



Agronomická  
fakulta

Mendelova  
univerzita  
v Brně



**Genetické aspekty domestikčního znaku pukavosti  
lusku u hrachu**

Diplomová práce

*Vedoucí práce:*

Ing. Pavel Hanáček, Ph.D.

*Konzultant:*

Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

*Vypracovala:*

Bc. Lenka Smutná

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

Genetické aspekty domestikačního znaku pukavosti lusku u hrachu

vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách 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**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Pavlu Hanáčkovi, Ph.D. za otevření dveří k novým poznatkům, zahrnujících také využití genetiky v praxi. Také bych ráda poděkovala konzultantovi Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. (katedra biologie, Universita Palackého v Olomouci) za odborné vedení a konzultace v rámci řešení jednotlivých cílů práce. Mé poděkování patří v neposlední řadě také Ing. Aleši Soukupovi, Ph.D. (katedra experimentální biologie, Universita Karlova v Praze).

## ABSTRAKT

Genetické aspekty domestikačního znaku pukavosti lusku u hrachu

Domestikace rostlin byl zprvu pravděpodobně neuvědomělý, posléze cílený proces, kdy působením člověka vznikaly kulturní plodiny z planých druhů. Některé plodiny se dříve vyskytovaly jako plevele prvních kulturních druhů a v průběhu domestikace byly selektovány v samostatné plodiny. Počátky domestikace můžeme datovat do mladší doby kamenné, kdy člověk změnil způsob života ze sběračsko-loveckého na zemědělsko-pastevecký. Svou roli zde patrně sehrála i změna klimatu po poslední době ledové. Plané druhy se od kulturních plodin odlišují v souboru znaků domestikačního syndromu. Domestikované plodiny mají například větší plody (lilek rajče - *Solanum lycopersicum* L.), obsahují menší množství toxických látek (solanin, lilek brambor - *S. tuberosum* L.), je potlačeno přirozené šíření semen a dormance (hrách - *Pisum* L.) atd. Samovolné vypadávaní semen bylo v minulosti, ale i současnosti velkým problémem a již od počátků zemědělství byla vyvíjena snaha tento znak potlačit.

Rostliny si vyvinuly různé mechanismy šíření semen do svého okolí, kvůli zachování vlastního druhu. Luskoviny si vytvořily explozivní způsob šíření semen. Sesychající chlopně lusku vytváří napětí na oba švy a po dosažení kritické síly se lusk prudce otevře, přitom změní orientaci (špičkou šikmo nahoru) a semena jsou vystřelena až několik metrů do okolí.

Cílem této práce bylo zúžit mapovací interval genu pukavosti lusku (*Dpo1*) u hrachu (*Pisum* L.) a zaměřit se na vyhodnocení fenotypu rekombinantních inbredních linií (RILs). Bylo pracováno s několika RILs liniemi vzniklými křížením kontrastních rodičovských genotypů *P. elatius* Steven ex M. Bieb. JI64 × kulturní hrách *P. sativum* L. JI92 a recipročním křížením JI92 × JI64; *P. elatius* Steven ex M. Bieb. VIR320 × kulturní hrách *P. sativum* L. WL1238. Dalším cílem byla srovnávací anatomická analýza stavby lusku v oblasti ventrálního i dorzálního švu a stavby endokarpu.

**Klíčová slova:** Domestikace rostlin, domestikační syndrom, Fabaceae Lindl., genetické mapování, hrách, lusk, *Pisum* L., pukavost.

## ABSTRACT

Genetic aspects of domestication attribute of pea pod shattering

At the beginning, the plant domestication was probably a non-conscious process. Later, it changed to a targeted process, when the cultural crops were developed from wild species due to human activities. Some crops occurred as a weed of the first cultural species in the past and were selected for individual crops during the domestication. The very beginning of the domestication can be found in neolithic era, when humans changed their way of life from picking & hunting to agriculture & shepherdly. Change of climate after the last ice age was probably one of the reasons. Wild plants as a whole differ from cultural crops in set of domestication characters. Domesticated crops have for example bigger fruits (tomato plant - *Solanum lycopersicum* L.), contain lower amount of toxic substances (solanine, potato - *S. tuberosum* L.), natural spreading of seeds and dormancy were inhibited (pea - *Pisum* L.) etc. Spontaneous releasing of seeds was a big issue already in the past, and is a big issue also now. Afford to avoid this behavior was exerted from the beginning of agriculture.

Plants developed various mechanisms of seed spreading into their surroundings for the purposes of species preservation. Legumes developed explosive seed spreading. Shrinking pod valves exert tension on both junctions and once the critical force was reached, the pod suddenly opens. During this action, the pod orientation changes (the tip obliquely upwards) and the seeds are catapulted up to several meters into surroundings.

The objective of this work was to narrow mapping interval of the pod shattering gene (*Dpo1*) in pea (*Pisum* L.) and focus on evaluation of phenotype of recombinant inbred lines (RILs). Several RILs formed by crossbreeding of contract parent genotypes of *P. elatius* were used Steven ex M. Bieb. JI64 × clutural pea *P. sativum* L. JI92 and reciprocal crossbreeding JI92 × JI64; *P. elatius* Steven ex M. Bieb. VIR320 × cultural pea *P. sativum* L. WL1238. Next objective was a comparison anatomical analysis of pod structure in the area of ventral and dorsal junction and endocarp structure.

**Key words:** Plant domestication, domestication syndrome, Fabaceae Lindl., genetic mapping, pea, pod, *Pisum* L., shattering.

## OBSAH:

<b>Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>Literární přehled</b> .....	<b>9</b>
1 Domestikace rostlin .....	9
2 Hrách ( <i>Pisum L.</i> ) jako experimentální model pro luskoviny .....	27
3 Biologie rodu hrách ( <i>Pisum L.</i> ) .....	29
<b>Materiál a metody</b> .....	<b>34</b>
4 Materiál .....	34
5 Izolace DNA .....	35
6 Kvantifikace DNA .....	36
7 Amplifikace DNA .....	37
8 Metado CAPS-PCR .....	38
9 JoinMap mapování .....	39
10 Anatomické řezy .....	39
<b>Výsledky</b> .....	<b>43</b>
<b>Diskuse</b> .....	<b>52</b>
<b>Závěr</b> .....	<b>56</b>
<b>Seznam literatury</b> .....	<b>57</b>
<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>64</b>
<b>Seznam tabulek</b> .....	<b>66</b>
<b>Použité zkratky</b> .....	<b>67</b>
<b>Seznam příloh</b> .....	<b>68</b>

## ÚVOD:

Domestikace a později i šlechtění rostlin se od počátků zaměřovaly na určité cíle. Zprvu pravěký člověk sbíral chutné plody a pomáhal tak rozšiřovat daný druh, později začal vysévat pouze ty plodiny, které měly větší plody s vyšší nutriční hodnotou. V minulosti se šlechtění zaměřovalo především na co nejvyšší výnos a díky úzkému výběru rodičovských genotypů se u plodin značně snížila genetická diverzita. Současné šlechtění se snaží již dále neprohlubovat genetickou erozi a naopak metodou introgrese vnášet užitečné geny (především geny rezistence) z planých druhů do kulturních plodin.

Vnášení genů z planých rostlin do plodin s sebou nese i možnost vnesení problematického znaku resp. původního znaku planého druhu. U luskovin je to především dormance semen a pukavost lusků (Hammer, 1984). Proto je nyní snahou odhalit pozici těchto genů a navrhnout na ně jednoduché molekulární markery pro rychlou analýzu. Možná však důležitějším důvodem je porozumění procesu domestikace jako zrychlené evoluce a odhalení genomových oblastí vystavených procesu selekce. Genetické údaje jsou odrazem fylogenetické historie a také postupu populační genetiky (Fuller *et al.*, 2012).

Tato práce je zaměřená na studium genetické podstaty pukavosti lusků u hrachu (*Pisum* L.). Byly zde použity metody genetického mapování pomocí CAPs-PCR pro zúžení intervalu, ve kterém by se gen měl nacházet, resp. pro zpřesnění jeho pozice na vazebné skupině III genomu hrachu (*Pisum* L.). Metoda CAPs kombinuje techniku PCR a RFLP. Principem je nalezení vhodné kombinace amplifikace specifického fragmentu a štěpení vhodnou restriční endonukleázou.

Výsledky analýzy CAPs-PCR mapování je nutno korelovat s fenotypovým projevem, a proto se práce zaměřila také na vyhodnocování fenotypu u RILs linií. Fenotyp byl vyhodnocován formou pozorování v poslední fázi dozrávání. Pro zpřesnění vyhodnocení fenotypu byla prováděna anatomická analýza rodičovských linií. Pracovalo se zde s anatomickými řezy barvenými histochemicky podobně jako v práci Ferrándiz a Fourquin, 2014.

# LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1 DOMESTIKACE ROSTLIN

Počátek domestikace rostlin můžeme datovat do mladší doby kamenné (neolitu) (Harlan, 1992, Smith, 1998). Impulzem bylo několik faktorů. Byla to změna klimatu, protože v době před 11 000 lety ustoupila doba ledová a Země se začala oteplovat (Tassel *et al.*, 2010). V závislosti na změně podmínek člověk změnil svoji životní strategii a přešel z kočovného života k usdlému a postupně začal rozvíjet zemědělství. Prvními plodinami Blízkého východu v době neolitu byla diploidní pšenice jednozrnka (*Triticum monococcum* L.), tetraploidní pšenice dvouzrnka (*T. diccicum* Schrank), ječmen (*Hordeum vulgare* L.), čočka (*Lens culinaris* Med.), hrách (*Pisum sativum* L.), cizrna (*Cicer arietinum* L.) a vikev setá (*Vicia sativa* L.) (Zohary a Hopf, 2000).

Domestikované rostliny se liší od svých planých předků v několika morfofyziologických znacích, z nichž většina je spojena s šířením semen, klíčením, habitem rostliny, velikostí, zbarvením semen a jejich požitelností (Hammer, 1984). Kulturní rostliny jsou dynamické genetické subjekty, a proto ne všechny morfologické, fyziologické, biochemické rozdíly mezi plodinami a jejich divokými předky lze přičíst dávným domestikacím epizodám (Abbo *et al.*, 2013).

Dnes je popsáno přibližně 2 750 tisíc druhů vyšších rostlin, ale domestikováno bylo pouze 1%. (Bennet *et al.*, 2011) V současnosti výživa lidstva závisí pouze na 30 druzích rostlin (Smýkal, 2009). Asi 50% našich potřeb zajišťuje nejpočetnější čeleď Poaceae Barnhart. Patří sem tři nejvýznamnější kulturní plodiny celého světa a to pšenice (*Triticum aestivum* L.) z Euroasie, rýže (*Oryza sativa* L.) z Asie a kukuřice (*Zea mays* L.) z Ameriky. K těmto plodinám lze přiřadit i čirok (*Sorghum* Moench), jako zástupce afrického původu.

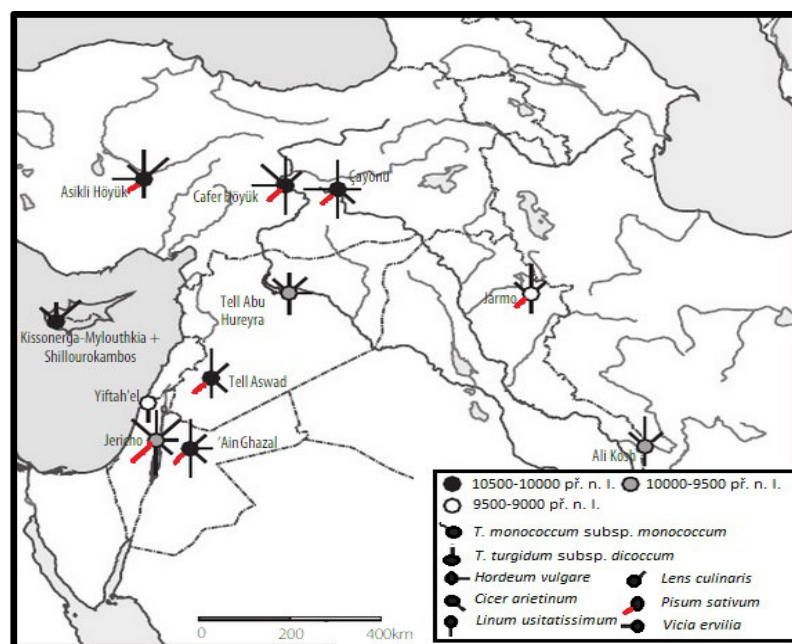
Další důležitou čeledí je také čeleď Fabaceae Lindl., která byla pravděpodobně paralelně domestikována s obilninami. (Abbo *et al.*, 2011) Zástupce čeledi Fabaceae jsou velmi důležití v potravě člověka, jako zdroj bílkovin rostlinného původu.



## 1.1 Proces domestikace

Domestikaci rostlin můžeme definovat jako proces postupné genetické a morfologické přeměny planých forem na kulturní produktivní plodinu. Zpočátku se pravděpodobně jednalo o neuvědomělý proces a teprve později docházelo k cílenému výběru semen z rostlin majících výhodné vlastnosti (Allaby, 2008). Tento proces byl u hlavních plodin dovršen přibližně před čtyřmi tisíci lety a proběhl na několika místech na světě. Dle N. I. Vavilova (1926) rozlišujeme centra původu kulturních rostlin.

Při studiu domestikace se setkáváme s pojmem „founder crops“, který popisuje první domestikované plodiny. Od těchto zakládajících plodin se odrazil proces domestikace, který pokračuje i nadále (Abbo *et al.*, 2009). Jako první byla pravděpodobně domestikována pšenice *Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccum*, *T. monococcum* L. subsp. *monococcum* a ječmen (*Hordeum vulgare* L.) v době 10500 až 10100 let před naším letopočtem. Později byla v jihovýchodní Asii domestikována čočka (*Lens culinaris* Med.) asi 10100 až 9700 let před naším letopočtem, hrách (*Pisum sativum* L.), vikev (*Vicia ervilia* L.) a cizrna (*Cicer arietinum* L.) 9900 až 9500 let před naším letopočtem. Pravděpodobně všechny čtyři luskoviny byly kultivovány již dříve společně s obilninami. Přibližně ve stejnou dobu jako luskoviny byl domestikován i len (*Linum usitatissimum* L.) (obrázek 1) (Zohary a Hopf, 2000).



**Obr. 1:** Archeologická naleziště zakládajících plodin v jihovýchodní Asii (Zohary a Hopf, 2000)

Rostliny byly domestikovány kvůli dosažení výhodných a důležitých znaků pro člověka. Mezi tyto znaky patří například zvětšení velikosti a počtu semen či zásobních hlíz, tvaru semen, zlepšení jejich klíčivosti a chuťových vlastností, eliminace toxických látek, pigmentů semen a mechanických ochranných útvarů (trny, ostny, ...). Dalšími znaky planých druhů byla odolnost k některým chorobám a škůdcům, mrazuvzdornost, vypadávání semen (rozpadavost či pukavost) atd. Je však zcela jisté, že dva znaky byly opravdu klíčové pro úspěšné pěstování a to odstranění dormance semen a zabránění vypadávání semen z klasů, lusků a jiných typů plodů (Hilu, 1993).

Stupeň domestikace často ovlivňuje závislost plodiny na člověku. U některých rostlin může vést až k plné závislosti, což vede ke ztrátě přirozené schopnosti reprodukce např. kukuřice (*Zea mays* L.), banánovník (*Musa* L.) atd. Naopak méně domestikované rostliny mají tendenci navracet se zpět k původní formě příkladem je konopí (*Canabis sativa* L.), mrkev (*Daucus carota* L.), locika setá (*Lactuca sativa* L.) (Cacas *et al.*, 1996). Pouze proso (*Panicum miliaceum* L.) a oves (*Avena sativa* L.) tvoří v současnosti stabilnější ferální populace schopné přežívat delší časové úseky jako plevelná příměs v kulturách jiných polních plodin (Kočár a Dreslerová, 2009).

Některé plodiny jsou často polyploidní a to jak v důsledku allo- nebo autopolyploidie, například pšenice (*Triticum aestivum* L.) - 6x, řepka olejka (*Brassica napus* L. subsp. *napus*) - 4x, bavlník (*Gossypium* L.) - 2x, 4x, tabák (*Nicotiana tabacum* L.) - 4x, jahodník obecný (*Fragaria vesca* L.) - 8x, lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) - 2x, 3x, 4x aj. (Huang *et al.*, 2002; Wendel, 1989; Murad *et al.*, 2002; Ames a Spooner, 2008; Huamán a Spooner, 2002). Přesto některé plodiny jako rýže (*Oryza sativa* L.), ječmen (*Hordeum, vulgare* L.) a kukuřice (*Zea mays* L.) byly domestikovány, aniž by prošly změnou ploidie (Doebley *et al.*, 2006).

Výhodou polyploidie pro organismus je především rozšíření jeho adaptačních schopností a u kulturních plodin například zvýšení výnosu díky robustnějšímu růstu, často lepší konkurenceschopnosti apod. Vznik polyploidního stavu je často komplikovaný a v případě pšenice (*Triticum aestivum* L.) tento proces musel proběhnout opakovaně. Tetraploidní i hexaploidní druhy pšenic jsou přirozenými alopolyploidy, kteří vznikly mezidruhovým křížením a následně spontánním zdvojením chromozomů (amfidiploidie) před 2,5 až 4,5 miliony lety (Matsuoka, 2011).

## Spontánní polyploidizace pšenice - vznik mezirodových a mezidruhových hybridů

*Aegilops speltoides* Tausch  $\times$  *Triticum boeoticum* Boiss.  
2n = 14  2n = 14  
genom BB  genom AA

$\Rightarrow$  *T. dicoccoides* Körnicke  
4n = 28  
genom AA BB  
(tetraploid) 14 párů chromozomů

$\Rightarrow$  z ní pěstovaná dvojnásobná *T. dicoccum* Schrank  
 $\Rightarrow$  z ní *T. durum* Desf., *T. turgidum* L., *T. polonicum* L.

*T. dicoccum* Schrank  $\times$  *Aegilops tauschii* Taush  
4n = 28  2n = 14  
genom AA BB  genom DD

$\Rightarrow$  *T. aestivum* L., *T. spelta* L., *T. compactum* Host ...  
6n = 42  
genom AA BB DD  
(allohexaploid) 21 párů chromozomů

## 1.2 Rychlost domestikace

Kulturní plodiny vznikaly ze svých planých předků činností člověka, a proto jsou domestikáční centra shodná s místem výskytu planých druhů (primární centra diverzity) a s podmínkou výskytu lidské populace. Centra původu kulturních plodin byla poprvé definována ruským botanikem N. I. Vavilovem v roce 1926. Z archeologických nálezů můžeme v současnosti pomocí molekulární genetiky a genomiky určit pravděpodobné místo a rekonstruovat časovou periodu domestikace. Často docházelo k domestikaci na více místech nebo v různých časových periodách. Jedná se například o domestikaci dýně (*Cucurbita pepo* L.), ječmene (*Hordeum* L.), fazolu (*Phaseolus* L.) (Fuller *et al.*, 2012).

Terénní experimenty prokázaly, že k domestikaci plodiny stačí pouhých 20 let, jsou-li k tomu správné podmínky a znalosti (Hillman a Davies, 1990). Z toho plyne, že dlouhé období pre-domestikační kultivace není podmínkou pro úspěšný vývoj zemědělství (Allaby, 2008). Proces domestikace byl ovlivňován různými faktory, jako je počet a rozsah působení genů, fenotypová variabilita znaku, četnost mutací, velikost populace, typ reprodukce atd. Pomocí analýz a počítačového modelování bylo zjištěno, že změna nerozpadavého klasu je u pšenice jednozrnky (*T. monococcum* L.) podmíněna pouze jedním genem a v případě jeho mutace je tento domestikační znak fixován již během 200 let (Hillman a Davies, 1990).

Je nutné uvědomit si, že na počátcích domestikace docházelo spíše k náhodnému výběru a rychlost domestikace tudíž nebyla tak velká. Docházelo také ke zpětnému křížení s původními formami a geneticky i biologicky dominantními planými druhy. Také je nutno vzít v potaz málo rozvinuté zemědělství a malé schopnosti prvních zemědělců bránit se nepříznivým přírodním podmínkám. Další otázkou, ale i limitem v prvních fázích zemědělství (9000-5000 př. n. l.) bylo rozšíření prvních domestikovaných forem a šíření vlastních znalostí o zemědělství. Později, od doby zámořských objevů, docházelo stále snadněji k introdukci rostlin i mezi kontinenty, především po roce 1492. Tímto otevřením světa se však začaly šířit i škůdci a choroby, které daly impuls ke vzniku složitějšího šlechtitelského procesu.

### **1.3 Centra diverzity a původu plodin**

Na světě nalezneme několik oblastí, které jsou označovány jako centra diverzity plodin a rozdělují se na primární a sekundární (Vavilov, 1992). Primární centrum je taková oblast, kde vznikl a vyskytuje se planý druh plodiny a zároveň se zde kulturní druh oddělil od planého předka. V jedné lokalitě se často vyskytuje planá forma vedle kulturní.

Sekundární centra jsou pak taková, kde proces vzniku nových forem proběhl nebo stále probíhá, ale nemusí se zde vyskytovat jeho plané formy. Nacházejí se zde druhy a formy, které jsou geneticky velmi různorodé a byly do oblasti včleněny introdukcí (úpl-

ná absence planých předků). Příkladem je rod pšenice (*Triticum* L.) v Etiopii, obdobně jako ječmen (*Hordeum* L.), len (*Linum* L.), oves (*Avena* L.) i hrách (*Pisum* L.).

Studiem domestikačních změn se zabývalo mnoho vědců a již v prvním století našeho letopočtu se objevily spisy zabývající se tímto problémem. Jedná se například o dílo *Historia Naturalis* sepsané Pliniem Starším (77 n. l.), kniha *De Re Rustica* od Columelli (60 n. l.), později se domestikací zabýval Charles Darwin v díle *Variation of Animals and Plants under Domestication* (1868) a také botanik Alfonse De Candolle v práci *Géographie Botanique Raisonnée* (1855).

Nejvýznamnější prací však bezesporu byla kniha ruského botanika Nikolaje Ivanoviče Vavilova *Centers of Origin of Cultivated Plants* vydaná v roce 1926. V této publikaci je svět rozdělen do deseti center podle původu kulturních druhů. Z hlediska důležitosti domestikovaných rostlin je nejvýznamnějším centrem Blízký východ.

**Blízký východ**, malá Asie, je centrem původu pšenice (*Triticum* L.), žita (*Secale* L.), ječmene (*Hordeum* L.), ovsa (*Avena* L.), některých luskovin, máku (*Papaver* L.), lnu (*Linum* L.) a ovocných druhů. Celkově do tohoto centra můžeme zařadit asi 83 druhů (obrázek 2-1).

Dalším centrem je **Indie**, kde má původ rýže (*Oryza sativa* L.), proso (*Panicum miliaceum* L.), lilek (*Solanum* L.), okurka (*Cucumis sativus* L.) a některé luskoviny (obrázek 2-2). Zvlášť je pak vyčleněná **indomalajská** oblast, která je centrem původu cukrové třtiny (*Saccharum officinarum* L.), kokosové palmy (*Cocos nucifera* L.), banánovníku (*Musa* L.) a dalších druhů ovoce (obrázek 2-3).

**Střední Asie** zaujímá Thajsko, Barmu, Vietnam a tyto oblasti jsou centrem původu pro pšenici (*Triticum* L.), révu vinnou (*Vitis vinifera* L.), bavlník (*Gossypium* L.), len (*Linum* L.), mrkev (*Daucus carota* L.), cibuli (*Allium cepa* L.) a některé luskoviny jako je hrách (*Pisum* L.) a čočka (*Lens culinaris* Med.) (obrázek 2-4).

**Čína** jako centrum diverzity plodin má nejvyšší zastoupení druhů a to asi 138. Z oblasti Číny pochází rýže (*Oryza sativa* L.), proso (*Panicum miliaceum* L.), pohanka (*Fagopyrum esculentum* Mill.), sója (*Glycine max* (L.) Merr.), mák (*Papaver* L.), konopí (*Canabis sativa* L.), citrusy a čajovník čínský (*Camellia sinensis* L., Kuntze) (obrázek 2-5).

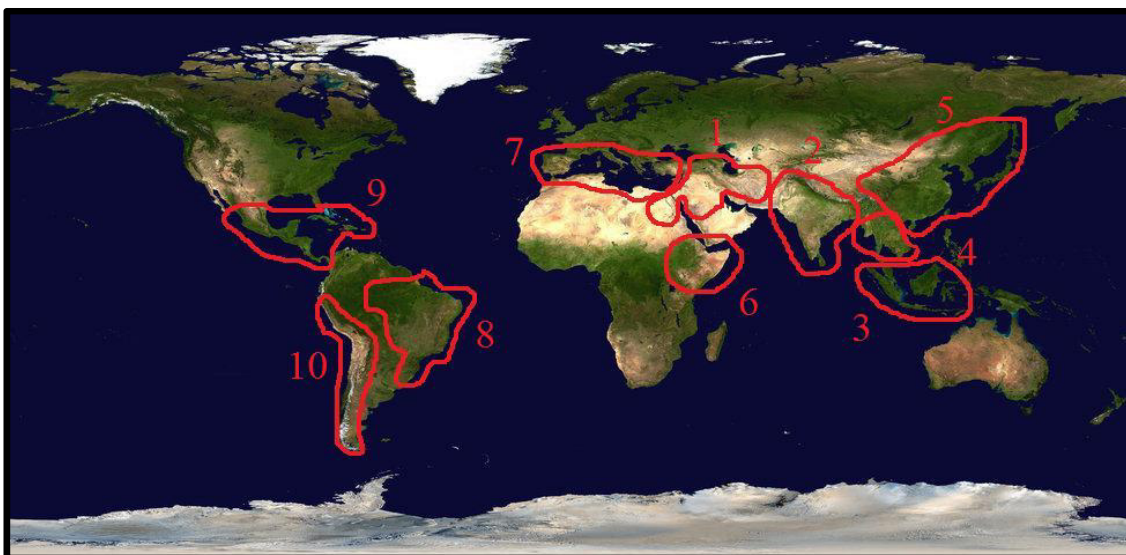
V Africe je centrum diverzity umístěno v oblasti **Etiopie**. Tato etiopská oblast je místem původu pro kávovník (*Coffea* L.), čirok (*Sorghum bicolor* L.), ječmen (*Hordeum vulgare* L.), některé druhy luskovin a koření (obrázek 2-6).

**Středozeří** zaujímající oblast táhnoucí se od Portugalska po hranici Turecka na evropské straně a pobřežní linii Afriky, je centrem původu pšenice (*Triticum* L.), ječmene (*Hordeum* L.), řepy (*Beta* L.), hořčice (*Sinapis* L.), olivovníku (*Olea* L.), chmele (*Humulus* L.), některých druhů brukvovitých atd. (obrázek 2-7).

Amerika je zastoupena třemi centry původu. Nejméně druhů kulturních plodin má centrum ležící v oblasti **Brazílie a Paraguaye** (asi 13 druhů). Původní jsou zde plané fazole (*Phaseolus* L.), maniok (*Manihot* Mill.), podzemnice olejná (*Arachis hypogaea* L.), ananasovník (*Ananas* Mill.) a kaučukovník (*Hevea brasiliensis* (Willd, ex Juss.) Müll.Arg.) (obrázek 1-8).

Dalším centrem původu je **Střední Amerika a Mexiko**. Do této oblasti patří kukuřice (*Zea mays* L.), fazole (*Phaseolus* L.), tykev (*Cucurbita pepo* L.), laskavec (*Amaranthus* L.), povijnice batátová (*Ipomoea batatas* L.), kakaovník (*Theobroma cacao* L.), ovocné a přadné druhy rostlin (obrázek 2-9).

Poslední oblastí jsou **Andy**, které jsou centrem původu pro brambor (*Solanum tuberosum* L.), lilek rajče (*S. lycopersicum* L.), tabák (*Nicotiana* L.), některé druhy zeleniny a podobně (obrázek 2-10) (Vavilov, 1992).



1-Blízký východ; 2-Indie; 3-Indomalaisie; 4-Střední Asie; 5-Čína; 6-Etiopie; 7-Středozeří;  
8-Brazílie a Paraguay; 9-Střední Amerika a Mexiko; 10-Andy

**Obr. 2:** Centra původu kulturních druhů

## 1.4 Domestikované druhy rostlin

Domestikace a historie šlechtění druhů měla velký vliv na rozmanitost současných moderních plodin. Většina agronomických a evolučně důležitých rysů je kvantitativní povahy. Fenotypová variace těchto vlastností je způsobena kombinací segregace ve více kvantitativní lokusech (QTL = Quantitative Trait Locus), podmínkami prostředí a interakcí mezi geny.

Člověk se v průběhu procesu moderního šlechtění vždy snažil přiblížit se tzv. ideotypu. Ideotyp je hypotetický ideální forma rostliny, která má maximální výnos vůči svému genetickému potenciálu. V každém z těchto domestikačních a šlechtitelských kroků, došlo ke změně genofondu (Abbo *et al.*, 2011). Více domácích, původních genofondové rezervy, mají užší rozsah diverzity. Kultivary mají užší fenotypovou rozmanitost ve vztahu k méně domácím krajovým odrůdám, např. kukuřice (*Zea mays* L.), ale v některých případech dojde i k rozšíření fenotypové rozmanitosti, jak dokládá například tvar ovoce, velikosti a barva rajčat (*Solanum lycopersicum* L.).

Plodiny pěstované v současnosti mají obecně malou genetickou diverzitu, některé alely mohou být v genomu přítomny, ale nemohou být využívány nebo došlo k jejich ztrátě v procesech šlechtění. Tato redukce je spojena s malou velikostí populace, genetickým driftem, dobou působení a bývá označována jako tzv. efekt hrdla láhve (bottleneck effect).

V tabulce (tabulka 1) jsou uvedeny nejznámější a nejvýznamnější domestikované druhy.

**Tab. 1:** Výběr nejvýznamnějších domestikovaných plodin

<b>banánovníkovité</b> (Musaceae Juss.)	<b>banánovník</b> ( <i>Musa</i> L.)
<b>bobovité</b> (Fabaceae Lindl.)	<b>hrách</b> ( <i>Pisum sativum</i> L.), <b>cizrna</b> ( <i>Cicer</i> L.), <b>sója</b> ( <i>Glycine max</i> (L.) Merr.), <b>podzemnice</b> ( <i>Arachis hypogaea</i> L.), <b>fazol</b> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.), <b>čočka</b> ( <i>Lens culinaris</i> Med.)
<b>brukvovité</b> (Brassicaceae Burnett)	<b>hořčice</b> ( <i>Sinapis</i> L.), <b>křen</b> ( <i>Armoracia rusticana</i> Gaertn., Mey. et Scherb.), <b>řepka</b> ( <i>Brassica napus</i> L.), <b>brukev</b> ( <i>Brassica oleracea</i> L.), <b>ředkev</b> ( <i>Raphanus sativus</i> L.)
<b>hvězdnicovité</b> (Asteraceae Bercht. et J. Presl)	<b>slunečnice</b> ( <i>Helianthus annuus</i> L.), <b>locika</b> ( <i>Lactuca sativa</i> L.), <b>čekanka</b> ( <i>Cichorium endivia</i> L.)
<b>lilkovité</b> (Solanaceae Juss.)	<b>brambor</b> ( <i>Solanum tuberosum</i> L.), <b>paprika</b> ( <i>Capsicum annuum</i> L.), <b>rajče</b> ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.)

<b>lipnicovité</b> (Poaceae Barnhart)	<b>ječmen</b> ( <i>Hordeum vulgare</i> L.), <b>pšenice</b> ( <i>Triticum aestivum</i> L.), <b>oves</b> ( <i>Avena sativa</i> L.), <b>žito</b> ( <i>Secale cereale</i> L.), <b>rýže</b> ( <i>Oryza sativa</i> L.), <b>čirok</b> ( <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench), <b>proso</b> ( <i>Panicum miliaceum</i> L.), <b>kukuřice</b> ( <i>Zea mays</i> L.), <b>cukrová třtina</b> ( <i>Saccharum officinarum</i> L.)
<b>tykvovité</b> (Cucurbitaceae Juss.)	<b>okurka</b> ( <i>Cucumis sativus</i> L.), <b>tykev</b> ( <i>Cucurbita pepo</i> L.), <b>meloun</b> ( <i>Cucumis melo</i> L.)
<b>prýšcovité</b> (Euphorbiaceae Juss.)	<b>maniok</b> ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz), <b>skočec</b> ( <i>Ricinus communis</i> L.), <b>kaučukovník</b> ( <i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex Juss.) Müll.Arg.)
<b>rdesnovité</b> (Polygonaceae Juss.)	<b>pohanka</b> ( <i>Fagopyrum esculentum</i> Mill.)
<b>routovité</b> (Rutaceae Juss.)	<b>pomerančovník</b> ( <i>Citrus chinensis</i> (L.) Osbeck), <b>citroník</b> ( <i>Citrus limon</i> (L.) Burm.f.), <b>mandarinka</b> ( <i>Citrus reticulata</i> Blanco)
<b>růžovité</b> (Rosaceae Juss.)	<b>jabloň</b> ( <i>Malus domestica</i> Borkh.), <b>hrušeň</b> ( <i>Pyrus communis</i> L.), <b>slivoň</b> ( <i>Prunus domestica</i> L.), <b>broskvoň</b> ( <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch), <b>mandloň</b> ( <i>Prunus dulcis</i> (Mill.) Webb), <b>meruňka</b> ( <i>Prunus armeniaca</i> L.), <b>jahody</b> ( <i>Fragaria vesca</i> L.)
<b>slézovité</b> (Malvaceae Juss.)	<b>bavlník</b> ( <i>Gossypium</i> L.), <b>ibiškovec (okra)</b> ( <i>Abelmoschus esculentum</i> Moench.) ( <b>kenaf</b> ) ( <i>Hibiscus cannabinus</i> L.)

## 1.5 Domestikační syndrom u rostlin

Proces domestikace lze rozdělit do tří fází (Harris, 1989). První fází je sběr volně rostoucích jedlých plodů a jejich uchovávání, druhou fází je pěstování volně rostoucích rostlin (tzv. pre-domestikace) a třetí fází je fixace domestikačního syndromu (vznik skutečného zemědělství) (Allaby, 2010).

Domestikační syndrom je představován trvalou fenotypovou změnou, která odlišuje planý druh od kulturní plodiny souborem vlastností (tabulka 2). Tento znak je obvykle brán jako definitivní ukazatel domestikované plodiny. Zvláštností je, že znaky domestikačního syndromu si jsou velmi podobné i u domestikovaných druhů vzdálených oblastí napříč většinou kulturních plodin.

**Tabulka 2:** Znaky domestikačního syndromu

Větší zásobní orgány	plody, semena hlízy	Př. rajče ( <i>S. lycopersicum</i> L.) Př. brambor ( <i>S. tuberosum</i> L.)
Tvar plodu, semene		Př. paprika ( <i>Capsicum annuum</i> L.)
Šíření semen	ne-rozpadavost klasu ne-pukavost lusku	Př. ječmen ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)




		Př. hrách ( <i>P. sativum</i> L.)
Dormance semen a hlíz	(snížení nebo její ztráta)	Př. řepka olejka ( <i>Brassica napus</i> L.)
Vernalizace	(rostliny jsou citlivější na fotoperiodu)	Př. pšenice ( <i>T. aestivum</i> L.)
Fotoperiodismus	dlouhodobý krátkodobý neutrální	Př. pšenice ( <i>T. aestivum</i> L.) Př. kukuřice ( <i>Zea mays</i> L.) Př. fazol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)
Architektura rostliny	apikální dominance odnožování popínavost keřovitost	Př. slunečnice ( <i>Helianthus annuus</i> L.) Př. ječmen ( <i>Hordeum vulgare</i> L.) Př. réva vinná ( <i>Vitis vinifera</i> L.) Př. ostružiník maliník ( <i>Rubus idaeus</i> L.)
Partenokarpie	(bezsemenost)	Př. ananasovník ( <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.)
Pohlavnost květu	Samosprašnost (izolace homozygota)	Př. hrách ( <i>P. sativum</i> L.)
Změny ploidie	(zvyšování sad chromosomů)	Př. pšenice ( <i>T. aestivum</i> L.) (6x)
Víceletost X jednoletost	Dvouletá vegetační forma – ozimá Jednoletá vegetační forma – jarní	Př. pšenice ( <i>T. aestivum</i> L.) Př. kukuřice ( <i>Zea mays</i> L.)
Eliminace toxických látek	Glykoalkaloidy (solanin, chakonin) Hořkost (amygdalin)	Př. brambor ( <i>S. tuberosum</i> L.) Př. plody mandloně ( <i>Amygdalus communis</i> L.)
Zvýšení obsahových látek	Antokyany Sacharosa	Př. réva vinná ( <i>Vitis vinifera</i> L.) Př. řepa cukrová ( <i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>altissima</i> )

Člověk záměrně vybíral semena rostlin, které byly svými vlastnostmi vhodné pro pěstování a zajišťovaly kvalitnější stravu a tím uplatňoval genetickou selekci. Některé kulturní plodiny však byly v minulosti nejdříve pouze plevely mezi dříve domestikovanými plodinami. Např. žito (*Secale cereale* L.) a oves (*Avena sativa* L.) existovaly nejprve jako plevely a až po nějakém čase se začaly selektovat a pěstovat odděleně.

Rod *Pisum* L. patří do široké skupiny rostlinných rodů, které si vyvinuly balistické šíření semen do okolního prostředí. Proces puknutí lusku se odehrává v tzv. zóně dehiscence podél ventrálního i dorzálního švu. Buňky exokarpu jsou zde zesíleny a sklerenchymatické vrstvy endokarpu jsou uspořádány diagonálně v rovinách kolmých na sebe. Sesychající stěny lusku se zmenšují, stáčí se v opačném směru a po dosažení maximálního pnutí se chlopně lusku dynamicky oddělí a semena jsou vystřelena do okolí.

Ambrose a Ellis (2008) testovali balistický efekt šíření semen u pukavých linií planého hrachu *P. elatius* Steven ex M. Bieb. JI 224 a JI 1794. Semena byla rozptýlena až do vzdálenosti až 357 cm od mateřské rostliny (tabulka 3).

**Tabulka 3:** Balistický efekt šíření semen hrachu (*Pisum* L.) (převzato a upraveno dle Ambrose a Ellis, 2008)

		<b>JI 1794</b> výška rostliny 85 cm	<b>JI 224</b> výška rostliny 32 cm
	Průměr	85,8 cm	71 cm
	Medián	52,5 cm	54 cm
	Minimum	1cm	14 cm
	Maximum	357 cm	274 cm

Dormance semen je také důležitý znak i pro moderní šlechtění plodin. Plané druhy různými mechanismy ovlivňují klíčivost semen ve volné přírodě a zajišťují si tak zachování svého druhu pro případ nepříznivých podmínek. Například u lupiny (*Lupinus angustifolius* L.) jsou semena planých druhů tvrdá a nepropustná pro vodu a pouze malé procento semen nabobtná (genotyp *Moll* / -). U kulturních druhů lupiny došlo k mutaci a vzniku recesivní alely (genotyp *moll* / *moll*), takové rostliny lehce klíčí a využívají se v zemědělství (Nelson et al., 2006).

Primární domestikovanou vlastností u pšenice (*Triticum aestivum* L.) je nerozpádavost klasu (nonshattering) a sekundárními znaky je redukce pluch (zjednodušení mláčení), změny rostlinné architektury, zvýšený obsah sacharidů v zrna, velikost a ztráta dormance semen (fotoperiodická necitlivost).

Rýže setá (*Oryza sativa* L.) byla prvotně domestikována od svého divokého předka *Oryza rufipogon* Griff. v Číně asi před 9000 lety, kdy byla vytvořena skupina japonica, která pak nahradila primitivnější druhy (*indica*) v Indii před asi 4000 lety. (Flint-Garcia, 2013). Domestikací bylo dosaženo snížení rozpadavosti klasu prostřednictvím genu *Sh4* kódující jaderný transkripční faktor, který řídí vývoj odlučovací vrstvy. Jednonukleotidová substituce (G/T) ve druhém exonu *Sh4* vede ke změně kódování aminokyselin a způsobuje nižší schopnost vazby protejnu SH4 na DNA (Li et al., 2006). Došlo také

k redukci dormance semen pomocí regulačního genu řídící zrání semen a ke zvýšení počtu zrn (Sugimoto *et al.*, 2010).

Uvádí se, že začátek domestikace sóji (*Glycine max* (L.) Merr.) byl asi před 3000 až 5000 lety v Číně. Během tohoto procesu došlo k velkému snížení genetické variability sóji. Domestikace sóji se soustřeďovala především na větší velikost semen, upravení fotoperiody, světlejší barvu semen a zabránění pukavosti lusku (nonshattering) (Flint-Garcia, 2013).

## 1.6 Geny spojené s pukavostí u rostlin

Jak už bylo řečeno, jedním z klíčových znaků domestikačního syndromu je rozpadavost (pukavost) plodů. Největší zájem byl vždy o studium rozpadavosti klasu u pšenice (*Triticum* L.) a rýže (*Oryza* L.) a o studium pukavosti šesule řepky (*Brassica napus* L.) a lusku sóji (*Glycine max* L.).

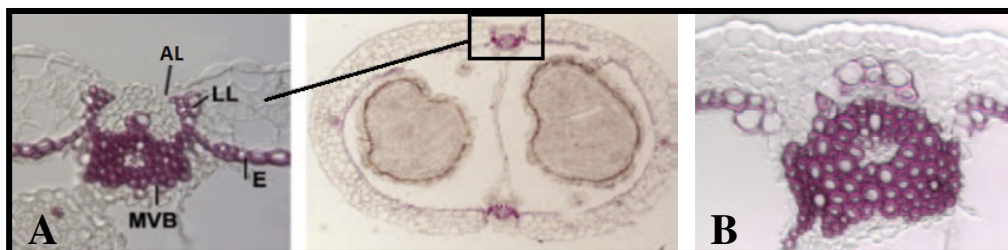
U obilovin je ztráta rozpadavosti klasu obvykle způsobena absencí nebo modifikací odlučovací vrstvy na bázi klásku. U rostlin čeledi Brassicaceae a Fabaceae se jedná o samovolné otevření ventrálního i dorzálního švu u suchého zralého plodu. Přístupy molekulární genetiky vedly k identifikaci několika transkripčních faktorů podílejících se na regulaci pukavosti u modelového druhu huseníčku, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., a podařilo se identifikovat homologní geny v ostatních významných druzích brukvovitých, včetně řepky olejky (*Brassica napus* L.) (Lewis *et al.*, 2006). Na tuto práci navázala další výzkum Cristina Ferrándiz *et al.* a spolu publikovali práce zabývající se pukavostí plodu huseníčku (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) a tolíce (*Medicago* L.) (viz níže).

Šíření semen u bobovitých rostlin je zprostředkováváno ústředním balistickým mechanismem, tzv. pukavostí. Lusk hrachu vzniká z jednoho plodolistu a dynamicky puká dvěma švy v místě srůstu plodolistu i v místě centrálního svazku cévního (Ambrose *et al.*, 2008). Jak lusk zraje, sesychá a jeho stěny se zmenšují v opačných směrech. Vytváří se tak napětí mezi chlopněmi a to se uvolní prasknutím švů a vystřelením semen. Studium genomu hrachu bylo zjednodušeno pomocí identifikace vzájemných syntenií mezi

genomy hrachu (*Pisum L.*), tolíce (*Medicago truncatula Gaertn.*), štírovníku (*Lotus japonicus Willd.*) a sóji (*Glycine Willd.*). Pomocí nástrojů bioinformatiky byly sestaveny konsenzuální mapy, které umožňují hledat pozici téměř jakékoliv genové sekvence na chromosomech hrachu (Bordat *et al.*, 2011).

Bylo zjištěno, že u čočky (*Lens culinaris*) je pukavost řízena jedním lokusem (Ladizinski, 1998), zatímco u vigny zlaté (*Vigna radiata L.*) Wilezek dvěma lokusy (Isemura *et al.*, 2012), kdy jeden řídí počet zákrutů po délce lusku a druhý se podílí na otevření lusku. Podle studie Weeden *et al.* 2002, Weeden 2007, je pukavost hrachu řízena obdobně dvěma lokusy. Semi-dominantní a monogenní *Dpo1* lokus je vázán na vazebnou skupinu LGIII (Weeden, 2007), zatímco *Dpo2* a *GP* lokusy byly zjištěny pouze u některých kříženců (Weeden *et al.*, 2002).

V poslední době byly identifikovány homologní geny pukavosti, (Nanni *et al.*, 2011, Gioia *et al.*, 2013) Oba tyto geny patří do rodiny MADS-boxových genů s širokou škálou funkcí (tvorba květů, kontrola kvetení) a bylo prokázáno, že se podílejí na pukavosti šesule huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) (Liljegren *et al.*, 2000). Plod většiny brukvovitých, jako je právě plod huseníčku (*Arabidopsis sp.*), puká čtyřmi švy v zóně dehiscence (DZ = dehiscence zone). Ve zralé šesuli DZ zahrnuje odlučovací vrstvu (AL = abscission layer) a k ní přiléhající vrstvu lignifikovaných buněk. Při sesychání dochází ke zvyšování mechanického napětí a následnému oddělení chlopní. MADS-box geny *FRUITFULL (FUL)*, *SHATTERPROOF 1 a 2 (SHP1/2)* a helix-loop-helix gen pukavosti *INDEHISCENT (IND)*, jsou hlavními regulátory tvorby zóny pukavosti a jejich funkcí je i dřevnatění přesné podskupiny buněk podél DZ a diferenciací odlučovací vrstvy (Liljegren *et al.*, 2004). Gen *FUL* u plané rostliny standardního typu (WT = wild type) potlačuje expresi *SHP* a potažmo i expresi *IND* a *ALCATRAZ (ALC)*, fenotypovým projevem je pak pukavost šesule (obrázek 3-A). Dvojitý mutant *shp1, shp2* nevytváří funkční DZ, nedochází k lignifikaci a plody následně nepukají (obrázek 3-B). Histochemické barvení floroglucinolem v kyselém prostředí, je postaveno na reakci barviva s látkami fenolické povahy (př. lignin). Lignifikované buňky reagují s floroglucinolem za vzniku tmavě fialového zbarvení (Ferrándiz a Fourquin, 2014).



A-řez šesulí WT rostliny; B-řez šesulí double-mutanta *shp1 shp2*; AL-odlučovací vrstva; E-endokarp; LL-lignifikovaná vrstva; MVB-středové svazky cévní

**Obr. 3:** Příčný řez šesulí huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) (Ferrándiz a Fourquin, 2014)

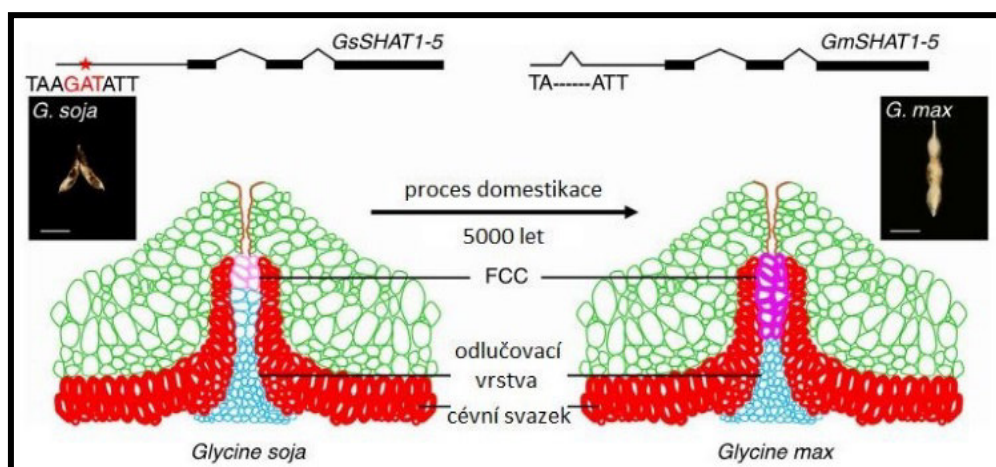
Genetické analýzy pukavosti u lusu sóji vedly k identifikaci majoritních QTL lokusů. Přítomnost těchto QTL lokusů (*qPDH1*) byla identifikována pomocí genetického mapování (Funatsuki *et al.*, 2006, 2008, 2012). Na rekombinantních inbredních liniích (RILs) spolu se znalostí fenotypu a genomové sekvence, bylo možné nalézt jednonukleotidové polymorfismy (SNP) sloužící následně jako markery pro mapování. Doprovodnými mikrosatelitními markery (SSR = microsatellites markers) pro pukavost byly Sat\_093 a Sat\_366 lokusy. Díky rekombinační události identifikované mezi oběma těmito doprovodnými markery, byl vymezen *qPDH1* lokus v malém genetickém intervalu 47 kb, ohraničený markery SNP10 a SNP6. Sekvenční analýzou byl identifikován indel (insertion/deletion) 113 bp v promotorové oblasti genu *Gm16g25600* kódující bZIP-typ transkripční faktor (Gao a Zhu, 2013).

Rezistence k pukavosti u sóji (*Glycine max* (L.) Merr.) spočívá v masivní lignifikaci sekundárních buněčných stěn v pruhu sklerenchymatických vláken ventrálního cévního svazku (FCC = fibre cap cells) a v práci Yang Dong *et al.* (2014) byl identifikován gen z oblasti QTL *qPDH1*, který kóduje NAC-doménový gen, který má funkci jako sekundární článek aktivace zesílení buněčné stěny. Gen ležící na šestnáctém chromosomu byl označen jako *SHATTERING1-5* (*SHAT1-5*). Tento gen funkčně aktivuje sekundární biosyntézu buněčné stěny a výrazně podporuje sekundární tloušťnutí buněčných stěn v pruhu sklerenchymatických vláken. Plody planého druhu sóji (*Glycine soja* Sieb. a Zucc.) a kulturní sóji (*Glycine max* Merr. (L.)) byly zkoumány po stránce anatomické a také pomocí homologní genomické analýzy *Glycine* versus *Arabidopsis*.

U dvanácti vybraných kandidátních genu byla analyzována nukleotidová rozmanitost a pouze u genů *Glyma04g39210* a *Glyma16g02200* bylo nalezeno její dramatické snížení u kulturního druhu, což naznačuje přítomnost selekce. Procházením QTL map sóji (Grant *et al.*, 2010), se potvrdilo, že gen *Glyma16g02200* je umístěn v rámci identi-

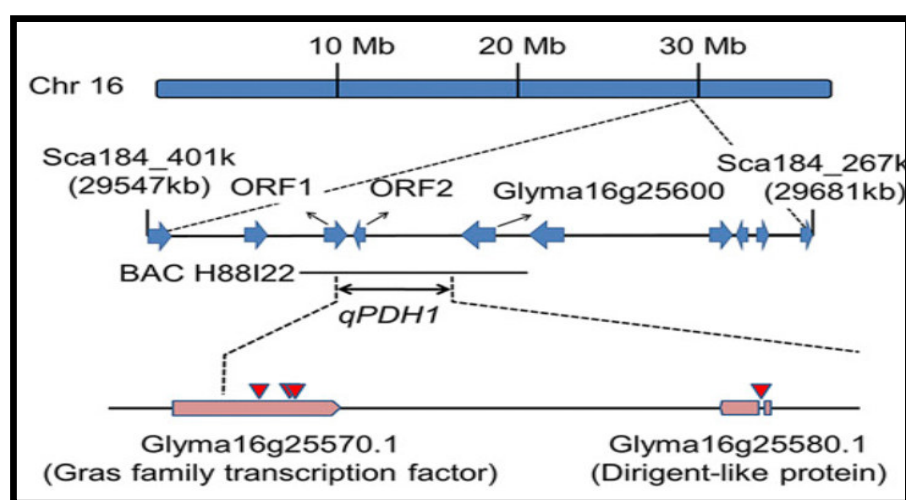
fikované QTL oblasti spojené s pukavostí (pod dehis 1-5) a kóduje NAC-doménový transkripční faktor (homologie s *AtNST1/2 Arabidopsis thaliana*), a proto byl označen jako *SHATTERING1-5*. Bylo provedeno stanovení expresního profilu *SHAT1-5* genu (pomocí kvantitativní real-time PCR) a následně byla provedena také detekce *SHAT1-5* proteinů (GmSHAT1-5 a GsSHAT1-5) pomocí specifické protilátky. Ukázalo se, že proteiny jsou obsaženy v buňkách pruhu sklerenchymatických vláken u ventrálního švu ve fázi dozrávání.

Expresse GmSHAT1-5 (gen *SHAT1-5* u *Glycine max*) je patnáctinásobně vyšší než u alely *G. soja*, což bylo dokázáno jak real-time PCR z buněk oblasti pruhu sklerenchymatických vláken ventrálního cévního svazku tak i real-time PCR z buněk odlučovací vrstvy získaných laserovou mikrodisekcí. Biologická funkce byla ověřena pomocí komplementace mutantů *Arabidopsis thaliana*. Expresse GmSHAT1-5 and GsSHAT1-5 byla v mutantních rostlinách kontrolována promotorem huseníčku (*pAtSND1* a *pAtNST1*) a výsledným projevem byl fenotyp vykazující pukavé šesule. Prokázalo se, že oba tyto proteiny mají konzervativní funkci pro aktivaci sekundární buněčné stěny u huseníčku (*Arabidopsis* Heynh. in Holl & Heynh). Testovány byly také *cis*-regulační domény, pomocí transgenních konstruktů s mutací v hlavních vazebných místech GAPP proteinů (Hosoda *et al.*, 2002) od AGAT do ACTA. Bylo zjištěno, že element AGAT potlačuje expresi histochemického markerového genu GUS::*GsSHAT1-5 in vivo*. Represivní prvek významně zvyšuje specifickou expresi GmSHAT1-5. DNA polymorfismus v *SHAT1-5* lokusu sóji odhalil změnu sekvence v promotoru genu absencí tří nukleotidů GAT (obrázek 4) (Dong *et al.*, 2014).



**Obr. 4:** Vývoj domestikace sóji (*Glycine Willd.*) (Dong *et al.*, 2014)

V prosinci 2014 (Funatsuki *et al.*, 2014) bylo publikováno, že hlavní gen *Pdh1* kontrolující pukavost lusku, kóduje dirigent-like protein, který je součástí DIR superrodiny (obrázek 5). Pukavé genotypy vykazují vysokou expresi genu *Pdh1* v lusku a to zejména ve sklerenchymatické vrstvě endokarpu v době zahájení ukládání ligninu do buněčných stěn (3 dny po opylení). Zvýšená lignifikace je přímo úměrná síle stočení lusků při nízké vlhkosti. Recessivní alely *pdhl* jsou geograficky strukturovány a vyskytují se především v genotypech z polosuchých oblastí 4íny a také v moderních odrůdách ze Severní Ameriky. Naopak původní alela *Pdh1* je přítomna v genotypech z Japonska, v prostředí s vlhčím klimatem.



Obr. 5: Gen *Pdh1* kódující dirigent-like protein sóji (*Glycine Willd.*) (Funatsuki *et al.*, 2014)

U nepukavých genotypů je gen *pdhl* defektní. Byl identifikován jednonukleotidový polymorfismus v kódující sekvenci genu, který má, u genotypů rezistentních k pukavosti, za následek vznik předčasného stop kodonu. Tento polymorfismus se dá lehce detekovat pomocí metody CAPs-PCR (Funatsuki *et al.*, 2014).

*Medicago truncatula* Gaertn. je taxonomicky nejbližší modelový druh pro luskoviny jako je hrách (*Pisum L.*), čočka (*Lens Mill.*), bob (*Vicia L.*) a cizrna (*Cicer L.*). Jeho genom je tvořen šestnácti páry chromosomů a k dispozici jsou sekvenované genotypy, soubory mutantních linií a detailní fyzické a genetické mapy (Young *et al.*, 2005). Rod *Medicago L.* má asi 87 druhů a u některých se vyskytují stočené (*M. noena* Boiss.) nebo stočené a ostnaté lusky (*M. truncatula* Gaertn.) nebo jsou lusky rovné (*M. ruthenica* (L.) Ledeb. *M. polyceratia* (L.) Trautv.) (obrázek 6). Někteří autoři spojují tuto zvláštní morfolo-



gii se zvýšenou odolností proti škůdcům respektive s nižší dostupností pro hmyz (Small a Brookes, 1984), jiní s adaptací na podmínky a lepší šíření semen.



A-plod *M. truncatula*; F-plod *M. noeana*; K-plod *M. ruthenica*; P-plod *M. polyceratia*;  
měřítko = 0,5 cm

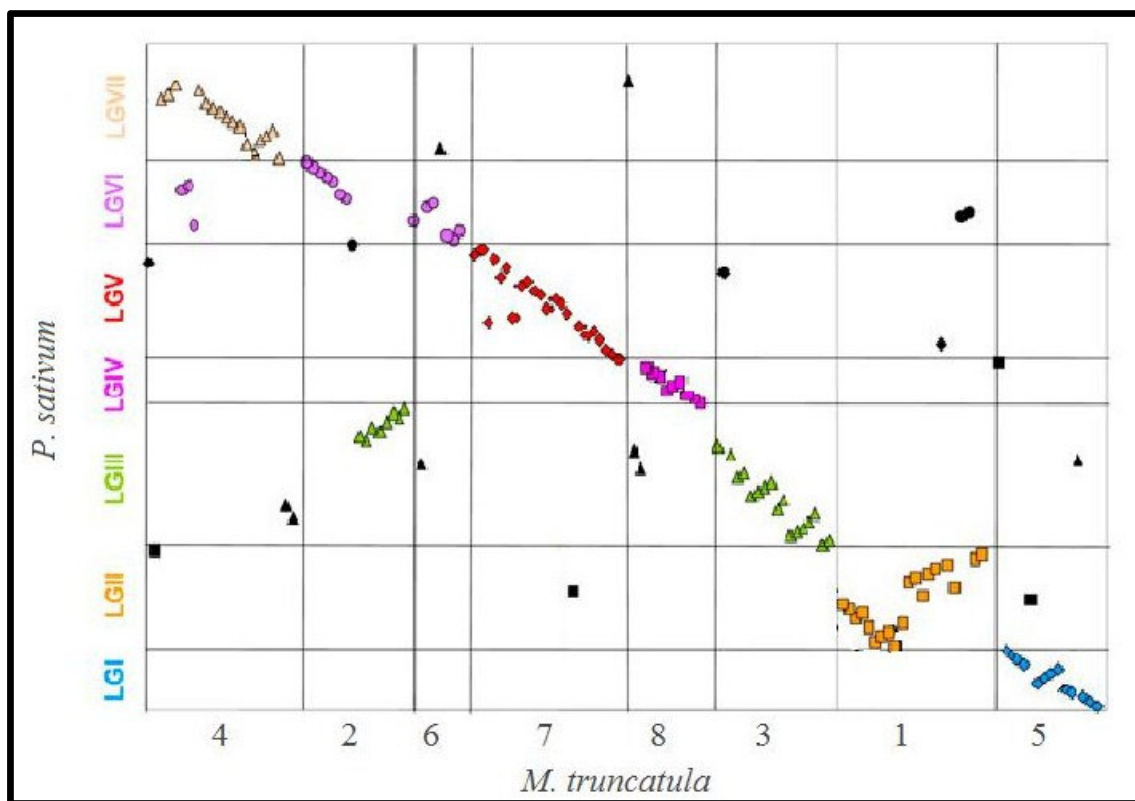
**Obr. 6:** Morfologie lusků tolice *M. truncatula* Gaertn. a *M. noeana* Boiss. (Fourquin *et al.*, 2013)

V sekvenci genu *SHP* u druhů *Medicago* L. se stočenými lusky byla nalezena jednobodová nukleotidová záměna, která ovlivňuje stočení lusků. Jedná se o záměnu prvního nukleotidu v tripletu, který způsobí při translaci navázání jiné aminokyseliny. Druh, který má v sekvenci ACA kóduje aminokyselinu threonin (Thr) a fenotypově se projeví rovným luskem, zatím co sekvence GCA kóduje alanin (Ala) a výsledkem je stočený lusk (Fourquin *et al.*, 2013).

Studie vazebných map poukázala na makrosynténii mezi hrachem (*Pisum* sp.), tolicí (*Medicago truncatula*), štírovníkem (*Lotus japonicus*), sójí (*Glycine max*) a dalšími luskovinami (Aubert *et al.*, 2006, Kalo *et al.*, 2004, Choi *et al.*, 2004), což naznačuje významnou kolinearitu mezi genomy těchto druhů. Byly vytvořeny tzv. konsenzuální mapy (příloha 1) mezi těmito druhy (Bordat *et al.*, 2011).

Synténie vztahů mezi vazebnými skupinami hrachu (*P. sativum*) a chromosomy tolice (*M. truncatula*) umožnila vytvořit bodový graf koliearity (obrázek 7). Reciproční homologie je postavená na závislosti chromosomů respektive vazebných skupin hrachu (osa Y) ku postavení chromozomů tolice (osa X). Zachování synténie se projevuje, pouze pokud jsou homology umístěny v diagonální linii, případně pokud jsou k ní postaveny kolmo (Bordat *et al.*, 2011).





**Obr. 7:** Graf kolinearity *P. sativum* a *M. truncatula* (Bordat *et al.*, 2011)

## 2 HRÁCH (*Pisum* L.) JAKO EXPERIMENTÁLNÍ MODEL PRO LUSKOVINY

Čeď Fabaceae a především hrách (*Pisum* L.) provází lidskou společnost jako plodina již dlouhou dobu. Archeologické nálezy dokazují, že hrách (*Pisum* L.) byl využíván již v době kamenné a bronzové. Podobně jako u jiných plodin, jednou z největších překážek domestikace hrachu (*Pisum* L.) byly znaky, které později vedly k domestikačnímu syndromu jako pukavost lusků a dlouhá dormance semen v důsledku existence nepropustné vrstvy osemení atd. (Smartt, 1990, Smýkal *et al.*, 2014).

Hrách byl také významný již v historii, jako model pro genetiku. V druhé polovině 19. století na něj svou pozornost upnul Johan Gregor Mendel a prostřednictvím pokusů s kříženci definoval zákony dědičnosti (Smýkal *et al.*, 2015).

### 2.1 Taxonomie hrachu (*Pisum* L.)

Taxonomie a vztahy mezi druhy v rodu *Pisum* L. se v minulosti často měnily v závislosti na autorech a typu studií. I v současnosti je botanická společnost stále nejednotná v názoru na zařazení jednotlivých druhů. Rod hrách (*Pisum* L.) řadíme do tribu Fabae společně s rodem hrachor (*Lathyrus* L.), čočka (*Lens* Mill.), vikev (*Vicia* L.) a *Vavilovia* Al.Fed. (Maxted a Ambrose, 2001, Smýkal *et al.*, 2011, Mackinder *et al.*, 2014).

Zařazení rodu *Pisum* do systému dle ITIS (2011)

Říše: Plantae

Podříše: Viridaeplantae

Oddělení: Tracheophyta

Pododdělení: Spermatophytina

Třída: Magnoliopsida

Nadřád: Rosanae

Řád: Fabales

Čeď: Fabaceae

Rod: *Pisum* L.

## 2.2 Genetická diverzita rodu hrách (*Pisum L.*)

Genetická rozmanitost druhů plodin je výsledkem přirozeného výběru z planých předků a lidských zásahů zemědělců a šlechtitelů. Genetická diverzita je rozpoznávána na bázi znalosti primární struktury DNA, sekvenci jednotlivých nukleotidů. Morfologické znaky, které se používají standardně pro odlišení odrůd, jsou velmi nepřesné, protože k jejich projevu je potřeba většinou exprese více genů. Jejich přesnost byla překonána markery genetickými, zejména markery jako jsou retrotranspozony a mikrosatelity (Smýkal *et al.*, 2010). Tyto repetitivní sekvence jsou vysoce polymorfní a mají vysokou mutační frekvenci ( $10^{-3}$  až  $10^{-5}$  na lokus a generaci), vyšší než je frekvence bodových mutací (Smýkal, 2011).

Je známo, že organismy s vyšším stupněm genetické diverzity lépe reagují na změny životních podmínek, dokáží se jim lépe přizpůsobit a jsou i vhodné pro šlechtění variabilnějších odrůd či kultivarů. Genetickou diverzitu můžeme studovat na více úrovních (jednotlivec, druh, populace). Mutacemi nebo selekcí vznikají v genomu nové alely genů, které působením genetického driftu mohou být náhodně fixovány v populaci.

Přenášení genů mezi populacemi prostřednictvím migrujících jedinců je jeden z významných evolučních faktorů. Probíhá na všech úrovních populace, i když jsou jednotlivé druhy reprodukčně izolovány. Genový tok je pak realizován mezidruhovým křížením (Flegr, 2009).

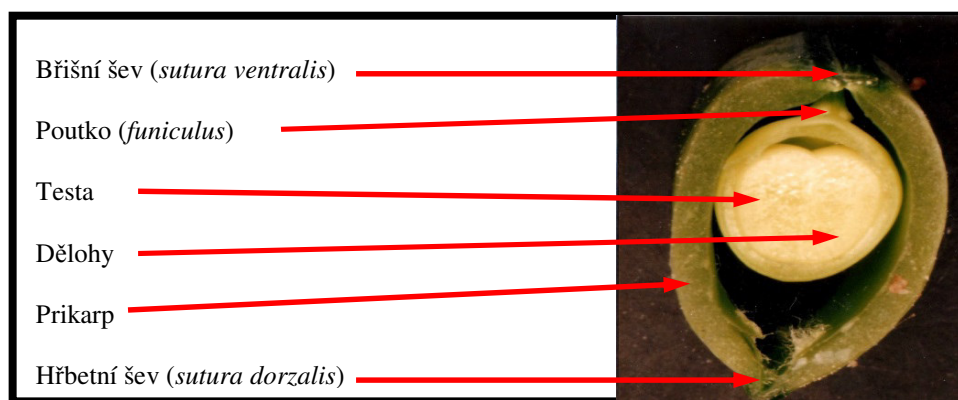
### 3 BIOLOGIE RODU HRÁCH (*Pisum L.*)

Zástupci rodu hrách (*Pisum L.*) jsou převážně jednoleté dvouděložné rostliny z čeledi bobovitých (Fabaceae). Výjimkou je jediný zástupce rodu *Vavilovia* Al.Fed., *Vavilovia formosa* (Steven) Al.Fed., která se vyskytuje jako vytrvalá bylina (Mikič *et al.*, 2013). Hrách se rozmnožuje generativně, samosprašením. Samosprašnost je zajištěna proteogynií a kleistogamií (opylením ještě v poupěti těsně před rozkvetem).

Genetická výbava buněk obsahuje 7 párů chromosomů ( $n=7$ ) a velikost genomu hrachu je 4 300 Mb. Genom obsahuje velké množství repetitivních sekvencí (Macas *et al.*, 2006), má vysoký sekvenční polymorfismus s průměrnou frekvencí jedné záměny na 15 nukleotidů (Jing *et al.*, 2007).

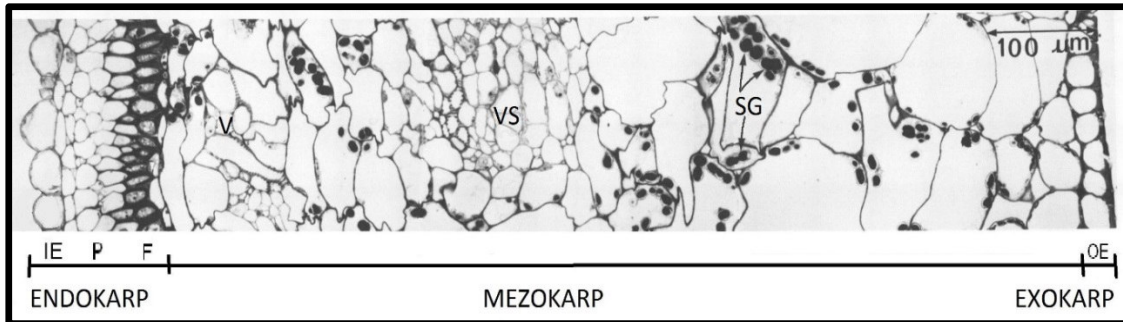
#### 3.1 Anatomie a stavba lusku

Lusk (lat. *legumen*) je suchý pukavý plod vzniklý z jednoho plodolistu apokarpního gynecea. Jedná se o oplodí, kde polovina plodolistu tvoří jednu chlopeň lusku. Lusk má chlopně dvě a otevírá se dvěma švy (ventrálním a dorzálním) (obrázek 8). V oblasti švů probíhají cévní svazky. Anatomie lusku u hrachu (*Pisum L.*) byla doposud studována převážně na kulturních formách *Pisum sativum*, a proto všechny informace uvedené v následujících kapitolách se vztahují právě k tomuto druhu.



**Obr. 8:** Příčný řez luskem hrachu (*Pisum L.*) (Vinter, 2009)

Chlopně se často šroubovitě stáčí. Atkins et al., 1977 popisuje, že v oplodí rozeznáváme tři vrstvy: exokarpem, mezokarpem a endokarpem (obrázek 9). Tloušťka stěny luskou je v průměru 1 mm, záleží však velmi na druhu a také na stavu oplodí.

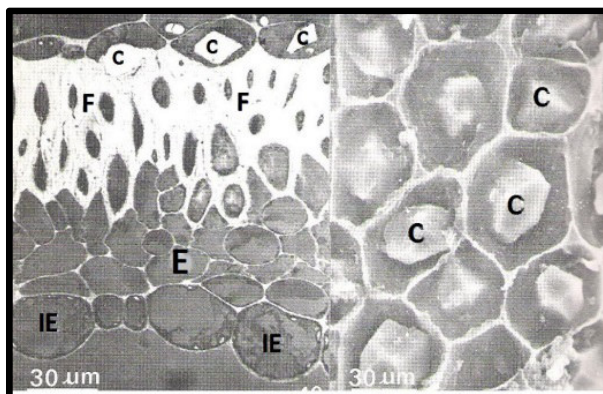


F-vláknitá vrstva endokarpu; IE-vnitřní epidermis; OE-vnější epidermis; P-parenchymatická vrstva endokarpu; SG-škrobová zrna; V-zakončení cévních svazků; VB-cévní svazky;

**Obr. 9:** Příčný řez perikarpem luskou hrachu (*Pisum sativum*) (Atkins et al., 1977)

Vnější povrch luskou tvoří exokarp. Tato vrstva je tvořena vnější epidermis (OE = outer epidermis), která zaujímá asi 3% tloušťky perikarpu. Epidermis sestává z dlaždicovitých buněk bez trichomů, buňky jsou hojně kutinizovány obsahují průduchy (průměrná hustota: 20 průduchů na  $\text{mm}^2$ ) (Pate a Kuo, 1981).

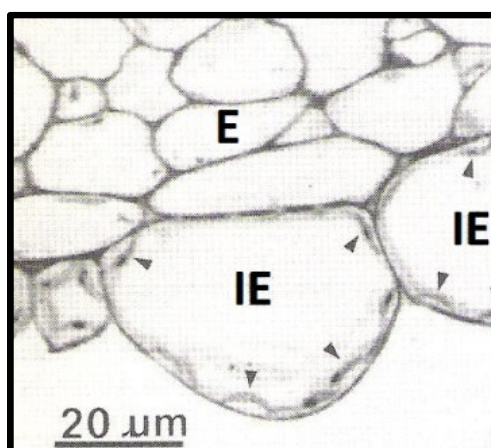
Vícevrstevný mezokarp je tvořen tenkostěnnými parenchymatickými buňkami s velkými vakuolami. Skládá se z osmnácti až dvaceti dvou vrstev buněk a zaujímá až 84% tloušťky perikarpu. Vrstvy buněk ležící blíže k epidermis obsahují převážnou část chlorofylu a obsahují hlavní vaskulární síť (žilnatinu), zatím co vnitřní vrstvy mezokarpu obsahují škrob, který se vyskytuje nejvíce v blízkosti cévních svazků. Fotosynteticky aktivní vrstva mezokarpu asimiluje  $\text{CO}_2$  z vnější atmosféry prostřednictvím průduchů nacházejících se ve vnější epidermis. Během dozrávání luskou obsah chlorofylu prudce klesá právě ve vnějších vrstvách (Atkins et al., 1977). Vnitřní vrstvy mezokarpu přiléhající ke sklerenchymatickým vláknům mají dobře vyvinuté krystaly šťavelanu vápenatého (obrázek 10) (Pate a Kuo, 1981).



C-krystal; E-endokarp; F-vláknitá vrstva endokarpu; IE-vnitřní epidermis

**Obr. 10:** Krystaly v buňkách mezokarpu (*Pisum sativum*) (rastrovací elektronová mikroskopie) (Pate a Kuo, 1981)

Tří až pětivrstevný endokarp je složen především z vláknitého sklerenchymatického pletiva zaujímající asi 13% tloušťky oplodí. Mezi vrstvami sklerenchymatických vláken (2 až 3) a vnitřní epidermis (IE = inner epidermis) se může nacházet tenkostěnný parenchym (3-4 vrstvy). Vnitřní epidermis je tvořena tenkostěnným parenchymem, má vypouklé vnější kontury (obrázek 11), neobsahuje průduchy a má hydrofilní kutikulu (Drew, 1994). Chloroplasty se nacházejí také ve vnitřní epidermis, ale jsou menší než chloroplasty mezokarpu a obsahují i menší škrobová zrna. Díky vypouklým konturám má vnitřní epidermis větší povrch pro asimilaci  $\text{CO}_2$  uvolněného ze semene při vystavení lusku slunečnímu záření. Plynová dutina lusku hrachu obsahuje asi 0,5 až 1,5%  $\text{CO}_2$  (Atkins *et al.*, 1977).



E-endokarp; IE-vnitřní epidermis

**Obr. 11:** Vypouklé stěny vnitřní epidermis (*Pisum sativum*) (elektronová mikroskopie) (Pate a Kuo, 1981)

Uspořádání cévních svazků je typické jako u ostatních luskovin. Dvojice cévních svazků, která leží podélně a dodává živiny semeni a odpovídá marginálním cévním svazkům pestíku. Třetí cévní svazek vede podél povrchu lusku (Drew, 1994). Všechny tři cévní svazky se zblíhají na obou koncích lusku a jsou doprovázeny sítí menších terciárních žilek, které procházejí bočními stěnami lusku a směřují k nejvnitřnějším vrstvám mezokarpu, kde končí (Atkins *et al.*, 1977).

### 3.2 Vývoj plodu

Poupata se u hrachu zakládají postupně v úžlabí listů s růstem rostliny. V průběhu vývoje může docházet k redukcí květních orgánů opadem poupat, květů nebo i malých lusků po oplození. Po opylení blizna a čnělka zasychá a stěny semeníku se mění v oplodí (perikarp). Růst oplodí do délky a šířky je rychlý, probíhá 2 až 5 dní po opylení (DAA = Days After Anthesis) a je v podstatě dokončen 8 dní po opylení (obrázek 12-A). Následně se rychle zvětšuje průměr oplodí a přizpůsobuje se tak vývoji semen 6 až 12 dní po opylení (obrázek 12-B). Poupě a květ vystihuje období -2 a 0 DAA (Ozga *et al.*, 2003).



**Obr. 12:** Vývoj oplodí hrachu (*Pisum L.*) (Ozga *et al.*, 2003)

Agronomickou zralost u luskovin rozdělujeme podle tří stupňů zralosti na zelenou, žlutou a plnou. Při zelené zralosti pokračuje ukládání zásobních látek do semen a dělohy lze tlakem od sebe oddělit. Žlutá zralost se projevuje typickým zbarvením lusků ve spodní třetině a semena mají polotuhou konzistenci. V plné zralosti jsou rostliny téměř suché, semena jsou tvrdá a ukládání zásobních látek je dokončeno.

Zralost luskovin se objektivně určuje stanovením vlhkosti semen, která je v plné zralosti 14 – 20 % (Houba *et al.*, 2009).

Vývoj od kvetení do zralosti se rozlišuje na tři fáze a to fázi iniciační, elongační a vlastní maturaci (zrání). Iniciační fáze nastává v době 1 až 2 dny po opylení (DAA = Day After Anthesis). Endokarp je v této fázi tvořen třemi vrstvami: tranziční-přechodovou, střední vrstvou a epidermis. Tranziční vrstva má parenchymatické, tenkostěnné buňky s velkými vakuolami, podobně jako u mezokarpu, ale jsou hustěji naskládané. Střední vrstva je tvořena třemi vrstvami meristemických buněk, které se na konci iniciační fáze začnou dělit a posléze jsou diferencovány v buňky sklerenchymatické. Většina buněk obsahuje malé vakuoly, velká jádra s výraznými jádérky, velké množství ribosomů v husté cytoplazmě, Golgiho aparát (GA), drsné endoplazmatické retikulum (ER). Buňky vnitřní epidermis mají čtyřúhelníkový profil, hustou cytoplazmu, obsahují hojně amyloplasty a chloroplasty.

Mezokarp je tvořen parenchymatickými tenkostěnnými buňkami, které jsou větší než buňky endokarpu.

Elongační fáze nastává 3 až 4 dny po opylení a endokarp je obvykle tvořen již čtyřmi vrstvami. Nově vzniklou vrstvou je vrstva protáhlých buněk vytvořených z buněk středové vrstvy blíže k tranziční vrstvě. Buňky středové vrstvy mají nyní řidší cytoplazmu, větší vakuoly, zvlněnou plazmalemu s velkým množstvím váčků, drsné ER s cisternami v blízkosti plazmalemy a GA má vyvinuté dictyosomy s malými cisternami s hustým obsahem. Buňky nemají sekundární buněčnou stěnu. Tranziční vrstva a vnitřní epidermis jsou bez výrazných změn oproti počáteční fázi.

Maturace je zahájena 4 až 5 dnů po opylení. V této fázi jsou již podlouhlé buňky zesíleny a hovoříme o pre-sklerenchymatické vrstvě, buňky tranziční vrstvy jsou zvětšeny a buňky epidermis se rozšiřují kolmo k hlavní ose.

Později, 8 dní po opylení, jsou vytvořeny 2 až 3 vrstvy sklerenchymu, který je tvořen mrtvými buňkami se sekundární buněčnou stěnou (Vercher *et al.*, 1987). V závislosti na genotypu je lusk plně zralý asi 36 dnů po opylení.



## MATERIÁL A METODY

### 4 MATERIÁL

V práci bylo pracováno s rekombinantními inbredními liniemi (RIL) hrachu. Jednalo se o 96 F<sub>10</sub> linií vzniklých zkřížením rodičovských genotypů VIR320 (*P. elatius* Steven ex M. Bieb.) × WL1238 (kulturní hrách *P. sativum* L.) (Bogdanova *et al.*, 2009), 67 linií F<sub>4:5</sub> generace recipročního křížení linek JI64 (*P. elatius*) × JI92 (afghánský typ kulturního hrachu *P. sativum*) (Domoney *et al.*, 1994) a částečně se 180 RILs liniemi vzniklým zkřížením L100 × Cameor v generaci F<sub>3:4</sub>.

Rodičovské linie se od sebe fenotypově odlišovaly nejen pukavostí lusků, ale i habitem, přítomností či absencí mechanických metamorfóz na koncích lodyhy nebo antokyanové skvrny v úžlabí palistů atd. (obrázek 13 a příloha 2 až 4). Například u *P. sativum* (WL1238) byl vypracován seznam genetických markerů s jejich zařazením do vazebných skupin (Bogdanova *et al.*, 2009).



**Obr. 13:** Rodičovské linie (zleva WL1238, VIR320, JI64, JI92)

## 5 IZOLACE DNA

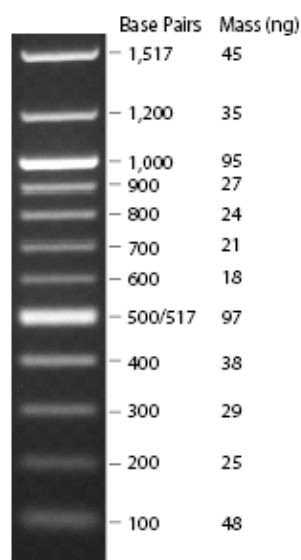
Izolace DNA byla provedena pomocí komerčního kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qia-gen, Německo) za použití originálního návodu a roztoků.

Na analýzu bylo odebráno přibližně 100 mg čerstvého materiálu, respektive mladých palistů. Materiál byl homogenizován v kapalném dusíku pomocí třecí misky a tloučku. K homogenátu bylo přidáno 400  $\mu$ l pufru AP1 a 2  $\mu$ l zásobního roztoku RNase A (100 mg/ml). Dále postupováno dle návodu výrobce:

1. Inkubace 10 minut při 65 °C. Během inkubace cca 3x promíchat.
2. Přidat 130  $\mu$ l pufru AP2, promíchat a inkubovat 5 minut při 0 °C.
3. Lyzát přemístit do QIAshedder spin kolony umístěné v zásobní zkumavce 2 ml.
4. Centrifugace 2 minuty při 20 000 x g.
5. 260  $\mu$ l kapalně frakce ze zásobní zkumavky přenést bez porušení peletu do nové mikrozukavky (1,5 ml).
6. Přidat 390  $\mu$ l pufru AP3 (s ethanolem) a směs jemně promíchat.
7. Směs aplikovat na DNeasy mini spin kolonu umístěné v zásobní zkumavce 2 ml.
8. Centrifugace 1 minutu při  $\geq 6\ 000$  x g.
9. DNeasy mini spin kolonu přemístit do nové zásobní zkumavky a na kolonu nanést 300  $\mu$ l promývacího pufru AW.
10. Centrifugace 1 minutu při  $\geq 6\ 000$  x g. Odstranit kapalinu ze zásobní zkumavky.
11. Nanést na kolonu 300  $\mu$ l pufru promývacího pufru AW.
12. Centrifugace 2 minuty při 20 000 x g.
13. Kolonu přemístit do nové mikrozukavky 1,5 ml a na střed kolony aplikovat 100  $\mu$ l předehřátého (65 °C) elučního AE pufru. 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě
14. Centrifugace 1 minutu při  $\geq 6\ 000$  x g,

## 6 KVANTIFIKACE DNA

Ke kvantifikaci DNA byla použita horizontální agarózová elektroforéza (OmniBio, Česká republika). Koncentrace agarosového gelu byla 1 % (agarósa - SERVA Electrophoresis GmbH, Německo) a použit byl TAE pufr (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo). Vizualizace byla zajištěna fluorescenčním barvivem ethidium bromid (Sigma-Aldrich, USA). Používán byl jeho vodný roztok (10 mg/ml) a nanášena byla 1/50 000 objemu. Do jamky bylo nanášeno 2 $\mu$ l velikostního (hmotnostního) standardu a 10  $\mu$ l vzorku. Kvantifikace byla prováděna porovnáním izolované DNA s hmotnostním standardem (obrázek 14) Quick load 100 bp ladder (New England BioLabs, Ipswich, USA) pomocí UV transluminátoru (Vilber Lourmat, Sud Torcy, Francie) a dokumentačního zařízení KODAK DC290 (KODAK, USA).



**Obr. 14:** Standard Quick-Load 100 bp DNA Ladder (NEB, USA)

## 7 PCR AMPLIFIKACE DNA

Reakční směs PCR byla ve všech experimentech míchána dle tabulky 4 a v rámci mapování byly použity různé druhy primerů (tabulka 5). Pro PCR byl odvozen cyklus termocyklieru viz tabulka 6.

**Tab. 4:** Reakční směs pro PCR

	1 reakce
Ultračistá voda	36 $\mu$ l
Pufr pro Green <i>Taq</i> (Promega)	10 $\mu$ l
dNTPs (12,5 mM)	0,6 $\mu$ l
Primer F (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Primer R (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Taq DNA-polymeráza (5U/ $\mu$ l) (Promega)	0,4 $\mu$ l
Templátová DNA	1 $\mu$ l
<b>součet</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

**Tab. 5:** Použité primery

Primer	Sekvence	Zdroj	Výrobce
IND-F	GATCCATCAAAAATTAGAATCTAGCA	Primer 3	IDG, Belgie
IND-R	CTGTATTCCGGATGGCAAGT		
bZIP-F	GCCATGAAAACAGGTTACTCC	Fast PCR	IDG, Belgie
bZIP-R	ATCCGACATAGAGTGGAAATTGC		
NIP-F	GGATTCTACTAACCACATGGACC	Aubert <i>et al.</i> , 2006	IDG, Belgie
NIP-R	CTGCATGTCAGAGGTCCATAGG		

**Tab. 6:** Reakční cyklus PCR

	Teplota	Čas	Počet opakování
Počáteční denaturace	94 °C	3 min	1 ×
Denaturace dsDNA	94 °C	30 s	35 ×
Annealing primerů	55 °C	30 s	
Elongace	72 °C	2 min	
Konečná elongace	72 °C	10 min	1 ×

## 8 METODA CAPs-PCR

Metoda CAPs v sobě zahrnuje metodu PCR (Polymerase Chain Reaction) a RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Prvním krokem je amplifikace segmentu DNA pomocí PCR (viz kapitola 7). Poté následuje štěpení fragmentu restriční endonukleázou a vyhodnocení restrikce elektroforetickým stanovením. Touto metodou můžeme odlišit bodové mutace a jednotlivé alely.

CAPs byla prováděna s restričními enzymy viz tabulka 7. Objem restričního mixu byl míchán na 10  $\mu$ l (tabulka 8) a do reakce byly dávány 2  $\mu$ l PCR produktu. Reakce probíhala jednu hodinu při 37 °C.

**Tab. 7:** Restriční enzymy

Enzym	Restriční místo	Reakční pufr	Výrobce
<i>Mse I</i>	5'... T↓TAA ... 3'	CutSmart Buffer	NEB, USA
	3'... AAT↑T ... 5'		
<i>Hinf I</i>	5'... G↓ANTC ... 3'	CutSmart Buffer	NEB, USA
	3'... CTNA↑G ... 5'		
<i>Alu I</i>	5'... AG↓CT ... 3'	CutSmart Buffer	NEB, USA
	3'... TC↑GA ... 5'		
<i>Mbo I</i>	5'... ↓GATC ... 3'	CutSmart Buffer	NEB, USA
	3'... CTAG↑... 5'		

**Tab. 8:** Reakční směs pro restrikci

	1 reakce
Ultračistá voda	10,2 $\mu$ l
10x pufr (CutSmart)	1,5 $\mu$ l
Enzym	0,3 $\mu$ l
<b>součet</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

## 9 JoinMap MAPOVÁNÍ

Pomocí programu JoinMap (Stam, 1993) byla vytvořena mapa v režimu RIL a byly spočítány všechny párové rekombinační frekvence. Nejprve byly testovány markery tzv. metodou dobré shody (poměr 1 : 1) za použití analýzy  $X^2$  (chí kvadrát), posléze byly stanoveny vazebné skupiny dle LOD (linklod) hodnoty 5 a 4. Pro vyjádření míry interference mezi crossing-overly v meióze byla vybrána mapovací funkce Kosambi. Nakonec byly pomocí této funkce rekombinační frekvence převedeny do mapových vzdáleností (cM).

## 10 ANATOMICKÉ ŘEZY

Anatomické řezy lusků byly prováděny dvěma technikami. První použitou technikou bylo jednoduché řezání segmentu lusku na ručním mikrotonu Bresser (Bresser, USA) ve spolupráci s katedrou fyziologie rostlin PřF UK v Praze (metodika viz kapitola 10.2). Druhou technikou bylo využití fixace segmentu lusku do parafínových bločků a následné řezání rotačním miktoronem LEICA RM 2255 (LEICA, Německo). Tato část práce byla prováděna na Mendelově universitě (metodika viz kapitola 10.3)

### 10.1 Fixáž materiálu

Z rodičovských lusků v zelené zralosti byly vyřezány segmenty, které obsahovaly ventrální a dorzální švy. Segmenty byly fixovány ve 2 % vodném roztoku formaldehydu (Dr.KulichPharma, ČR) nejméně 7 dnů při teplotě 4 °C.

## 10.2 Příčné řezy zhotovené pomocí ručního mikrotomu

Vzorky linie Cameor a VIR320, které se řezaly na ručním mikrotomu byly po vymytí fixáže (10 min pod tekoucí vodou) vkládány do vlhčené dřevě bezu (tzv. bezová duše), upevněny šroubem v mikrotomu a řezány břitvou. Tloušťka řezu u linie Cameor byla 10  $\mu\text{m}$ , u linie VIR320 15  $\mu\text{m}$ .

Na barvení byly použity tři typy histochemických látek: 1 % floroglucinol (Sigma, USA) s 35 % HCl (Sigma, USA), toluidinová modř O (Merck Millipore, USA) a Sudan III 7B (Sigma, USA). Barvení probíhalo dle protokolů Soukup (2014). K pozorování preparátů byl použit světelný mikroskop Olympus BX51 (Olympus, Japonsko) a preparáty byly foceny pomocí kamery Apogee Alta U4000 (Apogee, USA).

### **Příprava floroglucinolu:**

1. 2 g floroglucinolu rozpustit v 80 ml 20 % EtOH
2. Přefiltrovat a smíchat s 20 ml koncentrované HCl

### **Příprava okyseleného glycerolu:**

Smíchat 75 ml glycerolu s 15 ml H<sub>2</sub>O a 10 ml koncentrátu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### **Barvení preparátu barvivem Sudan III 7B:**

1. Barvení preparátu v roztoku po dobu nejméně 90 minut při laboratorní teplotě
2. Rychlé opláchnutí přebytku roztoku barviva v roztoku detergentu (0,5 % vodný roztok SDS).
3. Odmočit ve vodě.
4. Osušení a zakápnutí 65 % vodným roztokem glycerolu.

## 10.3 Příčné řezy zhotovené pomocí rotačního mikrotomu

Před další prací bylo potřeba vymytí fixáže (10 min pod tekoucí vodou). Dehydratace materiálu byla prováděna pomocí etanolové řady (tabulka 9) a následně byl do seg-

mentů infiltrován xylen (tabulka 10). Takto připravené segmenty byly podrobeny infiltraci parafínu.

1. Inkubace segmentu ve směsi xylene-parafín při laboratorní teplotě 9 h.
2. Inkubace při 42 °C 20 h, přidávat průběžně parafín.
3. Inkubace při 58 °C 45 h, přidávat průběžně parafín.
4. Inkubace při 58 °C 96 h, slévat směs xylene-parafín a přidávat rozehřátý parafín.

**Tab. 9:** Etanolová řada

EtOH [%]					inkubace
10	30	50	70	90	15 min
96	96	100	100		45 min

**Tab. 10:** Infiltrace xylenu

				inkubace
EtOH:xylen	3:1	1:1	1:3	60 min
xylen	100%			61 min
xylen	100%			20 h

Po infiltraci parafínu do materiálu, byly segmenty zafixovány do parafínového bločku a temperovány v laboratorní teplotě nejméně 2 h.

Řezy zhotovené rotačním mikrotomem byly přeneseny nejprve do vodní lázně a pak na pozitivně nabitá podložní sklíčka a vyhlazeny na topné desce. Takto připravené preparáty bylo možno skladovat při laboratorní teplotě. Před mikroskopií bylo nutné provést u těchto řezů odstranění xylenu (tabulka 11). Po této úpravě bylo možno skladovat preparáty při -25 °C. Následovalo zavodnění preparátu v obrácené etanolové řadě a nakonec inkubace minimálně 10 min v ddH<sub>2</sub>O (tabulka 12).



**Tab. 11:** Odstranění xylenu

		inkubace
xylén	100%	20 min
EtOH : xylén	1:1	10 min
EtOH	100%	10 min

**Tab. 12:** Hydratace preparátu

EtOH [%]					inkubace
90	70	50	30	10	6 min

Preparáty byly barveny 1 % floroglucinolem (Sigma, USA) s 35 % HCl (Sigma, USA) dle protokolů Soukup (2014). Před pozorováním byl na preparát aplikován tzv. okyselený glycerol. K mikroskopii byl použit invertovaný světelný mikroskop Olympus IX70 (Olympus, Japonsko) a preparáty byly foceny fotoaparátem Olympus E-450 (Olympus, Japonsko).

**Příprava floroglucínu:**

1. 2 g floroglucínu rozpustit v 80 ml 20 % EtOH
2. Přefiltrovat a smíchat s 20 ml koncentrované HCl

**Příprava okyseleného glycerolu:**

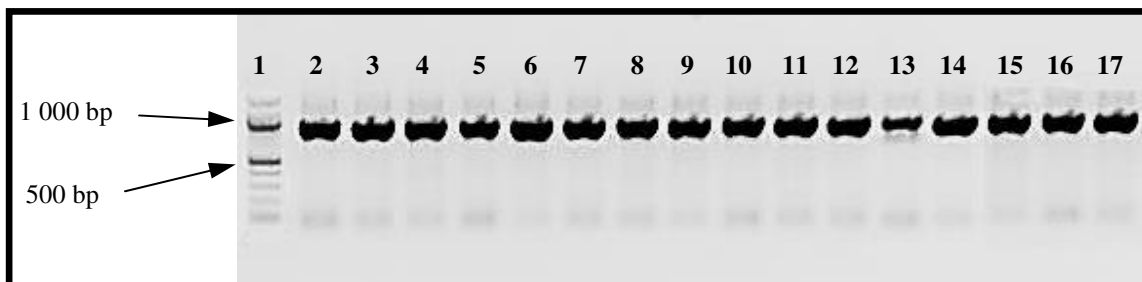
Smíchat 75 ml glycerolu s 15 ml H<sub>2</sub>O a 10 ml koncentráту H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## VÝSLEDKY

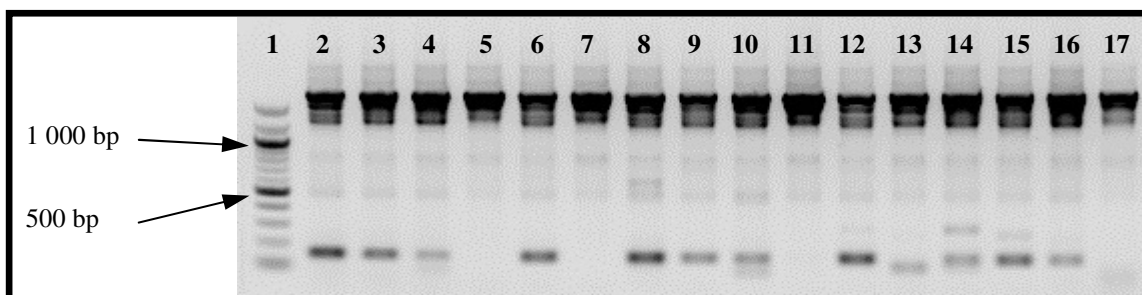
### PCR AMPLIFIKACE DNA

PCR byla prováděna dle standardních postupů. Jako templátová DNA pro reakci byla použita izolovaná genomová DNA z rodičovských genotypů a RILs linií. Na agarósovém gelu byly pozorovány PCR-produkty.

Byla provedena amplifikace oblasti genu *INDEHISCENT* (*IND*) (obrázek 15) a genu *NIP* (obrázek 16) u RILs linií odvozených z rodičovských genotypů VIR320 a WL1238. Takto se podařilo amplifikovat všechny RILs linie tohoto křížení. U rodičovských genotypů byla amplifikována také oblast genu *bZIP* (Basic-leucin zip (bZip) transkripční faktor).



**Obr. 15:** Ukázka PCR amplifikace oblasti genu *INDEHISCENT* u křížení VIR320 × WL1238

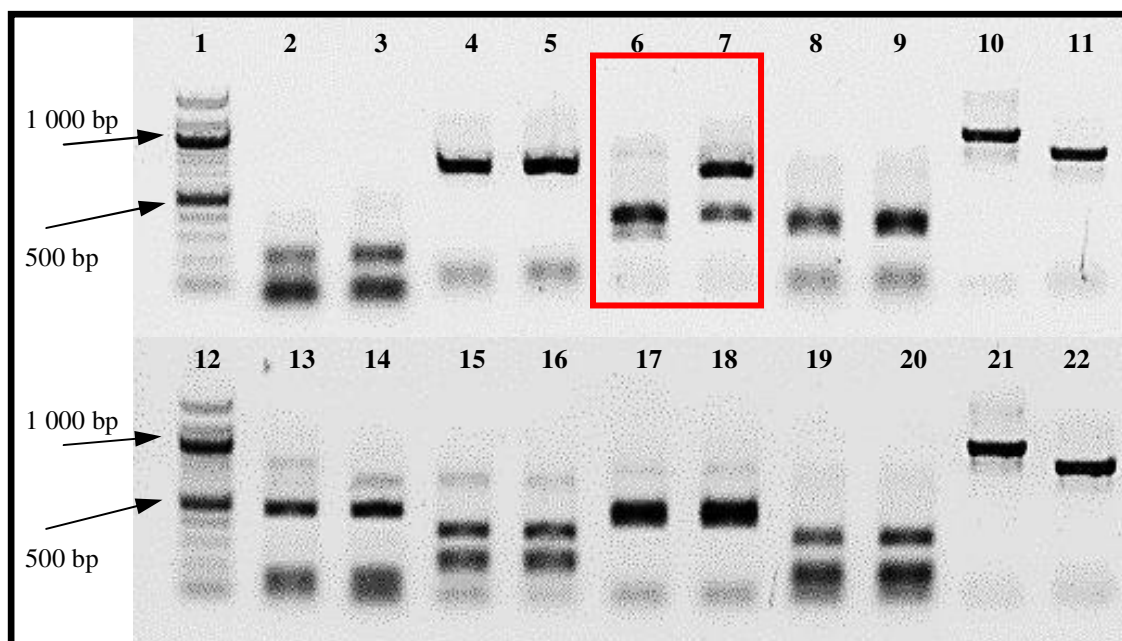


**Obr. 16:** Ukázka PCR amplifikace oblasti genu *NIP* u křížení VIR320 × WL1238

## METODA CAPS-PCR

PCR produkty byly podrobeny působení restrikčních endonukleáz. Na rodičovských genotypěch bylo provedeno testování v oblasti genů *IND* a *bZIP* restrikčními enzymy *MseI*, *HinfI*, *AluI*, *MboI* (obrázek 17). Jelikož kombinace genu *IND* s působením restrikčního enzymu *HinfI* vykazovala polymorfismus u genotypů VIR320 a WL1238, byly takto testovány všechny RILs linie vzniklé z tohoto křížení (obrázek 18).

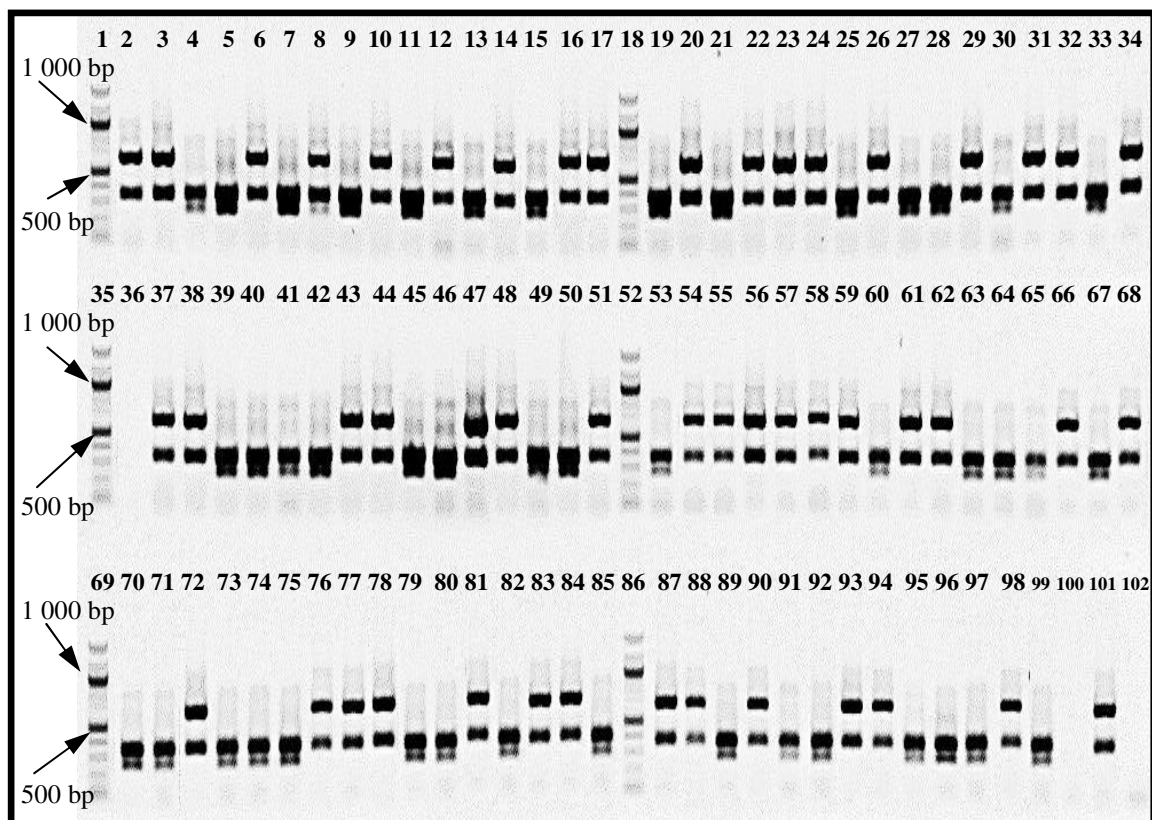
Stejným postupem byla amplifikována a posléze restrikčně štěpena i oblast genu *NIP*. Polymorfismus byl detekován na rodičovských genotypěch pomocí restrikčního enzymu *HinfI* (obrázek 19), a následně takto byly testovány i linie vzniklé z tohoto křížení (obrázek 20).



1 Quick-load 100 bp DNA Ladder (150 ng)  
2 *IND* VIR320 *MseI*  
3 *IND* WL1238 *MseI*  
4 *bZIP* VIR320 *MseI*  
5 *bZIP* WL1238 *MseI*  
6 *IND* VIR320 *HinfI*  
7 *IND* WL1238 *HinfI*  
8 *bZIP* VIR320 *HinfI*  
9 *bZIP* WL1238 *HinfI*  
10 *IND* VIR320 kontrola bez štěpení  
11 *bZIP* VIR320 kontrola bez štěpení

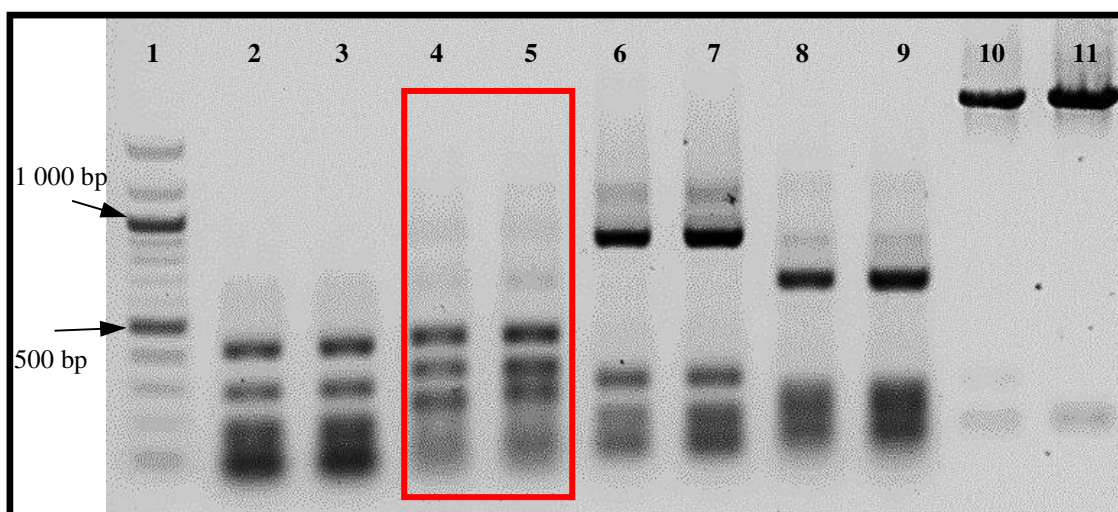
12 Quick-load 100 bp DNA Ladder (150 ng)  
13 *IND* VIR320 *AluI*  
14 *IND* WL1238 *AluI*  
15 *bZIP* VIR320 *AluI*  
16 *bZIP* WL1238 *AluI*  
17 *IND* VIR320 *MboI*  
18 *IND* WL1238 *MboI*  
19 *bZIP* VIR320 *MboI*  
20 *bZIP* WL1238 *MboI*  
21 *IND* WL1238 kontrola bez štěpení  
22 *bZIP* WL1238 kontrola bez štěpení

**Obr. 17:** Testování rodičovských genotypů VIR320 a WL1238 metodou CAPS-PCR v oblasti genů *IND* a *bZIP*



- |   |                                 |                                  |
|---|---------------------------------|----------------------------------|
| 1 Quick-load 100 bp DNA Ladder (150 ng) | 35 Quick-load 100 bp DNA Ladder | 70 genotyp 67 - VIR320 x WL1238  |
| 2 genotyp 1 - VIR320 x WL1238           | 36 genotyp 34 - VIR320 x WL1238 | 71 genotyp 76 - VIR320 x WL1238  |
| 3 genotyp 9 - VIR320 x WL1238           | 37 genotyp 43 - VIR320 x WL1238 | 72 genotyp 69 - VIR320 x WL1238  |
| 4 genotyp 2 - VIR320 x WL1238           | 38 genotyp 35 - VIR320 x WL1238 | 73 genotyp 77 - VIR320 x WL1238  |
| 5 genotyp 10 - VIR320 x WL1238          | 39 genotyp 44 - VIR320 x WL1238 | 74 genotyp 70 - VIR320 x WL1238  |
| 6 genotyp 3 - VIR320 x WL1238           | 40 genotyp 36 - VIR320 x WL1238 | 75 genotyp 78 - VIR320 x WL1238  |
| 7 genotyp 11 - VIR320 x WL1238          | 41 genotyp 45 - VIR320 x WL1238 | 76 genotyp 71 - VIR320 x WL1238  |
| 8 genotyp 4 - VIR320 x WL1238           | 42 genotyp 38 - VIR320 x WL1238 | 77 genotyp 79 - VIR320 x WL1238  |
| 9 genotyp 12 - VIR320 x WL1238          | 43 genotyp 46 - VIR320 x WL1238 | 78 genotyp 72 - VIR320 x WL1238  |
| 10 genotyp 5 - VIR320 x WL1238          | 44 genotyp 39 - VIR320 x WL1238 | 79 genotyp 80 - VIR320 x WL1238  |
| 11 genotyp 13 - VIR320 x WL1238         | 45 genotyp 47 - VIR320 x WL1238 | 80 genotyp 73 - VIR320 x WL1238  |
| 12 genotyp 6 - VIR320 x WL1238          | 46 genotyp 40 - VIR320 x WL1238 | 81 genotyp 81 - VIR320 x WL1238  |
| 13 genotyp 14 - VIR320 x WL1238         | 47 genotyp 48 - VIR320 x WL1238 | 82 genotyp 74 - VIR320 x WL1238  |
| 14 genotyp 7 - VIR320 x WL1238          | 48 genotyp 41 - VIR320 x WL1238 | 83 genotyp 82 - VIR320 x WL1238  |
| 15 genotyp 15 - VIR320 x WL1238         | 49 genotyp 49 - VIR320 x WL1238 | 84 genotyp 75 - VIR320 x WL1238  |
| 16 genotyp 8 - VIR320 x WL1238          | 50 genotyp 42 - VIR320 x WL1238 | 85 genotyp 83 - VIR320 x WL1238  |
| 17 genotyp 16 - VIR320 x WL1238         | 51 genotyp 50 - VIR320 x WL1238 | 86 Quick-load 100 bp DNA Ladder  |
| 18 Quick-load 100 bp DNA Ladder         | 52 Quick-load 100 bp DNA Ladder | 87 genotyp 84 - VIR320 x WL1238  |
| 19 genotyp 17 - VIR320 x WL1238         | 53 genotyp 51 - VIR320 x WL1238 | 88 genotyp 93 - VIR320 x WL1238  |
| 20 genotyp 26 - VIR320 x WL1238         | 54 genotyp 59 - VIR320 x WL1238 | 89 genotyp 85 - VIR320 x WL1238  |
| 21 genotyp 18 - VIR320 x WL1238         | 55 genotyp 52 - VIR320 x WL1238 | 90 genotyp 94 - VIR320 x WL1238  |
| 22 genotyp 27 - VIR320 x WL1238         | 56 genotyp 60 - VIR320 x WL1238 | 91 genotyp 87 - VIR320 x WL1238  |
| 23 genotyp 20 - VIR320 x WL1238         | 57 genotyp 53 - VIR320 x WL1238 | 92 genotyp 95 - VIR320 x WL1238  |
| 24 genotyp 28 - VIR320 x WL1238         | 58 genotyp 61 - VIR320 x WL1238 | 93 genotyp 88 - VIR320 x WL1238  |
| 25 genotyp 21 - VIR320 x WL1238         | 59 genotyp 54 - VIR320 x WL1238 | 94 genotyp 96 - VIR320 x WL1238  |
| 26 genotyp 29 - VIR320 x WL1238         | 60 genotyp 62 - VIR320 x WL1238 | 95 genotyp 89 - VIR320 x WL1238  |
| 27 genotyp 22 - VIR320 x WL1238         | 61 genotyp 55 - VIR320 x WL1238 | 96 VIR320                        |
| 28 genotyp 30 - VIR320 x WL1238         | 62 genotyp 63 - VIR320 x WL1238 | 97 genotyp 90 - VIR320 x WL1238  |
| 29 genotyp 23 - VIR320 x WL1238         | 63 genotyp 56 - VIR320 x WL1238 | 98 WL1238                        |
| 30 genotyp 31 - VIR320 x WL1238         | 64 genotyp 64 - VIR320 x WL1238 | 99 genotyp 91 - VIR320 x WL1238  |
| 31 genotyp 24 - VIR320 x WL1238         | 65 genotyp 57 - VIR320 x WL1238 | 100 prázdná                      |
| 32 genotyp 32 - VIR320 x WL1238         | 66 genotyp 65 - VIR320 x WL1238 | 101 genotyp 92 - VIR320 x WL1238 |
| 33 genotyp 25 - VIR320 x WL1238         | 67 genotyp 58 - VIR320 x WL1238 | 102 prázdná                      |
| 34 genotyp 33 - VIR320 x WL1238         | 68 genotyp 66 - VIR320 x WL1238 |                                  |
|   | 69 Quick-load 100 bp DNA Ladder |                                  |

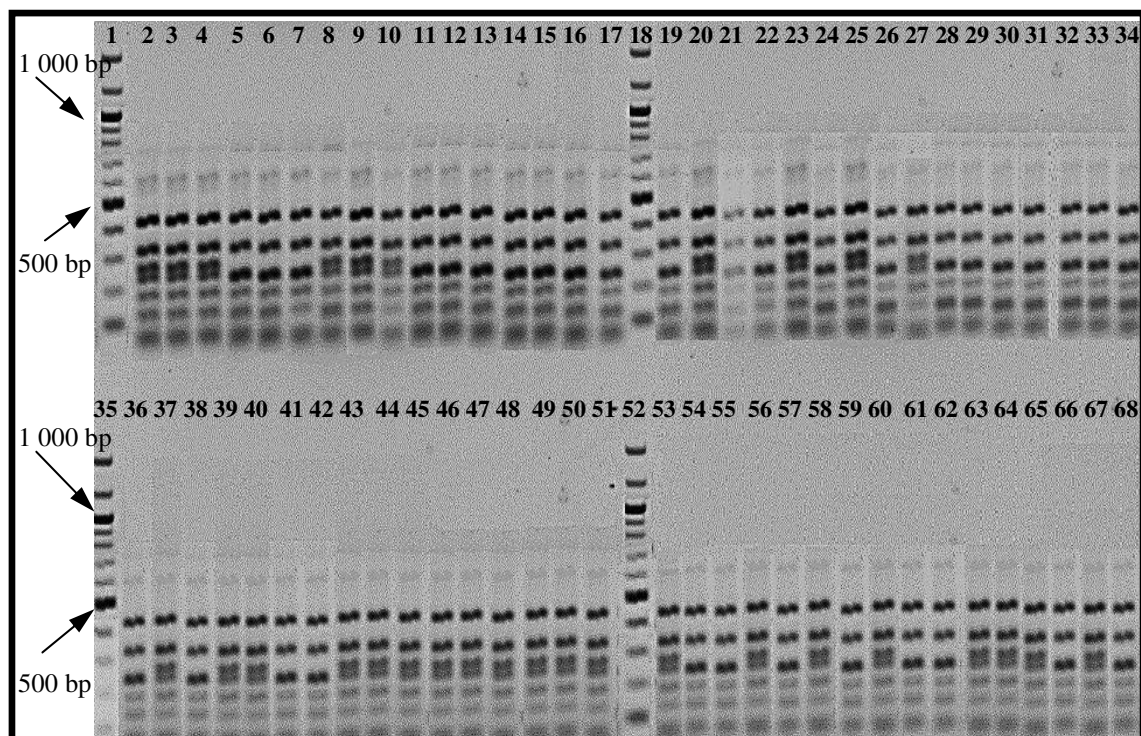
**Obr. 18:** Testování RILs linií v oblasti genu *IND* restričním enzymem *Hinf*I



1 Quick-load 100 bp DNA Ladder (150 ng)  
 2 VIR320 *Mse*I  
 3 WL1238 *Mse*I  
 4 VIR320 *Hinf*I  
 5 WL1238 *Hinf*I  
 6 VIR320 *Mbo*I

7 WL1238 *Mbo*I  
 8 VIR320 *Alu*I  
 9 WL1238 *Alu*I  
 10 VIR320 kontrola bez štěpení  
 11 VIR320 kontrola bez štěpení

**Obr. 19:** Testování rodičovských genotypů VIR320 a WL1238 metodou CAPS-PCR v oblasti genu *NIP*



1 Quick-load 100 bp DNA Ladder (150 ng)	23 genotyp 20 - VIR320 x WL1238	46 genotyp 40 - VIR320 x WL1238
2 genotyp 1 - VIR320 x WL1238	24 genotyp 28 - VIR320 x WL1238	47 genotyp 48 - VIR320 x WL1238
3 genotyp 9 - VIR320 x WL1238	25 genotyp 21 - VIR320 x WL1238	48 genotyp 41 - VIR320 x WL1238
4 genotyp 2 - VIR320 x WL1238	26 genotyp 29 - VIR320 x WL1238	49 genotyp 49 - VIR320 x WL1238
5 genotyp 10 - VIR320 x WL1238	27 genotyp 22 - VIR320 x WL1238	50 genotyp 42 - VIR320 x WL1238
6 genotyp 3 - VIR320 x WL1238	28 genotyp 30 - VIR320 x WL1238	51 genotyp 50 - VIR320 x WL1238
7 genotyp 11 - VIR320 x WL1238	29 genotyp 23 - VIR320 x WL1238	52 Quick-load 100 bp DNA Ladder
8 genotyp 4 - VIR320 x WL1238	30 genotyp 31 - VIR320 x WL1238	53 genotyp 51 - VIR320 x WL1238
9 genotyp 12 - VIR320 x WL1238	31 genotyp 24 - VIR320 x WL1238	54 genotyp 59 - VIR320 x WL1238
10 genotyp 5 - VIR320 x WL1238	32 genotyp 32 - VIR320 x WL1238	55 genotyp 52 - VIR320 x WL1238
11 genotyp 13 - VIR320 x WL1238	33 genotyp 25 - VIR320 x WL1238	56 genotyp 60 - VIR320 x WL1238
12 genotyp 6 - VIR320 x WL1238	34 genotyp 33 - VIR320 x WL1238	57 genotyp 53 - VIR320 x WL1238
13 genotyp 14 - VIR320 x WL1238	35 Quick-load 100 bp DNA Ladder	58 genotyp 61 - VIR320 x WL1238
14 genotyp 7 - VIR320 x WL1238	36 genotyp 34 - VIR320 x WL1238	59 genotyp 54 - VIR320 x WL1238
15 genotyp 15 - VIR320 x WL1238	37 genotyp 43 - VIR320 x WL1238	60 genotyp 62 - VIR320 x WL1238
16 genotyp 8 - VIR320 x WL1238	38 genotyp 35 - VIR320 x WL1238	61 genotyp 55 - VIR320 x WL1238
17 genotyp 16 - VIR320 x WL1238	39 genotyp 44 - VIR320 x WL1238	62 genotyp 63 - VIR320 x WL1238
18 Quick-load 100 bp DNA Ladder	40 genotyp 36 - VIR320 x WL1238	63 genotyp 56 - VIR320 x WL1238
19 genotyp 17 - VIR320 x WL1238	41 genotyp 45 - VIR320 x WL1238	64 genotyp 64 - VIR320 x WL1238
20 genotyp 26 - VIR320 x WL1238	42 genotyp 38 - VIR320 x WL1238	65 genotyp 57 - VIR320 x WL1238
21 genotyp 18 - VIR320 x WL1238	43 genotyp 46 - VIR320 x WL1238	66 genotyp 65 - VIR320 x WL1238
22 genotyp 27 - VIR320 x WL1238	44 genotyp 39 - VIR320 x WL1238	67 genotyp 58 - VIR320 x WL1238
	45 genotyp 47 - VIR320 x WL1238	68 genotyp 66 - VIR320 x WL1238

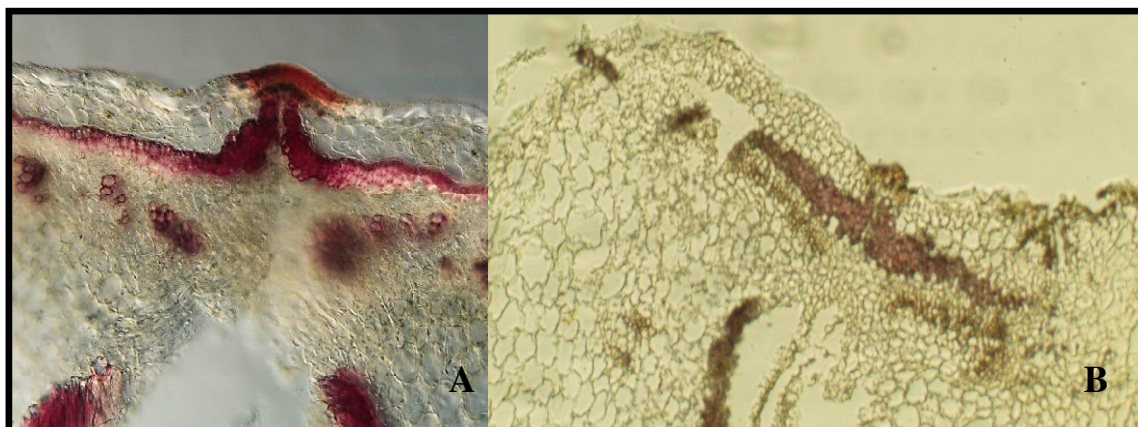
**Obr. 20:** Ukázka testování RILs linií v oblasti genu *NIP* restrikčním enzymem *Hin*II



## ANATOMICKÉ ŘEZY

Anatomické řezy byly prováděny dvěma technikami, ručním mikrotonem a pomocí parafínové fixace vzorku a následných řezů rotačním mikrotonem. V této práci se osvědčilo použití ručního mikrotonu. Zdokumentované řezy byly kompaktnější a lépe se na nich daly pozorovat okrajové struktury lusku. Řezy provedené rotačním mikrotonem a podrobené fixaci v parafínu byly poškozeny a nebylo tak možné sledovat a porovnávat mezi sebou anatomické struktury.

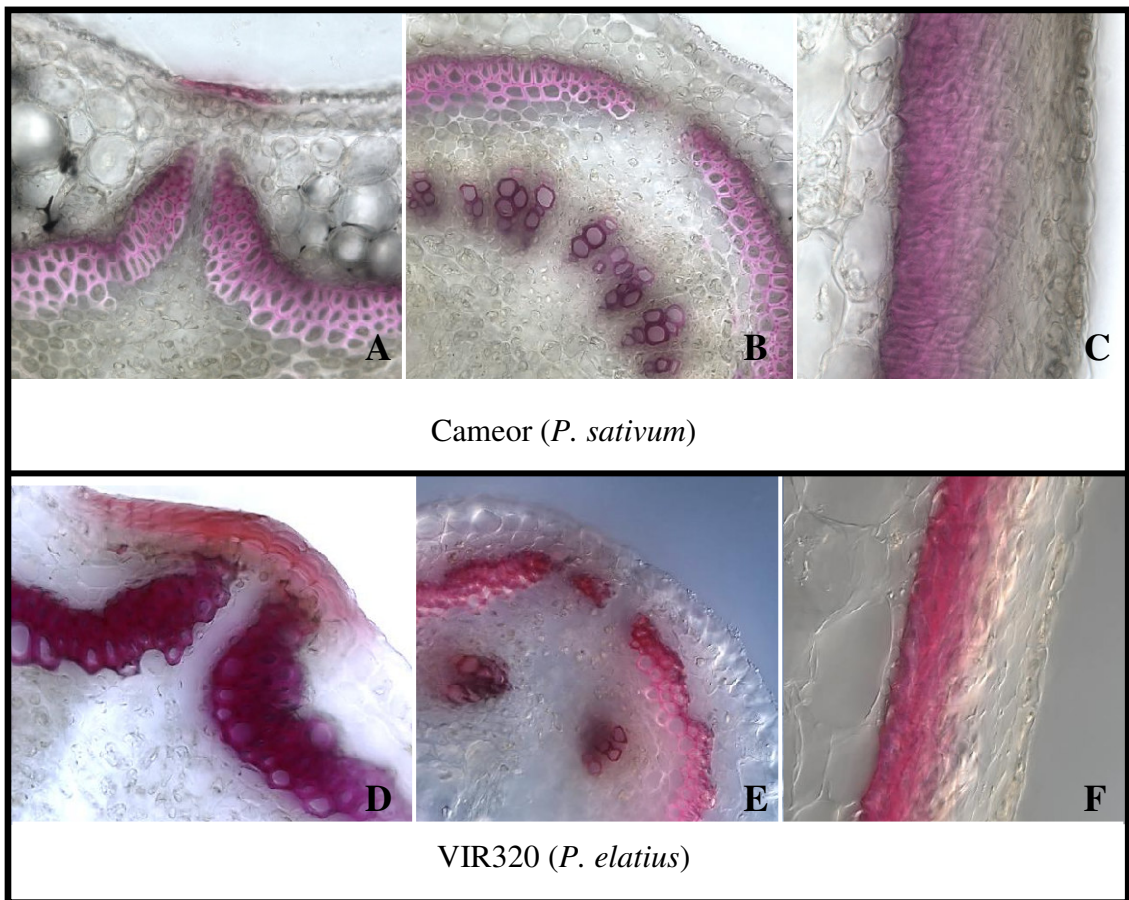
Obrázek 21 znázorňuje porovnání řezu u genotypu VIR320 řezaného na ručním mikrotonu (obrázek 21-A) a rotačním mikrotonu (obrázek 21-B). S genotypem VIR320 se obecně pracovalo hůře a při práci bylo nutné zvýšit tloušťku zhotovovaného řezu o 5 $\mu$ m.



A-řez ručním mikrotonem; B-řez rotačním mikrotonem

**Obr. 21:** Genotyp VIR320 - srovnání technik anatomických řezů

Řezy byly prováděny na kontrastních rodičovských genotypech (celkem přes 80 preparátů). Pukavý fenotyp mají zkoumané linie VIR320, JI64, nepukavý fenotyp mají pak linie JI92, Cameor. Mezi liniemi byla porovnáována oblast ventrálního švu, dorzálního švu a oblast endokarpu (obrázek 22 a příloha 6 až 30). Bylo zde pracováno s barvivý, které reagují s lipidy (Sudan III 7B) anebo vytváří metachromatické zbarvení (toluidinová modř O). Dále zde bylo použito barvení floroglucinolem, který barví lignifikovaná pletiva červeně s různou intenzitou, přičemž této reakce se využívalo nejvíce.



A- ventrální šev (Cameor); B-dorzální šev (Cameor); C-endokarp (Cameor); D-ventrální šev (VIR320); E-dorzální šev (VIR320); F-endokarp (VIR320)

**Obr. 22:** Porovnání anatomické stavby lusků u genotypů Cameor a VIR320 (ruční řezy, barveno floroglucnolem)

U linie JI92 byla objevena lignifikovaná struktura blízko dorzálního švu. Tyto ztloustlé buňky se objevily, vzhledem k pozici na lusku, blízko jeho špičky a s postupem ke středu lusku se struktura vytratila (obrázek 23).





A-řez blízko špičky lusku; B-řez ve středu lusku

**Obr. 23:** Porovnání dorzálního švu u genotypů JI92 (řezy rotačním mikrotomem, barveno floroglucinolem)

Kombinací informací z genetické analýzy a získaných fenotypových dat bylo možno sestavit tabulku pro křížení VIR320 × WL1238 (tabulka 13). Některé položky nebyly vitální (uhynuly během nebo po vyklíčení nebo nenasadily lusky) a nebylo je možno podrobit testování (červeně označené). Vyhodnocení genetické analýzy je znázorněno písmeny A; B (A-polymorfismus stejný jako u plané formy; B- polymorfismus stejný jako u kulturní formy). Vyhodnocení fenotypu je znázorněno číslicemi 1; 0 (1-pukavý lusk; 0-nepukavý lusk).

Fenotyp RILs linií byl posuzován formou pozorování ve dvou po sobě jdoucích generacích u křížení VIR320 × WL1238 (F<sub>10:11</sub>), JI64 × JI92 (F<sub>4:5</sub>), JI92 × JI64 (F<sub>4:5</sub>), L100 × Cameor (F<sub>3:4</sub>) (příloha 5).

**Tab. 13:** Křížení VIR320 × WL1238

VIR320 x WL1238	IDEH-Hinf1	NIP-Hinf1	fenotyp červenec 2014	fenotyp prosinec 2014				
	A	A	1	1				
<b>RILs</b>	B	B	0	0				
<b>1</b>	B	B	0	0				
<b>2</b>	A	B	0	0				
<b>3</b>	B	A	1	1				
<b>4</b>	B	B	0					
<b>5</b>	B	B	0					0
<b>6</b>	B	A	0					0
<b>7</b>	B	A	0					0
<b>8</b>	B	A	0					
<b>9</b>	B	B	0					0
<b>10</b>	A	A						0
<b>11</b>	A	A	0					0
<b>12</b>	A	B						

13	A	A	1	1
14	A	A	0	0
15	A	A	0	0
16	B	A	0	0
17	A	A	1	1
18	A	A	0	0
19				
20	B	B		
21	A	B	0	
22	A	B		
23	B	B	1	1
24	B	B	0	0
25	A	B	1	1
26	B	B	0	1
27	B	A	1	1
28	B	A	0	0
29	B	A	1	1
30	A	B		1
31	A	B	0	0
32	B	B	0	0
33	B	B	1	1
34		A	0	0
35	B	A	1	1
36	A	B	0	0
37				
38	A	A	0	0
39	B	B	1	1
40	A	B	1	1
41	B	B	0	0
42	A	B	0	0
43	B	B	0	0
44	A	B	1	
45	A	A	1	1
46	B	B	1	1
47	A	B	1	1
48	B	B	0	0
49	A	B	1	1
50	B	B	0	0
51	A	B	0	0
52	B	A	0	0
53	B	A	1	
54	B	A	0	0
55	B	A	1	1

56	A	B	0	0
57	A	B	1	1
58	A	B	1	1
59	B	A	0	0
60	B	B	0	0
61	B	B	0	0
62	A	B	0	0
63	B	A	0	0
64	A	B	1	1
65	B	A	0	0
66	B	A	0	0
67	A	B	1	1
68				
69	B	B	1	1
70	A	B	0	
71	B	B	0	0
72	B	A		
73	A	B	0	
74	A	B	1	1
75	B	A	0	0
76	A	A	1	1
77	A	A	1	1
78	A	B	1	1
79	B	B		0
80	A	A	0	0
81	B	B	1	1
82	B	B	1	1
83	A	B	1	1
84	B	A	0	
85	A	B	0	1
86				
87	A	B	0	1
88	B	A	1	
89	A	B	0	1
90	A	A		0
91	A	A	0	1
92	B	B	0	0
93	B	B	1	1
94	B	B	0	0
95	A	A	1	1
96	B	B	0	1
VIR320	A	A	1	1
WL1238	B	B	0	0

## DISKUSE

Identifikace znaků domestikačního syndromu je cílem vědců jednak kvůli usnadnění šlechtění nových odrůd vzniklých introgresí planých forem, ale především také pro pochopení procesu domestikace, jako formy zrychlené evoluce. Z tohoto pohledu je potřebné získat informace pro každou z geograficky a fylogeneticky nezávisle domestikovaných plodin, v našem případě pro druhy bobovitých rostlin, tak aby bylo možné provést srovnávací evoluční analýzu zodpovědných genů, popř. biosyntetických procesů. Protože genomy kulturních plodin jsou vesměs komplikované (s velkým často polyploidním nebo hybridním genomem) a také kvůli rychlejšímu získání výsledků, byly dosud identifikovány geny podílející se na pukání šešule s využitím modelové rostliny huseníčku (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) (Liljegren *et al.*, 2000, Nanni *et al.*, 2011, Gioia *et al.*, 2013), která má menší genom a dostatečné množství dostupných zdrojů (mutantních linií). V případě čeledi bobovitých tyto požadavky v současnosti splňuje tolíce (*Medicago truncatula* Gaertn.) a štírovník (*Lotus japonicus* L.), kteří však nemají odpovídající kulturní protějšky. Jsou to především geny z rodiny MADS-box genů, *FRUITFULL* (*FUL*), *SHATTERPROOF 1 a 2* (*SHP1/2*) a *INDEHISCENT* (*IND*) (Liljegren *et al.*, 2000). Gen *FUL* u standardní rostliny huseníčku (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) potlačuje expresi *SHP* (i *IND*) a výsledným projevem je tvorba plně funkční zóny dehiscence a lignifikace buněk, což způsobí pukavost šešule (Ferrándiz *et Fourquin*, 2014).

V případě luskovin, byl nejdříve identifikován u sóji (*Glycine* Willd.) gen *SHATTERING 1-5* (homologní s genem *AtNST1/2* huseníčku) zodpovědný za její domestikaci (Dong *et al.*, 2014). Tento gen leží na chromosomu 16, aktivuje biosyntézu sekundární buněčné stěny a podporuje tloušťnutí buněk v pruhu sklerenchymatických vláken (FCC = Fibre Cap Cells) ve švu lusku kulturní sóji (*Glycine max* (L.) Merr.). Polymorfismus v tomto lokusu je dán absencí tří nukleotidů v promotoru genu zodpovídající za změny genové exprese. Gao a Zhu (2013) sekvenční analýzou identifikovali indel (inzerce/delece) 113 bp v promotorové oblasti genu *Gm16g25600* kódující bZIP-typ transkripční faktor. Na poznatky této práce a práce Dong *et al.* (2014) navázali Funatsuki *et al.* (2014) a identifikovali gen *Pdh1* kontrolující pukavost lusku sóji a kódující dirigent-like protein. U pukavého fenotypu byla pozorována vysoká exprese proteinu zejména

na 3 dny po opylení, kdy začalo docházet k ukládání ligninu do buněk endokarpu. Nepukavé genotypy mají v sekvenci genu *pdh1* jednonukleotidovou záměnu, která při expresi vytváří předčasný stop kodon, tedy nefunkční protein.

Tyto dva geny jsou doposud jedinými identifikovanými geny souvisejícími s domestikací u luskovin, a proto bylo nutné vycházet ze známé syntenie mezi druhy *Pisum* L., *Lotus japonicus* L., *Glycine max* (L.) Merr., *Medicago truncatula* Gaertn. a dalšími (Kalo *et al.*, 2004, Choi *et al.*, 2004, Aubert *et al.*, 2006). Znalost reciproční homologie mezi *Pisum* L. a *Medicago truncatula* Gaertn. (Bordat *et al.*, 2011) byla také výhodou, protože *Medicago truncatula* Gaertn. je fylogeneticky nejbližší modelový druh pro rody *Pisum* L., *Vicia* L., *Lens* Mill. a *Lathyrus* L. a k dispozici jsou jeho sekvenované genotypy, mutantní linie a detailní fyzické a genetické mapy (Young *et al.*, 2005). U tolíce (*Medicago truncatula* Gaertn.) byl identifikován jednonukleotidový polymorfismus v sekvenci genu *SHATTERPROOF* a výsledkem této záměny je změna v kódování aminokyselin. Fenotypovým projevem je pak rovný lusk namísto stočeného (Fourquin *et al.*, 2013).

Jedním z cílů této práce bylo zúžit mapovací interval genu pukavosti lusku (*Dpo1*) u hrachu (*Pisum* L.). Pracováno bylo s rekombinantními inbredními liniemi (RILs) segregujícími mimo jiných znaků, také ve znaku pukavosti lusku. Studie Weeden *et al.* 2002, Weeden 2007 uvádí, že pukavost hrachu (*Pisum* L.) je řízena dvěma lokusy, semidominantním a monogenním *Dpo1* lokusem (vazebná skupina LGIII) (Weeden, 2007) a lokusem *Dpo2* (nalezen pouze u některých kříženců) (Weeden *et al.*, 2002).

Vzhledem k ukotvení markerů *Dpo1* lokusu umístěného na vazebné skupině LGIII, bylo použito několik genů. Mapována byla oblast genu *INDEHISCENT* (*IND*), *NIP* a *bZIP* u křížení VIR320 × WL1238. Pomocí metody CAPs byly nalezeny polymorfismy v amplifikovaných oblastech genů *IND* a *NIP* s použitím restriční endonukleázy *Hinf*I. Byla snaha porovnat/asociovat tyto polymorfismy s fenotypem, zde však byl problém objektivně posoudit fenotypový projev daného genotypu RILs linie. Pomocí programu JoinMap byla vytvořena mapa, nicméně se nepotvrdilo, že by byl některý z testovaných kandidátních genů s *NIP* markerem ve vazbě.

Testované rostliny hrachu (*Pisum* L.) byly pěstovány ve skleníku MENDELU a pravděpodobně kvůli konstantní teplotě a vlhkosti nebyl fenotypový projev tak jasně zřetelný jako v přirozených venkovních podmínkách s oscilující teplotou a vlhkostí. Dalším problémem byla degenerace vývoje lusků pravděpodobně ovlivněná výkyvem vysoké teploty. Lusky byly deformované, špatně se vyvíjely a celkově poskytovaly málo semen (nej-

citlivější byly právě RILs linie křížení VIR320 × WL1238). Tabulky srovnávající genotyp s fenotypem tak bohužel nepotvrdily, že by se geny *IND* či *NIP* podílely na pukavosti plodů nebo byly lokalizovány v daném intervalu na LGIII.

Tato diplomová práce je součástí projektu 14-11782S, financovaného Grantovou agenturou České republiky. Pro další přesnější celogenomové mapování byla v rámci projektu zvolena metodika DArTseq (Diversity Arrays Technology, Ltd. Austrálie) poskytující několik desítek sekvenčně charakterizovaných fragmentů, často s homologii ke genům tolíce (*Medicago truncatula* Gaertn.) a ostatních bobovitých rostlin se známým genomem. Takto bude možné získat vlastní mapu pro danou mapovací populaci a na všechny vazebné skupiny. Lze očekávat další zpřesnění těchto dat s ohledem na publikování genomu kulturního hrachu na přelomu roku 2015/16. Výsledky metodiky DArTseq nejsou součástí této práce. Přesto v dosavadní práci získaná data jsou cenná a dále použitelná, neboť umožní zakotvení markerů na již existující mapy.

Vyhodnocení fenotypu bylo dalším cílem této práce. Aby bylo vyhodnocování objektivní, zaměřila se tato práce na objasnění rozdílů v anatomické struktuře mezi pukavým a nepukavým luskem. Studium anatomických rozdílů v souvislosti s pukavostí bylo již provedeno například u huseníčku (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), sóji (*Glycine* Willd.) nebo u tolíce (*Medicago* L.). Všechny doposud zveřejněné publikace se zaměřují na stavbu švů (ventrálního švu) a především na lignifikované buňky v této oblasti, případně na sklerenchymatickou vrstvu endokarpu. Lignifikované struktury jsou v těchto studiích histochemicky barveny floroglucinolem v kyselém prostředí (Fourquin *et al.*, 2013, Ferrándiz *et Fourquin*, 2014, Dong *et al.*, 2014, Funatsuki *et al.*, 2014).

Huseníček (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) má mechanismus pukaní šesule založen na lignifikaci buněk v oblasti odlučovací vrstvy švu (Ferrándiz *et Fourquin*, 2014). U sóji (*Glycine* Willd.) byla pozornost nejprve zaměřena také na studium lignifikace buněk ventrálního švu (Dong *et al.*, 2014), kde byl prokázán fenotypový rozdíl v masivnosti lignifikace pruhu sklerenchymatických vláken (FCC). Později bylo zjištěno, že hlavním mechanismem pukavosti lusků sóji je zvýšená lignifikace buněk sklerenchymatické vrstvy endokarpu (Funatsuki *et al.*, 2014).

Na základě těchto poznatků bylo v této práci pracováno s kontrastními rodičovskými genotypy hrachu (*Pisum* L.) VIR320, JI64, JI92 a Cameor. Anatomické řezy byly nejprve prováděny na liniích VIR320 a Cameor pomocí ručního mikrotomu a použity byly histochemická barviva (floroglucinol, toluidinová modř O, Sudan III 7B) (ve spolupráci

s katedrou experimentální biologie rostlin PŘF UK v Praze). Z těchto tří barviv se nejlépe osvědčil floroglucinol, a proto byly další analýzy prováděny již pouze s touto látkou. Postupně byly zpracovávány preparáty zhotovované z dalších rodičovských linií, tentokrát pomocí fixace materiálu v parafínových bločcích a následného řezání na rotačním mikrotomu (MENDELU). Pozornost byla zaměřována nejen na oblast švů uprostřed lusku, ale i na oblasti švů v místě špičky lusku (cca 3 mm). Technika zalévání vzorků do parafínu se však neosvědčila. Preparáty byly po nařezání potřhané a pozorování struktur lusku nebylo objektivní u všech preparátů.

Hodnocení anatomických řezů probíhalo srovnáváním mezi kulturní (JI92, Cameor) a planou (JI64, VIR320) formou. V této práci bylo pozorováno, že plané formy hrachu (*Pisum elatius* Steven ex M. Bieb.) mají více lignifikované struktury lusku než je tomu u kulturních druhů (*Pisum sativum* L.). Aby tento poznatek byl uznán za fakt, bude potřebné se v další práci zaměřit na kvantifikaci lignifikace, potažmo na kvantifikaci počtu vrstev buněk ve sklerenchymatické vrstvě endokarpu planého hrachu (*Pisum elatius* Steven ex M. Bieb.). Hypotéza mechanismu pukání lusků hrachu (*Pisum* L.) by pak mohla být podobná systému pukavosti lusků sóji (*Glycine soja* Sieb. a Zucc.), kdy zvýšená lignifikace sklerenchymatické vrstvy endokarpu je hnací silou otevření lusku. Dalším zajímavým zjištěním bylo pozorování lignifikované struktury (asi 70  $\mu$ m dlouhé) u linie J92 pocházející z Afghánistánu a představující primitivní domestikovanou formu, na dorzálním švu v oblasti začátku špičky lusku. Tuto strukturu se nepodařilo identifikovat u jiné linie, což ale mohlo být případně způsobeno vynecháním dané oblasti z pozorování či špatnou kvalitou preparátů zhotovených pomocí parafínové fixace. Objasnění pozice a přítomnosti či absence této struktury by tak mohlo být užitečným znakem. Hypotézou by mohlo být, že daná struktura drží lusk zavřený a je třeba vnější síly, aby byl lusk otevřen.

V kontextu s publikovanými pracemi u sóji (*Glycine* Willd.), by bylo zajímavé a vhodné, najít způsob přesného fyzikálního měření pukavosti (napětí švu lusku při vyschnutí apod.), tak aby bylo možné co nejobektivněji posoudit fenotypový projev, což je klíčem vedoucím k identifikaci zodpovědného genu pro *Dpo1* lokus.

## ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zaměřovala na domestikační znak, pukavost lusku u hrachu (*Pisum* L.) a byly zde studovány nejen genetické, ale i fenotypové aspekty. Pracovalo se zde s rekombinantními inbredními liniemi (RILs) vzniklými křížením kontrastních rodičovských genotypů VIR320 (*P. elatius* Steven ex M. Bieb.) × WL1238 (kulturní hrách *P. sativum* L.) (F<sub>10</sub> generace), také s recipročním křížením linií JI64 (*P. elatius*) × JI92 (afghánský typ kulturního hrachu *P. sativum*) (F<sub>4:5</sub> generace) a s křížením L100 × Cameror (F<sub>3:4</sub> generace).

Na základě synteníí a kolineárních map byly přemapovány pozice genu *INDEHISCENT*, *NIP* a genu pro transkripční faktor bZIP. Zde byly nalezeny jednonukleotidové polymorfismy. Vyhodnocení fenotypu RILs linií bylo prováděno pozorováním a pro objektivní posouzení pukavosti byly v této práci využity techniky anatomických řezů prováděné na rodičovských genotypech. Získaná genetická data a informace o práci s anatomickými řezy jsou dále využitelná a perspektivní pro další práce.

## SEZNAM LITERATURY

- 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, 1399–1404.
- Abbo S., Saranga Y., Peleg Z., Kerem Z., Lev-Yadun S., Gopher A. 2009. Reconsidering domestication of legumes versus Cereals in the ancient near east. *The quarterly review of biology* 84(1), 29–50.
- Abbo S., van-Oss R.P., Gopher A., Saranga Y., Ofner I., Peleg Z. 2013. Plant domestication versus crop evolution: a conceptual framework for cereals and grain legumes. *Trends in Plant Science* 19, 351–360.
- Allaby R.G. 2008. The rise of plant domestication: life in the slow lane. *University of Warwick, UK Biologist* 55(2), 94–99.
- Allaby R.G. 2010. Integrating the processes in the evolutionary system of domestication. *Journal of Experimental Botany* 61, 935–944.
- Ambrose M.J., Ellis T.H.N. 2008. Ballistic seed dispersal and associated seed shadow in wild *Pisum* germplasm. *Pisum Genet* 40, 5–10.
- Ames M., Spooner D.M. 2008. DNA from herbarium specimens settles a controversy about origins of the European potato. *American Journal of Botany* 95, 252–257.
- Atkins C.A., Kuo J., Pate J.S. 1977. Photosynthetic pod wall of pea (*Pisum sativum* L.) *Plant Physiology* 60, 779–786.
- Aubert G., Morin J., Jacquin J., Loridon K., Quillet M.C. 2006. Functional mapping in pea, as an the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 112, 1024–1041.
- Bennett E.J., Roberts J.A., Wagstaff C. 2011. The role of the pod in seed development: strategies for manipulating yield. *New Phytologist* 190(4), 838–853.
- Bogdanova V. S., Galieva E. R., Kosterin O. E. 2009. Genetic analysis of nuclear-cytoplasmic incompatibility in pea associated with cytoplasm of an accession of wild subspecies *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.). *Schmahl. Theor Appl Genet* 118, 801–809.
- Bordat A., Savoie V., Nicolas M., Salse J., Chauveau A., Bourgeois M., Potier J., Houtin J., Rond C., Murat F., Marget P., Aubert G., Burstin J. 2011. Translational Genomics in Legumes Allowed Placing In Silico 5460 Unigenes on the Pea Functional Map and Identified Candidate Genes in *Pisum sativum* L. *G3* 1(2), 93–103.



- Cacas A., del Carmen Vázquez M., Viveros J.L., Caballero J. 1996. Plant management among the Nahua and the Mixtec in the Balsas River Basin, Mexico: an ethnobotanical approach to the study of plant domestication. *Human Ecology* 24(4), 455–478.
- Doebley J.F., Gaut B.S., Smith B.D. 2006. The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell* 127(29), 1309–1321.
- Domoney C., Wehler T., Ellis N., Hellens R. 1994. Inheritance of qualitative and quantitative trypsin inhibitor variants in *Pisum*. *Theor Appl Genet* 89, 387–391.
- Dong Y., Yang X., Liu J., Wang B.H., Liu B.L., Wang Y.Z. 2014. Pod shattering resistance associated with domestication mediated by a NAC gene in soybean. *Nature communications* 5:3352, 1–11.
- Drew J.E. 1994. Cloning and characterisation of genes determining pod morphology in pea. University of Durham, UK, 221 s.
- Ferrández C., Fourquin CH. 2014. Role of the FUL–SHP network in the evolution of fruit morphology and function. *Journal of Experimental Botany* 65(16), 2–9.
- Flegr J. 2009. *Evoluční biologie*. 2. opr. a rozš. vyd. Praha: Academia, 2009. 569s.
- Flint-Garcia S.A. 2013. Genetics and Consequences of Crop Domestication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 8267–8276.
- Fourquin CH., del Cerro C., Victoria F.C., Vialette-Guiraud A., de Oliveira A.C., Ferrández C. 2013. A Change in *SHATTERPROOF* Protein Lies at the Origin of a Fruit Morphological Novelty and a New Strategy for Seed Dispersal in *Medicago* Genus. *Plant Physiology* 162, 907–917.
- Fuller D.Q., Willcox G., Allaby R.G. 2012. Early agricultural pathways: moving outside the ‘core area’ hypothesis in Southwest Asia. *Journal of Experimental Botany* 63(2), 617–633.
- Funatsuki H., Hajika M., Hagihara S., Yamada T., Tanaka Y., Tsuji H., Ishimoto M., Fujino K. 2008. Confirmation of the location and the effects of a major QTL controlling pod dehiscence, qPDH1, in soybean. *Breed Science* 58, 63–69.
- Funatsuki H., Hajika M., Yamada T., Suzuki M., Hagihara S., Tanaka Y., Fujita S., Ishimoto M., Fujino K. 2012. Mapping and use of QTLs controlling pod dehiscence in soybean. *Breed Science* 61, 554–558.
- Funatsuki H., Ishimoto M., Tsuji H., Kawaguchi K., Hajika M., Fujino K. 2006. Simple sequence repeat markers linked to a major QTL controlling pod shattering in soybean. *Plant Breed* 125, 195–197.

- 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. *PNAS* 111 (50), 17797–17802.
- Gao M., Zhu H. 2013. Fine mapping of a major quantitative trait locus that regulates pod shattering in soybean. *Molecular Breeding* 32, 485–491.
- Gioia T., Logozzo G., Kami J., Zeuli P.S., Gepts P. 2013. Identification and Characterization of a Homologue to the Arabidopsis *INDEHISCENT* Gene in Common Bean. *Journal of Heredity* 104(2), 273–286.
- Grant D., Nelson R.T., Cannon S.B., Shoemaker R.C. 2010. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. *Nucleic Acids Res.* 38, 843–846.
- Hammer K. 1984. Das Domestikations syndrom. *Kulturpflanze* 32, 11-34.
- Harlan J.R. 1992. Origin and processes of domestication. 159–175. Chapman, G.P. Grass evolution and domestication. Cambridge University Press, New York, 390 s.
- Harris D.R. 1989. An evolutionary continuum of people–plant interaction. 11–26. Harris DR a Hillman GC. Foraging and farming: the evolution of plant exploitation. Unwin Hyman, London, 733 s.
- Higgs E.S. 1972. Papers in economic prehistory. Studies by members and associates of the British Academy Major Research Project in the early history of agriculture. Cambridge University Press, Cambridge, 229 s.
- Hillman G.C. a Davies M.S. 1990. Measured domestication rates in wild wheats and barley under primitive cultivation, and their archaeological implications. *J. World Prehistory* 4, 157–222.
- Hilu K.W. 1993. Polyploidy and the Evolution of Domesticated Plants. *American Journal of Botany* 80(12), 1494–1499.
- Hosoda K., Imamura A., Katoh E., Hatta T., Tachiki M., Yamada H., Mizuno T., Yamazaki T. 2002. Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the Arabidopsis response regulators. *Plant Cell* 14, 2015–2029.
- Houba M., Hochman M., Hosnedl V. 2009. Lupina (Lupinus Tour.) s. 84-87., Luskoviny a jejich užití. Nakladatelství Kurent České Budějovice, 134 s.
- Huamán Z., Spooner D.M. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. Petota). *American Journal of Botany* 89, 947–965.
- Huang S., Sirikhachornkit A., Su X., Faris J., Gill B., Haselkorn R., Gornicki P. 2002. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *PNAS* 99, 8133–8138.

- Choi H.K., Mun J.H., Kim D.J., Zhu H., Baek J.M. 2004. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *PNAS* 101, 15289–15294.
- Isemura T., Kaga A., Tabata S., Somta P., Srinives P. 2012. Construction of a Genetic Linkage Map and Genetic Analysis of Domestication Related Traits in Mungbean (*Vigna radiata*). *PLOS ONE* 7.
- Jing R., Vershinin A., Grzebyta J., Shaw P., Smýkal P., Marshall D., Ambrose M.J., Ellis T.H.N., Flavell A.J. 2010. The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evolutionary Biology* 10:44, 1–20.
- Jing R., Johnson R., Seres A., Kiss G., Ambrose M.J., Knox M.R., Ellis T.H.N. 2007. Flavell AJ: Gene-based sequence diversity analysis of field pea (*Pisum*). *Genetics* 177, 2263–2275.
- Kaló P., Seres A., Taylor S.A., Jakab J., Kevei Z. 2004. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Molecular Genetics and Genomics* 272, 235–246.
- Kočár P., Dreslerová D. 2010. Archeobotanické nálezy pěstovaných rostlin v pravěku České republiky. *Památky archeologické* 101, 203–242.
- Ladizinski G. 1998. *Plant Evolution under Domestication*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Lewis M.W., Leslie M.E., Liljegren S.J. 2006. Plant separation: 50 ways to leave your mother. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 59–65.
- Li C., Zhou A., Sang T. Rice domestication by reducing shattering. *Science* 311, 1936–1939.
- Liljegren S., Ditta G., Eshed Y., Savidge B., Bowmanand J., Yanofsky M. 2000. Control of fruit dehiscence in *Arabidopsis* by the *SHATTERPROOF* MADS-box genes. *Nature* 404, 766–769.
- Liljegren S.J., Roeder A.H.K., Kempin S.A., Gremski K., Østergaard L., Guimil S., Reyes D.K., Yanofsky M.F. 2004. Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell* 116, 843–853.
- Macas J., Neumann P., Navrátilová A. 2007. Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*, 8 (1), 427 S.
- Mackinder B., Clark R., Lewis G., Rico L. 2014. Legumes of the world. Kew Royal Botanic Garden, Databáze online [cit.2014-12-18] <http://www.kew.org/science-conservation/researchdata/resources/legumes-of-the-world>.

Matsuoka Y. 2011. Evolution of Polyploid Triticum Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. *Plant Cell Physiology* 52(5), 750–764.

Maxted N., Ambrose M. 2001. Peas (*Pisum* L). Maxted N, Bennett SJ.. Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean. Chapter 10. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Mikić A., Smýkal P., Kenicer G.J., Vishnyakova M., Sarukhanyan N., Akopian J., Vanyan A., Gabrielyan I., Smýkalová I., Sherbakova E., Zorić L., Atlagić J., Zeremski-Škorić T., Čupina B., Krstić D., Jajić I., Antanasović S., Đorđević V., Mihailović 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), 524–531.

Murad L., Lim K.Y., Christopodulou V., Matyasek R., Lichtenstein C.P., Kovarik A., Leitch A.R. 2002. The origin of tobacco's T genome is traced to a particular lineage within *Nicotiana tomentosiformis* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 89, 921–928.

Nanni L., Bitocchi E., Bellucci E., Rossi M., Rau D., Attene G., Gepts P., Papa R. 2011. Nucleotide diversity of a genomic sequence similar to *SHATTERPROOF* (PvSHP1) in domesticated and wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 10.

Nelson M., Phan H.T.T., Ellwood S.R., Moolhuijzen P.M., Hane J., Williams A., O'Lone C., Fosu-Nyarko J., Scobie M., Cakir M., Jones M.G.K., Bellgard M., Ksiazkiewicz M., Wolko B., Barker S., Oliver R.P., Cowling W. 2006. The first gene-based map of *Lupinus angustifolius* L.-location of domestication genes and conserved synteny with *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 113(2), 225–238.

Ozga J.A., YU J., Reinecke D.M. 2003. Pollination-, Development-, and Auxin-Specific Regulation of Gibberellin 3 $\beta$ -Hydroxylase Gene Expression in Pea Fruit and Seeds. *Plant Physiology* 131(3), 1137–1146.

Pate J.S., Kuo J. 1981. Anatomical studies of legume pods – A possible tool in taxonomic research. 903–912. Polhill RM, Raven PH. In *Advances in legume systematics* MAFF, England.

Small E., Brookes B. 1984. Coiling of alfalfa pods in relation to resistance against seed chalcids: additional observations. *Canadian Journal of Plant Science* 64, 659–665.

Smartt J., 1990: Grain legumes: evolution and genetic resources. Cambridge University Press, New York, 379 s.

Smith B.D. 1998. The Emergence of Agriculture. Scientific American Library, New York, 1–13.

Smýkal P. 2009. Domestikace rostlin z pohledu současné genetiky. *Živa* 1, 6–9.

Smýkal P. 2011. Fylogeneze, biogeografie a genetická diverzita rodu hrách. *Živa* 4, 151–154.

Smýkal P., Coyne C.J., Ambrose M.J., Maxted N., Schaefer H., Blair M.W., Berger J., Greene S.L., Nelson M.N., Beshart 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), 43–104.

Smýkal P., Jovanović Ž., Stanisavljević N., Zlatković B., Čupina B., Đorđević V., Mikić A., Medović A. 2014. A comparative study of ancient DNA isolated from charred pea (*Pisum sativum* L.) seeds from an Early Iron Age settlement in southeast Serbia: inference for pea domestication. *Genetic Resource and Crop Evolution* 61(8), 1533–1544.

Smýkal P., Kenicer G., Flavell A., Corander J., Kosterin O., Redden R.J., Ford R., Coyne C.J., Maxted N., Ambrose M.J., Ellis N.T.H. 2011. Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*, 9(01), 4–18.

Soukup A. 2014. Selected simple methods of plant cell wall histochemistry and staining for light microscopy. In *Plant Cell Morphogenesis Humana Press*, 25-40.

Stam P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *The Plant Journal* 3, 739-744.

Sugimoto K., Takeuchi Y., Ebana K., Miyao A., Hirochika A., Hara N., Ishiyama K., Kobayashi M., Ban Y., Hattori T., Yano M. 2010. Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. *PNAS* 107, 5792–5797.

Tassel D.L.V, DeHann L.R., Cox T.S. 2010. Missing domesticated plant forms: can artificial selection fill the gap? *Blackwell Publishing Ltd* 3, 434–452.

Vavilov N.I. 1992. Origin and geography of cultivated plants. Cambridge University Press, U.K. 498 s.

Vercher Y., Molwny A., Carbonell J. 1987. Gibberellic acid effects on the ultrastructure of endocarp cells of unpollinated ovaries of *Pisum sativum*. *Physiology Plant*, TJJL 302–308.

Vinter V. 2010. Rostliny pod mikroskopem (Základy anatomie cévnatých rostlin). Vydavatelství UP Olomouc, 2. doplněné vydání, 201 s.

Weeden N.F. 2007. Genetic Changes Accompanying the Domestication of *Pisum sativum*: Is there a Common Genetic Basis to the ‘Domestication Syndrome’ for Legumes? *Annals of Botany* 100, 1017–1025.

Weeden N.F, Brauner S., Przyborowski J.A. 2002. Genetic analysis of pod dehiscence in pea (*Pisum sativum* L.) *Cellular and Molecular Biology Letters* 7, 657–663.

Wendel J.F. 1989. New world tetraploid cottons contain Old World cytoplasm. PNAS 86, 4132–4136.

Young N.D., Steven B.C., Sato S., Kim D., Cook D.R., Rown C.D., Roe B.A., Tabata S. 2005. Sequencing the Genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. Plant Physiology 137, 1174–1181.

Zohary D., Hopf M. 2000. Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley. Oxford University Press, 316 s.

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1</b>	Archeologická naleziště zakládajících plodin v jihovýchodní Asii (Zohary a Hopf, 2000)	10
<b>Obr. 2</b>	Centra původu kulturních druhů	15
<b>Obr. 3</b>	Příčný řez šešulí huseníčku ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) (Ferrándiz a Fourquin, 2014)	22
<b>Obr. 4</b>	Vývoj domestikace sóji ( <i>Glycine</i> Willd.) (Dong <i>et al.</i> , 2014)	23
<b>Obr. 5</b>	Gen <i>Pdhl</i> kódující dirigent-like protein sóji ( <i>Glycine</i> Willd.) (Funatsuki <i>et al.</i> , 2014)	24
<b>Obr. 6</b>	Morfologie lusků tolíce <i>M. truncatula</i> a <i>M. noeana</i> (Fourquin <i>et al.</i> , 2014)	25
<b>Obr. 7</b>	Graf kolinearit <i>P. sativum</i> a <i>M. truncatula</i> (Bordat <i>et al.</i> , 2011)	26
<b>Obr. 8</b>	Příčný řez luskem hrachu ( <i>Pisum</i> L.) (Vinter, 2009)	29
<b>Obr. 9</b>	Příčný řez perikarpem lusku hrachu ( <i>Pisum sativum</i> ) (Aktins <i>et al.</i> , 1977)	30
<b>Obr. 10</b>	Krystaly v buňkách mezokarpu ( <i>Pisum sativum</i> ) (rastrovací elektronová mikroskopie) (Pate a Kuo, 1981)	31
<b>Obr. 11</b>	Vypouklé stěny vnitřní epidermis ( <i>Pisum sativum</i> ) (elektronová mikroskopie) (Pate a Kuo, 1981)	31
<b>Obr. 12</b>	Vývoj oplodí hrachu ( <i>Pisum</i> L.) (Ozga <i>et al.</i> , 2003)	32
<b>Obr. 13</b>	Rodičovské linie (zleva WL1238, VIR320, JI64, JI92)	34
<b>Obr. 14</b>	Standard Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (NEB, USA)	36
<b>Obr. 15</b>	Ukázka PCR amplifikace oblasti genu <i>INDEHISCENT</i> u křížení VIR320 × WL1238	43
<b>Obr. 16</b>	Ukázka PCR amplifikace oblasti genu <i>NIP</i> u křížení VIR320 × WL1238	43
<b>Obr. 17</b>	Testování rodičovských genotypů VIR320 a WL1238 metodou CAPS-PCR v oblasti genů <i>IND</i> a <i>bZIP</i>	44
<b>Obr. 18</b>	Testování RILs liníí v oblasti genu <i>IND</i> restričním enzymem <i>Hinf</i> I	45

<b>Obr. 19</b>	Testování rodičovských genotypů VIR320 a WL1238 metodou CAPS-PCR v oblasti genu <i>NIP</i>	46
<b>Obr. 20</b>	Ukázka testování RILs linií v oblasti genu <i>NIP</i> restričním enzymem <i>Hinf</i> I	47
<b>Obr. 21</b>	Genotyp VIR320 - srovnání technik anatomických řezů	48
<b>Obr. 22</b>	Porovnání anatomické stavby lusků u genotypů Cameor a VIR320 (ruční řezy, barveno floroglucnolem)	49
<b>Obr. 23</b>	Porovnání dorzálního švu u genotypů JI92 (řezy rotačním mikrotonem, barveno floroglucinolem)	50



## SEZNAM TABULEK

<b>Tab. 1</b>	Výběr nejvýznamnějších domestikovaných plodin	16
<b>Tab. 2</b>	Znaky domestikačního syndromu	17
<b>Tab. 3</b>	Balistický efekt šíření semen hrachu ( <i>Pisum L.</i> ) (převzato a upraveno dle Ambrose a Ellis, 2008)	19
<b>Tab. 4</b>	Reakční směs pro PCR	37
<b>Tab. 5</b>	Použité primery	37
<b>Tab. 6</b>	Reakční cyklus PCR	37
<b>Tab. 7</b>	Restrikční enzymy	38
<b>Tab. 8</b>	Reakční směs pro restrikci	38
<b>Tab. 9</b>	Etanolová řada	41
<b>Tab. 10</b>	Infiltrace xylenu	41
<b>Tab. 11</b>	Odstranění xylenu	42
<b>Tab. 12</b>	Hydratace preparátu	42
<b>Tab. 13</b>	Křížení VIR320 × WL1238	50

## POUŽITÉ ZKRATKY

<b>AL</b>	abscission layer (odlučovací vrstva)
<b>Ala</b>	alanin
<b>ALC</b>	gen <i>ALCATRAZ</i>
<b>bZIP</b>	Basic-leucin zip (gen pro transkripční faktor bZIP)
<b>C</b>	crystal (krystal)
<b>CAPs</b>	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
<b>DAA</b>	Days After anthesis (dny po opylení)
<b>Dpo</b>	locus pod dehiscence (lokus pukavosti lusku)
<b>DZ</b>	Dehiscence Zone (zóna pukavosti)
<b>E</b>	endokarp
<b>ER</b>	endoplazmatické retikulum
<b>F</b>	Fibre Layers (vláknitá vrstva)
<b>FCC</b>	Fibre Cap Cells (pruh sklerenchymatických vláken ventrálního cévního svazku)
<b>FUL</b>	gen <i>FRUITFULL</i>
<b>GA</b>	Golgiho aparát
<b>GP</b>	locus yellow Pod Gene
<b>IE</b>	Inner Epidermis (vnitřní epidermis)
<b>IND</b>	gen indehiscent (helix-loop-helix gen)
<b>ITIS</b>	Integrated Taxonomic Information System
<b>LG</b>	Linkage Group (vazebná skupina)
<b>LL</b>	Lignified Layer (lignifikovaná vrstva)
<b>MVB</b>	Medial Vascular Bundle (středové svazky cévní)
<b>NIP</b>	gen <i>NIP</i>
<b>OE</b>	Outer Epidermis (vnější epidermis)
<b>P</b>	Parenchyma (parenchymatická vrstva)
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>QTL</b>	Quantitative Trait Locus (kvantitativní lokus)
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RILs</b>	Recombinant Inbred Lines (rekombinantní inbrední linie)
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate (dodecylsírán sodný)
<b>SG</b>	Starch Grains (škrobová zrna)
<b>SHAT 1-5</b>	gen <i>SHATTERING 1-5</i>
<b>SHP</b>	gen <i>SHATTERPROOF</i>
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)
<b>Thr</b>	threonin
<b>V</b>	terminus of inward projecting veinlet (zakončení cévních svazků)
<b>VB</b>	Vascular Bundle (svazky cévní)
<b>WT</b>	Wild Type (snatdardní typ)

## SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1** Komparativní mapa mezi chromosomy (Chr) *P. sativum* (Ps), *M. truncatula* (Mtr), *L. japonicus* (Lj), *G. max* (Gmax) (Bordat *et al.*, 2011)
- Příloha 2** Srovnání rodičovských genotypů (zleva WL1238, VIR320, JI64, JI92)
- Příloha 3** Srovnání rodičovských genotypů (zleva WL1238, VIR320)
- Příloha 4** Srovnání lusků rodičovských genotypů (Ing. P. Hanáček, Ph.D.)
- Příloha 5** Fenotypová analýza RILs linií vzniklých křížením JI64 × JI92; JI92 × JI64; L100 × Cameor
- Příloha 6** Příčný řez luskem (Cameor) - ventrální šev, zvětšení 100× (řezáno na rotačním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 7** Příčný řez luskem (Cameor) - ventrální šev, zvětšení 100× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 8** Příčný řez luskem (Cameor) - ventrální šev, zvětšení 400× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 9** Příčný řez luskem (Cameor) - dorzální šev, zvětšení 100× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 10** Příčný řez luskem (Cameor) - dorzální šev, zvětšení 100× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 11** Příčný řez luskem (Cameor) - endokarp, zvětšení 400× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 12** Příčný řez luskem (Cameor) - ventrální šev, zvětšení 400× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno Sudan III)
- Příloha 13** Příčný řez luskem (Cameor) - dorzální šev, zvětšení 400× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno Sudan III)
- Příloha 14** Příčný řez luskem (Cameor) - endokarp, zvětšení 400× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno Sudan III)
- Příloha 15** Příčný řez luskem (Cameor) – ventrální šev, zvětšení 200× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno toluidinovou modří)

- Příloha 16** Příčný řez luskem (Cameor) – dorzální šev, zvětšení 400× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno toluidinovou modří)
- Příloha 17** Příčný řez luskem (Cameor) – endokarp, zvětšení 200× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno toluidinovou modří)
- Příloha 18** Příčný řez luskem (VIR320) – ventrální šev, zvětšení 400× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 19** Příčný řez luskem (VIR320) – ventrální šev, zvětšení 100× (řezáno na rotačním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 20** Příčný řez luskem (VIR320) – dorzální šev, zvětšení 400× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 21** Příčný řez luskem (VIR320) – endokarp, zvětšení 400× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 22** Příčný řez luskem (VIR320) – ventrální šev, zvětšení 400× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno Sudan III)
- Příloha 23** Příčný řez luskem (VIR320) – ventrální šev, zvětšení 100× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno toluidinovou modří)
- Příloha 24** Příčný řez luskem (VIR320) – ventrální šev, zvětšení 200× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno toluidinovou modří)
- Příloha 25** Příčný řez luskem (VIR320) – endokarp, zvětšení 200× (řezáno na ručním mikrotonu, barveno toluidinovou modří)
- Příloha 26** Příčný řez luskem (JI64) – dorzální šev, zvětšení 200× (řezáno na rotačním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 27** Příčný řez luskem (JI64) – endokarp, zvětšení 200× (řezáno na rotačním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 28** Příčný řez luskem (JI92) – ventrální šev, zvětšení 200× (řezáno na rotačním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 29** Příčný řez luskem (JI92) – ventrální šev, zvětšení 100× (řezáno na rotačním mikrotonu, barveno floroglucinolem)
- Příloha 30** Příčný řez luskem (JI92) – dorzální šev, zvětšení 200× (řezáno na rotačním mikrotonu, barveno floroglucinolem)