

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2017**

**Lucie Smržová**

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



# **Ekologická genomika adaptace druhu**

**Bakalářská práce**

**Lucie Smržová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

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

## **Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci na téma „Ekologická genomika adaptace druhu“ vypracovala samostatně pod vedením pana doc. Ing. Petra Smýkala, Ph.D. a s použitím uvedené literatury.

V Olomouci dne 9. 5. 2017

Lucie Smržová

## SHRNUTÍ

Evoluce působí na variabilitu přítomnou v jedincích daného druhu (populace) a jako výsledek dlouhodobého působení se projevuje adaptací k místním podmínkám prostředí. Současné možnosti a nástroje genomiky, společně s dostupnými bioklimatickými faktory, nám umožňují zjistit tuto adaptaci na úrovni genomu a poskytnout tak spojení mezi fenotypem (projevem znaku) a genotypem (DNA sekvencí). Práce si klade za cíl získat genomická data na vybraném souboru položek planých forem/druhů rodu hrachu (*Pisum sp.*) vedoucí k odhalení ekologických a geografických faktorů podílejících se na adaptaci k místním podmínkám prostředí.

Teoretická část práce se zabývá adaptací druhu a studiem adaptace pomocí ekologické genomiky. V rámci teoretické části je také popsán mechanismus regulující iniciaci kvetení rostlin, vzhledem k tomu, že načasování kvetení (přechod z vegetativní do reprodukční fáze) je důležitou adaptační reakcí u rostlin. Blíže se pak této problematice věnuje u příkladu bobovitých rostlin.

Praktická část je zaměřena na analýzu *ELF3* genu u hrachu (*Pisum sp.*), který byl identifikován v rámci původně definovaného *HR* lokusu (Weller *et al.* 2012) a je ortologem ke genu *Early flowering 3 (ELF3)* u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*). V rostlině tento gen ovlivňuje cirkadiánní rytmus, růst rostliny a kvetení. Předmětem této bakalářské práce je především sekvenční analýza daného genu u vybraných vzorků hrachu, zahrnujících jak kulturní, tak plané formy hrachu. Dále pak hodnocení fenotypového projevu těchto rostlin a jejich geografické a bioklimatické zařazení.

## SUMMARY

Evolution effects on variability that is present in individuals of a species (populations) and as a result of long-term exposure there is adaptation to local environmental conditions. Current possibilities and tools of genomics, together with available bioclimatic factors allow us to determine the adaptation at the genomic level, thus providing connection between the phenotype (expression of a feature) and genotype (DNA sequences). The aim of this work is to obtain genomic data for a selected set of items including landraces forms/species of pea (*Pisum sp.*) which lead to the detection of environmental and geographic factors involved in adaptation to local environmental conditions.

The theoretical part deals with the adaptation of the species and its study using ecological genomics. Within the theoretical part, a mechanism regulating the initiation of flowering of plants is also described, since timing of flowering (transition from vegetative to reproductive phase) is an important adaptation reaction in plants. Closer then it deals with this issue on the example of leguminous plants.

The practical part is focused on analysis of the *ELF3* gene in pea (*Pisum sp.*), which was identified within the originally defined *HR* locus (Weller et al., 2012) and is an orthologous gene for the *Early Flowering 3 (ELF3)* gene in *Arabidopsis thaliana*. This gene affects circadian rhythm, plant growth and flowering. The subject of this bachelor thesis is mainly sequential analysis of this gene in selected pea samples, including both cultural and wild forms of pea. Furthermore there is evaluation of phenotypic expression of these plants and their geographic and bioclimatic classification.

## **Poděkování:**

Mé poděkování patří především panu doc. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce. Velmi mu děkuji za jeho laskavý přístup, cenné rady, ochotu a podporu při psaní této bakalářské práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat za spolupráci panu RNDr. Janu Brusovi Ph.D. z katedry geoinformatiky, PřF UP a všem pracovníkům katedry botaniky, PřF UP, se kterými jsem se během tvorby mé práce setkala.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	CÍL PRÁCE .....	9
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	10
3.1	Adaptace druhu .....	10
3.2	Studium adaptace .....	11
3.3	Ekologická genomika .....	11
3.3.1	Přínos ekologického kontextu .....	11
3.3.2	Důležitost genetického přístupu v ekologii .....	12
3.3.3	Ekologická genomika při studiu adaptace .....	13
3.4	Mechanismy regulující iniciaci kvetení rostlin .....	13
3.4.1	Fotoperiodismus rostlin .....	14
3.4.2	Cirkadiánní hodiny .....	15
3.4.3	Vernalizace .....	17
3.5	Geny podílející se na regulaci kvetení – integrátorové geny .....	18
3.5.1	<i>FT</i> geny .....	19
3.5.2	<i>Suppressor of overexpression of Constans 1 (SOC1)</i> .....	19
3.5.3	Gen <i>Leafy (LFY)</i> .....	19
3.5.4	Geny podmiňující tvorbu květenství a květu .....	20
3.6	Kvetení u bobovitých rostlin .....	20
3.6.1	Geny řídící kvetení u hrachu .....	21
3.6.2	<i>HR</i> lokus .....	22
4	MATERIÁL A METODY .....	25
4.1	Laboratorní vybavení .....	25
4.2	Chemikálie .....	25
4.3	Rostlinný materiál .....	25
4.4	Izolace genomové DNA .....	28
4.5	Spektrofotometrické měření DNA .....	29
4.6	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	29
4.7	Gelová elektroforéza .....	30
4.8	Sekvenování .....	31
4.9	Software .....	32
4.9.1	Bio-Statistické zpracování sekvenčních dat .....	32
4.9.2	Geoinformatika .....	33

5	VÝSLEDKY .....	34
5.1	Amplifikace fragmentu <i>ELF3</i> genu.....	34
5.2	Sekvenční analýza .....	36
5.3	Hodnocení fenotypového projevu – nástupu kvetení.....	41
5.4	Odečet délky fotoperiody z GPS dat.....	44
5.5	Analýza vzorků kulturních hrachů .....	49
6	DISKUZE .....	50
7	ZÁVĚR .....	52
8	SEZNAM ZKRATEK .....	53
9	LITERATURA .....	54



# 1 ÚVOD

Působení evolučního procesu je již dlouho předmětem zkoumání vědců po celém světě. Při dlouhodobém působení biotických a abiotických vlivů prostředí dochází k adaptaci populací na místní podmínky, což může vést až k speciaci (vzniku nového druhu). Právě adaptace a speciace jsou projevem evolučního procesu. Dříve se k jejich studiu využívalo pouze pozorování změn fenotypového projevu. S rozvojem molekulárně-genetických metod je umožněno zkoumání adaptace na úrovni genomu. S využitím poznatků z geografie a ekologie je tak možné získat celkový pohled na adaptaci určitého druhu v globálním měřítku, a to jak na úrovni fenotypové (projevy znaků), tak také genetické (sekvence DNA).

Místní klimatické podmínky vytvářejí selekční tlak na geny podmiňující významné reprodukční znaky u rostlin jako je doba klíčení semen a kvetení. Důležitou adaptační reakcí je především správné načasování kvetení, tedy přechod z vegetativní do reprodukční fáze, v závislosti na okolních podmínkách. Rostliny si tak vyvinuly řadu mechanismů, kterými jsou schopné regulovat kvetení v kontextu k ročnímu období, především pak vzhledem ke kvalitě a délce dostupného osvětlení. Díky tomu jsou schopné načasovat cyklus tak, aby přechod do reprodukční fáze nastal ve chvíli, kdy jsou pro rostlinu zrovna optimální vnější podmínky.

Během domestikace rostlin byly tyto přirozené mechanismy většinou modifikovány nebo zcela eliminovány. Výrazným příkladem takového zásahu do rostlinných pochodů je odstranění fotoperiodické závislosti kvetení v souvislosti s tím, jak člověk přesouval jednotlivé druhy rostlin do jiných zeměpisných šířek.

## 2 CÍL PRÁCE

### **Teoretická část**

- Literární rešerše na téma ekologické genomiky, adaptace druhu.

### **Praktická část**

- Sekvenční analýzy kandidátních genů, řídících nebo podílejících se na sledovaných znacích (regulace kvetení, chladuvzdornosti a dormance semen), na souboru vybraných geograficky a bioklimaticky strukturovaných položek planých forem hrachu.
- Asociační analýza vybraného fenotypového projevu a genetických dat.

## 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 3.1 Adaptace druhu

V závislosti na rozšíření druhu se jeho různé populace adaptují na místní abiotické a biotické podmínky prostředí, hovoříme o tzv. lokální adaptaci. Biotickými podmínkami se rozumí především vztah druhu k jiným druhům a jeho celková role v ekosystému. Jedná se například o kompetici podobných druhů o světlo, živiny, vodu či opylovače nebo o vnitrodruhové vztahy, které jsou často pro jedince prospěšné.

Abiotické podmínky prostředí představují teplota, množství dostupné vody a živin, mění se světelné podmínky včetně fotoperiody atd. Úzce tak souvisí s klimatem na daném místě. Z tohoto důvodu pak právě klima může být potenciální selektivní silou v přirozených populacích a hraje tak důležitou roli v adaptaci druhu (Jump a Peñuelas, 2005).

Jedním z předpokládaných důsledků změn klimatu je migrace rostlinných druhů do vyšších nadmořských výšek a šířek, především tehdy, pokud již v prostředí, ke kterému jsou přizpůsobeny, nemohou dále přežít. Meziroční proměnlivost klimatu je však normální jev a při absenci dlouhodobých klimatických změn je většina druhů schopná ji tolerovat, a to díky fenotypové plasticitě. Pokud však klimatické změny dosáhnou míry, kterou již jedinci (a tedy druhy) nejsou schopny tolerovat, pak jsou distribuční a evoluční změny nevyhnutelné (Lynch a Bürger, 1995).

Vzhledem k tomu, že většina rostlinných druhů není schopná migrovat dostatečně rychle na to, aby unikla měnícím se klimatickým podmínkám, adaptace tak u nich hraje důležitou roli a umožňuje jim reagovat na měnící se podmínky prostředí. Přesto význam adaptace v odpovědi rostlinných druhů na minulé změny klimatu bývá zpochybňován (Jump a Peñuelas, 2005).

V přirozeném prostředí na organismy působí různé síly. Asi nejdůležitější silou je tlak přírodního výběru. V různých prostředích jsou vytvářeny různé tlaky výběru, což vede ke genetické různorodosti. Velkou roli hraje také heterogenita životního prostředí, jako je nadmořská výška, expozice nebo dostupnost vlhkosti. Takto jsou poměrně často vytvářeny významné překážky toku genů, např. prostřednictvím účinků na fenologii, a tím se zvyšuje genetická diferenciace mezi částečně izolovanými nebo zcela izolovanými populacemi (Linhart a Grant, 1996).

## 3.2 Studium adaptace

Lokální adaptace je společným znakem pro většinu druhů, které jsou široce rozšířené nebo zabírají prostorově heterogenní prostředí. Výzvou pro ekology a evoluční biology je za pomoci genomiky a biogeografických modelů poznat, jaké ekologické síly pohání adaptaci a udržují adaptivní diverzitu v rámci globálních změn (Fitzpatrick a Keller, 2015).

Rostliny poskytují jedinečnou příležitost ke studiu mechanismů a evolučních procesů adaptace k různým podmínkám prostředí. Díky doplňujícím se pokusům jak v laboratorních podmínkách, tak v přirozeném prostředí, je možné testovat hypotézy, které odráží dlouhodobou ekologickou a evoluční historii (Anderson *et al.* 2011). Vzhledem k důležitosti poznání, jak genetického hlediska, tak také ekologického kontextu, se při studiu adaptace druhu uplatňuje ekologická genomika.

## 3.3 Ekologická genomika

Ekologická genomika je mezioborová vědní disciplína, která umožňuje porozumět genetickému mechanismu, jakým organismus reaguje na podmínky přírodního prostředí. Moderní metody zahrnující sekvenování velkých souborů, genotypové analýzy a měření genetické exprese na úrovni celého genomu spolu s bioinformačními technologiemi poskytují nebývalé možnosti při komplexní analýze evoluční odpovědi. Ekologická genomika se snaží tyto moderní metody propojit a využít genomického přístupu v ekologickém kontextu (Ungerer *et al.* 2008).

### 3.3.1 Přínos ekologického kontextu

Rozmanité formy organismů a fyziologických systémů se v přírodě vyvinuly v důsledku evoluční odpovědi během miliónů let vývoje. Mnoho poznatků, které v dnešní době máme, bylo získáno studiem organismů v laboratorních podmínkách, kde byly tyto organismy pěstovány nebo chovány izolovaně od přirozeného prostředí, přístupem, který ignoruje nebo minimalizuje ekologický kontext. Je tedy prozkoumána řada biologických segmentů, avšak není známo, jak tyto segmenty vznikly a přetrvaly do dnešních dní, což může vést k neúplnému vysvětlení skutečnosti a k nesprávným vědeckým závěrům (Ungerer *et al.* 2008).

Právě s tímto problémem se potýká studium většiny modelových organismů, což jsou druhy, od kterých pochází největší množství poznatků v rámci genetických základů. Tradiční modelovou rostlinou je huseníček, *Arabidopsis thaliana*, který představuje zdroj

mnoha poznatků ve funkční genomice rostlin, avšak je toho velmi málo známo o ekologickém kontextu této rostliny v prostředí narušeném člověkem (Song a Mitchell-Olds, 2011).

I když dosavadní přístup přinesl mnoho užitečných informací, existoval zde po celou dobu nevyslovený předpoklad, že genetické loci a genetické cesty zjištěné v laboratoři budou pravděpodobně stejné jako ty, které působí v přirozeném prostředí. Tyto předpoklady však nemusí být plně oprávněné (Ungerer *et al.* 2008).

Dobře ilustrujícím příkladem o důležitosti ekologického kontextu může být experiment mapování kvantitativních znaků (quantitative trait loci, QTL) pro dobu kvetení u *Arabidopsis thaliana* pomocí rekombinantních inbredních linií provedený jak za geograficky a klimaticky rozdílných podmínek v terénu, tak také ve vysoce kontrolovaných podmínkách růstové komory. Během tohoto experimentu byly některé QTL detekovány za všech možných podmínek, jiné byly zjištěny pouze v podskupinách prostředí, a to v přirozených podmínkách, stejně jako v prostředí růstové komory, které odpovídalo podobné fotoperiodě. Důležité ovšem je, že zde byla také skupina QTL, která byla zjištěna pouze v přirozených polních podmínkách. To predikuje zapojení dalších genů v rámci přechodu rostliny do generativního stavu za ekologicky příslušných podmínek (Weinig *et al.* 2002).

Ekologický přístup v genomice je tedy klíčový pro genetickou komplexnost zjištěných poznatků, ale může hrát roli také při výzkumu v oblastech, kde nejsou k dispozici prakticky žádné předchozí znalosti. Jedná se například o určování rolí genů neznámé funkce. V posledních letech se objevuje stále více nových sekvenačních dat v podobě celých genomových sekvencí pro řadu organismů. Přičemž ale funkce mnoha genů není plně známá a často bývá odvozována na základě sekvenční homologie s geny v jiných organismech. Ekologický kontext může pomoci při identifikaci role těchto genů, protože jejich stávající funkce mohou být spojeny s ekologickým a evolučním původem organismů (Ungerer *et al.* 2008).

### **3.3.2 Důležitost genetického přístupu v ekologii**

Molekulární a genomické nástroje jsou velmi užitečné při studiu biologických jevů, které spadají na pole ekologie. Umožňují objevování nových a zásadních poznatků, které by bez genetického přístupu nebylo možné odhalit. V některých případech byly díky těmto technikám objeveny nové organismy nebo netušené biologické funkce v ekosystémech (Ungerer *et al.* 2008).

Bylo tak například možné zjistit dlouho diskutovanou úlohu alelochemikálií (toxiny vylučované z kořenů invazních rostlin) při kompetičních interakcích mezi organismy a vysvětlit tak jejich pravděpodobnou klíčovou roli pro úspěšnou invazi nepůvodních rostlin do ustálených rostlinných společenství (Baldwin, 2003).

### **3.3.3 Ekologická genomika při studiu adaptace**

Cílem studií ekologické genomiky je identifikovat geny a genetické cesty, které jsou základem důležitých ekologických dějů. Ekologická genomika si klade za cíl také určit, do jaké míry se tyto geny a cesty projevují ve funkční variabilitě v přírodě a snaží se taktéž charakterizovat ekologické a evoluční důsledky této variability. V současnosti je tento přístup nejnáze aplikovatelný při studiu organismů s dostupnými genomickými informacemi. Nejvíce genomických dat je dostupných u modelových organismů, u kterých však naopak ekologická stránka není příliš dobře prostudována. Přenesením genomických nástrojů z modelových organismů na příbuzné organismy, které za sebou mají bohatou historii ekologického studia, může pomoci rozšířit počet a rozmanitost druhů, které jsou předmětem tohoto typu vědeckého zkoumání (Ungerer *et al.* 2008).

## **3.4 Mechanismy regulující iniciaci kvetení rostlin**

Důležitou adaptační reakcí u rostlin je především načasování přechodu z vegetativní do reprodukční fáze v závislosti na okolních podmínkách. Tento děj představuje pro rostlinu nejvýznamnější vývojovou změnu, jejíž načasování musí rostlina kvůli svému usedlému způsobu života přizpůsobit podmínkám místního prostředí. Reprodukční fázi se rozumí zejména vznik a vývoj reprodukčních orgánů obsažených v květu, tedy iniciaci kvetení. Kvetení může být ohroženo především nevhodnou teplotou, ale jeho průběh taktéž závisí na optimálních světelných podmínkách a distribuci vodních srážek (Procházka *et al.* 1998).

Mnoho druhů rostlin má velmi specifické nároky především na délku fotoperiody a zároveň na charakteristické teploty, které jsou potřebné pro indukci kvetení. Pokud tyto nároky nejsou splněny, kvetení může být zpožděno nebo je zcela zamezeno (Weller a Ortega, 2015).

Desetiletí výzkumu odhalily, že kvetení může být zahájeno vlivem jak vnějších, tak vnitřních podnětů. Mezi klasické vnější podněty patří sezónní změny klimatu, jako jsou měnící se teploty prostředí nebo délky dne. Vnitřní podněty představují různé endogenní dráhy rostliny, jsou nezávislé na vnějších podmínkách a často jsou označovány za tzv. autonomní (Amasino a Michaels, 2010), jedná se nejčastěji o ontogenetické fáze vývoje.

### 3.4.1 Fotoperiodismus rostlin

Podle toho, zda rostliny vyžadují určitou délku fotoperiody, aby vykvetly, jsou rozdělovány na fotoperiodicky citlivé nebo neutrální. Neutrální rostliny jsou takové, které nemají žádné fotoperiodické požadavky. Rostliny fotoperiodicky citlivé se pak rozdělují do dvou základních skupin, a to na rostliny dlouhodobé a krátkodobé.

**Dlouhodobé rostliny** (LDP – „long-day plants“) pocházejí obvykle z oblastí mírného pásma, bývají citlivé na vernalizaci a kvetou při fotoperiodě, která je tzv. kritická nebo delší, případně je osvětlení nepřetržité. Kritickou periodou se rozumí maximální popřípadě minimální délka fotoperiody ve 24 hodinovém cyklu, která ještě indukuje kvetení. Zatímco u **krátkodobých rostlin** (SDP – „short-day plants“) je kvetení indukováno při fotoperiodě, která je kritická nebo kratší. Takovéto rostliny obecně pocházejí z nižších zeměpisných šířek, obvykle z oblastí blízko rovníku (Procházka *et al.* 1998).

Fotoperiodická indukce kvetení zahrnuje sled po sobě jdoucích fází, které se mohou částečně časově překrývat. V první fázi dochází k příjmu fotoperiodického signálu. Tento signál je obvykle přijímán listy, ale bylo zjištěno, že rostliny mohou přijímat fotoperiodický signál také jinými orgány jako například dělohami či stonkem (Procházka *et al.* 1998). Rostliny získávají primární informaci o světelném prostředí, díky které mohou detekovat délku dne pomocí fotoreceptorů (Weller a Ortega, 2015). Fotoreceptory jsou na světlo reagující proteiny, u kterých absorbcí světla dochází ke konformačním změnám. Jedná se o biologickou aktivaci, která je předávána dále a způsobuje změny v dalších proteinech, z nichž některé následně aktivují geny. Mezi fotoreceptory patří fytochromy, např. *phyA*, *phyB* nebo *phyC*, které jsou schopné detekovat červené světlo a dlouhé červené světlo v rozsahu vlnových délek 600–700 nm. Dále se pak vyskytují kryptochromy, např. *CRY2*, které detekují modré a UV světlo o vlnové délce 400–500 nm (Procházka *et al.* 1998)

Výsledkem přijatého fotoperiodického signálu jsou indukované listy, které dále syntetizují tzv. florigenní stimul, který představují produkty *FT* genů (*Flowering locus T*). *FT* geny kódují proteiny, které fungují jako mobilní signál pro kvetení, tzv. florigen (Laurie *et al.* 2011). V dalších fázích je pak tento stimul v rostlině transportován do cílových meristémů, kde vyvolává změny na molekulární úrovni vedoucí k morfogenetickým procesům. Tyto morfogenetické změny jsou zakončeny tvorbou květu jako reproduktivního orgánu (Procházka *et al.* 1998).

Indukci kvetení mohou způsobovat v rostlině taktéž fytohormony, především gibereliny, které regulují hlavní aspekty růstu a vývoje rostlin. Hlavním účinkem giberelinů je prodlužování internodií stonku, avšak u některých rostlin mohou nahradit fotoperiodický účinek dlouhého dne a indukovat kvetení (Procházka *et al.* 1998). Pravděpodobně působí gibereliny v rostlině tak, že aktivují gen *Leafy (LFY)*, který je jedním z genů, které jsou v rostlině odpovědné za vývoj květů. U mnoha druhů rostlin je pro kvetení nezbytné určité množství giberelinů v rostlině, aby mohla začít kvést (Taiz a Zeiger, 2010).

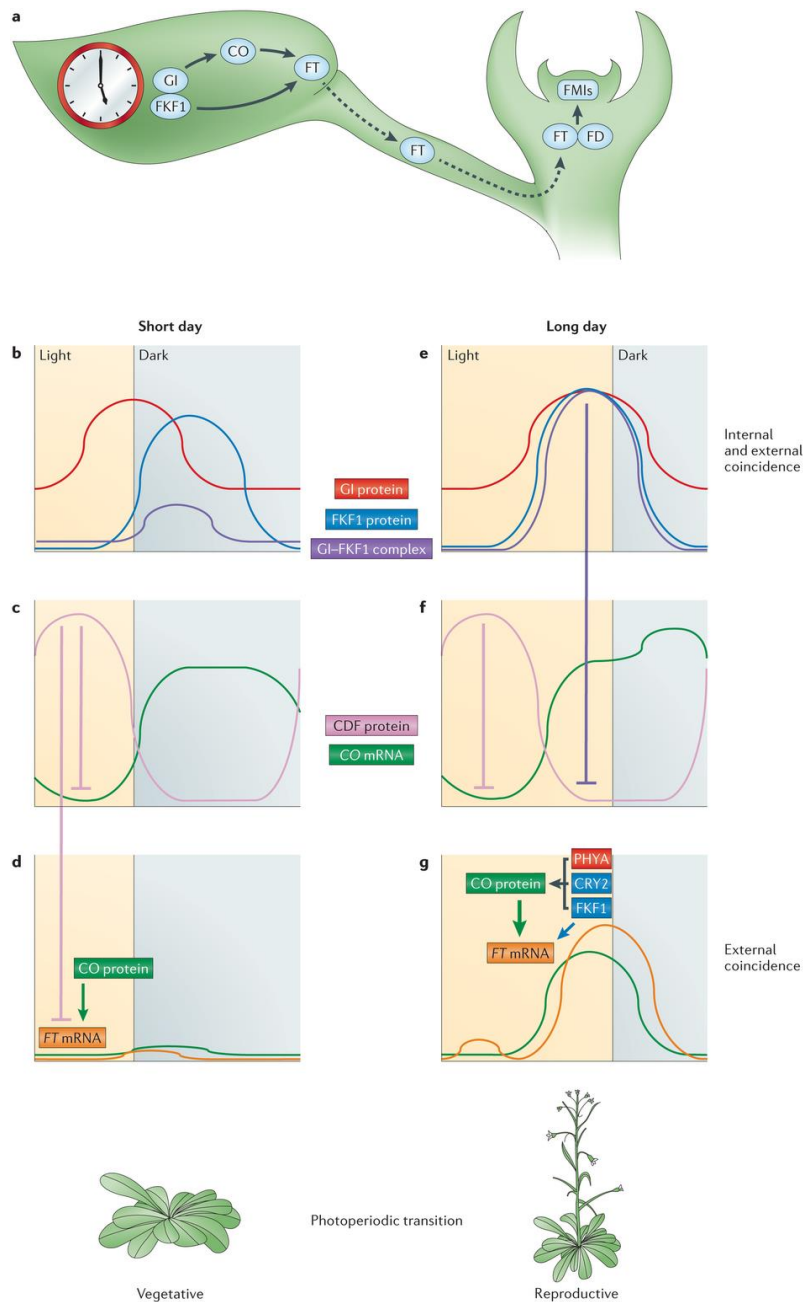
Do procesu kvetení je pak zapojeno mnoho dalších fytohormonů. Tvorbu květních částí a podporu kvetení mohou například zajišťovat také cytokininy a auxin (Procházka *et al.* 1998). Jsou transportovány do vyvíjejícího se květního meristému, a pokud je jejich přenos narušen, je narušen také vývoj květních orgánů. Dalším fytohormonem zapojeným v kvetení je ethylen, který obvykle kvetení inhibuje, ale u některých druhů může kvetení taktéž indukovat. Známe je jeho komerční využití při indukci kvetení u ananasu a příbuzných bromeliovitých rostlin (Taiz a Zeiger, 2010).

### **3.4.2 Cirkadiální hodiny**

Klíčové geny, které u rostlin spouští expresi *FT* genů důležitých pro indukci kvetení, jsou geny *Constans (CO)* a *Gigantea (GI)*. *CO* je zinc-finger protein, který pravděpodobně působí jako transkripční faktor. *GI* je pro rostliny specifický protein, který se zapojuje do funkce cirkadiálních hodin (Fowler *et al.* 1999; Putterill *et al.* 1995). Do funkce cirkadiálních hodin je však zapojena řada dalších genů, jejichž exprese a aktivita se cyklicky mění v průběhu dne a noci díky změnám vnějšího prostředí.



**Obrázek č. 1 - Fotoperiodická regulace kvetení u *Arabidopsis thaliana* (převzato z Greenham a McClung, 2015)**



Nature Reviews | Genetics

**Legenda:** Schéma zobrazuje, jak probíhá fotoperiodická regulace kvetení u *Arabidopsis thaliana*, kdy musí dojít k synchronizaci vnitřní exprese genů s podmínkami vnějšího prostředí. **a)** Fotoperiodické snímání probíhá v listech – cirkadiánní hodiny regulované genem *GIGANTEA (GI)* a *FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1 (FKF1)* aktivují transkripci *FLOWERING LOCUS T (FT)* prostřednictvím koherentní předávací smyčky a genu *CONSTANS (CO)*. *FT* protein (florigen) je floémem přenášen k vrcholovým meristémům, kde spouští transkripci genů identity květového meristému (FMI).

**Pokračování legendy k Obrázku č. 1 :** **b) a e)** Oscilace množství transkriptu *GI* a *FKF1* v průběhu krátkého a dlouhého dne v důsledku regulace cirkadiálních hodin. A tvorba komplexu těchto dvou genů. **c)** Časově regulovaná transkripce genů *CYCLING DOF FACTOR (CDF)*, jejichž proteiny se váží na promotor genu *CONSTANST (CO)* a potlačují tak jeho transkripci. **d)** Potlačení transkripce *CO* prostřednictvím *CDF* genů a v důsledku toho nízká transkripce *FT* genů. **f)** Komplex *GI-FKF1* produkovaný během dlouhého dne degraduje *CDF* proteiny, což umožňuje transkripci *CO*. **g)** *CO* protein, stabilizovaný *FKF1* a světelnou signalizací přes *PHYTOCHROME A (PHYA)*, *CRYPTOCHROME 2 (CRY2)*, se akumuluje a váže na *FT* promotor pro vyvolání transkripce a následné akumulace *FT* mRNA. Protein *FKF1* aktivovaný světlem také stimuluje transkripci *FT* genů vazbou na promotor. V dlouhých dnech tedy vzrůstá početnost *FT* mRNA a následná translace proteinu *FT* na hladiny dostatečné k indukci přechodu z vegetativního k reprodukčnímu růstu.

### 3.4.3 Vernalizace

Vernalizace neboli jarovizace je pojem označující efekt chladového působení nutný k vyvolání procesu kvetení, který se často vyskytuje u rostlin mírného pásma. Jedná se o dlouhodobé působení nízkých teplot, které obvykle podmiňuje fotoperiodickou indukci kvetení nebo zvyšuje citlivost rostlin k fotoperiodickému signálu. Vernalizace samotná však může iniciovat diferenciaci květu. U některých druhů rostlin je vernalizace nezbytná, tzv. obligatorní, u jiných může mít fakultativní charakter, což je případ, kdy efekt chladového působení pouze urychluje nástup kvetení (Procházka *et al.* 1998).

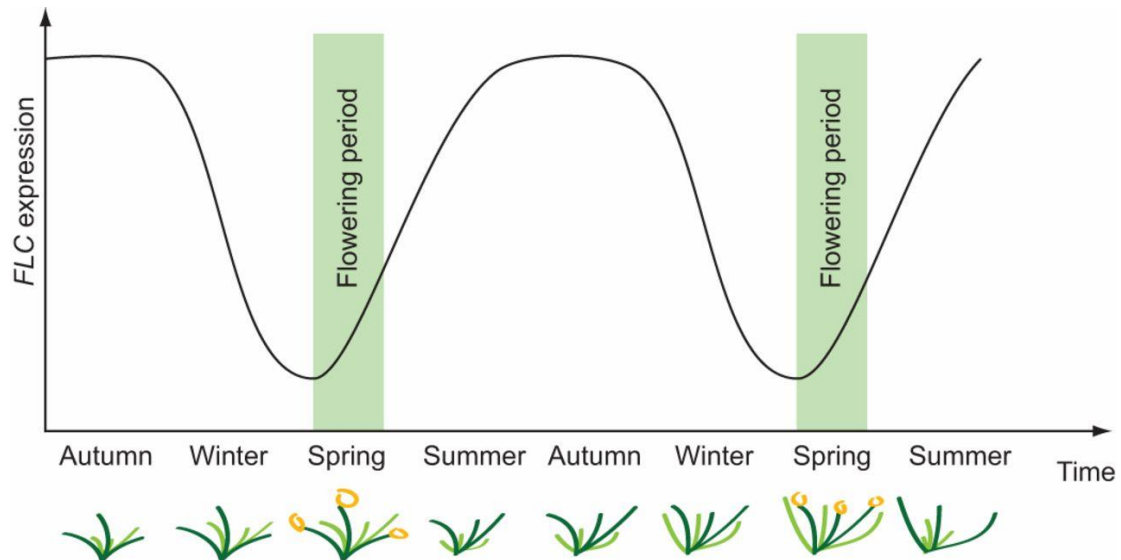
Požadavek dlouhodobého působení nízkých teplot je adaptivním rysem, který rostlinám umožňuje zamezit nástupu kvetení před zimou. Rostliny tak mohou vykvést až na jaře, kdy jsou pro reprodukci příznivé podmínky. U *Arabidopsis* a některých druhů obilovin bylo zjištěno, že vernalizace má tlumící účinek na geny, které potlačují kvetení. Proces umlčování exprese těchto genů, popsáný u *Arabidopsis*, zahrnuje přijímání komplexů modifikujících chromatin ke skupině represorů kvetení, které jsou umlčeny pomocí epigenetické modifikace histonů (Kim *et al.* 2009).

Právě u *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že klíčovým genem pro efekt chladového působení je *Flowering locus C (FLC)* a jeho produkt. Protein kódovaný *FLC* patří do skupiny tzv. MADS-box proteinů a je represorem kvetení. Vernalizace, jež umožňuje kvetení pozdně kvetoucím ekotypům, snižuje hladinu transkriptu *FLC* a tím i hladinu proteinu v rostlině. Ke snížení množství proteinu dochází ve všech pletivech rostliny a až v následujících generacích pak dochází k navrácení aktivity *FLC*. Existuje

přímý vztah mezi délkou působení nízkých teplot a mírou umlčování aktivity *FLC*, která určuje, jak velkou odezvu bude mít vernalizace na stimulaci kvetení (Sheldon *et al.* 2000).

Na regulaci kvetení v důsledku chladového působení se podílí taktéž gen *Frigida* (*FRI*). Jedná se o specifický rostlinný gen, který je potřebný pro vysokou úroveň exprese *FLC* genu (Johanson *et al.* 2000).

**Obrázek č. 2 - Umlčování exprese genu *FLC* působením chladných teplot (převzato ze Song *et al.* 2012)**



**Legenda:** Schéma zobrazuje měnící se expresi genu *FLC* v průběhu roku. Osa X – po sobě jdoucí roční období, Osa Y – množství exprese *FLC* genu. Nejvíce je exprese genu potlačena na jaře (Spring). Snížení hladiny proteinu *FLC* umožňuje nástup kvetení.

### 3.5 Geny podílející se na regulaci kvetení – integrátorové geny

Vzhledem k existencionální důležitosti správného načasování kvetení pro maximalizaci reprodukční schopnosti si rostliny v průběhu evoluce vytvořily mnoho různých mechanismů, kterými lze kontrolovat čas kvetení. Výzkum na *Arabidopsis* výrazně přispěl k pochopení těchto mechanismů na molekulární úrovni. Bylo zjištěno, že různorodost rostlinných mechanismů regulace kvetení je umožněna rozličnými vnitřními drahami, které spojuje malá skupina genů, tzv. integrátorové geny kvetení. Mezi tyto geny patří především *Flowering locus T (FT)* a *Twin sister of FT (TSF)* (Amasino, 2010).

Dalšími geny, u kterých bylo prokázáno, že integrují signál z rozličných rostlinných vnitřních drah, jsou *Supressor of overexpression of Constans 1 (SOC1)* / *Agamous like 20* a gen *Leafy (LFY)* (Parcy, 2005).

### 3.5.1 *FT* geny

Pravděpodobně právě *FT* geny a jejich homology hrají klíčovou roli v regulaci kvetení. Jak již bylo výše zmíněno, produkty *FT* genů jsou proteiny, které fungují jako mobilní signál pro kvetení, tzv. florigen. Ve studiích zabývajících se rýží (*Oryza sativa*) a *Arabidopsis*, bylo dokázáno, že *FT* protein je silný stimulant kvetení, který je transportován z cév listů k vrcholovým meristémům (Corbesier *et al.* 2007; Tamaki *et al.* 2007).

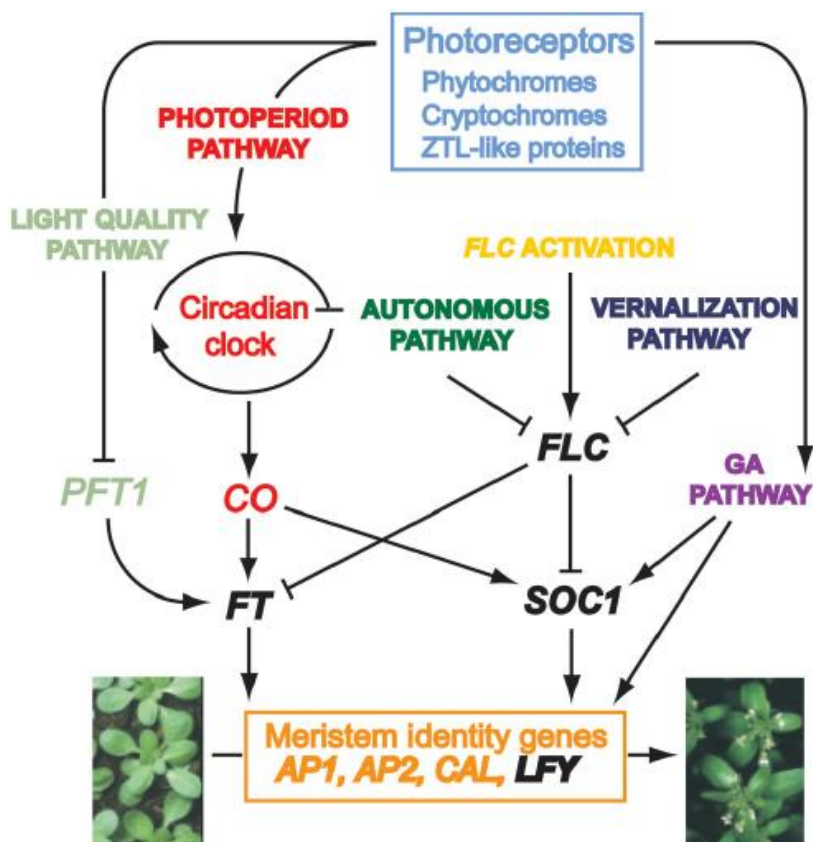
### 3.5.2 *Suppressor of overexpression of Constans 1 (SOC1)*

Tento gen kóduje MADS box transkripční faktor. Rostliny mutantní pro tento gen kvetou pozdě jak v krátkém, tak také v dlouhém dni. *SOC1* je exprimován převážně v listech a ve vrcholu prýtu. Exprese genu s časem narůstá a dále pak dochází k prudkému vzrůstu exprese ve vrcholu při přechodu rostliny z vegetativní fáze do reprodukční (Borner *et al.* 2000).

### 3.5.3 Gen *Leafy (LFY)*

Gen *LFY* hraje klíčovou roli při vývoji květu. Lze jej považovat jak za gen odpovědný za načasování kvetení, tak také za gen ovlivňující meristém (Parcy, 2005). Exprese tohoto genu předchází přechodu rostliny z vegetativní fáze do reprodukční, kdy je aktivita tohoto genu nejdříve zjišťována v primordiích mladých listů, a maximální aktivita je pak detekována v meristémech mladých květů. (Blázquez *et al.* 1998). Bylo zjištěno, že rostliny se zvýšeným počtem kopií genu *LFY* nebo konstitutivní expesí toho genu kvetou časně (Blázquez *et al.* 1997). Zdá se, že aktivita tohoto genu je ovlivňována délkou dne, neboť rostliny, které konstitutivně exprimují gen *LFY*, kvetou později v krátkém dni než v dlouhém dni (Nilsson *et al.* 1998).

Obrázek č. 3 – Genetická regulace času kvetení u *Arabidopsis* (převzato z Ausín *et al.* 2005)



### 3.5.4 Geny podmiňující tvorbu květenství a květu

Signály pro kvetení v rostlině vedou k aktivaci skupiny genů, které jsou označovány jako tzv. geny identity květového meristému, anglicky floral meristem identity (FMI) geny. Tyto geny jsou zodpovědné za změnu meristému na bocích vrcholu prýtu (Long a Barton, 2000). Do této skupiny genů se řadí především gen *Apetala 1* (*AP1*), *Apetala 2* (*AP2*), gen *Cauliflower* (*CAL*) a již zmíněný gen *Leafy* (*LFY*) (Parcy, 2005).

### 3.6 Kvetení u bobovitých rostlin

Čeleď bobovitých zahrnuje byliny i dřeviny. Tato čeleď představuje ekologicky významnou skupinu rostlin. Rostliny z této čeledi se pěstují jako krmivo pro hospodářská zvířata, dále jako zelené hnojení, některé druhy se používají pro získávání olejů, a především plody mnoha druhů slouží jako důležitá potravina. Na kvetení u této skupiny rostlin má vliv zejména délka dne a teplota. Způsob růstu a citlivost na tyto faktory jsou tak důležitými znaky pro produkci těchto plodin (Weller *et al.* 2009).

Genetická různorodost kvetení byla zdokumentována u mnoha druhů rostlin z této čeledi. Geny, související s kvetením byly prozkoumány jak u krátkodenních druhů (SD

plants) jako jsou sója (*Glycine max*) nebo fazol (*Phaseolus sp.*), tak také u dlouhodobých druhů (LD plants), např. u cizrny (*Cicer arietinum*), čočky (*Lens culinaris*) nebo lupiny (*Lupinus sp.*). Nejvíce je však genetická kontrola kvetení prozkoumána a vysvětlena u hrachu (*Pisum sativum*). Hrách se používá pro genetické studium již od pokusů Gregora Johanna Mendela. Při studiích zaměřených na kvetení se uplatnilo především použití mutantů, kdy zejména u hrachu existuje dostupné množství mutantů dané zejména rozšířením této rostliny (Weller *et al.* 2009).

Právě při studiu mutantů, kdy docházelo k porovnávání přírodních a indukovaných genetických variant, bylo odhaleno na 20 lokusů souvisejících s kvetením. Bylo tak možné popsat homologní/ortologní geny k modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*, a není překvapením, že většina základních genů a genetických cest zodpovědných za kvetení u *Arabidopsis thaliana* je nějakým způsobem, byť v jiné formě či velikosti, přítomna také u bobovitých rostlin (Weller *et al.* 2009).

### 3.6.1 Geny řídící kvetení u hrachu

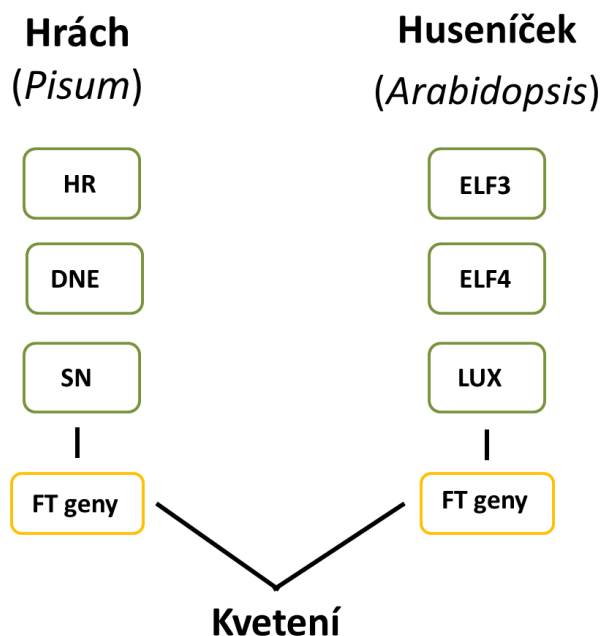
Podobně jako u *Arabidopsis thaliana* dochází u hrachu k odezvě na fotoperiodu a regulaci kvetení pomocí chladového působení (vernalizace). Jsou známy dva hlavní lokusy odpovědné za fotoperiodickou odpověď u hrachu, které oddalují kvetení v krátkém dni. Jedná se o recesivní alelu v *High response* (*HR*) lokusu, která způsobuje brzké kvetení v krátkém dni a částečně snižuje fotoperiodickou odpověď, a recesivní alelu v *Sterile nodes* (*SN*) lokusu, která způsobuje kompletní utlumení fotoperiodické odpovědi (Weller a Ortega, 2015).

Oba tyto lokusy jsou ortologní s geny, jež řídí cirkadiální hodiny u *Arabidopsis thaliana*. V případě *HR* lokusu se jedná o ortologní gen *Early flowering 3* (*ELF3*), u lokusu *SN* zase existuje předpoklad, že se jedná o ortologa ke genu *Lux arrhythm* (*LUX* nebo také *PHYTOCLOCK 1*). Pomocí sekvenačních analýz bylo zjištěno, že recesivní alela *HR* lokusu se často vyskytuje v genomech domestikovaných hrachů a právě tento lokus tak mohl zapříčinit, že se hrách začal pěstovat jako jarní plodina a mohl se rozšířit do větších zeměpisných šířek (Weller a Ortega, 2015).

Dále existují další dva přirozeně se vyskytující lokusy u hrachu. Jedním je *Late flowering* (*LF*) lokus, který inhibuje kvetení v krátkém i v dlouhém dni, a další je *Early* (*E*) lokus, který je zatím nejméně prozkoumán. Všechny čtyři lokusy spolu interagují a alelická diverzita jednotlivých genetických forem tak zapříčiňuje existenci různě dlouhých časových úseků potřebných pro kvetení v přirozených podmínkách (Weller a Ortega, 2015).

Kromě těchto přirozeně se vyskytujících lokusů, kdy nejdůležitější se zdají být lokus *HR* a *SN*, se však podařilo objevit při analýze indukovaných mutantů další kandidátní lokusy, které by mohly být spojené s fotoperiodickou odpovědí (Weller a Ortega, 2015). Především se jedná o lokus *Die neutralis (DNE)*, který má zřejmě v odpovědi na fotoperiodu podobnou roli jako *SN* lokus a je považován za ortologní gen k *Early flowering 4 (ELF4)* genu u *Arabidopsis thaliana* (Liew *et al.* 2009). Zdá se, že tyto tři důležité lokusy u hrachu *HR*, *SN* a *DNE* jsou ortologní ke genům *ELF3*, *ELF4* a *LUX* u *Arabidopsis thaliana*, kdy právě tyto tři geny jsou důležité pro funkci cirkadiálních hodin. Díky těmto genům totiž vzniká důležitý proteinový komplex, tzv. večerní komplex, který přímo ovlivňuje růst rostliny. Proteinový komplex je tvořen proteiny kódovanými genem *ELF3* a *ELF4* a je regulován transkripčním faktorem, který kóduje právě gen *LUX*. Tvorba a funkce komplexu je pravděpodobně regulována ještě dalšími regulačními faktory, avšak spojení genů *ELF3-ELF4-LUX* tvoří molekulární základ cirkadiálních hodin a ovlivňuje tak cirkadiální rytmus, růst a kvetení (Nusinow *et al.* 2011).

**Obrázek č. 4 – Porovnání genetické dráhy pro kvetení u hrachu a *Arabidopsis thaliana* (vytvořeno autorem)**



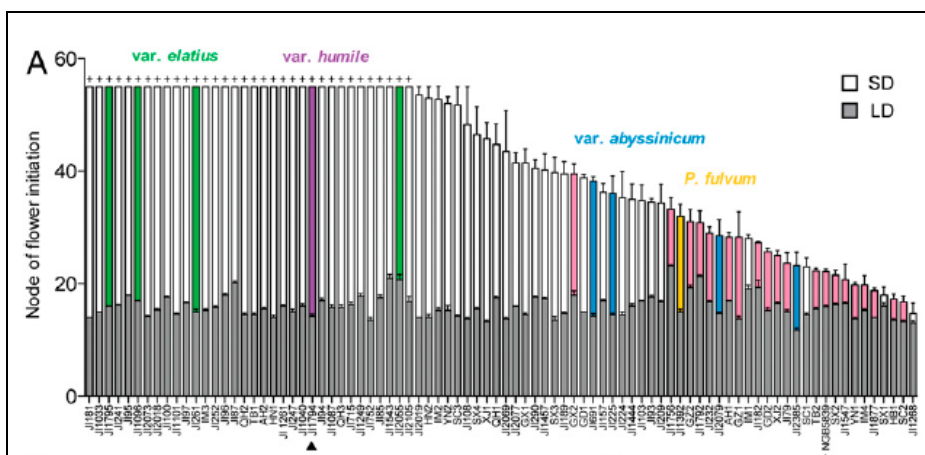
### 3.6.2 *HR* lokus

Nejdůležitějším z dosud známých lokusů, ovlivňujících kvetení u hrachu, se zdá být *HR* lokus (ortolog genu *ELF3* u *Arabidopsis thaliana*), který je spojován s jarním vyséváním dnešních kultivarů hrachu. Plané formy hrachu totiž obvykle klíčí na podzim,

přes zimu pak jsou ve vegetativním stavu a k přechodu do generativního stavu dochází až na jaře postupně s tím, jak se prodlužuje délka dne. Pokud však nejsou dny dostatečně dlouhé, k přechodu do generativní fáze vůbec nedochází. U těchto rostlin je tak pro kvetení důležité, aby prošly zimním cyklem a následně byly vystaveny dostatečně dlouhým dnům. Dnešní kultivary hrachů se však vysévají na jaře a nemají takové požadavky na délku fotoperiody jako jejich planí předchůdci. Nejspíš zrovna ztráta citlivosti k fotoperiodě pomohla hrachu k adaptaci na nová prostředí a umožnila tak jeho rozšíření (Weller *et al.* 2012).

Při studiu genetické diverzity na mnoha liniích hrachu bylo zjištěno, že většina jarních kultivarů nese právě v *HR* lokusu recesivní alely, a to nejspíše zapříčiňuje brzké kvetení těchto rostlin v krátkém dni. V provedené studii všechny linie hrachu vykvetly v dlouhém dni, rozdíl byl však patrný během krátké fotoperiody. Zatímco se totiž u planých forem hrachu objevovalo kvetení v krátkém dni pozdě nebo k němu vůbec nedošlo, domestikované formy s recesivní *hr* mutací vykvetly brzy. Kromě toho se při studiu introgresních linií hrachu, které byly buď *HR* dominantní nebo *hr* recesivní, zjistilo, že *hr* recesivní genotyp rostlin ovlivňuje také to, že se v krátkém dni méně větví a nemají velké nároky na kvalitu osvětlení během prodloužené fotoperiody (Weller *et al.* 2012).

**Obrázek č. 5 – Porovnání počtu nodů do nástupu kvetení u rostlin pěstovaných v dlouhém a v krátkém dni (převzato z Weller *et al.* 2012)**



**Legenda:** šedá barva – kvetení v dlouhém dni; bílá barva – kvetení v krátkém dni; „+“ symbol – rostlina nekvetla v krátkém dni; růžová barva – vzorky nesou recesivní *hr* mutaci (6C)

Jak již bylo výše zmíněno, *HR* lokus odpovídá ortolognímu genu ovlivňujícímu cirkadiální hodiny u *Arabidopsis thaliana*. Jedná se o gen *Early flowering 3 (ELF3)*. Tento gen kóduje pro rostliny specifický protein, který se účastní vnitřních fyziologických drah



v rostlině a ovlivňuje odezvu rostliny na fotoperiodu. Rostliny s recesivní *hr* mutací tento protein nevytvářejí, tvorba proteinu je právě díky *hr* mutaci v určité pozici zastavena. Bylo objeveno, že v případě této recesivní *hr* mutace je v sekvenci genu přidán navíc jeden cytosin (C). Místo původních 5C se tak v sekvenci objeví 6C, což způsobí posun čtecího rámce a následně chybu v tvorbě proteinu, a to kvůli nově vzniklému stop kodonu. Zdá se tedy, že *hr* mutace v *ELF3* genu zabrání tvorbě specifického proteinu zapojeného do funkce cirkadiálních hodin a rostlina se tak stane méně citlivá na délku fotoperiody. Podobný mechanismus byl nalezen také u čočky (*Lens*), kde díky jediné záměně bází v sekvenci ortologního genu k *ELF3* dochází taktéž k posunu čtecího rámce a ukončení tvorby proteinu, což, zdá se, vedlo stejně jako u hrachu k adaptaci na změněnou délku fotoperiody (Weller *et al.* 2012).

Předpoklad, že *hr* mutace s největší pravděpodobností souvisí s domestikací rostlin, je na místě. Jedním ze společných znaků při kultivaci rostlin byla totiž ztráta mechanismu, jenž zabraňuje kvetení při nepříznivých podmínkách. Zastavení tohoto mechanismu bylo výsledkem ztráty funkce genů zodpovědných za fotoperiodickou odpověď a odpověď na chladové působení tzv. vernalizaci. Díky těmto změnám se zkracuje růstový cyklus rostliny, který umožňuje v regionech mírného pásma přesun ze zimního vysévání na jarní, čímž dochází k rozšíření do míst, kde je doba pro sezónní růst rostliny omezená nebo je zde špatná dostupnost vodních zdrojů (Weller *et al.* 2012).

Přes velké rozšíření dnešních kultivarů hrachu to vypadá, že recesivní *hr* mutace vznikla poměrně nedávno, a to především kvůli velké příbuznosti skupiny hrachů, které sdílí ve svém genotypu *hr* mutaci. Tato mutace však zřejmě umožnila rozšíření rostliny z oblasti Blízkého východu do Středozeří a dále pak do severnějších oblastí Evropy (Weller *et al.* 2012). Z fylogeografických studií vyplývá, že původ divokého hrachu je právě na Blízkém východě, odkud se poté rozšířil na Kavkaz, Írán a Afghánistán a směrem na západ pak až k Středozeří (Smýkal *et al.* 2011).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Laboratorní vybavení:

Homogenizátor (FastPrep-24; MP Biomedicals); Homogenizační keramické kuličky (Ceramic Sphere 1/4“, zirkonium oxide, Life Science, MP Bio); Homogenizační zkumavky (1,5 ml); Nanodrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific); Centrifuga (Centrifuge 5415 R, Eppendorf); Stolní centrifuga (MCF 2360); Elektroforéza (Widi Mini Sub; Bio Rad); Zdroj stejnosměrného napětí (PowerPac Basic; Bio-Rad); UV transiluminátor (FireReader; Uvitec Cambridge); Thermocycler (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research); Váha (572; Kern); Mrazicí box (Sanyo-Ultra Low -86 °C)

### 4.2 Chemikálie:

Agaróza (SERVA, Německo); Alkalická fosfatáza (1 U/μl, Thermo Scientific); Exonukleáza Exo I (4 U/μL, Thermo Scientific); Destilovaná voda; Fast AP/Fast Alkaline Phosphatase pufr (10x, Thermo Scientific, USA); Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invisorb, Stratec, Německo) – Lysis Buffer P, Proteinasy K, Binding Buffer P, Wash Buffer I., Wash Buffer II., Elution Buffer D; RNáza A (Sigma Life Science, Sigma Aldrich, USA), Marker molekulové hmotnosti - GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (0,5 μg/μl, Thermo Scientific, USA); Barvivo SimplySafe™ (1 ml, EURX); Taq DNA polymeráza (5U/μl, MyTaq, Bioline); Taq pufr (5x, MyTaq, Bioline, UK); TBE pufr (1x; Tris, kyselina boritá a EDTA; Sigma Aldrich, ČR)

### 4.3 Rostlinný materiál:

V bakalářské práci bylo použito celkem 94 vzorků hrachu (*Pisum sp.*), které byly získány z následujících genových bank: John Innes Centre v Anglii (JIC,UK); Nordic Gene Bank, Sweden; IPK, Germany; USDA, USA; ICARDA; AGG, Australia; VIR, Russia; CzechNPC, CZ; Israeli genebank; Jim Weller 2012 a P. Smýkal, UPOL.

**Tabulka č. 1 (první část) – Seznam vzorků**

Vzorek	Původ	Taxon	Zdroj	Vzorek	Původ	Taxon	Zdroj
723	Israel	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK	<b>PIS 2850</b>	Italy	<i>Pisum elatius</i>	IPK, Germany
<b>JII096</b>	Turkey	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	JIC, UK	<b>StGeorgiu-HU</b>	Hungary	<i>Pisum elatius</i>	P. Smýkal, UPOL
<b>NGB5839</b>	Sweden	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	Nordic Gene Bank, Sweden	<b>PIS 2844</b>	Spain	<i>Pisum elatius</i>	IPK, Germany
<b>JI79</b>	Afghanistan	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	JIC, UK	<b>JI2629</b>	Ukraine	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK
<b>IG52524</b>	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA	<b>UP-Tur1</b>	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	P. Smýkal, UPOL
<b>PII93835</b>	Ethiopia	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	USDA, USA	<b>IG52520</b>	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
<b>JI2602</b>	Libya	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	JIC, UK	<b>JII796 (ATC 1633)</b>	Israel	<i>Pisum fulvum</i>	JIC, UK
<b>JII594</b>	Ethiopia	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	JIC, UK	<b>IG112136</b>	Israel	<i>Pisum fulvum</i>	ICARDA
<b>TG52</b>	Afghanistan	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	JIC, UK	<b>CRB191 (POL 6806)</b>	Poland	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	Jim Weller 2012
<b>JI2608</b>	Libya	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	JIC, UK	<b>JII794</b>	Israel	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK
<b>IG140897</b>	Armenia	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA	<b>JII 1228 (WL1771)</b>	Sweden	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	JIC, UK
<b>IG140973</b>	Armenia	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA	<b>CRB324 (ZP130)</b>	Spain	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	Jim Weller 2012
<b>IG52532</b>	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA	<b>ATC4285</b>	Morocco	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	AGG, Australia
<b>IG52507</b>	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA	<b>IG52459</b>	Morocco	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
<b>Caucas</b>	Russia	<i>Pisum elatius</i>	P. Smýkal, UPOL	<b>ATC3237</b>	China	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	AGG, Australia
<b>JII64</b>	Israel	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK	<b>Elmali (PS 028)</b>	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	P. Smýkal, UPOL
<b>VIR320</b>	Israel	<i>Pisum elatius</i>	VIR, Russia	<b>JII2546</b>	Georgia	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK
<b>W6-26112</b>	Georgia	<i>Pisum elatius</i>	USDA, USA	<b>IG52442</b>	Syria	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
<b>PIS 7475</b>	Macedonia	<i>Pisum elatius</i>	IPK, Germany	<b>PI358615</b>	Ethiopia	<i>Pisum abyssinicum</i>	USDA, USA
<b>IG52508</b>	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA	<b>JII241</b>	Israel	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK
<b>UPOL_ARM2</b>	Armenia	<i>Pisum elatius</i>	P. Smýkal, UPOL	<b>IG52443</b>	Syria	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
<b>IG141436</b>	Armenia	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA	<b>JII3553</b>	France	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK
<b>Chakaten I</b>	Armenia	<i>Pisum elatius</i>	P. Smýkal, UPOL	<b>713</b>	Israel	<i>Pisum elatius</i>	VIR, Russia
<b>JII94</b>	Afghanistan	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	JIC, UK	<b>JII2 (ATC1067)</b>	Ethiopia	<i>Pisum abyssinicum</i>	JIC, UK

**Tabulka č. 1 (druhá část) – Seznam vzorků**

Vzorek	Původ	Taxon	Zdroj	Vzorek	Původ	Taxon	Zdroj
ATC7008	China	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	AGG, Australia	J1261	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK
J192	Afghanistan	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	JIC, UK	VIR2759	Ethiopia	<i>Pisum abyssinicum</i>	VIR, Russia
722 (=J13263)	Israel	<i>Pisum elatius</i>	VIR, Russia	IG140971	Armenia	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
IS 18912	Israel	<i>Pisum elatius</i>	Israeli genebank	IG140562	Armenia	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
IG52518	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA	IG108291	Tunisia	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
PO17	Israel	<i>Pisum elatius</i>	VIR, Russia	W6-2107	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	USDA, USA
TG2548	Georgia	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK	IG52565	Jordane	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
IS 24324	Israel	<i>Pisum elatius</i>	Israeli genebank	J11040 (ATC 1500)	Afghanistan	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	JIC, UK
IS 18914	Israel	<i>Pisum elatius</i>	Israeli genebank	ATC6931	China	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	AGG, Australia
J12724	Spain	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK	IG52414	Syria	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
IS 18911	Israel	<i>Pisum elatius</i>	Israeli genebank	J11028	Nepal	<i>Pisum sativum</i> (cultigen)	JIC, UK
721 (J13262)	Israel	<i>Pisum elatius</i>	VIR, Russia	L02-0253	Ethiopia	<i>Pisum abyssinicum</i>	CzechNPC,CZ
Chakaten II	Armenia	<i>Pisum elatius</i>	P. Smýkal, UPOL	PI358617	Ethiopia	<i>Pisum abyssinicum</i>	USDA, USA
W6-2101	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	USDA, USA	IS 18910	Israel	<i>Pisum elatius</i>	Israeli genebank
714 (J13275)	Israel	<i>Pisum elatius</i>	VIR, Russia	IS 18908	Israel	<i>Pisum elatius</i>	Israeli genebank
W6-26109	Georgia	<i>Pisum elatius</i>	USDA, USA	IS 22287	Israel	<i>Pisum elatius</i>	Israeli genebank
IG52503	Turkey	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA	712 (J13273)	Israel	<i>Pisum elatius</i>	VIR, Russia
P013	Israel	<i>Pisum elatius</i>	VIR, Russia	IG119794	Spain	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
PIS 2854	Hungary	<i>Pisum elatius</i>	IPK, Germany	PI344537	Italy	<i>Pisum elatius</i>	USDA, USA
PIS 2853	Hungary	<i>Pisum elatius</i>	IPK, Germany	IG64350	Algeria	<i>Pisum elatius</i>	ICARDA
J12055	Italy	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK	PIS 7388	France	<i>Pisum elatius</i>	IPK, Germany
Serbia	Serbia	<i>Pisum elatius</i>	P. Smýkal, UPOL	PI344006	Greece	<i>Pisum elatius</i>	USDA, USA
J13557	Portugal	<i>Pisum elatius</i>	JIC, UK	PIS 1675	Italy	<i>Pisum elatius</i>	IPK, Germany

## 4.4 Izolace genomové DNA

Před samotnou izolací genomové DNA byl použitý rostlinný materiál homogenizován v homogenizátoru FAST Prep (MP Biomedicals). Následně byla provedena izolace genomové DNA pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kitu (Invisorb). Jedná se o komerčně vyráběný kit vhodný pro izolaci buněčné DNA z široké škály rostlinných druhů a typů tkání, který funguje na principu adsorpce DNA na silikát. Postup izolace se řídil návodem od výrobce.

### Postup:

1. Homogenizovaný materiál (drcené listy) vložit do 1,5 ml mikrozkušavky typu Eppendorf.
2. Pro lyzi materiálu přidat 400  $\mu$ l Lysis Buffer P + 20  $\mu$ l Proteinase K.
3. Krátce vortexovat a inkubovat 30 min při 65 °C, občas promíchat.
4. Centrifugovat při 14 000 rpm po dobu 15 min. Poté odebrat supernatant do nové 1,5 ml mikrozkušavky typu Eppendorf.
5. Následně přidat 10  $\mu$ l RNAase A roztoku a ponechat při pokojové teplotě 10 až 15 min.
6. Přidat 200  $\mu$ l Binding Buffer P a krátce vortexovat.
7. Pote napipetovat nebo přelít do popsané Spin Filter kolonky a nechat stát 1 až 2 min.
8. Centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min.
9. Odstranit, co proteče, vrátit zpět kolonku a napipetovat 550  $\mu$ l Wash Buffer I.
10. Centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min.
11. Odstranit, co proteče, vrátit zpět kolonku a napipetovat 550  $\mu$ l Wash Buffer II.
12. Centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min.
13. Odstranit, co proteče, vrátit zpět kolonku a napipetovat 550  $\mu$ l Wash Buffer II.
14. Centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min.
15. Odstranit, co proteče, vrátit zpět kolonku a poté centrifugovat „nasucho“ při 12 000 rpm po dobu 2 min.
16. Pro eluci DNA přenést kolonku do čisté mikrozkušavky a napipetovat 2krát po sobě 150  $\mu$ l předehřátého (65°C) Elution Buffer D a inkubovat po dobu 3 min.
17. Nakonec centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min. Izolovanou DNA uschovat pro pozdější práci při 4 °C nebo -20 °C.

## 4.5 Spektrofotometrické měření DNA

Koncentrace a čistota DNA se měřila spektrofotometricky (NanoDrop, Thermo Scientific). Po očištění optického čidla přístroje buničitou vatou došlo k nanesení a proměření blanku (destilovaná voda nebo eluční roztok), a poté byly proměřovány jednotlivé vzorky. Na NanoDrop byly vždy nanесeny 2  $\mu$ l vzorku. Následně přístroj proměřil absorbanci při 260 a 280 nm vyjadřující hodnoty čistoty a koncentrace DNA.

## 4.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulární metoda, která umožňuje syntetizovat určitý úsek DNA v mnoha kopiích. Pomocí polymerázové řetězové reakce byl amplifikován vždy určitý úsek genu *ELF3*. Pro amplifikaci byly použity primery uvedené v Tabulce č. 2.

**Tabulka č. 2 – Seznam primerů**

Označení	Forward/ Reverse	Sekvence primeru	Zdroj:
ELF3-FF	Forward	5'-GTTTAGAGTTTAGGATAGAAAAGGGGTAGG-3'	Weller et al. 2012
ELF3-11R	Reverse	5'-GCAATTTCTTTTCTGGCTTCC-3'	Weller et al. 2012
ELF3-7F	Forward	5'-TGTTTGCAGTCCAAGTGTTTG-3'	Weller et al. 2012
ELF3-RR	Reverse	5'-GATCCTCCATGTCAATATACACCACTAC-3'	Weller et al. 2012

Syntéza probíhala enzymaticky pomocí termostabilní DNA Taq polymerázy v přístroji zvaném thermocycler. Příprava polymerázové řetězové reakce byla provedena podle následujícího postupu:

1. Nejdříve byla připravena reakční směs. Součástí reakční směsi byl pufr (MyTaq pufr 5x), DNA-polymeráza (Taq polymeráza), forward primer (ELF3-FF/ ELF3-7F), reverse primer (ELF3-11R/ ELF3-RR) a destilovaná voda. Použitý pufr obsahoval směs nukleotidů (dNTP) a hořčičnaté ionty. Pro jednu PCR reakci bylo použito 13  $\mu$ l reakční směsi a 2  $\mu$ l DNA templátu. Jednotlivé složky pro jednu PCR

reakci byly namíchány v následujícím množství: 3  $\mu$ l MyTaq pufr 5x (BIOLINE); 9,23  $\mu$ l voda pro PCR; 0,7  $\mu$ l směs primerů (forward, reverse); 0,07  $\mu$ l Taq polymeráza (BIOLINE).

**Tabulka č. 3 – Příprava reakční směsi**

Reakční složky	Objem pro jednu reakci [ $\mu$ l]
MyTaq pufr 5x (BIOLINE)	3
Voda pro PCR	9,23
Směs primerů Forward primer (ELF3-FF/ ELF3-7F) Reverse primer (ELF3-11R/ ELF3-RR)	0,7
Taq polymeráza 5U/ $\mu$ l (BIOLINE)	0,07
Celkový objem	13
Vzorek (DNA templát)	2

2. Připravená reakční směs pro PCR byla důkladně zvortexována a stočena na minicentrifúze. Následně byla pomocí dávkovací pipety rozpipetována na desku. Do každé mikrozkušavky bylo napipetováno vždy 13  $\mu$ l reakční směsi a 2  $\mu$ l vzorku DNA templátu.

3. Následně byla deska stočena na minicentrifúze a vložena do thermocycleru. Samotný průběh PCR reakce byl složen z pěti kroků, a to preinkubace, denaturace, annealingu, elongace a finální extenze.

**Tabulka č. 4 – Časový a teplotní průběh PCR reakce**

Krok	Teplota ( $^{\circ}$ C)	Čas (min)	Počet cyklů
Preinkubace	95	5	1
Denaturace	95	0,5	
Annealing	55	1	35
Elongace	72	3	
Finální extenze	72	5	1

## 4.7 Gelová elektroforéza

Pomocí gelové elektroforézy byly ověřovány vzniklé PCR produkty (amplifikované úseky genu *ELF3*). Byla prováděna horizontální gelová elektroforéza na 1,5% agarózovém gelu (SERVA). Příprava byla prováděna následovně: Pro přípravu 80 ml 1,5% agarózového gelu bylo naváženo 1,3 g agarózy a přidáno 80 ml TBE pufru pomocí odměrného válce.

Směs byla poté zahřívána v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarózy, obvykle 2 až 3 minuty. Následně se nechala směs ochladit asi na teplotu 50 °C a bylo přidáno 1,5 µl barviva SimplySafe (EURX). Poté byla směs nalita do připravené elektroforetické vany (Bio-Rad), byly nasazeny hřebínky podle počtu vzorků a gel se nechal ztuhnout (cca 15 až 20 minut).

Po ztuhnutí gelu byly hřebínky vyjmuty a elektroforetická vana s gelem byla vložena do elektroforézy s TBE pufrém. Následně byly do první jamky na gelu napipetovány 2 µl markeru molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp Plus, Thermo Scientific) a do ostatních jamek bylo poté postupně pipetováno vždy 5 µl připravených PCR produktů (PCR produkty není třeba přidávat s nanášecím pufrém, jsou již obarvené MyTaq pufrém). Po připojení elektroforetické aparatury ke zdroji napětí (cca 100 až 120 V) se nechala elektroforéza probíhat cca 35 min. Po ukončení elektroforézy byl gel zdokumentován na UV transluminátoru (FireReader; Uvitec Cambridge) pomocí programu UVITEC.

## 4.8 Sekvenování

Před odesláním amplifikovaných úseků na sekvenování bylo nutné provést purifikaci PCR produktů. Purifikační proces neboli přečištění nukleových kyselin se používá pro odstranění veškerých nežádoucích látek. Nejčastějšími kontaminanty mohou být různé soli, nežádoucí enzymy, ale především přebytečné primery, které je nutno zcela odstranit pro úspěšné sekvenování jen s jedním vybraným primerem. K tomuto účelu může sloužit přečištění PCR produktů pomocí komerčně dostupných kitů zachycujících amplifikovanou DNA a umožňujících její promytí. V případě amplifikace více produktů se používá vyříznutí a vyčištění PCR produktů z gelu. Nejrychlejší a nejlevnější cestou pak je enzymatické odstranění přebytečných primerů. Purifikace byla prováděna v thermocycleru a při její přípravě byla použita Exonukleáza I (Thermo Scientific) a Alkalická fosfatáza (Thermo Scientific). Nejdříve byla připravena reakční směs, ve které bylo množství složek zvoleno podle počtu vzorků dle Tabulky č. 5.

**Tabulka č. 5 – Reakční směs pro purifikaci**

Reakční složky	Objem [µl]
Pufr (10x)	110
Voda	380
Exonukleáza Exo I (Thermo Scientific)	44
Alkalická fosfatáza Fast AP (Thermo Scientific)	16,5
Rozpipetováno po	5
Produkt PCR	5



Následně byla reakční směs rozpipetována po 5  $\mu$ l na desku a bylo přidáno vždy 5  $\mu$ l PCR produktů (vzorků). Stočená deska na minicentrifúze byla poté vložena do thermocycleru, kde byla ponechána po dobu 15 min při 37 °C a následně 1 min při 85 °C. Takto přečištěné PCR produkty se odesílaly na sekvenování.

Do jamek bylo napipetováno vždy 5  $\mu$ l PCR produktů s 5  $\mu$ l sekvenačního primeru (5 pmol/ $\mu$ l). Vzorky byly poté odesílány na sekvenační analýzu pomocí BigDye Terminator kit (Thermo Fisher Scientific) do Laboratoře sekvenace DNA, PřF UK Praha nebo Macrogen, Amsterdam, Nizozemí.

## **4.9 Software**

### **4.9.1 Bio-Statistické zpracování sekvenčních dat**

#### **Program Genious (verze 7.1.9)**

Pro editaci a vizualizaci DNA sekvencí byl použit program Genious (verze 7.1.9). Byla použita funkce „multiple alignment“, translace sekvencí do proteinu a tvorba fylogenetických stromů z genomové DNA a z cDNA.

#### **Program PopART**

Program PopART ([www.popart.otago.ac.nz](http://www.popart.otago.ac.nz)) je zdarma dostupný genetický software, který byl využit pro tvorbu síťovaných stromů na základě evolučních vztahů mezi populacemi.

#### **Program MEGA 7**

Program MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net>) byl použit pro vizualizaci sekvencí a tvorbu fylogenetických stromů metodou největší pravděpodobnosti „Maximum Likelihood Tree“ (Tamura *et al.* 2013).

## **4.9.2 Geoinformatika**

### **Geografický informační systém - GRASS GIS (Geographic Resources Analysis Support System)**

Software GRASS GIS byl použit pro tvorbu rastrů délky dne pro jednotlivé dny v roce, což bylo dále využito při odečítání délky fotoperiody z GPS dat pro jednotlivé vzorky hrachu.

(<https://grass.osgeo.org>)

### **ArcGIS for Desktop 10.4**

Prostřednictvím programu ArcGIS for Desktop 10.4 bylo možné vypočítat délku fotoperiody v týdnech a získat ji pro jednotlivé body, tedy vzorky s geografickou polohou, a následně bylo možné je zanést pomocí tohoto programu do mapy.

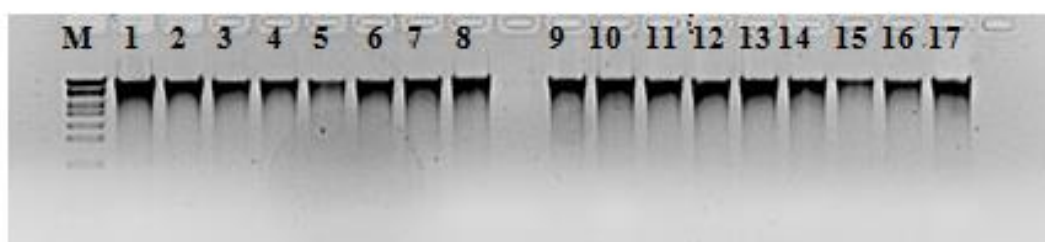
(<http://desktop.arcgis.com/en>)

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Amplifikace fragmentu *ELF3* genu

Byla provedena izolace genomové DNA u vybraných položek hrachu (*Pisum*) a její úspěšnost byla prověřena pomocí agarózové gelové elektroforézy, kdy bylo ověřeno, že došlo k získání vysokomolekulárních látek (viz Obrázek č. 6). Kvalita izolace genomové DNA byla následně vyhodnocena spektrofotometricky.

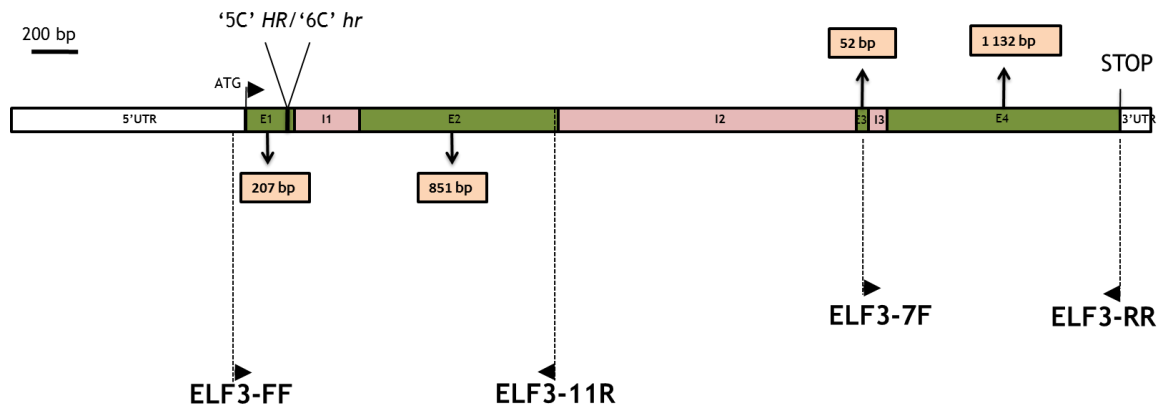
**Obrázek č. 6 – Elektroforetogram izolované genomové DNA hrachu**



**Legenda:** M – marker relativní molekulové hmotnosti, 1-17 – izolovaná genomová DNA.

Následně byla u vybraných vzorků hrachu, celkem 94 vzorků převážně planých forem *P. sativum subsp. elatius*, provedena PCR amplifikace dvou vybraných částí *ELF3* genu. Pro amplifikaci první části genu o celkové délce 1341 bp byly použity primery forward ELF3-FF a reverse ELF3-11R, nasedající v pozici 953-982 a 2320-2341. V první části genu se nachází exon 1 (207bp), intron 1 (283 bp) a exon 2 (851bp). Při amplifikaci druhé části genu byly použity primery forward ELF3-7F a reverse ELF3-RR, nasedající v pozicích 3634-3654 a 4751-4778. V rámci druhé části genu se nachází část exonu 3 (52 bp), intron 3 (81 bp) a částečně exon 4 (1 132 bp). Oblast genu obsahující intron 2 o délce 1278 bp byla při amplifikaci genu *ELF3* vynechána (Obrázek č. 7).

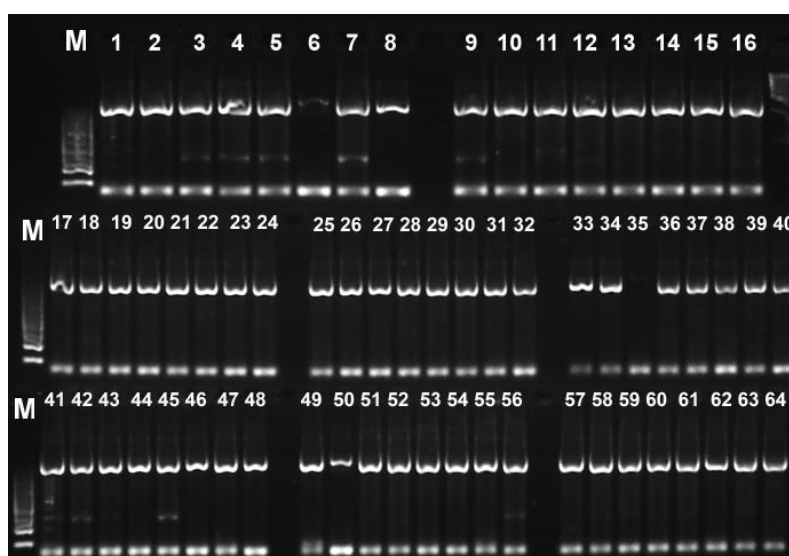
**Obrázek č. 7 - Schéma *ELF3* genu (vytvořeno autorem)**



**Legenda:** ATG – umístění start kodonu; STOP – umístění stop kodonu; E1 – exon1; E2 – exon 2; E3 – exon 3; E4 – exon 4; I1 – intron 1; I2 – intron 2; I3 – intron 3; '5C' HR/ '6C' *hr* – *HR* lokus s dominantní *HR* alelou (5 cytosinů) nebo recesivní *hr* alelou (6 cytosinů); ELF3-FF a ELF3-7F – forward primery; ELF3-11R a ELF3-RR – reverse primery; 5'UTR – nekódující oblast na 5' konci; 3'UTR – nekódující oblast na 3' konci

Úspěšnost amplifikace PCR produktů byla následně zhodnocena s využitím agarózové gelové elektroforézy. Vzniklé PCR produkty byly nanášeny na 1,5% agarózový gel spolu s 2 µl markeru molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp Plus, Thermo Scientific). Po ukončení elektroforézy byl gel zdokumentován na UV transluminátoru (FireReader; Uvitec Cambridge) pomocí programu UVITEC. Z výsledného elektroforetogramu byla porovnáním s markerem molekulové hmotnosti odečtena přibližná velikost PCR produktů, která u obou amplifikovaných částí činila více než 1000 bp.

**Obrázek č. 8 – PCR produkty z amplifikace první části *ELF3* genu pomocí primerů forward ELF3-FF a reverse ELF3-11R u 64 vzorků hrachu**



**Legenda:** M – marker relativní molekulové hmotnosti; 1-64 – PCR produkty

Následně byla provedena purifikace PCR produktů a vzorky byly poté odesílány na sekvenování pomocí BigDye Terminator kitu (Thermo Fisher Scientific). Při sekvenování došlo k přečtení amplifikovaných úseků z obou stran.

## 5.2 Sekvenční analýza

Získané sekvence byly nahrány do programu Genious, kde došlo k jejich editaci a především ke spojení Forward a Reverse sekvencí. Následně byl proveden „multiple alignment“ a seřazené sekvence byly dále upravovány. V programu Mega7 byla provedena analýza exonu 1, u které v souboru 94 vzorků byly zjištěny 4 synonymní a 7 nesynonymních záměn nukleotidů (viz Příloha č. 2 na CD). Při analýze exonu 2 bylo odhaleno 33 synonymních a 25 nesynonymních záměn nukleotidů (viz Příloha č. 3 na CD).

Intron 1 vykazoval celkem 14 změn v sekvenci, jednalo se o 8 SNP, a dále o jednoduché delece či inserce nebo delece či inserce ve dvou oblastech s tandemovými repeticemi. Bylo zjištěno, že mnoho z nukleotidových záměn, delecí a insercí vykazovalo velkou frekvenci. Polymorfismus s četností větší než 10 % byl dále analyzován a podle výsledků se v souboru 94 vzorků s velkou četností nacházelo celkem 30 SNP, z toho 20 tranzicí a 10 transverzí. Dále bylo zjištěno 5 delecí a jedna inserce s více než 10% četností a tyto všechny se nacházely v oblasti intronu 1 (viz Tabulka č. 6).

**Tabulka č. 6 – Analýza polymorfismu s více než 10% četností (exon1-intron1-exon2)**

	Číslo polymorfismu	Pozice (bp) od ATG kodonu	Délka (bp)	Záměna	Typ polymorfismu	Četnost výskytu v souboru 94 vzorků
<b>EXON 1</b>	1	60	1	T->C	SNP (transition)	19.1%
<b>INTRON 1</b>	2	305	1	G->A	SNP (transition)	23.4%
	3	333	1	G->A	SNP (transition)	22.3%
	4	337	0	(GTT)4->(GTT)5	Insertion (tandem repeat)	18.1%
	5	334	3	(GTT)4->(GTT)3	Deletion (tandem repeat)	27.7%
	6	343	1	A->T	SNP (transversion)	24.5%
	7	408	1	T->C	SNP (transition)	19.1%
	8	420	1	A->G	SNP (transition)	22.3%
	9	426	1	T->A	SNP (transversion)	13.8%
	10	454	1	(T)10->(T)9	Deletion (tandem repeat)	17.0%
	11	455	1	-G	Deletion	27.7%
	12	455	1	G->T	SNP (transversion)	25.5%
	13	456	1	-T	Deletion	18.1%
	14	458	3	-GTT	Deletion	26.6%
	15	477	1	T->C	SNP (transition)	17.0%
<b>EXON 2</b>	16	681	1	A->G	SNP (transition)	27.7%
	17	760	1	T->A	SNP (transversion)	11.7%
	18	831	1	T->G	SNP (transversion)	12.8%
	19	838	1	C->T	SNP (transition)	17.0%
	20	844	1	A->G	SNP (transition)	17.0%
	21	850	1	T->G	SNP (transversion)	12.8%
	22	871	1	G->A	SNP (transition)	13.8%
	23	871	1	G->T	SNP (transversion)	11.7%
	24	891	1	C->T	SNP (transition)	13.8%
	25	892	1	G->C	SNP (transversion)	18.1%
	26	894	1	T->C	SNP (transition)	18.1%
	27	896	1	T->A	SNP (transversion)	13.8%
	28	898	1	G->A	SNP (transition)	10.6%
	29	912	1	G->A	SNP (transition)	13.8%
	30	927	1	A->G	SNP (transition)	13.8%
	31	938	1	T->C	SNP (transition)	13.8%
	32	973	1	G->T	SNP (transversion)	20.2%
	33	1082	1	A->G	SNP (transition)	16.1%
	34	1122	1	G->A	SNP (transition)	17.2%
	35	1131	1	T->C	SNP (transition)	18.3%
	36	1198	1	G->A	SNP (transition)	17.2%

Objevena byla variabilita v pozici 189 až 194 bp od ATG. U většiny vzorků byla přítomna *HR* dominantní varianta, kdy se v sekvenci vyskytovalo pět cytosinů za sebou (5C). Recesivní *hr* mutace s šesti cytosiny v sekvenci (6C) byla objevena u celkem sedmi vzorků a jednalo se o vzorky: JI2608, IG52524, JI79, PI193835, JI2602, JI1594 a TG52, tzn. kulturní formy hrachu (viz Tabulka č. 1).

**Obrázek č. 9 – *HR* lokus**

	180					194							
Consensus	G	T	T	C	C	C	C	C	-	G	G	C	T
Coverage	61												
Identity	01												
1. JI3553	G	T	T	C	C	C	C	C	-	G	G	C	T
2. 722 (=JI3263)	G	T	T	C	C	C	C	C	-	G	G	C	T
3. JI2608	G	T	T	C	C	C	C	C	C	G	G	C	T
4. IG52524	G	T	T	C	C	C	C	C	C	G	G	C	T
5. L02-0253	G	T	T	C	C	C	C	C	-	G	G	C	T
6. IS18914	G	T	T	C	C	C	C	C	-	G	G	C	T

**Legenda:** červený rámeček – *HR* lokus; 1–6 – jednotlivé vzorky; vzorek 3 a 4 – přítomna *hr* mutace (6C).

V rámci první sekvenované části byly následně spojeny přítomné exony, tedy exon 1 a exon 2. Takto vytvořena cDNA byla využita při tvorbě fylogenetického stromu v programu Mega7 (viz Příloha č. 1). Poté byla tato sekvence translatována v programu Genious a byla tak získána sekvence proteinu.

V daném souboru 94 vzorků bylo zjištěno celkem 37 haplotypů na úrovni DNA (genomová, exon1-intron1-exon2), 36 haplotypů na úrovni cDNA (exon1-exon2) a 33 haplotypů na úrovni *ELF3* proteinu (viz Tabulka č. 7).

**Tabulka č. 7 – Množství zjištěných variant**

Druh analýzy	Počet haplotypů
Analýza genomové DNA	37
Množství alel v cDNA	36
Analýza <i>ELF3</i> proteinu	33

Podle sekvenčního polymorfismu v *ELF3* proteinu byly vzorky zařazeny do celkem 33 haplotypů obsažených ve skupinách A až E (viz Tabulka č. 8). Při analýze proteinu (viz Příloha č. 4 na CD) bylo dále zjištěno, že u celkem 12 vzorků byl přítomen předčasný stop kodon. Jednalo se o tyto vzorky: 723, JI1096, NGB5839, JI79, IG52524, PI193835, JI2602, JI1594, TG52, JI2608, IG140897, IG140973 (viz Tabulka č. 1). Nutno podotknout, že sedm z těchto dvanácti vzorků obsahuje recesivní *hr* mutaci.

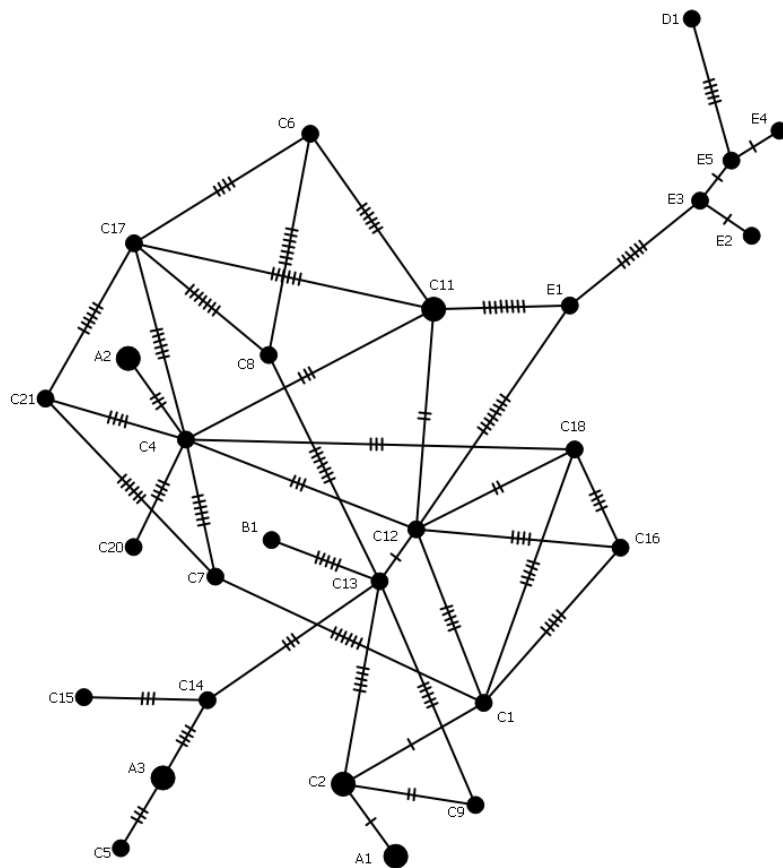
**Tabulka č. 8 – Zařazení vzorků do 33 haplotypů podle analýzy *ELF3* proteinu**

Číslo	Označení haplotypu	Počet vzorků v haplotypu	pozice STOP kodonu
1.	A1	2	17
2.	A2	8	86
3.	A3	3	—
4.	A3 (stop160)	1	160
5.	A3 (stop251)	1	251
6.	B1	7	—
7.	C1	9	—
8.	C2	4	—
9.	C3	1	—
10.	C4	1	—
11.	C5	1	—
12.	C6	1	—
13.	C7	1	—
14.	C8	1	—
15.	C9	1	—
16.	C10	1	—
17.	C11	1	—
18.	C12	7	—
19.	C13	2	—
20.	C14	1	—
21.	C15	2	—
22.	C16	2	—
23.	C17	1	—
24.	C18	1	—
25.	C19	9	—
26.	C20	4	—
27.	C21	8	—
28.	D1	6	—
29.	E1	1	—
30.	E2	1	—
31.	E3	2	—
32.	E4	2	—
33.	E5	1	—



Ke každému z jednotlivých haplotypů dle *ELF3* proteinu byla vybrána vždy jedna referenční sekvence a v programu PopART byl sestaven z cDNA (exon1-exon2) síťovaný strom na základě evolučních vztahů mezi těmito sekvencemi, který vyjadřuje příbuznost jednotlivých haplotypů (viz Obrázek č. 10).

**Obrázek č. 10 – Síťovaný Neighbor-Joining strom identifikovaných haplotypů dle proteinu**



**Legenda:** Jednotlivá písmena s čísly odpovídají 33 haplotypům získaných analýzou *ELF3* proteinu.

V rámci druhé sekvenované části nebyla objevena taková variabilita jako v první části, sekvence byly téměř identické. V získané délce 844 bp z oblasti exonu 4 bylo objeveno 6 SNP s četností více nebo rovno 10 %.

Z databáze NCBI byly získány publikované sekvence Dr. Wellera (Weller *et al.* 2012) rozdělené do 15 haplotypů, které byly porovnány se sekvencemi získanými v rámci této bakalářské práce. Jednalo se převážně o kulturní položky, jejichž sekvence byly zařazeny do shodných skupin jako sekvence získané sekvenováním stejných položek v průběhu této práce. U dvou vzorků JI64 a JI1096 však došlo k zařazení sekvencí do jiných skupin, což mohlo být způsobeno heterogenitou položek.

### 5.3 Hodnocení fenotypového projevu – nástupu kvetení

V podmínkách přirozeně se prodlužujícího dne (49°34'29.62"S, 17°16'51.04"V, Olomouc-Holice) v období (březen – červen) byl odečítán počet nodů a doba do začátku kvetení. Další údaje byly získány od Dr. J. Wellera z UTAS z rostlin pěstovaných při konstantní fotoperiodě dlouhého dne (16h světla /8h tmy). Jedná se o předběžné údaje získané jen na omezeném počtu rostlin, bez statistického zpracování variability.

Získané údaje o počtu nodů byly rozděleny do tří kategorií N1-3, kdy do kategorie N1 byly zařazeny rostliny s počtem nodů 8 až 20, do kategorie N2 rostliny s počtem nodů 20 až 30 a do kategorie N3 rostliny s počtem nodů 30 a více (viz Tabulka č. 9).

**Tabulka č. 9 – Kategorie N1-3 podle počtu nodů spolu se zastoupením vzorků**

Kategorie	Počet nodů	Počet vzorků v této kategorii
<b>N1</b>	8 až 20	32
<b>N2</b>	20 až 30	19
<b>N3</b>	30 a více	11
<b>Netestováno</b>		32

Ve spolupráci s Dr. Janem Brusem z katedry geoinformatiky, PřF UP byly následně vzorky s dostupnými údaji o počtu nodů zaneseny do mapy podle jejich GPS souřadnic. Barevné rozlišení odpovídá kategoriím N1-3 podle počtu nodů do prvního kvetoucího nodu (viz Obrázek č. 11).

**Obrázek č. 11 – Geografické rozšíření vzorků zařazených do kategorií N1-3 podle počtu nodů do prvního kvetoucího nodu**



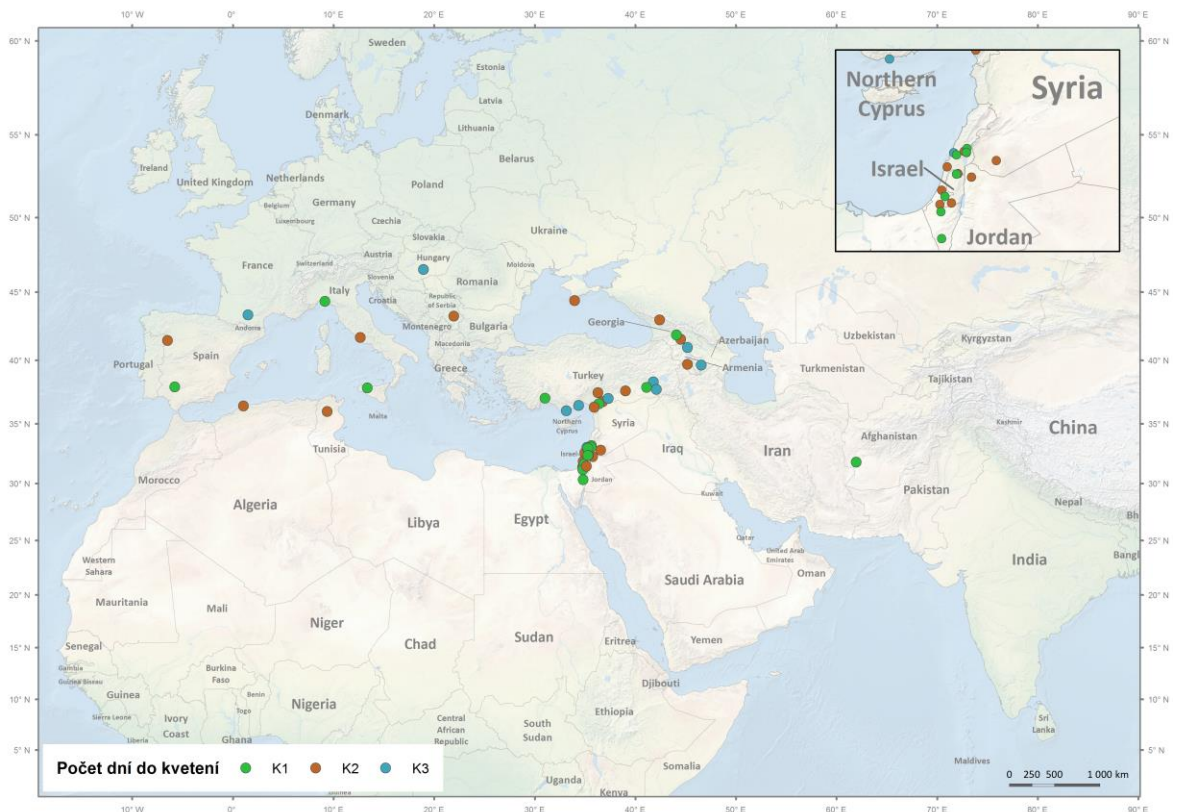
Podle získaných údajů o počtu dní do nástupu kvetení pak byly testované rostliny rozděleny do tří kategorií K1-3, kdy do kategorie K1 byly zařazeny rostliny, které vykvetly v časovém úseku 60 dní nebo méně, do kategorie K2 byly zařazeny rostliny, které pro kvetení potřebovaly více než 60 dní, avšak méně než 100 a do kategorie K3 byly zařazeny rostliny, které vykvetly po 100 a více dnech od jejich vysetí (viz Tabulka č. 10).

**Tabulka č. 10 – Kategorie K1-3 podle počtu dní do nástupu kvetení spolu se zastoupením vzorků**

Kategorie	Počet dní do kvetení	Počet vzorků v této kategorii
K1	25 až 60 včetně	16
K2	60 až 100	21
K3	100 a více	10
<b>Netestováno</b>		<b>47</b>

Následně byly vzorky v kategoriích K1-3 podle počtu dní do kvetení zaneseny do mapy s pomocí Dr. Jana Bruse z katedry geoinformatiky, PřF UP (viz Obrázek č. 12).

**Obrázek č. 12 – Geografické rozšíření vzorků zařazených do kategorií K1-3 podle počtu dní do kvetení**

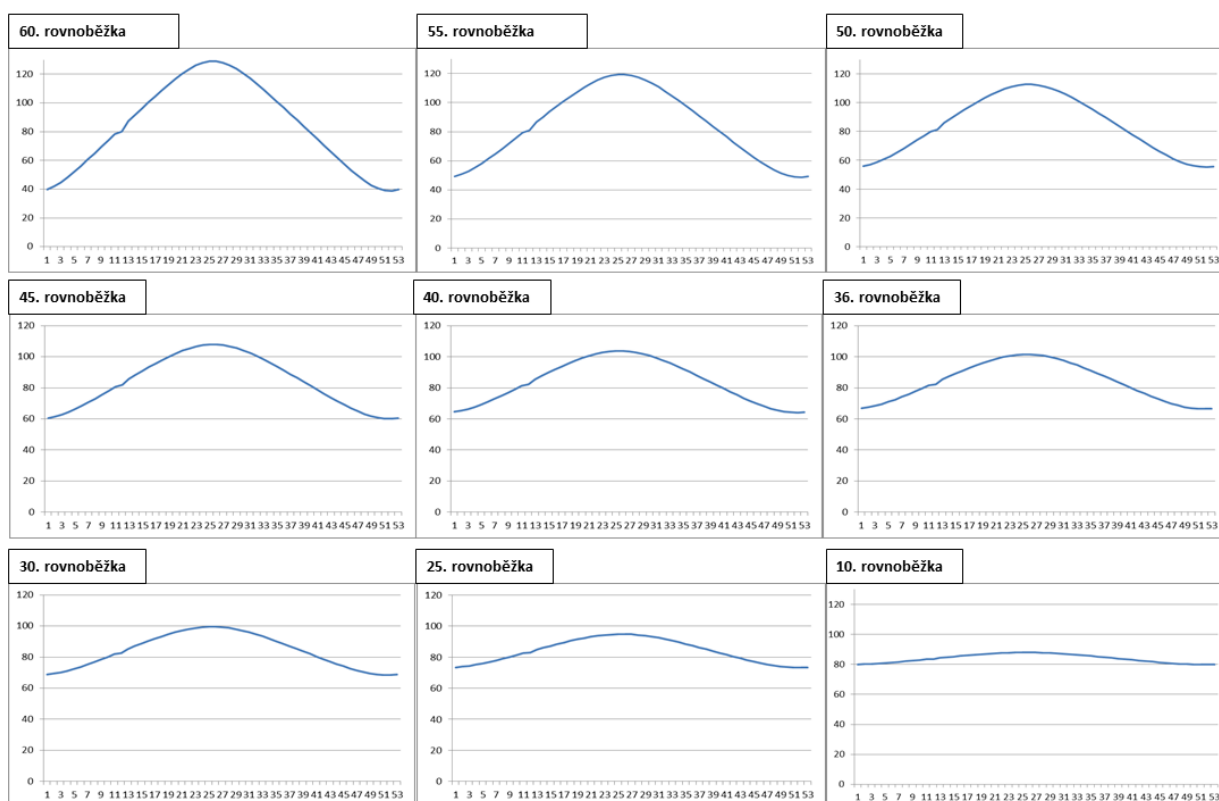


Při porovnání fenotypového projevu a získaných genomických dat bylo zjištěno, že vzorky vykazují náznaky korelace, některé haplotypy byly spíše brzy kvetoucí a u některých haplotypů převažovalo pozdní kvetení. V souvislosti s geografickým rozšířením bylo zjištěno, že rané typy jsou častější v jižních oblastech, což může být spojeno s většími teplotami a nedostatkem vodních zdrojů v pozdějších obdobích růstu rostliny.

## 5.4 Odečet délky fotoperiody z GPS dat

Ve spolupráci s Dr. Janem Brusem z katedry geoinformatiky, PřF UP byly z databáze WorldClim získány týdenní délky dne pro dané lokality původu analyzovaných vzorků hrachu. Pro jednotlivé zeměpisné rovnoběžky, ze kterých byly vzorky získány, pak byly sestaveny grafy měnící se délky fotoperiody (v týdnech) v průběhu roku, které byly dále použity pro sestavení přehledu změn délky fotoperiody v závislosti na zeměpisné šířce.

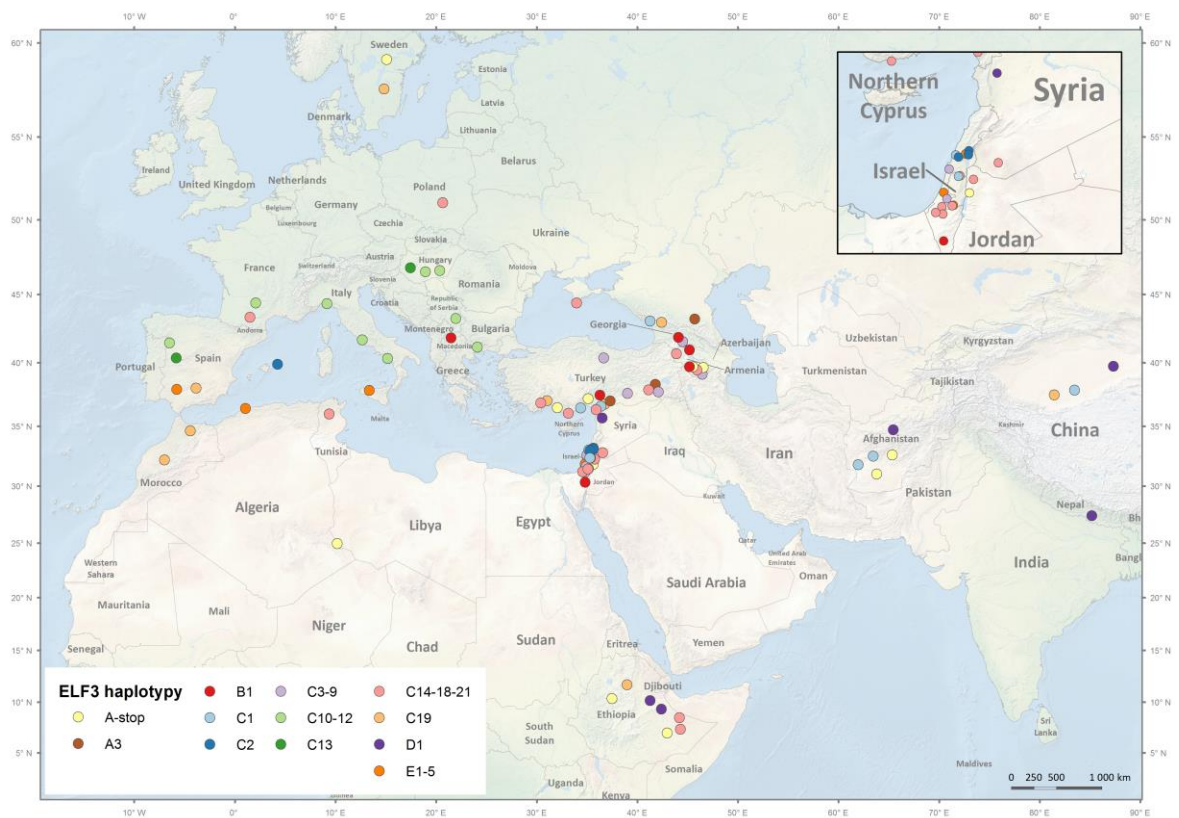
Obrázek č. 13 - Přehled změn délky fotoperiody v závislosti na zeměpisné šířce



**Legenda:** osa x – jednotlivé týdny v měsíci; osa y – počet hodin

Pomocí GPS dat jednotlivých vzorků byla sestavena mapa s vyznačeným výskytem jednotlivých proteinových haplotypů vyjadřující geografické rozšíření *ELF3* haplotypů (viz Obrázek č. 14). Rozšíření haplotypů v globálním měřítku nebylo rovnoměrné. V Evropě se přednostně vyskytovaly haplotypy C10-13, v severní Africe pak příbuzné skupiny haplotypů C14-19 a E1-5. Velká rozmanitost haplotypů byla zjištěna v oblasti Blízkého východu, odkud pravděpodobně hrách pochází.

## Obrázek č. 14 – Geografické rozšíření *ELF3* haplotypů

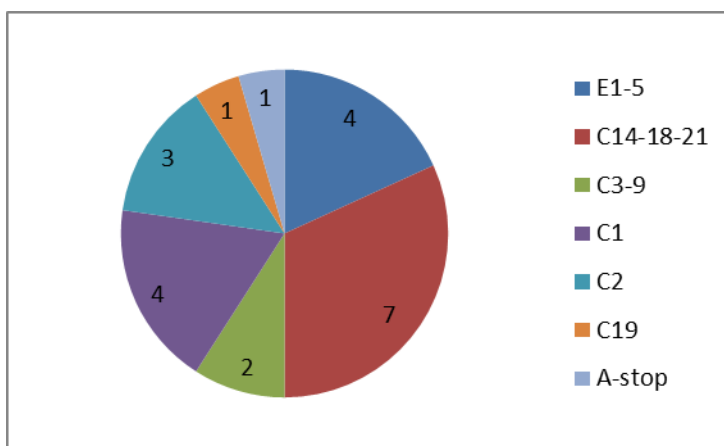


Podle místa původu byly vzorky rozděleny do tří skupin, a to na vzorky vyskytující se mezi 30. - 35. rovnoběžkou, dále na vzorky vyskytující se mezi 35. - 40. rovnoběžkou a vzorky vyskytující se mezi 40. - 49. rovnoběžkou. V těchto skupinách bylo porovnáno zastoupení jednotlivých haplotypů, kategorií N1-3 podle počtu nodů a zastoupení kategorií K1-3 podle počtu dní do nástupu kvetení.

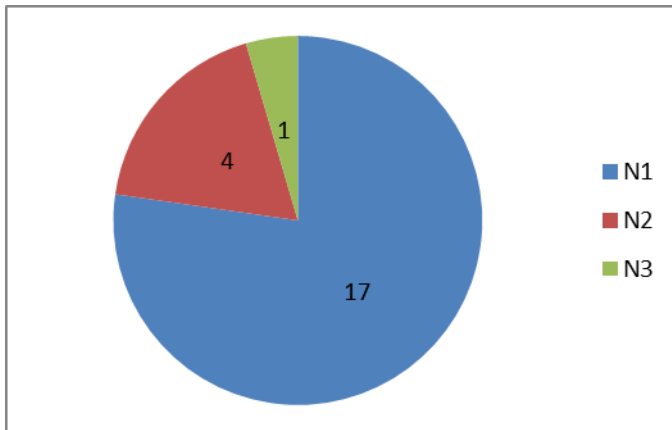
### Skupina vzorků č. 1 (30. - 35. rovnoběžka)

Do této skupiny bylo zařazeno celkem 22 vzorků planých forem hrachu.

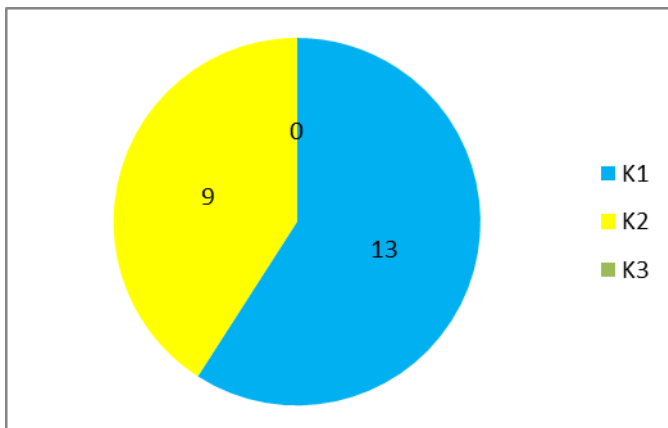
### Graf č. 1 – Zastoupení *ELF3* haplotypů ve skupině vzorků č. 1 (30. - 35. rovnoběžka)



**Graf č. 2 – Zastoupení kategorií počtu nodů (N1-3) ve skupině vzorků č. 1 (30. - 35. rovnoběžka)**



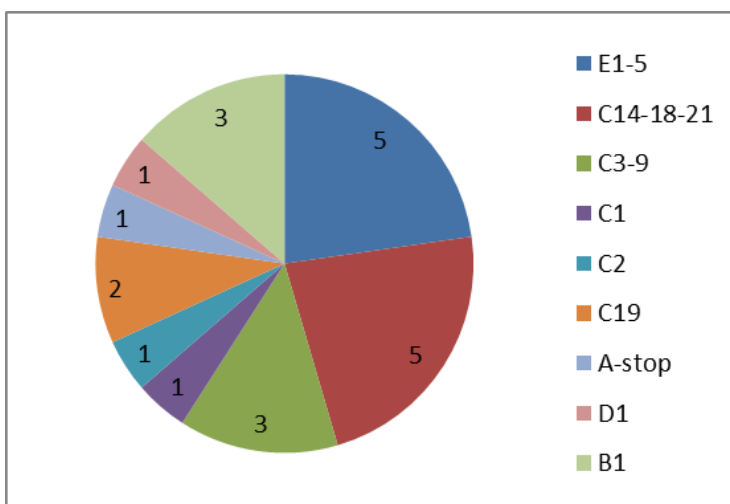
**Graf č. 3 – Zastoupení kategorií počtu dní do kvetení (K1-3) ve skupině vzorků č. 1 (30. - 35. rovnoběžka)**



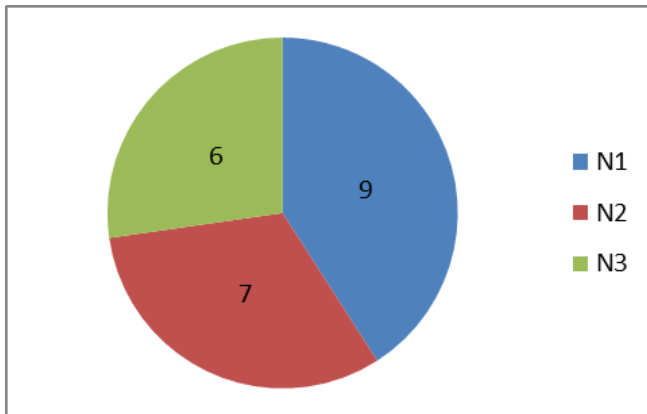
**Skupina vzorků č. 2 (35. - 40. rovnoběžka)**

Do této skupiny bylo zařazeno celkem 22 vzorků planých forem hrachu.

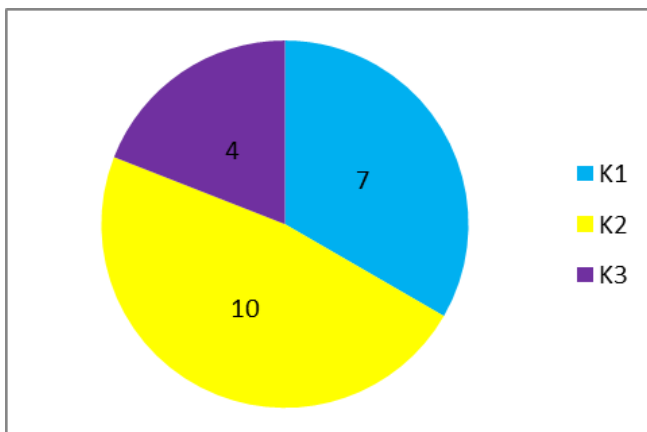
**Graf č. 4 – Zastoupení *ELF3* haplotypů ve skupině vzorků č. 2 (35. - 40. rovnoběžka)**



**Graf č. 5 – Zastoupení kategorií počtu nodů (N1-3) ve skupině vzorků č. 2 (35. - 40. rovnoběžka)**



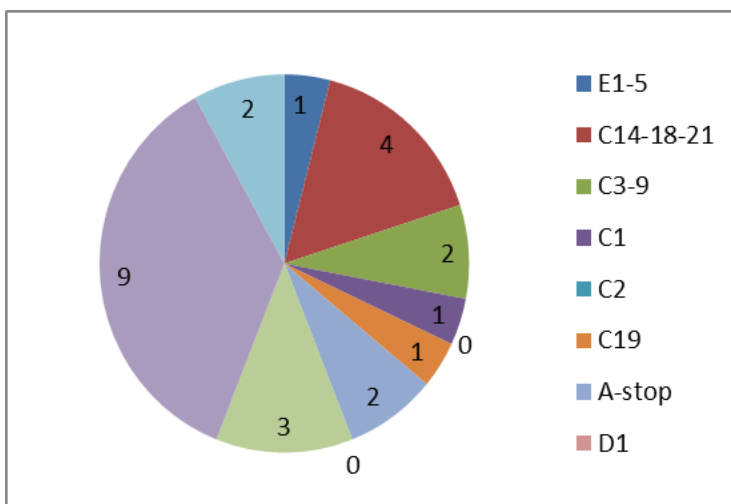
**Graf č. 6 – Zastoupení kategorií doby do kvetení (K1-3) ve skupině vzorků č. 2 (35. - 40. rovnoběžka)**



**Skupina vzorků č. 3 (40. - 49. rovnoběžka)**

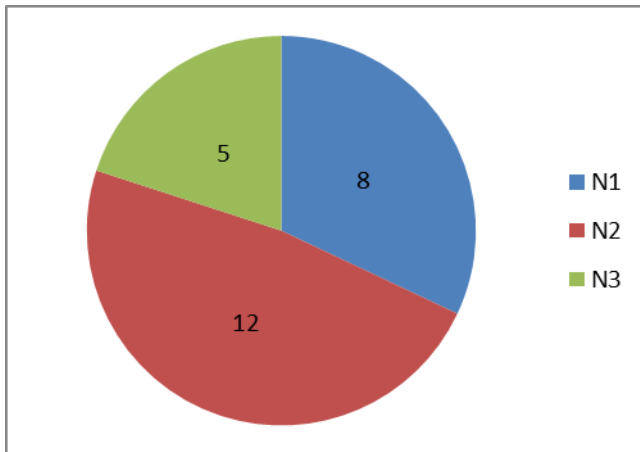
Do této skupiny bylo zařazeno celkem 25 vzorků planých forem hrachu.

**Graf č. 7 – Zastoupení *ELF3* haplotypů ve skupině vzorků č. 3 (40. - 49. rovnoběžka)**

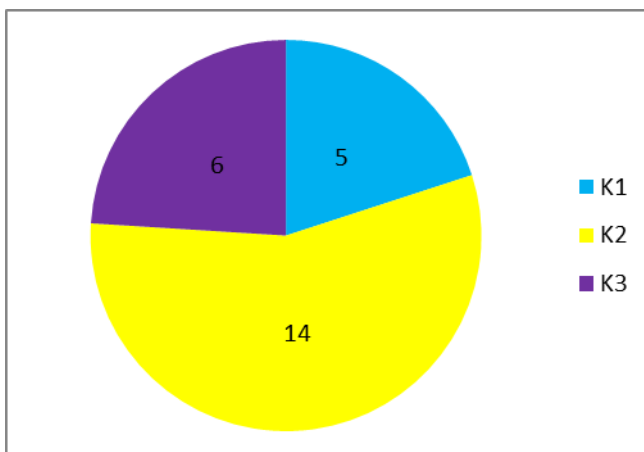




**Graf č. 8 – Zastoupení kategorií počtu nodů (N1-3) ve skupině vzorků č. 3 (40. - 49. rovnoběžka)**



**Graf č. 9 – Zastoupení kategorií doby do kvetení (K1-3) ve skupině vzorků č. 3 (40. - 49. rovnoběžka)**



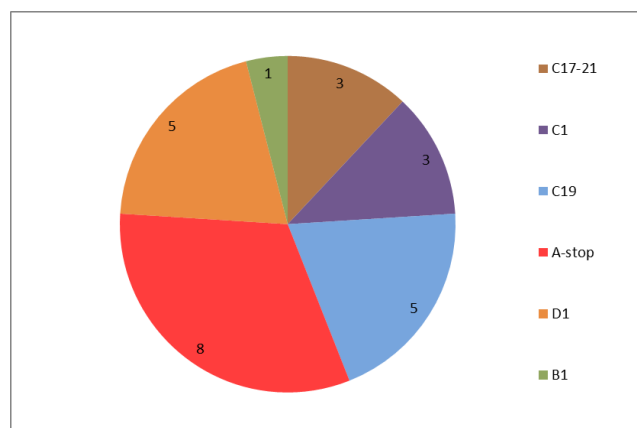
## 5.5 Analýza vzorků kulturních hrachů

Celkem 25 analyzovaných vzorků se řadilo mezi kulturní formy hrachu. Tyto položky patřily dle fenotypového projevu mezi časně kvetoucí s nízkým počtem nodů do nástupu kvetení (viz Tabulka č. 11). Jejich rozdělení do haplotypů dle *ELF3* proteinu bylo velmi různorodé, avšak nejčastější bylo zastoupení haplotypu A se stop kodonem, a to celkem u osmi vzorků z celkových 25 (viz Graf č. 10).

Tabulka č. 11 – Analýza kulturních položek vzorků hrachu

Vzorek	Původ	Taxon	Kategorie počet nodů	Kategorie kvetení	Haplotyp dle proteinu
J192	Afghanistan	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N2	K1	C1
J11096	Turkey	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N2	K1	A1
J11594	Ethiopia	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	A2
J179	Afghanistan	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	A2
NGB5839	Sweden	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	A2
PI193835	Ethiopia	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	A2
TG52	Afghanistan	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	A2
VIR320	Israel	<i>Pisum elatius</i>	N1	K1	B1
ATC7008	China	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	C1
J194	Afghanistan	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	C1
CRB191 (POL 6806)	Poland	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	C17
ATC3237	China	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	C19
ATC4285	Morocco	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	C19
CRB 324 (ZP130)	Spain	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	C19
J1 1228 (WL1771)	Sweden	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	C19
PI358615	Ethiopia	<i>Pisum abyssinicum</i>	N1	K1	C19
J12 (ATC1067)	Ethiopia	<i>Pisum abyssinicum</i>	N1	K1	C21
VIR2759	Ethiopia	<i>Pisum abyssinicum</i>	N1	K1	C21
ATC6931	China	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	D1
J11040 (ATC 1500)	Afghanistan	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	D1
L02-0253	Ethiopia	<i>Pisum abyssinicum</i>	N1	K1	D1
PI358617	Ethiopia	<i>Pisum abyssinicum</i>	N1	K1	D1
J12602	Libya	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	A2
J12608	Libya	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	A2
J11028	Nepal	<i>Pisum sativum (cultigen)</i>	N1	K1	D1

Graf č. 10 - Zastoupení kulturních *ELF3* haplotypů dle proteinu ve skupině kulturních položek vzorků hrachu



## 6 DISKUZE

Cílem této práce bylo získat genomická data (genu *ELF3*) na vybraném souboru položek planých forem/druhů rodu hrách (*Pisum sp.*), které by mohly vést k odhalení ekologických a geografických faktorů podílejících se na adaptaci k místním podmínkám prostředí, a porovnat tyto výsledky s již dostupnými údaji z analýzy omezeného počtu vzorků hrachu, kterou provedl Dr. Weller (Weller *et al.* 2012). Ten zjistil 15 haplotypů na vzorcích hrachu zahrnujících jak kulturní, tak také plané formy hrachu. Naopak tato bakalářská práce byla zaměřena především na analýzu planých forem, a přestože nebyla provedena sekvenační analýza kompletního genu, bylo nalezeno více forem (haplotypů). Na základě analýzy cDNA exonu1 a exonu2 bylo zjištěno na 36 variant. Po zaměření se na analýzu proteinu této části genu bylo zjištěno 33 haplotypů.

Práce Dr. Wellera identifikovala *HR* lokus jako jeden z hlavních lokusů odpovědných za rozšíření pěstování hrachu do vyšších zeměpisných šířek. Předpokladem je, že *hr* recesivní mutace se podílí na schopnosti hrachu kvést v krátkém dni a umožňuje tak jeho fotoperiodickou adaptaci. Především kulturní hrách se musel podobně jako jiné plodiny během své domestikace dále adaptovat a doba kvetení je jednou z klíčových vlastností. V této práci byla recesivní *hr* mutace s šesti cytosiny v sekvenci (6C) namísto pěti cytosinů (5C) objevena u celkem sedmi vzorků a to u vzorků: JI2608, IG52524, JI79, PI193835, JI2602, JI1594 a TG52, kdy se u všech položek jednalo o kultivované hrachy. Jeví se tedy, že by tento předpoklad mohl být správný. K podobnému závěru došla také skandinávská studie zabývající se adaptací doby kvetení u švédských krajových odrůdy hrachu. Počet dní v této studii pozitivně koreloval s délkou vegetačního období v místě původu vzorků a také byl významně spojen s alelickou variabilitou v *HR* lokusu. Průměrný rozdíl v počtu dní do kvetení byl 15,43 dnů mezi dvěma detekovanými haplotypy s *HR* dominantní a *hr* recesivní alelou. Zároveň také bylo zjištěno, že *HR* dominantní haplotyp ovlivňuje, zda bude mít exprese genu *Late flowering (LF)* vliv na kvetení (Vahnala *et al.* 2016).

Kromě *hr* recesivní mutace bylo však při analýze proteinu zjištěno, že se *ELF3* protein pravděpodobně netvoří až u 12 vzorků. Převážná většina těchto vzorků byly kultivary. Avšak stop kodon byl objeven také u čtyř planých položek hrachu, a to u vzorku 723 původem z Israele, vzorku IG52524 původem z Turecka a dvou vzorků původem z Arménie IG140897 se stop kodonem v pozici 160 od ATG a IG140973 se stop kodonem v pozici 261 od ATG. U těchto planých položek se prokazatelně vyskytuje mutace (u IG52524 *hr* recesivní mutace), která vede ke tvorbě stop kodonu a k nefunkčnosti

proteinu. Je tedy možné, že tyto položky mohou být předchůdci kulturního hrachu, ovšem s nezávislou mutací *ELF3* genu, nebo se jedná o položky, které se dostaly do volné přírody z kulturního pěstování. Zároveň je u nich známé, že jsou výrazně zimuvzdorné, což znamená, že tato mutace může hrát roli také v zimuvzdornosti rostlin hrachu (Lejeune-He'naut *et al.* 2008). Co se týče geografického rozšíření, haplotypy se stop kodonem se vyskytovaly převážně v oblastech Blízkého východu, Arménie, Afghánistánu, Etiopie a dalších oblastech pro kvetení hrachu příznivých, a je tedy pravděpodobné, že za citlivost k fotoperiodě u hrachu neodpovídá pouze gen *ELF3*, ale také další geny jemu podobné, které pak ovlivňují celkový proces kvetení.

Podobné studie zabývající se alelickou variabilitou genů zodpovídajících za kvetení byly provedeny také u jiných bobovitých rostlin. Například u typické krátkodenní rostliny sóji (*Glycine max*) je čas kvetení spojován s *FT* geny a pak také s několika *E* (*E1-8*) lokusy, u kterých byla snaha zjistit jejich roli v kvetení a v geografické adaptaci rostliny (Tsubokura *et al.* 2014). Bobovité rostliny však nejsou jedinými důležitými plodinami, velký důraz se klade také na studium kvetení u obilovin. Příkladem je studie genů zapojených ve fotoperiodické odezvě u rýže (*Oryza sativa*), jejímž výsledkem bylo zjištění, že začlenění genetického polymorfismu těchto genů do genofondu kultivované rýže zřejmě umožnilo její adaptaci k rozdílným fotoperiodám v různých zeměpisných šířkách (Huang *et al.* 2012). Lokální adaptace na základě polymorfismu genů zodpovídajících za kvetení byla taktéž zkoumána u historických vzorků ječmene (*Hordeum vulgare L.*) pocházejících především ze severní Evropy ve snaze o zjištění důvodu rychlé expanze ječmene do severských oblastí (Aslan *et al.* 2015).

V současnosti se často místo analýzy kandidátních genů využívá celogenomové asociační mapování. Toto mapování slouží k odhalení genomových oblastí asociovaných s daným zkoumaným znakem. Mnohdy tak dochází k identifikaci nových dosud neznámých genů či lokusů, které nelze zjistit na základě běžného testovacího křížení. Studie lokální adaptace ke klimatickým podmínkám v souvislosti s kvetením byla provedena na případu tolíce (*Medicago truncatula*), která umožnila identifikovat kandidátní geny pro kvetení podílející se na adaptaci k podmínkám životního prostředí (Burgarella *et al.* 2016).

## 7 ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byl analyzován gen *ELF3* u 94 vzorků převážně planých forem hrachu (*Pisum sp.*), u kterých bylo zjištěno celkem 37 haplotypů na úrovni DNA (genomová, exon1-intron1-exon2), 36 haplotypů na úrovni cDNA (exon1-exon2) a 33 haplotypů na úrovni *ELF3* proteinu (viz Tabulka č. 8). Bylo zjištěno, že tento gen *ELF3* vytváří funkční protein jak v planých, tak také v některých kulturních hráších. U mnohých rostlin byl však objeven stop kodon, který značí existenci nefunkčního proteinu genu *ELF3*. Tento stop kodon byl nalezen převážně u kulturních položek, ale také u několika planých forem. Zároveň byla zjištěna částečná geografická závislost v rozmístění haplotypů dle zeměpisných šířek. Bude zapotřebí podrobnější studie kompletního *ELF3* genu u většího počtu geograficky strukturovaných vzorků a také detailnější analýzy fenotypu umožňující testování hypotézy korelace/asociace doby kvetení s alelami *ELF3*.

## 8 SEZNAM ZKRATEK

<b>AP1</b>	Apetala 1
<b>AP2</b>	Apetala 2
<b>CAL</b>	Cauliflower
<b>CO gen</b>	gen Constans
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>DNE gen</b>	gen Die neutralis
<b>E</b>	Early
<b>ELF3 gen</b>	gen Early flowering 3
<b>ELF4 gen</b>	gen Early flowering 4
<b>FLC</b>	Flowering locus C
<b>FT</b>	Flowering locus T
<b>FRI gen</b>	gen Frigida
<b>GI gen</b>	gen Gigantea
<b>HR</b>	High response
<b>LDP</b>	Long-day plants
<b>LF gen</b>	gen Late flowering
<b>LFY gen</b>	gen Leafy
<b>LUX</b>	Lux arrhythmo
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>QTL</b>	Quantitative Trait Loci
<b>SDP</b>	Short-day plants
<b>SN</b>	Sterile nodes
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SOC1</b>	Suppressor of overexpression of Constans 1
<i>sp.</i>	Species
<b>TSF</b>	Twin sister of FT
<b>UV</b>	Ultraviolet

## 9 LITERATURA

- Amasino, R. M. (2010): Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal*, 61: 1001–1013.
- Amasino, R. M., Michaels, S. D. (2010): The timing of flowering. *Plant Physiology*, 154: 516–520.
- Anderson, J. T., Willis, J. H., Mitchell-Olds, T. (2011): Evolutionary genetics of plant adaptation. *Trends in Genetics*, 27: 258–266
- Aslan, S., Forsberg, N. E. G., Hagenblad, J., Leino, M. W. (2015): Molecular genotyping of historical barley landraces reveals novel candidate regions for local adaptation. *Crop Science*, 55: 2766-2776.
- Ausín, I., Alonso-Blanco, C., Martínez-Zapater, J. M. (2005): Environmental regulation of flowering. *The International Journal of Developmental Biology* 49: 689-705.
- Baldwin, I. T. (2003): Finally, proof of weapons of mass destruction. *Science Signaling*, 203.
- Blázquez, M. A., Soowal, L. N., Lee, I., Weigel, D. (1997): LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development*, 124: 3835-3844.
- Blázquez, M. A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M. R., Weigel, D. (1998): Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell* 10: 791-800.
- Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleissner, R., Wisman, E., Apel, K., Melzer, S. (2000): A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 24: 591-599.
- Burgarella, C., Chantret, N., Gay, L., Prospero, J.-M., Bonhomme, M., Tiffin, P., Young, N. D., Ronfort, J. (2016) : Adaptation to climate through flowering phenology: a case study in *Medicago truncatula*. *Molecular Ecology*, 25: 3397–3415.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., Coupland, G. (2007): FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316: 1030-1033.

- Fitzpatrick, M. C., Keller, S. R. (2015): Ecological genomics meets community-level modelling of biodiversity: mapping the genomic landscape of current and biodiversity: mapping the genomic landscape of current and future environmental adaptation. *Ecology Letters*, 18: 1–16.
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., Putterill, J. (1999): *Gigantea*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO Journal*, 18: 4679-4688.
- Greenham, K., McClung, C. R. (2015): Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature Reviews Genetics*, 16: 598–610.
- Huang, Ch.-L., Hung, Ch.-Y., Chiang, Y.-Ch., Hwang, Ch.-Ch., Hsu, T.-W., Huang, Ch.-Ch., Hung, K.-Ch., Tsai, K.-Ch., Wang, K.-H., Osada, N., Schaal, B. A., Chaing, T.-Y. (2012): Footprints of natural and artificial selection for photoperiod pathway genes in *Oryza*. *The Plant Journal* 70, 769–782.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R. M., Dean, C. (2000): Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science*, 290: 344-347.
- Jump, A. S., Peñuelas, J. (2005): Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters*, 8: 1010–1020.
- Kim, D.-H., Doyle, M. R., Sung, S., Amasino, R. M. (2009): Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *The Annual Review of Cell and Developmental*, 25: 277-299.
- Laurie, R. E., Diwadkar, P., Jaudal, M., Zhang, L., Hecht, V., Wen, J., Tadege, M., Mysore, K. S., Putterill, J., Weller, J. L., Macknight, R. C. (2011): The *Medicago* FLOWERING LOCUS T homolog, *mtFTa1*, is a key regulator of flowering time. *Plant Physiology*, 156: 2207–2224.
- Lejeune-He'naut, I., Hanocq, E., Be'thencourt, L., Fontaine, V., Delbreil, B., Morin, J., Petit, A., Devaux, R., Boilleau, M., Stempniak, J.-J., Thomas, M., Lainé, A.-L., Foucher, F., Baranger, A., Burstin, J., Rameau, C., Giauffret, C. (2008): The flowering locus *Hr* colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 1105–1116.



- Liew, L. C., Hecht, V., Laurie, R. E., Knowles, C. L., Vander Schoor, J. K., Macknight, R. C., Weller, J. L. (2009): DIE NEUTRALIS and LATE BLOOMER 1 contribute to regulation of the pea circadian clock. *The Plant Cell*, 21: 3198–3211.
- Long, J., Barton, M. K. (2000): Initiation of Axillary and Floral Meristems in *Arabidopsis*. *Developmental Biology*, 218: 341-353.
- Linhart, Y. B., Grant, M. C. (1996): Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27: 237–277.
- Lynch, M., Bürger R. (1995): Evolution and extinction in a changing environment: a quantitative-genetic analysis. *Evolution*, 49: 151-163.
- Nilsson, O., Lee, I., Blázquez, M. A., Weigel, D. (1998): Flowering-time genes modulate the response to LEAFY activity. *Genetics*, 150: 403-410.
- Nusinow, D. A., Helfer, A., Hamilton, E. E., King, J. J., Imaizumi, T., Schultz, T. F., Farré, E. M., Kay, S. A. (2011): The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature*, 475: 398-402.
- Parcy, F. (2005): Flowering: a time for integration. *The International Journal of Developmental Biology*, 49: 585-593.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. (1998): *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha, 484 s.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., Coupland, G. (1995): The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80: 847-857.
- Sheldon, C. C., Rouse, D. T., Finnegan, E. J., Peacock, W. J., Dennis, E. S. (2000): The molecular basis of vernalization: The central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 97: 3753-3758.
- Smýkal, P., Kenicer, G., Flavell, A. J., Corander, J., Kosterin, J., 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: 4-18.
- Song, B.-H., Mitchell-Olds, T. (2011): Evolutionary and ecological genomics of non-model plants. *Journal of Systematics and Evolution*, 49: 17–24.
- Song, J., Angel, A., Howard, M., Dean, C. (2012): Vernalization – a cold-induced epigenetic switch. *Journal of Cell Science*, 125: 3723-3731.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010): *Plant physiology*. Sinauer Associates, 781 s.

- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H. L., Yokoi, S., Shimamoto, K. (2007): Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science*, 316:1033-1036.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, A. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Tsubokura, Y., Watanabe, S., Xia, Z., Kanamori, H., Yamagata, H., Kaga, A., Katayose, Y., Abe, J., Ishimoto, M., Harada, K. (2014): Natural variation in the genes responsible for maturity loci E1, E2, E3 and E4 in soybean. *Annals of Botany*, 113: 429–441.
- Ungerer, M. C., Johnson, L. C., Herman, M. A. (2008): Ecological genomics: understanding gene and genome function in the natural environment. *Heredity*, 100: 178–183.
- Vanhala, T., Normann, K. R., Lundström, M., Weller, J. L., Leino, M. W., Hagenblad, J. (2016): Flowering time adaption in Swedish landrace pea (*Pisum sativum* L.). *BMC Genetics*, 17: 117.
- Weinig, C., Ungerer, M. C., Dorn, L. A., Kane, N. C., Toyonaga, Y., Halldorsdottir, S. S., Mackay, T. F. C., Purugganan, M. D., Schmitt, J. (2002): Novel loci control variation in reproductive timing in *Arabidopsis thaliana* in natural environments. *Genetics*, 162: 1875–1884.
- Weller, J. L., Hecht, V., Liew, L. C., Sussmilch, F. C., Wenden, B., Knowles, C. L., Vander Schoor, J. K. (2009): Update on the genetic control of flowering in garden pea. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2493-2499.
- Weller, J. L., Ortega, R. (2015): Genetic control of flowering time in legumes. *Frontiers in Plant Science*, 6:207.
- Weller, J. L., Liew, L. C., Hecht, V. F., Rajandran, V., Laurie, R. E., Ridge, S., Wenden, B., Vander Schoor, J. K., Jaminon, O., Blassiau, C., Dalmais, M., Rameau, C., Bendahmane, A., Macknight, R. C., Lejeune-Hénaut, I. (2012): A conserved molecular basis for photoperiod adaptation in two temperate legumes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 109: 21158-63.

**Příloha č. 1 – Fylogenetický strom cDNA (exon1+exon2) *ELF3* genu (Mega 7 software, metoda Maximum Likelihood, Jukes-Cantor model)**

