

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Monika Hladíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Genetická a biologická analýza dormance semen
čočky (*Lens culinaris* L.)**

Diplomová práce

Bc. Monika Hladíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

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

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. Ing. Petra Smýkala, Ph.D. a s použitím citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Bc. Monika Hladíková

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Monika Hladíková

Název práce: Genetická a biologická analýza dormance semen čočky (*Lens culinaris* L.)

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

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

Rok obhajoby práce: 2021

Klíčová slova: čočka, dormance, domestikace, osemení, genetická mapa

Počet stran: 88

Počet příloh: -

Jazyk: čeština

Souhrn

Předkládaná diplomová práce je věnována studiu lokusů podmiňujících dormanci planého předchůdce čočky (*Lens orientalis*).

Teoretická část této práce je zaměřena na zpracování literární rešerše. Jednotlivé kapitoly jsou věnované následující problematice: původ a domestikaci kulturní čočky, vývoj a anatomie osemení, dormance semen a biologické a genetické aspekty dormance semen bobovitých.

Praktická část této práce je věnována fenotypové charakterizaci dormance semen čočky testováním bobtnání a klíčení mapovacích populací rekombinantních inbredních linií kříženců kulturní a plané čočky segregující pro dormanci semen. Genotypická analýza se skládá z PCR amplifikace vybraných genově specifických markerů, sekvenační analýzy, identifikace polymorfismu potřebného pro mapování a aplikaci těchto polymorfních markerů na soubor RILs. V důsledku toho byla oblast 7 Mb umístěná na chromozomu 7 čočky identifikována jako hlavní lokus podmiňující dormanci semen u čočky. Bylo zjištěno, že testování dormance semen u rostlin vypěstovaných ve skleníku se liší ve srovnání s dormancí semen u rostlin vypěstovaných venku na poli, což značí vliv teploty a vlhkosti na vyklíčení. Bylo také potvrzeno, že pigmentace osemení a barva květu souvisí s dormancí semene. Dále bylo zjištěno, že kandidátní geny použité v této práci (*Lc31299*, *Lc31310*, *Lc30146*) jsou na sebe vázané

a vykazují korelaci s dormancí semen. Porovnáním konstruované genetické mapy s osekvenovaným genomem můžeme vidět, že mezi kandidátními geny *Lc31799* a *Lc31448* se pravděpodobně nachází inverze. Pro podrobnější studium těchto kandidátních genů je potřeba použít transkriptomickou srovnávací analýzu.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Monika Hladíková

Title: Genetic and biological analysis of lentil (*Lens culinaris* L.) seed dormancy

Type of thesis: master

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: Doc. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Keywords: lentil, dormancy, domestication, seed coat, genetic map

Number of pages: 88

Number of appendices: -

Language: czech

Summary

Submitted diploma thesis is focused on the locus conditioning dormancy of wild *Lens orientalis* ancestor of cultivated lentil.

The theoretical part is devoted to origin and domestication of cultivated *Lens*, development and anatomy of seeds, seed dormancy, biological and genetic aspects of legume seed dormancy with focus on seed coat.

Experimental part is devoted to the phenotypic characterization of the lentil seed dormancy by the imbibition and germination testing of mapping population of recombinant inbred lines resulting from the crosses between *Lens culinaris* and *Lens orientalis* segregating from seed dormancy. Genotypic analysis consists of PCR amplification of selected gene specific markers, sequence analysis, identification of polymorphism needed for mapping and application of these markers to a set of RILs. As result, the region of 7 Mb located on the lentil chromosome 7 was identified as major locus conditioning seed dormancy in lentil. It was revealed that seed dormancy of greenhouse grown plants differs from outdoor field grown plants, indicating the effect of temperature and humidity on seed coat properties mediating germination. It was also confirmed relationship between flower and seed coat colour and seed dormancy. Tested candidate genes (*Lc31299*, *Lc31310*, *Lc30146*) were found to be linked and correlated with seed dormancy. Comparison of the constructed genetic map with sequenced

genome, indicated probability of inversion in the region, between candidate genes *Lc31799* and *Lc31448*. Further genetic and transcriptomic comparative analysis is needed to dissect the region and to identify causative gene.

Děkuji Doc. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za odborné vedení, čas, trpělivost a ochotu, které mi v průběhu vypracování bakalářské práce věnoval. Dále děkuji všem pracovníkům katedry botaniky PřF UPOL za veškerou pomoc. Diplomová práce vznikla za podpory projektu Grantové agentury UP Olomouc (PrF-2020-003).

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Původ, domestikace kulturní čočky.....	3
3.1.1	Domestikace – domestikační syndrom	5
3.1.2	Dormance jako jeden z domestikačních znaků.....	6
3.1.3	Genetická diverzita a plané druhy rodu čočka (<i>Lens sp.</i>).....	7
3.1.4	Genetické mapy čočky.....	9
3.2	Vývoj semene bobovitých rostlin.....	10
3.2.1	Anatomie osemení	11
3.2.2	Fyziologie osemení	14
3.2.3	Vliv osemení na propustnost vody.....	15
3.3	Dormance semen	16
3.3.1	Druhy dormance	18
3.4	Biologické a genetické aspekty dormance semen bobovitých	21
3.4.1	Analýza genové exprese během vývoje osemení bobovitých	24
4	Materiál a metodika	26
4.1	Biologický materiál	26
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	26
4.3	Použité přístroje.....	27
4.4	Použitý software	27
4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	28
4.5.1	Izolace genomové DNA.....	28
4.5.2	Spektrofotometrická analýza DNA.....	29
4.5.3	PCR analýza.....	29
4.5.4	Izolace RNA	31

4.5.5	Přečištění RNA	32
4.5.6	Reverzní transkripce	33
4.5.7	RT-PCR analýza	34
4.5.8	Elektroforéza.....	35
4.5.9	Sekvenační analýzy s cílem nalezení vhodného restrikčního polymorfismu	36
4.5.10	Restrikce PCR produktu	37
4.5.11	RNA sekvenování	38
4.5.12	Anatomická analýza osemení	39
4.5.13	Testování bobtnání (dormance) semen	41
5	Výsledky	42
5.1	Testování dormance semen	42
5.2	Hodnocení fenotypu	46
5.2.1	Barva osemení a barva květu	46
5.2.2	Vztah mezi barvou květu a barvou osemení	47
5.2.3	Analýza anatomické struktury osemení	48
5.3	Hodnocení genotypu a genetické mapování	52
5.4	Hodnocení genové exprese pomocí RT-PCR analýzy	58
6	Diskuze	60
7	Závěr	66
8	Literatura.....	67

Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
CAPS	<i>Cleavage Amplified Polymorphic Sequence</i>
DArT	<i>Diversity Arrays Technology</i>
GA	giberelin
GBS	<i>Genotyping by sequencing</i>
IAA	kyselina indol-3-octová
PD	fyziologická dormance
MAS	<i>marker-assisted selection</i>
MD	morfologická dormance
MPD	morfofyziologická dormance
NIL	<i>nearly-isogenic line</i>
PY	fyzická dormance
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RIL	rekombinantní inbrední linie
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SEM	skenovací elektronová mikroskopie

Seznam obrázků

Obrázek 1- Zeměpisné rozšíření jednotlivých druhů <i>Lens</i>	3
Obrázek 2- Květ <i>Lens culinaris</i>	4
Obrázek 3- Struktura osemení bobovitých - Příčný řez osemením planého hrachu <i>Pisum sativum</i> subsp. <i>elatius</i> a jeho schématický nákres	13
Obrázek 4- Porovnání počtu dormantních a nedormantních linií u dat UPOL 2020.....	42
Obrázek 5- Distribuce bobtnání u jednotlivých RILs u dat UPOL 2020	43
Obrázek 6- Četnost bobtnání jednotlivých kategorií u dat UPOL 2020	43
Obrázek 7- Srovnání kategorií bobtnání u dat z jednotlivých měření a let.....	44
Obrázek 8- Vztah mezi mírou dormance mezi daty UPOL 2020 a UVM 2018	45
Obrázek 9- Časový průběh bobtnání u vybraných RILs	46
Obrázek 10- Rozdíl v pigmentaci osemení rodičovských genotypů.....	46
Obrázek 11- Ukázka různě zbarveného osemení u vybraných RILs	47
Obrázek 12- Vztah mezi pigmentací a barvou květu UPOL 2020.....	48
Obrázek 13- Mikroskopická analýza řezu osemení rodičovských genotypů 3339 a 72643 ...	48
Obrázek 14- Mikroskopická analýza řezu osemení u linií 43, 104, 57, 129	49
Obrázek 15- Mikroskopická analýza řezu osemení linie 58, 77, 66, 96	49
Obrázek 16- Průměrné hodnoty velikosti makroklereid u vybraných RILs.....	52
Obrázek 17- Ukázka polymorfních sekvencí markeru <i>Lc31310</i> u vzorků rodičovských genotypů a 2 RILs	53
Obrázek 18- Ukázka restrikce PCR produktů jednotlivých RILs amplifikovaných genem <i>Lc30146</i> pomocí enzymu <i>RsaI</i>	54
Obrázek 19- Ukázka restrikce PCR produktů jednotlivých RILs amplifikovaných genem <i>Lc32190</i> pomocí enzymu <i>AluI</i>	54
Obrázek 20- Ukázka restrikce PCR produktů amplifikovaných různými geny.....	55
Obrázek 21- Mapovací oblast genomu na chromozomu 7 čočky	57
Obrázek 22- Vzdálenost jednotlivých markerů ze sekvenování genomu v Kanadě	57
Obrázek 23- Genetická mapa se vzdálenostmi (cM) jednotlivých markerů na chromozomu 7 čočky	58
Obrázek 24- Kontrola exprese cDNA amplifikovanou různými geny.....	59
Obrázek 25- Porovnání zkounstruované genetické mapy s osekvenovaným genomem.....	65

Seznam tabulek

Tabulka 1- Seznam použitých primerů.....	30
Tabulka 2- Příprava reakční PCR směsi.....	30
Tabulka 3- Časový a teplotní průběh PCR reakce programu CAPS_55.....	31
Tabulka 4- Množství jednotlivých reakčních složek.....	32
Tabulka 5- Teplotní a časový průběh programu SENSIFAS pro reverzní transkripci.....	34
Tabulka 6- Seznam použitých primerů.....	34
Tabulka 7- Příprava reakční PCR směsi.....	35
Tabulka 8- Časový a teplotní průběh reakce programu pro cDNA.....	35
Tabulka 9- Reakční směs pro purifikaci DNA.....	37
Tabulka 10: Časový a teplotní průběh PCR reakce programu Exo-AP pro purifikaci DNA...37	
Tabulka 11: Seznam použitých restrikčních enzymů s příslušnými pufry a teplotou štěpení..38	
Tabulka 12: Reakční směs pro restrikci PCR produktu.....	38
Tabulka 13: Jednotlivá měření velikosti makroklereid u rodičovských genotypů a jejich průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou.....	50
Tabulka 14: Jednotlivá měření velikosti makroklereid u nedormantních linií a jejich průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou.....	50
Tabulka 15: Jednotlivá měření velikosti makroklereid u dormantních linií a jejich průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou.....	51
Tabulka 16: Část hodnocení polymorfismu RILs.....	56

1 Úvod

Čočka jedlá (*Lens culinaris ssp. culinaris*) hraje významnou roli v hospodářství po celém světě. Je to jednoletá rostlina z čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Čočka je bohatým zdrojem bílkovin, vitamínů, minerálů a patří mezi několik málo druhů potravin, které jsou klíčovým prvkem k udržitelnému zemědělství a světového potravinového zásobování. Je proto potřeba ji studovat a objevovat nové poznatky.

Čočka patří k nejranějším domestikovaným rostlinám. K domestikačním znakům patří např. dormance semen. Dormance semen je důležitý mechanismus rostlin, který umožňuje zpozdit klíčení, dokud nejsou podmínky pro přežití optimální. Dormance je vlastnost získaná během evoluce výběrem schopnosti přežít v nepříznivých podmínkách. Dormance také souvisí s klimatickými změnami a přispěla k vývoji nových druhů a rozšíření stávajících druhů. Dormance slouží ke snížení riziku předčasného úmrtí semen. Dormance semen je běžná u planých rostlin, zatímco domestikované druhy jsou selektovány pro své rychlé a uniformní klíčení, čímž se dosahuje většího výnosu. I když mohou mít nedormantní jedinci sníženou životnost semen, jsou používáni pro komerční účely právě pro rychlejší uvaření i větší chutnost. Dormance semen se rozděluje na 5 typů: fyziologickou, morfologickou, morfo-fyziologickou, fyzickou a kombinovanou. Pro semena bobovitých je nejdůležitější dormance fyzická, která je způsobena palisádovými buňkami v osemeni, které jsou nepropustné pro vodu. Je snaha identifikovat další faktory i specifické geny ovlivňující dormanci.

Předmětem této diplomové práce bylo identifikovat lokusy podmiňující dormanci planého předchůdce čočky (*Lens orientalis*) pomocí genetického mapování a analýzy fenotypu rekombinantních inbredních linií.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo identifikovat lokusy podmiňující dormanci planého předchůdce čočky (*Lens orientalis*) pomocí genetického mapování a analýzu fenotypu rekombinantních inbredních linií.

V teoretické části práce na základě podkladů literárních zdrojů vypracovat literární rešerši na téma vývoje semen a mechanismu dormance.

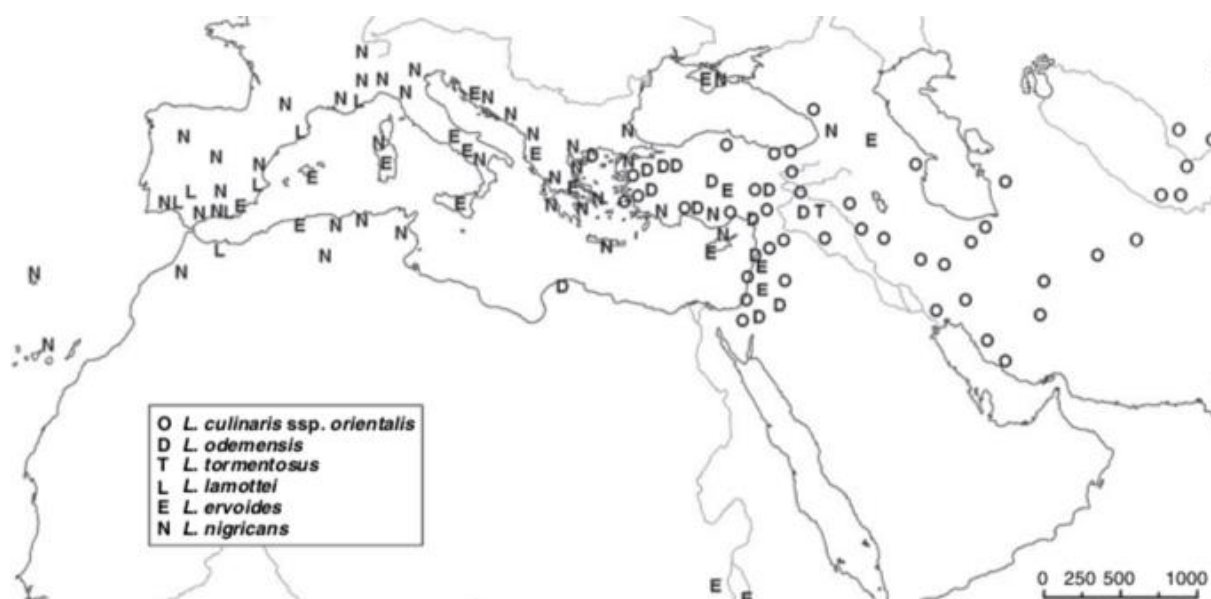
V praktické části provést experimenty pro testování dormance semen mapovací populace rekombinantních inbredních linií (RIL) kříženců kulturní (*L. culinaris*) a plané (*L. orientalis*) čočky segregující pro dormanci semen. PCR amplifikaci vybraných genově specifických markerů, sekvenční analýzu, identifikaci polymorfismu potřebného pro mapování (SNPs) a aplikaci těchto polymorfních markerů na soubor RIL linií. Následně aplikovat statistickou analýzu dat a mapovací postupy.

3 Literární přehled

3.1 Původ, domestikace kulturní čočky

Čočka (*Lens culinaris* Medikus subsp. *culinaris*) je luštěnina používaná jako výživná potravina. Je to jednoletá rostlina z čeledi bobovitých (*Fabaceae*), která dorůstá do výšky 20-45 cm. Vytváří mnoho malých lusků, které obsahují jedno či dvě semena. Čočková zrna jsou bohatým zdrojem bílkovin, vitamínů a minerálů (Bhatty, 1988), ke kterým patří draslík, fosfor, železo nebo zinek. Díky vysokému obsahu lysinu a tryptofanu zajišťuje spolu s pšenicí a rýží vyváženost esenciálních aminokyselin. Sláma z čočky je také cenným krmivem pro zvířata (Erskine *et al.*, 1990). Jeho schopnost fixace dusíku a vázání uhlíku neboli sekvestrace zlepšuje stav půdních živin, což zajišťuje udržitelnost v systémech rostlinné výroby (Erskine *et al.*, 2009).

Čočka patří k nejranějším domestikovaným rostlinám a je spojována se začátkem zemědělské revoluce na Blízkém východě. Pěstuje se již 10 000 let v těch nejobtížnějších zemědělských podmínkách. Mezi další domestikované rostliny patří pšenice, ječmen, hrách a len. Nyní se čočka pěstuje v suchých oblastech od Bangladéše na východě po Maroko na západě a od Ruska na severu po Etiopii na jihu (viz Obrázek 1). Na východě jsou největšími producenty Indie a Turecko. Na západě je předním producentem Kanada a poté USA a Mexiko. V Evropě jsou největšími hlavními producenty Španělsko, Francie a Rusko. Čočka je tedy důležitou složkou zemědělství a potravinářství mnoha zemí po celém světě (Erskine *et al.*, 2009).



Obrázek 1- Zeměpisné rozšíření jednotlivých druhů *Lens* (převzato z Erskine *et al.*, 2009)

Původ čočky z taxonu *Lens culinaris* byl prokázán morfologickými důkazy a šlechtitelskými experimenty. Tato planá forma vykazuje varianty v mnoha vlastnostech a je distribuována na rozsáhlém území od Středního východu po Střední Asii. Znaky, které jsou u planého předka polymorfní, ale naopak monomorfní u kulturní formy, mohou být využity pro lepší identifikaci genetických populací, které daly vzniknout domestikované čočce. Tři takové znaky identifikované v čočce jsou 1) chromozomální architektura 2) potenciál křížitelnosti a 3) restriční schéma chloroplastové DNA. U téměř všech položek kulturní čočky, které byly testovány na tyto tři znaky, byly nalezeny monomorfní znaky, na rozdíl od polymorfismu planých položek. Tři *L. orientalis* položky sdílejí uvedené znaky s kulturní formou a proto se považují za členy jedné genetické populace, z níž byla čočka domestikována. Tyto tři položky pocházejí z východního Turecka a severní Sýrie (Ladizinsky, 1999).

Lens orientalis je tedy planá forma, ze které se vyvinula kulturní forma. *Lens culinaris* vykazuje větší výšku, větší počet květů na stopku, kratší stopku, vyšší frekvenci bílých květů (viz Obrázek 2) a také větší lusky a semena. Tyto vlastnosti jsou spojovány s domestikací a se zvýšeným výnosem. Velikost semen je jediná morfologická vlastnost, která může indikovat domestikaci v archeologických pozůstatcích. Existují kulturní skupiny s některými primitivními znaky. Až do středověku byly odrůdy s načernalými a nesladkými semeny, tak jako odrůdy s normálními a kulatějšími semeny. Tyto formy mohly být také směsí planými druhy *Lens* nebo s jakoukoli primitivní krajovou odrůdou (Erskine *et al.*, 2009).



Obrázek 2- Květ *Lens culinaris* (převzato z Erskine *et al.*, 2009)

Původním materiálem byly populace *Lens orientalis*, ale primitivní zemědělci mohli také použít některé další druhy ve smíšené populaci spíše než v čisté populaci. Ale druhy *Lens orientalis* a *L. odemensis* jsou nejpravděpodobnějšími kandidáty, kteří byli společníky kulturní

formy (Erskine *et al.*, 2009). Analýzy molekulárních markerů však naznačují, že genetická variabilita u kulturní čočky je relativně nízká (Sonnante, 2003, Durán *et al.* Pérez de la Vega, 2004), což podporuje myšlenku, že mikrosperma a makrosperma morfotypy jsou jednoduché varianty kvantitativních znaků a jsou výsledkem disruptivní selekce (Sonnante, 2003). Je však obtížné zjistit, kolik planých genotypů se podílelo na genofondu kultivaru (Erskine *et al.*, 2009).

3.1.1 Domestikace – domestikační syndrom

Lidé za posledních 12 000 let domestikovali stovky rostlinných a živočišných druhů jako zdroj potravy, vláken, krmiva pro hospodářská zvířata a nástrojů (Meyer *et al.*, 2012) s dopady jak na lidskou společnost, tak genetickou strukturu domestikovaných druhů. Výsledky domestikace plodin byly formovány selekcí založenou na lidských preferencích, kultivačních postupech a zemědělském prostředí, a rovněž i dalších genetických procesech plynoucích z následného snižování efektivní velikosti populace. Je očividné, že jakákoli selekce ukládající snížení diverzity, upřednostňuje jisté genotypy, jako jsou nerozbitná semena nebo zvýšená chutnost. Mimoto zemědělské praktiky výrazně snížily efektivní velikost populace plodin, čímž umožnily, aby genetický drift změnil frekvence genotypů (Gross *et al.*, 2010; Olsen *et al.*, 2013; Cowling *et al.*, 2009).

Domestikované druhy rostlin se vyskytují ve více než 160 čeledích. Mezi nejdůležitější z nich patří lipnicovité (*Poaceae*), bobovité (*Fabaceae*) a brukvovité (*Brassicaceae*). Přibližně 2500 druhů prošlo alespoň nějakým stupněm domestikace a 250 druhů můžeme považovat za zcela domestikované (Meyer *et al.*, 2012). Avšak méně než 20 druhů rostlin poskytuje kolem 95 % světového kalorického příjmu. Patří k nim banány, fazole, kukuřice, brambory, rýže, sójové boby, cukrová třtina, pšenice a luštěniny, jako právě čočka, hrách nebo cizrna (FAOSTAT, 2015). Právě seskupení těchto několika druhů potravin je klíčovým prvkem zranitelnosti světového potravinového zásobování kvůli dopadu klimatických změn a náporu nových rostlinných chorob a škůdců (Smýkal *et al.*, 2018).

Evoluční trajektorie od planých druhů po domestikované plodiny je komplexní proces. Archeologické záznamy naznačují, že existovalo období pre-domestikace, kdy lidé nejprve začali záměrnou výsadbu či uvolnění prostoru pro růst planých porostů, které měly výhodné vlastnosti. Později se plodiny pravděpodobně diverzifikovaly, jelikož byly pěstovány v nových oblastech (Von Wettberg *et al.*, 2018; Abbo *et al.*, 2014). Běžně se má za to, že nejdřív došlo ke sklizni planých rostlin následovanou vědomou a nevědomou selekcí pro úpravu vlastností rostlin, a nakonec k vědomé selekci rostlinného materiálu pro specifické lokace a použití, čímž rostliny obecně ztrácí schopnost přežít bez lidské péče (Harlan, 1992). Opačný názor je, že

domestikace mohla nastat záměrněji, a že v případě bobovitých mohly mít domestikační rysy ještě před kultivací (Abbo *et al.* 2017). Tyto procesy vedou k tzv. domestikačnímu syndromu (Hammer, 1984), což je skupina vlastností, které vznikly lidskou preferencí pro zjednodušení sklizně a růstové výhody pod lidskou propagací nebo přežití v odlesněných nebo poničených oblastech. K těmto vlastnostem zahrnujeme sníženou schopnost disperze semen a plodů, změny v rostlinné struktuře a změny rostlinných obranných mechanismů (Berger *et al.*, 2017) a chutnosti rostlin (Meyer, 2013).

Do současnosti bylo identifikováno několik stovek genů a lokusů klasickým genetickým a asociačním mapováním jako cíle domestikace a post-domestikační divergence (Olsen *et al.*, 2013; Lenser *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2013 Fuller *et al.*, 2009). Jen několik z nich však bylo charakterizováno a ještě méně je pochopena role původní alely v přirozených populacích. Po domestikaci jsou jen u příznivých haplotypů zachovány vybrané alely, projevující se extrémně malou genetickou diverzitou. Tyto selektivní zásahy mohou dovolit fixaci mírně škodlivým alelám a mohou vytvořit genetickou zátěž v genofondu kultivované rostliny (Smýkal *et al.*, 2018).

Mnoho studií zjistilo, že moderní kultivary mají nižší hladinu mikroprvků a vitamínů. Tušíme, že selekce pro chutnost a zvýšení výnosu při domestikaci a během post-domestikační divergence se odrazilo v nízké hladině specifických prvků a metabolitů. Všechny rostlinné plodiny byly domestikovány z planých příbuzných. Plané druhy, ze kterých byla plodina odvozena, v některých případech mohou být známé a lehce identifikované v současné populaci planých rostlin, zatímco jiné mohli vzniknout hybridizací a polyploidizací (Kantar *et al.*, 2017; Piperno *et al.*, 2015; Warchefsky *et al.*, 2014).

3.1.2 Dormance jako jeden z domestikačních znaků

Načasování klíčení semen je klíčovým krokem v životním cyklu rostlin, zejména u letniček, kde určuje začátek vegetačního období. Ve volné přírodě mnoho semen vyklíčí až po splnění určitých podmínek nebo po fyzickém poškození osemení. Prediktivní klíčení, které reaguje na podněty signalizující počátek vegetačního období, zajišťuje to, že planá semena klíčí ve vhodnou dobu, zatímco v případě oddálení klíčení (tzv. *bet-hedging*), kde kohorty semen klíčí v jinou dobu, sníží riziko možného vymření populace či druhu (Gemer *et al.*, 2016). Domestikované plodiny jsou tak plně pod kontrolou zemědělce a nevyžadují žádný z těchto ochranných mechanismů. Plodiny mají tedy tendenci bobtnat a následně klíčit, v podstatě ihned, jakmile jsou vystaveny vodě (Weitbrecht *et al.*, 2011). Selektce plodin s nedormantními semeny byla dalším znakem domestikačního syndromu, která mohla být způsobena vědomě

i nevědomě. Vysoký podíl nedormantních semen umožňuje dobré založení domestikované plodiny, a v případech luštěnin s měkkými semeny zkracuje dobu vaření. Redukování tloušťky osemení vedlo k současnému snížení nepropustnosti osemení během domestikace bobovitých (Smýkal *et al.*, 2014). Naopak nižší hodnoty dormance mohou snížit životaschopnost a spustit předčasné klíčení, což způsobí ztráty úrody u obilovin (Liu *et al.*, 2013).

3.1.3 Genetická diverzita a plané druhy rodu čočka (*Lens sp.*)

Domestikovanou formou čočky je *Lens culinaris* (Webb *et al.*, 1981). V průběhu času předpokládali různí autoři druhy *Lens orientalis*, *Lens odemensis* a *Lens tomentosus* jako předky *Lens culinaris*. V rodu *Lens* navíc existují 3 plané druhy: *Lens nigricans*, *Lens ervoides* a *Lens lamottei* (Ferguson *et al.*, 2000). Všechny druhy *Lens* jsou diploidní ($2n = 2x = 14$) (Sharma *et al.*, 1995). *Lens orientalis* je plně křížitelná s domestikovanou čočkou (Muehlbauer *et al.*, 1981; Robertson *et al.*, 1997) a je nejpravděpodobnějším předchůdcem domestikované čočky (Barulina, 1930; Mayer *et al.*, 1994). Pochopení vztahů mezi druhem a diverzitou taxonů je důležité pro základní biologické důvody a pro vylepšení kultivarů čočky. Dávná historie domestikace kultivované čočky způsobila efekt hrdla láhve, což vedlo k úzkému genetickému základu, jehož následkem byla snížená úroveň rezistence vůči biotickému a abiotickému stresu vzhledem k jejím planým příbuzným. Ke zvýšení genetické diverzity a rezistenci vůči biotickému a abiotickému stresu u nových kultivarů je introgrese výhodných genů z jejich planých příbuzných nezbytná (Wong *et al.*, 2015).

Vzhledem k tomu, že si je všech 7 taxonů morfologicky velmi podobných a jen málo vlastností může být považováno za diagnostické, není tradiční identifikace druhů v tomto rodu na základě morfologických vlastností spolehlivá (Galasso, 2003). Z toho důvodu bylo zaměřeno na molekulární analýzu k rozboru inter- a intraspecifických vztahů. Předchozí studie molekulární diverzity druhových vztahů v rámci rodu *Lens* ukázaly poměrně nízké úrovně polymorfismu. Výsledky analýz s několika typy DNA markerů ukázaly, že druhy *Lens* lze snadno rozlišit. Blízký molekulární vztah mezi *L. culinaris* a *L. orientalis* potvrzuje dřívější pozorování morfologických znaků, chromozomálního uspořádání a křížitelnosti (Ladzinky, 1999). Úspěšná a účinná diverzifikace kulturní čočky introgresí genů od planých příbuzných značně závisí na přesné identifikaci planých druhů následovanou úspěšným rozvojem fertálních hybridních rostlin (Wong *et al.*, 2015).

Lens culinaris a *L. orientalis* sdílí stejný karyotyp, obsahující 2 páry metacentrických (jeden z nich se sekundární konstrikcí), 2 páry velkých submetacentrických a 3 akrocentrické chromozomy (Ladizinsky, 1979). *Lens nigricans* má mírně odlišný karyotyp: 3 páry

submetacentrických (jeden z nich má také sekundární konstrikci), 1 pár metacentrických a 3 akrocentrické chromozomy. (Balyan *et al.*, 2002) Různé genotypy *L. culinaris* formy mikrosperma se liší počtem metacentrických, submetacentrických a akrocentrických chromozomů, a genotypy *L. orientalis* v pozici NOR lokusu a lokusu 5S (Fernández *et al.*, 2005).

Oba poddruhy *L. culinaris* jsou spolu lehce křížitelné (Ladizinsky, 1979; Fratini *et al.*, 2004), ačkoli plodnost jejich hybridů závidí na chromozomálním uspořádání planého rodiče (Ladizinsky, 1979; Ladizinsky *et al.*, 1984). U plané *L. orientalis* byly identifikovány 3 skupiny křížení: běžná, vzácná a střední. Křížení mezi členy běžné a vzácné skupiny produkují abortovaná semena, která mohou být zachráněna embryonální kulturou. Členy střední skupiny jsou kompatibilní s dalšími dvěma skupinami (Ladizinsky, 1993; van Oss *et al.*, 1997). Poddruh *L. orientalis* se lehce kříží s *L. odemensis*. Jejich hybridy jsou vegetativně normální ale částečně sterilní kvůli meiotickým nepravidłnostem, které vyplývají ze 3 chromozomových přesmyků mezi rodičovskými kmeny (Ladizinsky, 1993).

Lens tomentosus je morfologicky blíže k *L. orientalis* než k jakémukoli jinému taxonu *Lens*. Nicméně jsou od sebe izolovány rozpadem hybridního embrya, kompletní sterilitou a 5 chromozomálními přestavbami, což podporuje myšlenku specifického statutu pro *L. tomentosus*. Podobně je *L. tomentosus* reprodukčně izolován od *L. lamottei* a *L. odemensis* aborcí hybridního embrya (van Oss *et al.*, 1997).

Studie vazeb odhalily chromozomální přestavby mezi *L. culinaris* a *L. odemensis* (Ladizinsky, 1993), což by mohlo vysvětlit, proč jsou určité části *L. odemensis* volně křížené s *L. culinaris* (Ladizinsky, 1979) a jiné potřebují záchranu embrya (Fratini *et al.*, 2006). *Lens odemensis* je nekompatibilní s *L. nigricans* a *L. ervoides* kvůli aborcí hybridního embrya (Ladizinsky *et al.*, 1984; Ladizinsky, 1993). Morfologické změny mezi *L. nigricans* a *L. lamottei* jsou limitovány tvarem palistu. Tyto dva se však liší čtyřmi reciprokými translokacemi a jednou paracentrickou inverzí, což vede k úplné sterilitě jejich hybridů (Ladizinsky *et al.*, 1984). Interspecifičtí hybridy *L. nigricans* a *L. ervoides* jsou vegetativně normální ale zcela sterilní (Ladizinsky, 1993).

Hybridizační bariéry podporují myšlenku šesti diferencovaných druhů. *Lens orientalis* patří očividně do primárního genofondu, *L. odemensis* spíše do sekundárního. *L. nigricans* a *L. ervoides* patří do terciárního genofondu, ale mohou být součástí sekundárního, pokud by došlo k záchraně embrya. Pro zjištění, zda *L. tomentosus* a *L. lamottei* patří do sekundárního nebo terciárního genofondu, jsou potřeba další hybridizační studie (Erskine *et al.*, 2009).

3.1.4 Genetické mapy čočky

Čočka (*Lens culinaris*) hraje významnou roli v udržitelném zemědělství po celém světě. Její nutriční hodnoty mohou hrát roli při boji s globálním zabezpečení potravin a výživy. Velikost genomu čočky je 4,3 Gb. Sestavení genomu čočky v1.0, která byla založená na odrůdě CDC Redberry, bylo vydáno v lednu 2016. Sestavení se skládá ze 7 pseudomolekul ukotvených pomocí 6 vysokohustotních genetických vazebných map. Celkový počet sestavených bází představoval přibližně polovinu z 4,3 Gb genomu čočky. Genomová sekvence čočky tedy poskytla nástroje usnadňující genetické studie do hloubky (Bett *et al.*, 2016).

Lens culinaris je diploidní ($2n = 2x = 14$; Arumuganathan *et al.*, 1991). Planí příbuzní čočky jsou široce používáni k rozvoji genetických map pro analýzu QTL (*Quantitative Trait Loci*), souvisejících s výnosem a dalšími vlastnostmi, jako jsou geny rezistence proti biotickým i abiotickým stresům a také pro rozšiřování genetického základu kultivarů čočky (Bhadauria *et al.*, 2017; Dadu *et al.*, 2017; Fiala *et al.*, 2009; Fratini *et al.*, 2009; Gorim *et al.*, 2017; Gujaria-Verma *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2017; Suvorova *et al.*, 2014). *L. odemensis* je planý druh zařazený do sekundárního genofondu a může být použit jako zdroj genové introgrese u šlechtitelských programů čočky. Data markerů byla použita ke konstrukci první genetické mezidruhové mapy mezi těmito dvěma druhy. Tato vazebná mapa byla použita k přesné identifikaci oblastí genomu CDC Redberry čočky, ve kterých se mohly nacházet kandidátní geny pro některé kvantitativní znaky (vzor skvrnitosti osemení, barva květu a pigmentace stonku). Byly identifikovány oblasti genomu odpovídající významnému QTL kontrolujícího „čas kvetení“ na chromozomu 6 a tři QTL regulující velikost semene na chromozomu 1 a dvě QTL na chromozomu 5 (Polanco *et al.*, 2019).

Konstrukce genetické mapy se stala potřebným nástrojem pro molekulární genetiku či šlechtění rostlin (Tanyolac *et al.*, 2010). Prvním krokem pro konstrukci genetických vazebných map je dostupnost velkého počtu molekulárních markerů a velkých mapovacích populací. Vysokohustotní vazebné mapy mají přímou implementaci ve šlechtitelských výzkumech jako např. výběr pomocí markerů (*marker-assisted selection*, MAS), protože zajišťují, že jakýkoliv zájmový gen bude těsně spojen s molekulárním markerem (Hamwiah *et al.*, 2005; Tanksley *et al.*, 1989). Poslední aplikace vysokohustotních vazebných map je orientace a ukotvení tzv. scaffoldů vycházejících z dat sekvence genomu (Gaur *et al.*, 2015). Vysokohustotní vazebné mapování by mohlo pomoci umístit sekvence do správné pozice (Wu *et al.*, 2015).

Běžně byla z jedné mapovací populace vytvořena genetická vazebná mapa. Velký zájem je však také o snahu konstrukce vazebných map z několika mapovacích populací, což se označuje jako konsenzuální mapa (Rajaram *et al.*, 2013). Konstrukce konsenzuální mapy má různé výhody. Mezi ně patří vyšší hustota markerů na jedné mapě, lepší pokrytí genomu, identifikace pozic společných markerů napříč mapovacími populacemi, detekci chromozomálních přestaveb a stupně duplikace genů, srovnání QTL nebo zájmových genů napříč mapami, nebo vytvoření základu pro srovnání genomů mezi příbuznými druhy (Milczarski *et al.*, 2011; Truco *et al.*, 2007; Shirasawa *et al.*, 2013; Blenda *et al.*, 2012).

Ates *et al.* (2018) poskládali konsenzuální mapu čočky z 9 793 DarT markerů, která pokrývala 977, 47 cM s průměrnou vzdáleností 0,10 cM mezi sousedními markery, a zkonstruovali 7 vazebných skupin reprezentujících 7 chromozomů genomu čočky. Lokalizace SNP markerů na konsenzuální mapě čočky byla konzistentní s jejich lokalizací na třech individuálních genetických vazebných mapách a konsenzuální mapa měla větší mapovací délku, vyšší hustotu markerů a kratší průměrnou vzdálenost mezi sousedními markery v porovnání s komponentní vazebnou mapou.

3.2 Vývoj semene bobovitých rostlin

Semena jsou komplexní struktury, které se skládají ze tří hlavních složek, z nichž má každá jiný genotyp. Embryo, které se stane vegetativní rostlinou, je diploidní a obsahuje jeden otcovský a jeden mateřský ekvivalent genomu. Endosperm, struktura poskytující výživu pro vyvíjející se embryo anebo sazenici, je triploidní se dvěma mateřskými a jedním otcovským ekvivalentem genomu. Osemení obklopuje embryo i endosperm a je striktně mateřského původu. Diverzita genotypů naznačuje odlišné genetické programy, které jsou základem vývoje každé složky semene. Komunikace mezi různými složkami je nutná vzhledem k tomu, že růst a vývoj semen musí být koordinovány (Bradford *et Nonogaki*, 2007).

Schopnost vyšších rostlin vytvářet semena jim zajistila významnou selektivní výhodu, která částečně odpovídá úspěchu krytosemenných (Walbot, 1978; Steeves, 1983). Vytvoření semen usnadnilo oplození v bezvodých prostředí a poskytlo ochranu (integumenty, osemení) a výživu (*nucellus* a endosperm) samičího gametofytu a vyvíjejícího se embrya. Vysušené embryo je metabolicky v klidu a umožňuje dlouhodobou životaschopnost. Osemení slouží jako bariéra propustnosti plynů a vody, a zásobní látky jako jsou lipidy, proteiny a sacharidy hromadící se v semenech jsou zdrojem živin pro růst sazenice (Bradford *et Nonogaki*, 2007).

Vývoj semene začíná dvojitým oplodněním u krytosemenných. Haploidní vaječná buňka a diploidní centrální buňka samičího gametofytu ve vajíčku každá fúzuje s jednou spermatickou buňkou z pylové láčky, aby se vytvořila zygota a buňka endospermu. Zygota podstupuje řadu diferenciačních procesů, které mají za následek formaci zralého embrya a suspenzoru, efemérní struktury podporující embryo fyzicky i fyziologicky během brzké embryogeneze. Embryo se skládá ze dvou hlavních embryonálních orgánových systémů: osa, ze které se odvozuje tělo vegetativní rostliny, a děloha (popř. dělohy), které většinou fungují jako zásobní orgány pro makromolekulární rezervy u dvouděložných druhů (West *et* Harada, 1993; Goldberg *et al.*, 1994). Oplozená centrální buňka podstupuje sérii jaderných dělení bez cytokineze, což vede k vytvoření syncytia, které později celularizuje (Olsen, 2004). Endosperm je buď přechodná nebo trvalá struktura u semen. Další hlavní složkou semene je osemení, které je odvozené z vnitřního, vnějšího nebo obou integumentů vajíčka a je tedy mateřského původu (Boesewinkel *et* Bouman, 1984; Bewley *et* Black, 1995).

Načasování klíčení semen je jedním z klíčových kroků v životě rostlin. Určuje začátek růstu rostlin v přírodních nebo zemědělských ekosystémech. Ve volné přírodě mnoho semen vykazuje dormanci a vyklíčí jen po vystavení určitým podmínkám prostředí. V porovnání s nimi semena kulturních rostlin vyklíčí hned, jakmile nasáknou vodu během výsadby. Tyto změny vyvolané domestikací představují adaptaci na kultivaci a sklizeň lidmi (Smýkal *et al.*, 2014).

3.2.1 Anatomie osemení

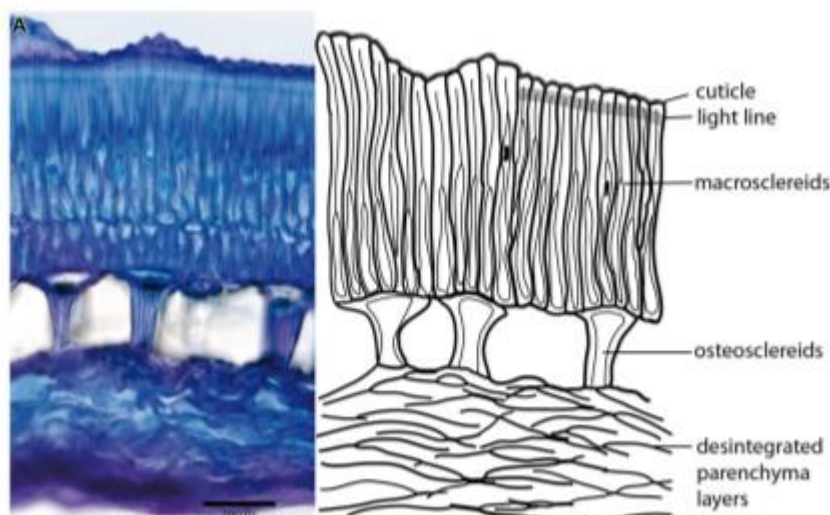
Osemení ohraničuje embryo a endosperm. Osemení slouží jako ochranná funkce proti fyzikálnímu poškození a poškození z ultrafialového záření, a také pomáhá při šíření semen a při kontrole klíčení (Bewley *et* Black, 1995).

Osemení se vyvíjí z epidermis primordia vajíčka, které je ontogeneticky odvozeno z meristematické L1 buněčné vrstvy (Schneitz *et al.*, 1997), a se vznikající sítí regulačních drah koordinujících vnitřní anebo vnější integument obklopuje vajíčko (Skinner *et al.*, 2004; Galbiati *et al.*, 2013; Kurdyukov *et al.*, 2014). Počet integumentů vajíčka se liší v závislosti na druhu. Konkrétně bobovité mají dva integumenty. Vnitřní integument převážně zmizí během vývoje (Esau, 1965), kdežto vnější vytváří několik rozdílných buněčných vrstev a zakládá „typickou“ strukturu osemení. Chalázní oblast je důležitou součástí osemení, kde končí spoje cévní tkáně mateřského poutka (*funiculus*). Jizva, kde bylo připojeno poutko, se nazývá pupek (*hilum*). Ačkoliv se osemení u různých druhů liší ve struktuře a složení, procházejí podobnými fázemi

vývoje, co se týče embrya a endospermu (Butler, 1988). U bobovitých se nejprve vyvíjí osemení a endosperm a následně probíhá vývoj embrya (Weber *et al.*, 2005).

Epidermis vnějšího integumentu vytváří jedinou vrstvu těsně nahloučených palisád radiálně prodloužených sklereid (tzv. palisádové buňky či makroklereidy) se silně a nepravidelně ztloustlými buněčnými stěnami. Vnější buněčné stěny jsou pokryté kutikulou a jsou běžně označeny jako koncové čepičky kvůli specifickému tloustnutí a modifikacím buněčné stěny. Jejich tvar společně s kutikulou a voskovými depozicemi určuje texturu povrchu osemení (Güneş, 2013). Architektura této vrstvy a struktura její kutikuly přitahuje značnou pozornost vzhledem k tomu, že jejich vlastnosti jsou obvykle spojovány s neprostupností vody tvrdých semen (White, 1908; Hamly, 1932, Hamly, 1935; Bevilacqua *et al.*, 1989 Argel *et Paron*, 1999). Kutikula vytváří souvislou vrstvu pokrývající semeno, kromě oblasti pupku, a je považována za nejsvrchnější bariéru pro nasáknutí vody (White, 1908; Spurny, 1963; Ma *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2007).

Oblast makroklereidních buněčných stěn odděluje koncové čepičky od jejich bazálních částí. Tato hraniční oblast, která se táhne příčně přes vrstvu makroklereid, se nazývá světelná linie či *linea lucida* u mnoho druhů. Její vzhled je odvozený z lokální změny indexů lomu a barvitelnosti, připisovaným modifikacím v ukládání polysacharidů anebo impregnaci této oblasti buněčné stěny (Hamly, 1935; Harris, 1983; Bhalla *et Slattery*, 1984; Bevilacqua *et al.*, 1987). Pevnost světelné linie souvisí s nepropustností osemení (Stevenson, 1937; Harris, 1987). Lumen makroklereid je obvykle nepravidelný a zužuje se směrem k povrchu osemení kvůli nápadnému ztloustnutí buněčné stěny. Subepidermální vrstva buněk se diferencuje na osteosklereidy (viz Obrázek 3). Tato vrstva obsahuje nápadné vzduchem vyplněné mezibuněčné prostory, které jsou výsledkem tvarování buněk během diferenciací osemení a masivní depozice buněčné stěny ve střední části (Harris, 1983; Miller *et al.*, 2010). Osteosklereidy jsou prvními hlavními buněčnými typy během diferenciací osemení, ve kterých byla detekována buněčná smrt, následována parenchymem a makroklereidy (Ranathunge *et al.*, 2010). Uvnitř a kolem pupku se vrstva osteosklereid spojuje s tlustostěnným hvězdicovitým parenchymem.



Obrázek 3- Struktura osemení bobovitých - Příčný řez osemením planého hrachu *Pisum sativum subsp. elatius* a jeho schématický nákres (převzato ze Smýkal *et al.*, 2014)

Nejvnitřnější část osemení se skládá z parenchymatických buněk, které jsou prodlouženy ve směru vně a vedou k hojným vzduchem vyplněným mezibuněčným prostorům. Často je 5-12 vrstev parenchymu s vnitřní vrstvou v přímém kontaktu s endospermem (Hamly, 1932; Hamly, 1935). Cévní systémy osemení jsou vloženy v parenchymatické vrstvě a jejich struktura se liší u různých druhů bobovitých. Během zrání osemení parenchymatické buňky ztrácí protoplast a nejvnitřnější vrstvy mohou být zničeny. Parenchymatické vrstvy obecně nesouvisí s nepropustností vody.

Anatomická struktura osemení je spíše homogenní kromě chalázní oblasti. Pupek je výrazně oválná nebo kulatá oddělovací jizva v chalázní oblasti semene, pozůstatek po spojení semene s mateřskou rostlinou pomocí poutka. Dále je zde další zbylá vrstva palisádových buněk, která pochází z poutka a je součástí pupeční jizvy (Lackey, 1981). Nachází se zde také centrální štěrbiná v pupeční palisádové vrstvě překrývající tracheální část z mikropyle do vaječného svazku na druhé straně.

Mikropyle, vstupní pór pro pylovou láčku, je nenápadný na semenech *Mimosoideae* a *Caesalpinioideae*, ale je rozeznatelný (většinou jiná barva) na semenech bobovitých (Gunn, 1981). U některých druhů je residuum mikropylárního otvoru pokryto voskovým víčkem (Vaughan *et al.*, 1987). U některých druhů může být zřetelný specifický růst rýhy, nazvaná strofiola, na druhé straně pupku (Lersten *et al.*, 1982; Lersten *et al.*, 1992). Tato struktura se považuje za vodní mezeru (Baskin *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2009; Karaki *et al.*, 2012), která může být otevřena vnějšími (např. teplo, mechanická činnost, teplotní variace; Baskin, 2003; Van Assche *et al.*, 2003) nebo vnitřními faktory (Rolston, 1978; Argel *et al.*, 1999). Palisádové buňky v oblasti strofioly jsou upravené, zúžené, delší a více variabilní než zbytek osemení.

Volně uspořádaná buněčná struktura na strofiolové straně pupku, hluboce rýhovaná pupeční trhlina, a úzká tracheální trubice bývají spojovány s vyšší počáteční absorpcí vody v některých druzích běžných fazolí a semen *Psophocarpus* (Deshpande *et* Cheryan, 1986).

3.2.2 Fyziologie osemení

Různé buněčné vrstvy osemení mají 3 hlavní fyziologické funkce: 1) Produkce, transport a stažení metabolitů pro vývoj zygoty, včetně metabolických inter-konverzí, transportu fotosyntetických asimilátů a fotosyntézy, 2) syntézy a depozice obraných sloučenin a 3) zahájení fyzické dormance a mechanické ochrany (Miller *et al.*, 1999; Wang *et* Grusak, 2005).

Osemení bobovitých hraje tedy kritickou roli v laterálním přenosu asimilátů a dalších živin před jejich uvolněním do vyvíjejícího se embrya (Lush *et* Evans, 1980; Offler *et* Patrick, 1984, Offler *et* Patrick, 1993). Osemení zásobuje zygotu vodou, kyslíkem, minerály, určitými fytohormony (ABA, IAA), a také asimiláty uhlíku a dusíku ve formě sacharózy a aminokyselin uvolněných z koncového floému. Dále je osemení luštěnin místem konverzí hlavních aminokyselin uvolněných z floému, asparagin a aspartát (prostřednictvím asparaginázy a aminotrasferázy) pro složení lépe přizpůsobené akumulaci zásobních proteinů před uvolněním do embryonálního vaku (Murray *et* Kennedy, 1980; Lanfermeijer *et al.*, 1992). Podobně je sacharóza částečně hydrolyzována extracelulárními invertázami před vstupem do embryonálního vaku, čímž přispívá mateřské kontrole vývoje semena (Weber *et al.*, 2005). Invertázy buněčných stěn podněcují uvolnění koncentračního gradientu sacharózy do uvolňovacích zón osemení luštěnin. Invertáza je obecně spojována s brzkým vývojem a sacharóza-syntáza se zráním a zásobením (Sturm *et* Tang, 1999; Weber *et al.*, 1995). Vytrvalost invertázy v určitých stádiích může zpozdit diferenciaci (Sturm, 1999). Naopak, diferenciaci může být vyvolána, když aktivita invertázy klesá (Silva *et* Ricardo, 1992). Uvolnění glukózy podněcuje dělení buněk embrya, což určuje výslednou velikost semene (Weber *et al.*, 1997).

Přenos rozpuštěných látek je také usnadněn speciálními transferovými buňkami, které se nacházejí v plášťovém parenchymu nebo epidermis dělohy, tedy na rozhraní mezi osemením a embryem (Thompson *et al.*, 2001). Tvorba vrstvy transferových buněk je brzká událost předcházející zrání. Dojde k ní během stádia přechodu a je důležitá k poskytnutí filiální tkáně nezávislé na mateřské kontrole (Weber *et al.*, 2005). Vývoj transportních buněk je doprovázen zvýšenou expresí genu pro sacharóza-H⁺ transportér. Bylo navrženo, že buněčná diferenciaci a genová exprese jsou indukovány signály z mateřského osemení nebo jsou vyvolány tkáňovým

kontaktem. Auxin, etylén a ROS byly navrženy jako indukční signály pro diferenciaci transferových buněk (Andriunas *et al.*, 2013).

3.2.3 Vliv osemení na propustnost vody

Vstřebávání vody hraje u bobovitých zásadní roli v rámci vaření. U různých rostlinných druhů se objevují různé druhy dormance. U bobovitých se vyskytuje fyzikální dormance, která zahrnuje vývoj vodou nepropustného osemení, způsobeným přítomností fenolických a suberinových impregnačních vrstev palisádových buněk. Mechanismus uvolnění dormance zahrnuje především odezvu semena na změnu teploty v místě výskytu, což způsobí propustnost osemení pro vodu (Smýkal *et al.*, 2014).

Klíčení začíná absorpcí vody klidovým suchým semenem a je dokončeno růstem kořínku skrz tkáň obklopující embryo. Nastává, když může růstový potenciál embrya překonat omezení krycích struktur (Bewley *et al.*, 1994). Neporušené životaschopné semeno se považuje za dormantní, když není schopné klíčení za podmínek prostředí vhodných pro klíčení (Bewley, 1997). Hlavními účinky tkání obklopujících embryo jsou: interference s absorpcí vody, mechanické omezení výrůstku kořínku, interference s výměnou plynů, zejména kyslíkem a oxidem uhličitým, prevence úniku inhibitorů z embrya, zásoba inhibitorů pro embryo a filtrace světla (Kelly *et al.*, 1992; Bewley *et al.*, 1994; Werker, 1997; Werker, 1980/81). Mnohé studie prokazují, že fenolické sloučeniny, zejména flavonoidy, se podílejí na daných účincích inhibujících klíčení. Několik dalších fyzikálně-chemických charakteristik obalů jiných než fenolických, jako specifické strukturální elementy a přítomnost slizu, kutinu nebo kalózy také ovlivňují dormanci určenou osemením (Kelly *et al.*, 1992; Werker, 1997; Werker, 1980/81).

Místo vstupu vody v osemení je stále předmětem diskuze (Meyer *et al.*, 2007; Ranathunge *et al.*, 2010). Bylo navrženo několik vysvětlení pro různou propustnost vody osemením u tvrdých a měkkých semen včetně pevně vázaných palisádových buněk (Corner, 1951; Ballard, 1973), ztloustlých tkání osemení (Wyatt, 1977; Miao *et al.*, 2001), tmavé barvy (Wyatt, 1977), uzavřeného pupku anebo mikropyle (Hyde, 1954; Ballard, 1973; Roslton, 1978; Hu *et al.*, 2009), modifikace vnějších stěn palisádových buněk (Werker *et al.*, 1979), výrazné světelné linie palisádových buněk (Harris, 1984; Harris, 1987), stejně jako praskliny v kutikule osemení (Morrison *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2009). I když je neporušenost kutikuly důležitá pro omezení průchodu vody skrz osemení u nedormantních semen, je to světelná linie, která představuje hlavní bariéru u těch dormantních. Světelná linie se vyvíjí v koncertu s voskovou subkutikulární vrstvou, která podporuje názor, že světelná linie představuje rozhraní mezi

voskovou subkutikulární vrstvou a kompaktní sekundární buněčnou stěnou. Spolu s vlivem faktorů prostředí (zejména teplota a vlhkost) závisí přerušování dormance na složení subkutikulárním vosku a mechanickém poškození osemení, které je spojováno s vlastnostmi buněčné stěny makrosklereid. Zatímco první způsob může být dosažen změnou teploty, druhý způsob je závislý na bobtnání embrya, které generuje dostatečně velkou mechanickou sílu pro navození vytvoření trhlin (Janská *et al.*, 2018).

3.3 Dormance semen

Dormance semen poskytuje rostlinám mechanismus, který umožňuje zpozdit klíčení, dokud nejsou podmínky pro přežití dalších generací optimální. Dormanci lze nalézt u většiny forem rostlinného života a může se vyskytovat v semenech, hlízách, cibulích, pupenech ale i v celé rostlině. Dormance je vlastnost, která byla získána pravděpodobně během evoluce výběrem schopností přežít v nepříznivém prostředí, jako např. teplo, chlad či sucho. Existují také důkazy o tom, že evoluční původ dormance souvisí s klimatickými změnami během historie Země a rozšířením druhů rostlin po celém světě. Dormance výrazně přispěla k vývoji nových druhů a úspěšnému rozšíření již existujících druhů. Jako součást mechanismu přežití nepříznivých podmínek poskytuje dormance určitou strategii semen pro rozšíření klíčení včas, aby se snížilo riziko předčasného úmrtí katastrofou (Baskin *et Baskin*, 1998).

Uvolnění dormance je regulováno kombinací environmentálních a endogenních signálů, které mají synergické i kompetitivní účinky. Molekulární studie dormance ukazují jistou korelaci změn transkriptomu, proteomu a hormonálních hladin se stavy dormance od hluboké primární nebo sekundární dormance po různé stupně uvolnění. Rovnováha hladin a citlivosti kyseliny abscisové (ABA) a giberelinu (GA) je hlavním regulátorem stavu dormance, není však jediným regulátorem. ABA podporuje indukci a udržení dormance, kdežto GA podporuje postup od uvolnění skrz klíčení. Environmentální signály regulují rovnováhu úpravou exprese biosyntetických a katabolických enzymů. Mediátory environmentální a hormonální odezvy zahrnují jak pozitivní, tak i negativní regulátory, z nichž mnohé jsou regulovány zpětnovazebně pro zesílení nebo zeslabení reakce (Finkelstein *et al.*, 2008).

Dormance semen je běžná u planých rostlin, kde může zajistit schopnost druhu přežít přírodní katastrofy, snížit kompetici mezi jedinci stejného druhu, nebo zabránit mimosezónnímu klíčení. Naopak domestikované druhy byly selektovány pro své rychlé a uniformní klíčení pro dosažení dobrého výnosu. Nedostatek dormance však není žádoucí, protože může způsobit předčasné vyklíčení, což je závažný problém u obilovin např. rýže,

pšenice, kukuřice (Bewley *et* Black, 1994). Nedormantní mutanti také mohou mít sníženou životnost semen (Clerkx *et al.*, 2006; Finkelstein *et al.*, 2008).

Dormance semen vyúsťuje v absenci klíčení. Avšak absence klíčení může mít několik příčin: semeno nemusí být životaschopné, prostředí může omezovat klíčení, nebo nějaké faktory v semenu mohou blokovat klíčení. Proto byla často používanou definicí dormance – absence klíčení životaschopného semene za podmínek příznivých pro klíčení (Harper, 1959). Tato definice by však mohla vést k různým interpretacím. První nepřesností je pojem „absence klíčení“. Mnoho druhů totiž vykazuje velmi pomalé klíčení (Da Silva *et al.*, 2004). Navíc čas potřebný pro klíčení se může lišit v závislosti na stupni a hloubce dormance. Základní doba klíčení pro rozlišení mezi dormantními a nedormantními semeny má očividné praktické výhody pro klasifikaci dormance, ale není užitečná ve fyziologických a molekulárních studiích dormance semen a klíčení. Druhou nepřesností je výraz „podmínky příznivé pro klíčení“. Méně dormantní semena klíčí za širší škály podmínek než ty více dormantní (Karssen, 1982).

Semena kultivované čočky jsou schopná vyklíčit krátce po dozrání za předpokladu, že jsou vhodné podmínky teploty a vlhkosti. Za stejných podmínek ale semena plané čočky nevyklíčí, a to dokonce ani po 5 měsících. V době klíčení následující sezóny zůstává dormance účinná. Skarifikace osemení však způsobí rychlé a kompletní vyklíčení. Tento typ dormance je dobře znám u bobovitých a je přisuzován enviromentálním a genetickým faktorům. Dormance semen plané čočky je způsobena kvůli tvrdému osemení. Při křížení kultivovaného druhu *L. culinaris* s jeho planým předkem *L. orientalis*, bylo tvrdé osemení planého druhu kontrolováno jediným recesivním genem v homozygotním stavu. Při křížení planého druhu *L. ervoides* s *L. culinaris*, bylo tvrdé osemení u *L. ervoides* kontrolováno jediným dominantním genem (Ladizinsky, 1985).

V případě teploty, dormantní semena klíčí v užším rozmezí teplot, kdežto nedormantní semena jsou více tolerantní k širšímu rozmezí teplot. Uvolňování dormance je tudíž spojováno s rozšířením rozmezí teplot klíčení a naopak při indukované dormanci se rozmezí teplot klíčení zužuje. Plně dormantní semena nebudou klíčit při žádné teplotě. Jedná se o relativní fenomén, u něhož se bude exprese lišit v závislosti na prostředí. To naznačuje, že pokud jsou semena přemístěna do vhodných teplotních podmínek, jeví se nedormantní a budou klíčit. To však nutně neznamená kompletní absenci v těchto semenech. Pořád se však mohou vyskytovat odlišnosti v rychlosti klíčení, což je citlivý indikátor dormance. Jinými slovy, exprese dormance semen, ale ne dormance jako taková, záleží na prostředí (Bradford *et* Nonogaki, 2007; Simpson, 1990).

Problémem však je, že doposud můžeme měřit dormanci jen *post facto* testováním klíčení, které je výsledkem uvolnění dormance. Ačkoliv je na populační úrovni možné najít přechodné kategorie dormance, je v současnosti technicky nemožné kvantifikovat stupeň dormance u jednotlivých semen ještě před jeho vyklíčením (Bradford *et* Nonogaki, 2007).

3.3.1 Druhy dormance

Pro popis dormance byla navržena řada klasifikačních schémat. Většina používaných klasifikací je odvozena (Baskin *et al.*, 1998, 2004) od klasifikace navržené Nikolaevou (1977) na základě morfologie semen. Další klasifikace je založena na načasování výskytu dormance. **Primární dormance** značí typ dormance, který nastává před rozšířením semen jako součást jejich vývojového programu. **Sekundární dormance** naopak nastává u zralých semen po imbibici jako důsledek nedostatku vhodných podmínek pro klíčení (Amen, 1968). Dormance se může nacházet v samotném embryu nebo v tkáních obklopujících embryo. U řady druhů je dormance indukovaná embryem a zároveň i obklopujícími tkáněmi. V případě embryonální dormance mají vlastnosti embrya zásadní význam. V dormanci určené tkáněmi mají význam krycí tkáň, včetně mechanických, chemických a permeabilních vlastností, které mohou zasahovat do úspěšného zakončení klíčení. Např. mnoho semen má osemení, které mechanicky omezuje růst embryí a které může obsahovat chemické inhibitory, jako fenolické sloučeniny, které brání růstu embrya (**mechanická a chemická dormance**). Tkáň endospermu může omezit růst embrya, dokud jsou buněčné stěny endospermu degradovány hydrolytickými enzymy, které mohou být indukovány faktory (např. rostlinnými hormony) odvozenými z embrya (**fyzická a mechanická dormance**) (Baskin *et* Baskin, 1998).

Všechny typy dormance způsobují zpoždění mezi svlékáním semene a klíčením, ale příčiny se mohou lišit. Zatímco primární dormance je získána během dozrávání semen, nabobtnalá dozralá semena vystavená nepříznivým teplotním podmínkám nebo nedostatku světla mohou vstoupit do stavu sekundární dormance. Mimoto mohou semena podstoupit sezónní cyklus dormance. Přičemž pokud nejsou podmínky optimální, postupně nastávají a ztrácí stav dormance, dokud nevyklíčí nebo neuhynou. Ačkoli fyziologicky plně dormantní semena nemohou vyklíčit bez ohledu na podmínky prostředí, semena s přechodnou dormancí klíčí pomalu nebo za nižšího rozmezí světla nebo teplotních podmínek (Baskin *et* Baskin, 1998; Baskin *et* Baskin, 2004).

Primární dormance odkazuje na vrozenou dormanci u semen, která jsou oddělena od mateřské rostliny. Primární dormance je obvykle spojena s přechodným zvýšením obsahu ABA během vývoje semen. U většiny studovaných druhů se hladiny ABA zvyšují během první

poloviny vývoje semene a klesají během pozdní maturace souběžně s poklesem vody v semenech. ABA byla detekována ve všech zkoumaných tkáních semen a souvisí s řadou procesů vývoje včetně syntézy zásobních proteinů, potlačení předčasného klíčení a indukce tolerance k vysušení (McCarty, 1995; Holdsworth *et al.*, 1999; Finkelstein *et al.*, 2002).

Sekundární dormance odkazuje na dormantní stav, který je indukovaný u nedormantních semen nepříznivými podmínkami klíčení nebo opětovně indukovaný u jednou dormantních semen po zmírnění primární dormance. Přerušování primární dormance následované dalším vstupem do sekundární dormance může vést k cyklům dormance. Termín sekundární dormance se používá pro typ dormance, která se objevuje poté, co semena ztratí primární dormanci. Sekundární dormance může být výsledkem prodloužené inhibice klíčení (Hilhorst, 1998). Inhibice může být způsobena aktivními faktory (např. endogenní ABA nebo sekundární metabolity) nebo pasivními (např. nedostatek vhodných podmínek pro klíčení).

Systém navržený Nikolaevou se rozděluje do 5 tříd dormance: fyziologická, morfologická, morfofyziologická, fyzická a kombinovaná (Baskin *et Baskin*, 2004).

Fyziologická dormance (PD) je nejčastější třídou dormance, která se objevuje u nahosemenných (*Coniferales*, *Gnetales*) a u všech hlavních kladů krytosemenných. Mechanismy dormance semen zahrnují rostlinné růstové regulátory ABA a GA. V modelu hormonální rovnováhy ABA (inhibitor) a GA (promotor) současně a antagonisticky regulují nástup, udržování a ukončení dormance (Amen, 1968; Wareing *et Saunders*, 1971). Tento model byl však opraven na studiích o *Arabidopsis thaliana* (Karssen *et Lacka*, 1986; Karssen *et Groot*, 1987; Hilhorst *et Karssen*, 1992; Karssen, 1995). V tomto modelu tedy ABA (produkovaná embryem) indukuje dormanci během vývoje semen a GA podporuje klíčení nedormantních semen. Množství GA potřebné pro klíčení zralých semen je kontrolováno koncentracemi ABA během vývoje semen. Semena s nízkou hladinou ABA produkovanou během vývoje („lehce dormantní“) tedy vyžadují nízkou hladinu GA k vyklíčení, zatímco semena s vyšší hladinou ABA produkovanou během vývoje („vysoce dormantní“) vyžadují vyšší hladinu GA k vyklíčení. Podle tohoto modelu spolu GA a ABA neinteragují přímo. Kromě ABA a GA se na regulaci dormance a klíčení semen podílí také třetí rostlinný hormon etylén. Etylén přerušuje dormanci anebo podporuje klíčení u semen mnoha druhů (Kępczyński *et Kępczyńska*, 1997; Matilla, 2000) tím, že zvýší citlivost semen k endogenní ABA. Etylén tedy může podporovat klíčení interferencí s účinky ABA (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000).

U semen s **morfologickou dormancí (MD)** je embryo malé (nedostatečně vyvinuté) a diferencované, tj. děložní lístek a hypokotyl lze rozlišit (Baskin *et* Baskin, 1998). Embrya v semenech s morfologickou dormancí nejsou fyziologicky dormantní a nevyžadují předčasnou úpravu přerušující dormanci, aby vyklíčila. Jednoduše potřebují čas narůst do plné velikosti a poté vyklíčí. Za vhodných podmínek embryo v čerstvě zralých semenech začnou růst (prodlužovat se) během několika dní až 2 týdnů a semena klíčí přibližně za 30 dní.

U **morfofyziologické dormance (MPD)** mají semena nedostatečně vyvinuté embryo s fyziologickou složkou dormance. Aby mohli vyklíčit, vyžadují předčasnou úpravu přerušující dormanci. U semen s touto formou dormance růst embrya či vznik kořene vyžaduje podstatně delší dobu než u semen s morfologickou dormancí (Baskin *et* Baskin, 2004).

Fyzická dormance (PY) je způsobena jednou nebo více vodou nepropustnými vrstvami palisádových buněk v osemeni (Baskin *et al.*, 2000). Typicky se dormance u semen s PY přerušuje za přirozených i umělých (kromě mechanické skarifikace) podmínek a předpokládá se vytvoření otvoru („vodní mezery“) ve specializované anatomické struktuře v osemeni, kterou voda přechází do embrya (Baskin *et al.*, 2000). V roce 1998 však byly předloženy důkazy (Morrison *et al.*, 1998), že u některých taxonů *Fabaceae* se dormance může přerušit zahřátím, což naruší osemení v jiné oblasti (popř. oblastech) než ve strofirole. Mechanická nebo chemická skarifikace bude podněcovat klíčení také u semen s fyziologickou dormancí. Fyzická dormance se vyskytuje u několika čeledí, např. *Fabaceae*, *Cannaceae*, *Malvaceae*. U všech čeledí je specializovaná struktura spojována s vodou nepropustnou vrstvou (popř. vrstvami). Přerušování fyzické dormance zahrnuje narušení nebo dislokaci těchto struktur, které fungují jako detektory signálu prostředí pro klíčení (Baskin *et* Baskin, 2000).

U semen s PY způsobuje zabránění absorpce vody to, že semeno zůstane dormantní, dokud některé faktory neučiní krycí vrstvu (popř. vrstvy) vodou propustnou. V přírodě mezi tyto faktory patří vysoké teploty, kolísavé teploty, žár, sušení, mrznutí a tání, a průchod trávícím traktem zvířat (Baskin *et* Baskin, 1998). Jakmile se semeno stane propustným pro vodu, může klíčit v širokém rozmezí teplot na světle i ve tmě (Baskin *et* Baskin, 1998). To však neplatí pro semena několika druhů, u kterých se projevuje i nějaký stupeň fyziologické dormance. Jakmile se jednou stane osemení u semen s fyzikální dormancí propustné, nemůže se již vrátit do nepropustného stavu (Hamley, 1932) na rozdíl od semen jen s fyziologickou dormancí, které mohou znovu podstoupit dormanci, tedy sekundární dormanci, poté co je primární dormance přerušena (Baskin *et* Baskin, 1998). Načasování přerušování dormance v přírodě se tedy jeví více kritickou událostí v průběhu života u rostlin s fyzikální dormancí, než u těch s fyziologickou

dormancí. Pro zajištění přežití druhu semen s PY musí být mechanismus přerušení PY zdokonalen v závislosti na prostředí tak, aby došlo k vyklíčení jen a pouze tehdy, pokud je šance pro založení a eventuální reprodukci rostliny maximalizovaná.

Fyzické uspořádání a chemická vrstva/impregnace buňky v palisádové vrstvě (popř. vrstvách) jsou nepochybně důležité pro určení, zda je průchod vody do semene blokován. Tzv. „tvrdosemenost“ a nepropustnost suchých osemení je způsobena kontrakcí stěn palisádové vrstvy, jak semeno dozrává (Corner, 1951). Aby mohly být palisádové buněčné stěny vodou nepropustné, musí být obaleny nebo impregnovány jednou nebo více voděodolnými látkami (Werker, 1980/81), což mohou být vosky ve spojení s matrixem suberinu a kutinu (Egley, 1989). Také se uvádí, že silně lignifikované buněčné stěny mohou učinit palisádovou vrstvu vodou nepropustnou (Egley, 1989). Odolnost pohybu vody do semen bobovitých je primárně způsobena vodou nepropustnými látkami na vnějších koncích palisádových buněk (Van Staden *et al.*, 1989).

U semen s **kombinovanou dormancí (PY + PD)** je osemení nepropustné pro vodu a navíc je embryo fyziologicky dormantní. Embrya čerstvě zralých semen např. *Trifolium (Fabaceae)* mají podmíněnou dormanci a vyjdou z dormance na suchém místě nebo na poli během pár týdnů po dozrání, i když osemení zůstane nepropustné pro vodu. Embrya u rodů jako *Cercis (Fabaceae)* jsou více dormantní a vyžadují tedy pár týdnů studené stratifikace, tj. poté co je fyzikální dormance přerušena a semena nasáknou vodu ještě, než vyklíčí (Baskin *et Baskin*, 1998).

3.4 Biologické a genetické aspekty dormance semen bobovitých

Tvrdosemennost u kulturní sóji (*Glycine max* (L.) Merr.) je typicky spojována s různými funkcemi (Moore, 2000). Podílí se například na životaschopnosti semen u zpožděné sklizně (Hartwig *et Potts*, 1987), životnosti semen ve vlhkém prostředí (Potts *et al.*, 1978; Heatherly *et al.*, 1995) a inhibici proti rychlému nabobtnání, což může často vést ke zhoršení klíčení (Raymond *et al.*, 1981; Hou *et Thseng*, 1991). Morfologická analýza sóji odhalila, že tvrdosemennost může být připisována nedostatku nebo úplné absenci drobných prasklin (Ma *et al.*, 2004) a přítomností nápadné světelné linie v subkutikulární vrstvě (Harris, 1987). U osemení propustných kulturních forem byly nalezeny drobné praskliny na dorzální straně (Ma *et al.*, 2004), kudy voda nejprve vstupuje do semene (Meyer *et al.*, 2007; Koizumi *et al.*, 2008), zatímco kutikula nepropustného osemení je mechanicky silná a za normálních podmínek nepraskne (Ma *et al.*, 2004). Předpokládá se tedy, že kutikula palisádové vrstvy je klíčovým faktorem propustnosti osemení. Dále bylo navrženo, že složení sacharidů, hydroxylovaných

mastných kyselin nebo fenolických sloučenin v osemení ovládá hladinu propustnosti (Mullin *et Xu*, 2000; Mullin *et Xu*, 2001; Shao *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2010).

Mullin a Xu (2001) zjistili, že osemení linie sóji (*Glycine max*, OX951) má vysokou koncentraci hemicelulózy, v podstatě složené z xylanů, které redukuje hydrofobicitu osemení a zvyšují zastoupení tvrdých semen (Mullin *et Xu*, 2001). Na druhou stranu Shao *et al.*, (2007) zjistili, že kutikula nepropustné linie obsahuje vyšší množství hydroxylovaných mastných kyselin než u nedormantních kulturních forem. To naznačuje, že přítomnost vyššího poměru hydroxylovaných mastných kyselin může poskytnout větší vzájemné propojení mezi monomery v kutinu tvrdých semen (Shao *et al.*, 2007). Saio (1976) také uvádí, že osemení nepropustných semen obsahují velké množství vápníku v porovnání s propustnými semeny. Všechny tyto faktory mohou ovlivnit strukturu osemení, ale stále je potřeba zjistit, které faktory jsou spojeny s genetickými změnami pozorovanými v propustnosti osemení (Saio, 1976).

Hradilová *et al.* (2017) porovnali dormantní linie hrachu (*Pisum elatius*) JI64, VIR320 a kulturní nedormantní linie hrachu (*Pisum sativum*) JI92, Cameor a příslušné rekombinantní inbrední linie, a provedli komparativní anatomickou, metabolickou a transkriptomickou analýzu. Byly nalezeny značné rozdíly v povrchu osemení, velikosti makroklereid a tloušťce osemení. Odhalili výrazně vyšší obsah proantokyanidinů (dimer a trimer gallokatechinu), kvercetin a hydroxylovaných mastných kyselin v dormantních formách v porovnání s nedormantními genotypy. Dormantní genotypy mají tlustší palisádovou vrstvu makroklereid, která může přispívat k nepropustnosti osemení (Miao *et al.*, 2001). Naznačují také různou tloušťku palisádové vrstvy mezi dormantními genotypy, přičemž nejvíce dormantní JI64 měl palisádovou vrstvu nejtlustší. Barvení toluidinovou modří odhalilo, že nedormantní nepigmentovaný Cameor vykazuje vyšší hladinu polyanionických pektinů s volně odhalenou karboxylovou skupinou. Na druhou stranu, nedormantní ale pigmentovaný JI92 vykázal nižší množství aniontů souvisejících s pektiny, podobně jako pigmentované dormantní genotypy (Hradilová *et al.*, 2017).

Genetická kontrola tvrdosemennosti u sóji byla studována křížením mezi kulturní a poloplanou nebo planou sójou (Liu *et al.*, 2007; Keim *et al.*, 1990; Sakamoto *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008; Kuroda *et al.*, 2013). Tyto studie naznačují účast několika genů anebo QTL s různým genovým působením. Analýzy QTL odhalily genomické pozice, na kterých jsou lokalizovány geny pro nepropustnost. *qHS1* má QTL lokalizováno ve vazebné skupině D1b na chromozomu 2. Tento QTL má také největší vliv na nepropustnost (Liu *et al.*, 2007; Keim *et al.*, 1990; Sakamoto *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004; Kuroda *et al.*,

2013). Pro studium *qHS1* vyvinuli Jang *et al.* (2015) izogenní linie (NIL) propustné (měkkosemenné) kulturní formy (Tachinagaha), která obsahuje alelu pro tvrdosemennost z plané sóji (*Glycine soja*), přenesenou postupným zpětným křížením. Alela tvrdosemennosti učinila osemení Tachinagaha formy tužší zvýšeným množstvím β -1,4-glukanů ve vnější vrstvě palisádových buněk osemení na dorzální straně semene, což je místo vstupu vody. Přesné mapování, následná exprese a sekvenční analýzy odhalily, že *qHS1* kóduje endo-1,4- β -glukanázu. Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) odhalil substituci aminokyseliny v substrát-vazebném místě enzymu, kde nejspíše redukuje nebo eliminuje jeho afinitu k substrátu u propustných kultivarů. Zavedení genomické oblasti *qHS1* z nepropustné linie do propustné kulturní formy Kariyutaka vedlo k akumulaci β -1,4-glukanu ve vnější vrstvě palisádových buněk a vytvoření tvrdých semen. Alela nalezená v NIL byla dále spojována s výskytem tvrdých semen u sójové kulturní formy různého původu. Tato studie naznačuje, že *qHS1* je tedy zapojen v akumulaci derivátů β -1,4-glukanu, jako např. xyloglukan anebo β -(1,3)(1,4)-glukan, který zpevňuje nepropustnost osemení u sóji (Jang *et al.*, 2015).

Sun *et al.* (2015) ukazují, že nepropustnost osemení u plané sóji je řízena jedním genem, *GmHs1-1*, který kóduje transmembránový protein metalofosfoesterázy podobné kalcineurinu. *GmHs1-1* je primárně exprimován v palisádové vrstvě osemení a je spojován s obsahem vápníku. Tvrdosemennost je spojována s obsahem vápníku u osemení a může tedy potenciálně zlepšit nutriční hodnotu sójových potravin. Přejít z nepropustnosti k propustnosti u domestikované sóji byl způsoben umělou selekcí bodové mutace v *GmHs1-1*. Je zajímavé, že řada krajových odrůd sóji obešla selekci pro propustnost kvůli alternativní selekci pro trhliny osemení, které také umožňují vstřebávání semen. Přes jediný původ mutantní alely *GmHs1-1*, distribuční vzor alelické varianty v kontextu struktury populace sóji a detekovaný vzor genomické introgrese mezi planou a kulturní sójou naznačují, že *GmHs1-1* mohli zažít re-selekci propustnosti osemení.

Chai *et al.* (2016) identifikovali mutanty s nedormantními semeny skříninkem velkého počtu *Tnt1* retrotranspozónových linií *Medicago trunculata*. Na rozdíl od planého typu tvrdých semen, které vykazují fyzikální dormanci, zralá mutantní semena bobtnají rychle a klíčí snadno bez nutnosti skarifikace. Mikroskopické pozorování příčných řezů ukázalo, že fenotyp mutantů byl způsoben nefunkční palisádovou vrstvou kutikuly v osemení. Pomocí chemické analýzy byly nalezeny rozdíly ve složení monomeru lipidů mezi planým a mutantním osemení. Genetické a molekulární analýzy odhalily, že *KNOX4*, gen třídy II *KNOTTED-like homeobox* (*KNOXII*), byl zodpovědný za ztrátu fyzikální dormance u semen mutantů. Analýzy mikro-

array a chromatinové imunoprecipitace indentifikovali *CYP86A*, což je gen spojovaný s biosyntézou kutinu, jako jeden z *downstream* cílových genů *KNOX4*.

Soltani *et al.* (2021) sledovali pohyby vody uvnitř osemení RIL populace fazole (*Phaseolus vulgaris* L.) a pomocí SEM identifikovali několik trhlin na povrchu čočky nedormantních genotypů fazole. Jejich analýza odhalila, že příjem vody semenem je spojen s jediným majorním QTL na Pv03. QTL oblast byla mapována na 118 kb intervalu, který obsahuje 11 genů. Analýza kódující sekvence kandidátních genů odhalila 5-bp inzerci u ortologu pektin-acetylerázy 8, která způsobuje ztrátovou mutaci u nedormantního genotypu. Analýza genové exprese kandidátních genů osemení kontrastních genotypů naznačuje 21x nižší expresi pektin-acetylerázy 8 u nedormantních genotypů. Analýza mutantního polymorfismu byla provedena mezi planou a domestikovanou fazolí. Ačkoliv všechny plané fazole obsahovaly funkční alelu pektin-acetylerázy 8, většina domestikované fazole obsahovala nefunkční alelu, což naznačuje, že tato varianta byla pod silným selekčním tlakem během domestikace, což poskytuje důkazy o vlivu pektin-acetylerázy 8 v dormanci semen.

3.4.1 Analýza genové exprese během vývoje osemení bobovitých

Primární barva osemení u většiny tříd čočky je určena dvěma nezávislými geny: *Ggc* (*gray ground colour*, šedá barva) a *Tgc* (*tan ground colour*, béžová barva; Vandenberg *et Slinkard*, 1990). Dominantní a recesivní alelické kombinace těchto dvou genů způsobují různé barvy osemení: hnědou (*Ggc Tgc*), šedou (*Ggc, tgc*), béžovou (*Ggc Tgc*) nebo zelenou (*Ggc Tgc*), čímž stanovují určité třídy. Třída čočky s nulovým taninem je určena expresí jediného recesivního genu *tan* (Vaillancourt *et al.*, 1986; Muehlbauer *et Sarker*, 2011). Homozygotní recesivní *tan* je epistatický k *Tgc*, ale ne ke *Ggc* (Vandenberg *et Slinkard*, 1990). U genotypů *tan*, exprese dominantního *Ggc* produkuje šedé průsvitné osemení, zatímco recesivní *ggc* vede k průhlednému osemení. Barva osemení u genotypů *tan* se nemění během skladování (Matus *et al.*, 1993) ani vaření. Výsledkem tenčího osemení je rychlejší uvaření, snadnější loupání a také kulatější tvar semene. Semena s nulovým taninem také nasávají vodu rychleji, což může vést k poškození během klíčení (Matus *et al.*, 1993; Smýkal *et al.*, 2014).

Gen (*tan*) vede k fenotypu charakterizovanému zelenými stonky, bílými květy a tenkým, průhledným nebo průsvitným osemením. Geny, jejichž výsledkem jsou vlastnosti nulového taninu, jsou užitečné pro studie pigmentace osemení a biochemické vlastnosti vzhledem k tomu, že mají změněnou pigmentaci. Mirali *et al.* (2016) porovnali fenolické sloučeniny mezi fenotypy a genotypy normálními a s nulovým taninem. Profilování fenolických sloučenin

odhalilo, že myricetin, dihydromyricetin, flavan-3-oly a proantokyanidy se nacházely pouze u normálních fenotypů. Molekulární analýza ukázala, že gen *tan* kóduje bHLH transkripční faktor, homolog genu A u hrachu. Výsledky této studie také naznačují, že *tan* jako bHLH transkripční faktor interaguje s regulačními geny v biochemické dráze fenolických sloučenin, které začínají od flavonoid-3',5'-hydroxylázy a dihydroflavonol-reduktázy.

Gen *tan* také ovlivňuje pigmentaci stonků a květů. Nemutantní rostliny čočky mají načervenalé stonky, fialové žilky na květních tkáních a tlustší pigmentované osemení (Vaillancourt *et al.*, 1986). Fenotyp *tan* je typický zelenými stonky a bílými květy. Tato sada vlastností je podobná jako Mendelův gen A u hrachu (*Pisum sativum*, Mendel, 1865), který kóduje bHLH transkripční faktor, jenž má regulační funkci s pleiotrofními efekty (Hellens *et al.*, 2015). Absence pigmentace u hrachu je výsledkem mutace v bHLH nesprávně sestřiženou mRNA, způsobenou předčasným stop kodónem (Hellens *et al.*, 2015). Značné podobnosti mezi těmito dvěma sadami fenotypů naznačují, že homolog genu A u hrachu by mohl být gen *tan* u čočky.

4 Materiál a metodika

4.1 Biologický materiál

Byly použity rodičovské genotypy kulturní čočky (*Lens culinaris*, 3339) pocházející z CDC University of Saskatchewan, Kanada a plané čočky (*Lens orientalis*, IG72643) z genobanky ICARDA. Ke genomické analýze bylo použito 121 rekombinantních inbredních linií (RIL) generace F9 s označením LR-68, pocházejících z křížení rodičů 3339 a IG72643.

Rostliny byly vypěstovány ze semen v 5-ti litrových květináčích ve skleníku Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období leden-červenec 2020. Byl použit substrát Proficom Ltd., Česká republika. Semena byla sklizena v období června-července, uložena při pokojové teplotě v papírových sáčcích a použita na testy bobtnání (září). Listy rostlin byly použity pro izolaci genomické DNA i pro RNA. Byla sledována pigmentace květů. Květy byly v okamžiku rozkvetení označeny visačkou. Byla sledována vizuálně také pigmentace osemení.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Destilovaná voda, agaróza (SERVA, Německo, kat. číslo: 9012-36-6), marker molekulové hmotnosti (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, Biogen, USA, kat. číslo 10488058), 10x TBE (Sigma Aldrich, Česká republika; na 1 litr 2,75 g kyseliny borité, 5,4 g TRIS báze, 2 ml 0,5 mol/l EDTA o pH 8,0), MyTaq™ RED polymeráza (Bioline, kat. číslo 37112), 5x koncentrovaný pufr MyTaq™ Reaction Buffer (Bioline, UK, kat. číslo: 37112), primery (viz Tabulka 1, Generi Biotech), Exonuclease I (Thermo Scientific, USA, kat. číslo: EN0581), Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific, USA, kat. číslo EF0651), 10x Fast Alkaline Phosphatase pufr (Thermo Scientific, USA, kat. číslo: EF0651), restriční enzymy: *RsaI* (Thermo Scientific, kat. číslo: 00175087), *AluI* (Thermo Scientific, kat. číslo: 00146372), *MboII* (Thermo Scientific, kat. číslo: 00095419), odpovídající pufr pro restriční enzymy 10x: Tango pufr (Buffer Tango, Thermo Scientific, kat. číslo: 00192401), Blue pufr (Buffer B, Fermentas, kat. číslo: 00075213), DNáza (Baseline-ZERO™ DNase, EpicentreBio, kat. číslo: DB0711K), RNase inhibitor (Ribonuclease Inhibitor, kat. číslo: N2511), etanol (VWR Chemicals, kat. číslo: 64-17-5), ledová kyselina octová (Tamba, kat. číslo: 190510), chloroform (Lach-Ner, kat. číslo 67-66-3), 2-propanol (VWR Chemicals, kat. číslo: 67-63-0), isoamylalkohol (CarlRoth, kat. číslo: 123-51-3), želatina (Merck KqaA, Německo, kat. číslo: 9000-70-8), sacharóza (Lach:Ner s.r.o., Česká republika, kat. číslo: 40135-APO), kryogel (Cryo-gel, Leica), reverzní transkriptáza (Reverse Transcriptase, Meridian

Bioscience, kat. číslo: SRT-020211A), 5x TransAmp Buffer (Meridian Bioscience, kat. číslo: TAB-020311A), toluidinová modř (LACHEMA n. p., Brno), primery (viz Tabulka 6, Generi Biotech)

4.3 Použité přístroje

Flowbox (PV – 102, TelSTAR), homogonizátor (FastPrep-24, MP Biomedicals), NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), vortex (MS2 Minishaker, IKA), centrifuga (Centrifuge 5415 R, Eppendorf), centrifuga (Centrifuge 5404 R, Eppendorf), minicentrifuga (Spectrafuge Mini, Labnet), termoblok (Termo Block MB – 102, BIOER.), předvážky (572, Kern), themocycler (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research), thermocycler (Master cycler Pro, Eppendorf), elektroforetická vana (Widi Mini Sub, Bio-Rad), forma na gel (Owl A6, Thermo Scientific), zdroj stejnosměrného napětí (Electrophoresis Power Supply EPS-601, Amersham Pharmacia), UV transiluminátor (FireReader Platinum HD7, Uvitec Cambridge), kryomikrotom (Kryostat, Leica CM1950), mikroskop Olympus BX60 s kamerou Olympus DP72, fotoaparát (Olympus CX31, Olympus), vývěva membránová (KNF Lab)

4.4 Použitý software

Geneious (<https://www.geneious.com/>): V tomto programu byly analyzovány a upravovány sekvence.

FastPCR (PrimerDigital, Helsinki, Finland, <https://primerdigital.com/...l>): V tomto programu byly navrženy primery použité pro PCR analýzu.

MapDisto (Washington state University, Pullman, USA, <http://mapdisto.free.fr>): V tomto programu byla zkonstruována genetická mapa.

Zeiss ZEN lite (<https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-software/zen-lite.html>): V tomto programu byly vyfoceny a upraveny fotografie a bylo provedeno měření tloušťky osemení..

Helicon Focus 7 (<https://www.heliconsoft.com/heliconsoft-products/helicon-focus/>): V tomto programu byly poskládány fotografie pro ostřejší obraz.

ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>): V tomto programu bylo přidáno měřítko k fotografiím.

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.5.1 Izolace genomové DNA

Genomová DNA byla vyzolována z mladých listů o hmotnosti přibližně 100 mg. Byl použit Macherey-Nagel NucleoSpin 96 Plant II Kit. Vzorky byly následně uchovávány při teplotě -20 °C.

Protokol podle výrobce:

1. Do jednotlivých zkumavek bylo vloženo 100 mg rostlinného materiálu a byla označena jejich pozice. Do jednotlivých zkumavek byla přidána kovová kulička. Zkumavky byly následně uzavřeny víčkem. Vzorky byly zmrazeny v tekutém dusíku. Buňky byly narušeny třepáním pomocí homogenizátoru. Poté byly zkumavky centrifugovány 2 min při 5600 g. Byla odstraněna víčka ze zkumavek.
2. Bylo přidáno 500 µl Buffer PL1 a 10 µl RNase A do každého vzorku. Zkumavky byly zavřeny novými víčky. Vzorky byly protřepány 15-30 s a byly stočeny 30 s při 1500 g. Vzorky byly inkubovány 30 min při 65 °C a centrifugovány 20 min při 6000 g. Byla opět odstraněna víčka.
3. Bylo přidáno 400 µl Buffer PL2 a 10 µl RNase A do každého vzorku. Zkumavky byly opět zavřeny novými víčky. Vzorky byly protřepány 15-30 s a stočeny 30 s při 1500 g. Vzorky byly inkubovány 30 min při 65 °C. Byla odstraněna víčka ze zkumavek a bylo přidáno 100 µl Buffer PL3. Zkumavky byly uzavřeny a promíchány. Vzorky byly inkubovány 5 min na ledu.
4. Vzorky byly centrifugovány 20 min při 6000 g. Byla odstraněna víčka. Bylo přidáno 450 µl Binding Buffer PC do každé zkumavky. Bylo přidáno 400 µl čistého lyzátu do každého vzorku, které byly následně promíchány pipetováním alespoň 3x.
5. Lyzát byl opatrně přesunut na destičku NucleoSpin Plant II Binding Plate, která se umístila na blok MN Square-well Block.
6. Destička NucleoSpin Plant II Binding Plate byla centrifugována 5 min při 6000 g.

7. Bylo přidáno 400 μ l PW1 do každé jamky destičky. Destička byla přikryta fólií a poté byla centrifugována 2 min při 6000 g. Poté byla destička přenesena na nový blok MN Square-well Block.
8. Bylo přidáno 700 μ l PW2 do každé jamky destičky, která byla překryta fólií a centrifugována 2 min při 6000 g.
9. Bylo opět přidáno 700 μ l PW2 do každé jamky destičky, která byla překryta fólií. Následně byla destička centrifugována 10 min při 6000 g. Destička NucleoSpin Plant II Binding Plate byla přenesena na nový blok MN Square-well Block.
10. Destička byla přenesena na nosiče stripů. Do každé jamky destičky bylo přidáno 100 μ l předeřátého Buffer PE. Destička byla centrifugována 2 min při 6000 g. Destička NucleoSpin Plant II Binding Plate byla odstraněna z nosičů stripů. Pro vyšší výtěžek byl tento krok zopakován.

4.5.2 Spektrofotometrická analýza DNA

1. Nejprve byly napipetovány 2 μ l destilované vody jako blank na snímač spektrofotometru NanoDrop 2000.
2. Poté byl snímač očištěn buničitou vatou.
3. Na snímač byly napipetovány 2 μ l jednotlivých vzorků DNA. Po každém měření byl snímač očištěn.
4. Byla změřena hodnota absorbancí vzorků DNA při vlnových délkách 260 nm a 280 nm, poměr absorbancí 260/280 nm pro čistotu DNA a koncentrace v ng/ μ l.

4.5.3 PCR analýza

Amplifikace vybraných genů (markerů) z rodičovských genotypů

1. Byly vybrány kandidátní geny pro amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí (PCR): *Lc30146*, *Lc31299*, *Lc31310*, *Lc32190*. Pro PCR amplifikaci byly navrženy primery pomocí programu FastPCR (Primer Digital, Helsinky, Finsko) a nasyntetizovány v Generi Biotech (Hradec Králové, ČR). Seznam použitých primerů viz Tabulka 1.

Tabulka 1- Seznam použitých primerů

Kandidátní geny	Primer - název	Sekvence primeru (5'-3')	Délka produktu (bp)
<i>Lc30146</i>	Lc30146_F1	5'-AGTTACCAAACAATGACAAATTTG-3'	734
	Lc30146_R712	5'-TTTAAATGAGCCCCCACTAGAGAT-3'	
<i>Lc31299</i>	Lc31299_F275	5'-TCTCCCTCGGAATATCCGAACAA-3'	1099
	Lc31299_R1350	5'-CATCAGGAGATTAGGCTCACAGAA-3'	
<i>Lc31310</i>	Lc31310_F497	5'-GGGGTTACTGTGCCAATCACTT-3'	1046
	Lc31310_R1520	5'-CTCCAGCTGAACATCCAGATAGAA-3'	
<i>Lc32190</i>	Lc32190_F139	5'-TCAGCAATGGAACCTGAAGTTCA-3'	1080
	Lc32190_R1197	5'-GGCTCAGAATCATAACCTGTGGA-3'	

2. Vzorky DNA byly naředěny s vodou tak, aby měly koncentraci přibližně 20 ng/μl.
3. Do mikrozumavky bylo napipetováno množství reakční směsi adekvátní počtu vzorků. Pro množství jednotlivých reakčních složek pro jeden vzorek viz Tabulka 2.

Tabulka 2- Příprava reakční PCR směsi

PCR reakční složka	Objem složky pro jeden vzorek (μl)
Voda	13
5x pufr Taq RED	4
Směs primerů F a R (5 pmol/μl)	1
Taq polymeráza (MyTaqRed)	0,1
Vzorek DNA	2
Celkem	20,1

4. Mikrozumavka s reakční směsí byla protřepána na vortexu.

5. Do řádně popsaných mikrozkuškových stripů nebo do 96 jamkové desky byla napipetována připravená reakční směs po 18 μ l, ke kterým byly připipetovány 2 μ l vzorku DNA.
6. Mikrozkuškové stripy nebo 96 jamková deska byly krátce stočeny na minicentrifuze.
7. Mikrozkuškové stripy nebo deska poté byly vloženy do přístroje Thermocycler, kde probíhala PCR reakce. Byl použit PCR program se jménem CAPS55, jehož teplotní průběh lze vidět v Tabulce 3.

Tabulka 3- Časový a teplotní průběh PCR reakce programu CAPS_55

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Preinkubace	95	5 min	1x
Denaturace	99	30 s	35x
Annealing	57	20 s	35x
Elongace	72	150 s	35x
Koncová extenze	72	10 min	1x

4.5.4 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byly odebrány vzorky rodičovských genotypů – 72643 a 3339. RNA byla izolována z listů, osemení a embryí (24. den).

1. Zhruba 100 mg jednotlivých vzorků (listy, embryo, osemení) bylo rozdroveno s tekutým dusíkem ve zmrazené třecí misce tloučkem na hladký prášek.
2. Do popsaných zkumavek bylo přidáno 500 μ l studeného PureLink Plant RNA Reagent ke 100 mg jednotlivých vzorků. Zkumavky byly vortexovány.
3. Vzorky byly inkubovány 5 min při pokojové teplotě.
4. Vzorky byly centrifugovány 2 min při 13 000 rpm při pokojové teplotě. Supernatant byl přesunut do čisté zkumavky.
5. Bylo přidáno 100 μ l 5M NaCl. Vzorky byly promíchány.
6. Bylo přidáno 300 μ l chloroformu a vzorky byly vortexovány.

7. Vzorky byly centrifugovány 10 min při 13 000 rpm při 4 °C. Horní vodná fáze byla přenesena do nové zkumavky.
8. K vodné fázi bylo přidáno ekvivalentní množství isopropylalkoholu. Vzorky byly promíchány a nechaly se inkubovat 10 min při pokojové teplotě.
9. Vzorky byly centrifugovány 10 min při 13 000 rpm při 4 °C.
10. Supernatant byl opatrně vylit a ke zbylému peletu byl přidán 1 ml 75% ethanolu.
11. Vzorky byly centrifugovány 1 min při 13 000 rpm při pokojové teplotě. Supernatant byl opatrně vylit. Vzorky byly opět centrifugovány 1 min při 13 000 rpm při pokojové teplotě a zbytková kapalina byla následně odstraněna pipetou.
12. RNA pelet byl poté rozpuštěn ve 40 µl RNase free H₂O a byl promíchán pipetou.
13. Množství a čistota RNA byla zkontrolována pomocí spektrometru Nanodrop 2000. Poté byla RNA skladována při -70 °C.

4.5.5 Přechištění RNA

Po izolaci RNA je potřeba odstranit zbytkovou DNA, protože ve vzorku se stále může nacházet. Všechny kroky přechištění byly provedeny na ledu.

1. Ke vzorku RNA byla přidána RNase free ddH₂O^{DEPC} do celkového objemu 100 µl. A následně byly přidány další složky reakce podle množství vzorků (viz Tabulka 4).

Tabulka 4- Množství jednotlivých reakčních složek

Reakční složka	Množství reakční složky (µl)
10x DNase I buffer	6
DNaseI	3
RNase Inhibitor	1

2. Vzorky byly inkubovány 30-60 min při 37 °C.
3. Do každého vzorku byla přidána voda do celkového objemu 200 µl.
4. Ke vzorku bylo přidáno 200 µl směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) a vzorky byly vortexovány. Vzorky byly ponechány na ledu, dokud nebyly

vytvořeny 2 fáze. Poté byly vzorky opět vortexovány. Vzorky byly okamžitě centrifugovány 10 min při 13 000 rpm při 4 °C.

5. Supernatant byl pipetou přesunut do nové zkumavky bez narušení interfáze. Bylo přidáno 300 µl směsi chloroform:kyselina octová (24:1). Vzorky byly poté vortexovány a centrifugovány 5 min při 13 000 rpm při 4 °C.
6. Supernatant byl pipetou přesunut do nové zkumavky. Ke vzorku bylo přidáno 20 µl 1M kyseliny octové a 550 µl 96% ethanolu. Vzorky se nechaly inkubovat přes noc při -80 °C.
7. Vzorky byly centrifugovány 30 min při 13 000 rpm při 4 °C. Supernatant byl opatrně vylit.
8. Bylo přidáno 500 µl 70% ethanolu. Vzorky byly centrifugovány 5 min při 13 000 rpm při 4 °C. Supernatant byl opět opatrně vylit.
9. Bylo přidáno 500 µl 96% ethanolu. Vzorky byly centrifugovány 5 min při 13 000 rpm při 4 °C. Supernatant byl opatrně vylit.
10. Vzorky byly centrifugovány 1 min při 13 000 rpm při 4 °C. Zbytkový ethanol byl odstraněn opatrně pipetou. Pelet byl vysušen na vzduchu po dobu 5 min. Poté byl pelet rozpuštěn v 10-30 µl vody podle množství RNA.
11. Pomocí spektrofotometru Nanodrop 2000 bylo zjištěno množství a čistota výsledné RNA.

4.5.6 Reverzní transkripce

Pomocí spektrofotometru byla stanovena koncentrace RNA. Poté bylo nutné naředit vzorky, aby obsahovaly stejné množství RNA 1 µg/µl. Následně byl proveden přepis RNA na cDNA, se kterou byla provedena PCR analýza.

1. Ke vzorku byly napipetovány 4 µl 5x TransAmp Buffer a 1 µl RTase. Ke směsi byla připipetována voda do celkového objemu 20 µl.
2. Vzorky se nechaly krátce centrifugovat a byly vloženy do PCR thermocycleru.
3. Byl spuštěn program s názvem SENSIFAS s následujícími podmínkami (Tabulka 5):

Tabulka 5- Teplotní a časový průběh programu SENSIFAS pro reverzní transkripci

Krok	Teplota (°C)	Čas
Annealing	25	10 min
Reverzní transkripce	42	15 min
Reverzní transkripce pro vysoce strukturovanou RNA	48	15 min
Inaktivace	85	5 min

4. Vzorke byly poté ponechány na ledu nebo při 4 °C.

4.5.7 RT-PCR analýza

- Byly vybrány kandidátní geny pro amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí: referenční gen *LcGAPDH*, a sledované geny *Lc31634*, *Lc31310*, *Lc30146*. Pro PCR amplifikaci byly navrženy primery pomocí programu FastPCR (Primer Digital, Helsinky, Finsko) a nasyntetizovány v Generi Biotech (Hradec Králové, ČR). Použité primery lze vidět v Tabulce 6.

Tabulka 6- Seznam použitých primerů

Kandidátní geny	Primer-název	Sekvence (5'-3')
<i>LcGAPDH</i>	LcGAPDH_F	5'-ATACCAGGTCGAGCATCTTTG-3'
	LcGAPDH_R	5'-GGGTACTGTAACCCAACTCATT-3'
<i>Lc31634</i>	Lc31634_F40	5'-AATGTTGGGCCAATAGGGTGC-3'
	Lc31634_R366	5'-CAGTAGGATGGTAAGGGTCCCAA-3'
<i>Lc31310</i>	Lc31310_F166	5'-TGTTTATCGACGGTTGCTATTCC-3'
	Lc31310_R313	5'-AGTAGGGTTGCAAGGATAAGAACA-3'
<i>Lc30146</i>	Lc30146_F358	5'-TTGGTAGCTGATATACCTCAAGCT-3'
	Lc30146_R712	5'-TTTAAATGAGCCCCCACTAGAGAT-3'

- Do mikrozkuavky bylo napipetováno množství reakční směsi adekvátní počtu vzorků. Množství jednotlivých reakčních složek pro jeden vzorek lze vidět v Tabulce 7.

Tabulka 7- Příprava reakční PCR směsi

PCR reakční složka	Objem složky pro jeden vzorek (μl)
5x buffer	3
Směs primerů F a R (5 pmol/μl)	1
Taq polymeráza	0,07
voda	9
Vzorek cDNA	2
Celkem	15

- Do mikrokumavkových stripů byla napipetována připravená reakční směs po 13 μl, ke kterým byly připipetovány 2 μl vzorku cDNA.
- Mikrokumavkové stripy byly krátce stočeny na minicentrifuze.
- Stripy byly poté vloženy do Thermocycleru, kde probíhala PCR reakce. Teplotní průběh PCR programu lze vidět v Tabulce 8.

Tabulka 8- Časový a teplotní průběh PCR reakce programu pro cDNA

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Preinkubace	95	2 min	1x
Denaturace	95	30 s	30x
Annealing	60	30 s	30x
Elongace	72	1 min	30x
Koncová extenze	72	5 min	1x

- Pro ověření správnosti průběhu PCR byla použita elektroforéza.

4.5.8 Elektroforéza

- Pro ověření správného průběhu PCR byla použita horizontální agarózová elektroforéza.
- Pro elektroforézu byly použity dvě velikosti elektroforetických van – 80 ml a 300 ml. Pro přípravu 80 ml 1,5% agarózového gelu bylo potřeba navázat 1,2 g agarózy, ke které bylo přidáno 80 ml TBE pufru. Pro přípravu 300 ml

1,5% agarózového gelu bylo potřeba navážit 4,5 g agarózy, ke které bylo přidáno 300 ml TBE pufri.

3. Směs byla rozehřáta v mikrovlnné troubě, než se agaróza zcela rozpustila.
4. Směs se nechala vychladnout asi na 50 °C.
5. Poté byl ke 80ml směsi připipetován 1,5 µl barviva GelRed, ke 300ml směsi 5 µl barviva.
6. Směs s barvivem byla nalita do elektroforetické formy na gel, do které se umístily hřebeny.
7. Takto připravený gel se nechal tuhnout zhruba 30 minut.
8. Po úplném ztuhnutí byly opatrně vytaženy hřebínky a gel byl vložen do elektroforetické vany doplněné 0,5x TBE pufrem.
9. Do první jamky gelu bylo napipetováno 1,5 µl markeru molekulové hmotnosti GeneRuler™ 100 bp. Do dalších jamek bylo napipetováno 5 µl vzorku (PCR produktu).
10. Poté byla elektroforetická aparatura připojena ke zdroji napětí (100-150 V pro 80 ml gel, 200-250 V pro 300 ml gel) a nechala se běžet 30-50 minut.
11. Po skončení byla aparatura odpojena od zdroje napětí. Gel byl vložen do UV transiluminátoru, který byl připojen k počítači s programem pro dokumentaci gelu.

4.5.9 Sekvenační analýzy s cílem nalezení vhodného restričního polymorfismu

Nejprve bylo potřeba provést purifikaci PCR produktu, která slouží k přečištění DNA od nežádoucích látek, jako např. zbylé primery, nepotřebné enzymy či neinkorporované nukleotidy. Byla použita exonukleáza I a alkalická fosfatáza. Exonukleáza I štěpí zbylé primery a alkalická fosfatáza defosforyluje neinkorporované nukleotidy.

1. Do mikrozkušavky bylo připraveno 90 µl reakční směsi, viz Tabulka 9.

Tabulka 9- Reakční směs pro purifikaci DNA

Reakční složka	Množství reakční složky (μl)
Voda	62,1
Fast AP buffer	18
Exonukleáza Exo I	7,2
Alkalická fosfatáza	2,7
Celkem	90

2. Do mikrokumavkových stripů byla reakční směs rozpipetována po 5 μl, ke kterým bylo připipetováno 5 μl PCR produktu.
3. Mikrokumavkové stripy byly stočeny na minicentrifuze.
4. Poté byly mikrokumavkové stripy vloženy do thermocykleru a spustil se program Exo-AP (viz Tabulka 10).

Tabulka 10- Časový a teplotní průběh PCR reakce programu Exo-AP pro purifikaci DNA

Krok	Teplota (°C)	Čas
Inkubace	37	15 min
Tepelná inaktivace	85	15 min

5. Pro sekvenaci bylo potřeba dodat purifikovanou PCR reakci společně se sekvenačním primerem (o koncentraci 5 pmol/μl) v celkovém objemu 8 μl na jeden vzorek, které obsahovaly 3 μl destilované vody, 1 μl F primer a 4 μl PCR (Exo-AP) produkt. Takto připravené vzorky se odeslali na sekvenování.
6. Sekvenování bylo provedeno v laboratoři sekvenace DNA, Core Facility PřF UK Praha. Byla provedena analýza získaných sekvencí pomocí programu Geneious a provedeno srovnání pomocí BLAST analýzy. Poté byl porovnán restriční profil získaných sekvencí rodičovských genotypů v programu Geneious.

4.5.10 Restrikce PCR produktu

PCR produkty byly štěpeny příslušným enzymem podle výsledku sekvenování a to metodou zvanou CAPS-PCR (Cleavage Amplified Polymorphic Sequence). Touto metodou se zjišťuje výskyt jednonukleotidových polymorfismů. Seznam použitých enzymů lze vidět v Tabulce 11.

Tabulka 11- Seznam použitých restričních enzymů s příslušnými pufrů a teplotou štěpení

Kandidátní gen	Restriční enzym	Pufr	Teplota štěpení (°C)
<i>Lc30146</i>	<i>Rsa I</i>	Tango pufr	37
<i>Lc31310</i>	<i>Rsa I</i>	Tango pufr	37
<i>Lc31310</i>	<i>Mbo II</i>	Blue pufr	37
<i>Lc31299</i>	<i>Mbo II</i>	Blue pufr	37
<i>Lc32190</i>	<i>Alu I</i>	Tango pufr	65

1. Do mikrozkuřavky bylo napipetováno množství reakční směsi adekvátní potřebnému množství vzorků. Množství reakční směsi pro jeden vzorek viz Tabulka 12.

Tabulka 12- Reakční směs pro restriční PCR produktu

Reakční složka	Množství reakční složky (μl)
Voda	8,3
10x pufr	1,5
Restriční enzym	0,2
Celkem	10

2. Do mikrozkuřavkových stripů byla rozpipetována reakční směs po 10 μl, ke které bylo přidáno 5 μl PCR produktu jinou pipetou.
3. Mikrozkuřavkové stripy byly vloženy do thermocykleru na 2-3,5 hodiny, kde byla nastavena teplota štěpení podle konkrétního enzymu (37 °C pro *RsaI*).
4. Produkty restričního štěpení byly separovány elektroforeticky a gely byly zdokumentovány pomocí UV transiluminátoru.

4.5.11 RNA sekvenování

Rostlinný materiál byl rozemlet v tekutém dusíku a RNA byla izolována pomocí PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen). Zbytková DNA byla odstraněna pomocí úpravy Baseline-ZERO Dnase (Epicenter) následovanou fenol/chloroformovou extrakcí. Degradace RNA a potenciální kontaminace byla kontrolována na 2% agarózovém gelu. Integrita RNA a kvantifikace byla zkontrolována pomocí Agilent 2100. Sekvenační knihovny byly obohaceny o mRNA pomocí oligo(dT) kuliček. mRNA byla fragmentována přidáním fragmentačního

pufry, poté byla syntetizována cDNA na základě mRNA templátu použitím náhodných primerů hexamerů, po kterém pokračovala syntéza druhého vlákna. Nakonec byly vytvořeny dvouvláknové cDNA knihovny adaptační ligací, velikostní selekcí a obohacení pomocí PCR. Knihovny byly sdruženy po kontrole kvality a kvantifikaci knihoven pomocí Qubit 2.0 (ThermoFisher), Agilent 2100 (Agilent) a Q-PCR. Sekvenování běželo v módu pair-end s délkou sekvenování 150 bp. Příprava knihovny a sekvenování byly provedeny firmou Novogene, Ltd. (UK) pomocí sekvenátoru NovaSeq 6000 (Illumina).

Na jednu knihovnu bylo v průměru 23,28 Mb čistých čtení (v rozmezí 19,2 až 32,26 Mb). Po kontrole kvality a filtrování provedeném na University of Saskatchewan byla čtení zpracována pro *downstream* analýzu, která zahrnovala mapování, složení referenčního genomu čočky a identifikaci diferenciálně exprimovaných genů.

4.5.12 Anatomická analýza osemení

Příprava podložních skel

1. Skla (Microscope Slides, Knittel Glass) byla umyta kapkou saponátu (Jar) a opláchnuta vodou.
2. Skla byla odmaštěna 96% ethanolem po dobu 24 hodin a vyčištěna gázou.
3. Skla byla ponořena do želatiny na 10 s. Poté byla položena na ták s filtračním papírem a nechala se ve 40-50 °C na 12 hodin nebo 24 hodin při laboratorní teplotě.

Příprava vzorků

1. Byla provedena infiltrace sacharózou suchých semen. Byla použita 2% sacharóza. Vzorek byl neprodleně přesunut do atmosféry se sníženým tlakem pro vytlačení vzduchu.
2. Bylo provedeno odstranění vzduchu vývěvou. Vzorky v otevřených zkumavkách byly vloženy do stojanu. Vývěva byla zapnuta na 30 minut.
3. Poté nutno vývěvu vypnout, uzavřít kohout exikátoru a nechat vzorky ve sníženém tlaku ještě minimálně dalších 30 minut.
4. Opatrně byla odstraněna hadice od vývěvy a byl na co nejméně povolen kohout exikátoru, aby tlak nevyletěl prudce.

Řezy na kryomikrotomu

1. Byl zapnut kryomikrotomu minimálně 1-5 hodin před řezáním i s terčí na vzorek.
2. Teplota komory musí být vychlazená na -19 °C a teplota vzorku -21 °C.
3. Těsně před prací byly vloženy štětce do komory a na terče byla dána základní vrstva kryogelu.
4. Na připravený terč s kryogelem byla přidána další vrstva kryogelu a byl do ní umístěn vzorek pinzetou.
5. Terče se vzorkem byly položeny na mrazicí desku v kryotomu a nechaly se mrazit asi 5 minut.
6. Byl upnut terč se vzorkem do hlavy kryotomu. Byl přivřen kryt kryomikrotomu a byl trimován vzorek k noži (trim 50 μm).
7. Byl upraven vzorek v gelu odřezáním nadbytečného kryogelu. Bylo provedeno řezání na velikost 20 μm.
8. Vzorek byl přesunut pomocí štětce. Bylo potřeba zkontrolovat orientaci řezu na podložním skle na mikroskopu (Olympus CX31).
9. Vzorky byly poskládány na podložní sklo.
10. Použitý vzorek na terči byl seříznut skalpelem a byla ponechána základní vrstva kryogelu.
11. Práce byla ukončena odstraněním kryogelu z terčů a odstraněním zbytků kryogelu z komory. Byl vytáhnut rozdělovač z mrazicího pultu a byl zakryt. Všechny vyčištěné věci z kryomikrotomu byly řádně osušeny a byl vypnut přístroj.

Barvení Toluidine Blue O

1. Na vzorky mikrořezů na sklíčku bylo kápnuto 0,01% Toluidine Blue O.
2. Bylo nutné barvit ve vodorovné poloze na Petriho misce.
3. Barvivo působilo 1-2 minuty, poté bylo odmyto vodou zhruba 3x.
4. Vzorky byly zality 20% glycerolem a bylo na ně položeno krycí sklíčko.
5. Nabarvený preparát byl ihned mikroskopován na mikroskopu Olympus BX60 s kamerou Olympus DP72, který byl připojený k počítači s programem na focení a upravování snímků.

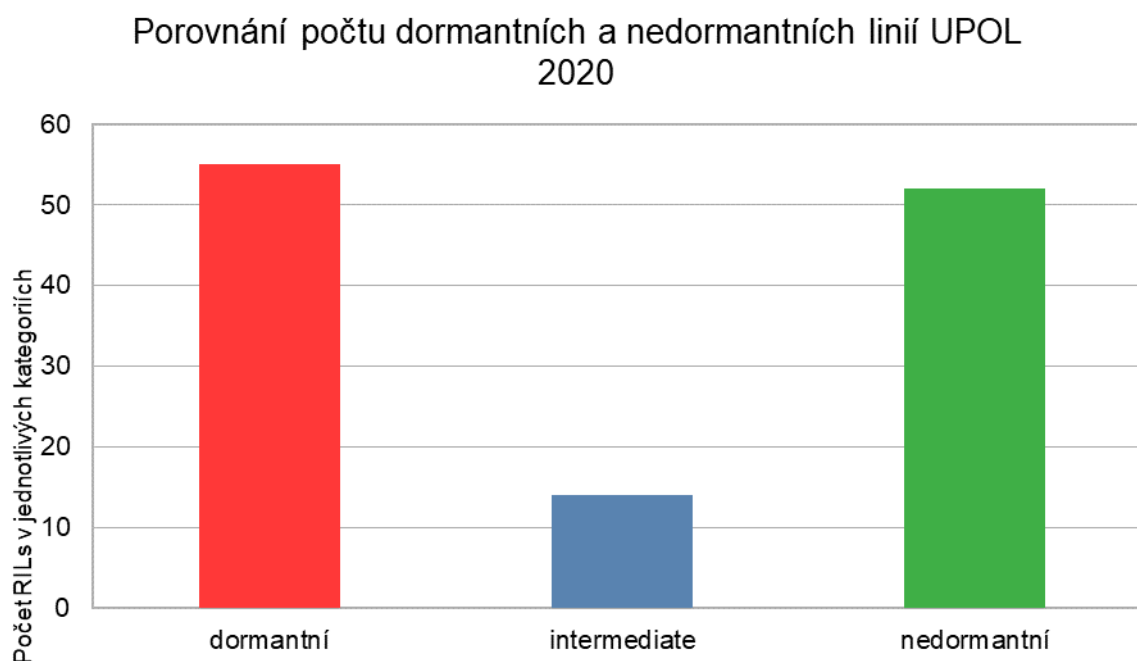
4.5.13 Testování bobtnání (dormance) semen

1. Do řádně označených Petriho misek byly vloženy filtrační papíry, na které bylo umístěno 25 semen každé linie tj. 121 RILs a rodiče 3339 a IG72643. Jedinou výjimkou byla rekombinantní inbrední linie 169, pro kterou bylo k dispozici pouze 20 semen.
2. Misky se semeny byly zality zhruba 3 ml vody s přídavkem fungicidu a nechaly se inkubovat při teplotě 25° C.
3. Byl zaznamenán počet bobtnajících semen ve 24-hodinovém intervalu po dobu celkem 5 dní.

5 Výsledky

5.1 Testování dormance semen

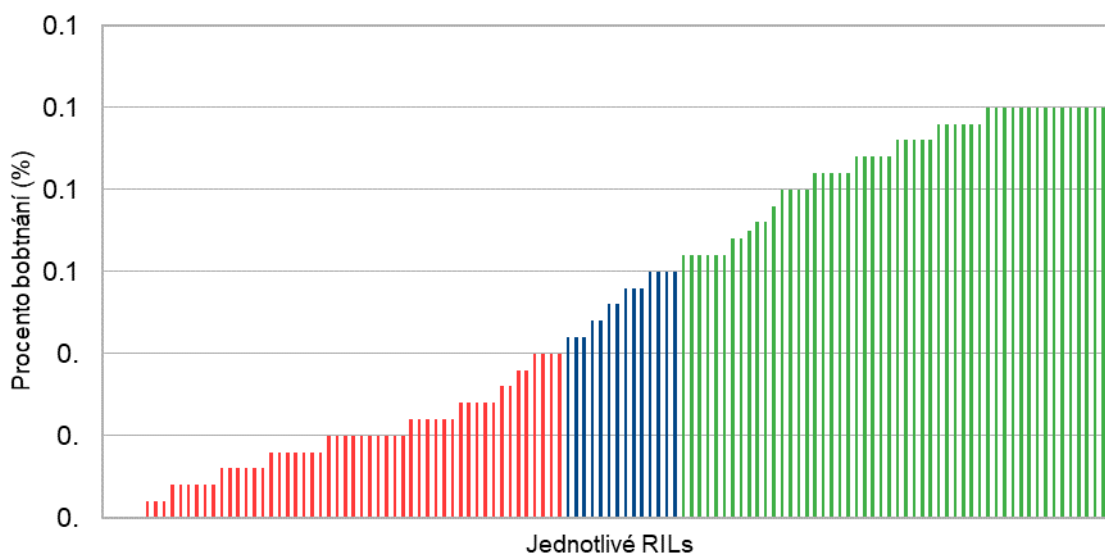
Pomocí kontrastních rodičovských linií kulturní čočky (genotyp 3339) a plané čočky (genotyp IG72463) byla vytvořena mapovací populace 121 rekombinantních inbredních linií (RILs). Sklizená semena z rostlin vypěstovaných ve skleníku katedry botaniky, UP (varianta označená UPOL 2020) byla testována v časovém intervalu 2 měsíce od sklizně. Pro testování dormance byl použit test bobtnání semen kultivovaných v Petriho miskách na vlhkém filtračním papíru po dobu 5 dní. Počet bobtnajících semen byl zaznamenán ve 24-hodinových intervalech. Na tento test bylo použito 25 semen z každé linie s výjimkou linie 169, pro kterou bylo použito pouze 20 semen. Za dormantní linie byly považovány ty, u kterých bobtnalo 0-40 % semen. U nedormantních (tedy následně klíčících) bobtnalo 60-100 % semen. U intervalu bobtnání 40-60 % nelze jednoznačně určit, zda se jedná o dormantní či nedormantní semena. Rodičovská linie kulturní čočky 3339 je příkladem nedormantní linie a rodičovská linie plané čočky IG72463 je příkladem dormantní linie. Dormantních linií pro data UPOL 2020 bylo celkem 55 a nedormantních 52. U 14 linií nebylo možné určit, zda jsou dormantní či ne (viz Obrázek 4).



Obrázek 4- Porovnání počtu dormantních a nedormantních linií u dat UPOL 2020

Distribuci bobtnání mezi jednotlivými liniemi lze vidět na Obrázku 5. Byly použity hodnoty bobtnání po 48 hod. V grafu na Obrázku 5 jsou červeně značeny linie, které jsou dormantní (0-40 % bobtnání), zeleně jsou označeny nedormantní linie (60-100 % bobtnání) a modře jsou vyznačeny linie, u kterých nejde určit, zda jsou dormantní či nikoliv (40-60 %).

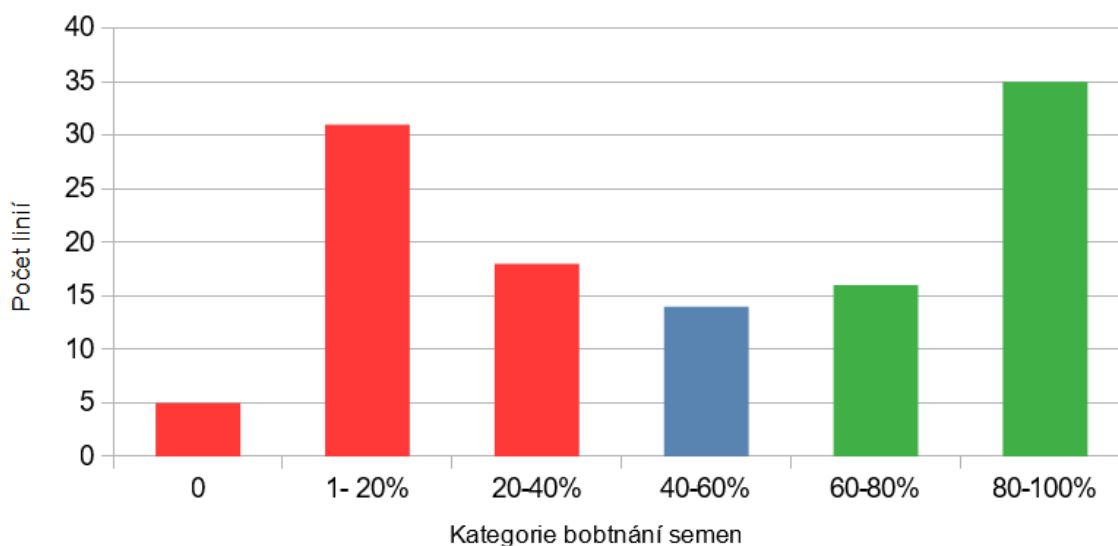
Distribuce bobtnání u jednotlivých RILs POL 2020



Obrázek 5- Distribuce bobtnání u jednotlivých RILs u dat UPOL 2020

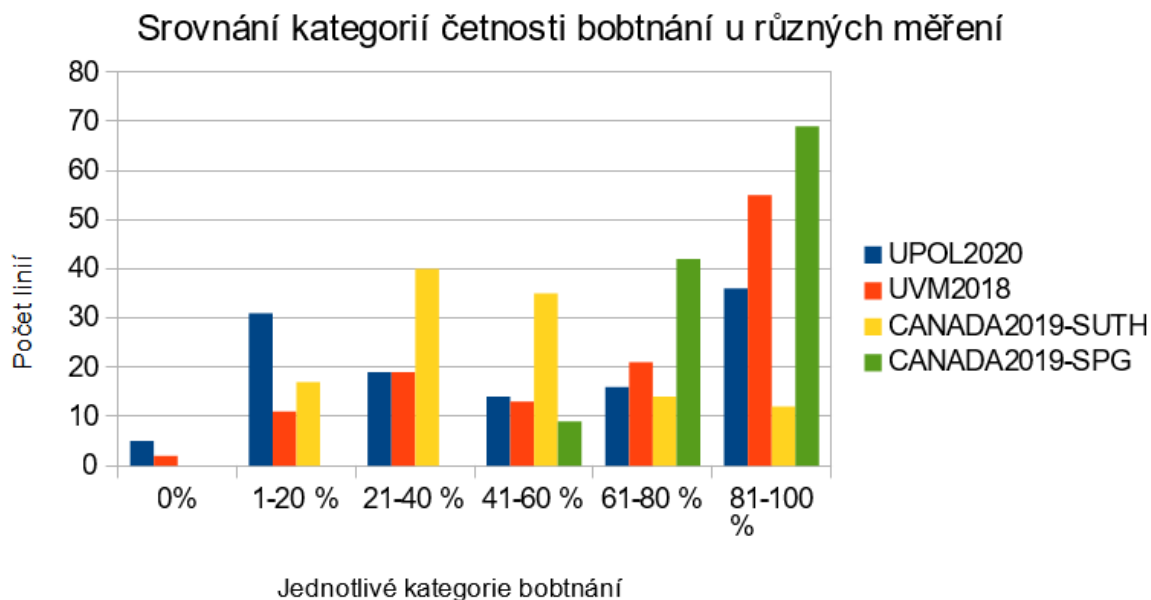
Distribuci mezi jednotlivými kategoriemi bobtnání semen lze vidět na Obrázku 6. Červeně jsou vyznačeny linie dormantní, zeleně nedormantní a modře ty, které nejdu určit. Kategorií s největším počtem linií byla kategorie 80-100 % a poté kategorie 1-20 %. Byly použity hodnoty bobtnání semen po 48 hod.

Četnost kategorií bobtnání (%) UPOL 2020



Obrázek 6- Četnost bobtnání jednotlivých kategorií u dat UPOL 2020

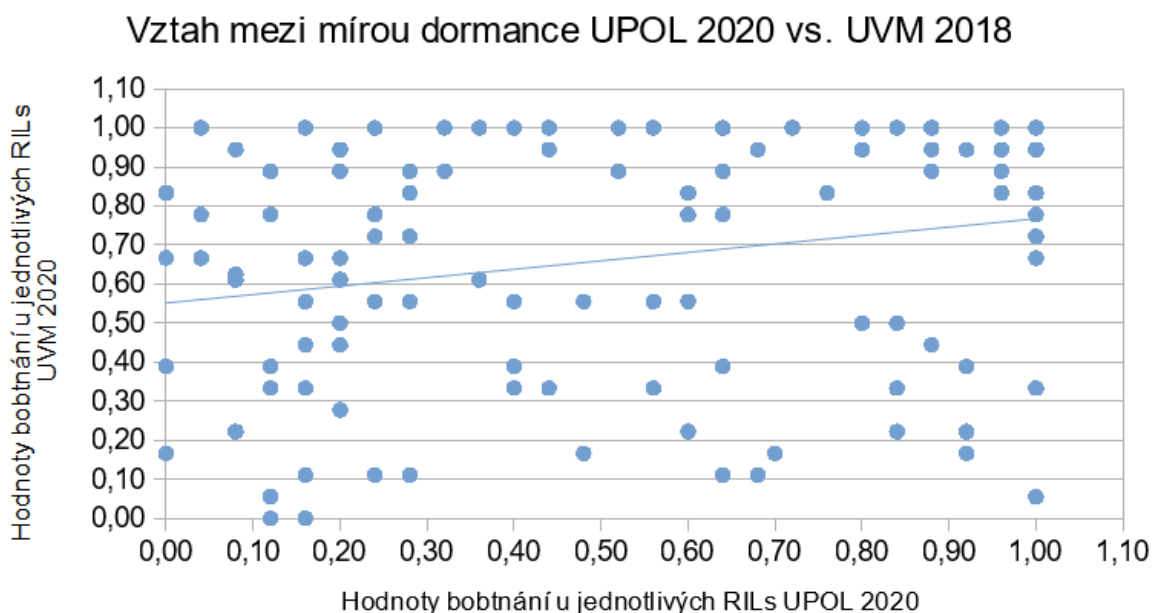
Data byla srovnána s daty z jiných měření: a to konkrétně z prvotní analýzy provedené Doc. Ing. Petrem Smýkalem, Ph.D. na University of Vermont (označení UVM 2018), a partnerským pracovištěm na University of Saskatchewan, Kanada (označení Canada 2019). Vlastní experimentální data jsou označena UPOL 2020. Rostliny z těchto semen byly pěstovány ve skleníku v období leden-červenec 2020. V průběhu června a července 2020 byla provedena sklizeň a nasbíraná semena byla uložena v popsaných papírových pytlících. Test bobtnání byl proveden na začátku září. Rostliny ze semen UVM 2018 (University of Vermont, USA) a Canada 2019 byly pěstovány na poli v Kanadě (Saskatoon, Saskatchewan). Test bobtnání UVM 2018 byl proveden na konci října 2018. U dat UVM 2018 bylo 32 dormantních linií, 76 nedormantních linií a 13 linií nešlo určit. Rostliny ze semen Canada 2019 byly vypěstovány na poli na dvou různých lokalitách (Sutherland a Saskatchewan Pulse Growers field) v Kanadě a jsou označeny Canada 2019-Suth a Canada 2019-SPG. U dat Canada 2019-Suth bylo 57 linií dormantních, 26 nedormantních a 35 se nedalo určit. U dat Canada 2019-SPG bylo 111 nedormantních linií, 9 nešlo určit a žádná linie nebyla dormantní. Pro srovnání četnosti bobtnání u všech dat viz Obrázek 7. Hodnoty bobtnání semen byly po 48 hod. Vidíme, že četnost kategorií bobtnání semen mezi jednotlivými daty je různá.



Obrázek 7- Srovnání kategorií bobtnání u dat z jednotlivých měření a let

Vztah mezi mírou dormance (mírou bobtnání) mezi daty UPOL 2020 a UVM 2018 lze vidět na Obrázku 8. Hodnoty 0-1 na ose grafu odpovídají 0-100 % bobtnajících semen po 48 hod testování. Můžeme vidět, že některé linie se neshodují mezi jednotlivými daty. Vyskytují se zde linie, které byly dormantní v jednom souboru dat, a naopak byly nedormantní

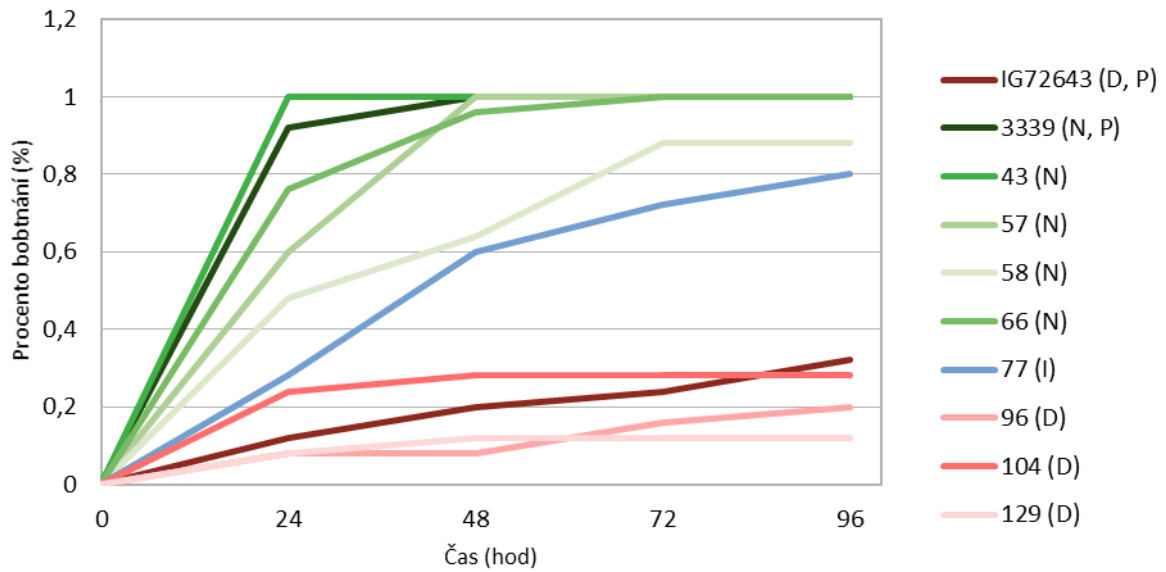
v druhém. V některých případech došlo i k extrémnímu rozdílu např. linie se 100% bobtnání semen v měření UPOL 2020, měla hodnotu bobtnání 4 % v měření UVM 2018.



Obrázek 8- Vztah mezi mírou dormance mezi daty UPOL 2020 a UVM 2018

Časový průběh bobtnání semen během 5 dní u vybraných linií UPOL 2020 lze vidět na Obrázku 9. Různé linie mají různý časový průběh bobtnání. Pro hodnocení bobtnání semen byly použity hodnoty po 48 hod. I po této hodnotě mohlo docházet k nárůstu bobtnání semen. Červeně jsou vyznačeny linie dormantní (D), nejtmavší červená linie značí planého rodiče IG72643 (D,P). Zeleně jsou vyznačeny linie nedormantní (N), nejtmavší zelená linie značí kulturního rodiče 3339 (N,P). Modře označenou linii (77) nelze jednoznačně přiřadit k dormantním či nedormantním liniím (I).

Časový průběh bobtnání semen

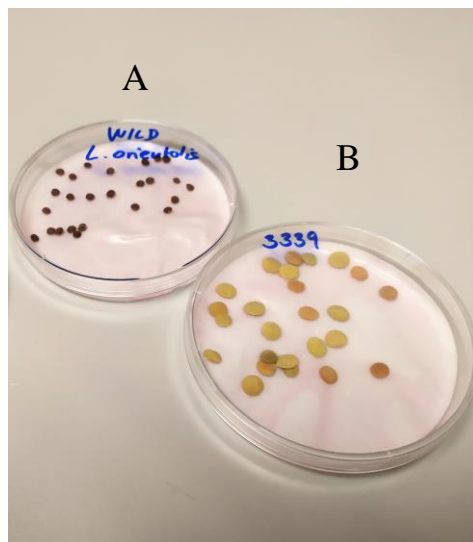


Obrázek 9- Časový průběh bobtnání u vybraných RILs

5.2 Hodnocení fenotypu

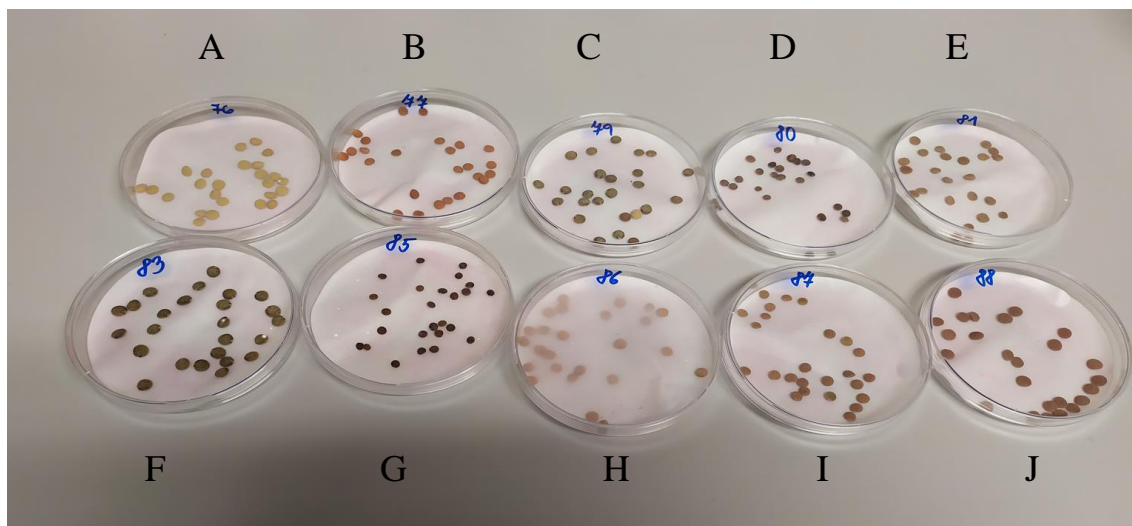
5.2.1 Barva osemení a barva květu

Barva osemení byla hodnocena vizuálně. Šlo o odlišení rozdílů mezi pigmentovaným a nepigmentovaným osemením. Semena plané čočky IG72643 se vyznačují tím, že jsou malá a pigmentovaná (tmavě hnědá až černá). Semena kulturní čočky 3339 jsou naopak velká a nepigmentovaná (viz Obrázek 10) s barvou prosvítajících děloh.



Obrázek 10- Rozdíl v pigmentaci osemení rodičovských genotypů: pigmentovaná rodičovská linie IG72643 (A) a nepigmentovaná rodičovská linie 3339 (B)

Barva osemení a velikost semen se lišila u různých linií. Barvy osemení se pohybovaly od světlé, přes oranžovou, světle hnědou až po hnědou a černou (viz Obrázek 11). Některé linie obsahovaly vzor – tečkování.



Obrázek 11- Ukázka různě zbarveného osemení u vybraných RILs

Legenda: světlé osemení linie 76 (A), oranžové osemení linií 77 (B) a 86 (H) a 87 (I), tečkované osemení linií 79 (C) a 80 (D) a 83 (F), světle hnědé osemení linie 81 (E), černé osemení linie 85 (G), hnědé osemení linie 88 (J)

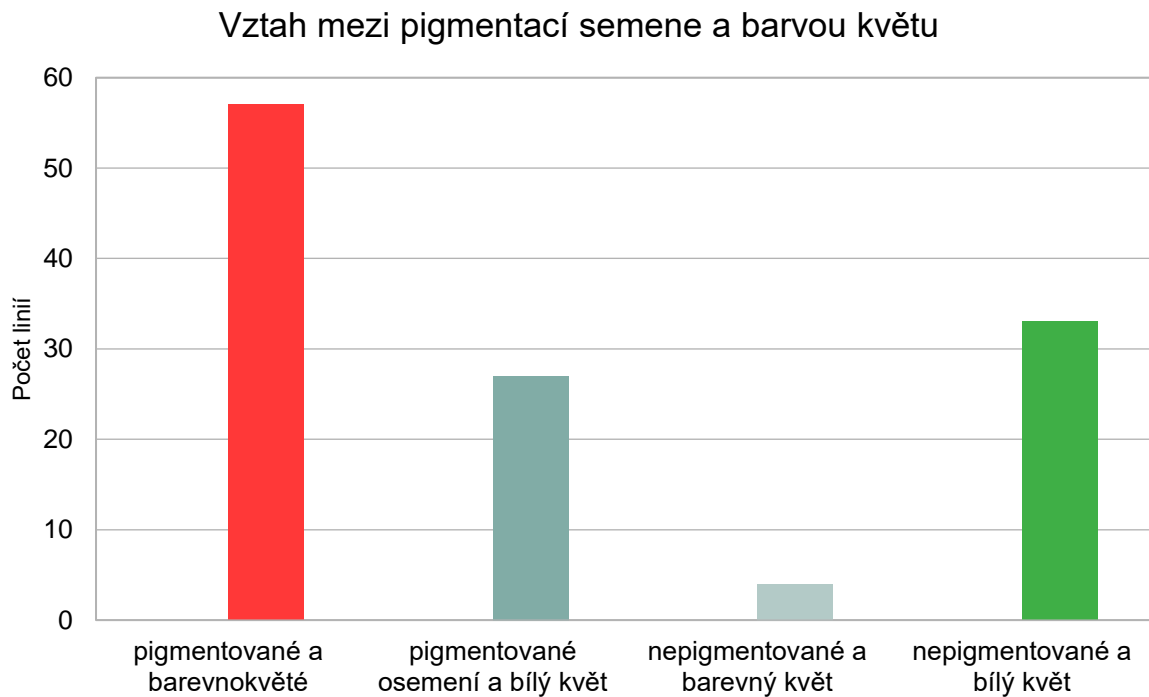
Osemení lze tedy rozdělit na pigmentované a nepigmentované. Ze 121 RIL bylo 84 pigmentovaných, 36 nepigmentovaných a 1 linie (194) nešla rozeznat, protože obsahovala světlá i tmavá semena. U 3 dalších linií se nacházela semena se dvěma různými barvami, což mohlo být způsobeno pomícháním semen z jiné linie.

Byla hodnocena také barva květu. Barva květů byla bílá nebo modrofialová popř. i smíšená. Linií s bílými květy bylo 56 a s barevnými květy 61. U 4 linií nebylo možné barvu květů jednoznačně přiřadit.

5.2.2 Vztah mezi barvou květu a barvou osemení

Mezi barvou květu a barvou osemení se může vyskytovat genetický vztah, vazba. Kulturní forma čočky se vyznačuje nejčastěji bílými květy, většími semeny a nepigmentovaným osemením. Linií s nepigmentovanými semeny a bílými květy bylo 33 (viz Obrázek 12). Planá forma čočky se zase vyznačuje pigmentovanými (modrými) květy, menšími semeny a pigmentovaným osemením. Linií s těmito vlastnostmi, tedy s pigmentovanými semeny a barevnými květy, bylo 57. 90 linií z dat UPOL 2020 z celkových 121 tedy odpovídá vlastnostem kulturní či plané formy čočky. Zbylých 31 linií neodpovídalo. Pigmentované

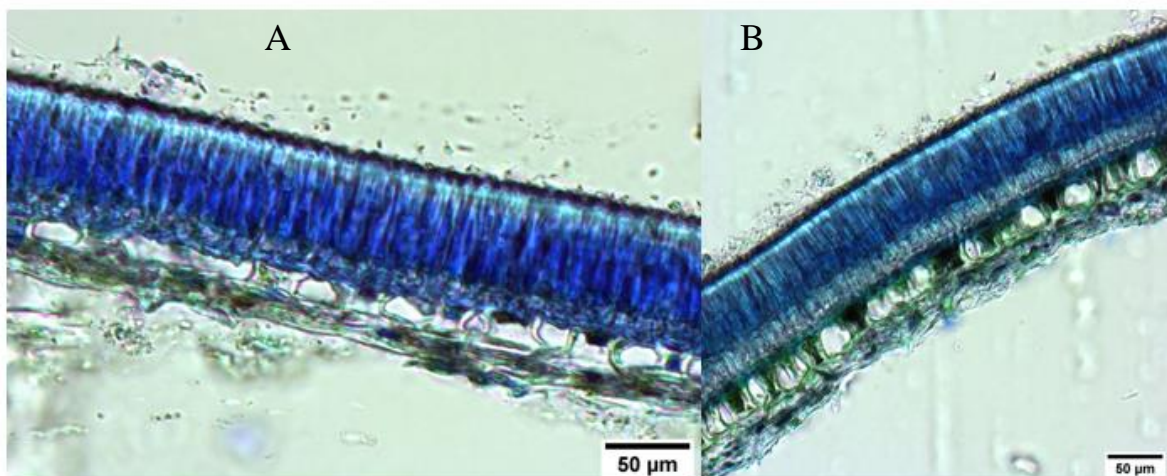
osemení a bílý květ obsahovalo 27 linií a zbylé 4 linie obsahovaly nepigmentované osemení a barevný květ.



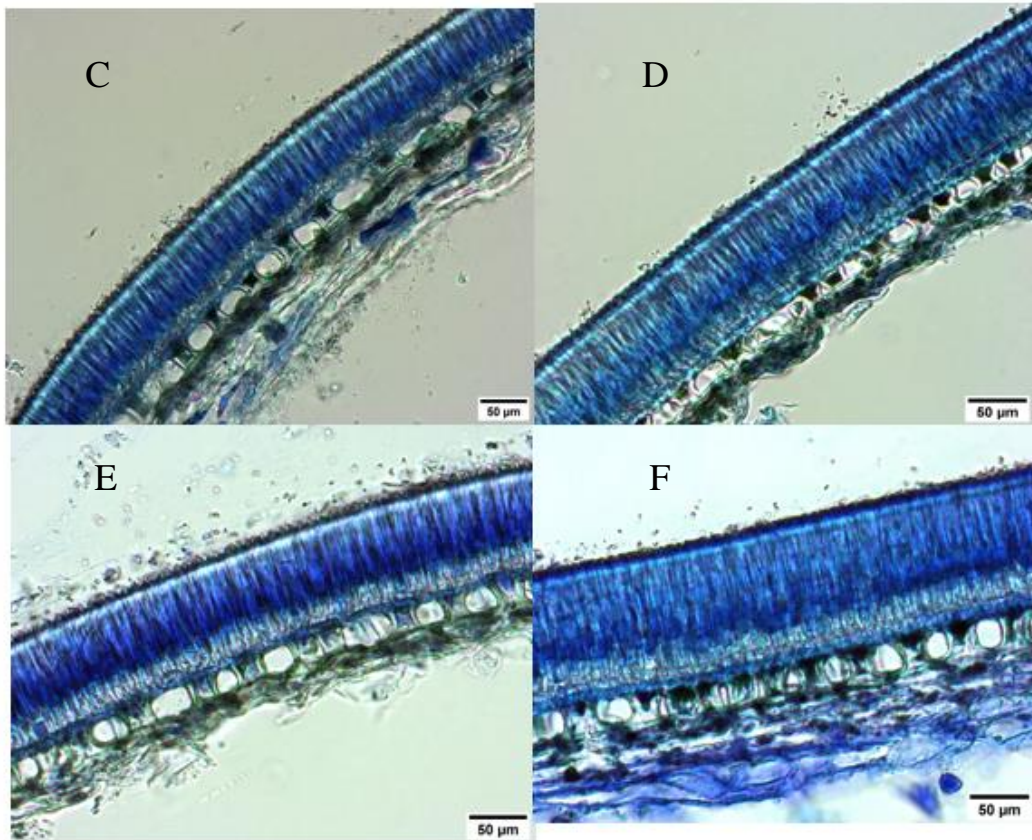
Obrázek 12- Vztah mezi pigmentací a barvou květu UPOL 2020

5.2.3 Analýza anatomické struktury osemení

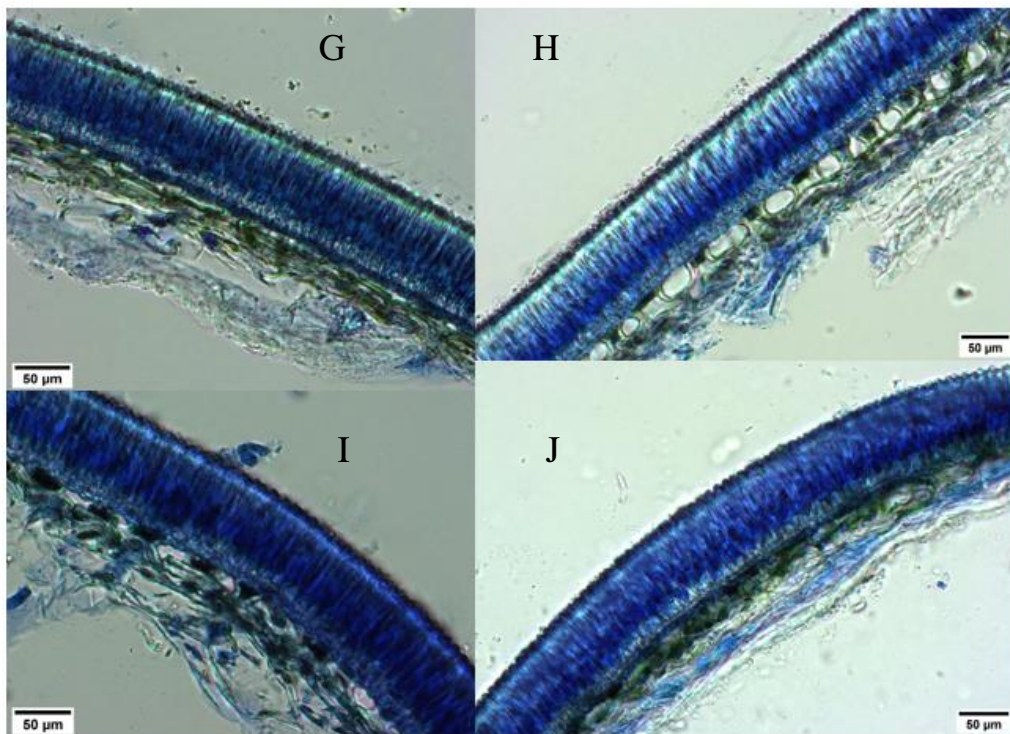
Se vzorky rodičovských genotypů 3339 a 72643 a vybranými RIL byly provedeny řezy pomocí kryomikrotomu. Byly vybrány nedormantní RIL linie 43, 57, 58, 66 a kontrastní dormantní linie 77, 96, 104, 129. Vzorky byly pozorovány mikroskopem a vyfoceny kamerou (viz Obrázky 13-15).



Obrázek 13- Mikroskopická analýza řezu osemení rodičovských genotypů 3339 (A) a 72643 (B)



Obrázek 14- Mikroskopická analýza řezu osemení u linií 43 (C), 104 (D), 57 (E), 129 (F)



Obrázek 15- Mikroskopická analýza řezu osemení linie 58 (G), 77 (H), 66 (I), 96 (J)

Následně bylo provedeno 6 měření tloušťky osemení pomocí programu Zeiss ZEN lite, ze kterých byla spočítána průměrná hodnota velikosti makroklereid jednotlivých linií a směrodatná odchylka. Z Tabulek 13-15 můžeme vidět průměrné hodnoty velikosti makroklereid u rodičovských genotypů a u vybraných RIL linií.

Tabulka 13- Jednotlivá měření velikosti makroklereid u rodičovských genotypů a jejich průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou

	Velikost makroklereid 3339 (μm)	Velikost makroklereid 72643 (μm)
1. měření	80,78	93,62
2. měření	77,77	95,24
3. měření	78,82	93,45
4. měření	80,04	95,33
5. měření	79,61	94,80
6. měření	79,46	95,72
Průměrná hodnota	79,41	94,69
Směrodatná odchylka	1,03	0,94

Tabulka 14- Jednotlivá měření velikosti makroklereid u nedormantních linií a jejich průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou

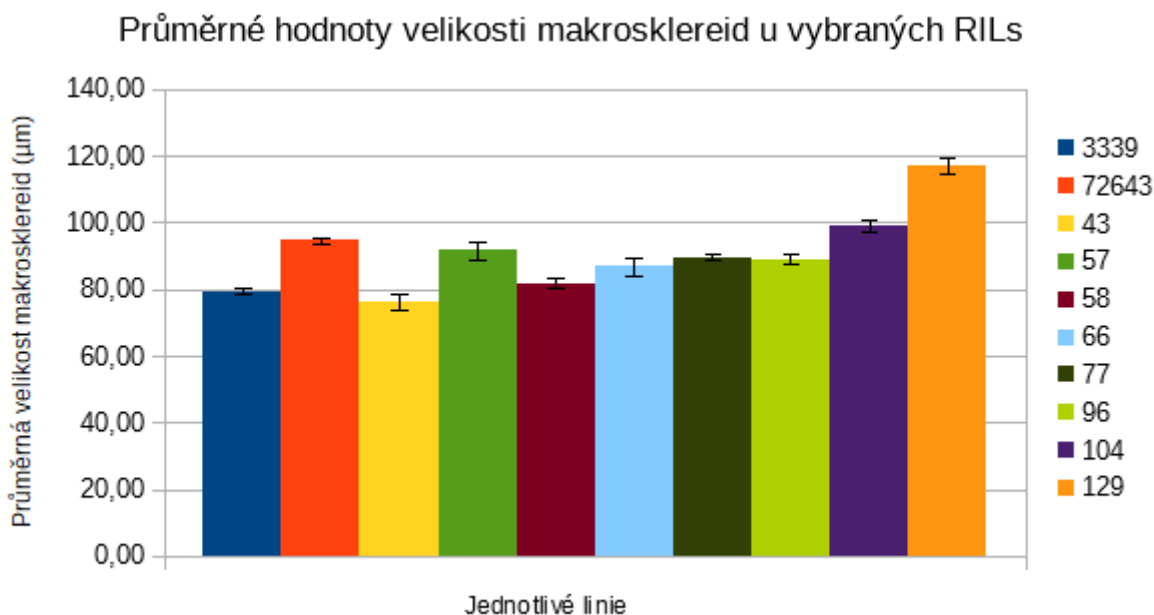
	Velikost makroklereid 43 (μm)	Velikost makroklereid 57 (μm)	Velikost makroklereid 58 (μm)	Velikost makroklereid 66 (μm)
1. měření	75,98	92,96	82,83	84,04
2. měření	75,70	90,65	81,75	88,92
3. měření	76,91	92,60	83,55	86,43
4. měření	71,35	93,52	82,22	84,23

5. měření	78,14	93,77	80,61	85,55
6. měření	78,09	86,62	79,62	91,00
Průměrná hodnota	76,03	91,69	81,76	86,70
Směrodatná odchylka	2,51	2,71	1,45	2,75

Tabulka 15- Jednotlivá měření velikosti makroklereid u dormantních linií a jejich průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou

	Velikost makroklereid 77 (µm)	Velikost makroklereid 96 (µm)	Velikost makroklereid 104 (µm)	Velikost makroklereid 129 (µm)
1. měření	88,11	89,19	96,03	117,57
2. měření	90,58	88,27	98,15	118,48
3. měření	90,01	91,06	100,92	116,29
4. měření	89,26	88,27	98,33	114,05
5. měření	89,45	87,04	100,58	120,20
6. měření	89,33	89,67	100,65	115,24
Průměrná hodnota	89,45	88,92	99,11	116,97
Směrodatná odchylka	0,83	1,38	1,94	2,24

Průměrná délka makroklereid u nedormantního rodičovského genotypu 3339 byla 79,41 µm (viz Obrázek 16). Rozpětí průměrné délky makroklereid nedormantních linií bylo mezi 76,03 µm a 91,69 µm. Průměrná délka makroklereid u dormantního rodičovského genotypu 72643 byla 94,69 µm. Rozpětí průměrných délek makroklereid dormantních linií bylo mezi 88,92 µm a 116,97 µm.



Obrázek 16- Průměrné hodnoty velikosti makrosklereid u vybraných RILs

5.3 Hodnocení genotypu a genetické mapování

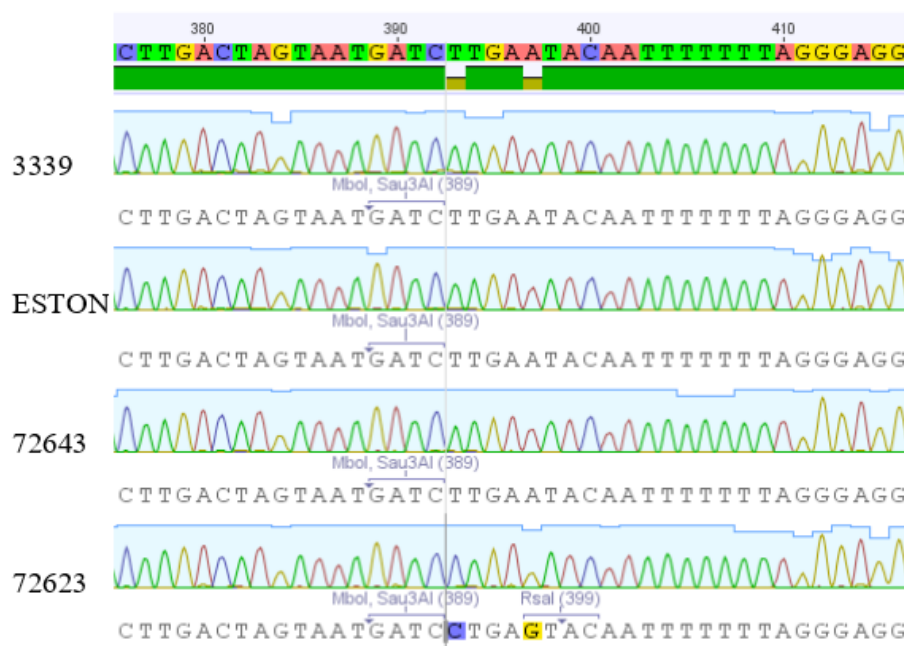
Z rodičovských genotypů 3339, 72643 a jejich rekombinantních inbredních linií byla vyizolována genomová DNA pomocí Macherey-Nagel NucleoSpin 96 Plant II Kitu. Koncentrace izolované DNA činila 40-70 ng/µl. Čistota izolované DNA byla vypočítána z poměru absorbancí A260/A280. Hodnoty se pohybovaly 1,8 až 2,0, což značí čistou DNA.

Počáteční mapování bylo provedeno na University of Vermont, USA a University of Saskatchewan, Kanada, kdy byly využity fenotypová data z hodnocení semen dané RIL populace ze sklizně 2018 (UVM 2018) a genotypová analýza provedená pomocí *Exom capture array* (Ogutcen *et al.*, 2018). Po filtrování bylo využito celkem 8 534 polymorfních SNP na kompletní populaci 121 RIL linií. Mapování vyústilo v identifikaci 7 Mbp oblasti lokalizované na chromozomu 7, nacházející se mezi markery C7-224498697 a C7-230845008, v 5 cM rekombinační vzdálenosti. V genomu kulturní čočky CDC Redberry to odpovídá pozicím 221 268 946 – 232 339 714, tedy 11 Mbp, obsahující celkem 379 anotovaných genů. Z této oblasti byly vybrány 4 geny (viz Tabulka 1) pro potřeby této diplomové práce a ověření daného intervalu.

Izolovaná DNA poté byla amplifikována vybranými primery (viz Tabulka 1) pomocí PCR. Byla provedena kontrola pomocí agorózové elektroforézy. Byla provedena purifikace PCR produktu a sekvenační reakce. Tyto PCR produkty byly odeslány k sekvenování. Následně byla provedena analýza získaných sekvencí pomocí programu Geneious a bylo provedeno

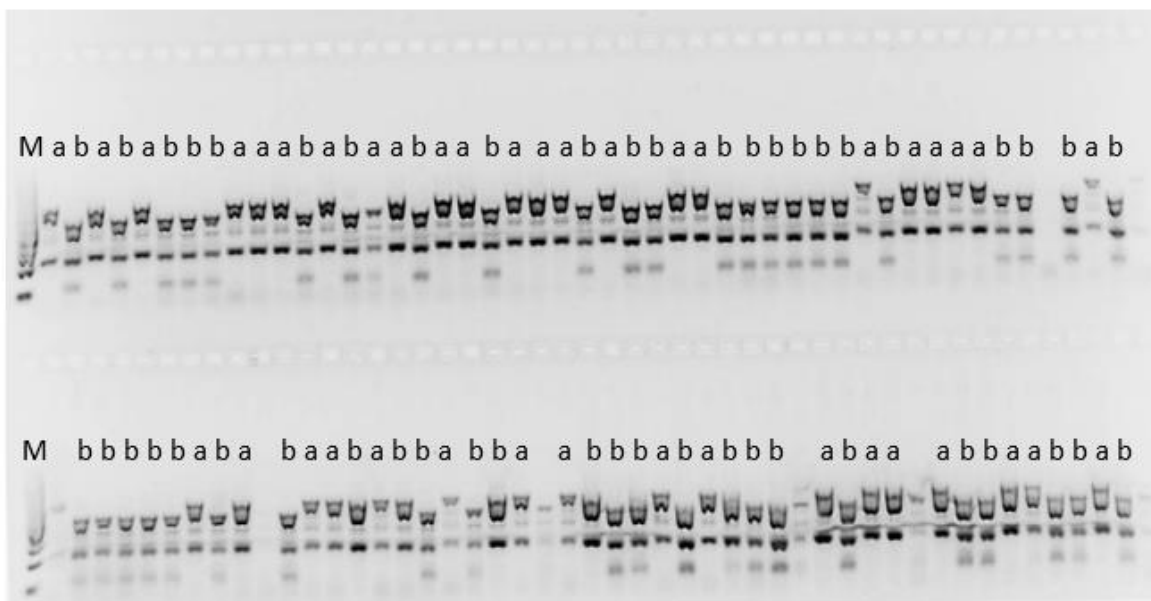
srovnání pomocí BLAST analýzy. Restriční profily získaných sekvencí rodičovských genotypů byly porovnány v programu Geneious.

Na základě sekvenování byly vybrány restriční enzymy k PCR produktům amplifikovaným příslušnými primery (viz Obrázek 17). Pro sekvenci amplifikovanou primery pro *Lc30146* byl použit restriční enzym *RsaI*. Pro sekvenci amplifikovanou primery pro *Lc32190* byl použit restriční enzym *AluI*. Restriční enzym *MboII* byl použit pro sekvenci amplifikovanou primery pro *Lc31299* i sekvenci amplifikovanou primery pro *Lc31310*. Pro sekvenci amplifikovanou primery pro *Lc31310* byl také použit restriční enzym *RsaI*.



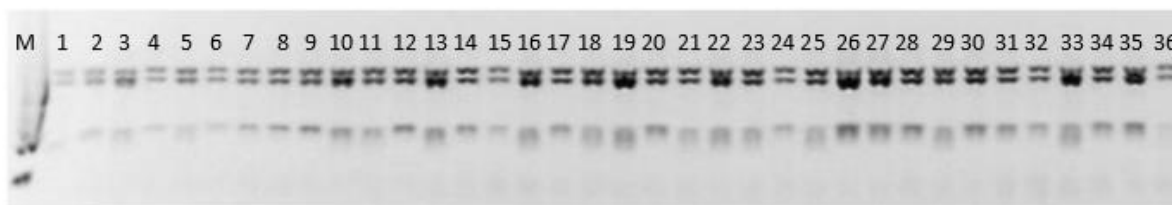
Obrázek 17- Ukázka polymorfních sekvencí markeru *Lc31310* u vzorků rodičovských genotypů a 2 RILs (ESTON, 72623)

Pro ověření funkčnosti na rodičovských genotypech bylo přistoupeno k testování mapovací RIL populace. Izolovaná DNA z RILs byla amplifikována danými primery pomocí PCR reakce. PCR produkty byly poté štěpeny danými restričními enzymy a výsledky restrikce byly zobrazeny pomocí elektroforézy (viz Obrázky 18-20) a zaznamenány do Tabulky 16. Byla použita také data získaná pomocí GBS sekvenování provedeného na University of Saskatchewan, v Kanadě v roce 2020. Na Obrázku 18 je štěpení PCR produktů jednotlivých RILs amplifikovaných primery pro *Lc30146* restričním enzymem *RsaI*, kde bylo možné určit varianty polymorfismu.



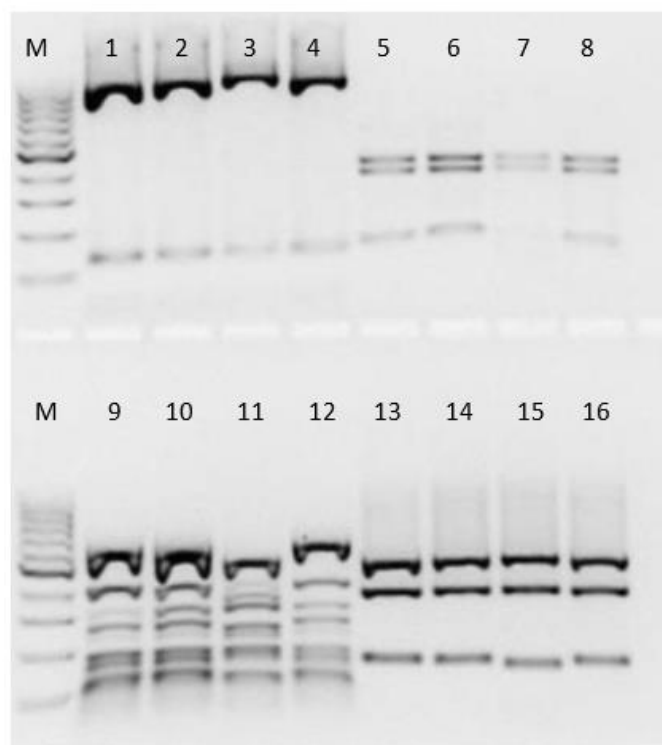
Obrázek 18- Ukázka restrikce PCR produktů jednotlivých RILs amplifikovaných genem *Lc30146* pomocí enzymu *RsaI*, M – marker molekulové hmotnosti, a – varianta polymorfismu pro nedormantní linie, b – varianta polymorfismu pro dormantní linie

Na Obrázku 19 můžeme vidět štěpení PCR produktů jednotlivých RILs amplifikovaných primery pro *Lc32190* restrikčním enzymem *AluI*. V tomto případě byly od sebe varianty polymorfismu nerozlišitelné a proto se nedaly použít pro genetické mapování.



Obrázek 19- Ukázka restrikce PCR produktů jednotlivých RILs amplifikovaných genem *Lc32190* pomocí enzymu *AluI*, M – marker molekulové hmotnosti, 1-36: jednotlivé RILs

Ukázku použití různých restrikčních enzymů pro štěpení PCR produktů rodičovských linií amplifikovaných různými primery lze vidět na Obrázku 20. U Restrikce PCR produktu rodičovských linií amplifikovaných primery pro *Lc31299* pomocí restrikčního enzymu *MboII*, PCR produktu rodičovských linií amplifikovaných primery pro *Lc32190* pomocí restrikčního enzymu *AluI* a PCR produktu rodičovských linií amplifikovaných primery pro *Lc31310* pomocí restrikčního enzymu *MboII* nelze určit varianty polymorfismu. U restrikce PCR produktu rodičovských linií amplifikovaných primery pro *Lc31310* pomocí restrikčního enzymu *RsaI* bylo potřeba provést restrikci všech RILs.



Obrázek 20- Ukázka restrikce PCR produktů amplifikovaných různými geny

Legenda: Ukázka restrikce PCR produktů amplifikovaných genem *Lc31299* enzymem *MboII* (1- 3339, 2- Eston , 3- 72623, 4- 72643), restrikce PCR produktů amplifikovaných genem *Lc32190* enzymem *AluI* (5- 3339, 6 - Eston, 7- 72623, 8 - 72643), restrikce PCR produktů amplifikovaných genem *Lc31310* enzymem *RsaI* (9- 3339, 10- Eston, 11- 72623, 12- 72643), restrikce PCR produktů amplifikovaných genem *Lc31310* enzymem *MboII* (13- 3339, 14- Eston, 15- 72623, 16- 72643), M- marker molekulové hmotnosti

Pro Tabulku 16 byla použita data testování bobtnání UPOL 2020 a jednalo se o interval 48 h. Varianta polymorfismu „a“ je typická pro nedormantní linie a varianta polymorfismu „b“ je typická pro dormantní linie, a to téměř u všech linií (viz Tabulka 16). U některých linií však některý gen nekoreloval s dormancí (např. linie 222 a gen *Lc30146*), ale koreloval s jinými geny, které se nacházely v blízkém okolí. To může značit rekombinaci. Některé linie jsou však zcela konfliktní (např. linie 227) a daná varianta nesouhlasí s dormancí u žádného genu. Konfliktních linií na základě přítomnosti druhé rodičovské alely bylo u varianty polymorfismu „b“ (dormantní linie) bylo 6 z celkových 41. Konfliktní linie na základě přítomnosti alely u varianty polymorfismu „a“ (nedormantní linie) byly 3 z celkových 41. Z celkových 82 linií použitých pro mapování tedy neodpovídalo 9 linií, u kterých nesouhlasí varianta polymorfismu s dormancí. Tyto linie je potřeba překontrolovat, jestli u nich nedošlo k chybě. U zbylých

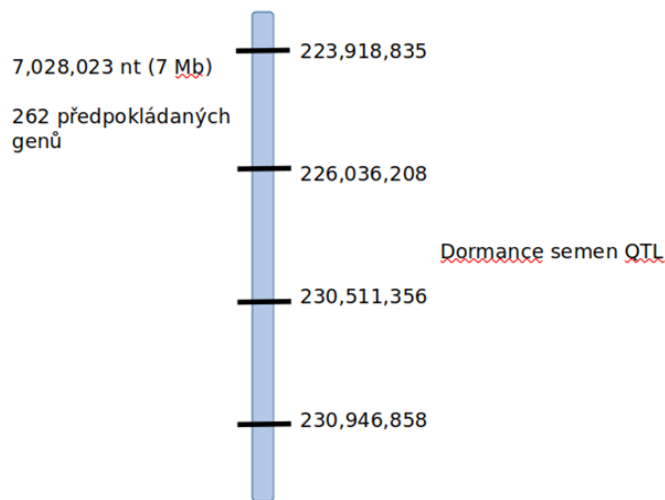
73 linií varianta polymorfismu souhlasí s dormancí, což naznačuje korelaci mezi těmito geny a dormancí a potvrzují správnost testovaného intervalu.

Tabulka 16- Část hodnocení polymorfismu RILs

RIL line	Test Bobtnání (%)	Lc31448	Lc30146	Lc31299	Lc31310	Lc31799
5	0,24	b	b	b	b	b
19	1,00	a	a	a	a	a
43	1,00	a	a	a	a	a
57	1,00	a	a	a	a	a
58	0,64	a	a	a	a	a
63	0,20	b	b	b	b	b
66	0,96	a	a	a	a	a
77	0,60	a	a	a	a	a
91	0,52	b	b	b	a	a
96	0,08	b	b	b	b	b
104	0,28	b	b	b	b	b
129	0,12	b	b	b	b	b
222	0,12	b	a	b	b	b
227	1,00	b	b	b	b	b

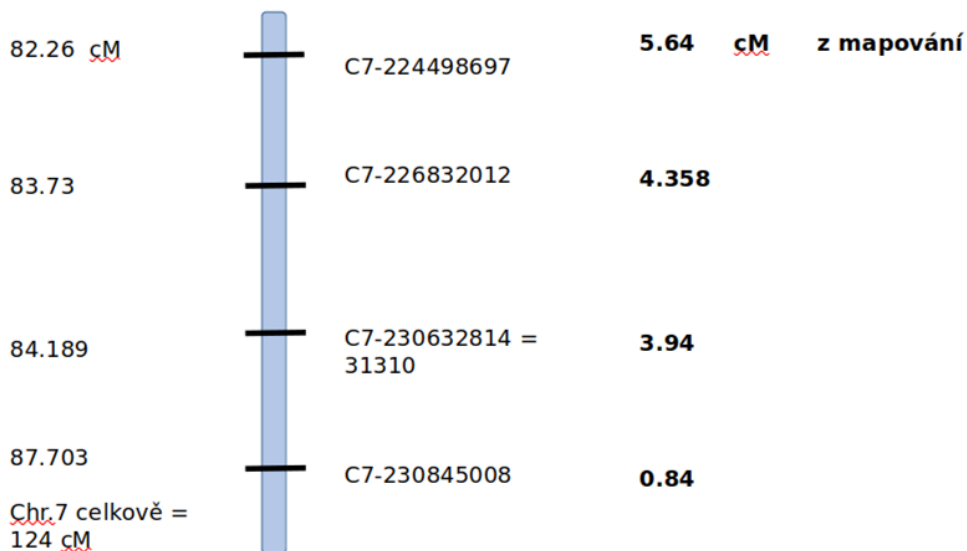
Následně byla konstruována genetická mapa pomocí programu MapDisto (Lorieux, 2012). Mapovací interval se nacházel na chromozomu 7 v rozmezí 223 918 835 nt a 230 946 858 nt a byl velký 7 Mb, u kterého se předpokládá výskyt 262 genů (viz Obrázek 21). Interval obsahuje geny, které souvisí s biosyntézou buněčné stěny a její modifikací. Mezi tyto geny patří 6 genů kódující glykosyltransferázu, 4 geny kódující pektinesterázu, 9 genů kódujících rostlinnou invertázu/inhibitor pektinmetylerázy, 1 gen kódující GDSL-like lipázu/acylhydrolázu, 1 gen kódující pektinacetylerázu, 1 gen kódující β -1,3-galaktosyltransferázu a 1 gen kódující β -glukosidázu. Mapovací interval však obsahuje další typy genů jako např. gen kódující protein jaderného transkripčního faktoru Y, gen kódující alanyl-tRNA syntetázu, geny kódující ribozomální protein ad. Geny vybrané pro tuto práci byly: *Lc32190*, gen kódující glykosyltransferázu, *Lc30146*, kódující rostlinnou invertázu/inhibitor pektinmetylerázy, *Lc31299*, gen kódující fosfatidylinositol-3 a -4-kinázu a *Lc31310*, gen kódující protein rodiny pektinacetyleráz. Gen *Lc32190* nebyl pro mapování použit. Pro mapování genů byla použita také data z Kanady a byly použity geny *Lc31448*, u kterého se předpokládá, že kóduje E3 ubiquitin-protein ligáza RING1-like protein, a *Lc31799*, který kóduje protein rodiny transducinů/WD-40 repeat protein. Některé geny zůstávají stále neprozkoumány a u některých genů na tomto intervalu není známa funkce vůbec.

Mapovací oblast na chromozomu 7 čočky



Obrázek 21- Mapovací oblast genomu na chromozomu 7 čočky

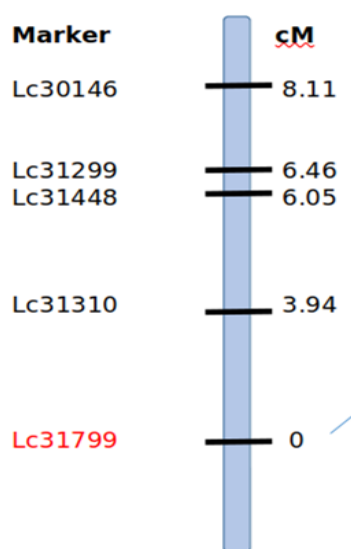
Byla také konstruována mapa na základě dat pocházejících z Kanady (viz Obrázek 22), kde se nacházel i kandidátní gen *Lc31310*. Pokud se marker C7-230845008 nachází ve vzdálenosti 0,84 cM, marker CZ-230632814 (odpovídá markeru *Lc31310*) byl ve vzdálenosti 3,94 cM, marker C7-226832012 ve vzdálenosti 4,358 cM a marker C7-224498697 byl ve vzdálenosti 5,64 cM.



Obrázek 22- Vzdálenost jednotlivých markerů získaných ze sekvenování genomu v Kanadě

Byly stanoveny vzdálenosti jednotlivých markerů (viz Obrázek 23). Pokud byl marker *Lc31799* ve vzdálenosti 0 cM, marker *Lc31310* se nacházel ve vzdálenosti 3,94 cM, marker

Lc31448 ve vzdálenosti 6,05 cM, marker *Lc31299* ve vzdálenosti 6,46 cM a marker *Lc30146* byl ve vzdálenosti 8,11 cM.



Obrázek 23- Genetická mapa se vzdálenostmi (cM) jednotlivých markerů na chromozomu 7 čočky

5.4 Hodnocení genové exprese pomocí RT-PCR analýzy

Pro prozkoumání molekulárních mechanismů a genů podílejících se na vývoji osemení, byly odebrány vzorky odděleně osemení a embrya ve 4 vývojových stádiích (10, 15, 20 a 25 DAP) a transkriptomické profily byly vytvořeny pomocí Illumina HiSeq 2500 provedené firmou Novogene Ltd. (UK).

Byly analyzovány 2 genotypy představující planou (*L. orientalis*) a kulturní čočku (*L. culinaris*). Kromě toho bylo také odebráno 28 a 20 vzorků osemení z vybraných RILs (buď dormantních nebo nedormantních). RNA-Seq data byla generována u obou duplikátů.

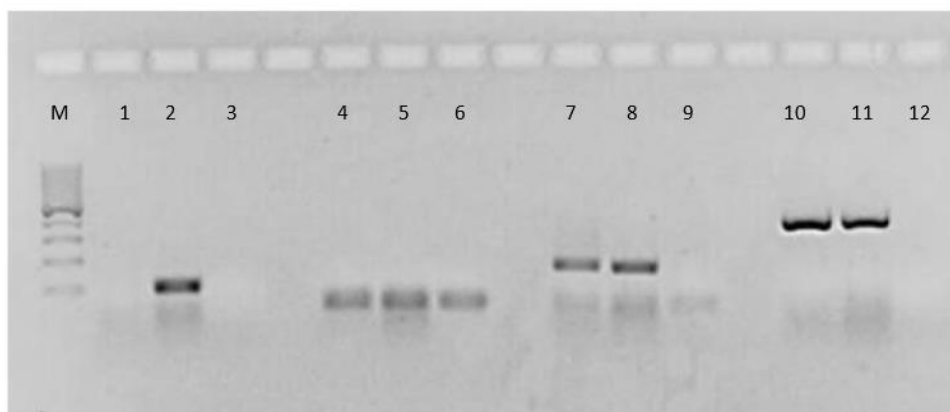
Na jednu knihovnu bylo v průměru 23,28 Mb čistých čtení (v rozmezí 19,2 až 32,26 Mb). Po kontrole kvality a filtrování provedeném na University of Saskatchewan byla čtení zpracována pro *downstream* analýzu, která zahrnovala mapování, složení referenčního genomu čočky a identifikaci diferenciólně exprimovaných genů. Exprese jednotlivých genů byla odhadována pomocí fragmentů na kilobázi na milion čtení (hodnoty FPKM).

Původním cílem práce bylo pracovat s diferenciólně exprimovanými geny pomocí RT-qPCR, což vzhledem k pandemii SARS-CoV-2 bohužel nebylo možné uskutečnit v plánovaném rozsahu. Získané vzorky izolované RNA byly odeslány k následné RNAseq analýze na přelomu roku 2019/2020. Raw sekvenační data byla získána v dubnu 2020, ale potřebné složení a mapování na genom bylo možné udělat až na jaře 2021. Bylo proto

přistoupeno k náhradnímu řešení – testování exprese genů použitých při genetickém mapování. Cílem tedy bylo zjištění, zda jsou geny exprimovány v osemeni, embryu a listu u sledovaných genotypů čočky *L. culinaris* i *L. orientalis*.

Z listů, osemení a embryí (24. den) rodičovských genotypů 3339 a IG72643 byla vyizolována a přečištěna RNA. Koncentrace izolované RNA byla zkontrolována na spektrofotometru NanoDrop 2000 a činila 180-1460 ng/μl. Čistota izolované DNA vypočítaná z poměru absorbancí (A260/A280) se pohybovala mezi 1,2 – 2,1, což by mohlo ukazovat na znečištěnou RNA.

Byl proveden přepis RNA na cDNA. S cDNA byla provedena amplifikace vybranými primery pomocí PCR reakce (viz Tabulka 6, Tabulka 8). Produkty RT-PCR analýzy byly zkontrolovány pomocí elektroforézy (viz Obrázek 24).



Obrázek 24- Kontrola exprese cDNA amplifikovanou různými geny

Legenda: kontrola exprese cDNA amplifikovanou genem *LcGADPH* (1- 72643 list, 2- 3339 list, 3- PCR premix s vodou jako kontrola), kontrola exprese cDNA amplifikovanou genem *Lc31634* (4- 72643 list, 5- 3339 list, 6 – PCR premix s vodou), kontrola exprese cDNA amplifikovanou genem *Lc31310* (7- 72643 list, 8- 3339 list, 9- PCR premix s vodou), kontrola exprese cDNA amplifikovanou genem *Lc30146* (10- 72643 list, 11- 3339 list, 12- PCR premix s vodou)

Na Obrázku 24 vidíme, že PCR produkt u referenčního genu *LcGADPH* se nachází pouze u vzorku 3339 list, obdobně tomu bylo i u vzorku 3339 embryo. Je tedy potřeba najít nový referenční gen. U genu *Lc31634* nebyl PCR produkt u žádného vzorku, ani u vzorků embryí či osemení. U genu *Lc31310* byl PCR produkt u všech vzorků – u obou listů, embryí i osemení. U genu *Lc30146* byl PCR produkt téměř u všech vzorků, s výjimkou vzorku 3339 osemení.

6 Diskuze

Dormance semen je důležitý mechanismus, který umožňuje rostlinám regulovat dobu klíčení, dokud nejsou vhodné podmínky pro přežití rostlin (Baskin *et al.*, 1998). Dormance semen je typická pro plané rostliny, u kterých může zajistit schopnost druhu přežít. Domestikované druhy byly naopak selektovány pro rychlé a uniformní klíčení (Bewley *et al.*, 1994). Problémem je, že měřit dormanci můžeme pouze *post facto* testováním klíčení, popř. bobtnání semen (Bradford *et al.*, 2007).

Domestikace rostlin je formována výběrem založeným na lidských preferencích, kultivačních postupech, prostředí a také na genetických procesech plynoucích z následného snižování efektivní velikosti populace (Gross *et al.*, 2010; Olsen *et al.*, 2013; Cowling *et al.*, 2009). Pro pochopení genetické a biologické podstaty slouží mj. křížení kulturních a planých genotypů a následné mapování na základě jejich rekombinantních inbredních linií.

Velikost genomu čočky (*Lens culinaris*) je 4,3 Gb. Sestavení genomu čočky v1.0, která byla založená na odrůdě CDC Redberry, bylo zpřístupněno v lednu 2016 (Bett *et al.*, 2016). K dispozici je však pouze genom kulturní čočky *L. culinaris*. Zdá se, že genom čočky je díky vysokému zastoupení repetitivních sekvencí a retrotranspozónů velmi dynamický a bohužel dosud není zcela kompletní. Pro genetické mapování se používají hybridy *L. culinaris* a *L. orientalis*. Bohužel genom plané čočky *L. orientalis* není dosud zpřístupněn, ale lze předpokládat, že se odlišuje od genomu kulturní čočky a to nejen inverzemi, transpozicemi, ale velmi pravděpodobně i přítomností nebo naopak absencí mnohých genů, podobně jako u plané a kulturní kukuřice (Díez *et al.*, 2013).

Analýza fenotypu

Různorodost kategorií mezi daty z různých měření (UPOL 2020, UVM 2018, Canada 2019 - SPG, Canada 2019 – Suth; viz Obrázek 7) může být způsobena různými podmínkami pěstování. Semena pocházejí z rostlin použitých pro data UPOL 2020 byla vypěstována ve skleníku, zatímco semena u ostatních dat (UVM 2018, Canada 2019 – SPG, Canada 2019 – Suth) pocházejí z rostlin vypěstovaných venku na poli. Ladizinsky (1985) zjistil, že semena kulturní čočky jsou schopná vyklíčit krátce po dozrání při vhodných podmínkách teploty a vlhkosti. Za stejných podmínek však semena plané čočky nevyklíčí ani po delší době. Pěstování při různých měření probíhalo tedy za různé teploty a vlhkosti, jelikož se jednalo o pěstování ve skleníku a venku na poli. To mohlo ovlivnit výsledky. Test bobtnání UPOL 2020 byl proveden téměř 2 měsíce po sklizni, naopak test bobtnání u kanadských dat byl vzhledem

k pandemii SARS-CoV-2 proveden až 9 měsíců po sklizni, což mohlo také ovlivnit různé výsledky. Další chybou mohla být i nepřesnost měření. Mohlo se také jednat o další chyby měření u ostatních dat, protože v souboru dat Canada 2019-SPG se nenachází žádné dormantní linie, což se jeví spíše jako nepravděpodobné. Dále u souboru dat Canada 2019 – Suth patří kulturní rodičovská linie 3339 mezi dormantní linie, což neodpovídá skutečnosti. Pro potvrzení rozdílů mezi pěstováním ve skleníku a pěstováním na poli je však potřeba provést experiment, při kterém se budou rostliny pěstovány souběžně při obou podmínkách.

Barva osemení je u čočky určena dvěma nezávislými geny: *Ggc* a *Tgc* (Slinkard, 1990). Dominantní a recesivní alelické kombinace těchto dvou genů mohou způsobovat různé barvy osemení. Ukázkou různých barev lze vidět na Obrázku 11. Třída čočky s nulovým taninem je určena expresí recesivního genu *tan* (Vaillancourt *et al.*, 1986; Muehlbauer *et Sarker*, 2011). Pro gen *tan* jsou typické dané znaky: bílé květy a tenké průhledné či průsvitné osemení. Pro dormantní rostliny jsou naopak typické fialové žilky na květech a tlustší pigmentované osemení (Vaillancourt *et al.*, 1986). Tyto vlastnosti jsou podobné jako u Mendelova genu A u hrachu (Mendel, 1865), který kóduje bHLH transkripční faktor (Hellens *et al.*, 2015). Podle Mirali *et al.* (2016) gen *tan* kóduje bHLH transkripční faktor, což by tedy mohl být homolog genu A u hrachu. Gen *tan* podmiňující barvu osemení a květu (Mirali *et al.*, 2016) se nachází v syntenické pozici na lokusu A u hrachu (Hellens *et al.*, 2010) a lokusu B u cizrny (Penmetsa *et al.*, 2016). Mezi barvou květu a barvou osemení tedy existuje vztah (viz Obrázek 12), což se potvrdilo u dat UPOL 2020, kdy 90 linií ze 121 odpovídalo těmto vlastnostem. 33 linií mělo bílé květy a nepigmentované osemení (nedormantní linie) a 57 linií mělo barevné květy a pigmentovaná semena (dormantní linie). Zbylé linie neodpovídaly a obsahovaly bílý květ a pigmentované osemení nebo barevný květ a nepigmentované osemení. U těchto linií je potřeba experiment zopakovat.

Dormance semen plané čočky je způsobena nepropustností osemení pro vodu, popř. plyny (Ladizinsky, 1985). Redukování tloušťky osemení vedlo ke zvýšení propustnosti osemení během domestikace bobovitých (Smýkal *et al.*, 2014). Tenčí osemení vede následně k rychlejšímu uvaření a snadnějšímu loupání (Matus *et al.*, 1993; Smýkal *et al.*, 2014). Hradilová *et al.* (2017) našli rozdíly v povrchu osemení, velikosti makroklereid a tloušťce osemení, když analyzovali dormantní linie hrachu (*Pisum elatius*), nedormantní linie hrachu (*Pisum sativum*) a příslušné rekombinantní inbrední linie. Dormantní genotypy vykazovaly silnější palisádovou vrstvu makroklereid a vyšší obsah specifických mastných kyselin. U čočky byla průměrná velikost makroklereid dormantního rodičovského genotypu (IG72643)

94,69 μm a u nedormantního rodičovského genotypu (3339) 79,41 μm (viz Tabulka 13). Mezi rodičovskými genotypy je tedy rozdíl 15,28 μm . Rozpětí průměrných hodnot velikosti makroklereid bylo u dormantních linií mezi 88,92 μm a 116,97 μm (viz Tabulka 15) a u nedormantních linií mezi 76,03 μm a 91,69 μm (viz Tabulka 14). Vzhledem k tomu, že některé dormantní linie měly podobnou průměrnou velikost makroklereid s těmi nedormantními, je potřeba provést experiment se všemi RILs, abychom mohli jednoznačně určit, zda velikost makroklereid souvisí s dormancí semen čočky. Shao *et al.* (2007) také zjistili, že kutikula dormantních linií sóji obsahuje vyšší množství hydroxylovaných mastných kyselin. Hradilová *et al.* (2017) také zjistili, že existuje vztah mezi barvením toluidinovou modří a pigmentací osemení. Nedormantní nepigmentovaná rodičovská linie vykazovala vyšší hladinu polyanionických pektinů a nedormantní pigmentovaná rodičovská linie vykazovala nižší množství aniontů souvisejících s pektiny, podobně jako dormantní pigmentované linie. Buněčné stěny s nízkým obsahem pektinu se obarví modrou, zatímco vzorky s vysokým obsahem pektinů se barví fialově až růžově (Soukup, 2014). Buněčné stěny obsahující lignifikované/fenolické sloučeniny mají nižší koncentraci acidických skupin, proto se barví nazelenale. Buněčné stěny s vakuolami obsahujícími tanin se mohou barvit zeleně až výrazně modře (Soukup, 2014). V rámci barvení toluidinovou modří u vzorků v této práci nebylo možné rozpoznat obsah pektinů v jednotlivých strukturách osemení a proto je potřeba provést barvení jinými barvivy.

Analýza genotypu

Zatímco je genetický mechanismus dormance do značné míry neznámý, změny v úrovni dormance jsou řízeny několika lokusy u některých druhů bobovitých (Koinange *et al.*, 1996; Forbes *et al.*, 1968; Ladizinsky, 1985; Isemura *et al.*, 2010; Isemura *et al.*, 2012; Kongajaimun *et al.*, 2012). U vigny čínské bylo detekováno 6 QTL souvisejících s dormancí semen (Kongajaimun *et al.*, 2012). U hrachu byly identifikovány 2 až 3 lokusy zapojené v dormanci, konkrétně tloušťka osemení a struktura povrchu osemení (Weeden, 2007). U fazole mungo byla dormance identifikována jako monogenní vlastnost (Isemura *et al.*, 2012). Nedávno byly objeveny 2 geny zapojené v propustnosti osemení u sóji (Jang *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015).

Pro genetické mapování byly použity geny nacházející se v mapovacím intervalu o velikosti 7 Mb nacházejícím se na chromozomu 7. Na mapování bylo použito 82 RILs. Běžně se však pro mapování využívá většího počtu mapovacích jedinců. Aby bylo mapování co nejpřesnější, používají se stovky až tisíce jedinců.

Byly vybrány specifické genetické markery, které definují vybrané QTLs, aby mohly být lokalizovány geny související s dormancí. Byla provedena amplifikace vybraných markerů a následně sekvenování ampliconů. Poté bylo provedeno štěpení pomocí restričních enzymů a výsledky byly zaznamenány do Tabulky 16. Cílem bylo zjistit, zda jedinec vykazující daný fenotyp získal genetický marker od rodiče se stejným projevem či od rodiče s opačným projevem. Míra kompatibility výsledku určuje, jak jsou dané genetické markery vzdáleny od hledaného genu.

Kandidátní gen *Lc32190* patří do skupiny genů pro glykosyltransferázu. U rostlin zodpovídají za glykosylaci důležitých rostlinných produktů, jejichž správné fungování pomáhá přežití v nepříznivých podmínkách. Glykosyltransferázy jsou enzymy, které jsou zapojeny v modifikaci sekundárních metabolitů, fytohormonů a xenobiotik tím, že přenášejí sacharidové skupiny z aktivovaných nukleotidových molekul na širokou škálu akceptorů. Tato skupina enzymů byla zkoumána např. u cizrny (*Cicer arietinum*), kde bylo definováno 96 genů pro glykosyltransferázu (Sharma *et al.*, 2014). Tento kandidátní gen ale pro mapování použit nebyl a je potřeba jej dále prozkoumat.

Kandidátní gen *Lc30146* patří mezi geny kódující invertázu/inhibitor pektinmetylerázy. Homologní sekvence toho genu byla nalezena také u *Medicago*, cizrny i hrachu. Inhibitor pektinmetylerázy je proteinový inhibitor, který moduluje aktivitu pektinmetylerázy. Souhra mezi těmito dvěma proteiny je považována za determinant buněčné adheze, pórovitosti buněčné stěny a také zdroj signálních molekul uvolněných při stresu buněčné stěny (Wormit *et Usadel*, 2018). U semen *Arabidopsis* vede aktivita pektinmetylerázy pravděpodobně ke slábnutí buněčné stěny pro vytvoření kořínku (Müller *et al.*, 2013; Scheler *et al.*, 2015). Nízká hladina pektinmetylerázy a inhibitoru pektinmetylerázy je silně up-regulována po klíčení a také v přítomnosti kyseliny abscisové, která zpomaluje slábnutí buněčné stěny a následnou trhlinu (Scheler *et al.*, 2015). Over-exprese inhibitoru pektinmetylerázy 15 u *Arabidopsis* vede ke snížené aktivitě pektinmetylerázy, což je doprovázeno dřívějším a rychlejším klíčením v porovnání s wild-typem (Müller *et al.*, 2013). To naznačuje, že aktivita těchto inhibitorů je nezbytná pro časování klíčení.

Kandidátní gen *Lc31310* je identifikovaný jako gen pro protein z rodiny pektinacetyleráz. Homologní sekvence byla nalezena u *Medicago*, cizrny a hrachu. Biologická funkce této skupiny enzymů je málo známá. Bylo však prokázáno, že mutanti, kterým chybí specifické pektinacetylerázy, vykazují změny v tuhosti buněčné stěny a také vykazují vývojové vady (de Souza *et al.*, 2014; Gou *et al.*, 2012; Orfila *et al.*, 2012). Soltani

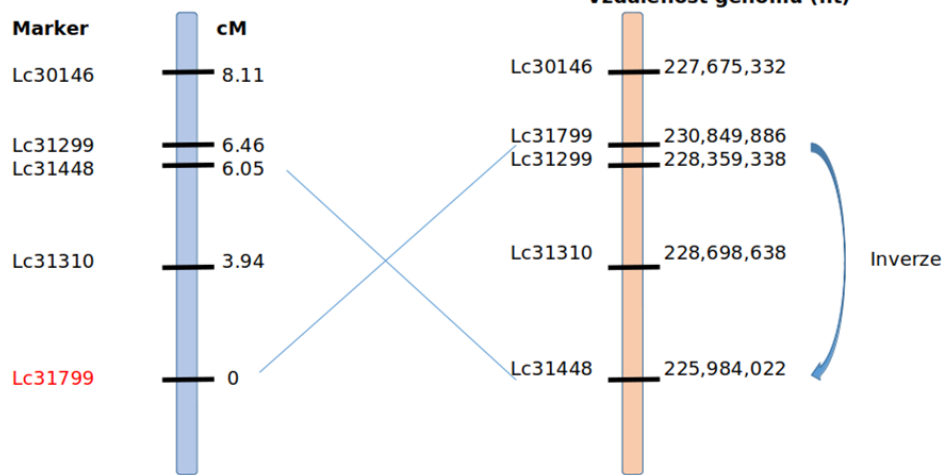
et al. (2021) odhalili inzerci u ortologu pektin-acetylerázy 8, která způsobuje ztrátovou mutaci u nedormantního genomu fazole (*Phaseolus vulgaris* L.). Analýza genové exprese kontrastních genotypů naznačuje 21x nižší expresi genu pro pektin-acetylerázu 8 u nedormantních genotypů. Planá fazole obsahovala funkční alelu pektin-acetylerázy 8 a kulturní fazole obsahovala nefunkční alelu. To mohlo být způsobeno silným selekčním tlakem během domestikace, což dokazuje vliv pektin-acetylerázy 8 v dormanci semen fazole.

Kandidátní gen *Lc31299* je gen kódující fosfatidylinositol-3- a -4-kinázu. Homologní sekvence se nachází u *Medicago* a hrachu. Fosfatidylinositol-3-kinázy se nachází u rostlin i živočichů. Fosfatidylinositol-3-kináza je důležitá pro normální růst rostlin a reakce na stres (Liu *et al.*, 2012). U rostlin reguluje dynamiku aktinu v buňkách. Fosfatidylinositol-4-kináza je také asociována s aktinovým cytoskeletem v rostlinných buňkách (Choi *et al.*, 2007). Liu *et al.* (2012) zjistili, že fosfatidylinositol-3-kináza hraje zásadní roli při klíčení semen rýže prostřednictvím regulace aktivity NADPH oxidázy. Potlačení aktivity fosfatidylinositol-3-kinázy inhibitory by mohlo zmírnit tvorbu ROS, což má za následek narušení klíčení semen.

V rámci diplomové práce byly zjištěny vzdálenosti jednotlivých markerů, které byly předány potomstvu společně, tzn. že jsou na sebe vázány a nacházejí se na stejném chromozomu v poměrně blízké vzdálenosti. Z 82 linií použitých pro mapování odpovídala varianta polymorfismu s dormancí u 73 linií. Bylo tedy zjištěno, že tyto geny mají určitou korelaci s dormancí semen.

Získaná genetická mapa byla porovnána se vzdálenostmi osekvenovaného genomu *L. culinaris*: CDC Redberry Genome Assembly v1.2 (viz Obrázek 25). Můžeme vidět, že pořadí genů je jiné. Naznačuje to, že mezi markery *Lc31448* a *Lc31799* pravděpodobně došlo k inverzi. Otázkou však zůstává, která verze pořadí je správná. Jelikož osekvenovaný genom není kompletní a může se v něm tedy nacházet chyba jak v pořadí, tak i anotační. Musíme brát také v potaz i to, že osekvenovaný je pouze genom kulturní čočky *L. culinaris* a nikoliv genom plané čočky *L. orientalis*. Pořadí genů v genomu plané čočky může být jiné. Pro další studium této problematiky bude potřeba použít mj. transkriptomickou srovnávací analýzu pro zjištění diferenciálně exprimovaných kandidátních genů, tak jak bylo původně plánováno i pro tuto práci.

Mapování na RIL populacích *L. culinaris* x *L. orientalis*



Obrázek 25- Porovnání zkounstruované genetické mapy (vlevo) s osekvenovaným genomem (vpravo)

7 Závěr

Úkolem této diplomové práce bylo identifikovat lokusy podmiňující dormanci planého předchůdce čočky (*Lens orientalis*). K tomu byly použity rodičovské genotypy kulturní čočky (*Lens culinaris*, 3339) a plané čočky (*Lens orientalis*, IG72643) a 121 rekombinantních inbredních linií (RIL). Tyto RILs byly použity pro genetické mapování a analýzu fenotypu.

Porovnáním fenotypových dat z testování dormance byly zjištěny rozdíly, což je nejspíš způsobeno různými podmínkami pěstování. Dále bylo potvrzeno, že pigmentace osemení a barva květu souvisí s dormancí semene. Pro dormantní genotypy jsou typické barevné květy a tlustší pigmentované osemení a pro nedormantní naopak bílé květy a tenčí průhledné osemení. 90 linií ze 121 odpovídalo svými vlastnostmi s dormancí.

Pro genové mapování byly použity geny z mapovacího intervalu o velikosti 7 Mb na chromozomu 7. Ze vzdálenosti jednotlivých markerů bylo zjištěno, že kandidátní geny *Lc31299*, *Lc31310*, *Lc30146* jsou na sebe vázané a vykazují korelaci s dormancí semene. U kandidátních genů *Lc31799* a *Lc31448* se pravděpodobně nachází inverze po srovnání s již osekvenovaným genomem kulturní čočky (*Lens culinaris*). Pro další studium těchto kandidátních genů bude potřeba použít i transkriptomickou srovnávací analýzu pro zjištění diferenciálně exprimovaných kandidátních genů.

8 Literatura

Abbo S, Gopher A. 2017. Near Eastern Plant Domestication: A History of Thought. *Trends Plant Sci.* 22: 491–511.

Abbo S, Pinhasi van-Oss R, Gopher A, Saranga Y, Ofner I, Peleg, Z. 2014. Plant domestication versus crop evolution: A conceptual framework for cereals and grain legumes. *Trends Plant Sci.* 19: 351–360.

Amen RD.1968. A model of seed dormancy. *Botanical Review* 34: 1–31.

Andriunas, FA, Zhang HM, Xia X, Patrick JW, Offler CE. 2013. Intersection of transfer cells with phloem biology-broad evolutionary trends, function, and induction. *Front. Plant Sci.* 4: 221.

Argel P, Paton C. 1999. “Overcoming legume hardseededness,” in *ForageSeed Production: Tropical and Subtropical Species*, Vol. 2, eds D. S. Loch and J. E. Ferguson (Wallingford: CAB International), 247–265.

Arumuganathan K, Earle ED. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Reporter*: 9.

Ates D, Aldemir S, Alsaleh A, Erdogmus S, Nemli S, Kahriman A, Ozkan H, Vandenberg A, Tanyolac B. 2018. A consensus linkage map of lentil based on DArT markers from three RIL mapping populations. *PLoS ONE* 13(1): e0191375.

Ballard LAT. 1973. Physical barriers to germination. *Seed Sci. Technol.* 1: 285–303.

Balyan HS, Houben A, Ahne R. 2002. Karyotype analysis and physical mapping of 18S-5.8S-25S and 5S ribosomal RNA loci in species of genus *Lens* Miller (*Fabaceae*). *Caryologia* 55: 121–128.

Barulina H. 1930. Lentil of the U.S.S.R. and of other countries. *Bull Appl Bot Plant Breed Suppl.* 40:1–319.

Baskin CC. 2003. Breaking physical dormancy in seeds – focussing on the *Lens*. *New Phytol.* 158: 229–232.

Baskin CC, Baskin JM. 1998. *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination.* Academic Press, San Diego.

Baskin CC, Baskin JM. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1–16.

Baskin JM, Baskin CC, Li X. 2000. Taxonomy, ecology, and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology* 15: 139–152.

Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J. 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *The Plant Cell* 12: 1103–1115.

Bett K, Chan C, Sharpe AG, Cook D, Penmetsa RV, Chang P, Coyne CJ, McGee R, Main D, Dolezel J, Edwards D, Kaur S, Agrawal SK, Udupa SM, Vandenberg A. 2016. The Lentil Genome – from the sequencer to the field. *International Conference on Pulses.* Marrakesh, Morocco: 18-20 April.

Bevilacqua LR, Fossati F, Dondero G. 1987. ‘Callose’ in the impermeable seed coat of *Sesbania punicea*. *Ann. Bot.* 59: 335–341.

Bevilacqua LR, Roti-Mihelozzi G, Modenesi P. 1989. The watertight dormancy of *Melilotus alba* seeds: further observations on the palisade cell wall. *Can. J. Bot.* 67: 3453–3456.

Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055–1066.

Bewley JD, Black M. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination.* New York: Plenum. 367 pp.

Bhadauria V, Ramsay L, Bett KE, Banniza S. 2017. QTL mapping reveals genetic determinants of fungal disease resistance in the wild lentil species *Lens ervoides*. *Sci Rep* 7: 3231.

Bhalla PL, Slattery HD. 1984. Callose deposits make clover seeds impermeable to water. *Ann. Bot.* 53: 125–128.

Bhatty RS. 1988. Composition and quality of lentil (*Lens culinaris* Medik.): a review. *Canadian Institute of Food Science and Technology* 21: 144-160.

Berger JD, Shrestha D, Ludwig C. 2017. Reproductive Strategies in Mediterranean Legumes: Trade-Offs between Phenology, Seed Size and Vigor within and between Wild and Domesticated *Lupinus* Species Collected along Aridity Gradients. *Front. Plant Sci.* 8: 548.

Blenda A, Fang DD, Rami JF, Garsmeur O, Luo F, Lacape JM. 2012. A high density consensus genetic map of tetraploid cotton that integrates multiple component maps through molecular marker redundancy check. *PLoS One* 7(9): e45739.

Boesewinkel FD, Bouman F. 1984. The seed: structure. In: *Embryology of Angiosperms* (ed. B.M. Johri), pp. 567–610. Springer-Verlag, Berlin.

Butler EA. 1988. “The SEM and seed identification, with particular reference to the Viciae,” in *Scanning Electron Microscopy in Archeology*, Vol. 452, ed. S. L. Olsen (Oxford: BAR International Series), 215–224.

Chai M, Zhou C, Molina I, Fu C, Nakashima J, Li G, Zhang W, Park J, Tang Y, Jiang Q, Wang ZY. 2016. A class II KNOX gene, KNOX4, controls seed physical dormancy. *PNAS* 113(25): 6997-7002.

Choi Y, Lee Y, Jeon BW, Staiger CJ, Lee Y. 2008. Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate modulate actin filament reorganization in guard cells of day flower. *Plant Cell Environ.* 31(3): 366-77.

Clerkx EJM, Blankestijn-de Vries H, Ruys GJ, Groot SPC, Koornneef M. 2003. Characterization of green seed, an enhancer of *abi3-1* in *Arabidopsis* that affects seed longevity. *Plant Physiol.* 132:1077–84.

Corner EJH. 1951. The leguminous seed. *Phytomorphology* 1: 117–150.

Cowling WA, Buirchell BJ, Falk DE. 2009. A model for incorporating novel alleles from the primary gene pool into elite crop breeding programs while reselecting major genes for domestication or adaptation. *Crop Pasture Sci.* 60: 1009–1015.

Da Silva EAA, Toorop PE, van Aelst AC, Hilhorst HWM. 2004. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta* 220: 251–261.

Dadu RHR, Ford R, Sambasivam P, Gupta D. 2017. A novel *Lens orientalis* resistance source to the recently evolved highly aggressive Australian *Ascochyta lentis* Isolates. *Front Plant Sci* 8: 1038.

de Souza A, Hull PA, Gille S, Pauly M. 2014. Identification and functional characterization of the distinct plant pectin esterases PAE8 and PAE9 and their deletion mutants. *Planta* 240:1123-38.

Deshpande, SS, Cheryan M. 1986. Microstructure and water uptake of Phaseolus and winged beans. *J. Food Sci.* 51: 1218–1223.

Díez CM, Gaut BS, Meca E, Scheinvar E, Montes-Hernandez S, Eguiarte LE, Tenailon MI. 2013. Genome size variation in wild and cultivated maize along altitudinal gradients. *New Phytol.* 199(1):264-276.

Durán Y, Pérez de la Vega M. 2004. Assessment of genetic variation and species relationships in a collection of *Lens* using RAPD and ISSR. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4: 538–544.

Egley GH. 1989. Water-impermeable seed coverings as barriers to germination. In: *Recent Advances in the Development and Germination of Seeds* (ed. R. B. Taylorson) pp. 207–223. Plenum Press, New York.

Erskine W, Muehlbauer FJ, Sarker A, Sharma B. 2009. *The Lentil: botany, production and uses.* Wallingford: CABI. ISBN 978-1-84593-487-3.

Erskine W, Rihawe S, Capper BS. 1990. Variation in lentil straw quality. *Animal Feed Science and Technology* 28: 61–69.

Esau K. 1965. *Plant Anatomy*, 2nd Edn. New York: John Wiley.

FAO, FAOSTAT. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy. Volume 2015.

Ferguson ME, Maxted N, Slageren MV, Robertson LD. 2000. A re-assessment of the taxonomy of *Lens Mill.* (*Leguminosae, Papilionoideae, Viciae*). *Bot J Linn Soc.* 133:41–59.

Fernández M, Ruiz ML, Linares C, Fominaya A, Pérez de la Vega M. 2005. The 5S rDNA genome regions of *Lens* species. *Genome* 48: 937–942.

Fiala JV, Tullu A, Banniza S, Séguin-Swartz G, Vandenberg A. 2009. Interspecies transfer of resistance to anthracnose in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Crop Sci.* 49: 825–830.

Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. 2008. Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:387–415

Finkelstein RR, Campala SSL, Rock CD. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* 14: S15–S45.

Fratini R, Durán Y, García P, Pérez de la Vega M. 2007. Identification of quantitative trait loci (QTL) for plant structure, growth habit and yield in lentil. *Spanish J Agricul Res.* 5(3): 348–356.

Fratini R, Ruiz ML. 2006. Interspecific hybridization in the genus *Lens* applying in vitro embryo rescue. *Euphytica* 150: 271–280.

Fratini R, Ruiz ML, Pérez de la Vega M. 2004. Intra-specific and inter-subspecific crossing in lentil (*Lens culinaris* Medik.) *Canadian Journal of Plant Science* 84: 981–986.

Forbes I, Wells HD. 1968. Hard and soft seededness in blue lupine, *Lupinus angustifolius* L.: inheritance and phenotype classification. *Crop Sci.* 8:195–7.

Fuller DQ, Allaby R. 2009. Seed Dispersal and Crop Domestication: Shattering, Germination and Seasonality in Evolution under Cultivation. In *Annual Plant Reviews: Fruit Development and Seed Dispersal*; Østergaard, L., Ed.; **John Wiley & Sons**: Hoboken, NJ, USA; Volume 38.

Galasso I. 2003. Distribution of highly repeated DNA sequences in species of the genus *Lens* *Miller*. *Genome.* 46:1118–1124.

Galbiati F, Sinha Roy D, Simonini S, Cucinotta M, Ceccato L, Cuesta C, Simaskova M, Benkova E, Kamiuchi Y, Aida M, Weijers D, Simon R, Masiero S, Colombo L. 2013. An integrative model of the control of ovule primordia formation. *Plant J.* 76: 446–455.

Gaur R, Jeena G, Shah N, Gupta S, Pradhan S, Tyagi AK, Jain M, Chattopadhyay D, Bhatia S. 2015. High density linkage mapping of genomic and transcriptomic SNPs for synteny analysis and anchoring the genome sequence of chickpea. *Scientific reports* 5.

Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P. 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12: 1117–1126.

Goldberg RB, de Paiva G, Yadegari R. 1994. Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266: 605–614.

Gorim LY, Vandenberg A. 2017. Evaluation of wild lentil species as genetic resources to improve drought tolerance in cultivated lentil. *Front Plant Sci* 8: 1129.

Gou JY, Miller LM, Hou G, Yu XH, Chen XY, Liu CJ. 2012. Acetyltransferase-mediated deacetylation of pectin impairs cell elongation, pollen germination, and plant reproduction. *The Plant Cell* 24:50-65

Gremer JR, Kimball S, Venable DL. 2016. Within-and among-year germination in Sonoran Desert winter annuals: Bet hedging and predictive germination in a variable environment. *Ecol. Lett.* 19: 1209–1218.

Gross BL, Olsen KM. 2010. Genetic perspectives on crop domestication. *Trends Plant. Sci.* 15: 529–537.

Güneş F. 2013. Seed characteristics and testa textures of *Pratensis*, *Orobon*, *Lathyrus*, *Orobastrum* and *Cicerula* sections from *Lathyrus* (Fabaceae) in Turkey. *Plant Syst. Evol.* 299: 1935–1953.

Gujaria-Verma N, Vail SL, Carrasquilla-Garcia N, Penmetsa RV, Cook DR, Farmer AD, Vandenberg A, Bett KE. 2014. Genetic mapping of legume orthologs reveals high conservation of synteny between lentil species and the sequenced genomes of *Medicago* and chickpea. *Front Plant Sci* 5: 676.

Gunn CR. 1981. Seed topography in the Fabaceae. *Seed Sci. Technol.* 9: 737–757.

Hamly DH. 1932. Softening of the seeds of *Melilotus alba*. *Botanical Gazette* 93: 345–375.

Hamly DH. 1935. The light line in *Melilotus alba*. *Bot. Gaz.* 96: 753–757.

Hammer K. 1984. Das Domestikationssyndrom. *Die Kulturpflanze* 32: 11–34.

Hamwieh A, Udupa S, Choumane W, Sarker A, Dreyer F, Jung C, Baum M. 2005. A genetic linkage map of *Lens* sp. based on microsatellite and AFLP markers and the localization of fusarium vascular wilt resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 110(4):669–77.

Harlan JR. 1992. *Crops and Man*; American Society of Agronomy: Madison, WI, USA.

Harper JL. 1959. The ecological significance of dormancy and its importance in weed control. In: *Proceedings of the IVth International Congress of Crop Protection, Hamburg, September 1957, Vol. 4: pp. 415–420.*

Harris WM. 1983. On the development of macrosclereids in seed coats of *Pisum sativum* L. *Am. J. Bot.* 70: 1528–1535.

Harris WM. 1984. On the development of osteosclereids in seed coats of *Pisum sativum* L. *New Phytol.* 98: 135–141

Harris WM. 1987. Comparative ultrastructure of developing seed coats of ‘hard-seeded’ and ‘soft-seeded’ varieties of soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Bot. Gaz.* 148: 324–331.

Hartwig EE, Potts HC. 1987. Development and evaluation of impermeable seed coats for preserving soybean seed quality. *Crop Sci* 27: 506–508.

Heatherly LG, Kenty MM, Kilen TC. 1995. Effects of storage environment and duration on impermeable seed coat in soybean. *Field Crops Research* 40: 57–62.

HelLens RP, Moreau C, Lin-Wang K, Schwinn KE, Thomson SJ, Fiers MWEJ, Frew TJ, Murray SR, Hofer JMI, Jacobs JME, Davies KM, Allan AC, Bendahmane A, Coyne CJ, Timmerman-Vaughan GM, Ellis THN. 2010. Identification of Mendel’s white flower character. *PLoS ONE* 5(10): e13230.

Hilhorst HWM. 1998. The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited. *Seed Science Research* 8: 77–90.

Hilhorst HWM, Karssen CM. 1992 Seed dormancy and germination: The role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regulation* 11: 225–238.

Holdsworth M, Kurup S, McKibbin R. 1999. Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends in Plant Science* 4: 275–280.

Hou FF, Thseng FS. 1991. Studies on the flooding tolerance of soybean seed: varietal differences. *Euphytica* 57: 169–173.

Hradilová I, Trněný O, Válková M, Cechová M, Janská A, Prokešová L, Aamir K, Krezdorn N, Rotter B, Winter P, Varshney RK, Soukup A, Bednář P, Hanáček P, Smýkal P. 2017. A Combined Comparative Transcriptomic, Metabolomic, and Anatomical Analyses of Two Key Domestication Traits: Pod Dehiscence and Seed Dormancy in Pea (*Pisum* sp.). *Front Plant Sci* 8:542.

Hu XW, Wanga YR, Wua YP, Baskin CC. 2009. Role of the *Lens* in controlling water uptake in seeds of two Fabaceae (Papilionoideae) species treated with sulphuric acid and hot water. *Seed Sci. Res.* 19: 73.

Hyde EOC. 1954. The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to ripening of the seed and the permeability of the testa. *Ann. Bot.* 18: 241–256.

Isemura T, Kaga A, Tabata S, Somta P, Srinives P, Shimizu T, Jo U, Vaughan DA, Tomooka N. 2012. Construction of a genetic linkage map and genetic analysis of domestication related traits in mungbean (*Vigna radiata*). *PLoS One* 7:e41304.

Isemura T, Kaga A, Tomooka N, Shimizu T, Vaughan DA. 2010. The genetics of domestication of rice bean, *Vigna umbellata*. *Ann Bot.* 106:927–44.

Jang S-J, Sato M, Sato K, Jitsuyama Y, Fujino K, Mori H, Takahashi R, Benitez ER, Liu B, Yamada T, Abe J. 2015. A Single-Nucleotide Polymorphism in an Endo-1,4- β -Glucanase Gene Controls Seed Coat Permeability in Soybean. *PLoS ONE* 10(6): e0128527.

Janská A, Pecková E, Sczepaniak B, Smýkal P, Soukup A. 2018. The role of the testa during the establishment of physical dormancy in the pea seed. *Annals of Botany* XX: 1–15.

Kantar MB, Nashoba AR, Anderson JE, Blackman BK, Rieseberg LH. 2017. The Genetics and Genomics of Plant Domestication. *Bioscience* 67: 971–982.

Karaki T, Watanabe Y, Kondo T, Koike T. 2012. Strophiole of seeds of the black locust acts as a water gap. *Plant Species Biol.* 27: 226–232.

Karssen CM. 1982. Seasonal patterns of dormancy in weed seeds. In: *The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination* (ed. A.A. Khan), pp. 243–270. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Karssen CM. 1995. Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control. pp. 333–350 in Kigel, J.; Galili, G. (Eds) *Seed development and germination*. New York, Marcel Dekker.

Karssen CM, Groot SPC. 1987. The hormone-balance theory of dormancy evaluated. pp. 17–30 in Pinfield, N.J.; Black, M. (Eds) *British plant growth regulator group monograph 15 – Growth regulators and seeds*. Bristol, UK, British Plant Growth Regulator Group.

Karssen CM, Lacka E. 1986. A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: Studies on gibberellin and/or abscisic acid-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. pp. 315–323 in Bopp, M. (Ed.) *Plant growth substances 1985*. Berlin, Springer-Verlag.

Keim P, Diers BW, Shoemaker RC. 1990. Genetic analysis of soybean hard seededness with molecular markers. *Theor Appl Genet* 79: 465–469.

Kelly KM, van Staden J, Bell WE. 1992. Seed coat structure and dormancy. *Plant Growth Regulation* 11: 213–222.

Kępczyński J, Kępczyńska E. 1997. Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiologia Plantarum* 101: 720–726.

Koinange EMK, Singh SP, Gepts P. 1996. Genetic control of the domestication syndrome in common bean. *Crop Sci.* 36:1037–45.

Koizumi M, Kaori K, Seiichiro I, Nobuaki I, Shighiro N, Hiromi K. 2008. Role of seed coat in imbibing soybean seed observed by micro-magnetic resonance imaging. *Annals of Botany* 102: 343–352.

- Kongjaimun A, Kaga A, Tomooka N, Somta P, Vaughan DA, Srinives P.** 2012. The genetics of domestication of yardlong bean, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Ssp. *unguiculata* cv.-gr. *Sesquipedalis*. *Ann Bot.* 109:1185–200.
- Kumar J, Srivastva E, Singh M, Kumar S, Nadarajan N, Sarker A.** 2014. Diversification of indigenous gene-pool by using exotic germplasm in lentil (*Lens culinaris* Medikus subsp. *culinaris*). *Physiol Mol Biol Plants* 20(1): 125–132.
- Kurdyukov S, Song Y, Sheahan MB, Rose RJ.** 2014. Transcriptional regulation of early embryo development in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Cell Rep.* 33: 349–362.
- Kuroda Y, Kaga A, Tomooka N, Yano H, Takada Y, Kato S, Vaughan D.** 2013. QTL affecting fitness of hybrids between wild and cultivated soybeans in experimental fields. *Ecology and Evolution* 3: 2150–2168.
- Lackey JA.** 1981. Systematic significance of the epihilum in Phaseoleae (Fabaceae, Faboideae). *Bot. Gaz.* 142: 160–164.
- Ladizinsky G.** 1979 The origin of lentil and its wild gene pool. *Euphytica* 28: 179–187.
- Ladizinsky G.** 1985. The genetic of hard seed coat in the genus *Lens*. *Euphytica* 34: 539-543.
- Ladizinsky G.** 1993. Wild lentils. *Critical Reviews in Plant Science* 12: 169–184.
- Ladizinsky G.** 1999 Identification of the lentil wild genetic stock. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 115–118.
- Ladizinsky G, Braun D, Goshen D, Muehlbauer FJ.** 1984. The biological species of the genus *Lens*. *Botanical Gazette* 145: 253–261.
- Lanfermeijer FC, van Oene MA, Borstlap AC.** 1992. Compartmental analysis of amino-acid release from attached and detached pea seed coats. *Planta* 187: 75–82.

Lenser T, Theißen G. 2013. Molecular mechanisms involved in convergent crop domestication. *Trends Plant Sci.* 18: 704–714.

Lersten NR, Gunn CR. 1982. Testa Characters in Tribe Viciae, with Notes About Tribes Abreae, Cicereae, and Trifolieae (Fabaceae). (Technical Bulletin No. 1667), (Washington, DC: United States Department of Agriculture), 1–40.

Lersten NR, Gunn CR, Brubaker CL. 1992. Comparative Morphology of the *Lens* on Legume (Fabaceae) Seeds, with Emphasis on Species in Subfamilies Caesalpinioideae and Mimosoideae. (Technical Bulletin No. 1791), (Washington, DC: United States Department of Agriculture), 44.

Liu B, Fujita T, Yan ZH, Sakamoto S, Xu D, Abe J. 2007. QTL mapping of domestication-related traits in soybean (*Glycine max*). *Annals of Botany* 100: 1027–1038.

Liu J, Zhou J, Xing D. 2012. Phosphatidylinositol 3-Kinase Plays a Vital Role in Regulation of Rice Seed Vigor via Altering NADPH Oxidase Activity. *PLoS One* 7(3): e33817.

Liu S, Sehgal SK, Li J, Lin M, Trick HN, Yu J, Gill BS, Bai G. 2013. Cloning and Characterization of a Critical Regulator for Preharvest Sprouting in Wheat. *Genetics* 195: 263–273.

Lorieux M. 2012. MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps. *Molecular Breeding*, 30(2): pp.1231-1235.

Lush WM, Evans LT. 1980. The seed coats of cowpeas and other grain legumes – structure in relation to function. *Field Crops Res.* 3: 267–286.

Ma F, Cholewa E, Mohamed T, Peterson CA, Gijzen M. 2004. Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. *Ann. Bot.* 94: 213–228.

Matilla AJ. 2000. Ethylene in seed formation and germination. *Seed Science Research* 10: 111–126.

Matus A, Slinkard AE, Vandenberg A. 1993. The potential of zero tannin lentil. In: Janick J, Simon JE, editors. *New crops*. New York: Wiley: 279–82.

Mayer MS, Soltis PS. 1994. Chloroplast DNA phylogeny of *Lens* (*Leguminosae*): origin and diversity of the cultivated lentil. *Theor Appl Genet.* 87:773–781.

McCarty DR. 1995. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 71–93.

Mendel JG. 1865. *Versuche über Pflanzenhybriden Abhandlungen*: 3–47.

Meyer CJ, Steudle E, Peterson CA. 2007. Patterns and kinetics of water uptake by soybean seeds. *J. Exp. Bot.* 58: 717–732.

Meyer RS, DuVal AE, Jensen HR. 2012. Patterns and processes in crop domestication: An historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. *New Phytol.* 196: 29–48.

Meyer RS, Purugganan MD. 2013. Evolution of crop species: Genetics of domestication and diversification. *Nat. Rev. Genet.* 14: 840–852.

Miao ZH, Fortune JA, Gallagher J. 2001. Anatomical structure and nutritive value of lupin seed coats. *Aust. J. Agric. Res.* 52: 985–993.

Milczarski P, Bolibok-Bragoszewska H, Myskow B, Stojalowski S, Heller-Uszynska K, Goralska M, Bragoszewski P, Uszyński, Kiljan A, Rakoczy-Trojanowska M. 2011. A high density consensus map of rye (*Secale cereale* L.) based on DArT markers. *PLoS One* 6.

Miller SS, Bowman LA, Gijzen M, Miki BLA. 1999. Early development of the seed coat of soybean (*Glycine max*). *Ann. Bot.* 84: 297–304.

Miller SS, Jin Z, Schnell JA, Romero MC, Brown DCW, Johnson DA. 2010. Hourglass cell development in the soybean seed coat. *Ann. Bot.* 106: 235–242.

Mirali M, Purves RW, Stonehouse R, Song R, Bett K, Vandenberg A. 2016. Genetics and Biochemistry of Zero-Tannin Lentils. *PLoS ONE* 11 (10): e0164624.

Moore SH. 2000. Using hard seed coats to preserve seed quality in soybean. In: Moore SH, Volenec JJ and Kral DM, editors. Genetic improvement of seed quality. CSSA Special Publication Number 31. Madison: Crop Science of America: 59–66.

Morrison DA, McClay K, Porter C, Rish S. 1998. The role of the *Lens* in controlling heat-induced breakdown of testa-imposed dormancy in native Australian legumes. *Annals of Botany* 82: 35–40.

Muehlbauer F, Sarker A. 2011. Tannin free lentils: A promising development for specialty use and increased value. *Grain Legumes*: 56.

Muehlbauer F, Slinkard A. 1981. Genetics and breeding methodology. In: Webb C, Hawtin G, editors. Lentils. Farnham Royal (UK): Commonwealth Agricultural Bureau. p. 69–90.

Mullin WJ, Xu WL. 2000. A study of the intervarietal differences of cotyledon and seed coat carbohydrates in soybean. *Food Research International* 33: 883–891.

Mullin WJ, Xu WL. 2001. Study of soybean seed coat components and their relationship to water absorption. *J. Agric Food Chem* 49: 5331–5335.

Murray DR, Kennedy IR. 1980. Changes in activities of enzymes of nitrogen-metabolism in seed coats and cotyledons during embryo development in pea seeds. *Plant Physiol.* 66: 782–786.

Müller K, Levesque-Tremblay G, Bartels S, Weitbrecht K, Wormit A, Usadel B, Haughn G, Kermode AR. 2013. Demethylesterification of cell wall pectins in *Arabidopsis* plays a role in seed germination. *Plant Physiol.* 161:305–316.

Nikolaeva MG. 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. In: *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination* (ed. A.A. Khan), pp. 51–74. North-Holland, Amsterdam.

Ofler CE, Patrick JW. 1984. Cellular structures, plasma-membrane surface-areas and plasmodesmatal frequencies of seed coats of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to photosynthate transfer. *Aust. J. Plant Physiol.* 11: 79–99.

Ofler CE, Patrick JW. 1993. Pathway of photosynthate transfer in the developing seed of *Vicia faba* L: a structural assessment of the role of transfer cells in unloading from the seed coat. *J. Exp. Bot.* 44: 711–724.

Ogutcen E, Ramsay L, von Wettberg EB, Bett KE. 2018. Capturing variation in *Lens* (Fabaceae): Development and utility of an exome capture array for lentil. *Appl Plant Sci.* 6(7):e01165.

Olsen KM, Wendel JF. 2013. A Bountiful Harvest: Genomic Insights into Crop Domestication Phenotypes. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 64: 47–70.

Olsen OA. 2004. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 16: S214–S227.

Orfila C, Dal Degan F, Jorgensen B, Scheller HV, Ray PM, Ulvskov P. 2012. Expression of mung bean pectin acetyl esterase in potato tubers: effect on acetylation of cell wall polymers and tuber mechanical properties. *Planta* 236:185-96.

Penmetsa RV, Carrasquilla-Garcia N, Bergmann EM, Vance L, Castro B, Kassa MT, Sarma BK, Datta S, Farmer AD, Baek J-M, Coyne CJ, Varshney RK, von Wettberg EJB, Cook DR. 2016. Multiple post-domestication origins of kabuli chickpea through allelic variation in a diversification-associated transcription factor. *New Phytologist* 211: 1440-1451.

Piperno DR, Holst I, Winter K, McMillan O. 2015. Teosinte before domestication: Experimental study of growth and phenotypic variability in Late Pleistocene and early Holocene environments. *Quat. Int.* 363: 65–77.

Polanco C, Sáenz de Miera LE, González AI, García P, Fratini R, Vaquero F, Vences FJ, de la Vega MP. 2019. Construction of a high-density interspecific (*Lens culinaris* x *L. odemensis*) genetic map based on functional markers for mapping morphological and agronomical traits, and QTLs affecting resistance to *Ascochyta* in lentil. PLoS ONE 14(3): e0214409.

Potts HC, Duangpatra J, Hairston WG, Delouche JC. 1978. Some influences of hardseededness on soybean seed quality. Crop Sci 18: 221–224.

Rajaram V, Nepolean T, Senthilvel S, Varshney RK, Vadez V, Srivastava RK, Shah TM, Supriya A, Kumar S, Kumari BR, Bhanuprakash A, Narasu ML, Riera-Lizarazu O, Hash CT. 2013. Pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] consensus linkage map constructed using four RIL mapping populations and newly developed EST-SSRs. BMC Genomics 14.

Ranathunge K, Shao S, Qutob D, Gijzen M, Peterson CA, Bernards MA. 2010. Properties of the soybean seed coat cuticle change during development. Planta 231: 1171–1188.

Raymond ET, Musgrave ME, Leopold AC. 1981. The seed coat as a control of imbibitional chilling injury. Crop Sci 21: 312–317.

Robertson L, Erskine W. 1997. Lentil. In: Fuccillo D, Sears L, Stapleton P, editors. Biodiversity in trust. Cambridge: Cambridge University Press. p. 128–138.

Rolston MP. 1978. Water impermeable seed dormancy. Bot. Rev. 44: 365–396.

Saio K. 1976. Soybeans resistant to water absorption. Cereal Foods World 21: 168–173.

Sakamoto S, Abe J, Kanazawa A, Shimamoto Y. 2004. Marker-assisted analysis for hard seediness with isozyme and simple sequence repeat loci. Breeding Sci 54: 133–139.

Schneitz K, Hulskamp M, Pruitt RE. 1995. Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana* – a light microscope study of cleared whole-mount tissue. The Plant Journal 7: 731–749.

Silva MP, Ricardo CPP. 1992. β -fructosidases and in vitro dedifferentiation-redifferentiation of carrot cells. *Phytochem.* 31: 1507–11.

Simpson GM. 1990. *Seed Dormancy in Grasses.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Singh M, Bisht IS, Kumar S, Dutta M, Bansal KC, Karale M, Sarker A, Amri A, Kumar S, Datta SK. 2014. Global wild annual *Lens* collection: A potential resource for lentil genetic base broadening and yield enhancement. *PLoS ONE* 9: e107781.

Singh M, Rana JC, Singh B, Kumar S, Saxena DR, Saxena A, Rizvi AH, Sarker A. 2017. Comparative agronomic performance and reaction to fusarium wilt of *Lens culinaris* \times *L. orientalis* and *L. culinaris* \times *L. ervoides* derivatives. *Front. Plant Sci* 8: 1162.

Singh M, Rana MK, Kumar K, Bisht IS, Dutta M, Gutam NK, Sarker A, Bansal KC. 2013. Broadening the genetic base of lentil cultivars through inter-sub-specific and interspecific crosses of *Lens* taxa. *Plant Breed.* 132: 667–675.

Shao S, Meyer CJ, Ma F, Peterson CA, Bernards MA. 2007. The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition and function during imbibition. *J. Exp. Bot.* 58: 1071–1082.

Sharma R, Rawat V, Suresh CG. 2014. Genome-Wide Identification and Tissue-Specific Expression Analysis of UDP-Glycosyltransferases Genes Confirm Their Abundance in *Cicer arietinum* (Chickpea) Genome. *PLoS One* 9(10): e109715.

Sharma SK, Dawson IK, Waugh R. 1995. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theor Appl Genet.* 91:647–654.

Scheler C., Weitbrecht K., Pearce S.P., Hampstead A., Büttner-Mainik A., Lee K.J.D., Voegelé A., Oracz K., Dekkers B.J.W., Wang X., Wood ATA, Bentsink L, King JR, Knox JP, Holdsworth MJ, Müller K, Leubner-Metzger G. 2015. Promotion of testa rupture during garden cress germination involves seed compartment-specific expression and activity of pectin methylesterases. *Plant Physiol.* 167:200–215.

Shirasawa K, Bertoli DJ, Varshney RK, Moretzsohn MC, Leal-Bertioli SC, Thudi M, Pandey MK, Rami JF, Foncéka D, Gowda MVC, Qin H, Gup B, Hong Y, Liang X, Hirakawa H, Tabata S, Isobe S. 2013. Integrated consensus map of cultivated peanut and wild relatives reveals structures of the A and B genomes of *Arachis* and divergence of the legume genomes. *DNA Res.* 20.

Skinner DJ, Hill TA, Gasser CS. 2004. Regulation of ovule development. *Plant Cell* 16: S32–S45.

Smýkal P, Nelson MN, Berger JD, von Wettberg EJB. 2018. The Impact of Genetic Changes during Crop Domestication. *Agronomy* 8: 119.

Smýkal P, Vernoud V, Blair MW, Soukup A, Thompson RD. 2014. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Front. Plant Sci.* 5: 351.

Soltani A, Walter KA, Wiersma AT, Santiago JP, Quijley M, Chitwood D, Porch TG, Miklas P, McClean PE, Osorno JM, Lowry DB. 2021. The genetics and physiology of seed dormancy, a crucial trait in common bean domestication. *BMC Plant Biology* 21:58.

Sonnante G, Galasso I, Pignone D. 2003. ITS sequence analysis and phylogenetic inference in the genus *Lens* Mill. *Annals of Botany* 91: 49–54.

Soukup A. 2014. Selected Simple Methods of Plant Cell Wall Histochemistry and Staining for Light Microscopy. *Methods Mol Biol.* 1080: 25-40.

Spurny M. 1963. Cell wall structure of epidermal cells of the pea seed coat (*Pisum sativum* L.) studied by microcinematography. *Mikroskopie* 18: 272–279.

Steeves TA. 1983. The evolution and biological significance of seeds. *Canadian Journal of Botany* 61: 3550–3560.

Stevenson TM. 1937. Sweet clover studies on habit of growth, seed pigmentation and permeability of the seed coat. *Sci. Agric.* 17: 627–654.

Sturm A. 1999. Invertases. Primary structure, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.* 121: 1–7.

Sturm A, Tang GQ. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* 4: 401–7.

Sun L, Miao Z, Cai C, Zhang D, Zhao M, Wu Y, Zhang X, Swarm SA, Zhou L, Zhang ZJ, Nelson RL, Ma J. 2015. *GmHs1-1*, encoding a calcineurin-like protein, controls hard-seededness in soybean. *Nat Genet* 47(8): 939-43.

Suvorova GN, Ikonnikov AV. 2014. Characteristics of recombinant lines of lentil *L. culinaris* × *L. orientalis*. *Russ Agric Sci* 40: 22–26.

Tanyolac B, Ozatay S, Kahraman A, Fred M. 2010. Linkage mapping of lentil (*Lens culinaris* L.) genome using recombinant inbred lines revealed by AFLP, ISSR, RAPD and some morphologic markers. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development* 2(1):1.

Tanksley S, Young N, Paterson A, Bonierbale M. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Nature Biotechnology* 7(3):257–64.

Thompson RD, Hueros G, Becker H, Maitz M. 2001. Development and functions of seed transfer cells. *Plant Sci.* 160: 775–783.

Truco MJ, Antonise R, Lavelle D, Ochoa O, Kozik A, Witsenboer H, Fort SB, Jeuken MJW, Kesseli RV, Lindhout P, Michelmore RW, Peleman J. 2007. A high-density, integrated genetic linkage map of lettuce (*Lactuca* spp.). *Theor Appl Genet*: 115.

Vaillancourt R, Slinkard AE, Reichert RD. 1986. The inheritance of condensed tannin concentration in lentil. *Can J Plant Sci.* 66(2):241–6.

Van Assche JA, Debucquoy KLA, Rommens WAF. 2003. Seasonal cycles in the germination capacity of buried seeds of some Leguminosae (Fabaceae). *New Phytol.* 158: 315–323.

van Oss H, Aron Y, Ladizinsky G. 1997. Chloroplast DNA variation and evolution in the genus *Lens Mill.* Theoretical and Applied Genetics 94: 452–457.

Van Staden J, Manning JC, Kelly KM. 1989. Legume seeds- The structure: function equation. In: Advances in Legume Research (eds C. H. Stirton & J. L. Zarucchi) pp. 417–450. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Gar.

Vandenberg V, Slinkard AE. 1990. Genetics of seed coat color and pattern in lentil. J Hered. 81 (6):484–8.

Varshney RK, Saxena RK, Upadhyaya HD, Khan AW, Yu Y, Kim C, Rathore A, Kim D, Kim J, An S, et al. 2017. Whole-genome resequencing of 292 pigeonpea accessions identifies genomic regions associated with domestication and agronomic traits. Nat. Genet. 49: 1082–1088.

Vaughan DA, Bernard RL, Sinclair JB, Kunwar IK. 1987. Soybean seed coat development. Crop Sci. 27: 759–765.

Von Wettberg EJB, Chang PL, Başdemir F, Carrasquilla-Garcia N, Korbu LB, Moenga SM, Bedada G, Greenlon A, Moriuchi K.S., Singh V, et al. 2018. Ecology and genomics of an important crop wild relative as a prelude to agricultural innovation. Nat. Commun. 9: 649.

Wang HL, Grusak MA. 2005. Structure and development of *Medicago truncatula* pod wall and seed coat. Ann. Bot. 95: 737–747.

Walbot V. 1978. Control mechanisms for plant embryogeny. In: Dormancy and Developmental Arrest (ed. M.E. Clutter). Academic Press, New York: 113-166.

Wareing PF, Saunders PF. 1971. Hormones and dormancy. Annual Review of Plant Physiology 22: 261–288.

Warschefsky E, Varma PR, Cook DR, von Wettberg EJ. 2014. Back to the wilds: Tapping evolutionary adaptations for resilient crops through systematic hybridization with crop wild relatives. Am. J. Bot. 101: 1791–1800.

Watanabe S, Tajuddin T, Yamanaka N, Hayashi M, Harada K. 2004. Analysis of QTLs for reproductive development and seed quality traits in soybean using recombinant inbred lines. *Breeding Sci.* 54: 399–407.

Webb C, Hawtin G. 1981. *Lentils*. Farnham Royal (UK): Commonwealth Agricultural Bureaux.

Weber H, Borisjuk L, Heim U, Buchner P, Wobus U. 1995. Seed coat associated invertases of Fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell* 7: 1835–46.

Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus U. 1997. A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9: 895–908.

Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 2005. Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 253–79.

Weeden NF. 2007. Genetic Changes Accompanying the Domestication of *Pisum sativum*: Is there a Common Genetic Basis to the ‘Domestication Syndrome’ for Legumes? *Ann. Botany* 100: 1017-1025.

Weitbrecht K, Müller K, Leubner-Metzger G. 2011. First off the mark: Early seed germination. *J. Exp. Bot.* 62: 3289–3309.

Werker E. 1980/81. Seed dormancy as explained by the anatomy of embryo envelopes. *Israel Journal of Botany* 29: 22–44.

Werker E. 1997. *Seed Anatomy – Encyclopedia of Plant Anatomy*. Gebrüder Borntraeger, Berlin

Werker E, Marbach I, Mayer AM. 1979. Relation between the anatomy of the testa, water permeability and the presence of phenolics in the genus *Pisum*. *Ann. Bot.* 43: 765–771.

West MA, Harada JJ. 1993. Embryogenesis in higher plants: an overview. *The Plant Cell* 5: 1361–1369.

White J. 1908. The occurrence of an impermeable cuticle on the exterior of certain seeds. *Proc. Royal Soc. Victoria* 21: 203–210.

Wong MML, Gujaria-Verma N, Ramsay L, Yuan HY, Caron C, Diapari M, et al. 2015. Classification and Characterization of Species within the Genus *Lens* Using Genotyping-by-Sequencing (GBS). *PLoS ONE* 10(3): e0122025.

Wormit A, Usadel B. 2018. The Multifaceted Role of Pectin Methyltransferase Inhibitors (PMEIs). *Int J Mol Sci* 19(10): 2878.

Wu P, Zhou C, Cheng S, Wu Z, Lu W, Han J, Chen Y, Chen Y, Ni P, Wang Y, Xu X, Huang Y, Song C, Wang Z, Shi N, Zhang X, Fang X, Yang Q, Jiang H, Chen Y, Li M, Wang Y, Chen F, Wang J, Wu G. 2015. Integrated genome sequence and linkage map of physic nut (*Jatropha curcas* L.), a biodiesel plant. *The Plant Journal* 81(5):810–21.

Wyatt JE. 1977. Seed coat and water absorption properties of seed of near-isogenic snap bean lines differing in seed coat color. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 102: 478–480.

Zhang B, Chen P, Chen CY, Wang D, Shi A, Hou A, Ishibashi T. 2008. Quantitative trait loci mapping of seed hardness in soybean. *Crop Sci* 48: 1341–1349.

Zhou S, Sekizuka H, Yang Z, Sawa S, Pan J. 2010. Phenolics in the seed coat of wild soybean (*Glycine soja*) and their significance for seed hardness and seed germination. *J Agric Food Chem* 58: 10972–10978.