

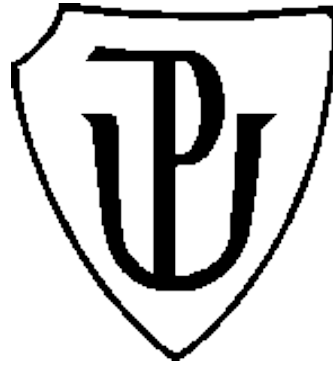
**Univerzita Palackého v Olomouci**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Olomouc 2015**

**Helena Štefanová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Genetické mapování *Gritty* lokusu  
hrachu (*Pisum sativum* L.)**

**Bakalářská práce**

**Helena Štefanová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**

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

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Genetické mapování *Gritty* lokusu hrachu (*Pisum sativum* L.) vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce Ing. Petra Smýkala, Ph.D. za použití uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Olomouci 2015

---

podpis

## Souhrn

Tato bakalářská práce s názvem Genetické mapování *Gritty* lokusu hrachu (*Pisum sativum* L.) je rozdělena na dvě osnovní části.

První teoretická část se zabývá genetickými aspekty domestikace rostlin s důrazem na dormanci semen.

Druhá praktická část kombinuje postupy a znalosti botaniky (testování dormance semen vybraných linií) a molekulární genetiky, s využitím rekombinantních inbredních linií (RIL) kříženců plané formy hrachu *P. elatius* VIR320 a kulturní formy hrachu *P. sativum* WL1238 segregující ve znaku dormance semen.

Cílem práce je zmapování rekombinačního intervalu a statistické vyhodnocení korelace mezi fenotypovým projevem a genetickými daty.

## Summary

This bachelor work titled Genetic mapping of *Gritty* locus in pea (*Pisum sativum* L.) is divided into two parts.

The first theoretical part deals with the genetic aspects of domestication of plants with emphasis on seed dormancy.

The second part combines practice and knowledge of botany (testing seed dormancy of selected lines) and molecular genetics, using recombinant inbred lines (RIL) hybrids of wild form of pea *P. elatius* VIR320 and cultivated form of pea *P. sativum* WL1238 segregating for seed dormancy.

The research aims to map the recombination interval and statistical evaluation of the correlation between phenotypes and genetic data.

## **Poděkování**

Děkuji Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za odborné vedení práce, věcné připomínky, dobré rady a vstřícnost při konzultacích a vypracovávání bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem lidem, se kterými jsem se během mé práce setkávala v laboratoři.

## Obsah

1	Cíl práce .....	8
2	Úvod.....	9
3	Současný stav řešené problematiky.....	10
3.1	Domestikace rostlin .....	10
3.1.1	Domestikační syndrom.....	11
3.1.2	Centra původu .....	12
3.2	Dormance semen.....	14
3.2.1	Typy dormance.....	14
3.2.2	Přerušení dormance .....	15
3.2.3	Klíčení .....	16
3.3	Povrch semene, osemení hrachu (bobovitých) .....	16
3.3.1	Vosková kutikula.....	16
3.3.2	Epidermis.....	17
3.3.3	Hypodermis .....	17
3.3.4	Parenchym nebo živná vrstva.....	17
3.3.5	Proantokyanidiny a tvrdosemennost.....	19
3.4	Genomika hrachu .....	22
3.4.1	Genetická mapa hrachu .....	22
4	Materiál a metodika.....	26
4.1	Rostlinný materiál.....	26
4.2	Makroskopické hodnocení povrchu semen ( <i>Gritty</i> znak).....	26
4.3	Testování dormance semen.....	26
4.4	Izolace genomové DNA.....	27
4.5	Měření koncentrace DNA (NanoDrop) .....	28
4.6	PCR amplifikace vybraných genů s pozicí na LGIII .....	28
4.7	Restrikce PCR produktu (CAPS-PCR, Cleavage Amplified Polymorphic Sequence).....	31
4.8	Kvantifikace DNA, elektroforetická kontrola integrity .....	32
4.9	Přečištění PCR produktu (pro sekvenování).....	33
4.10	Sekvenování, nalezení polymorfních míst (SNPs), Geneious software .....	34
4.11	Sestavení genetické mapy pomocí softwaru JoinMap 4.1 .....	34
5	Výsledky.....	35

6	Diskuze.....	44
7	Závěr.....	46
8	Příloha .....	47
9	Seznam zkratek .....	48
10	Literatura .....	49



# 1 CÍL PRÁCE

## **Teoretická část**

- Literární rešerše na téma genetické aspekty domestikace rostlin s důrazem na dormanci semen.

## **Praktická část**

- Kombinace postupů a znalostí botaniky (testování dormance semen vybraných linií, mapovací populace hrachu) a molekulární genetiky, s využitím rekombinantních inbredních linií (RIL) kříženců planého a kulturního hrachu segregující pro dormanci semen.
- PCR amplifikace vybraných genově specifických markerů, sekvenační analýza, identifikace polymorfismu potřebného pro mapování (SNPs).
- Aplikace těchto polymorfních markerů na soubor RIL linií.
- Mapování rekombinačního intervalu. Statistické vyhodnocení, korelace mezi fenotypovým projevem a genetickými daty.

## 2 ÚVOD

Domestikační syndrom zahrnuje znaky, omezující vypadávání semen, synchronizující dozrávání, minimalizující dormanci neboli vegetační klid semen. V mnoha případech došlo také ke změně opylování z cizosprašného na samosprašné, v extrémním případě jako u banánu pak ke ztrátě tvorby semen. Mnoho rostlin přešlo z víceletosti na jednoletý charakter růstu.

Vzhledem k existenci mnoha ve výsledném projevu vzájemně provázaných genů je naše současná znalost těchto genů podmiňujících domestikační znaky stále poměrně omezená. Je jisté, že většina znaků je podmíněna recesivními (tedy podřízenými) geny a jde tedy o ztrátu či omezení projevu určité vlastnosti, a ne její vylepšení či získání. To v podstatě odpovídá povaze mutací, které mnohem častěji vedou právě k ztrátě než vylepšení funkce daného genu. K úplné ztrátě funkce u dosud identifikovaných genů dochází jen zřídka. Z dosud známých 20 genů polovina vykazuje mutace vedoucí k nefunkčnímu proteinu, zbývající polovina má mutace, vedoucí k záměně aminokyselin výsledného proteinu. Na základě dosud identifikovaných genů byl vysloven názor, že většinu „domestikačních genů“ představují regulační geny, tedy takové, které „zapínají“ či „vypínají“ jisté procesy v tělech rostlin.

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Domestikace rostlin

Vznik zemědělství byl jedním z klíčových bodů v lidské historii a jeho hlavní částí byl vývoj nových forem rostlin, které byly lidmi vybrány a staly se domestikovanými plodinami. Domestikace divokých rostlin na kulturní plodiny může být viděna jako zrychlená evoluce, výsledek jak lidského, tak přírodního výběru (Abbo a kol., 2012, 2014). Domestikace je často popisována jako nová kvalita, ve které jsou morfologické a genetické změny nalezeny u pěstovaných rostlin ve srovnání s volně žijícími populacemi (Zohary, Hopf a Weiss, 2012; Hancock, 2012).

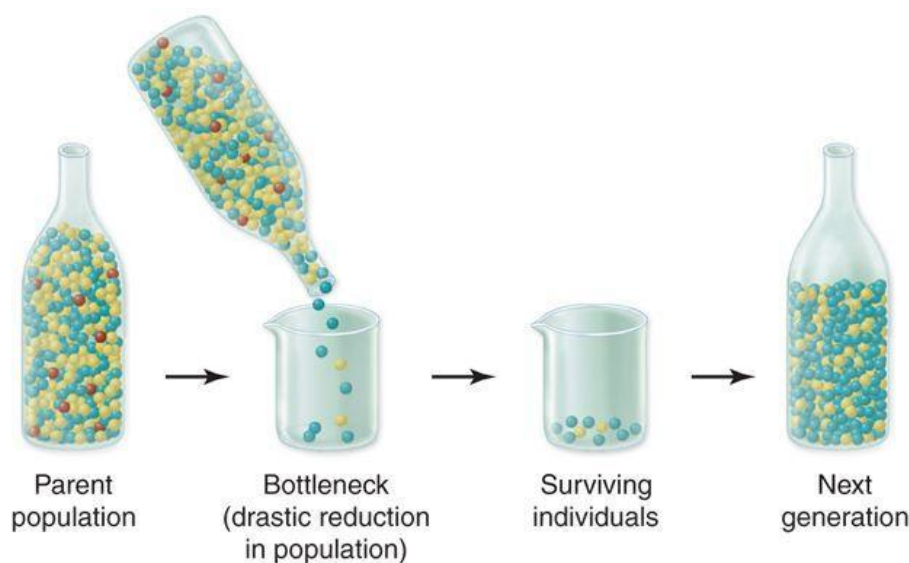
Jelikož ve většině případů dosud neexistuje reprodukční bariéra mezi planými a domestikovanými formami téhož druhu, je možné tohoto využít pro genetické mapování domestikačních znaků. Weeden (2007) pomocí křížení planých a kulturních forem hrachu objevil přibližně 20 lokusů zodpovědných za změny planých forem a funkcí při domestikaci hrachu.

Mezi všemi domestikačními znaky, dva zauímají centrální pozici, neboť byly již od počátku určující pro úspěšnost pěstování. Těmito znaky jsou ztráta dormance semen během kultivace a druhým je ztráta volného šíření semen (Fuller a Allaby, 2009). Ve specifickém případě luštěnin ztráta dormance byla selektována ještě jednou a to díky potřebě bobtnání semen pro jejich uvaření a ztravitelnost.

Z pohledu genetického existuje několik faktorů ovlivňujících proces domestikace jako je fenotypová variabilita daného znaku, počet a rozsah působících genů, dědivost, síla selekce, četnost mutací, míra cizoprášení, velikost populace a míra rekombinace, nebo naopak míra vazby mezi selektovanými geny (Abbo a kol., 2014).

Díky pokroku molekulární genetiky a genomiky (znalosti DNA sekvence druhu) se zjistilo, že počátky zemědělství byly založeny na výběru a upřednostňování jen vybraných genotypů. Prvotní zemědělci využívali jen malý počet vybraných jedinců, následkem čehož mají nynější pěstované rostliny malou genetickou diverzitu. Tento proces je pojmenován a přirovnáván k tzv. efektu hrdla láhve (viz Obrázek 1). Obecně se uvádí, že kulturní plodiny průměrně mají 60% genetickou diverzitu ve srovnání se svými planými dnes rostoucími předchůdci, příbuznými druhy.

Obrázek 1: Efekt hrdla láhve (bottleneck effect) (převzato z <http://pixgood.com/bottleneck-effect-definition.html>)



### 3.1.1 Domestikační syndrom

Proces domestikace vyvolal změny představující adaptaci ke kultivaci a sklizni doprovázené změnami genetickými. Tyto změny zahrnovaly znaky jako zvýšení počtu semen (sklizňového indexu), změny velikosti a tvaru semen, pigment semen, zlepšení fertility a klíčivosti, pohlaví květu - oboupohlavnost, změny v architektuře rostlin, zkrácení nebo úplnou ztrátu dormance, omezení vypadávání semen, změny v době kvetení, eliminace toxických nebo inhibujících látek, mechanických ochranných orgánů jako chlupů nebo trnů, větší zásobní orgány (semena, hlízy), partenokarpie - bezsemennost, samosprašnost, změny ploidie, fotoperiodismus (viz Tabulka 1). Tento společný soubor znaků byl zjištěn i u nepříbuzných plodin geograficky vzdálených oblastí a byl nazván "domestikačním syndromem" (Hammer, 1984; Harlan, 1992). Domestikační syndrom se vyskytuje také u luštěnin, jako je např. hrách (*Pisum sativum* L.), čočka (*Lens culinaris* Medik.), cizrna (*Cicer arietinum* L.), fazol (*Phaseolus vulgaris* L.), vigna (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), sója (*Glycine max* L.) aj. (Weeden, 2007).

Tato genetická modifikace vedla v mnoha v případech k vysoké či úplné závislosti na člověku, především ztrátě přirozené schopnosti reprodukce. Méně domestikované rostliny, jako např. konopí, mrkev nebo salát, se vracejí zpět k původní formě, ale i např. řepka a sója, které jsou vysoce domestikované, trpí stále vysokými sklizňovými ztrátami

v důsledku praskání šesulí, lusků a vypadávání semen. Tyto vlastnosti nebyly cílem výběru, ale odrazem tehdejších sklizňových, secích a pěstebních postupů.

Tabulka 1: Domestikací modifikované znaky *Pisum sativum* (Smýkal, osobní sdělení)

<b>znak</b>	<b>plané formy</b>	<b>domestikované formy</b>
<b>pukavost lusku</b>	ano	ne
<b>dormance semen</b>	ano	ne
<b>výška rostliny</b>	vysoká	nízká
<b>větvení stonku</b>	ano	ne
<b>velikost semen</b>	malá	velká
<b>kvalita semen</b>	nízká	vysoká
<b>počet semen</b>	nízký	vysoký
<b>pigmentace semen</b>	ano	ne
<b>obsah antinutričních látek</b>	ano	ne
<b>kvetení</b>	dlouhý den	neutrální
<b>mechanické ochranné orgány</b>	ano	ne

### 3.1.2 Centra původu

Hrách (*Pisum sativum* L.) patří mezi nejstarší domestikované plodiny. Před začátkem kultivace byl hrách spolu s vikví (*Vicia spp.*), hrachorem (*Lathyrus spp.*) a cizrnou (*Cicer spp.*) součástí každodenního jídelníčku lovců a sběračů na konci doby ledové na Blízkém východě a v Evropě. Dokládají to nálezy těchto luskovin ve španělské Santa Marii datované do doby před 9 - 12 tisíci lety. Archeologicky rozpoznatelné pozůstatky luskovin se častěji objevují v nálezech z 10. - 9. tisíciletí před naším letopočtem, což je dokonce dříve jak kulturní obiloviny (Zohary, Hopf a Weiss, 2012).

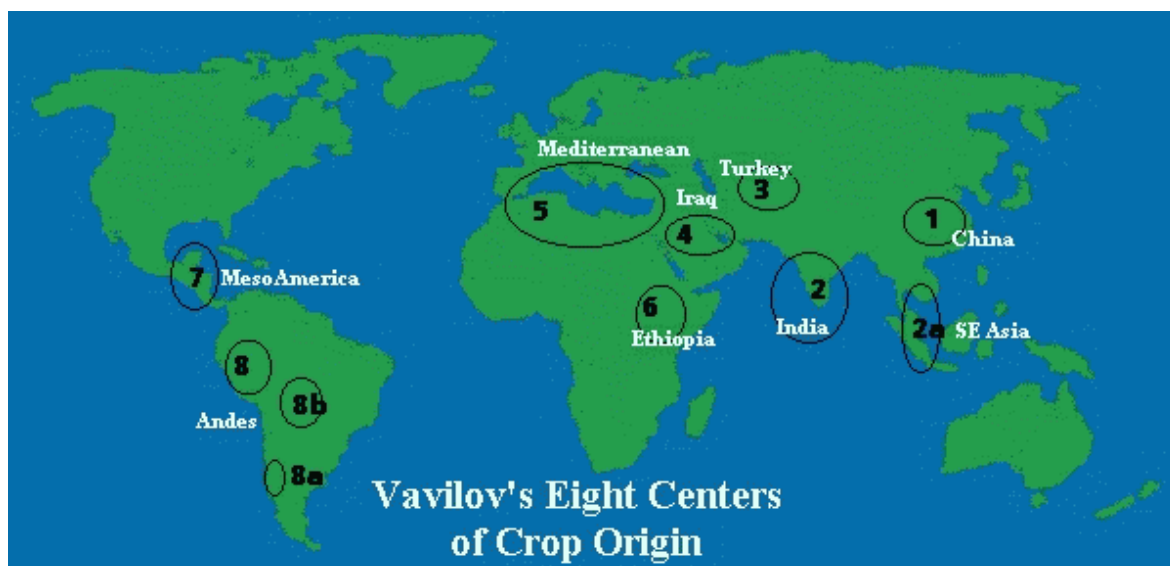
Proces postupné domestikace planých forem rostlin na kulturní proběhl v geografických místech, centrech původu kulturních rostlin, která poprvé definoval ruský botanik N. I. Vavilov (Centres of Origin of Cultivated Plants, 1926). Tato centra původu zahrnují Čínu, severovýchodní Ásii, Indii, Turecko, Irák, Středozeší, Etiopii, střední Ameriku a jižní Amriku (viz Obrázek 2). Jako oblast původu a prvotní domestikace hrachu se pokládá Středozeší a především Blízký východ.

Oblast výskytu planých zástupců *P. sativum* se nachází v Íránu, Turecku, Sýrii, Izraeli, severní Africe (Maroku, Alžírsku a Tunisku) a v jižní Evropě (Francii, Itálii, Balkánu a Řecku). Vzhledem k ranému pěstování hrachu je však obtížné určit přesnou polohu místa původní genetické diverzity a domestikace, především proto, že velká část Středomoří a Blízkého východu byla významně změněna lidskou činností a měnicími se klimatickými podmínkami. Kromě toho, spolehlivé a průkazné údaje často chybí nebo jsou neúplné. Luskoviny pěstované na zrna byly základní plodiny "zemědělské revoluce Starého světa", které usnadnily vytváření trvalých lidských sídel (Smýkal a kol., 2012).

Rod *Pisum* obsahuje planý hrach setý (*Pisum sativum* subsp. *elatius* a *P. sativum* subsp. *sativum*), který se volně v přírodě vyskytuje v jižní Evropě, západní Asii včetně Malé Asie a jeho areál sahá až do severní Afriky. Příbuzný volně žijící druh *P. fulvum* se vyskytuje jen na Blízkém východě, a to v Jordánsku, Sýrii, Libanonu a Izraeli. Další planý druh, popř. poddruh *P. abyssinicum*, v současnosti roste pouze jako pěstovaný nebo zplanělý druh v Jemenu a Etiopii a byl pravděpodobně zdomestikován nezávisle na *P. sativum* (Smýkal a kol., 2012).

V průběhu staletí výběru a křížení se vyvinuly tisíce odrůd (genotypů) hrachu, udržované v mnoha genových bankách po celém světě (Smýkal a kol., 2012).

Obrázek 2: Centra původu kulturních rostlin (N. I. Vavilov, 1926) (převzato z <http://oregonstate.edu/instruct/css/330/two/>)



## 3.2 Dormance semen

Dormance semene je hlavní fyziologickou adaptací na heterogenitu životního prostředí, která ovlivňuje přirozenou populační dynamiku (Bewley a kol., 2013). Dormance poskytuje strategii rozdělení klíčení v čase, aby se snížilo riziko úmrtí rostlin a případné vymírání druhů v nepříznivém období. Vleeshouwers a kol. (1995) definovali dormanci jako: "vlastnost semene, stupeň určující jaké podmínky by měly být splněny, aby semeno vyklíčilo" (Vleeshouwers a kol., 1995). Tento jev cyklické dormance (Baskin a Baskin, 1985) je regulován různými faktory. Je tu heterogenita semen na úrovni jednotlivých rostlin (Matilla a kol., 2005) závislá na věku a výživě mateřské rostliny během zrání semen, poloze semen na mateřské rostlině, velikosti a tvaru semen, době sklizně semen a době jejich skladování (Probert, 2000). Přes všechny tyto variace, dormance má jasný genetický základ (Graeber a kol., 2012).

### 3.2.1 Typy dormance

Klasický koncept dormance semen formuloval Harper (1957) rozlišující tři typy.

#### **Primární dormance**

1) **Vrozenou dormanci** mají rostliny, jejichž semena jsou neklíčivá ihned po dozrání na mateřské rostlině. K ukončení tohoto typu dormance je třeba vystavit semena po určitou dobu zvláštním podmínkám, které daný druh k překonání dormance potřebuje. Semena mnohých druhů potřebují k vyklíčení zvláštní podnět, bez něhož nevyklíčí, ani když dormance již skončila. Bývá to často vystavení světlu nebo pravidelnému střídání teploty, k jakému dochází v povrchových vrstvách půdy během dne a noci.

**Sekundární dormance** vzniká u klíčivých semen ležících v půdě jako reakce na určité, většinou nepříznivé, podmínky.

2) Ve stavu **vnucené dormance** je semeno udržováno působením vnějších podmínek, když tyto podmínky pominou, dojde brzy i k ukončení dormance.

3) **Indukovaná dormance** je stav fyziologicky podobný primární dormanci. Sekundárně dormantní semena nevyklíčí ihned po nástupu příznivých podmínek, ale k ukončení dormance potřebují projít obdobím podmínek vhodných pro ukončení dormance.

Dormantní třídy byly definovány Nikolaevem (1969, 1977) a nedávno přezkoumány Finch-Savagem a Leubner-Metzgerem (2006).

**1) Fyziologická dormance**, nejrozšířenější forma, pravděpodobně zahrnuje metabolismus abscisové kyseliny (ABA) a giberelinu (GA). Tyto růstové hormony závisí na vnějších podmínkách, jako je světlo, teplo a vlhkost.

**2) Morfologická dormance** se vztahuje na semena, která mají nevyvinuté embryo a vyžadují čas na růst a klíčení.

**3) Morfofyziologická dormance** se nachází u semen, které mají málo vyvinutá embryo a navíc mají fyziologické podmínky pro jejich dormanci. Tato semena vyžadují pro ukončení dormance skarifikaci, nebo aplikaci GA a podstatně delší dobu pro vývin.

**4) Fyzická dormance** zahrnuje vývoj vrstev palisádových buněk osemení nepropustného pro vodu, tzv. tvrdosemennost (Baskin a kol., 2000). Tato nepropustnost je porušena až mechanickou nebo chemickou skarifikací (Finch-Savage a kol., 2006). Tvrdosemennost je typický jev u většiny luskovin. Tento atribut poskytuje lepší možnosti pro přežití v přírodě. Přítomnost tvrdých semen nejen že brání rychlému a jednotnému klíčení, jak je požadováno pro pěstování, ale také prodlužuje dobu vyklíčení (Quinlivan 1971; Maass 2005). Tento typ dormance je nalezen nejméně u 17 rostlinných rodin, včetně agronomicky významných rodin jako je *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Cannaceae*, *Geraniaceae*, a *Convolvulaceae* (Baskin a kol., 2000) a je přítomen u planých předků kultivovaných luskovin (Dueberrn de Sousa a Marcos-Filho, 2001; Zohary a Hopf, 2012; Abbo a kol., 2014).

**5) Kombinační dormance** se nachází u pro vodu nepropustných semen v kombinaci s fyziologickou dormancí.

### 3.2.2 Přerušení dormance

Interakce mechanismů dormance s akumulovanými a současnými podmínkami prostředí určují, jaký podíl semen v semenné bance bude klíčit v daném čase. Meteorologické a půdní fyzikální vlastnosti vytváří mikroklima vnímané semenem.

Nejdůležitějším přírodním faktorem je **voda**. Semena nasávají vodu z prostředí a vodní potenciál půdy určuje maximální potenciál vody, kterého semeno může dosáhnout.



Po vodě je nejdůležitějším faktorem pro klíčení **teplota**. V extrémních případech je to spojeno s požáry (Hanley a Fenner, 1998) nebo vegetačními průrvami, které jsou teplejší než okolní lesní půdy (Vázquez-Yanes a Orozco-Segovia, 1982). Navíc vodní a teplotní režimy spolu interagují.

**Světlo** hraje roli v počátku klíčení kvůli fytochromovému mechanismu.

**Kyslík** nebo naopak **oxid uhličitý** indikují přítomnost případných kompetitorů v okolí.

### 3.2.3 Klíčení

Klíčení začíná absorpcí vody dormantním suchým semenem a je zakončen vyrostením kořínku přes tkáň obklopující embryo. Klíčení nastává, když růst embrya překonává omezení uložené osemením (Bewley a kol., 2013).

Existují tři fáze absorpce vody semenem (imbibice): Během fáze I mají suchá semena velmi nízký vodní potenciál, který způsobí rychlý influx vod. Propustnost osemení hraje ústřední roli v příjmu vody. Fáze II zahrnuje prasknutí osemení. Ve fázi III praskne endosperm a objeví se výčnělek kořínku (Finch-Savage a Leubner-Metzger, 2006).

## 3.3 Povrch semene, osemení hrachu (bobovitých)

Krytosemenné semeno se vyvíjí z oplodněného vajíčka a v závislosti na fázi vývoje se obvykle skládá z embrya vzniklého oplodněním vaječné buňky pylovou láčkou, nutriční tkáň endospermu a z ochranného osemení (testa) odvozeného z vnitřního, vnějšího nebo obou integumentů (Bradford a Nonogaki, 2009). Osemení se skládá ze čtyř vrstev, směrem od povrchu jsou to vosková kutikula, epidermis, hypodermis a vnitřní parenchym (viz Obrázek 3).

### 3.3.1 Vosková kutikula

Vnější buněčné stěny jsou zpravidla pokryty voskovou kutikulou, jsou nepravidelně ztluštělé a nazývají se koncové čepičky. Jejich tvary určují strukturu povrchu osemení (Güneş, 2013). Struktura této vrstvy je obecně spojená s vodní nepropustností tvrdých

semen (White, 1908; Hamly, 1932, 1935; Bevilacqua a kol., 1989.). Kutikula tvoří souvislou vrstvu pokrývající celé semeno s výjimkou pupku (hilu) a je považována za první překážku bobtnání (imbibice) semen.

### 3.3.2 Epidermis

Epidermis tvoří jednu vrstvu palisádových radiálně protáhlých sklereidů nazývaných **Malphigiho buňky** s nerovnoměrně ztlustělými buněčnými stěnami. (White, 1908; Spurný, 1963; Ma a kol., 2004.; Shao a kol., 2007).

U některých druhů luštěnin, jako je například sója, je povrch semen modifikován také sekreční aktivitou podstěny (Yaklich a kol., 1986), která může ukládat hydrofobní proteiny na kutikule (Clarkson a Robards, 1975; Gijzen a kol., 1999).

**Sklereidní vrstva** je oblast makrosklereidních buněčných stěn oddělujících koncové čepičky od bazální části. Tato hraniční čára je označována jako „světelná čára“ nebo *linea lucida*. Její vzhled je odvozen od místních rozdílů v indexu lomu a napomáhá k změnám v depozici polysacharidů a impregnaci (Hamly, 1935; Harris, 1983; Bhalla a Slattery, 1984; Bevilacqua a kol., 1987). Lumen makrosklereidů bývá nepravidelný a zužuje se směrem k povrchu semene kvůli ztluštění buněčných stěn.

### 3.3.3 Hypodermis

Subepidermální vrstva buněk se člení na **osteosklereidy** (buňky ve tvaru kosti), také nazývané jako sloupcovité nebo pilířovité buňky, které mají ztlustlou sekundární buněčnou stěnu, a **lagenosklereidy** (buňky ve tvaru baněk). Tato vrstva obsahuje vzduchem plněné mezibuněčné prostory vyplývající z formování buněk během diferenciací testa a masivní depozice buněčných stěn ve střední části (Harris, 1983; Miller a kol., 2010). V místě a okolí hilu vrstva osteosklereidů splývá se silnostěnným hvězdicovitým parenchymem.

### 3.3.4 Parenchym nebo živná vrstva

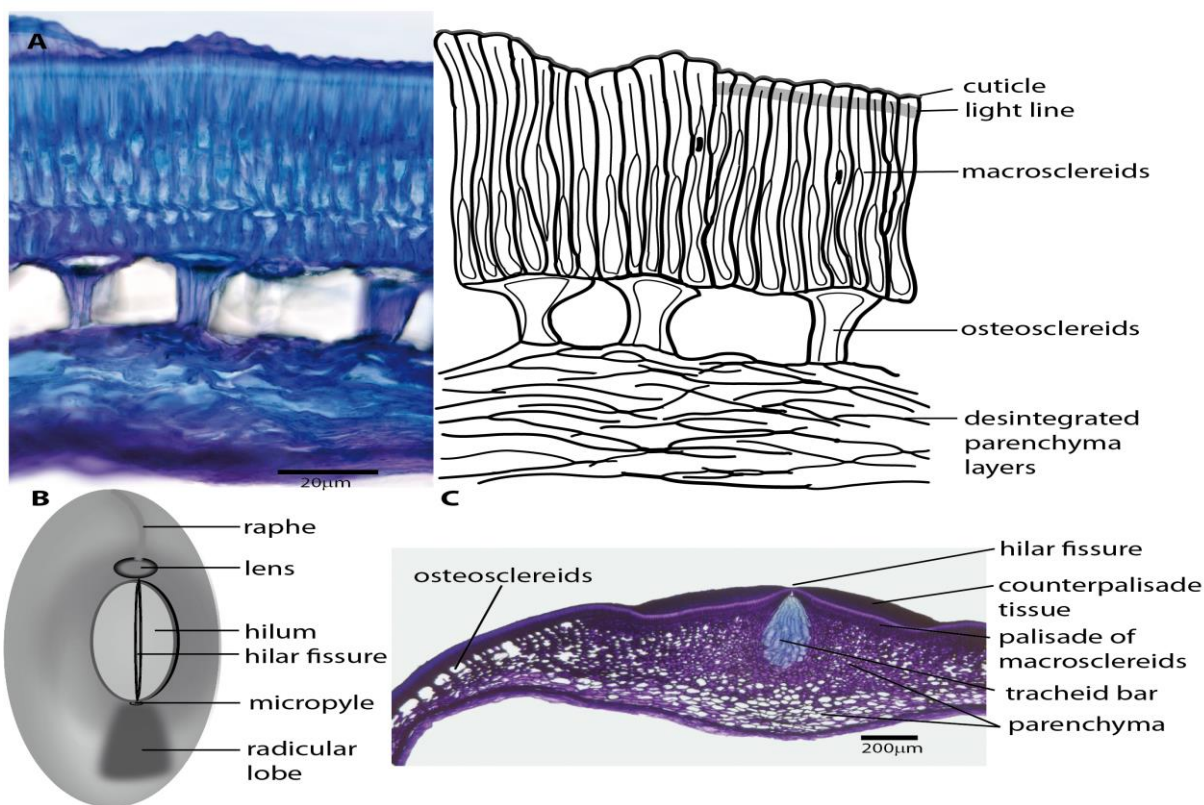
Nejvnitřnější část osemení se skládá z parenchymatických buněk, které jsou protáhlé v tangenciálním směru a vytváří vzduchem naplněné mezibuněčné prostory. Často

mají 5 - 12 vrstev s vnitřní vrstvou v přímém kontaktu s endospermem (Hamly, 1932, 1935). Někteří autoři nazývají parenchymatickou oblast "živnou vrstvou" vzhledem ke své funkci v průběhu vývoje embrya (van Dongen a kol., 2003).

Cévní systémy osemení jsou zabudovány do parenchymu a jejich struktury se mezi luštěninami liší. Některé druhy mají rozsáhlé vaskulární systémy, které tvoří síť skrz celé osemení (např. fazole, Offler a Patrick, 1984; sója, Thorne, 1981). Zatímco jiné druhy mají relativně jednoduché cévní systémy pouze s jediným cévním svazkem a dvěma bočními větvemi (např. hrách, Spurný, 1963; Hardham, 1976; bob, Offler a kol., 1989).

Během zrání osemení parenchymatické buňky ztrácejí protoplast a rozpadají se na fragmenty.

Obrázek 3: Struktura osemení bobovitých (*Fabaceae*) (převzato ze Smýkal a kol., 2014)



Legenda: A - příčný řez osemením divokého *Pisum sativum subsp. elatius* (vlevo), schématicky (vpravo); B - zobecněné schéma semene bobovitých (*Fabaceae*); C - příčný řez osemením *Pisum sativum* v oblasti hilu.

### 3.3.5 Proantokyanidiny a tvrdosemennost

Proantokyanidiny (PA), oligomery flavan-3-ol jednotek, získaly zvláštní pozornost kvůli jejich hojnému výskytu v osemeni (Dixon a kol., 2005; Zhao a kol., 2010). PA jsou také známé jako chemický základ tříslovin, polymerních flavonoidů, které rostliny produkují jako sekundární metabolity ve vnitřním integumentu nebo endotelu (Winkel-Shirley, 2001). Pomocí mutantů *Arabidopsis* s průhlednou testou (tt) byla objevena PA biosyntéza a její regulace (Lepiniec a kol., 2006) a 20 genů, které ovlivňují metabolismus flavonoidů (Bradford a Nonogaki, 2009).

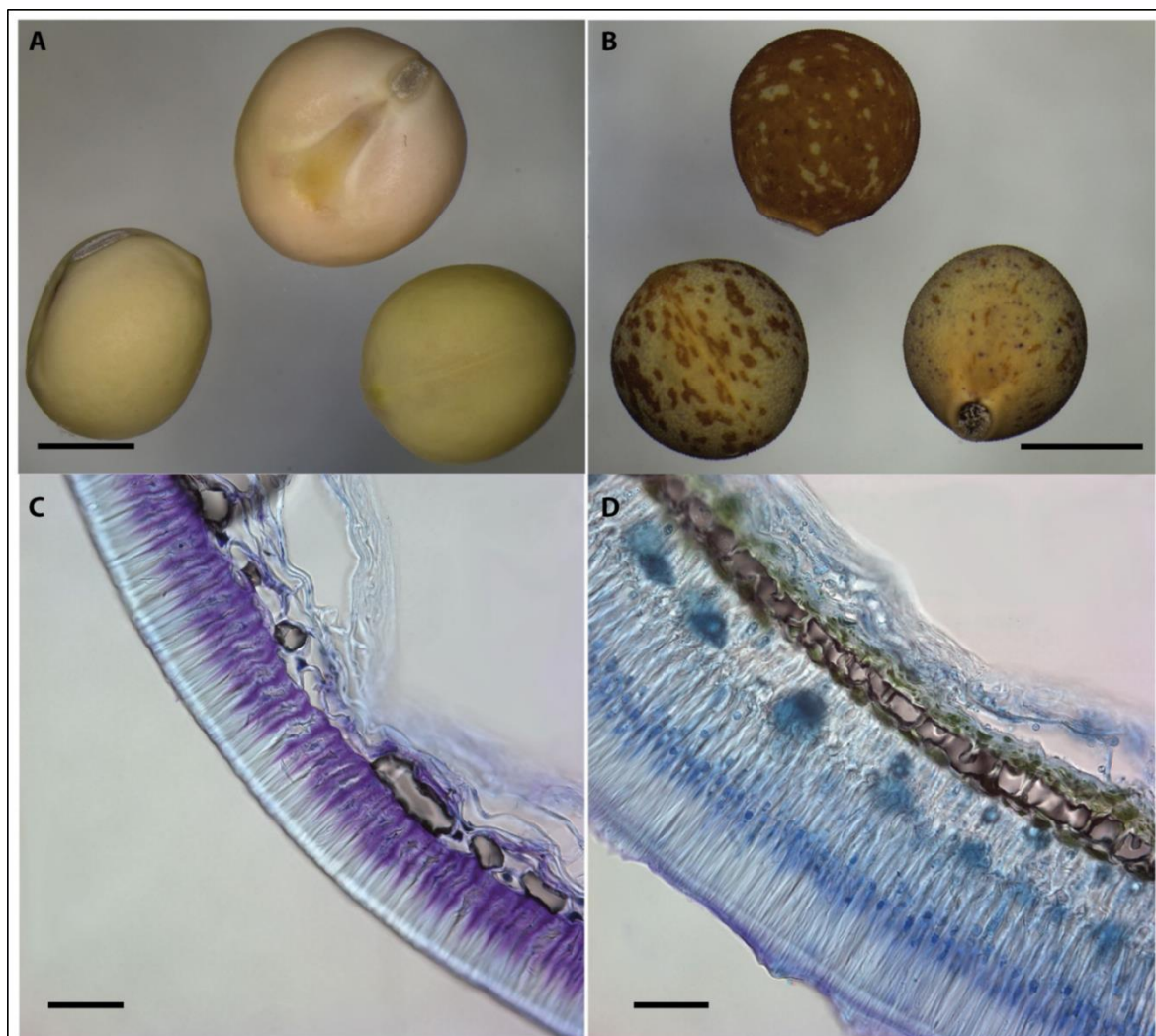
Na regulaci transkripce anthokyanidin reduktázy (ANR), klíčového enzymu produkujícího epikatechin (Baudry a kol., 2004), se podílí zejména sada tří transkripčních faktorů (TT2, TT8 a TTG1). Zjistilo se, že mnoho z těchto biosyntetických procesů ovlivňuje dormanci semen *Arabidopsis*, indikující úlohu pigmentů v tomto procesu (Debeaujon a kol., 2000). Čím nižší je obsah fenolických látek v osemeni, tím se může snižovat i pigmentace a tvrdost semen, což je také typické v průběhu procesu domestikace (Plitmann a kol., 1989) (viz Obrázek 4), také se tím může měnit povrch osemeni z hrubého (*Gritty*) u planých forem (viz Obrázek 5) na hladké transparentní u kulturních forem (viz Obrázek 6).

Luštění se liší podle typů PA monomerů, které polymerují za vzniku tříslovin. Nejlépe studované PA u *M. truncatuly* jsou složeny převážně z epikatechinu nebo katechinu (Dueñas a kol., 2003). Epikatechin vykazoval významně pozitivní vztah při vzniku tvrdosemennosti a s tím související dormance a klíčivosti semen.

Epikatechin má vlastnosti autooxidace s kyslíkem O<sub>2</sub>. Role epikatechinu pravděpodobně brání vstupu O<sub>2</sub> a chrání tak embryo proti oxidaci, proto jsou semena schopna udržet si vitalitu. Při pomalé a trvalé oxidaci O<sub>2</sub> na povrchu semene, se snižovala jeho tvrdosemennost a docházelo tak ke klíčení (Zhou a kol., 2010).

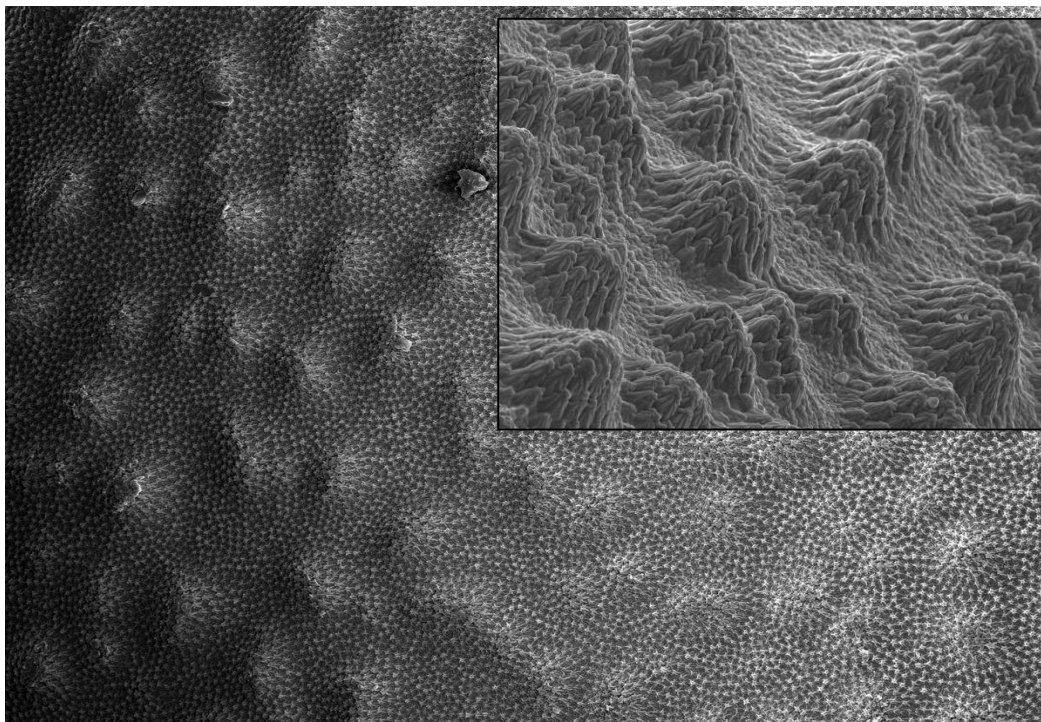
Tvrdosemennost je adaptivní vlastnost rostlin, které přežívají v nepříznivých podmínkách. Naopak je to negativní vlastnost z hlediska potravinářského využití, kdy snížení příjmu vody vede k prodloužení doby vaření (Zhou a kol., 2010).

Obrázek 4: Porovnání kultivovaných a planých semen hrachu (Smýkal a kol., 2014)

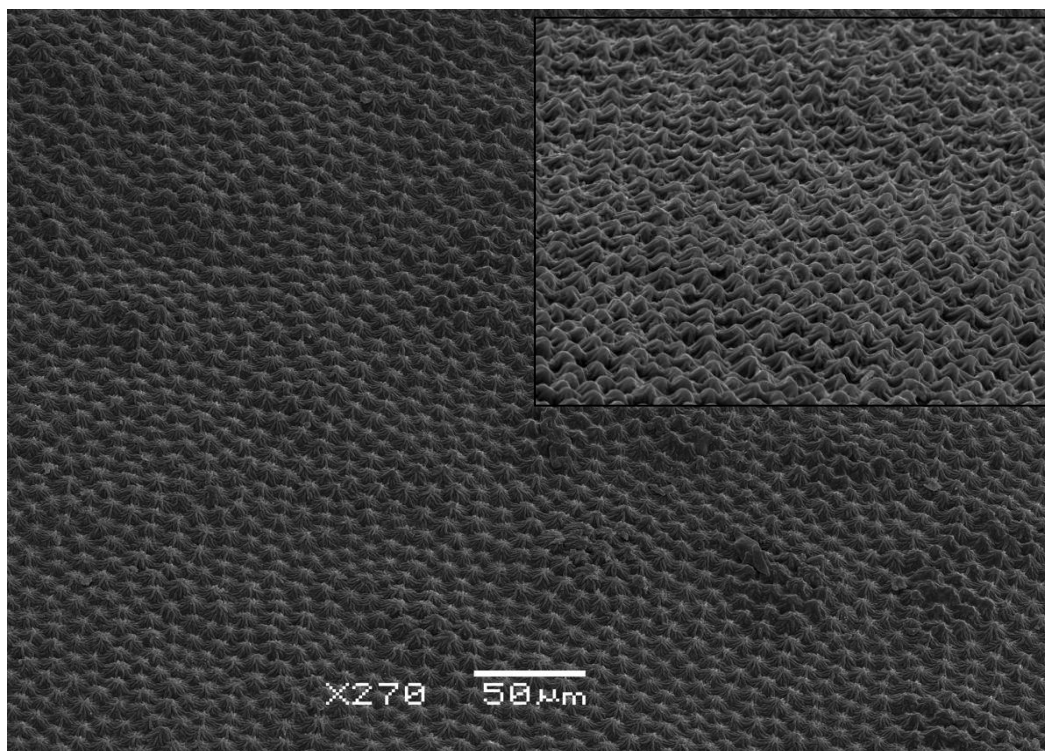


Legenda: A, C - kultivovaný *Pisum sativum* cv. Cameor s transparentním osemením; B, D - planý *P. sativum* subsp. *elatius* JI64 s pigmentovaným a hrubým (*Gritty*) povrchem osemení.

Obrázek 5: Snímek povrchu osemení planého druhu *P. elatius* L100 pořízený elektronovým mikroskopem (Soukup a Smýkal, osobní sdělení)



Obrázek 6: Snímek povrchu osemení kulturního druhu *P. sativum* cv. Cameor pořízený elektronovým mikroskopem (Soukup a Smýkal, osobní sdělení)



### 3.4 Genomika hrachu

Velikost jaderného genomu hrachu se odhaduje na 9,09 pg DNA/2C, což odpovídá haploidní velikosti genomu (1C) 4,45 Gbp. GC obsah hrachu je 37,7 %, ale spolu s mnoha eukaryotami se tento GC obsah mění a zdá se, že je distribuován v relativně dlouhých oblastech podobného složení bází. Přibližně 30 % zbytků C jsou 5methyl-cytoziny a přibližně 50 % 5meC jsou v sekvenci C(A/T)G. Z dřívějších studií složení sekvence genomu hrachu za použití DNA kinetiky a měření chování při tavení vyplynulo, že 75 až 97 % genomu je tvořeno heterogenní populací repetitivních sekvencí. Nedávné výzkumy pomocí next generation sequencing (NGS) potvrdily výskyt různých rodin repetitivních a ukázalo se, že asi 50-60 % jaderné DNA hrachu se skládá z velmi a mírně opakovaných sekvencí (Smýkal, 2012).

#### 3.4.1 Genetická mapa hrachu

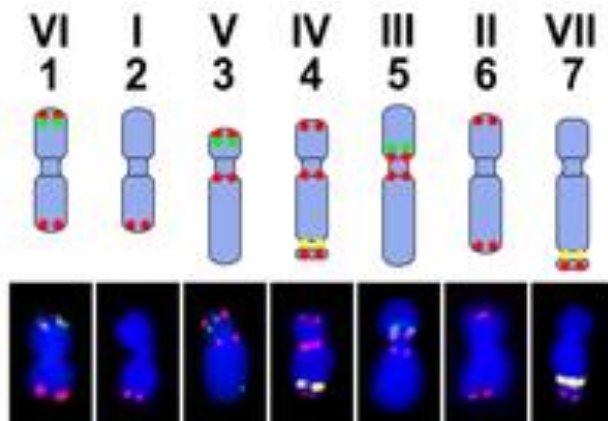
Standardní karyotyp hrachu se skládá ze sedmi chromozómů. Z toho pět chromozómů je akrocentrických a dva (4 a 7) se sekundární konstrikcí odpovídající seskupení genů 45S rRNA (viz Obrázek 7). Číslování chromozómů hrachu je netradiční v tom, že největší chromozóm, tradičně s názvem chromozóm 1, je ve skutečnosti chromozóm 5 s přiřazenou vazebnou skupinou (LG) III (Smýkal, 2012).

Chromozómy hrachu jsou rozlišitelné na základě morfologie a in situ hybridizace a tyto chromozómy mají vztah k vazebným skupinám. Je jasné, že je tu prostor pro redefinici jmen chromozómů hrachu, ale žádná systematická přejmenování nebyla doposud odsouhlasena. Z tohoto důvodu čísla chromozómů a čísla vazebných skupin jsou označována arabskými a římskými číslicemi, resp. 1 = VI, 2 = I, 3 = V, 4 = IV, 5 = III, 6 = II a 7 = VII (Smýkal, 2012).

Klíčové kroky vedoucí k vytvoření aktuální mapy zahrnují: určení sedmi vazebných skupin (Lamprecht, 1948), přiřazení vazebných skupin k určitým chromozómům, konstrukce chromozómové mapy se 128 lokusy (Lamprecht, 1961), obnovení Lamprechtovi mapy Blixtem (1972) s přidanými vazebnými daty k 128 lokusům a 41 novými geny, mapování biochemických markrů (27 izoenzymů) a vazba na kotvící markry (Weeden, 1985), přidání molekulárních markrů a strukturní reorganizování Lamprechtovi verze. Aktuální mapy (viz Obrázek 8 a Obrázek 9) vyplývají z mapovacích

postupů pro šest různých rekombinantních inbredních linií (RIL) populace (Bordat a kol., 2011; Weller, 2012). Máme dlouhou historii geneticky mapujících studií hrachu, byly použity různé typy polymorfismů: morfologické markery, izoenzymy, RFLP, RAPD, SSR, EST, PCR techniky a nedávno použité paralelní genotypizace.

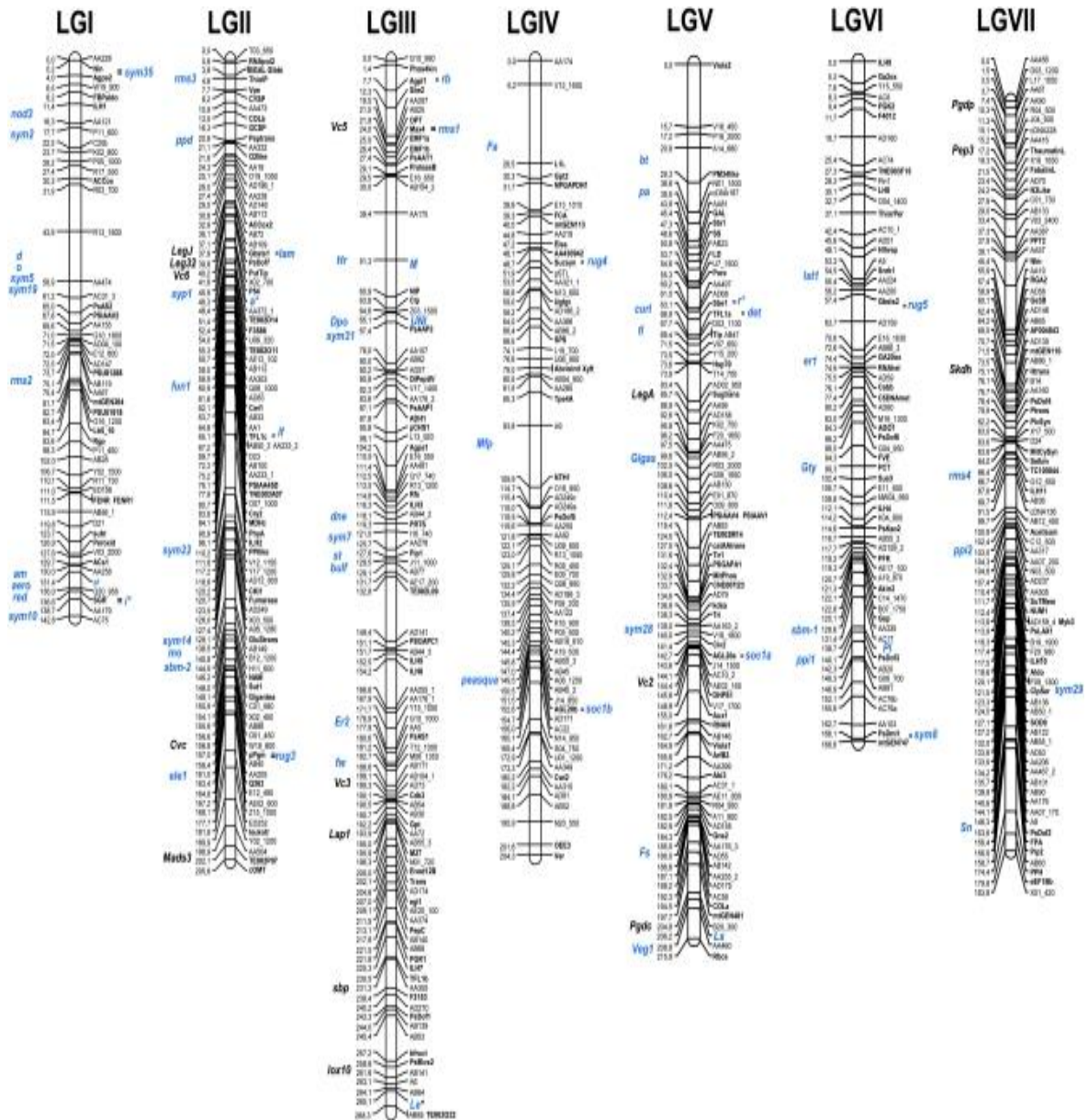
Obrázek 7: Karyotyp hrachu *Pisum sativum* (Smýkal a kol., 2012)



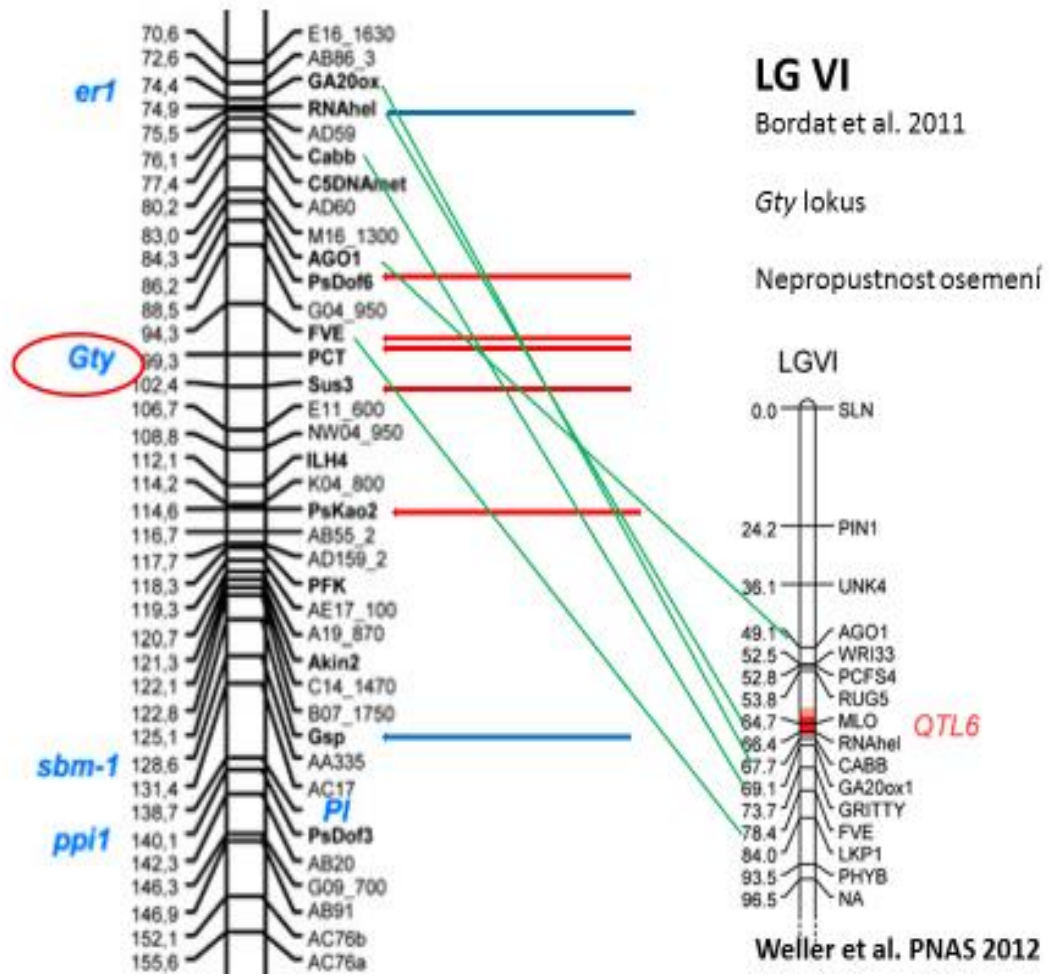
Legenda: Arabská čísla představují typ chromozómu a římská vazebné skupiny (LG) (Neumann a kol., 2002; Fuchs a kol., 1998). Horní obrázek představuje schéma karyotypu hrachu s lokusy pro PisTR-B (červený), 5S rDNA (zelený), 45S rDNA (žlutý). Spodní obrázek ukazuje stejné lokusy detekované pomocí metody FISH na izolovaných metafázních chromozómech, Bar = 5  $\mu$ m.



Obrázek 8: Genová mapa *Pisum sativum* L. (Bordat a kol., 2011).



Obrázek 9: Mapa *Gty* lokusu na vazbné skupině VI (Bordat a kol., 2011; Weller a kol., 2012)



## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Rostlinný materiál

Semena plané formy hrachu VIR320 (*Pisum sativum subsp. elatius*) původem z VIR kolekce, Rusko a kulturního hrachu WL1238 (*Pisum sativum subsp. sativum*) původem z Nordic Gene Bank, Švédsko a z nich odvozených 96 rekombinantních inbredních linií (RIL) v generaci F9:10 (Bogdanova a kol., 2009).

Semena byla vyseta po třech semenech do zahradnického substrátu namíchaného s ornici v poměru 1:1 do 96 třilitrových květináčů. Rostliny byly pěstovány ve sklenících katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci části Holice v období od dubna do června roku 2014.

Odebrané vzorky listů z jednotlivých rostlin byly uchovávány při -75 °C až do doby izolace genomové DNA, která byla dále použita v molekulárních analýzách. Při testování byly vzorky uchovávány krátkodobě v lednici při 4 °C nebo dlouhodobě při -20 °C.

### 4.2 Makroskopické hodnocení povrchu semen (*Gritty* znak)

**Laboratorní vybavení:** stereomikroskop (Olympus ZS30), 12-jamková kultivační deska (Biolite, Schoeller), pinzeta

#### Postup

- 1) Do 12-jamkových desek bylo vloženo vždy po třech semenech hrachu.
- 2) Pod stereomikroskopem byly hodnoceny rozdíly v povrchích semen.

### 4.3 Testování dormance semen

**Laboratorní vybavení:** 12-jamková kultivační deska (Biolite, Schoeller), buničitá vata, voda, brusný papír, pinzeta

#### Postup

- 1) Do jamek desky bylo vloženo na buničitou vatu vždy po třech semenech hrachu.
- 2) Každá deska byla popsána.

- 3) Semena byla zalita malým množstvím vody.
- 4) Semena byla nechána při pokojové teplotě bobtnat a klíčit.
- 5) V průběhu dvou dnů byl zaznamenán poměr klíčících a dormantních semen.
- 6) Vzorčky byly vyfotografovány (viz Příloha).
- 7) U semen, která neklíčila ani po dvou dnech, byla provedena skarifikace brusným papírem, aby se mechanicky narušilo osemení pro jeho lepší propustnost pro vodu a následné klíčení.

#### **4.4 Izolace genomové DNA**

Genomová DNA z RIL byla vyizolována z přibližně 300 mg rostlinného materiálu uchovávaného při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Laboratorní vybavení:** Invisorb Spin Plant Mini Kit (firma STRATEC Molecular GmbH, Německo), vortex (MS2 Minishaker), inkubátor (Termo Block MB - 102, BIOER.), centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415 R), automatická pipeta (Eppendorf Research plus), špičky

##### **Postup dle návodu výrobce**

- 1) Veškeré zkumavky byly označeny popisem.
- 2) K listu bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  Lysis Buffer P a 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K (100  $\mu\text{g/ml}$ ).
- 3) Krátce byly vzorky zvortexovány.
- 4) Vzorky byly inkubovány 30 min při  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 5) Homogenit byl přelit na kolonku PREFILTR.
- 6) Zkumavky byly zcentrifugovány 1 min při 12 000 rpm.
- 7) Do zkumavky bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  RNAase A (10  $\mu\text{g/ml}$ ) a ponecháno při pokojové teplotě 10 - 15 min.
- 8) Do zkumavky bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  Binding Buffer P a zvortexováno.
- 9) Vzorek byl přelit do kolonky SPIN FILTR a nechán 1 - 2 min stát.
- 10) Zkumavky byly zcentrifugovány 1 min při 12 000 rpm.
- 11) Bylo vyhozeno, co protéklo, vrátila se zpět kolonka a bylo napipetováno 550  $\mu\text{l}$  Wash Buffer I.
- 12) Zkumavky byly zcentrifugovány 1 min při 12 000 rpm.

- 13) Bylo vyhozeno, co protéklo, vrátila se zpět kolonka a bylo napipetováno 550  $\mu$ l Wash Buffer II.
- 14) Zkumavky byly zcentrifugovány 1 min při 12 000 rpm.
- 15) Bylo vyhozeno, co protéklo, vrátila se zpět kolonka a bylo napipetováno 550  $\mu$ l Wash Buffer II.
- 16) Zkumavky byly zcentrifugovány 1 min při 12 000 rpm.
- 17) Bylo vyhozeno, co protéklo, vrátila se zpět kolonka a centrifugovalo se 2 min při 12 000 rpm.
- 18) Po sobě bylo do zkumavky napipetováno 2x 100  $\mu$ l přehřátého Elution Buffer D na 65 °C a inkubovalo se 3 min.
- 19) Zkumavky byly zcentrifugovány 1 min při 12 000 rpm.

#### **4.5 Měření koncentrace DNA (NanoDrop)**

Byla změřena koncentrace vyizolované genomové DNA a koncentrace PCR amplifikace na NanoDropu.

**Chemikálie a roztoky:** destilovaná voda, TE pufr

**Laboratorní vybavení:** NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), automatická pipeta (Biohit), kádinka, buničitá vata

#### **Postup**

- 1) Byly napipetovány 2  $\mu$ l destilované vody na NanoDrop pro vyblankování.
- 2) Poté byly napipetovány 2  $\mu$ l TE pufru opět pro vyblankování.
- 3) Následně byly napipetovány 2  $\mu$ l vzorku DNA a byly změřeny hodnoty absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm, hodnota 260/280 nm a koncentrace v ng/ $\mu$ l.

#### **4.6 PCR amplifikace vybraných genů s pozicí na LGIII**

Výsledky PCR amplifikace byly ověřeny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu a zviditelněny UV zářením.

**Chemikálie a roztoky:** *MyTaq*<sup>RED</sup> polymeráza (Bioline), 5x koncentrovaný pufr pro *MyTaq*<sup>RED</sup> obsahující Mg, dNTP i nanášecí barvivo (Bioline), voda, primery (viz Tabulka 2) (Generi-Biotech, CZ)

Tabulka 2: Použité primery

Primer	Sekvence (3'-5')	Accession number	Citace
FVE-F1250	AACAATGGAGACTCCTCCGT	AY830931	Hecht a kol., 2005
FVE-R1250	CACAACCTCACAATTCGCAATCACC	-	Hecht a kol., 2005
FVE-F2290	GGGATGTTGAAAGTCAACCTAACCGTC	-	Weller a kol., 2012
FVE-R2290	CCTTAACAACAGGACTAGAGCCA	-	Weller a kol., 2012
LKP1-F	AGAATGGGCGACGAAGGTAT	JX946298	Weller a kol., 2012
LKP1-R	AAACCGCACCGTCCTCTAC	-	Weller a kol., 2012
Dof6-F	CTCACTACACACGAATTCCGAG	AB087851	Deulvot a kol., 2010
Dof6-R	TGAATGTGTCCAATACGGCTG	-	Deulvot a kol., 2010
KAO2-F	AGAGTTCTAGTGATGGCATCCTT	AF537322	Bordat a kol., 2010
KAO2-R	CACTGAAAGTGCCTCGTAGCCAT	-	Bordat a kol., 2010
RNAhel-F	GGGTTTGGTAGGTTTGGTAGAGG	PSCC24A19u	Aubert a kol., 2006
RNAhel-R	GCTATCAAAATTGTAGTGGGTGGG	-	Aubert a kol., 2006
PCT-F	TTGGCAAAAACGATAAACCTGT	BV165466-7	Deulvot a kol., 2010
PCT-R	CACGGCACATCTGGAATAACTT	-	Deulvot a kol., 2010
Sus3-F	GCCTCGATTCCGAAACCAACG	AJ311496	Aubert a kol., 2006
Sus3-R	GATGCGTTTGGAGCATCTCCTC	-	Aubert a kol., 2006
Laccase-F710	GAGTGGTGAAGGAACAAGTTATG	Pers. Comm.	vlastní
Laccase-R1900	CCTTGAATCTGATAGCAACCCAAC	Pers. Comm.	vlastní
UDPglyc-F513	ACTCCAATGATCTTCCACGAGG	Pers. Comm.	vlastní
UDPglyc-R1557	GTTACAAAGGGACAACCTTGCCA	Pers. Comm.	vlastní

**Laboratorní vybavení:** sterilní box (TelSTAR PV - 102), 2ml zkumavky, 0,2ml mikrozkušavky, zkumavkové stripy (Trefflab, Switzerl), 96 jamková deska na PCR (4titude), PCR termocykler (MJ Research PTC - 200), automatická pipeta (Eppendorf Research plus), špičky

## Postup

- 1) Práce byla prováděna ve sterilním boxu.
- 2) Chemikálie pro PCR byly po rozmrznutí umístěny do chladicího stojánku.
- 3) Do 2ml mikrozkušavky bylo připraveno potřebné množství reakční směsi bez DNA vzorku dle Tabulka 3.
- 4) Do označených 0,2ml mikrozkušavek nebo zkumavkových stripů byla rozpipetována reakční směs po 18  $\mu$ l.
- 5) Do reakční směsi byly napipetovány 2  $\mu$ l vzorku DNA.
- 6) Mikrozkušavky nebo zkumavkové stripy byly vloženy do PCR termocykleru a byl spuštěn program CAPS (viz Tabulka 4).

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi [ $\mu$ l]

	<b>1x</b>	<b>10x</b>	<b>20x</b>	<b>30x</b>
<b>5x pufr</b>	4	40	80	120
<b>voda</b>	13	130	260	390
<b>primer mix (5 mM F/R)</b>	1	10	20	30
<b>Taq (5 units/<math>\mu</math>l)</b>	0,1	1	2	3
<b>DNA vzorek (20-80 ng/<math>\mu</math>l)</b>	2	2	2	2
<b>celkem</b>	20	20	20	20

Tabulka 4: PCR teplotní program CAPS

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

## 4.7 Restrikce PCR produktu (CAPS-PCR, Cleavage Amplified Polymorphic Sequence)

Výsledky restrikce PCR produktu byly zviditelněny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu.

**Chemikálie a roztoky:** restrikční enzym (viz Tabulka 5) (Thermo Scientific, Biogen, CZ, enzymy testované pro polymorfismus rodičů), odpovídající pufr (např. žlutý, červený), voda, PCR produkt

Tabulka 5: Restrikční enzymy s používanými pufrů a teplotami štěpení

Restrikční enzym	Pufr	Teplota štěpení
<i>AluI</i>	žlutý	37 °C
<i>HaeIII</i>	červený	37 °C
<i>MseI</i>	pufr 2	37 °C
<i>RsaI</i>	pufr 1	37 °C

**Laboratorní vybavení:** zkumavkové stripy (Trefflab, Switzerl), 96-jamková deska (4titude), PCR termocykler (MJ Research PTC – 200), inkubátor (Termo Block MB - 102, BIOER), automatická pipeta (Eppendorf Research plus), špičky

### Postup

- 1) Chemikálie pro restrikci byly po rozmrznutí umístěny do chladicího stojánku.
- 2) Do 2ml mikrozukavky bylo připraveno potřebné množství reakční směsi bez PCR produktu dle Tabulka 6.
- 3) Do označených zkumavkových stripů nebo desky byla rozpipetována reakční směs po 10  $\mu$ l.
- 4) Do reakční směsi bylo napipetováno 5  $\mu$ l PCR produktu.
- 5) Zkumavkové stripy nebo deska byly vloženy do PCR termocykleru nebo inkubátoru podle potřebné teploty štěpení DNA enzymem (viz Tabulka 5).



Tabulka 6: Složení reakční směsi pro restrikci [ $\mu$ l]

	<b>1x</b>	<b>10x</b>	<b>20x</b>	<b>30x</b>
<b>10x pufr</b>	1,5	15	30	45
<b>voda</b>	8,42	84,2	168,4	252,6
<b>enzym</b>	0,08	0,8	1,6	2,4
<b>DNA/PCR</b>	5	5	5	5
<b>celkem</b>	15	15	15	15

#### 4.8 Kvantifikace DNA, elektroforetická kontrola integrity

**Chemikálie a roztoky:** agaróza (BIO-41025, Agarose Molecular Grade, Bioline), standard (marker) pro určení velikosti DNA fragmentů na gelu (GeneRuler 100bp DNA Ladder, kat. č. SM0241, Thermo Scientific, Biogen), 10x TBE (na 1 litr 5,40 g TRIS báze; 2,75 g kyseliny borité; 2 ml 0,5mol/l EDTA o pH 8,0), barvivo GelRed (Biotium)

**Laboratorní vybavení:** 250ml Erlenmayerova baňka, předvážky (Kern 572), elektroforetická vana a forma na gel (BIO-RAD), elektroforetický zdroj napětí (BIO-RAD), hřebeny, automatická pipeta (Eppendor Research plus), špičky, lžička, silikonová chňapka, dokumentační systém (Kodak EDAS 290)

#### Postup

- 1) Dle velikosti elektroforetické vany (80 ml) bylo do 250ml Erlenmayerovy baňky naváženo 1,2 g agarózy na 1,5% roztok agarózy.
- 2) Do baňky bylo nalito 80 ml pufru 0,5x TBE a vše bylo dáno vařit do mikrovlnné trouby.
- 3) Láhev byla vyjmuta z mikrovlnné trouby, promíchána krouživým pohybem a dána zpět, dokud se agaróza úplně nerozpustila.
- 4) Po vychladnutí asi na 50-60 °C byly přidány 2  $\mu$ l zásobního roztoku barviva GelRED a agaróza byla nalita do elektroforetické formy na gel.
- 5) Do elektroforetické formy na gel byly umístěny hřebeny a gel se nechal 30 min ztuhnout.

- 6) Po ztuhnutí byly hřebeny vyjmuty a gel byl vložen do elektroforetické vany s pufrům TBE.
- 7) Do jamek byly napipetovány vzorky po 7  $\mu$ l a marker po 5  $\mu$ l.
- 8) Elektroforéza byla spuštěna na 45 - 60 min při napětí 80 - 150 V.
- 9) Poté byl gel zdokumentován pomocí UV transiluminátoru (vlnové délky 280 - 302 nm) a digitálního fotoaparátu s oranžovým filtrem.
- 10) Výsledný snímek byl zpracován v PC v grafickém programu IrfanView.

#### **4.9 Přečištění PCR produktu (pro sekvenování)**

Před sekvenováním byly pomocí komerčního kitu odstraněny zbylé primery a neinkorporované nukleotidy (dNTP).

**Laboratorní vybavení:** GenElute™ PCR Clean-Up kit (Sigma-Aldrich, USA), vortex (MS2 Minishaker), inkubátor (Termo Block MB - 102, BIOER.), centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415 R), automatická pipeta (Eppendorf Research plus), špičky

#### **Postup dle návodu výrobce**

- 1) Veškeré zkumavky byly označeny popisem.
- 2) GenElute plasmid mini spin kolonka byla vložena do stanovené zkumavky.
- 3) Do každé mini spin kolonky bylo přidáno 0,5 ml Column Preparation Solution a zkumavky byly centrifugovány 1 min při 12 000 rpm, eluát byl vylit.
- 4) Do PCR produktu bylo přidáno Binding Solution v poměru 5:1 a vše promícháno.
- 5) Roztok byl převeden do vazebné kolonky a centrifugován při 12 000 rpm 1 min.
- 6) Eluát byl vylit, ale zkumavka byla ponechána.
- 7) Vazebná kolonka byla vrácena do zkumavky, bylo na ni naneseno 0,5 ml naředěného Wash Solution a bylo centrifugováno při 12 000 rpm po dobu 1 min.
- 8) Eluát byl vylit, ale zkumavka byla ponechána.
- 9) Vazebná kolonka byla vrácena do zkumavky a centrifugovalo se při 12 000 rpm po dobu 2 min a to bez jakéhokoli dalšího promývacího roztoku, aby se odstranil přebytečný etanol.
- 10) Zbytkový eluát byl vyhozen i se zkumavkou.

11) Kolonka byla přenesena do čerstvé 2ml zkušavky, na střed kolonky se aplikovalo 50 µl Elution Solution a inkubovalo se při pokojové teplotě po dobu 1 min.

12) Pro eluci DNA byla kolonka centrifugována při 12 000 rpm po dobu 1 min.

#### **4.10 Sekvenování, nalezení polymorfních míst (SNPs), Geneious software**

Sekvence byla provedena formou servisu v laboratoři sekvenace DNA na PřF UK v Praze (<https://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna>), kam byla dodána přečištěná PCR reakce (přibližně 100 - 200 ng DNA) společně s odpovídajícím sekvenačním primerem (5 pmol) v celkovém objemu 8 µl. Sekvence byla provedena metodou BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, UK) dle protokolu na sekvenátoru 3130xl Genetic Analyzer (2010) firmy Applied Biosystems. Získaný elektroferogram byl analyzován pomocí programu GENEIOUS verze R7 (Biomatters Ltd.). Sekvence byly porovnány se sekvencemi získanými pomocí BLAST (Altschul a kol., 1997) analýzy, která byla provedena na stránkách NCBI a především pak mezi rodičovskými genotypy pro nalezení potřebného polymorfismu pro mapování.

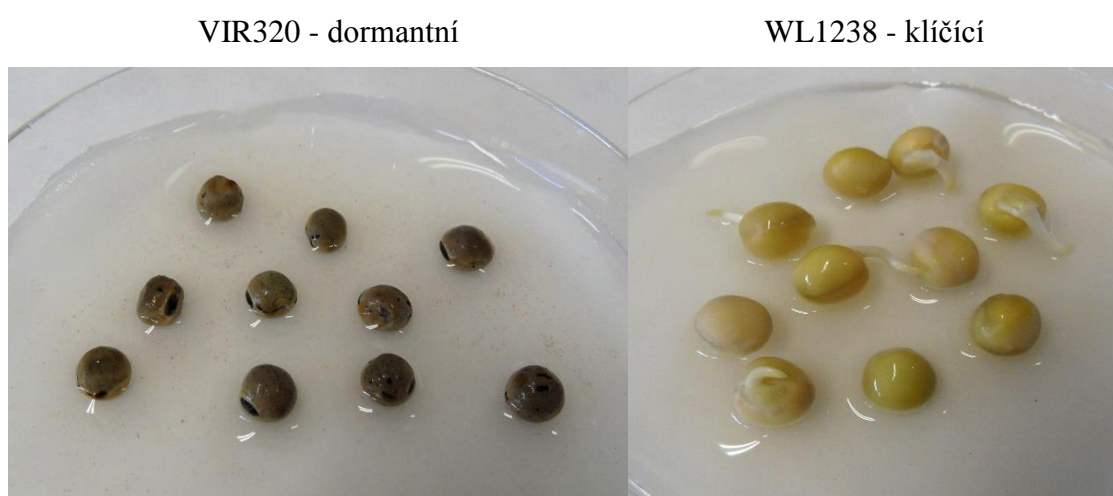
#### **4.11 Sestavení genetické mapy pomocí softwaru JoinMap 4.1**

Pro vytvoření genetické mapy byl použit program JoinMap (Stam, 1993) ve zkušební verzi, tj. bez možnosti ukládání, tisku a s jinými omezeními. Byl zvolen režim RIL a byly spočítány všechny párové rekombinační frekvence. Markery byly nejprve otestovány metodou dobré shody na očekávaný poměr 1 : 1 za použití analýzy  $\chi^2$  - kvadrát. Vazebné skupiny byly stanoveny vybráním LOD (likelihood of odds) hodnoty 5 a 4. LOD skóre nad tuto kritickou mez bylo považováno za propojené. Byla vybrána mapovací funkce Kosambi, která předpokládá určitou míru interference mezi crossing-overu v meiózy. Rekombinační frekvence byly převedeny do mapových vzdáleností (cM) pomocí funkce Kosambi. Výsledná grafická mapa byla zpracována v programu PowerPoint.

## 5 VÝSLEDKY

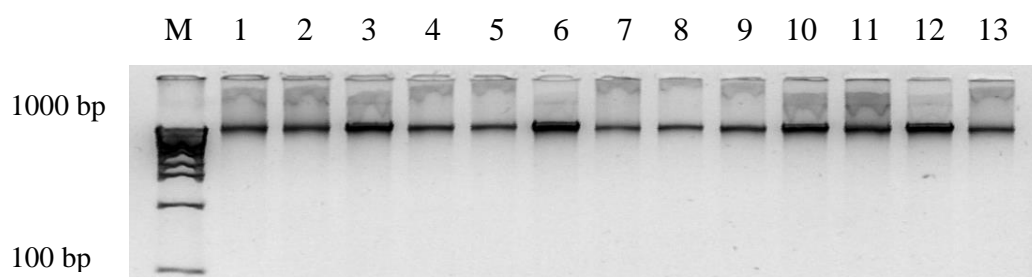
Jako test míry dormance semen rekombinantních inbredních linií (RIL) byl použit test bobtnání a klíčení semen (viz Obrázek 10). 3 - 5 semen z každé RIL linie bylo vystaveno po dobu 1 až 3 dnů působení vody za pokojové teploty a poté zaznamenány počty nabobtnalých za 1 den a semen s vyklíčeným klíčkem za 3 dny. Z celkem 96 testovaných linií populace VIR320 x WL1238 bylo 21 dormantních a 75 klíčilo po 3 dnech (viz Příloha).

Obrázek 10: Test dormance semen na rodičích po 3 dnech



Pomocí isolačního kitu byla vyizolována genomová DNA z 96 rostlin rekombinantních inbredních linií (RIL). Kvalita a částečně i množství DNA bylo zkontrolováno pomocí elektroforetické analýzy na agarózovém gelu (viz Obrázek 11).

Obrázek 11: Izolovaná genomová DNA z RIL kříženců



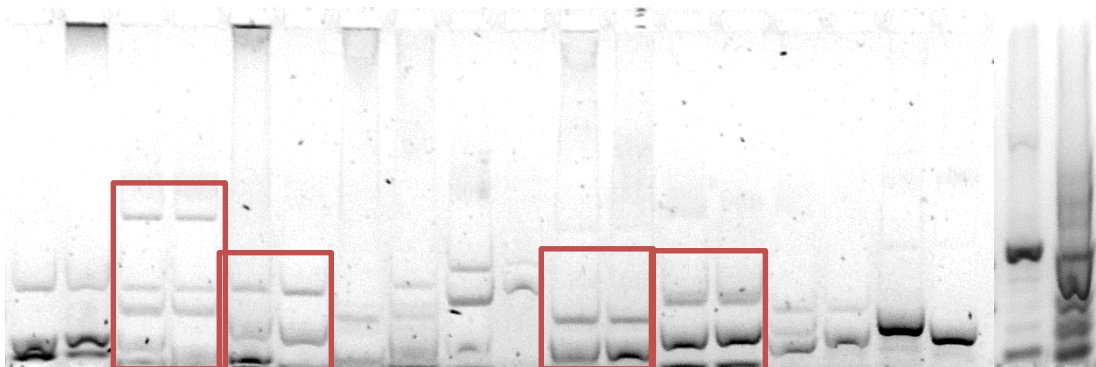
Legenda: M - ladder, 1-13 - izolovaná DNA ze vzorků RIL

Byla provedena PCR amplifikace vzorků rodičů VIR320 a WL1238 s vybranými specifickými primery (FVE1250, FVE2290, Dof6 aj.) a poté bylo provedeno restriční štěpení s enzymy testovanými pro polymorfismus rodičů (*MseI*, *AluI*, *RsaI* aj.). Výsledky byly analyzovány pomocí elektroforézy (viz Obrázek 12, 13, 14 a 15).

Některé PCR produkty vzorků rodičů nebyly v kombinaci s restričními enzymy polymorfní, proto při následném štěpení PCR produktů vzorků RIL nebyly tyto enzymy použity.

Obrázek 12: Restrikce s enzymem *MseI*

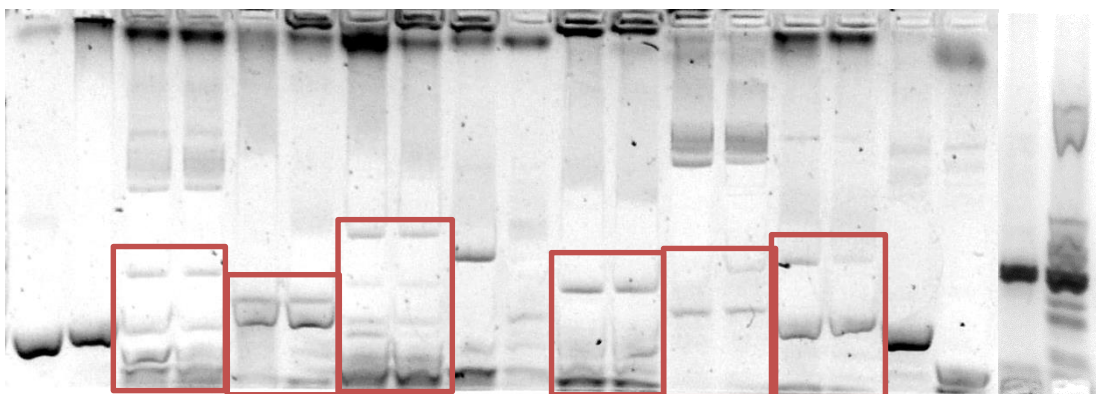
FVE1250 FVE2290 Dof6 UDPglyc Laccase LKP1 PCT KAO2 RNAhel Sus3



Legenda: červený rámeček - není polymorfismus

Obrázek 13: Restrikce s enzymem *AluI*

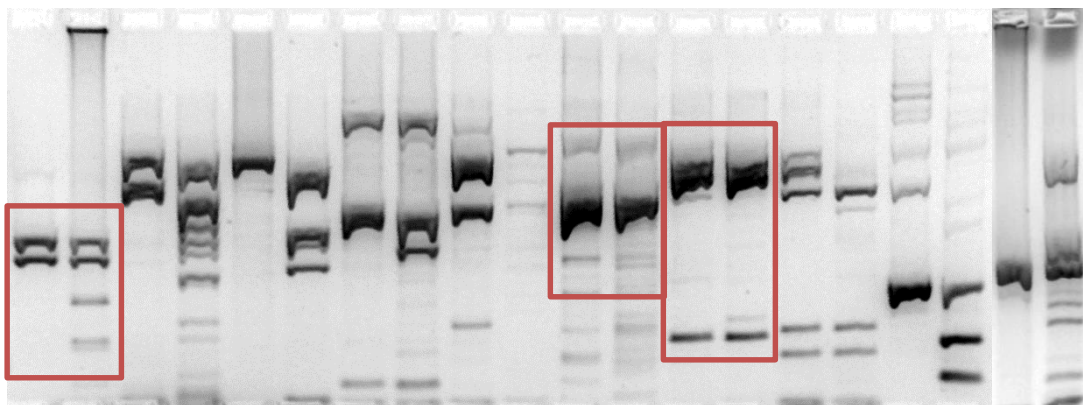
FVE1250 FVE2290 Dof6 UDPglyc Laccase LKP1 PCT KAO2 RNAhel Sus3



Legenda: červený rámeček - není polymorfismus

Obrázek 14: Restrikce s enzymem *HaeIII*

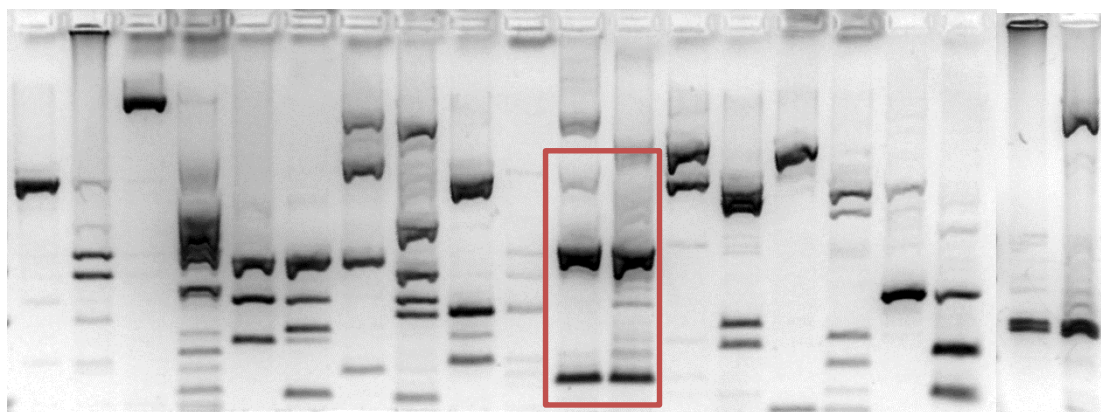
FVE1250 FVE2290 Dof6 UDPglyc Laccase LKP1 PCT KAO2 RNAhel Sus3



Legenda: červený rámeček - není polymorfismus

Obrázek 15: Restrikce s enzymem *RsaI*

FVE1250 FVE2290 Dof6 UDPglyc Laccase LKP1 PCT KAO2 RNAhel Sus3



Legenda: červený rámeček - není polymorfismus

PCR produkty rodičovských genotypů byly přečištěny pomocí PCR Clean-Up kitu a byly odeslány k sekvenaci. U všech získaných sekvencí byla provedena analýza shody s databázovými sekvencemi pomocí BLAST vyhledávání (viz Tabulka 7). Získané sekvence byly analyzovány pomocí softwaru Geneious (viz Obrázek 16).

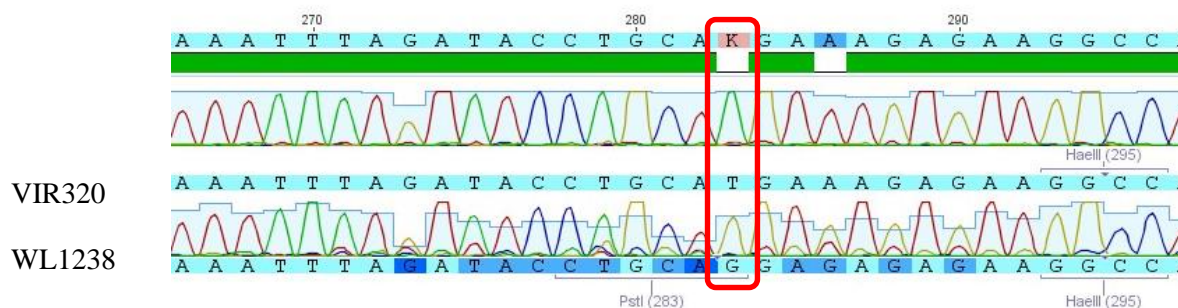
Sekvence s primerem FVE je polymorfní v oblasti štěpené pomocí *PstI*, sekvence s primerem Laccase a RNAhel je polymorfní v oblasti štěpené pomocí *AluI*, sekvence s primerem LKP1 je bez polymorfismu a sekvence s primerem Dof6 je polymorfní v oblasti štěpené pomocí *MseI*, ale rozdíl v délce je jen cca 30 - 40 bp a hned na začátku fragmentu (viz Obrázek 16).

Tabulka 7: BLAST analýza shody

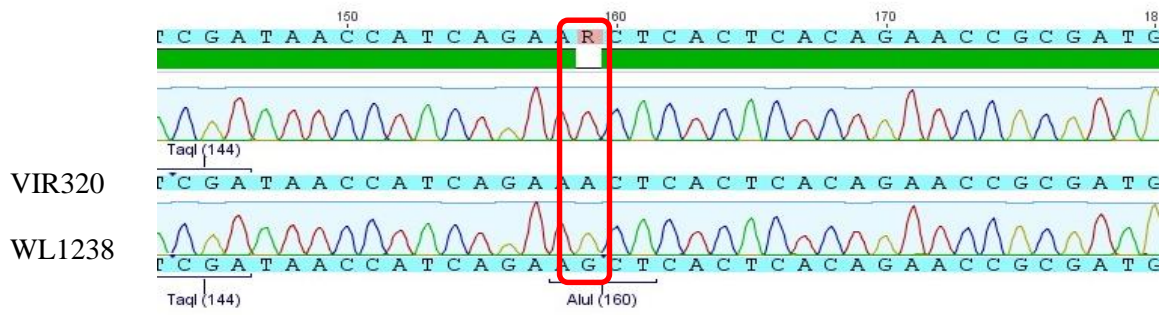
Accession	Popis	Total score	Query cover	E value	Identity
AB087851.1	<i>Pisum sativum</i> PsDof6 mRNA for DNA binding with one finger 6 protein, complete cds	1138	97%	0.0	98%
XM_008341030.1	PREDICTED: <i>Malus x domestica</i> laccase-14 (LOC103402291), mRNA	187	68%	3e-43	71%
JX946298.1	<i>Pisum sativum</i> LKP1 (LKP1) gene, 3' UTR	833	97%	0.0	99%
AY830931.1	<i>Pisum sativum</i> FVE (FVE) mRNA, complete cds	595	52%	4e-129	97%
AC131248.14	<i>Medicago truncatula</i> clone mth2-28n22, complete sequence	148	56%	6e-32	77%
Y09101.1	<i>P. sativum</i> mRNA for cholinephosphate cytidyltransferase	215	14%	1e-51	100%
AJ311496.1	<i>Pisum sativum</i> mRNA for sucrose synthase isoform 3 (sus3 gene)	641	74%	3e-124	99%
XM_003626738.1	<i>Medicago truncatula</i> UDP-glucuronosyltransferase 3A1 (MTR_8g009070) mRNA, complete cds	1324	81%	0.0	83%

Obrázek 16: Sekvence

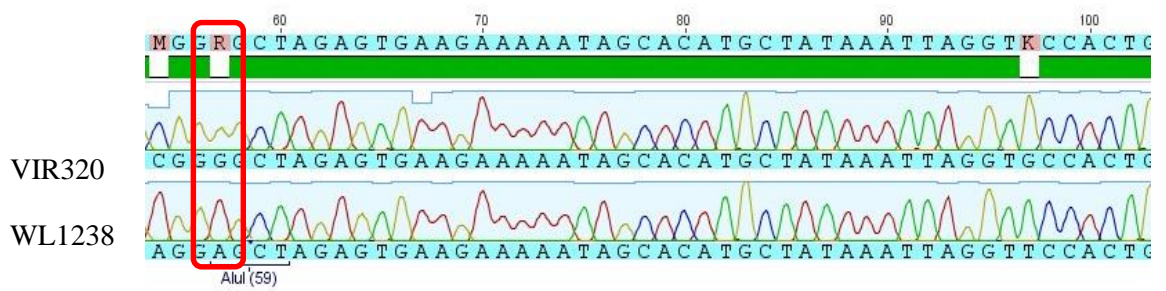
a) FVE



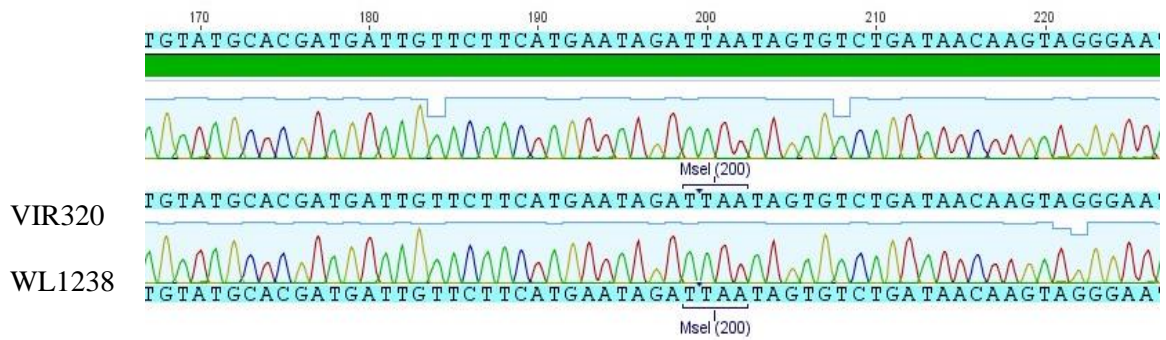
b) Laccase



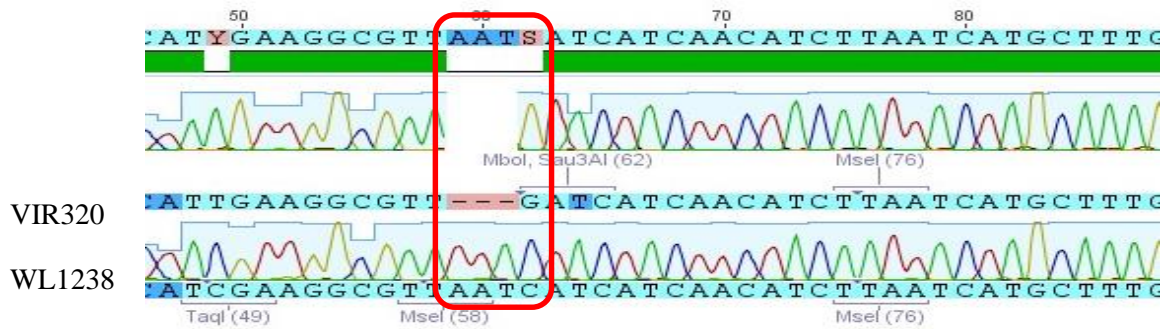
c) RNAhel



d) LKP1



e) Dof6

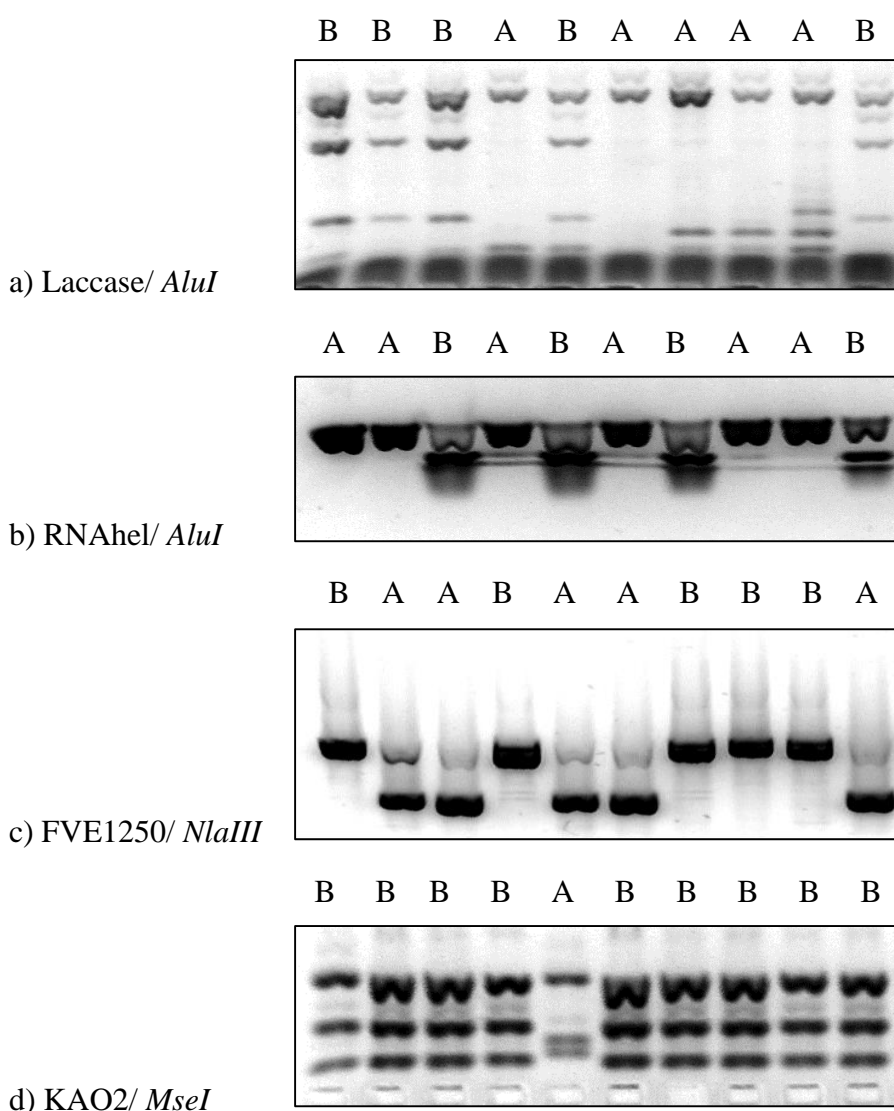


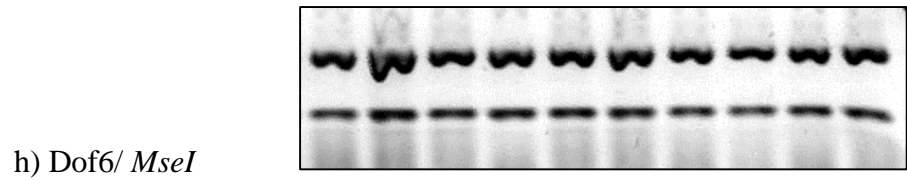
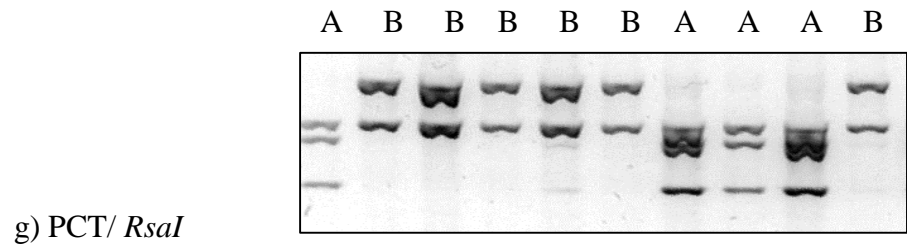
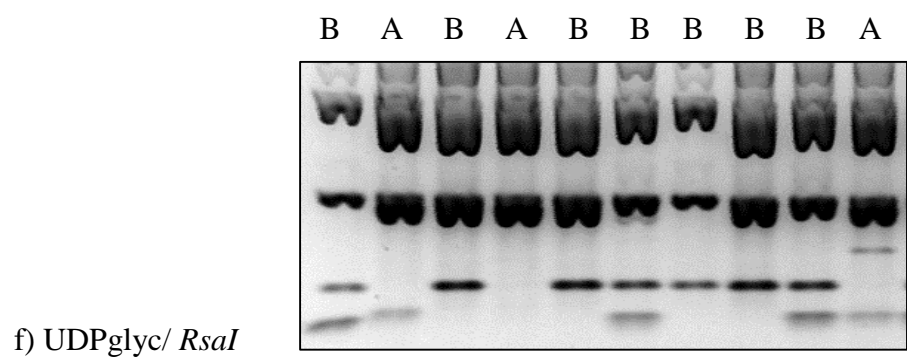
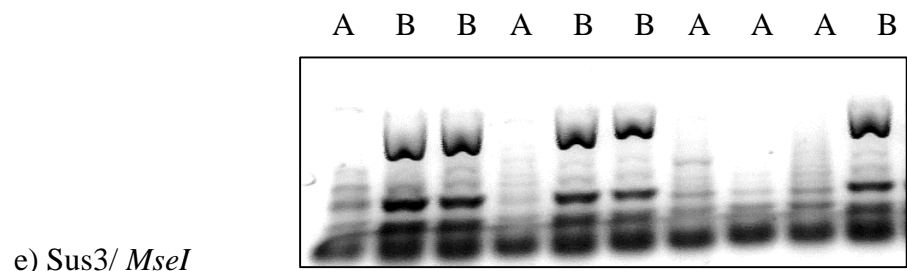


Vyizolovaná genomová DNA z rekombinantních inbredních linií byla naamplifikována pomocí PCR s vybranými specifickými primery, poté byly PCR produkty restriktivně štěpeny s enzymy dle výsledků testu polymorfismu rodičů (viz Obrázek 17) a výsledky z restriktivního štěpení byly zapsány do tabulky (viz Tabulka 8).

Všechna restriktivní štěpení byla polymorfní kromě restriktivního štěpení PCR produktu s primerem Dof6, proto není ani zahrnuto v Tabulce 8 a v genetické mapě (viz Obrázek 18).

Obrázek 17: Část restrikce naamplifikovaných vzorků RIL





Legenda: A - VIR320, B - WL1238

Tabulka 8: Část hodnocení polymorfismu RIL linií

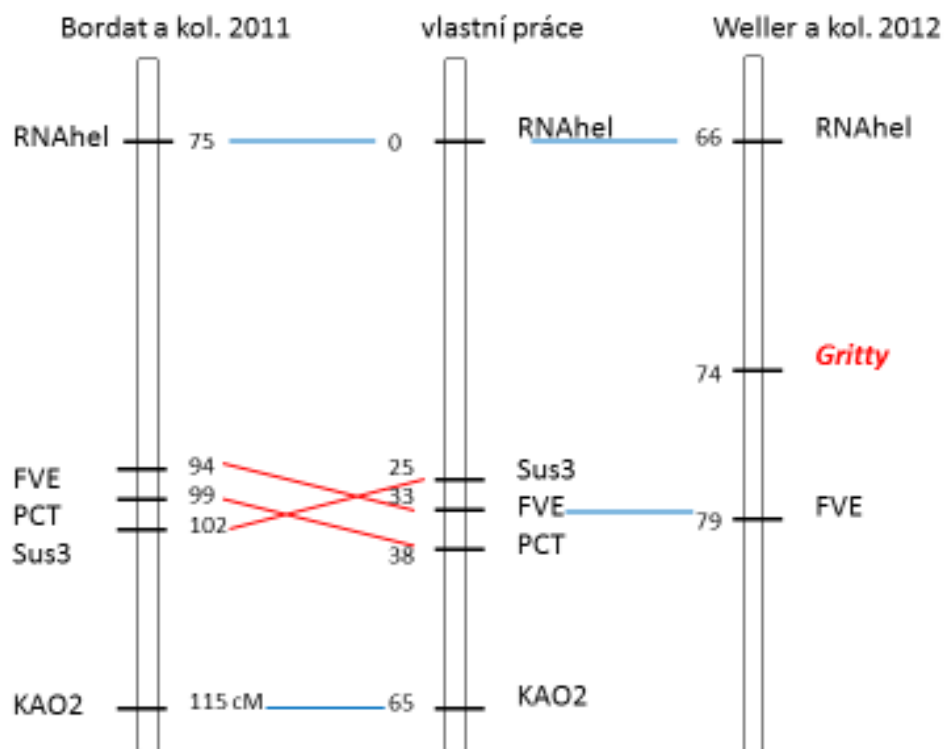
vzorky	test dormance	dormance	pigmentace	Laccase- <i>Alul</i>	UDPglyc- <i>Rsal</i>	PCT- <i>Rsal</i>	Sus3- <i>Msel</i>	FVE1250- <i>NlaIII</i>	KAO2- <i>Msel</i>	RNAhel- <i>Alul</i>
VIR320		A	A	A	A	A	A	A	A	A
WL1238		B	B	B	B	B	B	B	B	B
1	1/2	B	A	A	B	B	B	B	B	A
2	0/3	B	A	A	B	A	A	A	B	B
3	2/1	B	B	B	B	B	B	B	A	B
4	2/1	A	B	B	B	A	A	A	B	B
5	3/0	A	A	A	B	B	B	B	B	A
6	2/1	A	A	B	B	B	A	B	A	B
7	2/1	A	A	A	B	A	A	A	A	B
8	0/3	B	B	-	A	A	A	A	B	A
9	3/0	A	A	B	A	A	A	A	B	A
10	0/3	B	A	B	A	B	B	B	B	A
11	2/1	A	B	A	B	B	B	B	B	A
12	1/2	B	A	A	B	B	B	B	B	A
13	1/2	B	A	B	A	B	A	B	B	B
14	0/3	B	A	B	B	A	A	A	A	B
15	2/1	A	A	B	A	B	B	B	B	A

Legenda: A - VIR320, B - WL1238

Pomocí programu JoinMap byly spočítány rekombinační frekvence, které byly převedeny do mapových vzdáleností v cM (viz Obrázek 18).

Mapa odpovídá mapě sestrojené Wellerem a kol. (2012), ale s naší mapou má společné jen 2 markery, což není dostačující pro přesné určení. V mapě Bordata a kol. (2011) je konfliktní *Sus3* gen, který je v naší mapě před geny *FVE* a *PCT* a v mapě Bordat a kol. (2011) je až za nimi. V naší mapě je rekombinační vzdálenost markerů *RNAhel* a *Sus3* 25 cM, mezi *Sus3* a *FVE* 8 cM, mezi *FVE* a *PCT* 5 cM a mezi *PCT* a *KAO2* 27 cM (viz Obrázek 18).

Obrázek 18: Genetická mapa



## 6 DISKUZE

*Gritty* (*Gty*) lokus byl poprvé navržen jako lokus zodpovídající za dormanci semen hrachu, jednalo se o spojitost mezi drsnou strukturou povrchu semen planých forem hrachu (*Pisum sativum* subsp. *elatius* a subsp. *sativum*) a nepropustností osemení pro vodu. Námi použité RIL populace vyvrací tuto přímou spojitost vzhledem k absenci *Gritty* znaku, tj. drsnost povrchu osemení, u planého VIR320 rodiče. Znak dormantnosti je u rodiče VIR320 pozorovatelný, ale není přímo spojený ani s povrchem, ani s pigmentací osemení, neboť VIR320 představuje výjimku i v tomto směru, má šedavě-zelené osemení. Naopak druhý rodič WL1238 představující kulturní hrách setý, je svažštelosemenný (*rr*) typ zahradního hrachu s dalšími morfologickými markery (Bogdanova, 2012). Bohužel svažštelosemennost, jako důsledek blokace konverze cukrů ve škrob, je znak ovlivňující negativně hodnocení dormance, neboť během procesu vysychání semen vznikají mechanické pukliny usnadňující příjem vody. I když *Gritty* znak jako takový, tj. struktura povrchu osemení, není v genotypu VIR320 přítomen, je fenotyp dormance semen dobře reprodukovatelný. Vhodnější mapovací populace křížení JI64 (planá forma hrachu z Turecka) a JI92 (kulturní forma hrachu z Afgánistánu) byla v době práce ve stádiu F3:4 generaci, což je příliš brzy pro mapování vzhledem k vysokému podílu heterozygotních jedinců. Přesto jsou dosažené výsledky cenné a umožňují další mapování. V případě JI64 x JI92 populace se segregujícím *Gritty* znakem, je patrné, že tento znak segreguje nezávisle na dormanci semen.

Naše výsledky, tj. pořadí genů, odpovídají mapě Weller a kol. (2012), i když má s naší mapou společné jen 2 markery. V mapě Bordata a kol. (2011) je konfliktní *Sus3* gen, který je v naší mapě před geny *FVE* a *PCT* a v mapě Bordat a kol. (2011) je až za nimi. Naše mapa vzhledem k počtu použitých markerů i linií není zdaleka tak přesná jako mapy Bordat a kol. (2011) a Weller a kol. (2012). Pro mapování jsme použili jiné genotypy mapovací populace. Velikost použité RIL populace limituje rozlišovací schopnost, neboť její maximální teoretické rozlišení je na hranici 1 cM (1 rekombinant ze 100).

Fenotyp dormance byl testován na semenech z roku 2009/10, která byla poté uskladněna v pokojové teplotě. Mohlo však dojít k postupnému snížení dormance vzhledem ke skladování semen 4 - 5 let. Nyní čekáme na novou generaci semen pro opakování testování.

Do budoucna by bylo možné pokračovat v práci zmapováním celého genomu s pokrytím všech vazebných skupin pomocí metody DArTseq. V současnosti je k dispozici kolem 15 tisíc SNP sekvenčních markerů na každou linii. Důležitá je také co největší objektivizace hodnocení fenotypového projevu, tj. bobtnavosti a klíčení semen (jako míry stanovení dormance), s využitím anatomických a chemických analytických postupů.

## 7 ZÁVĚR

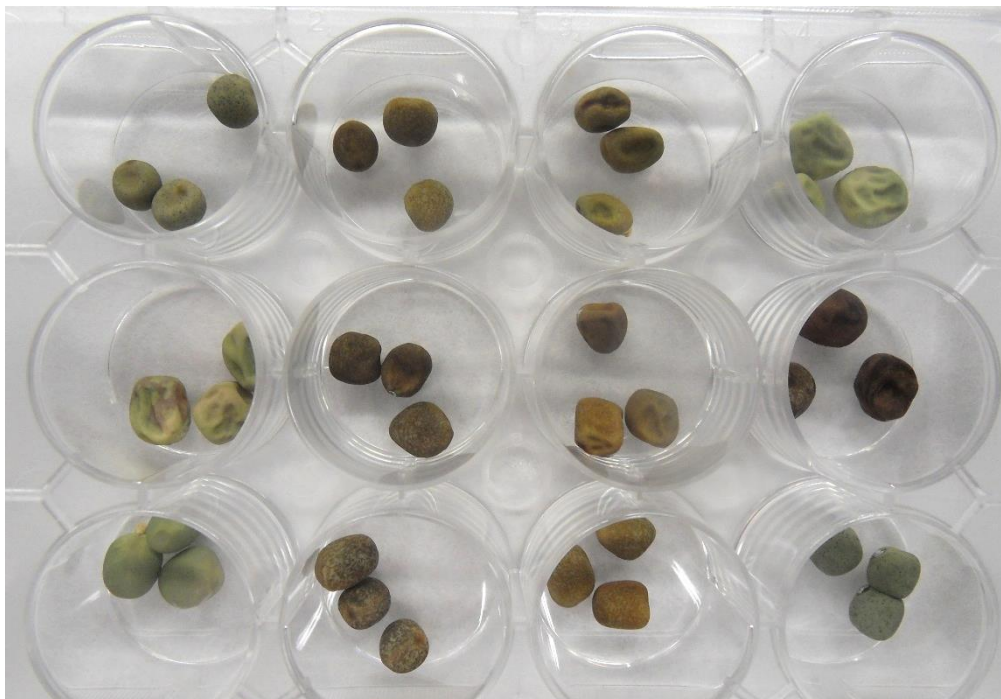
Naše genetická mapa odpovídá mapě Bordat a kol. (2011) pro pořadí genů v oblasti *Gritty* lokusu. Nově mapované vybrané kandidátní lokusy UDPglyc a Laccase se však v daném intervalu nenacházejí. Práce přispěla k přesnějšímu vymezení *Gritty* lokusu a jeho vztahu k fenotypu dormance semen hrachu.

Výsledky práce nepotvrdily hypotézu, že struktura povrchu osemení má souvislost s dormancí semene. Na základě práce kolegů z katedry analytické chemie PřF UP však víme, že pigmentace semen (resp. přítomnost vybraných typů fenolických látek) má nějakou souvislost s dormancí semen. Pokračuje se se zjištěním složení a množství fenolických látek v osemení, který má velký význam jak při tvrdosemennosti a nepropustnosti osemení pro vodu, tak při sledování obsahu fenolických látek u více či méně pigmentovaných semen. Genetické studium je také kombinováno s anatomickou analýzou osemení jak kontrastních rodičovských genotypů, tak RIL linií.

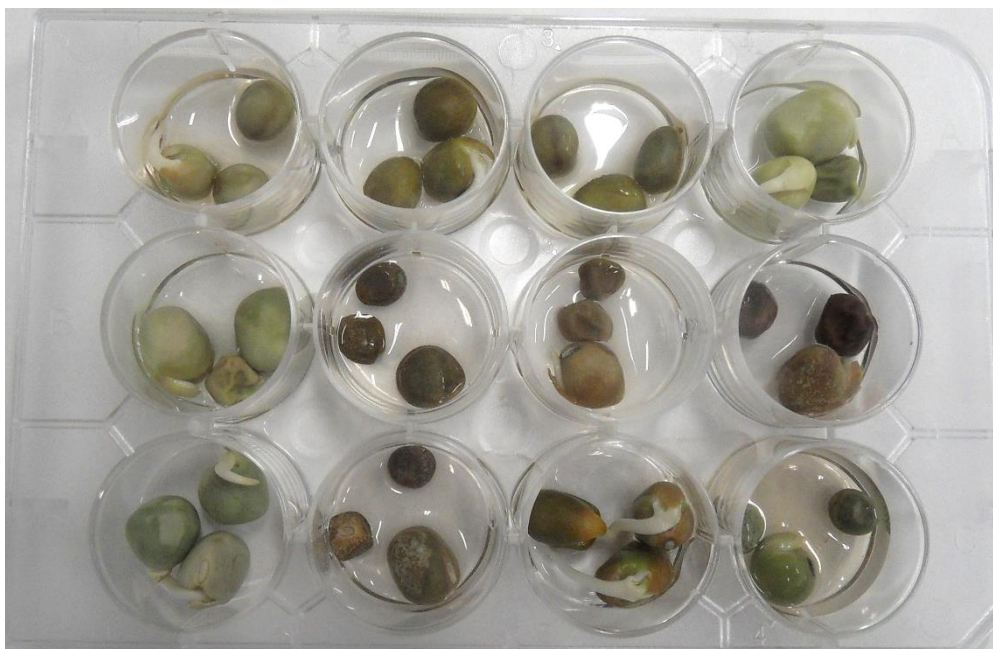
Pro další mapování znaku dormance semen bude vhodnější použít mapovací populaci křížení JI64 (planá forma hrachu) a JI92 (kulturní forma hrachu), kteří jsou typickými představiteli plané a kulturní formy.

## 8 PŘÍLOHA

Příloha 1a: Testování dormance semen RIL populace před začátkem testování



Příloha 1b: Testování dormance semen RIL populace po 3 dnech





## 9 SEZNAM ZKRATEK

ABA – abscisová kyselina

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CAPS – Cleavage Amplified Polymorphic Sequences

cv. – convariety

DArTseq – Diversity Arrays Technology

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxyribonukleotid trifosfát

EST – Expressed Sequence Tag

FISH – Fluorescent In Situ Hybridisation

GA – giberelin

*Gty* – *Gritty*

L. – Carl Linné

NGS – Next Generation Sequencing

PA - proantokyanidiny

PCR – Polymerase chain reaction

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

RIL – rekombinantní inbrední linie

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

SSR – Simple Sequence Repeat

*subsp.* (= *ssp.*) - *subspecies*

## 10 LITERATURA

- Abbo, S., Lev-Yadun, S., Gopher, A. (2012): Plant domestication crop evolution in the Near East: on events processes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31: 241-257.
- Abbo, S., Pinhasi van-Oss, R., Gopher, A., Saranga, Y., Ofner, I., Peleg, Z. (2014): Plant domestication versus crop evolution: a conceptual framework for cereals grain legumes. *Trends Plant Sci.* in press. doi.org/10.1016/j.tplants.2013.12.002.
- Aubert, G., Morin, J., Jacquin, F., Loridon, K., Quillet, M. C., Petit, A., Rameau, C., Lejeune-Hénaut, I., Huguet, T., Burstin, J. (2006): Functional mapping in pea, as an aid to the cidate gene selection for investigating synteny with the model legume. *Medicago truncatula. Theor. Appl. Genet.* 112: 1024-1041.
- Baskin, J. M. Baskin, C. C. (1985): The annual dormancy cycle in buried weed seeds: a continuum. *BioScience* 35: 492-498.
- Baskin, C. C., Baskin, J. M., Li, X. (2000): Taxonomy, anatomy evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Spec. Biol.* 15: 139-152.
- Baudry, A., Heim, M. A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B., Lepiniec, L. (2004): TT2, TT8, TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 39: 366-380.
- Bevilacqua, L. R., Fossati, F., Dondero G. (1987): 'Callose' in the impermeable seed coat of *Sesbania punicea*. *Ann. Botany* 59: 335-341.
- Bewley, J. D., Bradford, K., Hilhorst, H., Nonogaki, H. (2013): *Seeds: Physiology of Development, Germination Dormancy*, 3rd edition.
- Bhalla, P. L., Slattery, H. D. (1984): Callose Deposits Make Clover Seeds Impermeable to Water. *Ann. Botany* 53: 125-128.
- Blixt, S. (1972): Mutation genetics in *Pisum*. *Agric. Hort. Genet.* 30: 1-293.
- 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. Theor Appl Genet* 118: 801-809
- Bordat, A., Savoie, V., Nicolas, M., Salse, J., Chauveau, A., Bourgeois, M., Potier, J., Houtin, H., Rond, C., Murat, F. (2011): Translational genomics in legumes allowed placing in silico 5460 unigenes on the pea functional map identified cidate genes in *Pisum sativum* L. G3. *Genes-Genomes-Genetics* 2: 93-103.

- Bradford, K., Nonogaki, H. (2009): Annual Plant Reviews, Volume 27, Seed Development, Dormancy Germination.
- Clarkson, D. T., Robards, K. (1975): The endodermis, its structural development physiological role. In: Structure function of roots. Torrey, J. G., Clarkson, D. T. (eds) London, Academic Press: 415-436.
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K. M., Koornneef, M. (2000): Influence of the testa on seed dormancy, germination, longevity in *Arabidopsis*. PlantPhysiol. 122: 403-414. doi:10.1104/pp.122.2.403.
- Deulvot, C., Charrel, H., Marty, A., Jacquin, F., Donnadiou, C., Lejeune-Hénaut, I., Burstin, J., Aubert, G. (2010): Highly-multiplexed SNP genotyping for genetic mapping germplasm diversity studies in pea. BMC Genomics 11, doi:10.1186/1471-2164-11-468.
- Dixon, R. A., Xie, D. Y., Sharma, S. B. (2005): Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? New Phytol. 165: 9-28.
- Dueñas, M., Sun, B., Hernández, T., Estrella, I., Spranger, M. I. (2003): Proanthocyanidin Composition in the Seed Coat of Lentils (*Lens culinaris* L.). J Agr Food Chem, 51: 7999-8004.
- Finch-Savage, W. E., Leubner-Metzger, G. (2006): Seed dormancy the control of germination. New Phytol. 171: 501-523.
- Gijzen, M., Miller, S. S., Kuflu, K., Buzzell, R. I., Miki, B. L. (1999): Hydrophobic protein synthesized in the pod endocarp adheres to the seed surface. Plant Physiol. 120: 951-960.
- Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G., Soppe, W. J. J. (2012): Molecular mechanisms of seed dormancy. Pl. Cell Environ. 35: 1769-1786.
- Güneş, F. (2013): Seed characteristics testa textures of *Pratensis*, *Orobon*, *Lathyrus*, *Orobastrum* *Cicercula* sections from *Lathyrus* (*Fabaceae*) in Turkey. Plant. Syst. Evol. 299: 1935-1953.
- Hamly, D. H. (1932): Softening of the seeds of *Melilotus alba*. Bot. Gaz. 93: 345-375.
- Hamly, D. H. (1935): The light line in *Melilotus alba*. Bot. Gaz. 96: 753-757.
- Hammer, K. (1984): Das Domestikations syndrom. Kulturpflanze 11: 11-34.
- Hancock, J. F. (2012): Plant Evolution Origin of Species. 3rd edition. CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Hanley, M. E., Fenner, M. (1998): Pre-germination temperature the survivorship onward growth of Mediterranean fire-following plant species. Acta Oecol. 19: 181-187.

- Hardham, A. R. (1976): Structural aspects of pathways of nutrient flow to developing embryo cotyledons of *Pisum sativum* L. Aust. J. Botany 24: 711-721.
- Harlan, J. R. (1992): Crops Man, second edition American Society of Agronomy Crop Science Society of America, Madison, WI USA, 284.
- Harper, J. L. (1957): The ecological significance of dormancy its importance in weed control. Proceedings of the IVth International Congress of Crop Protection: 415- 420.
- Harris, W. M. (1983): On the development of macrosclereids in seed coats of *Pisum sativum* L. Amer. J. Botany 70: 1528-1535.
- Hecht, V., Foucher, F., Ferrándiz, C., Macknight, R., Navarro, C., Morin, J., Vardy, M. E., Ellis, N., Beltrán, J. P., Rameau, C., Weller, J. L. (2005): Conservation of *Arabidopsis* flowering genes in model legumes. Plant Physiol. 137: 1420-1434.
- Lamprecht, H. (1948): The variation of linkage and the course of crossing-over. Agric. Hort. Genet. 0: 10-48.
- Lamprecht, H. (1961): Uber die verschiedene Struktur von Chromosom V von *Pisum* sowie Allgemeines zum genanalytischen und zytologixhen Nachweis verschiedener Strukturtypen. Agric. Hort. Genet. 19: 245-244.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., Caboche, M. (2006): Genetics biochemistry of seed flavonoids. Ann. Rev. Plant Biol. 57: 405-430.
- Ma, F., Cholewa, E., Mohamed, T., Peterson, C. A., Gijzen, M. (2004): Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. Ann. Botany 94: 213-228.
- Maas, B. L. (2005): Changes in seed morphology, dormancy germination from wild to cultivated hyacinth bean germplasm (*Lablab purpureus*: *Papilionoideae*) Genetic Resources Crop Evolution 53: 1127-1135.
- Matilla, A., Gallardo, M., Puga-Hermida, M. I. (2005): Structural, physiological molecular aspects of heterogeneity in seeds: a review. Seed Sci. Res. 15: 63-76.
- Miller, S. S., Jin, Z., Schnell, J. A., Romero, M. C., Brown, D. C. W., Johnson, D. A. (2010): Hourglass cell development in the soybean seed coat. Ann. Botany 106: 235-242.
- Nikolaeva, M. G. (1969): Physiology of deep dormancy in seeds. Izdatel'stvo Nauka. Leningrad. (Translated from Russian by Z. Shapiro, NSF, Washington, DC.).
- Nikolaeva, M. G. (1977): Factors controlling the seed dormancy pattern. 51-74. In: Khan, A. A. (ed.). The physiology biochemistry of seed dormancy germination. North-Holl Publ. Co., Amsterdam.

- Offler, C. E., J. W. Patrick (1984): Cellular structures, plasma-membrane surface-areas plasmodesmatal frequencies of seed coats of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to photosynthate transfer. *Aus. J. Plant Physiol.* 11: 79-99.
- Offler, C. E., Nerlich, S. M., Patrick, J. W. (1989): Pathway of photosynthate transfer in the developing seed of *Vicia faba* L. Transfer in relation to seed anatomy. *J. Exp. Bot.* 40: 769-780.
- Plitmann, U., Kislev, M. E. (1989): Reproductive changes induced by domestication. In: Stirton, C. H., Zarucchi, J. L. (eds). *Advances in Legume Biology*, Missouri Bot. Gard 29: 487-503.
- Probert, R. J. (2000): The role of temperature in the regulation of seed dormancy germination. In: Fenner, M. (eds.), *Seeds. The ecology of regeneration in plant communities*. 2nd edition. CABI publishing: 261-292.
- Quinlivan, B. J. (1971): Seed coat impermeability in legumes. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 37: 283-295.
- Riggio Bevilacqua, L., Roti-Mihelozzi, G., Modenesi, P. (1989): The watertight dormancy of *Melilotus alba* seeds: further observations on the palisade cell wall. *Can. J. Botany* 67: 3453-3456. *Botan. Nederl.* 35: 475-487.
- Shao, S., Meyer, C. J., Ma, F., Peterson, C. A., Bernards, M. A. (2007): The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition function during imbibition. *J. Exp. Botany* 58: 1071-1082.
- Smýkal, P. (2009): Domestikace rostlin z pohledu současné genetiky. *ŽIVA* 1.
- Smýkal, P. (2009): Jak si člověk „uchočil“ rostliny. 21. století.
- Smýkal, P., Kenicer, G., Flavell, A. J., Corer, J., Kosterin, O., Redden, R. J., Ford, R., Coyne, C. J., Maxted, N., Ambrose, M. J., Ellis, T. H. N. (2011): Phylogeny, phylogeography genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genet Res* 9: 4 - 18.
- Smýkal, P. (2011): Fylogeneze a diverzita hrachu. *ŽIVA* 4.
- Smýkal, P., Aubert, G., Burstin, J., Coyne, C. J., Ellis, N. T. H., Flavell, A. J., Ford, R., Hýbl, M., Macas, J., Neumann, P., McPhee, K. E., Redden, R. J., Rubiales, D., Weller, J. L., a Warkentin, T. D. (2012): Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era. *Agronomy* 2: 74-115. doi:10.3390/agronomy2020074.
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J. (2014): Legume crops phylogeny genetic diversity for science breeding. *Critic.Rev. Plant Sci.* doi:10.1080/07352689.2014.897904.

- Smýkal, P., Vernoud, V., Blair, M. W., Soukup, A., Thompson, R. D. (2014): The role of the testa during development in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-14.
- Spurný, M. (1963): Cell wall structure of epidermal cells of the pea seed coat (*Pisum sativum* L.) studied by microcinematography. *Mikroskopie* 18: 272-279.
- Stam, P. (1993): Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *The Plant Journal* 3: 739-744.
- Thorne, J. H. (1981): Morphology ultrastructure of maternal seed tissues of soybean in relation to the import of photosynthate. *Plant Physiol.* 67: 1016-1025.
- Van Dongen, J. T., Ammerlaan, A. M., Wouterlood, M., Van Aelst, A. C., Borstlap, A. C. (2003): Structure of the developing pea seed coat the post-pholem transport pathway of nutrients. *Ann. Botany* 93: 729-737.
- Vavilov, N. I. (1926): Studies on the Origin of Cultivated Plants. *Bull. of Applied Botany* 16.
- Vazquez-Yanes, C., Oronzo-Segovia, A. (1982): Seed germination of tropical rain forest pioneer tree (*Heliocarpus donnell-smithii*) in response to diurnal fluctuation in temperature. *Physiol. Plant.* 56: 295-298.
- Vleeshouwers, L. M., Bouwmeester, H. J., Karssen, C. M. (1995): Redefining seed dormancy: An attempt to integrate physiology ecology. *J. Ecol.* 83: 1031-1037.
- Weeden, N. F. (2007): Genetic Changes Accompanying the Domestication of *Pisum sativum*: Is there a Common Genetic Basis to the 'Domestication Syndrome' for Legumes? *Ann. Botany* 100: 1017-1025.
- Weeden, N. F. (1985): Inheritance, organization mapping of rbcS cab multigene families in Pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 5083-7000.
- Weller, J. L., Liwa, L. C., Hechta, V. F. G., Rajandran, V., Laurieb, R. E., Ridgea, S., Wendenc, B., Schoora, J. K. V., Jaminond, O., Blassiaue, C., Dalmaisf, M., Rameauc, C., Bendahmanef, A., Macknightb, R. C., Lejeune-Hénautd, I. (2012): A conserved molecular basis for photoperiod adaptation in two temperate legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109: 21158-21163.
- White, J. (1908): The occurrence of an impermeable cuticle on the exterior of certain seeds. *Proc. Royal Soc. Victoria* 21: 203-210.
- Winkel-Shirley, B. (2001): Flavonoid Biosynthesis. A colourful model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, Biotechnology. *Plant Physiol.* 126: 485-493.

Yaklich, R. W., Vigil, E. L., Wergin, W. P. (1986): Pore development seed coat permeability in soybean. *Crop Sci.* 26: 616-624.

Zhao, J., Pang, Y., Dixon, R. A. (2010): The mysteries of proanthocyanidin transport polymerization. *Plant Physiol.* 153: 437-443.

Zhou, S., Sekizaki, H., Yang, Z., Sawa, S., Pan J. (2010): Phenolics in the seed coat of wild soybean (*Glycine soja*) their significance for seed hardness seed germination. *J. Agric. Food Chem.* 58: 10972-10978.

Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E. (2012): *Domestication of plants in the Old World*, Oxford University Press: Oxford, UK, 4th edition.

Internetové zdroje:

<http://pixgood.com/bottleneck-effect-definition.html>

<http://oregonstate.edu/instruct/css/330/two/>