány pomocí homogenizátoru FastPrep-24 (MP Biomedicals).

1. K homogenizovanému rostlinnému materiálu přidat 400  $\mu$ l lyzačního pufru P a 20  $\mu$ l proteinázy K.
2. Homogenizace na přístroji FastPrep při nastavení rychlosti  $6,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  po dobu 1 minuty.
3. Inkubovat 30 minut při  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ .
4. Vzorek přemístit na filtr v kolonce a centrifugovat 1 minutu při 12 000 rpm.
5. K filtrátu přidat 10  $\mu$ l RNázy A a inkubovat při pokojové teplotě 15 minut.
6. Přidat 200  $\mu$ l vazebného pufru a vortexovat.
7. Vzorek přemístit na kolonku a inkubovat při pokojové teplotě 2 minuty.
8. Centrifugovat 1 minutu při 12 000 rpm.
9. Filtrát vylít, na kolonku pipetovat 550  $\mu$ l promývacího pufru I.
10. Centrifugovat 1 minutu při 12 000 rpm.
11. Filtrát vylít, na kolonku pipetovat 550  $\mu$ l promývacího pufru II.
12. Centrifugovat 1 minutu při 12 000 rpm.
13. Filtrát vylít, na kolonku pipetovat 550  $\mu$ l promývacího pufru II.
14. Centrifugovat 1 minutu při 12 000 rpm.
15. Filtrát vylít, znova centrifugovat 2 minuty při 12 000 rpm.
16. Kolonku vložit do nové mikrozkuhavky, pipetovat 100  $\mu$ l na  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  předehřátého elučního pufru D.
17. Inkubovat při pokojové teplotě 3 minuty, centrifugovat 1 minutu při 12 000 rpm.
18. Pipetovat 100  $\mu$ l na  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  předehřátého elučního pufru D.
19. Inkubovat při pokojové teplotě 3 minuty, centrifugovat 1 minutu při 12 000 rpm.

#### 4.4.1.2 PCR amplifikace DNA

Pro amplifikaci *accD* genu byla použita polymerázová řetězová reakce. Pro PCR byl použit jeden pár primerů, F1 primer (forward) a R4 primer (reverse), a PHIRE polymeráza.

1. Před samotnou přípravou reakční směsi připravit pracovní směs primerů složenou z 90  $\mu\text{l}$  deionizované vody, 5  $\mu\text{l}$  forward primeru (F) o koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 5  $\mu\text{l}$  reverse primeru o koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (R).
2. Poté do podle počtu vzorků připravit reakční směs složenou z reakčního pufru (5x Phire), DNA polymerázy (Phire Hot Start II), směsi primerů, směsi nukleotidů ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  dNTPs) a deionizované vody (viz Tab. 5). Použitý pufr obsahuje hořčnaté ionty,  $1,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ .
3. Rozpipetovat do PCR mikrozkušavek a vložit do termocykléru (viz Tab. 6).

**Tab. 5:** Příprava reakční směsi pro PCR amplifikaci s Phire polymerázou

Reakční složky	Objem pro 1 reakci [ $\mu\text{l}$ ]	Celkový objem
5x Phire reakční pufr	4	18 $\mu\text{l}$
Deionizovaná voda	12,2	
dNTPs $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,4	
Směs primerů: Forward primer Reverse primer	1	
Phire Hot Start polymeráza	0,4	
Vzorek (20–80 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}$ )	2	20 $\mu\text{l}$

**Tab. 6:** Nastavení časového a teplotního průběhu PCR reakce s Phire polymerázou

Krok	Teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Čas [min]	Počet cyklů
Preinkubace	95	2	1
Denaturace	95	0,5	35
Annealing	55	0,5	
Elongace	72	2	
Dosyntetizování	72	5	1
Udržování	15	-	1



#### 4.4.2 Gen *bccp*

##### 4.4.2.1 Izolace RNA

RNA byla izolována pomocí komerčního kitu NucleoSpin RNA Plant a k provedení izolace bylo odebráno 100 mg mladých listů z jednotlivých rostlin hrachu (*Pisum* sp.). Ty byly homogenizovány pomocí homogenizátoru FastPrep-24.

1. K rostlinnému materiálu do mikrozkušavky přidat 350  $\mu$ l RA1 pufru a 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanolu
2. Homogenizace na přístroji FastPrep při nastavení rychlosti 6,5  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  po dobu 1 minuty.
3. Vzorek přemístit na filtr kolonky a centrifugovat 1 minutu při 11 000 rpm.
4. K filtrátu přidat 350  $\mu$ l 70% ethanolu ke zlepšení podmínek pro navázání RNA na kolonku, propipetovat.
5. Nanést na kolonku, centrifugovat 1 minutu při 11 000 rpm.
6. Filtrát vylít, na kolonku pipetovat 350  $\mu$ l MDB roztoku, centrifugovat 1 minutu při 11 000 rpm. Důležité pro odsolení membrány, což vede k efektivnějšímu odstranění genomové DNA (další krok).
7. Připravit si roztok pro rDNázu k odstranění genomové DNA – na jednu reakci 10  $\mu$ l rDNázy a 90  $\mu$ l reakčního pufru pro rDNázu.
8. Filtrát vylít, na kolonku pipetovat 95  $\mu$ l rDNasového roztoku, nechat inkubovat 15 minut při pokojové teplotě. Následuje série promývání.
9. Přidat 200  $\mu$ l RAW2 pufru.
10. Centrifugovat 1 minutu při 11 000 rpm.
11. Filtrát vylít, na kolonku pipetovat 600  $\mu$ l RA3 pufru.
12. Centrifugovat 1 minutu při 11 000 rpm.
13. Filtrát vylít, na kolonku pipetovat 250  $\mu$ l RA3 pufru.
14. Centrifugovat 2 minuty při 11 000 rpm.
15. Filtrát vylít, kolonku vložit do nové mikrozkušavky, eluovat přidáním 60  $\mu$ l RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$ .
16. Centrifugovat 1 minutu při 11 000 rpm.

#### 4.4.2.2 Měření koncentrace RNA

Koncentrace RNA byla ověřována pomocí spektrofotometru NanoDrop. Čidlo s optickým vláknem bylo očištěno buničitou vatou a byl proměřen slepý vzorek (deionizovaná voda). Poté byly proměřovány jednotlivé vzorky, na čidlo byly vždy nanесeny 2  $\mu\text{l}$  vzorku.

#### 4.4.2.3 Reverzní transkripce

Po vyizolování RNA a změření její koncentrace bylo nutné provést přepis RNA do cDNA. Ještě před samotnou reverzní transkripcí musela být RNA naředěna na základě její koncentrace změřené na spektrofotometru NanoDrop. Je nutné pracovat sterilně ve flowboxu, aby nedošlo ke kontaminaci ribonukleázami.

##### A. Inkubace s oligo(dT) primerem

1. Do PCR mikrozkušavek pipetovat 9  $\mu\text{l}$  deionizované vody, 1  $\mu\text{l}$  oligo(dT) primeru ( $270 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) a 5  $\mu\text{l}$  zředěného vzorku (viz Výsledky, Tab. 10).
2. PCR mikrozkušavky vložit do termocykléru předehřátého na 70 °C a inkubovat vzorky po dobu 5 minut.
3. Po inkubaci uchovávat na ledu.

##### B. Reverzní transkripce

1. Připravit reakční směs podle počtu vzorků.  
Pro průběh jedné reakce je potřeba 12,5  $\mu\text{l}$  deionizované vody, 8  $\mu\text{l}$  5x AMV RT pufru, 2,5  $\mu\text{l}$  dNTP, 1  $\mu\text{l}$  inhibitoru ribonukleáz a 1  $\mu\text{l}$  AMV reverzní transkriptázy.
2. Do PCR mikrozkušavek se vzorky z předchozího kroku pipetovat 25  $\mu\text{l}$  reakční směsi.
3. PCR mikrozkušavky vložit do termocykléru předehřátého na 42 °C a inkubovat vzorky po dobu 60 minut.

#### 4.4.2.4 PCR amplifikace cDNA

Pro amplifikaci genu *bccp* bylo nutné použít dvě sady primerů, tzv. nested PCR, aby došlo ke zvýšení specifity reakce a k detekovatelné amplifikaci. Nejprve byla provedena PCR amplifikace s párem vnějších primerů a následně s párem vnitřních primerů. Pro amplifikaci *bccp* genu byla použita MyTaq polymeráza (Bioline).

#### A. PCR amplifikace s vnějšími primery

1. Před provedením první PCR amplifikace zředit cDNA vzorky deionizovanou vodou v poměru 1:1.
2. Před samotnou přípravou reakční směsi připravit směs primerů složenou z 90  $\mu\text{l}$  deionizované vody 5  $\mu\text{l}$  forward primeru (F) a 5  $\mu\text{l}$  reverse primeru (R).
3. Poté podle počtu vzorků připravit reakční směs složenou z 5x MyTaq reakčního pufru, MyTaq DNA polymerázy, směsi primerů a deionizované vody (viz Tab. 7). V použitém pufru byla obsažena směs nukleotidů (dNTP) i hořčnaté ionty.
4. Rozpipetovat do PCR mikrozkušavek a vložit do termocykleru (viz Tab. 8).

#### B. PCR amplifikace s vnitřními primery

1. Před provedením druhé PCR amplifikace zředit vzorky amplifikované v předchozím kroku deionizovanou vodou v poměru 1:10.
2. Před samotnou přípravou reakční směsi připravit směs primerů složenou z 90  $\mu\text{l}$  deionizované vody 5  $\mu\text{l}$  forward primeru (F33) a 5  $\mu\text{l}$  reverse primeru (R1113).
3. Připravit reakční směs stejně jako v předchozím kroku.
4. Rozpipetovat do PCR mikrozkušavek a vložit do termocykleru (viz Tab. 8).

**Tab. 7:** Příprava reakční směsi pro PCR amplifikaci s Taq polymerázou

Reakční složky	Objem pro 1 reakci [ $\mu\text{l}$ ]	Celkový objem
5x MyTaq reakční pufr	3	13 $\mu\text{l}$
Deionizovaná voda	9,23	
Směs primerů Forward primer Reverse primer	0,7	
MyTaq polymeráza 5 U· $\mu\text{l}^{-1}$	0,07	
Vzorek	2	15 $\mu\text{l}$

**Tab. 8:** Nastavení časového a teplotního průběhu PCR reakce s Taq polymerázou

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Preinkubace	95	5	1
Denaturace	95	0,5	35
Annealing	55	1	
Elongace	72	3	
Dosyntetizování	72	5	1
Udržování	15	-	1

#### 4.4.3 Elektroforetická separace

Po provedení PCR bylo nutné ověřit, zda opravdu došlo k amplifikaci požadované sekvence. To bylo provedeno pomocí horizontální gelové elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu.

1. Pro přípravu 80 ml agarózového gelu navážit 1,2 g agarózy přidat 80 ml TBE pufru a zahřívat v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy.
2. Nechat zchladit na přibližně 50 °C a poté přidat 1,5 µl barviva SimplySafe, dobře rozmíchat.
3. Přelít směs do předem připravené elektroforetické vaničky, vložit hřebínky a nechat gel ztuhnout (20–30 minut).
4. Vyjmout hřebínky, elektroforetickou vaničku s gelem vložit do elektroforetické komory s TBE pufrem.
5. Do první jamky gelu pipetovat 1,5 µl standardu molekulové hmotnosti (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder), do dalších jamek pak pipetovat 5 µl PCR produktů.
6. Při nanášení PCR produktů reakce, při níž byla použita MyTaq polymeráza, není nutné přidávat nanášecí pufr (PCR produkty jsou již obarveny MyTaq pufrem). Při nanášení PCR produktů reakce, při níž byla použita Phire polymeráza je nutné vzorek smíchat s 2 µl nanášecího pufru (6x TriTrack) a až poté pipetovat do jamek.
7. Připojit elektroforetickou komoru ke zdroji elektrického napětí (110 V) a nechat elektroforézu probíhat po dobu 30–40 minut.
8. Po dokončení separace gel vyjmout a vložit jej do UV transiluminátoru, gel vyhodnotit a zdokumentovat pomocí programu UVITEC.

#### 4.4.4 Sekvenování

Před samotným sekvenováním bylo nutné PCR produkty purifikovat. Purifikací dochází k odstranění nežádoucích složek, zbytkových primerů a neinkorporovaných nukleotidů, které by mohly narušovat průběh sekvenování. PCR produkty byly ošetřeny exonukleázou I a FastAP termosenzitivní alkalickou fosfatázou.

1. Připravit reakční směs podle počtu vzorků (viz Tab. 9).
2. Reakční směs rozpipetovat po 5  $\mu\text{l}$  a přidat 5  $\mu\text{l}$  vzorku.
3. Vložit do termocykléru, ponechat 15 minut při 37 °C a poté 15 minut při 85 °C.

**Tab. 9:** Příprava reakční směsi pro purifikaci PCR produktu před sekvenováním

Reakční složky	Objem pro 1 reakci [ $\mu\text{l}$ ]	Celkový objem
10x FastAP pufr	1	5 $\mu\text{l}$
Deionizovaná voda	3,45	
Exonukleáza I	0,4	
FastAP alkalická fosfatáza	0,15	
Vzorek	5	10 $\mu\text{l}$

4. Do PCR mikroskopavek napipetovat 5  $\mu\text{l}$  přečištěného PCR produktu a 5  $\mu\text{l}$  sekvenačního primeru (5  $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ). Poté vzorky odeslat na sekvenační analýzu do Laboratoře sekvenace DNA, PřF UK Praha nebo Macrogen, Amsterdam, Nizozemsko.

#### 4.4.5 Bioinformatická analýza

Pro bioinformatickou analýzu získaných sekvencí byl použit program Geneious 7.1.9 (Biomatters Ltd., UK). Pro porovnání sekvencí byly využity funkce „multiple alignment“ a „pairwise alignment“ (mnohočetné a jednoduché přiřazení), kdy bylo možné vyhodnotit jednonukleotidové záměny (SNP), inserce a delece mezi sekvencemi jednotlivých vzorků. K provedení jednoduchého i mnohočetného přiřazení byl využit algoritmus MUSCLE a sekvence byly následně manuálně upraveny. Poté byly nukleotidové sekvence translatovány do proteinových z důvodu eliminace velkých delecí a zpřehlednění práce.

Pro určení jednotlivých alel byl použit nástroj FABOX (<http://www.birc.au.dk/fabox/>). K tvorbě fylogenetických stromů byl použit program MEGA6 (<https://www.megasoftware.net/>), pro získání kombinací alel program RStudio (<https://www.rstudio.com/>) a pro sestavení mapy program ArcGIS (<https://www.arcgis.com/>).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Izolace RNA a RT-PCR

Po izolaci RNA z rostlinného materiálu pomocí kitu NucleoSpin RNA Plant bylo nutné provést měření koncentrace nukleových kyselin pomocí spektrofotometru NanoDrop. Podle naměřené koncentrace byl pak vzorek pro potřeby následující RT-PCR ředěn. Naměřené hodnoty koncentrace se mezi jednotlivými vzorky lišily i v řádu stovek, což mohlo být zapříčiněno odlišným stářím rostlinného materiálu, případně kontaminací ribonukleázami. Vzorky o koncentraci nižší než je  $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  nebyly ředěny vůbec a pro RT-PCR bylo použito 5  $\mu\text{l}$  původního nezředěného RNA vzorku. Vzorky vyizolované DNA nebylo potřeba pro další zpracovávání ředit.

**Tab. 10:** Koncentrace vyizolované RNA a její ředění pro reverzní transkripci

Vzorek	Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Ředění pro RT-PCR		Vzorek	Koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Ředění pro RT-PCR	
		Vzorek [ $\mu\text{l}$ ]	dH <sub>2</sub> O [ $\mu\text{l}$ ]			Vzorek [ $\mu\text{l}$ ]	dH <sub>2</sub> O [ $\mu\text{l}$ ]
ARI00989	53	5	0	PI358609	261	4	1
ATC1044	117	5	0	PI358610	237	4	1
ATC6926	36	5	0	PI358611	193	5	0
Jl002	74	5	0	PI358612	247	4	1
Jl0130	94	5	0	PI358613	278	3,5	1,5
Jl0226	490	2	3	PI358614	224	4,5	0,5
Jl0691	713	1,5	3,5	PI358615	281	3,5	1,5
Jl1086	48	5	0	PI358616	460	2	3
Jl1108	43	5	0	PI358617	346	3	2
Jl1632	123	5	0	PI358618	271	3,5	1,5
Jl1834	26	5	0	PI560057	726	1,5	3,5
Jl1869	565	2	3	PI560069	609	1,5	3,5
Jl1943	406	2,5	2,5	PI560071	537	2	3
Jl2385	432	2,5	2,5	PI560072	758	1,5	3,5
Jl267	88	5	0	PI560969	1555	1	4
Jl86	33	5	0	PI639955	733	1,5	3,5
L02-0253	278	3,5	1,5	PI639959	529	2	3
PI181958	647	1,5	3,5	VIR1246	26	5	0
PI193835	144	5	0	VIR1541	95	5	0
PI343978	540	2	3	VIR2311	64	5	0
PI358607	250	4	1	VIR2759	263	4	1
PI358608	229	4	1				

## 5.2 Sekvenční a bioinformatická analýza

Pro analýzu sekvencí genů *accD* i *bccp* byl použit program Geneious 7.1.9. Po provedení mnohačetného přiřazení a translatování nukleotidových sekvencí do proteinových byly vzorky na základě jednonukleotidových záměn, inzercí a delecí v jednotlivých sekvencích roztrženy do skupin, alel.

### 5.2.1 Analýza *accD* genu

Po provedení bioinformatické analýzy plastidový gen *accD* kódující beta podjednotku karboxyltransferázy acetyl-CoA karboxylázy vykazoval velkou variabilitu. Velikost jednotlivých sekvencí byla poměrně odlišná, nejkratší o délce 1403 nukleotidů, tedy 467 aminokyselin (JI1010, *P. fulvum*), a nejdelší o délce 1859 nukleotidů, tedy 619 aminokyselin (JI267, *P. elatius*). Rozdíly v délce sekvencí u jednotlivých vzorků jsou způsobeny přítomností inzercí a delecí. Inzerce a delece byly přítomny u všech zkoumaných vzorků, jejich délka se pohybovala v rozmezí od jedné aminokyseliny až 130 aminokyselin. Kromě indelů k variabilitě přispívají také jednonukleotidové polymorfismy, které se taktéž vyskytovaly u všech analyzovaných vzorků.

Na základě podobnosti sekvencí bylo všech 104 analyzovaných vzorků rozřazeno do celkem 34 alel s označením *accD1* až *accD34* (viz Tab. 11). Nejvíce z analyzovaných vzorků má alely *accD29* (22) a *accD14* (21). Některé vzorky jsou natolik unikátní, že představují samostatnou alelu: *accD3* (PIS1675), *accD4* (PIS2853), *accD7* (PIS2850), *accD9* (JI3557), *accD10* (PI344006), *accD12* (JI1095), *accD13* (JI0130), *accD15* (JI261), *accD16* (W6-26109), *accD18* (JI1006), *accD19* (595946), *accD21* (JI2517), *accD26* (ATC7021), *accD27* (JI267), *accD30* (W6-19256) a *accD33* (W6-26112).

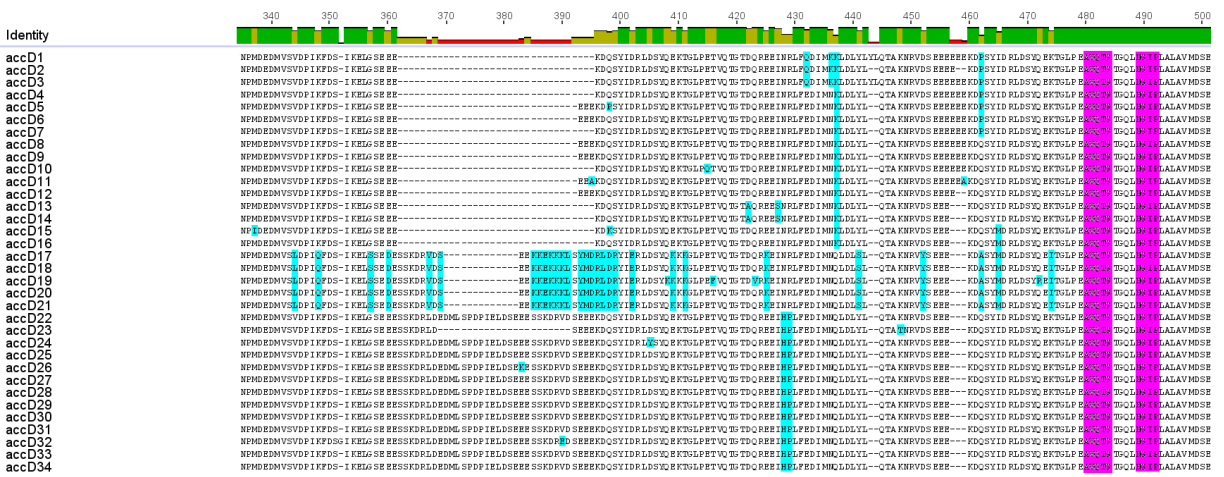
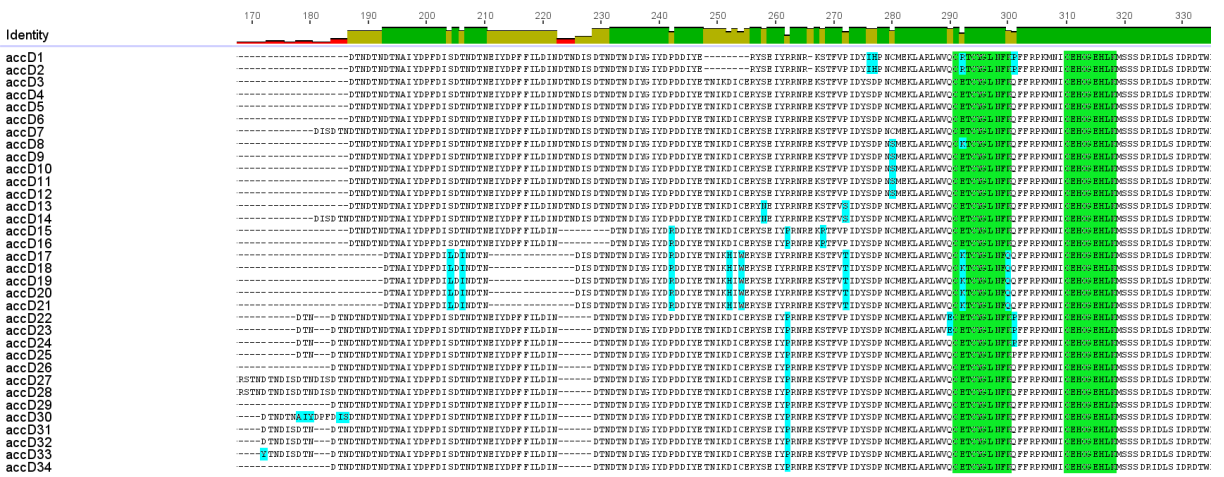
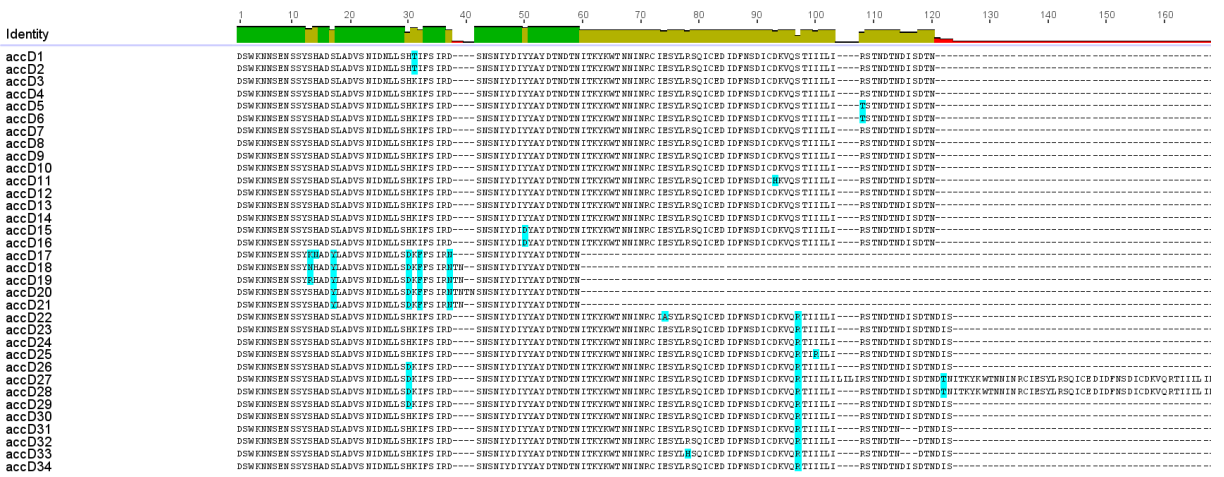
Následující analýza sekvencí byla prováděna pro větší přehlednost na úrovni alel (viz Obr. 7). Nejrozsáhlejší delece obsahuje alela *accD17* a to v pozicích 38–41, 60–192, 211–225, 352, 370–382, 443–444 a 457–459. Největší delece má velikost 133 aminokyselin a nachází se v pozici 60–192 u alel *accD17*, *accD18*, *accD19*, *accD20* a *accD21*, což jsou alely vyskytující se pouze u planého *P. fulvum*. Pro tyto alely jsou také jedinečné delece v pozicích 211–225 a 370–382 a jednonukleotidové polymorfismy např. v pozicích 17, 37, 204 nebo 344. Planý *P. elatius* nevykazuje tak významné sekvenční rozdíly od kulturních forem jako *P. fulvum*, vyskytují se u něj alely *accD1*–*accD12*, *accD15*–*accD25* a *accD29*–*accD34*. U kulturního etiopského hrachu *P. abyssinicum* se vyskytují pouze dvě alely *accD13* a *accD14*, zatímco u *P. sativum* jsou to alely *accD2*, *accD26*, *accD27*, *accD28*, *accD29*, *accD31* a *accD32*.

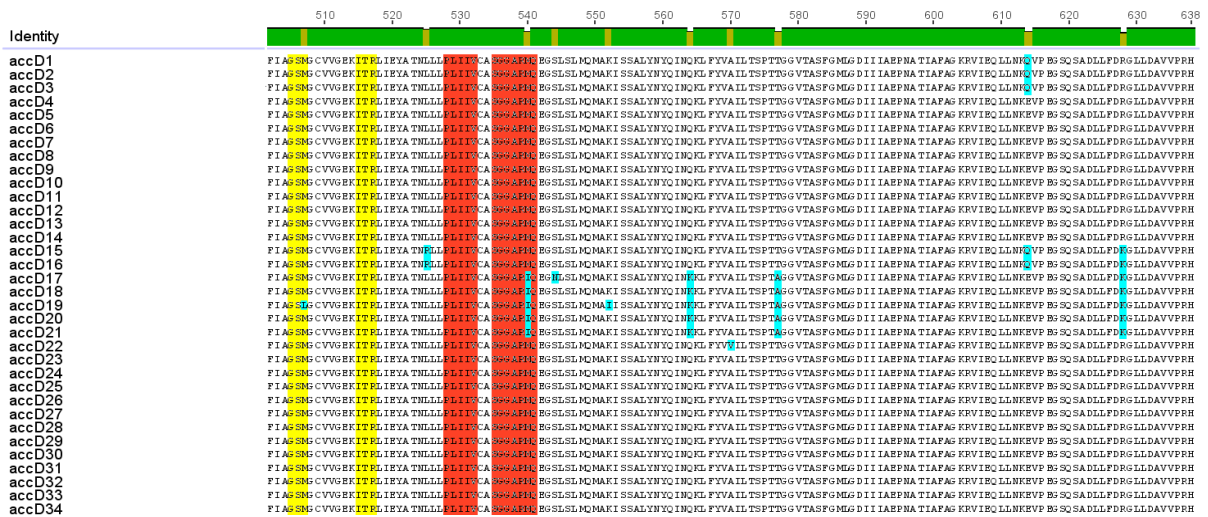
V Obr. 7 jsou vyznačená důležitá vazebná místa jako je acetyl-CoA vazebné místo, CoA karboxylační katalytické místo a karboxybiotin vazebné místo, a také Zn-finger doména. Všechny delece pozorované v *accD* alelách se vyskytují mimo tyto oblasti, které jsou důležité pro správnou funkčnost proteinu.

**Tab. 11:** Rozdělení vzorků podle příslušnosti do *accD* alel

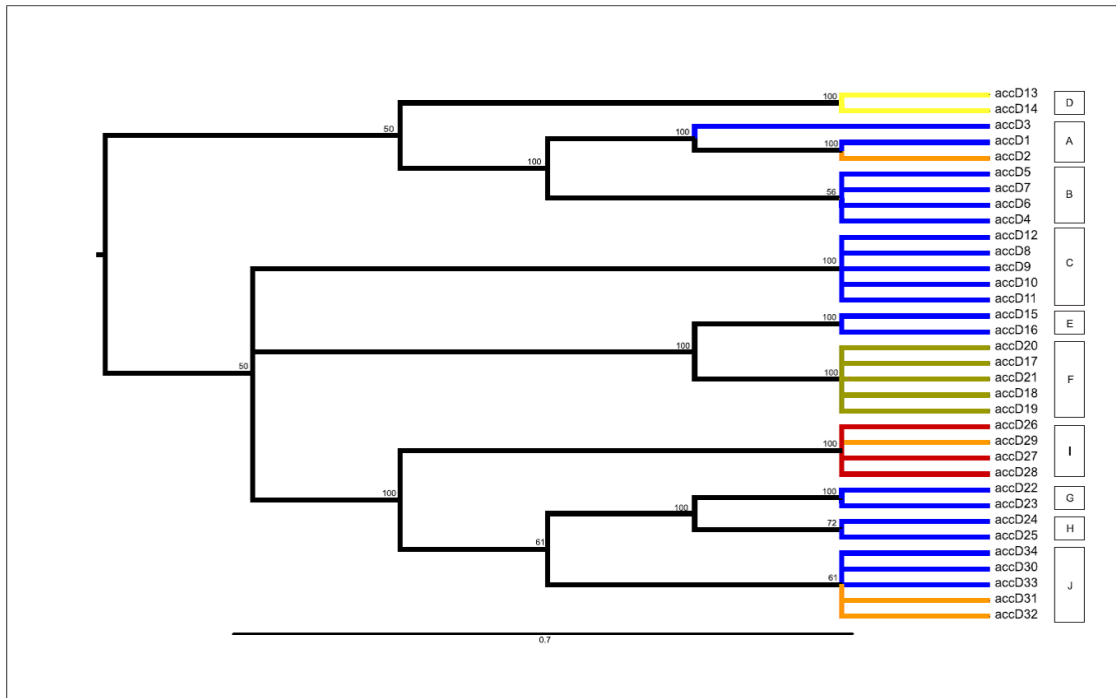
Alela	Vzorky	Alela	Vzorky	Alela	Vzorky	Alela	Vzorky
<i>accD1</i>	PI344537	<i>accD14</i>	J10130	<i>accD17</i>	PI595953	<i>accD29</i>	VIR2311
	IG119794		PI358607	<i>accD18</i>	J11006		IG25414
<i>accD2</i>	712		PI358609	<i>accD19</i>	PI595946		IG52518
	IS19864		PI358610	<i>accD20</i>	PI595935		IG52503
	IS22287		PI358611		PI595944		IG65050
	IS24337		PI358612	<i>accD21</i>	J12517		PI181958
	PI560069		PI358613	<i>accD22</i>	T14/5		PI181799
	PI560071		PI358614		T14/6		PI193835
	PI560969		PI358615	<i>accD23</i>	W6-2101		J11086
<i>accD3</i>	PI358616		T14/3		J11108		
<i>accD4</i>	PIS2853		PI358617	<i>accD24</i>	IG108291		J11853
<i>accD5</i>	721		PI358618		PI639959		J12546
	IS18911		L02-0253	<i>accD25</i>	PI343996		J12602
	PI560058		J12385		IG52443		J186
	PI560059		J11869		PI560072		J192
<i>accD6</i>	PI343972		J11943		T15/2		PI358608
	PI639955	J11974	<i>accD26</i>	ATC7021	T14/9		
<i>accD7</i>	PIS2850	J11632	<i>accD27</i>	J1267	<i>accD30</i>	W6-19256	
<i>accD8</i>	J13558	J1002	<i>accD28</i>	VIR1587	<i>accD31</i>	IG52507	
	PI560057	J10226		J11834		J12629	
<i>accD9</i>	J13557	J10691		J13554		IG52595	
<i>accD10</i>	PI344006	VIR2759	<i>accD29</i>	ARI00989	<i>accD32</i>	IG52596	
<i>accD11</i>	IS18909	<i>accD15</i>		J1261		ATC1044	IG52532
	IS18915	<i>accD16</i>		W6-26109	ATC6926	<i>accD33</i>	W6-26112
	J1262	<i>accD17</i>		IG112136	VIR1246	<i>accD34</i>	PI343978
<i>accD12</i>	J11010		VIR1541	IG140971			







**Obr. 7:** Alignment všech aminokyselinových sekvencí alel *accD*, znázorňující jejich variabilitu. Prázdná místa v sekvencích představují delece, světle modrou barvou jsou znázorněny jednonukleotidové polymorfismy. Zelenou barvou je vyznačena Zn-finger doména, fialovou acetyl-CoA vazebné místo, žlutou CoA karboxylační katalytické místo a červenou karboxybiotin vazebné místo.



**Obr. 8:** Fylogenetický konsenzuální strom pro *accD* gen. Byl sestaven z 18 nejvíce parsimonních stromů (délka 73, konzistenční index 0,900, retenční index 0,972, kompoziční index 0,892). Barvy větví udávají přítomnost alel u jednotlivých taxonomických skupin:

olivově zelená – alely přítomné pouze u *P. fulvum*; žlutá – alely přítomné u *P. abyssinicum*; modrá – alely přítomné pouze u *P. elatius*; červená – alely přítomné pouze u *P. sativum*; oranžová – alely přítomné u *P. elatius* i *P. sativum*. Pro větší přehlednost byly alely uskupeny do vyšších celků A–J (pravý sloupec).

### 5.2.2 Analýza *bccp* genu

Jaderný gen pro biotin karboxyl carrier protein acetyl-CoA karboxylázy vykazoval stejně jako gen *accD* vysokou variabilitu a to v podobě jednonukleotidových záměn. Inzerce nebo delece nebyly v genu přítomny. Kvůli přítomnosti intronů u tohoto genu byla analýza prováděna na cDNA, studován byl tedy polymorfismus kódující části DNA. Aby došlo k detekovatelné amplifikaci *bccp* genu, musela být provedena dvoustupňová (nested) PCR s dvěma páry primerů, což značí nízkou expresi tohoto genu v listech rostlin.

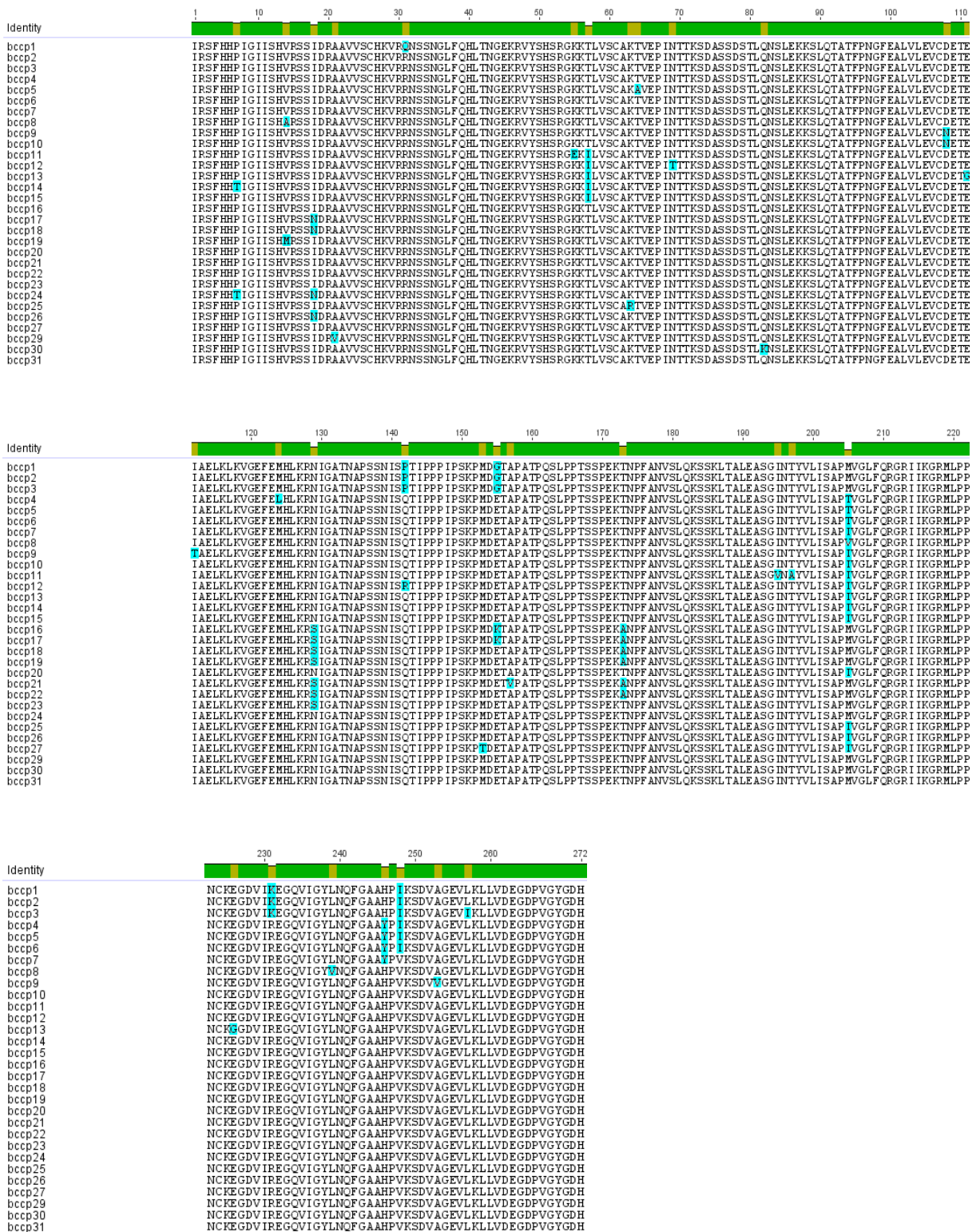
Na základě similarity sekvencí bylo všech 104 analyzovaných vzorků rozřazeno do celkem 31 alel s označením *bccp1* až *bccp31* (viz Tab. 12). Nejvíce z analyzovaných vzorků spadá pod alely *bccp22* (32) a *bccp26* (17). Stejně jako u genu *accD* některé vzorky představovaly samostatnou alelu: *bccp6* (IG52532), *bccp7* (T14/3), *bccp8* (W6-2101), *bccp9* (IG108291), *bccp10* (IS22287), *bccp11* (IG52596), *bccp12* (IG52595), *bccp13* (T14/9), *bccp14* (PI639959), *bccp15* (T14/6), *bccp17* (PI639955), *bccp19* (JI3558), *bccp21* (W6-26112), *bccp23* (JI3557), *bccp24* (PI560057), *bccp25* (T15/2), *bccp29* (PI343996) a *bccp30* (T14/5).

U planého *P. fulvum* se vyskytovaly tři alely *bccp1*, *bccp2* a *bccp3*, které současně nebyly přítomny u žádné z dalších druhů. Tyto alely obsahují shodné SNP v pozicích 142, 155, a 230 bp, odlišující se od alel ostatních. U *P. elatius* bylo identifikováno velké množství alel, některé z nich jsou společné i pro vzorky kulturního hrachu, např. *bccp22*, která převažuje u *P. sativum*. U *P. abyssinicum* byla nejčastěji identifikována příslušnost k alele *bccp26*, v menší míře se vyskytovaly alely *bccp20* a *bccp22*.

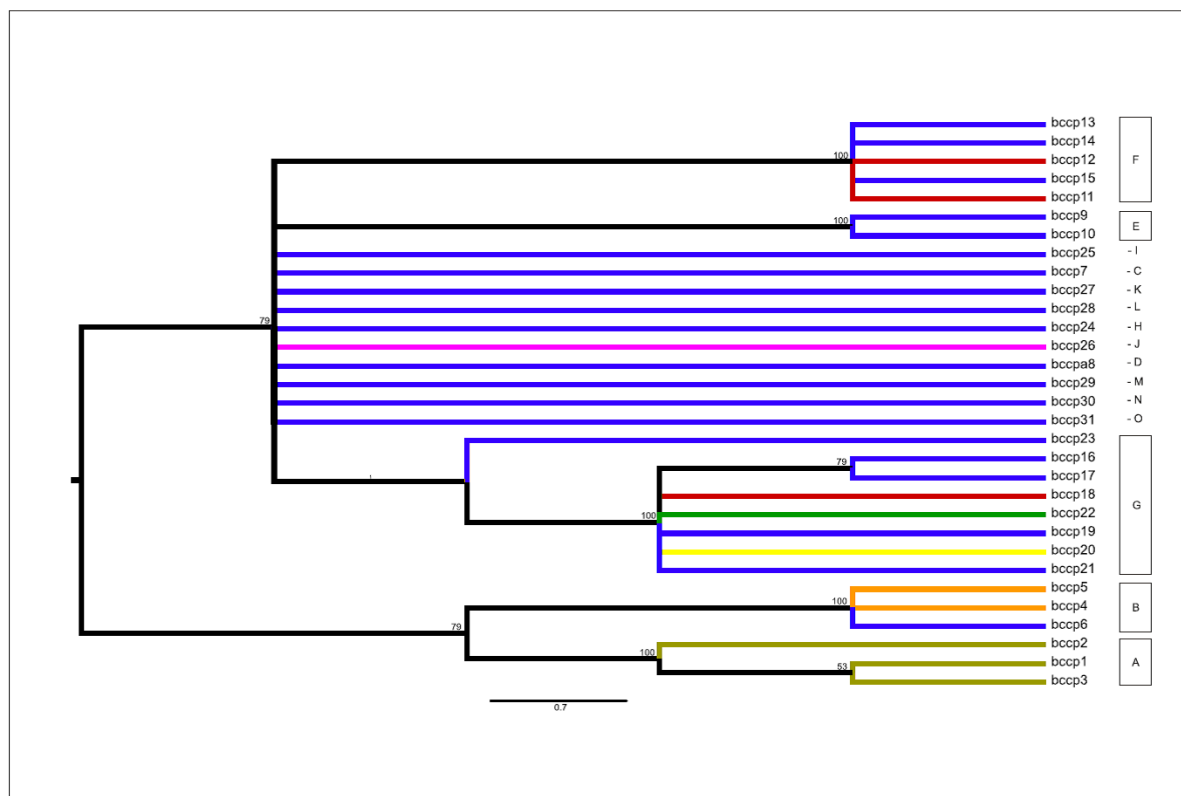
Největší variabilita byla zaznamenána v pozici 205, kdy u alel *bccp4*, *bccp5* a *bccp6* se na této pozici vyskytuje threonin, u alely *bccp8* valin, u alel *bccp7*, *bccp9–bccp15*, *bccp20* a *bccp25–bccp27* isoleucin a u ostatních alel pak methionin.

**Tab. 12:** Rozdělení vzorků podle příslušnosti do *bccp* alel

Alela	Vzorky	Alela	Vzorky	Alela	Vzorky	Alela	Vzorky
<i>bccp1</i>	PI595946	<i>bccp16</i>	PI560058	<i>bccp22</i>	J11086	<i>bccp26</i>	PI358609
	PI595935		PI560059		J11108		PI358610
	PI595944	<i>bccp17</i>	PI639955		J11853		PI358611
	J12517	<i>bccp18</i>	J1267		J12602		PI358612
PI595953	ARI00989		J186		PI358614		
J11006	VIR1246		IG52503		PI358615		
<i>bccp3</i>	IG112136		VIR2311		IG52507		PI358616
	J11010	PI358608	PI344006		PI358617		
<i>bccp4</i>	J11834	<i>bccp19</i>	J13558		IS18909		L02-0253
	J13554	<i>bccp20</i>	PI358613		IS18915		J11943
	IS19864		PI358618		J1262	J1002	
	PI560071		J12385		J11095	J10226	
<i>bccp5</i>	PI560969		J11869		IS24337	J10691	
	712	J11632	J12546		VIR2759		
	PI560069	<i>bccp21</i>	W6-26112		J10130		
<i>bccp6</i>	IG52532	<i>bccp22</i>	ATC7021		W6-19256	<i>bccp27</i>	IG52443
<i>bccp7</i>	T14/3		VIR1587		J12629	PI560072	
<i>bccp8</i>	W6-2101		ATC1044		IG140971	<i>bccp29</i>	PI343996
<i>bccp9</i>	IG108291		ATC6926		721	<i>bccp30</i>	T14/5
<i>bccp10</i>	IS22287		J192		PI343972	<i>bccp31</i>	PI344537
<i>bccp11</i>	IG52596		VIR1541	J11974	IG119794		
<i>bccp12</i>	IG52595		IG65050	<i>bccp23</i>	J13557		J1261
<i>bccp13</i>	T14/9		PI181958	<i>bccp24</i>	PI560057		W6-26109
<i>bccp14</i>	PI639959		PI181799	<i>bccp25</i>	T15/2		PI358607
<i>bccp15</i>	T14/6		PI193835	<i>bccp26</i>	PI343978		PI343978
<i>bccp16</i>	IS18911	IG52518	PI358607		PI358607	PI358607	PI358607



**Obr. 9:** Alignment všech aminokyselinových sekvencí alel *bccp*, znázorňující jejich variabilitu. Světle modrou barvou jsou znázorněny jednonukleotidové polymorfismy, delece ani inserce se v sekvencích nevyskytují.



**Obr. 10:** Fylogenetický konsenzuální strom pro *bccp* gen. Byl sestaven z 19 nejvíce parsimonních stromů (délka 42, konzistenční index 0,762, retenční index 0,900, kompoziční index 0,793). Barvy větví udávají přítomnost alel u jednotlivých taxonomických skupin: olivově zelená – alely přítomné pouze u *P. fulvum*; žlutá – alely přítomné u *P. abyssinicum*; modrá – alely přítomné pouze u *P. elatius*; červená – alely přítomné pouze u *P. sativum*; oranžová – alely přítomné u *P. elatius* i *P. sativum*, fialová – alely přítomné u *P. elatius* i *P. abyssinicum*; zelená – alely přítomné u *P. sativum*, *P. elatius* i *P. abyssinicum*. Pro větší přehlednost byly alely uskupeny do vyšších celků A–O (pravý sloupec).

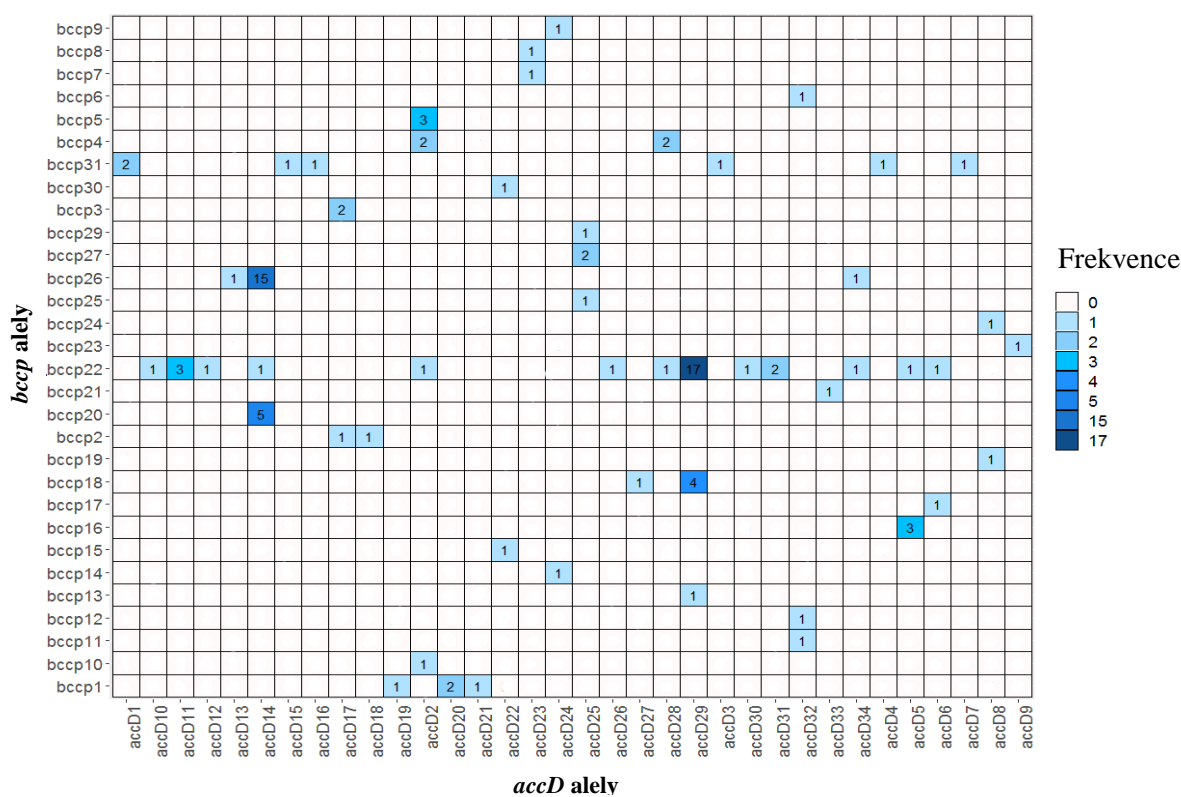
### 5.2.3 Kombinace alel *accD/bccp*

Pro 34 *accD* alel a 31 *bccp* alel je možných celkem 1054 kombinací, při analýze v testovaném souboru 104 vzorků však bylo zaznamenáno 54 kombinací. U planého hrachu *P. elatius* bylo detekováno celkem 37 kombinací, z nichž většina z nich (30 kombinací) se vyskytovala pouze jedenkrát, zbylé kombinace pak byly zastoupeny dvakrát (*accD29/bccp22*, *accD25/bccp27*, *accD1/bccp31*, *accD2/bccp4*, *accD2/bccp5*) až třikrát (*accD5/bccp16*, *accD11/bccp22*). U dalšího z planých hrachů, *P. fulvum* bylo objeveno 6 kombinací zastoupených nanejvýše dvakrát. V rámci kulturního *P. abyssinicum* byly detekovány jen 4 kombinace, přičemž převažovala kombinace alel *accD14/bccp26* (15) a následovala kombinace *accD14/bccp20*. Další dvě kombinace *accD14/bccp22* a *accD13/bccp26* byly

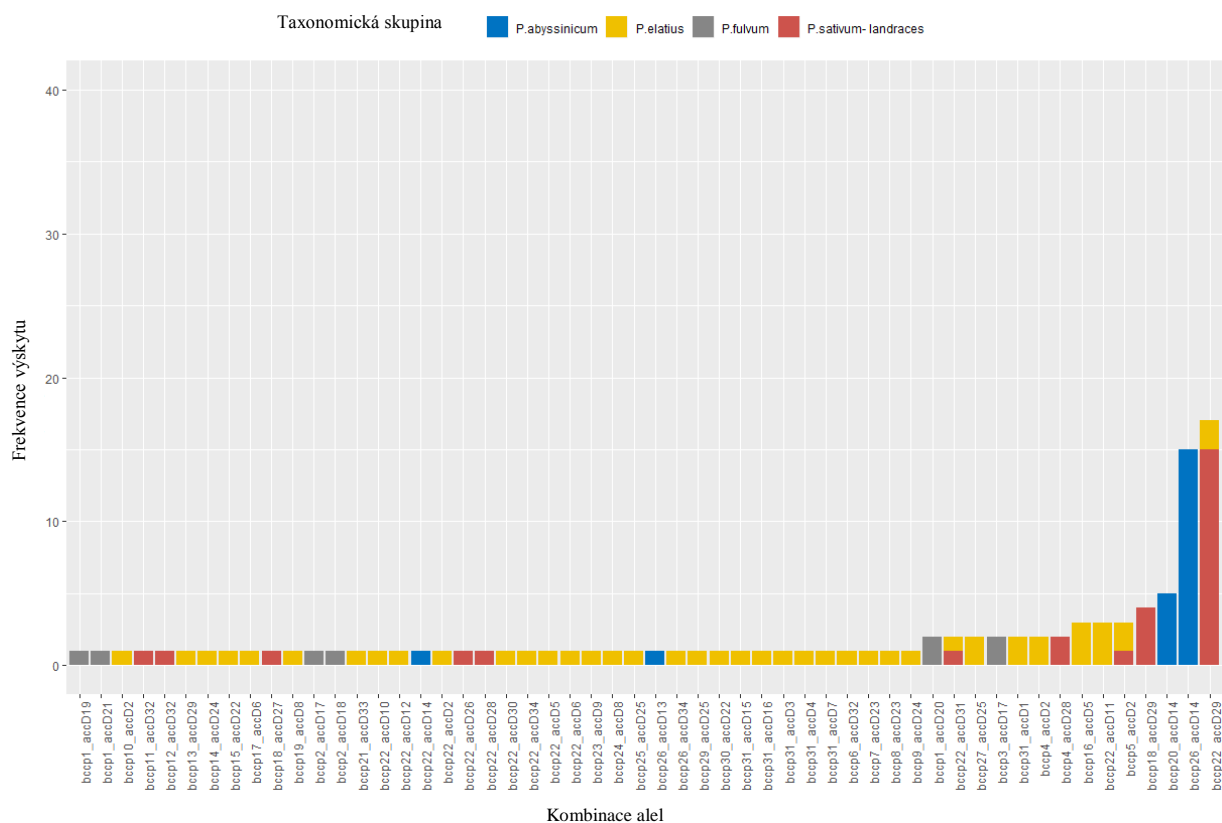
zastoupeny pouze jedenkrát. U kulturního *P. sativum* se vyskytovalo 10 kombinací, kdy nejčetnější byla kombinace *accD29/bccp22* (15) a dále pak *accD29/bccp18* (4). Další kombinace pak byly zastoupeny jedenkrát až dvakrát.

Většina kombinací alel *accD* a *bccp* byla přítomna pouze u jednoho z druhů. Výjimku představují kombinace *accD2/bccp5*, *accD29/bccp22* a *accD31/bccp22*, které se vyskytují u dvou druhů, *P. elatius* i *P. sativum*.

Nejpočetnější kombinace *accD29/bccp22* se ukázala jako typická především pro *P. sativum* (15), u *P. elatius* byla zaznamenána pouze dvakrát. Druhá nejčastější kombinace *accD14/bccp26* se vyskytovala pouze u *P. abyssinicum*.



Obr. 11: Všechny identifikované kombinace alel *accD* a *bccp*



**Obr. 12:** Výskyt kombinací alel v rámci jednotlivých druhů

### 5.2.4 Geografická distribuce alel *accD/bccp*

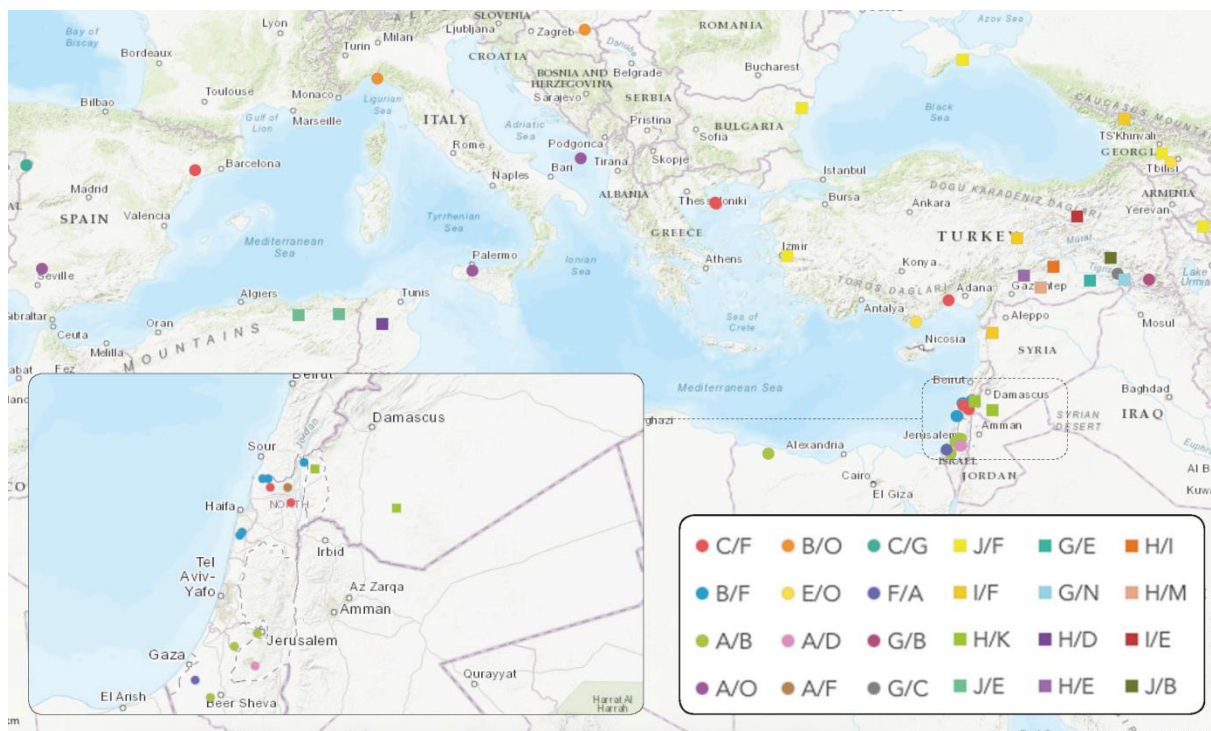
Rostlinné vzorky pocházely z geograficky rozsáhlé oblasti okolo Středozemního moře – jižní Evropy, severní Afriky a Blízkého východu, některé až z oblastí Asie. Planý hrách *P. fulvum*, u něž byly zaznamenány unikátní alely *accD17–21* a *bccp1–3*, tedy F/A, se vykytoval pouze na území Blízkého východu v Izraeli, Sýrii, Jordánsku a Turecku. *P. elatius* se ukázal jako velmi různorodý s mnoha kombinacemi alel *accD/bccp* a s oblastí výskytu od Portugalska přes Maďarsko, Tunisko, Blízký východ až do Ruska. Největší počet vzorků *P. elatius* pocházel z Izraele (14) a následně z Turecka (13), kombinace alel byla velmi pestrá. Přičemž alely *accD2* a *accD5* se vyskytovaly pouze u vzorků z Izraele. Mnoho *accD* i *bccp* alel se u *P. elatius* vyskytovalo pouze jedenkrát.

Rozšíření kulturního *P. sativum* bylo ještě rozsáhlejší než u *P. elatius*, kromě jihoevropských, severoafrických zemí a Blízkého východu zasahovalo až do Asie. Nejčastější kombinací alel byla *accD29/bccp22* (případně I/F, kdy I zahrnuje i alely *accD26–28* a F alelu *bccp18*). Odlišné alely byly zaznamenány u vzorku PI560969 z Nepálu (*accD2/bccp5*) a Alžírsku (*accD32/bccp11,12*). *P. abyssinicum* je svým výskytem typický pro Etiopii a zcela



u něj převažuje alela *accD14*, která se vyskytuje v kombinaci s alelami *bccp20*, *bccp22* nebo *bccp26* (také D/J a D/F).

Z důvodu mnoha zaznamenaných kombinací alel *accD/bccp* bylo pro vynesení vzorků do mapy použito vyšší označení skupin A–J pro *accD* a A–O pro *bccp* (viz Obr. 8 a 10).



**Obr. 13:** Mapa geografické distribuce *accD* a *bccp* alel sestavená s použitím vyšších skupin v oblasti okolo Středozemního moře

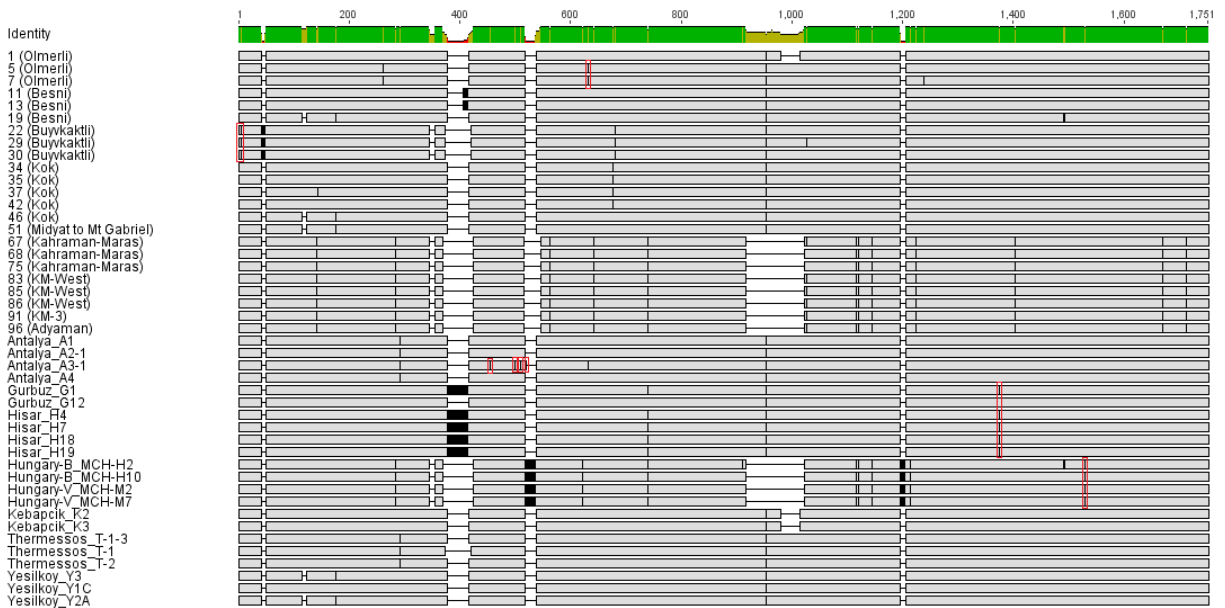
### 5.2.5 Analýza populací

Gen *accD* byl analyzován také u jednotlivých rostlin planého hrachu z několika populací nacházejících se na území východního Turecka a území Maďarska. I v rámci několika populací *P. elatius* bylo možné pozorovat variabilitu, k níž přispívá přítomnost inzercí, delecí i jednonukleotidových polymorfismů. Takováto variabilita může potencionálně vést i k reprodukční izolaci v rámci populace.

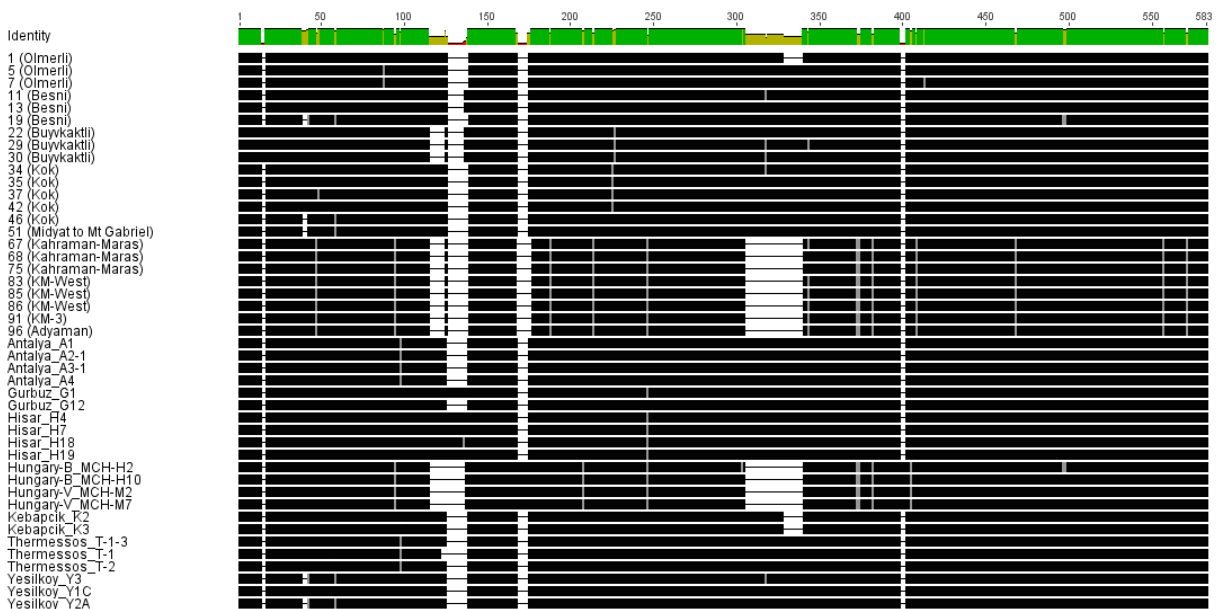
Jednonukleotidové záměny jsou vyznačeny v tabulce (Tab. 13). Inzerce byly identifikovány na pozicích 43–48, 379–414, 406–414, 519–536 a 1196–1204, delece na pozicích 115–123, 346–354, 370–423, 374–418, 518–544, 918–1020 a 980–1012.

**Tab. 13:** Analýza jednonukleotidových polymorfismů pro vzorky z východního Turecka a Maďarska

Pozice (bp)	Záměna	Typ záměny	Synonymní/nesynonymní
6	C → T	tranzice	synonymní
125	G → A	tranzice	nesynonymní
142	T → G	transverze	nesynonymní
145	T → A	transverze	nesynonymní
176	C → G	transverze	nesynonymní
262	G → T	transverze	nesynonymní
285	G → T	transverze	nesynonymní
293	T → G	transverze	nesynonymní
406	G → A	tranzice	nesynonymní
456	A → C	transverze	synonymní
501	A → T	transverze	synonymní
510	A → C	transverze	synonymní
518	C → T	tranzice	synonymní
563	C → G	transverze	nesynonymní
623	C → G	transverze	nesynonymní
633	A → G	tranzice	synonymní
642	T → G	transverze	nesynonymní
678	T → G	transverze	nesynonymní
681	G → C	transverze	nesynonymní
740	C → A	transverze	nesynonymní
911	A → T	transverze	nesynonymní
953	C → T	tranzice	nesynonymní
1027	C → A	transverze	nesynonymní
1028	A → C	transverze	nesynonymní
1117	C → A	transverze	nesynonymní
1121	C → G	transverze	nesynonymní
1144	C → A	transverze	nesynonymní
1214	A → C	transverze	nesynonymní
1224	C → G	transverze	nesynonymní
1238	C → T	tranzice	nesynonymní
1374	C → A	transverze	synonymní
1403	T → G	transverze	nesynonymní
1490	C → T	tranzice	nesynonymní
1493	C → T	tranzice	nesynonymní
1530	C → T	tranzice	synonymní
1669	G → C	transverze	nesynonymní
1712	G → A	tranzice	nesynonymní



**Obr. 14:** Alignment všech nukleotidových sekvencí genu *accD* jednotlivých rostlin populací z východního Turecka a Maďarska. Mezery představují delece, úseky vyznačeny černě inserce. Jednotlivé svislé linie značí jednonukleotidové záměny. Červeně jsou vyznačeny záměny synonymní.



**Obr. 15:** Alignment všech aminokyselinových sekvencí genu *accD* jednotlivých rostlin populací z východního Turecka a Maďarska. Mezerami jsou značeny delece. Šedé svislé linie představují jednonukleotidové záměny.

V analyzovaném souboru 45 rostlin pocházejících z patnácti tureckých populací a dvou maďarských (Chaloupská, 2015) bylo identifikováno 37 jednonukleotidových záměn, z nichž pouze 8 jich bylo synonymních. Mezi záměnami převažovaly transverze v počtu 26, zatímco tranzicí bylo 11. Jako téměř identické se jeví vzorky s označením 67 (Kahraman-Maras), 68 (Kahraman-Maras), 75 (Kahraman-Maras), 83 (KM-West), 85 (KM-West), 86 (KM-West), 91 (KM-3) a 96 (Adyaman), u nichž se vyskytují jednonukleotidové záměny, které u zbylých rostlin souboru pozorovány nebyly, např. SNP v pozicích 142 bp, 285 bp, 563 bp. Velkou podobnost také vykazují vzorky označené 22 (Buyvkaktli), 29 (Buyvkaktli) a 30 (Buyvkaktli), s unikátními SNP v pozicích 6 bp, 681 bp či inzercí v 43–48 bp. Stejně tak je tomu i u maďarských vzorků Hungary-B\_MCH-H10, Hungary-B\_MCH-H2, Hungary-V\_MCH-M2 a Hungary-V\_MCH-M7 se SNP v pozicích 623 bp, 1214 bp či inzercí v 519–536 a 1196–1204. I přes velkou podobnost sekvencí těchto výše zmíněných vzorků v nich byly zaznamenány jednonukleotidové polymorfismy, které je od sebe odlišují.

## 6 DISKUSE

Cílem diplomové práce byla analýza dvou genů, chloroplastového *accD* a jaderného *bccp*, podílejících se na jaderně-cytoplasmatickém konfliktu způsobujícím reprodukční izolaci u hrachu (*Pisum* sp.). Zkoumány byly nukleotidové a aminokyselinové sekvence těchto genů, s ohledem na jejich variabilitu byly rozděleny do jednotlivých alel. Poté bylo určeno, v jakých kombinacích se alely vyskytují a jaké je jejich geografické rozložení. Značná variabilita genu *accD* byla také objevena u rostlin v rámci jednotlivých vybraných populace nacházející se na východě Turecka a v Maďarsku (Chaloupská, 2015).

Analýza byla provedena na celkem 104 vzorcích hrachu, z toho bylo 28 vzorků kulturního *P. sativum* (landraces), 22 vzorků kulturního *P. abyssinicum*, 46 vzorků planého *P. elatius* a 8 vzorků planého *P. fulvum*; a souboru 45 vzorků z patnácti tureckých populací a dvou maďarských. Vzorky byly zvoleny na základě dřívějších studií provedených Bogdanova *et al.* (2015), Smýkal *et al.* (2017, 2018) a Trněný *et al.* (2018).

Geny *accD* a *bccp* se významně podílejí na stavbě a funkci enzymu acetyl-CoA karboxyláza, které je zodpovědná za syntézu mastných kyselin u rostlin. Nekompatibilní spojení alel *accD/bccp* vede k postzygotické jaderně-cytoplasmatické inkompatibilitě (Bogdanova *et al.*, 2015). Postižené rostliny vykazují sterilitu, jsou menšího vzrůstu a jejich listy jsou redukovány (Bogdanova *et al.*, 2009).

Velká variabilita v rámci genu *accD* v podobě inzercí, delecí i jednonukleotidových záměn je shodná se zjištěním D'Agostino *et al.* (2018), kteří gen *accD* společně s geny *ndhB*, *rpl20*, *ycf1* a *ycf2* označují při své studii na *Capsicum* sp. jako nejvariabilnější. Ke stejným výsledkům došli i Sloan *et al.* (2012) a Rockenbach *et al.* (2016), kteří u genu *accD* také pozorují pozitivní selekci, což se shoduje s poznatky z článku rozšiřujícího tuto diplomovou práci (Nováková *et al.*, 2019). I přes velkou variabilitu je gen *accD* přeložitelný do proteinů a zachovává si čtecí rámeček. Gurdon *et Maliga* (2014) uvádí, že variabilita genu *accD* je způsobena inzercí repetitivních sekvencí, což taktéž odpovídá zjištění této práce Nováková *et al.* (2019). Gen *bccp* se od genu *accD* výrazně liší a to především absencí inzercí a delecí, což může být zapříčiněno tím, že jde o gen jaderný a jeho sekvence je tedy více konzervovaná (Bogdanova *et al.*, 2015), zároveň však byl gen *bccp* studován pouze v rámci exonů.

Kromě genů *accD* a *bccp* byly v kontextu s jaderně-cytoplasmatickým konfliktem studovány i jaderné lokusy *Scs1* a *Scs2* (Bogdanova *et al.*, 2009), při čemž záleží na původu lokusů, tedy zda pochází z kulturní nebo plané rostliny hrachu. Při studiu alel *accD* a *bccp* Bogdanova *et al.* (2015) provedli křížení planého *P. elatius* L100 a kulturního *P. sativum*

WL1238, což vedlo k albinotickému potomstvu menšího vzrůstu, zatímco křížením *P. elatius* JI1794 či 721 s *P. sativum* WL1238 vznikalo potomstvo normální. Shodné poznatky jsou uvedeny i v článku Nováková *et al.* (2019), pro diplomovou práci se však tato studie ukázala jako příliš komplexní, nevyhovující podmínky křížení (vysoká teplota ve skleníku) a časová náročnost ji tak nakonec neumožnily. Bogdanova *et al.* (2015) také uvádí, že do inkompatibility způsobené interakcí genů *accD* a *bccp* mohou být zapojeny i geny další, např. jaderný gen *hcs2*, kódující biotin (acetyl-CoA karboxyláza) ligázu.

Jak již bylo uvedeno, článek Nováková *et al.* (2019) rozšiřuje poznatky z této diplomové práce. K analýze byl použit větší počet vzorků, celkem 195 namísto 104 vzorků, přičemž zahrnuty byly jak vzorky kulturního hrachu *P. sativum* a *P. abyssinicum*, tak hrachu planého *P. elatius* a *P. fulvum*. Shodné bylo taktéž rozdělení do alel, pro gen *accD* to byly alely *accD1* až *accD34* a pro gen *bccp* alely *bccp1* až *bccp31*. Nejpočetněji zastoupenou *accD* alelou byla v obou případech *accD29*, vyskytující se převážně u *P. sativum*, ale v menší míře také u *P. elatius*. Pro *bccp* gen to taktéž v obou případech byla alela *bccp22*, vyskytující se v podobném množství u *P. sativum* i *P. elatius* a v jednom případě i u *P. abyssinicum*. Nejčastější kombinace alel, *accD29/bccp22*, která se vyskytuje především u *P. sativum*, ale také u *P. elatius*, je taktéž ve shodě s poznatky z výše uvedeného článku. Stejně tak i alela *accD14* (tedy i kombinace *accD14/bccp26,bccp20*) vyskytující se pouze u *P. abyssinicum*, nebo alely *accD17–accD21* a *bccp1–bccp3* typické pro *P. fulvum*. Při analýze větší sady vzorků byla zjištěna přítomnost některých alel i u dalších druhů hrachu, než jak je uvedeno v této diplomové práci. Např. alela *accD6* byla kromě *P. elatius* zaznamenána i u *P. sativum*, *accD14* kromě *P. abyssinicum* i u *P. sativum* a *accD22* kromě *P. elatius* i u *P. fulvum*. U *bccp* genu se jedná např. o alelu *bccp3*, která se kromě *P. fulvum* vyskytovala i u *P. sativum*, *bccp18* kromě *P. sativum* i u *P. elatius* nebo *bccp20*, jež byla kromě *P. abyssinicum* i u *P. elatius* a *P. sativum*.

Trněný *et al.* (2018) provedli u hrachu DArTseq analýzu na celogenomové úrovni, jehož důsledkem bylo rozdělení hrachu do 10 genetických skupin. Při porovnání těchto skupin s distribucí alel *accD* a *bccp* můžeme pozorovat korelaci u nezávisle domestikovaného *P. abyssinicum* patřícího do skupiny 7 a zároveň majícího unikátní kombinace alel (*accD14/bccp26,bccp20*). U *P. sativum*, podle Trněný *et al.* (2018) náležícího do skupin 3 a 6, souvislost mezi genetickou skupinou a rozložením *accD/bccp* alel nebyla zřetelná. Stejně tak tomu bylo u planého *P. elatius* rozřazeného do celkem 7 skupin (1; 3–5; 8–10), přičemž skupina 3 je společná s *P. sativum*. Naopak u druhu *P. fulvum* byla jasně daná příslušnost do skupiny 2 a současně také přítomnost alel *accD17–accD21* a *bccp1–bccp3*. Mezi příslušností

do genetických skupin získaných DArTseq analýzou a distribucí *accD/bccp* alel tak byla zaznamenána pouze částečná souvislost. Vzhledem k velké variabilitě pozorované v obou genech a zároveň také u genu *accD* v rámci jednotlivých rostlin z několika tureckých populací (Smýkal *et al.*, 2018) je možné říci, že je hrách stále evolučně aktivní a vysoká variabilita může vést k reprodukční izolaci.

V přírodě hrají reprodukční bariéry důležitou roli mezi planými a kulturními formami, které se vyvinuly procesem domestikace (Ladizinsky, 1985). Během domestikace plodin došlo k snížení genetické diverzity (Olsen *et Gross*, 2008), což v dnešní době představuje problém z hlediska adaptability a dalšího šlechtění plodin. Řešením může být křížení původních planých forem s kulturními, a tedy překonávání reprodukčních bariér mezi nimi a umožnění genového toku (Dempewolf *et al.*, 2014).

V praxi tedy může být inkompatibilita a samčí cytoplazmatická sterilita využita pro šlechtění a produkci hybridů, u nichž je možné pracovat s heterozním efektem, a zajistit tedy větší výnosnost (Kim *et Zhang*, 2018). U CMS linií není nutné zbavovat rostliny pylových zrn a tedy bránit samoopylení, představují proto ideální samičí linie při produkci hybridních rostlin. Zároveň je však u nich následně možné obnovit fertilitu pomocí jaderného *Rf* genu (Eckardt, 2006; Chen *et Lui.*, 2014). Inkompatibilita a CMS linie našly využití u mnoha zemědělských plodin, např. rýže seté (*Oryza sativa* L.; Virmani *et al.*, 1982), pšenice (*Triticum* sp.; Liu *et al.*, 2006), sóji (*Glycine* sp.; Ding *et al.*, 2002) nebo bavlny (*Gossypium* sp.; Weaver *et Weaver*, 1977).

## 7 ZÁVĚR

Diplomové práce byla zaměřena na problematiku jaderně-cytoplazmatického konfliktu u hrachu (*Pisum* sp.) způsobeného inkompatibilitou dvou genů, chloroplastového *accD*, kódujícího beta podjednotku karboxyltransferázy acetyl-CoA karboxylázy, a jaderného *bccp*, kódující biotin karboxyl carrier protein acetyl-CoA karboxylázy. Analýza byla provedena na celkem 104 vzorcích hrachu, z toho 28 vzorcích kulturního *P. sativum*, 22 vzorcích kulturního *P. abyssinicum*, 46 vzorcích planého *P. elatius* a 8 vzorcích planého *P. fulvum*. Dále pak na 45 vzorcích *P. elatius* z populací Turecka a Maďarska.

Byla provedena izolace genomové DNA a RNA, která byla následně pomocí reverzní transkripce přepsána do cDNA. Poté byla provedena PCR amplifikace genů *accD* a *bccp*, elektroforetická separace a geny byly osekvenovány. Byla zjištěna vysoká variabilita, jednonukeotidové záměny byly přítomny u obou genů, u geny *accD* byl zaznamenán také velký počet inzercí a delecí. Na základě similarity sekvencí pak byla určena příslušnost ke konkrétní alele, pro gen *accD* bylo nalezeno 34 alel, pro gen *bccp* bylo alel 31. Mezi alelami genů pak bylo zjištěno 54 *accD/bccp* kombinací z 1054 možných, přičemž nejpočetnější byla kombinace *accD29/bccp22* vyskytující se převážně u *P. sativum* a následovala kombinace *accD14/bccp26* typická pro *P. abyssinicum*.

Planý *P. fulvum* se vyskytoval pouze na území Izraeli, Sýrii, Jordánsku a Turecku a byly u něj přítomny alely *accD17–21* a *bccp1–3*. *P. elatius* pokrýval rozsáhlé území jižní Evropy, severní Afriky a Blízkého východu. U kulturního druhu *P. sativum* z geograficky rozsáhlého území včetně oblastí střední Asie dominovala kombinace *accD29/bccp22*. Etiopský a pravděpodobně nezávisle domestikovaný *P. abyssinicum* měl odlišnou kombinaci *accD14/bccp26* alel.

Jaderně-cytoplazmatický konflikt studovaný v této práci představuje jednu z postzygotických reprodukčních bariér, poznatky z této diplomové práce jsou zajímavé z pohledu evolučního a mohou být také dále uplatněny při pěstování a šlechtění hrachu. Zajímavá by byla analýza homologních sekvencí u fylogeneticky příbuzných druhů rodů *Lathyrus*, *Vicia* či *Cicer*, včetně možného dopadu na vznik albinotických jedinců při vzdáleném křížení (Kumari *et al.*, 2011).



## 8 LITERATURA

- Aalto E. A., Koelewijn H. P., Savolainen O. (2013): Cytoplasmic male sterility contributes to hybrid incompatibility between subspecies of *Arabidopsis lyrata*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 3: 1727–1740.
- Baack E., Melo M. C., Rieseberg L. H., Ortiz-Barrientos D. (2015): The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytologist* 207: 968–984.
- Balk J., Leaver C. J. (2001): The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *The Plant Cell* 13: 1803–1818.
- Bank C., Bürger R., Hermisson J. (2012): The limits to parapatric speciation: Dobzhansky-Muller incompatibilities in a continent-island model. *Genetics* 191: 845–863.
- Barnard-Kubow K. B., McCoy M. A., Galloway L. F. (2017): Biparental chloroplast inheritance leads to rescue from cytonuclear incompatibility. *New Phytologist* 213: 1466–1476.
- Barnard-Kubow K. B., So N., Galloway L. F. (2016): Cytonuclear incompatibility contributes to the early stages of speciation. *Evolution* 70: 2752–2766.
- Barrett S. C. (1990): The evolution and adaptive significance of heterostyly. *Trends in Ecology & Evolution* 5: 144–148.
- Bateson W., Gairdner A. E. (1921): Male-sterility in flax, subject to two types of segregation. *Journal of Genetics* 11: 269–275.
- Bentolila S., Alfonso A. A., Hanson M. R. (2002): A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 10887–10892.
- Bernacchi D., Tanksley S. D. (1997): An interspecific backcross of *Lycopersicon esculentum* × *L. hirsutum*: linkage analysis and a QTL study of sexual compatibility factors and floral traits. *Genetics* 147: 861–877.
- Blair G. E., Ellis R. J. (1973): Protein synthesis in chloroplasts I. Light-driven synthesis of the large subunit of fraction I protein by isolated pea chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* 319: 223–234.

- Bogdanova V. S., Galieva E. R., Kosterin O. E. (2009): Genetic analysis of nuclear-cytoplasmic incompatibility in pea associated with cytoplasm of an accession of wild subspecies *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmahl. *Theoretical and Applied Genetics* 118: 801–809.
- Bogdanova V. S., Galieva E. R., Yadrikhinskiy A. K., Kosterin O. E. (2012): Inheritance and genetic mapping of two nuclear genes involved in nuclear-cytoplasmic incompatibility in peas (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 124: 1503–1512.
- Bogdanova V. S., Kosterin O. E. (2006): A case of anomalous chloroplast inheritance in crosses of garden pea involving an accession of wild subspecies. *Doklady Biological Sciences* 406: 44–46
- Bogdanova V. S., Zaytseva O. O., Mglinets A. V., Shatskaya N. V., Kosterin O. E., Vasiliev G. V. (2015): Nuclear-cytoplasmic conflict in pea (*Pisum sativum* L.) is associated with nuclear and plastidic candidate genes encoding acetyl-CoA carboxylase subunits. *PLoS One* 10: e0119835.
- Bomblies K., Lempe J., Epple P., Warthmann N., Lanz C., Dangl J. L., Weigel D. (2007): Autoimmune response as a mechanism for a Dobzhansky-Muller-type incompatibility syndrome in plants. *PLoS biology* 5: e236.
- Brewbaker J. L. (1957): Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *Journal of Heredity* 48: 271–277.
- Brown G. G., Formanová N., Jin H., Wargachuk R., Dendy C., Patil P., Laforest M., Zhang J., Cheung W. Y., Landry B. S. (2003): The radish Rfo restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *The Plant Journal* 35: 262–272.
- Bush G. L. (1975): Modes of animal speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 6: 339–364.
- Campbell R. B. (1986): The interdependence of mating structure and inbreeding depression. *Theoretical Population Biology* 30: 232–244.
- Cosmides L. M., Tooby J. (1981): Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *Journal of Theoretical Biology* 89: 83–129.
- Cui X., Wise R. P., Schnable P. S. (1996): The rf2 nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science* 272: 1334–1336.

- D'Agostino N., Tamburino R., Cantarella C., De Carluccio V., Sannino L., Cozzolino S., Cardi T., Scotti N. (2018): The complete plastome sequences of eleven *Capsicum* genotypes: insights into DNA variation and molecular evolution. *Genes* 9: 503.
- Darwin C. (1876): *The effects of cross and self fertilisation in the vegetable kingdom*. John Murray, London
- Darwin C. (1877): *The different forms of flowers on plants of the same species*. John Murray, London.
- De Meeûs T., Prugnolle F., Agnew P. (2007): Asexual reproduction: genetics and evolutionary aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 1355–1372.
- De Nettancourt D. (1977): *Incompatibility in angiosperms*. Springer Science & Business Media. Berlin.
- Dempewolf H., Eastwood R. J., Guarino L., Khoury C. K., Müller J. V., Toll J. (2014): Adapting agriculture to climate change: a global initiative to collect, conserve, and use crop wild relatives. *Agroecology and Sustainable Food Systems* 38: 369–377.
- Dewey R. E., Timothy D. H., Levings C. S. (1987): A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 5374–5378.
- Ding D., Gai J., Cui Z., Qiu J. (2002): Development of a cytoplasmic-nuclear male-sterile line of soybean. *Euphytica* 124: 85–91.
- Dinu I. I., Hayes R. J., Kynast R. G., Phillips R. L., Thill C. A. (2005): Novel inter-series hybrids in *Solanum*, section Petota. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 403–415.
- Dixit R., Nasrallah J. B. (2001): Recognizing self in the self-incompatibility response. *Plant physiology* 125: 105–108.
- Dobzhansky T. H. (1936): Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids. *Genetics* 21: 113.
- Dobzhansky T. H. (1937): *Genetics and the Origin of Species*. Columbia university press, New York.
- East E. M., Mangelsdorf A. J. (1925): A new interpretation of the hereditary behavior of self-sterile plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 11: 166.

- Eckardt N. A. (2006): Cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *The Plant Cell* 18: 515–517.
- Erickson L., Grant I., Beversdorf W. (1986): Cytoplasmic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 72: 151–157.
- Franklin-Tong N. V., Franklin C. F. (1993): Gametophytic self-incompatibility: contrasting mechanisms for *Nicotiana* and *Papaver*. *Trends in Cell Biology* 3: 340–345.
- Franklin-Tong V. E., Atwal K. K., Howell E. C., Lawrence M. J., Franklin F. C. H. (1991): Self-incompatibility in *Papaver rhoeas*: there is no evidence for the involvement of stigmatic ribonuclease activity. *Plant, Cell & Environment* 14: 423–429.
- Franklin-Tong V. E., Holdaway-Clarke T. L., Straatman K. R., Kunkel J. G., Hepler P. K. (2002): Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas*. *The Plant Journal* 29: 333–345.
- Franklin-Tong V. E., Ride J. P., Read N. D., Trewavas A. J., Franklin F. C. H. (1993): The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *The Plant Journal* 4: 163–177.
- Furstenau T. N., Cartwright R. A. (2017): The impact of self-incompatibility systems on the prevention of biparental inbreeding. *PeerJ* 5: e4085.
- Gavrilets S., Li H., Vose M. D. (2000): Patterns of parapatric speciation. *Evolution* 54: 1126–1134.
- Gerstel D. U. (1950): Self-incompatibility studies in guayule II. Inheritance. *Genetics* 35: 482.
- Greiner S., Wang X., Herrmann R. G., Rauwolf U., Mayer K., Haberer G., Meurer J. (2008): The complete nucleotide sequences of the 5 genetically distinct plastid genomes of *Oenothera*, subsection *Oenothera*: II. A microevolutionary view using bioinformatics and formal genetic data. *Molecular Biology and Evolution* 25: 2019–2030.
- Gurdon C., Maliga P. (2014): Two distinct plastid genome configurations and unprecedented intraspecies length variation in the *accD* coding region in *Medicago truncatula*. *DNA research* 21: 417–427.
- Hiscock S. J., McInnis S. M. (2003): Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends in Plant Science* 8: 606–613.

- Holsinger K. E. (2000): Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 7037–7042.
- Hughes M. B., Babcock E. B. (1950): Self-incompatibility in *Crepis foetida* (L.) subsp. *rhoeadifolia* (Bieb.) Schinz et Keller. *Genetics* 35: 570.
- Chaloupská M. (2015): Genetická diverzita *Vavilovia formosa* a *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Fabeae, Fabaceae). Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Charlesworth D. (1982): On the nature of the self-incompatibility locus in homomorphic and heteromorphic systems. *The American Naturalist* 119: 732–735.
- Chen C., Zhiguo E., Lin H. X. (2016): Evolution and molecular control of hybrid incompatibility in plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 1208.
- Chen L., Liu Y. G. (2014): Male sterility and fertility restoration in crops. *Annual Review of Plant Biology* 65: 579–606.
- Chen M., Zhao Z., Jiang L., Wan J. (2012): A new gene controlling hybrid sterility in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 184: 15–22.
- Johnston S. A., Den Nijs T. P. M., Peloquin S. J., Hanneman R. E. (1980): The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetics* 57: 5–9.
- Kannangara C. G., Stumpf P. K. (1972): Fat metabolism in higher plants: LIV. A procaryotic type acetyl CoA carboxylase in spinach chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 152: 83–91.
- Keereetaweep J., Liu H., Zhai Z., Shanklin J. (2018): Biotin attachment domain-containing proteins irreversibly inhibit acetyl CoA carboxylase. *Plant Physiology* 177: 208–215.
- Kim Y. J., Zhang D. (2018): Molecular control of male fertility for crop hybrid breeding. *Trends in Plant Science* 23: 53–65.
- Knight T. A. (1799): An account of some experiments on the fecundation of vegetables. In a Letter from Thomas Andrew Knight, Esq. to the Right Hon. Sir Joseph Banks, KBPRS. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series I* 89: 195–204.

- Kumari M., Clarke H. J., des Francs-Small C. C., Small I., Khan T. N., Siddique K. H. (2011): Albinism does not correlate with biparental inheritance of plastid DNA in interspecific hybrids in *Cicer* species. *Plant Science* 180: 628–633.
- Kushnir S., Babiychuk E., Bannikova M., Momot V., Komarnitsky I., Cherep N., Gleba Y. (1991): Nucleo-cytoplasmic incompatibility in cybrid plants possessing an *Atropa* genome and a *Nicotiana* plastome. *Molecular and General Genetics MGG* 225: 225–230.
- Ladizinsky G. (1985): Founder effect in crop-plant evolution. *Economic Botany* 39: 191–199.
- Lachance J., True J. R. (2010): X-autosome incompatibilities in *Drosophila melanogaster*: tests of Haldane's rule and geographic patterns within species. *Evolution: International Journal of Organic Evolution* 64: 3035–3046.
- Levin D. A. (2003): The cytoplasmic factor in plant speciation. *Systematic Botany* 28: 5–12.
- Liu C. G., Hou N., Liu L. K., Liu J. C., Kang X. S., Zhang A. M. (2006): A YA-type cytoplasmic male-sterile source in common wheat. *Plant Breeding* 125: 437–440.
- Lloyd D. G., Schoen D. J. (1992): Self-and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* 153: 358–369.
- Maan S. S. (1992): The *scs* and *Vi* genes correct a syndrome of cytoplasmic effects in alloplasmic durum wheat. *Genome* 35: 780–787.
- Maroof M. A., Zhang Q., Neale D. B., Allard R. W. (1992): Associations between nuclear loci and chloroplast DNA genotypes in wild barley. *Genetics* 131: 225–231.
- Mayr E. (1942): *Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, London, England.
- Mayr E. (1947): Ecological factors in speciation. *Evolution* 1: 263–288.
- Mayr E. (1963): *Animal species and evolution*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- McClure B. A., Haring V., Ebert P. R., Anderson M. A., Simpson R. J., Sakiyama F., Clarke A. E. (1989): Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 342: 955.
- Mignouna H., Virmani S. S., Briquet M. (1987): Mitochondrial DNA modifications associated with cytoplasmic male sterility in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 74: 666–669.

- Muller H. (1942): Isolating mechanisms, evolution, and temperature. *Biology Symposium* 6: 71–125.
- Nikolau B. J., Ohlrogge J. B., Wurtele E. S. (2003): Plant biotin-containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 211–222.
- Noor M. A., Feder J. L. (2006): Speciation genetics: evolving approaches. *Nature Reviews Genetics* 7: 851.
- Nováková E., Zablazková L., Brus J., Nesrstová V., Hanáček P., Kalendar R., Cvrčková F., Majeský E., Smýkal, P. (2019): Allelic diversity of acetyl coenzyme A carboxylase *accD/bccp* genes implicated in nuclear-cytoplasmic conflict in the wild and domesticated pea (*Pisum* sp.). *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1773.
- Olsen K. M., Gross B. L. (2008): Detecting multiple origins of domesticated crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 13701–13702.
- Orr H. A. (1992): Mapping and characterization of a ‘speciation gene’ in *Drosophila*. *Genetics Research* 59: 73–80.
- Orr H. A. (1995): The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities. *Genetics* 139: 1805–1813.
- Orr H. A. (1996): Dobzhansky, Bateson, and the genetics of speciation. *Genetics* 144: 1331.
- Orr H. A., Masly J. P., Presgraves D. C. (2004): Speciation genes. *Current Opinion in Genetics & Development* 14: 675–679.
- Powling A. (1981): Species of small DNA molecules found in mitochondria from sugarbeet with normal and male sterile cytoplasm. *Molecular and General Genetics MGG* 183: 82–84.
- Quetier F., Vedel F. (1977): Heterogeneous population of mitochondrial DNA molecules in higher plants. *Nature* 268: 365.
- Reverdatto S., Beilinson V., Nielsen N. C. (1999): A multisubunit acetyl coenzyme A carboxylase from soybean. *Plant Physiology* 119: 961–978.
- Rhoades M. M. (1931): Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays*. *Science* 73: 340–341.
- Rieseberg L. H., Church S. A., Morjan C. L. (2004): Integration of populations and differentiation of species. *New Phytologist* 161: 59–69.
- Rieseberg L. H., Willis J. H. (2007): Plant speciation. *Science* 317: 910–914.

- Richards A. J. (2003): Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 358: 1085–1093.
- Rockenbach K., Havird J. C., Monroe J. G., Triant D. A., Taylor D. R., Sloan D. B. (2016): Positive Selection in rapidly evolving plastid–nuclear enzyme complexes. *Genetics* 204: 1507–1522.
- Roux F., Mary-Huard T., Barillot E., Wenes E., Botran L., Durand S., Villoutreix R., Martin-Magniette M., Camilleri Ch., Budar F. (2016): Cytonuclear interactions affect adaptive traits of the annual plant *Arabidopsis thaliana* in the field. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 3687–3692.
- Sasa M. M., Chippindale P. T., Johnson N. A. (1998): Patterns of postzygotic isolation in frogs. *Evolution* 52: 1811–1820.
- Shiba H., Iwano M., Entani T., Ishimoto K., Shimosato H., Che F. S., Satta Y., Ito A., Takada Y., Watanabe M., Isogai A., Takayama S. (2002): The dominance of alleles controlling self-incompatibility in *Brassica* pollen is regulated at the RNA level. *The Plant Cell* 14: 491–504.
- Shimosato H., Yokota N., Shiba H., Iwano M., Entani T., Che F. S., Watanabe M., Isogai A., Takayama S. (2007): Characterization of the SP11/SCR high-affinity binding site involved in self/nonself recognition in *Brassica* self-incompatibility. *The Plant Cell* 19: 107–117.
- Schierup M. H., Vekemans X., Christiansen F. B. (1997): Evolutionary dynamics of sporophytic self-incompatibility alleles in plants. *Genetics* 147: 835–846.
- Schmitz-Linneweber C., Kushnir S., Babiychuk E., Poltnigg P., Herrmann R. G., Maier R. M. (2005): Pigment deficiency in nightshade/tobacco cybrids is caused by the failure to edit the plastid ATPase  $\alpha$ -subunit mRNA. *The Plant Cell* 17: 1815–1828.
- Schmitz-Linneweber C., Small I. (2008): Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in Plant Science* 13: 663–670.
- Schopfer C. R., Nasrallah M. E., Nasrallah J. B. (1999): The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286: 1697–1700.
- Silva N. F., Goring D. R. (2001): Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 1988–2007.



- Simon M., Durand S., Pluta N., Gobron N., Botran L., Ricou A., Camilleri Ch., Budar F. (2016): Genomic conflicts that cause pollen mortality and raise reproductive barriers in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 203: 1353–1367.
- Sloan D. B., Alverson A. J., Wu M., Palmer J. D., Taylor D. R. (2012): Recent acceleration of plastid sequence and structural evolution coincides with extreme mitochondrial divergence in the angiosperm genus *Silene*. *Genome Biology and Evolution* 4: 294–306.
- Smýkal P., Hradilová I., Trněný O., Brus J., Rathore A., Bariotakis M., Das R., Bhattacharyya D., Richards Ch., Coyne C. J., Pirintsos S. (2017): Genomic diversity and macroecology of the crop wild relatives of domesticated pea. *Scientific Reports* 7: 17384.
- Smýkal P., Kenicer G., Flavell A. J., Corander J., Kosterin O., Redden R. J., Ford R., Coyne C. J., Maxted N., Ambrose M. J., Ellis N. T. (2011): Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources* 9: 4–18.
- Smýkal P., Trněný O., Brus J., Hanáček P., Rathore A., Roma R. D., Pechanec V., Duchoslav M., Bhattacharyya D., Bariotakis M., Pirintsos S., Berger J., Toker C. (2018): Genetic structure of wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) populations in the northern part of the Fertile Crescent reflects moderate cross-pollination and strong effect of geographic but not environmental distance. *PloS One* 13: e0194056.
- Spreitzer R. J. (2003): Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 141–149.
- Stein J. C., Howlett B., Boyes D. C., Nasrallah M. E., Nasrallah J. B. (1991): Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 8816–8820.
- Stevens V. A. M., Murray B. G. (1982): Studies on heteromorphic self-incompatibility systems: Physiological aspects of the incompatibility system of *Primula obconica*. *Theoretical and Applied Genetics* 61: 245–256.
- Stout A. B. (1917): Fertility in *Cichorium intybus*: the sporadic occurrence of self-fertile plants among the progeny of self-sterile plants. *American Journal of Botany* 4: 375–395.
- Strasburger E. (1894): The periodic reduction of the number of the chromosomes in the life-history of living organisms. *Annals of Botany* 8: 281–316.

- Stubbe W., Raven P. H. (1979): A genetic contribution to the taxonomy of *Oenothera* sect. *Oenothera* (including subsections *Euoenothera*, *Emersonia*, *Raimannia* and *Munzia*). *Plant Systematics and Evolution* 133: 39–59.
- Sweigart A. L., Fishman L., Willis J. H. (2006): A simple genetic incompatibility causes hybrid male sterility in *Mimulus*. *Genetics* 172: 2465–2479.
- Tao R., Jezzoni A. F. (2010): The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Scientia Horticulturae* 124: 423–433.
- Tarsi K., Tuff T. (2012): Introduction to Population Demographics. *Nature Education Knowledge* 3(11): 3.
- Trněný O., Brus J., Hradilová I., Rathore A., Das 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: 535.
- Valero M., Richerd S., Perrot V., Destombe C. (1992): Evolution of alternation of haploid and diploid phases in life cycles. *Trends in Ecology & Evolution* 7: 25–29.
- Vekemans X., Slatkin M. (1994): Gene and allelic genealogies at a gametophytic self-incompatibility locus. *Genetics* 137: 1157–1165.
- Virmani S., Aquino R. C., Khush G. S. (1982): Heterosis breeding in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 63: 373–380.
- Wang R. J., Hahn M. W. (2018): Speciation genes are more likely to have discordant gene trees. *Evolution Letters* 2: 281–296.
- Weaver D. B., Weaver J. B. (1977): Inheritance of Pollen Fertility Restoration in Cytoplasmic Male-Sterile Upland Cotton. *Crop Science* 17: 497–499.
- Weider C., Stamp P., Christov N., Hüsken A., Foueillassar X., Camp K. H., Munsch M. (2009): Stability of cytoplasmic male sterility in maize under different environmental conditions. *Crop Science* 49: 77–84.
- White M. J. D. (1968): Models of speciation. *Science* 159: 1065–1070.
- Wright K. M., Lloyd D., Lowry D. B., Macnair M. R., Willis J. H. (2013): Indirect evolution of hybrid lethality due to linkage with selected locus in *Mimulus guttatus*. *PLoS biology* 11: e1001497.

- Yadrikhinskiy A. K., Bogdanova V. S. (2011). Nuclear-cytoplasm conflict in crosses of pea subspecies is controlled by alleles of a nuclear gene on Linkage Group III. *Doklady Biological Sciences* 441: 396–399.
- Yanai Y., Kawasaki T., Shimada H., Wurtele E. S., Nikolau B. J., Ichikawa N. (1995): Genomic organization of 251 kDa acetyl-CoA carboxylase genes in *Arabidopsis*: tandem gene duplication has made two differentially expressed isozymes. *Plant and Cell Physiology* 36: 779–787.
- Zavada M. S., Taylor T. N. (1986): The role of self-incompatibility and sexual selection in the gymnosperm-angiosperm transition: a hypothesis. *The American Naturalist* 128: 538–550.
- Zeng X., Li W., Wu Y., Liu F., Luo J., Cao Y., Zhu L., Li Y., Li J., You Q., Wu G. (2014): Fine mapping of a dominant thermo-sensitive genic male sterility gene (BntsMs) in rapeseed (*Brassica napus*) with AFLP-and *Brassica rapa*-derived PCR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 127: 1733–1740.
- Zeng Y. F., Zhang J. G., Duan A. G., Abuduhaiti B. (2016): Genetic structure of *Populus* hybrid zone along the Irtysh River provides insight into plastid-nuclear incompatibility. *Scientific Reports* 6: 28043.
- Zhang J., Ruhlman T. A., Sabir J., Blazier J. C., Jansen R. K. (2015): Coordinated rates of evolution between interacting plastid and nuclear genes in Geraniaceae. *The Plant Cell* 27: 563–573.

## **9 PŘÍLOHY**

**Příloha 1:** Seznam vzorků, jejich taxonomické zařazení, zdroj, původ, zeměpisné souřadnice a přiřazení ke konkrétní alele a vyšší skupin

**Příloha 1:** Seznam vzorků, jejich taxonomické zařazení, zdroj, původ, zeměpisné souřadnice a přiřazení ke konkrétní alele a vyšší skupin

Vzorek	Zdroj	Země původu	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Taxonomická skupina	accD alela	Označení vyšší skupiny (accD)	bccp alela	Označení vyšší skupiny (bccp)	Trněný <i>et al.</i> 2018 - genetická skupina
PI560969	USDA	Nepál		NA	<i>P.sativum</i> -landraces	accD2	A	bccp5	B	3
ATC7021	AGB	Čína			<i>P.sativum</i> -landraces	accD26	I	bccp22	F	6
J1267	JIC	Řecko		Kozani	<i>P.sativum</i> -landraces	accD27	I	bccp18	F	3
VIR1587	VIR	Rusko		Sverdlovskaya obl.	<i>P.sativum</i> -landraces	accD28	I	bccp22	F	6
J11834	JIC	Španělsko		Palomero Alto	<i>P.sativum</i> -landraces	accD28	I	bccp4	B	6
J13554	JIC	Itálie		Aosta	<i>P.sativum</i> -landraces	accD28	I	bccp4	B	6
ARI00989	GNGB	Kypr			<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp18	F	6
ATC1044	AGB	Indie			<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	6
ATC6926	AGB	Čína			<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	3
J192	JIC	Afgánistán			<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	
VIR1246	VIR	Tádžikistán		NA	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp18	F	3
VIR1541	VIR	Rusko		Primorkij kraj	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	6
VIR2311	VIR	Gruzie		NA	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp18	F	6
IG65050	ICARDA	Írán			<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	3
PI181958	USDA	Sýrie		Homs	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	6
PI181799	USDA	Libanon		Chtura	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	6
PI193835	USDA	Etiopie		Addis Ababa	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	6
IG52518	ICARDA	Turecko		Antakya	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	3
J11086	JIC	Turecko		Bagyurdu	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	3

Vzorek	Zdroj	Země původu	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Taxonomická skupina	accD alela	Označení vyšší skupiny (accD)	bccp alela	Označení vyšší skupiny (bccp)	Trněný <i>et al.</i> 2018 - genetická skupina
JI1108	JIC	Nepál		Keerau	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	3
JI1853	JIC	Izrael			<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	3
JI2602	JIC	Libye		Ghat oasis	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	6
JI86	JIC	Afghánistán		NA	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	6
PI358608	USDA	Etiopie		Nazareth	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp18	F	3
IG52503	ICARDA	Turecko	39,03333	37,63333	<i>P.sativum</i> -landraces	accD29	I	bccp22	F	9
IG52507	ICARDA	Turecko		Gaziantep	<i>P.sativum</i> -landraces	accD31	J	bccp22	F	3
IG52595	ICARDA	Alžírsko	36,3	5,66667	<i>P.sativum</i> -landraces	accD32	J	bccp12	E	3
IG52596	ICARDA	Alžírsko	36,35	7,441413	<i>P.sativum</i> -landraces	accD32	J	bccp11	E	3
PI344537	USDA	Itálie	37,88866389	13,38844444	<i>P.elatius</i>	accD1	A	bccp31	O	4
IG119794	ICARDA	Španělsko	37,94733	-5,76283	<i>P.elatius</i>	accD1	A	bccp31	O	4
PI344006	USDA	Řecko	40,2166	24,2401	<i>P.elatius</i>	accD10	C	bccp22	F	9
IS18909	IGB	Izrael	33,004166	35,298055	<i>P.elatius</i>	accD11	C	bccp22	F	8
IS18915	IGB	Izrael	32,8786	35,5085	<i>P.elatius</i>	accD11	C	bccp22	F	8
JI262	JIC	Turecko	36,851638	34,61804	<i>P.elatius</i>	accD11	C	bccp22	F	8
JI1095	JIC	Řecko	40,23484	24,20567	<i>P.elatius</i>	accD12	C	bccp22	F	9
JI261	JIC	Turecko	36,07	33,17	<i>P.elatius</i>	accD15	E	bccp31	O	5
W6-26109	USDA	Gruzie	41,60194444	44,52222222	<i>P.elatius</i>	accD16	E	bccp31	O	5
712	Novosibirsk	Izrael	31,185833	26,58	<i>P.elatius</i>	accD2	A	bccp5	B	
IS19864	IGB	Izrael	31,7661	35,163	<i>P.elatius</i>	accD2	A	bccp4	B	4
IS22287	IGB	Izrael	31,4802	35,1426	<i>P.elatius</i>	accD2	A	bccp10	D	4
IS24337	IGB	Izrael	33,0078	35,468	<i>P.elatius</i>	accD2	A	bccp22	F	4
PI560069	USDA	Izrael	31,21345	34,694375	<i>P.elatius</i>	accD2	A	bccp5	B	4
PI560071	USDA	Izrael	31,654839	34,931006	<i>P.elatius</i>	accD2	A	bccp4	B	1

Vzorek	Zdroj	Země původu	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Taxonomická skupina	accD alela	Označení vyšší skupiny (accD)	bccp alela	Označení vyšší skupiny (bccp)	Trněný et al. 2018 - genetická skupina
T14/5	Smýkal <i>et al.</i> 2018	Turecko	37,55562703	42,42590404	<i>P.elatius</i>	accD22	G	bccp30	N	1
T14/6	Smýkal <i>et al.</i> 2018	Turecko	37,53485	40,8956	<i>P.elatius</i>	accD22	G	bccp15	E	1
W6-2101	USDA	Turecko	37,7666	42,1166	<i>P.elatius</i>	accD23	G	bccp8	C	1
T14/3	Smýkal <i>et al.</i> 2018	Turecko	37,56468301	43,52921303	<i>P.elatius</i>	accD23	G	bccp7	B	1
IG108291	ICARDA	Tunisko	36	9,38333	<i>P.elatius</i>	accD24	H	bccp9	D	1
PI639959	USDA	Turecko	37,715053	37,972172	<i>P.elatius</i>	accD24	H	bccp14	E	1
PI343996	USDA	Turecko	37,284722	38,702356	<i>P.elatius</i>	accD25	H	bccp29	M	4
IG52443	ICARDA	Sýrie	32,83056	36,575	<i>P.elatius</i>	accD25	H	bccp27	K	1
PI560072	USDA	Izrael	33,16261667	35,75077222	<i>P.elatius</i>	accD25	H	bccp27	K	
T15/2	Smýkal <i>et al.</i> 2018	Turecko	38,00961203	39,29612696	<i>P.elatius</i>	accD25	H	bccp25	I	1
J12546	JIC	Gruzie	43,02	42,43	<i>P.elatius</i>	accD29	I	bccp22	F	3
IG25414	IGB	Sýrie	35,68222	36,53278	<i>P.elatius</i>	accD29	I	bccp22	F	8
T14/9	Smýkal <i>et al.</i> 2018	Turecko	39,77258889	40,33983889	<i>P.elatius</i>	accD29	I	bccp13	E	1
PIS1675	IPK	Itálie	41,727222	18,211667	<i>P.elatius</i>	accD3	A	bccp31	O	4
W6-19256	USDA	Bulharsko	43,37666667	28,085	<i>P.elatius</i>	accD30	J	bccp22	F	10
J12629	JIC	Rusko	44,93333333	35,2166667	<i>P.elatius</i>	accD31	J	bccp22	F	10
IG52532	ICARDA	Turecko	38,35	41,817	<i>P.elatius</i>	accD32	J	bccp6	B	5
W6-26112	USDA	Gruzie	41,90361111	44,09444444	<i>P.elatius</i>	accD33	J	bccp21	F	10
PI343978	USDA	Turecko	38,416708	27,431192	<i>P.elatius</i>	accD34	J	bccp26	F	1
IG140971	ICARDA	Arménie	39,43777	45,946111	<i>P.elatius</i>	accD34	J	bccp22	F	10

Vzorek	Zdroj	Země původu	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Taxonomická skupina	accD alela	Označení vyšší skupiny (accD)	bccp alela	Označení vyšší skupiny (bccp)	Trněný <i>et al.</i> 2018 - genetická skupina
PIS2853	IPK	Maďarsko	45,85507	18,41897	<i>P.elatius</i>	accD4	B	bccp31	O	9
721	Novosibirsk	Izrael	32,62674	35,00854	<i>P.elatius</i>	accD5	B	bccp22	F	3
IS18911	IGB	Izrael	33,2161	35,6397	<i>P.elatius</i>	accD5	B	bccp16	F	8
PI560058	USDA	Izrael	32,60249167	34,9913	<i>P.elatius</i>	accD5	B	bccp16	F	9
PI560059	USDA	Izrael	33,0822	35,2166	<i>P.elatius</i>	accD5	B	bccp16	F	5
PI343972	IGB	Turecko		Efes	<i>P.elatius</i>	accD6	B	bccp22	F	8
PI639955	USDA	Izrael	33,076446	35,275968	<i>P.elatius</i>	accD6	B	bccp17	F	8
PIS2850	IPK	Itálie	44,33822	9,16074	<i>P.elatius</i>	accD7	B	bccp31	O	9
J13558	JIC	Španělsko	41,3516667	1,0613889	<i>P.elatius</i>	accD8	C	bccp19	F	9
PI560057	USDA	Portugalsko			<i>P.elatius</i>	accD8	C	bccp24	H	8
J13557	JIC	Portugalsko	41,5	-6,4833333	<i>P.elatius</i>	accD9	C	bccp23	G	9
IG112136	ICARDA	Jordánsko			<i>P.fulvum</i>	accD17	F	bccp3	A	2
J11010	JIC	Izrael	31,36	34,54	<i>P.fulvum</i>	accD17	F	bccp3	A	2
PI595953	USDA	Izrael			<i>P.fulvum</i>	accD17	F	bccp2	A	2
J11006	JIC	Izrael			<i>P.fulvum</i>	accD18	F	bccp2	A	2
PI595946	USDA	Turecko			<i>P.fulvum</i>	accD19	F	bccp1	A	2
PI595935	USDA	Sýrie			<i>P.fulvum</i>	accD20	F	bccp1	A	2
PI595944	USDA	Izrael			<i>P.fulvum</i>	accD20	F	bccp1	A	2
J12517	JIC	Sýrie			<i>P.fulvum</i>	accD21	F	bccp1	A	2
PI358607	USDA	Etiopie			<i>P.abyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
PI358609	USDA	Etiopie			<i>P.abyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
PI358610	USDA	Etiopie			<i>P.abyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
PI358611	USDA	Etiopie			<i>P.abyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
PI358612	USDA	Etiopie			<i>P.abyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7



Vzorek	Zdroj	Země původu	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Taxonomická skupina	accD alela	Označení vyšší skupiny (accD)	bccp alela	Označení vyšší skupiny (bccp)	Trněný <i>et al.</i> 2018 - genetická skupina
PI358613	USDA	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp20	F	7
PI358614	USDA	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
PI358615	USDA	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
PI358616	USDA	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
PI358617	USDA	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
PI358618	USDA	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp20	F	7
L02-0253	CzNGB	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
J12385	JIC	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp20	F	7
J11869	JIC	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp20	F	7
J11943	JIC	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
J11974	JIC	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp22	F	7
J11632	JIC	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp20	F	7
J1002	JIC	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
J10226	JIC	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
J10691	JIC	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
VIR2759	Novosibirsk	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD14	D	bccp26	J	7
J10130	JIC	Etiopie			<i>P.abbyssinicum</i>	accD13	D	bccp26	J	6