Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav biologie rostlin

Genetická diverzita a fylogeneze *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

Diplomová práce

Vedoucí práce:
Ing. Pavel Hanáček, Ph.D.
Konzultant:
Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

Vypracoval:
Bc. Oldřich Trněný

Brno 2016

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: **Genetická diverzita a fylogeneze *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.** vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.*

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

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

V Brně dne:. . . . . ..

. . . .

podpis

Poděkování

Děkuji Petru Smýkalovi, Pavlu Hanáčkovi, Stergiosovi Pirintsosovi i oponentovi za plodnou spolupráci a pomoc při tvorbě výsledků, zpracování a hodnocení této diplomové práce. Děkuji také za finanční podporu projektu 14-11782S GA ČR, díky kterému mohla tato práce vzniknout.

Abstrakt

Genetická diverzita a fylogeneze *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

Pisum fulvum Sibth. & Sm. je jeden ze tří druhů v rodu *Pisum* L., do kterého jsou též řazeny druhy *Pisum sativum* L. a *Pisum abyssinicum* A.Br. Společně s poddruhy *P. sativum* subsp. *elatius* M.Bieb. a *P. sativum* subsp. *humile* Boiss. et Noe. je řadíme do skupiny planých forem hrachu. *P. fulvum* patří svým vztahem ke kulturnímu hrachu *P. sativum* L. subsp. *sativum*. do jeho sekundárního genového poolu. Vzhledem k potenciálu využití *P. fulvum* jako donora genů zájmu v procesech obohacování genetické diverzity kulturního hrachu ho lze považovat za významný rostlinný druh, jehož biologická charakteristika by měla být v rámci možností doplněna. Druh *P. fulvum* se od zbytku vývojové linie rodu *Pisum* oddělil v období před 1,7 miliony let +/- 0,4 milionů let. V současné době je jeho výskyt omezen na východní část území Levanty, a i když se zde vyskytuje sympatricky s dalšími zástupci rodu *Pisum*, je druhem vyskytující se zde v největší míře. Třemi přístupy molekulární biologie DNA sekvenace jaderné oblasti ITS a chloroplastové oblasti *trnSG*, DArT-Seq^{TM} a GenoPea 13.2K SNP je v této diplomové práci charakterizována genetická diverzita druhu *P. fulvum*. Sekvenace ITS oblasti u 149 položek vedla k identifikaci čtyř ribotypů, které byly dále analyzovány v biogeografických souvislostech. Na základě analýzy dat z celogenomové genotypizace DArT-Seq^{TM} v porovnání s místy původu analyzovaných položek byly určeny tři skupiny (jižní, střední a severní), které můžeme pokládat za vnitrodruhové vývojové linie. V případě analýzy dat z GenoPea 13.2K SNP byl genotyp *P. fulvum* porovnán s genotypy ostatních planých forem hrachu a *P. abyssinicum* a byly identifikovány SNP spojené s genotypem *P. fulvum.* Analýzou kodominantních SNP dat a analýzou sekvencí *trnSG* byl také potvrzen u některých položek *P. fulvum* recentní genový tok se zástupci ostatních planých forem hrachu.

Klíčová slova: ITS, *trnSG*, ribotyp, predikce distribuce, celogenomová genotypizace, vnitrodruhová variabilita, DArT-Seq^{TM}, GenoPea 13.2K SNP

Abstract

Genetic diversity and phylogeny of *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

Pisum fulvum Sibth. & Sm. is one of the three species in genus *Pisum* L., which also includes species *Pisum sativum* L. and *Pisum abyssinicum* A.Br. *P. fulvum* together with subspecies *P. sativum* subsp. *elatius* M.Bieb. and *P. sativum* subsp. *humile* Boiss. et Noe. belong to the group of wild pea. *P. fulvum* belongs to secondary gene pool of cultural pea *P. sativum* L. subsp. *sativum*. Due to the potential use of *P. fulvum* as a donor of gene of interest in processes of cultural pea genetic diversity enrichment, it may be considered as an important plant species whose biological characteristics should be assembled within the possibilities. Divergence separating *P. fulvum* from the rest of the evolutionary lineage of the genus *Pisum* occured in the period before 1.7 million years +/- 0.4 million years. Currently, its habitats is limited to the eastern part of the territory of Levant where *P. fulvum* is more abundant plant in its range than other groups of the genus *Pisum* that occurs sympatric with *P. fulvum*. The genetic diversity of *P. fulvum* is characterized in the current thesis by three approaches of molecular biology using DNA sequencing of ITS nuclear region and *trnSG* chloroplast region, DArT-Seq^{TM} and GenoPea 13.2km SNP. Sequencing ITS region of 149 accessions led to the identification of four ribotypes that were analyzed in biogeographical context. Based on the comparing the analysis of data from genome-wide genotyping DArT-Seq^{TM} and origin of analyzed accessions three groups (south, central and north) which can be considered as intraspecific evolutionary line were identified. In case of analysis of data from GenoPea 13.2K SNP *P. fulvum* genotype was compared with genotypes of other groups of pea and *P. fulvum* asociated SNPs were identified. Recent gene flow between some accessions of *P. fulvum* and accessions of other groups of wild pea was confirmed by analysis of codominant SNP data and by analysis of *trnSG* sequences.

Key words: ITS, *trnSG*, ribotyp, prediction of distribution, genome-wide genotyping, intraspecific variability, DArT-Seq^{TM}, GenoPea 13.2K SNP

Obsah

1 Úvod **8**

2 Literární přehled **11**

2.1 Biologická charakteristika rodu *Pisum* L. 11

2.1.1 Taxonomie rodu *Pisum* L. 11

2.1.2 Morfologie rodu *Pisum* L. 12

2.1.3 Geografické rozšíření 13

2.1.4 Fylogeneze rodu *Pisum* L. 14

2.2 Fylogenetické vztahy druhů příbuzných *Pisum fulvum* Sibth. & Sm. . . . 16

2.2.1 Variabilita druhu *Pisum sativum* L. 18

2.3 *Pisum fulvum* Sibth. & Sm. 19

2.3.1 Popis druhu *Pisum fulvum* Sibth. & Sm. 19

2.3.2 Morfologický popis druhu *Pisum fulvum* Sibth. & Sm. 20

2.3.3 Fylogeneze druhu *Pisum fulvum* Sibth. & Sm. 20

2.3.4 Biogeografie rodu *Pisum fulvum* Sibth. & Sm. 25

2.3.5 Druh *Pisum abyssinicum* A.Br. ve vztahu k *Pisum fulvum* Sibth. & Sm. 25

2.3.6 Využití *Pisum fulvum* Sibth. & Sm. pro obohacení genetické diverzity kulturního hrachu 26

3 Cíl práce **28**

4 Materiál a metody **29**

4.1 Použitý rostlinný materiál 29

4.2 Příprava DNA pro analýzy 32

4.2.1 Izolace DNA 32

4.2.2 Elektroforetická analýza 33

4.3 Sekvenace 33

4.4 Genotypizace metodou DArT-Seq^{TM} 34

4.5 Genotypizace metodou GenoPea 13.2K SNP 35

4.6 Modelování potencionálního rozšíření *Pisum fulvum* Sibth. & Sm. 35

5 Výsledky **37**
5.1 Sekvenace. 37
5.2 DArT-Seq^{TM} 37
5.3 GenoPea 13.2K SNP 43
5.4 Předpověď geografického rozšíření *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.. 45

6 Diskuse **47**

7 Závěr **54**

Literatura **57**

Seznam obrázků **68**

Seznam zkratek **70**

Přílohy **72**

1 Úvod

Biologický druh *Pisum fulvum* Sibth. & Sm., volně přeloženo do češtiny jako „hrách plavý", náleží společně s dvěma poddruhy *Pisum sativum* L. subsp. *elatius* M. Bieb. a subsp. *humile* Boiss. et Noe. mezi tzv. plané formy hrachu z rodu *Pisum* L. (Ladizinski & Abbo, 2015), z kterého pochází všeobecně známý kulturní hrách, jedna z nejstarších hospodářských významných plodin světa a nejslavnější modelový objekt Gregora Johanna Mendela (1822–1884) v hybridizačních pokusech klasické genetiky. Důležitou součástí evolučního vývoje v rodu *Pisum* je i přes převážnou samosprašnost při reprodukci příležitostná hybridizace i vzdálenějších vývojových linií a následná introgrese genů a tato skutečnost je základním problémem při řešení fylogenetických analýz jeho zástupců (Zaytseva et al., 2015).

Kulturní hrách byl domestikován přibližně před 10 000 lety tehdejšími obyvateli oblastí Úrodného půlměsíce výběrem jedinců z planého hrachu, který je nejspíše v současnosti označován jako *P. sativum* subsp. *humile* (Ladizinsky & Abbo, 2015; Smýkal, 2011). Dle fylogenetických analýz právě plané poddruhy *P. sativum* a námi studovaný druh *P. fulvum* tvoří dvě základní vývojové linie rodu *Pisum*, které se od sebe oddělily přibližně před 1,7 miliony let (Kosterin & Bogdanova, 2008; Schaefer et al., 2012; Zaytseva et al., 2015) a navzájem se od sebe významně liší chromozomovými přestavbami a rozvinutou reprodukční bariérou (Ben-Ze'ev & Zohary, 1973), která ovšem může být v některých případech křížení překonána (Kosterin & Bogdanova, 2015). Vývojová linie druhu *P. sativum* je co do genetické struktury, včetně šlechtěných odrůd, značně rozmanitá a i svým geografickým rozšířením zaujímá rozsáhlou oblast přirozeného výskytu (Ladizinsky & Abbo, 2015). Naopak druh *P. fulvum* je endemitem v oblastech východní Levanty, a ač jeho genetická struktura na vnitrodruhové úrovni je také docela rozmanitá (Vershinin et al., 2003), nebyla doposud podrobně charakterizována. Třetím druhem v rodě *Pisum* je endemitní druh oblastí Etiopie a Jemenu *Pisum abyssinicum* A.Br. Druh *P. abyssinicum* je pravděpodobně druhem nezávisle domestikovaným na druhu *P. sativum* subsp. *sativum* a jeho postavení v rámci rodu *Pisum* je doposud diskutované. Avšak recentní studie nastolily otázku, zdali druh *P. abyssinicum* nevznikl hybridizací *P. sativum* subsp. *elatius* s *P. fulvum* (Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2010).

Genetická diverzita hospodářsky významného rodu *Pisum* je v současnosti kromě přirozeně se vyskytujících planých forem a jednotlivých zplanělých zástupců kulturního hra-

chu uchovávána převážně ve formě *ex situ* celosvětově v genových bankách, avšak pouze z 2 % jsou zastoupeny plané formy a z velké části jsou vzorky duplicitní (Smýkal et al., 2013). Druh *P. fulvum* je uchováván zejména jako potencionální donor genů rezistence pro kulturní hrách k biotickým i abiotickým stresům. Doposud byla zjištěna u zástupců druhu *P. fulvum* rezistence k zrnokazu hrachovému (*Bruchus pisorum* L.), k tečkovce borové (*Mycosphaerella pinodes* Berk. & Blox.), k padlí hrachu (*Erisiphe pisi* Syd.), k záraze vroubené (*Orobanche crenata* Forssk.) a k rzi hrachové (*Uromyces pisi* Pers.) (Wroth, 1998; Pérez de Luque et al., 2005; Rubiales et al., 2005; Fondevilla et al., 2005, 2007; Clement et al., 2009; Barilli et al., 2010). A i přes problémy spojené s reprodukční bariérou mezi *P. fulvum* a *P. sativum* (Kosterin & Bogdanova, 2015) a polygenně založenou rezistencí se již, alespoň částečně, povedlo získat introgresí jedince kulturního hrachu s geny rezistence z *P. fulvum* k zrnokazu hrachovému (Byrne et al., 2008).

Druh *P. fulvum* byl popsán v 2. polovině 18. století a historicky je jeho popis připisován Siru Jamesi Edwardu Smithovi (1759–1828) a Johnu Sibthorpovi (1758–1796) (Sibthorp & Smith, 1813). Popis spolu s kresbou (obrázek 1 A) byl zveřejněn v 2. díle knihy Flora Graeca, která je označována za nejkrásnější oxfordský botanický poklad. Původ popisovaného exempláře je zde připisován do Malé Asie, kde se však v současnosti nejspíš nevyskytuje (Sibthorp & Smith, 1813; Ladizinsky & Abbo, 2015). Další historickou kresbou, která byla dohledána, je idealizovaná kresba z roku 1883 (obrázek 1 B). Zde se však *P. fulvum* objevuje znázorněn nesprávně jako rostlina s nepoměrně velkými květy rudého zabarvení, tlustým stonkem a celokrajnými palisty i lístky, tvořící složené listy i z více jak dvou párů lístků, které zcela odpovídají listům u zástupců rodu *Lathyrus* sp. (Zeller, 1883 v Byrne, 2005).

Obrázek 1: **A** Původní popisná kresba *P. fulvum* z knihy Flora Graeca (Sibthorp & Smith, 1813), ve spodní části obrázku jsou zvětšeny detaily květu a plodu. **B** Idealizovaná kresba *P. fulvum* z knihy Wild Flowers of the Holy Land autorky Hannah Zeller z roku 1883 (převzato z Byrne; 2005).

2 Literární přehled

2.1 Biologická charakteristika rodu *Pisum* L.

Stejně jako většina druhů rostlin rostoucích v oblasti Středomoří jsou i všechny druhy rodu *Pisum* rostlinami jednoletými. Typicky u druhů rodu *Pisum* převládá při opylení samosprašení s frekvencí cizosprášení v rozsahu 0 % až 60 % v závislosti na druhu, genotypu a stávajícím životním prostředí. Významnou vlastností rodů čeledi *Fabaceae* je symbióza s bakteriemi *Rhizobium sp.*, které poskytují rostlinám fixovaný vzdušný dusík výměnou za organické látky sloužící k jejich výživě. Počet chromosomů u všech druhů rodu *Pisum* je konstantní 2n = 14 (Warkentin et al., 2015). Velikost genomu je přibližně 4,45 Gbp s velkým obsahem zastoupení repetitivních sekvencí 75–95 % (Smýkal et al., 2012; Macas et al., 2015).

2.1.1 Taxonomie rodu *Pisum* L.

Druh *P. fulvum* patří do monofyletického rodu *Pisum* L., který je dle recentního zařazení součástí čeledi *Fabaceae* (nom. alt.: *Leguminosae, Papilionaceae*), podčeledi *Papilionoideae* a tribu *Fabeae*. Čeleď *Fabaceae* se skládá přibližně ze 720–730 rodů, jejichž součástí je přibližně 19 500 druhů. Součástí této čeledi jsou druhy v podobě bylin, stromů, keřů i lián (Simpson, 2010). Čeleď *Fabaceae* se dle tradiční taxonomie dále dělí na tři podčeledi *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* a *Papilionoideae*. Nejvíce příbuzné rody, které jsou společně s rodem *Pisum* řazeny do tribu *Fabea*e, jsou *Lathyrus* L., *Lens* Mill., *Vicia* L. a *Vavilovia* Al.Fed. (Mackinder et al., 2014, Schaefer et al., 2012). Ač je taxonomie rodu *Pisum* již v základních bodech v poslední době ustálená a pojmenování taxonomických skupin se odvíjí od autorů jednotlivých studií, rozlišení jednotlivých druhů spadajících do rodu *Pisum* je stále věcí názoru, odvíjejících se od provedených fylogenetických rekonstrukcí historie rodu *Pisum*.

Systematické zařazení rodu *Pisum* dle ITIS (2011):

- říše: *Plantae*
- podříše: *Viridaeplantae*
- oddělení: *Tracheophyta*

- pododdělení: *Spermatophytina*
- třída: *Magnoliopsida*
- nadřád: *Rosanae*
- řád: *Fabales*
- čeleď: *Fabaceae*
- rod: *Pisum* L.
- druh: *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

2.1.2 Morfologie rodu *Pisum* L.

Rostliny z rodu *Pisum* jsou jednoleté byliny s vystoupavými, popínavými nebo přímými lodyhami a vřetenovitými kořeny, které zasahují hluboko do půdy. Sudozpeřené listy se skládají z jednoho nebo více párů lístků a z koncového úponku, který může být často rozvětvený. Mladé lístky jsou složené podél střední žilky. V úžlabí listů se nacházejí bylinné palisty, které bývají často větší než jednotlivé lístky. Úžlabní květenství na dlouhých stopkách jsou chudokvěté hrozny s 1–3 nápadnými květy. Motýlovité květy jsou bilaterálně souměrné. Kalich je zvonkovitého tvaru s šikmou trubicí a s nestejnými širokými zoubky, které jsou z vrchní strany kratší. Různě zbarvená koruna je tvořena obvejčitou až okrouhlou pavézou a dvěma vypouklými křídly přiléhajícími k člunku. Květ obsahuje 9 navzájem nitkami srostlých tyčinek a 1 volnou nebo jen z části srostlou s ostatními, dále je přítomen pestík, který je složen z přisedlého semeníku a z dorzálně zploštělé čnělky u vrcholu rozšiřující se v bliznu. Vnější strana čnělky je rýhovaná, na straně vnitřní je pod vrcholem chlupatá. Plodem hrachu jsou mnohosemenné, podlouhlé, šikmo zkrácené, nezaškrcované lusky na vrcholu zužující se v zobánek a u planých forem přirozeně pukající po obou stranách. Semena jsou většinou kulovitá (Chrtková, 1995; Ladizinsky & Abbo, 2015).

Klíč k určení jednotlivých druhů a poddruhů

Na následujících řádcích je uveden klíč k určení *P. fulvum* a jeho blízce příbuzných druhů, vytvořeno dle Ladizinsky & Abbo (2015) a Smýkal et al. (2013).

1. Barva korunních lístků je žlutá, červenohnědá až rezavá. Lusk je dlouhý 2,5–3 cm a široký 0,7–1 cm. ***P. fulvum*** (obrázek květu 2 A)

- Barva korunních lístků je od růžové po fialovou nebo bílá. (2)

2. Stopka květu je v době kvetení kratší než délka palistů (1/3 až 2/3 délky palistů), pávéza květu sevřená, palisty nepravidelně zubaté, pouze jeden pár lístků na listě, modrošedá barva povrchu ojíněných listků. ***P. abyssinicum*** (obrázek květu 2 B)

- Stopka květu delší než délka palistů, palisty zubaté jen v bazální části. (3)

3. Specifické znaky domestikace rostliny, barva korunních lístků je fialová nebo bílá. ***P. sativum*** **subsp.** ***sativum***

- Planá forma s výrazně popínavým vzrůstem. Lusk je dlouhý 8–9 cm a široký 0,8–1,5 cm. ***P. sativum subsp. elatius*** (obrázek květu 2 C)
- Planá forma není popínavého vzrůstu, kratší internodia 20–30 cm. Lusk je 4–5 cm dlouhý a široký do 1 cm. ***P. sativum*** **subsp.** ***humile***

Obrázek 2: Květy *P. fulvum* a jeho blízce příbuzných druhů: **A** květ *P. fulvum* (vlastní zdroj) **B** květ *P. abyssinicum* **C** květ *P. sativum* subsp. *elatius* (převzato ze Smýkal, 2011).

2.1.3 Geografické rozšíření

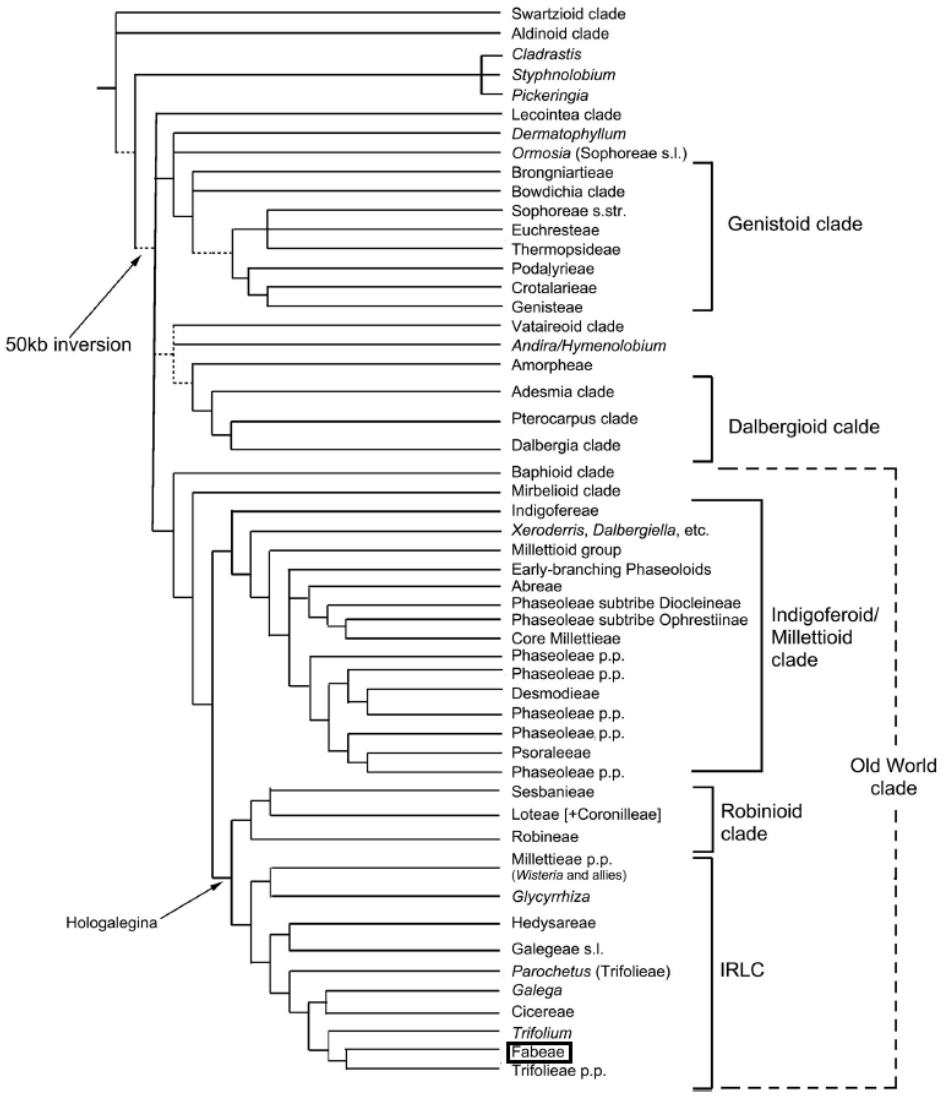
Rostliny rodu *Pisum* se vyskytují v mírném podnebném pásu, kde jsou kulturní formy *P. sativum* subsp. *sativum* var. *sativum* a *P. sativum* subsp. *sativum* var. *arvense* pěstovány celosvětově. Z planých forem má největší rozšíření *P. sativum* subsp. *elatius*, který je přirozenou součástí středomořské květeny. Pro středomořskou oblast je charakteristickým znakem „pravé" středomořské klima, u kterého poměr průměrného úhrnu srážek od června do srpna ku průměrné teplotě nejteplejšího měsíce v roce odpovídá hodnotám menším než 7 (Emberger v Zelený, 2005). Planý hrách je rozšířen na západě od Iberského poloostrova až po východ po území Sýrie a Jordánska. V Evropě jeho rozšíření zahrnuje oblasti Francie, Itálie přes území Balkánu až po Maďarsko. Na území blízkého východu je rozšířen v oblastech Turecka, Sýrie, Libanonu, Jordánska, Izraele, ale i v oblastech

Iránu a na územích států oblasti Zakavkazska . Dále se vyskytuje v oblastech severní Afriky a lze ho nalézt i na středomořských ostrovech Sardinie, Mallorca a Kypr (Kosterin et al., 2010; Ladizinski & Abbo, 2015).

2.1.4 Fylogeneze rodu *Pisum* L.

Dle taxonomie je druh *Pisum* součástí čeledi *Fabaceae*, podčeledi *Papilionoideae*, jejíž fylogenetické vztahy jsou prezentovány fylogenetickým stromem (obrázek 3) vycházejícího z výsledků několika fylogenetických studií čeledi *Fabaceae* (Bruneau et al., 2013). Tribus *Fabeae*, kam spadá rod *Pisum,* patří do monofyletické skupiny Hologalegina, která byla již dříve předpovězena na základě morfologických a anatomických vlastností jednotlivých rodů této skupiny, a se svými 75 rody je největší skupinou podčeledi *Papilionoideaea* (Polhill, 1981). Dále je tribus *Fabeae* součástí skupiny IRLC (Inverted Repeat-lacking Clade), která se vyznačuje absencí 25 kBp dlouhé sekvence, jedné z páru sekvence invertovaných repetic (IR), které jsou součástí chloroplastového genomu (cpDNA) (Wojciechowski, 2006; Lavin et al., 2005).

Do tribu *Fabeae* je včetně rodu *Pisum* řazeno 5 rodů, do nichž se řadí okolo 380 druhů (Schaefer et al., 2012, Smýkal et al., 2015). V rodě *Vicia* je zahrnuto 160–250 druhů, v rodě *Lathyrus* přibližně 160 druhů, do rodu *Lens* jsou řazeny 4 druhy, do rodu *Pisum* 3 druhy a do monotypického rodu *Vavilovia* je řazen pouze druh *Vavilovia formosa* (Steven) Fed.. Právě rod *Vavilovia* je považován za nejblíže příbuzný rod rodu *Pisum*. Kromě hrachu (*Pisum sativum* L.) jsou do tribu *Fabeae* řazeny i další významné zemědělské plodiny čočka jedlá (*Lens culinaris* Medik.), bob obecný (*Vicia faba* L.) a vikev čočková (*Vicia ervilia* Willd.). Historie vzniku tribu *Fabeae* sahá do epochy Miocénu v geologické periodě Neogén, a proto je považován za jednu z nejmladších skupin bobovitých rostlin. Přibližně před 23–16 miliony let v oblasti východního středomoří se vyvinuli předci dnešních zástupců tribu. Jednotlivé rody tribu *Fabeae* se až do současnosti rozšířily po kontinentech Evropy, Asie, Afriky, Ameriky a po souostroví Makaronesie. Dle rekonstrukce ancestrálních znaků byli tito předci jednoleté rostliny s charakteristickou dorsoventrálně zploštělou rovnoměrně chlupatou čnělkou a jejich chromozomové číslo bylo n=7 (Schaefer et al., 2012). Tribus *Fabeae* je monofyletickou taxonomickou skupinou sesterskou k rodu *Trifolium* L, a jako takový je vnořena do tribu *Trifolieae*. Fylogenetické vztahy mezi jednotlivými rody uvnitř tribu nelze vyvozovat z pouhého taxonomického určení druhů. Podle fylogenetických studií lze jako druhy monofyletické brát druhy *Pisum*, *Lens* a *Vavilovia*, kdežto druhy *Lathyrus* a *Vicia* jsou druhy parafyletické. Sesterské rody *Pisum* a *Vavilovia* jsou vnořeny do rodu *Lathyrus* a rod *Lens* je vnořen do rodu *Vicia*. V případě požadavků ohledně monofyletismu jednotlivých druhů by správně měly být rody *Pisum* a *Vavilovia* součástí rodu *Lathyrus*, kam rod *Pisum* historicky řadil již Lamarck (1778),



Obrázek 3: Schéma fylogeneze *Papilionoideae* v podobě stromu sestaveného na základě recentních fylogenetických analýz (převzato z Bruneau et al., 2013).

aniž by znal současné fylogenetické studie (Smýkal et al., 2015). Oddělení rodů *Pisum* a *Vavilovia* se datuje do období před 9,8–4,8 miliony let a před 2,3–0,8 miliony let došlo k speciačním událostem, které daly vznik současným druhům rodu *Pisum*. Rody *Pisum* a *Vavilovia* se morfologicky liší od rodu *Lathyrus* podélně složenou čnělkou, která se u jiných zástupců tribu *Fabeae* nevyskytuje. Společně s rodem *Vavilovia* mají k rodu *Pisum* největší afinitu někteří zástupci rodu *Lathyrus*, konkrétně *L. gloeosperma* Warb. & Eig., *L. neurolobu*s Boiss. & Heldr., a *L. nissolia* L., kteří by potenciálně mohli být využiti pro další šlechtitelské programy kulturního hrachu (Schaefer et al., 2012; Mackinder et al., 2014).

2.2 Fylogenetické vztahy druhů příbuzných *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

Taxonomie jednotlivých druhů, vyjadřující fundamentální taxonomickou skupinu, by ze své podstaty měla vycházet z poznání fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy rodu. Pouze z této pozice nám taxonomie může předložit systém uspořádání živých organizmů, který nám pravdivě vypovídá o jednotlivých speciačních událostech vedoucích ke vzniku daného druhu. Ernst Mayer definoval biologický druh jako soubor populací, které se skutečně nebo potenciálně kříží a jež jsou od ostatních takových souborů v přírodních podmínkách reprodukčně izolovány (Mayr, 2009). V rámci evoluce ovšem v jistých případech dochází k mezidruhové hybridizaci, protože bariéra zajišťující reprodukční izolaci není mezi některými druhy dostatečně vyvinuta, což má za následek retikularitu evolučních linií. Součástí evolučních procesů u rostlin vedoucích ke vzniku nových druhů může tak být i hybridizace a následná introgrese, což byly procesy, které hrají důležitou roli v evolučním vývoji rodu *Pisum* (Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2005, 2007; Zaytseva et al., 2015).

Procesy tvorby genetické diverzity vázané na změny struktury DNA u hrachu stejně jako u všech ostatních živých organizmů jsou tvořeny deterministickými procesy genovým tokem a přirozenou nebo záměrnou selekcí společně s náhodnými procesy genetickým driftem a tvorbou mutací. Genetická diverzita může být pozorována na úrovni druhů, populací nebo na úrovni intrapopulační. Při studiu genetické diverzity však vždy vycházíme ze studie jedinců asociovaných s jistou skupinou. Se zvyšujícím se stupněm genetické diverzity se jednotlivým skupinám zvyšuje adaptabilita ke změnám životního prostředí a v případě využití člověkem lze z nich lépe vybírat genový základ dle potřeby využití (Stevenson, 2013).

Součástí rodu *Pisum* jsou dle recentních studií druhy *P. sativum* a druh *P. fulvum* (Smýkal et al., 2013), avšak v průběhu doby bylo publikováno více způsobů rozřazení jednotlivých taxonů uvnitř rodu *Pisum*. V historii byl rod *Pisum* rozdělen až do 5 druhů (Govorov, 1937; Makasheva, 1979) a v opačném případě byl jinými autory prezentován jako rod monotypický pouze s jedním druhem, který se rozlišuje na jednotlivé ekotypy (Lamprecht, 1966; Blixt, 1974; Marx, 1977). Následující studie od sebe jistě rozlišují druhy *P. sativum* a *P. fulvum*, ale druh *P. abyssinicum* jimi ještě není považován za samostatný druh (Kupicha, 1981; Davis, 1970). Postavení *P. abyssinicum* v rámci rodu je stále diskutovaná skutečnost a jeho taxonomický status se liší v závislosti na autorovi a typu studie. Některé novější studie, s ohledem na analýzy využívající metod molekulární biologie, *P. abyssinicum* určují jako samostatný druh (Maxted and Ambrose, 2001; Vershinin et al., 2003; ILDIS, 2005; Jing et al., 2007; Smýkal et al., 2011, 2015), avšak jiné zdroje *P. abyssinicum* určují jako jeden z poddruhů *P. sativum* subsp. *abyssinicum* (Govorov,

1937; Rubiales et al., 2012) nebo ho navrhují prezentovat jako ekotyp či varietu (Conicella & Errico, 1990) nebo alespoň jeho zařazení jako druhu diskutují (Ladizinsky & Abbo; 2015). *P. abyssinicum* je endemitem východní Afriky, konkrétně oblastí dnešních států Etiopie a Jemenu, a i když tato oblast není nejspíš místem původního přirozeného výskytu rodu *Pisum*, vyskytují se zde kulturní formy *P. abyssinicum*, které byly nejspíše domestikovány nezávisle na domestikaci kulturních forem *P. sativum* (Jing et al., 2010). *P. abyssinicum* vykazuje napříč svými zástupci velice nízkou hladinu genetické diverzity, což odkazuje na přítomnost efektu zakladatele („bottleneck") v jeho nedávné evoluční historii. *P. abyssinicum* je podle fylogenetických studií jasně vymezenou vývojovou linií, která je ve fylogenetickém stromě umístěna mezi druhy *P. sativum*. subsp. *elatius* a *P. fulvum*, proto lze usuzovat, že v evoluční historii *P. abyssinicum* byla přítomná hybridizace předků těchto dvou taxonů, i když v současnosti je *P. abyssinicum* více morfologicky podobné druhu *P. sativum* (Ellis et al., 1998, Vershinin et al., 2003, Jing et al., 2010). V této diplomové práci bude využíváno rozdělení rodu *Pisum* dle tabulky 1, které je prezentováno autory Maxted & Ambrose (2001) ve spojení s recentní klasifikací autorů Ladizinski & Abbo (2015). Tato klasifikace je v základních rysech rozdělení rodu *Pisum* respektována v převážné části recentních studií zabývajících se rodem *Pisum*.

Tabulka 1: Klasifikace rodu *Pisum* (Maxted & Ambrose, 2001; Ladizinski & Abbo, 2015).

druh	poddruh	varieta
P. sativum L.	*sativum* L.	*sativum*
		arvense (L.) Poiret
	elatius M. Bieb.	
	humile Boiss. et Noe.	*humile* (Boiss. et Noe.) Ladizinsky
		syriacum (Berg. Lehm) Ladizinsky
P. fulvum Sibth. a Sm.		
P. abyssinicum A.Br.		

Fylogeneticky nejbližším rodem k rodu *Pisum* je sesterský rod *Vavilovia* se svým jediným zástupcem *V. formosa*. Druh *V. formosa* je vytrvalý cizosprašný druh, který byl mimo jiné ve své historii prezentována jako druh *Pisum formosum* (Stev.) Alef., ale recentně byl rod *Vavilovia* pomocí fylogenetických analýz potvrzen jako samostatný (Smýkal et al., 2013; Mikič et al., 2013). Brzy po oddělení vývojových linií rodu *Pisum* a rodu *Vavilovia* nastala v linii rodu *Pisum* dramatická redukce velikosti efektivní populace a s tím spojená redukce genetické diverzity, nejspíše z důvodu transformace druhu na samosprašný (Zaytseva et al., 2015).

2.2.1 Variabilita druhu *Pisum sativum* L.

Druh *P. sativum* je agregát několika poddruhů, které jsou rozlišovány na základě jejich morfologie, ekologie nebo fylogenetických vztahů. Tradičně jsou dle Ben-Ze'ev & Zohary (1973) u planých forem rozlišovány morfologické typy *„P. elatius"* a *„P. humile"* Mill. (nom. alt.: *P. syriacum* (A. Berger) C. O. Lehm., *P. sativum* var. *pumilio* Meikle). Do skupiny *„P. elatius*" jsou řazeny dlouhé mezofilní rostliny, jejichž výskyt je vázán na makchie a zalesněné břehy řek, kdežto do skupiny *„P. humile"* patří xerofytické rostliny menšího vzrůstu rostoucí v stepím podobných vegetacích. Skupiny *„P. elatius"* a *„P. humile"* nejsou přirozenými taxonomickými skupinami a jejich morfologické znaky jsou spíše známkou adaptace na životní prostředí výskytu rostlin (Vershinin et al., 2003). *„P. humile"* je dále členěn podle geografického výskytu na „severní" a „jižní" typ. Taktéž i další rozlišené skupiny „*P. abyssinicum*", „*P. jomardi*" a „*P. arvense*" jsou autory považovány za druh *P. sativum*, i když mezi jednotlivými podskupinami druhu *P. sativum* byly detekovány chromosomové inverze a translokace a při jejich vzájemných kříženích byla pozorována jistá míra snížení fertility. Výjimku tvoří křížení „severní *P. humile*" s *P. sativum*, u kterého nebylo snížení fertility pozorováno z důvodu kompatibilních karyotypů (Ben-Ze'ev & Zohary, 1973; Conicella & Errico, 1990). Recentně je autory Ladizinsky & Abbo (2015) pro obě skupiny *„P. elatius"* a *„P. humile"* přijat statut poddruhů, *P. sativum* subsp. *elatius* a *P. sativum* subsp. *humile* a navíc je jimi „severní" typ *„P. humile"* označen jako varieta *P. sativum* subsp. *humile* var. *humile* (Boiss. et Noe) Ladizinsky a „jižní" typ jako varieta *P. sativum* subsp. *humile* var. *syriacum* (Berg. Lehm.) Ladizinsky. *P. abyssinicum* je pravděpodobně nezávisle na *P. sativum* subsp. *sativum* domestikovaným endemitem východní Afriky, *P. sativum* subsp. *jomardi* je egyptský poddruh a *P. sativum* subsp. arvense je známý jako hrách setý polní neboli „peluška". Dále se lze setkat s poddruhy *P. sativum* subsp. *transcaucasicum* a *P. sativum* subsp. *asiaticum*, které popisují skupiny odlišující se některými vlastnostmi od ostatních zástupců druhu. *P. sativum*. *P. sativum* subsp. *transcaucasicum* je skupina vikvím podobných rostlin, které se využívají jako krmivo, vyskytujících se v oblasti Zakavkazska a *P. sativum* subsp. *asiaticum* je označení pro nepříliš jasnou skupinu rostlin s rozšířením od Egypta až po střední Asii (Govorov, 1937; Makasheva, 1979; Kosterin and Bogdanova, 2008; Kosterin et al., 2010). *P. sativum* subsp. *sativum* je taxonomické označení pro kulturní hrách, který byl domestikován přibližně před 10 000 lety v oblasti Úrodného půlměsíce. Kulturní hrách se rozlišuje od planých forem hrachu charakteristickými znaky pro domestikaci. Dva hlavní znaky domestikace jsou absence dormance semen a nepukavost zralých lusků (Smartt, 1990; Abbo et al., 2013; Smýkal et al., 2014). Dalšími člověkem pozměněnými znaky byla velikost a kvalita semen, výška rostlin, větvení stonku, vliv délky dne na kvetení a obsah toxických látek (Chimwamurombe & Khulbe, 2012). Ben-Ze'ev & Zohary (1973) předpokládali na základě morfologického a genetického porovnávání, že „severní" typ „*P. humile*" tvoří

genetický základ pro domestikované kulturní formy, ale recentně byly ještě specifikovány konkrétní kombinace plastidového, mitochondriálního a jaderného genotypu, které sdílejí kulturní formy hrachu s nejvíce příbuznými hrachy planými *P. sativum* subsp. *elatius* (Kosterin et al., 2010).

2.3 *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

2.3.1 Popis druhu *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

Druh *P. fulvum* je nejvíce zastoupeným druhem ze skupiny planých hrachů v oblasti východního pobřeží Středozemního moře. Nejčastěji se vyskytuje v polostínu jako pnoucí rostlina po okolní vyšší vegetaci, po keřích a stromech menšího vzrůstu. Zřídka ho lze také nalézt v otevřených prostranstvích s nízkou vegetací, bez možnosti růstu ve stínu, ale tyto rostliny jsou svým vzrůstem menší a polehlé, jen málo prosperující. Lze se domnívat, že tyto rostliny jsou pouze relikty z předešlých vyhovujících ekosystémů, které byly lidskou činností pozměněny v předešlých stoletích. Byla pozorována poměrně velká vnitrodruhová variabilita ve vzrůstu i v produkci semen mezi jednotlivými populacemi i uvnitř populací. Jelikož *P. fulvum* preferuje polostinná místa s možností opory pro pnutí, s výjimkou lesů a sadů není považován za plevelný druh v lidmi obdělávaných oblastech (Abbo et al., 2008). *P. fulvum* v oblastech svého geografického rozšíření osidluje rozmanitou skupinu stanovišť, které se liší v širokém rozsahu fyzikálních, chemických i klimatických podmínek. Nejčastěji se *P. fulvum* vyskytuje ve společenství spolu s *Quercus calliprinos*, *Pistacia* sp., *Ceratonia siliqua*, *Rhamnus* sp. a na sušších stanovištích i se *Zizyphus* sp. (Ladizinsky & Abbo, 2015). Jeho přirozený výskyt je zaznamenán v nadmořských výškách v rozsahu od -222 m.n.m v okolí Tiberiadského jezera (ISR) až do 1141 m.n.m v horských oblastech Sýrie. *P. fulvum* se také vyskytuje v půdách s širším rozsahem pH (6–8) než ostatní druhy rodu *Pisum*. I v nárocích na vláhu je *P. fulvum* velice nenáročný, záznamy uvádí výskyty v oblastech i s velice nízkým průměrným srážkovým úhrnem dosahující za rok okolo 100 mm srážek, ale na opačnou stranu lze nalézt horská stanoviště, kde se průměrný srážkový úhrn pohybuje nad 1000 mm (BioGIS, 2012; Majeed et al., 2012). Na území východní Levanty, kde se druh *P. fulvum* vyskytuje sympatricky s ostatními zástupci planého hrachu druhu *P. sativum*, má *P. fulvum* jako druh daleko širší ekologickou valenci a schopnost adaptace, související s vyšší mírou genetické diverzity (Zaytseva et al., 2015). Nastává tedy otázka, proč se *P. fulvum* nerozšířil dále za hranice svého současného výskytu, a doposud na rozdíl od planých forem *P. sativum* zaujímá jasně vymezené území východní Levanty. A také proč nebyl při domestikaci využit *P. fulvum* spíše než ostatní plané formy hrachu, které mají oproti *P. fulvum* pozdější dobu nástupu kvetení. Při porovnání s druhem *P. sativum* subsp. *elatius* je také *P. fulvum* lépe

uzpůsoben na nedostatek vláhy a oproti druhu *P. sativum* subsp. *humile*, pravděpodobně to nejbližším příbuzným kulturního hrachu, byla zase u *P. fulvum* dokázána výrazně vyšší efektivita volného sběru srovnatelná právě s druhem *P. sativum* subsp. *elatius* (Abbo et al., 2008, 2011). Na druhou stranu se uvádí, že druh *P. fulvum* byl také součástí zájmu člověka při sběru potravy a dodnes se řadí v oblastech svého výskytu mezi důležité jedlé plané druhy (Mayer-Chyssick & Lev, 2014).

Velikost genomu *P. fulvum* je 1C = 4,69 Gbp. V porovnání s druhem *P. sativum* je jeho genom větší přibližně o 7,6 %. Genom *P. fulvum* je tvořen z 82,6 % repetitivními oblastmi, z čehož největší část 57,52 % genomu zaujímá retrotranspozón Ogre ze skupiny LTR/gypsy, který tvoří velkou část genomu u všech druhů z tribu *Fabeae*. Právě vyšší zastoupení repetitivních oblastí tvoří důvod nárůstu velikosti genomu u *P. fulvum*. Zajímavé je, že součástí genomu *P. fulvum* je přibližně 4x více oblastí rDNA než v genomu *P. sativum* (Macas et al., 2015).

U druhu *P. fulvum* se vyskytují rostliny ve dvou formách, u některých jedinců se kromě klasických plodů vyskytují i plody podzemní (obrázek 4), tzv. amfikarpie (Warburg & Eig, 1926; Mattatia, 1977). Rostliny, které mají pouze klasické plody, jsou označovány jako *P. fulvum* var. *fulvum* Zohary a rostliny, u kterých se vyskytuje amfikarpie, jsou označovány jako *P. fulvum* var. *amphicarpum* Warb et. Eig. Zralé lusky, jak je u planých forem obvyklé, přirozeně explozivně pukají a umožňují rozšíření semen do okolí mateřské rostliny (Ladizinsky & Abbo, 2015).

2.3.2 Morfologický popis druhu *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

Rostliny *P. fulvum* jsou pnoucí byliny se štíhlým stonkem dosahující vzrůstu 15–50 cm. Listy jsou slouženy z jednoho nebo dvou páru výrazně zubatých lístků. Z úžlabí zubatých palistů vyrůstá stopka nesoucí obvykle jeden květ o velikosti 10–17 mm. Nejlépe lze *P. fulvum* rozlišit od ostatních planých forem hrachu pomocí barvy květu, která může být složena ze spektra barev žlutá, oranžová, hnědá. Podle barvy květu (obrázek 2 A) také *P. fulvum* nese druhové jméno, protože „fulvum" znamená plavá, žlutohnědá nebo zlatá. Plodem je 25–35 mm krátký a 5–10 mm široký pigmentovaný lusk. Osemení jednotlivých semen bývá zabarveno od tmavě hnědé až po sametově černou barvu (Byrne, 2005; Smýkal et al., 2013).

2.3.3 Fylogeneze druhu *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

Autoři Ben-Ze'ev & Zohary (1973) ve své tradiční studii založené na morfologii, ekologii, cytogenetice a na pokusech křižitelnosti pokládali *P. fulvum* již za plně rozlišený druh, zatímco v jiných studiích byl rod *Pisum* považován za monospecifický, a rozlišení *P. fulvum* bylo jen otázkou míry variability uvnitř druhu (Lamprecht, 1966; Blixt, 1974;

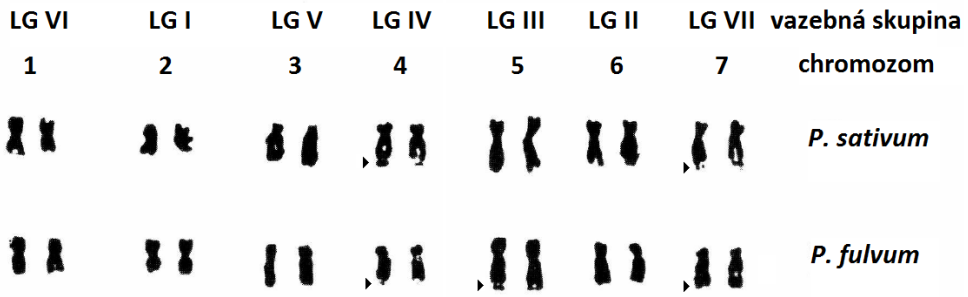
Obrázek 4: Podzemní plod *P. fulvum* (převzato z Ladizinsky & Abbo, 2015).

Waines, 1975; Marx, 1977; Wolff, 1980; Palmer et al., 1985; Hoey et al., 1996; Lu et al., 1996), avšak všechny fylogenetické studie se shodují, že druh *P. fulvum* je nejzřetelněji odlišená vývojová linie z časné fylogeneze rodu *Pisum* (Hoey et al., 1996; Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2007; Schaefer et al., 2012; Zaytseva et al., 2012).

Analýza křižitelnosti prokázala reprodukční bariéru mezi druhy *P. sativum* a *P. fulvum*, která snižovala fertilitu, avšak v případě použití *P. fulvum* jako pylového donora je možné získat intraspecifické hybridy (Ben-Ze'ev & Zohary, 1973). Později byli získáni i kříženci, u kterých byl použit *P. fulvum* jako mateřská rostlina, avšak tato kombinace byla úspěšná velice zřídka, a kříženci tvořili semena jen, když obsahovali paternálně zděděné plastidy od *P. sativum* (Kosterin & Bogdanova, 2015). Předpokládá se, že tento jev je výsledkem cytoplasmaticky jaderné inkompatibility, avšak oproti pozorované cytoplasmaticky jaderné inkompabilitě mezi křížením *P. sativum* subsp. *sativum* a *P. sativum* subsp. *elatius* zde musí být přítomný ještě i další negativní genetický vliv na vyvíjející se embryo (Bogdanova & Kosterin, 2007; Bogdanova et al., 2009; Kosterin & Bogdanova, 2015).

Karyotyp rodu *Pisum* (obrázek 5) je tvořen 7 chromozomy, chromozomy 1 a 2 jsou metacentrické, chromozom 3 je akrocentrický a zbylé chromozomy 4, 5, 6 a 7 jsou submetacentrické (Tayeh et al., 2015). Číslování vazebných skupin se liší od číslování chro-

mosomů (Ellis & Poyser, 2002). Mezi karyotypem *P. sativum* a *P. fulvum* byly prokázány dvě reciproční translokace T(3–5) a T(1–7) (Errico et al., 1991). Dále byly detekovány pomocí FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) analýzy sondou k rDNA oblasti nukleolárního organizátoru jadérka (NOR), které jsou u *P. fulvum* lokalizovány na 4, 5 a 7 chromosomu na rozdíl od *P. sativum*, kde byly lokalizovány pouze na 4 a 7 chromosomu, avšak s relativně větším počtem opakování rDNA podjednotek (Bolaños-Herrera et al., 2009).



Obrázek 5: Porovnání karyotypu *P. sativum* a *P. fulvum*, šipkou označeny satelitní oblasti (upraveno z Errico et al., 1991).

S rozvojem metod molekulární biologie se vyvinuly i nové metody, jak analyzovat položky nejenom pomocí pozorování morfologických znaků. S postupem času se tyto metody začaly využívat i pro charakterizaci zástupců rodu *Pisum*.

Na základě analýzy zásobních proteinů v semenech napříč jednotlivými zástupci rodu *Pisum* je profil proteinů *P. fulvum* nejblíže profilu *P. sativum* subsp. *transcaucasicum*, s kterým vykazuje 44% homologii, a pouze 18,2 % homologních lokusů sdílí s *P. abyssinicum*. Dále se vzájemná homologie s *P. sativum* subsp. *elatius* liší v rozmezí od 19,4 % až po 30 % a v rozmezí 5,3 % až 35,7 % v porovnání s hrachy kulturními (Jha & Ohri, 2002).

Metody sledující polymorfismus v primární struktuře DNA byly použity v řadě studií charakterizující genotyp jednotlivých zástupců rodu *Pisum*, avšak ne všechny studie se zabývají hrachy planými a častěji je spíše řešena problematika fylogenetických vztahů uvnitř druhu *P. sativum*, kam patří kulturní hrách. Mezi důležité studie, zahrnující i zástupce druhu *P. fulvum,* patří Palmer et al. (1985), která na základě analýzy RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) chloroplastového genomu, jehož dědičnost je maternální povahy, jasně rozlišila *P. fulvum* od komplexu *P. sativum* subsp. *humile*, *P. sativum* subsp. *elatius* a *P. sativum* subsp. *sativum*. Komplexní studie, která znovu analyzovala položky, které byly součástí již tradiční studie autorů Ben-Ze'ev & Zohary (1973),

využila morfologická pozorování společně s alozymovými a RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markery, a i když určila *P. fulvum* jako nejvíce rozdílnou skupinu od ostatních zástupců rodu, řadila ho do jednoho druhu společně s ostatními skupinami z rodu *Pisum*. Avšak z důvodu malého zastoupení položek *P. fulvum* více jeho strukturu genetické diverzity nerozvádí (Hoey et al., 1996).

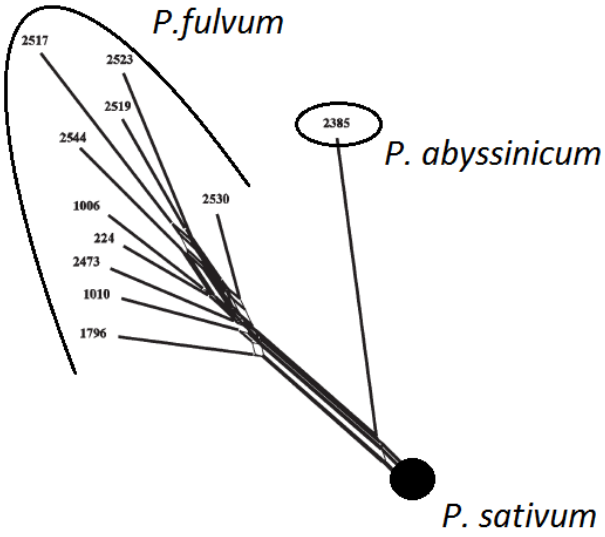
Důležitou skupinou molekulárních markerů, kterými byla zkoumána diverzita rodu *Pisum*, byly molekulární markery založené na sledování inzercí či absencí konkrétních retrotranspozónů (Ellis et al., 1998; Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2005, 2010, 2012; Majeed et al., 2012). Dvě významné analýzy z pohledu fylogenetických planých druhů hrachu Vershinin et al. (2003) využívající SSAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphisms) markery a Jing et al. (2010) využívající RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism) markery prezentovali důležitou roli genetického toku a introgrese mezi jednotlivými podskupinami rodu *Pisum*. Jen malá část alel byla specifická pro jednotlivé druhy a poddruhy, častěji byly jednotlivé alely spíše specifické pro jednotlivé subpopulace. Ač lze jednotlivé skupiny od sebe rozlišit, některé mezi sebou sdílejí jisté znaky odkazující k toku genů mezi nimi. Z tohoto pohledu je důležitý nejspíše hybridní původ druhu *P. abyssinicum*, který sdílí část genotypu jak s *P. fulvum*, tak s *P. sativum*.

Porovnáváním konkrétních sekvencí lze získat představu, jak se vyvíjela sekvenovaná oblast, avšak v případě druhů, u kterých je důležitou součástí evoluce genový tok mezi rozdílnými skupinami druhu, je potřebné pro odvození vzájemných fylogenetických vztahů využít větší počet sekvenci, které budou reprezentovat větší část genomu sledovaných jedinců. Často využívanou metodou pro určování druhů a fylogenetické studie dle sekvence DNA je tzv. „DNA barcoding". Pro tento účel jsou vybrané oblasti vykazující vyšší míru variability s ohledem na úroveň genetické vzdálenosti sledovaných objektů. U rostlin se využívá jak chloroplastových oblastí děděných u většiny druhů uniparentálně např. oblasti *matK*, *rbcL, rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA* a *ycf1*, tak jaderných oblasti děděných biparentálně, převážně pak oblast ITS, která je součástí ribosomální DNA (Cheng et al., 2016). Oblast ITS však ze své povahy má menší vypovídající hodnotu při sledování fylogeneze druhů, u kterých se vyskytuje mezidruhový genový tok (Li et al., 2014).

Porovnání sekvencí oblastí ITS vedlo k deklaraci sekvencí, které korelují s rozdělením rodu *Pisum* na druhy *P. fulvum* a *P. sativum*. Dále *P. fulvum* zřetelně odlišilo jako nejdříve oddělenou vývojovou linii v rámci rodu. Avšak na základě pozorované variability oblasti ITS mezi zástupci druhů *P. sativum* a *P. abyssinicum* nelze jednoznačně rozlišovat jejich příslušnost k druhu či poddruhu (Polans & Saar, 2002).

Jing et al. (2007) použil sekvence 39 genových oblastí lokalizovaných napříč všemi vazebnými skupinami. V případě využití všech sekvenovaných genových oblastí vznikne fylogenetický strom, který jasně odděluje *P. fulvum* od zbytku vývojových linií rodu *Pisum*, avšak *P. abyssinicum* a jistá skupina *P. sativum* subsp. *elatius* vykazuje větší genotypovou

afinitu k genotypu *P. fulvum*. V případě analýzy samostatných genů nelze u některých genů zjistit korelaci, mezi genotypem a druhem. Tento jev vypovídá o přítomnosti retikularity vývojových linií, nelze však jednoznačně určit jde-li o ancestrální polymorfismus či genový tok způsobený cizosprášením a mezidruhovou hybridizací. Dále je i mezi zástupci druhu *P. fulvum* pozorován vnitrodruhový polymorfismus, z jehož síťovitého charakteru v podání fylogenetické network analýzy (obrázek 6) lze odvozovat komplexitu příbuzenských vztahů mezi zástupci druhu reprezentovaných jejich genotypem.



Obrázek 6: Split-decomposition network pro *P. fulvum* vytvořen na základě analýzy 39 genových oblastí. Ukazuje zřejmý síťovitý fylogenetický vztah jednotlivých zástupců druhu i genotypovou afinita *P. abyssinicum* k *P. fulvum* (upraveno dle Jing et al., 2007).

Analýza sekvencí genů pro histon H1 podtypy *His5* a *His7*, které jsou lokalizovány ve vazebné skupině LG II v genetické vzdálenosti 40 cM, určila čas divergence *P. fulvum* od zbytku rodu *Pisum* do doby před 1,7 miliony let +/- 0,4 milionů let. U dvou položek *P. fulvum* zde byla prokázána sekvence *His7* ze skupiny *P. sativum* subsp. *elatius*, což dokazuje historický genový tok mezi oběma druhy. Dále ze studie vyplývá, že druh *P. fulvum* má oproti *P. sativum* o něco vyšší hodnoty efektivní velikosti populace, což svědčí nejspíše o větší hojnosti v místě přirozeného výskytu (Zaytseva et al., 2015).

V rámci studie genu *Sus1*, genu kódujícího sukrózo syntázu, který pokud je mutován u *P. sativum* způsobuje vráščitá semena a snižuje schopnost fixace dusíku, byl u druhu *P. fulvum* pozorován vyšší intraspecifický polymorfismus (1,4 % v kódující sekvenci genu), ale žádná nukleotidová substituce, která by měla za následek změnu aminokyseliny, nebyla na rozdíl od *P. sativum* subsp. *sativum* pozorována (Dyachenko et al., 2015).

2.3.4 Biogeografie rodu *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

P. fulvum se přirozeně vyskytuje v oblastech východní Levanty na územích dnešních států Sýrie, Izraele, Jordánska a Libanonu (Ladizinski & Abbo, 2015).

Oblast přirozeného výskytu *P. fulvum* spadá do oblastí se středomořským klimatem. Klimatické podmínky v oblastech výskytu jsou charakteristické humidním obdobím trvajícím přibližně od října do března, ve kterém naprší většinový úhrn dešťových srážek, který je ve většině pozorovaných případů v rozmezí 300–900 mm za rok (BioGIS, 2012; Majeed et al., 2012), a je následováno aridním obdobím od dubna do září, kdy výpar převládá nad srážkami. Průměrná roční teplota v oblastech výskytu se pohybuje v rozmezí 16-21 °C.

V rámci studie rozšíření zástupců rodu *Pisum* v souvislosti s jejich genotypem byla provedena studie, která na základě tří molekulárních markerů zastupující chloroplastový (gen *rbcL*), mitochondriální (gen *coxI*) a jaderný genom (gen *SCA* z LG V) rozlišila 4 kombinace těchto markerů (A, B, C a D), a společně s údaji výskytu jednotlivých kombinací upřesnila základní rysy vývoje rozšíření jednotlivých skupin. Součástí studie byl i druh *P. fulvum*, který společně s druhy *P. abyssinicum* a s částí druhu *P. sativum* subsp. *elatius* patří do skupiny A, která má kombinaci alel *coxI+*, *rbcL+* a SCF^f. Skupina A je pravděpodobně nejpůvodnější kombinací, vyskytující se na území východního středomoří, na některých středomořských ostrovech a v afrických oblastech výskytu *P. abyssinicum*. Další kombinace jsou specifické pro druh *P. sativum* a vznikly mutacemi z kombinace A na kombinaci C, z C na D a z D na B (Kosterin et al., 2010).

2.3.5 Druh *Pisum abyssinicum* A.Br. ve vztahu k *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

P. abyssinicum je endemitem oblastí severní Etiopie a západního Jemenu. Je druhem pravděpodobně nezávisle domestikovaným na *P. sativum* subsp. *sativum*. Přibližná doba divergence vývojové větve *P. abyssinicum* od zbytku rodu *Pisum* se datuje do doby před 4000 lety (Ellis et al., 1998). Morfologicky i cytologicky je blíže druhu *P. sativum*. V pokusech křižitelnosti vykazuje vyšší fertilitu s druhy *P. sativum* než s druhem *P. fulvum* (Zohary & Hops, 1973), avšak stále dostatečnou pro produkci fertilních potomků, a proto může být použito křížení *P. abyssinicum* s *P. fulvum* a následně vzniklý hybrid křížen s *P. sativum* pro překonání reprodukční bariéry mezi *P. fulvum* a *P. sativum* (Warkentin et al., 2015). Analýza zásobních proteinů semen vykazuje vyšší podobnost *P. abyssinicum* se zástupci jednotlivých skupin druhu *P. sativum* než s druhem *P. fulvum* (Jha & Ohri, 2002). I sekvence oblastí ITS u položek druhu *P. abyssinicum* je více podobná sekvencím druhu *P. sativum* (Polans & Saar, 2002) a haplotyp chloroplastové cpDNA se spíše shoduje s haplotypem některých zástupců *P. sativum* subsp. *elatius* (Smýkal, osobní sdělení). Avšak

recentní studie zkoumající fylogenetické vztahy na základě molekulárních markerů rozmístěných napříč genomem odhalily genotypovou podobnost i s genotypem *P. fulvum* (Ellis et al., 1998; Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2007, 2010). Lze tedy předpokládat, že součástí evoluční historie druhu *P. abyssinicum* byla i hybridizace druhů *P. fulvum* a *P. sativum* subsp. *elatius*. Proto v této diplomové práci jsou zahrnuty i zástupci *P. abyssinicum* a *P. sativum* subsp. *elatius*, z důvodu vymezení vztahu jednotlivých zástupců planého hrachu s druhem *P. fulvum*.

2.3.6 Využití *Pisum fulvum* Sibth. & Sm. pro obohacení genetické diverzity kulturního hrachu

Z důvodu určení míry fertility mezi jednotlivými druhy byl vytvořen systém genových poolů, který nám vyjadřuje využitelnost jednotlivých druhů jako rezervoáru genů ve vztahu k danému druhu, v tomto případě vztahu *P. fulvum* k hospodářsky významnému druhu *P. sativum*.

Systém genových poolů (Hancock, 2012):

- Primární genový pool: patří sem všechny nižší taxony v rámci daného druhu, s kterými mohou být bez problémů tvořeni fertilní kříženci.
- Sekundární genový pool: patří sem všechny druhy, kteří s daným druhem tvoří alespoň z části fertilní hybridy. Genový tok je možný, ale s možnými obtížemi.
- Terciální genový pool: patří sem všechny ostatní druhy, u kterých není možnost vzniku fertilních hybridů. Genový tok je možný pouze za využití speciálních laboratorních technik.

Druh *P. fulvum* řadíme k sekundárnímu genovému poolu kulturního hrachu. Ačkoli je mezi *P. fulvum* a *P. sativum* v jisté míře již vyvinuta reprodukční bariéra, lze v rámci křížení získat fertilní potomstvo. Hlavní potenciál *P. fulvum* v případě využití jako donora genů zájmu jsou rezistence k škůdcům a k patogenům. Již byly pomocí křížení vneseny z *P. fulvum* do kulturního hrachu geny rezistence k zrnokazu hrachovému (*Bruchus pisorum*) a padlí hrachu (*Erisiphe pisi*) (Clement et al., 2002; Fondevilla et al., 2007; Byrne, 2005, 2008). Někteří jedinci *P. fulvum* byli dále určení jako odolní proti tečkovce borové (*Mycosphaerella pinodes*), záraze vroubené (*Orobanche crenata*) a rzi hrachové (*Uromyces pisi*) (Wroth, 1998; Pérez de Luque, et al., 2005; Fondevilla et al., 2005; Barilli et al., 2010). *P. fulvum* je také potencionálním donorem genů souvisejících s odolnosti proti suchu, případně genů souvisejících s brzkým nástupem kvetení, avšak pro tyto účely doposud nebyly publikovány žádné studie.

Pro vnesení genů rezistence k zrnokazu hrachovému (*B. pisorum*) bylo využito křížení kulturního hrachu s položkami PI 595946, PI 343955 a ATC113 (708). I přes problémy

s křížením a produkcí fertilních potomků byla v menší části F3 populace pozorována u některých jedinců zvýšená míra odolnosti proti škůdci (Clement et al., 2009). Další studií genetické podstaty rezistence byly určeny 3 geny spojené s tímto znakem, kdy za rezistenci u položek *P. fulvum* jsou zodpovědné 3 recesivní geny, také proto je při přenosu této rezistence křížením velice nízká úspěšnost (Byrne et al., 2008).

Ve studii zabývající se přenosem rezistence z *P. fulvum* do genotypu kulturního hrachu k padlí hrachu (*E. pisi*) Fondevilla et al. (2007) určili dominantní gen *Er3*, který se liší od již dříve detekovaných recesivních genů rezistence *er1* a *er2*. Pro křížení byla použita položka P660-4, která má původ v Sýrii v okolí města Idlib, ze které se autorům podařilo přenést introgresí tento gen rezistence do genomu hrachu kulturního.

Dále bylo využito mezidruhového křížení *P. fulvum* položky JI1006 s kulturním genotypem hrachu pro přenos rezistence k houbovému patogenu tečkovce borové (*M. pinodes*), ovšem tato rezistence je spojená se zvýšenou obranou reakcí rezistentních rostlin. Napadené rezistentní rostliny vykazují vyšší aktivitu hypersenzitivní reakce, která zabrání dalšímu šíření patogenu rostlinou. Při napadení rezistentních rostlin dojde až k 30% redukci listové plochy (Wroth, 1998).

Barilli et al. (2010) ve své studii určili QTL, které odpovídají rezistenci ke rzi hrachu (*U. pisi*) u mezidruhových kříženců *P. fulvum* s kulturním hrachem, avšak úspěšná introgrese této polygenně založené rezistence do genomu kulturních položek hrachu nebyla doposud publikována.

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je podat ucelený pohled na genetickou diverzitu druhu *P. fulvum* při využití současných znalostí a tento pohled obohatit o výsledky analýz využívajících metod molekulární biologie k sledování genetické diverzity v porovnání s dalšími dostupnými údaji popisnými, geografickými nebo klimatickými souvisejícími s druhem *P. fulvum*.

4 Materiál a metody

4.1 Použitý rostlinný materiál

Jednotlivé položky *P. fulvum*, které byly zkoumány v této práci, byly získány ze zdrojů genetických materiálů 10 genových bank a semenných sbírek z celého světa (tabulka 2). Genové banky a semenné sbírky, z kterých byly získány vzorky pro analýzy, jsou: Ns. (Novosibirsk, RUS), JIC (Norwich, GBR), IGB (Bet-Dagan, ISR), VIR (St. Petersburg, RUS), IPK (Gatersleben, DEU), USDA (Pullman, USA), AGG (Horsham, AUS), PGB (Wiatrowo, POL), ICARDA (Aleppo, SYR), INRA (Dijon, FRA). Metodou sekvenace jasderné ITS oblasti a chloroplastové oblasti *trnSG* bylo analyzováno 149 položek. Celogenomovými metodami Dart-Seq^{TM} bylo analyzováno 20 položek a GenoPea 13.2K SNP bylo analyzováno 15 položek. Pouze v 6 případech byly položky podrobeny všem třem metodám genotypizace.

Tabulka 2: Seznam analyzovaných položek *P. fulvum*, jejich původ, ribotyp z analýzy ITS sekvence a provedené celogenomové analýzy. Zkratka GeP odpovídá analýze GenoPea 13.2K SNP a DAS odpovídá analýze DArT-Seq^{TM}.

ID položky	genová banka	ribotyp	celogen. analýza	ID položky	genová banka	ribotyp	celogen. analýza
701	Ns.	*ful1*		JI1008	JIC	*ful1*	
JI3270	JIC	*ful1*	GeP	JI2206	JIC	*ful1*	
JI2473	JIC	*ful1*	DAS/GeP	VIR6070	VIR	*ful1*	
IS19261	IGB	*ful1*		JI1012	JIC	*ful1*	
JI2203	JIC	*ful1*		L93	Ns.	*ful1*	
JI2510	JIC	*ful1*		PI560067	USDA	*ful1*	
JI2511	JIC	*ful1*		PI595946	USDA	*ful1*	DAS
JI2515	JIC	*ful1*		PIS1665	IPK	*ful1*	
JI2517	JIC	*ful1*	DAS	JI3249	JIC	*ful1*	
JI2518	JIC	*ful1*	DAS	AGG2239	AGG	*ful1*	
JI2519	JIC	*ful1*		AGG3733	AGG	*ful1*	
JI2520	JIC	*ful1*		AGG3739	AGG	*ful1*	
JI2522	JIC	*ful1*		AGG113	AGG	*ful1*	
JI2523	JIC	*ful1*	DAS/GeP	AGG3728	AGG	*ful1*	
JI2524	JIC	*ful1*		AGG3747	AGG	*ful1*	
JI2525	JIC	*ful1*		AGG1633	AGG	*ful1*	
JI2526	JIC	*ful1*		AGG3731	AGG	*ful1*	
JI2529	JIC	*ful1*		AGG1497	AGG	*ful1*	
JI2530	JIC	*ful1*		AGG3881	AGG	*ful1*	
JI2531	JIC	*ful1*		AGG114	AGG	*ful1*	
JI2533	JIC	*ful1*		AGG3730	AGG	*ful1*	
JI2535	JIC	*ful1*		AGG3727	AGG	*ful1*	
JI2536	JIC	*ful1*		AGG1496	AGG	*ful1*	
JI2540	JIC	*ful1*		AGG3740	AGG	*ful1*	
JI2541	JIC	*ful1*		AGG1723	AGG	*ful1*	
JI2542	JIC	*ful1*		AGG3738	AGG	*ful1*	
JI2544	JIC	*ful1*	DAS	AGG3723	AGG	*ful1*	
JI3216	JIC	*ful1*		AGG3729	AGG	*ful1*	GeP
JI1796	JIC	*ful1*	DAS	AGG3746	AGG	*ful1*	
JI2470	JIC	*ful1*		AGG3748	AGG	*ful1*	
JI2472	JIC	*ful1*		AGG3736	AGG	*ful1*	
JI2539	JIC	*ful1*		AGG3879	AGG	*ful1*	
JI3214	JIC	*ful1*		VIR6071	VIR	*ful2*	
JI3215	JIC	*ful1*		WT301	PGB	*ful2*	
JI3240	JIC	*ful1*		IS21628	IGB	*ful2*	
JI3245	JIC	*ful1*		IS22701	IGB	*ful2*	
JI3250	JIC	*ful1*		PI595951	USDA	*ful3*	
JI3264	JIC	*ful1*		JI1392	JIC	*ful3*	

ID položky	genová banka	ribotyp	celogen. analýza	ID položky	genová banka	ribotyp	celogen. analýza
JI3268	JIC	*ful3*	DAS	JI3218	JIC	*ful3*	
PI52496	USDA	*ful3*		JI3222	JIC	*ful3*	
JI1007	JIC	*ful3*		JI3251	JIC	*ful3*	
JI3265	JIC	*ful3*	GeP	JI2537	JIC	*ful4*	DAS
JI3267	JIC	*ful3*	DAS/GeP	JI3269	JIC	*ful4*	GeP
JI3493	JIC	*ful3*		L95	Ns.	*ful4*	
JI3499	JIC	*ful3*		L96	Ns.	*ful4*	
PI343955	USDA	*ful3*		PIS7608	IPK	*ful4*	
PI595944	USDA	*ful3*		PIS1319	IPK	*ful4*	
PI595945	USDA	*ful3*		PIS5133	IPK	*ful4*	
PI595953	USDA	*ful3*		PIS5134	IPK	*ful4*	
VIR2523	VIR	*ful3*		PIS5135	IPK	*ful4*	
WL2140	PGB	*ful3*	DAS	PIS5138	IPK	*ful4*	
W615046	USDA	*ful3*		PIS5139	IPK	*ful4*	
PIS5136	IPK	*ful3*		JI1011	JIC	*ful4*	DAS/GeP
JI1009	JIC	*ful3*		JI224	JIC	*ful4*	DAS/GeP
PI531199	USDA	*ful3*		AGG3725	AGG	*ful4*	
PI595932	USDA	*ful3*	GeP	AGG1495	AGG	*ful4*	
PI595935	USDA	*ful3*		AGG3743	AGG	*ful4*	
PI595949	USDA	*ful3*		AGG3344	AGG	*ful4*	
PI595950	USDA	*ful3*	GeP	AGG3735	AGG	*ful4*	
702	Ns.	*ful4*		AGG1494	AGG	*ful4*	
703	Ns.	*ful4*		AGG3104	AGG	*ful4*	
706	Ns.	*ful4*		AGG3734	AGG	*ful4*	
707	Ns.	*ful4*		AGG1724	AGG	*ful4*	
IG112136	ICARDA	*ful4*	DAS	AGG3482	AGG	*ful4*	
IS22592	IGB	*ful4*		AGG3342	AGG	*ful4*	
IS22700	IGB	*ful4*		AGG3737	AGG	*ful4*	
IS23464	IGB	*ful4*		AGG3741	AGG	*ful4*	
JI1006	JIC	*ful4*	DAS/GeP	AGG3878	AGG	*ful4*	
JI1010	JIC	*ful4*	DAS	AGG3744	AGG	*ful4*	
JI2512	JIC	*ful4*		AGG3880	AGG	*ful4*	
JI2513	JIC	*ful4*		AGG3343	AGG	*ful4*	
JI2514	JIC	*ful4*		AGG3722	AGG	*ful4*	
JI2516	JIC	*ful4*		IG64207	ICARDA	NA	DAS
JI2521	JIC	*ful4*		JI2534	JIC	NA	DAS
JI2527	JIC	*ful4*	DAS	JI849	JIC	NA	GeP
JI2528	JIC	*ful4*	DAS	DCG076	INRA	NA	GeP
JI2532	JIC	*ful4*					

4.2 Příprava DNA pro analýzy

4.2.1 Izolace DNA

Pro získání DNA ze semen hrachu byla provedena její izolace pomocí komerční sady pro izolaci DNA DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, DEU), dle modifikovaného návodu z použité sady za použití originálních roztoků v následujících krocích:

1. K přibližně 20 mg suchého homogenizovaného materiálu bylo přidáno 400 µl roztoku pufru AP1 a 2 µl zásobního roztoku RNase A a vzniklá směs byla důkladně promíchána.

2. Směs se inkubovala 10 minut při teplotě 65 °C. Během inkubace byla směs přibližně 3x promíchána převrácením mikrozkumavky.

3. Do směsi bylo přidáno 130 µl pufru AP2, vzniklá směs byla promíchána a poté se nechala inkubovat 5 minut při 0 °C.

4. Proběhla centrifugace 5 minut při 20 000x g.

5. Lyzát byl přemístěn do QIAshedder spin kolony, která byla umístěna v zásobní zkumavce 2 ml a proběhla centrifugace 2 minuty při 20 000x g.

6. Ze zásobní zkumavky bylo převedeno 260 µl kapalné frakce bez porušení peletu do nové mikrozkumavky.

7. Bylo přidáno 390 µl AP3 a vzniklá směs byla jemně promíchána.

8. Směs byla aplikována na DNeasy mini spin kolonu, která byla umístěna v zásobní zkumavce 2 ml a proběhla centrifugace 1 minutu při $\geq$ 6 000x g.

9. DNeasy mini spin kolona byla přemístěna do nové zásobní zkumavky, na kolonu bylo naneseno 300 µl pufru AW a proběhla centrifugace 1 minutu při $\geq$ 6 000x g. Po centrifugaci byla odstraněna kapalina ze zásobní zkumavky.

10. Na kolonu bylo naneseno dalších 300 µl pufru AW a proběhla centrifugace 2 minuty při 20 000x g.

11. Kolona byla přemístěna do nové mikrozkumavky (1,5 ml), na střed kolony bylo naneseno 100 µl předehřátého (65 °C) pufru AE. Následovalo 5 minut inkubace při laboratorní teplotě a proběhla centrifugace 1 minutu při $\geq$ 6 000x g

12. Pro získání II. frakce byl krok 11. zopakován ještě jednou.

4.2.2 Elektroforetická analýza

Pro verifikaci izolované genomové DNA, PCR produktů a určení jejich koncentrace a velikosti byla využita horizontální agarósová elektroforéza. Pro separaci DNA molekul byl použit 1% agarósový gel v kombinaci s elektroforetickým pufrem 1x TAE. Pro UV detekci DNA na gelu bylo použito fluorescenční barvivo ethidium bromid. Pro možnost zjištění velikostí PCR amplifikovaných fragmentů a jejich koncetrace byl požit hmotnostní standard Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA).

Použité chemikálie:

- agarósa
- 1x TAE – 50 x zředěný 50 x TAE pufr (1 litr): 242 g Tris báze; 57,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- zásobní roztok ethidium bromidu: vodný roztok 10 mg/ml
- nanášecí pufr: 20% Ficoll; 0,05% bromfenolová modř; TE pufr (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0)

4.3 Sekvenace

V rámci této diplomové práce byly sekvenovány oblasti ITS jaderné rDNA a *trnSG* chloroplastové cpDNA u části položek z celkového souboru 149 položek *P. fulvum*. Samotná sekvenace byla provedena firmou Macrogen. Před odesláním vzorků na sekvenaci byla provedena metodou PCR amplifikace sekvenovaných oblastí. Primery pro amplifikaci ITS oblasti byly použity ITS-VF (5´-TCG ATG CCT TAC ATG CAG TG-3´) a ITS-VR (5´-TAG AAA CGC ATA TGG GTA AAA GAG-3´) a pro oblast *trnSG* primery *trnS-V* (5´-GAT ACS TCG SAT AAA CAA AAA GAA C-3´) a *trnG-V* (5´-CAT GTT TCG TAA AGG GCC CCC TAA TG-3´) (Kenicer et al., 2005; Schaefer et al., 2012). Následně byla provedena purifikace vzorků a před odesláním vzorků ještě byla zkontrolována úspěšnost amplifikace a purifikace vzorků pomocí horizontální agarósové elektroforézy. Pro potřeby sekvenace byla stanovena velikost sekvenovaných oblastí a koncentrace DNA vzorků v roztoku porovnáním s hmotnostním markerem. Proces sekvenace byl proveden firmou Macrogen pomocí kapilárního provedení Sangerovy sekvenační metody.

4.4 Genotypizace metodou DArT-Seq™

Genomová DNA z 20 položek *P. fulvum*, jakožto součást komplexní studie genetické diverzity rodu *Pisum*, byla podrobena analýze DArT-Seq™ společností Diversity Arrays Technology Ltd. v Canbeře v Australia, dle standardní metodologie DArT-Seq™ (Kilian et al., 2012).

Metoda genotypizace DArT-Seq™ umožňuje identifikaci molekulárních markerů napříč celými genomy i u druhů, u kterých doposud není publikován sekvenovaný genom. Touto metodou jsou získány molekulární markery využívající genetické variability genomů v podobě SNP, indelů, restrikčních míst i případných metylací lokalizovaných v místech, které rozpoznávají metylačně senzitivní restrikční enodonukleázy. Metoda DArT-Seq™ kombinuje redukci komplexity DArT s výhodami NGS sekvenování. Pro analýzu rodu *Pisum* byla vybrána metoda redukce komplexity s využitím *PstI-MseI* restrikčních endonukleáz. *PstI* štěpí převážně genomickou DNA v oblastech s větším zastoupením genů, jelikož *PstI* je metylačně senzitivní restrikční endonukleáza. DNA je podrobena štěpící/ligační reakci s restrikčními endonukleázami za přidání adaptérů kompatibilních s místy překryvu vytvořenými štěpením *PstI-MseI*. Sekvence *PstI* adaptéru obsahuje komplementární sekvenci se sekvencí oligonukleotidu sloužící pro připojení k amplifikační destičce sekvenátoru Illumina, sekvenci sloužící k nasednutí sekvenačního primeru a sekvenci označovanou „barcode", která je rozdílná pro každou položku a slouží k identifikaci vzorků. Adaptér *MseI* obsahuje kromě sekvence kompatibilní s překryvem v místě štěpení také sekvenci komplementární sekvenci sloužící pro připojení k amplifikační destičce. Dále byly touto cestou vzniklé fragmenty amplifikovány v 30 cyklech PCR při podmínkách 94 °C – 1 min, 30 cyklů: 94 °C – 20 s, 58 °C – 30 s, 72 °C – 45 s a závěrečné prodloužení při 72 °C – 7 min. Výsledná amplifikovaná směs sekvencí byla přidána v ekvimolárním množství od každého vzorku do směsného vzorku, ten byl dále podroben c-Bot (Illumina) můstkové PCR a „single read" sekvenován pomocí Illumina Hiseq2500. Sekvenace proběhla v 77 cyklech. Z výsledků sekvenace bylo generováno přibližně 2 500 000 (+/- 7%) sekvencí na jeden vzorek (barcode), které byly zpracovány pomocí DArTsoft14 za vzniku souborů markerových dat SNP a SilicoDArT. Soubor dat SNP prezentuje záznam kodominantních markerů v kódování 0 – referenční nukleotid, 1 – alternativní nukleotid, 2 – heterozygotní stav (přítomný referenční i alternativní nukleotid). Soubor dat SilicoDArT reprezentuje binární záznam dominantních markerů SNP, přítomnost indelů, restrikční polymorfismus a metylačně senzitivní restrikční polymorfismus (Kilian et al., 2012; Sánchez-Sevilla et al., 2015; Raman et al., 2014).

4.5 Genotypizace metodou GenoPea 13.2K SNP

Genomová DNA 16 položek *P. fulvum* byla podrobena genotypizací metodou GenoPea 13.2K SNP, která byla vyvinuta autory Tayeh et al. (2015) pro účely genetického mapování a studie genetické diverzity hrachu. Tato metoda využívá přístup Illumina Infinium® BeadChip, založený na hybridizaci fragmentované PCR-free amplifikované genomové DNA k imobilizované sondě o délce 50 nukleotidů, a následné detekci varianty SNP pomocí enzymaticky katalyzovaného připojení fluorescenčně značeného nukleotidu v místě SNP. V případě metody GenoPea 13.2K SNP se analyzuje polymorfismus u 13 009 SNP, jež jsou umístěny v genových oblastech hrachového genomu a byly vybrány ze souboru 248 617 SNP objevených na základě celogenomové sekvenace Illumina HiSeq2000 16 vzorků, včetně zástupců planých forem *P. fulvum*, *P. sativum* subsp. *elatius* a *P. abyssinicum*, v porovnání se sekvencemi jednotlivých mRNA transkriptů od autorů Alves-Carvalho et al. (2015). Z 13 204 SNP je nejméně 6 110 SNP lokalizováno v sekvencích potenciálně kódující proteiny, z toho 4 305 SNP charakteru neměnící translatovanou aminokyselinu a 1 805 SNP je spojeno se změnou translatované aminokyseliny. V případě 12 805 SNP je určena jejich genetická pozice napříč celým genomem hrachu, která byla určena pomocí genetického mapování 12 RILs populací (Tayeh et al., 2015). Z výsledků Illumina Infinium® BeadChip analýzy vznikl soubor dat prezentující jednotlivé SNP u konkrétních analyzovaných položek v kódování AA – homozygot varianty A, BB – homozygot varianty B a AB – heterozygotní stav variant A i B. Mapovaným SNP je v souboru dat dále přiřazena jejich genetická pozice v cM v 1 ze 7 vazebných skupin.

4.6 Modelování potencionálního rozšíření *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

Z důvodu studie geografického rozšíření druhu *P. fulvum* i jeho potencionálního rozšíření byla použita dostupná volně přístupná GPS data výskytu položek *P. fulvum* (příloha 1) z jednotlivých databází genových bank a www.biogis.huji.ac.il a pomocí nich byla metodou maximální entropie za použití programu Maxent 3.3.3k (Philips et al., 2006) předpovězena potenciální distribuce *P. fulvum* a jeho jednotlivých skupin, které odpovídají ITS ribotypům. Pro modelování potencionální distribuce bylo použito GPS lokacím odpovídajících 19 bioklimatologických proměnných (tabulka 3) volně dostupných z databáze www.worldclim.org (Hijmans et al., 2005). K zpracování dat a k práci s mapami byly použity balíky sp (Pebesma & Bivard, 2005), SDMTools (VanDerWal et al., 2014) a plotrix (Lemon, 2006) v statistickém programovacím jazyce R.

Tabulka 3: 19 bioklimatologických proměnných použitých při predikci geografické distribuce rodu *P. fulvum*.

ID proměnné	charakteristika proměnné
BIO1	průměrná roční teplota
BIO2	teplotní proměnlivost – průměr rozdílů maximální a minimální teploty
BIO3	isotermalita – (BIO2/BIO7) * 100
BIO4	teplotní proměnlivost – (směrodatná odchylka měsíčních teplot) * 100
BIO5	maximální teplota nejteplejšího měsíce
BIO6	minimální teplota nejchladnějšího měsíce
BIO7	roční rozsah teplot – (BIO5-BIO6)
BIO8	průměrná teplota nejvlhčího čtvrtletí
BIO9	průměrná teplota nejsuššího čtvrtletí
BIO10	průměrná teplota nejteplejšího čtvrtletí
BIO11	průměrná teplota nejchladnějšího čtvrtletí
BIO12	Roční úhrn srážek
BIO13	úhrn srážek v nejvlhčím měsíci
BIO14	úhrn srážek v nejsuším měsíci
BIO15	srážková proměnlivost – variační koeficient
BIO16	úhrn srážek v nejvlhčím čtvrtletí
BIO17	úhrn srážek v nejsuším čtvrtletí
BIO18	úhrn srážek v nejteplejším čtvrtletí
BIO19	úhrn srážek v nejchladnějším čtvrtletí

5 Výsledky

5.1 Sekvenace

Mezi sekvencemi jednotlivých vzorků daných oblastí ITS (přibližně 664 bp) a *trnSG* (855 bp) bylo provedeno mnohočetné přiřazení pomocí softwaru ClustalX (Thompson et al., 1997). Dále byly pomocí grafického editoru sekvencí Bioedit lokalizovány variabilní pozice sekvencí a jednotlivé varianty sekvencí byly rozděleny do konkrétních haplotypových skupin.

Porovnání sekvencí oblasti ITS jaderné DNA u souboru 149 položek *P. fulvum* vedlo k detekci 4 ribotypů *ful1*, *ful2*, *ful3* a *ful4* (tabulka 2), které se mezi sebou lišily vždy v jedné bázi. Z toho 73 položek patří do skupiny *ful1*, 4 položky do skupiny *ful2*, 23 položek do skupiny *ful3* a 49 položek do skupiny *ful4*.

Porovnání chloroplastových sekvencí *trnSG* vedlo k detekci jednoho většinového haplotypu, avšak u 6 položek (JI2510, JI2523, JI2539, WL2140, JI2539, JI1006, JI2521 a IG112136) byl detekován haplotyp odpovídající *P. sativum* subsp. *humile* nebo *P. sativum* subsp. *elatius.*

5.2 DArT-Seq^{TM}

Výsledky genotypizace metodou DArT-Seq^{TM} vedly k získání souboru molekulárních markerů napříč celým genomem hrachu. Soubor dominantních molekulárních markerů DartSilico reprezentuje genetickou variabilitu primární sekvence DNA i epigenetickou variabilitu metylací cytozinu a soubor kodominantních molekulárních markerů DartSNP reprezentuje jednonukleotidový polymorfismus v homozygotním i heterozygotním stavu. Jednotlivé markery byly mapovány k již sekvenovaným genomům rostlin příbuzných rodu *Pisum* (tabulka 4), nejvíce markerů bylo mapováno k sekvenci genomu *Medicago truncatula* Gaertn., tyto údaje byly dále použity pro určení lokalizace *P. fulvum* specifických markerů. Jednotlivé filtrované soubory (parametry filtru: chybějící data; NA = 0 %, MAF > 5 %) DArT-Seq^{TM} markerů DartSilico i DartSNP byly využity pro fylogenetickou analýzu. Byla provedena PCA analýza (obrázek 7) pomocí softwarového balíku ggfortify v statistickém programovacím jazyce R a k tvorbě fylogenetického networku metodou

Tabulka 4: Počty filtrovaných DArT-Seq^{TM} markerů souboru 20 položek *P. fulvum* mapovaných k genomům příbuzných již sekvenovaných druhů.

DArT-Seq^{TM} analýza	DartSilico		DartSNP	
2O položek *P. fulvum*	polymorfních lokusů	MAF > 5 % NA = 0 %	polymorfních lokusů	MAF > 5 % NA = 0 %
	14 207	3 651	6 039	1 013
mapováno k genomu*:				
Medicago truncatula	525	104	487	127
Phaseolus vulgaris	151	30	143	33
Glycine max	210	35	242	54
Vigna radiata	120	24	136	39
Lupinus angustifolius	143	28	182	51

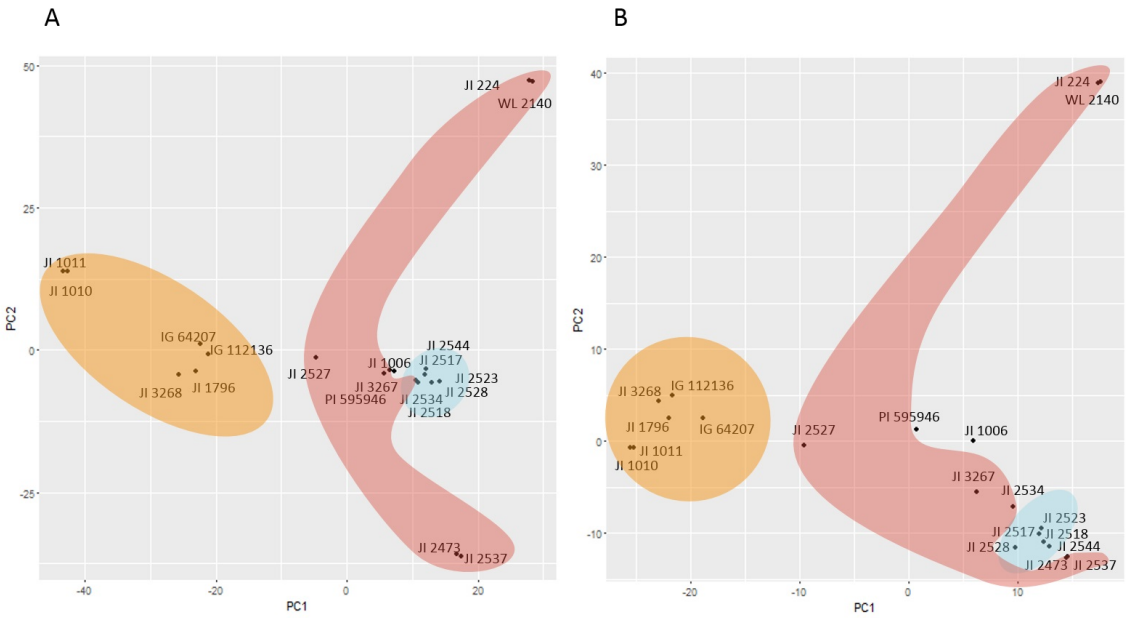
**využit program blastn, parametry E-value = 0,0005; minimální identita 85%*

Integer Neighbour-Joining network pro obsáhlejší soubor markerů DartSilico byl použit program POPART (French et al., 2014; Leigh et al., 2015).

Z 20 položek *P. fulvum* je u 15 položek zaznamenán jejich geografický původ, který koreluje s genetickou strukturou druhu *P. fulvum* (obrázek 9). Položky ze severní části východní Levanty a z jižní části východní Levanty tvoří shluky, jejichž zástupci jsou si geneticky bližší. Položky, které mají geografický původ mezi těmito dvěma póly, tvoří „střední" skupinu položek *P. fulvum*, jejíž genetická struktura je situována mezi „severní" a „jižní" skupinu, a je i více rozmanitá než genetická variabilita „severního" a „jižního" shluku (obrázek 8).V analýze DartSilico bylo u souboru položek reprezentující genetickou diverzitu rodu *Pisum* celkově detekováno 46 812 DartSilico polymorfních markerů, z toho bylo zaznamenáno 14 207 polymorfních markerů v námi analyzovaném souboru 20 položek *P. fulvum*. Z toho 4 687 markerů bylo zaznamenáno u všech položek *P. fulvum*. Dále z tohoto souboru jen 3 651 markerů mělo zastoupení minoritní alely větší než 5 % (MAF >5 %).

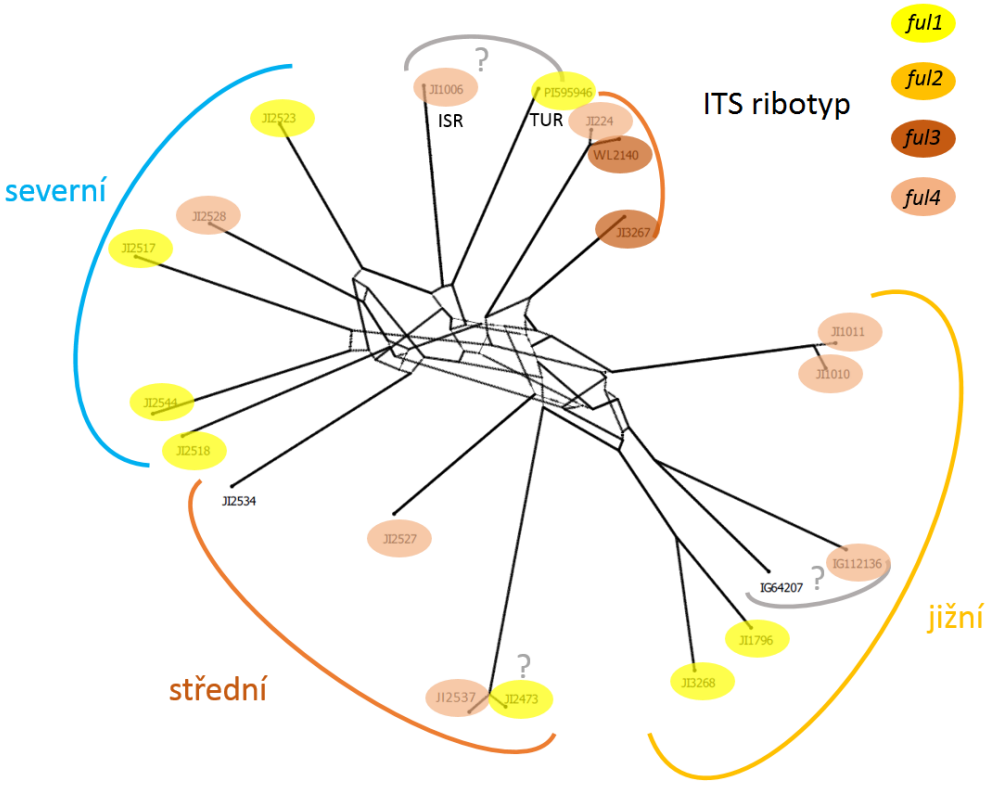
V analýze DartSilico bylo u souboru položek reprezentující genetickou diverzitu rodu *Pisum* celkově detekováno 46 812 DartSilico polymorfních markerů, z toho bylo zaznamenáno 14 207 polymorfních markerů v námi analyzovaném souboru 20 položek *P. fulvum*. Z toho 4 687 markerů bylo zaznamenáno u všech položek *P. fulvum*. Dále z tohoto souboru jen 3 651 markerů mělo zastoupení minoritní alely větší než 5 % (MAF >5 %).

V analýze DartSNP bylo z celkového počtu 35 647 detekovaných SNP lokusů, reprezentující genetický polymorfismus genově bohatých oblastí hrachového genomu, 6 039 SNP lokusů polymorfních u souboru 20 položek *P. fulvum*. Napříč všemi 20 položkami *P. fulvum* bylo zaznamenáno 1 331 polymorfních SNP, avšak pouze 1 013 polymorfních SNP lokusů, které byly použity pro PCA analýzu (obrázek 7B), mají MAF > 5 %. Jelikož analýza DartSNP vykazuje kodominantní charakter, byl u položek *P. fulvum* v 0,73 % de-

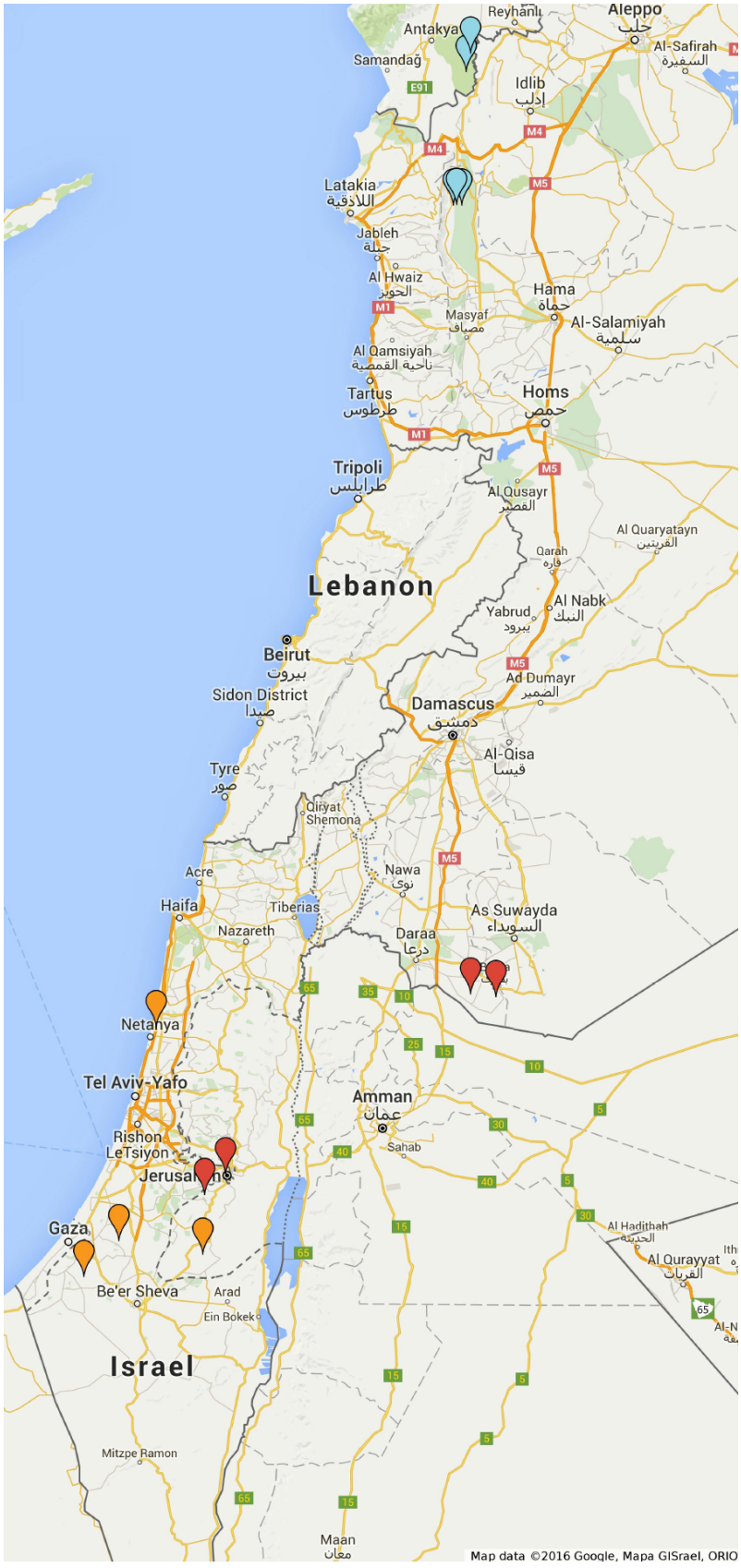


Obrázek 7: **A** PCA analýza na základě 3561 DartSilico polymorfních markerů u 20 položek *P. fulvum*, 0 % chybějících dat, MAF > 5 % **B** PCA analýza na základě 1013 DartSNP polymorfních markerů u 20 položek *P. fulvum*, 0 % chybějících dat, MAF > 5 %.

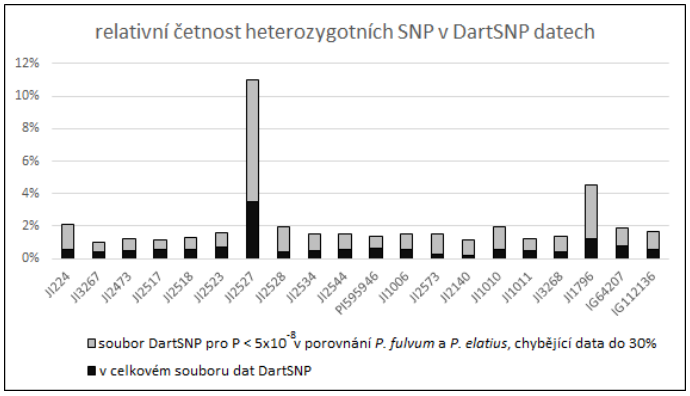
tekovaných SNP zaznamenán heterozygotní stav (obrázek 10).Obvyklé hodnoty zastoupení heterozygotních SNP u jednotlivých položek dobře reprezentuje jejich medián, který je 0,53 % zastoupení heterozygotních SNP u položky. Nejvyšší zastoupení heterozygotních SNP má položka JI2527 (3,52 %), následována položkou JI1796 (1,23 %). Nejnižší zastoupení heterozygotních SNP má položka JI3267 (0,39 %). V případě, že použijeme jako výchozí soubor DartSNP markerů jen ty markery, které jsou asociované s genotypem *P. fulvum* v porovnání s genotypem *P. sativum* subsp. *elatius* ($P > 5x10^{-8}$) a jejichž chybějící data u jednotlivých porovnávaných souborů dat nepřesahují 30 %, můžeme pozorovat zvýšení relativní četnosti zastoupení heterozygotů, zvláště pak vysoké zvýšení u položek JI2527 (11,00 %) a JI1796 (4,52 %).



Obrázek 8: Integer Neighbour-Joining network pro 20 položek *P. fulvum* ze souboru markerů DartSilico, 0 % chybějících dat (NA), MAF > 5 %. Hustota jednotlivých čar souvisí s počtem změn mezi body, jež daná čára spojuje. Vyznačené je rozdělení položek dle místa původu i jejich odpovídající ribotypy.



Obrázek 9: Mapa s označením původu 15 položek *P. fulvum* analyzovaných DArT-Seq^{TM}, jednotlivé barvy odpovídají rozdělení do skupin: jižní (žlutá), střední (červená) a severní (modrá).



Obrázek 10: Graf relativních četností heterozygotních SNP pro jednotlivé položky *P. fulvum* v DartSNP datech.

Pro určení SNP, které jsou specifické s *P. fulvum*, byly využity navíc data DartSNP (ze zdrojů Dr. Smýkala) pro 57 položek *P. sativum* subsp. *elatius* a 11 položek *P. abyssinicum* v celkovém rozsahu 35 674 detekovaných SNP. Byla porovnávána rozdílnost jednotlivých SNP mezi soubory položek *P. fulvum* a *P. sativum* subsp. *elatius*, mezi soubory položek *P. fulvum* a *P. abyssinicum* a mezi soubory položek *P. fulvum* a *P. abyssinicum* společně s *P. sativum* subsp. *elatius* (tabulka 5). Za specifické SNP byly považovány ty, které měly rozdílný SNP v homozygotním stavu mezi oběma porovnávanými skupinami a jejichž obsah chybějících dat byl menší než 30 %.

Tabulka 5: Počty SNP z DartSNP, které jsou striktně specifické pro porovnávané skupiny vyskytující se pouze v homozygotním stavu, chybějící data do 30% u jednotlivých skupin.

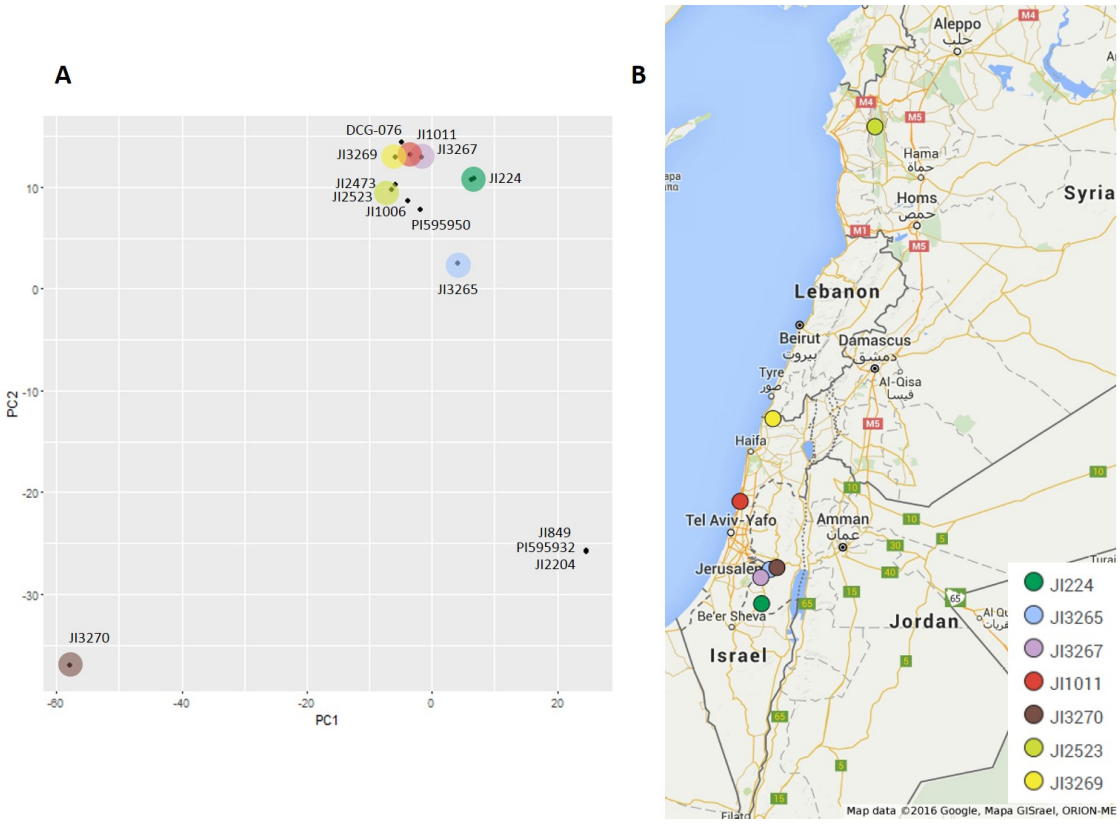
skupiny v porovnání	Počet specifických SNP
P. fulvum x *P. sativum* subsp. *elatius*	474
P. fulvum x *P. abyssinicum*	1 511
P. sativum subsp. *elatius* x *P. abyssinicum*	407
P. fulvum x (*P. abyssinicum* a *P. sativum* subsp. *elatius*)	374
(*P. fulvum* a *P. abyssinicum*) x *P. sativum* subsp. *elatius*	5

5.3 GenoPea 13.2K SNP

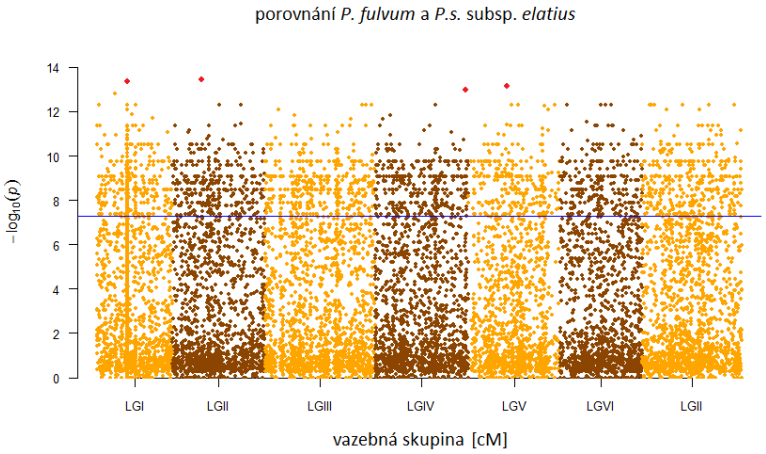
Soubor dat získaných metodou GenoPea 13.2K SNP obsahuje genotypizační údaje z 13 009 lokusů SNP, kterými bylo v rámci komplexní studie genetické diverzity genotypováno i 15 položek *P. fulvum*. Z tohoto souboru SNP markerů lokalizovaných ve všech 7 vazebných skupinách jaderného genomu hrachu byl v 1 828 SNP lokusech zaznamenán polymorfismus v souboru položek *P. fulvum*, avšak pouze v 1 238 SNP polymorfních lokusech byla detekována varianta SNP u všech 15 položek *P. fulvum*. Metoda filtrace SNP lokusů pro alely se zastoupením minoritní alely větší než 5 % (MAF > 5 %) zde nebyla využita z důvodu malého počtu vzorků v analýze. Jelikož je charakter genotypizace kodominantní, byl zaznamenán heterozygotní stav v 0,51 % detekovaných SNP. U jednotlivých položek je zastoupení heterozygotních SNP v rozsahu od 0,25 % u položky DCG-076 až po největší relativní četnost 0,96 % u položky PI595950 a 0,93 % u položky JI3270. Medián zastoupení heterozygotních SNP u položek je 0,46 %, tato hodnota dobře reprezentuje zastoupení heterozygotních SNP u většiny položek.

Genetická variabilita je znázorněna pomocí PCA analýzy (obrázek 11 A), většina položek tvoří jeden shluk, který alespoň částečně je rozdělen do dvou skupin, zbylé položky jsou však od tohoto shluku variabilně vzdáleny, nejvíce vzdálená od ostatních položek je položka JI3270. Položky, které se překrývají, nejspíše budou tvořit duplicitní položky nebo velice blízce příbuzné položky. U 7 z analyzovaných 15 položek je k dispozici geografická lokalita místa sběru (obrázek 11 B), avšak nelze vyvozovat žádné závěry z důvodu nereprezentativního malého souboru analyzovaných položek.

Jelikož genotypizační metoda GenoPea 13.2K SNP byla vytvořena tak, aby většina jednotlivých SNP byla asociována s konkrétním jaderně kódovaným genem hrachu, a jednotlivé SNP jsou geneticky mapovány do 7 vazebných skupin (Taeyeh et al., 2015). Bylo možno určit SNP, které jsou asociovány s jednotlivými druhy planých forem hrachu. Pro soubor 11 699 SNP, které jsou geneticky mapovány, byl vytvořen graf znázorňující rozložení jednotlivých SNP napříč vazebnými skupinami a jejich míru asociace vzhledem k danému porovnání druhů v podobě hodnoty *P.* Hodnota P vyjadřuje míru pravděpodobnosti, že jednotlivé SNP mezi porovnávanými soubory položek nejsou rozdílné. Bylo vytvořeno porovnání skupiny 15 položek *P. fulvum* s 42 položkami *P. sativum* subsp. *elatius* (obrázek 12). Pro porovnání byly využity pouze ty SNP, které měly v jednotlivých porovnávaných skupinách zastoupení chybějících dat méně než 30 %. Pro grafické znázornění SNP asociovaných s těmito druhy byl použit balík qqman v statistickém programovacím jazyce R. Bylo určeno 2 484 vybraných SNP, které mají v porovnání *P. fulvum* a *P. sativum* subsp. *elatius* hodnotu P menší než $5x10^{-8}$a které lze dohledat ve studii Tayeh et al. (2015) anotované k genům z *P. sativum* nebo *M. truncatula*.



Obrázek 11: **A** PCA analýza na základě 1238 markerů GenoPea 13.2K SNP pro 15 položek *P. fulvum.* **B** Geografický původ některých položek.

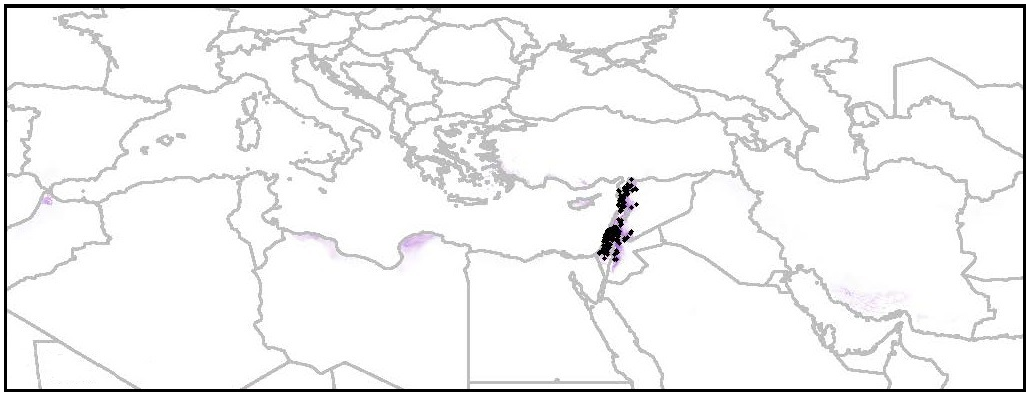


Obrázek 12: Rozložení 11 699 SNP a jejich míra asociace s druhem *P. fulvum* v porovnání s druhem *P. sativum* subsp. *elatius*, modrá čára značí mez (P=5 x 10^{-8}) nad níž jsou jednotlivé varianty SNP považovány za asociované s porovnávanými druhy. Červené body značí SNP jež jsou striktně specifické pro *P. fulvum* v porovnání s *P. sativum* subsp. *elatius* a naopak.

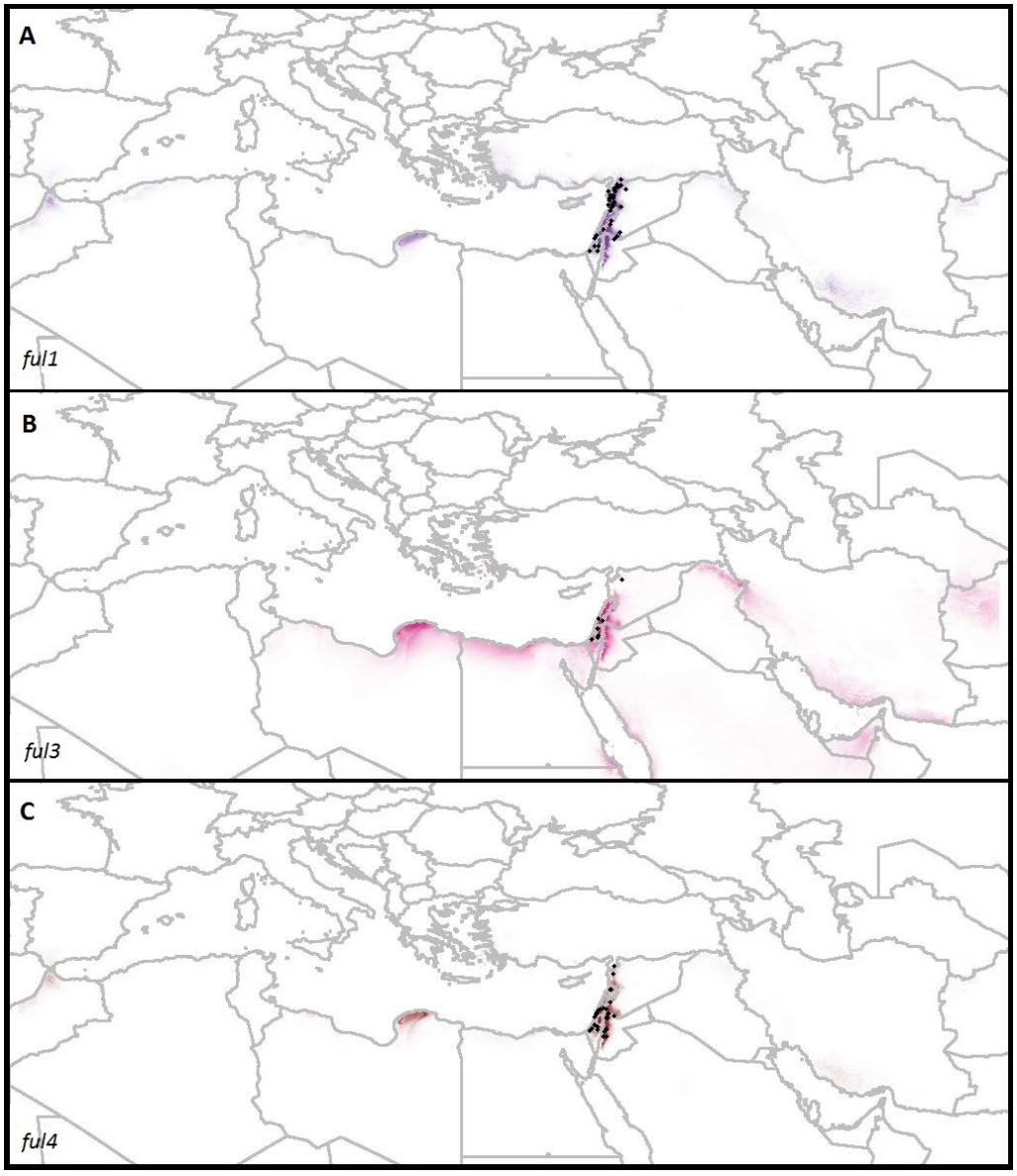
Při porovnání SNP mezi soubory 15 položek *P. fulvum* a 3 položek *P. abyssinicum* bylo vzhledem k homogenní struktuře genetické diverzity *P. abyssinicum* určeno větší množství SNP, které jsou rozdílné mezi těmito druhy. Seznam těchto SNP obsahuje 1 030 ve studii Tayeh et al. (2015) mapovaných a k *P. sativum* nebo *M. truncatula* anotovaných SNP, které mají zastoupení chybějících dat menší než 30 % a jsou specifické pro druh *P. fulvum* v porovnání s druhem *P. abyssinicum.*

5.4 Předpověď geografického rozšíření *Pisum fulvum* Sibth. & Sm.

Na základě 19 bioklimatologických proměnných byla metodou maximální entropie předpovězena potencionální distribuce *P. fulvum* v oblasti středomoří (obrázek 13) a také potencionální distribuce jednotlivých skupin položek s ITS ribotypy *ful1*, *ful3* a *ful4* (obrázek 14). Pro minoritní ribotypovou skupinu *ful2* nebyla z důvodů malého zastoupení tato analýza provedena. Mapy pro předpověď geografického rozšíření *P. fulvum* i jeho jednotlivých ribotypů byly vytvořeny za přispění Stergiose Pirintsose z University of Crete.



Obrázek 13: Předpověď potencionálního výskytu *P. fulvum* ve středomoří a přilehlých oblastech. Černé body značí místa zaznamenaného výskytu *P. fulvum*. Fialová barva odpovídá místům, které byly předpovězeny jako potencionální místa výskytu *P. fulvum*. Sytost barvy odpovídá pravděpodobnosti s jakou daná lokalita vyhovuje jako potencionální lokalita výskytu *P. fulvum*. Čím sytější barva tím vyšší pravděpodobnost.



Obrázek 14: Předpověď potencionálního výskytu pro ITS ribotypové skupiny *P. fulvum* **A** *ful1* (AUC = 0,995), **B** *ful3* (AUC = 0,981) a **C** *ful4* (AUC = 0,996) ve středomoří. Černé body značí místa zaznamenaného výskytu *P. fulvum*. Fialová barva odpovídá místům, která byla předpovězena jako potencionální místa výskytu *P. fulvum*. Sytost barvy odpovídá pravděpodobnosti s jakou daná lokalita vyhovuje jako potencionální lokalita výskytu *P. fulvum*. Čím sytější barva, tím vyšší pravděpodobnost. Hodnota AUC vyjadřuje přesnost modelování, čím blíže k 1 tím přesnější modelování.

6 Diskuse

Druh *P. fulvum*, jakožto nejodlišnější druh od zbytku rodu *Pisum*, patřící do sekundárního genového poolu kulturního hrachu, je významným druhem pro obohacování genetické diverzity kulturního hrachu a z této pozice by mu měla být věnována náležitá pozornost z hlediska uchování a podrobné charakteristiky jeho současné genetické diverzity. Ač je v kolekcích světových genových bank uchováváno přibližně 98 000 položek řazených k rodu *Pisum*, pouze přibližně 2% z toho jsou položky řazené do skupiny planého hrachu. V roce 2013 bylo uchováváno ve světových semenných kolekcích hrachu 706 položek *P. fulvum*, avšak z velké míry se jedná o duplicity a celkový počet jedinečných genotypů v tomto souboru položek *P. fulvum* není znám (Smýkal et al., 2013). V této diplomové práci bylo analyzováno celkem 153 položek *P. fulvum*, ale podařilo se dohledat v genovými bankami veřejně poskytovaných popisných listech položek, že přibližně v 20 % případech se jedná o duplicity, což odpovídá odhadovanému zastoupení duplicit v celkovém souboru celosvětově uchovávaných položek z rodu *Pisum* (Smýkal et al., 2013).

Čas divergence *P. fulvum* od zbytku rodu *Pisum* je odhadován do doby před 1,7 miliony let +/- 0,4 milionů let na přelom pozdního pliocénu a spodního pleistocénu (Zaytseva et al., 2015). Toto období je charakteristické nástupem vln ochlazování klimatu, kdy se na severní polokouli začaly střídat doby ledové a meziledové, hladina středozemního moře kolísala, střídaly se periody sušší, vlhčí, chladnější a teplejší a v závislosti na tom byla krajina Levanty částečně zalesněná (Goldreich, 2003). Do tohoto období je také datována migrace hominidů ze skupiny *Homo erectus* i velkých druhů afrických zvířat z vysychající Afriky do Eurasie územím Levanty, která dokládá probíhající dynamické změny klimatu a životního prostředí v té době (Hertler et al., 2014).

Genetická diverzita druhu *P. fulvum* byla již v řadě případů analyzována pomocí přístupů molekulární biologie avšak vždy pouze jako součást analýzy v kontextu ostatních zástupců rodu *Pisum*, ale z pohledu vnitrodruhové variability bývá pouze konstatováno, že se jedná o druh variabilní (Palmer et al., 1985; Hoey et al., 1996; Ellis et al., 1998; Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2005, 2007, 2010, 2012; Majeed et al., 2012).

Analýza fylogeneze na základě sledování chloroplastového genotypu je často využívána z důvodu častého uniparentálního typu dědičnosti. U hrachu je to ve většině případů maternální typ dědičnosti, avšak v některých případech byl zjištěn i paternální a biparentální typ dědičnosti (Kosterin & Bogdanova, 2015). Dle jednoho majoritního chloroplastového

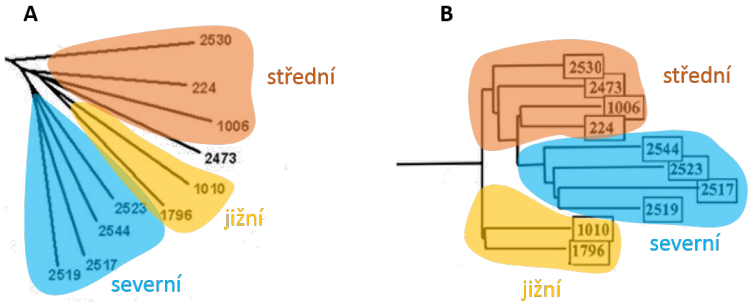
haplotypu zjištěného z výsledků sekvenace chloroplastové oblasti *trnSG* lze tuto oblast označit za málo variabilní napříč zástupci druhu *P. fulvum*. Avšak u 6 položek odpovídal chloroplastový haplotyp *P. sativum* subsp. *elatius* nebo *P. sativum* subsp. *humile*. U těchto položek lze v jejich vývojové historii předpokládat přítomnost mezidruhové křížení a následnou introgresi v druh *P. fulvum*. Přítomnost chloroplastů s genotypem *P. sativum* je podmínkou získání kříženců *P. sativum* x *P. fulvum*, jelikož v opačném případě nastává inkompatibilita jaderného genomu s chloroplastovým (Bogdanova & Kosterin, 2007; Kosterin & Bogdanova, 2015).

Používání analýzy sekvencí ITS je velice rozšířená metoda sledování genotypu nejen pro účely identifikace druhů, ale i pro účely studie fylogeneze, avšak nelze ji využít pro tento účel bez použití dalších přístupů (Álvarez & Wendel, 2003). Pokud srovnáme výsledky analýzy ITS sekvence, nebyl v dřívější studii, která se věnovala sekvenování ITS regionu i 8 zástupců *P. fulvum*, nalezen žádný polymorfismus mezi jednotlivými zástupci *P. fulvum*. Avšak autoři poukazují na nejednoznačnost nukleotidů na některých pozicích (Polans & Saar, 2002). V našich výsledcích sekvenace jsme detekovali 4 ribotypy mezi 149 sekvenovanými položkami *P. fulvum* a jednotlivé ribotypy se od sebe navzájem lišily vždy pouze jen v jedné nukleotidové bázi. A i v našich výsledcích sekvenace lze nalézt u velké části položek pozice s nejednoznačnými nukleotidy, z čehož lze usuzovat, že v případě zanedbání zkreslení v procesech zpracování vzorku, které nelze vyloučit, jednotlivé opakování podjednotek rDNA v genomu nemusí být naprosto homogenní. Tato skutečnost je v případě využívání oblasti ITS obvyklá, ale komplexita této problematiky ztěžuje jednoznačně vyvozovat z této analýzy fylogenetické závěry (Álvarez & Wendel, 2003).

Z našich výsledků rozdělení položek *P. fulvum* do 4 ribotypových skupin *ful1*, *ful2*, *ful3* a *ful4* můžeme určit dle počtu položek v nich zastoupených ribotypy *ful1* a *ful4* jako majoritní, ribotyp *ful3* jako běžný a ribotyp *ful2* jako minoritní. Jednotlivé ribotypy se od sebe odlišují v jednonukleotidové mutaci a nejméně 11 jednonukleotidových mutačních změn je třeba k transformaci sledované sekvence ITS *P. fulvum* na sekvence ITS jiných planých forem hrachu *P. sativum* subsp. *elatius* nebo *P. sativum* subsp. *humile* (Smýkal, osobní sdělení).

Dle výsledků fylogenetických analýz DArT-Seq^{TM} markerů v porovnání s lokacemi sběru položek lze usoudit, že genetická struktura koreluje se strukturou genetickou. Lze rozlišit tři skupiny: jižní, střední a severní, které odpovídají daným oblastem východní Levanty, a zároveň jejich genetická příbuznost je napříč skupinami strukturovaná dle odpovídajícího místa původu položek v dané skupině (obrázek 8). Ačkoli se tato struktura genetické variability *P. fulvum* vyskytuje v jisté míře již i v předešlých studiích (obrázek 15) (Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2007), doposud nebyla autory blíže zkoumána, i když Vershinin et. al (2003) v rozšířeném souboru analyzovaných položek obsahujícího 43 položek *P. fulvum* z genové banky JIC v Norwich (UK) pomocí 78 *PDR1* retrotranspo-

zónových SSAP markerů poukazuje na možnost rozčlenění některých položek *P. fulvum* do 3 skupin, v kterých si jsou jednotlivé položky dle této analýzy více geneticky podobné. I když tyto studie podrobně nepopisují genetickou vnitrodruhovou strukturu *P. fulvum*, jejich výsledky nám potvrzují správnost našich závěrů. Z PCA analýzy vycházející ze zpracování DartSilico i DartSNP (obrázek 7) markerů lze kromě zmíněné genetické struktury související s geografickým původem položek určit, že skupina položek náležící do jižní a severní skupiny jsou svojí genetickou strukturou více homogenní, kdežto skupina položek řazených do skupiny střední je svou genetickou strukturou více geneticky rozmanitá a můžeme tak předpokládat, že skupiny jižní a severní jsou skupiny položek vyskytující se jak svoji geografickou pozicí tak i v pomyslné genetické variabilitě druhu na okraji a hlavní část genetické variability druhu je uchovávána u položek vyskytujících se v oblastech označených jako střední. Nejzřetelněji odlišená od ostatních skupin je skupina jižních položek, kdežto skupina severní bude svým fylogenetickým původem nejspíše vycházet ze skupiny střední, čemuž odpovídá i topologie fylogenetických stromů v recentní fylogenetické studii rodu *Pisum* (Vershinin et al., 2003).



Obrázek 15: Porovnání detekované genetické struktury *P. fulvum* z recentních fylogenetických studií. Čísla položek odpovídají číslům položek z JI hrachové kolekce semen. Barevně odlišeno geografické rozložení na území východní Levanty. **A** NJ strom z retrotranspozónových SSAP markerů (Vershinin et al., 2003). **B** NJ strom z 39 sekvencí genů (Jing et al., 2007).

Porovnáním výsledků analýz markerů DartSilico a DartSNP lze pozorovat i epigenetickou variabilitu uvnitř druhu, protože soubor markerů DartSilico nese kromě informací o variabilitě genetické i o variabilitě epigenetické, kdežto soubor markerů DartSNP nese informace pouze na úrovni genetické (Kilian et al., 2012). Z porovnání PCA analýz (obrázek 7) obou souborů markerů můžeme usuzovat, že některé položky vykazují i vyšší variabilitu v metylačním záznamu genomu, neb se jejich pozice v PCA DartSilico liší od jejich pozice v PCA DartSNP analýze. Ve skupině střední se jedná o položky JI2473 a JI2537, ve skupině jižní o položky JI1010 a JI1011, které se výrazně liší od ostatních právě nejspíše epigenetickým metylačním záznamem. Ve skupině severní nebyly zaznamenány položky, které by vykazovaly rozdílný výsledek v porovnání PCA, proto lze usuzovat, že

jejich epigenetická variabilita je více homogenní.

Za využití metody Integer Neighbor-Joining (French et al., 2014) znázorňující síťovitost genetických podobností jednotlivých položek byl sestaven network (obrázek 8), na kterém jsou vyznačeny kromě rozdělení položek do skupin jižní, střední, severní také jejich příslušné ribotypy, které vzešly z sekvenace oblasti ITS, ale souvislost ITS ribotypů s genetickou strukturou druhu *P. fulvum* znázorněnou pomocí networku nebyla zaznamenána. Analyzovaní zástupci rodu *P. fulvum*, pokud se nejedná o duplicity nebo blízce příbuzné vzorky, jsou vzdáleny od středu networku, více než jednotlivé spoje uvnitř středu, které vyjadřují genetickou podobnost jednotlivých vzorků navzájem. Tato struktura networku značí vysokou míru diverzity mezi jednotlivými vzorky, specifickou pro samosprašné druhy, avšak k vyvozování vzájemných vztahů nám slouží hlavně spoje, které síťovitě spojují jednotlivé větve analyzovaných zástupců.

Ač jsou rody z druhu *Pisum* charakteristicky samosprašnými rostlinami, v jejich evoluční historii hraje významnou roli případná hybridizace a následná introgrese (Jing et al., 2007). Dokonce u některých položek *P. fulvum* (JI2206 a JI3266), ač jen velmi zřídka, bylo dokázáno na základě sekvenování více genů, že některé geny pochází z genotypu odpovídajícímu *P. sativum* subsp. *elatius* (Zaytseva et al., 2015). Protože je DartSNP metodou kodominantní, můžeme detekovat i heterozygotní stavy detekovaných SNP (obrázek 10). Dvě položky JI2527 a JI1796 ze souboru 20 položek *P. fulvum* mají oproti ostatním položkám větší četnost zastoupení heterozygotních SNP, proto se lze domnívat, že také v recentní evoluční historii těchto položek byla přítomna hybridizace, a jelikož relativní četnost heterozygotů je nepoměrně vyšší v případě souboru markerů, které jsou asociovány s *P. fulvum* v porovnání s *P. sativum* subsp. *elatius*, můžeme předpokládat, že součástí této hybridizace byla položka s genotypem *P. sativum* subsp. *elatius*, i když mezi *P. fulvum* a *P. sativum* subsp. *elatius* je reprodukční bariéra rozvinuta ve vysoké míře (Bogdanova & Kosterin, 2007; Kosterin & Bogdanova, 2015). I ostatní položky mají v případě souboru markerů, které jsou asociovány s *P. fulvum* v porovnání s *P. sativum* subsp. *elatius* oproti celkovému souboru DartSNP dat, o něco vyšší četnost zastoupení heterozygotů, a i když heterozygotní SNP se vyskytují v jisté míře u všech analyzovaných položek, jejich původ může být kromě hybridizační události s *P. sativum* subsp. *elatius* také spjat s vnitrodruhovou hybridizací kombinující ancestrální polymorfismus. Nicméně tok genů mezi *P. fulvum* a *P. sativum* subsp. *elatius* je zřejmý.

I když oba soubory dat DartSNP i GenoPea 13.2K SNP reprezentují SNP markery v překrývajících se souborech položek *P. fulvum*, nelze je brát jako totožné analýzy z důvodu rozdílné redukce komplexity před samotnou SNP analýzou, ale i v případě analýzy GenoPea 13.2K SNP je u dvou položek PI595950 a JI3270 zaznamenána vyšší relativní četnost heterozygotních SNP, avšak ne v takové míře jako u položek JI2527 a JI1796 analyzovaných v DartSNP. V souboru SNP, které můžeme považovat za asociované s

P. fulvum v porovnání s *P. elatius* ($P < 5x10^{-8}$) a zároveň se u nich kromě heterozygotních SNP objevuje jen jedna alela mezi položkami *P. fulvum*, je však pouze u položky JI3270 přibližně 13x větší absolutní četnost heterozygotních SNP než průměrná absolutní četnost zbytku položek *P. fulvum* a také v PCA analýze (obrázek 11 A) je její poloha nejvzdálenější od zbytku položek, proto se lze domnívat, že také v recentní historii této položky došlo ke křížení s jedincem z druhu *P. sativum* subsp. *elatius* i když v analýze dvou sekvencí genů *His5* a *His7* synonymní položka známky hybridizace nenesla (Zaytseva et al., 2015), ale to je z důvodu využití pouze dvou sekvencí genů reprezentující pouze malou část genomu. U položky PI595950 je její vyšší míra relativní četnosti heterozygotních SNP zřejmě výsledkem recentní vnitrodruhové hybridizace.

Jelikož je většina SNP v rámci metody GenoPea 13.2K SNP geneticky zmapována, můžeme zobrazit rozložení jednotlivých SNP asociovaných s *P. fulvum* v porovnání s *P. sativum* subsp. *elatius* (obrázek 12), jakožto jeho sesterskou vývojovou linií (Vershinin et al., 2003). Za asociované SNP považujeme ty, jejichž hodnota $P < 5x10^{-8}$. Na grafu rozložení je vidět, že oblasti s asociovanými SNP jsou rozloženy po celém genomu *P. fulvum*, i když v některých oblastech genomu jich je v porovnání více. Tyto oblasti mohou být oblastmi, v kterých jsou přítomny geny, jež jsou specifické pro *P. fulvum*, avšak pro detailní identifikaci oblastí specifických pro *P. fulvum* je hustota GenoPea 13.2K SNP napříč hrachovým genomem stále příliš řídká. Pouze 4 SNP (červené body v grafu rozložení jednotlivých SNP asociovaných s *P. fulvum* v porovnání s *P. sativum* subsp. *elatius*), u kterých je zároveň známa predikovaná funkce genů s nimi spojenými, jsou striktně specifické. Patří sem SNP spojené s geny pro BHLH transkripční faktor, TSL-kinasa interagující protein, aktin a N-acetyltransferasa (Taeyeh et al., 2015).

Fylogenetický vztah *P. fulvum* vzhledem k ostatním planým formám hrachu, kam řadíme *P. sativum* subsp. *elatius* a *P. abyssinicum*, je charakterizován vzhledem k stáří divergence vývojové linie *P. fulvum* a zbytku rodu *Pisum*, jako nejstarší (Zaytseva et al., 2015). V porovnání DartSNP druhově specifických SNP (tabulka 5) lze porovnávat počty SNP, které nejspíše vznikly v období brzké speciace jednotlivých skupin. I když je zastoupení počtu položek *P. abyssinicum* v této studii nízké, lze ho k homogenní povaze genetické struktury druhu *P. abyssinicum* brát jako reprezentativní, vzhledem k prokázané vysoké míře redukce genetické diverzity u tohoto druhu (Jing et al., 2010). Z uvedených počtů vyplývá, že ve vztah *P. abyssinicum* k *P. fulvum* je vymezen daleko vyšším počtem specifických SNP než vztah *P. abyssinicum* k *P. sativum* subsp. *elatius*, a zároveň je minimální počet specifických SNP, které mají společné *P. fulvum* a *P. abyssinicum* v porovnání s *P. sativum* subsp. *elatius*. I když tyto údaje nevyvrací hybridní původ *P. abyssinicum* mezi *P. sativum* subsp. *elatius* a *P. fulvum*, jak udávají recentní fylogenetické studie (Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2010), lze říct, že *P. abyssinicum* je od *P. fulvum* geneticky mnohem vzdálenější než od *P. sativum* subsp. *elatius*.

Za využití modelovací metody maximální entropie byly pořízeny prediktivní modely rozšíření *P. fulvum* v oblasti středomoří. Reálné rozšíření *P. fulvum* spadá pouze do oblasti východní Levanty, ze severu je limitována hranicí Turecka a Sýrie a z jihu zasahuje až do pouštních oblastí jižního Izraele (Ladizinsky & Abbo, 2015). Jeho rozšíření je dobře ilustrováno černými body na obrázku 13, i když nejlépe je výskyt zdokumentován na území Izraele. Modelování rozšíření druhu *P. fulvum* v závislosti na 19 bioklimatologických proměnných nám určuje jasně vymezený geografický prostor, kde by se mohl druh *P. fulvum* vyskytovat. Na území východní Levanty je patrné, že zaujímá značnou část potencionálních lokací, a lze se domnívat, že lokace, které v této oblasti jsou bez zaznamenaného místa výskytu *P. fulvum* nebyly dostatečně prozkoumány: Zejména jsou to oblasti států Jordánska, Sýrie a Libanonu. Největší z predikovaných oblastí, kde se ale nejspíš *P. fulvum* nevyskytuje, ale je dle bioklimatologických proměnných nejpodobnější přirozenému výskytu *P. fulvum*, je oblast severní Kyrenaiky v dnešní Libyi, konkrétně horská oblast Jabal al Akhdar (Zelené hory), dále také západní podhůří severomarockého pohoří Ríf, severozápadní libyjské pobřežní oblasti, ostrov Kypr a některé pobřežní oblasti Turecka. Potencionálním místem výskytu mimo středomoří, ale s menší pravděpodobností, by také mohla být oblast jižního úpatí pohoří Zagros směřující k severnímu pobřeží Perského zálivu ve státě Irán.

Porovnání potencionálního výskytu *ful1*, *ful3* a *ful4* ITS ribotypových skupin (obrázek 14) nám jednak geograficky situuje jednotlivé skupiny. Lze pozorovat, že většina položek skupiny *ful1* pochází ze severní části východní Levanty a naproti tomu položky skupiny *ful4* převážně pochází z jižní části východní Levanty. I když má skupina *ful3* menší zastoupení než skupiny *ful1* a *ful4*, položky patřící do této skupiny se také vyskytují převážně v jižních oblastech východní Levanty, ovšem na rozdíl od skupiny *ful4* většina položek pochází z oblastí, které jsou blíže mořskému pobřeží. Pokud však porovnáme potencionální rozšíření *ful3* a *ful4* v oblasti přirozeného výskytu *P. fulvum* je relativně shodné. Proto se lze domnívat, že ribotypová skupina *ful3* je ve své fylogenetické historii mladší než *ful4*. Když porovnáme potencionální rozšíření skupin *ful1* a *ful4* v oblasti přirozeného výskytu *P. fulvum*, je skupina *ful4* predikována pouze do jižních částí východní Levanty a v severních oblastech, kde se vyskytuje převážná většina položek *ful1* skupina *ful4* predikována není, kdežto obráceně skupina *ful1* je predikována i v oblastech hlavního reálného rozšíření skupiny *ful4*. A když porovnáme potencionální rozšíření *ful1* a *ful4* v středomořské oblasti, tak se jejich potencionální rozšíření příliš neliší, avšak skupina *ful1* má evidentně poněkud větší ekologickou valenci, proto u ní predikované oblasti výskytu jsou více rozsáhlé než u *ful4*. Dle modelování má nejrozsáhlejší predikované oblasti výskytu skupina *ful3*, avšak z důvodu menšího podílu zastoupení položek v analýze má tato skupina o něco nižší přesnost predikce (hodnota AUC) než zbylé dvě skupiny. Dle modelu je u této skupiny *ful3* v současných bioklimatologických podmínkách možné rozšíření podél

pobřeží až do oblasti Jabal al Akhdar, nejpravděpodobnější potencionální oblasti výskytu *P. fulvum* hned po oblastech přirozeného výskytu (obrázek 13). Avšak dle minoritního zastoupení *ful3* lze předpokládat, že tato migrace neproběhla, a ani z pozorování flory v této oblasti přítomnost *P. fulvum* nebyla zaznamenána (El Rabiai & Al tira, 2015).

V rámci této diplomové práce bylo také z důvodu pozorování a srovnání fenotypové variability druhu *P. fulvum* pěstováno ve venkovních podmínkách 25 položek *P. fulvum*, avšak pouze 14 položek se podařilo vypěstovat, sesbírat zralé plody a fotograficky zdokumentovat. Na uvedených fotografiích (příloha 2) byl zaznamenán názorný příklad fenotypové variability pěstovaných položek dokumentující různorodost tohoto rostlinného druhu.

7 Závěr

V této diplomové práci je podrobně zkoumána genetická diverzita druhu *P. fulvum*, blízce příbuzného důležité kulturní plodiny hrachu setému. Za pomocí tří přístupů sledování genetické variability metodami molekulární biologie byl charakterizován soubor položek *P. fulvum*, které jsou uchovávány v semenných kolekcích několika genových bank z celého světa. Získané genotypyzační údaje byly mezi sebou porovnány a dále použity v kontextu geografického původu analyzovaných položek a v bioklimatologickém kontextu.

Na souboru 149 položek *P. fulvum* byla provedena sekvenační analýza oblasti *trnSG* reprezentující chloroplastový genom, jež určila jednu typickou sekvenci této oblasti pro druh *P. fulvum,* avšak 6 položek *P. fulvum* mělo tuto sekvenci odpovídající sekvencím planých zástupců *P. sativum*. Proto můžeme předpokládat, že tyto položky mají mezi svými předky křížence *P. sativum* s *P. fulvum*.

Na stejném souboru položek *P. fulvum* byla také provedena sekvenační analýza jaderné oblasti ITS, která se standardně využívá jako oblast pro „barcoding", neboli identifikaci druhů na základě sekvence DNA. Mezi položkami lze rozlišit 4 ribotypové skupiny, kdy se jednotlivé skupiny liší mezi sebou vždy v jedné nukleotidové bázi. Mezi ribotypy *ful1*, *ful3* a *ful4* a geografický původem jednotlivých položek byla pozorována souvislost. Nejrozšířenější a s největším počtem zástupců je ribotypová skupina *ful1*, která je situována spíše v severní části přirozeného výskytu *P. fulvum*, na druhou stranu ribotypová skupina *ful4* se vyskytuje spíše v oblastech jižních. Ribotypová skupina *ful3* má podobné rozšíření jako *ful4*, avšak blíže východnímu pobřeží Středozemního moře.

Pomocí modelování predikce rozšíření *P. fulvum* byly lokalizovány v oblasti středomoří některé oblasti, kde by bioklimatologické podmínky měly odpovídat podmínkám současného výskytu *P. fulvum*. Nejpříhodnější pro výskyt *P. fulvum* mimo oblast současného výskytu je hornaté území Jabal al Akhdar v severní Libyi a některé další oblasti středomořského regionu, avšak *P. fulvum* je endemitním druhem východní Levanty (Ladizinsky & Abbo; 2015) a nejspíše neměl ve své historii příhodné podmínky pro migraci mimo své současné rozšíření.

Celogenomová genotypizační analýza metodou DArT-Seq^{TM} byla aplikována na soubor 20 položek *P. fulvum*, z nichž 15 svým známým původem reprezentují některé regiony z oblasti přirozeného výskytu *P. fulvum*. Tato metoda poskytuje dva rozdílné soubory markerů. DartSilico, který kromě genomické variability reprezentuje i variabilitu epige-

nomickou, a DartSNP, který reprezentuje pouze genomickou variabilitu jednonukleotidových polymorfismů SNP. Dále byla provedena metodou GenoPea 13.2K SNP analýza 15 vzorků *P. fulvum*, která byla vyvinuta pro sledování genetické diverzity v rodě *Pisum* a která detekuje přibližně 13 000 SNP v genových oblastech napříč všemi hrachovými chromozomy, které byly geneticky zmapovány (Tayeh et al., 2015).

Pro fylogenetickou analýzu byl zvolen přístup fylogenetického networku metodou Integer Neighbor-Joining (French et al., 2014), který reprezentuje síťovitým znázorněním genetickou vzdálenost mezi jednotlivými položkami v soubor markerů DartSilico, který byl zvolen pro fylogenetickou analýzu z důvodu největší četnosti polymorfních markerů s 100% zastoupením u všech analyzovaných položek. Lze pozorovat souvislost geografického původu položek s genetickou strukturou druhu. Analyzované položky byly rozděleny do 3 skupin jižní, střední a severní, ale jednotlivé skupiny neodpovídají ITS ribotypovým skupinám. PCA analýzy souborů markerů DartSilico a DartSNP nám ukazují, že jižní a severní skupina je spíše geneticky homogenní, kdežto skupina střední je více geneticky variabilní. A jelikož se pozice některých položek v jednotlivých PCA významně liší (JI2473, JI2537, JI1010, JI1011), lze změnu pozice připisovat epigenetické variabilitě zaznamenané v souboru markerů DartSilico.

Protože soubory markerů DartSNP a GenoPea 13.2K SNP jsou kodominantního charakteru, můžeme sledovat i heterozygotní stav jednotlivých markerů. V souboru markerů DartSNP byla zaznamenána u položek JI2527 a JI1796 zvýšená četnost heterozygotů, obzvláště pak zvýšený počet heterozygotních SNP mezi SNP asociovanými s *P. fulvum* v porovnání s *P. sativum* susbp. *elatius*. Proto se lze domnívat, že u těchto položek proběhla v jejich recentní historii hybridizace s *P. sativum* subsp. *elatius*. I mezi položkami analyzovanými metodou GenoPea 13.2K SNP byly dvě položky (PI595950, JI3270) se zvýšenou četností heterozygotních SNP, i když ne v takové míře jako u výše zmíněných položek ze souboru markerů DartSNP, avšak pouze u položky JI3270 byl prokázán nárůst četnosti heterozygotů u SNP, které jsou specifické v porovnání s *P. sativum* subsp. *elatius*. U položky PI595950 se jedná nejspíš o recentní vnitrodruhovou hybridizaci.

K vymezení vztahu druhu *P. fulvum* k ostatním zástupcům planých forem rodu *Pisum* byly porovnány počty specifických SNP v souboru dat DartSNP rozšířeného o zástupce druhu *P. abyssinicum* a *P. sativum* subsp. *elatius*. Hlavně byl sledován vztah *P. fulvum* k *P. abyssinicum* vzhledem k jeho potencionálnímu původu v hybridizaci *P. sativum* subps. *elatius* a *P. fulvum* (Vershinin et al., 2003; Jing et al., 2010). V naší analýze ale pouze 5 SNP z celkového počtu 35 647 detekovaných SNP lokusů v DartSNP analýze bylo specifických pro *P. fulvum* společně s *P. abyssinicum* v porovnání s *P. sativum* subsp. *elatius*, proto se lze domnívat, že pokud byla hybridizace *P. sativum* subps. *elatius* a *P. fulvum* v evoluční historii druhu *P. abyssinicum* přítomna, vlivem introgrese zůstala v současném genomu *P. abyssinicum* jen malá část genomu z druhu *P. fulvum*. V případě metody Ge-

noPea 13.2K SNP byl soubor markerů také rozšířen o zástupce druhu *P. abyssinicum* a *P. sativum* subsp. *elatius* a jelikož je většina SNP geneticky zmapována, bylo v analýze tohoto souboru pozorováno rozložení asociovaných SNP v porovnání dvou hlavních vývojových linií rodu *Pisum*, *P. fulvum* a *P. sativum* subsp. *elatius*. Rozložení SNP, které jsou charakterizovány jako asociované, je napříč všemi 7 vazebnými skupinami přibližně rovnoměrné a jen velice nízký počet SNP je na rozdíl od analýzy DartSNP vyloženě specifických.

Data použité v této diplomové práci jsou součástí rozsáhlé a komplexní studie genetické diverzity rodu *Pisum* vedené Dr. Smýkalem. Druh *P. fulvum* byl v této diplomové práci charakterizován z hlediska jeho genetické diverzity v kontextu fylogenetickém, geografickém i bioklimatologickém. S nástupem nových metod analýz genetické diverzity na celogenomové úrovni je tato diplomová práce nejspíš v současnosti nejrozsáhlejší prací věnující se studii genetické diverzity výhradně tohoto druhu. Druhu, který je významný jak svoji užitnou hodnotou, ale i druhu, který je stejně jako i jiné druhy jedinečnou a nedocenitelnou součástí biodiverzity na naší Zemi.

Literatura

[1] ABBO S., ZEZAK I., SCHWARTZ E., LEV-YADUN S. & GOPHER A, 2008: Experimental harvest of wild pea in Israel: implications for the origin of Near Eastern farming. Journal of Archaeological Science, 35(4): s. 922–929. ISSN 1095-8290.

[2] ABBO S., RACHAMIM E., ZEHAVI Y., ZEZAK I., LEV-YADUN S. & GOPHER A., 2011: Experimental growing of wild pea in Israel and its bearing on Near Eastern plant domestication. Annals of Botany, 107(8): s. 1399–1404. ISSN 03057364.

[3] ABBO S., LEV-YADUN S., HEUN M. & GOPHER A., 2013: On the 'lost' crops of the neolithic Near East. Journal of Experimental Botany 64(4): s. 815–822. ISSN 0022-0957.

[4] ÁLVAREZ, I. & WENDEL J.F., 2003: Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution, 29(3): s. 417-434. ISSN 10557903.

[5] ALVES-CARVALHO S., AUBERT G., BROCHOT A.-L., JACQUIN F., KLEIN A., MARTIN C., BOUCHEROT K., KREPLAK J., BURSTIN J., CARRÈRE S., MOREAU S., GAMAS P., GOUZY J., CRUAUD C., DA SILVA C. & WINCKER P., 2015: Full-length de novo assembly of RNA-seq data in pea (Pisum sativum L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. Plant Journal, 84(1): s. 1–19. ISSN 1365313X.

[6] BARILLI E., SATOVIC Z., RUBIALES D. & TORRES A.M., 2010: Mapping of quantitative trait loci controlling partial resistance against rust incited by Uromyces pisi (Pers.) Wint. in a Pisum fulvum L. intraspecific cross. Euphytica, 175(2): s. 151–159. ISSN 00142336.

[7] BEN-ZE'EV N. & ZOHARY D., 1973: Species relationship in the genus Pisum L. Israel Journal of Botany, 22: s. 73–91.

[8] BioGIS, 2012: Israel Biodiversity Information Systém, Databáze online [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: http://www.biogis.huji.ac.il

[9] BLIXT S., 1974: The Pea, s. 181–221. In: KING R.C., ed. *Handbook of Genetics*, vol 2. Boston: Springer US, s. 631 s. ISBN 978-1-4684-2996-1.

[10] BOGDANOVA V.S. & KOSTERIN O.E., 2007: Hybridization barrier between Pisum fulvum Sibth et Smith and P. sativum L. is partly due to nuclear-chloroplast incompatibility. Pisum Genetics, 39: s. 8–9. ISSN 1320-2510.

[11] BOGDANOVA V.S., GALIEVA E.R. & KOSTERIN O.E., 2009: Genetic analysis of nuclear-cytoplasmic incompatibility in pea associated with cytoplasm of an accession of wild subspecies Pisum sativum subsp. elatius (Bieb.) Schmahl. Theoretical and Applied Genetics, 118(4): s. 801–809. ISSN 0040-5752.

[12] BOLAÑOS-HERRERA A., CABRERA-CABALLERO A. & RECIO-CASTRO R., 2009: Análisis FISH en Pisum sativum y P. fulvum con secuencia telomérica de arabidopsis y ribosómica de soya. Agronomía Mesoamericana, 20(1): s. 23–30. ISSN 1021-7444.

[13] BRUNEAU A., DOYLE J.J., HERENDEEN P., HUGHES C., KENICER G., LEWIS G., MACKINDER B., PENNINGTON R.T., SANDERSON M.J., WOJCIECHOWSKI M.F., BOATWRIGHT S., BROWN G., CARDOSO D., CRISP M., EGAN A., FORTUNATO R.H., HAWKINS J., KAJITA T., KLITGAARD B., KOENEN E., LAVIN M., LUCKOW M., MARAZZI B., MCMAHON M.M., MILLER J.T., MURPHY D.J., OHASHI H., DE QUEIROZ L.P., RICO L., SARKINEN T., SCHRIRE B., SIMON M.F., SOUZA E.R., STEELE K., TORKE B.M., WIERINGA J.J. & VAN WYK B.E., 2013: Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. Taxon, 62(2): s. 217–248. ISSN 00400262.

[14] BYRNE O.M.T., 2005: Incorporation of pea weevil resistence from wild pea (Pisum fulvum) into cultivated field pea (Pisum sativum). Disertační práce [rukopis], The University of Western Australia, Perth, 150 s.

[15] BYRNE O.M., HARDIE D.C., KHAN T.N., SPEIJERS J. & YAN G., 2008: Genetic analysis of pod and seed resistance to pea weevil in a Pisum sativum x P. fulvum interspecific cross. Australian Journal of Agricultural Research, 59(9): s. 854–862. ISSN 00049409.

[16] CLEMENT S.L., HARDIEB D.C. & ELBERSONA L.R.., 2002: Variation among accessions of Pisum fulvum for resistance to pea weevil. Crop Science, 42(6): s. 2167–2173. ISSN 0011183X.

[17] CLEMENT S.L., ELBERSON L.R., MCPHEE K.E. & EVANS M.A., 2009: Pea weevil, Bruchus pisorum L. (Coleóptera: Bruchidae), resistance in Pisum sativum X Pisum fulvum interspecific crosses. Plant Breeding, 128(5): s. 478–485. ISSN 01799541.

[18] CONICELLA C. & ERRICO A., 1990: Karyotype Variations in Pisum Sativum Ect. Abyssinicum. Caryologia, 43(1): s. 87–97. ISSN 0008-7114.

[19] DAVIS P.H., 1970: Pisum L., s. 370–373. In: DAVIS P.H., ed. *Flora of Turkey and the east Aegean Islands*, vol. 3. Edinburgh: Edinburgh University Press, 628 s. ISBN 978-085-2241-547.

[20] DYACHENKO E.A., BORIS K.V. & KOCHIEVA E.Z., 2015: Identification and polymorphism of the sucrose synthase gene Sus1 in Pisum fulvum. Molecular Biology, 49(4): s. 627–630. ISSN 16083245.

[21] ELLIS T.H.N., POYSER S.J., KNOX M.R., VERSHININ A.V. & AMBROSE M.J., 1998: Polymorphism of insertion sites of Ty1-copia class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. Molecular and General Genetics, 260(1): s. 9–19. ISSN 0026-8925.

[22] ELLIS T.H.N. & POYSER S.J., 2002: An Integrated and Comparative View of Pea Genetic and Cytogenetic Maps. The New Phytologist, 153(1): s. 17–25. ISSN 0028646X.

[23] EL RABIAI G.T. & AL TIRA M., 2015: Checklist of the Flora of Wadi Haboonat AI Jabal AI Akhdar (Cyrenaica, Libya). International Journal of Pharmacy, 6(8–9): s. 4661–4665. ISSN 0976-7126.

[24] ERRICO A., CONICELLA C. & VENORA G., 1991: Karyotype studies on Pisum fulvum and Pisum sativum, using a chromosome image analysis system. Genome, 34(1): s. 105–108. ISSN 08312796.

[25] FONDEVILLA S., ÁVILA C.M., CUBERO J.I. & RUBIALES D., 2005: Response to Mycosphaerella pinodes in a germplasm collection of Pisum spp. Plant Breeding, 124(3): s. 313–315. ISSN 01799541.

[26] FONDEVILLA S., CARVER T.L.W., MORENO M.T. & RUBIALES D., 2007: Identification and characterization of sources of resistance to Erysiphe pisi Syd. in Pisum. Plant Breeding, 126(2): s. 113–119. ISSN 01799541.

[27] FRENCH N.,YU S., BIGGS P., HOLLAND B., FEARNHEAD P., BINNEY B., FOX A., GROVE-WHITE D., LEIGH J.W, MILLER W., MUELLNER P., CARTER P., 2014: Evolution of Campylobacter species in New Zealand, s. 221–240. In: SHEPPARD S.K. & MÉRIC G. (eds): *Campylobacter Ecology and Evolution*. Norfolk: Caister Academic Press, 396 s. ISBN 978-1908230362.

[28] GOLDREICH Y., 2003: *The Climate of Israel Observation, Research and Application*. Boston: Springer US, 270 s. ISBN 978-146-1352-006.

[29] GOVOROV L.I., 1937: Pisum, s. 231–336. In: VAVILOV N.I. & WULFF E.V., eds. *Flora of cultivated plants IV: Grain leguminosae*. Moscow: State Agricultural Publishing Company.

[30] HANCOCK J.F., 2012: *Plant evolution and the origin of crop species*. 3. ed. Cambridge: CABI, 245 s. ISBN 978-184-5938-017.

[31] HIJMANS R.J., CAMERON S.E., PARRA J.L., JONES P.G. & JARVIS A., 2005: Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. International Journal of Climatology, 25(15): s. 1965–1978. ISSN 08998418.

[32] HERTLER CH., BRUCH A. & MARKER M., 2014: The earliest stages of hominin dispersal in Africa and Eurasia, s. 9–17. In: BELLWOOD P.S., ed. *The global prehistory of human migration*. Chichester: Willey-Blackwell, 448 s. ISBN 978-1-118-97059-1.

[33] HOEY B.K., CROWE K.R., JONES V.M. & POLANS N.O., 1996: A phylogenetic analysis of Pisum based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics, 92(1): s. 92–100. ISSN 00405752.

[34] CHENG T., XU C., LI C., ZHOU S., LEI L. & ZHANG Y., 2016: Barcoding the kingdom Plantae: New PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. Molecular Ecology Resources, 16(1): s. 138–149. ISSN 17550998.

[35] CHIMWAMUROMBE P.M. & KHULBE R.K., 2012: Domestication, s. 19–34. In: PRATAP A & KUMAR J., eds. *Biology and breeding of food legumes*. Cambridge, CABI, 418 s. ISBN 18-459-3766-X.

[36] CHRTKOVÁ A., 1995: Pisum L. – hrách, s. 437–438. In SLAVÍK B. ed. *Květena České republiky*, 4. díl. Praha: Academia, 529 s. ISBN 80-200-0384-3.

[37] ILDIS, 2005: International Legume Database Information Service, rev. 25 November 2015, Databáze online [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: http://www.ildis.org

[38] ITIS Report: Pisum L, 2011: In: Integrated Taxonomic Information System, Databáze online [cit. 2016-01-28]. Dostupné z: http://www.itis.gov

[39] JHA S.S. & OHRI D., 2002: Comparative Study of Seed Protein Profiles in the Genus Pisum. Biologia Plantarum, 45(4): s. 529 – 532. ISSN 00063134.

[40] JING R., LEE J.M., FLAVELL A.J., KNOX M.R., VERSHININ A.V., AMBROSE M. & ELLIS T.H.N., 2005: Insertional polymorphism and antiquity of PDR1 retrotransposon insertions in Pisum species. Genetics, 171(2): s. 741–752. ISSN 00166731.

[41] JING R., JOHNSON R., SERES A., KISS G., AMBROSE M.J., KNOX M.R., ELLIS T.H.N. & FLAVELL A.J., 2007: Gene-Based Sequence Diversity Analysis of Field Pea (Pisum). Genetics, 177(4): s. 2263–2275. ISSN 0016-6731.

[42] JING R., VERSHININ A., GRZEBYTA J., SHAW P., SMYKAL P., MARSHALL D., AMBROSE M.J., ELLIS T.H.N & FLAVELL J., 2010: The genetic diversity and evolution of field pea (Pisum) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. BMC Evolutionary Biology, 10(1): 44. ISSN 1471-2148.

[43] JING R., AMBROSE M., KNOX M., SMYKAL P., HYBL M., RAMOS Á., CAMINERO C., BURSTIN J., DUC G., SOEST L., ŚWIĘCICKI W., PEREIRA M., VISHNYAKOVA M., DAVENPORT G., FLAVELL A. & ELLIS T., 2012: Genetic diversity in European Pisum germplasm collections. Theoretical Applied Genetics, 125(2): s. 367–380. ISSN 00405752.

[44] 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(7): s. 1199–1209. ISSN 00029122.

[45] KILIAN A., WENZL P., HUTTNER E., CARLING J., XIA L., BLOIS H., CAIG V., HELLER-USZYNSKA K., JACCOUD D., HOPPER C., ASCHENBRENNER-KILIAN M., EVERS M., PENG K., CAYLA C., HOK P. & USZYNSKI G., 2012: Diversity arrays technology: A generic genome profiling technology on open platforms. Data Production and Analysis in Population Genomics: Methods and Protocols, 888: s. 67–89. ISSN 10643745.

[46] KOSTERIN O.E. & BOGDANOVA V.S., 2008: Relationship of wild and cultivated forms of Pisum L. as inferred from an analysis of three markers, of the plastid,

mitochondrial and nuclear genomes. Genetic Resources and Crop Evolution, 55(5): s. 735–755. ISSN 0925-9864.

[47] KOSTERIN O.E. & BOGDANOVA V.S., 2015: Reciprocal compatibility within the genus Pisum L. as studied in F1 hybrids: 1. Crosses involving P. sativum L. subsp. sativum. Genetic Resources and Crop Evolution, 62(5): s. 691–709. ISSN 15735109.

[48] KOSTERIN O. E., ZAYTSEVA O.O., BOGDANOVA V.S. & AMBROSE M.J., 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(5): s. 733–739. ISSN 0925-9864.

[49] KUPICHA F.K., 1981: Vicieae (Adans.) DC. (1825), nom. conserv. prop., s. 377–381. In POLHILL R.M. & RAVEN P.H. (eds), *Advances in legume systematice*, vol.1. London: Kew Royal Botanical Gardens, 1050 s. ISBN 0855212241.

[50] LADIZINSKI G. & ABBO S., 2015: *The Search for Wild Relatives of Cool Season Legumes*. Cham: Springer International Publishing, 103 s. ISBN 978-3-319-14505-1.

[51] LAMPRECHT H., 1966: *Die Enstehung der Arten und hohhren Kaategorien*. Wien: Springer-Verlag, 452 s. ISBN 978-3-7091-7942-0.

[52] LAVIN M., HERENDEEN P. & WOJCHIECHOWSKI M., 2005: Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. Systematic Biology, 54(4): s. 575–594. ISSN 10635157.

[53] LEIGH J. W., BRYANT D. & NAKAGAWA S., 2015: Popart: full-feature software for haplotype network construction. Methods in Ecology and Evolution, 6(9): s. 1110–1116. ISSN 2041210x.

[54] LEMON J., 2006: Plotrix: a package in the red light district of R. R News, 6: s. 8–12.

[55] LI T., XU L., LIAO L., DENG H. & HAN X., 2014: Patterns of hybridization in a multispecies hybrid zone in the Ranunculus cantoniensis complex (Ranunculaceae). Botanical Journal of the Linnean Society, 174(2): s. 227–239. ISSN 00244074.

[56] LU J., KNOX M.R., AMBROSE M.J., BROWN J.K.M. & ELLIS T.H.N., 1996: Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP and PCR-based methods. Theoretical and Applied Genetics, 93(7): s. 1103–1111. ISSN 00405752.

[57] MACAS J., NOVÁK P., PELLICER J., ČÍŽKOVÁ J., KOBLÍŽKOVÁ A., NEUMANN P., FUKOVÁ I., DOLEŽEL J., KELLY L.J. & LEITCH I.J., 2015: In Depth Characterization of Repetitive DNA in 23 Plant Genomes Reveals Sources of Genome Size Variation in the Legume Tribe Fabeae. PLoS ONE, 10(11): e0143424. ISSN 19326203.

[58] MACKINDER B., CLARK R., LEWIS G. & RICO L., 2014: Legumes of the world. Kew Royal Botanics Garden, Databáze online [cit. 2016-02-18]. Dostupné na: http://www.kew.org/science-conservation/research-data/resources/legumes-of-the-world/

[59] MAJEED H., SAFDAR W., ALI B., MOHAMMAD A., AHMAD I. & MUMTAZ A.S., 2012: Genetic assessment of the genus Pisum L. based on sequence specific amplification polymorphism data. Journal of Medicinal Plants Research, 6(6): s. 959–967. ISSN 19960875.

[60] MAKASHEVA R.K., 1979: Gorokh (pea). In: KOROVINA O.N., ed. *Kulturnaya Flora SSR*. Leningrad: Kolos, 324 s.

[61] MARX G.A., 1977: Classification, genetics and breeding, s. 21–43. In: SUTCLIFFE J.F. & PATE J.S., eds. *Physiology of Garden Pea*. New York: Academic Press, 511 s. ISBN 978-0126775501.

[62] MATTATIA J., 1977: Amphicarpy and variability in Pisum fulvum. Botaniska Notiser, 130(1): s. 27–34.

[63] MAXTED N. & AMBROSE M., 2001: *Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 378 s. ISBN 07-923-6707-3.

[64] MAYER-CHISSICK U. & LEV E., 2014: Wild Edible Plants in Israel Tradition Versus Cultivation, s. 9–26. In: YANIV Z., DUDAI N., *Medicinal and Aromatic Plants of the World.* Netherlands: Springer, 337 s. ISBN 978-94-017-9276-9.

[65] MAYR E., 2009: Co je evoluce: aktuální pohled na evoluční biologii. Praha: Academia, 360 s. ISBN 978-80-200-1754-3. MIKIC A., SMYKAL P., KENICER G., VISHNYAKOVA M., SARUKHANYAN N., AKOPIAN J., VANYAN A., GABRIELYAN I., SMYKALOVA I., SHERBAKOVA E., ZORIC L., ATLAGIC J., ZEREMSKI-SKORIC T., CUPINA B., KRSTIC D., JAJIC I., ANTANASOVIC S., DORDEVIC V., MIHAILOVIC V., IVANOV A., OCHATT S. & AMBROSE M., 2013: The bicentenary of the research on 'beautiful' vavilovia (Vavilovia formosa),

a legume crop wild relative with taxonomic and agronomic potential. Botanical Journal of the Linnean Society, 172(4): s. 524–531. ISSN 00244074.

[66] PALMER J.D., JORGENSEN R.A. & THOMPSON W.F., 1985: Chloroplast DNA variation and evolution in Pisum: patterns of change and phylogenetic analysis. Genetics, 109(1): s. 195–213. ISSN 00166731.

[67] PEBESMA E.J. & BIVAND R.S., 2005. Classes and methods for spatial data in R. R News, 5(2): s. 9–13.

[68] PEREZ-DE-LUQUE A., JORRIN J., CUBERO J.I. & RUBIALES D., 2005: Orobanche crenata resistance and avoidance in pea (Pisum spp.) operate at different developmental stages of the parasite. Weed research, 45(5): s. 379–387. ISSN 00431737.

[69] PHILLIPS S.J., ANDERSON R.P. & SCHAPIRE R.E., 2006: Maximum entropy modeling of species geographic distributions. Ecological Modelling, 190(3): s. 231–259. ISSN 03043800.

[70] POLANS N.O. & SAAR D.E., 2002: ITS sequence variation in wild species and cultivars of pea. Pisum Genetics, 34: s. 9–14.

[71] POLHILL R.M., 1981: Papilionoideae, s. 191–208. In: POLHILL R.M. & RAVEN P.H. (eds), *Advances in legume systematice*, vol.1. London: Kew Royal Botanical Gardens, 1050 s. ISBN 0855212241.

[72] RAMAN H., RAMAN R., KILIAN A., DETERING F., CARLING J., COOMBES N., DIFFEY S., KADKOL G., EDWARDS D., MCCULLY M., RUPERAO P., PARKIN I.A.P., BATLEY J., LUCKETT D.J. & WRATTEN N., 2014: Genome-Wide Delineation of Natural Variation for Pod Shatter Resistance in Brassica napus. PLoS ONE, 9(7):e101673. ISSN 19326203.

[73] RUBIALES D., MORENO M.T. & SILLERO J.C., 2005: Search for resistance to crenate broomrape (Orobanche crenata Forsk.) in pea germplasm. Genetic Resources and Crop Evolution, 52(7): s. 853–861. ISSN 0925-9864.

[74] RUBIALES D., AMBROSE M.J., DOMONEY C. & BURSTIN J., 2012: Pea, s. 1–49. In: PÉREZ DE LA VEGA M., TORRES A.M., CUBERO J.I. & KOLE CH., eds. *Genetics, genomics and breeding of cool season grain legumes*. Enfield: Science Publishers, 470 s. ISBN 978-157-8087-655.

[75] SÁNCHEZ-SEVILLA J.F., AMAYA I., HORVATH A., GASTON A., DENOYES B., BOTELLA M.A., FOLTA K. & KILIAN A., 2015: Diversity Arrays Technology

(DArT) Marker Platforms for Diversity analysis and Linkage Mapping in a Complex Crop, the Octoploid Cultivated Strawberry (Fragaria × ananassa). PLoS ONE, 10(12): e0144960. ISSN 1932-6203.

[76] SCHAEFER H., HECHENLEITNER P., SANTOS-GUERRA A., MENEZES DE SEQUEIRA M., PENNINGTON R.T., KENICER G. & CARINE M.A., 2012: Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabeae with special focus on the middle-Atlantic island lineages. BMC Evolutionary Biology, 12(1): 250. ISSN 1471-2148.

[77] SIMPSON M.G., 2010: *Plant systematice*, 2.ed. Burlington: Academic Press, 752 s. ISBN 978-0-12-374380-0.

[78] SMARTT J., 1990: *Grain legumes: evolution and genetic resources*. New York: Cambridge University Press, 379 s. ISBN 05-213-0797-X.

[79] SMÝKAL P., 2011: Fylogeneze, biogeographie a genetická diverzita rodu hrách. Živa, 4: s. 151–154.

[80] SMÝKAL P., KENICER G., FLAVELL A.J., CORANDER J., KOSTERIN O., REDDEN R.J., FORD R., COYNE C.J., MAXTED N, AMBROSE M.J. a ELLIS T.H.N., 2011: Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the Pisum genus. Plant Genetic Resources, 9(1): s. 4–18. ISSN 1479-2621.

[81] SMÝKAL P., AUBERT G., BURSTIN J., COYNE C.J., ELLIS N.T.H., FLAVELL A.J., FORD R., HÝBL M., MACAS J., NEUMANN P., MCPHEE K.E., REDDEN R.J., RUBIALES D., WELLER J.L. & WARKENTIN T.D., 2012: Pea (Pisum sativum L.) in the Genomic Era. Agronomy, 2: s. 74–115. ISSN 2073-4395.

[82] SMÝKAL P., COYNE C., REDDEN R. & MAXTED N., 2013: Peas, s. 41–81. In: SINGH M., UPADHYAYA H.D. & BISHT I.S., eds. *Genetic and genomic resources of grain legume improvement*. London: Elsevier Ltd, 322 s. ISBN 978-012-3984-944.

[83] SMÝKAL P., VERNOUD V., BLAIR M.W., SOUKUP A. & THOMPSON R.D., 2014: The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. Frontiers in Plant Science, 5: 351. ISSN 1664462X.

[84] SMÝKAL P., COYNE C.J., AMBROSE M.J., MAXTED N., SCHAEFER H., BLAIR M.W., BERGER J., GREENE S.L., NELSON M.N., BESHARAT N., VYMYSLICKÝ T., TOKER C., SAXENA R.K., ROORKIWAL M., PANDEY M.K., HU J., LI Y.H., WANG L.X., GUO Y., QIU L.J., REDDEN R.J. & VARSHNEY

R.K., 2015: Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. Critical Reviews in Plant Sciences, 34(1–3): s. 43–104. ISSN 15497836.

[85] STEVENSON J. C., 2013: Genetic diversity. In: Salem Press Encyclopedia Of Science: Research Starters, Databáze online [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: http://eds.a.ebscohost.com/eds/

[86] SIBTHORP J.M.D. & SMITH J.E., 1813: *Flora Graeca Sibthorpiana*, vol. 2. London. [cit. 2016-03-21]. Dostupné z: http://www.bodleian.ox.ac.uk/science/resources/sherardian-library/flora_graeca

[87] TAYEH N., JACQUIN F., KLEIN A., HOUTIN H., ROND C., KREPLAK J., BOUCHEROT K., MARTIN C., MARGET P., AUBERT G., BURSTIN J., ALUOME C., CHAUVEAU A., BÉRARD A., BRUNEL D., LE PASLIER M.-C., FALQUE M., BARANGER A., PILET-NAYEL M.L. & WARKENTIN T.D., 2015: Development of two major resources for pea genomics: The GenoPea 13.2K SNP Array and a high-density, high-resolution consensus genetic map. Plant Journal, 84(6): s. 1257–1273. ISSN 1365313X.

[88] THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F. & HIGGINS D.G., 1997: The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25(24): s. 4876–4882. ISSN 13624962.

[89] VANDERWAL J., FALCONI L., JANUCHOWSKI S., SHOO L. & STORLIE C., 2014: SDMTools: Species Distribution Modelling Tools: Tools for processing data associated with species distribution modelling exercises. [cit. 2016-03-18] Dostupné z: http://CRAN.R-project.org/package=SDMTools

[90] VERSHININ A.V., ALLNUTT T.R., KNOX M.R., AMBROSE M.J. & ELLIS T.H.N., 2003: Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in Pisum diversity, evolution, and domestication. Molecular Biology and Evolution, 20(12): s. 2067–2075. ISSN 0737-4038.

[91] WAINES J.G., 1975: The biosystematics and domestication of peas (Pisum L.). Bulletin of the Torrey Botanical Club, 102(6): s. 385–395. ISSN 00409618.

[92] WARBURG D. & EIG A., 1926: Pisum fulvum Sibth. et. Smith n. var amphicarpum. Agricultural Records, 1: s. 1–6.

[93] WARKENTIN T., SMÝKAL, P. , COYNE C., WEEDEN N., DOMONEY C., BING D., LEONFORTE T., XUXIAO Z., DIXIT G., BOROS L., MCPHEE K., MCGEE

R., BURSTIN J. & ELLIS T.H.N., 2015: Pea, s. 37–85. In: DE RON A.M., ed. *Grain Legumes. Handook of Plant Breeding*, vol. 10. New York: Springer, 438 s. ISBN 978-1-4939-2797-5.

[94] WOJCIECHOWSKI M.F., LAVIN M. & SANDERSON M.J., 2004: A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. American Journal of Botany, 91 (11): s. 1846–1862. ISSN 0002-9122.

[95] WOLFF G., 1980: Investigations on the relations within the family papilionaceae on the basis of electrophoretic banding patterns. Theoretical and Applied Genetics, 57(5): s. 225–232. ISSN 00405752.

[96] WROTH J.M., 1998: Possible role for wild genotypes of Pisum spp. to enhance ascochyta blight resistance in pea. Australian Jurnal of Experimental Agriculture, 38(5): s. 469–479. ISSN 08161089.

[97] ZAYTSEVA O.O., BOGDANOVA V.S. & KOSTERIN O.E., 2012: Phylogenetic reconstruction at the species and intraspecies levels in the genus Pisum (L.) (peas) using a histone H1 gene. Gene, 504(2): s. 192–202. ISSN 03781119.

[98] ZAYTSEVA O.O., GUNBIN K.V., MGLINETS A.V. & KOSTERIN O.E., 2014: Divergence and population traits in evolution of the genus Pisum L. as reconstructed using genes of two histone H1 subtypes showing different phylogenetic resolution. Gene, 556(2): s. 235–244. ISSN 18790038.

[99] ZELENÝ V., 2005: *Rostliny Středomoří*. Praha: Academia, 480 s. ISBN 80-200-1224-9.

Seznam obrázků

1 **A** Původní popisná kresba *P. fulvum* z knihy Flora Graeca (Sibthorp & Smith, 1813), ve spodní části obrázku jsou zvětšeny detaily květu a plodu. **B** Idealizovaná kresba *P. fulvum* z knihy Wild Flowers of the Holy Land autorky Hannah Zeller z roku 1883 (převzato z Byrne; 2005). 10

2 Květy *P. fulvum* a jeho blízce příbuzných druhů: **A** květ *P. fulvum* (vlastní zdroj) **B** květ *P. abyssinicum* **C** květ *P. sativum* subsp. *elatius* (převzato ze Smýkal, 2011). 13

3 Schéma fylogeneze *Papilionoideae* v podobě stromu sestaveného na základě recentních fylogenetických analýz (převzato z Bruneau et al., 2013). 15

4 Podzemní plod *P. fulvum* (převzato z Ladizinsky & Abbo, 2015). 21

5 Porovnání karyotypu *P. sativum* a *P. fulvum*, šipkou označeny satelitní oblasti (upraveno z Errico et al., 1991). 22

6 Split-decomposition network pro *P. fulvum* vytvořen na základě analýzy 39 genových oblastí. Ukazuje zřejmý síťovitý fylogenetický vztah jednotlivých zástupců druhu i genotypovou afinita *P. abyssinicum* k *P. fulvum* (upraveno dle Jing et al., 2007). 24

7 **A** PCA analýza na základě 3561 DartSilico polymorfních markerů u 20 položek *P. fulvum*, 0 % chybějících dat, MAF > 5 % **B** PCA analýza na základě 1013 DartSNP polymorfních markerů u 20 položek *P. fulvum*, 0 % chybějících dat, MAF > 5 %. 39

8 Integer Neighbour-Joining network pro 20 položek *P. fulvum* ze souboru markerů DartSilico, 0 % chybějících dat (NA), MAF > 5 %. Hustota jednotlivých čar souvisí s počtem změn mezi body, jež daná čára spojuje. Vyznačené je rozdělení položek dle místa původu i jejich odpovídající ribotypy. 40

9 Mapa s označením původu 15 položek *P. fulvum* analyzovaných DArT-Seq^{TM}, jednotlivé barvy odpovídají rozdělení do skupin: jižní (žlutá), střední (červená) a severní (modrá). 41

10 Graf relativních četností heterozygotních SNP pro jednotlivé položky *P. fulvum* v DartSNP datech. 42

11 **A** PCA analýza na základě 1238 markerů GenoPea 13.2K SNP pro 15 položek *P. fulvum.* **B** Geografický původ některých položek. 44
12 Rozložení 11 699 SNP a jejich míra asociace s druhem *P. fulvum* v porovnání s druhem *P. sativum* subsp. *elatius*, modrá čára značí mez (P=5 x 10^{-8}) nad níž jsou jednotlivé varianty SNP považovány za asociované s porovnávanými druhy. Červené body značí SNP jež jsou striktně specifické pro *P. fulvum* v porovnání s *P. sativum* subsp. *elatius* a naopak. . . . 44
13 Předpověď potencionálního výskytu *P. fulvum* ve středomoří a přilehlých oblastech. Černé body značí místa zaznamenaného výskytu *P. fulvum*. Fialová barva odpovídá místům, které byly předpovězeny jako potencionální místa výskytu *P. fulvum*. Sytost barvy odpovídá pravděpodobnosti s jakou daná lokalita vyhovuje jako potencionální lokalita výskytu *P. fulvum*. Čím sytější barva tím vyšší pravděpodobnost. 45
14 Předpověď potencionálního výskytu pro ITS ribotypové skupiny *P. fulvum* **A** *ful1* (AUC = 0,995), **B** *ful3* (AUC = 0,981) a **C** *ful4* (AUC = 0,996) ve středomoří. Černé body značí místa zaznamenaného výskytu *P. fulvum*. Fialová barva odpovídá místům, která byla předpovězena jako potencionální místa výskytu *P. fulvum*. Sytost barvy odpovídá pravděpodobnosti s jakou daná lokalita vyhovuje jako potencionální lokalita výskytu *P. fulvum*. Čím sytější barva, tím vyšší pravděpodobnost. Hodnota AUC vyjadřuje přesnost modelování, čím blíže k 1 tím přesnější modelování. . . . 46

15 Porovnání detekované genetické struktury *P. fulvum* z recentních fylogenetických studií. Čísla položek odpovídají číslům položek z JI hrachové kolekce semen. Barevně odlišeno geografické rozložení na území východní Levanty. **A** NJ strom z retrotranspozónových SSAP markerů (Vershinin et al., 2003). **B** NJ strom z 39 sekvencí genů (Jing et al., 2007). 49

Seznam zkratek

AGG	Australian Grains Genebank
AUC	Area Under Curve
BIO	bioklimatologická proměnná
bp	base pair = pár bází
cpDNA	chloroplastová DNA
DArT	Diversity Arrays Technology
DAS	DArT-Seq^{TM}
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GeP	GenoPea 13.2K SNP
GPS	Globální Polohovací Systém
ICARDA	International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
IGB	Israel Gene Bank
INPA	Israel Nature and Parks Authority
INRA	L'Institut National de la Recherche Agronomique
IPK	Das Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IR	Inverted Repeat
IRLC	Inverted Repeat-lacking Clade
ITS	Internal Transcribed Spacer

JIC	John Innes Center
LG	Linkage Group
LTR	Long Terminal Repeat
MAF	Minor Allel Frequency
NA	Not Applicable - chybějící data
NGS	Next-Generation Sequencing
NJ	Neighboor Joining
NOR	Nucleolus Organizer Region
Ns.	Novosibirsk, RUS
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDR1	skupina LTR retrotransposonů typu *Ty1-copia*
PGB	Polish Gene Bank
QTL	Qantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RBIP	Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RILs	Recombinant Inbred lines
rDNA	ribosomální DNA
SSAP	Sequence-Specific Amplification Polymorphisms
TAE	Tris-acetate-EDTA
USDA	United States Department of Argiculture
UV	ultrafialové záření
VIR	N.I.Vavilov Institute of Plant Genetic Resources

Přílohy

Příloha 1: Použité GPS lokace původu položek *P. fulvum.*

ID položky	zdroj	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	nadmořská výška
118107	A. Danin grid database	31,46777083	34,60443501	109,5
197304	INPA database	31,49996002	34,75685333	179,7
52863	INPA database	31,97908182	34,83283634	54,4
93232	A. Danin grid database	32,26532933	34,83342547	0
136184	INPA database	31,72568964	34,84018208	134,8
189682	A. Danin point database	31,38030673	34,85203424	484,6
169231	A. Danin grid database	30,9726834	34,86924229	591,9
157675	A. Danin grid database	31,37854533	34,86780932	471,3
228767	INPA database	31,55896614	34,88506821	301,6
208321	A. Danin point database	30,97544441	34,89121524	507,4
218127	INPA database	31,0043167	34,89530929	525
27261	A. Danin grid database	31,01790587	34,92144682	562,6
142867	A. Danin grid database	31,55904826	34,91982533	373,2
224323	A. Danin grid database	31,60414139	34,91968822	298,7
126276	A. Danin grid database	31,6492342	34,91955081	375,4
211758	A. Danin grid database	31,73941887	34,91927505	201,5
32904	A. Danin grid database	32,55102303	34,91673691	8,1
136223	INPA database	31,60866233	34,92494353	337,4
17390	INPA database	31,72139373	34,9246057	233
190787	INPA database	31,81610938	34,93488202	155,4
109628	INPA database	32,55377061	34,935893	81,9
68982	Israeli Gene Bank	31,94238645	34,94509001	128,1
20215	INPA database	31,82157357	34,96127179	182,6
68985	Israeli Gene Bank	31,94242789	34,96624201	179,4
15758	A. Danin grid database	31,649341	34,97226415	375,3
169180	A. Danin grid database	31,69443368	34,9721519	309,8
50141	A. Danin grid database	31,73952604	34,9720394	234,8

ID položky	zdroj	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	nadmořská výška
39280	A. Danin grid database	31,8297098	34,97181364	190,5
86855	A. Danin grid database	31,96498304	34,97147311	118,3
205421	A. Danin grid database	32,46096015	34,97020473	44,8
143139	A. Danin grid database	32,64130577	34,96973572	65,8
11890	INPA database	32,6494212	34,96971452	75,2
226218	A. Danin grid database	32,68639136	34,96961781	77,4
193827	A. Danin grid database	32,73147663	34,96949964	29,5
146728	A. Danin grid database	32,77656158	34,96938121	28,4
195164	INPA database	31,81618425	34,97290373	244,1
182669	INPA database	32,64222314	34,97825943	130,7
66268	Israeli Gene Bank	32,22202265	34,98673215	75,8
91824	INPA database	32,58633706	34,99011604	93,3
72619	Israeli Gene Bank	31,8703377	34,99813118	225,1
72630	Israeli Gene Bank	31,89739246	34,99807084	232
68984	Israeli Gene Bank	31,92444709	34,99801042	235,2
68983	Israeli Gene Bank	31,91544564	35,00860352	240,8
118194	INPA database	32,16525008	35,01125131	225,4
218078	INPA database	32,72704084	35,01218213	263,9
111480	INPA database	32,63867795	35,0155686	157,4
72635	Israeli Gene Bank	31,90644327	35,01919456	288,6
180822	INPA database	32,51063584	35,01796532	85,8
122449	INPA database	32,63958286	35,01769816	157,4
222616	INPA database	32,64048458	35,01769629	157,4
86195	INPA database	32,74238262	35,02068481	320,5
204036	A. Danin grid database	31,37886236	35,02549429	606,9
157158	A. Danin grid database	31,69451886	35,02489096	402,2
200760	A. Danin grid database	31,78470356	35,02471684	406,2
200001	A. Danin grid database	31,82979543	35,02462948	337
199471	INPA database	32,05615177	35,02418798	240,5
63094	A. Danin grid database	32,59630804	35,02311411	82,8
32063	A. Danin grid database	32,77665037	35,02274912	177,6
204961	INPA database	32,55573787	35,02851948	132
71814	INPA database	32,75682358	35,03025929	408,5
25668	INPA database	32,65042333	35,03153182	196,5
119678	INPA database	32,19864959	35,0345131	226,9
116347	INPA database	32,6585417	35,03364811	257,3

ID položky	zdroj	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	nadmořská výška
215114	INPA database	31,83254783	35,06159651	481,6
196021	INPA database	31,84157086	35,06580843	382,3
27558	A. Danin grid database	31,69458223	35,07763022	631,2
4256	A. Danin grid database	31,73967485	35,07756879	567,9
44217	INPA database	31,74418409	35,07756264	430,6
72672	A. Danin grid database	31,78476715	35,07750722	543,6
209635	A. Danin grid database	31,82985913	35,07744551	546,1
147069	A. Danin grid database	32,59637365	35,07637506	188,3
12099	A. Danin grid database	32,73163123	35,0761819	420
209504	A. Danin grid database	31,28877521	35,13068911	518,9
134617	INPA database	31,76677195	35,13031214	513,5
183900	A. Danin grid database	32,68658888	35,12956099	37,5
27911	INPA database	32,73618303	35,1295195	129,9
14919	A. Danin grid database	33,00218131	35,12929525	28,4
141033	A. Danin grid database	33,04726464	35,12925695	25,3
215449	INPA database	32,43411644	35,15635337	262
8990	INPA database	31,90927871	35,16825832	749,7
106612	A. Danin grid database	31,73973628	35,18309873	787,8
81113	A. Danin grid database	31,78482868	35,18308834	755,7
35137	A. Danin grid database	32,01028593	35,18303605	579,7
163454	A. Danin grid database	32,55135052	35,18290814	220,6
928	A. Danin grid database	32,91203437	35,18282095	55,2
161150	INPA database	32,10407457	35,18831147	571,6
31390	INPA database	31,78753556	35,19364615	770,6
107578	A. Danin grid database	33,07967155	35,23400632	332,3
1267	A. Danin grid database	31,78482663	35,23587897	763,8
173038	A. Danin grid database	32,73169291	35,23620622	197,8
120859	A. Danin grid database	32,95711624	35,23628643	395,8
165566	A. Danin grid database	33,04728329	35,23631876	336,7
46812	INPA database	32,76775611	35,25222789	154,4
146508	A. Danin grid database	32,68658248	35,28950492	325,3
206109	A. Danin grid database	32,8218383	35,28963347	234,7
159013	A. Danin grid database	32,86692292	35,28967651	229,3
75316	A. Danin grid database	33,00217484	35,28980622	478,4
49777	A. Danin grid database	33,09234115	35,28989317	579,6
202277	A. Danin grid database	33,00212682	35,34330976	663,9

ID položky	zdroj	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	nadmořská výška
52410	INPA database	33,05351185	35,35195587	675,4
3789	A. Danin grid database	32,46103309	35,39565505	273,5
52798	A. Danin grid database	32,50612011	35,39575038	335
3495	A. Danin grid database	32,5512068	35,39584592	-63,1
29204	A. Danin grid database	32,68646494	35,39613383	263,9
82265	A. Danin grid database	32,86680457	35,39652071	98,6
88271	A. Danin grid database	32,95697243	35,39671545	953,2
123394	A. Danin grid database	33,00205587	35,39681315	1024,5
152685	A. Danin grid database	33,04713899	35,39691106	745,2
82905	INPA database	32,51423411	35,39683181	425,2
185788	INPA database	33,01015737	35,40539207	825
846	INPA database	32,50879652	35,41384722	392,1
135323	INPA database	32,41589524	35,42638957	307,1
219947	INPA database	32,44654704	35,43071845	281,1
4927	A. Danin grid database	32,46094113	35,448836	20,5
226437	A. Danin grid database	32,50602799	35,44895786	-103,2
101666	A. Danin grid database	32,59620073	35,44920238	74,4
30753	A. Danin grid database	32,64128662	35,44932505	92,1
10409	A. Danin grid database	32,95687871	35,45019144	625,9
178785	A. Danin grid database	33,00196199	35,45031632	800,6
35036	A. Danin grid database	33,04704495	35,45044147	631,7
38260	INPA database	32,91629287	35,45542443	294,2
72711	IGB	32,95235974	35,45552628	651
193462	INPA database	32,9388282	35,45869596	692,7
120091	INPA database	32,97306709	35,47056088	526,2
213996	INPA database	32,9613316	35,47694317	417,3
11031	INPA database	33,0758351	35,48050842	575,5
226624	INPA database	32,80893642	35,48181601	39,3
147049	INPA database	32,81885498	35,48184682	58,1
51057	INPA database	32,82426035	35,48399947	-21,3
18047	INPA database	32,8936579	35,49811107	-5,6
155547	A. Danin grid database	32,32556479	35,50157355	-66,7
141219	A. Danin grid database	32,6411714	35,50261217	157,7
10890	A. Danin grid database	32,86659496	35,50336404	-80,9
108150	INPA database	32,89815361	35,50346998	141,8
130289	A. Danin grid database	32,9116787	35,50351543	211,2

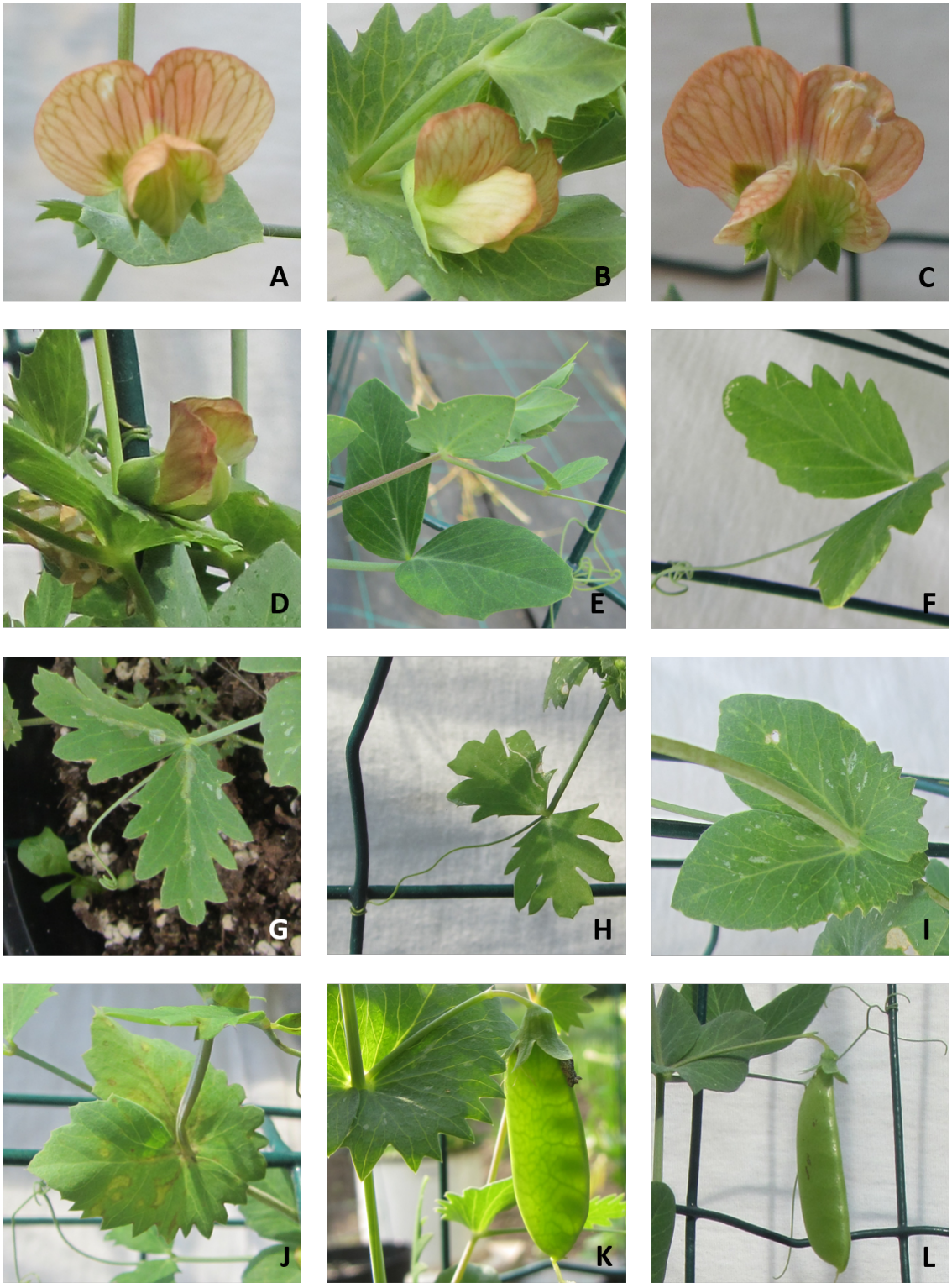
ID položky	zdroj	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	nadmořská výška
57163	A. Danin grid database	32,9567621	35,50366715	751,2
226713	A. Danin grid database	33,04692794	35,50397161	642
114986	A. Danin grid database	33,09200195	35,50760557	667,1
34790	INPA database	32,90083262	35,51416744	170
28204	INPA database	32,9702476	35,51975782	813,3
72720	IGB	33,06940202	35,5308197	508,5
110109	A. Danin grid database	32,76047416	35,53586709	211,2
27369	INPA database	32,59599177	35,53974491	-171,2
87217	A. Danin grid database	32,72070084	35,54567215	-13,3
133091	A. Danin grid database	32,6861187	35,55607543	-221,7
28161	A. Danin grid database	32,91153944	35,55696368	90,9
42062	A. Danin grid database	33,13695201	35,55786188	245,2
48308	A. Danin grid database	33,22711475	35,55822397	347,4
72728	IGB	32,90701592	35,56229035	15,1
199895	INPA database	33,01339933	35,56700012	219,1
80506	A. Danin grid database	33,26142036	35,57114416	360,6
134372	INPA database	33,26762136	35,58092627	400
192362	A. Danin grid database	32,95646022	35,61061749	133
68979	IGB	32,89779934	35,62638166	-207,1
202991	A. Danin grid database	32,71595372	35,62966203	-57,5
209412	INPA database	33,24935462	35,6516702	183,6
222994	INPA database	33,24754367	35,65380706	208,2
114940	INPA database	32,90130528	35,65525712	-159,7
68981	IGB	32,97883568	35,65885995	164,9
53149	INPA database	32,9617005	35,6598418	135,4
76115	A. Danin grid database	32,91119237	35,66385892	-22,6
197131	A. Danin grid database	32,95627494	35,664092	144,6
1915	A. Danin grid database	33,13660196	35,66502953	472,2
68980	IGB	32,76239792	35,66842925	316,9
126181	INPA database	32,9273944	35,67142673	-37,4
138492	INPA database	32,93003841	35,68747845	143,3
25692	INPA database	32,94264904	35,69075502	170,8
110590	INPA database	32,74065614	35,69498958	150,4
57813	INPA database	32,74065196	35,69605648	150,4
195156	INPA database	32,98045454	35,70700905	356,7
136743	A. Danin grid database	33,09131146	35,71835007	753,1

ID položky	zdroj	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	nadmořská výška
35112	INPA database	32,99657348	35,73385009	485,2
221121	INPA database	32,90636387	35,74400168	322,2
164747	INPA database	32,91267538	35,74403996	410,9
175829	INPA database	32,92439673	35,74411108	434,9
27608	INPA database	32,89909472	35,75678335	317,7
102139	INPA database	32,89725338	35,76532223	377,6
95467	INPA database	32,89723896	35,76852851	456,6
33130	A. Danin grid database	33,22631976	35,77277678	1069,8
80018	INPA database	33,01259424	35,78103364	733,2
228664	INPA database	32,96731879	35,82138527	696,2
104804	INPA database	33,09173091	35,82439491	994,1
67743	A. Danin grid database	32,86541869	35,82388402	475,9
21140	INPA database	33,02854841	35,83786697	898,7
89744	A. Danin grid database	32,9524243	35,86870101	726,4
19860	IGB	31,78433418	35,12083435	714
20579	IGB	31,93716621	34,97116852	170,5
21111	IGB	32,72249985	35,28766632	296,8
22847	IGB	32,9905014	35,22116852	372,8
23407	IGB	32,04116821	35,33549881	783,2
24210	IGB	32,92266846	35,38933182	349,9
52390	ATC	34,66666667	36,11666667	60
52392	ATC	34,72111111	36,86805556	490
52394	ATC	34,78083333	36,31777778	370
52395	ATC	34,86027778	35,94027778	45
52396	ATC	34,8125	36,1625	280
52397	ATC	34,92083333	35,93333333	60
52399	ATC	35,25	35,96805556	50
52400	ATC	35,59722222	36,05166667	440
52404	ATC	36,33861111	36,85083333	410
52407	ATC	36,19444444	36,65833333	380
52409	ATC	36,21527778	36,59722222	380
52411	ATC	36,1375	36,56694444	660
52412	ATC	35,69555556	36,54305556	720
52416	ATC	35,68222222	36,53277778	650
52419	ATC	35,9525	36,56277778	410
52420	ATC	35,91388889	36,44166667	400

ID položky	zdroj	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	nadmořská výška
52421	ATC	35,98055556	36,35222222	240
52424	ATC	36,75833333	36,8375	720
52428	ATC	32,53194444	36,59444444	NA
52432	ATC	32,80416667	36,76805556	1105
52437	ATC	33,73722222	36,11694444	1300
52439	ATC	33,615	36,02555556	1110
52441	ATC	35,96666667	36,51805556	310
52448	ATC	36,21666667	36,68333333	NA
52450	ATC	36,3375	36,83888889	NA
52453	ATC	36,24166667	36,80416667	380
52466	ATC	35,09305556	36,22277778	1040
52541	ATC	31,55	35,75	500
52542	ATC	31,46666667	35,8	200
52544	ATC	30,96666667	35,76666667	675
52546	ATC	30,9	35,58333333	900
52559	ATC	31,28333333	35,63333333	820
52561	ATC	32,6	35,93333333	440
52566	ATC	32,33333333	35,75	850
52567	ATC	32,41666667	35,83333333	1050
52568	ATC	32,3	35,83333333	1000
52569	ATC	32,33333333	35,8	1125
52570	ATC	32,36666667	35,76666667	950
52571	ATC	32,35	35,81666667	1100
52574	ATC	32,08333333	35,95	675
108359	ATC	32,99861111	35,98333333	620
135896	ATC	32,7149	35,88676667	110
136809	ATC	32,95	36,88666667	1282
137025	ATC	33,85831667	35,89836667	1125
SYR012	Maxted	32,791	35,913	1141
SYR013	Maxted	32,791	35,917	1141
SYR017	Maxted	34,901	37,226	320
SYR018	Maxted	34,864	36,188	390
SYR019	Maxted	34,866	36,19	410
SYR020	Maxted	34,868	36,191	452
SYR024	Maxted	35,061	36,355	960
SYR113	Maxted	35,042	36,373	970

ID položky	zdroj	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	nadmořská výška
SYR032	Maxted	35,917	35,93	820
SYR033	Maxted	35,917	35,935	810
SYR034	Maxted	35,921	35,937	810
SYR035	Maxted	35,901	35,951	822
SYR036	Maxted	35,904	35,952	823
SYR065	Maxted	35,913	35,935	710
SYR089	Maxted	36,128	37,175	509
PI560065	USDA	31,5033	34,7044	NA
PI560066	USDA	33,0822	35,2166	NA
PI560067	USDA	31,7801	35,2066	NA
W617051	USDA	35,9822	36,9322	NA
PI560064	USDA	31,6899	35,1088	NA
W617052	USDA	35,9822	36,9322	NA
W617039	USDA	35,9822	36,9322	NA
PI531199	USDA	32,9177	35,5088	370
JI224	JIC	31,46	35,1	700
JI1007	JIC	31,42	34,55	NA
JI1009	JIC	32,3	35,09	NA
JI1010	JIC	31,36	34,54	300
JI1011	JIC	32,36	34,88	NA
JI1012	JIC	32,36	34,88	NA
JI1796	JIC	31,46	35,1	NA
JI2513	JIC	34,47	36,07	186
JI2514	JIC	34,46	36,11	280
JI2515	JIC	35,37	36,03	440
JI2516	JIC	36,15	36,36	380
JI2518	JIC	36,08	36,34	660
JI2520	JIC	35,42	36,28	720
JI2521	JIC	35,59	36,27	410
JI2522	JIC	35,54	36,27	400
JI2523	JIC	35,57	36,28	240
JI2525	JIC	36,4	36,56	720
JI2526	JIC	32,32	36,34	NA
JI2527	JIC	32,49	36,36	1000
JI2528	JIC	35,57	36,32	310
JI2529	JIC	33,44	36,05	1100

ID položky	zdroj	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	nadmořská výška
JI2530	JIC	34,4	36,07	60
JI2531	JIC	34,85	35,894	450
JI2534	JIC	32,48	36,48	1105
JI2535	JIC	35,38	36,29	650
JI2537	JIC	33,49	36,09	1300
JI2539	JIC	36,05	37,22	300
JI2540	JIC	36,16	36,49	410
JI2542	JIC	36,08	36,34	660
JI2544	JIC	35,57	36,28	240
L93	Ns.	31,772163	35,207543	750
24388	IGB	32,797979	35,385353	420
24328	IGB	32,959343	35,325	830
23464	IGB	32,901654	35,169181	42
22701	IGB	33,019183	35,554698	220
22700	IGB	32,710296	35,015	350
22592	IGB	32,954991	35,752767	466
21628	IGB	31,81249	34,923831	144
19261	IGB	32,586666	35,046114	120



Příloha 2: Příklad fenotypové variability *P. fulvum*: **A** květ PI560065, **B** květ w615046, **C** květ JI3251, **D** květ JI2203, **E** list JI2540, **F** list PI560065, **G** list JI3251, **H** list JI2524, **I** palist JI3251, **J** palist JI2518, **K** lusk JI2203, **L** lusk JI2540