

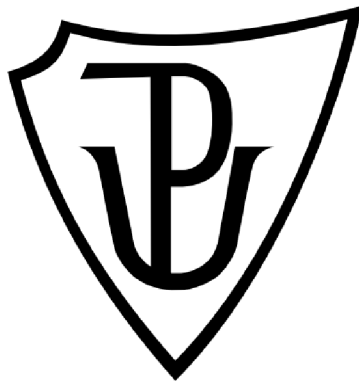
**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2022**

**Lenka Slavíčková**

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



**Genetická a transkriptomická analýza pukavosti lusku  
hrachu**

**Bakalářská práce**

**Lenka Slavíčková**

Studijní program: biologie

Studijní obor: molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

**Olomouc 2022**

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

## Podklad pro zadání BAKALÁŘSKÉ práce studenta

Jméno a příjmení: Lenka SLAVÍČKOVÁ  
Osobní číslo: R19856  
Adresa: Králova 1674, Tišnov, 66601 Tišnov 1, Česká republika  
Téma práce: Genetická a transkriptomická analýza pukavosti lusku hrachu  
Téma práce anglicky: Genetic and transcriptomic analysis of pea pod dehiscence  
Vedoucí práce: doc. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.  
Katedra botaniky

### Zásady pro vypracování:

1. Teoretická část – literární rešerše na téma pukavosti/rozpadavosti, vývoje lusku, klasu.
2. Praktická část – kombinace postupů a znalostí botaniky (anatomie lusku, histochemie) a molekulární genetiky, s využitím rekombinantních inbredních linií (RIL) kříženců planého a kulturního hrachu segregujících znak pukavosti lusku. Analýza genové exprese (qPCR vybraných kandidátních genů, sekvenční analýza genomové DNA rodičovských genotypů).
3. Statistické vyhodnocení, korelace mezi fenotypovým projevem a genetickými daty.

### Seznam doporučené literatury:

- Hancock, J.F. (2012) Plant Evolution and Origin of Crop Species. 3rd edition. CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Smýkal P. (2009) Domestikace rostlin z pohledu současné genetiky. ŽIVA 1
- Di Vittori et al. (2019) Convergent Evolution of the Seed Shattering Trait. *Genes* 10, 68.
- Dong R, Dong D, Luo D et al. (2017) Transcriptome analyses reveal candidate pod shattering-associated genes involved in the pod ventral sutures of common vetch (*Vicia sativa* L.). *Front. Plant Sci.* 8:649.
- Dong Y., Wang Y.Z. (2015) Seed shattering: from models to crops. *Front. Plant Sci.* 6: 476.
- Hradilová I, Trněný O, Válková M. et al., Smýkal P. (2017) A combined comparative transcriptomic, metabolomic, and anatomical analyses of two key domestication traits: Pod dehiscence and seed dormancy in pea (*Pisum sp.*). *Front. Plant Sci.* 8: 542e.
- Ogutzten et al. (2018) Pod Shattering: A Homologous series of variation underlying domestication and an avenue for crop improvement. *Agronomy* 8: 137.
- Smýkal P, Nelson MN, Berger JD and von Wettberg EJB (2018) The Impact of Genetic Changes during Crop Domestication. *Agronomy* 8: 119.

Podpis vedoucího práce:

Datum:

Podpis vedoucího pracoviště:

Datum:

Datum zadání bakalářské práce: 1. března 2021  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

L.S.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

  
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice  
tel.: +420 585 634 901  
-2-

15 -03- 2021

V Olomouci dne 15. března 2021

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci „Genetická a transkriptomická analýza pukavosti lusku hrachu“ vypracovala samostatně a s použitím odborné literatury a pramenů, které jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Olomouci dne 6. 5. 2022

.....

Lenka Slavičková

## **Bibliografické údaje**

**Jméno a příjmení autora:** Lenka Slavičková

**Název práce:** Genetická a transkriptomická analýza pukavosti lusku hrachu

**Typ práce:** bakalářská

**Pracoviště:** Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

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

**Rok obhajoby práce:** 2022

**Klíčová slova:** Hrách setý (*Pisum sativum*), pukavost lusku, genová exprese

**Počet stran:** 44

**Počet příloh:** -

**Jazyk:** čeština

## **Bibliographical identification**

**Author's first name and surname:** Lenka Slavičková

**Title:** Genetic and transcriptomic analysis of pea pod dehiscence

**Type of thesis:** bachelor

**Department:** Department of Cell biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

**Supervisor:** doc. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

**The year of presentation:** 2022

**Keywords:** pea, *Pisum sativum*, pod dehiscence, gene expression

**Number of pages:** 44

**Number of appendices:** -

**Language:** Czech

## Souhrn

Bakalářská práce se zabývá genetickou a transkriptomickou analýzou pukavosti lusku hrachu (*Pisum sativum*). Konkrétně se zaměřuje na gen kódující lipoxygenázu a její roli při pukání lusku.

V teoretické části se tato práce zabývá problematikou domestikace rostlin, tedy přeměnou planých druhů rostlin do podoby kulturních plodin, jak je dnes známe. Poté se věnuje čeledi bobovité včetně hrachu. V další části je popsána anatomie a morfologie lusku hrachu. U morfologie se zaměřuje hlavně na šev lusku, který ovlivňuje míru pukavosti. Nakonec jsou zmíněny molekulární dráhy zapojené v procesu pukání u modelového organismu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), obilnin a bobovitých rostlin.

Praktická část obsahuje anatomii lusku planého (JI1794) a kulturního (Cameor) hrachu a popisuje rozdíly mezi jejich strukturou. V další části je popsána RNA seq transkriptomická analýza švů izolovaných z pukavých a nepukavých genotypů, díky čemuž byly identifikovány diferenciálně exprimované geny. Ze získaných dat byly vybrány kandidátní geny pro pukavost lusku.

Následuje analýza genové exprese vybraných kandidátních genů pro lipoxygenázu a polyfenoloxidázu. Přičemž pro další práci byl vybrán pouze gen pro lipoxygenázu. Dále se zabývá sekvenční analýzou DNA rodičovských genotypů a hledáním polymorfizmu. Ten poslouží k porovnávání genotypů populace rekombinantních linií (RIL) vzniklé křížením rodičovských genotypů kulturního (JI92) s planým (JI64) hrachem a fenotypu pukání. V neposlední řadě se věnuje mapování genu pro lipoxygenázu s využitím syntenie genomu bobovitých rostlin. Výsledkem je genomová lokalizace genu pro lipoxygenázu. Tato práce ukázala vliv lipoxygenázy na proces pukání lusku.

## Summary

This bachelor thesis is about genetic and transcriptomic analysis of the pea pod shattering (*Pisum sativum*). The work is particularly focused on the gene encoding lipoxygenase and its role during pod shattering.

Theoretical part describes the topic of plant domestication, the process of the transformation from wild into cultivated plants as we know today. The next part is devoted to legume family, including pea. The anatomy and morphology section of the pea pod, Description of the pod suture, involved in process of the shattering. Lastly, the molecular pathways of pod shattering in model organism *Arabidopsis thaliana*, cereals and legumes are mentioned.

Experimental part consists of comparative pod anatomy of the wild (JI1794) and cultivated (JI92) pea and description of the differences between their structure. Next part describes RNA seq transcriptomic analysis of pod sutures isolated from the shattering and non-shattering genotypes. This was used for the identification of the differentially expressed genes and for the selection of candidate genes for pod shattering. Among these, genes encoding lipoxygenase and polyphenol oxidase. For the further work was chosen only lipoxygenase gene. Based on the DNA polymorphism of the parental genotypes genetic mapping was conducted one of the recombined imbreeding line population obtained by cross of cultivated genotype (JI92) with the wild genotype (JI64). Last part is devoted to mapping of the lipoxygenase gene using synteny among the genomes of related legume species. Altogether, this thesis shows the relationship between lipoxygenase gene and the pod shattering in pea.



## **Poděkování**

Děkuji Doc. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za odborné vedení práce, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Balarynové, Ph.D. za odborný dohled během práce v laboratoři a za dobré rady.

## Obsah

Seznam symbolů a zkratk	iv
Seznam obrázků	v
Seznam tabulek	vi
1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
3 Literární přehled	3
3.1 Počátky domestikace	3
3.2 Domestikace bobovitých rostlin	3
3.3 Domestikace a pukavost	4
3.4 Hospodářsky významné druhy čeledi bobovitých ( <i>Fabaceae</i> )	5
3.5 Pukavé plody	7
3.5.1 Morfologie a anatomie lusku	7
3.6 Molekulární podstata pukání	10
3.6.1 Huseníček ( <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.)	10
3.6.2 Hospodářsky významné lipnicovité ( <i>Poaceae</i> ) rostliny – obilniny	12
3.6.3 Bobovité ( <i>Fabaceae</i> ) rostliny	13
4 Materiál a metody	15
4.1 Biologický materiál	15
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	15
4.2.1 Použité chemikálie	15
4.2.2 Použité soupravy	16
4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava	16
4.3 Seznam použitých přístroje a zařízení	16
4.3.1 Přístroje a zařízení	16
4.3.2 Programy	17
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	18
4.4.1 Anatomická analýza lusků hrachu na kryomikrotomu	18
4.4.2 Barvení řezu pomocí fluoroglucinolu	18
4.4.3 Izolace RNA	18
4.4.4 Odstranění zbytku genomické DNA	19
4.4.5 Spektrofotometrické stanovení kvality a koncentrace RNA	20
4.4.6 Přepis RNA do cDNA	20
4.4.7 Kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)	21
4.4.8 PCR amplifikace LOX genů v rodičovských genotypch JI64 a JI92	22

4.4.9	Horizontální gelová elektroforéza .....	22
4.4.10	Sekvenování DNA.....	23
4.4.11	Restrikční štěpení pomocí CAPS-PCR .....	23
4.4.12	Stanovení síly potřebné k puknutí lusku .....	24
5	Výsledky .....	25
5.1	Anatomická analýza lusku.....	25
5.2	Transkriptomická analýza švů izolovaných z pukavých ( <i>P. elatius</i> ) a nepukavých ( <i>P. sativum</i> ) genotypů.....	26
5.3	Diferenciálně exprimované geny .....	27
5.4	Analýza exprese vybraných genů pomocí kvantitativní real-time polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR) .....	28
5.5	Identifikace sekvenčního polymorfismu genu LOX.....	29
5.6	Restrikční analýza mapovací RIL populace .....	30
5.7	Mapování LOX genu .....	33
6	Diskuze .....	36
7	Závěr .....	39
8	Seznam literatury .....	40

## Seznam symbolů a zkratek

ADPG	<i>ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE</i>
ALC	<i>ALCATRAZ</i>
AP	<i>APETALA</i>
AP2/ERF	<i>APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR</i>
b-HLH	Basic helix-loop-helix
CAL	<i>CAULIFLOWER</i>
CESA7	Gen kódující celulóza syntázu
DAP	Dny po opylení z anglického „Days after pollination“
DZ	Zóna dehiscence
Dpo	Dehiscent pod
FUL	<i>FRUITFULL</i>
Gp	Green pod
IND	<i>INDEHISCENT</i>
LFY	<i>LEAFY</i>
LG	Linkage group
MADS-box	Odvozeno od genů této rodiny: MCM1, Agamous, Deficiens, SRF1
MYB	Transkripční faktor
NST	<i>NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR</i>
PG	Endo-polygalaktukoronáza
PIN	PIN formed proteins
<i>PvIND</i>	<i>Phaseolus vulgaris INDEHISCENT</i>
QTL	Quantitative trait locus
RIL	Rekombinantní inbrední linie
RPL	<i>REPLUMLESS</i>
SHP	<i>SHATTERPROOF</i>
SND1	Secondary wall associated NAC domain protein 1
SPT	<i>SPATULA</i>
VLX	Vegetativní lipoxygenáza

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Fylogenetické postavení kmene <i>Fabeae</i> v rámci <i>Fabaceae</i> .....	5
<b>Obrázek 2:</b> Struktura lusku u luskovin. ....	8
<b>Obrázek 3:</b> Rozdíly v pukavosti zralých lusků .....	9
<b>Obrázek 4:</b> Dorzální švy lusku planého a kulturního hrachu.....	10
<b>Obrázek 5:</b> Schematické zobrazení genetické cesty pukání u huseníčku .....	12
<b>Obrázek 6:</b> Působení molekulárních drah na buňky švu sóji luštinaté ( <i>Glycine max</i> ). ....	14
<b>Obrázek 7:</b> Průřez švem lusku kulturního hrachu Cameor ve stádiu 14 DAP po obarvení fluoroglucinolem. ....	25
<b>Obrázek 8:</b> Průřez švem lusku planého hrachu JI1794 ve stádiu 17 DAP po obarvení fluoroglucinolem. ....	26
<b>Obrázek 9:</b> Tabulka vybraných diferenciálně exprimovaných genů. ....	27
<b>Obrázek 10:</b> Relativní exprese genu pro lipoxygenázu (Psat0s1212g0160) ve švech lusků odebraných ze dvou kulturních (Cameor, JI92) a dvou planých (JI1794, JI261) genotypů hrachu. ....	28
<b>Obrázek 11:</b> Relativní exprese genu pro polyfenol oxidázu (Psat1g206360) ve švech lusků odebraných ze dvou kulturních (Cameor, JI92) a dvou planých (JI1794, JI261) genotypů hrachu .....	29
<b>Obrázek 12:</b> Porovnání sekvencí LOX genu rodičovských genotypů JI64 a JI92 .....	30
<b>Obrázek 13:</b> Elektroforetická separace fragmentu LOX genu z RIL linií po štěpení enzymem PvuI. ....	30
<b>Obrázek 14:</b> Ukázka výsledku naměřených sil potřebných k puknutí lusků RIL populace a výsledných alel LOX genu. ....	31
<b>Obrázek 15:</b> Měření síly potřebné k puknutí lusku hrachu pomocí sondy tvaru koule o průměru 10 mm (horizontální typ měření) .....	32
<b>Obrázek 16:</b> Měření síly potřebné k puknutí lusku hrachu stlačováním čelistmi (vertikální typ měření). ....	33
<b>Obrázek 17:</b> Mapování pozice genu psat0s1212g0160 v genomu hrachu s využitím syntenie příbuzných druhů.....	35

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1:</b> Použité primery .....	21
<b>Tabulka 2:</b> Teplotní program pro qRT-PCR.....	21
<b>Tabulka 3:</b> Navržené primery pro lipoxygenázu .....	22
<b>Tabulka 4:</b> Teplotní program pro PCR amplifikaci .....	22
<b>Tabulka 5:</b> Přehled genů a jejich popis použitých při mapování genu Psat0s1212g0160.....	34

# 1 Úvod

Zemědělství je v dnešní době závislé na domestikovaných plodinách. Hrách i jiné kulturní plodiny byly původně plané rostliny s mnoha pro člověka ne zcela výhodnými vlastnostmi. Proto došlo před přibližně 12 tisíci lety k procesu domestikace, díky čemuž došlo k postupné přeměně planých rostlin v kulturní plodiny. Tento proces byl pravděpodobně zpočátku neuvědomělý, až později začalo docházet k výběru semen rostlin s nejlepšími vlastnostmi, což dalo vznik kulturním plodinám tak, jak je známe dnes.

Díky domestikace došlo nejen u hrachu, ale i jiných luskovin k eliminaci pukavosti lusku. Tento znak slouží k co největší disperzi semen od mateřské rostliny. U planých rostlin tak dochází nejen úplnému oddělení chlopní lusku, ale i jejich spiralizaci. Tento jev však způsobuje v zemědělství každoroční ztráty úrody. V průběhu času tak došlo k přechodu planého pukavého hrachu na nepukavý kulturní hrách. Lusky planého a kulturního hrachu se liší v anatomické struktuře hřbetních švů, které hrají roli v míře otevření lusku. Lusk planého hrachu obsahuje oproti kulturnímu lusku větší množství lignifikovaných buněk. Tento stav je ovlivňován řadou molekulárních drah podílející se na lignifikaci, tenzi a uspořádání buněk. Určitou roli v tomto procesu může mít i enzym lipoxygenáza.

Lipoxygenáza je enzym řadící se k nehemovým dioxygenázám obsahující železo. Jeho funkce je katalizace procesu oxygenace polynenasycených mastných kyselin obsahující (Z,Z)-1,4-pentadienový systém za vzniku hydroperoxidu nenasycených mastných kyselin. Důležitou roli hraje při vzniku obranných složek, jako jsou například jasmonáty, divinylethery, listové aldehydy, které pomáhají chránit rostliny před hmyzem a patogeny. Tento gen pro lipoxygenázu je vysoce exprimován ve švech lusku planého hrachu, avšak má-li tato skutečnost souvislost s pukáním, není dosud zcela známa.

## 2 Cíl práce

- 1) Teoretická část – literární rešerše na téma pukavosti/rozpadavosti, vývoje lusku, klasu.
- 2) Praktická část – kombinace postupů a znalostí botaniky (anatomie lusku, histochemie) a molekulární genetiky, s využitím rekombinantních inbredních linií (RIL) kříženců planého a kulturního hrachu segregující znak pukavosti lusku. Analýza genové exprese qRT-PCR vybraných kandidátních genů, sekvenční analýza genomové DNA rodičovských genotypů.
- 3) Statistické vyhodnocení, korelace mezi fenotypovým projevem a genetickými daty.



### 3 Literární přehled

#### 3.1 Počátky domestikace

Začátek zemědělství je klíčovou událostí v lidské historii a hraje hlavní roli v domestikaci rostlin (Hradilová *et al.*, 2017). Tento fenomén nastal v období zvaném holocén přibližně před 12 tisíci lety, díky čemuž se pěstováním plodin staly z lovců sběrači. Pěstované plodiny se tak staly hlavním zdrojem potravy a v dnešní době jsou podstatné pro naše přežití (Purugganan, 2019).

V důsledku domestikace neboli zdomácnění vznikaly fenotypové změny rostlin zpočátku neuvědoměle. Velký vliv na tento jev měla i přírodní selekce (Ross-Ibarra *et al.*, 2007). Teprve později docházelo k cílenému sběru semen z rostlin s nejvhodnějšími vlastnostmi, což způsobilo během několika generací postupnou přeměnu z planého druhu rostlin na produktivní kulturní plodinu.

Na transformaci planých rostlin v kulturní lze nahlížet jako na zrychlenou evoluci, reprezentující přizpůsobování pěstování a sklizení lidmi doprovázeno genetickými změnami (Hradilová *et al.*, 2017). Tyto změny se týkaly například: zvýšení počtu semen, změny ve velikosti plodu, zlepšení fertility a klíčivosti, ztráty dormance, neutrální fotoperiodizace kvetení, omezení šíření semen, změny v době kvetení, eliminaci, toxických nebo inhibujících látek, pigmentu semen a mechanických ochranných orgánů jako chlupů či trnů (Ross-Ibarra *et al.*, 2007; Smýkal, 2009b, Smýkal *et al.*, 2018).

Do dnešních dob však dochází u kulturních druhů k neustálému vylepšování vlastností a tvorbě nových odrůd. Tomuto konání se říká šlechtění. Pokrok ve šlechtění umožnila schopnost plánovat kombinování geneticky podmíněných znaků a selektováním tak dosáhnout co nejvíce vyhovujících parametrů. Podmínkou těchto změn je, že musí být stálé a geneticky fixované. Stálost je totiž jednou ze základních charakteristik nových odrůd (Houba *et Dostálová*, 2009a).

#### 3.2 Domestikace bobovitých rostlin

Čeď bobovitých (*Fabaceae*) zahrnuje jeden z největších počtů druhů domestikovaných rostlin (Smýkal *et Mikič*, 2009, Smýkal *et al.*, 2015). Je to třetí největší čeď krytosemenných rostlin, hned po čeledi vstavačovitých (*Orchidaceae*) a hvězdnicovitých (*Asteraceae*) (Smýkal, 2015). Navzdory stěžejní pozici bobovitých rostlin jakožto plodin obsahující proteiny důležité v lidském jídelníčku, je o jejich domestikaci málo známo (Hradilová *et al.*, 2017).

Fylogeneticky různorodé bobovité rostliny společně s obilninami byly jedny z nejstarších domestikovaných plodin v různých geografických oblastech, kde domestikace probíhaly nezávisle na sobě (Ogutcen *et al.*, 2018).

Nalezeny byly luskoviny z doby před 10. a 9. tisíci lety před naším letopočtem, což naznačuje tomu, že domestikace luštěnin předcházela domestikaci obilovin (Smýkal *et Mikič*, 2009). Domestikační centra se liší v podmínkách domestikace související s výsevním systémem plodin, zeměpisnou lokací a na potřebách lidí žijících v daných oblastech. (Ogutcen *et al.*, 2018). Jednou z oblastí je Tell El-Kerkh v Sýrii, kde byly nálezy čočky, vikve, cizrny a hrachoru. Ostatní luskoviny byly domestikovány na jiných místech. Například ke zdomácnění sóji došlo v Číně, vigny zase v Africe. Domestikace fazole nastala ve Střední a Jižní Americe (Smýkal *et Mikič*, 2009). Za původní oblast, kde probíhaly počátky domestikace hrachu se považuje Středomoří, hlavně tedy blízký východ. Dodnes se hrách volně vyskytuje v částech jižní Evropy, západní Asii. Nalézt jej můžeme i v severní Africe (Smýkal, 2011). Kromě rozdílnosti lokalit, kde docházelo k domestikaci, se může tento jev lišit i rychlostí jeho průběhu. Mohlo také dojít v průběhu času k vícenásobným či paralelním domestikačním událostem, které přispěly fenotypové diverzitě dnešních plodin (Ogutcen *et al.*, 2018).

Díky tomuto zdomácnění došlo ke změně celkového vzhledu bobovitých rostlin, což se týká například uceleného vzrůstu, tvorbě silných méně větvených stonků. Rostliny se také staly fotoperiodicky neutrální, zlepšila se jejich velikost i kvalita semen a v neposlední řadě se omezila jejich dormance.

### **3.3 Domestikace a pukavost**

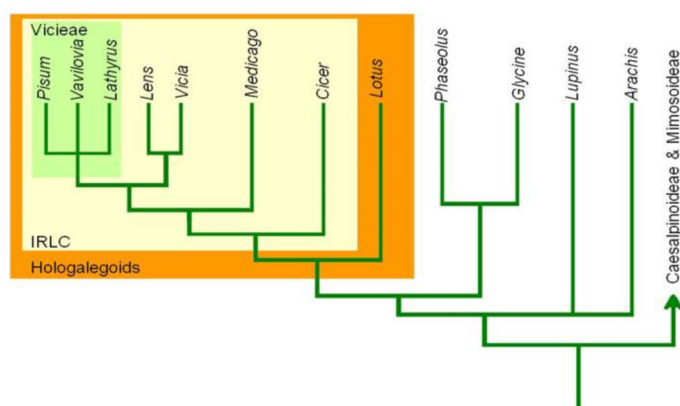
Podstatný vliv měla domestikace i na zabránění samovolného šíření semen (Smýkal, 2009a). Disperze semen je nezbytná pro všechny plané rostliny, kterým zaručí šíření a následně pak i možnost adaptace jejich potomstva na různé podmínky. Semena se tak dostávají dál od mateřské rostliny a jejich patogenů, popřípadě škůdců. Zaručí se i menší konkurence mezi potomstvem. V podmínkách zemědělství však tento fenomén způsobuje ztrátu značné části úrody (Ogutcen *et al.*, 2018; Tu *et al.*, 2019). Ztráty se pak mohou i navýšit obzvláště v období suchého a horkého počasí (což je velmi běžná situace na Blízkém východě). Za takových podmínek lusky planých rostlin vyschnou, chlopně se od sebe rozdělí a semena se rozsypou (Zohary, 1989). Během domestikace se však podařilo eliminovat tento znak, čímž se plodiny staly závislé na člověku, neboť semena musela být dále rozptýlena lidskou silou (Meyer *et Purugganan*, 2013). K vývoji nepukavosti došlo zcela přirozeně v důsledku

sklizně, kdy byli upřednostňováni nepukaví mutanti, kteří byli dále vyseti (Smýkal *et al.*, 2015). Na počátku zemědělství tak byla pravděpodobně lidmi kontrolována přirozená disperze semen pro zajištění větší efektivity sklizně (Meyer *et Purugganan*, 2013). V dnešní době může docházet k navýšení ztrát, pakliže úroda není sklizena tradičními způsoby, ale je použita mechanická moderní technika.

Zabránění pukavosti je tedy zásadní pro větší výnos. Proto je zapotřebí porozumět genetickému principu pukavosti u domestikovaných plodin. Tímto tématem se zabývali botanici více než století. Jednu z nejvýznamnějších studií o plodinách Zákona homologních sérií napsal N. I. Vavilov. Zde se zabýval několika sdílenými znaky mezi obilninami a luštěninami, přičemž jedním z nich byla i pukavost, kdy pozoroval podobnost mezi taxonomicky příbuznými druhy. Čím větší je příbuznost mezi druhy, tím větší je výskyt podobných znaků mezi nimi (Ogutcen *et al.*, 2018).

### 3.4 Hospodářsky významné druhy čeledi bobovitých (*Fabaceae*)

Čeď bobovité (*Fabaceae*) je třetí největší čeledí kvetoucích rostlin a je dělena do tří podčeledí: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* a *Papilionoideae* (Smýkal *et al.*, 2015). Dohromady zahrnují 800 rodů s více než 20000 druhy. Tato čeď je rozšířená po celém světě, přičemž v tropech a subtropích lze najít spíše dřeviny a v mírných pásech převládají byliny (Smýkal *et Mikič*, 2009; Novák, Skalický 2012). Na Obrázku 1 je vidět fylogenetický vztah kmenu *Fabeae* v rámci čeledi *Fabaceae*. Tento kmen je považován za jeden z nejpokročilejších a obsahuje pět rodů: *Lathyrus* L. (okolo 160 druhů), *Lens* Mill. (4 druhy), *Pisum* L. (2–3 druhy), *Vicia* L. (160–200 druhů) a monotypický rod *Vavilovia* Fed. (Smýkal *et al.*, 2011).



**Obrázek 1:** Fylogenetické postavení kmene *Fabeae* v rámci *Fabaceae* (převzato z Ellis, 2011).

Čeď bobovité je charakteristická svou stavbou květu, který se skládá z korunního lístku označený jako pavéza (vexillum), dvou křídel (allae) a člunku (carina) vzniklého srůstem dvou lístků. Květenství je hroznovité. Listy jsou střídavé, palistnaté a většinou složené. Často jsou zakončené úponkem (Chrtek, 2021). Typické pro tuto čeď je plod nazývaný lusk, podle kterého také získala svůj název luskoviny (Smýkal *et al.*, 2015). Rostliny jsou důležité i pro svou symbiózu kořenů s nitrogenními hlízkovými bakteriemi rodu *Rhizobium*.

Tato čeď hraje významnou a nezastupitelnou roli v zemědělství. Pro naše střeoevropské podmínky jsou z hlediska pěstování nejrozšířenější vikev, bob, sója, čočka či hrách, přičemž středem zájmu jsou především jejich semena.

Jednou z hospodářských významných luskovin je bob setý (*Vicia faba*), bohužel nyní jeho pěstování značně ustoupilo vzhledem k dovozu semen sóji. Bob setý je jednoletá rostlina. Lodyha je dlouhá v rozmezí 50–170 cm. Lusky jsou 3–20 cm dlouhé obsahující 3 až 8 semen. Semena jsou hlavně využita pro přípravu krmných směsí pro zvířata (Houba *et* Huňady, 2009). Velice žádanou luskovinou je sója luštinatá (*Glycine max.* Merr.) kvůli svému vysokému obsahu bílkovin (36–40%) a oleje (22–28%). Je to samosprašná rostlina dorůstající výšky 20 až 200 cm (Houba *et* Hýbl, 2009). V neposlední řadě je zde čočka jedlá (*Lens culinaris* Medic.), rovněž jednoletá samosprašná rostlina. Je to po stránce lidské výživy velmi oblíbená luskovina, neboť její semena obsahují významné množství bílkovin, sacharidů, vitamínů, fosforu, hořčíku, vápníku, železa, draslíku a selenu (Houba *et* Dostálová, 2009b).

Do této čeledi patří i hrách setý (*Pisum sativum*). Hrách je jednoletá rostlina dorůstající až do výšky 1,8 m. Tento druh je diploidní ( $2n = 2x = 14$ ) (Burnie *et al.*, 2007; Hancock, 2012). Listy se skládají z 1–3 párů vejčitých až podlouhlých lístků a palisty jsou nápadně velké. Květy jsou bílé nebo narůžovělé, někdy se světlejšími či tmavšími purpurovými žilkami a jsou velké okolo 30 mm (Burnie *et al.*, 2007; Chrtek, 2021). Z květních částí vzniká plod, konkrétně tedy lusk, jehož úkolem je uzavírat jedno a více semen a chránit je během zrání, popřípadě zajistit i jejich následné rozšíření. V období zralosti se plody otevírají a uvolňují semena do okolí. Proto se tyto plody označují jako pukavé (Vinter, 2008). Kromě hrachu setého lze však dodnes najít i planě rostoucí druhy, mezi něž patří například *P. fulvum* nebo poddruhy *P. sativum* subsp. *elatius* a *P. sativum* subsp. *humile* (Smýkal, 2009a). Rod *Pisum* fylogeneticky pochází z východní části střeomořské oblasti, kde má i největší genetickou diverzitu (Smýkal *et al.*, 2017) a kde také před 15–10 tisíci lety proběhla pravděpodobně jeho domestikace. V současnosti je hrách významnou kulturní plodinou (Burnie *et al.*, 2007).

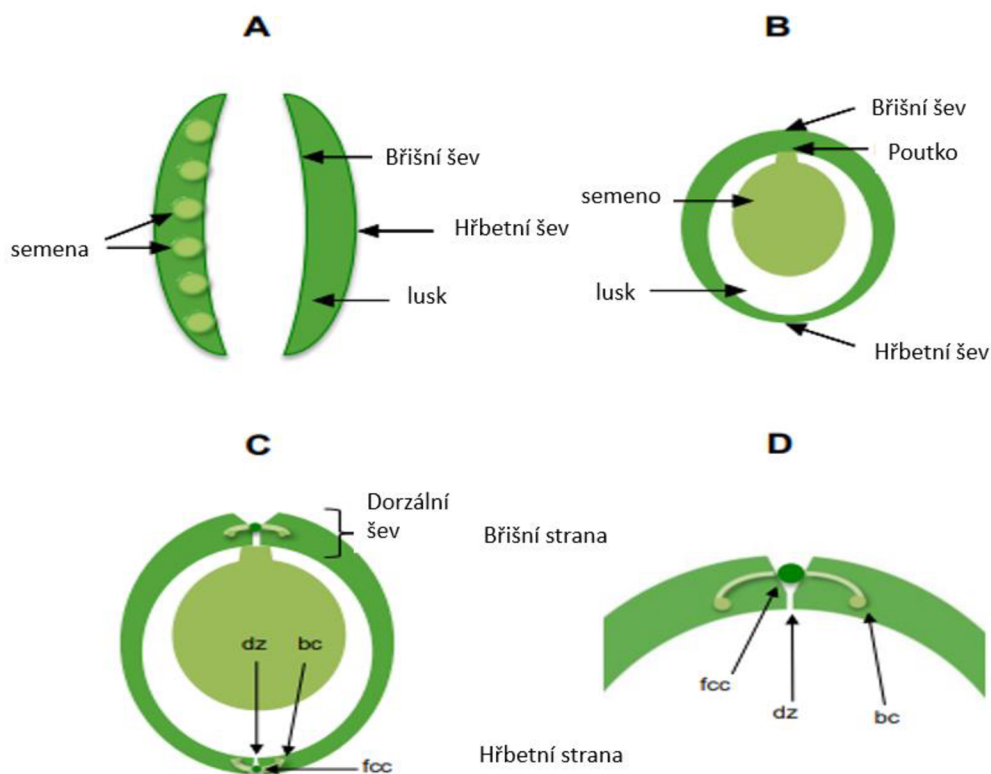
### 3.5 Pukavé plody

Pukavé plody jsou po dozrání suché a zpravidla obsahují více semen. Patří sem například vývojově prvotní plod měchýřek (folliculus), vyskytující se u pryskyřníkovitých (*Ranunculaceae*) rostlin, který puká na místě srůstu plodolistu. U brukvovitých (*Brassicaceae*) rostlin nalezneme plod zvaný šešule (siliqua), který vzniká srůstem dvou plodolistů. V případě tobolky (capsula) vyskytující se u mnoha rodů krytosemenných rostlin, která vzniká z několika plodolistů, dochází k podélnému puknutí buď v místech srůstu plodolistů anebo na hřbetě plodolistů. Tobolka se může také otevírat i zuby, děrami, víčkem nebo nepravidelným rozpadem. Dalším plodem je lusk (legumen) typický pro bobovité (*Fabaceae*) rostliny, který je jednoplodolistový, přičemž dvě poloviny plodolistu se od sebe oddělují a šroubovitě zkrucují (Černohorský, 1964).

#### 3.5.1 Morfologie a anatomie lusku

Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, plod hrachu se nazývá lusk a vzniká z jednoho plodolistu, přičemž poloviny plodolistu se nazývají chlopně a jsou spojeny dvěma švy: břišním a hřbetním (viz Obr. 2 A, B) (Černohorský, 1964). Lusk má tvar dlouhý, protáhlý a zploštělý. K pukání lusku čili k rozdělení dvou chlopní dochází v místech švu (Murgia *et al.*, 2017).

U dozrávajícího plodu lze rozlišit tři vrstvy vnější – exokarp, střední – mezokarp a vnitřní vrstva, která se nazývá endokarp. Někdy může být však jen přítomný exokarp a endokarp. U luštěnin je exokarp složen pouze z epidermis. Mezokarp obsahuje relativně tlustý parenchym a u endokarpu lze najít sklerenchymatické pletivo (Fahn, 1990). V místě mezokarpu švu jsou také umístěné cévní svazky, ze kterých se následně vyvíjí struktura nazývaná 'bundle cap' buňky. Další součástí švu jsou 'fibre cap', které se nachází mezi spoji dvou cévních svazků (Zhang *et al.*, 2018). Zóna dehiscence se nachází jak u břišního, tak hřbetního švu. V břišním švu končí u 'fibre cap' buněk na rozhraní mezi 'bundle cap' buňkami a mezokarpem (viz Obr. 2 C, D) (Ogutcen *et al.*, 2018).

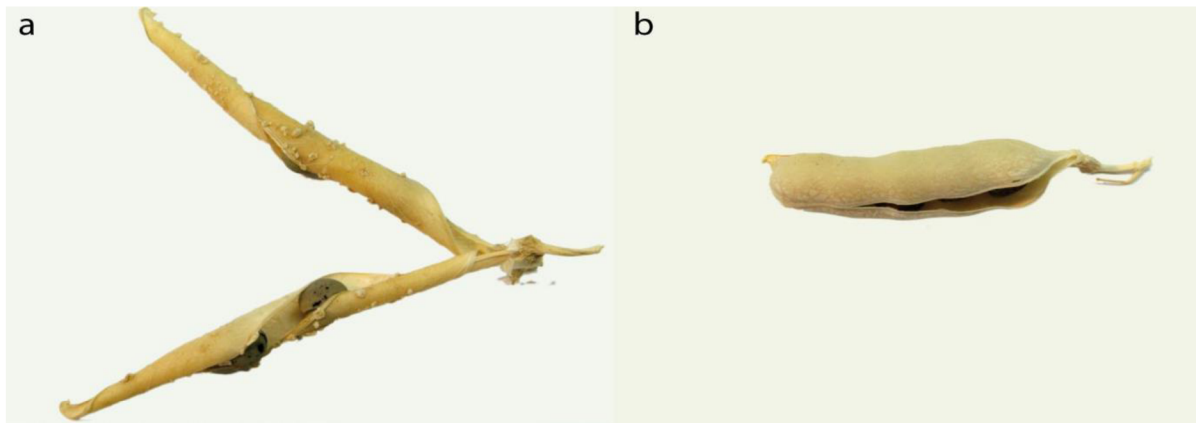


**Obrázek 2:** Struktura lusk u luskovin. (A) Průřez luskem, ve kterém jsou uzavřeny semena. (B) Průřez luskem, kde je semeno přichyceno skrz placentu ke švu. (C, D) Zvětšený pohled na průřez (převzato a upraveno z Ogutcen, 2018).

Legenda: bc: 'bundle cap', dz: zóna dehiscence, fcc: 'fibre cap cell'.

Přestože jsou základní struktury u luštěnin stejné, můžou se lišit tloušťkou různých pletiv perikarpu. Dvě chlopně lusk se po dozrání a vyschnutí obvykle stočí. Je to dáno anizotropním smrštěním ztlustělých buněčných stěn buněk perikarpu. Tento znak je výsledkem rozdílné orientace mikrofibril celulózy nacházející se v buněčné stěně (Fahn, 1990).

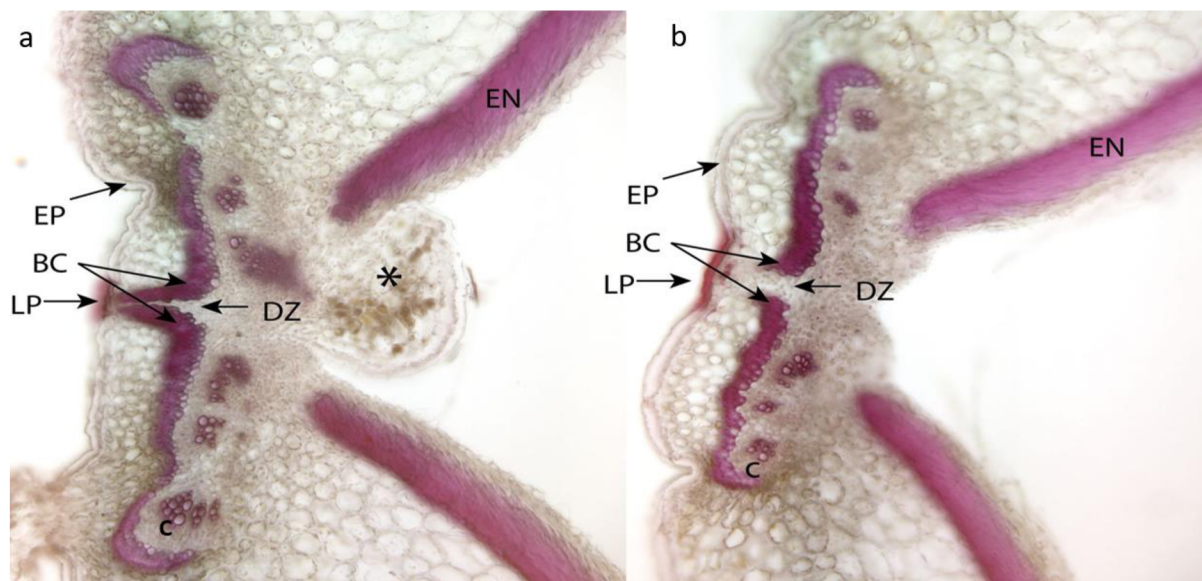
Během pukání lusk dochází k oddělení dvou chlopní od sebe, díky kombinaci zmenšené adheze buněčných stěn v dehiscenční zóně a vznikajícímu pnutí ve vysychajících buňkách endokarpu a exokarpu lusk. Přičemž tento jev je u lusk kulturního hrachu značně omezen (viz Obr. 3) (Hradilová *et al.*, 2017).



**Obrázek 3:** Rozdíly v pukavosti zralých lusků (a) planého (*P. elatius*, JI64) a (b) kulturního hrachu (*P. sativum*, JI92) (převzato z Hradilová *et al.*, 2017).

Histologické analýzy ukázaly, že lusky planých a kulturních rostlin se liší zejména stupněm lignifikace buněk nacházejících se ve švech (Murgia *et al.*, 2017). Regulace jejich vývoje, uspořádání vrstev a jejich histologické vlastnosti (tloušťka buněčné stěny, lignifikace, hydratace) by mohly být klíčovými faktory pro vytvoření požadovaného pnutí v lusu.

Rozdíl mezi lusky planého a kulturního hrachu je mimo jiné ve velikosti dorzálního útvaru nazývaném 'bundles caps', který hraje roli v intenzitě otevření lusu (Hradilová *et al.*, 2017). U planých rostlin dosahuje sklerenchymatické 'bundles caps' až k lignifikované epidermální destičce (viz Obr. 4a), díky čemuž dochází k plnému rozevření lusu umožňující tak šíření semen, zatímco u kulturních rostlin k tomuto nedochází (viz Obr. 4b).



**Obrázek 4:** Dorzální švy lusku planého a kulturního hrachu. (a) Průřez dorzálním švem planého hrachu, barveno fluoroglucinolem. (b) Průřez dorzálním švem kulturního hrachu, barveno fluoroglucinolem (převzato z Hradilová *et al.*, 2017).

Legenda: BC – ‘bundle cap’; DZ – zóna dehiscence; C – cévní svazky, EN – endokarp, včetně sklerenchymu; EP – epidermis; LP – lignifikovaná epidermální destička; \* – poutko.

### 3.6 Molekulární podstata pukání

Mechanismus pukání ovlivňuje spousta genetických faktorů ať už velkého, nebo malého účinku. Přestože byly objeveny a popsány transkripční faktory kontrolující pukavost u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a některých obilnin, je znalost molekulární podstaty pukání u luštěnin dosud spíše omezená (Ogutcen *et al.*, 2018).

#### 3.6.1 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)

Pukavost byla studována především na modelu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) patřící do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), kde plodem je šešule (Ferrándiz *et al.*, 1999).

U huseníčku je pukavost kontrolována složitou sítí obsahující mnoho transkripčních faktorů (Ogutcen *et al.*, 2018). Dva hlavní transkripční faktory jsou MADS-box kódující geny *SHATTERPROOF 1* (*SHP1*) a *SHATTERPROOF 2* (*SHP2*). Ukázalo se, že *SHP1* a *SHP2* působí na vrcholu genetické kaskády při vývoji zóny dehiscence lusku. Paralelně se *SHP1* a *SHP2* působí dva b-HLH transkripční faktory *INDEHISCENT* (*IND*) a *ALCATRAZ* (*ALC*),



kdy mutace v *ALC* vedou k nepukavým plodům (Dong *et Wang*, 2015). Transkripční faktory *SHP1* a *SHP2* ovlivňují *IND* a *ALC* tak, že zvýší jejich expresi (Aguilar-Benitez *et al.*, 2020).

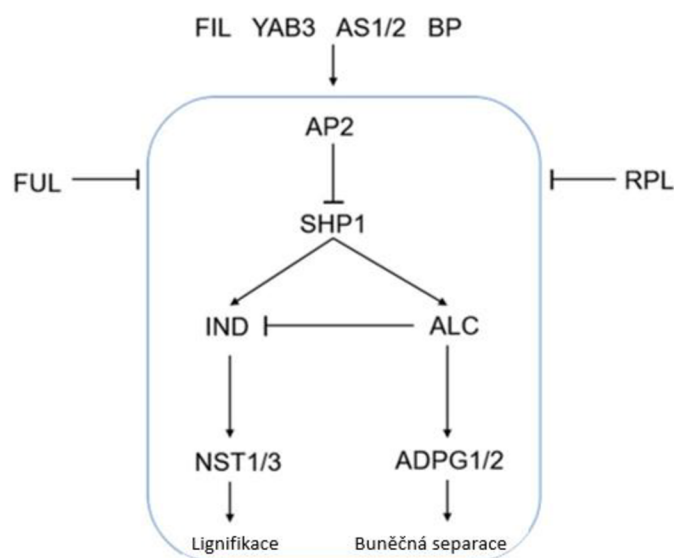
Aktivity těchto transkripčních faktorů jsou omezovány geny *FRUITFULL* (*FUL*) v plodolistu a *REPLUMLESS* (*RPL*) v rámečku (Ogutcen *et al.*, 2018). *FUL* negativně ovlivňuje expresi *SHP1* a *SHP2*. Tudíž když je *FUL* potlačeno, zvýší se tím exprese *SHP1*, *SHP2* a tím i *IND*. I u rostlin s mutací v *rpl* se zvýšila nepukavost díky expresi *SHP1*, *SHP2* a *IND* (viz Obr. 5) (Aguilar-Benitez *et al.*, 2020).

Jak *RPL*, tak *FUL* jsou potřebné pro správný vývoj a funkci zóny dehiscence i tím, že dojde k omezení exprese *SHP1* a *SHP2* v okrajích chlopní plodolistu. *NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR 1* (*NST1*) a *SECONDARY WALL ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN 1* (*SND1*) [známé také jako *NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR 3* (*NST3*)] jsou hlavními přepínači kontrolující sekundární tloušťnutí buněčné stěny. Mutanti *nst1* ztratili schopnost pukat, kvůli zabránění lignifikace v okrajích plodolistu. Z dat se usuzuje, že *SHP1* a *SHP2* reguluje lignifikaci právě ovlivňováním *NST1*.

Pukavost také ovlivňují enzymy, které degradují matrix buněčné stěny, což způsobí redukci adheze mezi buňkami. V zóně dehiscence lusku jsou exprimovány *ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE 1* (*ADPG1*) a *ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE 2* (*ADPG2*). Ty kódují specifické endo-polygalakturonázy (PG). Tyto geny jsou potřebné k rozrušení střední lamely a puknutí šesule. Pro správnou expresi *ADPG1* je zapotřebí *IND*. Expresi *IND* je také zodpovědná za množství auxinu v okraji plodolistu regulováním vtoku auxinu do buněk separační vrstvy. To se děje interakcí *IND* s genem *SPATULA* (*SPT*), který podporuje lokalizaci PIN FORMED PROTEINS (*PIN*) v plazmatické membráně buněk okraje plodolistu. *PIN FORMED PROTEINS 3* (*PIN3*) zajišťuje spotřebu auxinu v okraji plodolistu, čímž tak připraví prostředí potřebné pro specifický buněčný vývoj (Dong *et Wang*, 2015).

U huseníčku se také vyskytuje homeotický gen *APETALA 2* (*AP2*), který řídí tři podstatné aspekty při ontogenezi květu. Jedná se o založení květního meristému, specifikaci květního orgánu a v neposlední řadě časovou a prostorovou regulaci exprese dalších homeotických genů. Během rané fáze vývoje květního meristému se podílí mimo jiné i další tři geny *APETALA 7* (*AP7*), *LEAFY* (*LFY*), *CAULIFLOWER* (*CAL*) (Jofuku *et al.*, 1994). *AP2* kóduje transkripční faktory patřící do rodiny *APETALA 2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR* (*AP2/ERF*). Tento gen mimo jiné působí v místě zóny dehiscence, kde je jeho exprese ovlivňována genem *FUL*

(Aguilar-Benitez *et al.*, 2020). *AP2* také negativně ovlivňuje nadměrný růst rámečku (replum) a chlopně tak, že v tomto místě reguluje genovou expresi (Ripoll *et al.*, 2011).



**Obrázek 5:** Schematické zobrazení genetické cesty pukání u huseníčku (převzato z Aguilar-Benitez, 2020)

### 3.6.2 Hospodářsky významné lipnicovité (*Poaceae*) rostliny – obilniny

Co se obilnin týče, hovoříme o rozpadavosti klasu, přičemž dochází k oddělení plodu, semene – zrna od květní stopky mateřské rostliny. K oddělení semene od zbytku rostliny nastává v oblasti specializovaných buněk, která se nazývá abscisní zóna. Studie zabývající se molekulárními mechanizmy rozpadavosti květenství a uvolňování zralých obilek se zaměřovaly především na rýži, pšenici a čirok (Ogutcen *et al.*, 2018).

Jako jeden z hlavních lokusů podílející se na rozpadavosti laty u rýže (*Oryza sativa* L.) byl zjištěn *SHATTEPROOF (SH4)*. Gen kódující *SH4* je transkripční faktor s vazbou na *MYB3* a hraje důležitou roli při vytváření abscisní vrstvy u raného stádia vývoje květu (Li *et al.*, 2006). Jediná změna aminokyseliny v DNA vázající doméně je úzce spojená s redukcí volného vypadávání semen u domestikované rýže (Dong *et Wang*, 2015).

U pšenice (*Triticum aestivum* L.) lze najít lokus Q kódující transkripční faktor podobný genu *AP2* u huseníčku. Geny typu *AP2* se účastní různých vývojových procesů zejména při kvetení (Faris *et al.*, 2003). Gen Q je pravděpodobně nejdůležitějším domestikačním genem u kultivované pšenice, neboť udává charakter rozpadavosti klasu. Ovlivňuje i řadu dalších vlastností souvisejících s domestikací jako je například tvar klasu, doba kvetení, výška rostliny

(Zhang *et al.*, 2011). Rozpadavost laty čiroku (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) je řízen jediným genem *SHI*, který kóduje transkripční faktor YABBY (Dong *et Wang*, 2015). U rýže a kukuřice byly nalezeny ortology k tomuto genu (Ogutcen *et al.*, 2018).

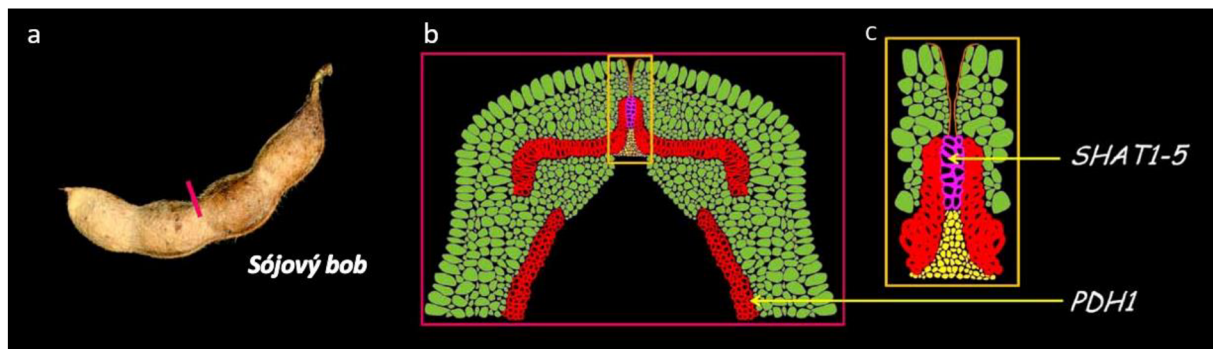
### 3.6.3 Bobovité (*Fabaceae*) rostliny

Genetické analýzy zabývající se pukavostí lusku, byly provedeny u různých druhů luskovin jako je například vigna, sója, fazol, hrách, čočka (Ogutcen *et al.*, 2018).

U vigny (*Vigna unguiculata* L.) byly identifikovány dva geny podílející se na biosyntetické dráze syntézy celulózu a hemicelulózy spojené s pukáním lusku. Syntéza celulózy je spojována s genem *CELLULOSE SYNTHASE A (CESA7)* nacházející se na vazebné skupině I. Syntéza hemicelulózy zase souvisí s genem *MYB83* nacházející se na vazebné skupině VII. Z histologických a chemických analýz byla zjištěna korelace mezi pukáním lusku a obsahem ligninu ve chlopních lusku. Podle genetických analýz byl zjištěn i hlavní lokus pro pukání, nacházející se na vazebné skupině V (Aguilar-Benitez *et al.*, 2020).

Co se týče lignifikace u sóji (*Glycine max*), byly identifikovány dva hlavní geny. Prvním z nich je *WRKY12*, který kóduje transkripční faktor. Tento transkripční faktor byl nalezen u čiroku, tolice (*Medicago truncatula*) a huseníčku, kde se účastní syntézy ligninu. Druhý gen *PDHI* kóduje protein, který hraje roli při kompozici ligninu v buněčné stěně (viz Obr. 6). Gen *PDHI* není homologní k ostatním genům popsaných u huseníčku (Aguilar-Benitez *et al.*, 2020). Tento gen je vysoce exprimován ve vnitřní sklerenchymatické vrstvě lusku, která je bohatá na lignin. Působí ve fázi zahájení ukládání ligninu. *PDHI* tedy podporuje pukavost lusku tak, že zvýší pnutí vysychajících buněčných stěn buněk lusku (Funatsuki *et al.*, 2014). U sóji je také s pukavostí spojován gen *Glycine max SHATTERPROOF 1–5 (GmSHAT1-5)*, který ve velkém množství exprimován v buňkách břišního švu. Zvýšení exprese tohoto genu může vést k tloušťnutí buněčných stěn a přispět tak k nepukavosti (Kang *et al.*, 2020).

Pomocí celogenomového mapování byl nedávno zjištěn gen *NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR 1A (NST1A)* (Glyma07G050600), který se pravděpodobně rovněž účastní pukání. *NST1A* kóduje transkripční faktor patřící do NAC rodiny a je paralogem genu *SHAT1-5* u sóji. Jiným kandidátním genem asociovaný s pukavostí je Glyma09g06290. Tento je podobný genům kódující transkripční faktory *IND* a *ALC* u huseníčku a kóduje helix-loop-helix protein. Tento gen je vysoce exprimován ve vyvíjejících se luscích (Parker *et al.*, 2021).



**Obrázek 6:** Působení molekulárních drah na buňky švu sóji luštinaté (*Glycine max*) (a) lusk sóji luštinaté, (b) průřez břišním švem lusku sóji, (c) detailní zobrazení části švu (převzato z Dong *et* Wang, 2015).

U fazolu (*Phaseolus vulgaris* L.) byl nalezen gen *INDEHISCENT* (*PvIND*), který je orthologem genu *IND* u huseníčku. U fazolu bylo také zjištěno, že velký vliv na pukavost a s tím i spojenou ztrátu vláken nacházejících se v buněčné stěně má lokus *Stringless* (*St*). Tento lokus se nachází ve vazebné skupině *Pv02* (Parker *et al.*, 2022). Díky mapování se zjistilo, že v této oblasti se nachází i *PvIND*, proto se předpokládalo, že by mohl hrát určitou roli při pukání. Nicméně nebyl nalezen žádný polymorfismus *PvIND*, který by měl spojitost s fenotypem pukavostí lusku (Ogutcen *et al.*, 2018).

U hrachu (*Pisum sativum*) je známo několik lokusů regulující jeho pukavost lusků. Hlavní je lokus *DpoI*, který je lokalizovaný na chromosomu 5 (vazebné skupině, LG III) hrachu (Weeden, 2002). *DpoI* je spojen s omezením schopnosti spiralizace chlopní lusku. Kromě *DpoI* je zde i výskyt *DpoII*, který je lokalizován na chromosomu 7 (LG VII). *DpoII* je zodpovědný za post-domestikační redukci pukání. V neposlední řadě je zde lokus *Gp* (*Green pod*), který byl využit i v práci Gregora Mendla. *Gp* má velký efekt na pukání a je epistatický vůči lokusu *DpoI*. *Gp* také specificky ovlivňuje vývoj plastidů v mezokarpu lusku, ovšem vliv tohoto na pukání lusku není zcela jasný (Parker *et al.*, 2021).

Během domestikace čočky (*Lens culinaris*) byl selektovaný lokus *Pi* jakožto prvotní regulátor pukavosti. Recesivní mutace potvrdila resistenci k pukání. Tento lokus je lokalizován v LG IV genomu čočky a je považován za syntenickou oblast k *DpoI* lokusu hrachu. To naznačuje, že homologní geny by mohly být odpovědný za znak pukání (Parker *et al.*, 2021).

## **4 Materiál a metody**

### **4.1 Biologický materiál**

Pro anatomickou analýzu byly použity švy lusků ze dvou kulturních (Cameor, JI92) a dvou planých (JI1794, JI261) genotypů hrachu. Květy jak kulturních, tak planých genotypů byly označeny v den otevření a poté sklizeny v odpovídajících časových intervalech: DAP (days after pollination) 13 a DAP 17.

Pro analýzu genové exprese ve švech lusků byly použity dva kulturní genotypy hrachu (*Pisum sativum*, JI92, Cameor) a dva genotypy planého hrachu (*Pisum elatius*, JI1794, JI261). Použité byly i rekombinantní inbrední linie vzniklé recipročním křížením kulturního genotypu JI92 a planého genotypu JI64. Francouzská odrůda Cameor byla získána z INTRA, Dijon, Francie. Genotypy JI92, JI1794 a JI261 byly poskytnuty z genové banky John Innes Centrum, Norwich, Velká Británie. Lusky byly sklizeny z rostlin pěstovaných v 5 L květináčích se substrátovým mixem rašelina-písek (90:10) (Florcom Profi, BB Com Ltd., Letohrad, Česká republika) a každý týden podstoupily fertilizaci (Kristalon Plod a Květ, Agro Ltd., Říkov, Česká republika). Rostliny byly pěstovány ve skleníku (leden–květen 2020, 2021) o denní teplotě 35 až 20 °C a noční teplotě 18 až 12 °C. Pěstování bylo doplněno světlem (Sylvania Grolux 600 W, Hortilux Schreder, Nizozemsko).

### **4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky**

#### **4.2.1 Použité chemikálie**

Agaróza (Bioline Kat. č. BIO-41025);

Cryo-gel 12/case (Leica, kat. č. 39475237);

DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, kat. č. EN0521);

Ethanol (VWR Chemicals, kat. č. 67-17-5);

Fenol (Sigma, kat. č. 108-95-2);

Glycerol (Tamda, kat. č. 13102004);

Chloroform (Lachner, kat. č. 67-66-3);

Isoamylalkohol (Roth, kat. č. 123-51-3);

Kyselina octová (Tamda, kat. č. 01022010);

MboI (10 U· $\mu$ l<sup>-1</sup>, Thermo Scientific, kat. č. ER0811);

PvuI (10 U· $\mu$ l<sup>-1</sup>, Thermo Scientific, kat. č. ER0621);

RiboSafe RNAase Inhibitor (Bioline, kat. č. BIO-65027);

Taq DNA polymeráza (5 U· $\mu$ l<sup>-1</sup>, MyTaq, Bioline, kat. č. BIO-21105);

Barvivo (Bluelight DNA, EZ-Vision, kat. č. 1B1680-0.5ML);

GeneRuler 100 bp DNA Ladder (0,5  $\mu$ g· $\mu$ l<sup>-1</sup>, Thermo Scientific, kat. č. SM0241);

Kyselina chlorovodíková (Penta, kat. č. 017-002-01-X);

Taq pufr (5 $\times$ , MyTaq Red, Bioline, kat. č. 37112)

#### **4.2.2 Použité soupravy**

PureLink® Plant RNA Reagent (Thermo Scientific, kat. č. 12322-012);

SensiMix™ SYBR® Low-ROX Kit (Bioline, kat. č. QT625-05);

SentiFAST™ cDNA synthesis kit (Meridian, kat. č. BIO-65054)

#### **4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava**

10 $\times$  TBE pufr (Na 1 litr 5,40 g TRIS báze; 2,75 g kyseliny borité; 2 ml 0,5 mol·l<sup>-1</sup> EDTA o pH 8,0; Sigma Aldrich, ČR);

Fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1);

HCl:Fluoroglucinol: Smíchat 18% kyselinu chlorovodíkovou s 1% fluoroglucinolem;

Roztok 75% glycerolu s destilovanou vodou a 10% kyselinou sírovou

### **4.3 Seznam použitých přístroje a zařízení**

#### **4.3.1 Přístroje a zařízení**

Centrifuga (Centrifuge 5415 R, Eppendorf);

Elektroforéza (EasyCast B1, Thermo Scientific);

Flowbox (PV – 100, TelSTAR);  
Inkubátor (Melag, P-LAB a.s.);  
Lednice (No frost, Liebherr);  
Nanodrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific);  
Real-time systém (CFX Connect, Bio-Rad);  
Stolní centrifuga (Mini Star, VWR);  
Světelný mikroskop BX60 (Olympus);  
TIRATEST 27 025 (TIRA GmbH, Schalkau, Germany);  
Termocykler (Mastercycler Pro S, Eppendorf);  
Termocykler (PTC 200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research);  
Třepačka (MS 3 basic, IKA);  
Ultramikrotom CM 1950 (Leica);  
UV transiluminátor (FireReader Platinum HD7, Uvitec Cambridge);  
Váha 572 (Kern);  
Výrobník ledu (Ice flaker, Brema IceMacers);  
Zdroj stejnosměrného napětí (Minis-300, MS Major Science)

#### **4.3.2 Programy**

Microsoft Excel 2016 (Microsoft);  
Program CFX Maestro (verze 4.1.2433.1219., Bio-rad);  
Program Geneious (verze 7.1.9, Biomatters);  
Program FastPCR (verze 6.8.04, PrimerDigital);  
Program FireReader V4;  
Program Primer3 (verze 0.4.0.);  
Software QuickPHOTO CAMERA (verze 3.0, Promicra)

## **4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

### **4.4.1 Anatomická analýza lusků hrachu na kryomikrotomu**

Pro anatomickou analýzu švu lusků bylo potřeba připravit si řezy. Byly použity švy dvou genotypů: kulturního hrachu odrůdy Cameor a planého hrachu JI1794.

1. Vypreparovat pomocí skalpelu přibližně 1 mm část dorzálního švu a vložit ho do předem připraveného kryogelu na hliníkovém disku.
2. Po ztuhnutí gelu vložit preparát do kryomikrotomu a příčně krájet 20 $\mu$ m řezy.
3. Řezy pokládat na podložní sklíčko.

### **4.4.2 Barvení řezu pomocí fluoroglucinolu**

K vizualizaci buněk obsahujících lignin bylo připraveno barvivo fluoroglucinol, kterým byly připravené řezy barveny.

1. Připravit HCl:Fluoroglucinol: 18% kyselinu chlorovodíkovou přidat k 1% fluoroglucinolu a promíchat.
2. Namíchat 75% glycerol s destilovanou vodou a 10% kyselinou sírovou.
3. Řezy na podložním sklíčku zakápnout fluoroglucinolem a nechat minutu působit, poté opatrně smýt destilovanou vodou.
4. Na řezy nakapat roztok glycerolu a kyseliny sírové a nechat minutu působit, poté opatrně promýt destilovanou vodou.
5. Takto nabarvené řezy překrýt krycím sklíčkem.

### **4.4.3 Izolace RNA**

Pro izolaci byly použity švy lusku dvou kulturních genotypů (JI92, Cameoru) a dvou planých genotypů (JI1794, JI261). Švy lusků všech čtyř genotypů byly stádia 13 a 17 DAP (days after pollination).

1. Dát do mikrozkuhavky 0,5 ml PureLink® Plant RNA Reagent a cca 0,1 g zmrazeného homogenizovaného rostlinného materiálu.
2. Krátce zvortexovat a nechat inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Mikrozkuhavky horizontálně položit, aby byl povrch směsi co největší.



3. Centrifugovat 2 minuty při 12000 rpm, následně přenést supernatant do čisté mikrokumavky.
4. Přidat 0,1 ml 5M NaCl a promíchat.
5. K promíchané směsi přidat 0,3 ml chloroformu, také pořádně promíchat.
6. Centrifugovat při 12000 rpm po dobu 10 minut při 4 °C, poté přepipetovat vodní fázi do čisté mikrokumavky.
7. Přidat isopropyl alkohol o stejném množství jako je vodní fáze a nechat stát 10 minut při pokojové teplotě.
8. Centrifugovat při 12000 rpm po dobu 10 minut při 4°C.
9. Opatrně slít supernatant a ke vzniklému peletu poté přidat 1 ml 75% ethanolu.
10. Centrifugovat 1 minutu při 12000 rpm při pokojové teplotě.
11. Supernatant opatrně vylít a zbylou tekutinu odstranit pipetou.
12. Přidat k peletu 40 µl RNA-free vodu a resuspenzovat RNA.
13. Uchovávat při -70 °C.

#### **4.4.4 Odstranění zbytku genomické DNA**

Před přepisem RNA do cDNA bylo zapotřebí odstranit všechny zbytky DNA, které by mohly vytvořit během následné PCR amplifikaci nespecifické produkty.

1. Nechat rozmrazit vzorky, po celou dobu pracovat na ledu.
2. Ke 40 µl vzorku přidat 4 µl 10× Baseline-Zero DNase Reaction pufru, 4 µl Baseline-Zero DNase, 1 µl ribonukleázového inhibitoru a nechat inkubovat při 37 °C po dobu 20 minut.
3. Doplnit každý vzorek vodou do 200 µl.
4. Přidat 200 µl fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) a zvortexovat.
5. Nechat rozdělit na dvě fáze a poté znovu promíchat zvortexováním a okamžitě centrifugovat při 13000 rpm po dobu 10 minut při 4 °C.
6. Přepipetovat supernatant do nové mikrokumavky a přidat 300 µl chloroform:isoamylalkohol (24:1), promíchat vortexováním a centrifugovat 5 minut při 13000 rpm.
7. Přepipetovat supernatant do čisté mikrokumavky a přidat 20 µl 1M kyseliny octové a 550 µl 96% ethanolu, nechat inkubovat přes noc při -80 °C.
8. Centrifugovat 30 minut při 13000 rpm při 4 °C.

9. Vylít supernatant a přidat 500  $\mu\text{l}$  70% ethanol, centrifugovat při 13000 rpm po dobu 5 minut při 4 °C.
10. Slít opatrně supernatant a přidat 96% ethanol, centrifugovat při 13000 rpm po dobu 5 minut při 4 °C.
11. Opatrně vylít supernatant a centrifugovat 1 minutu, odstranit veškerou tekutinu a poté přidat 30  $\mu\text{l}$  vody.

#### **4.4.5 Spektrofotometrické stanovení kvality a koncentrace RNA**

Před samotným přepisem RNA do cDNA bylo potřeba proměřit koncentraci a čistotu vyizolované RNA pomocí NanoDropu.

1. Stanovit koncentraci a čistotu vyizolované RNA pomocí spektrofotometru NanoDrop.
2. Nejprve nanést 2  $\mu\text{l}$  vody (blank), utřít buničinou a poté nanést 2  $\mu\text{l}$  vzorku.
3. Mezi každým vzorkem otřít snímač.
4. Absorbanci přeměřit na NanoDropu při 260 nm a 280 nm.

#### **4.4.6 Přepis RNA do cDNA**

Přepis RNA do cDNA byl proveden za pomoci dvoukrokové reverzní transkripce.

1. Naředit vzorky tak, aby každý z nich měl koncentraci 1  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , poté přidat 4  $\mu\text{l}$  5 $\times$  TransAmp pufru, 1  $\mu\text{l}$  reverzní transkriptázy, doplnit RNA-free vodou do 20  $\mu\text{l}$  a pipetováním promíchat.
2. Vložit mikrozkušavky do přednastaveného cyklu:
  - 25 °C: 10 minut
  - 42 °C: 15 minut
  - 48 °C: 15 minut
  - 85 °C: 5 minut
  - 4 °C: chlazení

#### 4.4.7 Kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)

V dalším kroku byla provedena qRT-PCR, kterou se zjišťuje množství ampliconu v reálném čase. K tomu je zapotřebí i referenční gen, přičemž pro tento účel byl použit gen pro protein fosfatázu 2. qRT-PCR reakcí se stanovovala exprese genů pro lipoxygenázu a polyfenoloxidázu.

1. Navržené primery suspendovat v daném objemu vody na koncentraci  $100 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  a následně naředit  $10\times$ .
2. Připravit do 1,5ml mikrozkušavky reakční směs (pro jeden vzorek napipetovat: 10  $\mu\text{l}$  SYBR, 3,6  $\mu\text{l}$  destilované vody, 1,2  $\mu\text{l}$  forward primeru a 1,2  $\mu\text{l}$  reverse primeru)
3. Reakční směs rozpipetovat do 96jamkové PCR desky a přidat 4  $\mu\text{l}$  vzorku cDNA.
4. Desku vložit do termocykleru a nastavit program (viz Tabulka 2).

**Tabulka 1:** Použité primery.

Primer	Forward/Reverse primer	Sekvence (5' – 3')
Protein fosfatáza 2	F	CCACATTACCTGTATCGGATGACA
	R	GAGCCCAGAACAGGAGCTAACA
Lipoxygenáza	F	TGGAGATGTCTGCACCAAAG
	R	AAGGTAAGGGGACGCAGAAT
Polyfenol oxidáza	F	GGTGATTGGACCAGGGAATACTGAGTT
	R	TGACAAGTCCTTTCCACATCTTGGTA

**Tabulka 2:** Teplotní program pro qRT-PCR.

Průběh	Teplota [°C]	Počet cyklů	Čas [s]
Počáteční denaturace	95	1	600
Denaturace	95		15
Nasednutí primeru	60	39	15
Elongace	72		20

#### 4.4.8 PCR amplifikace LOX genů v rodičovských genotypech JI64 a JI92

Před osekvenováním vybraného genu je nejdříve potřeba provést jeho amplifikaci v rodičovských genotypech JI64 a JI92 pomocí PCR reakce. Pro tuto reakci byly použity navržené primery v programu FastPCR.

1. Připravit reakční směs (pro jeden vzorek napipetovat: 3  $\mu$ l 5 $\times$  pufr, 9,23  $\mu$ l destilované vody, 0,7  $\mu$ l mixu forward a reverse primerů, 0,07  $\mu$ l Taq polymerázy).
2. K reakční směsi přidat 2  $\mu$ l vzorku a opatrně promíchat pipetováním.
3. Poté směs vložit do termocykleru s nastaveným programem (viz Tabulka 4).

**Tabulka 3:** Navržené primery pro lipoxygenázu.

Primer	Forward/Reverse primer	Sekvence (5' – 3')
Lipoxygenáza	F	GACCAAAAGCTACGTTGGCTC
	R	GGTCCTGTAAAGAGCGTTCCTT

**Tabulka 4:** Teplotní program pro PCR amplifikaci.

Průběh	Teplota [°C]	Počet cyklů	Čas [min]
Počáteční denaturace	95	1	5
Denaturace	95		0,5
Nasednutí primeru	55	35	0,5
Elongace	72		2
Finální elongace	72	1	8
Udržování	15	-	-

#### 4.4.9 Horizontální gelová elektroforéza

Pro ověření správného průběhu PCR amplifikace byla provedena horizontální gelová elektroforéza.

1. Pro přípravu 1,5% agarózového gelu navážit 0,9 g agaru a přidat jej do 60 ml TBE pufru.
2. Směs za občasného zamíchání zahřívát do úplného rozpuštění agaru a poté nechat zchladnout.

3. Do zchlazené směsi přidat nanášecí pufr a promíchat.
4. Nalít směs do předem připravené elektroforetické vany, vložit hřebínky a nechat ztuhnout.
5. Po ztuhnutí gelu vyjmout hřebínek, vaničku vložit do elektroforetické komůrky, kterou následně naplnit TBE pufrem, tak aby gel byl převrstven cca 5 mm pufrem.
6. Napipetovat do jamek 5  $\mu$ l vzorku PCR produktu. Do první jamky přijde 2  $\mu$ l standardu molekulové váhy.
7. Zapojit zdroj stejnoměrného elektrického proudu. Zdroj nastavit na 100 V.
8. Po rozdělení vzorků vypnout zdroj a gel vložit do UV transluminátoru.

#### **4.4.10 Sekvenování DNA**

Vzorky po PCR amplifikaci byly zbaveny zbytkových primerů pomocí 10 jednotek Exonukleázy I a 10 jednotek Termosensitivní alkalické fosfatázy v cykleru po dobu 15 min při 37 °C, následované 15 min inaktivací enzymů při 85 °C. Následně bylo ke vzorku přidáno 5 pmol daného primerů a byly poslány do Laboratoře sekvenace DNA, PŘF UK Praha. Díky sekvenaci byl nalezen polymorfismus mezi genotypy rodičů kulturního JI92 a planého JI64.

#### **4.4.11 Restrikční štěpení pomocí CAPS-PCR**

Díky sekvenování byl vybrán nejvhodnější enzym pro restrikční štěpení.

1. Připravit reakční směs složenou z: 8,4  $\mu$ l destilované vody, 1,5  $\mu$ l R pufru a 0,1  $\mu$ l *PvuI* enzymu.
2. Reakční směs rozpipetovat do 96jamkových desek a do každé jamky napipetovat 5  $\mu$ l vzorku.
3. Nechat inkubovat 2–3 hodiny při 37 °C.

#### **4.4.12 Stanovení síly potřebné k puknutí lusku**

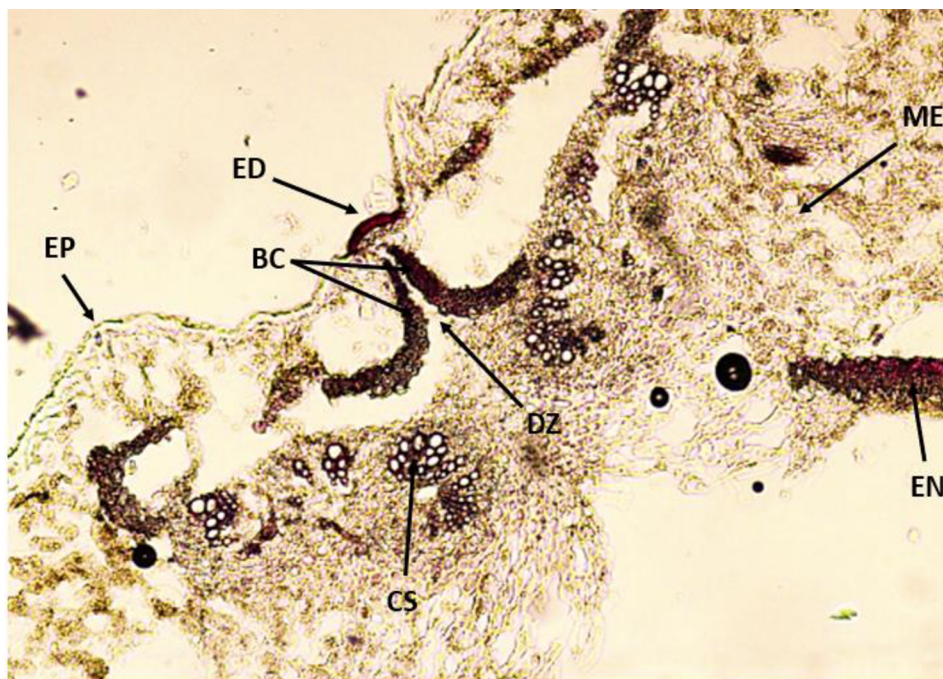
Pro určení síly potřebné k puknutí lusků hrachu byl použit přístroj TIRATEST 27 025 (TIRA GmbH, Schalkau, Germany) na Ústavu potravinářství, AF Mendelu v Brně, na pracovišti doc. Nedomové. Měřeny byly lusky, které byly vysušeny na konstantní vlhkost v sušárně.

1. Provést měření stlačováním po upnutí lusku do čelistí (rychlost příčnicku:  $10 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ ; kritérium pro ukončení zkoušky: porušení švu).
2. Provést penetrační zkoušku pomocí sondy tvaru koule o průměru 10 mm (rychlost příčnicku:  $10 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ ; kritérium pro ukončení zkoušky: porušení švu).

## 5 Výsledky

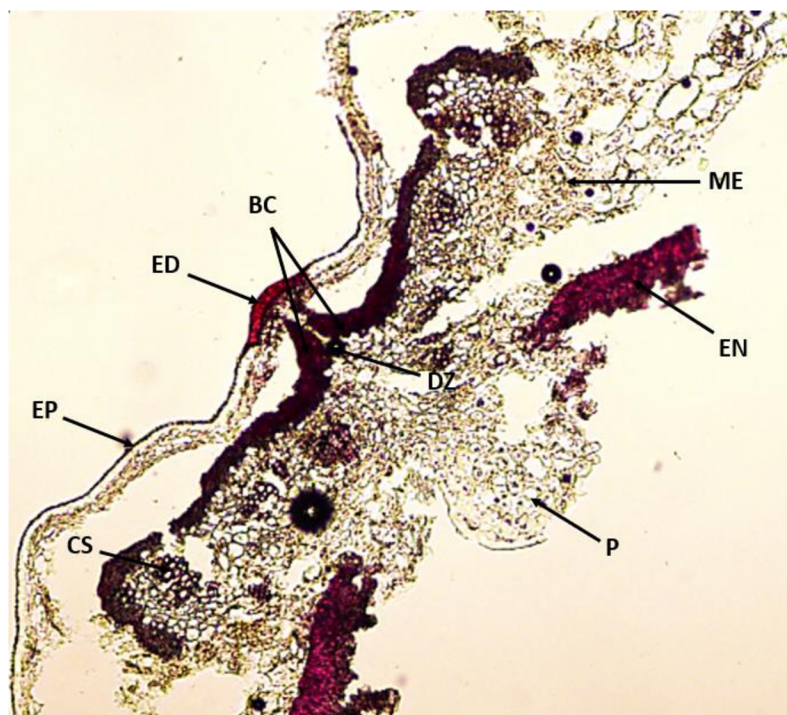
### 5.1 Anatomická analýza lusku

Pro anatomickou analýzu švu lusku hrachu byl vybrán jeden genotyp kulturního hrachu cv. Cameor a jeden genotyp planého hrachu JI1794. Čerstvé lusky nebyly v době práce k dispozici, a proto byly použity lusky konzervované v PBS pufru s 1% formaldehydem a uložené při 4 °C. U cv. Cameor byl použit lusk, který byl 14 DAP (days after pollination) a u JI1794 byl použit lusk 17 DAP. Nejdříve bylo potřeba vypreparovat část dorzálního švu, umístit jej do kryogelu na disku a nechat ztuhnout mrazem v chladicí komoře kryomikrotomu. Připravený preparát byl vložen do mikrotomu a nakrájen na 20µm silné řezy. Tyto řezy byly následně barveny po dobu jedné minuty připraveným fluoroglucinolem (1% w/v fluoroglucinol smíchan s 18% HCl). Následně byly promyty vodou a znovu zakápnuty, tentokrát ale roztokem 75% glycerolu s vodou a 10% kyselinou sírovou. Roztok byl po jedné minutě odmyt. Takto nabarvené řezy byly použity k mikroskopování (viz Obr. 7 a 8).



**Obrázek 7:** Průřez švem lusku kulturního hrachu Cameor ve stádiu 14 DAP po obarvení fluoroglucinolem.

Legenda: EP – epidermis; ED – epidermální destička; BC – ‘bundle cap’; DZ – zóna dehiscence; CS – cévní svazky; ME – mezoderm; EN – endoderm.



**Obrázek 8:** Průřez švem lusku planého hrachu JI1794 ve stádiu 17 DAP po obarvení fluoroglucinolem.

Legenda: EP – epidermis; ED – epidermální destička; BC – ‘bundle cap’; DZ – zóna dehiscence; CS – cévní svazky; ME – mezoderm; EN – endoderm; P – pouško.

## 5.2 Transkriptomická analýza švů izolovaných z pukavých (*P. elatius*) a nepukavých (*P. sativum*) genotypů

Před vlastní bakalářskou prací byla provedena transkriptomická analýza izolovaných švů odebraných z vývojových stádií kontrastních genotypů hrachu. Isolovaná RNA (Norgen RNA isolation kit) byla odeslána do firmy Novogen, Cambridge, UK kde byla přepsána do cDNA, fragmentována a sekvenována pomocí technologie Illumina. Následně byly fragmenty mapovány na genomu hrachu (Cameor v1.0, Kreplak *et al.*, 2019, <https://urgi.versailles.inra.fr/download/pea/>) a sestaveny v transkripty, které byly anotovány. Tato část práce byla provedena Ing. Oldřichem Trněným, VUPT Troubsko.



### 5.3 Diferenciálně exprimované geny

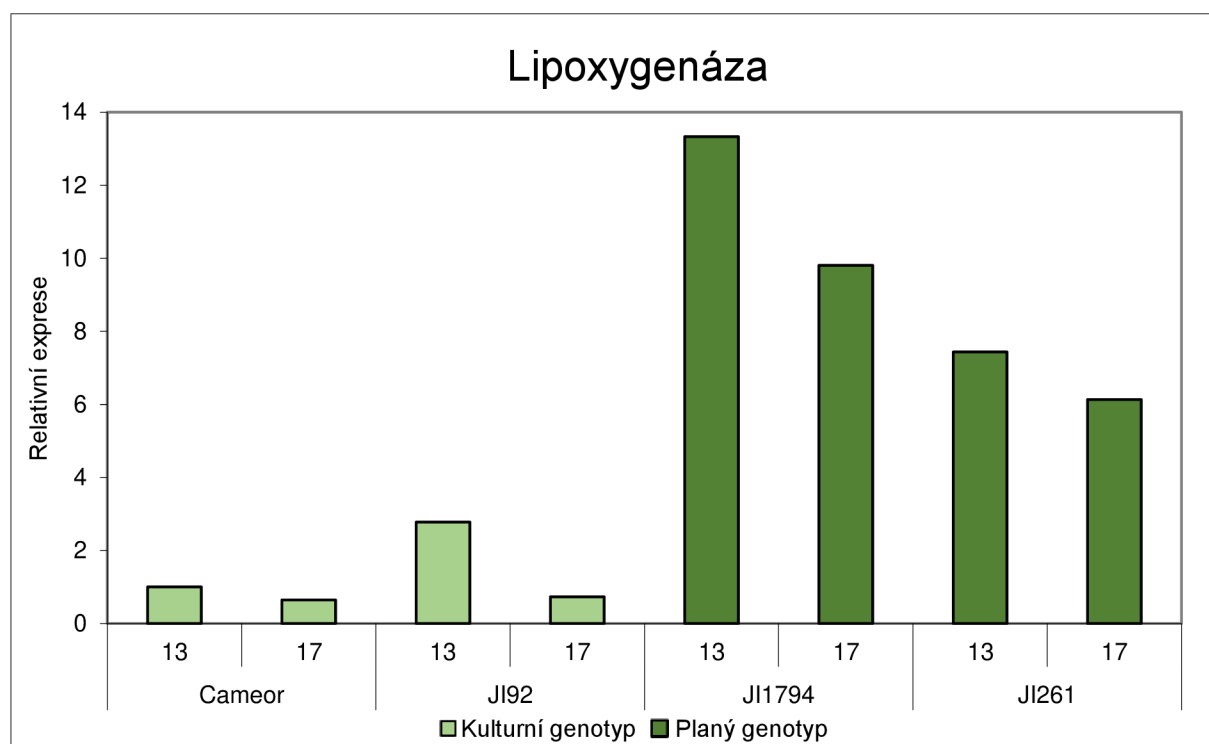
Následně byly identifikovány diferenciálně exprimované geny, při srovnání vzorků švů z pukavých a nepukavých genotypů pomocí balíčků DESeq2 a edgeR. Poté byla provedena genová anotace a analýza genové ontologie (GO). Tato část práce byla provedena Ing. Oldřichem Trněným, VUPT Troubsko. Výsledkem byl soubor diferenciálně exprimovaných genů (DEGs) (viz Obr. 9).

Název genu	BCoVIR*	Popis/Anotace	Ji64.23	Ji1261.23	Ji1794.23	Ji1794.23?	Ji92.23	Ji92.23?	Ca.23
Ps_DEGgenes:10779	0,999	NA	0,333	0,138	0,627	1,948	0	0	0
MSTRG.10655	2,088	Transcription factor MYB88	2,308	7,794	16,500	18,837	0	0	0
Psat3g107080	0,281	Cellulose synthase / Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type	3,131	5,393	4,527	11,545	0,192	0,211	0,002
MSTRG.20038	0,307	??? Receptor-like protein kinase 2 (Medicago)	1,257	0,772	0,737	1,554	0	0	0
Psat4g226960	0,128	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	1,877	2,214	19,410	12,387	0,323	0,314	0,868
Psat5g204160	1,257	Putative anthocyanin 5-(6"-hydroxycinnamoyltransferase)	2,327	0,845	3,586	0,351	0	0	0
Psat5g254760	0,378	Late nodulin protein	0,096	0,170	0,104	0,075	0	0	0
MSTRG.34901	0,334	NA	0,108	2,994	10,906	13,620	0	0	0
Ps_DEGgenes:54443	0,344	NA	0,967	2,051	0,356	1,912	0	0	0
Psat6s1212g0160	0,130	Lipoxygenase / Putative linoleate 9S-lipoxygenase	177,031	159,764	278,216	179,251	13,007	16,764	11,774
Psat1g195480	0,877	AP2 domain	260,690	108,181	329,292	79,922	4,178	7,442	0,798
Ps_DEGgenes:5776	0,740	NA	0,280	1,770	11,205	14,121	0	0	0
MSTRG.5181	0,478	??? CLASSICAL ARABINO GALACTAN PROTEIN 1	13,514	49,239	20,687	9,817	0	0	0
MSTRG.7979	0,968	? Putative transcription factor WD40-like family / protein kinase	4,099	2,734	2,561	6,046	0	0	0

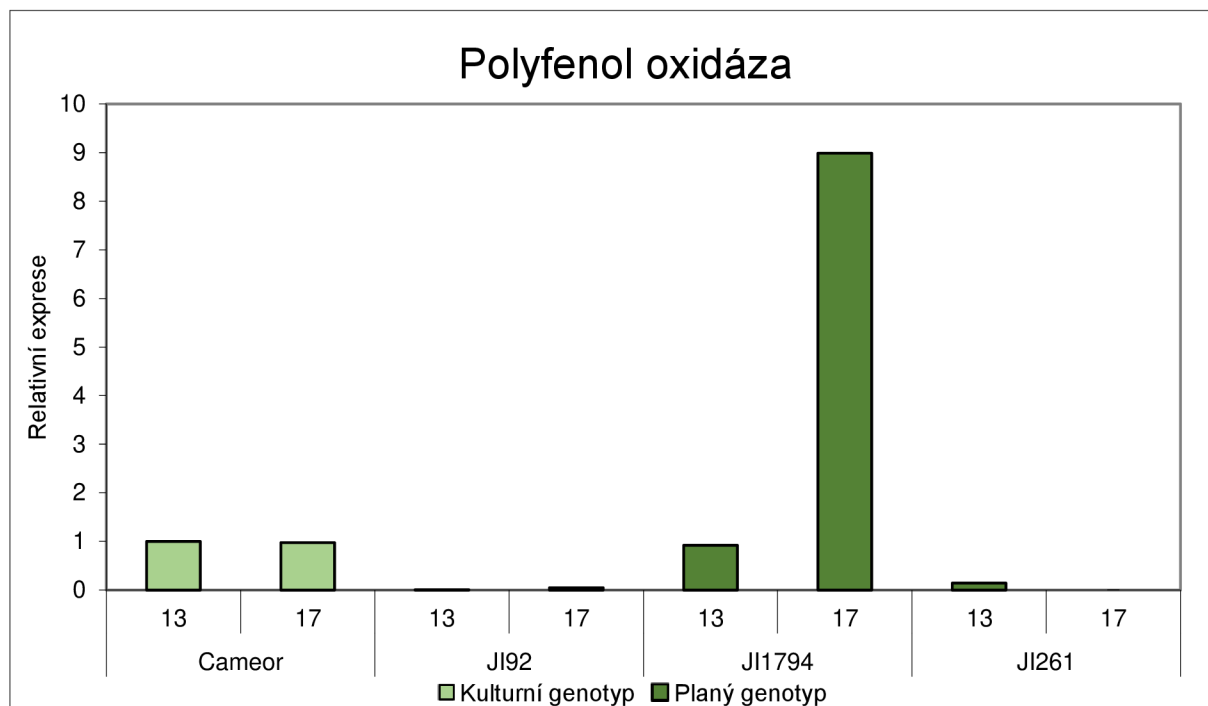
**Obrázek 9:** Tabulka vybraných diferenciálně exprimovaných genů včetně kandidátního genu u kulturních (Cameor, Ji92) a planých (Ji1794, Ji64, Ji261) genotypů ve vývojovém stádiu 23 DAP.

## 5.4 Analýza exprese vybraných genů pomocí kvantitativní real-time polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR)

Pro analýzu genové exprese vybraných genů kódujících lipoxygenázu (Psat0s1212g0160) a polyfenol oxidázu (Psat1g206360) byly použity čtyři genotypy: dva kulturní (Cameor, JI92) a dva plané (JI1794, JI261) z nichž byly odebrány lusky ve vývojových stádiích 13 a 17 DAP. Jako referenční gen byl použit gen pro protein fosfatázu 2 (Z25888). Reakce proběhla v triplicátech. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v grafech (viz Obr. 10 a 11). Z grafů je patrné, že exprese genu pro lipoxygenázu je značně zvýšena v planých genotypech, zatímco v kulturních nikoli. Toto však neplatí pro gen kódující polyfenol oxidázu, kde spojitost mezi jeho expresí a genotypy není.



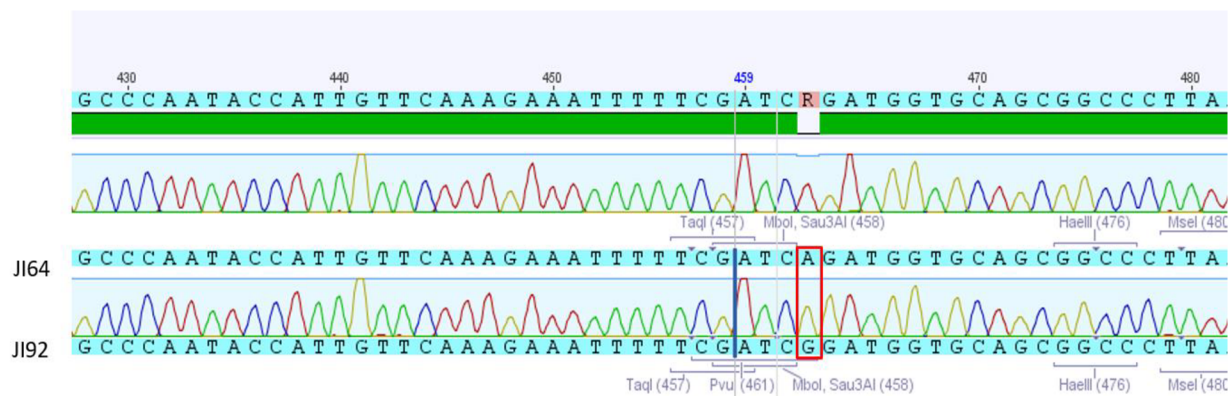
**Obrázek 10:** Relativní exprese genu pro lipoxygenázu (Psat0s1212g0160) ve švech lusků odebraných ze dvou kulturních (Cameor, JI92) a dvou planých (JI1794, JI261) genotypů hrachu ve dvou vývojových stádiích 13 a 17 DAP. Vztáženo k referenčnímu genu pro protein fosfatázu 2 (Z25888).



**Obrázek 11:** Relativní exprese genu pro polyfenol oxidázu (Psat1g206360) ve švech lusků odebraných ze dvou kulturních (Cameor, JI92) a dvou planých (JI1794, JI261) genotypů hrachu ve dvou vývojových stádiích 13 a 17 DAP. Vzataženo k referenčnímu genu pro protein fosfatázu 2 (Z25888).

## 5.5 Identifikace sekvenčního polymorfismu genu LOX

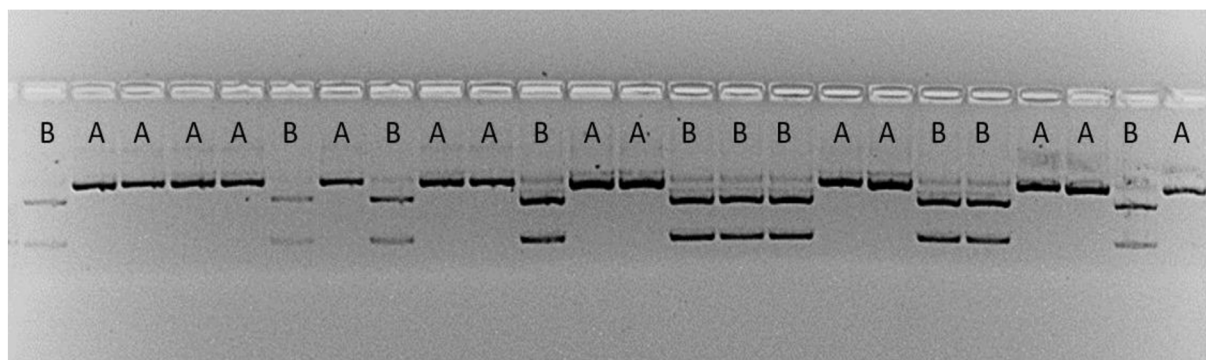
Pro potřeby genetického mapování s využitím populace rekombinantních linií (RIL) vzniklé křížením kontrastních rodičovských genotypů kulturního (JI92) a planého (JI64) hrachu bylo nutné nalezení sekvenčního polymorfismu. Fragment o délce 1586 bp byl amplifikován pomocí PCR a následně sekvenován. Pomocí programu Geneious byly mezi sebou porovnány sekvence LOX genu kulturního a planého genotypu hrachu. Z dat získaných sekvenováním byl nalezen bodový polymorfismus. Následně se určila nejvhodnější místa vhodná ke štěpení restrikními enzymy. Výsledný polymorfismus CGATCG se nacházel v pozici 462 bp (štěpení pomocí *PvuI*) u kulturního rodičovského genotypu JI92, přičemž u planého rodičovského genotypu JI64 došlo k jednonukleotidové záměně G za A (viz Obr. 12). Tato záměna by měla způsobit, že u genotypu JI64 nebude tuto oblast restrikní enzym štěpit.



**Obrázek 12:** Porovnání sekvencí LOX genu rodičovských genotypů JI64 a JI92, červeně je znázorněn polymorfismus v pozici 462 bp.

## 5.6 Restrikční analýza mapovací RIL populace

Pro analýzu genu lipoxygenázy u planého a kulturního hrachu byly použity rekombinantní inbrední linie pocházející z křížení kulturního genotypu JI92 a planého genotypu JI64. Na základě sekvenčních dat byly vybrány možné restrikční enzymy *MboI* a *PvuI* štěpící specifická místa amplifikovaného fragmentu genu LOX. Nejprve byl použit dostupný restrikční enzym *MboI*, avšak výsledná elektroforetická analýza na agarózovém gelu neukázala dostatečně viditelné rozdíly ve vzniklých produktech štěpení. Proto byl použit restrikční enzym *PvuI*, díky kterému vznikly produkty štěpení lišící se svou molekulovou hmotností.



**Obrázek 13:** Elektroforetická separace fragmentu LOX genu z RIL linií po štěpení enzymem *PvuI*.

Legenda: A) vzorek neštěpený enzymem *PvuI* odpovídající planému, pukavému JI64, B) vzorek štěpený enzymem *PvuI* odpovídající kulturnímu, nepukavému JI92 genotypu.

Výsledky z elektroforézy (viz Obr. 13) byly porovnány s naměřenými hodnotami síly potřebné pro puknutí lusku (měřeno v Newtonech, N) pro každého jedince mapovací populace.

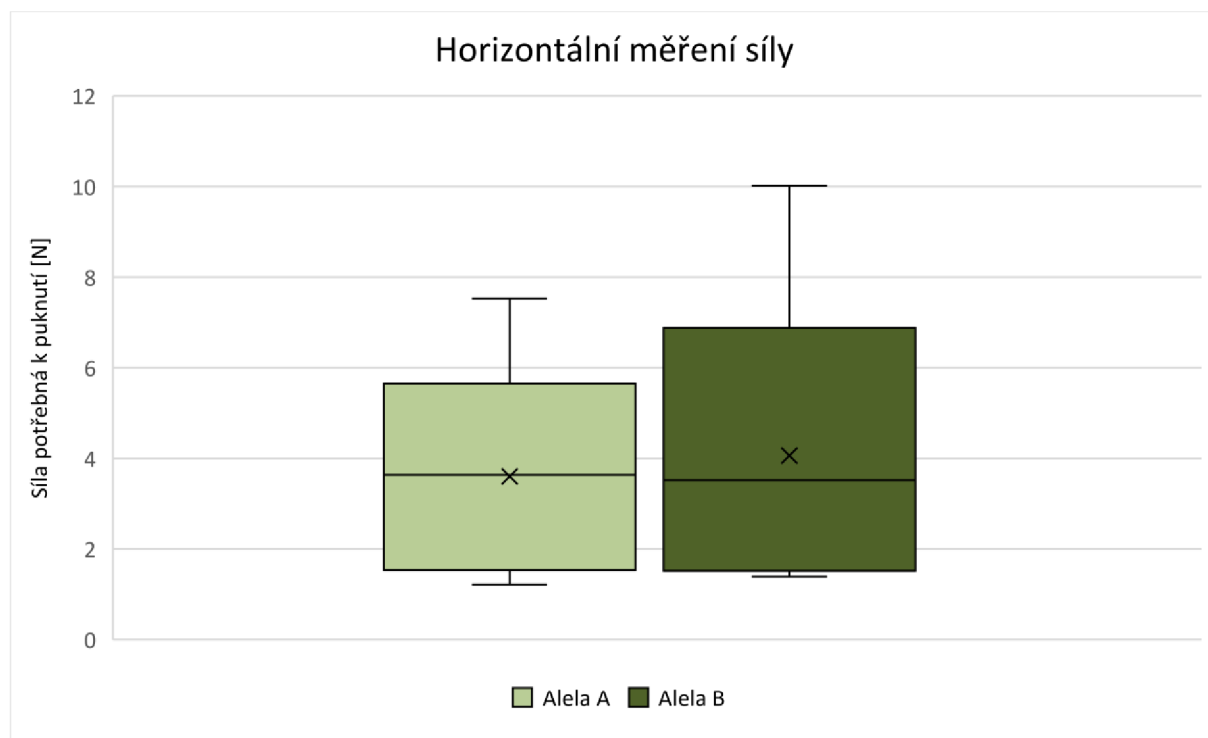
Pro co nejobektivnější vyjádření míry pukavosti, bylo využito měření pomocí siloměru na Ústavu potravinářství, AF Mendelu v Brně, na pracovišti doc. Š. Nedomové. K tomu byly použity lusky sklizené z rostlin vypěstovaných v roce 2019 (leden–květen). Ty byly vysušeny na konstantní vlhkost v sušárně a následně měřeny. Jelikož není známo, které vyjádření síly nejlépe vystihuje fenotyp pukavosti, bylo na lusk působeno silou jak vertikálně (čelistmi), tak horizontálně (kuličkou) (viz Obr. 14). Stanovení síly potřebné k puknutí lusků bylo provedeno na přístroji TIRATEST 27 025 (TIRA GmbH, Schalkau, Německo).

	síla potřebná k puknutí lusku (N)						síla potřebná k puknutí lusku (N)				
	LOX-allele	kulicka	celisti	logKULICKA	logCELISTI		LOX-allele	kulicka	celisti	logKULICKA	logCELISTI
15B	A	4,61	18,75	0,663700925	1,273001272	1	B	2,9	19,61	0,462397998	1,292477594
30A	A	3,05	12,2	0,484299839	1,086359831	9A	B	3,55	19,06	0,550228353	1,280122896
31	A	3,24	14,97	0,51054501	1,1752218	13	B	4,01	20,46	0,603144373	1,310905629
33	A	4,88	18,87	0,688419822	1,2757719	16	B	5,19	19,15	0,715167358	1,282168778
34	A	3,36	23,57	0,526339277	1,372359583	18	B	3,7	15,28	0,568201724	1,184123354
35	A	1,85	15,28	0,267171728	1,184123354	20	B	4,98	17,76	0,697229343	1,249442961
36	A	2,99	10,91	0,475671188	1,037824751	21	B	3,58	21,01	0,553883027	1,322426052
41	A	2,79	13,9	0,445604203	1,1430148	22A	B	5,36	12,11	0,72916479	1,083144143
44	A	2,74	11,45	0,437750563	1,058805487	25	B	3,59	23,39	0,555094449	1,369030222
46A	A	4,71	17,7	0,673020907	1,247973266	27	B	3,69	12,53	0,567026366	1,097951071
46B	A	5,56	15,41	0,745074792	1,187802639	29	B	2,5	12,1	0,397940009	1,08278537
56B	A	5,83	20,23	0,765668555	1,305995883	30B	B	3,52	21,15	0,546542663	1,325310372

**Obrázek 14:** Ukázka výsledku naměřených sil potřebných k puknutí lusků RIL populace a výsledných alel LOX genu.

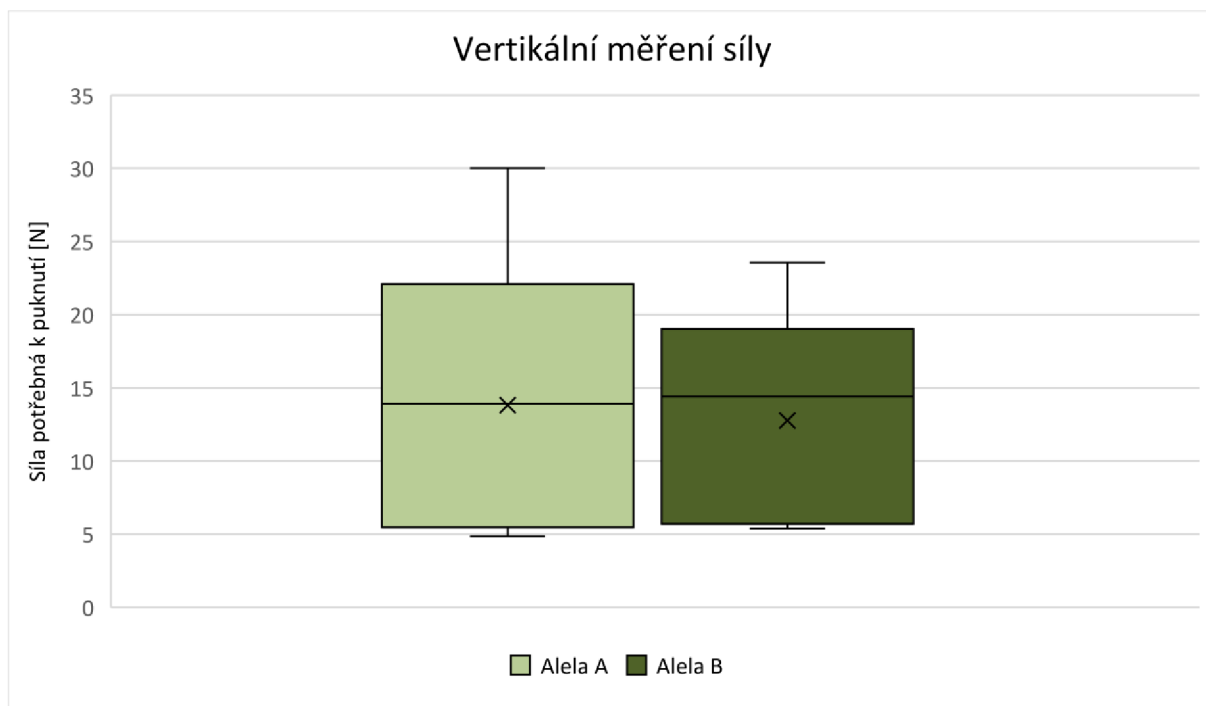
Výsledná korelace mezi alelou A, tedy *PvuI* neštěpenou, odpovídající planému, pukavému JI64 genotypu a alelou B – *PvuI* štěpenou, odpovídající kulturnímu, nepukavému JI92 a fenotypem pukání je uvedena na Obrázcích 15 a 16.

Z výsledků je patrné že, u obou metod měření se linie nesoucí alelu A příliš neliší v hodnotách naměřených sil od linií nesoucích alelu B.



**Obrázek 15:** Měření síly potřebné k puknutí lusku hrachu pomocí sondy tvaru koule o průměru 10 mm (horizontální typ měření).

Legenda: Alela A – neštěpená restrikčním enzymem *PvuI*, odpovídá 49 liniím planého pukavého JI64 genotypu; Alela B – štěpená restrikčním enzymem *PvuI*, odpovídá 53 liniím kulturního nepukavého JI92.



**Obrázek 16:** Měření síly potřebné k puknutí lusků hrachu stlačováním čelistmi (vertikální typ měření).

Legenda: Alela A – neštěpená restrikčním enzymem *PvuI*, odpovídá 49 liniím planého pukavého JI64 genotypu; Alela B – štěpená restrikčním enzymem *PvuI*, odpovídá 53 liniím kulturního nepukavého JI92.

## 5.7 Mapování LOX genu

V současné verzi genomu hrachu Cameor v1.0 není známa chromosomální lokalizace genu kódujícího lipoxygenázu (psat0s1212g0160), a proto je umístěn na neukotveném tzv. scaffoldu, pravděpodobně v důsledku nekompletního sekvenování. Bylo proto využito syntenie mezi příbuznými druhy.

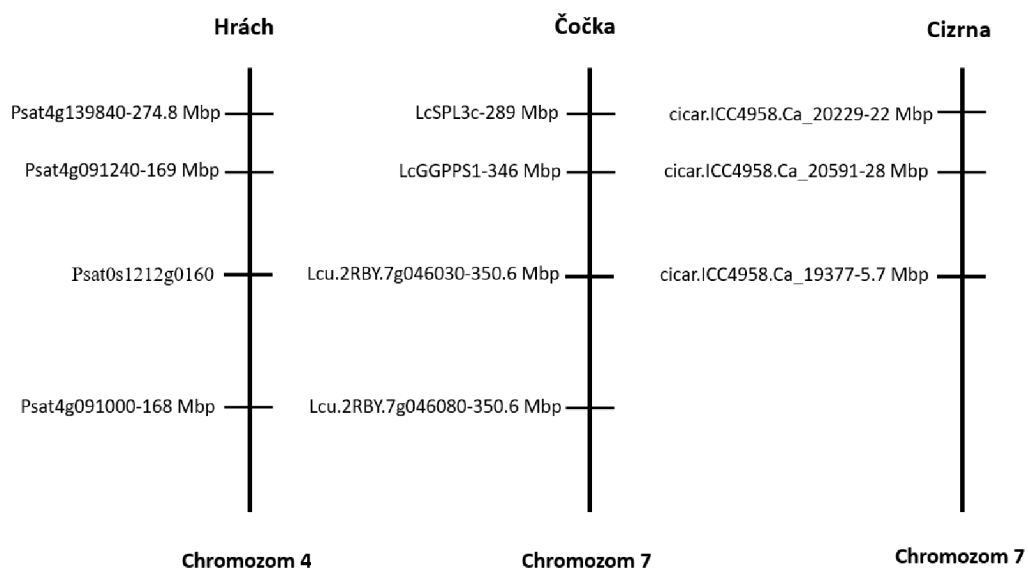
Pomocí BLAST analýzy s DNA sekvencí LOX genu hrachu v databázi obsahující genomy čočky a cizrny (<https://knowpulse.usask.ca/>) se ukázalo, že homologní geny u čočky (Lcu.2RBY.7g046030 – 92,1% homologie) a cizrny (cicar.ICC4958.Ca\_19377 – 83,64% homologie) leží na chromozomech 7 (viz Tabulka 5). Dále byly zjišťovány geny sousedící s těmito homology. Následně byly hledány homologní geny těchto sousedních genů v genomu hrachu. Zjistilo se, že homology genů sousedících s genem pro lipoxygenázu u čočky a cizrny se v genomu hrachu nachází na chromozomu 4.

**Tabulka 5:** Přehled genů a jejich popis použitých při mapování genu Psat0s1212g0160

	Název genu	Číslo genu	Délka [bp]	Pozice
<b>Čočka</b>	Squamosa promoter binding protein-like	LcSPL3c	1,199	Chr.7: 289021579–289022777
	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	LcGGPPS1	1,763	Chr.7: 346502577–346504339
	Lipoxygenase	Lcu.2RBY.7g046030	922	Chr.7: 350285614–350286535
	Hexosyltransferase	Lcu.2RBY.7g046080	1,696	Chr.7: 350678420–350680116
<b>Cizrna</b>	Squamosa promoter binding protein-like 4	cicar.ICC4958.Ca_20229	1,233	Chr.7: 22243044–22244276
	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase 1	cicar.ICC4958.Ca_20591	1,842	Chr.7: 28013194–28015035
	Seed linoleate 9S-lipoxygenase	cicar.ICC4958.Ca_19377	4,437	Chr.7: 5766258–5770694
<b>Hrách</b>	Squamosa promoter binding protein-like 4	Psat4g139840	3,305	Chr.4: 274895179–274898483
	Polyprenyl synthetase	Psat4g091240	3,104	Chr.4: 169205814–169208917
	Glycosyl transferase family 8	Psat4g090920	1,046	Chr. 4: 168145001–168146047

Z toho vyplývá, že také gen pro lipoxygenázu psat0s1212g0160 leží s největší pravděpodobností na chromozomu 4 (viz Obr. 17). Toto bude potvrzeno s využitím celogenomového mapování stejné mapovací populace RIL (JI64 x JI92) pomocí DARTseq sekvencí, kdy získané hodnocení restrikčního polymorfismu bude vloženo do souboru přibližně 20000 DNA fragmentů. Tato část práce je v současné době prováděna na pracovišti prof. A. Korola, Institute of Evolution at the University of Haifa, Israel.





**Obrázek 17:** Mapování pozice genu psat0s1212g0160 v genomu hrachu s využitím syntenie příbuzných druhů.

## 6 Diskuse

Problematika pukání plodu je studována jak z důvodů praktického využití, tak i pochopení principů. Tento fenomén šíření semen je v kontextu zemědělské produkce nežádoucí, neboť způsobuje značné ztráty ve výnosech (Vaughan *et al.*, 2007).

V případě bobovitých rostlin je míra puknutí lusku závislá na švech a jejich struktuře. Na řezech švů lusků planého a kulturního hrachu lze vidět rozdíly v jejich anatomii. Oba švy se skládají z epidermu, který je tvořen exokarpem. Pod epidermis je poměrně silná vrstva mezokarpu tvořena parenchymem. V mezokarpu se nachází i cévní svazky. Vnitřní vrstvu tvoří lignifikovaný sklerenchym (Hradilová *et al.*, 2017). Právě obsahem a rozložením lignifikovaných buněk se švy lusku planého a kulturního hrachu liší. U planého hrachu je obsah ligninu značně vyšší, díky čemuž je lusk schopen puknout a rozptýlit tak semena do okolí. Šíření semen u planých luskovin tak dosahuje okruhu 1–5 metrů (Parker *et al.*, 2021). U lusku planého hrachu navíc z lignifikovaných buněk nazývajících se 'bundle cap' buňky vzniká útvar dosahující až k epidermální destičce, zatímco u lusků kulturních hrachu k tomuto nedochází. U švu lusku kulturního hrachu se mezi 'bundle cap' buňkami a epidermální destičkou se nachází mezera vyplněna parenchymem. Tato skutečnost také umožňuje větší schopnost otevření a spiralizace lusku planého hrachu.

V předchozí práci (Hradilová *et al.*, 2017) byla provedena transkriptomická analýza pukavosti lusku hrachu a pomocí metody MACE a na směsném vzorků několika vývojových stádií. Výsledkem byla identifikace potenciálního kandidátního genu pomocí MACE-P015, který je lokalizovaný ve vazebné skupině III. Je to jeden z hlavních kandidátních genů zodpovědný za pukavost lusku a jeho homologem je *PEPTIDOGLYCAN-BINDING DOMAIN PROTEIN (PGDB)* u vojtěšky (Medtr2g079050). Nicméně tato práce se věnovala jiným kandidátním genům získaných odlišnými metodami.

Současná analýza vycházela ze vzorků RNA připravených z konkrétních vývojových stádií švů lusků planých s použitím moderní metody RNA sekvenování. Následně srovnáním transkriptů RNA pocházející ze švů lusků planých (*Pisum elatius*) a kulturních (*Pisum sativum*) genotypů byl získán soubor diferenciálně exprimovaných genů. Z výsledných hodnot se jevil jako dobrý kandidát hrající roli v pukavosti lusku gen Psat0s1212g0160, který byl hodně exprimován u planých genotypů, zatímco u kulturních nikoli. Jedná se o gen kódující lipoxygenázu a jeho umístění v genomu bylo neznámé, respektive nacházel se na nezařazeném scaffoldu. Z předchozích studií je znám *Dpo1* lokus podmiňující pukání lusku, který se nachází na chromozomu 5 (původní vazebná skupina III) (Weeden, 2007). Proto bylo také potřeba gen

Psat0s1212g0160 v genomu hrachu lokalizovat. Výsledky diferenciálně exprimovaných genů také odhalily dva geny lokalizované na chromozomu 5: Psat5g204160 kódující enzym putative anthocyanin 5-(6"- hydroxycinnamoyltransferase) a Psat5g254760 kódující late nodulin protein, avšak nebyl žádný zásadní rozdíl v expresi těchto genů mezi planými a kulturními genotypy, proto nebyly vybrány mezi kandidátní geny způsobující pukavost lusku.

Lipoxygenáza je enzym široce vyskytující se v rostlinných a živočišných buňkách (Shi *et al.*, 2020). Lipoxygenázy (LOX, linoleate:oxygen reduktáza, EC 1.13.11.12) jsou nehemové dioxygenázy obsahující železo. Funkce lipoxygenázy je katalyzace procesu oxygenace polynenasycených mastných kyselin obsahující (Z,Z)-1,4-pentadienový systém za vzniku hydroperoxidu nenasycených mastných kyselin (Rodriguez-Concepción, 1996; Porta *et Rocha-Sosa*, 2002).

Lipoxygenázy jsou hojně zastoupeny a studovány u obilnin, kde hrají důležitou roli při aktivování zásobních lipidů v době klíčení (Lampi *et al.*, 2019; Lončarić *et al.*, 2021). Důležitou roli mají i u rostlin při vzniku obranných složek, jako jsou například jasmonáty, divinylethery, listové aldehydy, které pomáhají chránit rostliny před hmyzem a patogeny (Lončarić *et al.*, 2021). Lipoxygenázy jsou i komerčně důležité, neboť se značně podílí na tvorbě chuti a vůně u ovoce a zeleniny (Rodriguez-Concepción, 1996). Tyto enzymy se také účastní růstu vegetativních částí rostlin. Například u luskovin se našel vysoký obsah lipoxygenáz ve vyvíjejících se kořenových hlízkách, zatímco byl zaznamenán pokles lipoxygenáz u plně vyvinutých hlízkách. U rajčat se zjistila vysoká exprese genů *Tomlox A*, *Tomlox B* a *Tomlox C* během zrání ovoce, přičemž jejich exprese je ovlivňována etylenem a jinými neznámými faktory (Porta *et Rocha-Sosa*, 2002). Vzhledem k tomu, že se lipoxygenáza podílí na řadě důležitých rostlinných pochodů je možné, že může ovlivňovat i procesy vedoucí k pukání lusku hrachu. Je však potřeba dalších analýz na zodpovězení funkce LOX. Je možné, že se jedná jen o spojitost mezi obrannou funkcí, která je přítomná u planých forem hrachu.

Další kandidátním gen byl gen pro polyfenoloxidázu (PPO). Z qRT-PCR však nebyl zjištěn značný rozdíl mezi expresí tohoto genu v luscích kulturních a planých genotypech, jak tomu bylo u lipoxygenázy. PPO je enzym oxidující orto-difenoly na orto-dichynony pomocí molekulárního kyslíku. Některé PPO přeměňují i monofenoly na orto-difenoly. PPO geny byly identifikovány jak u živočichů a hub, tak i u rostlin, kde se tento enzym podílí na pigmentaci. Reaktivní orto-chinonové produkty způsobují také hnědnutí poškozeného ovoce

a zeleniny (Tran *et al.*, 2012). Zdá se tedy, že PPO gen hraje roli spíše v pigmentaci nežli v procesu lignifikace, proto se s ním dále nepracovalo.

Genová exprese je však závislá na vývojových stádiích, jak bylo zjištěno například u fazole (*Phaseolus vulgaris* L.), kde se exprese genu *PvIND* ve stádiích 5 a 21 DAP liší přibližně 40× (Parker *et al.*, 2021). Vzhledem k dostupnosti rostlinného materiálu se v této bakalářské práci pracovalo pouze s lusky hrachu ve stádiích 13 a 17 DAP, tudíž nemuselo dojít k zaznamenání maximální exprese kandidátních genů. Bylo by proto dobré se dále věnovat expresi u větší škály stádií a zjistit tak expresi v průběhu času.

U LOX genu (Psat0s1212g0160) byl zjištěn DNA polymorfismus mezi planým a kulturním genotypem. S využitím těchto poznatků a se získanými daty z měření síly potřebné k puknutí u každého jedince z RIL generace F6 bylo možné porovnat korelaci mezi tímto genem a fenotypem. Přiřazení alel k jedincům s daným fenotypem však neukázal souvislost mezi expresí LOX genu a pukavostí.

To, že se lipoxygenáza nepodílí na pukání lusku hrachu se potvrdilo i mapováním tohoto genu s využitím syntenie, která je založena na podobnosti genomů mezi blízkými příbuznými druhy (Liu *et al.*, 2018). Homologní LOX genu byly hledány u příbuzných druhů hrachu, což jsou čočka a cizrna, kde se nacházely na chromozomu 7. Sousední geny byly následně použity k hledání jejich homologů v genomu hrachu, které se našly na chromozomu 4. S největší pravděpodobností tedy i gen psat0s1212g0160 leží na chromozomu 4. Toto tvrzení bude potvrzeno na základě celogenomového mapování téže populace RIL (JI64xJI92), kdy získané hodnocení restrikčního polymorfismu bude vloženo do souboru přibližně 20000 DNA fragmentů. Tato část práce je v současné době prováděna na pracovišti prof. A. Korola, Institute of Evolution at the University of Haifa, Israel.

Jak bylo již výše zmíněno, v genomu hrachu se nachází lokus *Dpo1* na chromozomu 5, který je zodpovědný za pukavost lusku. Vzhledem k tomu, že gen psat0s1212g0160 v tomto místě neleží, je pravděpodobné, že se nepodílí na pukání lusku. Nevylučuje se však možnost, že se tento gen může ať přímo či nepřímo účastnit molekulárních cest vedoucích k pukání.

V dalších studiích by bylo zajímavé porovnat expresi těchto genů mezi příbuznými druhy jako je sója, fazol a cizrna. Tyto luskoviny byly domestikovány v různých částech světa nezávisle na sobě a jejich genetické změny tak mohly nastat různými mechanismy.

## 7 Závěr

Tato bakalářská práce se věnovala analýze genetických a transkriptomických cest ovlivňující pukavost lusku hrachu (*Pisum sativum*). Konkrétně byla zaměřena na gen pro lipoxygenázu a polyfenol oxidázu. Pomocí qRT-PCR byla zjištěna vysoká míra exprese genu pro lipoxygenázu v lusku hrachů planých genotypů, zatímco v lusku hrachů kulturních genotypů byla nízká. Naopak gen pro polyfenol oxidázu nevykazoval významný rozdíl v expresi mezi lusky planých a kulturních genotypů.

Byl analyzován polymorfismus LOX genu u planého (JI64) a kulturního (JI92) genotypu a populace rekombinantních linií (RIL) vzniklých jejich křížením. Tyto výsledky pak byly porovnávány s fenotypovým hodnocením síly potřebné pro puknutí lusku naměřené u jednotlivých linií mapovací populace (JI64xJI92). Nebyla však zjištěna žádná korelace mezi expresí LOX genu a fenotypem pukání lusku.

Dále bylo provedeno mapování LOX genu pomocí syntenie mezi příbuznými druhy. Díky tomu bylo zjištěno, že se gen pro lipoxygenázu nachází na chromozomu 4. To bude dále potvrzeno na základě celogenomového mapování téže populace.

## 8 Literatura

- Aguilar-Benitez D., Rubio J., Millán T., Gil J., V. Die J., Castro P. (2020): Genetic analysis reveals PDH1 as a candidate gene for control of pod dehiscence in chickpea. *Molecular Breeding* 40: 2.
- Burnie G., Forrester S., Greig D., Guest S., Harmony M., Hobley S., Jackson G., Lavarck P., Ledgett M., McDonald R., Stirling M., Molyneux B., Moodie D., Moor J., Newman D., North T., Pienaar K., Purdy G., Silk J., Ryan S., Schien G. (2007): *Botanika*. Slovart, s.r.o., Praha.
- Černohoský Z. (1964): *Základy rostlinné morfologie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Dong Y., Wang Y. (2015): Seed shattering: from models to crops, *Frontiers in Plant Science* 6: 476.
- Ellis T. H. N. (2011): Pisum. In: Kole Ch. (eds.): *Wild crop relatives: genomic and breeding resources*, pp. 259, Springer, Germany.
- Fahn A. (1990): *Plant anatomy*. Fourth edition. Pergamon press, England 491-492.
- Faris J. D., Fellers P. J., Brooks S. A., Gill B. S. (2003): A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus Q in wheat and identification of a candidate gene. *Genetics* 163: 311–321.
- Ferrándiz C., Pelaz S., Yanofsky M. F. (1999): Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annual Review of Biochemistry* 68: 321–329.
- Funatsuki H., Suzuki M., Hirose A., Inaba H., Yamada T., Hajika M., Komatsu K., Katayama T., Sayama T., Ishimoto M., Fujino K. (2014): Molecular basis of a shattering resistance boosting global dissemination of soybean. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 111: 17800–17801.
- Hancock J. F. (2012): *Plant evolution and origin of crop species*. Third edition. Michigan state university, USA.
- Houba M., Dostálová R. (2009a): Šlechtění a semenářství. In: Houba M., Hochman M., Hosnedl V. (eds.): *Luskoviny pěstování a užití*, pp. 28–35, Kurent, České Budějovice.
- Houba M., Dostálová R. (2009b): Čočka jedlá. In: Houba M., Hochman M., Hosnedl V. (eds.): *Luskoviny pěstování a užití*, pp. 28–35, Kurent, České Budějovice.

- Houba M., Huňady I. (2009): Bob obecný. In: Houba M., Hochman M., Hosnedl V. (eds.): Luskoviny pěstování a užití, pp. 59–66, Kurent, České Budějovice.
- Houba M., Hýbl M. (2009): Sója luštinatá. In: Houba M., Hochman M., Hosnedl V. (eds.): Luskoviny pěstování a užití, pp. 59–66, Kurent, České Budějovice.
- Hradilová I., Trněný O., Válková M., Cechová M., Janská A., Prokešová L., Ammir K., Krezdorn N., Rotter B., Winter P., Varshney R. K., Soukup A., Bednář P., Hanáček P., Smýkal P. (2017): A combined comparative transcriptomic, metabolomic, and anatomical analyses of two key domestication traits: pod dehiscence and seed dormancy in Pea (*Pisum sp.*) *Frontiers in Plant Science* 8: 1–20.
- Chrtek J. (2021): Fabaceae Lindl-bobovité. In: Kaplan Z. (ed.): Klíč ke květeně České republiky, pp. 409–449, Academia, Praha.
- Jofuku K. D., W. den Boer B. G., Montagu M. V., Okamoto J. K. (1994): Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *The Plant Cell* 6: 1211–1212.
- Kang X., Cai J., Chen Y., Yan Y., Yang S., He R., Wang D., Zhu Y. (2020): Pod-shattering characteristics differences between two groups of soybeans are associated with specific changes in gene expression. *Functional & Integrative Genomics* 20: 201.
- Lampi A., Yang Z., Mustonen O., Piironen V. (2019): Potential of faba bean lipase and lipoxygenase to promote formation of volatile lipid oxidation products in food models. *Food Chemistry* 311.
- Li N., Zhang D. S., Liu H. S., Yin Ch. S., Li X. X., Liang W., Yuan Z., Xu B., Chu H. W., Wang J., Wen T. Q., Huang H., Luo D., Ma H. Zhang D. B. (2006): The rice tapetum degeneration retardation gene is required for tapetum degradation and anther development. *Plant Cell* 18: 2999–3014.
- Liu D., Hunt M., Tsai I. J. (2018): Inferring synteny between genome assemblies: a systematic evaluation. *BMC Bioinformatics* 19: 1–13.
- Lončarić M., Strelec I., Moslavac T., Šubarić D., Pavić V., Molnar M. (2021): Lipoxygenase inhibition by plant extracts. *Biomolecules* 11: 1–2.
- Meyer R.S., Purugganan M. D. (2013): Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature Review in Genetics* 14: 840–845.

- Murgia L. M., Attene G., Rodriguez M., Bitocchi E., Bellucci E., Fois D., Nanni L., Gioia T., Albani M. D., Papa R., Rau D. (2017): Comprehensive phenotypic investigation of the „Pod-shattering syndrome“ in common bean. *Frontiers in Plant Science* 8: 2.
- Novák J., Skalický M. (2012): *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. 3. vydání, Powerprint, Praha.
- Ogutcen E., Pandey A., Khan K. M., Marques E., Penmetsa V. R., Kahraman A., Wettberg E. (2018): Pod shattering: a homologous series of variation underlying domestication and an avenue for crop improvement. *Agronomy*. 8: 2–6.
- Parker A. T., Lo S., Gepts P. (2021): Pod shattering in grain legumes: emerging genetic and environment-related patterns. *The Plant Cell* 33: 179–199.
- Porta H., Rocha-Sosa M. (2002): Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology* 130: 15.
- Purugganan M. (2019): Evolutionary insights into the nature of plant domestication. *Current Biology* 29: 705.
- Ripoll J. J., Roeder A. H. K., Ditta G. S., Yanofsky M. F. (2011): A novel role for the floral homeotic gene *APETALA2* during Arabidopsis fruit development. *Development* 138: 5167–5176.
- Rodriguez-Concepción M., Gómez D. M., Beltrán J. (1996): Immunolocalization of lipoxygenase in pea (*Pisum sativum* L.) carpels. *Plant Cell Reports* 15: 620–625.
- Ross-Ibarra J., Morrell L. P., Gaut S. B. (2007): Plant domestication, a unique opportunity to identify the genetic basis of adaptation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 104: 8641–8648.
- Shi Y., Mandal R., Singh A., Pratap Singh A. (2020): Legume lipoxygenase: Strategies for application in food industry. *Legume Science* 2:e44
- Smýkal P. (2009a): Genetika a genomika v luskovinách. In: Houba M., Hochman M., Hosnedl V. (eds.): *Luskoviny pěstování a užití*, pp. 59–66, Kurent, České Budějovice.
- Smýkal P. (2009b): Domestikace rostlin z pohledu současné genetiky. *Živa* 1: 1.
- Smýkal P. (2011): Fylogeneze, biogeografie a genetická diverzita rodu hrách. *Živa* 4: 151.



- 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* 4: 45.
- Smýkal P., Kenicer G., Flavell A. J., Corander J., Kosterin O., Redden R. J., Ford R., Coyne C. J., Maxted N., Ambrose M. J., Ellis T. H. N. (2011): Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 9: 4–18.
- Smýkal P., Mikič A. (2009): Historie pěstování luskovin v Evropě. *Úroda* 57 (11) 41–43.
- Smýkal P., Nelson M. N., Berger J. D., Wettberg E. J. B. (2018): The impact of genetic changes during crop domestication. *Agronomy* 8: 119.
- Tran L. T., Taylor J. S., Constabel C. P. (2012): The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics* 13: 2–12.
- Tu B., Liu Ch., Wang X., Li Y., Zhang Q., Liu X., Herbert S. J. (2019): Greater anatomical differences of pod ventral suture in shatter-susceptible and shatter-resistant Soybean cultivar. *Crop Science* 59: 2784–2793.
- Vaughan D.A., Balázs E., Heslop-Harrison J. S. (2007): From crop domestication to super-domestication. *Annals of Botany* 100: 893–901.
- Vinter V. (2008): Rostliny pod mikroskopem (Základy anatomie cévnatých rostlin). Twin s.r.o., Olomouc.
- Weeden N. F. (2007): Genetic changes accompanying the domestication of *Pisum sativum*: Is there a common genetic basis to the “Domestication syndrome“ for the legumes? *Annals of Botany* 100: 1017–1025.
- Weeden N.F., Brauner S., Przyborovski J. A. (2002): Genetic analysis of pod dehiscence in pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 657–664.
- Zhang Q., Tu B., Liu Ch., Liu X (2018): Pod anatomy, morphology and dehiscing forces in pod dehiscence of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Flora* 248: 49.

Zhang Z., Belcram H., Gornicki P., Charles M., Just J., Huneau C., Magdelenat G., Couloux A., Samain S., Gill B. S., Ramussen J. B., Barbe V., Faris J. D., Chalhoub B. (2011): Duplication and partitioning in evolution and function of homoeologous Q loci governing domestication characters in polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 18737–18742.

Zohary D. (1989): Pulse domestication and cereal domestication: How different are they? *Economy Botany* 43: 31–34.