

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Barbora Mičová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Genetická charakterizace introgresních linií planého
(*Pisum fulvum*) a kulturního hrachu setého
(*Pisum sativum* L.)

Bakalářská práce

Barbora Mičová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením pana Ing. Petra Smýkala, Ph.D., pouze s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci dne 31. července 2015

.....

Barbora Mičová

Souhrn

Bakalářská práce se zabývá genetickou charakterizací introgresních linií planého druhu hrachu *Pisum fulvum* Sibth. et Smith na pozadí kulturního hrachu setého *Pisum sativum* L.

V teoretické části je stručně charakterizován rod *Pisum*. Dále jsou zmíněny všeobecné aspekty domestikačního procesu, přičemž hlavní důraz je kladen na problematiku ztráty genetické diverzity kulturních plodin. V závěru rešerše je vysvětlena použitá metoda introgresní hybridizace.

Experimentální část práce se věnuje zejména molekulární analýze 24 introgresních linií hrachu, získaných pomocí opakovaného zpětného křížení kulturního hrachu setého *Pisum sativum* s planou formou hrachu *Pisum fulvum*. Cílem byla identifikace přítomnosti polymorfismů mezi jednotlivými liniemi a zmapování vnesených chromozomových fragmentů. Zaznamenán byl také fenotypový projev introgresních linií a rodičovských rostlin ve vybraných znacích.

Zjištěné poznatky přispěly k vybrání linií vhodných pro využití v další výzkumné činnosti.

Summary

This bachelor thesis is focused on the genetic characterization of wild pea (*Pisum fulvum* Sibth. et Smith) introgression lines in cultivated pea (*Pisum sativum* L.) genetic background.

The theoretical part at first briefly characterizes the *Pisum* genus. Subsequently, general aspects of the process of domestication are mentioned, with the emphasis on the matter of genetic diversity loss in crops. At the end, the basis of the introgression is explained.

The main part of the experimental section of the thesis deals with a molecular analysis of 24 pea introgression lines obtained by backcrossing wild *Pisum fulvum* to domesticated *Pisum sativum*. The aim was to detect the presence of polymorphisms among the lines and to map introgressed genomic fragments of wild species in defined genetic background. Additionally, the phenotypic characterization of both introgression and parental lines was noted.

The findings of this bachelor thesis have made a contribution to the selection of introgression lines suitable for upcoming researches.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a zejména za vstřícný přístup, který při spolupráci se mnou projevil. Nesmírně si toho vážím. Dále děkuji lidem, se kterými jsem se setkávala v laboratoři, za přátelskou pracovní atmosféru a za ochotu pomoci. V neposlední řadě bych ráda poděkovala také mé rodině, přátelům a všem, kteří mne v tomto období podpořili. Jsem ráda, že Vás mám.

Práce byla podpořena projektem MŠMT číslo ME10062 a byla financována grantem Evropské unie FP7-613551 v rámci projektu LEGATO - LEGumes for the Agriculture of TOmorrow.

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce.....	10
3	Současný stav řešené problematiky.....	11
3.1	Charakteristika rodu <i>Pisum</i>	11
3.1.1.	Taxonomické zařazení.....	11
3.1.2.	Původ.....	12
3.1.3.	Genomika.....	12
3.1.3.1.	Genom.....	12
3.1.3.2.	Karyotyp.....	12
3.1.3.3.	Genetické mapy.....	13
3.1.4.	Genetická diverzita.....	14
3.2	Domestikace rostlin.....	15
3.2.1.	Efekt hrdla lahve.....	16
3.2.2.	Domestikační syndrom.....	17
3.3	Hybridizace.....	17
3.3.1.	Důsledky hybridizačního procesu.....	18
3.3.2.	Introgresní hybridizace.....	18
3.3.2.1.	Význam intogresní hybridizace.....	19
3.3.2.2.	Potenciál planých forem a jejich genetická diverzita.....	19
3.3.2.3.	Princip introgresní hybridizace.....	20
3.3.2.4.	Úskalí introgresní hybridizace.....	22
3.3.2.5.	Introgresní hybridizace jako alternativa k transgenozí.....	23
3.4	Genové banky.....	23
3.4.1.	Genové banky a jejich využití.....	23
3.4.2.	Tvorba a vývoj genetických knihoven.....	24
4	Materiál a metody.....	27
4.1	Rostlinný materiál.....	27
4.2	Hodnocení fenotypového projevu.....	27
4.3	Izolace genomové DNA.....	27
4.4	Spektrofotometrická analýza DNA.....	28
4.5	Elektroforetická separace DNA, PCR produktů a produktů restriční štěpení.....	29

4.6	Molekulární markery	29
4.7	PCR amplifikace	30
4.8	Restrikce PCR produktu	31
4.9	Hodnocení získaných dat	32
4.10	Seznam použitého vybavení a chemikálií	33
5	Výsledky	34
6	Diskuse	40
7	Závěr	42
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	43
9	Literatura	44
10	Přílohy	54

1 ÚVOD

Hrách setý (*Pisum sativum* L.) představuje významnou složku v otázce lidské obživy i ekonomiky. Patří k nejstarším kulturním plodinám. S ohledem na jeho brzkou domestikaci se však stále častěji setkáváme s negativními dopady plynoucími ze ztráty značné části původní genetické diverzity.

Alely eliminované šlechtitelským procesem z genofondu hrachu se již nemohou v budoucnu projevit. Jednou z možností, jak znovu obohatit genetický základ kulturních forem, je jejich hybridizace s planými druhy. Opakovaným zpětným křížením vybraného rodičovského genotypu lze v ideálním případě dosáhnout vnesení jediného chromozomového segmentu, jenž může nést agronomicky významný znak. Tento proces, označovaný jako introgresní hybridizace, skýtá prostor k vylepšení hospodářské kvality současných zemědělských plodin. Již v současné době funguje řada projektů založených na této myšlence. Nejčastěji se jedná o spojitost s hledáním rezistence vůči škůdcům a chorobám, zvýšením tolerance k abiotickým stresům či vylepšením dalších hospodářsky využitelných vlastností.

Bakalářská práce pracuje s introgresními liniemi planého a kulturního druhu hrachu a zabývá se jejich genetickou charakterizací. Získané výsledky slouží jako podklad k vybrání linií vhodných k dalším vědeckým studiím.

2 CÍLE PRÁCE

- Literární rešerše na téma využití introgresní hybridizace planých forem k rozšíření genetické diverzity kulturních rostlin.
- Osvojení si základních metod molekulární biologie a genetiky včetně izolace genomové DNA, PCR amplifikace, restrikčního štěpení a elektroforézy v agarózovém gelu.
- Identifikace polymorfismu v souboru introgresních linií kříženců planého a kulturního hrachu, genotypizace a molekulární mapování těchto linií, statistické vyhodnocení zjištěných dat.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 CHARAKTERISTIKA RODU *PISUM*

Hrách setý (*Pisum sativum* L.) je jednou z nejstarších kulturních plodin. Od doby domestikace, uskutečněné přibližně před deseti tisíci lety, představuje spolu s ostatními luštěninami nepostradatelnou složku lidské obživy a jako bohatý zdroj bílkovin, sacharidů, tuků, vlákniny, vitaminů a minerálů nachází velkého užitku i v současnosti. Z ekonomického hlediska jsou luštěniny druhou nejvýznamnější skupinou kulturních plodin, představující zhruba čtvrtinu globální produkce. Hrách je z nich v současné době druhou nejpěstovanější položkou, s přibližně 11,2 miliony tun roční celosvětové sklizně (hodnota platná pro rok 2013) (FAOSTAT 2015). Význam luštěnin však nespočívá pouze v nutriční hodnotě. Předpokládá se, že některé jejich sekundární metabolity (například izoflavonoidy) vykazují protirakovinnou aktivitu, důležitou roli hrají také v přírodních a umělých ekosystémech, kdy je třeba zdůraznit schopnost fixace vzdušného dusíku s pomocí symbiotických bakterií. V neposlední řadě potom hrách samotný představuje od dob práce Gregora Mendela významnou experimentální rostlinu na poli genetiky (Bastianelli *et al.* 1998; Ellis *et al.* 2011; Smýkal 2011; Smýkal *et al.* 2012).

3.1.1. Taxonomické zařazení

Dle fylogenetické klasifikace se rod *Pisum* (hrách) řadí do čeledi *Leguminosae* (syn. *Fabaceae*), podčeledi *Fabeae* (syn. *Vicieae*) (Endo *et al.* 2008; Käss *et al.* 1996). Na základě molekulární studie provedené Smýkal *et al.* (2011) byl potom v rámci podčeledi *Fabeae* rod *Pisum* geneticky zařazen mezi rody *Vicia* (vikev) a *Lathyrus* (hrachor), s přihlédnutím k úzké spojitosti s monotypickým rodem *Vavilovia*. Součástí stejné podčeledi je také rod *Lens* (čočka).

Jak uvádějí Maxted *et al.* (2001), v rodu *Pisum* jsou rozlišeny tři druhy hrachu - *P. sativum*, zahrnující kulturní *P. sativum* subsp. *sativum* a planý *P. sativum* subsp. *elatius*, planý *P. fulvum* a kulturní *P. abyssinicum*, domestikovaný pravděpodobně nezávisle na *P. sativum*. K odlišení jednotlivých druhů došlo na základě průběhu několika chromozomových přestaveb, které v případě snahy o vzájemnou hybridizaci rostlin zapříčiňují častou genomovou inkompatibilitu. Ta je navíc podpořena teorií jaderně-cytoplazmatického konfliktu genů (Bogdanova 2007, Bogdanova *et al.* 2015; Jing *et al.* 2010; Smýkal *et al.* 2011).

3.1.2. Původ

Oblast původu hrachu leží ve Středomoří, zejména na území Blízkého východu. Plané druhy jsou rozšířeny v širokém úseku od Íránu a Turkmenistánu, přes severní Afriku až k jižní Evropě. Určit konkrétní centrum genetické diverzity rodu je však kvůli časně kultivaci této plodiny obtížné (Smýkal *et al.* 2012).

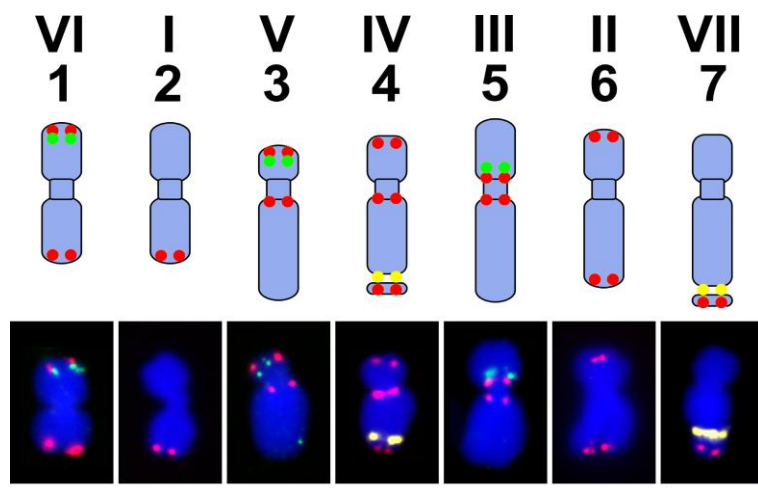
3.1.3. Genomika

3.1.3.1. Genom

Velikost jaderného genomu hrachu je odhadována na 4,45 Gbp tvořících haploidní (1C) genom, což odpovídá přibližně 9,09 pg DNA nacházejícím se ve stadiu 2C (Smýkal *et al.* 2012). Jak ukázaly dříve provedené experimenty sledující kinetiku reasociace DNA či nedávné výzkumy využívající technologií NGS, více jak jeho tři čtvrtiny jsou tvořeny různorodými, převážně středně až vysoce repetitivními, sekvencemi. Dominantní úlohu přitom hrají motivy retroelementů (Macas *et al.* 2007).

3.1.3.2. Karyotyp

Standardní karyotyp hrachu (obr. 1) je tvořen sedmi chromozomy, odlišitelnými na základě morfologických znaků a *in situ* hybridizace. Chromozomy 1 a 2 jsou submetacentrické. Ostatních pět chromozomů je akrocentrických, přičemž na dlouhých raménkách chromozomů 4 a 7 se nacházejí oblasti sekundární konstriktce, odpovídající repetitivním sekvencím genů kódujících 45S rRNA. Chromozomy hrachu jsou číslovány netradičně, díky čemuž s označením jednotlivých chromozomů nekoreluje čísla vazebných skupin, které se na nich nacházejí. Z tohoto důvodu se využívá specifického systému značení, kdy arabská čísla odpovídají konkrétním chromozomům a římská čísla označují vazebné skupiny. Vzájemný vztah chromozomů a vazebných skupin je potom následující: 1 = VI, 2 = I, 3 = V, 4 = IV, 5 = III, 6 = II, 7 = VII. S ohledem na netradiční číslování stojí také za zmínku, že největší chromozom hrachu je označen číslem 5, ačkoliv se pro tento účel konvenčně využívá čísla 1 (Ellis *et Poyser* 2002; Smýkal *et al.* 2012).



Obrázek 1. Schematické znázornění standardního karyotypu hrachu (převzato ze Smýkal *et al.* 2012). Na náčrtu v horní části jsou zvýrazněny lokusy pro PisTR-B (červená), 5S rDNA (zelená) a 45S rDNA (žlutá). Dolní část obrázku ukazuje stejné lokusy detekované FISH na izolovaných metafázních chromozomech. Měřítko = 5 μ m.

3.1.3.3. Genetické mapy

V průběhu desetiletí věnovaných studiu genomu hrachu vzniklo velké množství genetických map, zachycujících relativní umístění řady lokusů. K jejich tvorbě jsou využívány zejména experimentální populace rekombinantních inbredních linií. Analýza polymorfismů je potom často založena na různých systémech genetických markerů včetně izozymů, RFLP, RAPD a SSR, na řadě PCR technik či na aktuální metodě paralelní genotypizace (Smýkal *et al.* 2012).

Data obsažená v dílčích mapách bývají v průběhu let doplňována a často kompletována za vzniku konsenzuálních map. Jak uvádějí Lörz *et Wenzel* (2005), klíčové kroky vedoucí k vytvoření těch aktuálních zahrnují:

- stanovení sedmi vazebných skupin (Lamprecht 1948)
- přiřazení vazebných skupin k jednotlivým chromozomům (Lamprecht 1961)
- vytvoření chromozomové mapy se 128 lokusy (Lamprecht 1974)
- rozšíření Lamprechtovy mapy Blixtem (1977) o 41 nových genů
- zmapování biochemických markerů (27 izoenzymových lokusů) a vazba na kotvicí markery (Weeden *et Provvidenti* 1985)
- rozšíření o další molekulární markery a strukturní reorganizace Lamprechtovy verze (Weeden *et al.* 1993)

současné kulturní typy hrachu vykazují značnou variabilitu, je její většina stále uložena v planých formách (Jing *et al.* 2012). Ty lze proto dále využít ve šlechtitelském procesu.

Studie Jing *et al.* (2007) ukázala, že v genomu hrachu připadá průměrně na každých 15 bp jedna záměna nukleotidu. Ke zhodnocení genetické diverzity mezi jednotlivými druhy je využívána zejména analýza repetitivních sekvencí. Mikrosatelitní markery jsou schopny rozlišit délkový polymorfismus ve zkoumaných lokusech, v souvislosti se značnou rozmanitostí celého rodu *Pisum* s sebou však nesou riziko detekce případné homoplazie (stav, kdy jsou alely v lokusu identické, avšak nemají společný původ). Jelikož je 60 - 70 % genomu hrachu tvořeno retroelementy, nabízejí alternativu metody využívající jako molekulární markery retrotranspozony (Smýkal *et al.* 2011).

Většina hybridů v rámci rodu *Pisum* je fertálních, pokusy mezi *P. sativum* a *P. fulvum* však prokázaly pouze omezenou křížitelnost (Ben-Ze'ev *et Zohary* 1973). Klíčový je zde fakt, že *P. fulvum* tvoří ve všech molekulárních analýzách odlišný klád a jedná se tedy o jiný druh (Schaefer *et al.* 2012). S ohledem na velkou genetickou vzdálenost od ostatních kulturních i planých forem hrachu se proto *P. fulvum* jeví jako slibný kandidát pro obnovu diverzity ztracené v průběhu domestikačního procesu (Jing *et al.* 2010; Smýkal 2011). Nejvíce pozornosti bylo v tomto směru věnováno studiu možnosti jeho využití jako donora rezistence k zrnokazu (*Brunchus pisorum*) a padlí (*Erysiphe pisi*) (Byrne *et al.* 2008; Fondevilla *et al.* 2007).

3.2 DOMESTIKACE ROSTLIN

Definice publikovaná Allabyem v oxfordském slovníku (2010) vysvětluje pojem domestikace jako člověkem uskutečňovaný selektivní výběr a pěstování rostlinných či chování živočišných druhů za účelem jejich přizpůsobení se lidským potřebám, přičemž pro zajištění přežití a optimální produkce domestikovaných druhů je potřebné provést značné zásahy do přírodních ekosystémů. Ačkoli se tedy s termínem domestikace setkáváme jak u živočichů, tak u rostlin, následující odstavce se budou zmíněné problematice věnovat zejména z botanického hlediska.

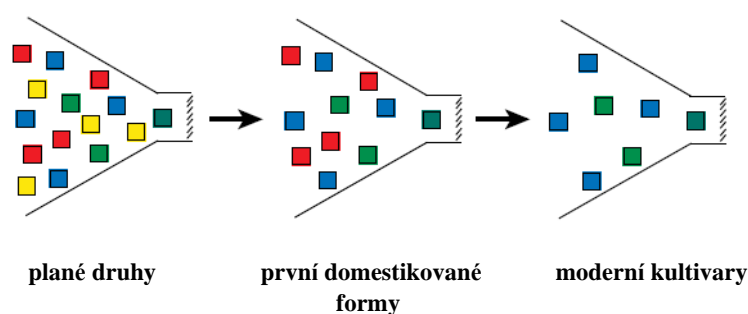
Hned v úvodu je dobré si uvědomit, že domestikace samotná představuje v celém evolučním konceptu pouhou epizodu. Stejně tak jako procházely rostliny diverzifikací již před zásahem člověka, ani se skončením domestikační etapy nedošlo k jejímu zastavení. Plodiny

jsou i nadále vystaveny velkému množství odlišných selekčních tlaků a jejich genetický vývoj se ubírá různými drahami (Abbo *et al.* 2014).

3.2.1. Efekt hrdla lahve

Během posledních deseti tisíc let došlo k postupné domestikaci řady rostlinných druhů, jejichž zástupce lze mimo jiné nalézt mezi ořechy, kořením, ovocem a zeleninou, cereáliemi nebo mezi luštěninami, do jejichž skupiny se řadí také hrách (Zohary *et al.* 2012).

Z původních divokých forem byli uvědomělou lidskou volbou selektivně vybírání jedinci vykazující ve svém fenotypovém projevu agronomicky výhodné znaky, zatímco geneticky variabilnější ale méně produktivní hybridy byli často z dalších pěstitelských pokusů vyloučeni. Opakovaným upřednostňováním několika málo vybraných genotypů docházelo k neustálému poklesu míry prvotní diverzity a k postupnému zužování genetického základu u následujících populací. Tento princip zodpovědný za fakt, že řada současných plodin představuje pouze zlomek původní variability, nacházející se v divokých druzích, je označován jako efekt hrdla lahve či „bottleneck effect“ (obr. 3) (Smýkal 2009).



Obrázek 3. Znázornění efektu hrdla lahve (upraveno dle Tanksley *et McCouch* 1997).

Různé barvy reprezentují odlišné alelické varianty.

Alely eliminované šlechtitelským procesem z genofondu populace se již nemohou ve fenotypu projevit. I když se velikost populace postupně obnoví, ta nadále zůstává zmíněným efektem poznamenána. Zlepšení hospodářské kvality rostlin bylo docíleno na úkor fixace řady škodlivých alel a za značného omezení schopnosti adaptace na změny podmínek prostředí, vyplývající ze zmenšení genetického základu. Často se objevuje ztráta rezistence k nemocem či patogenům a větší zranitelnost vlivem působení biotických nebo abiotických stresových podnětů (Ellis *et al.* 2000; Warschefsky *et al.* 2014). Jednou z možností, jak znovu obohatit genomy moderních zemědělských plodin o ztracené formy genů, je návrat k jejich planým

předkům a využití jejich genetické diverzity (Doebley *et al.* 2006; Kumar *et al.* 2004; Tanksley *et McCouch* 1997; Warschefsky *et al.* 2014; Zamir 2001).

3.2.2. Domestikační syndrom

Velká část genetické variability přítomné u divokých forem se negativním způsobem projevuje na schopnosti rostlin adaptovat se na nastalé hospodářské podmínky. Výsledkem domestikačního procesu tedy bylo nahromadění významných alel a pozvolná specializace druhů vedoucí k maximalizaci výnosu a k idealizaci vlastností agronomicky ceněných orgánů (Gur *et Zamir* 2004; Warschefsky *et al.* 2014).

Jak zmiňuje Abbo *et al.* (2014), dnešní domestikované rostliny se od svých planých předků odlišují v množství morfofyziologických znaků. Většina z nich je spojena s hospodářským uplatněním, zejména potom s nepukavostí plodů a plodenství, klíčivostí semen bez dormantní fáze a s vlastnostmi souvisejícími s ekonomicky důležitými částmi (např. způsob růstu, velikost zásobních orgánů, barva, požitelnost). Obdobné rozdíly mezi planými a kulturními rostlinami způsobené vlivem domestikace označujeme pojmem domestikační syndrom (Hammer 1984).

3.3 HYBRIDIZACE

Ani uplynutí několika milionů let od doby vzniku jednotlivých druhů nestačilo vždy k tomu, aby se mezi jejich populacemi vyvinuly dostatečně účinné reprodukčně izolační mechanismy, bránící toku genů. To druhům umožňuje vzájemně hybridizovat a inkorporovat tak do svého genomu alely pocházející z cizích genofondů (Ellstrand *et al.* 1999; Jansky 2006). Bylo zjištěno, že mezidruhová hybridizace se objevuje alespoň u jedné čtvrtiny rostlinných druhů a přibližně u jedné desetiny druhů živočišných (Mallet 2005). Ačkoli je tedy v přírodě poměrně častá, její míra se mezi jednotlivými skupinami značně liší a nelze ji považovat za všudypřítomnou (Ellstrand *et al.* 1999).

Většina z dosud publikovaných prací se zabývá převážně otázkou mezidruhové hybridizace. Je však třeba zmínit, že ke stejnému procesu může docházet také v rámci jednoho druhu, a to mezi zástupci populací, které od sebe byly dříve izolovány a nyní se odlišují frekvencí alel konkrétních genů (Culley *et Hardiman* 2009).

3.3.1. Důsledky hybridizačního procesu

Dle Gottlieba (1984) je poměrně otevřený a plastický systém rostlinné morfogeneze, vyplývající z průběhu embryogeneze, ze struktury pletiv a rostlinného těla celkově, všeobecně shovívavější k rozsáhlým genomovým změnám, než je tomu v případě zvířat. To je pravděpodobně dáno také odlišným způsobem života. Rostliny jsou po vyklíčení semen fixovány na dané místo a potřebují vykazovat dostatečnou míru plasticity vůči podmínkám okolního prostředí, což je do značné míry umožněno genovou nadpočetností.

Přesto však hybridizační proces představuje výrazný zásah do struktury genetické informace organismu. Ve stejném okamžiku může docházet k pozitivním i negativním genomovým interakcím, které se navíc mohou v každé generaci významně lišit díky rekombinačnímu procesu. Vyvolané změny jsou s ohledem na okolní podmínky často nepříznivé a dochází k outbrední depresi snižující celkovou fitness jedince (Culley *et al.* 2009; Edmands 2002; Ellstrand 1992). Jak ale dokazují studie provedené na několika druzích slunečnic (*Helianthus* spp.) (Lexer *et al.* 2003; Riesberg *et al.* 2003) nebo práce Langevin *et al.* (1990), v některých případech představuje hybridizace díky nárůstu variability, epistatickým změnám, ztrátě škodlivých alel (případně zamaskováním jejich přítomnosti) či přenosu výhodných alel důležitý faktor přispívající ke zvýšení adaptability organismu.

3.3.2. Introgresní hybridizace

V případě hybridizace mezi planými a kulturními populacemi ve volné přírodě dochází v současnosti primárně k jednosměrnému toku genů z kulturních plodin do divokých variant (Ellstrand *et al.* 1999; Papa *et al.* 2003). V průběhu domestikace často docházelo ke změně reprodukčního systému z cizosprašného na samosprašný (Dempewolf *et al.* 2012), což omezilo tok genů a vedlo k fixaci převážně recesivně podmíněných domestikačních znaků. Cíleným křížením kulturních a planých forem je však možno dosáhnout opačného výsledku a obohatit tak genofond dnešních kultivarů o alely přítomné u jejich planých předků (Ellstrand *et al.* 1999; Langevin *et al.* 1990). V případě, kdy dochází k opakovanému křížení jednoho z rodičovských genotypů, označujeme proces termínem introgresní hybridizace.

3.3.2.1. Význam intogresní hybridizace

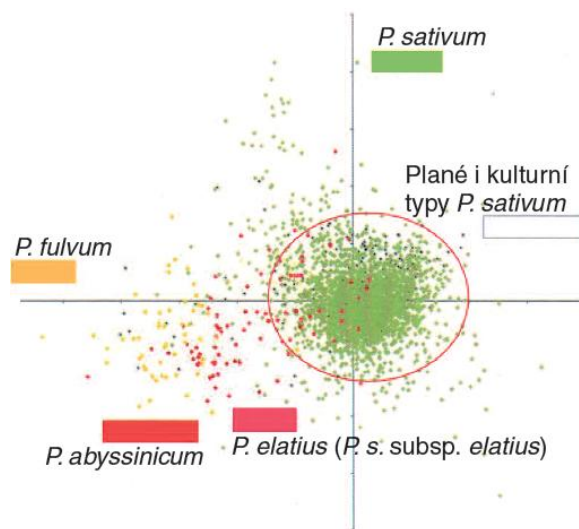
Počet kvetoucích rostlinných druhů žijících na Zemi je odhadován na 300 000. Přesto závisí současný energetický příjem celé lidské společnosti z 80 % na necelém tuctu z nich (mj. pšenice, ječmen, rýže, rajče, brambor). Už nyní jsou na celosvětovou produkci jídla kladeny obrovské nároky. S předpokladem narůstajícího počtu obyvatel planety ji však bude potřeba během nadcházejících dvou až tří dekád nejméně zdvojnásobit (McCouch *et al.* 2013). Komplikace nastávají v souvislosti s nedostatkem vodních zdrojů a půd, snižující se kvalitou půdy, antropogenním efektem, narušením přirozeného prostředí organismů a v neposlední řadě také ve spojení se změnami klimatu. Bylo zjištěno, že i relativně mírné klimatické výkyvy, zaznamenané v uplynulém století, zasáhly velké množství rostlinných druhů a výrazně ovlivnily jejich rozšíření, četnost, fyziologii a fenologii (Jarvis *et al.* 2008). Proto, aby bylo možno zmíněné dvojnásobné produkce potravy dosáhnout, je tedy důležité najít vhodný a dlouhodobě udržitelný způsob zajišťující uchování maximální míry biodiverzity, jež by organismům pomohla vyrovnat se se změněnými podmínkami. Jedním z možných řešení je přitom právě využití potenciálu, který nabízí metoda intogresní hybridizace.

3.3.2.2. Potenciál planých forem a jejich genetická diverzita

Plané formy rostlin jsou zdrojem velkého množství alel, které již nejsou u současných kulturních plodin vlivem domestikační epizody přítomny. Jak bylo zjištěno, s největší genetickou variabilitou se setkáváme v populacích vyskytujících se na místech s extrémními podmínkami (Nevo *et al.* 1997). Právě divoké formy dokázaly v podobných podmínkách dlouhodobě přežít. Jejich genomy však bývají zatíženy řadou alel podmiňujících fenotypové znaky, které jsou z agronomického hlediska spíše nežádoucí. Ačkoli šlechtěním došlo k částečné eliminaci těchto nežádoucích forem genů, spolu s nimi byla v důsledku cílené selekce odstraněna též řada takových, které by mohly být hospodářsky významné (Warschefsky *et al.* 2014; Zamir 2001).

Již Darwin (1859) přikládá problematice týkající se genetické diverzity domestikovaných druhů velký význam, když v abstraktu uvádějícím své stěžejní dílo *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life* vybízí k jejímu podrobnějšímu studiu. Skutečný potenciál, který se skrývá v genomu planých forem, však zaznamenali poprvé ve větší míře až Bessey (1906) a Vavilov (1940). Jak znázorňuje obrázek 4, rozdíl v alelické variabilitě mezi domestikovanými

a nekulturními formami plodin je často markantní. Vysoká úroveň genetické diverzity přítomné u planých druhů je způsobena zejména absencí dlouhodobého selekčního tlaku ze strany šlechtitelů. Zachování maximální variability je pro divoké druhy výhodné z důvodu usnadnění adaptace na široké rozpětí přírodních podmínek a ekologických nik (Chan *et al.* 1997; Ram *et al.* 2007). Dle některých studií (Abo-elwafa *et al.* 1995; Aldrich *et al.* 1992) navíc plané druhy v porovnání s kulturními plodinami častěji vykazují vyšší míru polymorfismu.



Obrázek 4. Genetická diverzita druhů a poddruhů rodu *Pisum* (převzato ze Smýkal 2011).

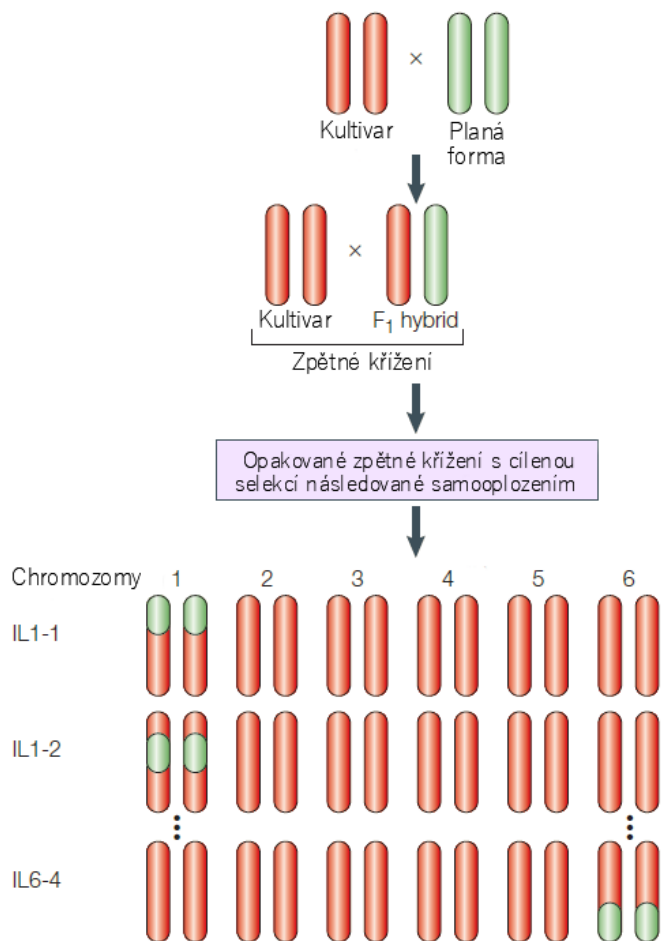
Pěstované kulturní typy jsou ohraničeny červenou elipsou.

Využití divokých příbuzných dnešních rostlinných kultivarů coby zdroje genetické variability ztracené v průběhu domestikace je jednou z možností, jak v mnoha ohledech vylepšit hospodářskou kvalitu současných zemědělských plodin (Zamir 2001). Jak dokazuje řada dosud publikovaných prací, velký počet planých druhů našel na tomto poli uplatnění již dnes. Mezi nejčastější pokroky zaznamenané v souvislosti s vnitrodruhovou hybridizací patří vylepšení rezistence vůči škůdcům a chorobám (Malik *et al.* 2003; Pavek *et al.* 2001), tvořící přibližně tři čtvrtiny veškerých prací (Hajjar *et al.* 2007). Dále potom zvýšení tolerance k abiotickým stresům (Farooq *et al.* 2001), zvýšení výnosnosti či nutriční hodnoty (Pan *et al.* 2000) a vylepšení řady jiných kvalitativních znaků, významných z agronomického hlediska.

3.3.2.3. Princip introgresní hybridizace

Podstatou introgresní hybridizace je několikanásobné zpětné křížení plané či exotické formy rostliny s jí příbuzným domestikovaným kultivarem. Z řady studií (Chen *et al.* 2001;

Linh *et al.* 2012) je patrné, že šance jediné introgresní hybridizace na významné vylepšení sledovaného znaku je poměrně mizivá. V praxi se proto využívá pyramidového systému, kdy každý z učiněných kroků znamená alespoň částečné vylepšení vybraného znaku v porovnání s mírou jeho projevu, zaznamenanou v předchozí rostlinné generaci (Gur *et* Zamir 2004; Tanksley *et* McCouch 1997).



Obrázek 5. Stěžejní kroky introgresní hybridizace (upraveno dle Zamir 2001).

Chromozomy kulturní formy jsou vyznačeny červeně, zelená barva znázorňuje segmenty inkorporované z planého druhu. Ve spodní části jsou zobrazeny hypoteticky získané introgresní linie (IL).

Postup introgresní hybridizace je schematicky znázorněn na výše uvedeném obrázku 5. První fáze procesu spočívá ve zkřížení vybraného planého druhu, zastupujícího úlohu samce, s druhem kulturním. Hybridizací vzniklí jedinci F₁ generace (tj. první získaná introgresní linie, IL1) jsou následně za vzniku F₂ generace (IL2) zpětně kříženi s původním domestikovaným druhem. Analogickým způsobem, kdy je nově vzniklá introgresní linie vždy zkřížena se stejným rodičem, se postup dále opakuje. Jak podotýká Mallet (2005), získat první generaci hybridů je zpravidla nejtěžší. Ti navíc často vykazují nižší viabilitu a fertilitu. Další

kroky zpětného křížení však bývají daleko přímočařejší. V šesté generaci je možno izolovat vzájemně nezávislé rostliny, přičemž každá z nich je heterozygotní v jiném chromozomovém segmentu. Konečným krokem šlechtění je potom samooplození rostlin, jež je zapotřebí k získání jedinců, kteří budou ve vnesených segmentech homozygotní. To zpravidla vyžaduje nejméně další dvě experimentální generace (Zamir 2001).

Stěžejní myšlenkou celého přístupu je fakt, že s každým zpětným křížením dochází v nově vzniklých introgresních liniích k poklesu obsahu genomové DNA planého druhu na polovinu. Taková redukce ve výsledku umožňuje zkoumání vlivu přítomnosti konkrétní skupiny alel či lokusů, pocházejících z divoké formy, na výsledný fenotypový projev hybridní rostliny. Lokalizování polohy vnesených chromozomových segmentů na jinak uniformním genetickém pozadí domestikovaného kultivaru umožňují genetické markery a s jejich pomocí sestavené molekulární mapy. Díky nim lze na základě nově přítomného polymorfismu v genomu rostliny odlišit, ze kterého rodiče konkrétní forma genu pochází. Rozpoznání introgresí vnesených segmentů, ovlivňujících fenotyp žádaným způsobem, a následná eliminace negativních znaků, přenesených z plané formy spolu se chtěnými lokusy, zpravidla vyžaduje mezi třemi až šesti experimentálními generacemi (Tanksley *et* McCouch 1997; Zamir 2001).

Při volbě vhodných rodičovských druhů se bere v úvahu nejen kvalita jejich hospodářského projevu, ale také vzájemná genetická vzdálenost. Čím rozdílnější genotypy se mezi sebou kříží, tím je pravděpodobnější, že budou obsahovat nové formy genů. Na druhou stranu je však nutno podotknout, že přílišná genetická vzdálenost může v některých případech přinášet problémy pramenící z akumulace velkého počtu genomových inkompatibilit (Stelkens *et* Seehausen 2009).

3.3.2.4. Úskalí introgresní hybridizace

Volba introgresní hybridizace coby metody vedoucí k vylepšení žádaných znaků u domestikovaných rostlin je v mnohém výhodná. Skrývá však také několik úskalí. Mezi hlavní se řadí poměrně značná časová náročnost vícenásobného zpětného křížení. Ta je dána jak generační dobou, rozdílnou dle výběru experimentálních rostlin, tak tím, že vyšlechtění výsledné hybridní linie, lišící se pouze v malém fragmentu chromozomu, trvá přibližně deset pokusných generací (Warschefsky *et al.* 2014; Zamir 2001). Další problém vyplývá z faktu, že jak přímí hybridí, tak jejich nejbližší potomci vzniklí zpětným křížením, často nenaplnují očekávanou míru hospodářské kvality. Toto bývá zapříčiněno absencí důležitých

domestikačních znaků (mj. pukání lusků, posun doby klíčení) či rozdíly v adaptaci na okolní prostředí. Komplikace může působit inkompatibilita mezi genomy kulturní a plané formy, sterilita hybridů F1 generace nebo snížená fertilita segregujících generací. Riziko také představuje možnost výskytu řady pleiotropních interakcí či negativního vlivu lokusů kvantitativně děděných znaků (Acosta-Gallegos *et al.* 1998; Warschefsky *et al.* 2014; Zamir 2001).

3.3.2.5. Introgresní hybridizace jako alternativa k transgenozí

Řadu výše zmíněných nedostatků vyvažuje možnost využití introgrese jako alternativního způsobu ke strategiím zabývajícím se genovým inženýrstvím. To se snaží podobného výsledku u rostlin dosáhnout zejména s pomocí transgenů, přičemž organismy vzniklé uvedeným způsobem označujeme jako geneticky modifikované (Holst-Jensen 2009; Tanksley *et McCouch* 1997, Warschefsky *et al.* 2014; Zamir 2001). Ačkoli prozatím nebylo vědecky prokázáno, že takto geneticky upravené plodiny představují větší riziko než kterékoliv jiné, dosavadní znalosti týkající se možných dopadů tvorby a využívání transgenních populací jsou stále mizivé (Hails *et Morley* 2005). Jak zdůrazňuje Zamir (2001), s ohledem na etickou stránku věci by měly být technologie genového inženýrství v oblasti šlechtitelství aplikovány pouze v případech, kdy není jiné volby.

3.4 GENOVÉ BANKY

Poznatky týkající se potenciálního využití genetické diverzity divoce rostoucích rostlin k vylepšení hospodářských plodin vedly ve spojení se stále aktuálnějšími problémy vymírání krajových druhů a narušení přirozeného prostředí organismů k založení rozsáhlých genových bank (Vavilov 1926; Zamir 2001). V současné době je po světě rozmístěno více než 1 700 těchto institucí, jejichž úlohou je uchovávat genotypy domestikovaných a planých forem, stejně tak jako odrůd s dosud nevyužitým potenciálem. Genové banky představují moderní úložiště genetické variability. Jako snadno přístupný zdroj usnadňují šlechtitelům vyhledávání vhodných experimentálních vzorků, díky čemuž došlo v této oblasti v uplynulých letech ke značnému pokroku (McCouch *et al.* 2013; Tanksley *et McCouch* 1997).

3.4.1. Genové banky a jejich využití

Podobně jako práce Skovmand *et al.* (2001) nebo Rygulla *et al.* (2007) se dosavadní šlechtitelské pokusy zaměřují především na identifikaci jedinců vykazujících co

nejmarkantnější projev ve znaku, který má být u domestikovaných plodin vylepšen, a na jejich následnou hybridizaci. Jedná se však o časově i finančně náročný proces, jenž je navíc nutno pro každý další cílový znak opakovat. Uvedený způsob se tak vyplácí pouze v okamžiku, kdy je exprese znaku výsledkem interakce malého počtu genů.

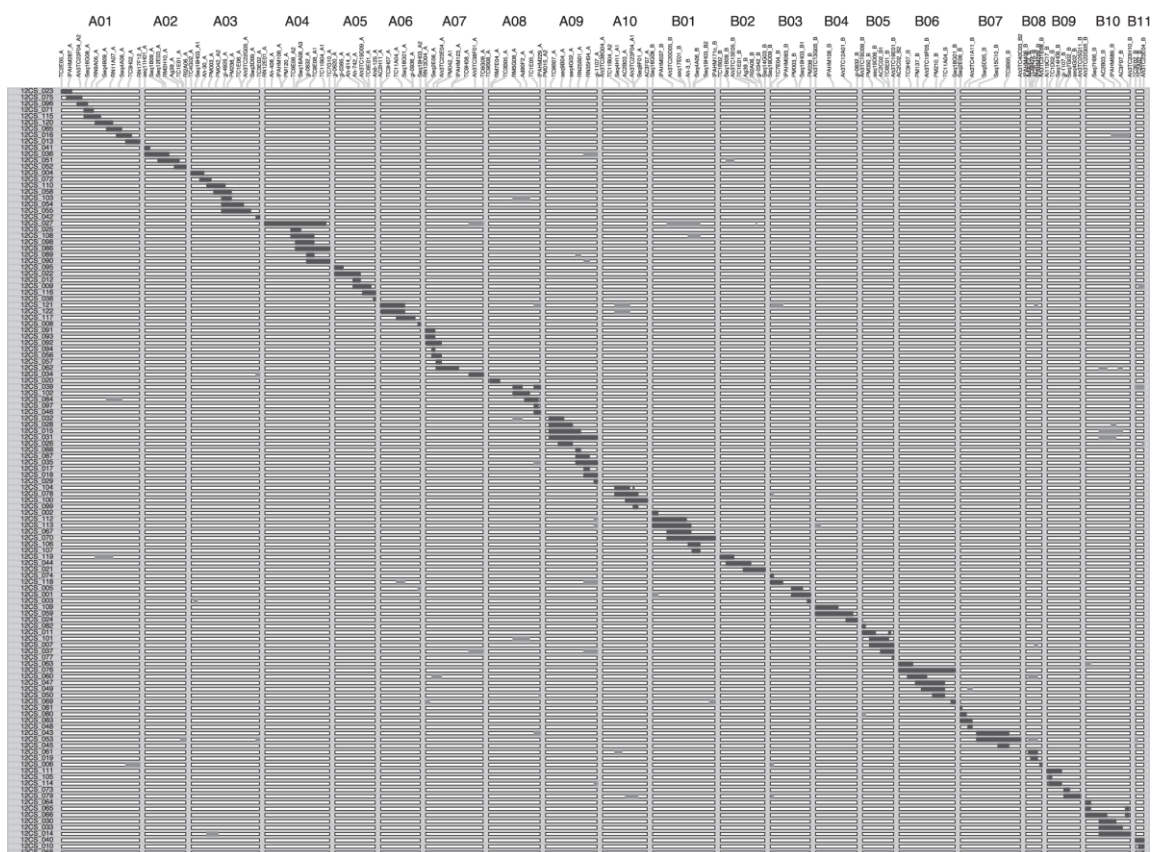
V případě komplexních nebo kvantitativně děděných vlastností, na jejichž vývoji se v různé míře podílí více rozdílných lokusů najednou (tzv. quantitative trait loci, QTL), může být celkový potenciál ukrytý v genomu stejné rostliny přehlédnut (Tanksley *et* McCouch 1997). Warschefsky *et al.* (2014) věří, že pokrok by mohlo přinést nahrazení tohoto dosud spíše zdrženlivého a převážně účelového výběru systematickým křížením planých druhů s jejich příbuznými elitními kultivary. Konečným výsledkem zmíněných hybridizačních pokusů by byla řada introgresních linií, tvořících dohromady genetickou knihovnu. Uplatnění, které její sestavení a využívání nabízí, je velmi široké. Již nyní se můžeme s řadou takových setkat a je pravděpodobné, že v nejbližších letech bude jejich počet díky projektům řady organizací i soukromých šlechtitelů ještě navýšen.

3.4.2. Tvorba a vývoj genetických knihoven

Položky uložené v genetických knihovnách jsou představovány jednotlivými introgresními liniemi, odvozenými z uniformního genetického pozadí kulturní plodiny. Každá z těchto linií nese ve svém genomu jedinečný chromozomový segment pocházející z planého druhu, jehož poloha je díky pokrokům molekulární biologie definována genetickými markery (Fonceka *et al.* 2012, Zamir 2001). Knihovna (soubor linií) je sestavena tak, aby se jednotlivé introgresí vnesené segmenty svou délkou vždy částečně překrývaly (Warschefsky *et al.* 2014). To umožňuje následné sestavení fyzické genomické mapy, jejíž výsledné rozlišení se odvíjí od zvoleného počtu markerů.

Progresivní vývoj genetických markerů pomáhá v sestavování stále přesnějších map. Ty díky tomu nejen zefektivňují přenos žádaných planých znaků do genomu kultivarů (Hajjar *et* Hodgkin 2007), ale v současné době už umožňují i bližší studium QTL ovlivňujících variabilitu ve fenotypu. Na základě zmapované genetické výbavy jsou šlechtitelé schopni u jednotlivých rostlin předpovědět jejich agronomický potenciál. Markery bývají využívány k identifikaci konkrétních linií nesoucích žádané geny, přičemž tímto způsobem je možno jednoduše eliminovat až tři čtvrtiny vzorků a obejít tak zdlouhavé a technicky náročné multienvironmentální testování v terénu (McCouch *et al.* 2013).

Řadě šlechtitelů se již podařilo větší či menší genetické knihovny introgresních linií, využívající plané formy rostlin, sestavit. Na pilotní práci Eshed *et al.* (1995) provedenou na planém a domestikovaném typu rajčete, kdy bylo poprvé využito řízené introgrese chromozomových segmentů, navázalo mnoho dalších experimentů s různými plodinami. Von Korff *et al.* (2004) vyšlechtili zpětným křížením introgresní linie ječmene, byly vytvořeny linie se substituovanými chromozomovými segmenty rýže (Wan *et al.* 2004). Smýkal *et al.* (nepublikováno) sestavili knihovnu čítající 105 introgresních linií planého druhu hrachu *Pisum fulvum* na pozadí kulturního hrachu *Pisum sativum*. Obrázek 6 zobrazuje knihovnu Fonceka *et al.* (2012) tvořenou 122 liniemi se substituovanými chromozomovými segmenty mezi planým a kulturním druhem podzemnice olejné (*Arachis hypogaea* L.). Je jisté, že takové experimentální populace rostlin najdou uplatnění jak ve studiu molekulární podstaty mnoha fenotypových projevů a v budoucích projektech zabývajících se mapováním QTL, tak v praktické stránce šlechtitelského procesu.



Obrázek 6. Grafické znázornění genotypů 122 linií (horizontální osa) se substituovanými chromozomovými segmenty získanými křížením planého a kulturního druhu podzemnice olejné (převzato z Fonceka *et al.* 2012). Vertikální osa znázorňuje 21 vazebných skupin. Černé oblasti zastupují chromozomové segmenty pocházející z plané rostliny zobrazené na genetickém pozadí kulturní plodiny.

Pro maximální využití biodiverzity uložené v genových bankách navrhuje McCouch (2013) ve svém komentáři třibodový plán. V prvním kroku by bylo třeba provést sekvenování genomů všech unikátních položek daného rostlinného druhu. Získaná data by následně pomohla rozluštit mechanismy, které rostliny využívají k adaptaci na okolní prostředí. Druhá část programu by spočívala v analýze fenotypových projevů položek uložených v genových bankách a v zaznamenání souvisejících ekologických a geografických informací. Kombinace genetických dat s těmito informacemi a jejich následné zpřístupnění veřejnosti, které je třetím bodem návrhu, by umožnila vypracování modelových studií předpovídajících konečnou hospodářskou kvalitu rostlin. To by vedlo ke zrychlení, zefektivnění a zlevnění celého šlechtitelského procesu (Zamir 2001).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL

Soubor 24 introgresních linií hrachu $BC_{2,3}F_4$ generace vzniklých hybridizací plané formy *Pisum fulvum* genotyp WL2140 (původ Údolí kříže, Jeruzalém, Izrael) s kulturní formou *Pisum sativum* subsp. *sativum* genotyp WL1238 (původ NordicGenebank, Švédsko) (Bogdanova et al. 2009) a následným dvou až třinásobným opakovaným zpětným křížením s hrachem setým *Pisum sativum* kultivar Terno (původ SELGEN, Česká republika). Genotyp WL1238 je často využívanou testovací linií s mnoha zmapovanými morfologickými znaky.

Experimentální rostliny byly pěstovány v areálu katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci ve skleníkových podmínkách, v období od února do června roku 2014. Rostliny byly umístěny ve 24 třílitrových květináčích naplněných zahradnickým substrátem (Profi zahradnický substrát, AGRO, Česká republika) smíchaným s ornici v poměru 1 : 1. V jednom květináči byly vždy 3 rostliny patřící ke stejné introgresní linii. Po zhodnocení individuálního fenotypového projevu byly ze všech rostlin odebrány vzorky listů, z nichž byla izolována genomová DNA, nezbytná k provedení následných molekulárních analýz. Po dobu vypracování bakalářské práce byly vzorky DNA uchovávány při teplotách 4 °C nebo -20 °C.

4.2 HODNOCENÍ FENOTYPOVÉHO PROJEVU

U jednotlivých introgresních rostlin $BC_{2,3}F_4$ generace bylo v květnu 2014 provedeno vizuální hodnocení fenotypového projevu deseti znaků. Zaznamenána byla výška rostlin, počet internodií do prvního květu, délka internodia, přítomnost anthokyanové skvrny na bázi palistů, přítomnost bazálního větvení stonku, barva květů a lusků, typ listů (normální/*afila*/*tendriless*) a přítomnost voskové vrstvy na jejich povrchu. Dále proběhlo hodnocení homozygotity linií dle jejich morfologie (tj. zda všechny rostliny patřící ke stejné linii vykazují v uvedených znacích stejný fenotypový projev).

4.3 IZOLACE GENOMOVÉ DNA

Genomová DNA z jednotlivých introgresních rostlin byla izolována z přibližně 100 mg čerstvého listového materiálu za využití komerčně dostupného kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit využívajícího metodu adsorpce na silikát. Postupováno bylo dle návodu

výrobce. Před samotnou izolací byl rostlinný materiál lyzován v homogenizátoru využívajícím kombinovaný systém vícesměrného pohybu a lyzačních kuliček.

POSTUP DLE NÁVODU VÝROBCE

- 1) Řádně označit veškeré zkumavky popisem.
- 2) K homogenizovanému materiálu umístěnému v 1,5 ml mikrozkušavkách přidat 400 μ l Lysis Buffer P a 20 μ l Proteinase K (100 μ g/ml), krátce zvortexovat, inkubovat při 65 °C po dobu 30 min.
- 3) Přelít lyzovaný materiál na kolonku Prefilter, centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm.
- 4) Přidat 10 μ l RNAase A (10 μ g/ml), ponechat 10 - 15 min při pokojové teplotě.
- 5) Přidat 200 μ l Binding Buffer P a důkladně zvortexovat.
- 6) Přemístit suspenzi do kolonky Spin Filter, nechat 1 - 2 min inkubovat při pokojové teplotě, centrifugovat při 12 000 rpm po dobu 1 min.
- 7) Vylít filtrát, vrátit kolonku zpět a napipetovat 550 μ l Wash Buffer I. Centrifugovat zkumavky 1 min. při 12 000 rpm.
- 8) Vylít filtrát, vrátit kolonku zpět a napipetovat 550 μ l Wash Buffer II. Centrifugovat zkumavky 1 min. při 12 000 rpm.
- 9) Vylít filtrát, vrátit kolonku zpět a napipetovat 550 μ l Wash Buffer II. Centrifugovat zkumavky 1 min. při 12 000 rpm.
- 10) Vylít filtrát, vrátit kolonku zpět, centrifugovat zkumavky 2 min. při 12 000 rpm.
- 11) Eluovat DNA přidáním 100 μ l Elution Buffer D předehřátého na teplotu 65 °C.
- 12) Zopakovat předchozí bod, nechat inkubovat 3 min. při pokojové teplotě.
- 13) Centrifugovat vzorky při 12 000 rpm po dobu 1 min.
- 14) Získanou genomovou DNA pro krátkodobou potřebu uskladnit při teplotě 4 °C, dlouhodobě při teplotě -20 °C.

4.4 SPEKTROFOTOMETRICKÁ ANALÝZA DNA

Spektrofotometrickým měřením na přístroji NanoDrop 1000 byla zjištěna koncentrace a čistota DNA vyizolované v předchozím kroku. Výsledky byly získány na základě poměru absorbancí DNA při vlnových délkách 260 a 280 nm.

4.5 ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE DNA, PCR PRODUKTŮ A PRODUKTŮ RESTRIKČNÍHO ŠTĚPENÍ

Ke kontrole integrity získané genomové DNA, k ověření správnosti průběhu následně provedených polymerázových řetězových reakcí (PCR) a k vizualizaci výsledků restrikčního štěpení byla využita separace vzorků horizontální elektroforézou v 1,5% nebo 2,0% agarózovém gelu. Gely s výsledky elektroforézy byly hodnoceny v UV transiluminátoru při vlnové délce 302 nebo 312 nm a zdokumentovány pomocí digitálního fotoaparátu s oranžovým filtrem. Snímky byly zpracovány počítačově v grafickém programu IrfanView.

POSTUP

- 1) Rozvařit 1,5 g agarózy ve 100 ml 0,5x TBE pufru (pro 2% gel 5,5 g agarózy v 275 ml 0,5x TBE pufru) v mikrovlnné troubě, v případě odpaření části roztoku doplnit do destilovanou vodou na původní hmotnost.
- 2) Přidat 2 μ l fluorescenčního barviva GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain a důkladně promíchat.
- 3) Nalít agarózu vychladlou na 50 - 60 °C do vaničky určené na horizontální elektroforézu, ve které jsou umístěny hřebeny. Nechat ztuhnout do konzistence gelu.
- 4) Po ztuhnutí umístit vaničku s gelem do elektroforetické komory, převrstvit TBE pufrům a vyjmout hřebeny.
- 5) Do jamek nanést 2 μ l (příp. 4 μ l, dle velikosti jamek) standardu molekulové hmotnosti GeneRuler 100bp DNA Ladder. Barevné vzorky nanášet po 5 μ l (příp. 8 μ l), v případě bezbarvých vzorků nanést směs vzorku s bromfenolovou modří (v poměru 5:2 ve prospěch vzorku) o stejném objemu.
- 6) Zapojit elektrické pole nastavené na napětí 100 - 120 V (příp. 280 - 320 V, dle rozměrů elektroforetické komory), nechat probíhat elektroforézu asi 35 min.
- 7) Odpojit elektroforetickou komoru od zdroje napětí a prohlédnout gel v UV transiluminační komoře, zdokumentovat.

4.6 MOLEKULÁRNÍ MARKERY

S ohledem na dostupné morfologické mapy genomu hrachu byly pro molekulárně-genetickou analýzu experimentálních introgresních linií s využitím metody PCR účelně vybrány konkrétní genově specifické jednolokusové DNA markery formátu CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) (Aubert *et al.* 2006; Konovalov *et al.* 2005) a několik

mikrosatelitních (SSR) markerů (Loridon *et al.* 2005; Smýkal *et al.* 2008). Celkem bylo zvoleno 12 markerů (viz tabulku I) testujících výskyt restričního či délkového polymorfismu, a to převážně na vazebných skupinách III a VI.

Tabulka I. Seznam markerů použitých k detekci výskytu polymorfismu

marker	sekvence primeru (3'-5'); forward (F), reverse (R)	NCBI číslo položky	reference
ThiolP	F - CCGAAGAGGATTACCCCTAYCGTGC	X66061	Aubert <i>et al.</i> 2006
	R - GCTTCTCCCCAGCTACCACCCC		
DRR49	F - ATGGGTGTTTTTAATGTTG	U31669	Brauner <i>et al.</i> 2002
	R - AGTTGTAATCAGGATGAG		
RNAHel	F - GGGTTTGGTAGGTTTGGTAGAGG	PSCC24A19u	Aubert <i>et al.</i> 2006
	R - GCTATCAAATTGTAGTGGGTGGG		
Dof6	F - CTCACTACACACGAATTCCGAG	AB087851	Deulvot <i>et al.</i> 2010
	R - TGAATGTGTCCAATACGGCTG		
Xyft	F - ACATGCCCTTTGACTTTGATG	AF223643	Aubert <i>et al.</i> 2006
	R - AAACAAAAGATGGCACAGTGG		
FVE1250	F - AACAAATGGAGACTCCTCCGT	AY830931	Hecht <i>et al.</i> 2005
	R - CACAACCTCACAATTCGCAATCACC		
Sodmt	F - GAACATGCCTACTACTTACAG	U30841	Brauner <i>et al.</i> 2002
	R - CTCTCTTCTCATATACTTCAC		
CipPor	F - ACTGCTAAGGCTTTGGCTGA	X63060	Brauner <i>et al.</i> 2002
	R - AGATTTTGTAGGCTTGGATCACT		
PIN1	F - GATTTCTACCATGTCATGACAGC		Aubert <i>et al.</i> 2006
	R - AACAGGTGAAGCACTTGAACCTCC		
TuBA1	F - GGAAACGCCTGCTGGGAG	U12589	Brauner <i>et al.</i> 2002
	R - AACAGTTGGAGGCTGATAAT		
AD141	F - AATTTGAAAGAGGCGGATGTG		Loridon <i>et al.</i> 2005
	R - ACTTCTCTCCAACATCCAACGA		
AD270	F - CTCATCTGATGCGTTGGATTAG		Loridon <i>et al.</i> 2005
	R - AGGTTGGATTTGTTGTTTGTG		

4.7 PCR AMPLIFIKACE

Amplifikace definovaných sekvencí DNA byly provedeny metodou PCR. Reakce probíhaly v termocyleru v 96-jamkových mikrotitračních destičkách nebo v 8-jamkových stripech o objemu 0,2 ml dle teplotního profilu uvedeného v tabulce II.

Příprava PCR premixu probíhala z důvodu zabránění možné kontaminace vzorků ve sterilním boxu dle níže uvedeného protokolu. Složení reakční směsi o celkovém objemu 15 μ l je zaznamenáno v tabulce III, k 13 μ l PCR premixu bylo vždy přidáno po 2 μ l DNA vzorku o přibližné koncentraci 20 - 60 ng/ μ l (originální vzorky ředěny 1:10). Použité primery uvádí tabulka I.

Tabulka II. Teplotní profil PCR reakce (program CAPS_55)

krok	čas	teplota [° C]	počet cyklů
počáteční denaturace DNA	5 min	95	1
denaturace DNA	30 s	95	35
annealing	20 s	55	
extenze	150 s	72	
finální extenze	10 min	72	1

POSTUP

- 1) Chemikálie pro PCR nechat rozmrazit a umístit do chladicího stojánu.
- 2) Do 2 ml mikrozkušavky připravit dle tabulky II potřebné množství PCR reakční směsi.
- 3) Do řádně popsanych mikrotitračních destiček nebo zkumavkových stripů rozpipetovat reakční směs po 13 μ l, následně přidat po 2 μ l testovaného vzorku DNA.
- 4) Umístit mikrotitrační desky nebo zkumavkové stripy do PCR termocycleru, spustit teplotní program CAPS_55 (viz tabulku I).
- 5) Amplifikovaný PCR produkt uskladnit pro krátkodobou potřebu při teplotě 4 °C, dlouhodobě při teplotě -20 °C.

Tabulka III. Složení PCR reakční směsi o celkovém objemu 15 μ l

	koncentrace pracovního roztoku	pro 1 test [μ l]	pro 26 testů [μ l]
pufř	5x	3	78
destilovaná voda		9,23	240
primer mix (F/R)	5 mmol/l	0,7	18,2
<i>Taq</i> pol	5 U/ μ l	0,07	1,82

4.8 RESTRIKCE PCR PRODUKTU

Získané PCR produkty byly za účelem zjištění výskytu polymorfismu enzymaticky štěpeny. Tabulka IV uvádí restriční enzymy využité v této práci. Produkty restričního štěpení byly elektroforeticky separovány, gely s výsledky separace řádně zdokumentovány.

Tabulka IV. Seznam použitých restričních enzymů s odpovídajícími teplotami štěpení, příslušnými pufrů a s korespondujícími molekulárními markery

marker	restriční enzym	teplota štěpení [° C]	pufr
ThiolP	<i>MboII</i>	37	modrý
DRR49, Dof6	<i>RsaI</i>	37	žlutý, Tango
PIN1, FVE1250, RNAHel	<i>AluI</i>	37	žlutý, Tango
TubA1	<i>TaqI</i>	65	<i>Taq</i> pufr
Sodmt, CipPor	<i>BclI</i>	55	zelený

Restrikce byla provedena dle níže uvedeného protokolu. Složení reakční směsi pro restriční štěpení o celkovém objemu 15 μ l je zaznamenáno v tabulce V, k 10 μ l premixu bylo vždy přidáno po 5 μ l DNA vzorku.

Tabulka V. Složení reakční směsi pro restriční štěpení o celkovém objemu 15 μ l

	pro 1 test [μ l]	pro 26 testů [μ l]
10x pufr	1,5	39
destilovaná voda	8,42	12,63
restriční enzym	0,08	2,08

POSTUP

- 1) Chemikálie pro restriční štěpení rozmrazit a následně umístit do chladicího stojánku.
- 2) Do mikrozkušavky odpovídající velikosti připravit dle tabulky V potřebné množství reakční směsi.
- 3) Rozpipetovat reakční směs po 10 μ l do řádně popsanych 8-jamkových zkumavkových stripů nebo do 96-jamkové mikrotitrační desky.
- 4) Přidat po 5 μ l PCR produktu.
- 5) Umístit zkumavkové stripy nebo mikrotitrační desku v závislosti na teplotě potřebné ke štěpení (viz tabulku IV) do PCR termocycleru nebo inkubátoru.

4.9 HODNOCENÍ ZÍSKANÝCH DAT

Vizuální a molekulární data získaná z jednotlivých introgresních linií byla ukládána ve formě tabulek a zpracovávána v počítačovém programu Microsoft Excel.

4.10 SEZNAM POUŽITÉHO VYBAVENÍ A CHEMIKÁLIÍ

PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

homogenizátor FastPrep-24, MB Biomedicals; **Invisorb® Spin Plant Mini Kit**, STRATEC Molecular GmbH; **vortex** MS2 Minishaker, IKA; **termoblok** MB-102, BIOER; **centrifuga** Centrifuge 5415 R, Eppendorf; **centrifuga** MPS 1000 Mini PCR Plate Spinner, Labnet; **minicentrifuga** Spectrafuge Mini, Labnet; **NanoDrop** 1000, Thermo Scientific; **sterilní box** PV-102, TelSTAR; PCR termocycler PTC-200, MJ Research; **soupravy pro horizontální gelovou elektroforézu** Owl A6, Thermo Scientific a Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad; **elektroforetický zdroj napětí** PowePac™ Basic Power Supply, Bio-Rad; **digitální fotoaparát** s oranžovým filtrem EDAS 290, Kodak

LABORATORNÍ VYBAVENÍ

automatické pipety Research Plus, Eppendorf; plastové špičky; kádinky; Erlenmeyerovy baňky; odměrný válec; mikrocentrifugační zkumavky; 96-jamkové mikrotitrační desky; 8-jamkové zkumavkové stripy; laboratorní předvážky; navažovací lžičky; buničitá vata; ochranné rukavice; stojany; ledová tříšť

CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

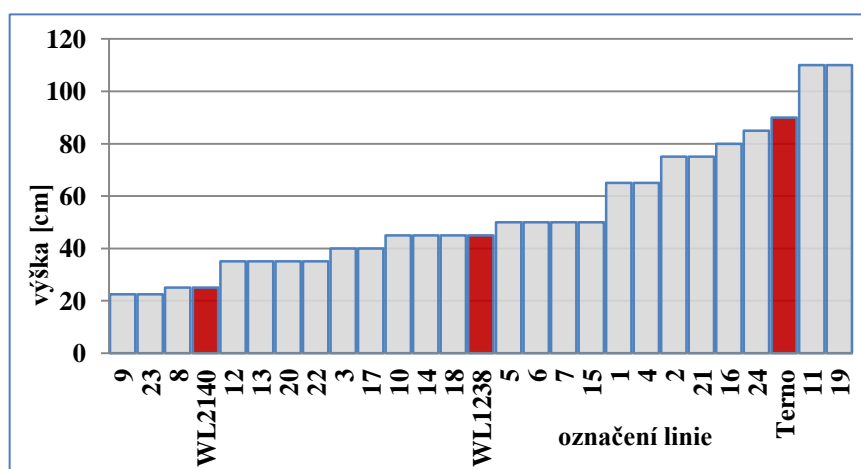
agaróza BIO-41025 Molecular Grade, Bioline; **standardy molekulové hmotnosti** GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, Biogen; **fluorescenční barvivo** GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, Biotium; 0,1% **bromfenolová modř** v 30% glycerinu, Promega; 10x **TBE pufr** (108 g TRIS báze, 55 g kyseliny borité, 40 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0), doplnit destilovanou vodou do objemu 1 l); **destilovaná voda**; **polymeráza** MyTaq™ RED DNA, Bioline; **pufr** 5x MyTaq™ Reaction Buffer Red, Bioline (s obsahem 15mmol/l MgCl₂, 5mmol/l dNTPs a nanášecího barviva); **primery**, Generi Biotech (viz tabulku III); **restrikční enzymy**, Thermo Scientific, Biogen (viz tabulku IV); **pufr pro restrikční enzymy** 10x, Thermo Scientific, Biogen (viz tabulku IV); **TE pufr** (12 g TRIS báze, 2 ml 0,5 mol/l EDTA, doplnit destilovanou vodou do objemu 1 l a upravit pH na 8,0)

5 VÝSLEDKY

Výsledky vizuálního hodnocení fenotypového projevu rodičovských rostlin a 24 experimentálních introgresních linií jsou zaznamenány v tabulce VI. Jak je patrné, většina linií (20) vykazovala homozygotní projev. V případě, kdy se jednotlivé rostliny příslušející ke stejné linii v projevu vybraného znaku lišily, je tak v tabulce uvedeno nebo je zapsána nejmenší a největší naměřená hodnota. V příloze (obrázky 1 - 4) jsou pro porovnání uvedeny fotografie projevu některých znaků.

Markantní rozdíly byly zaznamenány v souvislosti s výškou jednotlivých rostlin, pohybující se v rozmezí od 20 do 120 cm (viz graf I.). Krátká internodia o délce 3 až 5 cm, recesivní znak *lele* pocházející z *P. sativum* genotypu WL1238, se vyskytla u 19 linií. Květy většiny IL byly bílé barvy (*aa*), 6 linií mělo květy zbarveny růžově, jedna linie fialově. Žluté květy, vyskytující se u planého rodičovského genotypu WL2140, nebyly přítomny u žádné z introgresních linií. Žlutá barva lusků (*gpgp*) byla zjištěna u 5 linií, z toho se v jednom případě jednalo o heterozygotní založení znaku. Zelené lusky jedné linie nesly tmavé pigmentové skvrny, 5 linií v době fenotypového hodnocení lusky nemělo. Největší zastoupení (21 linií) vykazovaly IL s redukovanou listovou plochou (*afila*), podmíněnou jako recesivní znak původem z rodičovského genotypu Terno. U jedné linie se mimo list typu *afila* vyskytl také původní recesivní znak *tendriless* (*tltl*) rodiče genotypu WL1238. Chybějící vosková vrstva (*wbwb*) na povrchu listu se vyskytla pouze u 2 linií.

Graf I. Celková výška introgresních linií a jejich rodičovských rostlin



pozn.: linie jsou řazeny vzestupně dle výšky, výchozí genotypy jsou zvýrazněny červeně; v případě, kdy byly rostliny patřící ke stejné linii odlišného vzrůstu, je v tabulce uvedena hodnota nacházející se mezi nejnižší a nejvyšší naměřenou výškou

Tabulka VI. Vizuální hodnocení fenotypového projevu introgresních linií a jejich rodičovských genotypů

označení linie	výška [cm]	počet sterilních nodů	krátká internodia (LG III; <i>le</i>)	anthokyanová skvrna	bazální větvení	barva květu	barva lusku (LG V; <i>gp</i>)	typ listu	vosková vrstva (LG II; <i>wb</i>)	homozygocita dle morfologie
1	60 - 70	17 - 19	ano	ne	ne	bílá	zelená	<i>afila</i>	ano	ano
2	70 - 80	15 - 17	ne	ne	ne	bílá	-	<i>afila</i>	ano	ano
3	40	17 - 18	ano	ne	ne	bílá	-	<i>afila</i>	ano	ano
4	60 - 70	19 - 20	ano	ne	ne	bílá	zelená	<i>afila</i>	ano	ano
5	50	17	ano	ne	ne	bílá	zelená	<i>afila</i>	ano	ano
6	50	20 - 21	ano	ne	ne	bílá	zelená	<i>afila</i>	ano	ano
7	50	19	ano	ano/ne	ne	bílá	zelená	<i>afila</i>	ne	ne
8	20 - 30	15 - 17	ano	ne	ne	růžová	žlutá	<i>afila/tendriless</i>	ano	ne
9	20 - 25	15	ano	ne	ano	růžová	zelená (pigment)	<i>afila</i>	ano	ano
10	40 - 50	17	ano	ne	ne	bílá	zelená/žlutá	<i>afila</i>	ano	ne
11	100 - 120	22 - 23	ne	ne	ne	bílá	-	<i>afila/normální</i>	ano	ne
12	30 - 40	14 - 15	ano	ne	ne	růžová	zelená	<i>afila</i>	ano	ano
13	30 - 40	12 - 13	ano	ano	ne	fialová	zelená	<i>afila</i>	ano	ano
14	40 - 50	17 - 18	ano	ne	ne	bílá	žlutá	<i>afila</i>	ano	ano
15	50	20	ano	ne	ne	bílá	-	normální	ano	ano
16	80	20	ano	ne	ne	bílá	zelená	<i>afila</i>	ano	ano
17	40	15	ano	ne	ne	bílá	žlutá	<i>afila</i>	ano	ano
18	40 - 50	14 - 15	ano	ano	ne	růžová	zelená	<i>afila</i>	ano	ano
19	100 - 120	16 - 17	ne	ne	ne	růžová	zelená	<i>afila</i>	ano	ano
20	30 - 40	14 - 16	ano	ne	ano	bílá	zelená	<i>afila</i>	ano	ano
21	70 - 80	20 - 21	ne	ne	ne	bílá	žlutá	<i>afila</i>	ano	ano
22	30 - 40	16 - 17	ano	ne	ne	bílá	zelená	<i>afila</i>	ano	ano
23	20 - 25	12 - 13	ano	ne	ne	růžová	zelená	<i>afila</i>	ne	ano
24	80 - 90	22 - 23	ne	ano	ne	bílá	-	<i>afila</i>	ano	ano
Terno	80 - 100	15 - 18	ano	ne	ano	bílá	zelená	<i>afila</i>	ano	-
WL2140	20 - 30	10	ne	ne	ne	žlutá	zelená (pigment)	normální	ano	-
WL1238	40 - 50	12	ano	ne	ne	růžová	žlutá	<i>tendriless</i>	ano	-

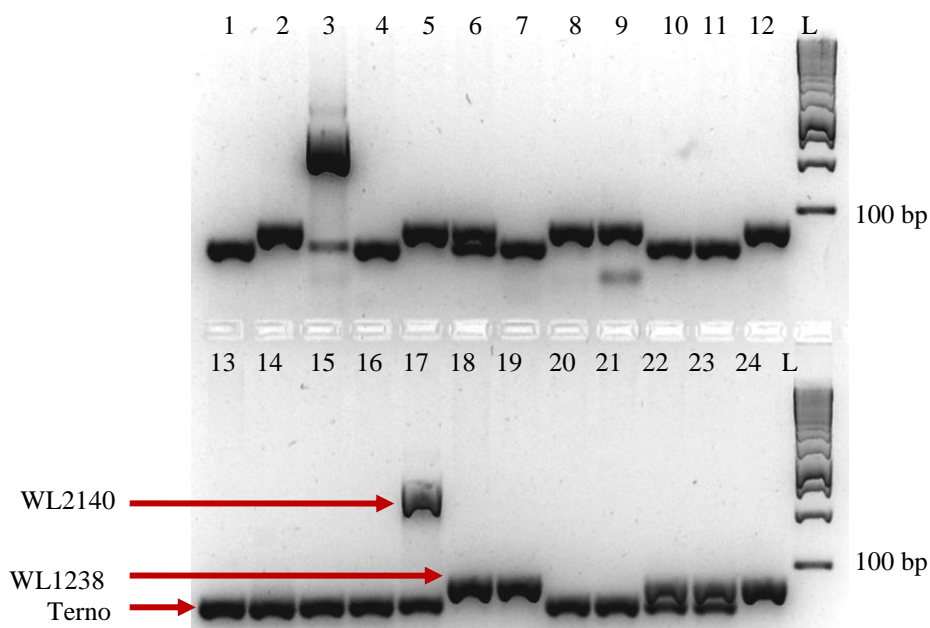
legenda: LG = vazebná skupina, na které je daný znak umístěn u *P. sativum* subsp. *sativum* genotyp WL1238; *le*, *gp*, *wb* - geny podmiňující daný znak

V rámci projektu číslo ME10062, uskutečněného za spolufinancování MŠMT v letech 2010 - 2012 v programu KONTAKT, byla izolována genomová DNA z rodičovských rostlin (cv. Terno, WL2140, WL1238). Dále byla provedena řada PCR reakcí se specifickými primery, přičemž v případě potřeby proběhlo štěpení získaných PCR produktů restrikcími enzymy. Následná elektroforetická separace vzniklých DNA fragmentů vedla ke zjištění přítomnosti polymorfismu v jednotlivých lokusech. Výsledky získané v rámci projektu byly využity k vyhodnocení níže uvedených dat.

V této bakalářské práci byla za použití izolačního kitu získána genomová DNA z 24 rostlin, představujících populace introgresních linií. Horizontální gelovou elektroforézou v agarózovém gelu byla následně zkontrolována její integrita. Spektrofotometrickou analýzou na přístroji NanoDrop 1000 byla zjištěna koncentrace izolované DNA, činící 40-80 ng/μl. Čistota DNA získaná z poměru absorbcí A260/280 se pohybovala v rozmezí 1,8 až 2,0, což poukazuje na neznečištěnou DNA.

Izolovaná genomová DNA byla dále s využitím metody PCR amplifikována s vybranými specifickými primery, uvedenými v tabulce I. Primery byly účelně zvoleny tak, aby korespondovaly s lokusy vyskytujícími se zejména na vazebných skupinách III (lokalizace lokusu *Dpo1* pro pukavost lusků) a VI (nese lokus *Gty* zodpovídající za dormanci semen hrachu). Celkem bylo použito 10 genově specifických markerů ve formátu CAPS-PCR (3 pro LG III, 1 pro LG IV a 6 pro LG VI) a 2 SSR lokusy (LG III). Průměrná vzdálenost mezi jednotlivými markery je 57,5 cM v případě LG III a 13,2 cM u LG VI.

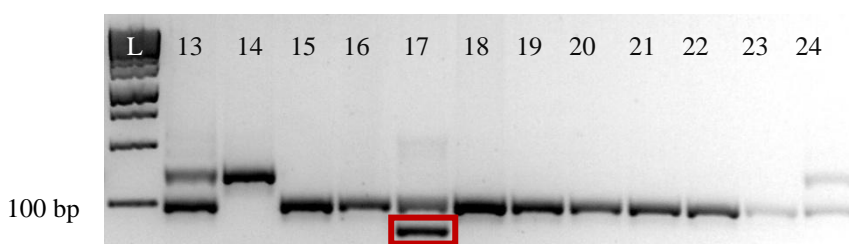
Marker Xyft byl i přes výskyt na jiné vazebné skupině (IV) testován s ohledem na předpokládanou možnost rozlišení přítomnosti všech tří rodičovských genotypů. Tato domněnka byla po provedení elektroforetické separace PCR produktu potvrzena. Xyft byl nakonec jediným použitým markerem, kde se vlivem délkového polymorfismu projevila přítomnost alely odpovídající *P. sativum* subsp. *sativum* genotypu WL1238 (viz obr. 7).



Obrázek 7. Elektroforetické rozdělení PCR produktů sledovaných vzorků při využití primerů pro fragment genu Xyft. legenda: 1-24 - vzorky jednotlivých IL; L - standard molekulové hmotnosti; šipky vyznačují příslušnost detekovaného fragmentu (alely) ke konkrétnímu genotypu

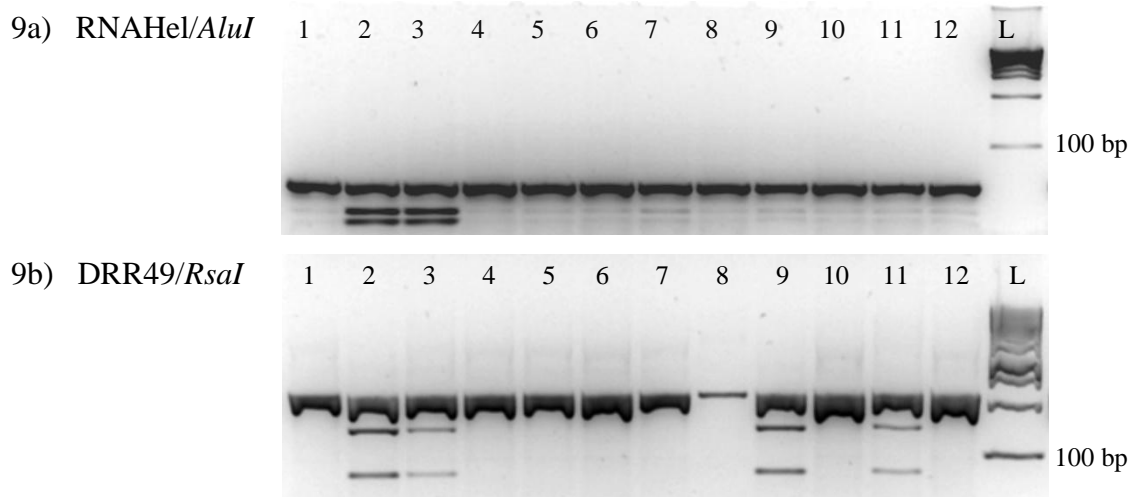
Elektroforetická analýza délkového polymorfismu byla obdobně provedena také u PCR produktů mikrosatelitních markerů AD270 a AD141 (viz obrázek 8). U vzorku IL číslo 17 však bylo ve druhém případě možno identifikovat pouze jeden z detekovaných fragmentů (příslušnost kultivaru Terno). Na základě toho zde nešlo spolehlivě rozhodnout o přítomnosti žádné z pěti možných kombinací sledovaných genotypů hrachu.

8) AD141



Obrázek 8. Elektroforetické rozdělení PCR produktů sledovaných vzorků při využití primerů pro SSR lokus AD141. legenda: 13-24 - vzorky jednotlivých IL; L - standard molekulové hmotnosti; červený obdélník značí neznámý fragment

PCR produkty ostatních molekulárních markerů byly podrobeny restričnímu štěpení odpovídajícími enzymy (viz tabulku IV) a takto získané segmenty DNA byly následně elektroforeticky rozděleny (viz obrázky 9a a 9b). Výsledky vizuální analýzy všech elektroforetogramů jsou zaznamenány dále v tabulce VII.



Obrázky 9a, 9b. Elektroforetické rozdělení části fragmentů genů RNAHel a DRR49 získaných restričním štěpením vzorků IL příslušnými enzymy. legenda: 1-12 - vzorky jednotlivých IL; L - standard molekulové hmotnosti

Z celkového počtu 288 detekovaných fragmentů odpovídalo 61 (21,2 %) planému hrachu *P. fulvum* genotyp WL2140. Genotyp kulturního druhu *P. sativum* byl přítomen ve 203 případech (70,5 %), z toho byl 195krát (67,7 %) zaznamenán genotyp kultivaru Terno a 8krát (2,8 %) genotyp WL1238. Celková míra heterozygotnosti byla vypočtena na 8 % (23 případů). Stav Terno/WL2140 se vyskytoval u 20 položek (6,9 %), stav Terno/WL1238 byl zjištěn u 3 případů (1 %). V jednom případě nebylo možno příslušnost detekovaných fragmentů identifikovat.

Tabulka VII. Hodnocení genotypového projevu introgresních linií s využitím vybraných molekulárních markerů

vazebná skupina	VI	VI	VI	VI	VI	VI	III	III	III	III	III	IV
relativní vzd. [cM]	28	37	45	75	86	94	10	70	149	180	240	79
marker	PIN1	ThiolP	DRR49	RNAHel	Dof6	FVE1250	TuBA1	Sodmt	AD141	CipPor	AD270	Xyft
číslo linie												
1	T	T	T	T	T	2140	T	T	T/2140	T	T	T
2	T	T	2140	T/2140	T	2140	2140	T	2140	T	2140	1238
3	T	2140	2140	T/2140	T	2140	T	2140	T	2140	T	2140
4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T/2140	T	T
5	2140	T	T	T	T	T	T	T	T/2140	T	T	1238
6	T	T	T	T	T	T	2140	T	T	T	T	T/1238
7	T	T	T	T	T	T	T	T	T	2140	T	T
8	2140	T	T	T	T	T	T	2140	T	T	T	1238
9	2140	2140	2140	T	2140	2140	T/2140	T	2140	T	T	1238
10	T	T	T	T	T	T	T/2140	T	2140	T	T	T
11	T	T	2140	T	T	2140	T	2140	T	T/2140	2140	T
12	2140	2140	T	T	T	T	T/2140	T	2140	T	2140	1238
13	2140	2140	T	T	T	T	T	T	T/2140	2140	2140	T
14	T	T	T	T/2140	T	T	T	T	2140	T	T	T
15	2140	2140	T	2140	T	T	2140	T	T	T	T	T
16	T	2140	T	T	T	T	2140	T	T	2140	T	T
17	T	T	T	T	T	T	2140	T	neznámý	T/2140	T/2140	T/2140
18	T/2140	2140	T	T	T	T	T	T	T	T	T/2140	1238
19	2140	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	1238
20	T/2140	T	2140	2140	T	2140	2140	2140	T	T	T	T
21	T	T	T	2140	T	T	2140	T	T	T	T	T
22	T	T	T	T	T	T	T/2140	2140	T	T	T	T/1238
23	T	2140	T	T	T	T	2140	2140	T	T	T	T/1238
24	2140	2140	T	T	T	T	T/2140	T	T/2140	T	2140	1238

legenda: **2140** - genotyp lokusu odpovídající *P. fulvum* genotyp WL2140; **1238** - genotyp lokusu odpovídající *P. sativum* subsp. *sativum* genotyp WL1238; **T** - genotyp lokusu odpovídající *P. sativum* kultivar Terno; **T/2140** - heterozygotní genotyp Terno/WL2140; **T/1238** - heterozygotní genotyp Terno/WL1238

6 DISKUSE

V bakalářské práci bylo analyzováno 24 introgresních linií (IL) hrachu BC_{2:3}F₄ generace, vzniklých zkřížením plané formy *Pisum fulvum* genotyp WL2140 s kulturní formou *Pisum sativum* subsp. *sativum* genotyp WL1238 a následným dvou až třinásobným opakovaným zpětným křížením s hrachem setým *Pisum sativum* kultivar Terno.

Počáteční fertilita hybridů byla vzhledem k odlišnému karyotypu mezi planým *P. fulvum* a kulturním *P. sativum* nízká. Zejména u prvních generací se projevilo narušení meiotické rekombinace a segregace alel (Errico *et al.* 1991; De Martino *et al.* 2000). I přes tuto omezenou křížitelnost se však nakonec podařilo vyšlechtit řadu introgresních linií, nesoucích kombinaci výše zmíněných genomů. Bylo tak potvrzeno, že ačkoliv je *P. fulvum* fylogeneticky nejvzdálenějším planým druhem (součást sekundárního genofondu), může stále hybridizovat s ostatními příslušníky rodu (Smýkal *et al.* 2014).

Největší rozdíly mezi jednotlivými IL byly ve fenotypovém projevu zaznamenány v souvislosti s výškou rostlin. Zvýšená variabilita znaku s velkou pravděpodobností poukazuje na přítomnost hybridního efektu a s tím související transgresivní segregace. Jedná se o jev vznikající jako důsledek rekombinace alel, projevující se vznikem extrémního fenotypového projevu (jak v pozitivním, tak v negativním směru) přesahujícího oba rodičovské (Rieseberg *et al.* 1999). Je však třeba zmínit, že do velké míry se v tomto projevuje také vliv prostředí (např. dostupnost živin, umístění v porostu).

U experimentálních IL i u rodičovských rostlin bylo provedeno mapování introgresních fragmentů *P. fulvum* genotypu WL2140 s využitím 10 genově specifických markerů ve formátu CAPS-PCR a 2 SSR lokusů. S ohledem na možnosti práce byly k mapování vybrány vazebné skupiny (LG) III a VI. LG III byla zvolena z důvodu přítomnosti lokusu *Dpo1*, spojeného s domestikačním znakem pro pukavost lusku (Blixt 1972), na LG VI se nachází lokus *Gty* ovlivňující dormanci semen (Blixt 1974). Kromě uvedených markerů byla obdobná molekulární analýza provedena i s mnoha dalšími (např. Hop1, Gsp, ThioPer, Sus3, Gpic, GsnI, A278), zjištěné výsledky zde však nejsou prezentovány. Jednalo se o případy, kdy nebyl u rodičovských rostlin detekován polymorfismus, kdy nebylo možno svědomitě rozhodnout příslušnost k žádnému z rodičovských genotypů, či kdy se vybrané markery nevztahovaly k vazebné skupině III ani VI. Výjimku tvoří pouze Xyft, prezentovaný

i přes souvislost s LG IV. Tento byl jediným testovaným markerem schopným vzájemně odlišit alely *P. sativum* genotyp WL1238 a *P. sativum* kultivar Terno.

Genotyp kulturního druhu *P. sativum* (WL1238 nebo kultivar Terno) byl zaznamenán v 70,5 % (203 případů), genotyp *P. fulvum* WL2140 v 21,2 % (61 případů). Zjištěná míra heterozygotnosti odpovídala 8 % (23 případů). V jednom případě nebylo možno detekované fragmenty přiřadit, vysvětlením tohoto zjištění by mohlo být nechtěné cizosprášení rostliny či přítomnost nežádoucí příměsi v počátečních fázích vývoje dané linie. Dle předpokladu se rostliny ve fenotypovém projevu nejčastěji přiblížily kulturnímu hrachu setému *P. sativum* kultivar Terno. Vzhledem k tomu, že s každým křížením klesá podíl planého genotypu v IL o polovinu, pochází teoreticky u generace vzniklé dvojnásobným zpětným křížením (BC₂ generace) 87,5 % genetického materiálu ze zmíněného kulturního druhu, u BC₃ generace potom asi 93,75 %. Rozdílnost zjištěné a očekávané hodnoty může odkazovat na fakt, že nejméně v prvních dvou generacích po křížení nebyla prováděna cílená skarifikace (rozrušení integrity) osemení. Na základě toho může být zastoupení některých fragmentů (především v okolí *Gty* lokusu) nižší, než očekávané. Roli mohlo sehrát také narušení štěpných poměrů některých IL vlivem omezené křížitelnosti, či nedostatečný soubor 24 introgresních linií. K získání reprezentativních dat by bylo zapotřebí provést molekulární analýzu spíše na stovkách či tisících podobných IL.

Tato bakalářská práce je součástí většího celku (program FP7 projektu LEGATO), použité postupy tedy byly voleny spíše s ohledem na osvojení si základních molekulárních technik. Zvolená metoda CAPS-PCR markerů patří ke spolehlivým, ale časově náročným způsobům genetické analýzy. V budoucích projektech by místo ní bylo možno využít moderních next-generation sekvenovacích technik (NGS) a celogenomových přístupů SNP detekce. Prostor pro další práci skýtá také rozšíření studia polymorfismů na ostatní vazebné skupiny a zejména šlechtění dalších generací IL. K získání ideální linie s 99,9% zastoupením genomu kulturního druhu hrachu bude třeba dosáhnout alespoň BC₅ generace, což je otázka nejméně dvou let, následovaných několikolikerým samosprášením.

7 ZÁVĚR

V literární rešerši bakalářské práce jsou shrnuty základní poznatky týkající se problematiky využití introgresní hybridizace planých forem k rozšíření genetické diverzity kulturních rostlin. Praktická část práce se zabývá fenotypovým popisem a molekulární analýzou 24 introgresních linií kříženců planého a kulturního druhu hrachu.

Získaná data byla statisticky vyhodnocena a byla vypočtena míra pokrytí genomu kulturního hrachu *Pisum sativum* fragmenty planého druhu *Pisum fulvum*. Zjištěné výsledky se lišily od předpokládaných hodnot. To pravděpodobně souvisí s omezenou vzájemnou křížitelností zmíněných druhů, vliv ale mohl mít také málo reprezentativní soubor 24 introgresních linií.

Přes uvedené odchylky přispěly výsledky práce k vybrání linií vhodných k rozšíření stávající úzké genetické diverzity kulturního hrachu. Toto nabízí možnost navazující výzkumné činnosti, zejména potom v oblasti detailnější genotypizace pomocí SNP markerů a fenotypového testování vybraných znaků. Části z těchto bodů se již nyní věnuje aktuálně probíhající mezinárodní projekt LEGATO, v jehož rámci je tým Univerzity Palackého v Olomouci pod vedením školitele Ing. Petr Smýkala, Ph.D. zodpovědný za vývoj více než 150 introgresních linií *P. fulvum* a *P. elatius*.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

5S rDNA	oblast DNA kódující 5S rRNA protein
45S rDNA	oblast DNA kódující 45S rRNA protein
45S rRNA	ribozomální RNA se sedimentačním koeficientem 45S
BC_{2,3}F₄	4. filiální generace získaná 2-3 násobným zpětným křížením
bp	páry bází
C	množství jaderné DNA reprezentující jednu úplnou kopii jaderného genomu
CAPS	štěpené amplifikované polymorfní sekvence
cM	centimorgan, jednotka relativní vzdálenosti genů na chromozomu
cv.	kultivar
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
F1, F2	1. filiální generace, 2. Filiální generace
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
IL	introgresní linie
LG	vazebná skupina
MŠMT	Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	sekvenování nové generace (next-generation sequencing)
P.	rod <i>Pisum</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
PisTR-B	satelitní repetice <i>Pisum sativum</i>
RAPD	náhodná amplifikace polymorfní DNA
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
spp.	druhy (species)
SSR	krátké tandemové repetice
Taq pol	<i>Taq</i> polymeráza
TBE	Tris-borátový pufr
TE	Tris-EDTA pufr
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
QTL	lokusy kvantitativních znaků

9 LITERATURA

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 in Plant Science*, **19**, 351-360.

ABO-ELWAFI A., MURAI K., SHIMADA T. (1995) Intra- and inter-specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**, 335-340.

ACOSTA-GALLEGOS J.A., QUINTERO C., VARGAS J., TORO O., TOHME J., CARDONA C. (1998) A new variant of arcelin in wild common bean, *Phaseolus vulgaris* L., from southern Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **45**, 235-242.

ALDRICH P.R., DOEBLEY J., SCHERTZ K.F., STEC A. (1992) Patterns of allozyme variation in cultivated and wild *Sorghum bicolor*. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**, 451-460.

ALLABY M. (2010) *A dictionary of ecology* 4th ed. New York: Oxford University Press.

AUBERT G., MORIN J., JACQUIN F., LORIDON K., QUILLET M.C., PETIT A., RAMEAU C., LEJEUNE-HÉNAUT I., HUGUET T., BURSTIN J. (2006) Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**, 1024-1041.

BASTIANELLI D., GROSJEAN F., PEYRONNET C., DUPARQUE M., RÉGNIER J.M. (1998) Feeding value of pea (*Pisum sativum*, L.) 1. Chemical composition of different categories of pea. *Animal Science*, **67**, 609-619.

BEN-ZE'EV N., ZOHARY D. (1973) Species relationship in the genus *Pisum* L. *Israel Journal of Botany*. **22**, 73-91.

BESSEY C.E. (1906) Crop Improvement by Utilizing Wild Species. *Journal of Heredity*, **2**, 112-118.

BLIXT S. (1972) Mutation genetics in *Pisum*. *Agriculture Horticulture Genetica*, **30**, 1-293.

BLIXT S. (1974) The Pea, In *Handbook of genetics: Plants, Plant Viruses, and Protists*, pp. 181-221. New York: Plenum Press.

BLIXT S. (1977) The gene symbols of *Pisum*. *Pisum Newsletter*, **9**, 1-59.

- BOGDANOVA V.S. (2007) Inheritance of organelle DNA markers in a pea cross associated with nuclear-cytoplasmic incompatibility. *Theoretical and Applied Genetics*, **114**, 333-339.
- BOGDANOVA V.S., GALIEVA E.R., KOSTERIN O.E. (2009) Genetic analysis of nuclear-cytoplasmic incompatibility in pea associated with cytoplasm of an accession of wild subspecies *Pisum sativum* subsp. *elatius* (Bieb.) Schmahl. *Theoretical and Applied Genetics*, **118**, 801-809.
- BOGDANOVA V.S., ZAYTSEVA O.O., MGLINETS A.V., SHATSKAYA N.V., KOSTERIN O.E., VASILIEV G.V. (2015) Nuclear-Cytoplasmic Conflict in Pea (*Pisum sativum* L.) Is Associated with Nuclear and Plastidic Candidate Genes Encoding Acetyl-CoA Carboxylase Subunits. *PLOS ONE*, **10**, e0119835.
- BORDAT A., SAVOIS V., NICOLAS M., SALSE J., CHAUVEAU A., BOURGEOIS M., POTIER J., HOUTIN H., ROND C., MURAT F., MARGET P., AUBERT G., BURSTIN J. (2011) Translational Genomics in Legumes Allowed Placing *In Silico* 5460 Unigenes on the Pea Functional Map and Identified Candidate Genes in *Pisum sativum* L. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, **1**, 93-103.
- BRAUNER S., MURPHY R.L., WALLING J.G., PRZYBOROWSKI J., WEEDEN N.F. (2002) STS Markers for Comparative Mapping in Legumes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **127**, 616-622.
- BYRNE O.M., HARDIE D.C., KHAN T.N., SPEIJERS J., YAN G. (2008) Genetic analysis of pod and seed resistance to pea weevil in a *Pisum sativum* x *P. fulvum* interspecific cross. *Australian Journal of Agricultural Research*, **59**, 854-862.
- CULLEY T.M., HARDIMAN N.A. (2009) The role of intraspecific hybridization in the evolution of invasiveness: a case study of the ornamental pear tree *Pyrus calleryana*. *Biological Invasions*, **11**, 1107-1119.
- DARWIN C.R. (1859) On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London: John Murray.
- DE MARTINO T., ERRICO A., LASSANDRO A., CONICELLA C. (2000) Distorted segregation resulting from pea chromosome reconstructions with alien segments from *Pisum fulvum*. *Journal of Heredity*, **91**, 322-325.

- DEMPEWOLF H., HODGINS K.A., RUMMELL S.E., ELLSTRAND N.C., RIESEBERG L.H. (2012) Reproductive Isolation during Domestication. *The Plant Cell*, **24**, 2710-2717.
- DEULVOT C., CHARREL H., MARTY A., JACQUIN F., DONNADIEU C., LEJEUNE-HÉNAUT I., BURSTIN J., AUBERT G. (2010) Highly-multiplexed SNP genotyping for genetic mapping and germplasm diversity studies in pea. *BMC Genomics*, **11**, 468.
- DOEBLEY J.F., GAUT B.S., SMITH B.D. (2006) The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell*, **127**, 1309-1321.
- EDMANDS S. (2002) Does parental divergence predict reproductive compatibility? *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 520-527.
- ELLIS R.P., FORSTER B.P., ROBINSON D., HANDLEY L.L., GORDON D.C., RUSSELL J.R., POWELL W. (2000) Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century? *Journal of Experimental Botany*, **51**, 9-17.
- ELLIS T.H.N., POYSER S.J. (2002) An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps. *New Phytologist*, **153**, 17-25.
- ELLIS T.H.N., HOFER J.M.I., TIMMERMAN-VAUGHAN G.M., COYNE C.J., HELLENS R.P. (2011) Mendel, 150 years on. *Trends in Plant Science*, **16**, 590-596.
- ELLSTRAND N.C. (1992) Gene Flow by Pollen: Implications for Plant Conservation Genetics. *Oikos*, **63**, 77-86.
- ELLSTRAND N.C., PRENTICE H.C., HANCOCK J.F. (1999) Gene Flow and Introgression from Domesticated Plants into Their Wild Relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **30**, 539-563.
- ENDO Y., CHOI B.-H.C., OHASHI H., DELGADO-SALINAS A. (2008) Phylogenetic Relationships of New World *Vicia* (*Leguminosae*) Inferred from nrDNA Internal Transcribed Spacer Sequences and Floral Characters. *Systematic Botany*, **33**, 356-363.
- ERRICO A., CONICELLA C., VENORA G. (1991) Karyotype studies on *Pisum fulvum* and *Pisum sativum*, using a chromosome image analysis system. *Genome*, **34**, 105-108.

- ESHED Y., ZAMIR D. (1995) An Introgression Line Population of *Lycopersicon pennellii* in the Cultivated Tomato Enables the Identification and Fine Mapping of Yield-Associated QTL. *Genetics*, **141**, 1147-1162.
- FAOSTAT (2015) Production. Available at: http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E [Accessed July 02, 2015].
- FAROOQ S., AZAM F. (2001) Co-Existence of Salt and Drought Tolerance in Triticeae. *Hereditas*, **135**, 205-210.
- FONCEKA D., TOSSIM H.-A., RIVALLAN R., VIGNES H., LACUT E., DE BELLIS F., FAYE I., NDOYE O., LEAL-BERTIOLI S.C.M., VALLS J.F.M., BERTIOLI D.J., GLASZMANN J.-C., COURTOIS B., RAMI J.-F. (2012) Construction of Chromosome Segment Substitution Lines in Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Using a Wild Synthetic and QTL Mapping for Plant Morphology. *PLoS ONE*, **7**, e48642.
- FONDEVILLA S., TORRES A.M., MORENO M.T., RUBIALES D. (2007) Identification of a New Gene for Resistance to Powdery Mildew in *Pisum fulvum*, a Wild Relative of Pea. *Breeding Science*, **57**, 181-184.
- GOTTLIEB L.D. (1984) Genetics and Morphological Evolution in Plants. *The American Naturalist*, **123**, 681-709.
- GUR A., ZAMIR D. (2004) Unused Natural Variation Can Lift Yield Barriers in Plant Breeding. *PLoS Biology*, **2**.
- HAILS R.S., MORLEY K. (2005) Genes invading new populations: a risk assessment perspective. *Trends in Ecology*, **20**, 245-252.
- HAJJAR R., HODGKIN T. (2007) The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, **156**, 1-13.
- HAMMER K. (1984) Das Domestikationssyndrom. *Die Kulturpflanze*, **32**, 11-34.
- HECHT V., FOUCHER F., FERRÁNDIZ C., MACKNIGHT R., NAVARRO C., MORIN J., VARDY M.E., ELLIS N., PÍO BELTRÁN J., RAMEAU C., WELLER J.L. (2005) Conservation of Arabidopsis Flowering Genes in Model Legumes. *Plant Physiology*, **137**, 1420-1434.

- HOLST-JENSEN A. (2009) Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. *Biotechnology Advances*, **27**, 1071-1082.
- CHAN K.F., SUN M. (1997) Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 865-873.
- CHEN S., XU C.G., LIN X.H., ZHANG Q. (2001) Improving bacterial blight resistance of '6078', an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. *Plant Breeding*, **120**, 133-137.
- JANSKY S. (2006) Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding*, **125**, 1-12.
- JARVIS A., LANE A., HIJMANS R.J. (2008) The effect of climate change on crop wild relatives. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **126**, 13-23.
- JING R., JOHNSON R., SERES A., KISS G., AMBROSE M.J., KNOX M.R., ELLIS T.H.N., FLAVELL A.J. (2007) Gene-Based Sequence Diversity Analysis of Field Pea (*Pisum*). *Genetics*, **177**, 2263-2275.
- JING R., VERSHININ A., GRZEBYTA J., SHAW P., SMÝKAL P., MARSHALL D., AMBROSE M.J., ELLIS T.H.N., FLAVELL A.J. (2010) The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evolutionary Biology*, **10**, 1-20.
- JING R., AMBROSE M.A., KNOX M.R., SMYKAL P., HYBL M., RAMOS Á., CAMINERO C., BURSTIN J., DUC G., VAN SOEST L.J.M., ŚWIĘCICKI W.K., PEREIRA M.G., VISHNYAKOVA M., DAVENPORT G.F., FLAVELL A.J., ELLIS T.H.N. (2012) Genetic diversity in European *Pisum* germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*, **125**, 367-380.
- KALÓ P., SERES A., TAYLOR S.A., JAKAB J., KEVEI Z., KERESZT A., ENDRE G., ELLIS T.H.N., KISS G.B. (2004) Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Molecular Genetics and Genomics*, **272**, 235-246.
- KÄSS E., WINK M. (1996) Molecular evolution of the *leguminosae*: Phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL*-sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, **24**, 365-378.

- KONOVALOV F., TOSHCHAKOVA E., GOSTIMSKY S. (2005) A CAPS marker set for mapping in linkage group III of pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular and molecular biology letters*, **10**, 163-171.
- KUMAR S., GUPTA S., CHANDRA S., SINGH B.B. (2004) How wide is the genetic base of pulse crops?, In *Pulses in new perspective*, pp. 211-221. Kanpur, India: Indian Institute Pulses Research.
- LANGEVIN S.A., CLAY K., GRACE J.B. (1990) The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). *Evolution*, **44**, 1000-1008.
- LAMPRECHT H. (1948) The variation of linkage and the course of crossingover. *Agri Hortique Genetica*, **6**, 10-48.
- LAMPRECHT H. (1961) Die Genekarte von *Pisum* bei normaler Struktur der Chromosomen. *Agri Hortique Genetica*, **19**, 360-401.
- LAMPRECHT H. (1974) *Monographie der Gattung Pisum: die genetischen Grundlagen für die Züchtung der Erbse und der verwandten Leguminosen*. Graz: Steiermarkischen Landesdruckerei.
- LEXER C., WELCH M.E., DURPHY J.L., RIESEBERG L.H. (2003) Natural selection for salt tolerance quantitative trait loci (QTLs) in wild sunflower hybrids: Implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. *Molecular Ecology*, **12**, 1225-1235.
- LINH L.H., LINH T.H., XUAN T.D., HAM L.H., ISMAIL A.M., KHANH T.D. (2012) Molecular Breeding to Improve Salt Tolerance of Rice (*Oryza sativa* L.) in the Red River Delta of Vietnam. *International Journal of Plant Genomics*, **2012**, 1-9.
- LORIDON K., MCPHEE K., MORIN J., DUBREUIL P., PILET-NAYEL M.L., AUBERT G., RAMEAU C., BARANGER A., COYNE C., LEJEUNE-HÉNAUT I., BURSTIN J. (2005) Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **111**, 1022-1031.
- LÖRZ H., WENZEL G. (2005) *Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement*. Berlin: Springer.

- MACAS J., NEUMANN P., NAVRÁTILOVÁ A. (2007) Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*, **8**.
- MALIK R., SMITH C.M., BROWN-GUEDIRA G.L., HARVEY T.L., GILL B.S. (2003) Assessment of *Aegilops tauschii* for Resistance to Biotypes of Wheat Curl Mite (Acari: Eriophyidae). *Journal of Economic Entomology*, **96**, 1329-1333.
- MALLET J. (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology*, **20**, 229-237.
- MAXTED N., AMBROSE M. (2001) Peas (*Pisum* L.): Chapter 10, In *Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean*, pp. 181-191. Boston: Kluwer Academic Publishers.
- MCCOUCH S., BAUTE G.J., BRADEEN J., BRAMEL P., BRETTING P.K., BUCKLER E., BURKE J.M., CHAREST D., CLOUTIER S., COLE G., DEMPEWOLF H., DINGKUHN M., FEUILLET C., GEPTS P., GRATTAPAGLIA D., GUARINO L., JACKSON S., KNAPP S., LANGRIDGE P., LAWTON-RAUH A., LIJUA Q., LUSTY C., MICHAEL T., MYLES S., NAITO K., NELSON R.L., PONTAROLLO R., RICHARDS C.M., RIESEBERG L., ROSS-IBARRA J., ROUNSLEY S., HAMILTON R.S., SCHURR U., STEIN N., TOMOOKA N., VAN DER KNAAP E., VAN TASSEL D., TOLL J., VALLS J., VARSHNEY R.K., WARD J., WAUGH R., WENZL P., ZAMIR D. (2013) Agriculture: Feeding the future. *Nature*, **499**, 23-24.
- NEVO E., APELBAUM-ELKAHER I., GARTY J., BEILES A. (1997) Natural selection causes microscale allozyme diversity in wild barley and a lichen at 'Evolution Canyon', Mt. Carmel, Israel. *Heredity*, **78**, 373-382.
- PAN Q., LIU Y.-S., BUDAI-HADRIAN O., SELA M., CARMEL-GOREN L., ZAMIR D., FLUHR R. (2000) Comparative Genetics of Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat Resistance Gene Homologues in the Genomes of Two Dicotyledons: Tomato and *Arabidopsis*. *Genetics*, **155**, 309-322.
- PAPA R., GEPTS P. (2003) Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theoretical and Applied Genetics*, **106**, 239-250.
- PAVEK J.J., CORSINI D.L. (2001) Utilization of potato genetic resources in variety development. *American Journal of Potato Research*, **78**, 433-441.

- RAM S.G., THIRUVENGADAM V., VINOD K.K. (2007) Genetic diversity among cultivars, landraces and wild relatives of rice as revealed by microsatellite markers. *Journal of Applied Genetics*, **48**, 337-345.
- RIESEBERG L.H., ARCHER M.A., WAYNE R.K. (1999) Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity*, **83**, 363–372.
- RIESEBERG L.H., RAYMOND O., ROSENTHAL D.M., LAI Z., LIVINGSTONE K., NAKAZATO T., DURPHY J.L., SCHWARZBACH A.E., DONOVAN L.A., LEXER C. (2003) Major Ecological Transitions in Wild Sunflowers Facilitated by Hybridization. *Science*, **301**, 1211-1216.
- RYGULLA W., SNOWDON R.J., EYNCK C., KOOPMANN B., TIEDEMANN A. VON, LÜHS W., FRIEDT W. (2007) Broadening the Genetic Basis of *Verticillium longisporum* Resistance in *Brassica napus* by Interspecific Hybridization. *Phytopathology*, **97**, 1391-1396.
- SCHAEFER H., HECHENLEITNER P., SANTOS-GUERRA A., DE SEQUEIRA M.M., PENNINGTON R.T., KENICER G., CARINE M.A. (2012) Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabaeae with special focus on the middle-Atlantic island lineages. *BMC Evolutionary Biology*, **12**, 250.
- SKOVMAND B., REYNOLDS M.P., DELACY I.H. (2001) Mining wheat germplasm collections for yield enhancing traits. *Euphytica*, **119**, 25-32.
- SMÝKAL P. (2009) Domestikace rostlin z pohledu současné genetiky. *Živa*, **1**, 6-9.
- SMÝKAL P. (2011) Fylogeneze, biogeografie a genetická diverzita rodu hrách. *Živa*, **4**, 151-154.
- SMÝKAL P., HÝBL M., CORANDER J., JARKOVSKÝ J., FLAVELL A.J., GRIGA M. (2008) Genetic diversity and population structure of pea (*Pisum sativum* L.) varieties derived from combined retrotransposon, microsatellite and morphological marker analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **117**, 413-424.
- SMÝKAL P., KENICER G., FLAVELL A.J., CORANDER J., KOSTERIN O., REDDEN R.J., FORD R., COYNE C.J., MAXTED N., AMBROSE M.J., ELLIS N.T.H. (2011) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*, **9**, 4-18.

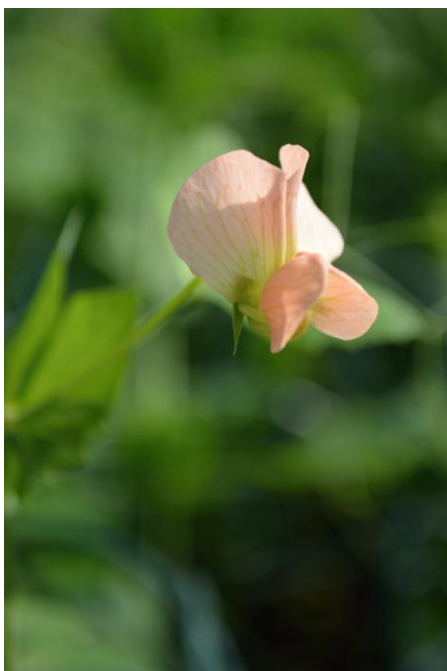
- SMÝKAL P., AUBERT G., BURSTIN J., COYNE C.J., ELLIS N.T.H., FLAVELL A.J., FORD R., HÝBL M., MACAS J., NEUMANN P., MCPHEE K.E., REDDEN R.J., RUBIALES D., WELLER J.L., WARKENTIN T.D. (2012) Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era. *Agronomy*, **2**, 74-115.
- SMÝKAL P., COYNE C.J., AMBROSE M.J., MAXTED N., SCHAEFER H., BLAIR M.W., BERGER J., GREENE S.L., NELSON M.N., BESHARAT N., VYMYSLICKÝ T., TOKER C., SAXENA R.K., ROORKIWAL M., PANDEY M.K., HU J., LI Y.H., WANG L.X., GUO Y., QIU L.J., REDDEN R.J., VARSHNEY R.K. (2014) Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **34**, 43-104.
- STELKENS R., SEEHAUSEN O. (2009) Genetic distance between species predicts novel trait expression in their hybrids. *Evolution*, **63**, 884-897.
- TANKSLEY S.D., MCCOUCH S.R. (1997) Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science*, **277**, 1063-1066.
- VAVILOV N.I. (1926) Studies on the Origin of Cultivated Plants. *Bulletin of Applied Botany*, **16**, 1-248.
- VAVILOV N.I. (1940) The new systematics of cultivated plants, In *The new systematics*, pp. 549-566. Oxford: The Clarendon Press.
- VON KORFF M., WANG H., LÉON J., PILLEN K. (2004) Development of candidate introgression lines using an exotic barley accession (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) as donor. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**, 1736-1745.
- WAN X.Y., WAN J.M., SU C.C., WANG C.M., SHEN W.B., LI J.M., WANG H.L., JIANG L., LIU S.J., CHEN L.M., YASUI H., YOSHIMURA A. (2004) QTL detection for eating quality of cooked rice in a population of chromosome segment substitution lines. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**, 71-79.
- WARSCHEFSKY E., PENMETS A R.V., COOK D.R., VON WETTBERG E.J.B. (2014) Back to the wilds: Tapping evolutionary adaptations for resilient crops through systematic hybridization with crop wild relatives. *American Journal of Botany*, **101**, 1791-1800.
- WEEDEN N.F., PROVVIDENTI R. (1985) A marker locus, *Adh-1*, for resistance to pea enation mosaic virus. *Journal of Heredity*, **79**, 128-131.

WEEDEN N.F., SWIECICKI W.K., AMBROSE M., TIMMERMAN G.M. (1993) Linkage groups of pea. *Pisum Genetics*, **25**, 4.

ZAMIR D. (2001) Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics*, **2**, 983-989.

ZOHARY D., HOPF M., WEISS E. (2012) Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin 4th ed. New York: Oxford University Press.

10 PŘÍLOHY



Obrázek 1. Růžový květ introgresní linie číslo 19.



Obrázek 2. Introgresní rostlina s anthokyanovou skvrnou na bázi palistů.



Obrázek 3. Introgresní rostlina s listy typu *afila*, znakem pocházejícím z *Pisum sativum* kultivar Terno.



Obrázek 4. Dlouhá internodia zaznamenaná u introgresní linie 19.