

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2017

VERONIKA SEDLÁKOVÁ



**Molekulární fylogeneze a genetická diverzita nejbližších
příbuzných rodu *Pisum***
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
doc. Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

Vypracovala:
Veronika Sedláková

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci „Molekulární fylogeneze a genetická diverzita nejbližších příbuzných rodu *Pisum*“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše

V Brně dne:.....

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Tomáši Vyhnánkovi, Ph.D. za veškerou pomoc a rady při sepisování práce a také za pomoc při vyhodnocování a zpracování získaných výsledků. Velké poděkování také patří mému konzultantovi Ing. Pavlu Hanáčkovi, Ph.D. za odborné vedení při praktické části, ochotu a poskytnuté rady. Další poděkování patří doc. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za poskytnutí rostlinného materiálu pro práci a za cenné rady.

ABSTRAKT

Molekulární fylogeneze a genetická diverzita nejbližších příbuzných rodu *Pisum*

Tématem této práce bylo studium genetické diverzity a fylogeneze vybraného planého druhu *Lathyrus neurolobus* Boiss. & Heldr., který je příbuzný kulturnímu hrachu setému, pomocí moderních metod molekulární fylogenetiky. Z genotypů *L. neurolobus* získaných z Katedry botaniky PřF UP v Olomouci byla izolovaná genomická DNA a vzorky byly podrobeny analýze pomocí SSR a iPBS markerů. Bylo zjištěno, že pro posouzení genetické diverzity je vhodná metoda iPBS markerů, kde je průměrná hodnota polymorfního informačního obsahu velmi vysoká (PIC=0,928). Podle vyhodnoceného polymorfismu markerů a vytvořených dendrogramů bylo zjištěno, že pro hledání souvislostí mezi místem původu a umístěním v dendrogramu, bude vhodná metoda SSR markerů, ale jen v případě výběru informativních markerů. Také byla potvrzena přenosnost SSR markerů navržených pro hrách do planého druhu z jiného rodu.

Klíčová slova: fylogenetika, *Fabeae*, *Lathyrus neurolobus*, SSR, iPBS

ABSTRACT

Molecular phylogeny and genetic diversity of the genus *Pisum* closest relatives

The topic of this work was studied genetic diversity and phylogeny of selected wild species *Lathyrus neurolobus* Boiss. & Heldr., which is closely related to cultivated pea, using modern methods of molecular phylogenetics. Genotypes of *L. neurolobus* were obtained from Department of Botany at Palacký University in Olomouc, genomic DNA was isolated of these genotypes and samples were subjected to analysis using SSR and iPBS markers. It was found that for assessment of genetic diversity is suitable method of iPBS markers, where the average value of polymorphic information content is very high (PIC=0,928). According to evaluated markers polymorphism and assembled dendrograms was found that for search of relationship between place of origin and placement in dendrogram, will be appropriate the method of SSR markers, but only in case of selection informative markers. There was also confirmed transferability of SSR markers designed for pea to wild species of another genus.

Key words: phylogenetics, *Fabeae*, *Lathyrus neurolobus*, SSR, iPBS

Obsah

1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
3.1 Čeleď <i>Fabaceae</i> Lindl.	10
3.1.1 Rod <i>Pisum</i>	11
3.1.2 Rod <i>Vicia</i>	11
3.1.3 Rod <i>Lathyrus</i>	11
3.1.4 <i>Lathyrus neurolobus</i> Boiss. & Heldr.	12
3.2 Genetická diverzita.....	14
3.2.1 Genetická diverzita <i>Fabaceae</i>	15
3.2.2 Genetická diverzita genofondových kolekcí rodu <i>Pisum</i>	15
3.3 Fylogenetika.....	16
3.4 Molekulární fylogenetika	17
3.4.1 Metody molekulární fylogenetiky.....	17
3.4.2 Molekulární fylogenetika čeledi <i>Fabaceae</i>	20
4 MATERIÁL A METODIKA	25
4.1 Použitý materiál	25
4.2 Metodika molekulárních analýz.....	25
4.2.1 Izolace DNA.....	25
4.2.2 SSR analýza	25
4.2.3 iPBS analýza	26
4.2.4 Příprava gelů a elektroforéza	27
4.2.5 Vyhodnocování výsledků.....	29
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	30
5.1 Izolovaná DNA	30
5.2 Vyhodnocení analýzy SSR markerů	30

5.3 Vyhodnocení iPBS analýzy.....	33
5.4 Posouzení genetické variability dosažené jednotlivými metodami	36
6 ZÁVĚR	40
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
SEZNAM OBRÁZKŮ	48
SEZNAM TABULEK.....	48
SEZNAM ZKRATEK.....	49

1 ÚVOD

Do velmi rozmanité čeledi bobovité (*Fabaceae* Lindl.) patří skupina plodin, označované jako luštěniny či luskoviny, patřící do tribu *Fabeae* Rchb. Tribus *Fabeae* zahrnuje 5 nejdůležitějších rodů pro výživu člověka i zvířat, jako významný zdroj bílkovin.

Přeměna planých forem na kulturní souvisí s centry původu kulturních rostlin, která byla poprvé definována ruským botanikem N. I Vavilovem a zahrnují oblasti Blízkého východu, Afriky, Střední Ameriky, jižní a jihovýchodní Asie a Čínu (Smýkal, 2009). Pro poznání původu plodin a diverzifikaci jsou třeba fylogenetické analýzy pro rekonstrukci vztahů mezi druhy. Hrách setý je považován za jednu z nejstarších kulturních plodin, jeho pěstování začalo před deseti tisíci lety a během let tato plodina prošla domestikacím procesem a došlo k mnoha změnám. Tato plodina je také známá jako modelová rostlina, na které Gregor Mendel popsal základy dědičnosti. Některé dnes pěstované a využívané druhy vikví a hrachorů byly domestikovány později a původně se vyskytovaly jako plevelné nebo doprovodné druhy dříve domestikovaných plodin (Smýkal, 2009).

Pro studium genetické diverzity se používají DNA markery, např. mikrosatelitní nebo retrotranspozonové, kdy se sleduje variabilita v sekvencích DNA. Mikrosatelitní, SSR markery, jsou velmi oblíbené díky své velké variabilitě a kodominantnímu charakteru. Jsou také velmi efektivní pro studium planých druhů rostlin. Retrotranspozonové markery mají dominantní charakter a metoda iPBS je univerzálně použitelná pro rostlinnou i živočišnou říši. Retrotranspozonové markery jsou obecně považované za velmi výkonné ve fylogenetických analýzách.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo vypracování literární rešerše na téma genetická diverzita, domestikace, fylogeografie a molekulární fylogeneze čeledi *Fabaceae* s důrazem na rody *Pisum*, *Vicia* a *Lathyrus*. Dále byly popsány některé metody využívané molekulární fylogenetikou.

V praktické části byla izolovaná genomická DNA druhu *Lathyrus neurolobus* Boiss. & Heldr., jednoho z nejbližších příbuzných druhu *Pisum sativum* L. S použitím metod SSR a iPBS markerů, založených na polymorfismu DNA, byla testována genetická diverzita a fylogenetické vztahy *L. neurolobus*.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Čeleď *Fabaceae* Lindl.

Jedná se o třetí nejpočetnější čeleď, s 800 rody a asi 20 000 druhy (Lewis a kol., 2005; Smýkal a kol., 2015), někdy označovanou jako motýlokvěté (*Papilionaceae*) nebo vikvovité (*Viciaceae*), která patří do řádu bobotvaré (Fabales). Zástupci této rozmanité čeledi mohou být dřeviny, keře a jednoleté i vytrvalé byliny. Rozšířeny jsou téměř po celém světě, v tropech a subtropích převládají dřeviny, v mírných pásech byliny. Listy jsou střídavé, palistnaté, většinou složené, často zakončené úponkem nebo hrotem. Květy nejčastěji v hroznovitých květenstvích nebo jednotlivě, jsou souměrné a oboupohlavné. Tyčinky jsou volné nebo srostlé, dvoubratré nebo jednobratré. Korunní lístky se označují jako pavéza, 2 křídla a člunek vzniklý srůstem dvou lístků. Plodem je lusk, který puká 2 chlopněmi nebo se otevírá víčkem, případně je nepukavý (analogie nažky) nebo poltivý (analogie struku) (Novák a Skalický, 2012).

Do čeledi *Fabaceae* zařazujeme užší skupinu asi 380 druhů luskovin/luštěnin spadající pod tribus *Fabeae* Rchb., jedná se o některé z nejstarších a nejdůležitějších plodin. Tribus *Fabeae* má celosvětovou distribuci: z pěti rodů v tribu, jsou *Vicia* L. (216 druhů) a *Lathyrus* L. (150 druhů) nejrozmanitější ve Východním Středomoří, ale postupně se rozšířili po celé Evropě a oba mají své zástupce i v Asii, severní až tropické Africe a Severní a Jižní Americe. Rod *Vicia* také kolonizoval Havaj a středoatlantské souostroví Kanáry, Madeiru a Azory. Zbývající tři rody jsou malé a většinou lokální pro určité místo: *Lens* Mill. (4–8 druhů) a *Pisum* L. (2 druhy a několik poddruhů) jsou nejrozmanitější v oblasti Východního Středomoří; rod *Vavilovia* Al.Fed. s jedním zástupcem. Zástupci *Fabeae* byly zavlečeny do Austrálie a Polynésie evropskými osadníky (Schaefer a kol., 2012).

Druhy skupiny luskovin/luštěnin se dále rozlišují na poddruhy, pěstitelské formy a odrůdy. Počet kulturních druhů s významnějším podílem na světové produkci je ale malý. Za nejdůležitější se považuje hrách, bob, fazol, sója, čočka a vikev. Největší využití mají v potravinářství a krmivářství, kde jsou předmětem zájmu semena nebo zelená hmota v čerstvém nebo konzervovaném stavu. Jsou významným zdrojem bílkovin. Další vlastností luskovin je pěstitelská hodnota, která pomáhá udržovat půdní úrodnost a zlepšovat fyzikální vlastnosti půdy. Pozitivní je zejména schopnost symbiózy s hlízkovými bakteriemi z rodu *Rhizobium*, které mají schopnost přijímat vzdušný dusík

a přeměňovat je na dusičnany nebo amoniak, které jsou využitelné pro hostitelskou rostlinu (Houba a kol., 2009). *Fabaceae* jsou pěstovány na 12–15 % obdělávatelné půdy na světě a představují asi 27 % světově primární produkce plodin (Graham a Vance, 2003; Schaefer a kol., 2012).

3.1.1 Rod *Pisum*

Jedná se o velmi různorodý rod, jehož přesné rozdělení na plané a kulturní druhy je nejasné. Do rodu hrách patří jednoleté byliny s typicky poléhavou, vystoupavou nebo popínavou lodyhou. Listy jsou sudozpeřené a zakončené úponkem, velké palisty. Květy jsou buď jednotlivé, nebo v hroznech. Plodem jsou mnohosemenné lusky, které se otevírají v obou švech. Opylení je entomogamické (Slavík, 1995). Druhy rodu hrách mají diploidní počet chromozomů 14.

Hrách (*Pisum sativum* L.) je jedním z nejstarších domestikovaných plodin a nejrozšířenější luštěnina. K domestikaci došlo asi před 10 000 lety (Ambrose, 1995; Zohary a Hopf, 2000; Smýkal a kol., 2011) a staletí selekce a šlechtění vyústily v tisíce odrůd hrachu (Smýkal, 2011).

3.1.2 Rod *Vicia*

Druhy rodu vikve jsou nejčastěji jednoleté nebo vytrvalé, přímé, poléhavé, popínavé nebo vystoupavé byliny s úponky. Nicméně, hlavní domestikovaný druh *Vicia faba* L. nevykazuje popínavost a postrádá úponky. Pestrobarevné květy jsou v hroznech, každý může nést 1–40 jednotlivých květů. Květy vytváří nektar a nejčastějšími opylovači jsou včely. Plodem jsou neopadavé, suché lusky otevírající se oběma švy. Obsahují 2–8 semen. Většina druhů vikve má diploidní počet chromozomů 14. Využití vikví v zemědělství je omezeno, kvůli přítomnosti toxinů (př. lektin). Pro lidskou výživu je dnes pěstována *Vicia faba*. I přes dlouhou historii selekce na nízký obsah toxinů, tento druh způsobuje favismus (Bryant a Hughes, 2011).

3.1.3 Rod *Lathyrus*

Díky počtu přibližně 160 druhů lze očekávat teoreticky velkou genetickou diverzitu rodu hrachor (Gurung a Pang, 2011). Druhy rodu hrachor jsou jednoleté nebo vytrvalé byliny. Podle morfologických znaků lze rod rozdělit do 13 sekcí (Kupicha, 1983; Gurung a Pang, 2011). Nejčastěji s plazivou, vystoupavou až přímou nebo popínavou lo-

dyhou. Listy jsou sudozpeřené, někdy zakončené úponkem nebo hrotem. Květenství v úžlabních hroznech, často redukované na jeden květ. Opylování je entomogamické. Plodem jsou neopadavé lusky, které se otevírají v obou švech a nemají přepážku (Slavík, 1995). Všechny jednoleté druhy a většina vytrvalých má diploidní počet chromozomů 14, v rodě se nachází i několik polyploidních druhů (Gurung a Pang, 2011). Mnoho druhů rodu *Lathyrus* se používá jako krycí plodiny, krmivo (*Lathyrus cicera* L.), jako okrasné rostliny (*L. odoratus* L.), potrava (*L. sativus* L.) nebo jako hnojivo. V některých druzích jsou přítomny toxiny, které způsobují lathyrismus (Oskoueiyana a kol., 2014).

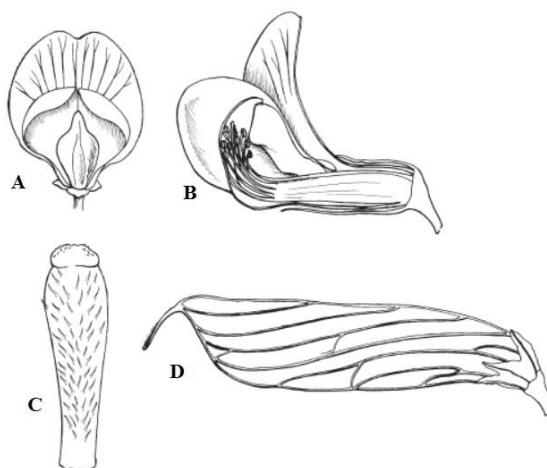
3.1.4 *Lathyrus neurolobus* Boiss. & Heldr.

Tato drobná vytrvalá rostlina (Obr. 1) patří mezi krétské endemity a je zajímavá pro svou jedinečnou pozici v rodu, z hlediska geografického i taxonomického (Kupicha, 1983; Kenicer a Norton, 2008). Tento druh je endemitem, který se nachází v západní části Kréty nejčastěji ve vlhkých lesích v okolí potoků, na okrajích říček a v rašeliništích na krytých severně orientovaných stanovištích v údolí Fásas. Geografická izolace druhu se odráží v morfologii rostliny, která se liší od všech ostatních Euroasijských druhů v rodu (Kenicer a Norton, 2008).

Samosprašná bylina s větším počtem křídlatých zelených stonků do výšky 50 cm. Jeden pár přisedlých nebo řapíkatých listů zakončený jednoduchým nebo několikavětveným úponkem. Lístky jsou oválné, paralelně žilkované se síťovanou žilnatinou. Palisty jsou pološípovité. Květenství se skládá z jednoho nebo dvou květů na úžlabí. Květy jsou 6–9 mm dlouhé (Obr. 2). Kalich je zvonkovitý, zelený s nádechem fialové, na vnitřním povrchu jsou trichomy. Koruna je modro-fialová s tmavšími žilkami. Lusk se silnou žilnatinou má hnědou barvu a obsahuje 4–8 semen (Kenicer a Norton, 2008). *L. neurolobus* kvete od května do června a jako hemikryprofyt má obnovovací pupeny při povrchu země (Bergmeier a Abrahamczyk, 2007).



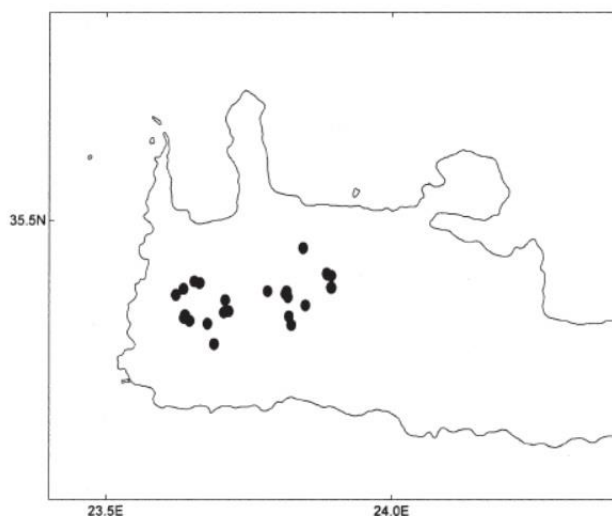
Obr. 1 – *Lathyrus neurolobus* (Kenicer a Norton, 2008)



Obr. 2 – Morfologie květu *L. neurolobus*. A – květ, B – řez květem, C – vrchol
čnělky, D – lusk (upraveno dle Kenicer a Norton, 2008)

L. neurolobus má omezený výskyt na ploše asi 30 km, na západním a severozápadním úbočí pohoří Lefka Ori, v současné době i v širším okolí oblasti Elos (Obr. 3). Vyskytuje se v křemičitých fylit-křemencových oblastech. Tato oblast je poměrně bohatá

na povrchové vody, protože na břidlicových půdách srážky nepronikají tak rychle do země. Roste v rozmezí výšek od 160–800 m (Bergmeier a Abrahamczyk, 2007).



Obr. 3 – Rozšíření *L. neurolobus* v západní části Kréty (Bergmeier a Abrahamczyk, 2007)

3.2 Genetická diverzita

Z přibližně 215 tisíc druhů rostlin na Zemi patří pouze 7 tisíc mezi kulturní rostliny, označované jako plodiny. Více než 95 % lidské výživy je závislé na 30 hlavních plodinách. Zemědělství začalo asi na deseti různých místech na Zemi, ale nejlepší podmínky pro pěstování a šlechtění poskytl Euroasijský kontinent. Mezi centra původu plodin podle Vavilova patří zejména podhůří Himalájí, Hindúkuše, Blízkého východu, Balkánu, Apenin a And, které se vyznačují často se měnícími velmi různorodými podmínkami prostředí. Pro horské polohy jsou typické výkyvy teplot a silné ultrafialové záření, což umožnilo vznik mutací. Každý druh je adaptován na své naleziště, ale uvnitř druhů existují i jemnější a citlivější stupně adaptace populací na menší rozdíly mezi podobnými lokalitami. Těmto adaptovaným populacím uvnitř druhu se říká ekotypy. V posledních dvou až třech tisíci letech dochází k nárůstu lidské populace a rychlým změnám přírodního prostředí, a tudíž se některé druhy nestačí adaptovat a vymizí (Chloupek, 2008).

Postupná přeměna planých forem na kulturní, nazývaná jako proces domestikace, se odehrála na různých místech a u všech hlavních plodin byla dovršena přibližně před 4 tisíci lety (Smýkal, 2009). Tento proces přinesl mezi plodiny mnoho vlastností, jako

např. zvýšení počtu semen, hromadné klíčení semen, současné zrání všech rostlin i všech plodenství na rostlině, nerozpadavost klasů, nepukání lusků, zvětšení některých orgánů, zesílení některých pletiv, zlepšení fertility a klíčivosti, zkrácení dormance, neúměrné zvětšení zásobních orgánů, nadměrné zvýšení obsahu zásobních látek, eliminace toxických a inhibujících látek, eliminace trnů a chlupů aj. Důležitými faktory domestikace jsou introgrese, tj. vnesení a exprese genů určitého druhu do genomu jiného a genetický drift, tj. náhodné změny v četnosti alel určité populace (Chloupek, 2008). Prvotní zemědělci využívali pro následující generace většinou malý počet vybraných jedinců a v důsledku toho mají dnes pěstované plodiny malou genetickou diverzitu. Mnoho genetického potenciálu nebylo využito nebo se vytratilo. Proces redukce diverzity, spojený s malou velikostí populace a působením genetického driftu, byl pojmenován jako tzv. efekt hrdla láhve, jehož síla závisí na velikosti populací během procesu domestikace a době působení (Smýkal, 2009).

Genetická diverzita může být posuzována na úrovni genových rezerv (gene-pool), populací, individuí, genomu, lokusu nebo sekvence DNA (Krestovich a McFerson, 1992; Chloupek, 2008). Plané druhy představují zdroj genů pro rezistence k chorobám a škůdcům i pro tolerance k nepříznivým růstovým podmínkám (Chloupek, 2008). Cesta přenosu genů zájmu se provádí klasickým šlechtěním, tj. křížením vhodných rodičů a výběr nejlepších potomků, jinou cestou jsou v současné době genové manipulace (Smýkal, 2009).

3.2.1 Genetická diverzita *Fabaceae*

Do čeledi bobovité (*Fabaceae*) patří nejvýznamnější zástupci domestikovaných plodin: hrách, cizrna, sója, podzemnice, bob, fazol a čočka. U luskovin jsou doklady domestikace omezené, zřejmé ale je, že čočka, bob, cizrna a hrách patří mezi velmi staré kulturní plodiny. Na velikosti a tvaru semen lze pozorovat, že postupně docházelo k omezování pukání lusků (Smýkal, 2009).

3.2.2 Genetická diverzita genofondových kolekcí rodu *Pisum*

Položky (genotypy) hrachu jsou shromážděny a uchovávány v několika hlavních genových bankách po celém světě (Smýkal a kol., 2008). Patří sem např. John Innes Centre (JIC; 3 557 položek), Mezinárodní centrum pro zemědělský výzkum v suchých oblastech (ICARDA, 6 105 položek) a Vavilovův institut šlechtění rostlin (6 790 položek)

(Smýkal a kol., 2011). Česká národní kolekce hrachu soustředěná na pracovišti v Šumperku má přes 2 200 položek. Pro posouzení genetické diverzity jsou populární DNA markery, například SSR (*simple sequence repeats*, mikrosatelity), které mají vysoký polymorfismus a kodominanci, na druhou stranu mají vysokou mutační frekvenci (Vigouroux a kol., 2002) a častou homoplazii tj. stav, ve kterém jsou alely shodné, ale ne podle původu (Bhargava a Fuentes, 2010). Další typy markerů používané ke studiu diverzity zahrnují retrotranspozony, jako jsou SSAP (*sequence-specific amplification polymorphism*) (Ellis a kol., 1998, Smýkal a kol., 2011) a IRAP (*inter-retrotransposon amplified polymorphism*), jde o dominantní markery (Kalendar a Schulman, 2006; Smýkal, 2006).

K charakterizování rozložení genetické diverzity hrachu byly využity mikrosatelity i retrotranspozony. I přesto, že rod *Pisum* obsahuje jen 2–3 druhy a několik taxonomicky definovatelných jednotek, je velmi rozmanitý a tato diverzita závisí na geografickém původu, taxonomické příbuznosti a šlechtitelských genových zdrojích. S použitím těchto markerů bylo analyzováno 4 429 položek hrachu z hlavních genofondových kolekcí. Cílem bylo sestavit světovou reprezentativní kolekci hrachu. Analýza jasně oddělila plané druhy a poddruhy (*P. fulvum* Sibth. & Sm., *P. sativum* subsp. *elatius* (M. Bieb.) Asch. & Graebn. a *P. abyssinicum* A. Braun) od kulturní formy hrachu. Byly odlišeny i položky kulturního hrachu z Afghánistánu, Etiopie a Číny, což pravděpodobně naznačuje jejich samostatný původ. Mezi zástupci planého hrachu je velké genetická variabilita (Smýkal, 2011).

3.3 Fylogenetika

Součástí systematické biologie je taxonomie, věda o taxonech, tj. jakýkoliv přirozený a rozlišený soubor žijících nebo vymizelých organismů, který je vyhraněný. Taxonomie se zabývá jejich poznáváním, vymezováním, tříděním a vytvářením přirozené klasifikace organismů. Je spojena s fylogenetikou, která se snaží o rekonstrukci historického vývoje organismů a zjištění jejich příbuznosti. Rozlišují se 3 druhy taxonů: taxony monofyletické, které zahrnují výlučně jednoho společného předka tohoto taxonu a všechny jeho potomky; taxony parafyletické, které zahrnují společného předka, ale ne všechny jeho potomky, společný předek parafyletického taxonu není výlučný (byl předkem i jiného taxonu); a taxony polyfyletické, které nezahrnují společného předka, jsou jen sběrnými skupinami založené na nezávisle vzniklé podobnosti. Další pojem použí-

vaný ve fylogenetice je taxon monotypický, jde o nadřazený taxon, který obsahuje pouze jediný taxon podřazený (např. rod s jediným druhem). Fylogenetická (kladistická) klasifikace přijímá pouze monofyletické taxony a snaží se, aby klasifikace co nejděleji odrážela příbuznost organismů. Klasifikace přisuzuje sesterským skupinám stejnou hierarchickou úroveň a stává se hypotézou o sesterských vztazích a monofyletický taxon je klasifikován spíše svým výlučným původem (předkem) než vlastnostmi. Zavedení principů kladistické klasifikace vedlo ke značným změnám v taxonomii (Rosypal, 2003). Vývoj druhů organismů v procesu evoluce se nazývá fylogeneze. Tento proces je reprezentován fylogenetickým stromem. Ve fylogenetice se používají morfologické nebo molekulární vlastnosti (např. proteinové a genetické markery).

3.4 Molekulární fylogenetika

V současné době se ve fylogenetice masivně uplatňují molekulární markery, nejčastěji sekvence DNA, získané pomocí molekulárně biologických metod. Tato data mohou být použita například pro rozpoznávání jednotlivých organismů, jejich třídění, pro zjišťování příbuznosti jedinců v rámci druhu nebo populace a pro rekonstrukci fylogeneze druhů či vyšších taxonů. Využitím molekulárních dat pro účely fylogenetiky a systematické biologie se zabývá samostatný obor molekulární fylogenetika (Flegr, 2005).

3.4.1 Metody molekulární fylogenetiky

Molekulární markery hrají zásadní roli ve všech aspektech genetiky a moderního šlechtění rostlin. Jednou ze dvou hlavních skupin transponovatelných elementů v eukaryotických genomech jsou retrotranspozony. Jsou všudypřítomné, velmi hojné, rozptýlené po celém genomu a jejich *copy and paste* mechanismus replikativní transpozice vede k nové inzerci v genomu, bez vystřížení původního elementu. Celková struktura i domény retrotranspozonů, odpovědné za různé fáze jejich replikace, jsou vysoce konzervativní ve všech eukaryotech. Díky jejich hojnosti a aktivitě v rostlinných genomech byly vyvinuty různé markerové systémy využívající polymorfismus retrotranspozonů (Kalendar, 2011).

Rozptýlené repetitivní sekvence tvoří transponovatelné elementy se dvěma hlavními skupinami, které se liší způsobem jejich množení: retrotranspozony (třída I) a DNA transpozony (třída II). Retrotranspozony se transponují pomocí RNA meziprojektu. Podle přítomnosti dlouhých terminálních repetitiv (LTR) se retrotranspozony rozdělují na

LTR retrotranspozony a non-LTR retrotranspozony, lišící se svojí strukturou a transpozičním cyklem (Kalendar, 2011). U mnoha plodin se 40–70 % z celkové DNA skládá z LTR retrotranspozonů (Pearce a kol., 1996).

Retrotranspozony jako molekulární markery, patří k metodám založeným na polymerázové řetězové reakci (PCR), vyznačují se Mendelistickou dědičností s velkou genetickou variabilitou (Manninen a kol., 2000). Přítomnost nebo absence transponovatelných elementů může být použita pro konstrukci fylogenetických stromů druhů v důsledku rozdílné distribuce retrotranspozonů mezi organismy. Proto byly retrotranspozony navrženy jako výkonné fylogenetické markery s velmi malou nebo žádnou homoplazií (Shedlock a Okada, 2000; Alzohairy a kol., 2014).

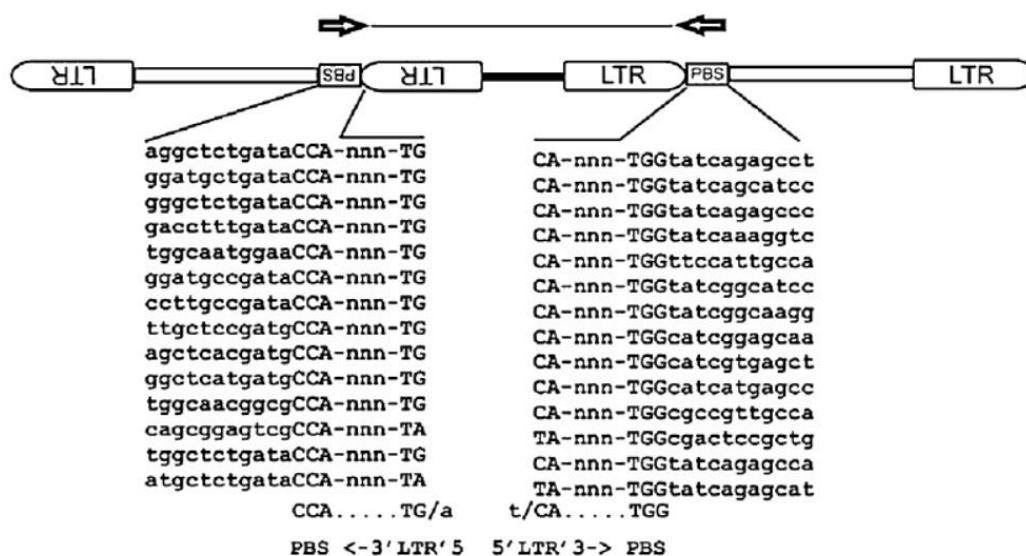
Mezi metody retrotranspozonových molekulárních markerů patří SSAP (*sequence-specific amplified polymorphism*), RBIP (*retrotransposon-based insertion polymorphism*), IRAP (*inter retrotransposon amplified polymorphism*), REMAP (*retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism*) a iPBS (*inter-primer binding sequence*). Díky obecné použitelnosti metod, jednoduchosti provedení a rozlišení genotypů je tento systém markerů používán ve studiích genetické diverzity nebo v markery asistované selekci (Kalendar a Schulman, 2006).

iPBS

Nutnost znalosti sekvencí pro návrh specifických primerů je u metod využívajících retrotranspozonové markery nevýhodou, která je však u iPBS metody překonána. Metoda iPBS amplifikace (Obr. 4) je založena na přítomnosti vazebného místa primeru (PBS, *primer binding sequence*) reverzní transkriptázy, které je součástí vnitřní retrotranspozonové domény. LTR retrotranspozony a všechny retroviry obsahují konzervativní sekvenci tRNA sloužící jako PBS pro tRNA^{iMet}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Pro}, tRNA^{Trp}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Phe}, tRNA^{Leu} a tRNA^{Gln}. Prodlužování 3' konce příslušných tRNA má za následek přestavbu retrotranspozonové nebo virové RNA do dvouřetězcové DNA a jeho následné začlenění na nové místo (Kalendar, 2011).

Jde tedy o mimořádně univerzální a účinnou metodu, která umožňuje přímou vizualizaci polymorfismů mezi jednotlivci, rychlé klonování LTR segmentů genomové DNA a provádění *in silico* databázového vyhledávání. V mnoha druzích rostlin jsou retrotranspozony vnořené, smíšené a převrácené. S použitím PBS primerů mohou být jednoduše amplifikovány. PCR amplifikace probíhá mezi dvěma vnořenými PBS ve dvou

LTR sekvencích. PBS sekvence jsou vnořeny blízko sebe a díky tomu mohou být použity pro klonování LTR (Kalendar a kol., 2010).



Obr. 4 – Schéma iPBS amplifikace (Kalendar a kol., 2010)

Vysvětlivky: dva retrotranspozony v opačné orientaci a to buď dostatečně blízko pro účinnou amplifikaci (jak je znázorněno) nebo vnořené. Diagram dvou strukturních prvků retrotranspozonů, LTR a PBS. Znázornění předpokládaného produktu spolu s orientací PBS primeru. PCR produkt obsahuje LTR a PBS sekvence spolu se sekvencí mezi LTR segmenty.

Mikrosatelity (1–10 nukleotidů) a minisatelity (>10 nukleotidů) jsou podkategorie tandemové repetitivní DNA, které spolu s rozptýlenými repetitivy tvoří repetitivní oblasti genomu. Mikrosatelity nebo SSR (*simple sequence repeats*), STR (*short tandem repeats*) a SLP (*simple sequence length polymorphisms*) se nachází v prokaryotech i eukaryotech a jsou rozmístěny po celém genomu, zejména v euchromatinu eukaryot, kódující a nekódující jaderné a organelové DNA (Vieira a kol., 2016).

SSR

SSR patřily v posledních 20 letech k nejpoužívanějším markerům pro genotypizaci rostlin, protože jsou velmi informativní, kodominantní, multialelické a zároveň reprodukovatelné a přenosné mezi příbuznými druhy (Mason, 2015; Vieira a kol., 2016). SSR jsou obzvláště užitečné pro plané druhy při studiích genetické diverzity, k odhadu toku genů a míry crossing overu, v evolučních studiích k posouzení vnitrodruhových

genetických vztahů. U kulturních rostlin se SSR běžně používají pro vytvoření genetických map, mapování lokusů pro kvantitativní znaky (QTL), pro odhad stupně příbuznosti mezi genotypy, pro markery asistovanou selekci a fingerprint odrůd rostlin (Jonah a kol., 2011). SSR byly užitečné pro vytvoření integrovaných map a pro kombinované, fyzikální a sekvenční mapy, které poskytují šlechtitelům a genetikům nástroj pro propojení fenotypové a genotypové variability (Vieira a kol., 2016).

Vývoj SSR markerů má 4 stupně, nejdůležitější je znalost sekvencí, ve kterých se vyskytují SSR, dále návrh oligonukleotidů (primerů) komplementárních oblastem obklopujících SSR, ověření primerů pomocí PCR a elektroforetické separace produktů a na závěr detekce polymorfismů mezi jednotlivci (Mason, 2015).

Mikrosatelity byly původně získávány z kódujících i nekódujících oblastí rostlinných genomů a k vyhledávání SSR bylo použito několik zdrojů, včetně různých DNA knihoven (např. genomové a cDNA knihovny) a veřejných databází (Vieira a kol., 2016). Pokrok v sekvenování nové generace (NGS) poskytl nový způsob detekce mikrosatelitů. V posledních desetiletích je ve veřejných databázích k dispozici obrovské množství sekvencí, které jsou používány pro výzkum mikrosatelitů a to díky mnoha NGS projektům (Schnable a kol., 2009; Vieira a kol., 2016). V současné době jsou platformy 454 a Illumina nejpoužívanější pro získávání nových SSR markerů (Grohme a kol., 2013). Pro identifikace sekvencí obsahující SSR, musí být nasyntetizovány specifické primery (18–25 bp), komplementární k sekvenci okolo mikrosatelitu a následná amplifikace a testování polymorfismů. Následná genotypizace je poměrně jednoduchá a levná metoda. Varianty alel daného SSR lokusu mohou být identifikovány pomocí agarózové nebo polyakrylamidové gelové elektroforézy (Vieira a kol., 2016).

3.4.2 Molekulární fylogenetika čeledi *Fabaceae*

Rekonstrukce fylogenetických vztahů *Fabaceae* je důležitá pro porozumění původu a diverzifikace čeledi. První molekulární fylogenetické analýzy *Fabaceae* začaly s plastidovým genem *rbcL* a později s více variabilní genem *matK*. Analýzy závisí na postupném sekvenování genomů. Díky dostupným genomům u modelových luštěnin *Medicago truncatula* Gaertn., *Lotus japonicus* (Regel) K. Larson, a znalosti chloroplastového genomu u *Lathyrus sativus*, *Pisum sativum* a několika dalších, bylo dosaženo rychlého pokroku ve fylogenetických analýzách. Monofylie čeledi *Fabaceae* byla opakovaně demonstrována pomocí molekulární systematiky (Smýkal a kol., 2015).

Na základě morfologických znaků jsou uznávány 3 hlavní podčeledi: *Mimosoideae* (4 triby, 3 270 druhů); *Papilionoideae* (28 tribů, 13 800 druhů); *Caesalpinioideae* (4 triby, 2 250 druhů) (Lewis a kol., 2005). *Papilionoideae* je monofyletická skupina a považuje se za největší podčeleď, všichni zástupci sdílí společného předka, který má za sebou 50 kb inverzi ve svém chloroplastovém genomu před asi 50 miliony lety (Doyle, 1995; Smýkal a kol., 2015). Největší skupina *Papilionoideae* je Hologalegina se 75 rody, včetně velkých tribů *Galegeae*, *Fabeae*, *Trifolieae*, *Genisteae* aj., které spojuje ztráta jedné kopie chloroplastové obrácené repetice. Z ekonomického a vědeckého hlediska je nejvýznamnější tribus *Fabeae* a *Trifolieae*, které společně tvoří 11 rodů a téměř 800 druhů (Smýkal a kol., 2015).

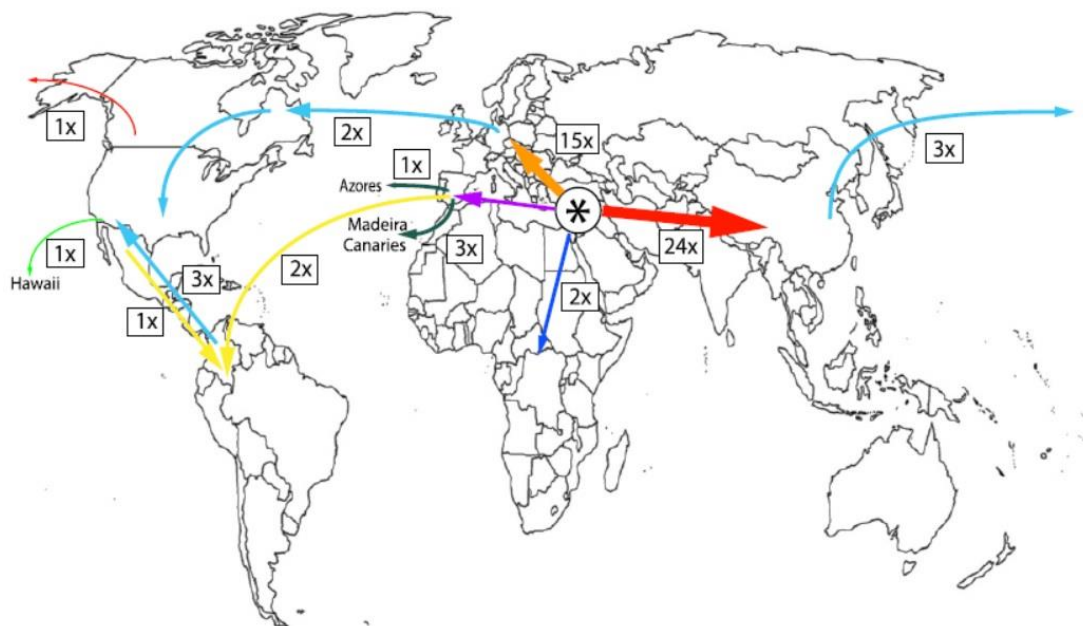
Papilionoideae mohou být dále rozděleny do 4 kladů: Phaseoloids (tropický klad; *Glycine* Willd., *Phaseolus* L., *Cajanus* L. a *Vigna* Savi), Galegoids (klad mírného pásu; *Pisum*, *Lens*, *Lathyrus*, *Vicia*, *Medicago* L. a *Cicer* L.), Genistoids (*Lupinus* L.) a Dalbergoids (*Arachis* L. a *Stylosanthes* Sw.) (Lewis a kol., 2005). Do *Mimosoideae* a *Caesalpinioideae* patří většinou keře a dřeviny, mnohé cenné na dřevo (*Acacia* spp. Mill.), barviva (*Indigofera tinctoria* L.), pryskyřice (*Trachylobium verrucosum* (Gaertn.) Oliv), gumy (*Senegalia senegal* Britton), insekticidy (*Derris elliptica* (Wall.) Benth), léčiva (*Senna occidentalis* (L.) Link.), potravu (*Tamarindus indicus* L.) a krmivo (*Bauhinia* spp. L.) (Smýkal a kol., 2015).

Molekulární fylogenetické analýzy se v poslední době zaměřily více na úrovně aktuálně uznaných rodů, podrodů a mnoho tradičních sekcí, jejichž molekulární data ukazují, že nejsou monofyletické. Rody *Pisum* a *Vavilovia* jsou sesterské skupiny a jsou vnořeny v rodu *Lathyrus*, který je spolu s rodem *Lens* vnořen v rodu *Vicia*. Toto seskupování je podpořeno analýzami plastidového genomu *Fabeae*: *Lathyrus sativus* a *Pisum sativum* mají společné 4 ztráty genů (*infA*, *rsp16*, *rpl22* a *rl23*) a ztrátu prvního intronu *clpP* a cis-intronu *rps12* (Magee a kol., 2010; Schaefer a kol., 2012). *Pisum* a *Lathyrus* mají dále společný fytoalexin pisatin, který nebyl nalezen v rodě *Vicia* a *Lens*. V téměř všech druzích rodů *Vicia* a *Lens* se nachází fytoalexin wyeron, jehož přítomnost by mohla být synapomorfní pro tyto rody (Schaefer a kol., 2012).

Na základě fylogeneze podle nově generovaných sekvencí jaderné a chloroplastové DNA (*rbcL*, *matK*, *trnLtrnF*, *trnS-trnG*, *psbA-trnH* a ITS oblastí) druhů tribu *Fabeae* z Atlantských ostrovů, Severní a Jižní Ameriky, Afriky a Eurasie bylo zjištěno, že jejich původ je se východním Středomoří ve středním miocénu (23–16 Ma). Předek dnešních

zástupců *Fabeae* byl pravděpodobně jednoletá rostlina s chromozomovým číslem $2n=14$ s rovnoměrně chlupatou, dorziventrálně stlačenou čnělkou. Ze svého centra ve Středomoří se tribus rozšířil nejméně 15krát do střední a západní Evropy, 24krát do Asie, 2krát do tropické Afriky a nejméně 7krát přes Atlantik nebo Pacifik do Severní a Jižní Ameriky. Středoatlantské ostrovy byly kolonizovány 4krát, ale nesloužili jako odrazový můstek pro šíření do Ameriky. Biogeografická analýza ukázala, že dálkové šíření rostlin neboli *Long Distance Dispersal* (dále jen LDD; zde definováno jako rozptýlené přes oceány) je u *Fabeae* poměrně běžné. Během přibližně 18 milionů let se podařilo rekonstruovat 12 LDD událostí (Obr. 5) (Schaefer a kol., 2012).

Migrace do Ameriky přes Beringův pevninský most byla pravděpodobná pro alespoň jednu linii rodu *Vicia* (předkové tichomořských *Vicia nigricans* Hook. & Arn., *V. gigantea* Hook. a havajské *V. menziesii* Spreng.). V časovém okně 9–5 Ma dosáhly amerického kontinentu další *Fabeae* linie (např. *Vicia* sekce *Australes*, *Lathyrus* sekce *Notolathyrus*) a to LDD událostí ze Středomořské oblasti přes Atlantik. To naznačuje příznivé podmínky pro rozptylování semen v pozdním miocénu. Například pro jihoamerickou sekci *Notolathyrus* byl navržen její původ ve východním Středomoří, odkud se šířila do severní Eurasie. Beringův pozemní most umožnil její migraci do Severní Ameriky a na konci třetihor se rozšířila do Jižní Ameriky. S otevřením Beringova průlivu (5,5–5,4 Ma) se stala migrace po zemi na americký kontinent dočasně nemožná. Později došlo znovu ke spojení, což umožnilo pozemní migraci chladu-adaptovaným liniím. U některých druhů není možné rozhodnout mezi migrací po zemi nebo LDD přes oceány (Schaefer a kol., 2012).



Obr. 5 – Mapa biogeografické historie *Fabeae* (Schaefer a kol., 2012)

Vysvětlivky: hvězdička – centrum původu *Fabeae*; šipky znamenají směr šíření do určité geografické oblasti a jsou barevně odlišeny (Asie – 24krát; střední a západní Evropa – 15krát; tropická Afrika – 2krát; Jižní Amerika – 2krát ze Středomoří a 1krát ze Severní Ameriky; Severní Amerika – 2krát ze Středomoří, 3krát z Asie a 3krát z Jižní Ameriky; Makaronézie – 4krát ze Středomoří)

Lathyrus

Molekulární fylogenetické studie rodu *Lathyrus* založené na jaderných (ITS) a chloroplastových (*trnL-F*, *trnSG*) markerech vedly k odhadům fylogeneze s rody *Pisum* a *Vavilovia* vnořenými v rodě *Lathyrus* a zároveň rody *Pisum*, *Vavilovia*, *Lathyrus* a *Lens* vnořenými v rodě *Vicia* (Smýkal a kol., 2015).

Mnoho analýz se v poslední době zaměřuje na obecně přehlížené středomořské druhy rodu *Lathyrus* (*L. gleosperma* Warb et Eig., *L. neurolobus*, a *L. nissolia* L.), které mohou být, na rozdíl od Kavkazského druhu *Vavilovia*, velmi zajímavé pro šlechtění nových odrůd *Pisum* díky prospěšným vlastnostem, jako např. tolerance k suchu a vytrvalé formy života. Všechny tyto druhy mají podobnost s *Pisum* a mohou být zahrnuty ve šlechtitelských programech. (Schaefer a kol., 2012)

Vicia

Rod *Vicia* byl podle morfologických znaků rozdělen do dvou podrodů, *Vicilla* a *Vicia*. Podrod *Vicia* byl rozdělen do 5 sekcí. Analýza těchto sekcí ukázala, že *Vicia faba* musí být umístěna daleko od ostatních členů sekce *Faba*, kvůli odlišnému počtu chromozomů. *V. bithynica* (L.) L., *V. oroboides* Wulfen a *V. sepium* L. mají $2n=14$ chromozomů, zatímco *V. faba* má $2n=12$, což ztěžuje křížení rostlin pro šlechtitelské účely (Schaefer a kol., 2012). U druhu *Vicia faba* není dosud přesně známý planý předek. Jako možný předek byla navržena *V. faba* subsp. *paucijuga* (Alef.) Murat. z Pákistánu a Afghánistánu, další možný předek je *V. pliniana* (Trabut) Murat. z Alžírsko. Podle morfologické podobnosti byla navržena *V. narbonensis* L. jako předek, nicméně díky překážkám v křížení byl tento návrh vyvrácen. Podle výsledků z fylogenetických analýz ani jeden z návrhů na předka druhu *Vicia faba* není správný a není jisté, jestli předek není již vymizelý (Smýkal a kol., 2015).

Pisum

Klasifikace rodu *Pisum* se v průběhu let měnila z rodu s 5 druhy na monotypický rod, dále na rod se 2 druhy. Nedávné analýzy molekulární fylogeneze zjistily, že rod *Pisum* je vnořen v rodě *Lathyrus* (Schaefer a kol., 2012). Analýzy molekulární fylogeneze prokázali, že rod *Vavilovia* a její druh *V. formosa* je sesterská skupina k rodu *Pisum*.

Fylogenetické studie založené na inzercích retrotranspozonových markerů podporují model *Pisum sativum* subsp. *elatius* jako parafyletická skupina, mezi kterou jsou vnořeny všechny plané formy *P. sativum* (Nasiri a kol., 2010; Smýkal a kol., 2015). Fylogenetický vztah *Pisum* byl rekonstruován s použitím molekulárního, multilokusového přístupu, který zjistil, že *P. fulvum* a *P. sativum* subsp. *abyssinicum* tvoří sesterské klady. *Pisum sativum* subsp. *elatius* je umístěno mezi *P. fulvum* – *P. sativum* subsp. *abyssinicum* a kulturní *P. sativum* (Smýkal a kol., 2015).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Použitý materiál

Rostlinný materiál použitý pro experimentální část práce byl poskytnut Katedrou botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého. Jednalo se o usušené nadzemní části 10 rostlin *Lathyrus neurolobus* uchovávané v silikagelu v chladu. Vzorky se lišily místem nálezů (Tab. 1) a byly získány ze sběrové expedice na Krétě.

Tab. 1 – Rostlinný materiál pro DNA analýzy

Číslo vzorku	Označení podle místa nálezů	Souřadnice
1	Paleo-1	35°24'01.6"N, 23°46'45.6"E
2	Elos-01	35°21'36.0"N, 23°38'08.0"E
3	M 3-4	35°22'05.0"N, 23°42'18.0"E
4	Milanos-3	35°21'36.0"N, 23°38'08.0"E
5	Milanos 3-2	35°21'36.0"N, 23°38'08.0"E
6	Milanos 3-3	35°21'36.0"N, 23°38'08.0"E
7	Milones 1	35°22'12.7"N, 23°42'27.2"E
8	Milones 2	35°22'12.7"N, 23°42'27.2"E
9	Milones 2-2	35°22'12.7"N, 23°42'27.2"E
10	Milones 3-3	35°22'12.7"N, 23°42'27.2"E

4.2 Metodika molekulárních analýz

4.2.1 Izolace DNA

Při první izolaci bylo z každého vzorku odebráno 40 mg vysušených pletiv prýtlů. Při opakované izolaci byla tato navážka snížena na 10 mg. Vzorky byly homogenizovány v homogenizátoru FastPrep-24™. DNA byla izolována pomocí manuálu Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Stratec Molecular, 2011), který je určen pro izolaci a purifikaci DNA různých rostlinných druhů a to z čerstvého, mraženého nebo sušeného materiálu.

4.2.2 SSR analýza

Pro analýzu bylo použito 24 SSR markerů z práce Loridon a kol. (2005), který jich původně navrhl 216 pro *P. sativum*. V práci Bačovské (2015) bylo na druhu *Lathyrus neurolobus* otestováno 51 markerů. A 24 z nich mohlo být použito pro druh *Lathyrus neurolobus*.

Reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) je v tabulce 2. Směsi pro jednotlivé SSR primery byly připraveny postupným přidáváním složek do 1,50 ml mikrozkuvek a rozděleny do 96 jamkových 0,20 ml PCR desek po 14,50 μ l. Nakonec bylo přidáno 0,80 μ l templátové DNA. Připravené desky byly vloženy do komory termocyklieru TProfessional Basic Gradient (Biometra) s nastaveným odpovídajícím programem reakce, který byl převzat od Loridon a kol. (2005) (Tab. 3).

Tab. 2 – Reakční směs pro SSR analýzu

Složky reakce	1 reakce
Deionizovaná voda	10,78 μ l
Pufr	3,0 μ l
Primery	0,60 μ l
MyTaq polymeráza	0,12 μ l
Celkem	14,50 μl
+ Templátová DNA	0,80 μ l

Tab. 3 – Program PCR reakce podle Loridon a kol. (2005)

	Teplota (°C)	Čas	Počet opakování
Počáteční denaturace	94	4 min	1 ×
Denaturace	94	30 s	30 ×
Nasednutí primerů	55	30 s	
Elongace	72	40 s	
Konečná elongace	72	10 min	1 ×

4.2.3 iPBS analýza

Pro analýzu bylo použito 16 iPBS primerů podle Kalendar a kol. (2010), u kterých byla podle Bačovské (2015) ověřena jejich použitelnost pro druh *L. neurolobus*.

Reakční směs pro PCR je uvedena v tabulce 4. Směsi pro jednotlivé iPBS primery byly připraveny postupným přidáváním složek do 1,50 ml mikrozkuvek a rozděleny do 96 jamkových 0,20 ml PCR desek po 14,50 μ l. Následně bylo přidáno 0,80 μ l templátové DNA. Připravené desky byly vloženy do termocyklieru TProfessional Basic Gradient (Biometra). Časový a teplotní profil reakce byl převzat od Kalendar a kol. (2010) (Tab. 5).

Tab. 4 – Reakční směs pro iPBS analýzu

Složky reakce	1 reakce
Deionizovaná voda	11,18 μ l
Pufr	3,0 μ l
Primery	0,20 μ l
MyTaq polymeráza	0,12 μ l
Celkem	14,50 μl
+ Templátová DNA	0,80 μ l

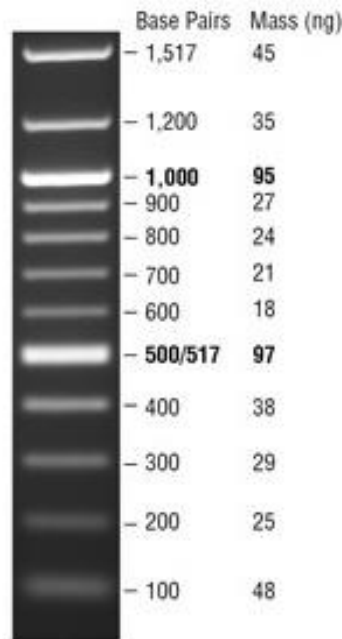
Tab. 5 – Program PCR reakce podle Kalendar a kol. (2010), optimalizace teploty nasedání primerů Bačovskou (2015)

	Teplota (°C)	Čas	Počet opakování
Počáteční denaturace	95	3 min	1 ×
Denaturace	95	15 s	35 ×
Nasednutí primerů	55	60 s	
Elongace	68	60 s	
Konečná elongace	72	5 min	1 ×

4.2.4 Příprava gelů a elektroforéza

Agarózová elektroforéza

Posouzení kvality izolované DNA a separace produktů po PCR u analýzy SSR a iPBS byla prováděna na 1% a 1,5% agarózovém gelu. Jako velikostní marker byl použit Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (Obr. 6). Vizualizace DNA probíhala v UV transiluminátoru Vilber Lourmat a gely byly nasnímány pomocí GDS programem Vision-Capt verze 14.2.



Obr. 6 – Quick-Load® 100 bp DNA Ladder

Zdroj: <https://www.neb.com/products/n0467-quick-load-100-bp-dna-ladder>

Polyakrylamidová elektroforéza

Na polyakrylamidovém (PAA) gelu bylo prováděno přesné stanovení velikosti PCR produktů u 4 SSR markerů pro posouzení genetické diverzity rostlin druhu *L. neurolobus*.

Bylo připraveno 50,0 ml polyakrylamidového gelu. Do kádinky se postupně přidalo 34,65 ml destilované vody, 5,0 ml 10× TBE (pufr Tris-borát-EDTA), 10,0 ml zásobního roztoku akrylamidu/bisakrylamidu, 334,5 μl TEMED (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin) a 334,0 μl 10% roztoku APS (persíranu amonného). Směs byla promíchána a celý obsah nalit mezi skleněné elektroforetické desky, kam se nakonec umístil hřebínek pro vytvoření nanášecích jamek.

PCR produkty byly nanášeny na gel v objemu 10,0 μl. Elektroforéza probíhala 10 minut při napětí 100 V, poté bylo napětí zvýšeno na 310 V po dobu 120 minut v závislosti na očekávané velikosti separovaných produktů. Vizualizace produktů byla provedena barvením stříbrem. Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen do nádoby s fixačním roztokem a na třepače inkubován 3 minuty. Poté byl přenesen do další nádoby s roztokem dusičnanu stříbrného a na třepače inkubován 5 minut. Po inkubaci se

stříbrem byl gel 2× promyt destilovanou vodou a přemístěn do další nádoby s vývojkou a za mírného třepání inkubován 15 minut. Gely byly zataveny do fólie a naskenovány.

4.2.5 Vyhodnocování výsledků

Výsledky SSR a iPBS analýz ve formě elektroforetogramů byly vyhodnoceny pomocí matice podobnosti. Přítomnost specifického amplikonu byla označena jako 1 a absence jako 0. Matice byly zpracovány volně dostupným programem FreeTree verze 9.1 (Hampl a kol., 2001) pomocí UPGMA metody (*Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean*) a Jaccardova koeficientu podobnosti (Jaccard, 1908). Dendrogramy byly vytvořeny v programu TreeView verze 1.6 (Page, 1996). Pro každý SSR a iPBS marker byly vypočítány hodnoty DI (index diverzity), PI (index pravděpodobnosti) a PIC (polymorfnní informační obsah) podle Russell a kol., (1997):

$$DI = \sum p_i^2$$

$$PI = \sum p_i^4 + \sum_{i=1}^{i=n-1} \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2$$

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Vysvětlivky: n – počet alel, p_i – frekvence i-té alely, p_j – frekvence j-té alely

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Izolovaná DNA

Izolace DNA byla prováděna dvakrát. Při testování kvality izolované DNA byla detekována výraznější fragmentace DNA a ve všech vzorcích se na elektroforetogramu tvořil tzv. *smear*, namísto jednoho výrazného pruhu. To bylo důvodem pro provedení druhé izolace ve stejných podmínkách, ale za snížení navážky. Výsledek byl stejný, což ukazuje na fakt, že k částečné fragmentaci DNA došlo během skladování vzorků. Jedním z vysvětlení snížené kvality může být nedostatečně rychlé vysušení rostlinného materiálu. Mohlo to být také způsobeno skladováním usušeného materiálu v silikagelu, kdy během skladování postupně klesla jeho kvalita. Vinod (2004) uvádí, že v případě dlouhodobého uchovávání mraženého rostlinného materiálu je nutné předejít i krátkému rozmrazení, které by vedlo k degradaci DNA.

5.2 Vyhodnocení analýzy SSR markerů

Pro analýzu 10 vzorků *Lathyrus neurolobus* bylo použito 24 SSR markerů (Tab. 6). Byla stanovena přibližná velikost produktů, která se nejčastěji pohybovala v rozmezí 80–200 bp a největší produkt měl přibližně 500 bp u markeru AD237. Stejné markery použité u *Pisum sativum* měly podle Loridon a kol. (2005) přibližnou velikost 180–380 bp a největší produkt měl 670 bp u markeru B17. Rozdíly ve velikostech mohly být způsobeny použitým způsobem separace. Loridon a kol. (2005) používal k separaci PAA gely a vizualizaci autoradiografií nebo barvením PAA gelů stříbrem. Separace na PAA gelech má větší rozlišovací schopnost a zároveň mají použité metody vizualizace větší citlivost než má tradičně využívaný etidium bromid u agaróзовé elektroforézy (Lee a kol., 2012). U markerů AA456 a A6 nebyl detekován žádný PCR produkt, proto mohou být považovány jako nevhodné pro druh *L. neurolobus*. Velikostní rozdíl produktů u druhů *P. sativum* a *L. neurolobus* nebo nepřítomnost produktů u *L. neurolobus* mohou být také dány rozdíly v DNA odlišných druhů. Některé SSR markery navržené Loridon a kol. (2005) pro hrách byly použity pro analýzu dalšího velmi blízkého příbuzného druhu *Vavilovia formosa*, ale pouze 18 % testovaných vzorků poskytlo produkty a nebylo možné odlišit rozdíly mezi dvěma populacemi (Smýkal a kol., 2017). Přenosnost mikrosatelitních markerů mezi rody byla studována v práci Reddy a kol. (2010), kdy byly mj. použity i některé z SSR markerů navržených pro hrách u zástupců rodu *Lens*.

Přenosnost mikrosatelitů mezi rody je určena jejich úspěšnou amplifikací, která se vyjadřuje v procentech. U SSR markerů odvozených od hrachu to bylo pouze 25 %. Autoři Smýkal a kol. (2017) a Reddy a kol. (2010) neuvádí velikosti produktů, ani další statistické hodnoty, proto mohou být výsledky analýzy *L. neurolobus* dále porovnávány jen s druhem *P. sativum*.

Pro další analýzu byly vybrány 4 markery: AA163.2, D21, B13 a B16, které měly jen jeden dobře zřetelný PCR produkt, ve všech případech v rozmezí 140–180 bp. U ostatních markerů byly přítomny nespecifické produkty nebo byly pruhy slabší a obtížně se vyhodnocovaly. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. Po přesnější analýze na PAA gelu s větší rozlišovací schopností, která se liší podle koncentrace gelu a je možné rozlišit až jednonukleotidové rozdíly (Schlötterer, 1998), se potvrdila přítomnost jedné alely u markerů AA163.2, D21 a B16. Tyto uniformní markery mají velikosti 130 bp a 150 bp. Hodnoty DI a $PIC=0$ a $PI=1$ znamenají, že tyto markery nejsou vhodné pro studium genetické variability. Při testování genetické diverzity hrachu se ale marker AA163.2 ukázal jako užitečný a podle Ahmad a kol. (2012) měl 2 alely a velikost okolo 290 bp, hodnota PIC byla 0,245. Podle Kumari a kol. (2013) byl dále u hrachu testován marker D21, který byl polymorfní se 2 alelami a velikostí 200–300 bp, jeho hodnota PIC byla 0,477. Rozdíly mezi *L. neurolobus* a *P. sativum* jsou patrné i u třetího uniformního markeru B16, který má u hrachu 3 alely a velikost 370–400 bp. Na rozdíl od první analýzy se zjistilo, že marker B13 je polymorfní a má 3 alely (Obr. 7), což nebylo možné určit z agarózového gelu s nižší rozlišovací schopností. Hodnoty $DI=0,66$ a $PIC=0,61$ jsou průměrné. Porovnání s hrachem není možné, protože v práci Loridon a kol. (2005) nejsou pro marker B13 dostupná data. Podle Bačovské (2015) měl marker B13 u *L. neurolobus* pouze jednu alelu o velikosti 159 bp.

Celkem bylo v SSR analýze detekováno 6 alel, průměrně 1,50 alel na lokus. Pro srovnání u hrachu se podle různých autorů lišil průměrný počet alel na lokus. Podle Burstin a kol. (2001) to bylo 3,60 alel na lokus při studiu 31 SSR markerů u 12 genotypů, Loridon a kol. (2005) uvádí 3,80 alel na lokus při mapování *P. sativum* pomocí 216 SSR markerů a novější práce podle Kumari a kol. (2013) udává průměrně 2,10 alel na lokus při studiu 21 SSR markerů u 28 genotypů. Hodnota polymorfního informačního obsahu u *L. neurolobus* je průměrně 0,15. U hrachu je to podle Ahmad a kol. (2012) a Kumari a kol. (2013) mezi 0,40–0,50. Aby mohl být marker užitečný pro studium genetické diverzity hrachu, měl by mít podle Loridon a kol. (2005) hodnotu PIC více než

0,60. Vzhledem k nízkému počtu detekovaných alel a nízkým hodnotám jednotlivých ukazatelů pro SSR markery bude třeba pro dosažení lepších výsledků s vyšší vypovídající hodnotou analyzovat větší množství SSR markerů.

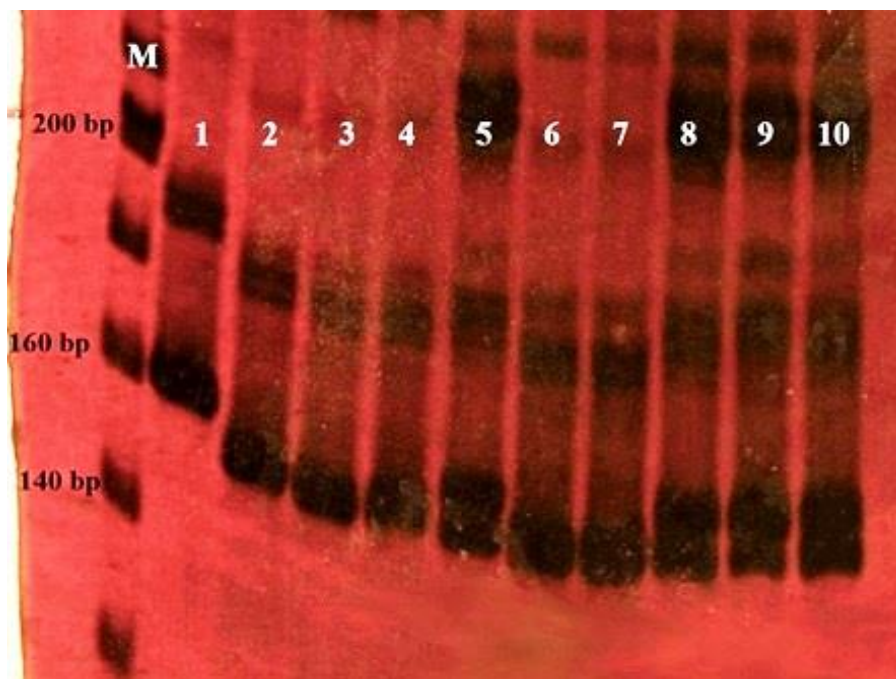
Tab. 6 – Analyzované SSR markery

SSR marker		Počet PCR produktů	Přibližná velikost (bp)
1	AA163.2	1	160
2	AD85	1	180
3	B14	2	100–190
4	AA476	1	100
5	B4	1	100
6	134	2	80–490
7	AA1	1	80
8	AD237	2	100–500
9	AB100	1	100
10	AB36	3	80–200
11	AD174	1	80
12	C20	1	100
13	B13	1	180
14	D21	1	160
15	AD270	2	90–200
16	B16	1	140
17	B17	3	180–450
18	AD134	1	480
19	37	1	90
20	AA278	1	90
21	AA206	1	80
22	AA456	žádný produkt	
23	A6	žádný produkt	
24	AD141	1	100

Tab. 7 – Vyhodnocení vybraných SSR markerů

SSR marker	Velikost (bp)	Počet alel	DI	PI	PIC
AA163.2	150	1	0,00	1,00	0,00
D21	150	1	0,00	1,00	0,00
B13	150–160	3	0,66	0,15	0,61
B16	130	1	0,00	1,00	0,00
průměr		1,50	0,17	0,79	0,15

Vysvětlivky: DI – index diverzity, PI – index pravděpodobnosti, PIC – polymorfni informační obsah



Obr. 7 – Elektroforetogram, polymorfní SSR marker B13 (M – hmotnostní marker 20 bp DNA Ladder; 1–10 genotypy *L. neurolobus*: 1 – Paleo-1, 2 – Elos-01, 3 – M 3-4, 4 – Milanos-3, 5 – Milanos 3-2, 6 – Milanos 3-3, 7 – Milones 1, 8 – Milones 2, 9 – Milones 2-2; 10 – Milones 3-3)

5.3 Vyhodnocení iPBS analýzy

Pro analýzu 10 vzorků *L. neurolobus* bylo použito 16 iPBS markerů (Tab. 8), u kterých byl nejprve stanoven přibližný počet produktů a přibližná velikost, která se pohybovala v rozmezí 300–1390 bp. U markeru iPBS2241 nebyl na gelu přítomný žádný produkt, v dřívější práci podle Bačovské (2015), kde byla optimalizována teplota nasedání primerů (T_a), tento marker fungoval a měl při T_a 55°C přibližnou velikost 1000–2700 a počet produktů 8. Pravděpodobně došlo k chybě při PCR. Dalších 5 iPBS markerů nemělo žádný polymorfní fragment. Celkem 10 iPBS markerů bylo polymorfních a u 9 z nich byly polymorfizmy velmi dobře zřetelné, proto byly vybrány pro další analýzu.

Vybrané iPBS markery jsou uvedené v tabulce 9. Celkem bylo nalezeno 85 pruhů a 58 z nich bylo polymorfních. Počet fragmentů na marker se pohyboval v rozmezí 6–13, s průměrem 9,444. Počet polymorfních fragmentů na marker měl průměr 6,444. Baloch a kol. (2015a), který pomocí 12 iPBS markerů studoval polymorfizmy na 138 tureckých položkách hrachu, zjistil celkem 106 pruhů s průměrem 8,830 fragmentů na marker,

z nich 81 bylo polymorfních s průměrem 6,750 polymorfních fragmentů na marker. Průměrné hodnoty celkového počtu fragmentů i polymorfních fragmentů na marker se od sebe u dvou blízce příbuzných druhů významně neliší. Analýza iPBS markerů byla provedena i na kulturních a planých zástupcích rodu *Lens* ze stejné čeledi *Fabaceae*. Baloch a kol. (2015b) testoval 10 iPBS markerů na 7 položkách čočky, kdy z celkem 151 fragmentů bylo 150 polymorfních s průměrem 15 polymorfních fragmentů na marker.

U *L. neurolobus* byla hodnota indexu diverzity v rozmezí 0,812–0,966 s průměrem $DI=0,929$; hodnota indexu pravděpodobnosti byla v rozmezí 0,001–0,021 s průměrem $PI=0,005$ a polymorfní informační obsah se pohyboval v rozmezí 0,812–0,966 s průměrnou hodnotou $PIC=0,928$. U hrachu byla podle Baloch a kol. (2015a) hodnota polymorfního informačního obsahu v rozmezí 0,330–0,840 s průměrem $PIC=0,610$, u čočky byla tato hodnota vyšší, podle Baloch a kol. (2015b) to bylo v rozmezí 0,840–0,970 s průměrem $PIC=0,90$. Aby mohly být markery klasifikovány jako informativní, měla by hodnota PIC být vyšší než 0,50 (Sharma a kol., 2009). To je splněno u hrachu, hrachoru i čočky. Těmto získaným vysokým hodnotám PIC předchází testování, optimalizace a výběr markerů, které dobře fungují pro určitý druh. Proto z 83 univerzálních retrotranspozonových markerů navržených v práci Kalendar a kol. (2010) může vykazovat polymorfizmy, a tak být využito pro studium genetické diverzity, jen několik pro daný druh. Na obrázku 8 je ukázka dvou polymorfních iPBS markerů iPBS2271 a iPBS2394.

Tab. 8 – Analyzované iPBS markery

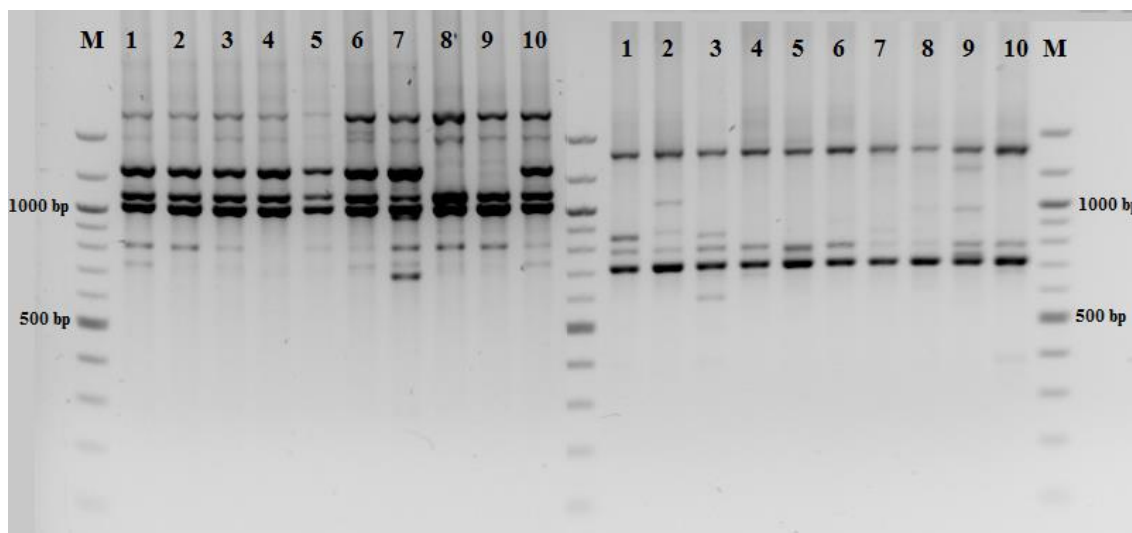
iPBS marker	Počet produktů	Přibližná velikost	Polymorfizmus	
1	iPBS2076	5–6	720–1350	++
2	iPBS2077	3	400–1250	-
3	iPBS2078	6–8	480–1300	++
4	iPBS2228	4	600–1220	-
5	iPBS2229	2	1120–1350	-
6	iPBS2232	5–10	620–1300	++
7	iPBS2239	6–7	700–1350	+
8	iPBS2241	žádný produkt		
9	iPBS2247	5–9	490–1390	++
10	iPBS2249	1–7	660–1310	++
11	iPBS2251	2–8	350–1270	++
12	iPBS2271	4–7	720–1160	++
13	iPBS2277	5	300–1120	-
14	iPBS2383	2	390–500	-
15	iPBS2390	1–3	410–1100	++
16	iPBS2394	2–4	700–1160	++

Vysvětlivky: Polymorfizmus: (-) není polymorfní; (+) polymorfní; (++) dobře zřetelný polymorfizmus

Tab. 9 – Vyhodnocení vybraných iPBS markerů

iPBS marker	Velikost (bp)	Počet fragmentů		DI	PI	PIC
		Celkem	Polymorfní			
iPBS2076	280–1380	13	8	0,940	0,004	0,939
iPBS2078	480–1300	9	5	0,931	0,005	0,929
iPBS2232	620–1300	10	8	0,966	0,001	0,966
iPBS2247	780–1450	13	5	0,966	0,001	0,965
iPBS2249	770–1300	7	6	0,812	0,021	0,812
iPBS2251	760–1250	12	11	0,943	0,003	0,943
iPBS2271	690–1280	10	7	0,961	0,001	0,961
iPBS2390	430–1250	6	3	0,922	0,006	0,920
iPBS2394	600–1160	8	5	0,919	0,005	0,919
průměr		9,444	6,444	0,929	0,005	0,928
celkem		85	58			

Vysvětlivky: DI – index diverzity, PI – index pravděpodobnosti, PIC – polymorfní informační obsah



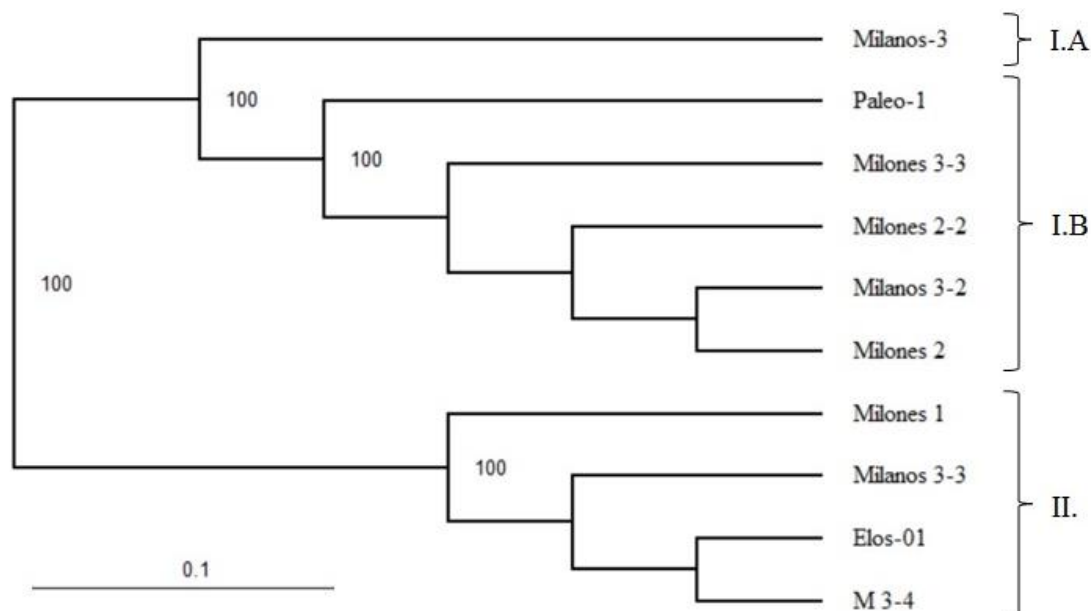
Obr. 8 – Elektroforetogram, polymorfni iPBS markery iPBS2271 a iPBS2394 (M – hmotnostní marker Quick-Load® 100 bp DNA Ladder; 1–10 genotypy *L. neurolobus*: 1 – Paleo-1, 2 – Elos-01, 3 – M 3-4, 4 – Milanos-3, 5 – Milanos 3-2, 6 – Milanos 3-3, 7 – Milones 1, 8 – Milones 2, 9 – Milones 2-2; 10 – Milones 3-3)

5.4 Posouzení genetické variability dosažené jednotlivými metodami

Doposud nebyly analyzované mikrosatelitní ani retrotranspozonové markery použity pro studium genetické diverzity kulturních i planých druhů rodu *Lathyrus*. Získané průměrné hodnoty polymorfního informačního obsahu PIC naznačují, že pro studium variability by byla vhodnější metoda iPBS, kde průměrná hodnota PIC=0,928, oproti metodě SSR, kde byla hodnota nižší než 0,50, což je hranice, aby byl marker považován za dostatečně informativní pro analýzy genetické diverzity. Nicméně pouhé 4 analyzované SSR markery zpochybňují rozhodování o vhodnější metodě a bude jich třeba analyzovat větší množství.

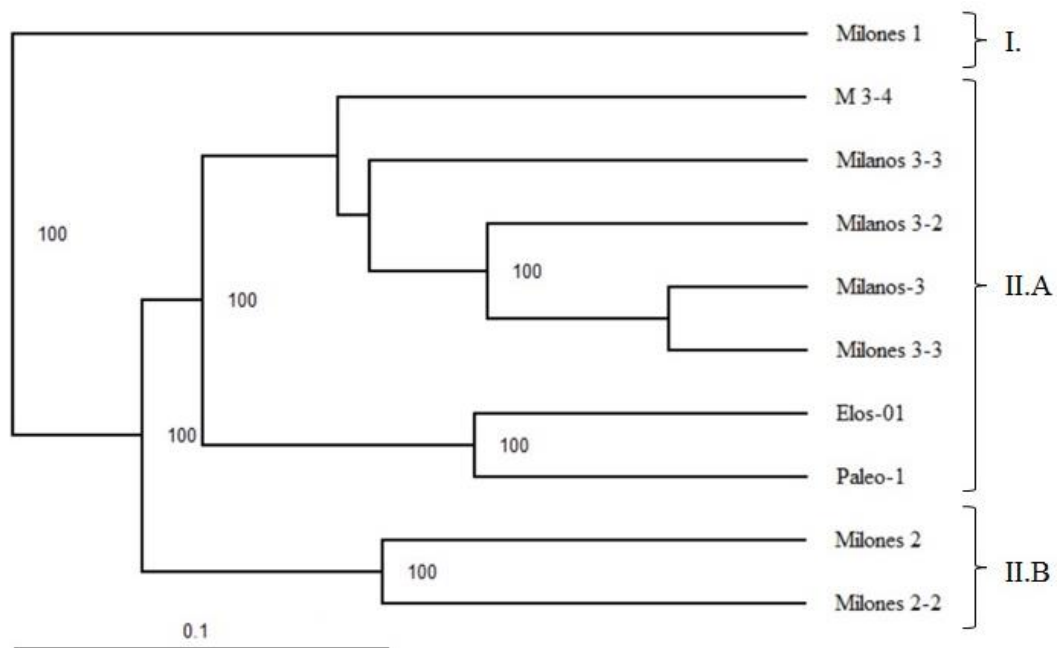
Na základě vyhodnoceného polymorfizmu u SSR markerů byl sestaven dendrogram (Obr. 9), na kterém můžeme pozorovat rozlišení genotypů do dvou klastrů (I. a II.). Klastř I. může být dále rozdělen do dvou subklastrů I.A a I.B. Subklastř I.A je tvořen pouze jedním genotypem Milanos-3. Subklastř I.B je tvořen 5 genotypy (Paleo-1, Milones 3-3, Milones 2-2, Milanos 3-2, Milones 2). Klastř II. se skládá ze 4 genotypů (Milones 1, Milanos 3-3, Elos-01 a M 3-4). Analýzou SSR markerů se již dříve několikrát podařilo odlišit zástupce hrachu. Rana a kol. (2016) metodu SSR markerů doporučuje pro charakterizaci genofondových kolekcí. Při analýze 151 položek hrachu z celého

světa se jim pomocí 20 SSR markerů podařilo rozlišit genotypy do 3 klastrů, které odpovídaly geografické oblasti. V této práci byl analyzován nízký počet míst genomu, a proto se vliv lokality nálezu nijak neprojevil na rozlišení jednotlivých analyzovaných genotypů.



Obr. 9 – Dendrogram podobnosti na základě 4 SSR markerů

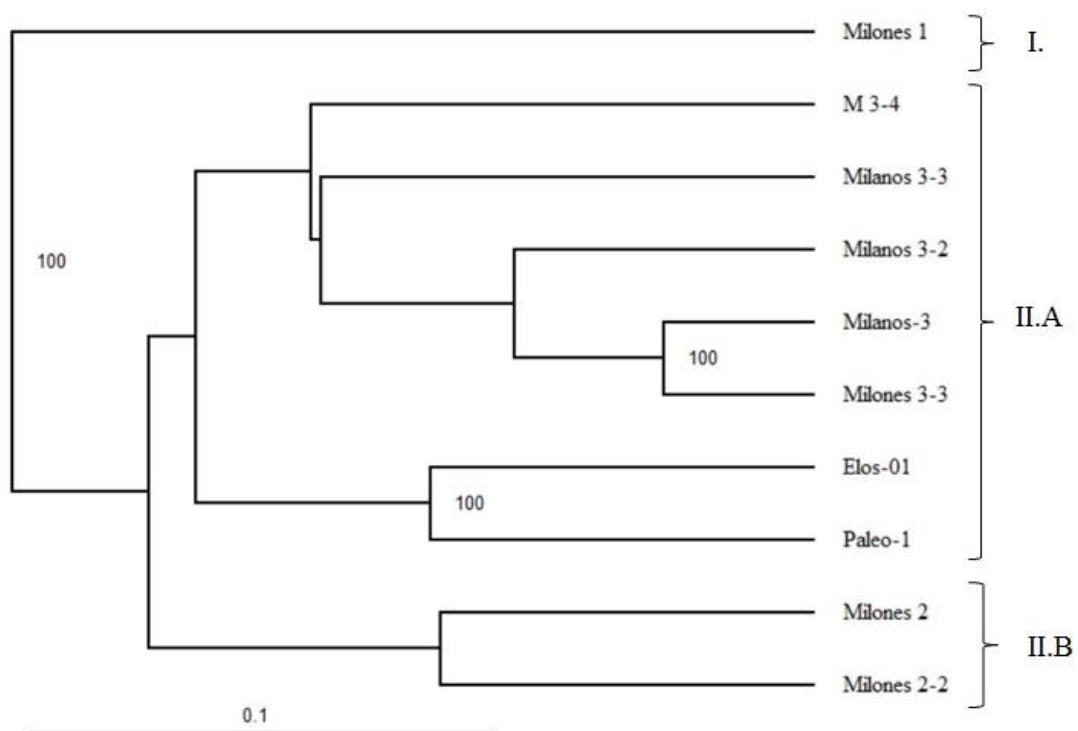
Podle vyhodnoceného polymorfizmu iPBS markerů byl sestaven dendrogram podobnosti (Obr. 10), na jehož základě můžeme pozorovat rozlišení genotypů do dvou klastrů (I. a II.). Klastř I. je tvořen pouze jedním genotypem Milones 1. Klastř II. může být rozdělen do dvou subklastrů II.A a II.B. Subklastř II.A je tvořen skupinou 7 genotypů (M 3-4, Milanos 3-3, Milanos 3-2, Milanos-3, Milones 3-3, Elos-01 a Paleo-1). Subklastř II.B se skládá ze 2 genotypů (Milones 2 a Milones 2-2). Baloch a kol. (2015a), který metodou iPBS analyzoval turecké položky hrachu, nepozoroval žádnou spojitost mezi místem výskytu a rozlišením do klastrů, i když byly shromážděny z různých geografických oblastí Turecka. To platí i v případě *L. neurolobus*, rozlišení do klastrů není v souladu s místem nálezu. Pouze genotypy rozlišené do subklastru II.B mají stejné místo nálezu.



Obr. 10 – Dendrogram podobnosti na základě 9 iPBS markerů

Dendrogramy získané na základě SSR a iPBS markerů se od sebe dost liší. Za přijatelný může být považován dendrogram na obrázku 10, protože je vytvořen na základě 9 iPBS markerů. Zatímco dendrogram na obrázku 9 je sestaven pouze ze 4 SSR markerů, z nichž 3 byly uniformní. Solberg a kol. (2015) studoval genetickou diverzitu 29 položek hrachu ze severní Evropy a podařilo se mu položky jasně odlišit s pouhými 5 SSR markery, které měly průměrně 4,4 alely na lokus. To znamená, že pokud jsou dobře zvolené markery, nemusí jich být vysoký počet, aby bylo dosaženo kvalitních výsledků. Na obrázku 11 je výsledný dendrogram sestavený celkem z 13 markerů. Tento dendrogram je identický s předchozím, který byl získán na základě iPBS markerů. Přidáním dat z SSR analýzy nebyl výsledný dendrogram ovlivněn.

Podle Yildiz a kol. (2015), který se zabýval čeledí *Malvaceae*, jsou iPBS markery velmi informativní pro studium genetické diverzity a k odlišení genotypů. Nicméně pro shlukovou analýzu související s geografickým původem položek, je účinnější metoda SSR markerů.



Obr. 11 – Dendrogram podobnosti na základě 4 SSR a 9 iPBS markerů

6 ZÁVĚR

Lathyrus neurolobus je středomořský planý druh z rodu *Lathyrus*, který v sobě skrývá potenciál pro šlechtitelské programy hrachu. Stejně jako další příbuzné plané druhy hrachu má některé prospěšné vlastnosti. Jedná se o vytrvalý druh, který je tolerantní vůči suchu.

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium genetické diverzity *Lathyrus neurolobus*. Byla testována použitelnost vybraných SSR a iPBS markerů pro stanovení fylogenetických vztahů v rámci druhu a na sestavených dendrogramech se sledovalo, zda vytvořené klastry souvisí s geografickou lokalitou nálezů.

Transponovatelné elementy, zejména retrotranspozony, představují velkou část rostlinných genomů, jejich replikační systém vytváří genetickou diverzitu a to z nich dělá výborný zdroj molekulárních markerů (Schulman a kol., 2004). Mnoho retrotranspozonových markerů mohlo být dosud využito jen v jednom druhu, ale díky nedávno vyvinuté metodě iPBS markerů mohou být univerzálně používány u všech rostlinných i živočišných druhů. iPBS markery již byly využity ke studiu genetické diverzity a odlišení genotypů několika druhů rostlin čeledi bobovité, např. u hrachu a čočky. Nicméně nebyly využity ke zkoumání genetické diverzity u žádného planého druhu.

Pro posouzení genetické diverzity *L. neurolobus* se metoda iPBS markerů ukázala jako velmi informativní. Z 83 univerzálních markerů bylo analyzováno 16, ze kterých 9 vykazovalo zřetelné polymorfnní fragmenty. V dřívějších fylogenetických analýzách čočky a hrachu bylo podle Baloch a kol. (2015a,b) pozorováno, že položky ze stejné geografické oblasti jsou umístěny do různých klastrů na dendrogramech. Tato skutečnost byla pozorována i v této práci.

Pro některé z SSR markerů navržených pro hrách platí přenosnost mezi druhy a rody a je možné díky nim zkoumat i plané druhy. SSR markery patří už dlouho dobu mezi nejpopulárnější markery pro charakterizaci genetické diverzity. Hlavní studie hrachu s využitím SSR markerů se zaměřovaly především na charakterizaci genofondových kolekcí, odlišení odrůd a určení genetické historie a geografického původu.

Zde byly přesněji analyzovány 4 SSR markery a pouze marker B13 mohl být považován jako užitečný pro studium genetické diverzity, další 3 markery byly uniformní. U druhu *L. neurolobus* ale funguje díky přenosnosti mezi rody dalších 22 SSR markerů. Proto by další analýzy měly být zaměřeny právě na tyto markery.

Jak již osvědčená metoda SSR markerů, tak i poměrně nová metoda iPBS markerů, mohou být pro budoucí studium zástupců čeledi bobovité velmi užitečné. Proto bych ráda využila poznatky a zkušenosti nabyté při zpracování bakalářské práce v navazující diplomové práci.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AHMAD S., SINGH M., LAMB-PALMER N.D., LEFSRUD M. & SINGH J., 2012: Assessment of genetic diversity in 35 *Pisum sativum* accessions using microsatellite markers. *Plant Science*, 92: s. 1075–1081.

ALZOHAIRY A.M., GYULAI G., RAMADAN M.F., EDRIS S., SABIR J.S.M., JANSEN R.K., EISSA H.F. & BAHIELDIN A., 2014: Retrotransposon-based molecular markers for assessment of genomic diversity. *Functional Plant Biology*, 41(8): s. 781–789.

AMBROSE M.J., 1995: From Near East centre of origin the prized pea migrates throughout world. *Diversity*, 11: s. 118–119.

BAČOVSKÁ N., 2015: Molekulární fylogeneze a genetická diverzita nejbližších příbuzných rodu *Pisum*. Bakalářská práce (in MS, dep. knihovna MENDELU v Brně), MENDELU Brno, 48 s.

BALOCH F.S., ALSALEH A., SÁENZ DE MIERA L., HATIPOĞLU R., ÇIFTÇI V., KARAKÖY T. & YILDIZ M., 2015a: DNA based iPBS-retrotransposon markers for investigating the population structure of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61: s. 244–252.

BALOCH F.S., DERYA M., ANDEDEN E.E., ALSALEH A., CÖMERTPAY G., KILIAN B. & ÖZKAN H., 2015b: Inter-primer binding site retrotransposon and inter-simple sequence repeat diversity among wild *Lens*, *Biochemical Systematics and Ecology*. 58: s. 162–168.

BERGMEIER E., ABRAHAMCZYK S., 2007: Ecology and distribution of the Aegean wetland endemics *Carex cretica* and *Lathyrus neurolobus*. *Nova Hedwigia*, 131: s. 207–219.

BHARGAVA A. & FUENTES F.F., 2010: Mutational dynamics of microsatellites. *Molecular Biotechnology*, 44: s. 250–266.

BRYANT J.A. & HUGHES S.G., 2011: *Vicia*, In: KOLE C., *Wild crop relatives genomic and breeding resources: Legume Crops and Forages*, Springer, s. 273–286.

BURSTIN J., DENIOT G., POTIER J., WEINACHTER C., AUBERT G. & BARANGER A., 2001: Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*. *Plant Breeding*, 120: s. 311–317.

- DOYLE J.J., 1995: DNA data and legume phylogeny: a progress report. In: CRISP M. & DOYLE J.J., *Advances in Legume Systematics, Phylogeny*, s. 11–30.
- ELLIS T.H.N., POYSER S.J., KNOW M.R., VERSHININ A.V. & AMBROSE M.J., 1998: Polymorphism of insertion sites of Ty1-copia class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. *Molecular and General Genetics*, 260: s. 9–19.
- FLEGR J., 2005: *Evoluční biologie*. Academia, Praha, 559 s. ISBN 8020012702.
- GRAHAM P.H. & VANCE C.P., 2003: Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3): s. 872–877.
- GROHME M.A., SOLER R.F., WINK M. & FROHME M., 2013: Microsatellite marker discovery using single molecule real-time circular consensus sequencing on the Pacific Biosciences RS. *BioTechniques*, 55(5): s. 253–256.
- GURUNG A.M. & PANG C.K., 2011: Lathyrus, In: KOLE C., *Wild crop relatives genomic and breeding resources: Legume Crops and Forages*, Springer, s. 117–125
- HAMPL V., PAVLÍČEK A. & FLEGR J., 2001: Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to *Trichomonad* parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: s. 731–735.
- HOUBA M., HOCHMAN M. & HOSNEDL V., 2009: *Luskoviny: pěstování a užití*. Kurent, České Budějovice, 133 s. ISBN 9788087111192.
- CHLOUPEK O., 2008: *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. Academia, Praha, 312 s. ISBN 978-80-200-1566-2.
- Invisorb®Spin Plant Mini Kit, 2011: *Protocol*, Stratec Molecular, 18 s.
- JACCARD P., 1908: Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin del la Societé Vaudoise des Scientes Naturalles*, 44: s. 233–270.
- JOHAN P., BELLO L., LUCKY O., MIDAU A. & MORUPPA S., 2011: Review: the importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Global Journal of Science Frontier Research*, 11(5): s. 5–12.
- KALENDAR R. & SCHULMAN A.H., 2006: IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols*, 1: s. 2478–2484.
- KALENDAR R., 2011: The Use of Retrotransposon-Based Molecular Markers to Analyze Genetic Diversity. *Field and Vegetable Crops Research*, 48: s. 261–274.

- KALENDAR R., ANTONIUS K., SMÝKAL P. & SCHULMAN A.H., 2010: iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*, 121: s. 1419–1430.
- KENICER G., NORTON S., 2008: *Lathyrus neurolobus*. *Curtis's Botanical Magazine, Kew*, 25(4): s. 310–316.
- KRESTOVICH S., MCFERSON J.R., 1992: Assessment and management of plant genetic diversity – considerations of intraspecific and interspecific variation. *Field Crops Research*, 29: s. 185–204.
- KUMARI P., BASAL N., SINGH A.K., RAI V.P., SRIVASTAVA C.P. & SINGH P.K., 2013: Genetic diversity in pea (*Pisum sativum* L.) using simple sequence repeats markers. *Genetics and Molecular Research*, 12 (3): s. 3540–3550.
- KUPICHA F., 1983: The infrageneric structure of *Lathyrus*, Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh, 41(2): s. 211–244.
- LEE P.Y., COSTUMBRADO J., HSU C.Y. & KIM Y.H., 2012: Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, s. 3923
- LEWIS G., SCHRIRE B., MACKINDER B. & LOCK M., 2005: *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- LORIDON K., MCPHEE K., MORIN J., DUBREUIL P., PILET-NAYEL M.L., AUBERT G., RAMEAE C., COYNE C., LEJEUNE-HENAUT I. & BURSTIN J., 2005: Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 111: s. 1022–1031.
- MAGEE A.M., ASPINALL S., RICE D.W., CUSACK B.P., SEMON M., PERRY A.S., STEFANOVIC S., MILBOURNE D., BARTH S., PALMER J.D., GRAY J.C., KAVANAGH T.A. & WOLFE K.H., 2010: Localized hypermutation and associated gene losses in legume chloroplast genomes. *Genome Research*, 20: s. 1700–1710.
- MANNINEN O., KALENDAR R., ROBINSON J. & SCHULMAN A.H., 2000: Application of BARE -1 retrotransposon markers to map a major resistance gene for net blotch in barely. *Molecular Genetics and Genomics*, 264: s. 325–334.
- MASON A.S., 2015: SSR Genotyping. In: BATLEY J. (ed). *Plant Genotyping*. Springer, 1245: s. 77–89.

- NASIRI J., HAGHNAZARI A. & SABA J., 2010: Genetic diversity among cultivars and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on SSR markers. *African Journal of Biotechnology*, 15: s. 3405–3417.
- NOVÁK J. & SKALICKÝ M., 2012: *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. Powerprint, Praha, 336 s. ISBN 9788087415535.
- OSKOUEIYAN R., OSALOO S.K., AMIRAHMADI A., 2014: Molecular phylogeny of the genus *Lathyrus* (Fabaceae-Fabeae) based on cpDNA matK sequence in Iran. *Iranian Journal of Biotechnology*, 12(2): s. 41–48.
- PEARCE S.R., HARRISON G., LI D., HESLOP-HARRISON J.S., KUMAR A. & FLAVELL A.J., 1996: The Ty1-copia group of retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation. *Molecular Genetics and Genomics*, 205: s. 305–315.
- RANA J.C., RANA M., SHARMA V., NAG A., CHAHOTA R.K. & SHARMA T.R., 2016: Genetic diversity and structure of Pea (*Pisum sativum* L.) germplasm based on morphological and SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 35: s. 118–129.
- REDDY M.R.K., RATHOUR R., KUMAR N., KATOCH P. & SHARMA T.R., 2010: Cross-genera legume SSR markers for analysis of genetic diversity in *Lens* species. *Plant Breeding*, 129: s. 514–518.
- ROSYPAL S., 2003: *Nový přehled biologie*. Scientia, Praha, 824 s. ISBN 8071832685.
- RUSSEL J., FULLER J., YOUNG G., THOMAS B., TARAMINO G, MACAULAY M., WAUGH R. & POWEL W., 1997: Discriminating between barely genotypes using micro-satellite markers. *Genome*, 40: s. 442–450
- SHARMA M.V., KANTARTZI S.K. & STEWARD J.M., 2009: Molecular diversity and polymorphism information content of selected gossypium hirsutum accessions. *Summaries of Arkansas Cotton Research*, s. 124–127.
- SHEDLOCK A.M. & OKADA N., 2000: SINE insertions: powerful tools for molecular systematics. *BioEssays*, 22: s. 148–160.
- SCHAEFER H., HECHENLEITNER P., SANTOS-GUERRA A., MENEZES DE SEQUEIRA M., PENNINGTON R.T., KENICER G. & CARINE M.A., 2012: Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabeae with special focus on the middle-Atlantic island lineages. *BCM Evolutionary Biology*, 12(1): 250. ISSN 1471-2148.

- SCHLÖTTERER C., 1998: Microsatellites. In: HOELZEL A.R., Molecular genetic analysis of populations: A practical approach, s. 237–261.
- SCHNABLE P.S., WARE D., FULTON R.S., STEIN J.C., WI F., PASTERNAK S., LIANG C., ZHANG J., FULTON L. & GRAVES T.A., 2009: The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 326: s. 1112–1115.
- SCHULMAN A.H., FLAVELL A.J. & ELLIS T.H., 2004: The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods in Molecular Biology*, 260: s. 145–173.
- SLAVÍK B., 1995: Květena České republiky 4. Academia, Praha, 530 s. ISBN 80-200-0384-3.
- SMÝKAL P., 2006: Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification. *Journal of Applied Genetics*, 47: s. 221–230.
- SMÝKAL P., 2009: Domestikace rostlin z pohledu současné genetiky. *Živa*, 1: s. 6–9.
- SMÝKAL P., 2011: Fylogeneze, biogeografie a genetická diverzita rodu hrách. *Živa*, 4: s. 151–154.
- SMÝKAL P., COYNE C.J., AMBROSE M.J., MAXTED N., SCHAEFER H., BLAIR M.W., BERGER J., GREENE S.L., NELSON M.N., BESHARAT N., VYMYSLICKÝ T., TOKER C., SAXENA R.K., ROORKIWAL M., PANDEY M.K., HU J., LI Y.H., WANG L.X., GUO Y., QIU L.J, REDDEN R.J. & VARSHINEY R.K., 2015: Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34 (1–3): s. 43–104. ISSN 15497836.
- SMÝKAL P., COYNE C.J., FORD R., REDDEN R., FLAVELL A.J., HÝBL M., WARKENTIN T., BURSTIN J., DUC G., AMBROSE M. & ELLIS T.H.N., 2008: Effort towards a world pea (*Pisum sativum* L.) germplasm core collection: the case for common markers and data compatibility. *Pisum Genetics*, 40: s. 11–14.
- SMÝKAL P., CHALOUPSKÁ M., BARIOTAKIS M., MAREČKOVÁ L., SINJUSHIN A., GABRIELIAN I., AKOPIAN J., TOKER C., KENICER G., KITNER M. & PIRINTSOS S., 2017: Spatial patterns and intraspecific diversity of the glacial relict legume species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. in Eurasia. *Plant Systematics and Evolution*, 303: s. 267–282.
- SMÝKAL P., KENICER G., FLAVELL A.J., CORANDER J., KOSTERIN O., REDDEN R.J., FORD R., COYNE C.J., MAXTED N, AMBROSE M.J. a ELLIS T.H.N.,

2011: Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*, 9(1): s. 4–18. ISSN 1479-2621.

SOLBERG S.O., BRANTESTAM A.K., OLSSON K., LEINO M.W., WEIBULL J. & YNDGAARD F., 2015: Diversity in local cultivars of *Pisum sativum* collected from home gardens in Sweden. *Biochemical Systematics and Ecology*, 62: s. 194–203.

VIEIRA M.L.C., SANTINI L., DINIZ A.L. & MUNHOZ C.F., 2016: Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetic and Molecular Biology*, 39(3): s. 312–328.

VIGOUROUX Y., JAQUETH J.S., MATSUOKA Y., SMITH O.S., BEAVIS W.D., SMITH J.S.C. & DOEBLEY J., 2002: Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. *Molecular Biology and Evolution*, 19: s. 1254–1260.

VINOD K.K., 2004: Total genomic dna extraction quality check and quantitation. In: Presented in the training programme on “Classical and modern plant breeding techniques – A hands on training”. Centre for Advanced Studies on Genetics and Plant Breeding, s. 109–121.

YILDIZ M., KOCAK M. & BALOCH F.S., 2015: Genetic bottlenecks in Turkish okra germplasm and utility of iPBS retrotransposon markers for genetic diversity assessment. *Genetic and Molecular Research*, 14 (3): s. 10588–10602.

ZOHARY D. & HOPF M., 2000: Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. Oxford University, Oxford. ISBN 0-19-850356-3.

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1 – *Lathyrus neurolobus*
- Obr. 2 – Morfologie květu *L. neurolobus*
- Obr. 3 – Rozšíření *L. neurolobus* v západní části Kréty
- Obr. 4 – Schéma iPBS amplifikace
- Obr. 5 – Mapa biogeografické historie *Fabeae*
- Obr. 6 – Quick-Load® 100 bp DNA Ladder
- Obr. 7 – Elektroforetogram, polymorfní SSR marker B13
- Obr. 8 – Elektroforetogram, polymorfní iPBS markery iPBS2271 a iPBS2394
- Obr. 9 – Dendrogram podobnosti na základě 4 SSR markerů
- Obr. 10 – Dendrogram podobnosti na základě 9 iPBS markerů
- Obr. 11 – Dendrogram podobnosti na základě 4 SSR a 9 iPBS markerů

SEZNAM TABULEK

- Tab. 1 – Rostlinný materiál pro DNA analýzy
- Tab. 2 – Reakční směs pro SSR analýzu
- Tab. 3 – Program PCR reakce
- Tab. 4 – Reakční směs pro iPBS analýzu
- Tab. 5 – Program PCR reakce
- Tab. 6 – Analyzované SSR markery
- Tab. 7 – Vyhodnocení vybraných SSR markerů
- Tab. 8 – Analyzované iPBS markery
- Tab. 9 – Vyhodnocení vybraných iPBS markerů

SEZNAM ZKRATEK

bp	base pair
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GDS	gelový dokumentační systém
iPBS	inter-primer binding sequence
IRAP	inter-retrotransposon amplified polymorphism
ITS	internal transcribed spacer
kb	kilobase pair
LDD	long distance dispersal
LTR	long terminal repeats
Ma	million years ago
NGS	next-generation sequencing
PBS	primer binding sequence
PCR	polymerázová řetězová reakce
QTL	quantitative trait locus
RBIP	retrotransposon-based insertion polymorphism
REMAP	retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism
RNA	ribonukleová kyselina
SSAP	sequence-specific amplification polymorphism
SSLP	simple sequence length polymorphism
SSR	simple sequence repeats
STR	short tandem repeats
Ta	annealing temperature
tRNA	transferová ribonukleová kyselina