

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2015**

**Bc. Michala Chaloupská**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra botaniky**



**Genetická diverzita *Vavilovia formosa* a  
*Pisum sativum* subsp. *elatius* (Fabeae,  
Fabaceae)**

**Diplomová práce**

**Bc. Michala Chaloupská**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**

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

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Petra Smýkala, Ph.D. a jen s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci 5.5. 2015

---

podpis

## **Poděkování:**

Největší díky patří mému vedoucímu diplomové práce Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. Chtěla bych mu touto cestou poděkovat za vedení, podporu a jeho nápady na vylepšení práce, jak při získávání výsledků v laboratoři tak při stylistických úpravách této práce. Další veliké díky patří RNDr. Miloslavovi Kitnerovi, Ph.D. a Mgr. Lucii Marečkové za zaučení do tajů AFLP. Nesmím opomenout i další pracovníky univerzity, s kterými jsem se potkávala v laboratoři a kteří mi vždy ochotně pomáhali, když bylo potřeba.

V roce 2014 jsem mohla díky finanční podpoře z projektu IGA\_Pr\_f\_2014001 vycestovat do Maďarska na přirozenou lokalitu hrachu, což pro mě bylo velikým přínosem. Práce v laboratoři byla podpořena granty PrF-2013-003 IGA\_Pr\_f\_2014001, IGA\_Pr\_f\_2015\_001.

Za ochotu snášet mé libé či nelibé projevy a pocity nad touto prací chci poděkovat hlavně mé skvělé rodině, mému úžasnému příteli a kamarádům, od kterých jsem čerpala sílu a vůli vše dotáhnout do konce. Na Vaši podporu a uklidňování nikdy nezapomenu.

Děkuji Vám.

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora: Michala Chaloupská

Název práce: Genetická diverzita *Vavilovia formosa* a *Pisum sativum* subsp. *elatius* (*Fabeae*, *Fabaceae*)

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP

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

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt: Práce se zabývá analýzou genetické diverzity populací dvou druhů, *Vavilovia formosa* a *Pisum sativum* subsp. *elatius*. Pomocí molekulárních metod (SSR) byla zjištěna 1% heterozygotnost rodu *Pisum* u 253 vzorků z 11 populací a vzájemná příbuznost mezi studovanými populacemi hrachu. Genetická diverzita a příbuznost mezi jednotlivými populacemi u obou druhů byly diagnostikovány pomocí dominantních markerů AFLP. Hodnoty očekávané genetické heterozygotnosti ve sledovaných populacích se pohybovaly v rozmezí 0,004 do 0,268 u druhu *P. sativum* subsp. *elatius* a u *V. formosa* 0,077 (Turecko) a 0,098 (Arménie). V případě ohroženého horského druhu *Vavilovia formosa* byla provedena analýza genetické diverzity pomocí sekvenační analýzy ITS a vybraných cpDNA markerů na dostupných herbářových položkách reprezentující geografický areál druhu. Úseky *matK* objevily 2 haplotypy druhu *Vavilovia formosa*, které vykazovaly částečnou geografickou strukturovanost s překryvem v Arménii a Dagestánu.

Klíčová slova: hrách, heterozygotnost, genetická diverzita, *Pisum*, reprodukční systémy, *Vavilovia*, tok genů

Počet stran: 76

Počet příloh: 4

Jazyk: čeština

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Michala Chaloupská

Title: Genetic diversity of *Vavilovia formosa* and *Pisum sativum* subsp. *elatius* (*Fabeae*, *Fabaceae*)

Type of thesis: Dissertation thesis

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

The year of representation: 2015

Abstract: The thesis analyzes the genetic diversity of populations of two species *Vavilovia formosa* and *Pisum sativum* subsp. *elatius*. The detected rate of heterozygosity was 1% of genus *Pisum* at 253 samples representing 11 populations and genetic relationship between studied populations of pea was observed using molecular methods (SSR). Genetic diversity and relationship among various populations of both species were diagnosed with dominant AFLP markers. The method revealed expected genetical heterozygosity in range of 0,004 to 0,268 (*P. sativum* subsp. *elatius*) and by *V. formosa* revealed 0,077 (Turkey) and 0,098 (Armenia). The analysis of the genetic diversity was performed using sequence analysis of ITS and selected cpDNA markers on the available herbarium items be a representative of geographic area species in the case of endangered mountain species *Vavilovia formosa*. The regions of *matK* discovered two haplotypes of species *Vavilovia formosa* which were geographically structured with overlap in Armenia and Dagestan.

Keywords: gene-flow genetic diversity, heterozygosity, pea, *Pisum*, reproduction systems, *Vavilovia*,

Number of pages: 76

Number of appendices: 4

Language: Czech

## Obsah

1	ÚVOD.....	8
1.1	Čeleď Leguminosae.....	8
1.2	Podčeleď <i>Fabeae</i> .....	10
1.3	Popis jednotlivých rodů.....	12
1.3.1	Rod <i>Pisum</i> L.....	12
1.3.2	Rod <i>Vavilovia</i> / druh <i>Vavilovia formosa</i> (Stev.) Fed. ....	14
1.4	Studium genetické diverzity rodu <i>Pisum</i> .....	15
2	METODIKA.....	18
2.1	Rostlinný materiál.....	18
2.2	Maďarsko, lokalita Villany (hora Szársomlyó).....	21
2.3	Izolace DNA.....	24
2.4	PCR amplifikace - sekvenování.....	24
2.5	SSR (Simple Sequence Repeats):.....	26
2.6	AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism):.....	27
2.6.1	Restrikce.....	28
2.6.2	Ligace.....	29
2.6.3	Preselektivní amplifikace.....	30
2.6.4	Selektivní amplifikace.....	32
2.6.5	Příprava gelu:.....	34
2.6.6	Postup při vyvolávání gelu:.....	36
2.7	Niche modelling.....	38
3	VÝSLEDKY.....	39
3.1	Sekvenační analýza.....	39
3.2	Mikrosatelity (SSR).....	40
3.3	AFLP.....	45
3.4	Niche modelling.....	53
4	DISKUZE.....	56
5	ZÁVĚR.....	64
6	PŘÍLOHY.....	65
7	CITACE.....	67

# 1 ÚVOD

## 1.1 Čeleď Leguminosae

Taxonomie této čeledi je dosud ne zcela jednotná a existující tři alternativní možnosti zařazení: 1) *Leguminosae* je chápána jako čeleď a *Mimosoideae* a *Caesalpinioideae* jako podčeledi, nebo 2) *Leguminosae* = *Fabaceae*, zahrnující tři podčeledi: *Faboideae* (= *Papilionoidae*), *Mimosoideae* a *Caesalpinioideae*, a nebo 3) *Fabaceae* (= *Papilionaceae*) je chápána jako čeleď stejně jako *Mimosaceae* a *Caesalpiniaceae* (Lewis et al. 2005).

Čeleď *Leguminosae* zahrnuje byliny a dřeviny, s výjimkou rostlin adaptovaných na vodní prostředí. Rostliny patřící do *Leguminosae* (*Fabaceae*) rostou často na půdách ochuzených o dusík, proto na svých kořenech mají speciální útvary - hlízky, které jim vyrůstají po infekci nitrogenními bakteriemi rodu *Rhizobium*, což jim dává výhodu ve srovnání s jinými druhy rostlin. Jedná se o symbiózu, kde bakterie metabolizují atmosférický dusík na amonný iont, který využívá hostitelská rostlina za úplatek v podobě jednoduchých cukrů a peptidů, které si naopak bakterie berou od rostliny. Rostliny čeledi *Leguminosae* mají listy střídavé, nejčastěji složené, jednoduše zpeřené nebo dlanitě složené, vzácněji jednoduché, palistnaté, výjimečně palisty chybějí. Listy v případě rodů *Lathyrus* L. a *Pisum* L. jsou ukončené úponkem. Květenství je hroznovité (rod *Vicia* L.), méně často jsou květy jednotlivé (rody *Lathyrus*, vzácněji *Vicia*, *Pisum* a *Vavilovia* (Stev.) Fed. Květy jsou oboupohlavné, souměrné, kalich srůstá z pěti lístků, korunu tvoří pět lístků volných rozlišených na pavézu, křídla a člunek, kde pavéza je v rovině souměrnosti. V pupenu pavéza obaluje ostatní části květu (sestupná estivace). Dva sousedící lístky - křídla, a člunek srůstající ze dvou zbylých lístků. Tyčinek bývá 10 v kruhu, buď 10 nitkami srostlých, nebo 9 srostlých a jedna volná pod pavézou. Vzácněji jsou volné všechny. Pylová zrna jsou samostatná, trikolpátní výjimečně tetrakolpátní. Apokarpní gyneceum je tvořeno jedním plodolistem, semeník je svrchní, vajíčka četná nebo pouze jedno, příčná, s jedním až dvěma integumenty, čnělka je terminální, vyrůstající na břišním švu. Plodem je lusk (legume) pukající v jednom nebo ve dvou švech, lusk ve většině případech postrádá přepážky, vzácně se vyskytuje s podélnou přepážkou. Může být nepukavý jako obdoba nažky, s jedním nebo více semeny, nebo zaškrcovaný a lámavý na jednosemenné díly (obdoba struku



např. u rodu *Coronilla* L). Semena bez endospermu nebo s endospermem nepatrně vyvinutým jsou často se strofiolou (masitý výrůstek na bázi poutka). Embryo této čeledi má velmi mohutně vyvinuté dělohy bohaté na škrob (30-60%) a bílkoviny (20-40%) a zralé semeno většinou postrádá endosperm. Klíčení je epigeické (děložní lístky jsou vynášeny nad povrch jen u některých rostlin např. *Phaseolus* L.) nebo hypogeické (děložní lístky zůstávají pod zemí, např. *Pisum*) (Skalická & Skalický 1995). Čeleď zahrnuje 850 rodů a 24 tisíc druhů rozšířených téměř po celém světě (Lewis *et al.* 2005). Dřeviny rostou spíše v teplejších oblastech, bylinné a vývojově starší dřeviny v meridionálním až temperátním pásu (Skalická & Skalický 1995).

Tabulka č. 1: Hlavní diagnostické znaky podčeledí.

<b>Caesalpionideae</b>	<b>Mimosoideae</b>	<b>Papilionoideae</b>
stromy, keře, liány	stromy, keře, liány, zřídka vodní byliny	byliny, keře, stromy, liány
relativně velké květy	malé květy uspořádané do hlávky nebo klasu	Typické hráškovité (motýlokvěté) květy
zygomorfni květy	aktinomorfni, radiálně souměrné	zygomorfni květy
okvětní lístky v poupěti střechovité	okvětní lístky se v poupěti nepřekrývají, ale jen dotýkají	okvětní lístky v poupěti střechovité
pokud je střední okvětní lístek přítomen, překrývá ostatní	střední lístek nepřekrývá ostatní, je ve stejném tvaru a velikosti	střední okvětní lístek (klasická pavéza nebo prapor) přečnává ostatní (ty občas chybí)
kališní lístky obvykle volné	kališní lístky (a okvětní) na bázi spojené	kališní lístky srostlé v kalich
semena bez pleurogramu (pokud je uzavřený) postrádá také hilum	semena s otevřeným pleurogramem	u tvrdých semen pupek (hilum) přítomno, pleurogram chybí
klíček rovný	klíček rovný	klíček zakřivený
listy dvakrát zpeřené, vzácně jednoduché nebo složené	listy dvakrát zpeřené často se specializovanými žlázami, australské akáty mají phylloides	listy jednoduché nebo jednou zpeřené, některé zakončené úponkem, pouze některé druhy dvakrát zpeřené
tyčinky (1-) 10 a více, někdy dimorfické nebo heteromorfické	tyčinky (3-) 10 a více někdy přes 100	tyčinky (9-) 10 a více, někdy dimorfické
nejvíce nápadnou částí jsou okvětní lístky	nejvíce nápadnou částí jsou tyčinky	nejvíce nápadnou částí jsou okvětní lístky
polyads vzácně	polyads běžně	pyl je v samostatných

		zrnkách
hlízky na kořenech méně časté, ale často v symbióze s houbami	hlízky na kořenech přítomny	hlízky na kořenech přítomny

(dle Lewis *et al.* 2005)

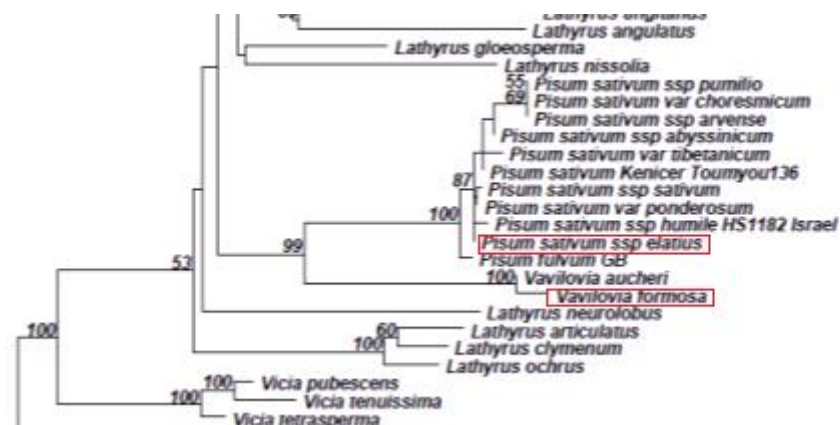
## 1.2 Podčeleď *Fabeae*

Podčeleď *Fabeae* (*syn. Viciaeae*) zahrnuje pět rodů, z nichž některé patří mezi ekonomicky významné luskoviny pěstované na zrno: hrachor, *Lathyrus* (160 druhů), čočka, *Lens* Medik. (4 druhy), hrách, *Pisum* (2-3 druhy) a vikev, *Vicia* (140 druhů). Zbývající monotypický rod je *Vavilovia formosa* (Schaefer *et al.* 2012). Podčeleď je morfologicky charakterizována zpeřenými listy, často ukončenými úponkem, a čnělkou zakončenou kartáčkem. Tvar čnělky a uspořádání chloupků na čnělce jsou jedním z hlavních diagnostických znaků mezi rody *Fabeae* (Kupicha 1981, Endo *et al.* 2008). Tato podčeleď pravděpodobně vznikla ve východním Středomoří v období Miocénu před 10-20 milióny let. Během doby své existence se nejméně 39 krát rozšířila na území Eurasie, 7 krát do Ameriky, 2 krát do tropické Afriky a 4 krát na území Makaronésie (Schaefer *et al.* 2012).

Taxonomicky je podčeleď *Fabeae* velmi zajímavou skupinou. Podčeleď *Fabeae* byla v rámci čeledě *Leguminosae* považována za monofyletickou větev a vložena do podčeledi *Trifoleae* (Kupicha 1981, Wojciechowski *et al.* 2004, Steele & Wojciechowski 2003, Lock & Maxted 2005). V rámci *Fabeae*, rod *Vicia* je kladisticky vložený do rodů *Pisum*, *Lens* a *Lathyrus* takže je k nim parafyletický (Steele & Wojciechowski 2003, Endo *et al.* 2008). Fylogenetické vztahy podčeledi nejsou dosud uspokojivě vyřešeny, především vzhledem k nedostatečnému počtu analyzovaných druhů. Schaefer *et al.* (2012) provedl molekulární analýzu 262 druhů tj. 70% druhů z této podčeledi, která prokázala, že rody *Vicia* a *Lathyrus* nejsou monofyletické: rody *Pisum* a *Vavilovia* byly zahrnuty do rodu *Lathyrus* a rod *Lens* byl zahrnut do rodu *Vicia*. Dále bylo zjištěno, že *Vicia hirsuta*, *Vicia sylvatica* a další především endemické druhy (*V. capreolata* Lowe, *V. costae* A. Hansen, *V. ferreirensis* Goyder a další) Makaronésie (tj. Kanárských, Azorských ostrovů a Madeiry) jsou zahrnuty v malém, ale dobře podporovaném sesterském kládu všech ostatních rodů v podčeledi. Komerční význam domestikovaných zástupců podčeledi *Fabeae* i rozmanitost volně žijících druhů zajišťuje poměrně stálý taxonomický

výzkum (Smýkal *et al.* 2015). Za posledních 50 let byla použita celá řada molekulárních markerů k odvození fylogenetických vztahů ve skupině. Rané dílo zahrnovalo chemotaxonomickou práci badatele jako je Simola (1966), který se zaměřil na aminokyseliny a flavony jako případné markery. První studie analyzující DNA využívaly RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Croft *et al.* 1999) a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) metody (Asmussen & Liston 1998).

Několik rodů z podčeledi bylo studováno pomocí sekvenační analýzy chloroplastového genu pro ribulózu bisfosfát karboxylázu (*rbcL*) (Kass & Wink, 1996, Doyle *et al.* 1997) a později pomocí chloroplastového genu pro maturázu K (*matK*) (Wojciechowski *et al.* 2004). Tyto dvě oblasti chloroplastových (cpDNA) genů jsou běžně používány pro rekonstrukci fylogeneze na vyšší taxonomické úrovni, jako je mezi rody v čeledi. Steele & Wojciechowski (2003) prokázali využitelnost *matK* při studiu fylogeneze jednotlivých druhů podčeledí *Trifolieae* a *Fabaeae*. V této práci vytváří *Lathyrus* a *Pisum* jednu skupinu, zatímco *Vicia* není formulována jako monofyletická skupina, ale byla označena za parafyletickou s rody *Lathyrus*, *Pisum* a *Lens*, které jsou vloženy do ní. Další velmi často využívanou oblastí genomu chloroplastu je oblast pro tRNA, jako je *trnL-F*, tato oblast se ukázala být informativní pro rod *Vicia* (Fennel *et al.* 1998) a v kombinaci s *trnS-G* oblastí i u rodu *Lathyrus* (Kenicer *et al.* 2005). Jaderně kódovaný Internal Transcribed Spacer (*ITS*) rDNA byl použit v mnoha studiích podčeledi, včetně rodu *Lens* (Mayer & Bagga 2002), *Pisum* L. (Polans & Saar 2002), *Vicia* (Endo *et al.* 2008) a v kombinaci s oblastmi cpDNA, u rodu *Lathyrus* (Kenicer *et al.* 2005, Kenicer 2007).



Obrázek č. 1: Fylogenetická příbuznost, červeně vyznačené jsou druhy kterými se zabývá tato diplomová práce (dle Schaefer *et al.* 2012).

Pro získání výsledků byly v diplomové práci použity metody AFLP, SSR a sekvenace jaderné a chloroplastové DNA.

### 1.3 Popis jednotlivých rodů

#### 1.3.1 Rod *Pisum* L.

Jedná se o jednoleté byliny s přímými lodyhami. Kořeny jsou vřetenovité a dlouhé. Sudozpeřené listy jsou zakončeny úponkou, v mládí složené podle středové žilky. Palisty jsou bylinné a velké. Úžlabní květenství je dlouhé a stopkaté s chudokvětými (1 - 2 květy) hrozny. Kalich je zvonkovitý. Koruna bílé barvy bývá často narůžovělá, namodralá nebo 2 – 3 barevná. Pavéza a křídla mají velkou čepel. Tyčinky jsou uspořádané jako devět srostlých a jedna volná. Semeník je přisedlý, čnělka dorzoventrálně zploštělá a na vrcholu rozšířená, na vnější straně rýhovaná a na vnitřní straně pod vrcholem chlupatá. Plodem je lusk otevírající se v obou švech, mnohosemenné, podlouhlé, na vrcholu zúžené v zobánek, nezaškrcované. Semena kulovitá až zaobleně mnohohranná s podlouhlým hilum. Jedná se diploida  $2n = 14$ . Asi 2 - 3 druhy s rozšířením po jižní Evropě, Středozeří, jihovýchodní Asii, severní Africe včetně Etiopie (*P. sativum* subsp. *abyssinicum*) (Chrtíková 1995, Ambrose & Maxted 2001, Smýkal *et al.* 2015).

Na základě morfologických charakteristik bylo určeno nejdříve pět druhů rodu *Pisum* (Gorovov 1937), později byly tyto označeny jako poddruhy podle Makashevy (1979). Karyologická bariéra *P. sativum* a jednoznačné fenotypové rozdíly podporují teorii druhů (Lamprecht 1963). Centrum genetické rozmanitosti hrachu je široká oblast vedoucí přes Turecko, Sýrii, Irák, Izrael a Libanon. Rozšiřuje se dále na východ do střední Asie (především Írán, Afghánistán, Pákistán a Turkmenistán) (Smýkal *et al.* 2011). Etiopie je považována za sekundární centra diverzity (van der Maesen *et al.* 1998). Podle Vavilova (1949) naopak patří Etiopie společně se Středomořím a střední Asii do primárních center, zatímco Blízký východ jako sekundární. Fylogeneticky existují dvě volně žijící populace popsány jako poddruhy *P. sativum* L. nebo jako druhy *P. sativum* subsp. *elatus* Bieb. a *P. sativum* subsp. *sativum* (*P. humile* Boiss a Noe, syn. *P. syriacum* (Berger) Lehm. (Ben-Ze'ev

& Zohary, 1973). Tyto dvě plané skupiny jsou morfologicky, ekologicky a také geneticky odlišné. Pomocí křížení prováděné Ben-Ze'ev & Zohary (1973) zahrnující genotypy *P. sativum* subsp. *elatius* (M. Bieb.) Aschers. & Graebn., *P. sativum* subsp. *sativum* (*P. humile* Boiss. et Noe), *P. fulvum* Sm. a kulturní *P. sativum*, můžeme tyto druhy definovat jako primární genofond *P. sativum* shromážděné včetně volně žijících *P. sativum* subsp. *elatius*. Sekundární genofond je pak uložen v *P. fulvum* a do terciárního genetického fondu spadá pouze *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. (Smýkal *et al.* 2015). Domestikace kultivovaného hrachu z tzv. severních populací byla navržena Ben-Ze'ev & Zohary (1973), ale zdroj by měl být rovněž ze "severního *P. elatius*" (Kosterin *et al.* 2010; Smýkal *et al.* 2011).

*P. sativum* L.

- subsp. *sativum* (zahrnuje var. *sativum* and var. *arvense*)
- subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. & Graebn

(zahrnuje var. *elatius*, var. *brevipedunculatum* and var. *pumilio*)

- *P. fulvum* Sibth. & Sm.
- *P. abyssinicum* A.Br. v současnosti spíše považovaný za poddruh *P. sativum* subsp. *abyssinicum*
- *Vavilovia formosa* (*P. formosum*) (Stev.) Fed.

Ve své diplomové práci se věnuji druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. & Graebn. Tedy druhu, který představuje divoce rostoucího příbuzného k polní plodině - hrachu.

**Druh *Pisum sativum* subsp. *sativum*, *P. s.* subsp. *elatius* (Bieb.) Aschers. & Graebn.**

*P. s.* subsp. *elatius* má květy dvojbarevné. Lusky jsou dlouhé 7 - 12 mm, semena bývají velmi hustě pokrytá papilami. Stopky jsou 4krát delší než palisty. U *P. s.* subsp. *sativum* pokrytí semen papilami chybí, jsou hladká nebo vráscitá. Stopky jsou pouze 2krát delší než palisty. Kvete bíle nebo dvoubarevně. Lusky jsou stejně dlouhé, ale zřídka mohou dosahovat až 30 mm. Podle některého taxonomického členění tento poddruh zahrnuje ještě dvě varianty (Ambrose and Maxted, 2001,

Shehadeh) i když jejich taxonomická hodnota je diskutabilní. Jedná se v podstatě jen o odlišení pigmentovaných (var. *arvense*) a bělokvětvých (var. *sativum*) kulturních hrachů.

- *P. s.* subsp. *e.* var. *sativum*
- *P. s.* subsp. *e.* var. *arvense*

*Pisum sativum* subsp. *elatius* zahrnuje tři varianty:

- *P. s.* subsp. *e.* var. *elatius*, vysoký 60 - 200 mm, který může kvést ve svazečku po 2 - 3 květech, ale standardně kvete po jednom. Stopky má 2 - 4krát delší než palisty. Lístky má spárované po 3 - 4, vzácněji po 2. Květy jsou velké 25 - 30 mm.

- *P. s.* subsp. *e.* var. *brevipedunculatum*, vysoký 30 - 60 mm, který kvete po jednom květu. Stopky má stejně dlouhé jako palisty. Lístky má spárované po 2 - 3, vzácněji po jednom. Květy jsou velké 20 - 22 mm.

- *P. s.* subsp. *e.* var. *pumilio*, vysoký 10 - 30 cm. Lístky má spárované po 1 - 3, eliptické nebo elipticky obvejčité, obvykle ± zubaté. Lusky má 45 - 45 x 7 - 8 mm velké. Květy jsou velké 15 - 18 mm (Shehadeh - nepublikováno).

### 1.3.2 Rod *Vavilovia* / druh *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed.

*Vavilovia* byla dlouho na seznamu nezvěstných, ne-li vyhynulých rostlin. Poprvé vavilovii popsal botanik Steven v roce 1812 jako *Orobis formosus* Stev. V roce 1939 taxonomicky upravil tuto rostlinu Andrey Fedorov a pojmenoval ji po N. I. Vavilovovi. Expedice v roce 2009 (Akopian 2010), odstartovala zvýšený zájem o tuto rostlinu u botaniků, pro které představuje takovou malou senzaci. A to například z důvodu, že je to monofyletický taxon, ale taky z důvodu, že by mohla představovat fylogenetické pojitko mezi rody *Lathyrus* a *Pisum* (Mikič *et al.* 2010).

#### Druh *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed.

*Vavilovia* je vytrvalá vysokohorská bylina (najdeme ji v 1300-2800 m n. m., ale i ve vyšších polohách) s dlouhými podzemními oddenky. Podzemní oddenky jsou pro rostlinu nepostradatelné, umožňují jí přežít na kamenných půdách, pohyblivých sutích nebo přežít spásání herbivorů. Stonky jsou 5 - 15 cm dlouhé, poléhavé, štíhlé, neokřídlené a lysé. List je složený s malým semisagitálním palistem,

má jeden pár klínovitých až obvejčitých lístků. Listy jsou zakončené zřetelnou špičkou, na stonek nasedají přímo. Květ je velký, fialové nebo růžové barvy. Lusky jsou čárkovitě podlouhlé, 20 - 35 mm dlouhé. Semena bývají po 3 - 5 (Davies 1970). Semena jsou kulovitá nebo oválná s tmavými skvrnami na povrchu. Stejně jako u rodu *Pisum* se jedná o diploida  $2n = 14$  chromosomů, jeho karyotyp je složen z submetacentrických chromozomů a metacentrických (Mikič *et al.* 2010). Geografické rozšíření je omezeno ekologií - preferuje vysokohorské suť (viz příloha č. 1). Centrum biodiverzity je střední a východní část Kavkazu (Arménie, Gruzie, Rusko), Taurus (Turecko, Irák), Irán a Libanon (Akopian 2010, Mikič 2012).

#### 1.4 Studium genetické diverzity rodu *Pisum*

Jing *et al.* 2010 popisuje genetickou diverzitu jako reakci jedinců druhu na životní prostředí. Výsledkem této reakce je kumulativní mutace, rekombinace a selekce. Velkou roli v diverzitě hraje i velikost areálu druhu. Právě podle velikosti areálu lze posoudit, jak se daný druh dokáže přizpůsobit různým podmínkám prostředí. Z planého druhu *Pisum sativum* byly vybírány ty rostliny, co nesly výhodnější znaky pro zemědělce. Upřednostňovány byly větší semena, tenčí osemení a nejvyšší možný výnos. Tento silný výběr zúžil genetickou variabilitu původního druhu a vznikl kulturní hrách. Přestože je kulturní hrách znám několik tisíciletí, stále se uchovávají původní genetické zdroje, z kterých byl vyšlechtěn. Mapují se i další populace příbuzných planých druhů a jejich znaky jako potencionální zdroj genetické variability (Jing *et al.* 2010).

*P. sativum* L. zahrnující (*P. sativum* subsp. *sativum* a subsp. *elatius* Asch. & Grain) najdeme ve střední Evropě, Středomoří a v severozápadní Asii. Zatímco *P. fulvum* Slight Sm. nalezneme pouze na Blízkém východě. *Pisum sativum* subsp. *abyssinicum* A. Braun se pěstuje (spolu s *P. sativum* subsp. *sativum*) ve východní Africe. Tento taxon je původem z Etiopie a Jemenu a má velmi nízkou genetickou diverzitu.

Primární genový pool kulturního hrachu se skládá z *Pisum sativum* / *elatius* komplexu. I když je obtížné ho definovat, protože existuje určitá hranice fertility způsobená jaderně-cytoplasmatickým konfliktem, který je v rámci druhu *P. sativum* (Bogdanova *et al.* 2009, Bogdanova *et al.* 2015). Sekundární genový pool zahrnuje *P. fulvum* a *P. sativum* subsp. *abyssinicum*. Podle nových poznatků o

fylogenetických vztazích do sekundárního poolu patří i druhy rodu *Lathyrus*, zejména úzce příbuzných druhů *L. ochrus*, *L. clymenum*, *L. articulatus* L. a *L. neurolobus* Boiss. & Heldr. (Schaefer *et al.* 2012). Terciární genový pool v současné době tvoří *Vavilovia formosa* (Steve.) Fed. a některé druhy rodu *Vicia* a *Lathyrus* (Smýkal *et al.* 2015).

Při studiu genetické variability se nejčastěji používá molekulárních markerů. S ohledem na finanční stránku a kvalitu analýz je dosud nejčastěji používáno mikrosatelitních markerů. V práci Jing *et al.* (2010) použili na studium diverzity metodu RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism). Jedná se PCR reakci, detekující inzerci retrotransposonu v daném lokusu. Následně se detekuje přítomnost nebo absence retrotranspozomu (Jing *et al.* 2010).

U kulturních plodin můžeme studovat genetickou diverzitu pomocí deskriptorů, které se liší pro každou plodinu a nabývají různých morfologických znaků. Takto bylo zaměřeno několik studií (Sardana *et al.* 2007, Sarikamis *et al.* 2010, Azmat *et al.* 2012). S různými technikami se setkáváme i v oblasti molekulární biologie. Pomocí sekvenačních analýz, SSR, AFLP, RBIP a dalších metod bylo možné v průběhu posledních dvou desetiletí studovat genetickou variabilitu mnoha druhů rostlin včetně hrachu (Baranger *et al.* 2004, Loridon *et al.* 2005, Smýkal *et al.* 2008, 2011 atd.). Ze všech studií vyplývá společný názor: *Pisum* je rozmanitý rod a jeho genetická diverzita je velmi strukturována (Ellis 2011, Smýkal *et al.* 2011, 2013) (Smýkal 2015).

V diplomové práci jsem se zabývala analýzou genetické diverzity planého předchůdce kulturního hrachu *Pisum sativum* subsp. *elatius* a druhem *Vavilovia formosa*, který je dle Schaefer *et al.* 2012 blízce příbuzný. V této práci byla genetická diverzita studována pomocí sekvenačních analýz, SSR a AFLP.

### **Hybrid mezi *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. a *Pisum* L.**

Díky příbuznému fylogenetickému vztahu a stejnému počtu chromozomů ( $2n = 14$ ), lze hrách a vavilovii omezeně křížit (Atlagic *et al.* 2010). Jediné informace o pokusech vytvořit hybridy mezi vavilovií a jiným druhem pochází od Dr. Golubeva z N. I. Vavilova institutu (VIR) v Petrohradě, v Rusku. Jednalo se o kombinaci mateřské rostliny *V. formosa* a otcovské *Pisum sativum*. Vzniklo několik normálně



vyvinutých semen F1 generace, ale pouze jedna rostlina byla životaschopná. Hybrid byl s bazálními větvemi, měl dlouhá internodia, bez bočních větví. Listy byly trojčetné, okrajové, větší než vrcholový lístek. Rostlina neprodukovala semena ani nedorostla do generativní fáze. Zvadla v důsledku chlorózy (možná v důsledku jaderně-cytoplasmatického konfliktu, Bogdanova *et al.* 2007, 2009). Reciproké křížení produkovalo opět F1 hybridní rostliny s bočními větvemi o mnohem delšími, než bývá u *Pisum* či *Vavilovia*. Hybridi měly i květy a lusky, které obsahovaly buď nezralá nebo neoplozená semena (Golubev 1990). Bohužel hybridní F1 rostliny nebyly zachovány.

## 2 METODIKA

Náplní této diplomové práce bylo zjištění genetické variability druhů *Vavilovia formosa* a *Pisum sativum* subsp. *elatius* pomocí různých molekulárních metod. U rodu *Vavilovia* byla testována metoda mikrosatelitních repetic (SSR), AFLP a sekvenační analýza úseků *mat K*, *ITS*, *trn H - psb A*, *trn F - L*, *rbcL*, *trn S - G*, *rpl 32*, *rpl 32 - Ndh*.

U rodu *Pisum* byla použita metoda SSR, AFLP. Sekvenování (viz tab. č. 6) rodu *Pisum* proběhlo u 11 vzorků, kde byl vždy jeden vybrán jako zástupce celé populace.

### 2.1 Rostlinný materiál

Tabulka č. 2: Rostlinný materiál použitý při práci (*Vavilovia formosa*)

	<i>Vavilovia formosa</i>	GPS-N	GPS-E	(m n. m.)
<b>1. populace</b>	24 jedinců, hora Ughtasar, Arménie	39°41'11.37"	46°03'36.01"	3330
<b>2. populace</b>	6 jedinců, hora Ughtasar, Arménie	39°41'18.01"	46°03'31.85"	3401
<b>3. populace</b>	17 jedinců, pohoří Taurus, Turecko	36°36'13.61"	30°5'39.03	2055

Sekvenační analýze byly podrobeny vzorky z herbářových položek (viz tab. č 3) a vždy jeden vzorek z populace 1 (Arménská) a 3 (Turecká). Tyto populace jsou popsány v tabulce č. 2.

Tabulka č. 3: Herbářové položky použité při sekvenační analýze.

RBGE number	Země	GPS-N	GPS-E	(m n. m.)
E00158112	Turecko	39° 09' 54"	45° 59' 42"	3200 - 3300
E00158111	Turecko	37° 23' 60"	31° 10' 12"	2100
E00294270	Libanon	39° 52' 26.4"	41° 15' 32.4"	3200
E00162353	Turecko	38° 23' 24"	39° 40' 04.8"	2134 - 2438
E00162350	Turecko			
E00162351	Írán	35° 57' 18"	51° 02' 60"	2110
E00294269	Arménie			3500
E00162357	Turecko	39° 25' 12"	39° 12' 18"	2500
E00162354	Dagestán	35° 57' 18"	51° 02' 60"	2250
E00162360	Turecko	37° 49' 40.8"	35° 08' 60"	2850
E00162359	Turecko	38° 10' 30"	42° 53' 60"	2900
E00162356	Turecko			3200

E00162355	Turecko	37° 43' 58.8"	30° 24' 57.6"	
E00400314	Arménie	37° 39' 25.2"	31° 16' 37.2"	2100-2200
E00400315	Nachičevan			
E00400316	Turecko	37° 39' 25.2"	31° 17' 24"	2800-2900
E00400318	Írán	34° 17' 49.2"	36° 06' 54"	3200
E00162349	Turecko	37° 49' 01.2"	35° 10' 01.2"	3000
E00162358	Turecko	37° 20' 02.4"	43° 48' 07.2"	3400
3576	Turecko			3200
175	Turecko	39° 25' 12"	39° 12' 18"	2500
24517	Turecko	37° 43' 58.8"	35° 08' 60"	2700
24504	Turecko	38° 02' 60"	42° 57' 00"	3000
<b>Vienna Herbarium</b>				
W39	Turecko			
W40	Turecko			
W41	Turecko			
W42	Írán			2400
<b>Komarov Herbarium</b>				
K26	Írán			
K27	Írán			
<b>Yerevan Herbarium</b>				
ERE180384	Arménie	39° 41' 15"	46° 06' 14"	3320
ERE170020	Arménie	39° 40' 48"	46° 05' 24"	3335
ERE13411	Arménie			3000
ERE151385	Arménie			3100
ERE62829	Arménie			

*Pozn: RBGE (Royal Botanic Garden Edinburgh) number odpovídá číslu herbářové položky v této instituci.*

Tabulka č. 4: Rostlinný materiál použitý při práci (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) (p. = populace).

	<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	GPS-N	GPS-E	(m n. m.)	Odhadovaný počet jedinců v p.	Odhadovaná velikost areálu p. (m <sup>2</sup> )
<b>1. populace</b>	12 jedinců, okolí jezera Balaton, Maďarsko	46°50'28.04"	17°27'9.01"	320		
<b>2. populace</b>	23 jedinců, oblast Villány, Maďarsko	45°51'18.25"	18°25'8.28"	274	80	450
<b>3. populace</b>	12 jedinců, Srbsko	42°19'41.40"	21°53'51.68"	456		
<b>4. populace</b>	30 jedinců, Antalya	36°52'818"	30°24'376"	990	20	1000
		36°53'472"	30°22'337"	1180	150	200
		36°53'140"	30°22'145"	1278	50	400
<b>5. populace</b>	25 jedinců, Thermessos	36°59'062"	30°27'791"	986	100	2x10 <sup>6</sup>
<b>6. populace</b>	17 jedinců, Bagyaki	37°31'586"	40°42'778"	845	100	200
<b>7. populace</b>	20 jedinců, Kebapcik	37°32'153"	40°31'718"	900	100	1x10 <sup>6</sup>
<b>8. populace</b>	42 jedinců, Gurbuz	37°38'440"	41°25'697"	825	200	2x10 <sup>6</sup>
<b>9. populace</b>	40 jedinců, Hisar	37°38'016"	40°53'347"	730	200	1x10 <sup>6</sup>
<b>10. populace</b>	13 jedinců, Xaniasor	37°34'572"	39°49'121"	1430	13	4x10 <sup>6</sup>
<b>11. populace</b>	19 jedinců, Yesilkoy	37°35'54.00"	40°29'5.94"	900	50	1000

## 2.2 Maďarsko, lokalita Villany (hora Szársomlyó)

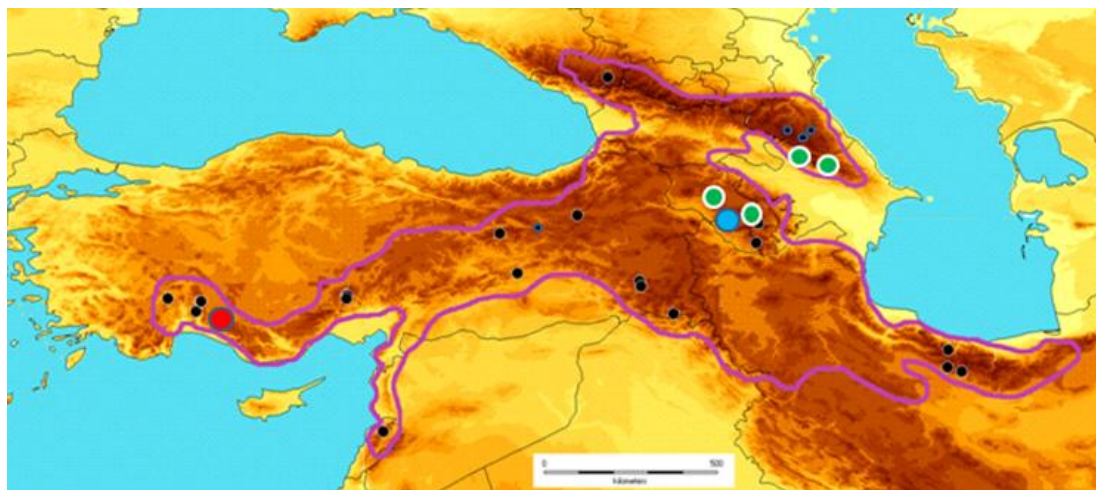
Díky spolupráci školitele této práce, pana Ing. Petra Smýkala, Ph. D. a jeho maďarského kolegy, pana L. Erdőse, Ph. D., mi byla umožněna cesta do Maďarska na přirozenou lokalitu výskytu druhu *P. sativum* subs. *elatus*. Stáž byla zrealizována v říjnu 2014 a financována pomocí projektu PrF-2013-003 IGA\_PrF\_2014001, IGA\_PrF\_2015\_001.

Náplní stáže bylo poznání přirozené lokality druhu, seznámení se s metodikou sběru vzorků na lokalitě a měření délky a počtu internodií u nalezených jedinců v kontextu s životní strategií druhu (podzimním klíčením a přezimování v podmínkách střední Evropy). Po dobu mého pobytu mi byl průvodcem pan Dr. L. Erdős, katedra ekologie, Univerzita Szeged. Pan Dr. Erdős vyjednal u Maďarského ministerstva Životního prostředí povolení číslo 7452 - 2/2014 a 7452 - 8/2014 pro sběr vzorků.

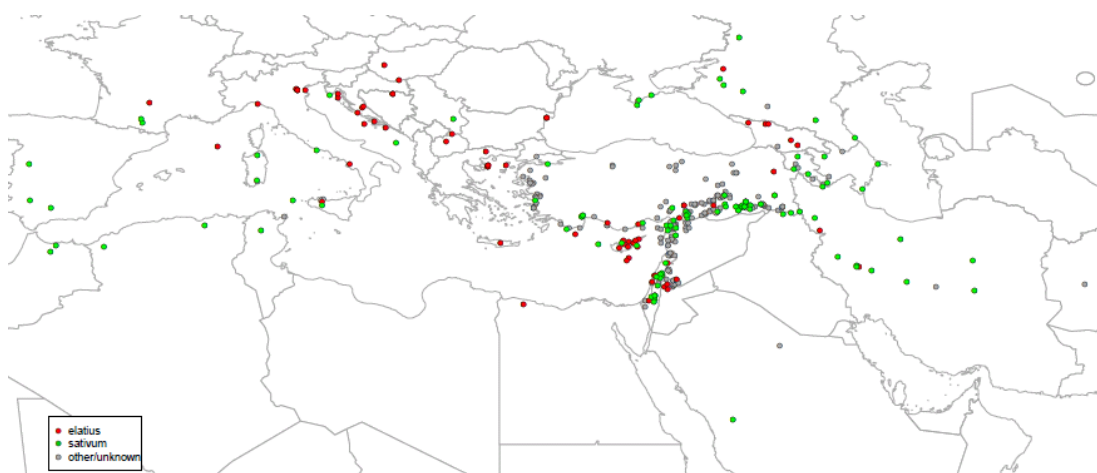
Obec Villany se nachází 30 km jihovýchodně od města Pécs na jihu Maďarska. Přesné místo nálezu hrachu bylo nedaleko obce - hora Szársomlyó (GPS koordináty, 442 m n. m.). Tato lokalita byla roku 1944 prohlášena za rezervaci a představuje v podstatě nejsevernější (s výjimkou lokalit v oblasti Balatonu) hranici areálu druhu *P. sativum* subsp. *elatus*.

Jižní svahy hory byly tvořeny mozaikou ze stromů keřovitého vzrůstu, nejvíce to odpovídalo asociaci *Inulo spiraeifoliae-Quercetum pubescentis* a ze skalních srázů, kde dominovala spíše asociace *Sedo sopianae-Festucetum dalmaticae* (Erdős *et al.* 2012). Všechny vzorky z 2. populace byly odebrány z této mozaiky (viz příloha č. 2a). V severní části rezervace byly i stromy vyššího vzrůstu. Tam jim vápenné podloží umožnilo lépe čerpat živiny. Severní část nebyla tak xerothermní jako jižní. V celé rezervaci bylo objeveno mnoho endemitů a chráněných druhů rostlin jako jsou například: *Orlaya grandiflora* (L.) Hoffm., *Festuca dalmatica* (Hack.) K. Richt, *Ceterach javorkeanum* (Vida) Soó, *Colchicum hungaricum* Janka, *Convolvulus cantabrica* L., *Ranunculus illyricus* L., *Trigonella gladiata* M. Bieb. a v neposlední řadě studovaný druh *Pisum sativum* subsp. *elatus* (M. Bieb.) Asch. et Graebn. (Erdős *et al.* 2013).

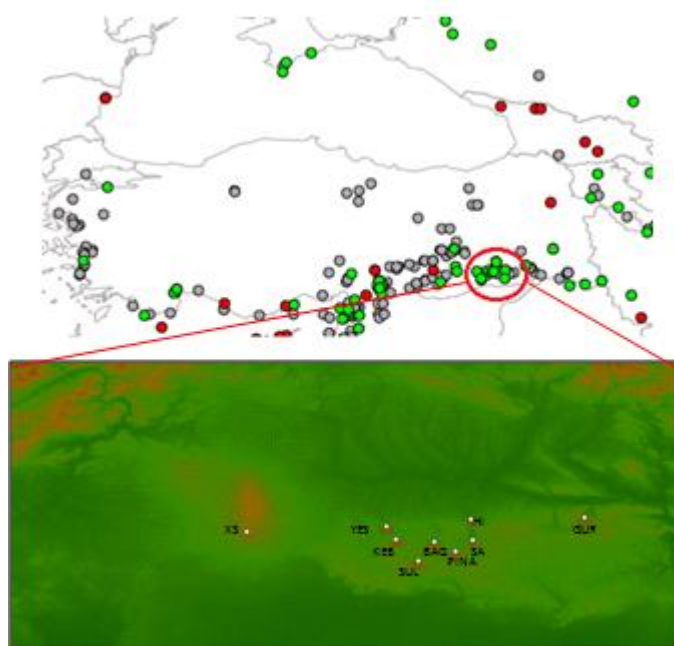
Lokalitu jsem navštívila dvakrát, vždy na celý den. Na lokalitě, kde by mohl být nějaký jedinec rodu *Pisum*, byl vytyčen čtverec 4 x 4 m. Tato plocha byla zaměřena pomocí GPS souřadnic. V tomto čtverci se pak hledali jedinci druhu, pokud byl nějaký objeven, byla změřena jeho výška a spočítány internodia. Když se ve čtverci žádný nevyskytoval, byla zaznamenána "0". Takto se postupovalo skoro po celém jižním svahu (viz příloha č. 2b). Z některých čtverců byl odebrán vzorek na analýzu DNA.



Obrázek č. 2: Mapa s celkovým areálem druhu *Vavilovia formosa* a zároveň vyznačené haplotypy druhu (zeleně byl zvýrazněn haplotyp, kde byla detekována repetice, černě byl zvýrazněn haplotyp bez 7 bp repetice v *matK*. Modrá prezentuje populaci z Arménie, Mt. Ughtasar a červená populaci z Turecka, Mt. Kizlar Sivresi (Kenicer *et al.* 2009).



A)



B)

Obrázek č. 2 (A, B): A) Mapa s celkovým areálem druhu *Pisum sativum* subs. *elatus*. B) Zvýraznění některých populací z Turecka (HI, Hisar; XS, Xaniasor; BAG, Bagyaki; KEB, Kebačik; YES, Yesilkoy; GUR, Gurbuz). (Červeně je znázorněn haplotyp *P. elatus*, zeleně haplotyp *P. sativum* a šedá barva představuje neotestované položky.)

Pozn.: V obrázku č. 2 byly některé body symbolizující areál *Pisum sativum* subsp. *elatus* na mapě nepřesně zaznačeny. Způsobily to chyby GPS přístroje.

Tabulka č. 5: Vzdálenosti v kilometrech mezi populacemi z Turecka vyznačené v obrázku č. 2 B.

	<b>Xaniasor</b>	<b>Hisar</b>	<b>Bagyaki</b>	<b>Kebačik</b>	<b>Yesilkoy</b>	<b>Gurbuz</b>
<b>Xaniasor</b>	0.00					
<b>Hisar</b>	94.54	0.00				
<b>Bagyaki</b>	79.01	19.57	0.00			
<b>Kebačik</b>	62.72	33.57	16.29	0.00		
<b>Yesilkoy</b>	58.78	35.81	21.63	7.93	0.00	
<b>Gurbuz</b>	142.00	47.48	64.30	80.12	83.21	0.00

## 2.3 Izolace DNA

Izolace genomové DNA byla prováděna v laboratoři molekulárních markerů, katedry botaniky PŘF v Olomouci. Genomová DNA byla vyizolována z přibližně 100 mg rostlinného materiálu vysušeného pomocí silikagelu nebo z herbářových položek. Izolace byla provedena pomocí kitu-kolonek INVITEK (firma Invitek, Německo). Při provádění tohoto kroku se postupovalo podle protokolu výrobce, který je popsán v bakalářské práci (Chaloupská 2013).

## 2.4 PCR amplifikace - sekvenování

PCR reakce byly provedeny pomocí cykleru MJ Research Gradient Cycler podle Smýkal *et al.* (2010) s použitím primerů (Generi-Biotech, CZ) pro *ITS*, *trnSG* a úseků *matK* (viz tab. č. 6). Objem jednoho vzorku odpovídal 15 µl. Příprava PCR mixu byla provedena dle tabulky č. 7. Podrobný postup byl popsán v bakalářské práci (Chaloupská 2013). Program byl nastaven na počáteční denaturaci při 94 °C po dobu 5 min, následovalo 40 cyklů denaturace po 30 s na 94° C, 30 s pro nasednutí primerů při 55 °C, 90 s při 72 °C + prodloužená konečná inkubace po dobu 10 minut při 72 °C. Produkty byly separovány na 1,5% agarózovém TBE gelu, s využitím velikostního standardu (100bp MW ladder, Fermentas, CZ) a vizualizovány barvením GelRED (BIOTIUM) pomocí UV transluminátoru a dokumentačního zařízení (Kodak EDAS 290).

Tabulka č. 6: Použité primery pro sekvenační analýzu.

<b>Primer</b>	<b>Sekvence (3'-5')</b>	<b>Citace</b>
<i>trn H-F</i>	CGCGCATGGTGGATTACAAAATC	Schaefer <i>et al.</i> 2012
<i>psbA-R</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Schaefer <i>et al.</i> 2012
<i>trn S-F</i>	GTAGCGGGAATCGAACCCGCA	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>trn G-R</i>	CCTCTCAACGAGCAATTCGAG	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>Rpl32 - F</i>	GGAAGTGGCATAACAATTAGTATAG	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>Rpl32 - R</i>	TACGGCAGGATTGAAAGCCTTTTC	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>ITS 4-F</i>	TCGATGCCTTACATGCAGTG	Kenicer <i>et al.</i> 2005
<i>ITS 5-R</i>	TAGAAACGCATATGGGTAAAAGAG	Kenicer <i>et al.</i> 2005
<i>matK1L-F</i>	TTCAGTGGTACGDAGTCAAATG	Kenicer <i>et al.</i> 2005
<i>trn K2-R</i>	AACTAGTCGGATGGAGTA	Kenicer <i>et al.</i> 2005
<i>trn G-F</i>	CATCATTAGCTTGAAGGCTAAG	Schaefer <i>et al.</i> 2012
<i>trn S-R</i>	CTTTAGTCCACTCAGCCATCTCTC	Schaefer <i>et al.</i> 2012
<i>rbcL -F</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	Schaefer <i>et al.</i> 2012



<i>rbcL -R</i>	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	Schaefer <i>et al.</i> 2012
<i>Rpl32 - F</i>	GGAAGTGGCATAACAATTAGTATAG	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>Ndh -R</i>	TAGGAAGTGGGAGGGATGAAAG	Shaw <i>et al.</i> 2005

Sekvenace vzorků byla provedena u rodu *Vavilovia* na herbářových položkách uvedených v tabulce č. 3 a vždy u jednoho jedince z populací 1 (arménská) a 3 (turecká) uvedené v tabulce č. 2. U rodu *Pisum* byla sekvenace provedena u jednoho jedince z populací 1 (maďarská, oblast jezera Balaton), 2 (maďarská, oblast Villany), 3 (srbská), 4 (turecká - Antalya), 5 (turecká - Thermessos), 6 (turecká - Bagyaki), 7 (turecká - Kebabčik), 8 (turecká - Gurbuz), 9 (turecká - Hisar), 10 (turecká - Xaniasor) a 11 (turecká - Yesilkoy) (*viz tab. č. 4*).

Tabulka č. 7: Rozpis pro PCR mix

Složení PCR reakční směsi dle standardního protokolu výrobce např. s využitím MyTaq<sup>RED</sup> polymerázy (Bioline).

(v µl)	1x	10x	20x	30x
<b>10x pufr (Bioline)</b>	1,50	15,00	30,00	45,00
<b>Voda</b>	9,60	96,00	192,00	288,00
<b>10 mM dNTP</b>	0,30	3,00	6,00	9,00
<b>Primer mix (5mM F/R)</b>	1,53	15,30	30,60	45,90
<b>Taq (MyTaq RED) 5u/µl</b>	0,08	0,80	1,60	2,40
<b>Mix</b>	<b>13,00</b>			
<b>DNA vzorek (v přibližné koncentraci 30-100 ng/µl)</b>	<b>2,00</b>			
<b>Celkový objem reakce (µl)</b>	15,00			

### Elektroforetická separace PCR produktů

Rozdělení PCR produktů bylo prováděno horizontální gelovou elektroforézou (BIO-RAD). Získané PCR byly separovány na 1,5% agarózovém gelu (SERVA), s obsahem barviva GelRED (BIOTIUM) v 0,5x TBE pufru při napětí 2 V/cm. Separace probíhala po dobu přibližně 45-60 minut při 75-120 V, poté byl gel dokumentován pomocí UV transluminátoru (Kodak EDAS 290). Výsledný snímek byl zpracován v grafickém programu (PowerPoint).

### **Přečištění PCR produktu pro sekvenční analýzu pomocí - SureClean (Bioline):**

1. K 15 µl PCR produktu přidat stejný objem SureClean roztoku.
2. Po důkladném promíchání nechat inkubovat 10 min při pokojové teplotě.
3. Centrifugovat (Eppendorf Centrifuge 5415 R) 10 min při (14,000 rpm).
4. Odpipetovat veškerý supernatant a vysráženou DNA promýt 2 násobným objemem 70% etanolu.
5. Vortexovat (MS2 Minishaker) a opět centrifugovat (10/14,000 rpm).
6. Supernatant odpipetovat a pellet nechat vyschnout. Poté rozpustit v demineralizovaná H<sub>2</sub>O. (Získaný objem je 20-40 µl).

Sekvence byla prováděná v servisní laboratoři PřF UK, Praha pomocí BigDye metody dle protokolu AppliedBiosystems na sekvenátoru ABI Prism 3130 Genetic Analyzer. Následně byly sekvence manuálně upravovány v programu Geneious 7.1.7 (Biomatters Ltd). a CLUSTAL alignment za pomoci webově dostupného rozhraní ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_multalinan.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html)).

### **2.5 SSR (Simple Sequence Repeats):**

Jedná se o metodu, která využívá PCR amplifikaci. Primery v PCR amplifikaci jsou specifické pro daný mikrosatelitní lokus. Detekce probíhala pomocí 2-3% agarózového gelu umožňující však jen omezené rozlišení velikosti fragmentů maximálně v rozdílu 10-20bp.

Tabulka 7: Teplotní program pro PCR amplifikaci.

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

O druhu *Vavilovia formosa* neexistují informace případného zkoušení mikrosatelitů, proto byly použity mikrosatelity vyvinuté pro *Lathyrus sativus* L. použité v práci (Yang *et al.* 2014) a *Pisum sativum* (Loridon *et al.* 2005). Pro případné porovnání byly ze stejného článku vybrány i primery pro *Pisum*. Před začátkem bylo vyzkoušeno více primerů na jednom vzorku *Pisum* a *Vavilovia*, následně se fungující mikrosatelity aplikovaly na celý set vzorků. Všechny zkoušené mikrosatelity obsahuje tabulka č. 19 (*viz výsledky*).

U rodu *Vavilovia* byly primery vyzkoušeny na jednom jedinci z populace 1 (Arménie) a 3 (Turecká), v souboru nebyly zahrnuty vzorky z herbářových položek vzhledem k fragmentované genomové DNA.

U rodu *Pisum* byly fungující primery aplikovány na všechny populace, kromě populace (*viz tab. č. 4*).

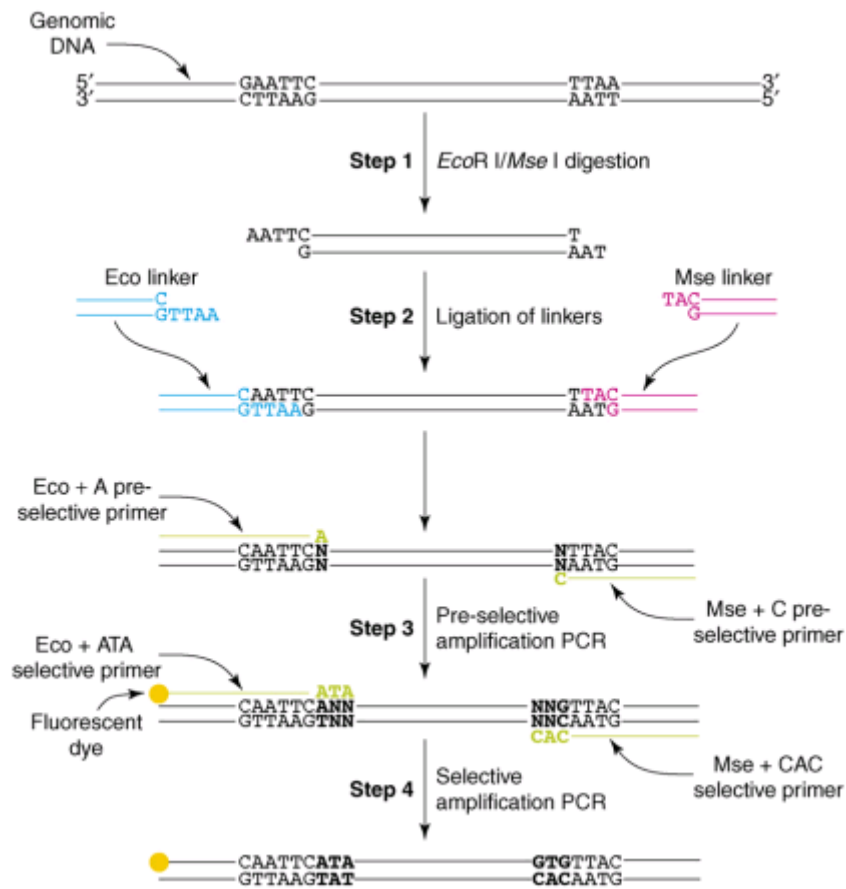
Příprava PCR reakce proběhla stejně jako v případě sekvenování dle tabulky č. 6. Stejný byl i teplotní program. Separace produktu na 1,5% agarózovém gelu probíhala pomaleji mezi 70-80 min při 70-100V.

## **2.6 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism):**

Důležitým krokem byla stejná koncentrace vzorků genomové DNA (50 ng/μl). Koncentrace byla spektrofotometricky změřena (Thermo SCIENTIFIC, NANODROP 200) a následně zředěna na požadovanou koncentraci. AFLP metoda zahrnovala čtyři kroky: restrikci, ligaci, preselektivní amplifikaci a selektivní amplifikaci.

Během restrikce byla DNA rozštěpována pomocí restrikčních endonukleáz *MseI* a *EcoRI* (Fermentas, CZ). *MseI* rozpoznávala 4bp sekvenci (TTAA) a *EcoRI* 6bp sekvenci (GAATTC). Po tomto kroku byla DNA "rozštěpována" a vznikly lepivé konce. Na tyto konce byly při ligaci pomocí T4 ligázy (Fermentas) připojeny synteticky vyrobené adaptory, kde byla známa jejich sekvence (Kitner *et al.* 2008). Preselektivní a selektivní amplifikace probíhala jako klasická PCR reakce, kde z velkého množství produktů vznikaly pomocí těchto kroků specifikované úseky, které byly žádoucí. U preselektivní amplifikace byl definován jeden nukleotid směrem dovnitř fragmentu od adaptoru a u selektivní definujeme další dva nukleotidy

směrem dovnitř od adaptoru a nukleotidu zařazeného během předcházejícího kroku (Vos *et al.* 1995). Pro lepší orientaci (viz obr. č. 3)



Obrázek č. 3: Zobrazení AFLP dle Meudt & Clarke 2007.

## 2.6.1 Restrikce

### Chemikálie potřebné k restrikci:

- sterilní ddH<sub>2</sub>O
- pufr dodaný s *EcoRI* (PROMEGA)
- restrikční endonukleázy *MseI* a *EcoRI* (Fermentas, CZ)

### Průběh restrikce:

- Chemikálie (pufr) po rozmrznutí zvortexovat (MS2 Minishaker) a umístit do chladicího stojánku.

2. Připravit potřebné množství reakční směsi (v pořadí voda-pufr-primery) dle tabulky č. 9.
  3. Do označené PCR desky(4tititude), (obsahuje 96 jamek po 0,2 ml) rozpipetovat reakční směs po 15  $\mu$ l.
  4. Do reakční směsi v desce napipetovat 5  $\mu$ l vzorku DNA v požadované koncentraci.
- Pozn.: Kroky 2 - 4 probíhají ve sterilním boxu (TelSTAR PV - 102) z důvodu zabránění možné kontaminace vzorků.*
5. Celou desku vložit zavíčkovanou krátce do centrifugy(VWR).
  6. Desku vložit do PCR cykleru (Eppendorf vapo protect, Mastercycler proS) a spustit teplotní program 37 °C na 2,5 hodiny.
  6. Po ukončení teplotního programu je nutné přejít hned k dalšímu kroku - ligace.

Tabulka č. 9: Protokol přípravy restričního mixu

(v $\mu$ l)	<b>1x</b>	<b>10x</b>	<b>20x</b>	<b>30x</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	12,790	127,90	255,80	383,70
<b>pufr dodaný s EcoRI</b>	2,000	20,00	40,00	60,00
<b>MseI</b>	0,125	1,25	2,50	3,75
<b>EcoRI</b>	0,063	0,63	1,26	1,89
<b>Mix</b>	<b>15,000</b>			
<b>DNA vzorek</b>	<b>5,000</b>			
<b>Celkem</b>	20,000			

### 2.6.2 Ligace

#### Chemikálie potřebné k ligaci:

- a) sterilní ddH<sub>2</sub>O
- b) pufr dodaný s ligázou (PROMEGA)
- c) adaptory *MseI* a *EcoRI*
- d) ligáza (PROMEGA)

### Průběh ligace:

1. Připravit potřebné množství reakční směsi (v pořadí voda-pufr-adaptory-ligáza) dle tabulky č. 10.
2. Do desky obsahující právě dokončenou restrikcí rozpipetovat reakční směs po 5  $\mu$ l.  
*Pozn.: Kroky 1 - 2 probíhají ve sterilním boxu (TelSTAR PV - 102) z důvodu zabránění možné kontaminace vzorků.*
3. Celou desku vložit zavíčkovanou krátce do centrifugy (VWR).
4. Desku vložit do PCR cykleru (Eppendorf vapo protect, Mastercycler proS) a spustit teplotní program 37 °C na 3 hodiny.
5. Po ukončení teplotního programu lze vzorky krátkodobě uchovávat v lednici, nebo i dlouhodobě zamražené při -20 °C.

Tabulka č. 10: Protokol přípravy ligačního mixu

(v $\mu$ l)	1x	10x	20x	30x
ddH <sub>2</sub> O	3,0	30	60	90
10x pufr dodaný s ligázou	0,5	5	10	15
<i>EcoRI</i> adaptor	0,5	5	10	15
<i>MseI</i> adaptor	0,5	5	10	15
Ligáza	0,5	5	10	15
Mix	5,0			

### 2.6.3 Preselektivní amplifikace

#### Chemikálie potřebné k preselektivní amplifikaci:

- a) sterilní ddH<sub>2</sub>O
- b) pufr dodaný s polymerázou (5x) (PROMEGA)
- c) nukleotidy (Fermentas, CZ)
- d) primery *EcoRI* a *MseI* (Fermentas, CZ)
- e) GoTag polymeráza (5 U/ $\mu$ l) (PROMEGA)

### Průběh preselektivní amplifikace:

1. Připravit potřebné množství mastermixu (v pořadí voda-pufn-nukleotidy-primery-polymeráza) dle tabulky č. 11.

*Pozn.: Sekvence primerů použité v tomto kroku jsou obsaženy v tabulce č. 15.*

2. Do nové označené desky rozpipetovat mastermix po 18  $\mu$ l.

*Pozn.: Kroky 1 - 3 probíhají ve sterilním boxu (TelSTAR PV - 102) z důvodu zabránění možné kontaminace vzorků.*

3. Z výsledku ligace odebrat 2  $\mu$ l a přidat k mastermixu.

4. Celou desku vložit zavíčkovanou krátce do centrifugy(VWR).

5. Desku vložit do PCR cykleru (eppendorf vapo protect, Mastercycler proS) a spustit teplotní program (viz tab. č. 12).

*Pozn.: Výsledek z preselektivní amplifikace je před další použitím nutné 7x zředit dd H<sub>2</sub>O!*

Tabulka č. 11: Protokol přípravy mastermixu pro preselektivní amplifikaci.

(v $\mu$ l)	1x	10x	20x	30x
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	11,85	118,5	237,0	355,5
<b>pufn (5x)</b>	4,50	45,0	90,0	125,0
<b>dNTP</b>	0,50	5,0	10,0	15,0
<b>Eco A*primer</b>	0,50	5,0	10,0	15,0
<b>Msel*primer</b>	0,50	5,0	10,0	15,0
<b>Polymeráza</b>	0,15	1,5	3,0	4,5
<b>Maestermix</b>	<b>18,00</b>			
<b>výsledek z ligace</b>	<b>2,00</b>			
<b>Celkem</b>	20,00			

Tabulka č. 12: Teplotní program pro preselektivní amplifikaci.

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
<b>Denaturace DNA</b>	1x	94 °C	3 min
<b>Denaturace DNA</b>		94 °C	30sek

<b>Nasednutí primerů</b>	20x	56 °C	1min
<b>Syntéza DNA</b>		72 °C	1min 45 sek
<b>Syntéza DNA</b>	1x	72 °C	5 min
<b>Chlazení</b>	1x	4 °C	Neomezeně

#### 2.6.4 Selektivní amplifikace

##### Chemikálie potřebné k selektivní amplifikaci:

- a) sterilní ddH<sub>2</sub>O
- b) pufr dodaný s polymerázou (5x) (PROMEGA)
- c) nukleotidy (Fermentas,CZ)
- d) primery *EcoRI* a *MseI* (Generi-Biotech, CZ)
- e) GoTag polymeráza (5 U/μl) (PROMEGA)

##### Průběh selektivní amplifikace:

1. Připravit potřebné množství mastermixu (v pořadí voda-pufr-nukleotidy-primery-polymeráza) dle tabulky č. 13.
2. Do nové označené PCR desky rozpipetovat mastermix po 8 μl.  
*Pozn.: Kroky 1 - 3 probíhají ve sterilním boxu (TelSTAR PV - 102) z důvodu zabránění možné kontaminace vzorků.*
3. Ze 7x zředěného preamplifikátu odebrat 2 μl a přidat k mastermixu.
4. Celou desku vložit zavíčkovanou krátce do centrifugy (VWR).
5. Desku vložit do PCR cykleru (Eppendorf Vapo Protect a nebo Mastercycler proS) a spustit teplotní program (viz tab. č. 14).

Tabulka č. 13: Protokol přípravy mastermixu pro selektivní amplifikaci.

(v μl)	1x	10x	20x	30x
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	3,74	37,4	68,8	106,2



<b>pufr (5x)</b>	2,00	20,0	40,0	60,0
<b>dNTP</b>	0,20	2,0	4,0	6,0
<b>Eco A***primer</b>	1,00	10,0	20,0	30,0
<b>Msel***primer</b>	1,00	10,0	20,0	30,0
<b>Polymeráza</b>	0,06	0,6	1,2	1,8
<b>Maestermix</b>	<b>8,00</b>			
<b>zředěný preamplifikát</b>	<b>2,00</b>			
<b>Celkem</b>	10,00			

Pozn.: Primery\*\*\* použité v práci pro *Pisum* a *Vavilovia* jsou uvedeny v tabulce č. 15.

Tabulka č. 14: Teplotní program pro selektivní amplifikaci.

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
<b>Denaturace DNA</b>	1x	94 °C	3 min 30 sek
<b>Denaturace DNA</b>	17x	94 °C	30 sek
<b>Nasednutí primerů</b>		60,1 °C	30 sek
<b>Syntéza DNA</b>		72 °C	1min
<b>Chlazení</b>	1x	4 °C	Neomezeně

Tabulka č. 15: Primerové kombinace preselektivní a selektivní amplifikace pro rody *Vavilovia* a *Pisum*.

<b>Sekvence preamplifikačních primerů</b>			
EcoRI 5' – G ACT GCG TAC CAA TTC A –3'			
MseI 5' – G ATG AGT CCT GAG TAA C –3'			
<b>Sekvence amplifikačních primerů</b>			
<i>Vavilovia</i>	EcoRI***	Msel***	Kombinace
	AGC	CTG	1.2
	AGC	CGAT	1.94
	AGG	CTG	2.2
	AGG	CGAT	2.94
<i>Pisum</i>			

	ACA	CAATG	4.641
--	-----	-------	-------

Detekce AFLP proběhla pomocí vertikální elektroforézy (Thermo SCIENTIFIC T-rex) mezi "malým a velkým" sklem na 6% polyakrylamidovém gelu barveném stříbrem. Dle protokolu Kitner *et al.* 2008.

### 2.6.5 Příprava gelu:

#### Chemikálie použité při přípravě skel:

- a) saponát (pur)
- b) 100% ethanol (EtOH) (Lachner)
- c) Rain Repellent (Turtle WAX)
- d) 3-methacryloxypropyl-trimethoxysilane (SERIA)
- e) 8 % kyselina octová ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) v 96% EtOH, (100 ml 96% EtOH + 500  $\mu\text{l}$  8 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (Lachner)
- f) 0,5xTBE

#### Postup při přípravě denaturačního PAA gelu:

1. Velké sklo (tam bude přichycen gel se vzorky i během hodnocení) je nutné pořádně očistit saponátem, spláchnout vodou z vodovodu a následně i destilovanou vodou.
2. Sklo osušit laboratorními utěrkami.
3. Přetřít 2x ddH<sub>2</sub>O do sucha a přenést do digestoře (MERCİ) na polystyrenové víko.
4. Ošetřit 2x silanem (3  $\mu\text{l}$ ) a kyselinou octovou v etanolu (1 ml), chemikálie se rozetřou papírovým ručníkem od okrajů do středu, nechat 5 min stát.
5. Malé sklo s výřezem opláchnout vodovodní vodou a destilovanou, osušit a ošetřit Rain Repellentem (přípravek na odpuzování vody).
6. Pár kapek přípravku rozetřít po okrajích a pak směrem do středu, nechat 5 min stát.

7. Přetřít 1x destilovanou vodou a 1x EtOH.
8. Velké sklo přetřít 4x EtOH, umístit po okrajích spacery.
9. Malé sklo ošetřenou stranou s Rain Repellentem umístit na velké sklo a spacery zafixovat svorkami.
10. S brýlemi připravit gel a nanést injekční stříkačkou mezi skla.

Chemikálie použité při přípravě 86 % akrylamidu na jednu elektroforézu:

- 70 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu - bis akrylamid 19:1 (MERCK)
  - 476 µl 10 % roztoku peroxodisíranu amonného  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (SIGMA)
  - 46,7 µl N, N, N', N' - tetramethylendiamin (MERCK)
11. Po naplnění vložit obrácenou stranu hřebínku mezi skla a zafixovat svorkami.
  12. Nechat hodinu tuhnout.
  13. Po hodině omýt přebytečný zaschlý gel, vytáhnout hřebínek a umístit na elektroforézu (Thermo SCIENTIFIC, OWL S3S) (malé sklo směřuje k elektroforéze).
  14. Nalít 900 ml 0,5xTBE, v horní části elektroforézy asi 1 cm nad výřez v malém skle a zbytek nalít do dolní části, aby sklo bylo částečně ponořené.
  15. Na 40 min spustit nahřívání, nastavit na výkon 75 W, maximální proud a napětí (2000V, 120 mA).
  16. 10 min před ukončením nahřívání provést denuraci vzorků.
  17. K výsledku selektivní amplifikace připipetovat 5 µl bronfenilové a xylenové modři 1:1 (SIGMA), krátce celý blok zvortexovat (VWR) a přemístit na vyhřátý termocykler (Eppendorf vapo protect, Mastercycler proS) na 97 °C po dobu 3 min.
  18. Po ukončení programu vložit blok mezi dvě "chladítka", zastavit elektroforézu, umístit hřebínek do nahřátého gelu a začít plnit jamky 2-3 µl vzorky pomocí osmi kanálové pipety.
  19. Opět zapnout elektroforézu a nechat běžet 1hod a 40 min.

*Pozn.: Čas separace vzorků závisí na molekulárních hmotnostech (délkách) rozdělovaných PCR produktů. Orientačně je možné se řídit pomocí barviv v nanášecím pufru, jimiž jsou bromfenolová modř a xylenová modř, které ukazují průběh elektroforézy. Přičemž platí, že v 6% polyakrylamidovém gelu se bromfenolová modř pohybuje stejně rychle jako řetězec DNA dlouhý přibližně 60 párů bází a xylenová modř jako řetězec DNA dlouhý 220 párů bází. Obvyklá doba separace vzorků je 1-3 hodiny.*

20. Během probíhající separace vzorků připravit roztoky potřebné na zviditelnění výsledné reakce.

a) Fix/Stop roztok = 10% CH<sub>3</sub>COOH (Lachner)

- 165 ml CH<sub>3</sub>COOH doplnit do 2000 ml ddH<sub>2</sub>O

b) 1% HNO<sub>3</sub> (Lachner)

- 18 ml konc. HNO<sub>3</sub> pomalu nalít do 1l ddH<sub>2</sub>O, pak doplnit do 1200 ml

c) 1% AgNO<sub>3</sub> (VWR Chemicals)

- 2g dusičnanu rozpustit 1l ddH<sub>2</sub>O, pak doplnit do 1200 ml, přidat 3 ml formaldehydu

d) Vývojka = 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (VWR Chemicals)

- 45g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> rozpustit v 1l ddH<sub>2</sub>O, pak doplnit do 1500 ml a dát vychladit do lednice na 10 °C
- před použitím přidat 2,25 ml formaldehydu (Lachner) a 300 µl 1% roztoku Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

#### **2.6.6 Postup při vyvolávání gelu:**

1. Po uběhnutí doby potřebné k separaci, odpojit od zdroj (III ajor Science MP 2000 P), přenést sklo na podložku, vytáhnout hřebínek a spacery.
2. Malé sklo na okraji odchlípnout od velkého opatrně nožem, přemístit do fotomisky s Fix/Stop roztokem tak, aby přilepený gel byl směrem vzhůru.

3. Fotomisku umístit na třepačku (GFL 3017) v digestoři (MERCID) a nastavit na 65 otáček/min, nechat v roztoku 20 min.
4. 4x promýt v destilované vodě, roztok slít zpět do láhve.
5. Použít 2. roztok = 1% HNO<sub>3</sub>, sklo s gelem ponechat 5 min na třepačce ve fotomisce.
6. 4x promýt v destilované vodě, roztok slít zpět do láhve. (Při dalším vyvolávání se může ještě 1x použít).
7. Do další fotomisky nalít 1% AgNO<sub>3</sub>, ponořit sklo a nechat na třepačce 35 min.
8. 1x krátce promýt v destilované vodě, roztok slít zpět do láhve. (Při dalším vyvolávání se může ještě 1x použít).
9. Použít vývojku, nechat sklo v roztoku do té doby, dokud nezačnou tmavnout okraje gelu, pak zalít Fix/Stop roztokem a ponechat 10 min na třepačce.
10. Sklo ponoříme do destilované vody a na třepačce necháme 10 min, pak vložíme do sušárny (HS 62A).

Hodnocení probíhalo subjektivně na prosvětlovačce (ELLA NHQ1R, ELLA NBX 2). Výsledná matice hodnocených fragmentů v dané velikosti byla hodnocena jako přítomnost (1) a absence (0) zapsána do Microsoft Excelu 7. Následně se matice importovala pomocí poznámkového bloku do programu FREE TREE, kde byla navolena jako metoda vytvoření pro výsledný fylogram UPGMA dle Jacardova koeficientu. Fylogram byl vytvořen a upravován v programu FigTree v. 1.4.0. Ukázka hodnoceného skla u druhu *P. sativum* subsp. *elatius* (viz příloha č. 3).

Na sledování interakce mezi dvěma populacemi (Arménské populace byly až příliš blízko u sebe, proto byly sjednoceny v jednu a brány jako subpopulace) byl použit i program STRUCTURE (Falush *et al.* 2007) a to pomocí Bayesianké analýzy. Hodnota K (shluk) byla nastavena na 1-10 s 10 opakováním. Pro každý K (shluk) byl použit 1 000 000 MCMC (Markov Chain Monte Carl) opakování po dobu 100 000 burn-in interakcí. STRUCTURE Harvester (Earl & von Holdt 2012) byl použit pro shrnutí grafického výstupu, který byl dotvořen v programu Distruct (Rosenberg 2004).

Za použití programu GenAlex 6 software (Peakall & Smouse 2006) byly provedeny i statistické analýzy (AMOVA) na posouzení genetické variability mezi populacemi.

Analýza AMOVA byla provedena pouze u druhu *Vavilovia formosa*, stejně tak hodnoty z programu STRUCTURE.

## 2.7 Niche modelling

V rámci této diplomové práce byla rovněž vypracována studie týkající se pouze druhu *Vavilovia formosa* na základě Niche modellingu.

Niche modelling předpovídá potenciální rozšíření studovaného druhu v minulosti a současnosti. Používá pro to znalost lokalit výskytu druhu v současné době (GPS souřadnice), ekologických podmínek prostředí a údaje porovnává s ekologií druhu. Pro analýzy výskytu druhu v minulosti bere v úvahu paleoklimatická data. Z dostupné databáze (WorldClim) extrahuje bioklimatické parametry (srážky, teploty, oslunění, apod.) a ze stránek světové půdní databáze údaje o vlastnosti půdy na lokalitě. Z těchto dat za pomoci algoritmu Maximum Entropy (MaxEnt) (Philips *et al.* 2006) získáme mapy areálu druhu pro poslední interstadiál, poslední glaciál a současnost. Zároveň Niche modelling predikuje potenciální místa výskytu druhu.

Ekologické podmínky pro rostliny se v průběhu let mění, díky Niche modellingu jsme schopni částečně změny předpokládat, a tím včas a efektivněji chránit rostliny, kterým by jinak hrozilo vyhynutí.

### 3 VÝSLEDKY

#### 3.1 Sekvenační analýza

Po úspěšné amplifikaci vybraných fragmentů ITS a cpDNA, ověřené elektroforetickou separací 5 µl PCR produktu, byla zbývající část přečištěna pomocí SureClean a po změření koncentrace byla namíchána sekvenační reakce obsahující 500 ng PCR produktu a 5 pmol sekvenačního primeru v celkem 14 µl a odeslána k sekvenaci. Získané sekvence byly analyzovány pomocí softwaru, včetně případné editace. Polymorfní pozice byly identifikovány pomocí softwaru Geneious 7.1.7 a následně převedeny do Excel tabulky.

První sekvenování proběhlo na dvou jedincích *Pisum* z populace 1 a 3 (viz tab. č. 4) a dvou jedincích *Vavilovia* z populace 1 a 3 (viz tab. č. 2). Všechna data ze začátku nebyla podrobena analýze z finančních důvodů. Po použití programů na vyhodnocení sekvenování bylo zjištěno, že ve většině případů sekvence nebyly čisté.

Tabulka č. 16: Vzorčky *Vavilovia formosa*, které obsahují 7 bp repetici GATTGGT v sekvenci *matK* a vzorky, kde došlo k výměně nukleotidu A za G v sekvencích ITS.

	<i>ITS (G/A)</i>	<i>matK (repetice)</i>
Číslo vzorků	E00400315	E00400314
	E00400318	E00162354
	E00400314	ERE180384
	E00162353	ERE170020
	E00162360	ERE13411
	E00162355	K 26
	zástupce pop. z Turecka	K 27
	zástupce pop. z Arménie	zástupce pop. z Arménie

Pozn.: Většina čísel vzorků včetně K 26 a 27 jsou uvedeny v tabulce č. 3 kromě zástupců (pop. = populace) z Arménie a Turecka.

Tabulka č. 17: Vyhodnocení informovanosti úseků cp DNA a ITS.

Úseky DNA	Informativnost
<i>trn H - psb A</i>	1 SNP
<i>trFL</i>	žádný SNP
<i>rbcL</i>	žádný SNP
<i>trn SG</i>	nízká kvalita sekvenování

<i>rpl 32</i>	Multiband
<b>ITS</b>	<b>1 informativní SNP</b>
<b>mat K</b>	<b>7 bp indel</b>
<i>rpl 32 - Ndh</i>	Multiband

Pozn: SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Tabulka č. 18: Rozdělení populací *Pisum* na základě sekvencí do dvou haplotypů.

	<b>Země</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Haplotyp</b>
<b>1. pop.</b>	Maďarsko	Balaton	<i>Elatius</i>
<b>2. pop.</b>	Maďarsko	Villany	<i>Elatius</i>
<b>3. pop.</b>	Srbsko	Sv. Prohor	<i>Elatius</i>
<b>4. pop.</b>	Turecko	Antalya	<i>Humile</i>
<b>5. pop.</b>	Turecko	Thermessos	<i>Humile</i>
<b>6. pop.</b>	Turecko	Bagyaki	<i>Humile</i>
<b>7. pop.</b>	Turecko	Kebapcik	<i>Humile</i>
<b>8. pop.</b>	Turecko	Gurbuz	<i>Humile</i>
<b>9. pop.</b>	Turecko	Hisar	<i>Humile</i>
<b>10. pop.</b>	Turecko	XaniaSor	<i>Humile</i>
<b>11. pop.</b>	Turecko	Yesilkoy	<i>Humile</i>

Sekvenování herbářových položek ukázalo, že druh *Vavilovia formosa* má dva odlišné haplotypy, které byly doloženy jak molekulární analýzou, tak izolovaným geografickým rozmístěním, to je možné vidět na obrázku č. 2. Dle sekvenační analýzy se jednalo o 7 bp delecii a o repetici GATTGGT na pozici 670 bp při použití *matK* (v amplifikovaném fragmentu pomocí *matK1777L* a *trn2K* primerů. Vzorky, pro které toto platí, byly zahrnuty do tabulky č. 16. Ostatní markery nebyly tolik informativní (viz tab. č. 17). Důkaz o repetici GATTGGT a 7 bp indelu znázorněné v programu Geneious v sekvencích *matK* (viz příloha č. 4).

Na základě sekvence vzorků *Pisum sativum* subsp. *elatus* byly vzorky rozděleny do dvou haplotypů dle Ben-Ze'ev & Zohary (1973) na haplotyp *P. humile* Boiss and Noë a *P. elatus* Bieb. Výsledky byly shrnuty do tabulky č. 18.

### 3.2 Mikrosatelity (SSR)

Původně měla být studie založena na výsledcích z mikrosatelitů (viz tab. č. 19) a sekvenačních analýz, z kterých měly být patrné mezipopulační i vnitropopulační rozdíly, ale u druhu *Vavilovia formosa* je nebylo možné zcela použít

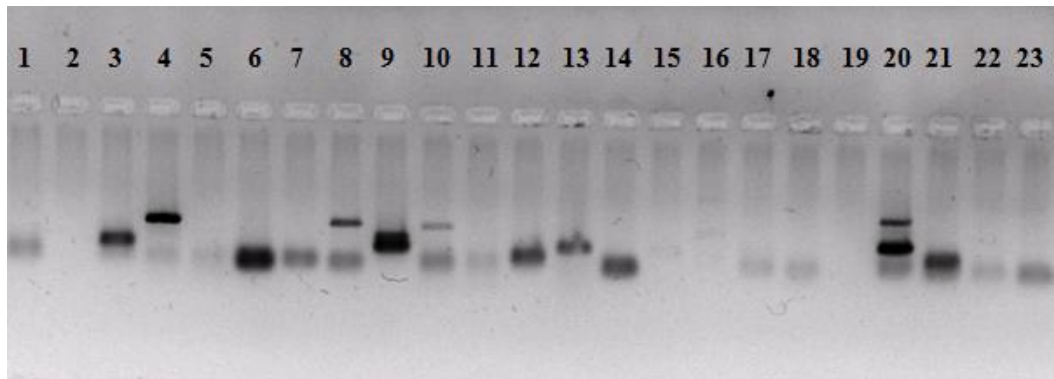


(viz obr. č. 4), pravděpodobně vzhledem k fylogenetické vzdálenosti mezi rody *Pisum*, pro které byly mikrosatelity vyvinuty.

Tabulka č. 19: Použité primery v práci. (Primery se lišily v závislosti na daném druhu, v tabulce byly pro názornost zvoleny značky. "0" = marker nebyl použit a "1" byl použit, dále se objevuje zelená barva znázorňující funkčnost markeru a červená barva vyznačující, že marker nefungoval (tj. neproběhla buď žádná, nebo jen nespecifická amplifikace).

SSR	Sekvence (3'-5')	Citace	<i>Pisum</i>	<i>Vavilovia</i>
A5-F	GTAAAGCATAAGGGGATTCTCAT	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
A5-R	CAGCTTTTAACTCATCTGACACA			
A6-F	CTTAAGAGAGATTAAATGGACAA	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
A6-R	CCAACTCATAATAAAGATTCAAA			
A7-F	CTTGAAATACTAAGGCACCATA	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
A7-R	GTGAACACTCTTTGTTTTACCA			
A9-F	GTGCAGAAGCATTGTTCAGAT	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
A9-R	CCCACATATATTTGGTTGGTCA			
AA 31-F	CATTGTGTAGTTGTAATTTTCATT	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
AA 31-R	TGAGAATGGATCATGTTATGAT			
AA 99-F	AACAATAACATGGCAAAGATT	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
AA 99-R	ACCTTGCGATATAATTGATG			
AA 163,2-F	TAGTTTCCAATCAATCGACCA	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
AA 163,2-R	AGTGTATTGTAAATGCACAAGGG			
AA 278-F	CCAAGAAAGGCTTATCAACAGG	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
AA 278-R	TGCTTGTGTCAAGTGATCAGTG			
AA 476-F	TAGTTTTGAAC TTGGCCGTAT	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
AA 476-R	CACACCCTAATCTAGGCTATCC			
AB 23-F	TCAGCCTTTATCCTCCGA ACTA	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
AB 23-R	GAACCCTTGTGCAGAAGCATT A			
AB 36-F	GTCGGTGGCGACTCTTGCTA	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
AB 36-R	GCAGAAGCATTGTGCAGTTGA			
AB 65-F	CTCGTATCCAAAGATTTCGTAGA	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
AB 65-R	AGGGTTAATCGGAGTTTATGA			
AB 122-F	AATGCAGTTGCAATTTTCGTTCTC	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
AB 122-R	GCGTCCAAAACGCATAGG			
AD 237-F	AGATCATTGGTGTCATCAGTG	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	0
AD 237-R	TGTTAATACAACGTGCTCCTC			
AD 60-F	CTGAAGCACTTTTGACA ACTAC	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
AD 60-R	ATCATATAGCGACGAATACACC			
AD 85-F	CGGGTACTAAATCTATGGTGAA	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1

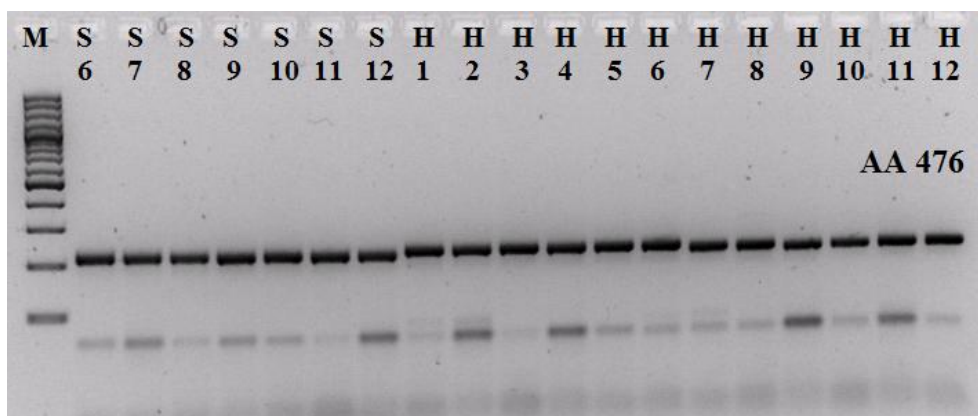
<b>AD 85-R</b>	TGAAAGATGAAGCTCAAGTGTT			
<b>AD 100-F</b>	TACACCCAAGACGACAAGCCT	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
<b>AD 100-R</b>	GGAGCTTCGCTTGATTCTCT			
<b>AD 141-F</b>	AATTTGAAAGAGGCGGATGTG	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
<b>AD 141-R</b>	ACTTCTCTCCAACATCCAACGA			
<b>AD 144-F</b>	AGGCGTCAGCAGATTGACTATT	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
<b>AD 144-R</b>	TGCCATCGGAAACAACCTCTAAA			
<b>AD 146-F</b>	TGCTCAAGTCAATATATGAAGA	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
<b>AD 146-R</b>	CAAGCAAATAGTTGTTTTGTTA			
<b>AD 174-F</b>	GGAGGGATGATTCTAACAAGGT	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
<b>AD 174-R</b>	AACTCCCCTCCTCGAACTATT			
<b>AD 175-F</b>	CTTGTGCAGAAGCATTGATTA	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
<b>AD 175-R</b>	AGAGACAATGGATGCTCATAGT			
<b>AD 186-F</b>	TCAATGACGTGTTGATCGAGGA	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
<b>AD 186-R</b>	CCATGCTTTGCACCGAAAGTAA			
<b>AD 237-F</b>	AGATCATTTGGTGCATCAGTG	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
<b>AD 237-R</b>	TGTTTAATACAACGTGCTCCTC			
<b>AD 270-F</b>	CTCATCTGATGCGTTGGATTAG	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
<b>AD 270-R</b>	AGGTTGGATTTGTTGTTTGTG			
<b>B14-F</b>	GAGTGAGCTTTTTAGCTTGCAGCCT	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
<b>B14-R</b>	TGCTTGAGAACAGTGACTCGCA			
<b>BLOX 13,1-F</b>	CTGCTATGCTATGTTTCACATC	Burstin <i>et al.</i> 2001	1	1
<b>BLOX 13,1-R</b>	CTTTGCTTGCAACTTAGTAACAG			
<b>BLOX 13,1-F</b>	GAACTAGAGCTGATAGCATGT	Burstin <i>et al.</i> 2001	1	1
<b>BLOX 13,1-R</b>	GCATGCAAAAAGAACGAAACAGG			
<b>SAT 5-F</b>	ATTTTGGCCTCCACCGACATC	Loridon <i>et al.</i> 2005	1	1
<b>SAT 5-R</b>	TGCTTTAGGTGGTTGTTGTTG			
<b>Ls 074-F</b>	ATGCTTCAGATGCAAAAAGAT	Shiferaw <i>et al.</i> 2012	1	1
<b>Ls 074-R</b>	TCAAAAAGTTGAAACAGAGAGC			
<b>Ls 848-F</b>	TTGAAACTATTGAGGCAACAT	Shiferaw <i>et al.</i> 2012	1	1
<b>Ls 848-R</b>	AGACTTTCAAGGAAAATGCTT			
<b>Ls 989-F</b>	GGGCTTTTACACTGATATGT	Shiferaw <i>et al.</i> 2012	1	1
<b>Ls 989-R</b>	AACAGCATAAATACCCCTTTT			
<b>MtBB02-F</b>	AAGTGCCAAAAGAACAGGGTTT	Shiferaw <i>et al.</i> 2012	1	1
<b>MtBB02-R</b>	AACCTACGCTAGGGTTGCAG			
<b>MtBF05-F</b>	TCACAACTATGCAACAAAAGTG	Shiferaw <i>et al.</i> 2012	1	1
<b>MtBF05-R</b>	GTGGGTCGGTGAATTTTCTGT			



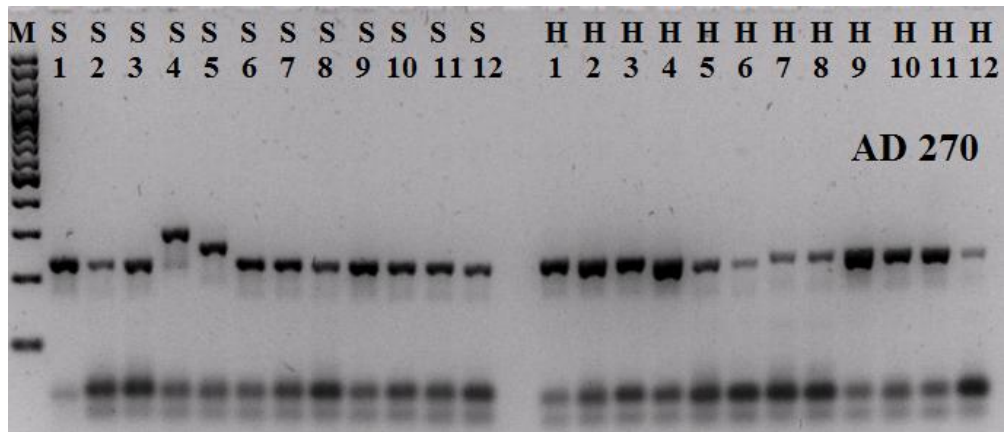
Pozn: 1) *Ls* 74, 2) *Ls* 848, 3) *Ls* 989, 4) *Mt* BF05, 5) *Mt* BB02, 6) *AD* 175, 7) *B14*, 8) *AD* 141, 9) *AD* 270, 10) *A5*, 11) *AB* 122, 12) *AB* 36, 13) *AD* 174, 14) *AB* 65, 15) *AD* 60, 16) *AB* 23, 17) *AD* 146, 18) *A6*, 19) *AD* 144, 20) *SAT* 5, 21) *AA* 278, 22) *A7*, 23) *AD* 270

Obrázek č. 4: Elektroforetická separace na agarósovém gelu některých zkoušených mikrosatelitů u *Vavilovia formosa* (jako DNA byl použit vzorek arménské populace 1).

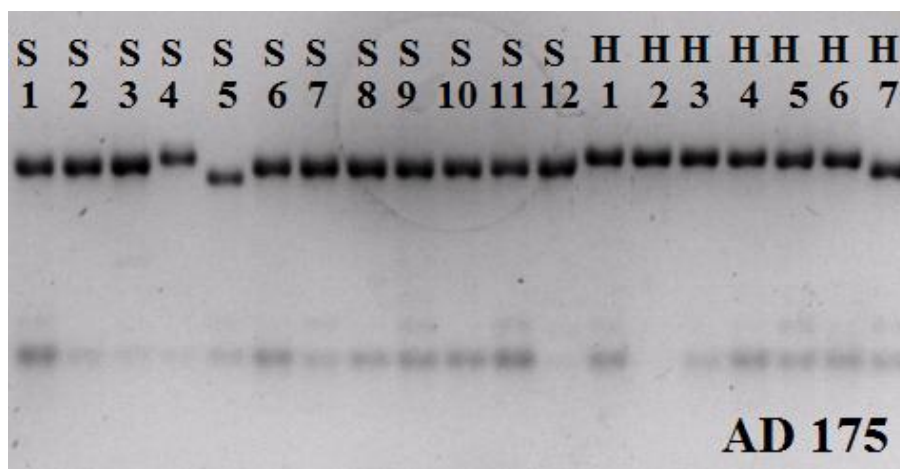
U druhu *Pisum sativum* subs. *elatius* vybrané SSR (viz tab. č. 19) fungovaly, a proto byly amplifikovány u všech populací. Většina markerů, které byly použity na všechny populace, neukazovaly žádnou variabilitu (viz obr. č. 5A). Pomocí ostatních markerů byla dokázána variabilita, kde délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů jednotlivých vzorků je až 50bp, a to i v rámci jedné populace (viz obr. č. 5B-E). Některé z těchto variabilních markerů potvrdily i přítomnost heterozygotních jedinců tohoto druhu (viz obr. č. 5D,E).



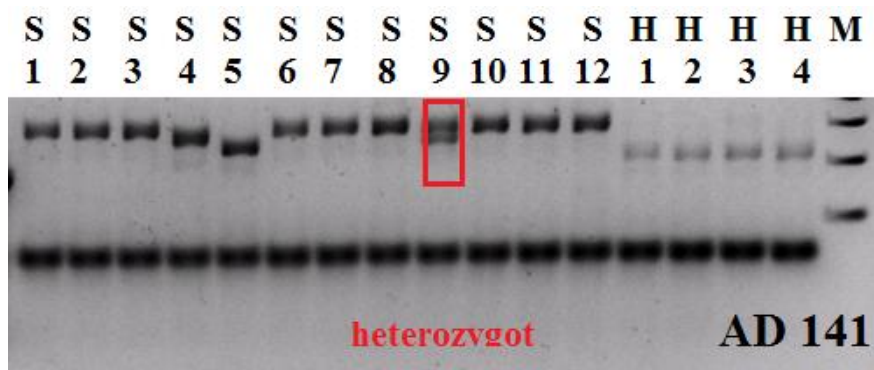
A)



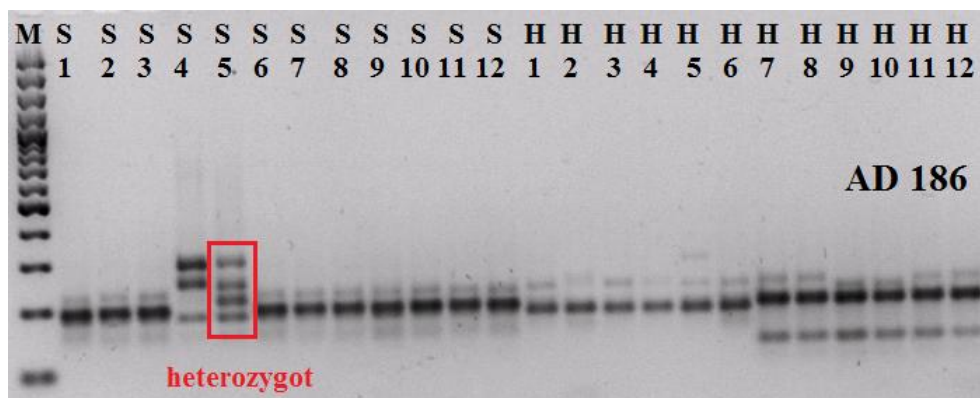
B)



C)



D)



E)

Obrázek č. 5 (A-E): Některé výřezy gelů dokládající výsledky SSR u *Pisum sativum* subsp. *elatius*. **A)** Neinformativní mikrosatelit na příkladu AA 476. **B), C)** Variabilní mikrosatelity AD 270 a AD 175 bez heterozygota. **D), E)** Variabilní mikrosatelity AD 186 a AD 141, kde je přítomen heterozygot (*M*, 100 bp DNA marker; *S*, srbská populace a *H*, maďarská z oblasti jezera Balaton. Čísla označují jedince daných populací. Heterozygoti jsou zvýrazněny červeně).

Použitím čtyřech mikrosatelitů (A9, AB 273, AD 270 a B14) se heterozygotnost u 96 vzorků u populace Hisar, Yesilkoy a Xaniasor rodu *Pisum* ukázala okolo 1% v daném vzorku.

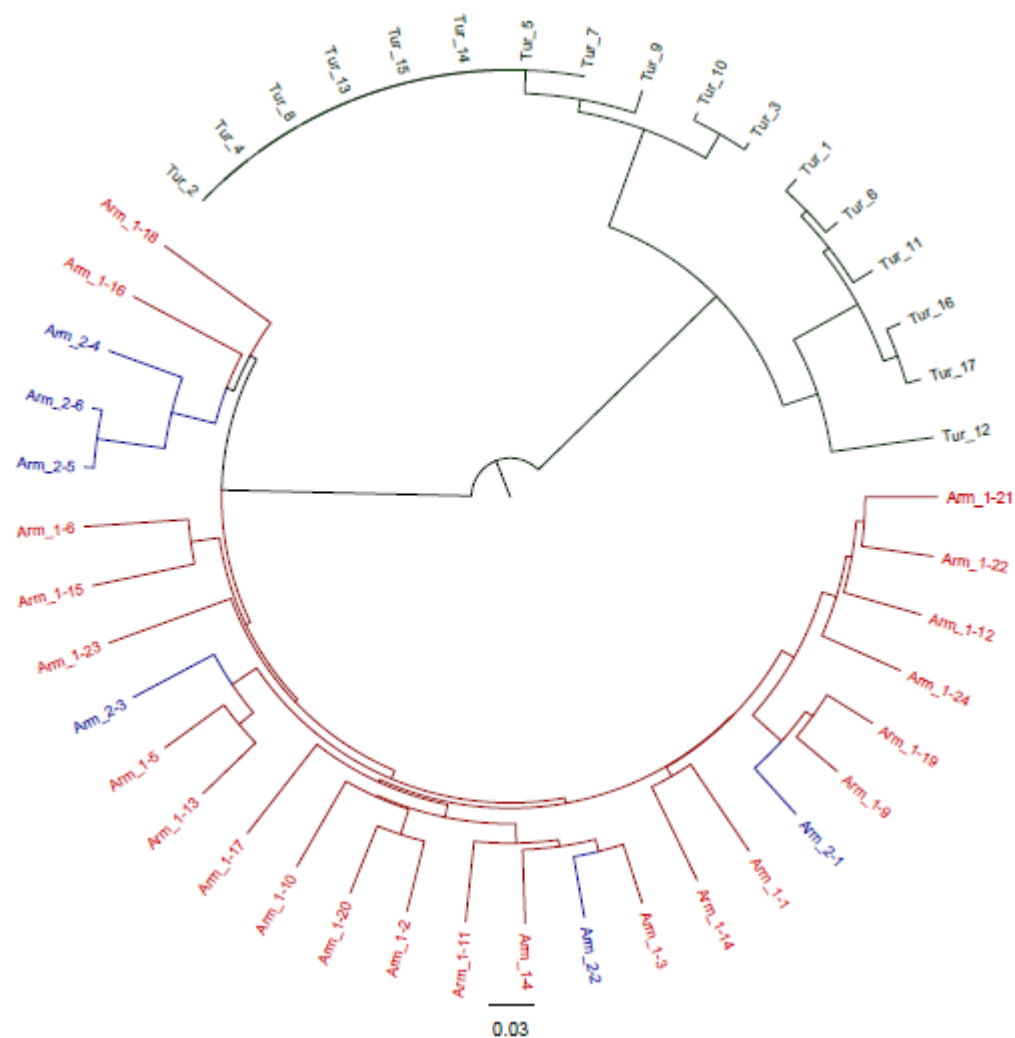
### 3.3 AFLP

Jelikož mikrosatelity u *Vavilovia formosa* nefungovaly, byla vyzkoušena AFLP metoda nejprve na populacích rodu *Vavilovia* (viz tab. č. 2) a následně na všech populacích rodu *Pisum* (viz tab. č. 4).

U *Vavilovia* byla analýza založena na testování čtyřech primerových kombinací (viz tab. č. 15) a na vyhodnocení 143 fragmentů v rámci mezipopulační i vnitropopulační variability. Tabulka č. 20 odkazuje na poměr vyhodnocených a polymorfních fragmentů u každého primeru. Výsledkem AFLP u *Vavilovia* byl fylogram (viz obr. č. 6), výstup z programu STRUCTURE (viz obr. č. 7A,B) a statistické analýzy za použití GenAlex (AMOVA) (viz tab. č. 21).

Tabulka č. 20: Údaje o fragmentech použitých při skórování ( $N_B$ ) a o polymorfních fragmentech ( $N_{PB}$ ) všech primerových kombinací.

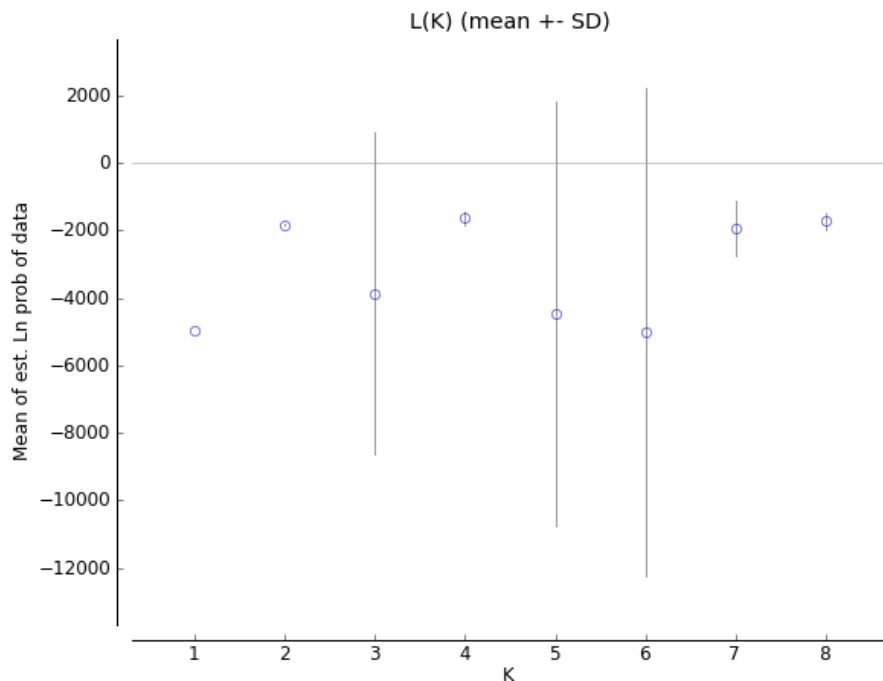
Primery použité při amplifikaci		N <sub>B</sub>	N <sub>PB</sub>
1.2	EcoRI primer E-GC / MseI primer M-TG	45	28 (62.2%)
1.94	EcoRI primer E-GC / MseI primer M-GAT	37	28 (75.7%)
2.2	EcoRI primer E-GG / MseI primer M-TG	36	21 (58.3%)
2.94	EcoRI primer E-GG / MseI primer M-GAT	25	17 (68.0%)



Obrázek č. 6: Fylogram znázorňující mezipopulační i vnitropopulační genetickou variabilitu druhu *Vavilovia formosa*. (Arm, arménská populace; Tur, turecká, následující číslo za tureckou populací je číslo jedince. První číslo u arménských populací se shoduje s označením populace 1 a 2, druhé udává číslo jedince).

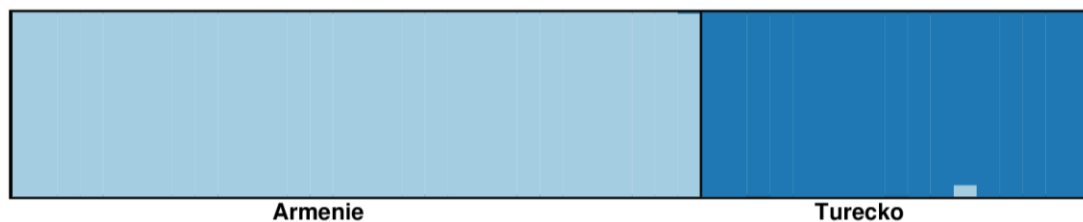
Z fylogramu na obrázku č. 6 byla vyvozena mezipopulační i vnitropopulační genetická variabilita druhu *Vavilovia formosa*. Fylogram byl rozdělen na dvě

základní větve (arménská a turecká pop.) Největší mezipopulační variabilitu podle fylogramu byla u 2. arménské populace. Největší vnitropopulační variabilitu měla 1. arménská populace.

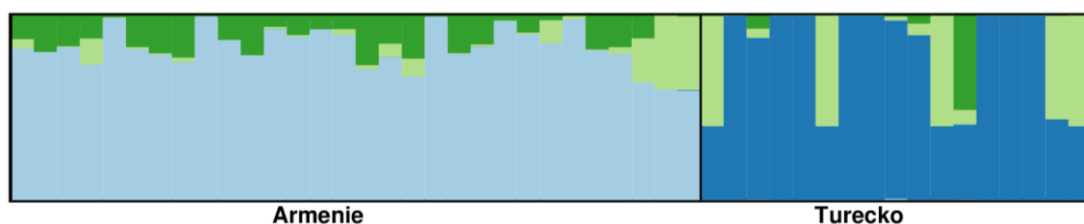


Graf č. 1: Střední hodnoty pravděpodobností z programu (STRUCTURE - Harvester) pro každé K od 1 - 8.

Na základě informací obsažených v grafu č. 1 byly vybrány shluky 2 a 4, které byly vloženy do obrázku č. 7 A) a B).



A)



B)

Obrázek č. 7: Výstup z programu STRUCTURE. **A)**  $K = 2$  a **B)**  $K = 4$ . Pořadí vzorků zleva doprava: arménská subpop. 1 vzorky 1-24, arménská subpop. 2 vzorky 1-6 a turecká pop. vzorky 1-17.

Analýza z programu STRUCTURE (viz obr. č. 7A) potvrdila striktní rozdělení na arménskou a tureckou populaci. Podle hodnoty  $K = 2$  byla turecká populace variabilnější. Vyšší variabilita arménské populace byla u  $K = 4$  (viz obr. č. 7 B). U tohoto shluku byla detekována v menší míře a různé škále podobnost obou populací. To mohlo být způsobeno tím, jak se druh šířil nebo, jak spolu populace komunikovaly (křížení), či kumunikují.

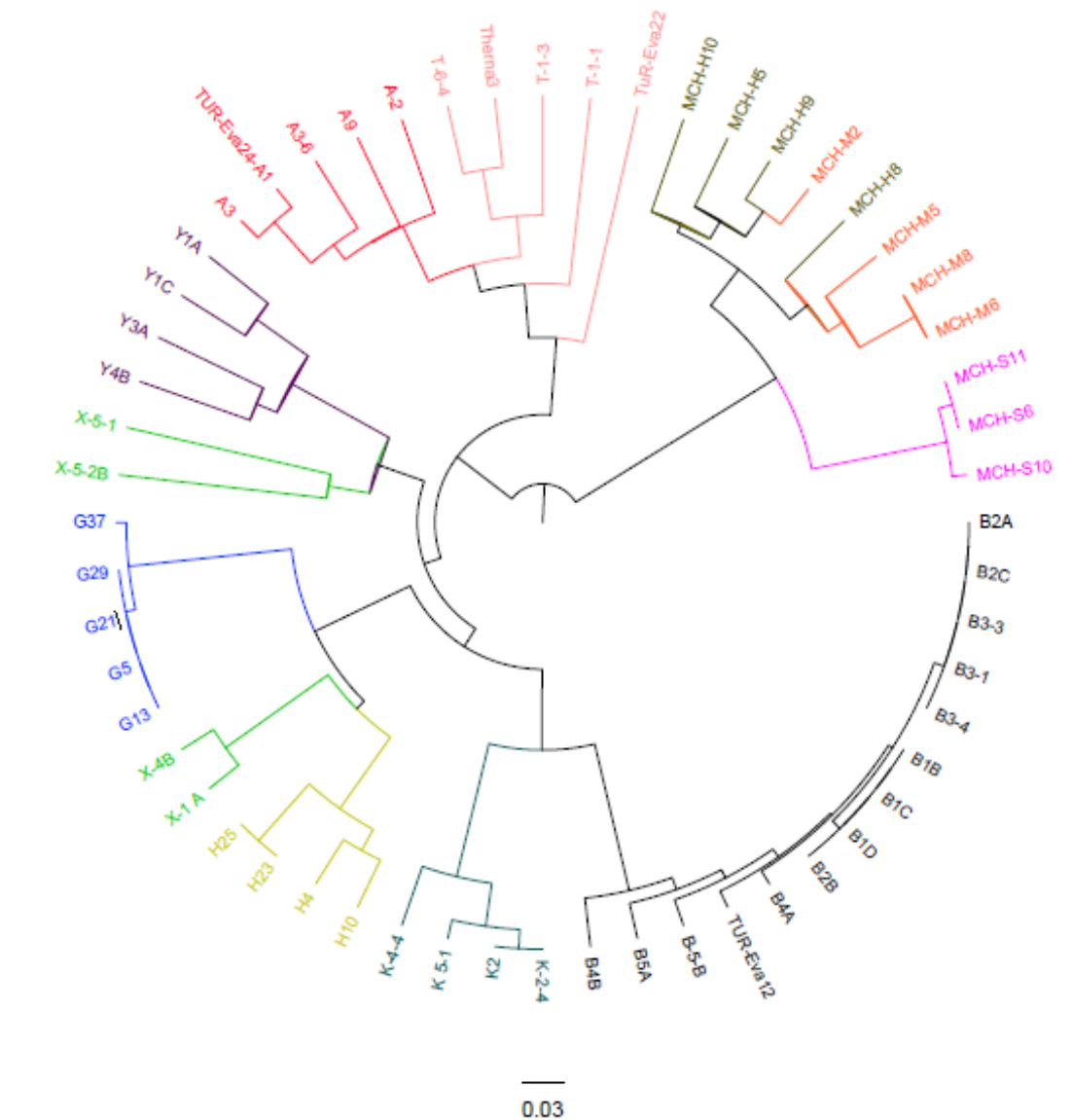
Tabulka č. 21: Přehled genetických hodnot rozmanitosti dvou populací *Vavilovia formosa* na základě 143 AFLP fragmentů. (*NS*, počet vzorků; *NBP*, počet fragmentů na populaci; *NPoB*, počet polymorfní fragmentů; *NPrB*, počet nalezených privátních fragmentů; *NFPB*, počet fixovaných privátních fragmentů; *NG*, počet genotypů; *GD*, genotypová diverzita; *P*, procento polymorfních lokusů; *HE*, očekávaná heterozygotnost).

	<b>Arménie</b>	<b>Turecko</b>
<b><math>N_S</math></b>	30	17
<b><math>N_{BP}</math></b>	97	107
<b><math>N_{PoB}</math></b>	39	30
<b><math>N_{PrB}</math></b>	36	46
<b><math>N_{FPB}</math></b>	7	24
<b><math>NG</math></b>	30	10
<b><math>GD</math></b>	1	0.79
<b><math>P</math> (%)</b>	27.27	20.98
<b><math>H_E</math></b>	0.098	0.077



AMOVA analýza odhalila molekulární odchylku (78,96%), která je přítomna mezi dvěma populacemi, zatímco menší část (21,04%) představují odchylky pozorované v populacích. Mezi populacemi byl pozorován rozdíl i díky  $F_{ST}$  (fixační index) = 0,78, který byl vypočítán v programu Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010).  $F_{ST}$  index nabývá hodnot 0-1, proto se jedná o významný rozdíl. Ostatní významné parametry byly zahrnuty do tabulky č. 21.

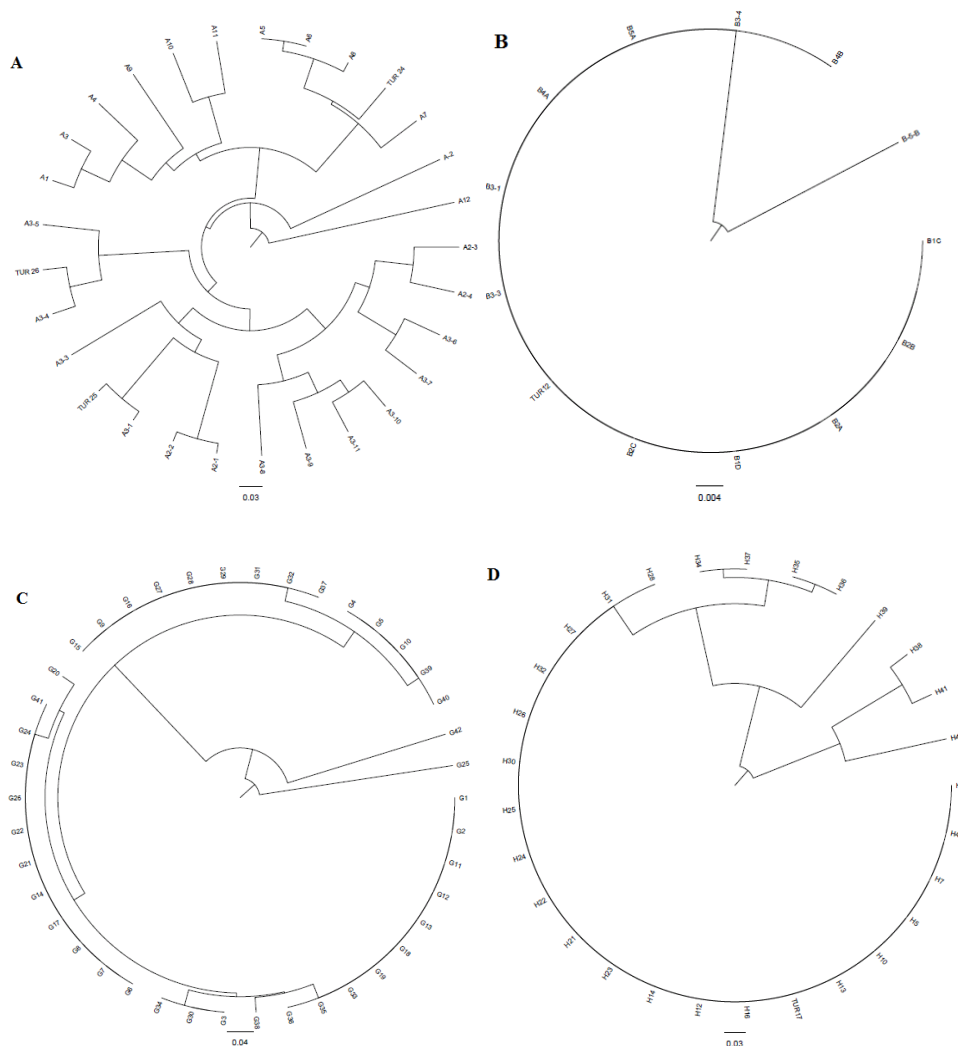
U druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius* byla testována pouze jedna primerová kombinace (viz tab. č. 15). Pro mezipopulační srovnání bylo vybráno 3 - 14 jedinců z každé populace, kteří prezentovali danou populaci (viz obr. č. 8). Bylo získáno 101 fragmentů.

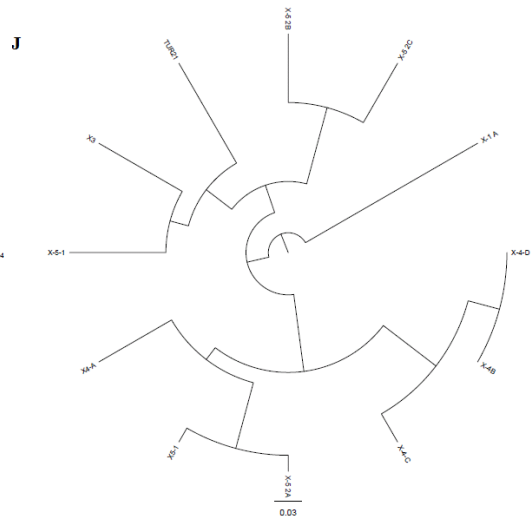
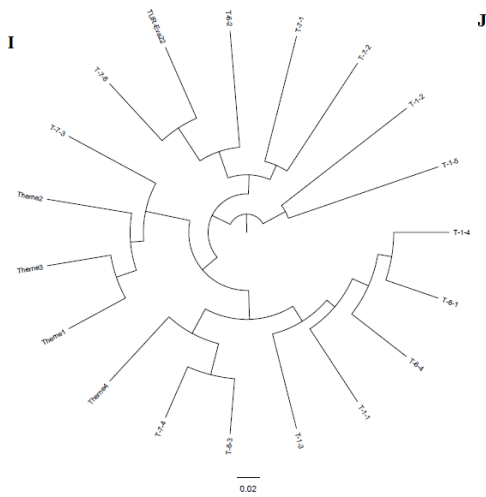
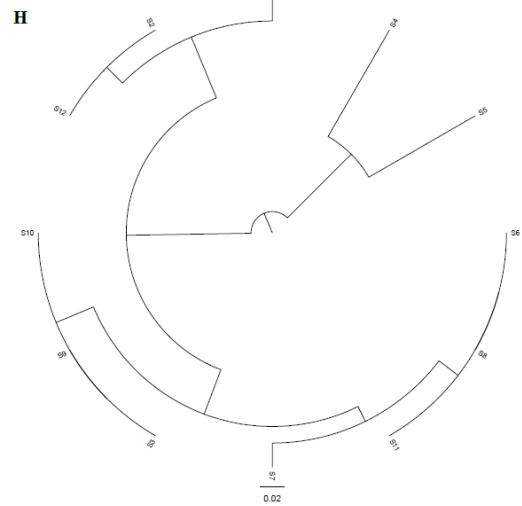
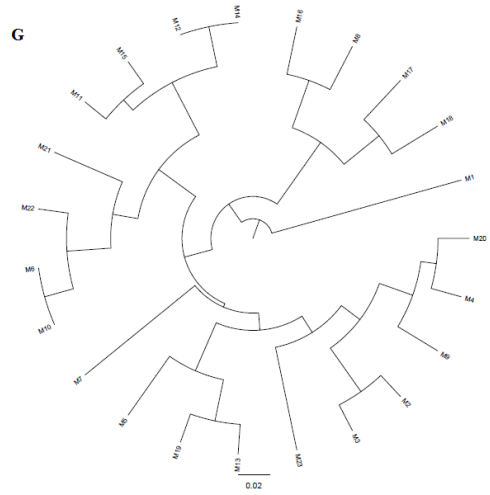
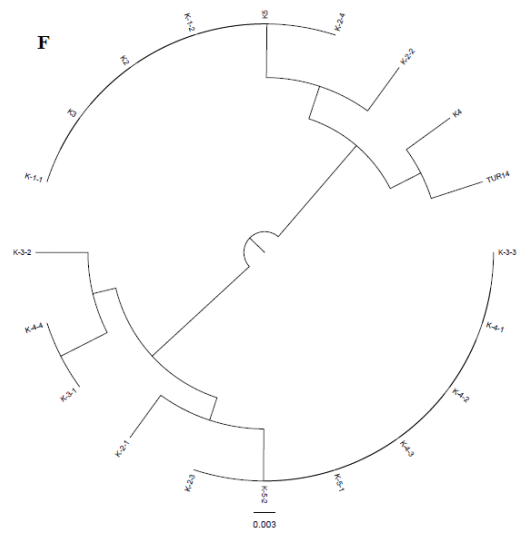
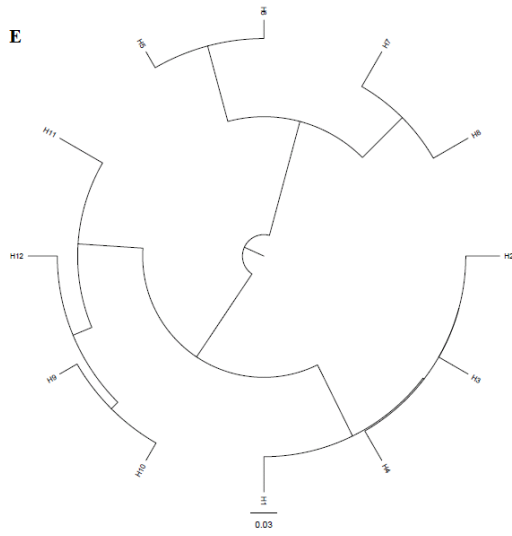


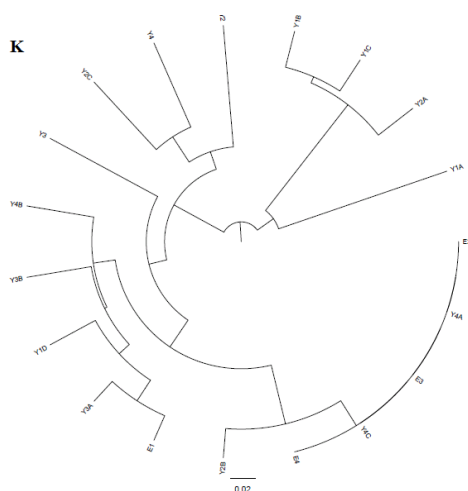
Obrázek č. 8: Fylogram znázorňující mezipopulační genetickou variabilitu druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius*. (Každá populace byla pro větší názornost zvýrazněna odlišnou barvou a zároveň první písmeno odpovídá názvu populace (viz tab. č. 4). U některých vzorků se první písmeno z názvu populace skrývá za písmeny MCH. Ty jsou v obrázku vpravo nahoře. H u těchto vzorků popisuje populaci z Maďarska z oblasti Balatonu).

Populace ve fylogramu (viz obr. č. 8), MCH-S = srbská p., H = maďarská p. z obl. Balatonu a M = maďarská p. z obl. Villany, byly vyhodnoceny natolik odlišné od ostatních populací z Turecka, že se musel fylogram rozštěpit na dvě větve. Ostatní populace z Turecka dohromady vytvořily druhou část fylogramu.

Vnitropopulační variabilita byla u rodu *Pisum* vyhodnocena pro každou populaci zvlášť. Variabilita byla znázorněna pomocí 11 fylogramů do obrázku č. 9 A-K.







Obrázek č. 9 (A-K): Fylogramy znázorňující vnitropopulační genetickou variabilitu druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius*. (A-K: Antalya, Bagyaki, Gurbuz, Hisar, Maďarsko-Balaton, Kebapčik, Maďarsko-Villany, Srbsko, Thermessos, Xaniasor, Yesilkoy).

Podle fylogramů (viz obr. č. 9) bylo možné stanovit populaci s největší a nejmenší vnitropopulační variabilitou. Téměř nulová variabilita byla zjištěna v populaci Bagyaki (viz obr. č. 9B). Největší vnitropopulační variabilitu měla pak populace Antalya (viz obr. č. 9A).

Druh *Pisum sativum* subsp. *elatius* nebyl podroben STRUCTURE analýze ani testu AMOVA, ale díky programu GenAlex byla pro každou populaci zvlášť vypočítána heterozygotnost a v procentech polymorfní fragmenty (viz tab. č. 21).

Tabulka č. 22: Hodnoty heterozygotnosti a údaje o informativních fragmentech pro každou populaci odděleně.

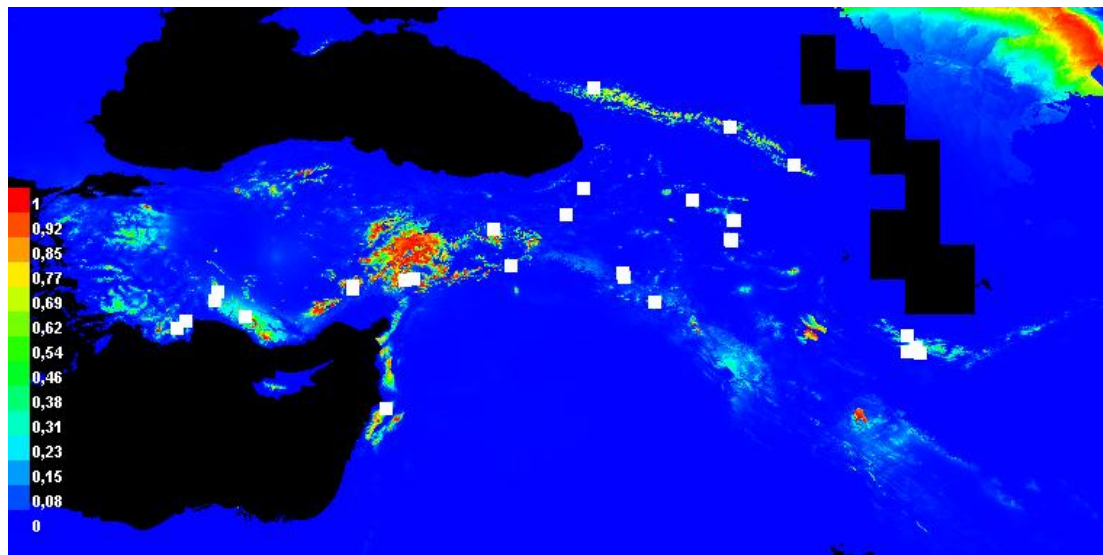
	<i>Pisum sativum</i> subsp. <i>elatius</i>	Počet vzorků	Heterozygotnost	Polymorfismus (%)
1. pop.	okolí jezera Balaton, Maďarsko	23	0,120	47,37
2. pop.	oblast Villany, Maďarsko	12	0,222	62,86
3. pop.	Srbsko	12	0,098	46,34
4. pop.	Antalya	30	0,268	77,19
5. pop.	Thermessos	25	0,228	60,34
6. pop.	Bagyaki	14	0,004	06,00
7. pop.	Kebapcik	20	0,028	07,25
8. pop.	Gurbuz	44	0,046	74,24
9. pop.	Hisar	29	0,197	71,21
10. pop.	Xaniasor	12	0,253	67,50

11. pop.	Yesilkoy	19	0,157	52,38
----------	----------	----	-------	-------

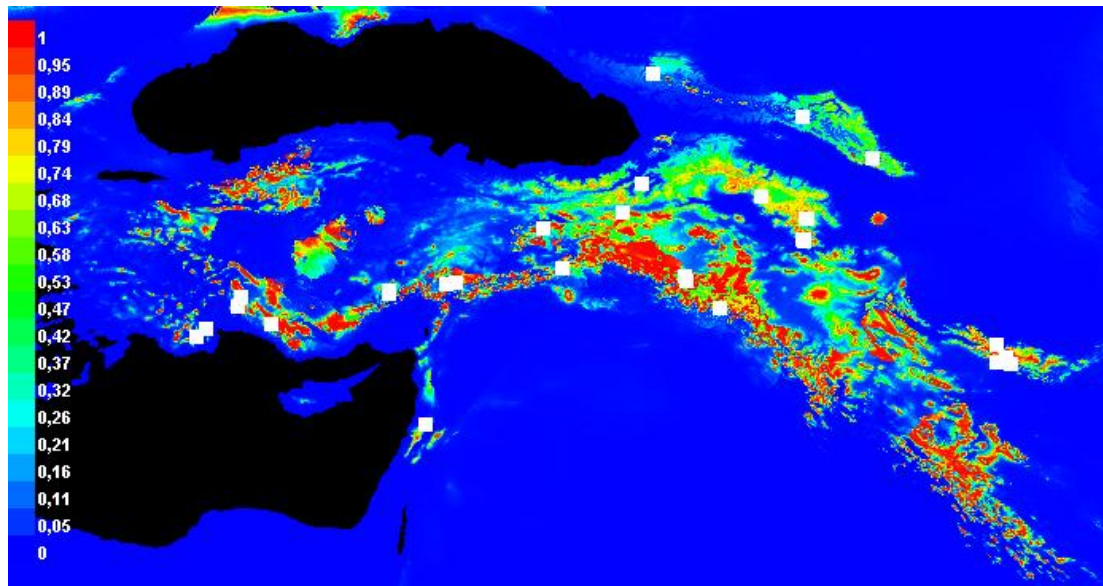
Pomocí údajů (viz tab. č. 22) byla podrobně popsána heterozygotnost *P. sativum* subsp. *elatus* s ohledem na počet vzorků. Polymorfismus byl chápán jako informační hodnota fragmentů použitých z vyhodnocování gelů.

### 3.4 Niche modelling

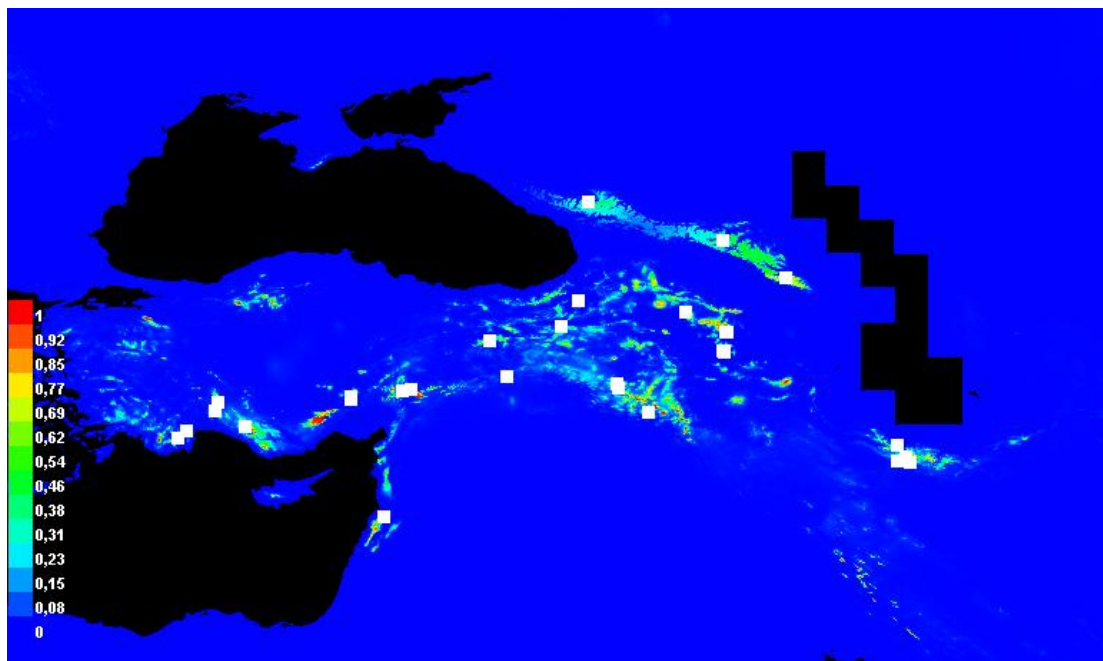
Údaje o geografickém areálu druhu *Vavilovia formosa*, přesné souřadnice jednotlivých položek a údaje o ekologii druhu umožnily modelování za použití algoritmu (MaxEnt) dle Philips *et al.* 2006 u tohoto druhu.



A)



B)



C)

Obrázek č. 8 (A-C): Výsledky z Niche modellingu. A) Poslední interglaciál (před 130 mil.l.). B) Poslední glaciální maximum (před 22 mil. l.). C) Současná situace.

Barevnou škálou nalevo u obrázku č. 8 byl znázorněn pravděpodobný výskyt *Vavilovia formosa* během let (od modré barvy = žádná pravděpodobnost, až po červenou barvu = nejvyšší pravděpodobnost výskytu, bílé čtverce znázorňují

skutečný doložený výskyt druhu). Druh nejvíce prosperoval během posledního glaciálu. V současné situaci druh *Vavilovia formosa* ubývá.

## 4 DISKUZE

Rody *Pisum* a *Vavilovia* jsou blízkými příbuznými. Poprvé to zjistili molekulárními metodami v práci Steele *et al.* (2004), kde sekvenovali chloroplastovou DNA, úsek *matK*. Příbuzenský vztah rodů potvrdil Lock & Maxted (2005) i bez použití molekulárních technik. Fylogeneticky jsou tak příbuzní, že při experimentálních pokusech Golubev *et al.* (1990) doložil vznik hybridů. V přírodě by hybridy vzniknout nemohly, protože oba druhy mají odlišnou ekologickou niku.

Z tohoto důvodu byla v diplomové práci studována genetická diverzita druhů *Vavilovia formosa* a *Pisum sativum* subsp. *elatius*. Bylo analyzováno několik vzorků ze tří populací *V. formosa* a z 11 populací *P. sativum* subsp. *elatius* podle vzoru Schaefer *et al.* 2012, který použil v práci více vzorků od každého druhu napříč čeledí *Fabaceae*, což mu umožnilo detailnější pohled na fylogenezi druhů a v menším měřítku nahlédnout do vnitrodruhové diverzity.

Na základě jednoho informativního SNP v sekvenci *psbA* došlo podle Schaefer *et al.* 2012 k rozlišení u rodu *Vavilovia* na dva haplotypy, jimž odpovídaly dva analyzované a dříve taxonomicky determinované „druhy“ - *V. formosa* a *V. aucheri*.

Obdobně jako Fedorov (1939) rozlišoval Grossheim (1949) dva druhy vavilovie, dříve zařazené do samostatného rodu *Alophotropis*, *A. aucheri* (Jaub. & Spach) Grossh. a *A. formosa* (Stev.) Grossh. Hlavní rozdíl mezi druhy měl být ve tvaru lístků. Vejčitý tvar lístků měl mít *A. aucheri* a obvejčitý tvar *A. formosa*.

Podobných výsledků bylo dosaženo pomocí sekvencí (viz tab. č. 6) aplikovaných v této práci na herbářové položky (viz tab. č. 3). U *Vavilovia formosa* byl odhalen jeden informativní SNP v sekvenci *ITS* a 7 bp indel či repetice GATTGGT v *matK*. To poukazuje na skutečnost, že se pravděpodobně bude jednat nejméně o dva rozdílné haplotypy. Tato skutečnost je patrná i z geografického hlediska. Repetice byla objevena u 8 vzorků z oblasti Arménie, Dagestánu, Nachičevanu a Íránu, ostatní vzorky z Arménie a Turecka měly v sekvencích indel. Zaznačením odlišných vzorků do mapy pomocí různých barev (viz obr. č. 2) lze sledovat dva oddělené areály, které mohou mít hybridní zónu v Arménii.



Sekvenační analýza probíhala několikrát. Při prvním sekvenování došlo na analýzu vždy jednoho vzorku jako zástupce populace (viz tab. č. 2 a 4), kromě populace 3 - 11 v případě *Pisum*. Po úpravě sekvencí se vybraní zástupci přiřadili k odpovídajícím haplotypům druhů. Populace 3 - 11 u *Pisum* nebyly sekvenovány, protože tento set DNA vzorků byl obdrženo později.

Během druhého sekvenování byly podrobeny analýze vzorky z herbářových položek (viz tab. č. 3) a zástupci zbylých 9 populací hrachu. Tato sekvenační analýza dokázala 2 haplotypy *Vavilovia formosa*. U hrachu byl každý zástupce populací přiřazen pomocí morfologické a ekologické analýzy dle Ben-Ze'ev & Zohary (1973) do 2 haplotypů: *Pisum elatius* a *P. humile* Boiss and Noë (= *P. syriacum* (Berger) Lehm.) (viz tab. č. 18). V práci pojednává o 3 haplotypech *P. elatius*, *P. humile* a *Pisum fulvum* Sibth. and Sm. Haplotyp *P. elatius* odpovídá vzorkům z Maďarska a Srbska. Vzorky z Turecka mají haplotyp *P. humile*. Tyto výsledky podporuje práce Smýkal (2011), kde po dosazení geografického původu studovaných položek planých typů hrachu *P. s. subsp. elatius*, bylo možné uspořádat do jednoho haplotypu položky ze severozápadní a centrální části Středomoří (Španělsko, Francie, Itálie, Makedonie a Řecko), zatímco do druhého patřily vzorky z jihozápadního Středomoří (Maroko, Tunisko, Alžírsko). Na Blízkém východě (Turecko, Jordánsko, Libanon, Sýrie a Izrael) se nacházely oba tyto haplotypy, což by odpovídalo původnímu centru diverzity rodu *Pisum*. Nejvýchodnější areál rozšíření (Arménie, Gruzie a Írán) zastupují položky se stejným haplotypem, jako byly nalezeny v jihozápadním Středomoří. Haplotypy byly identifikovány na základě chloroplastové DNA jako v diplomové práci. Druhé sekvenování vyhodnotil Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

Odlišná genetická variabilita byla prokázána i u symbiotických bakterií, které u *Fabaceae* vytváří hlízky poutající vzdušný kyslík. Je možné, že právě výskyt bakterií rodu *Bosea* a *Phyllobacterium* mohou naznačovat jiný poddruh rodu vavilovie a vysvětlit tak rozsáhlou genetickou variabilitu lokality severní Ossetie.

Bylo sebráno 16 vzorků z lokality severní Ossetie, kde byla již před tím dokázána největší genetická variabilita rostlin druhu *Vavilovia formosa*. Výsledky ukázaly, že se na tvorbě hlízek podílí různé druhy bakterií. Nejčastěji byl dokázán výskyt rodu *Rhizobia*, ale detekovány byly i rody *Bosea* a *Phyllobacterium*. Detekce proběhla pomocí AFLP fingerprintingu, sekvenování rDNA 16 S a ITS a za použití genů *nodC* a *nodX* (Safronova *et al.* 2014).

Diverzita rodu *Pisum* byla extenzivně studována, ale vždy na vzorcích pocházejících již z genových bank a především u kulturních forem (Jing *et al.* 2010, Smýkal *et al.* 2008, Sinjushin & Akopian 2011). Podobně jsou na tom i jiné druhy z čeledi *Fabaceae*, výjimky tvoří studie o druhu *Vicia cracca* L. (Trávníček *et al.* 2010) nebo druh *Lathyrus pannonicus* Jack. (Schlee *et al.* 2011). V této práci analyzované vzorky pocházely z terénu, ve většině případů ze sběrů vedoucího práce. Hlavním cílem práce bylo u druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius* prozkoumat heterozygotnost, která souvisí s možnou cizosprašností druhu. Podobnému tématu se experimentálně věnovala práce Dostálové *et al.* (2005). Pomocí polních pokusů se autoři zaměřili na křížení dvou odrůd *Pisum sativum*: Zekon a Arvika, kde v F1 generaci sledovali dominantní alely z odrůdy Arvika. Na základě získaných údajů předpokládají, že pravděpodobnost křížení u komerčních odrůd hrachu je extrémně nízká (nula v jejich experimentech). Práce monitorovala i škůdce a opylovače během pokusů, nejčastější výskyt byl květopase hrachorového (*Bruchus pisorum*), kyjatky hráškové (*Acyrtosiphon pisum*), třásněnky hrachové (*Kakothrips robustus*), včely medonosné (*Apis mellifera*) a čmeláků (*Bombus* sp.). V neotevřených květech hrachu je nejpravděpodobnějším kandidátem přenosu pylu *Bruchus pisorum*. Podle Orzáez *et al.* (1999) se jedná o samosprašný druh. Cizosprašnost bude pravděpodobně způsobena tím, že u rodu *Pisum* je pyl aktivní až 24 hodin, a přestože se jedná o rod samosprašný, jeho květy obsahují nektária jako lákadla pro opylovače. Proto je možný přenos pylu z jedné rostliny na druhou. To může být důvodem určité míry heterozygotnosti (Orzáez *et al.* 1999).

Heterozygotnost rodu *Pisum* byla zkoumána pomocí mikrosatelitů a na základě matice získané z AFLP, kde byl pro výpočet předpokládané heterozygotnosti zvolen program GenAlex.

Mikrosatelity měly být hlavní metodou při studiu genetické diverzity obou druhů, ale u druhu *Vavilovia formosa* se mikrosatelity (viz tab. č. 19) nepodařilo optimalizovat (viz obr. č. 4). To mohlo být způsobené tím, že vybrané primery byly vyvinuty pro jiné druhy, v tomto případě pro druhy *Pisum sativum* (Loridon *et al.* 2005), *Lathyrus sativus* (Yang *et al.* 2014) a *Medicago truncatula* Gaertn (Shiferaw *et al.* 2012). Z tohoto důvodu byla *Vavilovia formosa* podrobena analýze AFLP.

U druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius* některé mikrosatelity fungovaly, z výše vyjmenovaných to byly primery pro *Pisum sativum* uvedené v práci Loridon *et al.* (2005). Mikrosatelity pro druhy *Medicago truncatula*, *Lathyrus sativus* a některé vyrobené pro *Pisum sativum* nefungovaly. Pravděpodobně proto, že jejich sekvence druh *Pisum sativum* subsp. *elatius* neobsahoval. Domnívám se, že ze stejného důvodu nebyly mikrosatelity funkční u druhu *Vavilovia formosa*.

Stejně jako sekvence byly i mikrosatelity zkoumány ve dvou vlnách. Během první se zkoumaly vzorky populací 1 - 3 a v druhé vlně populace 4 - 11 (viz tab. č. 4). Tuto analýzu prováděl v rámci svého stipendijního pobytu na UP (září-prosinec 2014) Dr. Debjyoti Bhattacharya z Indie. Nejvýznamnější výsledky práce pomocí metody SSR u *Pisum* jsou popsány ve výsledcích v obrázku č. 5 (A-E).

Detekce metody SSR probíhala na 1,5 - 2% agarózovém gelu. Ve většině publikovaných prací např. (Loridon *et al.* 2005) detekce probíhá pomocí fluorescenčního značení, které je přesnější (Schuelke 2000).

Vyhodnocení SSR (AD 237, A9, AA 278 a AD 270) u rodu *Pisum* pomocí fluorescenčního značení probíhalo během měsíce dubna roku 2015. Proto kapitola "výsledky" v této práci hodnocení z fluorescenčního značení neobsahuje. Na analýzu bylo posláno 96 vzorků prezentující část populací Antalya, Thermessos, Yesilkoy, Hisar, Gurbuz, Kebapçik, Maďarsko - Balaton a Maďarsko - Villany. Heterozygotní stav byl objeven u třech vzorků z populací Thermessos, Gurbuz a Yesilkoy celkem 8krát. Heterozygotnost těchto vybraných vzorků se pohybuje okolo 2%.

Z agarózy byly fragmenty odečítány na základě markeru, který se odlišuje v násobcích 100 bp. Dále maximální rozlišovací schopnost i 2-3% agarózového gelu je kolem 10-15 bp. Z toho vyplývá, že pokud byl mikrosatelit v rámci populace variabilní pouze v řádu 10 bp, na agaróze bude vypadat podobně jako ostatní. Při vyhodnocování gelů pak můžeme usoudit chybné závěry, které by mohly být způsobené lidským faktorem. Přes možné problémy s detekcí vnitropopulační variability byla práce zaměřena i na míru heterozygotnosti a tu lze odhadnout i z agarózového gelu. Heterozygotnost druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius* se na základě analýzy 4 mikrosatelitů (AD 237, A9, AD 270 a B14) a 96 vzorků prezentující populaci Hisar, Xaniasor a Yesilkoy pohybuje okolo 1%.

U kultivarů čočky *Lens culinaris* Medik. bylo zjištěno možné křížení v rozmezí od 0,06% do 5,12%. Křížení závisí na kultivaru, lokalitě a roku. Existují dokonce důkazy o tom, že stupeň křížení může být dědičný. Čočka pravděpodobně bude mít značný potenciál pro evoluční změny. Kultivary rostoucí blízko u sebe nebo ve formě směsi mohou vést k přírodnímu nebo vědomému výběru a lokálním adaptacím (Horneburg 2006). To by mohlo vysvětlit, proč u některých populací rodu *Pisum* (viz tab. č. 5) které, i když jsou blízko u sebe, mají poměrně vysokou variabilitu. Čočka je převážně samosprašný druh stejně jako *Phaseolus vulgaris* L., a přesto dochází ke křížení. Tok genů probíhá ve směru z domestikovaných na plané 3krát rychleji než v opačném případě (Papa & Gepts 2003).

Podle Suso *et al.* (1999) je pravděpodobnější cizosprašnost druhu *Vicia faba* L. v oblasti Středomoří v subtropickém a mírném pásu. Výsledky diplomové práce tuto myšlenku potvrzují u populací z Turecka a Srbska u druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius*.

Bob, čočka, fazol, hrách nebo cizrna (*Cicer arietinum* L.), studovaná v práci Rubio *et al.* (2010), jsou označovány jako samosprašné druhy, ale v určitém procentu jsou i cizosprašné. Pravděpodobně se bude jednat o přirozenou adaptaci na boj proti inbrední depresi.

Metoda AFLP u *Vavilovia formosa* odhalila vnitropopulační i mezipopulační variabilitu druhu. Z hodnocení čtyř použitých primerových kombinací Msel a EcoRI (viz tab. č. 15) bylo získáno celkem 143 fragmentů. Hodnocení na prosvětlovačce (ELLA NHQ1R, ELLA NBX 2) hodnotil pan Dr. M. Kitner, který v případě vavilovie pracoval se získanou maticí i u dalších analýz.

Fylogram (viz obr. č. 6) znázorňuje mezipopulační a vnitropopulační variabilitu druhu *Vavilovia formosa*. Fylogram se větví na 2 základní větve, kde první větev obsahuje vzorky z Turecka a druhá vzorky z Arménie. To dokládá i geografická vzdálenost populací. I mezi arménskými populacemi 1 a 2 se vyskytuje variabilita, ale v tomto případě se bude spíše jednat o subpopulace, a proto se v dalších analýzách sloučily do populace jedné. Opět to potvrzuje i sběr vzorků na lokalitě v Arménii. Původní označení populací "Arménie 1" a "Arménie 2" (viz tab. č. 2) označuje stejnou lokalitu, pouze jiný transekt sběru. V případě "Arménie 1" byla vavilovie v transektu velmi četná. I ostatní rostliny byly v hojném počtu, což

mohlo být způsobeno tím, že tam dlouho nebyla žádná eroze podkladu. Tady je větší pravděpodobnost klonality rostlin než u populace "Arménie 2", kde *Vavilovia* rostla na relativně nedávno spadlé suťové lavině. V tomto transektu nebyla tak častá a jiné rostliny se téměř nevyskytovaly.

Z fylogramu a z tabulky č. 21 je patrné, že arménská populace je variabilnější než turecká. Podle analýzy AMOVA je mezi dvěma populacemi přítomna molekulární odchylka (78,96%), zatímco menší část (21,04%) je v rámci populace. Zajímavá je i hodnota přepokládané heterozygotnosti, i když je u obou populací menší než 1%. Druh bude pravděpodobně samosprašný. Toto podporují i data z celo-genomové DArTseq analýzy (Diversity Arrays Technology Ltd. Austrálie) čtyř vybraných vzorků (dva nejvíce vzdálené vzorky z každé populace podle AFLP výsledků) detekujících asi 3000 SNP z 15 000 analyzovaných, které dokládají velmi nízkou heterozygotnost mezi 0,005 a 0,01 (Smýkal et al., nepublikováno).

Jedná se o horský druh, který má spodní hranici areálu 1500 m n. m. a horní až 3500 m n. m. Z hlediska možnosti opylovačů můžeme předpokládat, že potenciaální heterozygoti se budou vyskytovat na dolní hranici výškového vymezení druhu. *Vavilovia* byla podrobena i analýze pomocí programu STRUCTURE. Na základě toho jsme získali informace o genetické podobnosti obou populací. Pomocí programu STRUCTURE - Harvester byly vybrány 2 shluky jako nejvíce informativní pro tuto analýzu (*viz graf 1*). Dle shluku  $K = 2$  byla populace z Turecka vyhodnocena jako variabilnější na základě jednoho vzorku. U vzorků z Arménie byla vyšší variabilita pro  $K = 4$  (*viz obr. č. 7*).

U druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius* byla mezipopulační variabilita vizualizována pomocí fylogramu (*viz obr. č. 8*). Laboratoř botaniky na UP je vybavena 2 prosvětlovačkami, na kterých lze odečítat fragmenty ze 3 gelů. To by bylo v mém případě velmi náročné. AFLP 253 vzorků byla rozmístěna na 4 gelech. Kvůli lepší manipulaci při vyhodnocování výsledků mezipopulační variability bylo vybráno 3-14 vzorků jako potenciaální zástupci populací. Všichni jedinci do mezipopulační diverzity nebyli zahrnuti. To mohlo způsobit nadhodnocení nebo podhodnocení diverzity mezi populacemi. Dalším faktorem, který hrál významnou roli při hodnocení, byl problém s plísní v laboratoři, která se pravděpodobně živila močovinou na nedokonale opláchnutých sklech s polyakrylamidovým gelem. Plíseň

způsobila, že fragmenty obarvené stříbrem se po pár dnech infekce staly špatně viditelnými. Tento případ postihl gel, který obsahoval vzorky populací z Maďarska a Srbska. AFLP hodnocení je subjektivní záležitostí, pokud není vyhodnocena na základě softwarového fingerprintingu, aplikovatelného v případě fragmentační analýzy na sekvenátoru. Proto výsledky z fylogramů (viz obr. č. 7, 8, 9) mohou být částečně zkreslené. Fylogram (viz obr. č. 8) se větví na dvě základní větve. Na populace z Turecka a na populace 1-3 (z Maďarska a Srbska). To buď může potvrzovat hypotézu o 2 haplotypech (Smýkal 2011) zjištěných během sekvenace chloroplastové DNA, nebo nadhodnocenou mezipopulační diverzitu druhu.

Vnitropopulační variabilita *P. sativum* subsp. *elatius* je vidět na fylogramech (viz obr. č. 9). Vyšší variabilitu reprezentují populace Antalya, Maďarsko - Villany, Thermessos, Xaniasor a Yesilkoy. Menší variabilitu mají populace Bagyaki, Srbsko, Maďarsko - Balaton, Gurbuz, Hisar a Kebabčik. V případě populace Bagyaki se jedná o variabilitu téměř nulovou. Tady musíme zohlednit i informace o geografické vzdálenosti populací, odhadnuté velikosti a areálu populace z tabulek č. 4 a 5. Reprezentativní vzorek populace se pohybuje od 20 do 100/150 nasbíraných vzorků. Populace z oblasti Bagyaki reprezentuje 17 vzorků a to může způsobit podhodnocení variability.

Kvůli absenci společně analyzovaných vzorků při hodnocení mezipopulační variability nebylo možné podrobit výslednou matici statistické analýze AMOVA a programu STRUCTURE jako u druhu *Vavilovia formosa*. Z tohoto důvodu byla spočítána pomocí programu GenAlex alespoň heterozygotnost pro každou populaci zvlášť (viz tab. č. 22). Podle výsledků z tabulky č. 22 by největší procento heterozygotů připadlo na populaci Antalya. Toto vyvrací metoda SSR, která detekovala heterozygoty převážně v srbské populaci, která podle výsledků AFLP (viz tab. č. 22) patří mezi populace na heterozygoty slabší. Heterozygoti z populací Hisar, Xaniasor a Yesilkoy se shodují s tvrzením vyplývajícím z tabulky.. Vyhodnocení SSR pomocí fluorescenčního značení detekovalo heterozygoty v populaci Thermessos, Gurbuz a Yesilkoy. Gurbuz opět patří mezi populace na heterozygoty slabší (viz tab. č. 22).

Díky profesoru S. Pirintsovi (University of Crete, Heraklion, Řecko) bylo možné zahrnout do této práce i výsledky z Niche modellingu zpracované pro druh

*Vavilovia formosa*. Postup byl podobný jako u druhu *Zelkova abalicea* (Lam.) Boiss., s kterým pan Pirintsos pracoval dříve ( viz práce *Bosque et al. 2013*).

Západní Kavkaz a pobřežní oblasti Černého moře mají nejvýhodnější vlhkostní a teplotní podmínky v severní Eurasii pro růst listnatých a teplých smíšených lesů. Dolukhanov (1989) a Grichuk (1984) naznačují, že tyto oblasti jsou pravděpodobně útočištěm pro teplomilnou flóru během nejchladnějších fází posledního glaciálu. To ale neplatí pro vavilovii. Naopak se druhu během posledního glaciálu dařilo nejlépe (viz obr. č. 8 B). Adaptace na suché a studené klima během glaciálu umožňovalo druhu *Vavilovia formosa* expanzi.

Naopak dnešní teplé a vlhké klima vavilovii neprospívá (viz obr. 8 C). Pravděpodobně jí to bere jedinou výhodu, kterou tato rostlina měla v posledním glaciálu oproti ostatním druhům na stanovišti.

## 5 ZÁVĚR

Téměř všechny molekulární metody použité v práci potvrdily mezipopulační a vnitropopulační variabilitu druhů *Vavilovia formosa* a *Pisum sativum* subsp. *elatius*.

Sekvenační analýzy dokázaly přítomnost odlišných haplotypů. V případě *Vavilovia formosa* se jednalo o 2 haplotypy, které vykazovaly částečnou geografickou strukturovanost s překryvem v Arménii a Dagestánu.

U *Pisum* pak přítomnost haplotypu *P. elatius* a *P. humile*. Toto tvrzení je podloženo i geografíí obou druhů.

Mikrosatelity se ukázaly jako nezdolná překážka pro druh *Vavilovia formosa*, ale u hrachu se s jejich pomocí podařilo dokázat určitou vnitropopulační variabilitu. Míra heterozygotnosti druhu byla odhadnuta na 1% (detekce 96 vzorků na agaróze) a 2% (detekce 96 odlišných vzorků pomocí fluorescenčního značení).

Podle metody AFLP byla u vavilovie jasně dokázána odlišnost mezi populacemi z Arménie a Turecka. Arménská populace byla vyhodnocena jako variabilnější nejen na základě fylogramu, ale za použití programu STRUCTURE a statistické analýzy AMOVA.

AFLP u druhu *Pisum sativum* subsp. *elatius* odhalila mezipopulační i vnitropopulační variabilitu, která populace rozdělila ve fylogramu do dvou větví. Na populace z Turecka a na populace 1-3 (z Maďarska a Srbska). Pomocí dalších fylogramů (pro každou populaci zvlášť) byla populace z Antalye vyhodnocena jako nejvariabilnější a populace z Bagyaki jako ta s nejnižší variabilitou. Toto potvrdil i program GenAlex zaměřený u hrachu na analýzu polymorfních lokusů a předpokládanou heterozygotnost, která nabývá hodnot od 0,004 do 0,268.

Niche modelling poukazuje na znepokojující informaci, druh *Vavilovia formosa* mizí. Nejlépe se mu dařilo při posledním maximálním glaciálu, kdy jako horská rostlina adaptovaná na sucho a chlad, měla logicky oproti ostatním značné výhody.



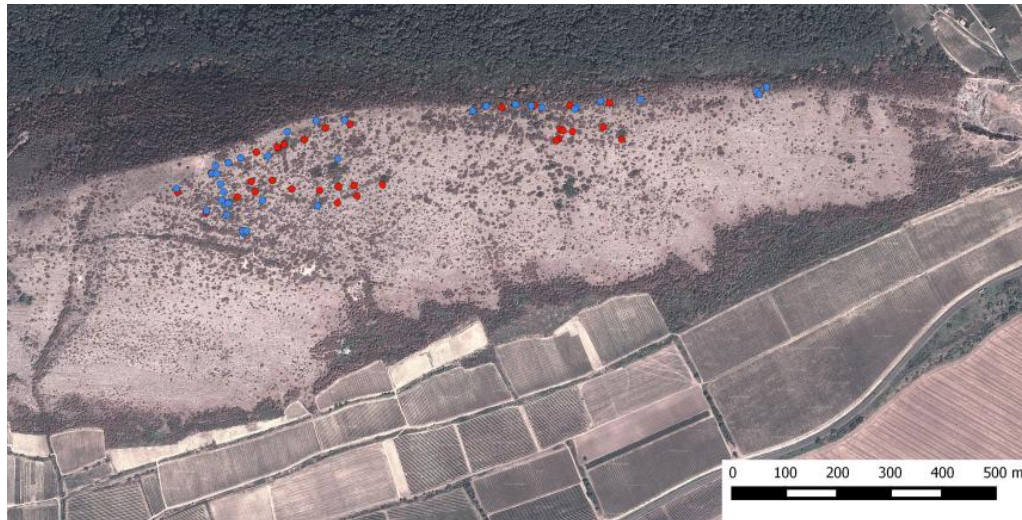
## 6 PŘÍLOHY



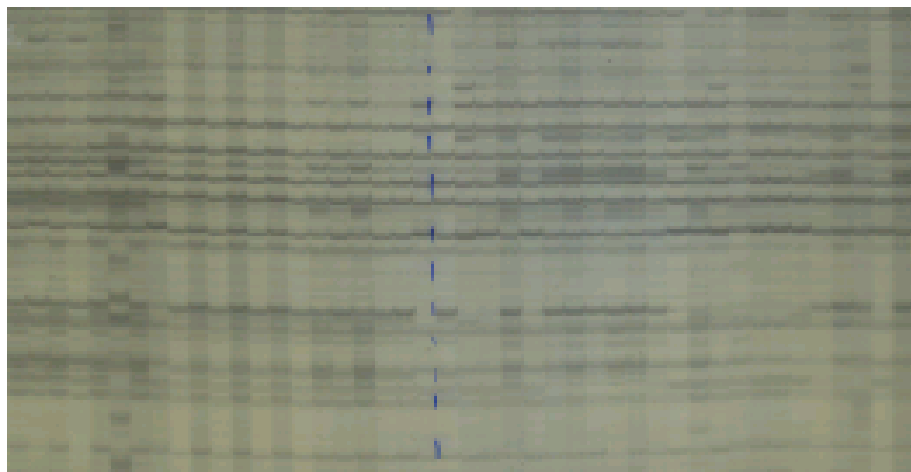
Příloha č. 1: Fotografie z lokality *Vavilovia formosa*, hora Ughtasar v Arménii. Červeně je vyznačena *Vavilovia* (zdroj: P. Smýkal).



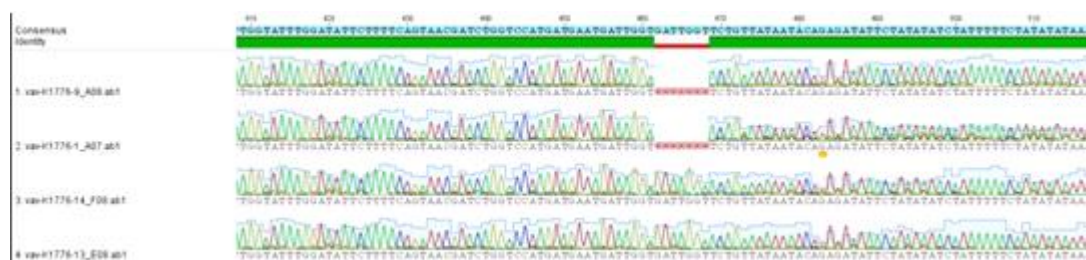
Příloha č. 2 a: Maďarsko oblast Villány: fotografie z lokality *Pisum sativum* subsp. *elatius* (zdroj: M. Chaloupská).



Příloha č. 2 b: Maďarsko oblast Villany: vyznačení vyměřených čtverců. (Červená kolečka představují čtverce, kde hrách nebyl nalezen, a modrá, kde nalezen byl) (zdroj: L. Erdős).



Příloha č. 3: Ukázka hodnoceného skla v případě výsledků mezipopulační variability u druhu *P. sativum* subsp. *elatius* (vlevo část vzorků z Antalye, vpravo část z Thermessosu) (zdroj: M. Chaloupská).



Příloha č. 4: Důkaz o repetici GATTGGT a 7 bp indelu znázorněné v programu Geneious v sekvencích *matK*.

## 7 CITACE

- AKOPIAN J., SARUKHANYAN N., GABRIELIAN I. & *et al.* (2010): Reports on establishing an ex situ site for 'beautiful' *Vavilovia* (*Vavilovia formosa*) in Armenia. - Genetic Resources and Crop Evolution. 57: 1127-1134.
- AMBROSE M. & MAXTED N. (2001): Peas (*Pisum L.*). - Plant genetic resources of legumes in the mediterranean. 39: 181-190.
- ASMUSSEN, C. B. & LISTON, A. (1998): Chloroplast DNA characters, phylogeny, and classification of *Lathyrus* (*Fabaceae*). - Amer. J. Bot. 85(3): 387-401.
- ATLAGIC J., MIKIČ A., TERZIC S., ZORIĆ L., ZEREMSKI-SKORIC T., MIHAILOVIC V., ČUPINA B. (2010): Contributions to the characterization of *Vavilovia formosa* (syn. *Pisum formosum*). II. Morphology of androecium and gynoecium and mitosis. - *Pisum Genet.* 42:25-27.
- AZMAT M. A., KHAN A. A., SAEED A., ASHRAF M., & NIAZ S. (2012): Screening pea germplasm against Erysiphe polygonifera disease severity and latent period. - Inter. J. Veget. Sci. 18: 153-160.
- BARANGER A. G., AUBERT G., ARNAU G., LAINÉ A. L., DENIOT G., POTIER J., WEINACHTER C., LEJEUNE-HÉNAUT J., LALLEMAND J., & BURSTIN J. (2004): Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein- and PCR-based markers. - Theor. Appl. Genet. 108: 1309-1321.
- BEN-ZE'EV N. & ZOHARY D. (1973): Species relationship in the genus *Pisum L.* - Israel Journal of Botany. 22: 73-91.
- BOGDANOVA V. S. (2007): Inheritance of organelle DNA markers in a pea cross associated with nuclear-cytoplasmic incompatibility. - Theor. Appl. Genet. 114:(4425) 333-339.
- 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.

BOGDANOVA V. S., OLGA O. ZAYTSEVA O. O., ANATOLIY V. MGLINETS A. V., SHATSKAYA N. V., KOSTERIN O. E. & VASILIEV G. V. (2015): Nuclear-Cytoplasmic Conflict in Pea (*Pisum sativum* L.) Is Associated with Nuclear and Plastidic Candidate Genes Encoding Acetyl-CoA Carboxylase Subunits - PLoS ONE 10(3): 1-18.

BOSQUE M., ADAMOGIANNI M.-I., BARIOTAKIS M., FAZAN L., STOFFEL M., GARFI G., GRATZFELD J., KOZLOWSKI G., PIRINTSOS S., (2013): Fine-scale spatial patterns of the Tertiary relict *Zelkova abelicea* (*Ulmaceae*) indicate possible processes contributing to its persistence to climate changes. - Reg. Environ Change. 14: 835-849.

BURSTIN J., DENIOT G., POTIER J., WEINACHTER C., AUBERT G., BARANGER A. (2001): Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*. - Plant Breed. 120:311–317.

CROFT A.M., PANG P.C.K. & TAYLOR P.W.J. (1999): Molecular analysis of *Lathyrus sativus* L.(grasspea) and related *Lathyrus* species. - Euphytica. 107:167-176.

DAVIES P.H. (1970): *Vavilovia* A. Fed. In: Davies P.H. (ed) Flora of Turkey and East Aegean Islands 3. University of Edinburgh, Edinburgh: 44–45.

DOLUKHANOV P. M. (1989): Prehistoric ethnicity in the north-east of Europe - comments on the paper by Milton G. Nunez. - Fennoscandia archaeologica. 6: 81-84.

DOSTÁLOVÁ R., SEIDENGLANZ M. & GRIGA M. (2005): Simulation and Assessment of Possible Environmental Risks Associated with Release of Genetically Modified Peas (*Pisum sativum* L.) into Environment in Central Europe. - Czech J. Genet. Plant Breed. 41 (2): 51-63.

- DOYLE J.J., DOYLE J.L., BALLENGER J.A., DICKSON E.E., KAJITA T. & OHASHI (1997): A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the *Leguminosae*: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. - *American Journal of Botany*. 84: 541–554.
- EARL D.A. & von HOLDT B. M. (2012) :*Structure Harvester*: a website and program for visualizing *Structure* output and implementing the Evanno method. - *Conservation Genetics Resources*. 4 (2): 359-361.
- ELLIS T. H. N. (2011): *Pisum*. - In: Kole C. [edd.] *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. 237–248, Springer, Heidelberg, Germany.
- ENDO Y., CHOI B.H., OHASHI H. & DELGADO-SALINAS A. (2008) Phylogenetic relationships of New World *Vicia* (*Leguminosae*) inferred from nrDNA internal transcribed spacer sequences and floral characters. - *Systematic Botany*. 33: 356–363.
- ERDŐS L., MÉRI Á., BÁTORI Z., GALLÉ R. & KÖRMÖCZI L. (2012): North-south facing vegetation gradients in the Villány Mountains: a case study on the population and the community level. – *Pakistan Journal of Botany* 44: 927-932.
- ERDŐS L., CSERHALMI D., BÁTORI Z., KISS T., MORSCHHAUSER T., BENYHE B. & DÉNES A. (2013): Shrub encroachment in a wooded-steppe mosaic: combining gis methods with landscape historical analysis. - *Applied ecology and environmental research* .11(3): 371-384.
- EXCOFFIER L. & LISCHER H. E. L. (2010): Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. - *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- FALUSH D., STEPHENS M, PRITCHARD J. K. (2007): Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. - *Mol Ecol Notes* 7: 574–578.

- FEDOROV A. A. (1939): Wild high-mountain peas of Caucasus.- Trans Biol Inst Arm SSR 1:39–79 (in Russian).
- FENNELL S.R., POWELL W., WRIGHT F., RAMSAY G. & WANGH R.(1998): Phylogenetic relationships between *Vicia faba* (*Fabaceae*) and related species inferred from chloroplast *trnL* sequences. - Plant Syst Evol. 212:247–259.
- GOLUBEV A. A. (1990): Habitats, collection, cultivation and hybridization of *Vavilovia formosa* Fed. Bull. - Appl Bot Genet Plant Breed. 135:67–75.
- GOROVOV L.I. (1937): Gorocho (Peas). Kulturnaja Flora SSR. Moscow: State Printing Offic. 229–336.
- GROSSHEIM A. A. (1949): Identification of plants of the Caucasus. - Moscow. Sovetskaya Nauka. 162 (in Russian).
- GRICHUK V. P. (1984): Late Pleistocene vegetation history. - In: Velichko A. A. [edd.] Late Quaternary Environments of the Soviet Union, 155-178, University of Minnesota Press, Minneapolis.
- HORNEBURG B. (2006): Outcrossing in lentil *Lens culinaris* depends on cultivar, location and year, and varies within cultivars. - Plant Breeding. 125(6): 638-640.
- CHALOUPSKÁ M. (2013): Morfologické a molekulární studium fylogeneze a genetické diverzity druhů *Vicia tetrasperma*, *Lathyrus ochrus* a *Lathyrus clymenum*, nejbližších příbuzných rodu *Pisum*. Olomouc.
- CHRTÍKOVÁ A. (1995): *Pisum* L. - hrách. - In: Slavík B. [edd.] Květena České republiky, 4: 437-438, Academia, Praha.
- JING R., VERSHININ A., GRZEBYTA J., SHAW P., SMÝKAL P., MARSHALL D., AMBROSE M. J., ELLIS T. H. N., & FLAVELL A. J. (2010): The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. - BMC Evol. Biol. 10: 44.

- KASS E. & WINK M. (1996): Molecular evolution of the *Leguminosae*: phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL*-sequences. - *Biochemical Systematics and Ecology*. 24: 365-378.
- KENICER G. J. (2007): Systematics and biogeography of *Lathyrus* L. (*Leguminosae*, *Papilionoideae*). PhD Thesis, Royal Botanical Garden Edinburgh.
- KENICER G. J., SMÝKAL P., VISHNYAKOVA M. & MIKIC A. (2009): *Vavilovia formosa*, an intriguing *Pisum* relative. - *Grain legumes*. 51.
- KENICER G. J., KAJITA T., PENNINGTON R. T. & MURATA J. (2005): Systematics and biogeography of *Lathyrus* (*Leguminosae*) based on internal transcribed spacer and cpDNA sequence data. - *American Journal of Botany*. 92: 1199–1209.
- KITNER M., LEBEDA A., DOLEŽALOVÁ I., MARAS M., KŘÍSTKOVÁ E., NEVO E., PAVLÍČEK T., MEGLIC V. & BEHARAV A. (2008): AFLP analysis of *Lactuca saligna* germplasm collections from four European and three Middle Eastern countries. - *Israel J. Plant Sci*. 56: 185-193.
- KOSTERIN O. E., ZAYTSEVA O. O., BOGDANOVA V. S. & AMBROSE M. (2010): New data on three molecular markers from different cellular genomes in Mediterranean accessions reveal new insights into phylogeography of *Pisum sativum* L. subsp. *elatius* (Bieb.) Schmalh. - *Genetic Resources and Crop Evolution*. 57: 733–739.
- KUPICHA F. K. (1981): *Vicieae* (Adans.) DC. (1825) nom conserv prop. In: Polhill R.M. & Raven P.H. (eds) *Advances in Legume Systematics 1*. Kew: Royal Botanical Gardens: 377–381.
- LAMPRECHT H. (1963) Zur Kenntnis von *Pisum arvense* L. oect. *abyssinicum* Braun, mit genetischen und zytologischen Ergebnissen. - *Agric Hort Genetics*. 21: 35–55.

- LOCK M. & MAXTED N. (2005): Tribe *Fabeae*. In: Lewis G., Schrire B., Mackinder B. and Lock M. (eds) Legumes of the World. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew.
- LORIDON K., MCPHEE K., MORIN J., DUBREUIL P., PILET-NAYEL M. L., AUBERT G., RAMEAU C., BARANGER A., COYNE C., LEJEUNE-HE`NAUT I., BURSTIN J. (2005): Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.) - Theor Appl Genet. 111: 1022–1031.
- MAYER M. S. & BAGGA S. K. (2002): The phylogeny of *Lens* (*Leguminosae*): new insight from *ITS* sequence analysis. - Plant Syst Evol. 232:145-154.
- MEUDT H. M. & CLARKE A. C. (2007): Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. - Science direct. 12: 106-117.
- MIKIČ A., SMÝKAL P., KENICER G., SARUKHANYAN N., AKOPIAN J., GABRIELIAN I., VANYAN A. SINJUSHIN A., DEMIDENKO N., ČUPINA B., MIHAILOVI V., VISHNYAKOVA M., AMBROSE M. (2010): Achievements in Research on Vavilovia (*Vavilovia formosa* (Stev.) Fed.), a Legume Crop Wild Relative. - Genetic resources. 47:387-394.
- MIKIČ A. (2012): Words for ancient eurasian grain legumes in the hypothetical Altaic family. - Folia linguistica historica. 33: 123-134.
- ORZÁEZ D., BLAY R. & GRANELL A.(1999): Programme of senescence in petals and carpels of *Pisum sativum* L. flowers and its control by ethylene. - Planta. 208: 220-226.
- PAPA R. & GEPTS P. (2003): Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. -Theor Appl Genet. 106: 239-250.
- PEAKALL R. & SMOUSE P. E. (2006): GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. - Mol. Ecol. 6: 288–295.



- PHILLIPS S. J., ANDERSON R. P. & SCHAPIRE R. E. (2006): Maximum entropy modeling of species geographic distributions. - *Ecological modelling*. 190:231–259.
- ROSENBERG N. A. (2004): *Distruct*: a program for the graphical display of population structure. - *Mol Ecol Notes* 4: 137–138.
- RUBIO J., FERNANDEZ-ROMERO M. D., MILLÁN T., GIL J. & SUSO M. J. (2010): Outcrossing rate and genetic structure on an open-flowering population of *Cicer arietinum* L. based on microsatellite markers. 5th International Food Legumes Research Conference (IFLRC-V) & 7th European Conference on Grain Legumes, AEP-VII. Book of Abstracts, April 26–30, Antalya (Turkey), 220.
- SAAR D.E. & POLANS N.O. (2000): *ITS* sequence variation in selected taxa of *Pisum*. - *Pisum Genetics*. 109: 195–213.
- SAFRONOVA V. I., KIMEKLIS A. K., CHIZHEVSKAYA E. P., BELIMOV A. A., ANDRONOV E. E., PINAEV A. G., PUKHAEV A. R., POPOV K. P. & TIKHONOVICH I. A. (2014): Genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the relic species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. - *Antonie Van Leeuwenhoek* 105:389–399.
- SARDANA S., MAHAJAN R. K., GAUTAM N. K., & RAM B. (2007): Genetic variability in pea (*Pisum sativum* L.) germplasm for utilization. - *Sabrao J. Breeding and Genet.* 39: 31–41.
- SARIKAMIS, G., YANMAZ R., ERMIS, S., BAKIR M., & YUKSEL C. (2010) Genetic characterization of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey using morphological and SSR markers. - *Genet. Mol. Res.* 9: 591–600.
- SHAW J., LICKEY E. B., BECK J. T., FARMER S. B., LIU W., MILLER J., SIRIPUN K. C., WINDER CH. C., SCHILLING E. E. & SMALL R. L. (2005): The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast dna sequences for phylogenetic analysis. - *American Journal of Botany* 92(1): 142–166.

- SHIFERAW E., PE`M. E.,PORCEDDU E. & PONNAIAH M. (2012): Exploring the genetic diversity of Ethiopian grass pea (*Lathyrus sativus* L.) using EST-SSR markers. - Mol Breeding 30: 789–797.
- SCHAEFER H., HECHENLEITNER P., SANTOS-GUERRA A. & *et al.*(2012): Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe *Fabeae* with special focus on the middle-Atlantic island lineages. - BMC Evolutionary Biology. 12: 1-19.
- SCHLEE M., GÖKER M., GRIMM G. & HEMLEBEN V. (2011): Genetic patterns in the *Lathyrus pannonicus* complex (*Fabaceae*) reflect ecological differentiation rather than biogeography and traditional subspecific division. - Botanical Journal of the Linnean Society. 165 : 402–421.
- SCHUELKE M. (2000): An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. - Nat Biotechnol 18(2):233–234.
- SINJUSHIN A. A. & AKOPIAN J. A.(2011): On seedling structure in *Pisum* L., *Lathyrus* L. and *Vavilovia* Fed. (*Fabeae*: *Fabaceae*). - Wulfenia 18: 81–93.
- SKALICKÁ A. & SKALICKÝ V. (1995): *Fabaceae* LINDL. - bobovité. - In: Slavík B. [edd.] Květena České republiky, 4: 326-328, Academia, Praha.
- SMÝKAL P., HÝBL M., CORANDER J., JARKOVSKÝ J., FLAVELL A., & GRIGA M. (2008): Genetic diversity and population structure of pea (*Pisum sativum* L.) cultivars derived from combined retrotransposon, microsatellite and morphological marker analysis. - Theor. Appl. Genet. 117: 413–424.
- SMÝKAL P., KENICER G., FLAVELL A.; *et al.* (2011): Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. - Plant Genetic Resources. 9: 4-18.
- SMÝKAL P. (2011): Fylogeneze, biogeografie a genetická diverzita rodu hrách. - Živa. 4: 151-154.

- SMÝKAL P., COYNE C., REDDEN R., & MAXTED N. (2013): Peas. - In: Singh M. & Upadhyaya H. [edd.] Genetic and Genomic Resources of Grain Legume Improvement Elsevier, Netherlands.
- SMÝKAL P., COYNE C. J., AMBROSE M. J., MAXTED N., SCHAEFER H., BLAIRM. 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. L., WANG L. X., GUO. Y., QIU L. J., REDDEN R. J., & VARSHNEY R. K. (2015): Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. - Critical Reviews in Plant Sciences. 34:1–62.
- SUSO M. J., MORENO M. T. & MELCHINGER A. E. (1999): variation in outcrossing rate and genetic structure on six cultivars of *Vicia faba* L. as affected by geographic location and year. - Plant Breeding. 118(4): 347–350.
- STEELE K.P. & WOJCIECHWSKI M.F. (2003): Phylogenetic analyses of tribes *Trifolieae* and *Vicieae*, based on sequences of the plastid gene *matK* (*Papilionoideae: Leguminosae*). In: Klitgaard B.B. & Bruneau (eds) Advances in Legume Systematics. Kew: Royal Botanical Garden: 355–370.
- STEVEN C. (1812): *Orobus formosus* Steven. - Mem Soc Imp Nat Mosc 4:50 (in French).
- TRÁVNÍČEK P., ELIÁŠOVÁ A., SUDA J. (2010): The distribution of cytotypes of *Vicia cracca* in Central Europe: the changes that have occurred over the last four decades. Preslia 81: 149-163.
- VAN DER MAESEN L.J.G. (1998): Wild plants as genetic resources for crop improvement. In. Mathew P., Sivadasan M. (Eds.) Diversity and taxonomy of tropical flowering plants. Calicut, Mentor Books: 93-112.
- VAVILOV N.I. (1949-1950). The phytogeographic basis of plant breeding. In. K. S. Chester (Trans.), The origin, variation, immunity, and breeding of cultivated plants. Waltham, MA: Chronica Botanica: 13-54.

- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. & ZABEAU M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. - *Nucleic Acid Research*. 23: 4407-4414.
- WOJCIECHOWSKI M.F., LAVIN M. & SANDERSON M.J. (2004): Aphylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. - *American Journal of Botany*. 91: 1846–1862.
- YANG T., JIANG J., BURLYAEVA M., HU J., COYNE C. J., KUMAR S., REDDEN R., SUN X., WANG F., CHANG J., HAO X., GUAN J., ZONG X. (2014): Large-scale microsatellite development in grasspea (*Lathyrus sativus* L.), an orphan legume of the arid areas. - *BMC Plant Biology*. 14: 65.