



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ**

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

**Studium genetické diverzity u kmínu kořenného
(*Carum carvi* L.)**

Ing. Petra Röslerová

**České Budějovice
2026**

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorand: Ing. Petra Röslerová

Studijní program: Zemědělská chemie a biotechnologie

Název práce: Studium genetické diverzity u kmínu kořeného (*Carum carvi* L.)

Školitel: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
FZT JU České Budějovice

Školitel specialista: doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.
FZT JU České Budějovice

Oponenti: doc. Ing. Pavel Vejl, Ph.D.
FAPPZ ČZU v Praze

Ing. Petra Hlásná Čepková, Ph.D.
CARC Praha Ruzyně

Mgr. Jiří Horáček, Ph.D.
AGRITEC Šumperk

Obhajoba disertační práce se koná dne 16. 6. 2026 ve 14 hodin v zasedací místnosti ZR-ZM 01 053 na Katedře genetiky a biotechnologií Fakulty zemědělské a technologické JU v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Fakulty zemědělské a technologické JU v Českých Budějovicích.

ANOTACE

V České republice je kmín kořený (*Carum carvi* L.) významnou hospodářskou rostlinou s dlouholetou tradicí pěstování. Přesto se jedná o dosud málo popsanou plodinu z hlediska molekulárně genetické charakterizace. Disertační práce je proto zaměřena na studium genetické diverzity souboru 95 genotypů českého původu a možnost odrůdové identifikace. Pro tyto účely bylo analyzováno 12 SSR markerů přenesených z příbuzných rostlin čeledi *Apiaceae*. Studie byla dále doplněna o 8 ISSR markerů. Práce zároveň poskytuje metodický postup pro izolaci DNA z odlišných rostlinných materiálů, s doporučením metody CTAB-PVP pro listy a komerčních kitů pro semena.

SSR i ISSR markery poskytly celkově nízké hodnoty diverzitních indexů ($H_e = 0,378$; $H = 0,279$), které odráží omezenou genetickou diverzitu v rámci studovaného souboru. Pomocí testu AMOVA bylo zjištěno, že 82–94 % genetické variance je lokalizováno uvnitř skupin. Oba typy markerů shodně identifikovaly biologický i šlechtitelský typ jako statisticky signifikantní strukturující faktor ($p < 0,001$), přičemž statistický test PERMANOVA označil biologický typ za silnější prediktor genetické struktury.

Klastrovací analýzy (PCoA, UPGMA, snapclust) odhalily spíše kontinuální charakter populační struktury se smíšenou příslušností několika jedinců. Na odrůdové úrovni oddělila DAPC u SSR i ISSR markerů všechny analyzované odrůdy (Aklei, Aprim, Kamín, Rekord) a naznačila tak potenciál pro budoucí identifikaci registrovaných odrůd.

Mantelův test prokázal středně silnou korelaci mezi oběma typy markerů ($r = 0,402$; $p < 0,0001$), což potvrzuje, že SSR a ISSR markery zachycují částečně odlišné aspekty genetické variability a jejich kombinace poskytla v této práci více komplexní přístup. Získané výsledky potvrzují využitelnost obou typů markerů pro detekci genetické variability u kmínu kořeného na úrovni skupin i odrůd.

ANOTATION

In the Czech Republic, caraway (*Carum carvi* L.) is an important crop with a long tradition of cultivation. Nevertheless, it remains a relatively understudied crop, particularly in terms of molecular genetic analysis. This dissertation thesis therefore focuses on studying the genetic diversity of a Czech collection of 95 genotypes and the possibility of variety identification. For this purpose, 12 SSR markers were analysed, derived from related plants of the *Apiaceae* family. The study was further expanded with 8 ISSR markers. The thesis also provides a methodological procedure for DNA isolation from various plant materials, recommending the CTAB-PVP method for leaves and commercial kits for seeds.

Both SSR and ISSR markers yielded overall low diversity indices ($H_e = 0,378$; $H = 0,279$), reflecting limited genetic diversity within the studied population. The AMOVA test revealed that 82–94% of genetic variance is located within groups. Both types of markers consistently identified biological and breeding types as statistically significant structuring factors ($p < 0,001$), while the PERMANOVA statistical test identified biological type as a stronger predictor of genetic structure.

Clustering analyses (PCoA, UPGMA, snapclust) revealed a rather continuous character of the population structure with mixed membership of several individuals. At the variety level, DAPC for both SSR and ISSR markers separated all analysed varieties (Aklei, Aprim, Kamín, Rekord), thus indicating potential for the future identification of registered varieties.

The Mantel test revealed a moderate correlation between the two types of markers ($r = 0,402$; $p < 0,0001$), confirming that SSR and ISSR markers detect partially different aspects of genetic variability and that their combination provided a more comprehensive approach in this study. The results obtained confirm the utility of both types of markers for detecting genetic variability in caraway at both the group and variety level

OBSAH

| | |
|--|----|
| Úvod..... | 6 |
| 1. Literární přehled..... | 7 |
| 1.1 Čeleď miříkovité (<i>Apiaceae</i>)..... | 7 |
| 1.2 Kmín kořený (<i>Carum carvi</i> L.)..... | 7 |
| 1.3 Genetická diverzita a její ochrana..... | 8 |
| 1.4 Molekulární markery a jejichž využití v čeledi <i>Apiaceae</i> | 9 |
| 2. Hypotézy a cíle práce..... | 11 |
| 3. Metodika..... | 12 |
| 3.1 Kolekce genetických zdrojů..... | 12 |
| 3.2 Příprava rostlinného materiálu a izolace DNA..... | 12 |
| 3.3 Analýza molekulárních markerů..... | 12 |
| 3.4 Statistická analýza..... | 13 |
| 4. Výsledky..... | 14 |
| 4.1 Izolace DNA..... | 14 |
| 4.2 Optimalizace molekulárních markerů..... | 15 |
| 4.3 Charakteristika SSR markerů..... | 15 |
| 4.4 Charakteristika ISSR markerů..... | 16 |
| 4.5 Diferenciace podle šlechtitelského a biologického typu..... | 16 |
| 4.6 Populační struktura..... | 18 |
| 4.7 Identifikace odrůd..... | 20 |
| 4.8 Srovnání SSR a ISSR markerů..... | 21 |
| 5. Závěr..... | 24 |
| 6. Seznam literatury..... | 27 |
| 7. Seznam zkratk..... | 32 |

ÚVOD

Kmín kořený (*Carum carvi* L.) je významnou hospodářskou rostlinou z čeledi miříkovité (*Apiaceae*). Pěstování kmínu má v České republice dlouholetou tradici zejména díky vhodným podmínkám podnebí a prostředí. K dnešnímu dni je v České republice registrováno sedm odrůd kmínu kořeného a od roku 2008 nese komodita Český kmín chráněné označení původu v rámci Evropské unie.

Se zvyšující se potřebou nových odrůd hospodářsky významných rostlin je jejich charakterizace a sledování genetické variability předpokladem efektivního šlechtění a zachování genových zdrojů. Morfologické znaky přitom nemusí vždy poskytovat dostatečné rozlišení, a proto se v posledních letech stále více uplatňují molekulární markery. Ty poskytují dostatečnou reprodukovatelnost, nezávislost na vnějších podmínkách prostředí a mohou významně doplňovat konvenční šlechtitelské postupy.

Disertační práce je zaměřena na studium genetické diverzity u kmínu kořeného s využitím SSR (*Simple Sequence Repeat*) a ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) markerů. Metodika využití SSR markerů u kmínu kořeného zatím není v České republice zavedena a ani zahraniční studie neposkytují dostatek informací o jejich aplikaci u této plodiny. Práce proto vychází z dostupných studií genetické diverzity v rámci čeledi miříkovitých a ověřuje možnosti přenosu těchto přístupů na kmín kořený. Analýza ISSR markerů slouží k rozšíření molekulární charakterizace studované kolekce a ke vzájemnému porovnání informační hodnoty obou typů markerů.

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 Čeled' miříkovité (*Apiaceae*)

Čeled' miříkovité (*Apiaceae*) patří k významným a druhově bohatým čeledím rostlin (Plunkett & Lowry, 2001). Čeled' zahrnuje rostliny primárně léčivé a aromatické – kmín kořený (*Carum carvi*), kmín římský (*Cuminum cyminum*), koriandr setý (*Coriandrum sativum*) – i významné zeleniny, jako jsou petržel zahradní (*Petroselinum crispum*), mrkev obecná (*Daucus carota*) a miřík celer (*Apium graveolens*) (Jamalova et al., 2021). Tato čeled' zahrnuje kromě rostlin užitkových také rostliny jedovaté, kvůli jejich morfologické podobnosti a podobné chemické skladbě však dochází k jejich záměně. Biochemické markery jsou pro tyto druhy nedostatečné a správná molekulární identifikace druhů je zásadní (Abdelaziz et al., 2024).

Čeled' *Apiaceae* je známá svou výraznou chutí, díky níž je mnoho zástupců využíváno jako koření, popřípadě k přípravě bylinných čajů. Specifickou chuť rostliny získávají přítomnosti silic a pryskyřic ve schizogenních kanálcích v nadzemních i podzemních částech rostlin (Heywood, 1971).

1.2 Kmín kořený (*Carum carvi* L.)

Kmín kořený (*Carum carvi* L., $2n = 20$, *Apiaceae*) je rostlinou podmíněně dvouletou s délkou vegetační doby 300–340 dní. Dostupné jsou však i jednoleté odrůdy s kratší vegetační dobou (130–240 dní) (de Haro Reyes et al., 2025; Kocourková, 1996). Kmín se pěstuje pro obsah silic, které jsou přítomny v celé rostlině, ale jejich koncentrace je nejvyšší v nažkách (semenech) (Kameník, 1996). Nažky kmínu obsahují 1–6 % esenciálních olejů (silic), které dávají kmínu charakteristické aroma. Množství a složení silice je geneticky podmíněné a závisí na klimatických podmínkách, době kvetení a dozrávání plodů (Sedláková et al., 2003).

Kmín kořený je rostlina převážně cizosprašná (60–70 % heterogamní) (Šmirous, 2005). Šlechtitelé využívají především hybridizaci a selekci, což vyžaduje 10–15 let k vytvoření nových odrůd (Smýkalová & Horáček, 2021). Podmínky pěstování kmínu reflektují směry šlechtění, které se dlouhodobě zaměřují na zvýšení obsahu silic (Králík et al., 2007) a odolnost proti klimatickým stresům a zkrácení vegetační doby (von Maydell et al., 2022). Dříve byly studie zaměřeny na vyšlechtění kmínu neopadavého typu (Šmirous & Kocourková, 2006), současné jarní odrůdy Lesix a Aklei se již vyznačují střední až zvýšenou odolností proti opadávání nažek (Zehnálek & Kraus, 2024). Tyto odrůdy sice mírně zaostávají ve výnosu nažek a silic za tradiční dvouletou formou kmínu, nicméně kratší vegetační doba přináší další benefity

jako odolnost proti polehání či odolnost proti napadení vybranými patogeny v důsledku pozdější doby vcházení (Seidenglanz et al., 2023).

Odrůdy kmínu lze rozdělit na dvouleté a jednoleté. Zatímco dvouleté jsou rozšířeny v Evropě, Asii a v zemích Evropy se pěstují již od Středověku, jednoleté rostliny byly omezeny na severní Afriku a Blízký východ a předpokládá se u nich egyptský původ (Nemeth, 1998). Jednoleté odrůdy se nicméně v současnosti pěstují i v Evropě, byly ale zavedeny až v 90. letech 20. století.

Pěstování kmínu má v českých zemích bohatou tradici. Na domácích pěstitelských plochách převažují až ze 75 % tradiční dvouleté odrůdy, zbývající plochu tvoří domácí odrůda ozimého kmínu Aprim (registrace 2014) (Zehnálek & Kraus, 2024). Komodita Český kmín nese od roku 2008 chráněné označení původu v rámci Evropské unie (Králík et al., 2007). K dnešnímu dni je v České republice registrováno sedm odrůd kmínu kořeného, přičemž žádosti o registraci dalších dvou dvouletých odrůd jsou aktuálně v procesu schvalování (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2026).

1.3 Genetická diverzita a její ochrana

Se zvyšující se potřebou nových odrůd hospodářsky významných rostlin je jejich charakterizace a sledování genetické variability předpokladem efektivního šlechtění a zachování genových zdrojů. Genetická diverzita je jedním z nejdůležitějších faktorů pro zachování ekologické stability. S rostoucí genetickou diverzitou v populaci roste i její odolnost vůči změnám prostředí a schopnost druhu přežít v konkurenci s ostatními druhy (Primack et al., 2011). Intenzivní šlechtění sice vede ke zlepšování výnosu a dalších vlastností, ale často zároveň zužuje genetickou základnu kulturních plodin (Khoury et al., 2022).

K ochraně genetických zdrojů se využívají dva hlavní přístupy: *ex situ* (genové banky, kde jsou semena uchovávána mimo původní prostředí) a *in situ* (zachování přírodních populací nebo tradičních odrůd přímo na polích či v přírodě) (Brozynska et al., 2016). Kombinace obou přístupů je považována za nejspolehlivější formu ochrany genetických zdrojů (Cohen et al., 1991; Khoury et al., 2022). Kmín kořený je v České republice spravován Oddělením genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin VÚRV, v.v.i. v Olomouci, jako součást kolekce genetických zdrojů zelenin, léčivých, aromatických a kořeninových rostlin (Dotlačil et al., 2013). Genetické zdroje kmínu jsou součástí i dalších kolekcí, příkladem je kolekce Genové banky CGN v Nizozemsku (*CGN – Centre for Genetic Resources, the Netherlands*). Tato kolekce je však relativně malá, a to v důsledku omezených šlechtitelských aktivit u této rostliny (CGN, 2026).

1.4 Molekulární markery a jejichž využití v čeledi *Apiaceae*

Molekulární markery jsou považovány za lepší než tradiční markery založené na morfologii a proteinech, protože jsou četné, spolehlivé, bývají vhodné k automatizaci a jsou cenově výhodné (Spooner et al., 2005).

SSR markery představují opakující se motivy o délce 1–6 nukleotidů, které se vyskytují v kódujících i nekódujících oblastech genomů eukaryot i prokaryot, včetně mitochondriální a chloroplastové DNA (Garrido-Cardenas et al., 2018; Powell et al., 1996). Přes velké množství dostupných molekulárních markerů patří SSR markery k jednomu z nejpobulárnějších z mnoha důvodů – v genetice rostlin to je díky jejich reprodukovatelnosti, kodominantní dědičnosti a relativně dobrému pokrytí genomu (Guler & Imamoglu, 2023).

Jednou z možností, jak získat SSR markery u minoritních plodin, kde je k dispozici málo informací o genomu, je využití přenositelnosti SSR markerů z příbuzných druhů. Tato metoda vychází z předpokladu, že určité části DNA mohou být u příbuzných druhů dostatečně podobné, díky čemuž je možné použít již existující primery k amplifikaci SSR markerů i v novém cílovém organismu (Rossetto, 2001). V čeledi *Apiaceae* Cavagnaro et al. (2011) popsali přenositelnost 58.3 % mezi druhy *Daucus* sp. a dokonce 41 % napříč celou čeledí *Apiaceae*. Úspěšnost přenosu v různých studiích se však výrazně liší, a to jak v rámci jednoho rodu (4,7–100 %), tak napříč různými rody (0–71,4 %) (Rossetto, 2001).

Zatímco polymorfismy SSR jsou detekovány pomocí dvojice primerů, které jsou jedinečné pro jeden lokus v genomu, ISSR využívají pro studium polymorfismů pouze jediný primer. V tomto případě je jeden primer využíván k amplifikaci fragmentů mezi dvěma identickými, ale inverzně orientovanými sousedními mikrosatelity (Hussain & Nisar, 2020). Využití dominantních ISSR markerů obchází většinu praktických omezení SSR a RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) analýzy (Reddy et al., 2002).

Dosavadní genetické studie kmínu kořenného

Přestože je kmín hospodářsky významným zástupcem čeledi *Apiaceae*, převážná část publikací zaměřených na charakteristické znaky této čeledi a genetické srovnání jejich zástupců jej zmiňuje okrajově (Palumbo et al., 2021; Wang et al., 2022). Důvodem může být omezené množství genetických studií u kmínu, které nabývají na významu až v posledních letech (von Maydell et al., 2020). Jak zmiňuje Wang et al. (2022), molekulární markery jako AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR či ISSR jsou široce používány při šlechtění zástupců čeledi *Apiaceae* a při studiu genetické diverzity v populaci, ale četnost studií je u různých plodin odlišná.

Genetická analýza kmínu byla po dlouhou dobu omezena na využití RAPD markerů (Janipour et al., 2018; Laribi et al., 2011), a to zejména z důvodu, že genom kmínu dosud nebyl kompletně popsán (von Maydell et al., 2024). RAPD markery totiž nevyžadují znalost sekvence DNA, což umožnilo jejich použití i bez dostupného referenčního genomu (Hussain & Nisar, 2020).

Díky poklesu nákladů na sekvenování je nyní možné i u méně významných plodin využít metody nové generace (NGS – *New Generation Sequencing*), například genotypování pomocí sekvenování (GBS – *Genotyping by Sequencing*) (von Maydell et al., 2022). von Maydell et al. (2021) použili GBS ke studiu genetické diverzity a populační struktury v souboru 67 jednoletých a 70 dvouletých odrůd. Nejenže vytypovali 13 155 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), ale genotypová data poukázala na jasné oddělení dvou subpopulací, které korelovali s typem kvetení (jednoleté vs. dvouleté). Kromě toho byla odhadnuta velikost genomu pomocí průtokové cytometrie 4,282 pg/2C ($\pm 0,0096$ S.E.).

Nejnovější studií využívající GBS je de Haro Reyes et al. (2025). Studie byla provedena na souboru 198 jedinců z 16 populací pěti severských zemí. Zjistili, že genetická diverzita uvnitř populací téměř jednotná, ale napříč populacemi je patrné východně-západní rozložení korelující s kolonizací.

Aplikace molekulárních markerů u kmínu kořenného není dostatečná, popřípadě se velmi liší rozsah studovaných populací. Jiné, hospodářsky významnější plodiny z čeledi *Apiaceae*, jsou prozkoumány více (Aiello et al., 2020; Cavagnaro et al., 2011; Pangyuan, 2017).

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Kmín kořený (*Carum carvi* L.) patří mezi hospodářsky významné aromatické plodiny, jejichž molekulárně genetická charakterizace zůstává ve srovnání s jinými druhy čeledi *Apiaceae* omezena. Nedostatek spolehlivých molekulárních nástrojů přitom představuje praktickou překážku jak pro správu genetických zdrojů, tak pro ochranu práv šlechtitelů. Předložené hypotézy proto vycházejí z předpokladu, že SSR a ISSR markery mohou tuto mezeru zaplnit a poskytnout základ pro charakterizaci genetické diverzity i molekulárních identifikací registrovaných odrůd.

Hypotézy

H1: Biologické typy (dvouletý, jednoletý, ozimý) a šlechtitelské typy (odrůdy, šlechtitelský materiál, plané druhy) kmínu kořeného představují geneticky diferencované skupiny identifikovatelné pomocí molekulárních markerů.

H2: SSR a ISSR markery jsou využitelné pro molekulární rozlišení registrovaných odrůd kmínu kořeného.

H3: SSR a ISSR markery poskytují srovnatelný obraz genetické diverzity a populační struktury souboru českých vzorků kmínu kořeného.

Cíle práce

- 1) Zhodnotit genetickou diverzitu a diferenciaci v souboru kmínu kořeného podle biologického typu (dvouletý, jednoletý, ozimý) a podle šlechtitelského typu (odrůdy, šlechtitelský materiál, plané druhy).
- 2) Ověřit využitelnost SSR a ISSR markerů pro molekulární rozlišení registrovaných odrůd kmínu kořeného.
- 3) Porovnat výsledky analýzy genetické diverzity a populační struktury kmínu kořeného mezi SSR a ISSR markery a posoudit shodu mezi oběma typy markerů.

3. METODIKA

3.1 Kolekce genetických zdrojů

Primárním souborem této disertační práce je kolekce kmínu kořenného (*Carum carvi* L.), u které byla provedena kompletní molekulární analýza SSR i ISSR markerů. Vlastní statistické vyhodnocení genetické diverzity je zaměřeno na vzorky pocházející z České republiky a z Československa. Kolekce byla tvořena 95 vzorky, přičemž všechny vzorky od společnosti Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk (52 vzorků) a z Mendelovy univerzity v Brně (dále jako Mendelu; 26 vzorků) pocházejí výhradně z ČR. Ze vzorků Genové banky CARC (GRIN) bylo do kolekce zařazeno 17 položek (5 z ČR a 12 z ČSR).

3.2 Příprava rostlinného materiálu a izolace DNA

Převážná část vzorků byla získána ve formě semen. Z tohoto důvodu byly u většiny vzorků semen v první řadě provedeny testy klíčivosti. U semen výborně až středně klíčivých byla všechna zbývající semena předklíčena a z listů byla následně izolována DNA. Semena hůře klíčivá a neklíčivá byla přímo homogenizována v tekutém dusíku a použita pro přímou izolaci DNA ze semen.

V této práci byly použity tři metody izolace DNA: modifikovaný CTAB-PVP protokol (Doyle, 1991), komerční kit Quick-DNA Plant/Seed Miniprep Kit (ZymoResearch) a izolace pomocí automatizované stanice MagCore s kitem MagCore® Plant DNA Kit (RBC Bioscience). Výběru vhodné metody předcházela optimalizace izolace DNA. Soubor vzorků pro optimalizaci byl tvořen 54 vzorky (3 odrůdy × 2 typy materiálu (listy/semena) × 3 metody izolace × 3 opakování). Pro experiment byly záměrně vybrány takové typy odrůd, které poskytovaly velmi dobrou klíčivost, aby bylo možné získat listy i semena v dostatečném množství. Výběr vhodné metody vycházel ze spektrofotometrického ověření kvality i kvantity a ověření amplifikovatelnosti DNA pomocí metody PCR (oblast *trnH-psbA*; Abdelaziz et al. (2024)). Získané výsledky byly dále statisticky zhodnoceny pomocí MANOVA (vícerozměrná analýza rozptylu; *Multivariate Analysis of Variance*) a následně ANOVA pro každý parametr zvlášť, s ohledem na vliv metody izolace a typu rostlinného materiálu (listy, semena) na koncentraci DNA a poměry OD 260/280 a OD 260/230.

3.3 Analýza molekulárních markerů

Pro screening kolekce bylo na základě schopnosti odhalit polymorfismus v existujícím souboru rostlin (vysoká frekvence alel, vysoké číslo PIC (Informační obsah polymorfismu; *Polymorphic Information Content*) a přenositelnost v čeledi *Apiaceae*) vybráno 47 SSR markerů. Ze souboru

47 SSR markerů bylo 12 markerů úspěšně amplifikováno u kmínu kořenného. Tyto markery byly následně využity k testování celé kolekce kmínu kořenného prostřednictvím fragmentační analýzy s použitím fluorescenčně značených primerů.

Pro testování ISSR markerů byly použity primery vyvinuté Univerzitou Britské Kolumbie (UBC – *University of British Columbia*). Na základě optimalizačních kroků bylo vybráno 8 ISSR markerů vhodných pro analýzu celé kolekce. Amplifikační produkty byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy.

3.4 Statistická analýza

Soubor zahrnoval celkem 95 jedinců kmínu kořenného z České republiky. Pro statistickou analýzu byl materiál rozdělen do tří skupin podle šlechtitelského typu: registrované odrůdy ($n = 40$), šlechtitelský materiál ($n = 49$) a plané druhy ($n = 6$). Podle biologického typu byly vzorky klasifikovány jako dvouletá forma ($n = 29$), jednoletá forma ($n = 16$), ozimá forma ($n = 23$) a vzorky s nezařazeným biologickým typem ($n = 27$). Pro analýzu genetické diverzity byly použity dva typy markerů, kodominantní SSR markery a dominantní ISSR markery. Veškerá statistická analýza byla zpracována v RStudio verze 2026.01.1+403 (Posit team, 2026) pro R verze 4.4.3 (R Core Team, 2025).

4. VÝSLEDKY

Přestože testy klíčivosti semen nebyly primárním cílem této práce, poskytly výchozí informaci pro volbu vhodné metody izolace DNA. U vzorků ze společnosti Agritec byl pozorován výrazný pokles klíčivosti u semen starších čtyři roky. U vzorků z genové banky nebyla zjištěna jednoznačná souvislost mezi rokem zařazení do genové banky a klíčivostí semen. Z celkového počtu 126 vzorků splnilo klíčivost 7–10/10: 42 vzorků, klíčivost 4–6/10: 59 vzorků a klíčivost 0–3/10 pouze 25 vzorků.

4.1 Izolace DNA

Na základě porovnání jednotlivých izolačních metod z hlediska výtěžnosti, čistoty a amplifikovatelnosti DNA byla provedena volba nejvhodnější metody pro následné SSR a ISSR analýzy. Srovnání průměrných hodnot koncentrace DNA a poměrů OD 260/280 a OD 260/230 pro jednotlivé metody uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1: Srovnání průměrných hodnot koncentrace DNA a poměrů OD 260/280 a OD 260/230

| Metoda izolace DNA | Rostlinný materiál | Průměrná koncentrace DNA [ng/μl] | Průměrný poměr OD 260/280 | Průměrný poměr OD 260/230 |
|------------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| CTAB-PVP | Listy | 37,57 | 2,32 | 2,04 |
| ZymoResearch | | 34,82 | 2,01 | 1,17 |
| MagCore | | 16,85 | 1,94 | 1,38 |
| Průměr – listy | | 29,75 | 2,09 | 1,53 |
| CTAB-PVP | Semena | 130,48 | 1,39 | 0,32 |
| ZymoResearch | | 66,90 | 1,94 | 1,52 |
| MagCore | | 18,10 | 2,06 | 0,70 |
| Průměr – semena | | 71,83 | 1,80 | 0,85 |

Výsledky statistické analýzy prokázaly, že metoda izolace, typ materiálu i jejich vzájemná interakce mají statisticky významný vliv na sledované parametry ($p < 0,001$), zatímco vliv odrůdy nebyl statisticky významný ani pro kvantitu, ani kvalitu DNA ($p = 0,317$).

Získané výsledky prokázaly potřebu volby odlišných izolačních metod pro listy a semena. Zatímco metoda CTAB-PVP není vhodná pro izolaci DNA ze semen, byla naopak využita při izolaci DNA z listů. Metody ZymoResearch a MagCore se naopak na základě výsledků osvědčily pro izolaci DNA ze semen a byly kombinovány podle aktuální potřeby.

4.2 Optimalizace molekulárních markerů

Před analýzou celé kolekce bylo nutné optimalizovat molekulární markery vhodné pro kmín kořený. Výsledkem optimalizace byl panel 12 SSR markerů a 8 ISSR markerů, který byl následně použit pro genotypizaci celého souboru. Nejvyšší míra přenositelnosti byla zaznamenána u markerů původně vyvinutých pro mrkev obecnou (Cavagnaro et al., 2011), kde bylo amplifikováno 5 z 20 testovaných markerů, a pro kmín římský (Bharti et al., 2018), kde bylo úspěšných 6 z 17 markerů.

Fragmentační analýzou bylo následně úspěšně detekováno všech 12 SSR markerů, přičemž tři primery (Cumin SSR 306, Cumin SSR 861 a Cumin SSR 699) amplifikovaly dva nezávislé lokusy, čímž celkový počet analyzovaných lokusů dosáhl 15. Z počátečního souboru 16 ISSR markerů bylo pro genotypizaci kolekce vybráno 8 markerů, jejichž funkčnost byla nejdříve ověřena na souboru 12 vzorků pocházejících výhradně z České republiky.

4.3 Charakteristika SSR markerů

Celkem bylo amplifikováno 15 SSR lokusů s nízkou až střední úrovní polymorfismu. Souhrnné parametry jednotlivých lokusů jsou uvedeny viz Tabulka 2.

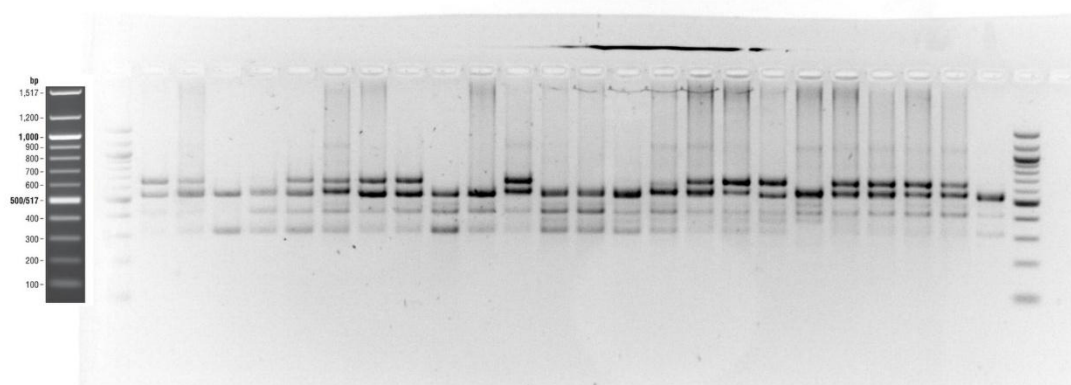
Tabulka 2: Charakteristika SSR markerů, *** $p < 0.001$, ns – nesignifikantní

| Lokus | N _A | H _o | H _e | FIS | PIC | HWE | HWE signif. |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|---------------|--------------|----------|-------------|
| Cumin186_L1 | 2 | 0,402 | 0,368 | -0,093 | 0,314 | 0,565 | ns |
| Cumin256_L1 | 3 | 0,670 | 0,573 | -0,169 | 0,417 | 0,000 | *** |
| Cumin306_L1 | 3 | 0,734 | 0,478 | -0,535 | 0,378 | 0,000 | *** |
| Cumin306_L2 | 2 | 0,184 | 0,171 | -0,073 | 0,154 | 1,000 | ns |
| Cumin53_L1 | 2 | 0,125 | 0,125 | 0,004 | 0,158 | 0,576 | ns |
| Cumin699_L1 | 3 | 0,407 | 0,345 | -0,180 | 0,294 | 0,056 | ns |
| Cumin699_L2 | 4 | 0,494 | 0,482 | -0,025 | 0,351 | 0,052 | ns |
| Cumin861_L1 | 2 | 0,214 | 0,347 | 0,382 | 0,352 | 0,000 | *** |
| Cumin861_L2 | 2 | 0,222 | 0,178 | -0,250 | 0,073 | 0,103 | ns |
| ECMS16_L1 | 2 | 0,578 | 0,555 | -0,042 | 0,374 | 0,000 | *** |
| GSSR111_L1 | 2 | 0,588 | 0,378 | -0,554 | 0,363 | 0,000 | *** |
| GSSR138_L1 | 2 | 0,534 | 0,454 | -0,177 | 0,361 | 0,183 | ns |
| GSSR140_L1 | 3 | 0,452 | 0,394 | -0,146 | 0,315 | 0,534 | ns |
| GSSR154_L1 | 3 | 0,489 | 0,424 | -0,154 | 0,386 | 0,541 | ns |
| GSSR97_L1 | 4 | 0,520 | 0,391 | -0,332 | 0,449 | 0,000 | *** |
| Průměr / celkem | 2,60 | 0,441 | 0,378 | -0,223 | 0,316 | - | 6/15 |

Počet alel na lokus (N_A) se pohyboval v rozmezí 2–4. Pozorovaná heterozygotnost (H_o) nabývala hodnot od 0,125 do 0,734, s průměrem 0,441, přičemž očekávaná heterozygotnost (H_e) byla v průměru nižší (rozmezí 0,125–0,573, průměr 0,378). Nepoměr mezi H_o a H_e se promítl v záporných hodnotách inbredního koeficientu (FIS), jehož průměr činil $-0,223$. Záporný FIS byl zaznamenán u 13/15 lokusů, což ukazuje na celkový přebytek heterozygotů v analyzovaném souboru. Informační obsah polymorfismu (PIC) se pohyboval od 0,073 do 0,449 s průměrem 0,316, což odpovídá nízké až střední informativní hodnotě markerů podle klasifikace Botstein et al. (1980).

4.4 Charakteristika ISSR markerů

Osm ISSR markerů použitých v této práci generovalo celkem 79 reprodukovatelných bandů, z nichž všechny (100 %) byly polymorfnní napříč analyzovaným souborem. Počet bandů na marker se pohyboval od 7 do 13, s průměrem 10 bandů na primer. Polymorfismus všech bandů u všech osmi markerů svědčí o tom, že zvolený set ISSR markerů zachycuje genetickou variabilitu v analyzovaném souboru a žádný z primerů negeneroval monomorfnní fragmenty. Příklady amplifikačních profilů ISSR markerů jsou zobrazeny viz Obrázek 1.



Obrázek 1: Příklad amplifikačního profilu ISSR 841 u vybraných vzorků (šlechtitelský materiál Agritec, mix vzorků GRIN)

4.5 Diferenciace podle šlechtitelského a biologického typu

Soubor byl rozdělen do tří skupin podle šlechtitelského typu: registrované odrůdy ($n = 40$), šlechtitelský materiál ($n = 49$) a plané druhy ($n = 6$). Podle biologického typu byly vzorky klasifikovány jako dvouletá forma ($n = 29$), jednoletá forma ($n = 16$), ozimá forma ($n = 23$) a vzorky s nezařazeným biologickým typem ($n = 27$).

SSR markery

Všechna tři párová srovnání PERMANOVA podle šlechtitelského typu prokázala signifikantní diferenciaci i po Bonferroniho korekci ($p < 0,05$). Hodnoty R^2 se však pohybovaly v rozmezí 0,074–0,087, což znamená, že šlechtitelský typ vysvětluje pouze 7–9 % celkové genetické variance. Nejvyšší diferenciacie byla zaznamenána mezi odrůdami a planými druhy ($G'ST = 0,139$; Jost $D = 0,058$). Nejvyšší počet privátních alel byl sledován u planých druhů (7), přičemž šest z nich pocházelo z jediného lokusu Cumin861_L2. Odrůdy nesly tři privátní alely rozložené na dvou lokusech a šlechtitelský materiál pouze jednu.

U biologického typu se dvouletý typ statisticky významně odlišoval jak od jednoletého ($R^2 = 0,178$; $p < 0,001$), tak od ozimého typu ($R^2 = 0,234$; $p < 0,001$), zatímco srovnání jednoletého a ozimého typu neprokázalo signifikantní diferenciaci ($R^2 = 0,043$; $p = 0,491$). Hodnoty R^2 (0,178 a 0,234) jsou přitom vyšší než u srovnání podle šlechtitelského typu (0,074–0,087), což naznačuje, že biologický typ je silnějším prediktorem genetické struktury než šlechtitelský typ.

To potvrzuje také srovnání výsledků analýzy molekulární variance (AMOVA, Tabulka 3).

Tabulka 3: AMOVA – rozložení genetické variance podle biologického typu a šlechtitelského typu (SSR)

| Faktor | Zdroj variance | df | SSD | MSD | σ^2 | % variance | p |
|-------------------|----------------|----|---------|-------|------------|------------|---------|
| Biologický typ | Mezi skupinami | 2 | 12,199 | 6,100 | 0,222 | 15,40 | <0,0001 |
| | Uvnitř skupin | 65 | 79,084 | 1,217 | 1,217 | 84,60 | - |
| Šlechtitelský typ | Mezi skupinami | 2 | 7,403 | 3,702 | 0,088 | 5,94 | 0,0008 |
| | Uvnitř skupin | 92 | 128,166 | 1,393 | 1,393 | 94,06 | - |

Pomocí AMOVA biologický typ vysvětluje 15,40 % celkové genetické variance mezi skupinami ($p < 0,0001$), zatímco šlechtitelský typ pouze 5,94 % ($p = 0,0008$). Biologický typ tedy vysvětluje téměř třikrát více meziskupinové variability než šlechtitelský typ. V obou případech nicméně zůstává většina genetické variance lokalizována uvnitř skupin (84,60 % resp. 94,06 %), což potvrzuje, že studovaný soubor kmínu kořenného vykazuje vysokou vnitroskupinovou variabilitu bez ohledu na použitý klasifikační faktor.

ISSR markery

Výsledky ISSR markerů diferenciaci podle obou klasifikačních faktorů potvrdily. Všechna tři párová srovnání PERMANOVA podle šlechtitelského typu byla vysoce signifikantní ($p = 0,001$; po Bonferroniho korekci $p = 0,003$). Hodnoty R^2 byly celkově vyšší než u SSR markerů (0,064–0,130 vs. 0,074–0,087), což naznačuje, že ISSR markery zachycují meziskupinovou diferenciaci výrazněji.

Párová srovnání podle biologického typu byla signifikantní ($p < 0,05$ pro všechna pozorování i po Bonf. korekci). Srovnání jednoletého a ozimého typu bylo oproti výsledkům získanými SSR markery rovněž signifikantní ($p < 0,001$).

Pomocí analýzy AMOVA vysvětlil šlechtitelský typ 17,87 % celkové genetické variance mezi skupinami ($p < 0,0001$), zatímco biologický typ vysvětlil pouze 10,05 % ($p < 0,0001$) (Tabulka 4). U ISSR markerů je tedy šlechtitelský typ silnějším strukturujícím faktorem než biologický typ. V obou případech zůstává dominantní podíl variance lokalizován uvnitř skupin (82,13 % resp. 89,95 %).

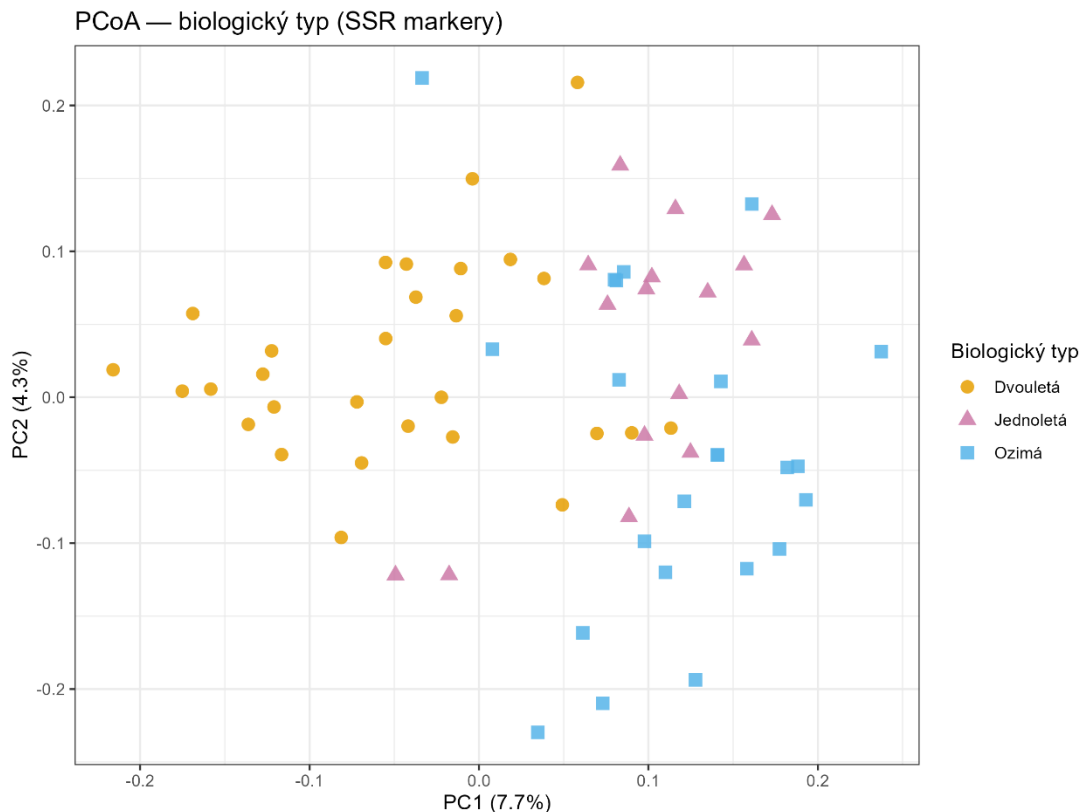
Tabulka 4: AMOVA – rozložení genetické variance podle biologického typu a šlechtitelského typu (ISSR)

| Faktor | Zdroj variance | df | SSD | MSD | σ^2 | % variance | p |
|-------------------|----------------|----|---------|--------|------------|------------|---------|
| Biologický typ | Mezi skupinami | 2 | 69,838 | 34,919 | 1,127 | 10,05 | <0,0001 |
| | Uvnitř skupin | 65 | 655,368 | 10,083 | 10,083 | 89,95 | - |
| Šlechtitelský typ | Mezi skupinami | 2 | 133,234 | 66,617 | 2,159 | 17,87 | <0,0001 |
| | Uvnitř skupin | 92 | 913,124 | 9,925 | 9,925 | 82,13 | - |

4.6 Populační struktura

Populační struktura analyzovaného souboru byla vizualizována pomocí analýzy hlavních koordinát (PCoA; *Principal Coordinates Analysis*), hierarchické klastrové analýzy (UPGMA; *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), diskriminační analýzy hlavních komponent (DAPC; *Discriminant Analysis of Principal Components*) a heatmap genetické podobnosti mezi odrůdami.

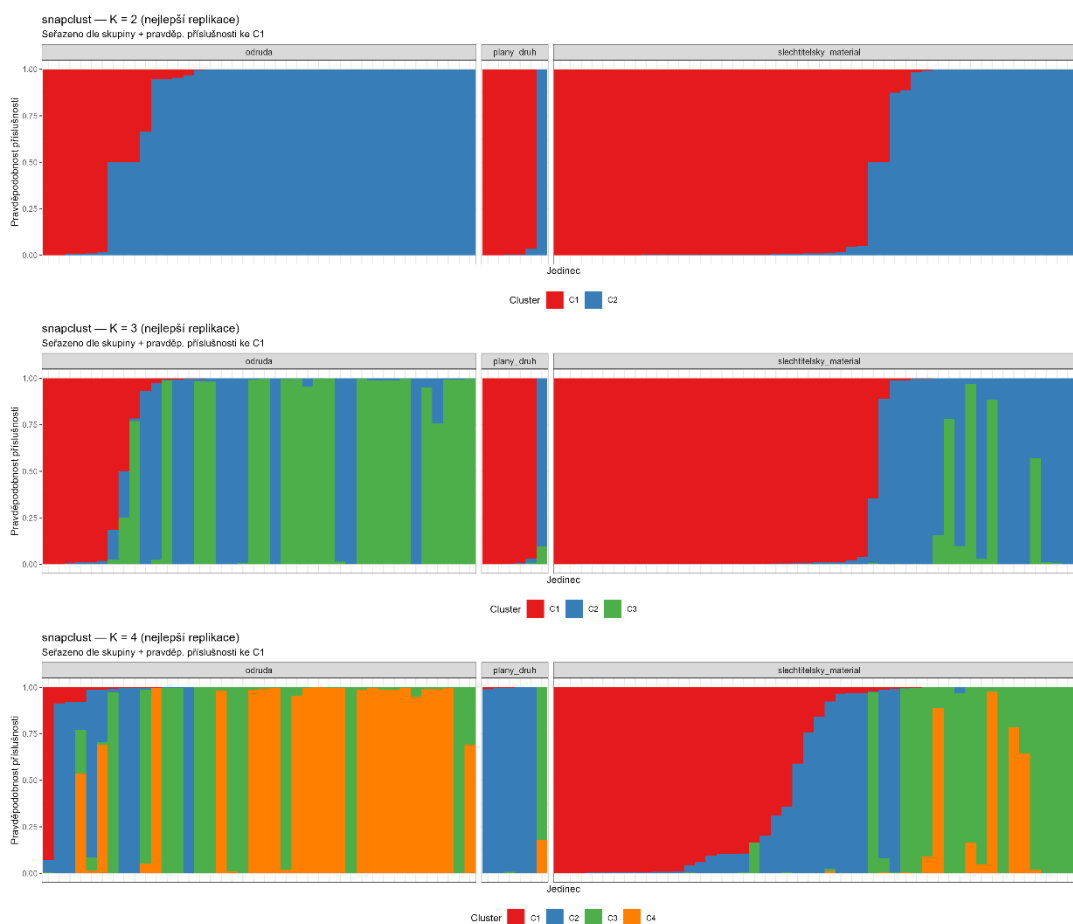
První dvě hlavní koordináty PCoA vysvětlily dohromady 12,0 % celkové variance u SSR markerů (PC1 = 7,7 %; PC2 = 4,3 %), u ISSR markerů dohromady 30,9 % (PC1 = 23,2 %; PC2 = 7,7 %). Z hlediska biologického typu bylo patrné, že dvouletý typ se spíše koncentruje v levé polovině grafu, zatímco jednoletý a ozimý typ se prolínají v pravé části, což je konzistentní s výsledky PERMANOVA, která neprokázala signifikantní diferenciaci mezi jednoletým a ozimým typem u SSR markerů (Obrázek 2).



Obrázek 2: PCoA pro biologický typ, SSR markery

Hierarchická klastrová analýza UPGMA oddělila s vysokou bootstrapovou podporou (100 %) dvě hlavní větve u obou typů markerů. U SSR markerů dendrogram biologického typu prokázal lepší klastrování – dvouletý typ se shlukoval převážně v menší větvi, zatímco jednoletý a ozimý typ se promísily v rámci větší větve, což potvrzuje jejich genetickou blízkost. V obou případech šlechtitelský typ nekorespondoval s hierarchickou strukturou – odrůdy a šlechtitelský materiál se prolínaly bez zřetelných klastrů.

Při $K = 4$ u bayesovského klastrování snapclust se objevila výrazná heterogenita – řada jedinců vykazovala smíšenou příslušnost ke třem i čtyřem klastrům, což potvrzuje spíše kontinuální charakter genetické struktury v souboru (Obrázek 3).

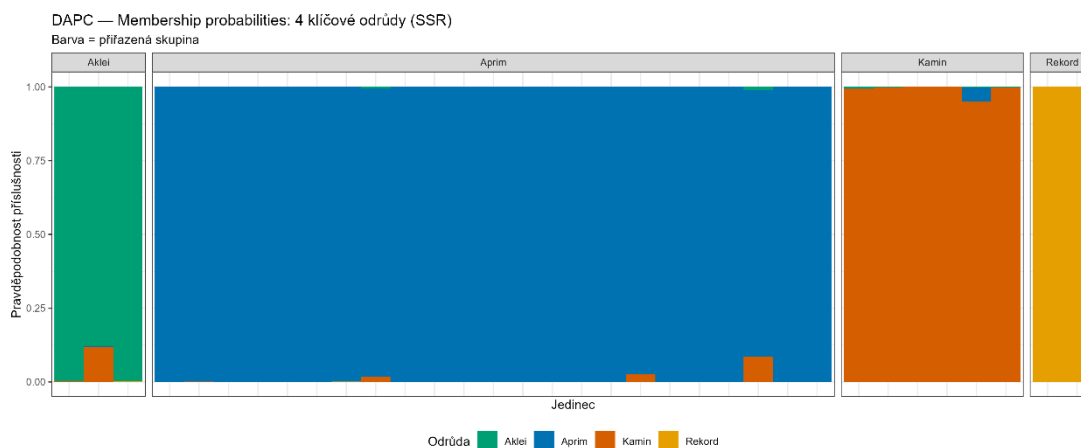


Obrázek 3: Výstup snapclust – Barploty příslušností pro K = 2, 3 a 4, SSR markery

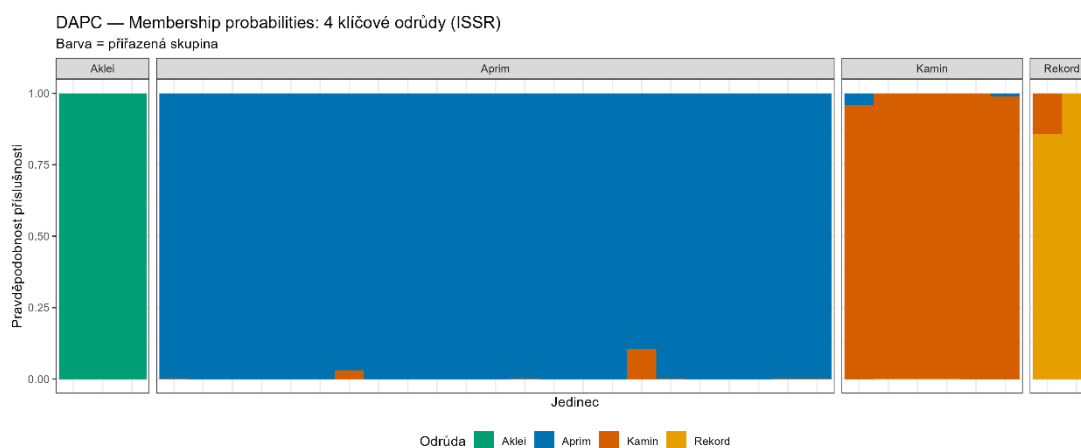
Diskriminační analýza hlavních komponent (DAPC) byla provedena pro šlechtitelský typ i pro jednotlivé odrůdy. DAPC podle šlechtitelského typu oddělila plané druhy jako separátní skupinu, zatímco odrůdy a šlechtitelský materiál se u SSR markerů částečně překrývaly. Řada jedinců vykazovala smíšenou příslušnost k oběma skupinám, což koresponduje s nízkou hodnotou $G'ST$ mezi těmito kategoriemi ($G'ST = 0,076$). DAPC podle šlechtitelského typu u ISSR markerů výrazněji oddělila všechny tři skupiny než u SSR dat.

4.7 Identifikace odrůd

DAPC na odrůdové úrovni oddělila čtyři odrůdy do zřetelně separovaných klastrů u SSR i ISSR markerů (Obrázek 4, Obrázek 5). U odrůdy Aklei byl dále identifikován jeden diagnostický band (ISSR812_610), přítomný u všech jedinců odrůdy a nepřítomný u všech ostatních analyzovaných genotypů (frekvence = 1,0 / 0,0), a dalších osm téměř diagnostických bandů (frekvence $\geq 0,8$ v cílové odrůdě a $\leq 0,2$ u ostatních).



Obrázek 4: DAPC graf pravděpodobnosti příslušnosti, odrůdy, SSR markery



Obrázek 5: DAPC graf pravděpodobnosti příslušnosti, odrůdy, ISSR markery

4.8 Srovnání SSR a ISSR markerů

Patnáct SSR lokusů detekovalo celkem 39 alel (průměr 2,6 alely na lokus) s průměrným PIC 0,316 a průměrnou očekávanou heterozygotností $H_e = 0,378$. Osm ISSR markerů generovalo 79 bandů (průměr 9,9 bandu na marker), z nichž všechny byly polymorfní. Celková Neiova genová diverzita dosáhla hodnoty $H = 0,279$. Základní parametry SSR a ISSR markerů shrnuje Tabulka 5.

Tabulka 5: Souhrnné srovnání SSR a ISSR markerů

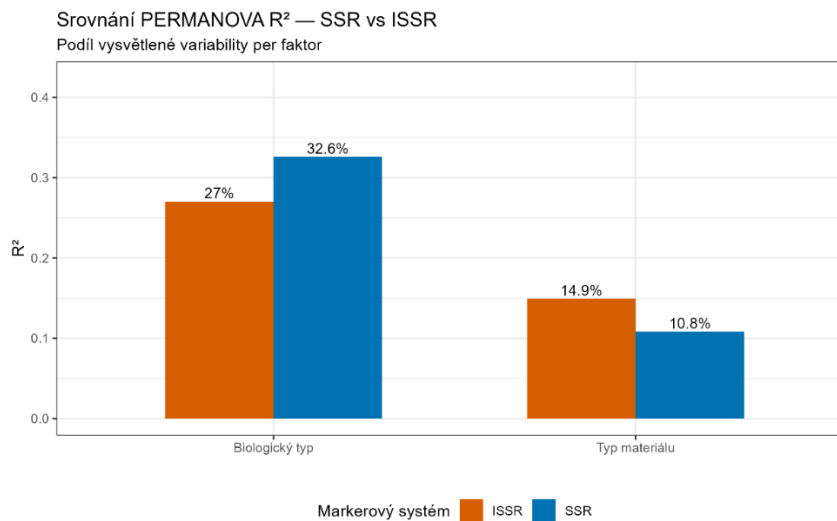
| | SSR | ISSR |
|--|--------------|------------|
| Typ markeru | Kodominantní | Dominantní |
| Počet lokusů | 15 | 8 |
| Celkem alel / bandů | 39 | 79 |
| Průměrně per lokus | 2,6 | 9,9 |
| PIC (průměr) / % polymorfismus | 0,316 | 100 % |
| H_e (průměr) / Nei's H (celkový) | 0,378 | 0,279 |

Míru shody mezi oběma typy markerů na úrovni párových genetických vzdáleností kvantifikuje Mantelův test. Korelace distančních matic pro celý soubor byla signifikantní, ale pouze středně silná ($r = 0,401$; $p < 0,0001$). Nejvyšší korelace byla zaznamenána u šlechtitelského materiálu ($r = 0,675$; $p < 0,001$), což naznačuje, že v rámci této skupiny oba systémy zachycují podobné genetické vztahy. Srovnání výsledků AMOVA pro oba typy markerů shrnuje Tabulka 6.

Tabulka 6: AMOVA – vysvětlená variance mezi skupinami (SSR vs. ISSR)

| Faktor | SSR (%) | SSR p | ISSR (%) | ISSR p |
|-------------------|---------|---------|----------|---------|
| Šlechtitelský typ | 5,94 | 0,0008 | 17,87 | <0,0001 |
| Biologický typ | 15,40 | <0,0001 | 10,05 | <0,0001 |

SSR markery odhalily u biologického typu výrazně vyšší podíl vysvětlené meziskupinové variance (15,40 %) než u šlechtitelského typu (5,94 %). U ISSR markerů byl vzorec opačný – šlechtitelský typ vysvětlil 17,87 % variance, zatímco biologický typ pouze 10,05 %. Oba faktory byly u obou markerů signifikantní ($p < 0,001$), ale pořadí jejich relativní důležitosti se mezi nimi obrátilo. Srovnání výsledků PERMANOVA poskytlo částečně odlišný obraz (Obrázek 6).



Obrázek 6: Srovnání PERMANOVA, SSR vs. ISSR markery

U biologického typu vysvětlily SSR markery vyšší podíl variance ($R^2 = 0,326$) než markery ISSR ($R^2 = 0,270$). U šlechtitelského typu byly obě hodnoty bližší, ale ISSR dosáhly mírně vyššího R^2 (0,149) než SSR (0,108). V obou případech byl biologický typ silnějším strukturujícím faktorem než šlechtitelský typ, nicméně rozdíl mezi oběma faktory byl u SSR markerů výrazně větší ($R^2 = 0,326$ vs. 0,108) než u ISSR ($R^2 = 0,270$ vs. 0,149).

Výsledky PERMANOVA naznačují, že biologický typ je konzistentně silnějším prediktorem genetické struktury v obou systémech, avšak ISSR markery přisuzují šlechtitelskému typu vyšší relativní váhu než SSR.

Oba typy markerů se shodují v tom, že odrůdy jsou geneticky nejvíce diverzní skupinou (SSR $H_e = 0,388$; ISSR Nei's $H = 0,288$) a v identifikaci nejvíce diferencovaného páru odrůdy vs. plané druhy ($G'ST = 0,139$; $GST = 0,132$). Absolutní hodnoty diference jsou v obou systémech nízké ($< 0,15$), což potvrzuje, že skupiny sdílejí převážnou část genetické variability bez ohledu na typ markeru.

5. ZÁVĚR

Tato disertační práce poskytuje první molekulárně genetickou charakterizaci české kolekce 95 genotypů kmínu kořeného (*Carum carvi* L.) s využitím SSR a ISSR markerů. Vzhledem k tomu, že genom kmínu zatím nebyl kompletně popsán a dosavadní studie genetické diverzity se opíraly především o RAPD markery či GBS přístupy u zahraničních souborů, množství publikovaných informací není dostatečné.

Protože veškeré navazující analýzy jsou podmíněny kvalitou výchozí DNA, byly nejprve řešeny testy klíčivosti semen a volba vhodné metody izolace DNA. Orientační testy klíčivosti potvrdily, že vitalita semen výrazně klesá se stářím vzorků, a že u materiálu z genové banky nelze na vitalitu semen spoléhat. Orientační testování klíčivosti před volbou izolační metody lze proto doporučit jako standardní postup u všech vzorků neznámého stáří.

Porovnání tří metod izolace DNA (modifikovaný CTAB-PVP protokol, komerční kit Quick-DNA Plant/Seed Kit a automatizovaná stanice MagCore) ukázalo, že žádná metoda není univerzálně optimální pro všechny typy rostlinného materiálu. Pro listy se jako finančně i kvalitativně nejvýhodnější ukázal CTAB-PVP protokol, zatímco pro izolaci DNA ze semen, kde CTAB-PVP selhává kvůli přítomnosti PCR inhibitorů, je vhodné využít komerční kit nebo automatizovanou stanici. Na základě těchto zjištění byl v této práci použit kombinovaný přístup, kdy u klíčivých semen byla pro izolaci DNA z listů použita metoda CTAB-PVP, zatímco u neklíčivých semen byla DNA získána přímo ze semen pomocí komerčního kitu. Tento přístup je přenositelný do dalších studií genetické diverzity kmínu kořeného i dalších zástupců čeledi *Apiaceae*.

Z dvanácti SSR markerů přenesených z příbuzných taxonů čeledi *Apiaceae* bylo úspěšně optimalizováno 15 polymorfních lokusů. Současně bylo optimalizováno 8 ISSR markerů, které poskytly reprodukovatelné a polymorfní amplifikační profily a posloužily jako komplementární zdroj informace o genetické struktuře ve studované kolekci. Optimalizované protokoly a vybrané markery jsou samostatným metodickým výstupem této práce, který dosud nebyl pro kmín kořený k dispozici a může být přímo využitelný dalšími pracovišti.

Výsledky genetické diverzity a populační struktury byly dále vyhodnoceny ve vztahu ke třem stanoveným hypotézám.

Hypotéza H1, která předpokládala, že biologické typy (dvouletý, jednoletý, ozimý) a šlechtitelské typy (odrůdy, šlechtitelský materiál, plané druhy) představují geneticky diferenciované skupiny identifikovatelné pomocí molekulárních markerů, byla oběma typy markerů potvrzena. Diferenciace mezi skupinami byla téměř ve všech párových srovnáních

statisticky průkazná (PERMANOVA $p < 0,05$). Její biologická síla je nicméně spíše nízká, protože převážný podíl genetické variability (AMOVA 82–94 %; $p < 0,0001$) se u všech analyzovaných faktorů nachází uvnitř skupin, což odpovídá převažující cizosprašnosti kmínu. Oba typy markerů shodně identifikovaly biologický i šlechtitelský typ jako statisticky signifikantní strukturující faktor ($p < 0,001$), přičemž PERMANOVA označila biologický typ za silnější prediktor genetické struktury. Diferenciace v rámci biologického typu byla pozorována především mezi dvouletým a jednoletým/ozimým typem. Mezi šlechtitelskými typy byla nejvýraznější diferenciace mezi odrůdami a planými druhy, u kterých byla navíc zachycena přítomnost privátních alel, které potvrzují jejich roli jako potenciálního rezervoáru alelické variability.

Hypotéza H2 o využitelnosti SSR a ISSR markerů pro molekulární rozlišení registrovaných odrůd byla potvrzena pro vybranou skupinu čtyř odrůd (Aklei, Aprim, Kamín, Rekord) na úrovni DAPC. ISSR markery oddělily všechny čtyři odrůdy do samostatných klastrů s pravděpodobností přiřazení blízkou 1,0 u většiny jedinců. SSR markery poskytly nepatrně slabší, ale stále jasné rozdělení. Podpurným nálezem byla identifikace jednoho diagnostického bandu pro odrůdu Aklei.

Hypotéza H3, která předpokládala, že SSR a ISSR markery poskytují srovnatelný obraz genetické diverzity a populační struktury, byla potvrzena pouze částečně. Oba typy markerů shodně identifikovaly hlavní charakter populační struktury – statisticky průkaznou diferenciaci podle biologického a šlechtitelského typu. Lišily se však v relativní váze přisuzované jednotlivým faktorům. Z praktického hlediska je mezi oběma typy markerů pouze středně silná korelace (Mantelův test $r = 0,402$; $p < 0,0001$) a ukázaly se tedy spíše jako vzájemně komplementární. Výsledky obou typů markerů odrážejí nízkou až střední diverzitu v rámci studovaného souboru (SSR $H_e = 0,378$; ISSR $H = 0,279$).

Získaná data poskytují celkový obraz genetické diverzity české kolekce, který může sloužit jako podklad pro regeneraci akcesí v genové bance, pro výběr rodičovských komponent při šlechtění a pro hodnocení uniformity registrovaných odrůd na molekulární úrovni. Za hlavní omezení této práce lze považovat velikost a nevyváženost analyzovaného souboru. Některé odrůdy a skupiny byly zastoupeny pouze nízkým počtem jedinců, což zvyšuje citlivost odhadovaných parametrů, zejména FIS a vnitroskupinových vzdáleností.

Pro navazující práce se tak nabízí několik směrů. Pro rozšíření poznatků o celkové genetické diverzitě u kmínu kořeného by bylo vhodné rozšířit kolekci o zahraniční registrované odrůdy a početnější zastoupení jedinců v analyzovaných skupinách. To by jednak umožnilo srovnání české kolekce se zahraničními vzorky, ale také posílení interpretace

diagnostických bandů identifikovaných u odrůdy Aklei včetně jejich validace na větším počtu jedinců. Dalším směrem výzkumu by mohla být návaznost na již publikovanou populační strukturu pomocí GBS, konkrétně analýza lokusu kontrolujícího vernalizaci pro cílenou selekci. V neposlední řadě by bylo možné přiblížit vztah mezi molekulárními daty a morfologickými znaky, což by umožnilo cílené využití zjištěné genetické diverzity ve šlechtitelské praxi.

Závěrem lze konstatovat, že stanovené cíle disertační práce byly splněny. Práce poskytla metodický postup pro molekulární charakterizaci kmínu kořenného a popsala genetickou diverzitu a populační strukturu kolekce českých vzorků ve vztahu k biologickému typu, šlechtitelskému typu i vybraným českým odrůdám. Získané výsledky představují výchozí bod pro další výzkum genetické diverzity této hospodářsky významné, nicméně doposud opomíjené, plodiny čeledi *Apiaceae*.

6. SEZNAM LITERATURY

- Abdelaziz, S. A., Khaled, K. A. M., Younis, R. A. A., Al-Kordy, M. A., El-Domyati, F. M., & Moghazee, M. M. (2024). Comparison of four DNA barcoding loci to distinguish between some Apiaceae family species. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-023-00457-7>
- Aiello, D., Ferradini, N., Torelli, L., Volpi, C., Lambalk, J., Russi, L., & Albertini, E. (2020). Evaluation of cross-species transferability of SSR markers in *Foeniculum vulgare*. *Plants*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/plants9020175>
- Bharti, R., Kumar, S., & Parekh, M. J. (2018). Development of genomic simple sequence repeat (gSSR) markers in cumin and their application in diversity analyses and cross-transferability. *Industrial Crops and Products*, 111, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.018>
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–331.
- Brozynska, M., Furtado, A., & Henry, R. J. (2016). Genomics of crop wild relatives: Expanding the gene pool for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 14(4), 1070–1085. <https://doi.org/10.1111/pbi.12454>
- Cavagnaro, P. F., Chung, S. M., Manin, S., Yildiz, M., Ali, A., Alessandro, M. S., Iorizzo, M., Senalik, D. A., & Simon, P. W. (2011). Microsatellite isolation and marker development in carrot - genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across Apiaceae. *BMC Genomics*, 12, 386 (2011). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-386>
- CGN. (2026). *CGN caraway collection*. <https://www.wur.nl/en/cgn/plant/crop-collections/apiaceae/caraway>
- Cohen, J. I., Williams, J. T., Plucknett, D. L., & Shands, H. (1991). Ex situ conservation of plant genetic resources: global development and environmental concerns. *Science*, 253(5022), 866–872. <https://doi.org/10.1126/science.253.5022.866>
- de Haro Reyes, B., Palmé, A., Fitzgerald, H., Göransson, M., Lyytikäinen, V., Madsen, B., Normand, S., Thorbjörnsson, H., Treier, U. A., & Hagenblad, J. (2025). An east–west distribution of genetic diversity in Nordic populations of caraway (*Carum carvi* L.) and its consequences for conservation prioritisation. *Conservation Genetics*, 26, 771–785. <https://doi.org/10.1007/s10592-025-01702-5>

- Dotlačil, L., Zedek, V., Papoušková, L., Faberová, I., & Holubec, V. (Eds.). (2013). *20 let Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity*. Ministerstvo zemědělství, Praha.
- Doyle, J. (1991). DNA Protocols for Plants: CTAB Total DNA Isolation. In G. M. Hewitt, A. W. B. Johnston, & J. P. W. Young (Eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy*. NATO ASI Series, vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg, 283–293. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Garrido-Cardenas, J. A., Mesa-Valle, C., & Manzano-Agugliaro, F. (2018). Trends in plant research using molecular markers. *Planta*, 247(3), 543–557. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2829-y>
- Guler, B. A., & Imamoglu, E. (2023). Molecular marker technologies in food plant genetic diversity studies: an overview. *Foods and Raw Materials*, 11(2), 282–292. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-2-575>
- Heywood, V. H. (1971). *History of the Classification of Umbelliferae* (1st ed.). Academic Press.
- Hussain, H., & Nisar, M. (2020). Assessment of plant genetic variations using molecular markers: A review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 8(5), 99–109. <https://doi.org/10.7324/JABB.2020.80514>
- Jamalova, D. N., Gad, H. A., Akramov, D. K., Tojibaev, K. S., Al Musayeib, N. M., Ashour, M. L., & Mamadalieva, N. Z. (2021). Discrimination of the essential oils obtained from four apiaceae species using multivariate analysis based on the chemical compositions and their biological activity. *Plants*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/plants10081529>
- Janipour, L., Fahmideh, L., & Fazeli Nasab, B. (2018). Genetic assessment of some populations of the medicinal plant Caraway (*Carum carvi*) using RAPD and ISSR markers. *Journal of Iranian Plant Exophysiological Research*, 12(48), 78–91
- Kameník, J. (1996). *Perspektivy uplatnění kmínu v zemědělství v ČR*. [Sborník] Brno, MZLU: 8–10
- Khoury, C. K., Brush, S., Costich, D. E., Curry, H. A., de Haan, S., Engels, J. M. M., Guarino, L., Hoban, S., Mercer, K. L., Miller, A. J., Nabhan, G. P., Perales, H. R., Richards, C., Riggins, C., & Thormann, I. (2022). Crop genetic erosion: understanding and responding to loss of crop diversity. *New Phytologist*, 233(1), 84–118. <https://doi.org/10.1111/nph.17733>
- Kocourková, B. (1996). Biologie a agrotechnika kmínu kořenného. Perspektivy uplatnění kmínu v zemědělství ČR. *Sborník referátů*, Vol. 35, 11–14. MZLU.

- Králík, J., Jůzl, M., & Kocourková, B. (2007). Vliv prostředí na výnos a obsah silice kmínu kořeného (*Carum carvi* L.). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, *LV*(5), 83–94.
- Laribi, B., Zoghlami, N., Lamine, M., Kouki, K., Ghorbel, A., & Mougou, A. (2011). RAPD-based assessment of genetic diversity among annual caraway (*Carum carvi*) populations. *EurAsian Journal of Biosciences*, *5*, 37–47.
- Nemeth, Eva. (1998). *Caraway: the Genus Carum*. CRC Press.
- Palumbo, F., Vannozzi, A., & Barcaccia, G. (2021). Impact of genomic and transcriptomic resources on apiaceae crop breeding strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(18). <https://doi.org/10.3390/ijms22189713>
- Pangyuan, L. (2017). The Study of Based on RAPD Molecular Markers in Celery Cultivars Relationship. *Science Discovery*, *5*(5), 312. <https://doi.org/10.11648/j.sd.20170505.12>
- Plunkett, G. M., & Lowry, P. P. (2001). Relationships among “Ancient Araliads” and their significance for the systematics of Apiales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *19*(2), 259–276. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0920>
- Posit team. (2026). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. Posit Software, PBC. <http://www.posit.co/>
- Powell, W., Machray, G. C., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, *1*(7), 5.
- Primack, R. B., Kindlamn, P., & Jersáková, J. (2011). *Úvod do biologie ochrany přírody*. Portál.
- R Core Team. (2025). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <https://www.R-project.org/>
- Reddy, M. P., Sarla, N., & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, *128*, 9–17.
- Rossetto, M. (2001). Sourcing of SSR Markers from Related Plant Species Microsatellite technology. In R. J. Henry (Ed.), *Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants* (pp. 211–224).
- Sedláková, J., Kocourková, B., Lojková, L., & Kubáň, V. (2003). The essential oil content in caraway species (*Carum carvi* L.). *Horticultural Science*, *2*(30). <https://doi.org/https://doi.org/10.17221/3818-HORTSCI>
- Seidenglanz, M., Muñoz-Arbeláe, M., & Šmirous, P. (2023). Pěstování kmínu se zkrácenou vegetační dobou. *Úroda*, (8), 83–87.

- Šmirous, P. (2005). *Effect of recurrent phenotype selection on selected agricultural characteristics in caraway (Carum carvi L.)* [PhD thesis]. Mendel University of Agriculture and Forestry Brno.
- Šmirous, P., & Kocourková, B. (2006). Výběr vhodných genotypů kmínu kořenného (*Carum carvi* L.) pro jeho další šlechtění. *Sborník Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně: LIV* (2).
- Smýkalová, I., & Horáček, J. (2021). Caraway (*Carum carvi* L.): Anther Culture and Production of DH Plants. In Seguí-Simarro (Ed.), *Doubled Haploid Technology: Volume 2: Hot Topics, Apiaceae, Brassicaceae, Solanaceae* (Vol. 2, 5). Humana New York, NY. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1335-1_5
- Spooner, D. M., Treuren, R. van., & Vicente, M. C. de. (2005). *Molecular markers for genebank management*. IPGRI Technical Bulletin.
- Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. (2026). *Databáze odrůd*. <https://ido.ukzuz.cz/ido/#plant-variety-database>
- von Maydell, D., Beleites, C., Stache, A. M., Riewe, D., Krähmer, A., & Marthe, F. (2024). Genetic variation of annual and biennial caraway (*Carum carvi*) germplasm offers diverse opportunities for breeding. *Industrial Crops and Products*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117798>
- von Maydell, D., Brandes, J., Lehnert, H., Junghanns, W., & Marthe, F. (2021). Breeding synthetic varieties in annual caraway: observations on the outcrossing rate in a polycross using a high-throughput genotyping system. *Euphytica*, 217(1). <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02732-5>
- von Maydell, D., Keilwagen, J., Lehnert, H., Berner, T., & Marthe, F. (2022). On the search for the vernalization locus in caraway (*Carum carvi*) using genotyping by sequencing data. *Journal Fur Kulturpflanzen*, 74(11–12), 263–270. <https://doi.org/10.5073/JfK.2022.11-12.06>
- von Maydell, D., Lehnert, H., Berner, T., Klocke, E., Junghanns, W., Keilwagen, J., & Marthe, F. (2020). On genetic diversity in caraway: Genotyping of a large germplasm collection. *PLoS ONE*, 15(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244666>
- Wang, X. J., Luo, Q., Li, T., Meng, P. H., Pu, Y. T., Liu, J. X., Zhang, J., Liu, H., Tan, G. F., & Xiong, A. S. (2022). Origin, evolution, breeding, and omics of Apiaceae: a family of vegetables and medicinal plants. *Horticulture Research*, 9. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac076>

Zehnálek, P., & Kraus, P. (2024). *Odrůdy 2024. Olejniny 2024: Seznam doporučených odrůd řepka olejka – ozimá, len setý – olejný. Přehled odrůd hořčice bílá, mák setý a kmín kořený.* Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Národní odrůdový úřad.

7. SEZNAM ZKRATEK

| | |
|----------------|---|
| AFLP | <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> |
| AMOVA | Analýza molekulární variance (<i>Analysis of Molecular Variance</i>) |
| ANOVA | Analýza rozptylu (<i>Analysis of Variance</i>) |
| AR | Alelická bohatost (<i>Allelic Richness</i>) |
| ČARC | Národní centrum zemědělského a potravinářského výzkumu (<i>Czech Agrifood Research Center</i>) |
| CGN | <i>Centre for Genetic Resources, the Netherlands</i> |
| CTAB-PVP | Cetrimoniumbromid-polyvinylpyrrolidon |
| ČR | Česká republika |
| ČSR | Československá republika |
| DAPC | Diskriminační analýza hlavních komponent (<i>Discriminant Analysis of Principal Components</i>) |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| FIS | Inbrední koeficient (<i>Inbreeding Coefficient</i>) |
| GBS | <i>Genotyping by Sequencing</i> |
| GRIN | <i>Germplasm Resources Information Network</i> |
| GST | <i>Coefficient of Gene Differentiation</i> |
| He | Očekávaná heterozygotnost (<i>Expected Heterozygosity</i>) |
| Ho | Pozorovaná heterozygotnost (<i>Observed Heterozygosity</i>) |
| HWE | Hardy-Weinbergova rovnováha |
| ISSR | <i>Inter Simple Sequence Repeat</i> |
| MANOVA | Vícerozměrná analýza rozptylu (<i>Multivariate Analysis of Variance</i>) |
| N _A | Počet alel (<i>Number of alleles</i>) |
| NGS | Sekvenování nové generace (<i>New Generation Sequencing</i>) |

| | |
|-----------|--|
| PCoA | Analýza hlavních koordinát (<i>Principal Coordinates Analysis</i>) |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PERMANOVA | Permutační multivariační analýza rozptylu (<i>Permutational Multivariate Analysis of Variance</i>) |
| PIC | Informační obsah polymorfismu (<i>Polymorphic Information Content</i>) |
| RAPD | <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> |
| SNP | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> |
| SSR | <i>Simple Sequence Repeat</i> |
| UBC | Univerzita Britské Kolumbie (<i>University of British Columbia</i>) |
| UPGMA | <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> |