

Univerzita Palackého v Olomouci

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Olomouc 2017

Bc. Helena Štefanová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Genomická a transkriptomická analýza vybraných genů
aktivních při vývoji osemení hrachu (*Pisum sativum* L.)**

Diplomová práce

Bc. Helena Štefanová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017 Vedoucí práce: Doc. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Genomická a transkriptomická analýza vybraných genů aktivních při vývoji osemení hrachu (*Pisum sativum* L.) vypracovala samostatně, pod vedením vedoucího diplomové práce Doc. Ing. Petra Smýkala, Ph.D. za použití uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Olomouci 2017

podpis

Souhrn

Diplomová práce se zabývá transkriptomickou a genetickou analýzou genů hrajících roli při vývoji osemení hrachu (*Pisum sativum*).

V teoretické části je charakterizován rod *Pisum* a popsáno osemení hrachu. Dále je popsána dormance semen, která je jedním ze dvou klíčových domestikačních znaků bobovitých rostlin. U kulturních forem byla dormance odstraněna, umožňující tak rychlé klíčení po vysetí a zároveň také bobtnání semen v souvislosti s vařivostí a následnou stravitelností. V případě semen bobovitých rostlin se jedná o fyzikálně podmíněnou dormanci zprostředkovanou nepropustností osemení pro vodu.

Experimentální část se zabývá molekulární analýzou genů identifikovaných pomocí diferenciální transkriptomické analýzy dormantních a nedormantních genotypů mapovací populace hrachu (*Pisum sativum* L.). Cílem bylo sledování exprese vybraných kandidátních genů pomocí kvantitativní RT-PCR a provedení jejich genetického mapování v kombinaci s analýzou fenotypového projevu na úrovni bobtnání a klíčení semen kontrastních linií hrachu.

Tato studie prokázala, že v blízkosti A lokusu se nachází lokus/gen zodpovídající za dormanci semene. Naopak analýza genu *GLABRA2* neprokázala jeho souvislost s dormanci semene.

MACE analýzou byly objeveny diferenciálně exprimované kandidátní geny: gen pro 4-coumarate CoA ligase (MACE-131) a UDP-glucosyl transferase (MACE-139).

Zjištěné poznatky přispěly k identifikaci a analýze genů hrajících roli při vývoji osemení hrachu (*Pisum sativum* L.).

Summary

The thesis deals with transcriptomic and genetic analysis of genes involved in the development of the seed coat of pea (*Pisum sativum*).

In the theoretical part *Pisum* genus is characterized and testa of pea described. It is also described dormancy, which is one of two key characters' pea plant domestication. Dormancy was removed in cultural genotype, allowing quick germination after planting and swelling of seeds in connection with cooking and subsequent digestibility. In the case of legume seeds dormancy is mediated by physically conditioned dormancy, impermeability of testa for water.

Experimental part deals with molecular analysis of genes identified by differential transcriptomic analysis of dormant and nondormant genotypes of pea mapping population (*Pisum sativum* L.). The aim was to monitor the expression of selected candidate genes by quantitative R-T PCR and genetic mapping in conjunction with the analysis of phenotype, swelling and germination of pea contrasting line.

This study showed that in vicinity of Mendel's A locus there is locus/gene responsible for seed dormancy. Analysis of GLABRA2 gene did not support its connection with seed dormancy.

By transcriptomics MACE analysis new differentially expressed candidate genes were found: for 4-coumarate CoA ligase (MACE-131) and UDP-glucosyl transferase (MACE-139).

The findings have contributed to the identification and analysis of genes involved in the development of the seed coat of pea (*Pisum sativum* L.).

Poděkování

Děkuji Doc. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za odborné vedení práce, věcné připomínky, dobré rady a vstřícnost při konzultacích a vypracovávání diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem lidem, se kterými jsem se během mé práce setkávala v laboratoři.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce.....	2
3	Současný stav řešené problematiky.....	3
	3.1 Hrách setý (<i>Pisum sativum</i> L.).....	3
	3.1.1 Botanický popis.....	3
	3.1.2 Taxonomické zařazení.....	4
	3.1.3 Původ a výskyt rodu <i>Pisum</i>	5
	3.1.4 Domestikace.....	7
	3.1.5 Genom hrachu.....	7
	3.1.6 Karyotyp hrachu.....	8
	3.2 Semeno hrachu.....	9
	3.2.1 Nutriční hodnoty semen hrachu.....	11
	3.2.2 Osemení.....	12
	3.2.3 Dormance semene.....	13
	3.2.4 Klíčení semene.....	15
	3.2.5 Genomické a transkriptomické analýzy vývoje semen bobovitých (<i>Fabaceae</i>).....	16
	3.3 Flavonoidy.....	18
	3.3.1 Vztah mezi dormancí semen a proanthokyanidiny.....	18
	3.3.2 Genetická regulace biosyntézy a akumulace flavonoidů.....	19
	3.4 Vybrané geny aktivní při vývoji osemení.....	23
	3.4.1 Mendelův A lokus hrachu (bHLH transkripční faktor).....	23
	3.4.2 Gen GLABRA2.....	26
4	Materiál a metodika.....	28
	4.1 Genomická analýza.....	28
	4.1.1 Testování dormance semen.....	29
	4.1.2 Hodnocení fenotypu osemení.....	30
	4.1.3 Izolace genomové DNA.....	30
	4.1.4 Spektrofotometrická analýza DNA (NanoDrop).....	31
	4.1.5 Horizontální agarózová elektroforéza DNA, PCR produktů a produktů restrikčního štěpení.....	31
	4.1.6 PCR amplifikace vybraných genů.....	32

4.1.7	Přečištění PCR produktu (pro sekvenování).....	34
4.1.8	Sekvenování, nalezení polymorfních restrikčních míst, Geneious software.....	35
4.1.9	Restrikce PCR produktu (CAPS-PCR, Cleavage Amplified Polymorphic Sequence).....	35
4.2	Transkriptomická analýza.....	36
4.2.1	Izolace RNA.....	37
4.2.2	Odstranění zbytkové DNA.....	38
4.2.3	Reverzní transkripce (RT-PCR).....	38
4.2.4	Kvantitativní real-time PCR amplifikace (qRT-PCR).....	41
4.2.5	Bioinformatická analýza.....	42
5	Výsledky.....	43
5.1	Testování dormance semen a hodnocení fenotypu osemení mezi planým a kulturním hrachem.....	43
5.2	Výběr genů aktivních při vývoji osemení.....	44
5.3	Genomická analýza vybraných genů (A lokus, GLABRA2).....	45
5.4	Výběr diferenciálně exprimovaných genů (DEG).....	48
5.5	qRT-PCR analýza vybraných kandidátů.....	50
6	Diskuze.....	56
6.1	Dormance vs. pigmentace osemení.....	56
6.2	Diferenciální exprese – transkriptomická analýza osemení.....	58
6.3	Proanthokyanidiny.....	59
6.4	GLABRA2.....	60
7	Závěr.....	62
8	Seznam zkratk.....	64
9	Literatura.....	66

1 Úvod

Hrách setý (*Pisum sativum* L.) je hospodářsky významná rostlina z čeledi bobovitých (*Fabaceae*), a zároveň díky práci J.G. Mendela také ikonický genetický model.

Dormance semen je společně s rozpadavostí plodu jedním ze dvou klíčových domestikačních znaků včetně bobovitých rostlin. Dormance je důležitou složkou rostlinné zdatnosti, která reguluje klíčení semen do nástupu příznivých růstových podmínek. V přirozeném prostředí je ukončení dormance regulováno především teplotou a dostupností vody, ale také prostřednictvím fyziologického stavu mateřské rostliny. Dormance je komplexní vlastnost, která je určena genetickými faktory s výrazným vlivem prostředí. Rozlišuje se pět typů dormance semen: 1) dormance fyziologická (hormonální regulace), 2) dormance morfologická (malá diferencovaná, avšak plně nevyvinutá embrya), 3) dormance morfo-fyziologická (kombinace fyziologické a morfologické dormance), 4) dormance fyzikální (nepropustnost osemení pro vodu bez skarifikace), 5) dormance kombinovaná (kombinace fyziologické a fyzické dormance). Role rostlinných hormonů, především kyseliny abscisové (ABA) a gibberelinů (GA) při regulaci vegetačního klidu a klíčení je již dlouho uznána. V posledním desetiletí bylo identifikováno několik dalších faktorů, které ovlivňují dormanci včetně specifických genů. V případě semen bobovitých rostlin se jedná o fyzikálně podmíněnou dormanci zprostředkovanou nepropustností osemení pro vodu. U kulturních forem byla dormance odstraněna, umožňující tak rychlé klíčení po vysetí a zároveň také bobtnání semen v souvislosti s vařivostí a následnou stravitelností.

Záměrem této práce je identifikovat a analyzovat geny, které se podílejí na dormanci semen hrachu (*Pisum sativum* L.).

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce s názvem „Transkriptomická a genomická analýza vybraných genů aktivních při vývoji osemení hrachu (*Pisum sativum* L.)“ je napsat literární rešerši na toto téma se zaměřením na domestikaci a dormanci semen, molekulární analýza genů identifikovaných pomocí diferenciální transkriptomické analýzy dormantních a nedormantních genotypů mapovací populace hrachu, sledování exprese vybraných kandidátních genů pomocí kvantitativní RT-PCR, genetické mapování v kombinaci s analýzou fenotypového projevu na úrovni bobtnání a klíčení semen kontrastních linií hrachu, využití syntenie s genomem modelového druhu (*Medicago truncatula*).

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Hrách setý (*Pisum sativum* L.)

Hrách je jednou z nejstarších a nejrozšířenějších kulturních plodin spolu s obilovinami a ostatními luskovinami jako je sója, cizrna a fazole. Patří do čeledi bobovitých (*Fabaceae*) a pěstuje se v celém mírném pásmu převážně jako jarní plodina.

Díky vysokému obsahu bílkovin (až 25%), jsou semena bobovitých rostlin nepostradatelnou složkou lidské obživy. Hrách se řadí k nejstarším kulturním plodinám, archeologické nálezy dokazují, že hrách byl pěstován již v době kamenné a bronzové (Zohary *et* Hopf, 2012). V 6. století n. l. patřil mezi nejběžněji konzumovanou stravu, byl rozšířen téměř po celé Evropě. Pěstujeme ho především pro semena, která mají vysoký obsah bílkovin (21 – 24 %), který je asi 2 x vyšší než u obilovin. Skladba aminokyselin je rovněž příznivější než u obilovin, neboť má více nepostradatelných aminokyselin, vyšší obsah vitaminů i minerálních látek. V krmivářském průmyslu je u nás v současné době díky převaze dovážené sóji nedocenen. Pro lidskou výživu se spotřebuje méně než 10 % produkce (Ministerstvo zemědělství ČR, 2004).

Ekologicky a ekonomicky je významná fixace vzdušného dusíku symbiotickými bakteriemi rodu *Rhizobium* a jeho exkrece do půdy. Výhodná je dále jeho resorpce živin, především fosforu i z obtížněji přijatelných forem. Nezanedbatelný není ani jeho vliv na zlepšení fyzikálního stavu půdy. 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, 2015; Smýkal *et al.*, 2012).

3.1.1 Botanický popis

Hrách setý je jednoletá, samosprašná a popínavá bylina. Kořenová soustava se skládá ze silného hlavního kořene a slabých kořenů bočních, na nichž žijí v symbióze hlízkové nitrogenní bakterie rodu *Rhizobium*. Stonek je někdy fasciováný, tj. podélně srostlý, lodyha je dutá, málo se větví, většinou vyššího vzrůstu od 45 do 200 cm. Listy jsou tvořeny třemi páry vejčitých nebo oválných, celokrajných nebo zubatých lístků a vrcholový je přeměněn v úponek. Listy jsou sudozpeřené s úponky a velkými, listovitými, srdčítými palisty až 10 cm dlouhé. Úponky slouží k uchycení k opoře. Květy jsou oboupohlavné. Koruna je složena z charakteristicky utvářených korunních plátků. Pavéza -

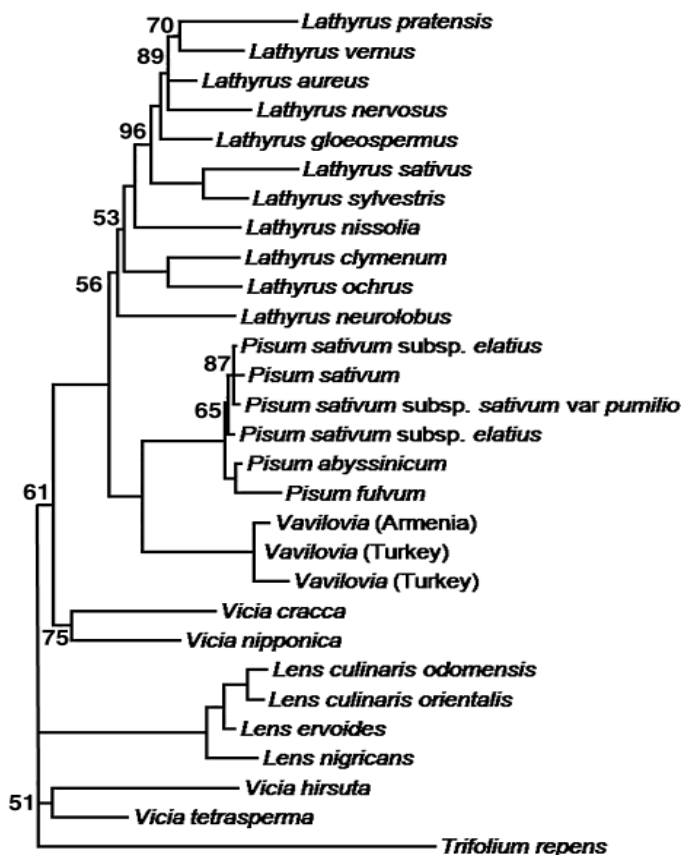
jeden horní korunní plátek je obvejčitý, křídla - dva postranní volné párové lístky, člunek - dva spodní srostlé lístky. Květ je obvykle bílý. Květy vyrůstají v hroznovitých květenstvích v paždí listů. Opylení nastává před otevřením květu a odrůdy hrachu se dělí dle rannosti. Doba květenství je od dubna do září. Lusky jsou 8 – 13 cm dlouhé, podlouhlé, nafouklé, na vrcholu špičaté, mají vnitřní membránu a obsahují 4 – 13 semen, která jsou ve zralosti žlutá nebo zelená (Dolejší, 1987; Troníčková, 1985).

3.1.2 Taxonomické zařazení

Dle fylogenetické klasifikace se rod *Pisum* (hrách) řadí do čeledi *Leguminosae* (syn. *Fabaceae*), podčeledi *Fabeae* (dříve *Vicieae*) (Endo *et al.*, 2008; Käss *et Wink*, 1996; Schafer *et al.* 2012). Podčeleď *Fabaeae* obsahuje některé z nejdůležitějších luštěnin lidstva, jmenovitě asi 160 druhů *Lathyrus* (hrachor) včetně pěstováno *L. sativus*, 5 druhů rodu *Lens* (čočka), 140 druhů *Vicia* (vikev), 2-3 druhy *Pisum* (hrách) a monotypický rod *Vavilovia*. Na základě molekulární studie byl v rámci podčeledi *Fabeae* rod *Pisum* (hrách) geneticky zařazen mezi rody *Vicia* (vikev) a *Lathyrus* (hrachor), s přihlédnutím k úzké spojitosti s monotypickým rodem *Vavilovia* (viz Obrázek 1) (Smýkal *et al.*, 2011; Schafer *et al.* 2012, Mikic' *et al.*, 2013).

V rodu *Pisum* jsou rozlišeny tři druhy hrachu - *P. sativum*, zahrnující kulturní *P. sativum* subsp. *sativum*, který pochází z planého *P. sativum* subsp. *elatius*, planý *P. fulvum* a kulturní *P. abyssinicum*, domestikovaný pravděpodobně nezávisle na *P. sativum* (Maxted *et Ambrose*, 2001, Smýkal *et al.* 2011, 2012, 2015). K odlišení jednotlivých druhů došlo pravděpodobně na základě několika chromozomových přestaveb, které v případě snahy o vzájemnou hybridizaci rostlin zapříčiňují častou genomovou inkompatibilitu. Ta je navíc podpořena existencí jaderně - cytoplazmatického konfliktu mezi geny kódovanými na chloroplastu a chromozomu (Bogdanova, 2009; Jing *et al.*, 2010; Smýkal *et al.*, 2011).

Obrázek 1: Fylogenetický strom podčeledi *Fabeae* na základě cpDNA a ITS sekvencí (převzato z Mikic' *et al.*, 2013)



3.1.3 Původ a výskyt rodu *Pisum*

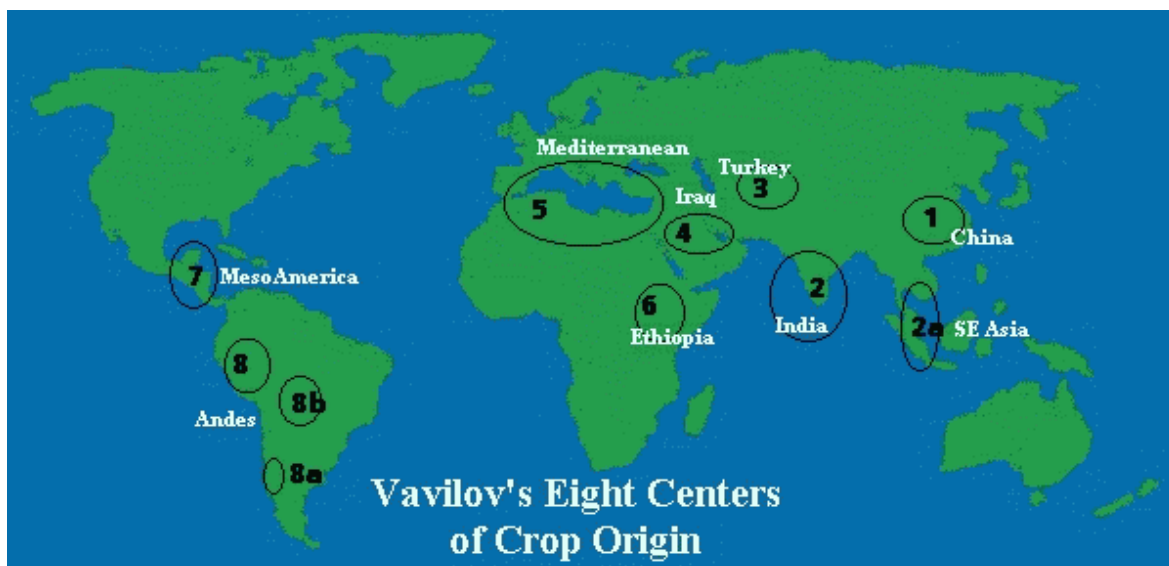
Hrách (*Pisum sativum* L.) patří mezi nejstarší domestikované plodiny. Před začátkem kultivace byl hrách spolu s vikví (*Vicia*), hrachorem (*Lathyrus*) a cizrnou (*Cicer*) pravděpodobně součástí každodenního jídelníčku lovců a sběračů na konci doby ledové na Blízkém východě a v Evropě. Dokládají to nálezy těchto luskovin ve španělské Santa Marii datované do doby před 9 - 12 tisíci lety. Archeologicky rozpoznatelné pozůstatky luskovin se častěji objevují v nálezech z 10. - 9. tisíciletí před naším letopočtem, což je dokonce dříve, jak kulturní obiloviny (Zohary *et* Hopf, 2012).

Proces postupné domestikace planých forem rostlin na kulturní proběhl v geografických místech, centrech původu kulturních rostlin, která definoval ruský botanik N. I. Vavilov (1926). Tato centra původu zahrnují Čínu, severovýchodní Asii, Indii, Turecko, Irák, Středozeší, Etiopii, střední Ameriku a jižní Ameriku (viz Obrázek 2). Jako oblast původu a prvotní domestikace hrachu se pokládá Středozeší a především Blízký

východ. Vzhledem k ranému pěstování hrachu je však obtížné určit přesnou polohu místa původní genetické diverzity a domestikace, především proto, že velká část Středomoří a Blízkého východu byla významně změněna lidskou činností a měnícími se klimatickými podmínkami. Kromě toho, spolehlivé a průkazné údaje často chybí nebo jsou neúplné. Luskoviny pěstované na zrna byly základní plodiny "zemědělské revoluce Starého světa", které usnadnily vytváření trvalých lidských sídel (Smýkal *et al.*, 2012).

Oblast výskytu planých zástupců *P. sativum* se nachází v Íránu, Turecku, Sýrii, Izraeli, severní Africe (Maroku, Alžírsku a Tunisku) a v jižní Evropě (Francii, Itálii, Balkánu a Řecku). Planý hrách setý *P. sativum* subsp. *elatius* se volně v přírodě vyskytuje v jižní Evropě, západní Asii včetně Malé Asie a jeho areál sahá až do severní Afriky. Příbuzný druh *P. fulvum* se vyskytuje jen na Blízkém východě, a to v Jordánsku, Sýrii, Libanonu a Izraeli. *P. abyssinicum* v současnosti roste pouze jako pěstovaný nebo zplanělý druh v Jemenu a Etiopii a byl pravděpodobně domestikován nezávisle na *P. sativum* (Maxted *et* Ambrose, 2001). V průběhu staletí výběru a křížení se vyvinuly tisíce odrůd (genotypů) hrachu, udržované v mnoha genových bankách po celém světě (Smýkal *et al.* 2012).

Obrázek 2: Centra původu kulturních rostlin (N. I. Vavilov, 1926) (převzato z <http://oregonstate.edu/instruct/css/330/two/>)



3.1.4 Domestikace

Vznik zemědělství byl jedním z klíčových bodů v lidské historii a jeho hlavní částí byl vývoj nových forem rostlin, domestikovaných plodin (Meyer *et al.*, 2012; Fuller *et al.*, 2014). Prvotní zemědělci využívali jen malý počet vybraných jedinců, následkem čehož mají nyní pěstované rostliny malou genetickou diverzitu. Tento proces je pojmenován a přirovnáván k tzv. efektu hrdla láhve (angl. bottleneck effect). Obecně se uvádí, že kulturní plodiny průměrně mají 60% genetickou diverzitu ve srovnání se svými planými dnes rostoucími předchůdci, příbuznými druhy. Domestikace divokých rostlin na kulturní plodiny může být brána jako zrychlená evoluce, výsledek jak lidského, tak přírodního výběru (Abbo *et al.*, 2012, 2014).

Proces domestikace vyvolal změny představující adaptaci ke kultivaci a sklizni doprovázené změnami genetickými (Brown, 2010; Lenser *et Theissen*, 2013; Olsen *et Wendel*, 2013; Shi *et Lai*, 2015). Mezi všemi domestikačními znaky, dva zaujímají centrální pozici, neboť byly již od počátku určující pro úspěšnost pěstování. Těmito znaky jsou ztráta dormance semen během kultivace a druhým je ztráta volného šíření semen (Fuller *et Allaby*, 2009). Společný soubor domestikačních znaků byl zjištěn i u nepříbuzných plodin geograficky vzdálených oblastí a byl nazván "domestikačním syndromem" (Hammer, 1984; Harlan, 1992). Tato genetická modifikace vedla v mnoha případech k vysoké či úplné závislosti na člověku, především ztrátě přirozené schopnosti reprodukce.

Z pohledu genetického existuje několik faktorů ovlivňujících proces domestikace jako je fenotypová variabilita daného znaku, počet a rozsah působících genů, dědivost, síla selekce, četnost mutací, míra cizosprášení, velikost populace a míra rekombinace, nebo naopak míra vazby mezi selektovanými geny (Abbo *et al.*, 2014).

3.1.5 Genom hrachu

Z pohledu genomiky představuje podstatnou překážku rozsáhlý genom hrachu. Velikost jaderného genomu hrachu je odhadován na 4,45 Gbp, tvořící haploidní (1C) genom, což odpovídá přibližně 9,09 pg DNA nacházejícím se ve stádiu 2C (Smýkal *et al.*, 2012). Jak ukázaly dříve provedené experimenty sledující kinetiku reasociace DNA či nedávné výzkumy využívající technologii next-generation sequencing (NGS), více jak jeho tři čtvrtiny jsou tvořeny různorodými, převážně středně až vysoce repetitivními,

sekvencemi. Dominantní úlohu přitom hrají retrotranspozony (Macas *et al.*, 2007). Postupně byly pro experimentování nalezeny vhodnější biologické, rostlinné modely. Jedním z nich je tolice druhu *Medicago truncatula* (příbuzná vojtěšky), jejíž genom je 10× menší než hrachu (5×10^8 bp). Tento druh byl vybrán jako modelová luskovina pro sekvenování její kompletní genetické informace (Cook *et al.* 1997, 1999).

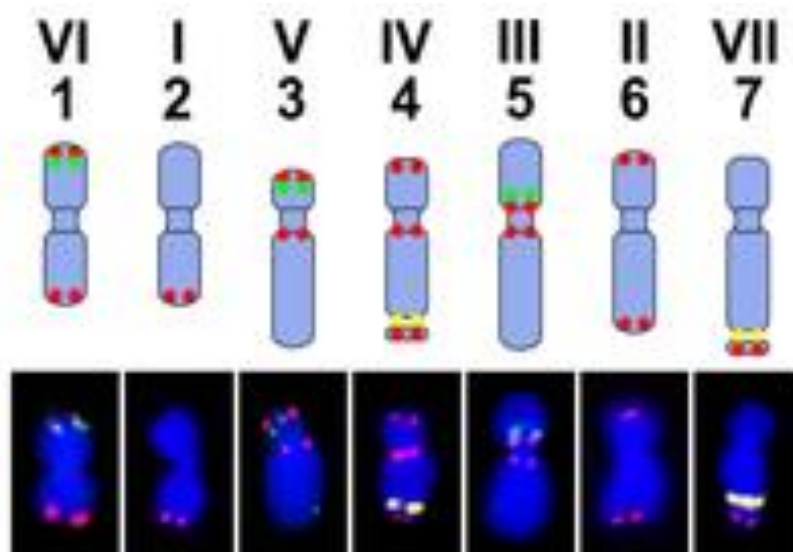
Přestože je hrách objektem genetických studií již půldruhého století, překvapivě málo víme o struktuře jeho genomu, a to jak o karyotypu, tak i o genetické informaci jednotlivých chromozomů. Příčinou je především již zmíněná složitost genomu.

Díky existenci podrobných genetických a cytogenetických map bude možné postupně porovnat jednotlivé úseky genomu a jednotlivé geny evolučně blízkých druhů, např. hrachu, bobu či čočky. Studium genomu hrachu bylo zjednodušeno pomocí identifikace syntení mezi genomy hrachu (*Pisum sativum* L.), tolíce (*Medicago truncatula*) a sóji (*Glycine max*) (Cook *et al.* 1997, 1999).

3.1.6 Karyotyp hrachu

Standardní karyotyp hrachu tvoří sedm párů chromozomů ($2n = 14$), 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 45S rRNA. Chromozomy hrachu jsou číslovány netradičně, čísla chromozomů nekorelují s čísly 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: 1 = VI, 2 = I, 3 = V, 4 = IV, 5 = III, 6 = II, 7 = VII (Neumann *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 1998). Největší chromozom hrachu je označen číslem 5, ačkoliv se pro tento účel konvenčně využívá čísla 1 (Ellis *et Poyser*, 2002; Smýkal *et al.*, 2012). Jediný způsob, jak spolehlivě rozlišit chromozomy, je pomocí fluorescent *in situ* hybridization (FISH) (viz Obrázek 3).

Obrázek 3: Schématické znázornění standardního karyotypu hrachu (převzato ze Smýkal *et al.*, 2012)



Legenda: Horní část obrázku představuje schéma karyotypu hrachu s lokusy pro PisTR-B (červená), 5S rDNA (zelená), 45S rDNA (žlutá). Spodní část obrázku ukazuje stejné lokusy detekované pomocí metody FISH na izolovaných metafázních chromozómech. Měřítko = 5 μ m.

3.2 Semeno hrachu

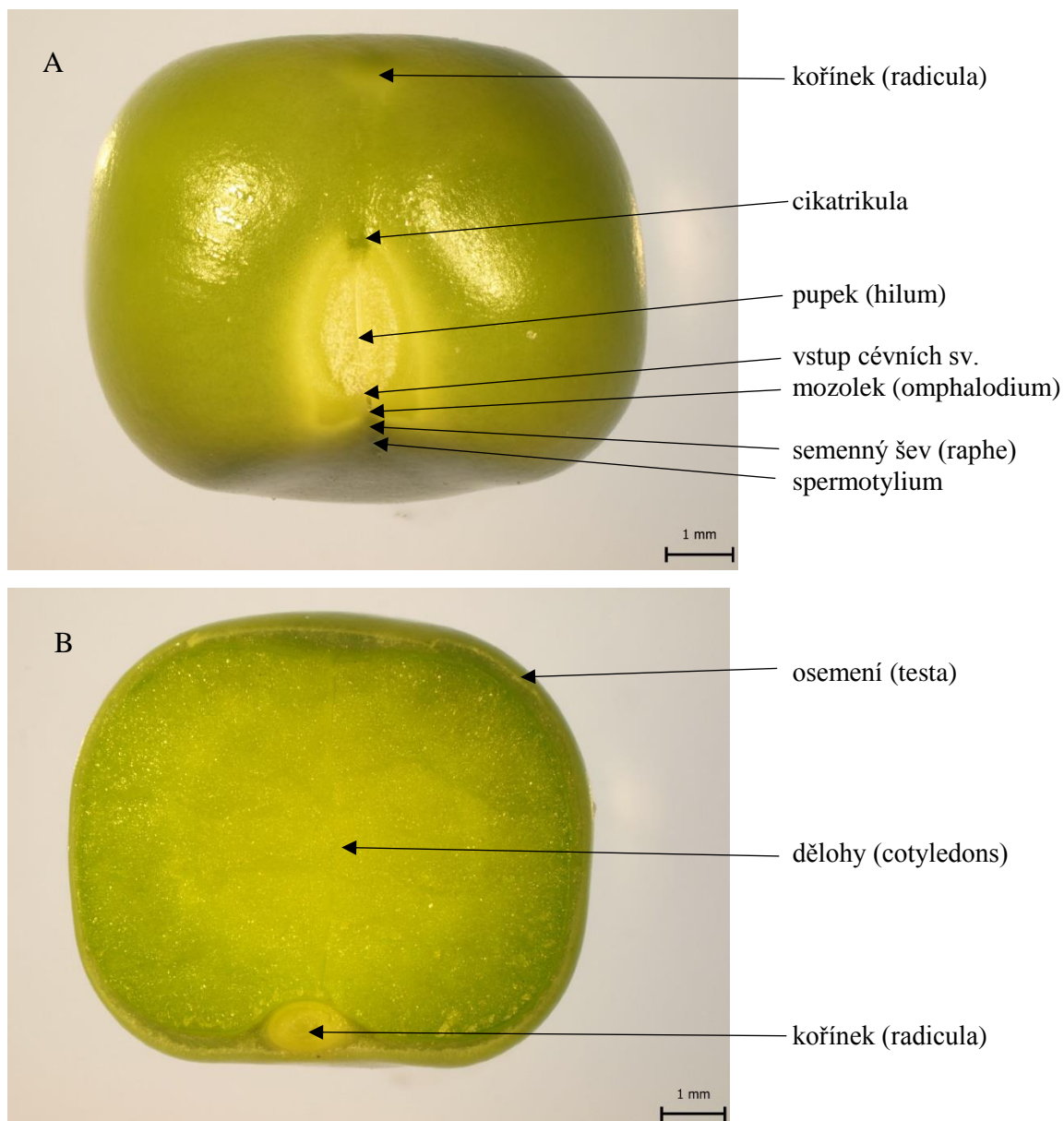
Při vývoji semene probíhá přestavba pletiv vajíčka na pletiva semene. Po oplození se z oplozené vaječné buňky (zygoty) vyvíjí zárodek (embryo), z centrální buňky zárodečného vaku triploidní endosperm, z nucellu perisperm, z vaječných obalů (integumentů) osemení (testa). Na příčném řezu osemením lze rozlišit slizové, sklerenchymatické a pigmentové vrstvy. Povrch osemení může být hladký, lesklý, rýhovaný, štětinatý nebo opatřený háčky či výrůstky, přispívající k zoochorii (rozšiřování semen pomocí zvířat) (Marinos, 1970; Hardman, 1976).

Na povrchu osemení zralého semene můžeme rozlišit malou jizvičku cikatrikulu, která vzniká v místě mikropylárního otvoru vajíčka. V tomto místě je osemení nejtenčí, a proto k němu směřuje špička radikuly embrya. Při klíčení semen jako první vyrůstá kořen a v tomto místě může osemení nejnanežněji roztrhnout. Dále na osemení bývá výrazná, oválná ploška označovaná jako pupek (hilum). Je to místo, kde se oddělilo poutko (funikulus) od semene. U obrácených a příčných vajíček je někdy patrný semenný šev nebo poutec (raphe), což je hrana v místě srůstu poutka s obalem vajíčka. Na bázi poutce je

spermatyrium, což je malý hrbolek v místě chalázy vajíčka (Marinos 1970; Hardman, 1976) (viz Obrázek 4).

Embryo semene dvouděložných rostlin se vždy skládá z plumuly, dvou děloh, hypokotylu a radikuly. Embryo leží v semeni buď rovně, nebo je svinuto či charakteristicky zakřiveno. Endosperm bobovitých semen je v průběhu embryogeneze zcela spotřebován a živiny potřebné pro klíčení semene a vývoj mladé rostliny jsou pak uloženy ve velkých dělohách, vyplňující většinu semene. Nahromaděné látky v pletivech zabezpečují počáteční klíčení rostliny a mnohdy jsou využívány také pro výživu člověka (Marinos 1970; Hardman, 1976).

Obrázek 4: Semeno hrachu (*Pisum sativum* L.) (A) a jeho řez (B) (vlastní)



3.2.1 Nutriční hodnoty semen hrachu

Semena hrachu setého obsahují velké množství sacharidů (9 – 13 %), bílkovin (5 – 7 %) a vlákniny 5 %. Dále obsahuje lipidy (do 1 %) a vitamíny: vitamín C, vitamíny skupiny B (B₅, B₆), vitamín E, niacin a karoten, a významněji jsou zastoupeny následující minerální látky: draslík, vápník, hořčík, železo, fosfor, zinek aj. Hrách setý obsahuje pyridinový alkaloid trigonellin, isoflavonové fytoalexiny (pisatin aj.), neproteinovou aminokyselinu kanavanin, různé aminy, isokvercitrin, pinitol, z kumarinů zejména dafnetin (Steinbach, 1997; Troníčková, 1985). Semena bobovitých rostlin obsahují obtížně stravitelné sacharidy: stachiosy a rafinosy. Tyto polysacharidy se dostávají do střev nestrávené, vážou na sebe vodu. K jejich odbourávání dochází až pomocí střevních bakterií za vzniku oxidu uhličitého a jiných plynů, které způsobují nebezpečné nadýmání (Dahl, 2012).

Luštěniny také obsahují zdraví škodlivé látky lektiny, tj. proteinů, které dokáží s vysokou mírou specifity rozpoznávat a vázat cukry, ať už volné nebo vázané. Lektiny patří mezi antinutriční látky, které inhibují působení amylázy a dalších enzymů trávení. Mohou zapříčinit zpomalení růstu organismu, tím, že ovlivňují metabolismus červených krvinek, snižují hladinu inzulínu v krvi, mohou způsobovat nedostatečné využívání vitamínů, glukózy, tuků a aminokyselin, může docházet také k trávicím poruchám a k hubnutí. Lektiny jsou rozpustné ve vodě, proto je vhodné luštěniny před varem namáčet. Tyto látky přestávají být nebezpečné u namočených luštěnin již po 10-ti minutách varu, na rozdíl od nenamáčených luštěnin, kde se tyto látky zničí až po 90-ti minutách varu (Dahl, 2012).

Vláknina z osemení a buněčných stěn dělohy přispívá ke gastrointestinální funkci a snižuje stravitelnost škrobu. Meziprodukt amylóza přispívá k snížení glykemického indexu a snížení stravitelnosti škrobu. Vitamínová a minerální složka hrachu může hrát důležitou roli v prevenci nemocí souvisejících s nedostatkem speciálně selenu nebo kyseliny listové. Hrášek obsahuje různé látky, které působí jako antinutriční faktory. Patří mezi ně polyfenoly, zejména u zelených hrachů, které mají však také antioxidační a antikarcinogenní účinky, saponiny, které snižují cholesterol v krvi a mají antikarcinogenní účinek, a oligosacharidy galaktózy, které mají příznivé prebiotické účinky v tlustém střevě (Dahl, 2012).

3.2.2 Osemení

Semeno krytosemenných rostlin se vyvíjí z oplodněného vajíčka a v závislosti na fázi vývoje se obvykle skládá z embrya vzniklého oplodněním vaječné buňky pylovou láčkou, z endospermu a z ochranného osemení (testa) odvozeného z vnitřního, vnějšího nebo obou integumentů (Bradford *et* Nonogaki, 2009). Osemení obklopuje embryo a endosperm, plní ochrannou funkci proti fyzickému poškození a poškození ultrafialovým světlem a u některých semen pomáhá při šíření a v oblasti kontroly klíčení. Osemení se skládá ze čtyř vrstev, směrem od povrchu jsou to vosková kutikula, epidermis, hypodermis a vnitřní parenchym (viz Obrázek 5). Vnější buněčné stěny jsou zpravidla pokryty voskovou kutikulou, jsou nepravidelně ztlustělé a nazývají se koncové čepičky. Jejich tvary určují strukturu povrchu osemení (Güneş, 2013). Struktura této vrstvy je obecně spojená s nepropustností pro vodu u tvrdých semen (White, 1908; Hamly, 1932, 1935; Bevilacqua *et al.*, 1989.). Kutikula tvoří souvislou vrstvu pokrývající celé semeno s výjimkou pupku (hilu) a je považována za první překážku bobtnání (imbibice) semen.

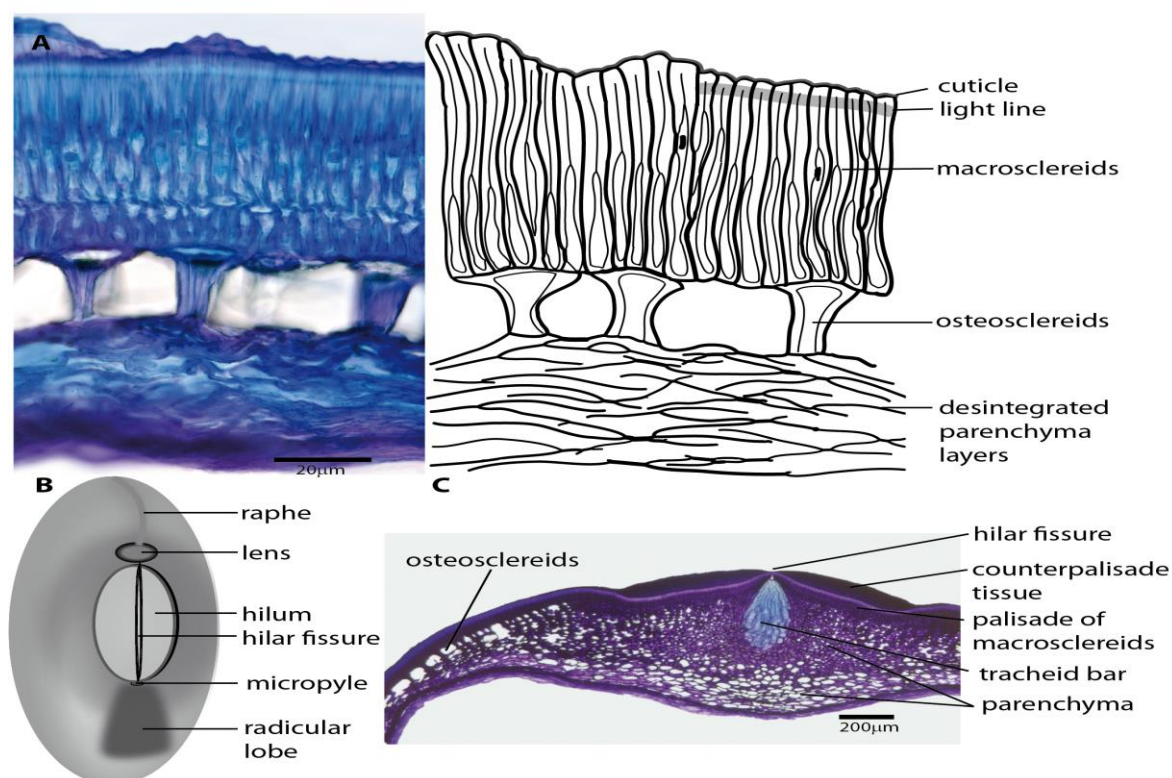
Epidermis tvoří jednu vrstvu palisádových radiálně protáhlých sklerenchymatických buněk nazývaných Malpighiho buňky s nerovnoměrně ztlustělými buněčnými stěnami (White, 1908; Spurný, 1963; Ma *et al.*, 2004). Sklereidní vrstva je oblast makrosklereidních buněčných stěn oddělujících koncové čepičky od bazální části. Hraniční čára je označována jako „světelná čára“ nebo *linea lucida*. Její název je odvozen od místních rozdílů v indexu lomu, pravděpodobně jako důsledek různé depozice polysacharidů a impregnací (Hamly, 1935; Harris, 1983; Bhalla *et* Slattery, 1984; Bevilacqua *et al.*, 1987). Lumen makrosklereidů bývá nepravidelný (viz Obrázek 5).

Subepidermální vrstva buněk se člení na osteosklereidy (buňky ve tvaru kosti), také nazývané jako sloupcovité nebo pilířovité buňky, které mají ztloustlou sekundární buněčnou stěnu, a lagenosklereidy (buňky ve tvaru baněk). Tato vrstva obsahuje vzduchem plněné mezibuněčné prostory vyplývající z formování buněk během diferenciací osemení a masivní depozice buněčných stěn ve střední části (Harris, 1983; Miller *et al.*, 2010). V místě a okolí pupku vrstva osteosklereidů splývá se silnostěnným hvězdovitým parenchymem (viz Obrázek 5).

Nejvnitřnější část osemení se skládá z parenchymatických buněk, které jsou protáhlé v tangenciálním směru a vytváří vzduchem naplněné mezibuněčné prostory. Často mají 5 - 12 vrstev s vnitřní vrstvou v přímém kontaktu s endospermem (Hamly, 1932; 1935). Někteří autoři nazývají parenchymatickou oblast "živnou vrstvou" vzhledem ke své

funkci v průběhu vývoje embrya (van Dongen *et al.*, 2003). Cévní systémy osemení jsou zabudovány do parenchymu a jejich struktury se mezi luštěninami liší. Některé druhy mají rozsáhlé vaskulární systémy, které tvoří sítě skrz celé osemení (např. fazole, Offler *et al.*, 1984; sója, Thorne, 1981). Zatímco jiné druhy mají relativně jednoduché cévní systémy pouze s jediným cévním svazkem a dvěma bočními větvemi (např. hrách, Spurný, 1963; Hardman, 1976; bob, Offler *et al.*, 1989). Během zrání osemení parenchymatické buňky ztrácejí protoplast a rozpadají se na fragmenty.

Obrázek 5: Struktura osemení bobovitých (*Fabaceae*) (převzato ze Smýkal *et al.*, 2014)



Legenda: A - příčný řez osemením planého hrachu *Pisum sativum* subsp. *elatius*, D - schématicky; B - zobecněné schéma semene bobovitých (*Fabaceae*); C - příčný řez osemením *Pisum sativum* v oblasti hilu.

3.2.3 Dormance semene

Dormance semene je hlavní fyziologickou adaptací na heterogenitu životního prostředí, která ovlivňuje přirozenou populační dynamiku (Bewley *et al.*, 2013). Dormance poskytuje strategii rozdělení klíčení v čase, aby se snížilo riziko úmrtí rostlin a případné vymírání druhů v nepříznivém období. Dormance byla definována jako: "*vlastnost semene, stupeň určující jaké podmínky by měly být splněny, aby semeno vyklíčilo*" (Vleeshouwers *et*

al., 1995). Tato strategie je regulována různými faktory, jako je heterogenita semen na úrovni jednotlivých rostlin (Matilla *et al.*, 2005) závislá na věku a výživě mateřské rostliny během zrání semen, poloze semen na mateřské rostlině, velikosti a tvaru semen, době sklizně semen a době jejich skladování (Probert, 2000). Přes všechny tyto variace, dormance má jasný genetický základ (Graeber *et al.*, 2012).

Klasický koncept dormance semen formuloval Harper (1957) rozlišující tři typy. **Primární vrozenou dormanci** mají rostliny, jejichž semena jsou neklíčivá ihned po dozrání na mateřské rostlině. K ukončení tohoto typu dormance je třeba vystavit semena po určitou dobu zvláštním podmínkám, které daný druh k překonání dormance potřebuje. Semena mnohých druhů potřebují k vyklíčení zvláštní podnět, bez něhož nevyklíčí, ani když dormance již skončila. Bývá to často vystavení světlu nebo pravidelnému střídání teploty, k jakému dochází v povrchových vrstvách půdy během dne a noci.

Sekundární dormance vzniká u klíčivých semen ležících v půdě jako reakce na určité, většinou nepříznivé, podmínky. Ve stavu vnucené dormance je semeno udržováno působením vnějších podmínek, když tyto podmínky pominou, dojde brzy i k ukončení dormance.

Indukovaná dormance je stav fyziologicky podobný primární dormanci. Sekundárně dormantní semena nevyklíčí ihned po nástupu příznivých podmínek, ale k ukončení dormance potřebují projít obdobím podmínek vhodných pro ukončení dormance.

Dormantní třídy byly definovány Nikolaevem (1969, 1977) a nedávno přezkoumány Finch-Savagem a Leubner-Metzgerem (2006).

Fyziologická dormance, nejrozšířenější forma, pravděpodobně zahrnuje metabolismus abscisové kyseliny (ABA) a giberelinu (GA). Tyto růstové hormony závisí na vnějších podmínkách, jako je světlo, teplo a vlhkost. Předpokládá se, že ABA indukuje dormanci, kdežto GA jsou zodpovědné za počátek klíčení. Pokud je semeno slabě dormantní, a obsahuje tedy nízkou dávku ABA, vyžaduje ke klíčení i nízkou dávku GA. Naopak pokud bylo v semeni průběhu jeho vývoje produkováno větší množství ABA, ke klíčení je zapotřebí rovněž větší množství GA (Baskin *et Baskin*, 2004). ABA mimo jiné zabraňuje předčasnému klíčení semene během jeho vývoje; stejné účinky má i osmotický tlak okolního prostředí nebo jejich kombinace (Berry *et Bewley*, 1992). Hormonální regulaci dormance také ovlivňuje ethylen. U mnoha rostlinných druhů bylo prokázáno, že ukončuje dormanci a stimuluje klíčení (Kępczynski *et al.*, 1997). Ethylen interaguje s ABA a patrně snižuje citlivost semene k ní (Baskina *et Baskin*, 2004).

Morfologická dormance se vztahuje na semena, která mají nevyvinuté embryo a vyžadují čas na růst a klíčení. Za příznivých podmínek trvá toto období několik dnů, nejvýše dva týdny. Poté semena klíčí do měsíce (Baskin *et* Baskin, 2004)

Morfo-fyziologická dormance se nachází u semen, které mají málo vyvinutá embryo a navíc mají fyziologické podmínky pro jejich dormanci. Tato semena vyžadují pro ukončení dormance skarifikaci, nebo aplikaci GA a podstatně delší dobu pro vývin (Baskin *et* Baskin, 2004).

Fyzická dormance zahrnuje vývoj vrstev palisádových buněk osemení nepropustného pro vodu, tzv. tvrdosemennost (Baskin *et al.*, 2000). Tato nepropustnost je porušena až mechanickou nebo chemickou skarifikací (Finch-Savage *et al.*, 2006). Tzv. tvrdosemennost je typický jev u většiny luskovin. Tento atribut poskytuje lepší možnosti pro přežití v přírodě. Přítomnost tvrdých semen nejen že brání rychlému a jednotnému klíčení, jak je požadováno pro pěstování, ale také prodlužuje dobu vyklíčení (Quinlivan, 1971; Maas, 2005). Tento typ dormance je nalezen nejméně u 17 rostlinných rodin, včetně agronomicky významných rodin jako je *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Cannaceae*, *Geraniaceae*, a *Convolvulaceae* (Baskin *et al.*, 2000) a je přítomen u planých předků kultivovaných luskovin (Dueberrn de Sousa *et* Marcos-Filho, 2001; Zohary *et* Hopf, 2012; Abbo *et al.*, 2014).

Kombinační dormance se nachází u pro vodu nepropustných semen v kombinaci s fyziologickou dormancí (Baskin *et* Baskin, 2004).

3.2.4 Klíčení semen

Klíčení semen začíná za příznivých podmínek, při dostatku vody pro bobtnání semene, vzduchu pro dýchání klíčící rostliny, světla a tepla (Finch-Savage *et* Leubner-Metzger, 2006; Smýkal *et al.*, 2014). Během bobtnání se zvyšuje obsah vody, voda je pohlcována tkáněmi semene a současně dochází k předávání zásobních látek meristému. Během klíčení semen dochází k růstu zárodku a jeho přeměně v autotrofní rostlinu. Výživa zárodku je zajišťována z děloh nebo jiných zásobních pletiv semene. Nejdříve začíná růst kořínek. Pokud prorazí osemením, semeno je naklíčené. U *Fabaceae* dochází, jak k hypogeickému klíčení, kdy dělohy zůstávají uzavřeny v semeni pod zemí, předávají látky meristému a postupně zasychají (hrách), tak k epigeickému klíčení, kdy z horní části kořínku roste hypokotyl, který se narovná a vyzvedává semeno nad půdu (fazol). Osemením prorůstá první nadděložní článek - epikotyl, z něž vyrůstá prýt, mluvíme

o klíčící rostlině. Je pozorována zesílená činnost hydrolytických a oxidačních procesů. Po nabobtnání semene se zvyšuje intenzita dýchání, dochází k velké spotřebě energie a snižuje se obsah sušiny v semenu. Dochází k rozpadu polymerních sloučenin bílkovin, polysacharidů a tuků, kterou jsou později využity k biosyntéze při tvorbě buněk klíčků a později kořínků. Ke změnám dochází také v syntéze nukleových kyselin, hlavně RNA (Bewley, 2006).

Interakce mechanismů dormance se současnými podmínkami prostředí určují, jaký podíl semen v semenné bance bude klíčit v daném čase. Meteorologické a půdní fyzikální vlastnosti vytváří mikroklima vnímané semenem.

Po vodě je nejdůležitějším faktorem pro klíčení teplota. U teploty rozlišujeme teplotní minimum, optimum a maximum. Na teplotě klíčení závisí délka trvání klíčení (Bewley, 2006). Minimální teploty pro klíčení umožňují zahájit biochemické a fyziologické pochody klíčení. Semena hrachu nebo bobu mohou klíčit při nízkých teplotách těsně nad 0 °C.

Světlo hraje roli v počátku klíčení kvůli fytochromovému mechanismus. Pro některé druhy je to podmínkou pro klíčení a v některých případech klíčení urychluje.

Jednou z nezbytných podmínek pro klíčení je kyslík, bez něhož by semena nevyklíčila. Kyslík nebo naopak oxid uhličitý indikují přítomnost případných kompetitorů v okolí. Při zvýšeném hromadění oxidu uhličitého v prostředí dochází k brzdění klíčení. Pokud je jeho obsah nad 35 %, semena hynou. To je jeden z důvodů, proč nemá být semeno během klíčení trvale namočeno ve vodě (Bewley, 2006).

Vliv na klíčení semen mohou mít i různé chemické látky. Působení chemických látek v nižších koncentracích semena podráždí a ve vyšších koncentracích je vždy poškodí. Proto musí být zachována opatrnost při desinfekci semen. Nepříznivý účinek má zvýšený obsah solí ve vodě (Bewley, 2006).

3.2.5 Genomické a transkriptomické analýzy vývoje semen bobovitých (*Fabaceae*)

Transkriptomická analýza je běžná technika ve funkční genomice a molekulární biologii. Pokrok v bioanalytických metodách a postupně se snižující cena vedly ke vzniku rozsáhlých transkriptomických datasetů, které zahrnují jak různé tkáně a orgány, tak i vývojová stádia (Junker *et al.*, 2012).

Efektivní metodou pro celogenomovou transkriptomickou analýzu je RNA sekvenování (RNA-Seq) (Sudheesh *et al.*, 2015) založené na next-generation sequencing

(NGS). Ukázalo se, že je vhodnější než dříve používané metody založené na hybridizaci (např. microarrays), neboť zohledňuje biologicky důležité izoformy a identifikuje geneticky odlišné varianty, jako třeba alternativní alely (Zhao *et al.*, 2014). RNA-Seq bylo použito pro studium změn v genové expresi během vývoje semene u *Arabidopsis* (Le *et al.*, 2010), rýže (Xue *et al.*, 2012), sóji (Severin *et al.*, 2010, Jones *et al.*, 2013), *Medicago truncatula* (Gallardo *et al.*, 2006), cizrny (Pradhan *et al.*, 2014) a hrachu (Alves-Carvalho, 2015).

Dřívější studie změn v expresi genů během vývoje semene na *M. truncatula* zjistili, že je celkem 15 786 genů odlišně exprimováno (Benedito *et al.*, 2008). Více než 45 % těchto genů bylo zařazeno do metabolických drah sacharidů, aminokyselin, lipidů a sekundárních metabolitů, včetně fytohormonů typu kyseliny abscisové (ABA) a gibberelové (GA), což naznačuje, že vývoj semene je řízen metabolismem. Je identifikováno několik transkripčních faktorů, které jsou významně zapojeny do procesu vývoje semene, jako je B3, MYB, bHLH a AP2 (Sreenivasulu *et al.*, 2013). Všechny tyto výsledky ukazují složitost regulace vývoje semene. Alves-Carvalho (2015) zveřejnil RNA-Seq data hrachu v databázi Unigene obsahující 20 cDNA knihoven, které zahrnují různé tkáně odebírané při různých vývojových stádiích a pěstovány v kontrastních výživových podmínkách.

Podobné analýzy byly provedeny i na sóji. Redekar *et al.* (2015) provedli komplexní srovnání genové exprese u normálních a low phytic acid (*lpa*) mutantních semen sóji (*Glycine max*) za použití RNA-Seq. Mutantní rostliny obsahují nižší hladinu kyseliny fytové, mj. přispívají k redukci znečištění fosfáty. Mutace jsou přímo nebo nepřímo spojeny s biosyntetickou dráhou kyseliny fytové a s jejím ukládáním v semenech. Po osekvenování třiceti knihoven bylo identifikováno 4235 rozdílně exprimovaných genů, které zahrnovaly i 512 transkripčních faktorů. Ukázalo se, že *lpa* mutace hrají roli v navozování a potlačování obranných reakcí rostliny během časných a pozdních fází vývoje semen.

Pang *et al.* (2008) provedli analýzu exprese transkripčních faktorů *transparent testa2* (TT2) MYB. Analýza na mikročipu ukázala, že TT2 indukuje expresi genů pro biosyntetickou dráhu flavonoidů a proanthokyanidinů, transkripčních faktorů a také množství genů neznámé funkce. Pomocí druhého mikročipu byly identifikovány geny preferenčně exprimované v osemeni *Medicago truncatula*. Srovnáním takto získaných dat určili do té doby neznámé klíčové geny některých kroků v biosyntetické dráze PA a jejich akumulaci. Jeden z těchto genů byl gen pro glukosyltransferázu (UGT72L1).

Transkriptomické analýzy byly provedeny také na semenech hrachu. Chen *et al.* (2013) se zabývali stárnutím semen hrachu, konkrétněji vztahem mezi životaschopností semen, genovou expresí během umělého stárnutí semen hrachu. Provedli rozsáhlou transkriptomickou analýzu pomocí mikročipů (microarrays), doplněnou o qRT-PCR analýzu vybraných genů a víceúrovňovou analýzu antioxidantu glutathionu. Výzkum ukázal, že u stárnutí těchto semen byly na molekulární úrovni klíčové změny v transkripci, které ovlivňovaly rozvoj programované buněčné smrti a snížení antioxidantních schopností, což vedlo k nižší životaschopnosti semen.

Chai *et al.* (2016) provedli screening velkého počtu *Tnt1* retrotransposonových linií *Medicago truncatula*. Mikroskopickým pozorováním bylo zjištěno, že mutantní fenotyp byl způsoben dysfunkční palisádovou kutikulou osemení. Chemická analýza ukázala rozdíly v lipidovém obsahu mezi osemením planého a mutantního typu. Genetická a molekulární analýza odhalila, že gen *KNOX4* z třídy II *KNOTTED-like* homeoboxů (*KNOXII*) je zodpovědný za ztrátu fyzické dormance u mutantních semen. V jeho důsledku je změněna exprese *P540* cytochromoxidázy a také složení hydroxylovaných mastných kyselin, tak jak to odpovídá recentním datům srovnávající planý a kulturní hrách (Hradilová *et al.*, 2017).

Liu *et al.* (2015) provedli komparativní transkriptomickou analýzu polního a zahradního hrachu. Pomocí RNA-Seq získali 18,7 G dat a objevili 459 a 801 genů odlišně exprimovaných v různých fázích vývoje semene hrachu. Dále zjistili, že obsah rozpustných cukrů a škrobu v pozdějším stádiu vývoje semene negativně koreluje s expresí genů podílejících se na jejich metabolismu.

3.3 Flavonoidy

3.3.1 Vztah mezi dormancí semen a proanthokyanidiny

Flavonoidy jsou sekundární metabolity široce zastoupené u vyšších rostlin a patří mezi ně flavonoly, anthokyaniny a proanthokyanidiny (PA). Flavonoidy jsou syntetizovány fenylypropanovou dráhou (Liu *et al.*, 2014), biosyntézou malonyl-Coa a fenylalaninu. Deriváty flavonoidů určují pigmentaci vegetativních orgánů a semen (Lepiniec *et al.*, 2006) a chrání rostlinu před poškozením (Debeaujon *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2013). Flavonoly chrání rostliny před UV zářením (Li *et al.*, 1993) a dobarvují květy a listy

(Bloor, 1997). Anthokyaniny jsou pigmenty, které jsou z části zodpovědné za červenou, fialovou a modrou barvu květů, listů, plodů a semen (Liu *et al.*, 2014) a chrání rostliny a semena před UV zářením (Chapple *et al.*, 1994).

Katechin a epikatechin jsou flavan-3-ol monomery (Pang *et al.*, 2008) jejich oligo- a polymery tvoří proanthokyanidiny (PA) nebo také kondenzované taniny, které jsou významně zastoupeny v osemení (Pang *et al.*, 2008; Dixon *et al.*, 2005). Proanthokyanidiny jsou rozpustné a bezbarvé, hromadí se v květech, listech a osemení a jsou zemědělsky a ekologicky důležité pro snížení nadýmání u přežvýkavců. PA jsou také známé jako chemický základ vysoce polymerních a nerozpustných tříslovin, polymerních flavonoidů, které rostliny produkují jako sekundární metabolity ve vnitřním integumentu nebo endotelu (Winkel-Shirley, 2001). Oxidázy (Marbach *et Mayer*, 1974) se podílejí na oxidaci rozpustných PA za vzniku nerozpustných PA, které chrání semeno proti biotickým a abiotickým stresům (Pourcel *et al.*, 2005) a udělují semenům hnědou barvu (Liu *et al.*, 2014). U zvířat působí proti nadýmání, protože se váží na proteiny, zpomalují jejich kvašení a snižují tak tvorbu metanu.

Nejlépe studované proanthokyanidiny u *Medicago truncatula* jsou složeny převážně z epikatechinu nebo katechinu (Dueñas *et al.*, 2003). Epikatechin vykazoval významně pozitivní vztah při vzniku tvrdosemennosti a s tím související dormance a klíčivosti semen. Epikatechin má vlastnosti autooxidace s kyslíkem. Epikatechin pravděpodobně brání vstupu kyslíku a chrání tak embryo proti oxidaci, proto jsou semena schopna udržet si vitalitu. Při pomalé a trvalé oxidaci kyslíku na povrchu semene, se snižovala jeho tvrdosemennost a docházelo tak ke klíčení (Zhou *et al.*, 2010).

Fyzikální typ dormance semen, tzv. tvrdosemennost je adaptivní vlastnost rostlin, které přežívají v nepříznivých podmínkách. Naopak je to negativní vlastnost z hlediska potravinářského využití, kdy snížení příjmu vody vede k prodloužení doby vaření (Zhou *et al.*, 2010). Lze ji narušit mechanicky, např. vymrznutím a roztáním, střídáním teplot, či chemicky, např. v žaludku působením žaludečních kyselin.

3.3.2 Genetická regulace biosyntézy a akumulace flavonoidů

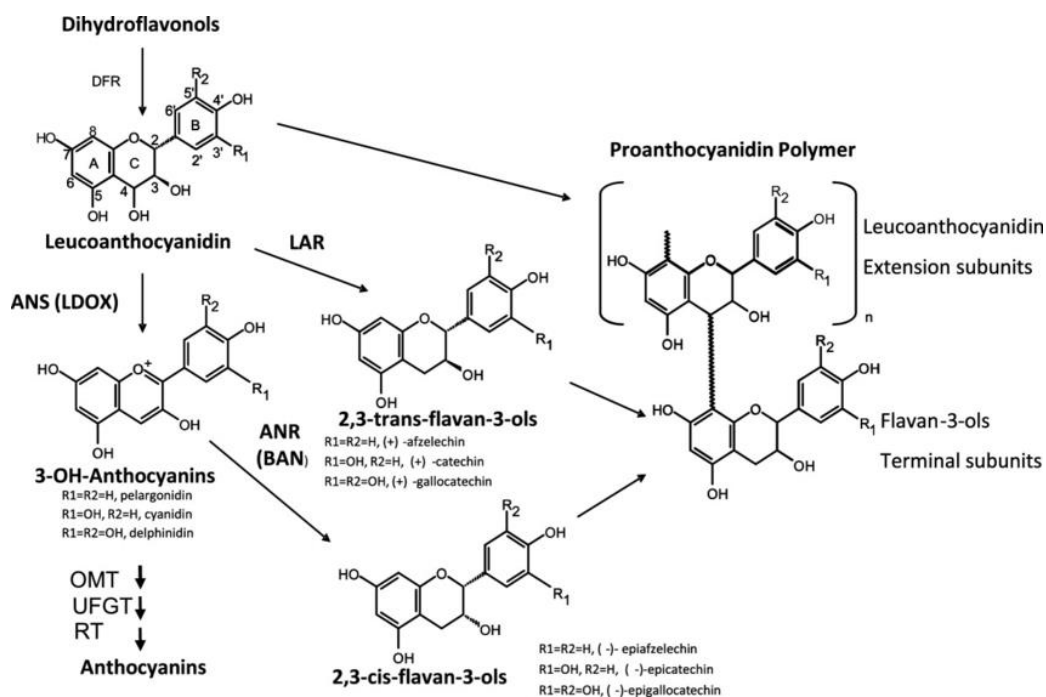
Zjistilo se, že anthokyanidinové a proanthokyanidinové biosyntetické procesy ovlivňují dormanci semen *Arabidopsis*, indikující úlohu pigmentů v tomto procesu (Debeaujon *et al.*, 2000). Čím nižší je obsah fenolických látek v osemení, tím se může snižovat i pigmentace a tvrdost semen, což je také typické v průběhu procesu domestikace

(Plitmann *et al.* 1989). Jak se osemení u *Arabidopsis* vyvíjí, hromadí se flavonoidy a slizové látky (angl. mucilage).

Biosyntetická dráha proanthokyanidinů začíná na vnější straně membrány endoplasmatického retikula, pokračuje v cytosolu a končí polymerizací ve vakuole, kam se dostávají monomery flavon-3-oly pomocí MATE transportérů lokalizovaných v tonoplastu (Zhao *et al.* 2009). Některé polymery dále vstupují do buněčné stěny. Pomocí mutantů *Arabidopsis* s průhledným osemením (tt) byla objevena biosyntéza proanthokyanidinů a její regulace (Lepiniec *et al.*, 2006) a geny, které ovlivňují metabolismus flavonoidů (Bradford *et al.* Nonogaki, 2009).

Dráha začíná postupnou přeměnou fenylalaninu až na naringenin, který je hydroxylován. Poloha hydroxylové skupiny B-prstence naringenu pak zapříčiňuje diverzitu výsledných proanthokyanidinů. Její umístění na naringenu určují tyto enzymy: cytochromy P450, flavonoid-3'-hydroxyláza (F3'H) a flavonoid-3'5'-hydroxyláza (F3'5'H). Dále probíhají reakce katalyzované flavanon-3-hydroxylázou (F3H) a dihydroflavonal-4-reduktázou (DFR), které dávají vznik flavan-3,4-diolům, neboli leukoanthokyanidinům. Leukoanthokyanidin je látka, z které vzniká 3-OH-anthokyanidin pomocí anthokyanidin syntázy (ANS) (Liu *et al.*, 2014) a katechin pomocí leukoanthokyanidin reduktázy (LAR) (Tanner *et al.*, 2003). Ze 3-OH-anthokyanidinu vzniká epikatechin pomocí anthokyan-reduktázy (ANR) (Xie *et al.*, 2003; Baudry *et al.*, 2004) nebo anthokyanidin glykosylací pomocí anthocyanidin/flavonol glukosyltransferázy (UFGT) (Pang *et al.*, 2008). Epikatechin může být glykosylován uridindifosfát glukosyltransferázou (UGT72L1) na epikatechin-3'-O-glukosid (Pang *et al.*, 2008), Takto glykosylovaný epikatechin (Pang *et al.*, 2008) je přenesen přes tonoplast MATE1 transportérem do vakuoly (Zhao *et al.* Dixon, 2009). Neglykosylovaný epikatechin se taktéž může přenášet do vakuoly pomocí AHA10 transportéru (Zhao *et al.* Dixon 2009). Anthokyanidin je přenesen do vakuoly MATE2 transportérem (Lepiniec *et al.*, 2006, Pang *et al.*, 2013). U epikatechinu a epikatechin-3'-O-glukosidu následuje enzymatická nebo neenzymatická polymerizace, jejíž mechanismus není znám, ale předpokládá se, že probíhá ve vakuole. Enzymaticky probíhá polymerizace pravděpodobně pomocí lakázy (*laccase-like 14*), enzymu kódovaného *TT10* genem u *Arabidopsis* (Pourcel *et al.*, 2005) na rozpustné proanthokyanidiny. Popřípadě vznikají epikatechin dimerní sloučeniny. Epikatechin-3'-O-glukosidu oxiduje na nerozpustný proanthokyanidin pravděpodobně působením apoplastické polyfenoloxidázy (Pang *et al.*, 2013) (viz Obrázek 6).

Obrázek 6: Biosyntetická dráha proanthokyanidinů (převzato z Liu *et al.*, 2014)



Legenda: DFR - dihydroflavonol 4-reduktáza, ANS - anthokyanidin syntáza, ANR - anthokyanidin reduktáza, LAR - leukoanthokyanidin reduktáza, OMT - O-metyltransferáza, UFGT - UDP-glukóza anthokyanidin/flavonol 3-O-glukosyltransferáza, RT - rhamnosyltransferáza

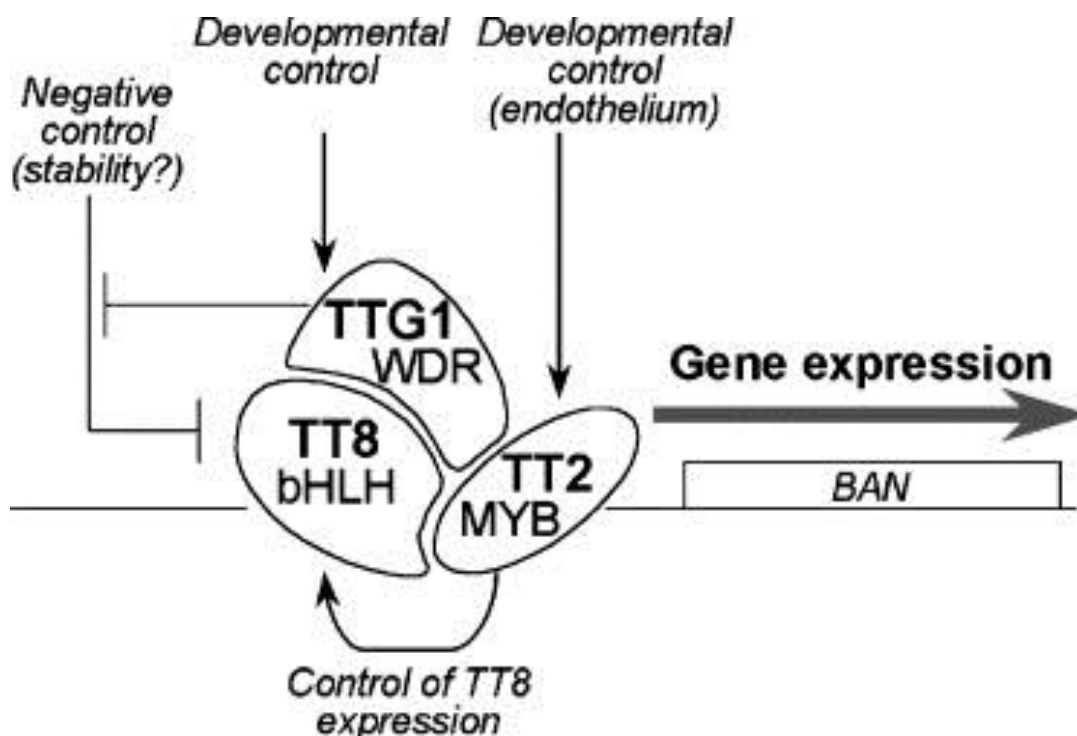
BANYLUS (BAN) gen kóduje anthokyanidin reduktázu (ANR), která řídí větvení anthokyanidinů, společný prekurzor anthokyanů a proanthokyanidinů (Xie *et al.*, 2003). RNA lokalizační experimenty ukázaly, že BAN je přechodně exprimován v semenech konkrétně v endotelu od fertilizace až po pre-globulární fázi (Devic *et al.*, 1999). U *ban* mutantů bez funkčního genu BAN, akumulace anthokyaninů v osemeni již není omezena na pozdější fázi vývoje semene, ale vyskytuje se i v endotelu během časně fáze morfogeneze (Albert *et al.*, 1997). Na regulaci transkripce anthokyanidin reduktázy (ANR) v osemeni *Arabidopsis thaliana* se podílí komplex tří transkripčních faktorů MYB (TT2), bHLH (TT8) a WD40 (TTG1) (Baudry *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2014) (viz Obrázek 7). TT2, TT8 a TTG1 mohou přímo aktivovat BAN gen, ale TTG1 působí především prostřednictvím partnera bHLH (tj. TT8 nebo příbuzné proteiny).

TRANSPARENT TESTA 2 transkripční faktor (TT2) patří do rodiny MYB proteinů (Pang *et al.*, 2008) a indukuje expresi UGT72L1 a ANR genů (Zhao a Dixon, 2009). Nejvyšší aktivita byla pozorována v osemeni (Pang *et al.*, 2008). Inzertní mutanti TT2 u *A. thaliana* ztrácí schopnost akumulace PA v osemeni (Nesi *et al.*, 2001). TT2 nemůže být nahrazen jiným souvisejícím MYB proteinem k aktivaci BAN u *A. thaliana*.

TRANSPARENT TESTA 8 transkripční faktor (TT8) patří do rodiny bHLH (basic helix-loop-helix) (Baudry *et al.*, 2006). TT8 je hlavní regulátor exprese flavonoidových genů a genů pro slizový obal semen u *A. thaliana*. V semenech pozitivně reguluje BANYLUS, ANR, akumulaci PA a tvorbu slizu. Ve vegetativních částech rostlin reguluje akumulaci anthokyanů (Baudry *et al.*, 2006). Inzercí v genu pro MYB (*tt2* mutant) transkripční faktor nedochází ke snížení mRNA TT8 v semenech. Wdr (*ttg1*) mutant zcela vyřazuje expresi TT8 v semenech a snižuje transkript ve vegetativních částech rostliny (Baudry *et al.*, 2006). Inzerce v genu pro TT8 odhalila, že v některých typech buněk dochází k autoregulaci (Baudry *et al.*, 2006). Dále bylo prokázáno, že ve vnějším integumentu osemení, TT8 a EGL3 redundantně regulují biosyntézu slizového obalu (Zhang *et al.*, 2003) a EGL3 je také zapojen do regulace TT8 v těchto buňkách (Baudry *et al.*, 2006).

TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1) patří mezi WD40 a kontroluje bHLH a MYB geny (Baudry *et al.*, 2006)

Obrázek 7: Komplex transkripčních faktorů TT2 (MYB), TT8 (bHLH) a TTG1 (WD40) (převzato z Baudry *et al.*, 2004)



Legenda: TT2, TT8 a TTG1 tvoří transkripční komplex schopný aktivovat expresi BAN. TT2 je zodpovědný za specifické rozpoznání promotoru a kontroluje expresi TT8. TTG1 reguluje aktivitu proteinů prostřednictvím negativní kontroly TT8.

3.4 Vybrané geny aktivní při vývoji osemení

3.4.1 Mendelův A lokus hrachu (bHLH transkripční faktor)

bHLH (basic helix-loop-helix) proteiny jsou super-rodinou transkripčních faktorů, které se váží jako dimery na DNA a regulují transkripci. Již Mendelem elegantně využitý A lokus je homolog bHLH transkripčního faktoru. MYB a basic helix-loop-helix (bHLH) transkripční faktory a WD40 proteiny tvoří komplexy regulující anthokyanidin syntázu (ANS) a anthokyanidin reduktázu (ANR), které dále regulují anthokyanidinovou a proanthokyanidinovou (PA) biosyntézu. Předchozí výzkumy ukázali, že bílý květ (recesivní alela *a*) je způsoben narušením tohoto regulačního genu.

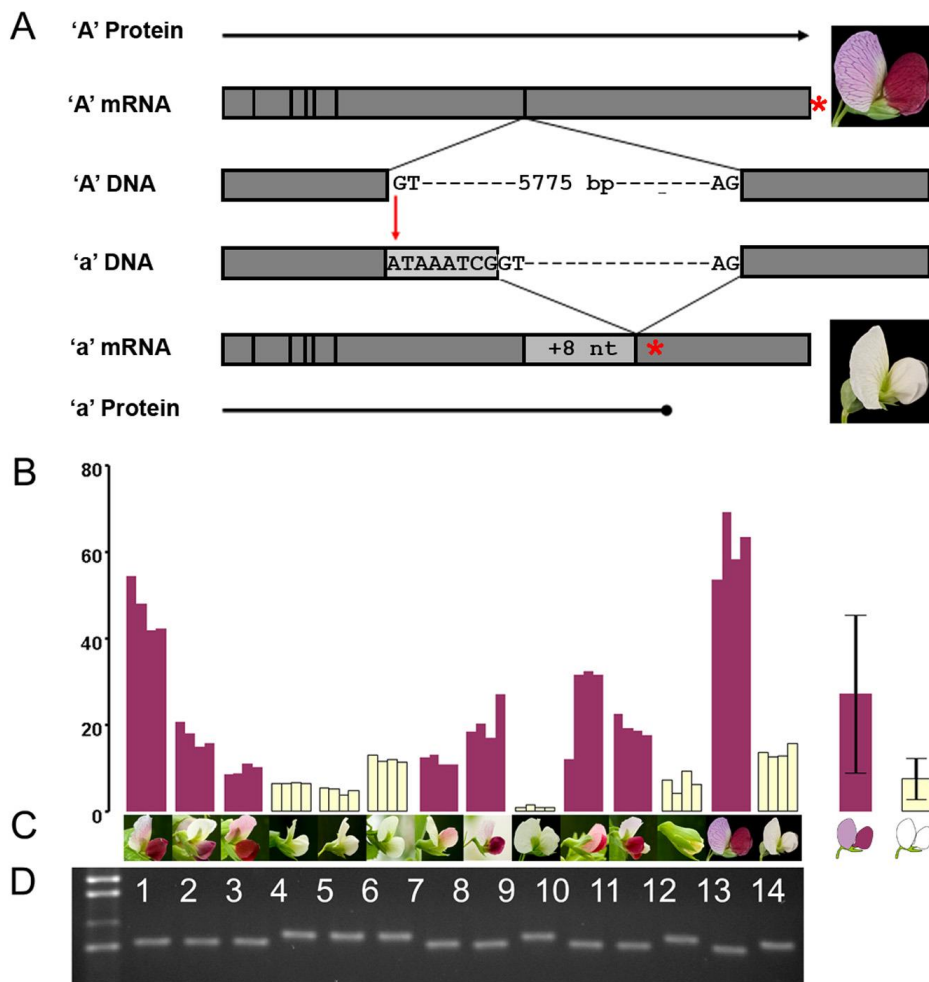
U hrachu, stejně jako u mnoha dalších rostlin, jsou červené, fialové nebo modré pigmentace způsobeny akumulací anthokyanových sloučenin, sloučenin odvozených od fenylalaninu. Mutace v (*a*) genu ruší akumulaci anthokyaninů v celé rostlině. A lokus je potenciálně regulační gen regulující expresi různých strukturálních genů. Gen, který kóduje basic helix-loop-helix (bHLH) transkripční faktor, byl identifikován jako kandidátní gen (Hellens *et al.* 2010). U petúnie jsou mutace genu ANTHOCYANIN 1 bHLH (AN1) zodpovědné za bílý květ a podobné geny byly spojeny s akumulací anthokyaninu u hledíku, kukuřice a huseníčku (Hellens *et al.*, 2010).

Absence pigmentace je způsobena jednobodovou mutací bHLH genu a následným chybným sestřihem mRNA vedoucí k předčasnému stop kodonu. U rostlin je GT místo sestřihu přítomno téměř ve všech intronech a narušení sekvence často vede k chybnému sestřihu. Sekvence cDNA z linie Cameor s bílými květy má v důsledku toho navíc osm nukleotidů přidaných k intronu 6. Dochází k tranzici G na A rozrušující GT místo sestřihu intronu 6 a spliceosom identifikuje další dostupný motiv GT. Předpokládá se, že těchto 8 nukleotidů navíc, má za následek předčasný stop kodon v kódovaném polypeptidu (Hellens *et al.*, 2010) (viz Obrázek 8 A).

Přítomnost předčasného stop kodonu může snížit nahromadění mRNA prostřednictvím nonsense-zprostředkovaného rozpadu. Studie ukázala, že množství bHLH RNA v bílých květech byla obecně nižší než v barevných květech. Některé genotypy s bílými květy měly více mRNA než linky s barevnými květy, což naznačuje, že ještě jiné faktory v pozadí mohou hrát roli (viz Obrázek 8 C, D). Zvětšená délka fragmentu cDNA

u linky s bílými květy byla v souladu s navrženou hypotézou mis-sestříhu (Hellens *et al.*, 2010).

Obrázek 8: Molekulární charakterizace mutace hrachu s bílými květy (převzato z Hellens *et al.*, 2010)



Legenda: A - Schéma ukazuje hlavní rysy genu bHLH a jeho expresních produktů (není v měřítku). Kultivar Cameor s bílými květy má genotyp a. U DNA jsou zobrazeny exony 6 a 7 jako šedá políčka, která ohraničují intron 6. U mRNA světle šedé políčko představuje 8 nukleotidů (nt) vložených do mRNA, což má za důsledek chybný sestřih intronu 6. Červená hvězdička ukazuje polohu stop kodonu způsobující předčasnou terminaci u kultivarů s bílými květy. B - Kvantitativní RT-PCR bHLH z RNA okvětních lístku pigmentovaných a bílých linek. C - Květy z dvanácti linek JI 2822 a Cameor. D - RT-PCR produkty oblasti mezi exon6-exon7. Standard molekulové hmotnosti je znázorněn vlevo. Všech osm barevně kvetoucích linek mají produkt dlouhý 79 bp a všechny bíle kvetoucí linky mají produkt o 8 nukleotidů větší, tzn. 87 bp.

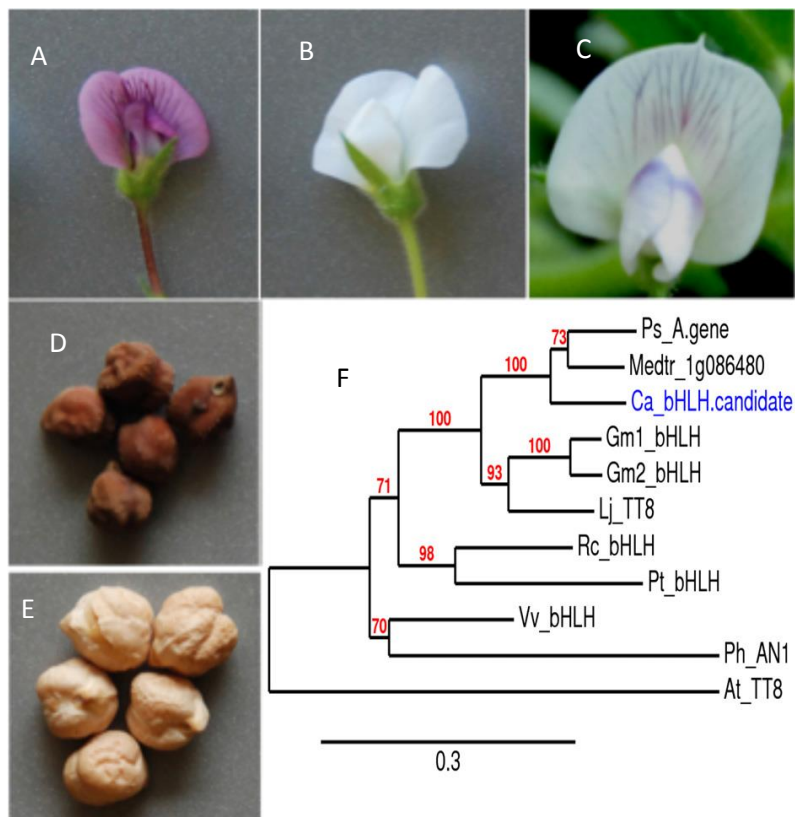
Byly objeveny homologické geny A lokusu v *Medicago truncatula*, cizně a čochce. Homologní transkripční faktor bHLH MtTT8 u *Medicago truncatula* byl

charakterizován jako ústřední součást MYB-bHLH-WD40 komplexů. *Mttt8* mutantní semena mají transparentní osemení se sníženým množstvím PA a anthokyanů (Li *et al.*, 2016).

TAN gen čočky kóduje transkripční faktor bHLH homologní k A genu hrachu. Nemutantní rostlina má načervenalé stonky, fialové květy a tlusté, pigmentované osemení. Recesivní gen (*tan*) má za následek pokles produkce taninu a s tím související změnu fenotypu charakterizovanou zelenými stonky, bílými květy a tenkým, průhledným nebo průsvitným osemením. Tento soubor znaků je podobný u Mendelova A lokusu hrachu (Mirali *et al.*, 2016).

Byl zjištěn homolog i u cizrny a to v oblasti B lokusu (Penmetsa *et al.*, 2016). Rozlišujeme dva druhy cizrny: typ desi, který má fialové květy a pigmentovaná semena, a typ kabuli, který má bílé květy a nepigmentovaná semena. Cizrna může mít i pigmentovaný květ v důsledku slabé alely *b5* na B lokusu (Penmetsa *et al.*, 2016) (viz Obrázek 9).

Obrázek 9: Morfologie květů a osemení dvou hlavních typů kultivované cizrny
(převzato z Penmetsa *et al.*, 2016)



Legenda: A, D - typ desi, B, E - typ kabuli. C - pigmentovaný květ v důsledku slabé alely *b5* na B lokusu. F - fylogram basic helix-loop-helix (bHLH) kandidátního genu (modře) a homologové *Medicago truncatula*

(Medtr), *Pisum sativum* (Ps_A; Mendelův gen), sója (GM1, GM2), lotus (Lj), ricin (Rc), topol (Pt), vinná réva (Vv) a funkčně charakterizované ortology petúnie (Ph_AN1) a *Arabidopsis* (At_TT8).

3.4.2 Gen GLABRA 2

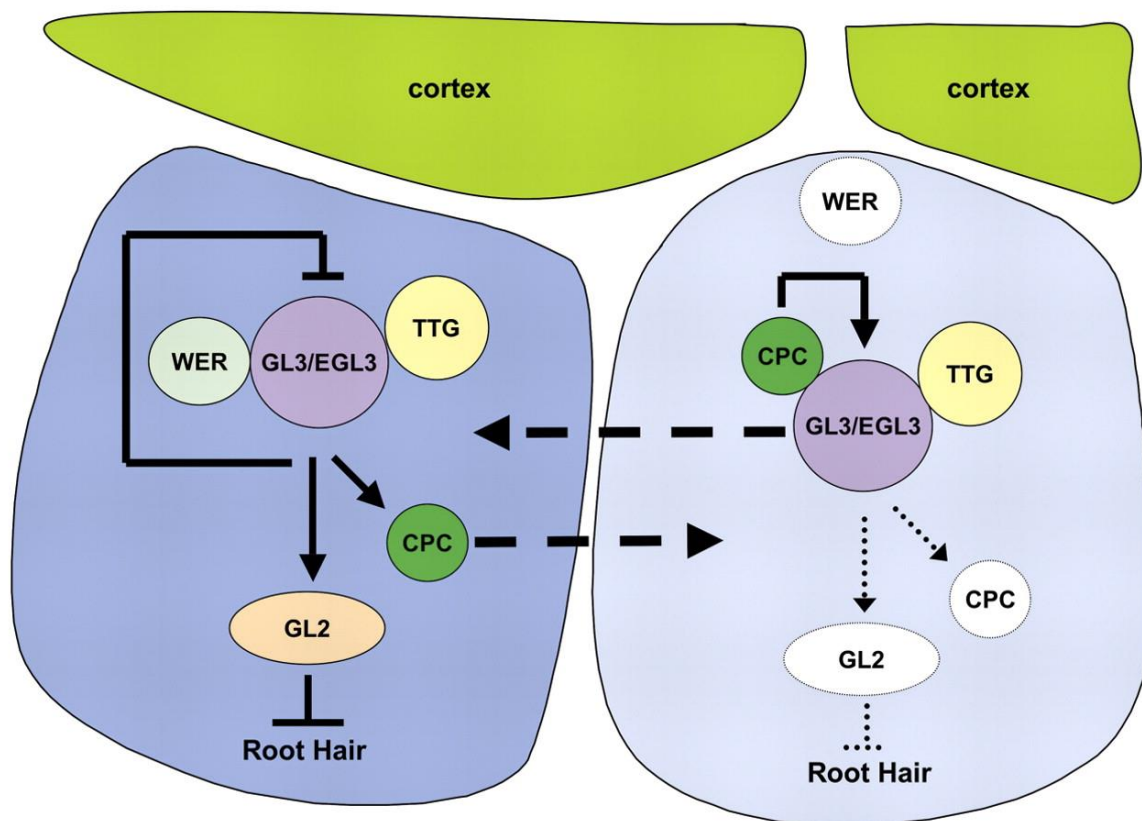
GLABRA 2 (GL2) kóduje transkripční faktor, který na základě své proteinové sekvence patří do třídy IV a homeodomain-leucin zipper (HD-ZIP) genové rodiny (Rerie *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2006). Bylo prokázáno, že GL2 řídí vlastnosti několika epidermálních buněčných typů, včetně morfogeneze trichomů jako je větvení, prodloužení a zrání (Koornneef *et al.*, 1982; Rerie *et al.*, 1994; Szymanski *et al.*, 1998), atrichoblastů (Masucci *et al.*, 1996) a osemení (Koornneef *et al.*, 1982; Western *et al.*, 2001). GL2 způsobuje abnormální strukturu osemení a absenci biosyntézy slizu (Rerie *et al.*, 1994; Masucci *et al.*, 1996), což je sekret produkovaný vnějším osemením *Arabidopsis thaliana*, složen převážně z polysacharidů, tvořící gelovitou matici z dvou klíčových pektinů homogalacturonanu (Hg) a rhamnogalacturonanu I (RGI) (Western *et al.*, 2000). GL2 působí jako pozitivní kontrola MUCILAGE MODIFIED 4 (MUM4) / RHM2 genu (Western *et al.*, 2004). MUM4 / RHM2 kóduje syntázu rhamnosy, která je nezbytná pro produkci rhamnosy (Usadel *et al.*, 2004; Western *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2006). Rhamnosa je klíčovým substrátem pro biosyntézu slizu.

Ve všech buněčných typech se exprese GL2 pozitivně reguluje transkripčním komplexem, který se skládá z R2R3 MYB, basic helix-loop-helix (bHLH) a WD40 transkripčních faktorů. Komplex řídící biosyntézu slizu v osemení se skládá z MYB5 / TRANSPARENT TESTA 2 (TT2), TRANSPARENT TESTA 8 (TT8) / ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3) a TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 (TTG1). Podobný komplex GLABRA 1 (GL1) / GLABRA 3 (GL3) / EGL3 / TTG1 řídí tvorbu trichomů a další podobný komplex WEREWOLF (WER) / GL3 / EGL3 / TTG1 iniciuje vznik kořenových vlásků (viz Obrázek 10) (Walker *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003; Western *et al.*, 2004; Bernhardt *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). Akumulace GL2 v buňce způsobuje zablokování tvorby kořenových vlásků a trichomů, na druhou stranu u osemení způsobuje produkci slizu.

U trichoblastů a atrichoblastů negativní kontrolu GL2 zajišťuje několik malých single-repeat R3 MYB transkripčních faktorů: TRIPTYCHON (TRY), CAPRICE (CPC), ENHANCER OF TRY AND CPC1 (ETC1), ETC2, ETC3, CAPRICE-LIKE MYB3 (CPL3), TRICHOMELESS1 (TCL1) nebo TCL2/CPL4. Tyto R3 MYB transkripční

faktory jsou podobně jako GL2 pozitivně regulovány komplexem R2R3 MYB / bHLH / WD40 a transportují se do sousední buňky, kde soutěží s MYB o vazbu s bHLH a vzniká neaktivní komplex CPC / GL3 / EGL3 / TTG1, který zabraňuje expresi GL2 (Bernhardt *et al.*, 2005) (viz Obrázek 10).

Obrázek 10: Předpokládaný model regulace GL2 (převzato z Bernhardt *et al.*, 2005)



Legenda: Nepřerušované čáry představují genovou regulaci transkripce, přerušované čáry představují pohyb bílkovin a tečkované čáry představují malou nebo žádnou regulaci transkripce. Bílkoviny v bílé barvě značí jejich nízkou koncentraci.

4 Materiál a metodika

4.1 Genomická analýza

Rostlinný materiál:

Dva rodičovské genotypy byly vybrány pro genomickou analýzu: JI1794 (planý typ, *P. elatius*) a WL5238 (kulturní typ, *P. sativum*). Ke genomické analýze kontrastních linií (dormantní vs. nedormantní) bylo použito 138 rekombinantních inbredních linií (RILs) F₈ generace, získaných křížením JI 1794 a WL5238 (zdroj J. Weller, University of Tasmania, Austrálie).

Semena dvou rodičovských a 138 rekombinantních inbredních linií (RILs) byla sklizena z rostlin pěstovaných ve sklenících (září 2016 – leden 2017). Po testu dormance semen (25 semen / test) byla semena z každé rekombinantní inbrední linie po jednom umístěna do květináčů naplněných výsevním substrátem (Profi výsevní substrát, Florcom, Česká republika). Experimentální rostliny byly pěstovány v areálu katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci ve skleníkových podmínkách v období leden – únor 2017. Poté byly ze všech rostlin odebrány vzorky listů, z nichž byla izolována genomová DNA, nezbytná k provedení následných molekulárních analýz. Po dobu vypracování diplomové práce byly vzorky DNA uchovávány při teplotách 4 °C nebo -20 °C.

Laboratorní vybavení:

Petriho misky (průměr 9 cm), filtrační papír (Whatman, stupeň 1), brusný papír, pinzeta, digitální fotoaparát (DP73, Olympus), třmenový mikrometr (0 – 25 mm, přesnost 0,01 mm, biofyzika - prof. Iljík), Invisorb Spin Plant Mini Kit (STRATEC Molecular GmbH, Německo), vortex (MS2 Minishaker, IKA), termoblok (Termo Block MB - 102, BIOER.), centrifuga (Centrifuge 5415 R, Eppendorf; MPS 1000 Mini PCR Plate Spinner, Labnet), minicentrifuga (Spectrafuge Mini, Labnet), automatická pipeta (Eppendorf Research plus, Biohit), špičky, homogenizátor (FastPrep-24, MP Biomedicals), NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), kádinka, buničitá vata, 500ml Erlenmayerova baňka, předvážky (572, Kern), elektroforetická vana a forma na gel (Owl A6, Thermo Scientific; Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad), elektroforetický zdroj napětí

(PowerPac™ Basic, Bio-Rad), hřebeny, lžička, silikonová chňapka, UV transiluminátor (FireReader, Uvitec Cambridge), digitální fotoaparát s oranžovým filtrem (EDAS 290, Kodak), sterilní flowbox (PV – 102, TelSTAR), 2ml zkumavky (Eppendorf), zkumavkové stripy (Trefflab, Switzerl), 96 jamková deska na PCR (4titude), PCR termocykler (PTC-200 Peltier Thermal Cykler, MJ Research)

Chemikálie a roztoky:

destilovaná voda, agaróza (SERVA, Německo), standard (marker) molekulové hmotnosti (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, kat. č. SM0241, Thermo Scientific, Biogen, USA), 10x TBE (na 1 litr 5,40 g TRIS báze; 2,75 g kyseliny borité; 2 ml 0,5mol/l EDTA o pH 8,0; Sigma Aldrich, ČR), bromfenolová modř v 30% glycerinu (Promega), fluorescenční barvivo pro DNA Simply Safe™ (EurX), *MyTaq*™ RED polymeráza (Bioline), 5x koncentrovaný pufr *MyTaq*™ Reaction Buffer s obsahem 15mmol/l MgCl₂, 5mmol/l dNTPs a nanášecího barviva (Bioline, UK), primery (viz Tabulka 1) (Generi-Biotech, CZ), Exonuclease I (20 U/μl, Thermo Scientific, USA), Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/μl, Thermo Scientific, USA), Fast Alkaline Phosphatase pufr (10x, Thermo Scientific, USA), restrikční enzym (viz Tabulka 4) (Thermo Scientific, Biogen, CZ, enzymy testované pro polymorfismus rodičů), odpovídající pufr pro restrikční enzymy 10x (viz Tabulka 4) (Thermo Scientific, Biogen)

4.1.1 Testování dormance semen

Postup

1. Do Petriho misek byly vloženy filtrační papíry a vždy po 20 semenech rodičů a RILs.
2. Každá deska byla popsána.
3. Semena byla zalita 3 ml vody a byla inkubována při 25 °C.
4. Ve 24 hod intervalech po dobu jednoho týdne byl zaznamenán poměr klíčících a dormantních semen.
5. U semen, která neklíčila ani po sedmi dnech, byla provedena skarifikace brusným papírem, aby se mechanicky narušilo osemení pro jeho lepší propustnost pro vodu a následné klíčení.

4.1.2 Hodnocení fenotypu osemení

1. Byly pořízeny fotografie semen pomocí digitálního fotoaparátu (viz Obrázek 12) pro subjektivní hodnocení barevnosti semen, tj. pigmentace.
2. Bylo provedeno měření tloušťky osemení pomocí mikrometru.

4.1.3 Izolace genomové DNA

Genomová DNA z rodičů a RILs byla vyizolována vždy z dvou mladých listů, tj. přibližně 100 mg rostlinného materiálu za použití komerčně dostupného kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit využívajícího adsorpci na silikát. Vzorky byly po izolaci dlouhodobě uchovávány při -20 °C.

Postup dle návodu výrobce (Invisorb Spin Plant Mini Kit, STRATEC Molecular GmbH, Německo)

1. Veškeré zkumavky byly označeny popisem.
2. K listu bylo přidáno 400 μ l Lysis Buffer P a 20 μ l Proteinase K (100 μ g/ml).
3. Vzorky byly 60 sekund homogenizovány.
4. Vzorky byly inkubovány 30 min při 65 °C.
5. Homogenit byl přelit na kolonku PREFILTR.
6. Zkumavky byly zcentrifugovány 1 min při 12 000 rpm.
7. Do zkumavek bylo přidáno 10 μ l RNAase A (10 μ g/ml) a byly ponechány při pokojové teplotě 10 - 15 min.
8. Do zkumavek bylo přidáno 200 μ l Binding Buffer P a byly zvortexovány.
9. Vzorky byly přelity na kolonku SPIN FILTR a nechány 1 - 2 min stát.
10. Zkumavky byly zcentrifugovány 1 min při 12 000 rpm.
11. Byl odstraněn filtrát, vrátily se zpět kolonky a na kolonky bylo napipetováno 550 μ l Wash Buffer I.
12. Zkumavky byly zcentrifugovány 1 min při 12 000 rpm.
13. Byl odstraněn filtrát, vrátily se zpět kolonky a bylo napipetováno 550 μ l Wash Buffer II.
14. Byly zopakovány kroky 12 a 13.
15. Zkumavky byly zcentrifugovány 1 min při 12 000 rpm.

16. Bylo odstraněn filtrát, vrátily se zpět kolonky a zkumavky byly centrifugovány 2 min při 12 000 rpm.
17. Do zkumavek bylo napipetováno 50 µl Elution Buffer D předeřátého na 65 °C a vzorky se inkubovaly 3 min.
18. Zkumavky byly zcentrifugovány 1 min při 12 000 rpm.
19. Byly zopakovány kroky 17 a 18.

4.1.4 Spektrofotometrická analýza DNA (NanoDrop)

Byla zjištěna koncentrace a čistota vyizolované genomové DNA a koncentrace PCR amplifikace na NanoDropu 2000. Výsledky byly získány z poměru absorbancí DNA při vlnových délkách 260 a 280 nm.

Postup

1. Byly napipetovány 2 µl destilované vody na NanoDrop pro odečet blanku.
2. Následně byly napipetovány 2 µl vzorku DNA a byly změřeny hodnoty absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm, hodnota 260/280 nm a koncentrace v ng/µl.
3. Po každém měření se snímač přístroje očistil buničitou vatou.

4.1.5 Horizontální agarózová elektroforéza 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 1,7% agarózovém gelu. Gely s výsledky elektroforézy byly hodnoceny pomocí UV transiluminátoru při vlnové délce 302 nm a zdokumentovány pomocí digitálního fotoaparátu s oranžovým filtrem. Snímky byly zpracovány počítačově v grafickém programu IrfanView.

Postup

1. Dle velikosti elektroforetické vany (80 ml nebo 250 ml) bylo do 500ml Erlenmayerovy baňky naváženo 1,4 nebo 4,2 g agarózy na 1,7% roztok agarózy.

2. Do baňky bylo nalito 80 nebo 250 ml pufru 0,5x TBE a vše bylo dáno vařit do mikrovlnné trouby.
3. Láhev byla vyjmuta z mikrovlnné trouby, promíchána krouživým pohybem a dána zpět, dokud se agaróza úplně nerozpustila.
4. Po vychladnutí asi na 50 - 60 °C byly přidány 2 nebo 4 µl zásobního roztoku barviva EurX a agaróza byla nalita do elektroforetické formy na gel.
5. Do elektroforetické formy na gel byly umístěny hřebeny a gel se nechal 30 min ztuhnout.
6. Po ztuhnutí byly hřebeny vyjmuty a gel byl vložen do elektroforetické vany s pufrům TBE.
7. Do jamek byly napipetovány vzorky po 6 µl a marker po 3 µl.
8. Elektroforéza byla spuštěna na 45 - 60 min při napětí 100 nebo 250 V.
9. Poté byl gel zdokumentován pomocí UV transiluminátoru (vlnová délka 302 nm) a digitálního fotoaparátu s oranžovým filtrem.
10. Výsledný snímek byl zpracován v PC v grafickém programu IrfanView.

4.1.6 PCR amplifikace vybraných genů

S ohledem na dostupné morfologické mapy genomu hrachu byly pro molekulárně-genetickou analýzu RILs účelně vybrány konkrétní genově specifické DNA markery na vazebných skupinách II a III (viz Tabulka 1). Marker PsCam024624 se nachází na LGIII a je homologní genu pro GLABRA2 a marker PsCam001551 (35,6 cM) pro A lokus se nachází na LGII. Dále byly vybrány další čtyři markery PsCam000900 (32,4cM), PsCam050604 (32,4 cM), PsCam048988 (38,4 cM) a PsCam006687 (40,5 cM) k bližšímu zmapování lokusu zodpovídajícího za tloušťku osemení a dormanci semen zjištěného na mapovací populaci *P. elatius* JI1794 x *P. sativum* WL5238. Výsledky PCR amplifikace byly ověřeny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu a zviditelněny na UV transiluminátoru. Amplifikovaný PCR produkt byl uskladněn pro krátkodobou potřebu při teplotě 4 °C, dlouhodobě při teplotě -20 °C.

Tabulka 1: Použité primery (Generi Biotech)

primer (marker), accession number (Tayeh <i>et al.</i> , 2015)	F/R	sekvence (3'-5')	délka produktu [bp]	Citace
PsCam024624	F	GTGCAATCCCTTCACCTACGT	1426	vlastní
	R	ACCTCGGATTTGAGTTTGGCAT		
PsCam001551 (bHLH)	F	TCCAATCGAAGAACCTCTCG	658	Hellens <i>et al.</i> , 2010
	R	GACAATCCAAATTTACTCGACA		
PsCam000900	F	GCGGTGATTTCGAACCGAGC	1101	vlastní
	R	CTCCGATACAATCGCCACAATGC		
PsCam006687	F	ATCAGCAACTGAAGTAGCATGGGT	1021	vlastní
	R	GGAAATGGCCCAAAGCTTGTAGAACA		
PsCam048988	F	CAACTGGTATCCTTGATGGAGC	981	vlastní
	R	CTGGAAGGTTTCCTCGTTGATAG		
PsCam050604	F	ACTGGTGAAGCTGTGAATAGGTTTC	1611	vlastní
	R	GCAGCATGAGAGGATGCCCGGCTAGGA		

Postup

1. Práce byla prováděna ve sterilním flowboxu.
2. Vzorky DNA byly naředěny 1:7 s vodou, aby měly přibližnou koncentraci 20 - 80 ng/μl.
3. Chemikálie pro PCR byly po rozmrznutí umístěny do chladicího stojánku.
4. Do 2ml mikrozkušavky bylo připraveno potřebné množství reakční směsi bez DNA vzorku dle počtu vzorků (pro jeden vzorek: 3 μl 5x pufu, 9,23 μl destilované vody, 0,7 μl primer mix (5 mM F/R), 0,07 μl *Taq* pol (5 units/μl))
5. Do označených 0,2ml zkumavkových stripů nebo jamek 96 jamkové desky byla rozpipetována reakční směs po 13 μl.
6. K 13 μl reakční směsi byly napipetovány vždy 2 μl vzorku DNA.
7. 96 jamková deska nebo zkumavkové stripy byly vloženy do PCR termocyklieru a byl spuštěn program CAPS_55 (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: PCR teplotní program CAPS_55

krok	počet cyklů	teplota	čas
počáteční denaturace dna	1x	95 °C	5 min
denaturace dna	35x	95 °C	30 s
nasednutí primerů		55 °C	20 s
syntéza dna		72 °C	150 s
syntéza dna	1x	72 °C	10 min

4.1.7 Přečištění PCR produktu (pro sekvenování)

Před sekvenováním byly odstraněny zbylé primery a neinkorporované nukleotidy (dNTP) podle AP/EXO protokolu pomocí exonukleázy I, která rozštěpí jednořetězcové primery, a alkalické fosfatázy, která defosforyluje zbytkové dNTPs. Před odesláním vzorku pro sekvenaci se ověřila přítomnost inzertu PCR amplifikací a horizontální gelovou elektroforézou.

Postup dle návodu výrobce

1. Do 2ml mikrozkušavky bylo připraveno potřebné množství reakční směsi bez PCR produktu dle počtu vzorků (pro jeden vzorek: 1 μ l 10x Fast AP pufru, 3,45 μ l destilované vody, 0,15 μ l AP fosfatázy, 0,4 μ l Exo I)
2. Do označených 0,2ml zkumavkových stripů nebo jamek 96 jamkové desky byla rozpipetována reakční směs po 5 μ l.
3. K 5 μ l reakční směsi bylo napipetováno vždy 5 μ l PCR produktu.
4. 96 jamková deska nebo zkumavkové stripy byly vloženy do PCR termocykleru a byl spuštěn program Exo-AP (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: PCR teplotní program Exo-AP pro přečištění PCR produktu

krok	teplota	čas
inkubace	37 °C	15 min
tepelná inaktivace	85 °C	15 min

4.1.8 Sekvenování, nalezení polymorfních restrikčních míst, Geneious software

Sekvence byla provedena formou servisu v Laboratoři analýzy DNA na PřF UK v Praze (<https://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna>), kam byla dodána přečištěná PCR reakce (přibližně 100 - 200 ng DNA) společně s odpovídajícím sekvenačním primerem (5 pmol) v celkovém objemu 8 µl (4 µl PCR produktu, 1 µl F primeru a 3 µl destilované vody). Sekvence byla provedena metodou BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, UK) dle protokolu na sekvenátoru 3130xl Genetic Analyzer (2010) firmy Applied Biosystems. Získaný elektroforetogram byl analyzován pomocí programu GENEIOUS verze R7 (Biomatters Ltd.). Sekvence byly porovnány se sekvencemi získanými pomocí BLAST (Altschul *et al.*, 1997) analýzy, která byla provedena na stránkách NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> pro ověření identity sekvence genu a především pak mezi rodičovskými genotypy pro nalezení potřebného polymorfismu pro mapování.

4.1.9 Restrikce PCR produktu (CAPS-PCR, Cleavage Amplified Polymorphic Sequence)

Získané PCR produkty byly za účelem zjištění výskytu polymorfismu enzymaticky štěpeny s použitím vhodného enzymu dle výsledků ze sekvenování. Tabulka 4 uvádí restrikční enzymy využití v této práci. Produkty restrikčního štěpení byly elektroforeticky separovány, gely s výsledky separace řádně zdokumentovány.

Tabulka 4: Restrikční enzymy s používanými pufrů a teplotami štěpení

marker	restrikční enzym	pufr	teplota štěpení
PsCam024624	<i>MseI (TruI)</i>	R pufr	65 °C
PsCam001551 (bHLH)	<i>TaqI</i>	Taq pufr	65 °C
PsCam006887	<i>RsaI</i>	Tango pufr	37 °C
PsCam048898	<i>HinfI</i>	R pufr	37 °C

Postup

1. Chemikálie pro restrikci byly po rozmrznutí umístěny do chladicího stojánku.

2. Do 2ml mikrozkušavky bylo připraveno potřebné množství reakční směsi bez PCR produktu dle počtu vzorků (pro jeden vzorek: 1,5 µl 10x pufru, 8,42 µl destilované vody, 0,08 µl restriktivního enzymu)
3. Do označených zkumavkových stripů nebo jamek desky byla rozpipetována reakční směs po 10 µl.
4. Do 10 µl reakční směsi bylo napipetováno vždy 5 µl PCR produktu.
5. 96 jamková deska nebo zkumavkové stripy byly vloženy na 4 hod do PCR termocyklieru nebo inkubátoru s potřebnou teplotou štěpení dle enzymu (viz Tabulka 4).

4.2 Transkriptomická analýza

Rostlinný materiál:

Byly vybrány čtyři rodičovské genotypy pro transkriptomickou analýzu: *P. sativum* subsp. *elatius* JI64 (planý typ, Turecko) a *P. sativum* subsp. *sativum* JI92 (kulturní typ, Afganistán) z John Innes Pisum Collection (Norwich, UK); *P. sativum* subsp. *elatius* VIR320 (planý typ, Israel) (Bogdanova *et al.*, 2012) z Vavilov Research Institute of Plant Industry (St. Petersburg, Rusko) a *P. sativum* cv. Cameor (kulturní typ, Francie) z INRA (Dijon, Francie). Dva genotypy byly s pigmentovaným osemením (JI64, JI92) a dva s nepigmentovaným osemením (Cameor, VIR320).

Rostliny byly pěstovány v 3l kontejnerech v zahradnickém substrátu (Profi zahradnický substrát, Florcom, Česká republika) ve sklenících katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období únor – květen 2016.

Laboratorní vybavení:

BioTeke Plant Total RNA Extraction Kit (Čína), laboratorní váhy (572-35), homogenizátor (FastPrep-24, MP Biomedicals), homogenizační keramické kuličky (Ceramic Sphere ¼“, zirconium oxide, Life science, MP Bio), třepačka (Mixing Block MB102), třepačka laboratorní (IKA MS2), centrifuga (Eppendorf 5415), spektrofotometr (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo scientific) termocykler (Base unit Ix DNA), mikrocentrifuga (MCF 2360), termocykler (CFX96™ Real-Time Detection System, Bio-Rad), třecí miska

Chemikálie a roztoky:

reakční pufr (10X Baseline-ZERO™ DNase Reaction Buffer, Epicentre), DNáza (Baseline-ZERO™ DNase, Epicentre), STOP pufr (10X Baseline-ZERO™ DNase Stop Solution, Epicentre), AMV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer (M515A, Promega), Enzyme Storage Buffer (Promega), RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega), Oligo(dT)15 Primer (Promega), SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline), dNTP (10 nM, KAPA BIOSYSTEMS), primery (5μM, Generi Biotech, ČR)(viz Tabulka 4), voda ošetřená DEPC (diethyl pyrokarbonát)

4.2.1 Izolace RNA

Vzorky rodičovského genotypu byly odebrány ve dvou vývojových stádiích osetení (15 a 30 DAA), protože není známo, v jaké fázi jsou kandidátní geny podmiňující dormanci exprimovány. Pro Massive analysis of cDNA Ends (MACE) byl každý vzorek rodičovského genotypu složen z několika smíchaných vývojových stádií (10, 15, 20, 30 DAA). Pro každé stádium bylo odebráno přibližně 100 mg osetení, které bylo odděleno od embrya pod stereomikroskopem, ihned zmrazeno v tekutém dusíku a skladováno při teplotě -20 °C až do použití. Výtěžek, množství a čistota vyizolované RNA byla stanovena za použití spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) a bylo provedeno ředění v DEPC-H₂O na 100 ng / μl.

Postup dle návodu výrobce (BioTeke Plant Total RNA Extraction Kit, Čína)

1. Zmrazená osetení byla rozdracena tloučkem na jemný prášek v třecí misce s tekutým dusíkem.
2. Asi 100 mg rostlinného materiálu bylo umístěno do 1,5ml zkumavky spolu s 1 ml Lysis Buffer PL předeřátým na 65 °C.
3. Ke vzorku byla přidána keramická kulička a obsah byl homogenizován pomocí homogenizátoru (1 min, síla 6).
4. Vzorky byly zahřívány v inkubátoru 5 min při 65 °C.
5. Zkumavky byly centrifugovány 10 min při 12 000 rpm.
6. Supernatant byl přenesen na filtrační kolonku.
7. Centrifugovalo se 1 min při 12 000 rpm.
8. Filtrát byl přenesen do 1,5ml zkumavky a přidán stejný objem 70% ethanolu (700 μl).

9. 700 µl směsi bylo naneseno na kolonku Spin-column AC a centrifugovalo se 1 min při 10 000 rpm.
10. Filtrát byl odstraněn, na kolonku bylo naneseno zbývajících 700 µl směsi a opět se centrifugovalo 1 min při 10 000 rpm.
11. Byl odstraněn filtrát, na kolonku bylo naneseno 500 µl Buffer RE, centrifugovalo se 1 min při 12 000 rpm a opět byl odstraněn filtrát.
12. Přidalo se 700 µl Buffer RW, centrifugovalo se 1 min při 12 000 rpm a odstranil se filtrát.
13. Přidalo se 500 µl Buffer RW, centrifugovalo se 1 min při 12 000 rpm a odstranil se filtrát.
14. Centrifugovalo se 2 min při 12 000 rpm a odstranil se filtrát.
15. Kolonka byla přenesena do nové zkumavky, přidalo se 50 µl RNase-free vody a vzorky se nechaly stát 2 min.
16. Centrifugovalo se 1 min při 12 000 rpm.
17. Přidalo se 20 µl RNase-free vody a centrifugovalo se 1 min při 12 000 rpm.

4.2.2 Odstranění zbytkové DNA

Před samotnou transkripcí RNA do cDNA je zapotřebí degradovat veškerou zbytkovou DNA, která by mohla způsobovat nespecifickou reakci v dalších krocích. DNA je sice odstraněna už během samotné izolace, může se však stát, že malé množství ve vzorku zůstane. Vzorky se tedy musí vystavit působení DNázy.

Postup

1. Do PCR mikrozkušavek bylo napipetováno 65 µl vzorku RNA, 7,6 µl reakčního pufru a 3,8 µl DNázy.
2. Inkubovalo se 20 min při 37 °C.
3. Bylo přidáno 7,6 µl STOP pufru a inkubovalo se 10 min při 65 °C.

4.2.3 Reverzní transkripce (RT-PCR)

Vzorky bylo potřeba vhodně naředit, aby do reakce vstupovalo stejné množství RNA. Ředění proběhlo na základě výsledků měření koncentrace spektrofotometrem NanoDrop. Na závěr byly vzorky zředěny vodou ošetřenou DEPC v poměru 1:1.

Postup

Inkubace vzorků s Oligo (dT) primerem

1. Do PCR mikrokumavek bylo napipetováno 9 μl vody, 5 μl zředěného vzorku RNA a 1 μl primeru (viz Tabulka 5).
2. Vzorky byly umístěny do termocycleru na 5 min při 70 $^{\circ}\text{C}$.
3. Po vytažení byly vzorky umístěny na led.

Reverzní transkripce

4. Do mikrokumavky byla připravena reakční směs složenou z: 12,5 μl vody ošetřené DEPC, 8 μl pufru, 2,5 μl dNTP, 1 μl inhibitoru ribonukleáz a 1 μl AMV reverzní transkriptázy
5. Bylo přidáno 25 μl reakční směsi ke každému vzorku z předcházejícího kroku.
6. Vzorky byly vloženy do termocycleru na 60 min při 42 $^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 5: Použité primery (Generi Biotech)

primer (marker)	F/R	sekvence (3'-5')	délka produktu [bp]	accession number	citace
Aktin	F	TTCTCACTGAAGCTCCGCTTAACC	144	PSU81047	Ferraro <i>et al.</i> , 2014
	R	CAATACCAGTTGTACGGCCACTAGC			
PsANR	F	TCAGAATACCTGTGTTCCCGAGCTTG	90	KF516483	Ferraro <i>et al.</i> , 2014
	R	CCTTGCGGCAATCCTCGAATTTAGT			
MtMyb5 homolog	F	CGTCTTTGTGGGAATCGCAA	94	PsCTri1E003845	vlastní
	R	GCATCATGAATCTGTCCCGT			
PsCam024624	F	CAATGGAGTCTGTGGACTCTGTT	209	-	vlastní
	R	CTTTCTACCTAGGGGAGAAACAC			
MACE-130	F	CCTTCTTCAGAAGGAGAGTTTGCA	178	-	vlastní
	R	TCCACTTATAACATCAAACCGGCA			
MACE-131	F	CCAACAAGATCAGGCTCATGTG	77	-	vlastní
	R	GAAAGACCAGTTTCAGCGTCAA			
MACE-132	F	TATCTTCCATTTGGTGGAGGTCCA	93	-	vlastní
	R	CCGTGCAACAAGCATTGCAAGAGCT			
MACE-133	F	TGTGTTTGCAGAGCTATTTGAACC	161	-	vlastní
	R	TTCATCGCATAATTATTGGTCCAACAC			
MACE-134	F	CATCAAGTTGTAATCAGAGCCATTCC	102	-	vlastní
	R	GACATGGTTGTTCAAGAACCGT			
MACE-135	F	GGCATCCTGCTAAACCTAGTGAA	95	-	vlastní
	R	AAACGCACAACCGTGCTCCTT			
MACE-136	F	AAAGCCGTTGCATAAGGCACC	136	-	vlastní
	R	CCAAGTGAGATGACGGTTCAC			
MACE-137	F	GTGGAATAAGACCCCTAAGAGTG	140	-	vlastní
	R	CTGCCGAGGGCATTGTCACC			
MACE-138	F	CAAAGGAGGATATTAACCAATC	225	-	vlastní
	R	TTCCTAACTCCACTGCAAGTG			
MACE-139	F	TAGTACCCGCTTACTCATGGGCT	114	-	vlastní
	R	ATTGTAGCGCGAGACAAGAC			
MACE-140	F	GGTCCGTATTGTTGGCTTCCA	104	-	vlastní
	R	ACAGTTGATTCCACATAGCTTGG			
MACE-141	F	TCTTGCCAGCAGAATGTCAC	329	-	vlastní
	R	GTCAAAGAATAGAACTGTATACATATC			
MACE-142	F	CGAAATGCCGAGAACTTGG	862	-	vlastní
	R	GACAGCAGAAGCAACTGTTAGC			
MACE-143	F	GGAGCAAAAGATGTCCTCACC	270	-	vlastní
	R	ACTTTCCTTGAATCTCACCT			

4.2.4 Kvantitativní real-time PCR amplifikace (qRT-PCR)

Po provedení qRT-PCR amplifikace byl její správný průběh a specifita ověřena gelovou elektroforézou a pozorováním průběhu křivky teploty tání.

Kvantifikace hladiny transkriptu byla stanovena pomocí Software CFX Manager (Bio-Rad). Aktin byl použit jako referenční gen pro normalizaci relativní kvantifikaci (Ferraro *et al.*, 2014), jako kontrola sloužila hodnota ΔC_t mladšího vývojového stadia kultivaru Cameor. Relativní kvantifikace exprese byla provedena za použití komparativní C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) metody (Livak *et Schmittgen*, 2001). Hodnota C_t je charakterizována jako prahový cyklus, tedy číslo označující počet cyklů, při kterém dosáhne množství amplifikovaného produktu fixní hodnoty (Livak *et Schmittgen*, 2001). Výpočet byl proveden tak, že od hodnoty C_t studovaného genu byla odečtena hodnota C_t referenčního genu, čímž byla získána ΔC_t . Hodnota $\Delta\Delta C_t$ byla definována jako rozdíl ΔC_t studovaného genu a kontroly. Následně byla tato hodnota dosazena do vzorce $2^{-\Delta\Delta C_t}$, výsledky z obou opakování byly zprůměrovány a byla vypočítána směrodatná odchylka.

Postup

1. Do 1,5ml mikrozkušavky byly napipetovány jednotlivé složky reakční směsi dle počtu vzorků (pro jeden vzorek: 7,5 μ l pufru, 4,3 μ l destilované vody, 1,2 μ l primeru).
2. Reakční směs byla napipetována do PCR mikrozkušavek a byly přidány 2 μ l vzorku cDNA.
3. Mikrozkušavky byly vloženy do termocycleru na program qRT-PCR (viz Tabulka 6).

Tabulka 6: Teplotní program qRT-PCR

fáze	teplota (°C)	počet cyklů	čas (s)
denaturace	95	1	600
syntéza	95	45	10
	55		30
	72		20
udržování	72	1	300
melting analýza	60 °C – 97 °C po 0,1 °C/s		

4.2.5 Bioinformatická analýza

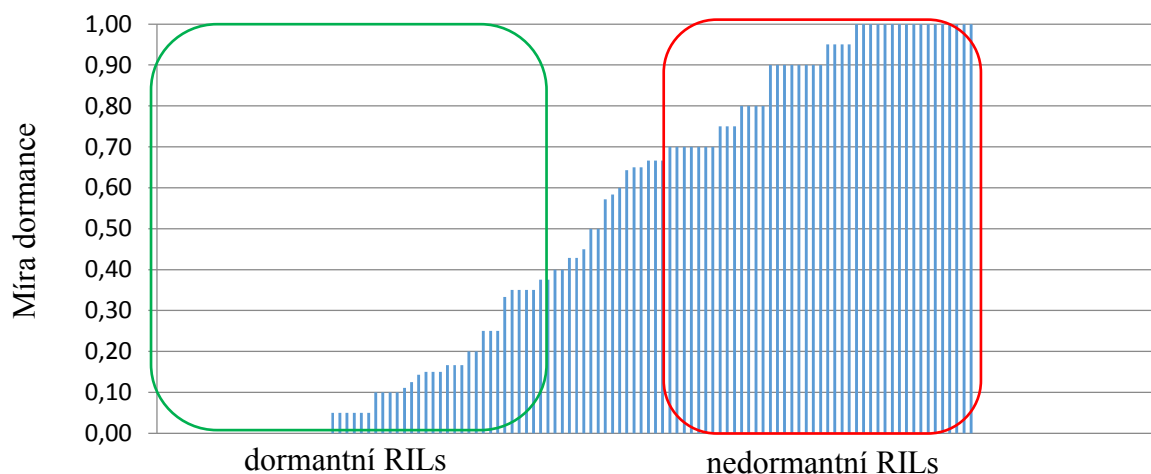
Sekvence byly porovnány se sekvencemi získanými pomocí BLAST (Altschul *et al.*, 1997) analýzy, která byla provedena na stránkách NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> pro ověření identity sekvence genu a především pak mezi rodičovskými genotypy pro nalezení potřebného polymorfismu pro mapování. Pro kontrolu inzercí, alignmentu sekvencí a navrhovaných či převzatých primerů byla využívána internetová stránka https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html. Samotné primery byly navrhovány v programu Fast PCR (Primer Digital, Finsko).

5 Výsledky

5.1 Testování dormance semen a hodnocení fenotypu osemení mezi planým a kulturním hrachem

Planý hrách je dormantní díky snížené permeabilitě osemení. Byly vybrány kontrastní rodičovské linie planého (JI1794) a kulturního (WL5839) hrachu, které se liší v pigmentaci osemení a dormanci. Byly vytvořeny rekombinantní inbrední linie. Jako test míry dormance semen byl použit test bobtnání a klíčení semen (viz Tabulka 7). 25 semen od každého rodičovského genotypu JI1794 a WL5839 a 25 semen z každé RIL linie bylo vystaveno po dobu 7 dnů působení vody za pokojové teploty a každý den byly zaznamenány počty nabobtnalých a vyklíčených semen. Z celkem 112 testovaných linií populace JI1794 x WL5839 bylo vyhodnoceno 48 linií jako klíčících (nedormantních, tj. s mírou klíčení 0 - 40 %), 47 dormantních (60 % a více neklíčících semen) a 17 se nedalo určit (viz Obrázek 11).

Obrázek 11: Distribuce klíčení rekombinantních inbredních linií (RILs)

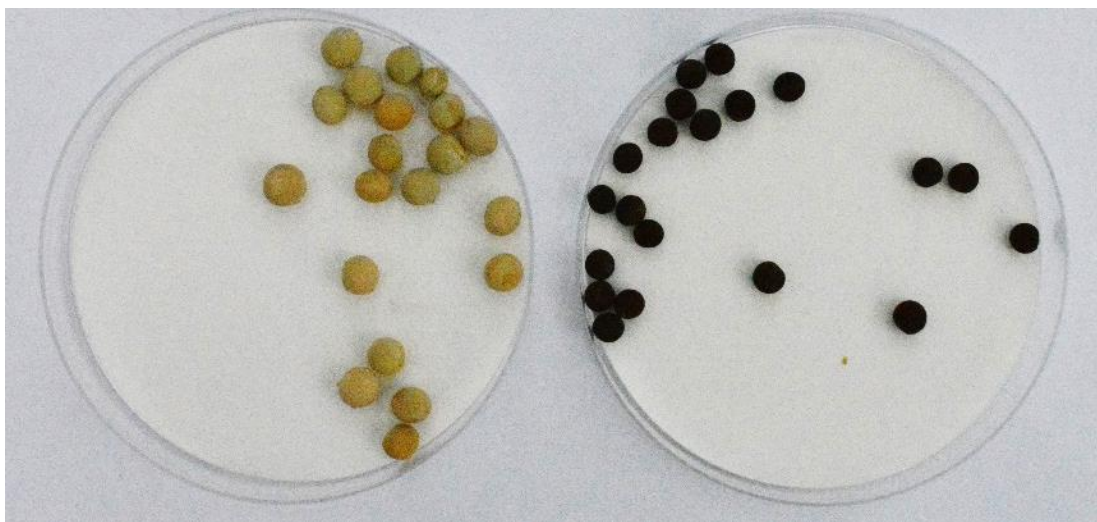


Dále se hodnotila barva semen (pigmentováno vs. nepigmentováno) (viz Obrázek 12), která u 97 RILs korelovala s mírou dormance, u 5 RILs nešlo barvu určit a u 12 RILs (1, 3, 28, 30, 66, 81, 103, 106, 109, 129, 132, 134) barva s mírou dormance nesouhlasila.

Obrázek 12: Rozdíl v pigmentaci semen rodičovských genotypů

WL5839 – klíčící, nepigmentovaný

J11794 – dormantní, pigmentovaný



5.2 Výběr genů aktivních při vývoji osemení

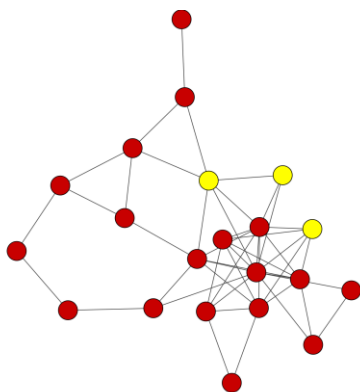
Na základě provedené celogenomové analýzy metodou DArTseq, která je založena na next-generation sekvenování (Diversity Arrays Technology, Ltd.) bylo získáno celkem více než 20 tisíc informativních SNP-ů na mapovací RIL populaci. Ve spolupráci s Dr. Matthew Nelsonem (Millenium Seed Bank, UK) byla získána vysokohustotní genetická mapa, umožňující lokalizaci sledovaných znaků, v našem případě dormance (sledované jako klíčení) a tloušťky osemení (měřené mikrometricky). Následně tak byl stanoven interval zodpovídající za dormanci nacházející se na vazebné skupině LGII v blízkosti *A* lokusu nacházející se v pozici 35,6 cM (*bHLH* - PsCam001551). Pro mapování *A* lokusu byla použita konsenzuální mapa získaná pomocí GenoPea 13,2K SNP Arraye a 12 RIL populací (Tayeh *et al.*, 2015) s pozicí 13 000 genů hrachu, což vedlo k vymezení intervalu lokusu do oblasti 32 až 40 cM nacházející se na vazebné skupině LGII. Pro přesnější zjištění byly zvoleny následující markery: PsCam000900 (32,4cM), PsCam050604 (32,4 cM), PsCam048988 (38,4 cM) a PsCam006687 (40,5 cM).

Ve spolupráci s Dr. Jerome Verdierem (INRA, Angers, Francie) byl vytvořen gene regulatory network pomocí Cytoscape softwaru za použití známého *Medicago truncatula* transkriptomického networku osemení (Verdier *et al.*, 2013). Byly odděleně použity dvě sady dat: dormantní a nedormantní (viz Obrázek 13). U dormantního networku nebyl zjištěn žádný centrální regulační gen, ale u nedormantního networku byl klíčovým genem Medtr2g101720, ortologní gen *GLABRA2* u *Arabidopsis At1g79840* a u *P. sativum*

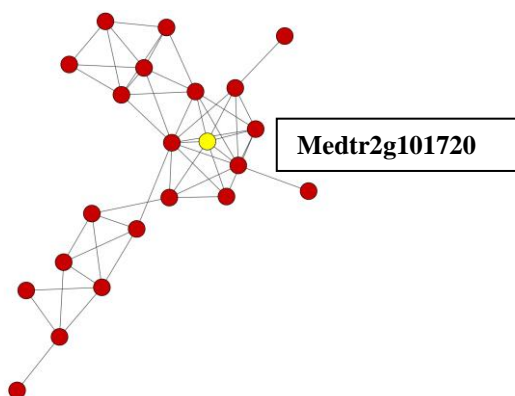
PsCam024624 na vazebné skupině III (Tayeh *et al.*, 2015), kde byly mapovány některé QTL zodpovědné za dormanci semen za použití DArTseq mapování.

Obrázek 13: Gene regulatory network

A) dormantní gene network



B) nedormantní gene network



Legenda: tečka – gen, spojnice - regulace

5.3 Genomická analýza vybraných genů (A lokus, GLABRA2)

Pomocí isolačního kitu byla vyizolována genomová DNA ze 112 rostlin rekombinantních inbredních linií (RIL) JI1794 x WL5839 a rodičovských genotypů. Kvalita, specifita a částečně i množství DNA bylo zkontrolováno pomocí elektroforetické analýzy na agarózovém gelu. Spektrofotometrickou analýzou na přístroji NanoDrop 2000 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 rodičů JI1794 a WL5839 byla s využitím metody PCR amplifikována s vybranými specifickými primery (viz Tabulka 1). Primery byly navrženy na základě dostupné cDNA hrachu, cDNA homologního genu a genomu *Medicago truncatula*, tak aby se nacházely v oblasti exonu, ale pokrývaly také oblast intronu, kde je předpoklad vyššího polymorfismu. Primery byly zvoleny tak, aby korespondovaly s lokusy vyskytujícími se zejména na vazebných skupinách III (pro gen GLABRA2 - PsCam024624) a II (lokazace lokusu A pro bHLH - PsCam001551).

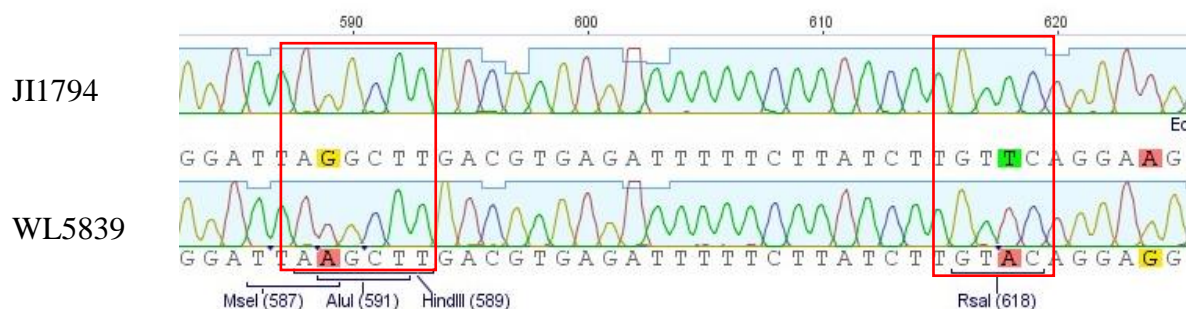
PCR produkty rodičovských genotypů byly přečištěny podle AP/Exo protokolu a byly odeslány k sekvenaci. U všech získaných sekvencí byla provedena analýza shody s databázovými sekvencemi pomocí BLAST vyhledávání. Získané sekvence byly

analyzovány pomocí softwaru Geneious, kde byly nalezeny polymorfismy v restrikčních místech (viz Obrázek 14).

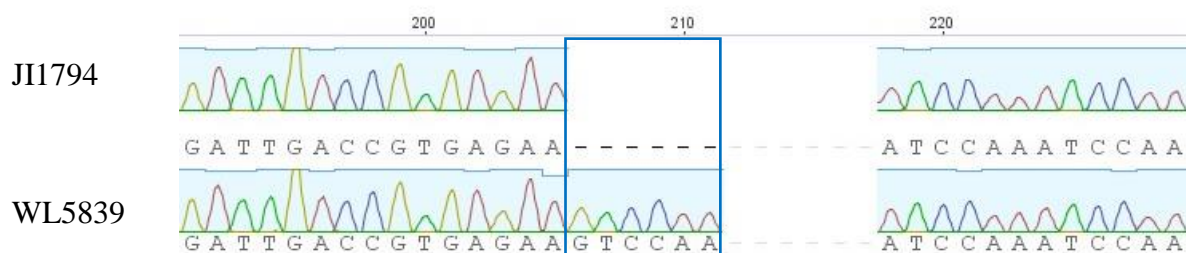
Sekvence amplifikovaná primerem PsCam024624 byla polymorfní v oblasti štěpené pomocí restrikčního enzymu *MseI* (*TruI*), sekvence amplifikovaná primerem PsCam001551 byla polymorfní v oblasti štěpené pomocí restrikčního enzymu *TagI*, sekvence amplifikovaná primerem PsCam006687 byla polymorfní v oblasti štěpené pomocí restrikčních enzymů *RsaI*, *MseI*, *AluI* a *HindIII* (vybrali jsme restrikční enzym *RsaI*), sekvence amplifikovaná primerem PsCam048988 byla polymorfní v oblasti štěpené pomocí restrikčního enzymu *HinfI* a v sekvenci amplifikované primerem PsCam050604 a PsCam000900 nebyl nalezen žádný polymorfismus v restrikčním místě, pouze inserce a delece jen několik párů bází, přičemž by rozdíl na agarózové elektroforéze nebyl viditelný (viz Obrázek 14).

Obrázek 14: Ukázka sekvencí polymorfních a nepolymorfních v restrikčním místě

a) PsCam006687



b) PsCam050604



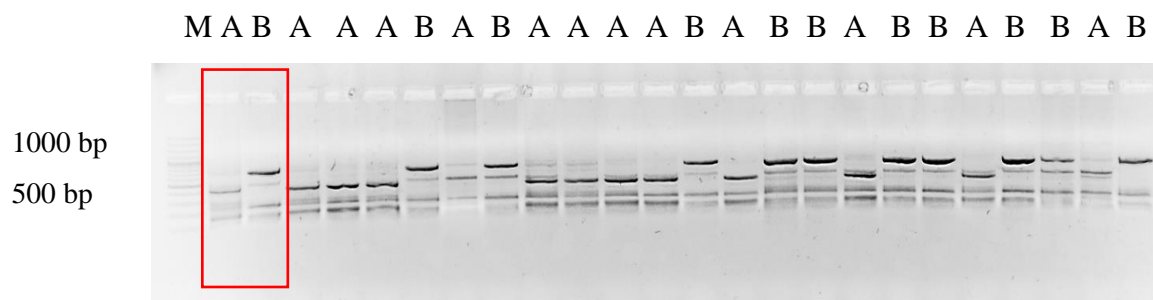
Legenda: červený rámeček – polymorfní restrikční místo, modrý rámeček – inserce / delece

Vyizolovaná genomová DNA z rekombinantních inbredních linií byla naamplifikována pomocí PCR s vybranými specifickými primery, poté byly PCR produkty restrikčně štěpeny s enzymy dle výsledků testu polymorfismu rodičů, výsledky byly

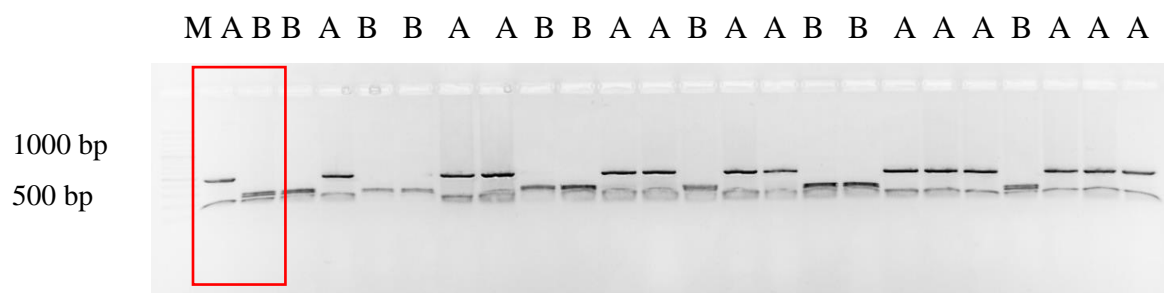
analyzovány pomocí elektroforézy (viz Obrázek 15) a byly zapsány do tabulky (viz Tabulka 7).

Obrázek 15: Ukázka restrikce amplifikovaných genů

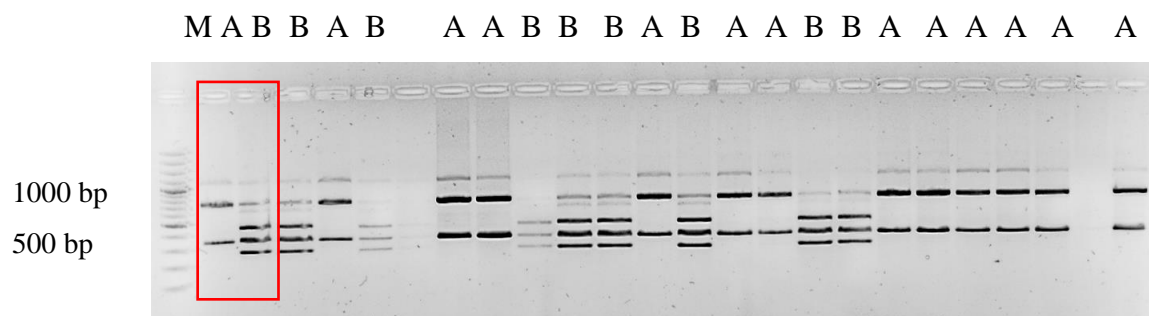
a) PsCam024624 / *MseI* (*TruI*)



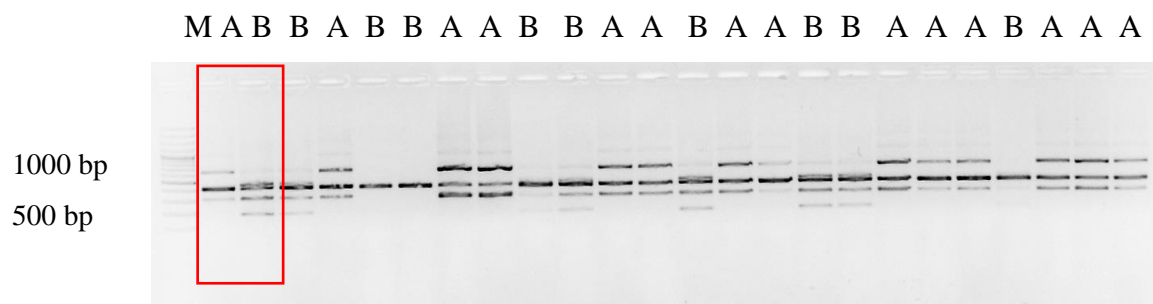
b) PsCam001551 (bHLH) / *TagI*



c) PsCam006687 / *RsaI*



d) PsCam048988 / *HinfI*



Legenda: M – standard molekulové hmotnosti (100 bp), A – JI1794, B – WL5839, červený rámeček – rodičovské genotypy

Dle výsledků je zřejmé, že markry v oblasti A lokusu a barva osemení na vazebné skupině II silně korelují s dormancí semene. Z toho plyne, že se jedná o genetickou vazbu, ve velmi malé rekombinační vzdálenosti. Bylo nalezeno několik RIL linií, u kterých gen pro bHLH nekoreloval s dormancí semene, ale koreloval s jinými studovanými primery v blízkosti (viz Tabulka 7), což naznačuje přítomnost rekombinační události. Některé RIL jsou v konfliktu, dormance vůbec nesouhlasí s žádným studovaným genem. Tyto RIL je nutné znovu prověřit, jestli případně nedošlo k chybě při hodnocení dormance semen nebo záměně vzorků.

Tabulka 7: Část hodnocení polymorfismu RIL linií

vzorky	barva osemení	test dormance (QTL) LGII	Mendelův A lokus (bHLH) LGII 35,6 cM	PsCam48988 LGII 38,4 cM	PsCam06687 LGII 40,5 cM	PsCam24624 (GLABRA2) LGIII
Jl1794	A	0,0	A	A	A	A
WL5839	B	1,0	B	B	B	B
1	B	0,2	-	-	-	-
2	B	0,9	B	B	B	A
3	B	0,3	A	A	A	A
4	B	0,7	B	B	B	A
5	B	1,0	B	B	B	B
6	A	0,1	A	A	A	B
7	A	0,0	A	A	A	B
8	B	1,0	B	B	B	A
9	B	1,0	B	B	B	A
10	A	0,0	A	A	B	A
12	A	0,0	A	A	A	A
13	B	1,0	B	B	B	B
14	A	1,0	A	A	A	A
15	A	0,1	A	A	A	B

Legenda: A – Jl1794; B – WL5839; 0,0 – dormantní; 1,0 – klíčící; modré pole – RIL rekombinantní v studované oblasti; žluté pole – konfliktní RIL

5.4 Výběr diferenciallyně exprimovaných genů (DEG)

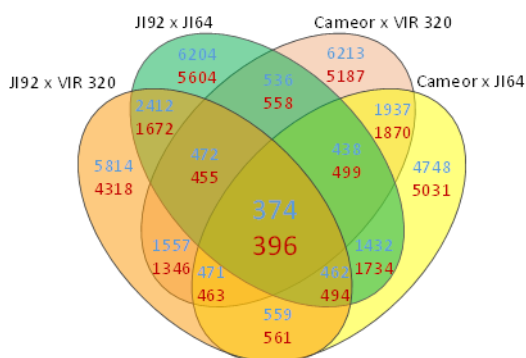
Hodnotila se exprese u vzorků domestikovaného *P. sativum* (cv. Cameor, Jl92) a planého *P. elatius* (Jl64, VIR320). Pro identifikaci kandidátních genů byla použita next-generation sequencing metoda Massive Amplification of cDNA Ends (MACE) provedená formou služby v laboratořích GenXPro GmbH (Frankfurt, Německo), jak je

popsánu v článku Zawada *et al.* (2014). Metoda MACE (Kahl *et al.*, 2012) na rozdíl od konvenční RNA-Seq, která generuje několik sekvencí ze stejného transkriptu, produkuje pouze jedno čtení sekvence z polymorfního 3'-konce každého polyadenylovaného transkriptu, což značně usnadňuje kvantifikaci transkriptů.

Stručně, cDNA z 5 µg celkové RNA byla náhodně fragmentována a biotinylované 3' konce byly zachyceny na streptavidinové matici. Knihovna byla připravena pro high-throughput sekvenování za použití TrueQuant adaptérů. Knihovna se skládala z 50 - 700 bp dlouhých fragmentů. 5' konce těchto knihoven byly sekvenovány na sekvenátoru HiSeq 2000 (Illumina) pro generování MACE tags, jednotlivé tags reprezentují jednotlivé transkripty. Z každého vzorku bylo získáno 8 až 15 milionů čtení.

Bioinformatická analýza provedená GenXPro identifikovala 144 000 transkriptů exprimovaných v osemeni. Následně bylo nalezeno celkem 10 132 až 11 808 transkriptů diferenciálně exprimovaných mezi kulturními a planými rodiči (Hradilová *et al.* 2017). Z těchto transkriptů bylo 770 rozdílně exprimovaných mezi všemi kulturním a planými genotypy, z nichž 374 bylo up-regulováno a 396 down-regulováno u kulturních genotypů (viz Obrázek 16).

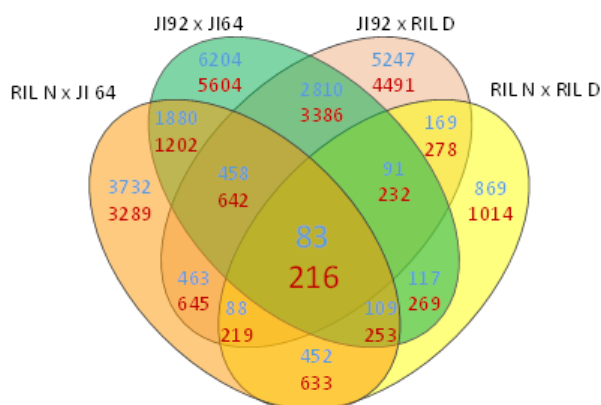
Obrázek 16: Venn diagram diferenciálně exprimovaných genů v osemeni mezi kulturním a planým genotypem



Navíc byly analyzovány bulky osemení v různých vývojových stádiích 7 dormantních a 7 nedormantních rekombinantních inbredních linií. Po srovnání JI64, JI92 a bulků bylo objeveno 83 up-regulovaných a 216 down-regulovaných genů (viz Obrázek

17). Nejvíce diferenciálně exprimovaných genů bylo nalezeno v biosyntetické dráze fenyylpropanoidů a flavonoidů.

Obrázek 17: Venn diagram diferenciálně exprimovaných genů v osemeni mezi rodičovskými genotypy JI92 a JI64 a bulky RILs



Gene ontology (GO) analýza byla použita k identifikování funkce a vztahu diferenciálně exprimovaných genů (DEGs). Výsledky z této analýzy byly exportovány do Blast2go pro finální anotaci. DEGs byly analyzovány, jestli nejsou přítomny v různých drahách Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

5.5 qRT-PCR analýza vybraných kandidátů

Byly vybrány kontrastní rodičovské linie planého (JI64, VIR320) a kulturního (Cameor, JI92) hrachu, které se liší v pigmentaci osemeni a míře dormance. Osemení byla separována od embrya ze vzorků odebraných ze všech čtyř testovaných genotypů hrachu (JI64, JI92, Cameor, VIR 320). Izolace RNA osemeni byla prováděna pomocí izolačního kitu BioTeke Plant Total RNA Extraction Kit. Izolovat RNA z osemeni planých genotypů hrachu bylo obtížné, pravděpodobně vzhledem k vysokému obsahu metabolitů (oligosacharidů a proanthokyanidinů). Koncentrace a čistota byla kontrolována pomocí spektrofotometru NanoDrop. Hodnoty koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 50 do 900 ng/μl. Poměr absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm (A260/A280) se

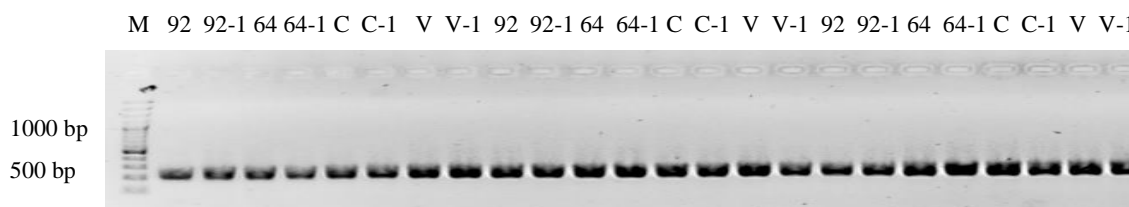
pohyboval okolo 2,0. Integrita, kvalita a částečně i množství RNA bylo zkontrolováno pomocí elektroforetické analýzy na agarózovém gelu.

Pro MACE analýzu byly vybrány diferenciólně exprimované geny na základě rozdílu v expresi a anotací. Bylo vybráno 14 diferenciólně exprimovaných genů analyzovaných pomocí qRT-PCR (Hradilová *et al.*, 2017). Dále byl testován gen GLABRA2 (vybrán na základě gene regulatory network analýzy) a geny MYB5 a ANR, faktory ovlivňující tvorbu proanthokyanidinů v osemeni.

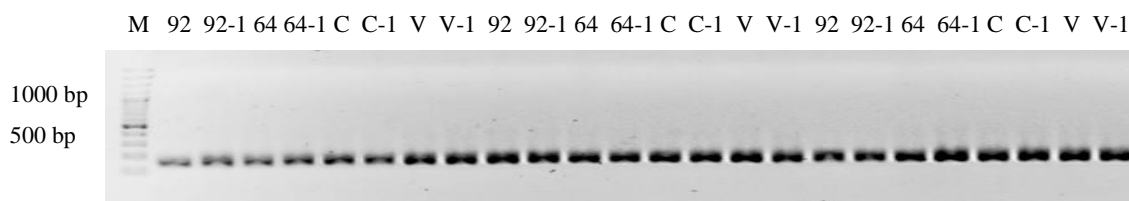
Metodou reverzní transkripce byla RNA převedena na cDNA. Vybrané geny byly amplifikovány pomocí qRT-PCR za použití specifických primerů, kdy bylo měřeno množství templátové DNA. Správný průběh, specifita a úspěšnost reakce byla ověřena gelovou elektroforézou na agarózovém gelu (viz Obrázek 18) a pomocí křivky teploty tání produktů (viz Obrázek 19). Reakce proběhla celkem ve třech opakováních, některé hodnoty byly dle elektroforézy v agarózovém gelu a křivky teploty tání z analýzy vyloučeny. U všech měření byly zaznamenány horší výsledky pro C-1 (starší stádium genotypu Cameor).

Obrázek 18: Ukázka analýzy specifity amplifikovaných genů v průběhu qRT-PCR u dvou stadií čtyř genotypů hrachu

a) PsCam024624

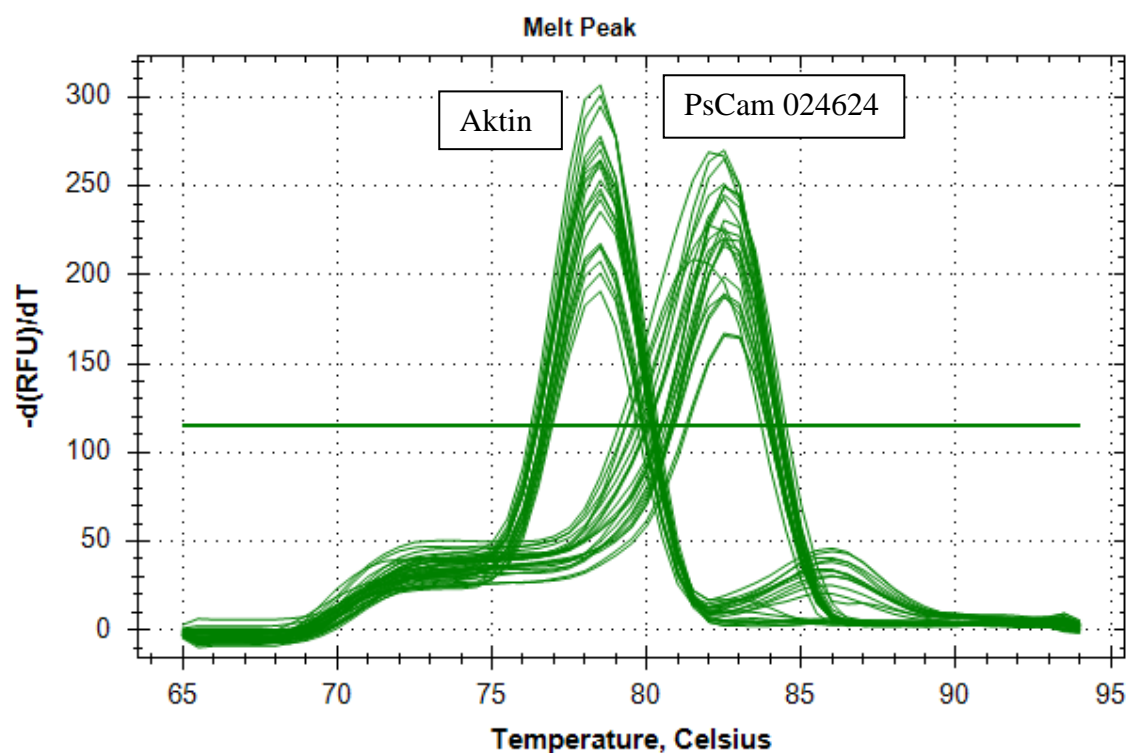


b) Aktin



Legenda: M - standard molekulové hmotnosti (100 bp); 64 - JI64, 92 - JI92, C - Cameor, V - VIR320; starší stádium – 64, 92, C, V; mladší stádium – 64-1, 92-1, V-1, C-1

Obrázek 19: Ukázka analýzy teploty tání (Tm)

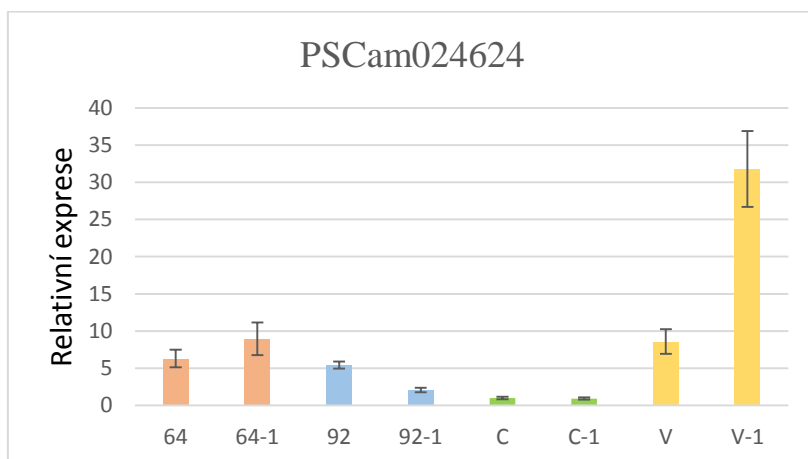


Proběhla relativní kvantifikace exprese vybraných genů metodou $2^{-\Delta\Delta CT}$, podle Livaka a Schmittgena (2001).

Na základě této analýzy bylo zjištěno, že z testovaných genů byl nejvíce exprimován gen pro PsCam024624, naopak nejméně byl exprimován gen pro PsANR (viz Graf 1, 2, 3).

Gen pro PsCam024624 byl up-regulovaný a byl hojně exprimován u genotypu planého nepigmentovaného a dormantního VIR320, nejvíce pak u staršího stádia. Stejně tak u planého pigmentovaného kultivaru JI64 byla pozorována vyšší exprese u staršího stádia. Nejmenší exprese oproti ostatním vzorkům byla u kulturního nepigmentovaného hrachu Cameor (viz Graf 1).

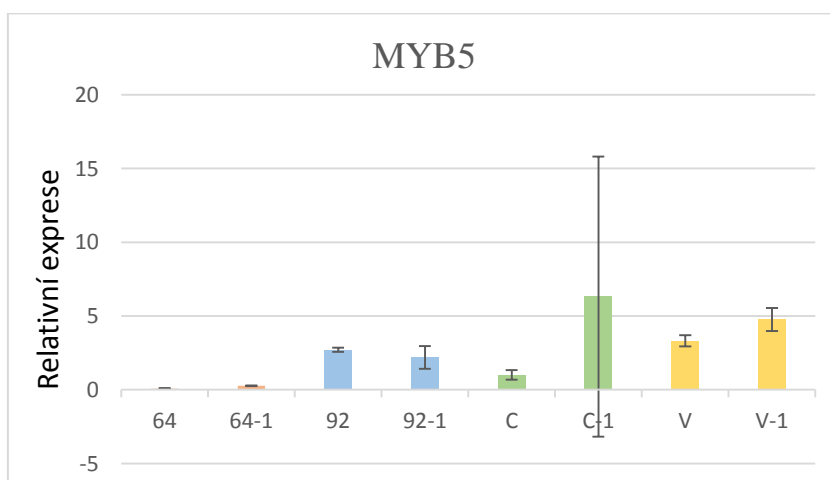
Graf 1: Relativní exprese genu pro PsCam024624 ve dvou vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



Legenda: 64 - JI64, 92 - JI92, C - Cameor, V - VIR320; starší stádium – 64, 92, C, V; mladší stádium – 64-1, 92-1, V-1, C-1

Expresse genu M_tMYB5 u většiny genotypů s věkem semene narůstala kromě JI92, kde je exprese u obou vývojových stádií téměř stejná. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u kulturního nepigmentovaného genotypu Cameor a planého nepigmentovaného a dormantního VIR320. U genotypu JI64 byla exprese tohoto genu na rozdíl od ostatních velmi nízká. Stejně tak nízkou hodnotu vykazuje mladší stádium genotypu Cameor (viz Graf 2).

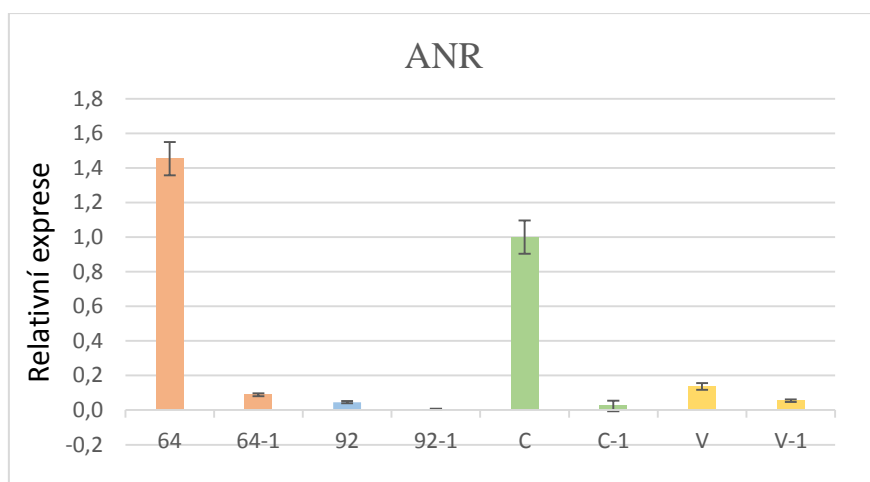
Graf 2: Relativní exprese genu pro PsMYB5 ve dvou vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



Legenda: 64 - JI64, 92 - JI92, C - Cameor, V - VIR320; starší stádium – 64, 92, C, V; mladší stádium – 64-1, 92-1, V-1, C-1

Gen ANR byl down-regulovaný. U většiny genotypů se exprese genu pro ANR snižovala. U kulturního pigmentovaného genotypu JI92 byla naměřena exprese nejmenší. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u mladšího vývojového stádia planého pigmentovaného genotypu JI64 a druhá nejvyšší exprese byla naměřena u mladšího vývojového stádia kulturního nepigmentovaného genotypu Cameor. Míra exprese ANR ve všech genotypech byla oproti ostatním genům velmi nízká (viz Graf 3).

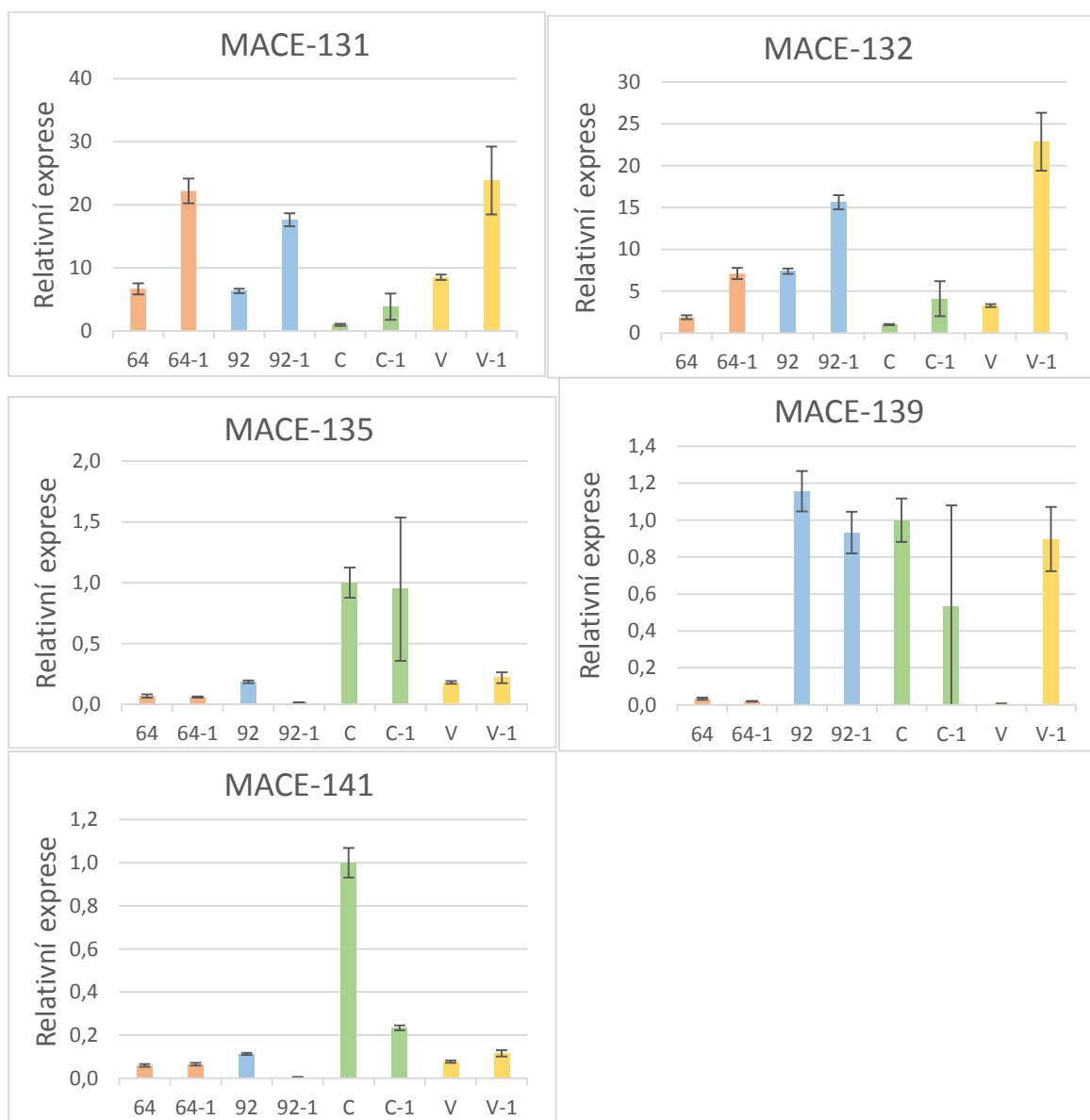
Graf 3: Relativní exprese genu pro PsANR ve dvou vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



Legenda: 64 - JI64, 92 - JI92, C - Cameor, V - VIR320; starší stádium – 64, 92, C, V; mladší stádium – 64-1, 92-1, V-1, C-1

Byly vybrány DEGs na základě rozdílů v expresi s ohledem na anotaci, které by mohly být považovány za kandidátní geny pro osetím zprostředkovanou dormanci. Dle MACE analýzy byly testovány následující geny: 4-coumarate CoA ligase (MACE-131), cytochrome P450 monooxygenase CYP97A10 (MACE-132), β -amyrin synthase (MACE-135), UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase (MACE-139), xyloglucan:xyloglucosyl transferase (MACE-141). Vybrané DEGs z MACE analýzy byly ověřeny pomocí qRT-PCR (viz Obrázek 19). Geny MACE-130, MACE-136, MACE-137, MACE-138 a MACE-142 nebyly měřeny, protože primery nebyly specifické. Geny MACE-133, MACE-134, MACE-140 a MACE-143 nebyly vyhodnoceny, protože dle analýzy teplot tání měly křivky nestandardní průběh. Geny MACE-135, MACE-139 a MACE-141 byly již vyhodnoceny a použity v nedávno publikovaném článku Hradilová *et al.*, 2017. Z těchto tří genů je velmi zajímavý gen MACE-139, který je hojně exprimován u kulturních genotypů JI92 a Cameor (viz Graf 4).

Graf 4: qRT-PCR výsledky vybraných kandidátních genů v porovnání s MACE analýzou ve dvou vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



Legenda: 64 - JI64, 92 - JI92, C - Cameor, V - VIR320; starší stádium – 64, 92, C, V; mladší stádium – 64-1, 92-1, V-1, C-1

6 Diskuze

Domestikace rostlin je zajímavý fenomén člověkem zrychlené evoluce. K objevení genetických změn spojených s tímto procesem se využívá křížení planých a kulturních genotypů (mapování na základě RILs) nebo nově genome wide mapping (celogenomová analýza pomocí sekvenování typu DArTseq).

Vzhledem k velikosti (4,6 Gb) je genomu hrachu dosud neznámý a nedostupný. Obecně máme velký počet markerů (řádově desetitisíce, DArTseq analýzy), ale malý počet mapovacích jedinců RIL populace (112). Bylo proto očekáváno, že nebude možné přesněji určit pozici daných lokusů, a proto byla paralelně použita transkriptomická srovnávací analýza pro zjištění diferenciálně exprimovaných genů (řádově stovky).

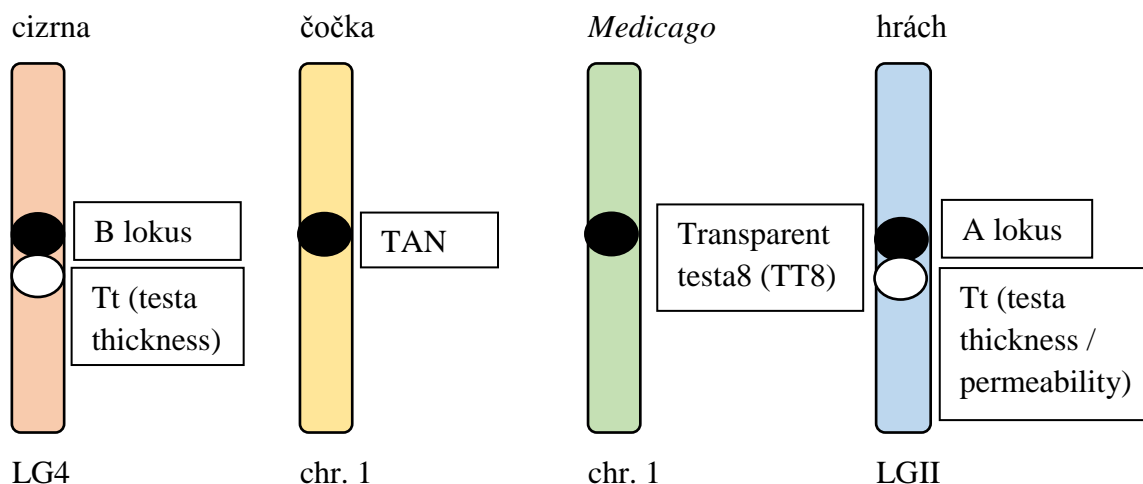
6.1 Dormance vs. pigmentace osemení

Přestože byla dormance semen identifikována jako monogenní vlastnost u mungo fazole (Isemura *et al.*, 2012), šest QTL bylo detekováno u vigny, rýže a fazole (Kongjaimun *et al.*, 2012), dva až tři lokusy byly popsány u hrachu (tloušťku osemení a strukturu povrchu osemení) (Weeden, 2007), pomocí testování RIL populace bylo v případě dormance semen zjištěno kontinuum fenotypů (viz Obrázek 11), což naznačuje spíše kvantitativní základ tohoto znaku. Studie Weeden (2007) byla provedena s nízkým počtem markerů a testovaných semen, zatímco při použití genome-wide DArTseq mapování (s asi 10 000 SNPs na 140 RIL liniích) byly objeveny 4 až 6 QTL (nepublikováno).

Hellens *et al.* (2010) zjistili, že gen kódující bHLH transkripční faktor je přítomen v oblasti A lokusu hrachu a jeho mutací se vyvíjí hrách s bílými květy. K podrobnějšímu mapování oblasti A lokusu byla použita konsenzuální mapa získaná pomocí GenoPea 13,2K SNP Arraye a 12 RILs (Tayeh *et al.*, 2015) (viz Obrázek 21). Dle naší genomické analýzy bylo zjištěno, že lokus A a barva osemení na vazebné skupině II jsou ve vazbě s dormancí semene. Je možné, že barva osemení se svezla („hitchhiking“) s dormancí. Lokus pro dormanci a tloušťku osemení identifikovaný na LGII na základě celogenomové DArTseq analýzy se nachází v homologní, resp. syntenické pozici u čočky (*TAN* gen, Mirali *et al.*, 2016), cizrny (*B* lokus, Penmetsa *et al.*, 2016), hrachu (*A* lokus, Hellens *et al.*,

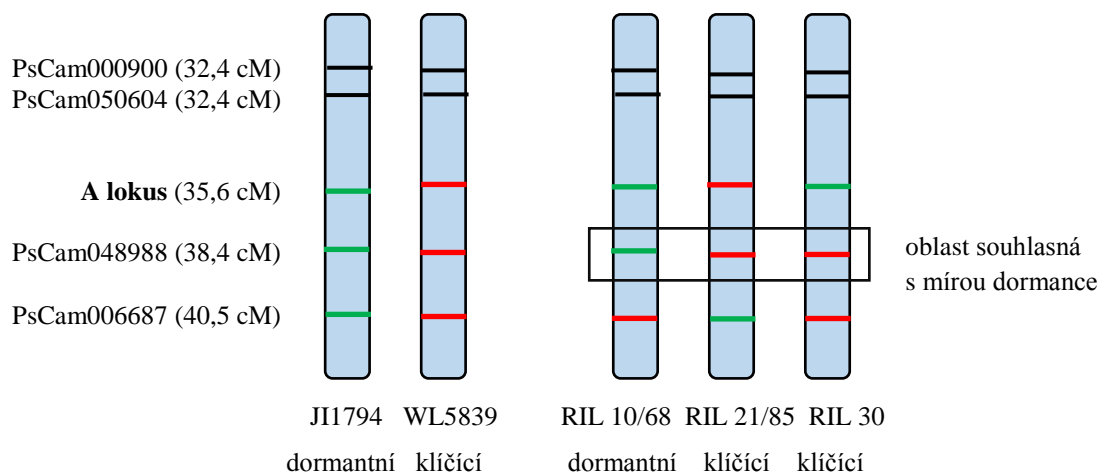
2010) a *Medicago* (*MtTT8*, Li *et al.*, 2016) (viz Obrázek 20). Každý z těchto lokusů podmiňuje barvu osemení a květu a v případě cizrny je popsán v blízkosti se nacházející lokus pro tloušťku osemení (Gil *et al.*, 1993; Millan *et al.*, 2010) (viz Obrázek 20).

Obrázek 20: Syntenní lokus pro pigmentaci a dormanci semene



Bylo nalezeno několik RIL linií rekombinantních ve studované oblasti, u kterých gen pro bHLH nekoreloval s dormancí semene (viz Obrázek 21). Podle těchto RILs je marker PsCam048988 nejbliže genu podmiňujícího dormanci semene, u všech těchto RILs souhlasí s mírou dormance. Tyto RILs budou použity pro další studium osemení. Budou analyzovány předchozí mladší generace (F_3 - F_5) vybraných linií, kde lze očekávat možnost dalších rekombinací.

Obrázek 21: Schéma oblasti A lokusu na LGII (s vybranými geny pro mapování této oblasti) rodičů a vybraných RILs rekombinantních v dané oblasti



Legenda: zelený marker - A (JI1794 - dormantní), červený marker - B (WL5839 - klíčící), černý marker – bez polymorfismu

6.2 Diferenciální exprese - transkriptomická analýza osemení

V případě několika znaků bylo prokázáno, že domestikační proces je regulován na úrovni transkripce (Dobley *et al.*, 1997; Konishi *et al.*, 2006). Dosud bylo provedeno jen velmi málo studií za účelem objevení transkriptomických změn mezi planými a kulturními plodinami (např. osemení pšenice, Zou *et al.*, 2015). Byla provedena komplexní transkriptomická, metabolomická a anatomická analýza porovnávající semena a lusky planého a kulturního hrachu ve vztahu ke ztrátě dormance semen a pukavosti lusku (Hradilová *et al.*, 2017).

Vývoj semene byl důkladně studován u řady plodin, včetně luštěnin, zejména se zaměřením na vývoj embrya (Bewley *et al.*, 2013). Transkripční změny během vývoje semene a lusku byly studovány na kajanu (Pazhamala *et al.*, 2016), sóji (Aghamirzaie *et al.*, 2015; Redekar *et al.*, 2015), podzemnici (Wan *et al.*, 2016), *Medicago* (Gallardo *et al.*, 2006; Benedito *et al.*, 2008; Verdier *et al.*, 2013) a hrachu (Liu *et al.*, 2015), ale žádná studie neprovedla srovnání planého a kulturního genotypu.

V této diplomové práci byla provedena srovnávací analýza exprese vybraných genů zapojených do biosyntetické dráhy proanthokyanidinů. Testování probíhalo na vzorcích ze čtyř genotypů hrachu, z nichž dva byly kulturní s nedormantními semeny (Cameor, JI92) a dva plané s dormantními (VIR320, JI64), od každé skupiny pak jeden s pigmentovaným osemením (JI64, JI92) a druhý s nepigmentovaným (Cameor, VIR320).

Z rostliny každého genotypu byly odebírány dvě časově odlišná vývojová stadia lusků, resp. semen (15 a 30 DAA). Toto rozdělení je však do jisté míry relativní, neboť každý sledovaný genotyp má odlišnou rychlost vývoje, tj. plané formy rostou a vyvíjejí se rychleji (VIR320, JI64) než kulturní (Cameor, JI92).

Osemení hrachu obsahuje velké množství sacharidů (Castell *et al.*, 1996) a fenolických látek, byla v nich naměřena největší koncentrace v rámci bobovitých (Dueñas *et al.*, 2003). Je známo, že proanthokyanidiny se váží na RNA a brání následně její extrakci (Wang *et al.*, 1994). Kvůli těmto složkám byla izolace RNA obtížnější než u jiných pletiv. To také pravděpodobně způsobilo nižší výtěžek a kvalitu RNA u planého hrachu, který má silnější osemení a také více těchto inhibujících látek.

Za účelem vyloučení genů výhradně mezi kontrastními rodičovskými genotypy byly použity fenotypově klasifikované bulky (dormantní vs. nedormantní) získané z rekombinantních inbredních linií. Použitím bulků byly nalezeny homozygotní SNPs spojené s daným bulkem (dormantní vs. nedormantní). Vzhledem k absenci genomu hrachu byl použit syntenní genom *Medicago truncatula*. Spojení BSA s high throughput RNA sequencing bylo úspěšně použito pro mapování genů a pro identifikaci diferencióálně exprimovaných genů (DEGs).

Geny pro 4-coumarate CoA ligase (MACE-131) a UDP-glucosyl transferase (MACE-139) souhlasili ve všech čtyřech genotypech s daty získanými pomocí Massive analysis of cDNA Ends (MACE). Tyto geny budou dále testovány. Relativní exprese genu MACE-135 byla kompletně v kontrastu s MACE výsledky, kde vyšší hodnoty byly naměřeny u planých dormantních genotypů. Rozpor mezi qRT-PCR a MACE daty byl nalezen u JI64 a JI92 v případě genů MACE-132 a MACE-141.

Přestože zjištěné diferencióálně exprimované geny mezi dormantními a nedormantními semeny hrachu patří do různých GO a KEGG drah, největší počet anotovaných genů bylo nalezeno u fenylypropanoidových a flavonoidových drah. Tyto geny jsou zapojeny do různých činností, jako je UV filtrace, fixace atmosférického dusíku a ochrana buněčných stěn (Zhao *et al.*, 2013). Podle studií na *Medicago* (Verdier *et al.*, 2013) a sóji (Ranathunge *et al.*, 2010) je genová exprese v osemení komplexní a dynamická. V současné době nemůžeme anotovat 10 % zjištěných transkriptů, se zveřejněním genomu hrachu lze očekávat zlepšení této situace.

6.3 Proanthokyanidiny

Změny v obsahu proanthokyanidinů u hrachu byly již zmíněny v článku Troszyska *et al.* (2002), ale nebylo provedeno srovnání planého hrachu s kulturním. Proanthokyanidinová biosyntéza a její regulace byla studována u *Arabidopsis* za použití *transparent testa (tt)* mutantů (Lepiniec *et al.*, 2006) a byly charakterizovány geny, které ovlivňují metabolismus flavonoidů (Bradford *et al.*, 2009). Mnohé z těchto genů, účastnících se flavonoidové biosyntézy, ovlivňují dormanci semen *Arabidopsis*, naznačující roli pigmentů v tomto procesu (Debeaujon *et al.*, 2000). Podobně jsou proanthokyanidiny syntetizovány v osemení *Medicago* (Lepiniec *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010).

Homolog genu MYB5 (PsMYB5) byl vybrán, protože se jedná o jeden z faktorů ovlivňujících tvorbu proanthokyanidinů v osemeni. Společně s MYB14 aktivují v přítomnosti TT8 a WD40-1 promotor ANR a LAR a pomocí mutantní linie *Medicago truncatula* bylo prokázáno, že ovlivňují formování osemeni (Liu *et al.*, 2014). Exprese genu PsMYB5 u většiny genotypů kromě JI92, kde je exprese téměř stejná, s věkem semene narůstala. U pigmentovaného planého JI64 byly naměřené hodnoty velmi nízké. Toto zjištění je potřeba ještě prověřit zopakováním analýzy na novém materiálu. Exprese genu MtMYB5 u většiny genotypů s věkem semene narůstala kromě JI92, kde je exprese u obou vývojových stádií téměř stejná. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u planého nepigmentovaného a dormantního VIR320 a u staršího stádia kulturního nepigmentovaného genotypu Cameor, avšak u staršího stádia genotypu Cameor se na základě křivek teplot tání a elektroforézy musely ze tří opakování dvě opakování vyřadit, proto je zde velká odchylka. Bohužel vzhledem k obtížím s izolací RNA nebylo dostatek materiálu pro opakování této analýzy. U genotypu JI64 byla exprese tohoto genu na rozdíl od ostatních velmi nízká, Stejně tak nízkou hodnotu vykazuje mladší stádium genotypu Cameor. Ke stejným výsledkům dospěla i Tereza Vojtková ve své práci (2016).

Míra exprese ANR ve všech genotypech byla oproti ostatním genům velmi nízká. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u mladšího vývojového stádia planého pigmentovaného genotypu JI64 a druhá nejvyšší exprese byla naměřena u mladšího vývojového stádia kulturního nepigmentovaného genotypu Cameor. V této diplomové práci byl pokles exprese genu PsANR pozorován u většiny genotypů. U kulturního pigmentovaného genotypu JI92 byla naměřená exprese nejmenší u obou stádií, což je v rozporu s výsledky Terezy Vojtkové (2016). V publikaci Ferraro *et al.* (2014) byl pozorován pokles exprese genu PsANR s rostoucím stářím semene hrachu kultivaru Courier, což je kulturní hrách podobný v této práci použitému genotypu JI92, který má pigmentované osemeni.

6.4 GLABRA2

Gen GLABRA2 (GL2) byl vybrán na základě výsledků z gene regulatory network analýzy, podle které je centrálním regulačním genem Medtr2g101720 (gen GLABRA2, homolog u *Arabidopsis* At1g79840 a *P. sativum* PsCam024624). GL2 kóduje transkripční faktor, který na základě své proteinové sekvence patří do třídy IV a homeodomain-leucin zipper (HD-ZIP) genové rodiny (Rerie *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2006). Bylo prokázáno, že GL2 řídí vlastnosti několika epidermálních buněčných typů, včetně

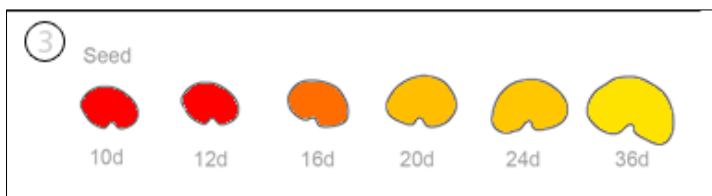
morfogeneze trichomů jako je větvení, prodloužení a zrání (Koornneef *et al.*, 1982; Rerie *et al.*, 1994; Szymanski *et al.*, 1998; Kirik *et al.*, 2005), atrichoblastů (Masucci *et al.*, 1996) a osemení (Koornneef *et al.*, 1982; Western *et al.*, 2001). Mutace GL2 způsobuje abnormální strukturu osemení a absenci biosyntézy slizu u *Arabidopsis* (Rerie *et al.*, 1994; Masucci *et al.*, 1996). Tento gen je také zapojen do biosyntézy flavonoidů. GL2 se zdá být zajímavý, protože je také exprimován v osemení *Arabidopsis* genotypu Columbia, ale ne v osemení genotypu Wassilevskaja, dvou genotypů odlišných v míře dormance semen.

Dle genomické analýzy tohoto genu bylo zjištěno, že nekoreluje s dormancí semene.

Gen pro PsCam024624 byl hojně exprimován u genotypu planého nepigmentovaného VIR320, nejvíce u staršího stádia. Stejně tak u planého kultivaru JI64 byla pozorována vyšší exprese u staršího stádia. Nejmenší exprese oproti ostatním vzorkům byla u nepigmentovaného hrachu Cameor.

Exprese homologního Medtr2g101720 *Medicago truncatula* je nejvyšší v ranných fázích vývoje semene (po 10 dnech) a se zráním semene se snižuje (viz Obrázek 22), což je v rozporu s našimi výsledky zjištěnými u osemení hrachu.

Obrázek 22: Exprese genu Medtr2g101720 v semeni *Medicago* (převzato z <http://bar.utoronto.ca/efpmedicago/cgi-bin/efpWeb.cgi>)



Legenda: červená – vysoká exprese, žlutá – nízká exprese, 10d – 36d – stáří semene

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo provést genomickou a transkriptomickou analýzu genů aktivních během vývoje osemení planého (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) a kulturního (*Pisum sativum* subsp. *sativum*) hrachu, konkrétně těchto genotypů: planý s pigmentovaným osemením JI64, kulturní s pigmentovaným osemením JI92, planý s nepigmentovaným osemením VIR320 a kulturní kultivar s nepigmentovaným osemením Cameor. V této práci byla provedena srovnávací studie mezi planým a kulturním hrachem a bylo provedeno mapování vybrané oblasti poblíž Mendelova A lokusu. Byly identifikovány geny vykazující diferenciální expresi v příslušných rodičích a byla kvantifikována exprese vybraných genů biosyntetické dráhy proantokyanidinů (MtMYB5, PsANR), geny z MACE analýzy a gen GLABRA2 (PsCam024624).

Dle naší genomické analýzy bylo zjištěno, že lokus A a barva osemení na vazebné skupině II souvisí s dormancí semene. Gen podmiňující dormanci semene je blízko markeru PsCam048988. Je možné, že barva osemení se „svezla“ s dormancí. Lokus pro dormanci a tloušťku osemení identifikovaný na LGII na základě celogenomové DArTseq analýzy se nachází v homologní, resp. syntenické pozici u čočky (*TAN* gen, Mirali *et al.*, 2016), cizrny (*B* lokus, Penmetsa *et al.*, 2016), hrachu (*A* lokus, Hellens *et al.*, 2010) a *Medicago truncatula* (*MtTT8*, Li *et al.*, 2016). Bylo nalezeno několik RILs rekombinantních ve studované oblasti, u kterých *A* lokus nekoreloval s dormancí semene. Tyto RILs budou použity pro další studium.

Pro MACE analýzu byly za účelem vyloučení genů výhradně mezi kontrastními rodičovskými genotypy použity fenotypově klasifikované bulky (dormantní vs. nedormantní) získané z rekombinantních inbredních linií. Spojení BSA s high throughput RNA sequencing bylo úspěšně použito pro mapování genů a pro identifikaci diferenciálně exprimovaných genů (DEGs). Přestože zjištěné diferenciálně exprimované geny mezi dormantními a nedormantními semeny hrachu patří do různých GO a KEGG drah, největší počet anotovaných genů bylo nalezeno u fenylypropanoidových a flavonoidových drah. Exprese genů pro 4-coumarate CoA ligase (MACE-131) a UDP-glucosyl transferase (MACE-139) souhlasila ve všech čtyřech genotypech s daty získanými pomocí Massive analysis of cDNA Ends (MACE). Relativní exprese genu MACE-135 byla naopak v kontrastu s MACE výsledky, kde vyšší hodnoty byly naměřeny u planých dormantních

genotypů. Rozpor mezi qRT-PCR a MACE daty byl nalezen u JI64 a JI92 v případě genů MACE-132 a MACE-141. Možným vysvětlením je proces bulkování vývojových stádií použitý při MACE analýze.

Největší exprese genu pro PsANR, který katalyzuje vznik *cis*-flavan-3-olů, byla, jak u genotypu s pigmentovaným osemením JI64, tak i u kultivaru Cameor s osemením nepigmentovaným. V této diplomové práci byl pokles exprese genu PsANR pozorován u většiny genotypů.

Expresí genu pro PsMYB5, který slouží jako transkripční faktor pro ANR, měla podobnou expresi u všech genotypů kromě pigmentovaného planého JI64, kde byla exprese překvapivě nízká. Expresí genu PsMYB5 u většiny genotypů kromě JI92 s věkem semene narůstala. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u planého a dormantního VIR320 a překvapivě také u staršího stádia kulturního nepigmentovaného genotypu Cameor.

Dle gene regulatory network analýzy bylo zjištěno, že gen GLABRA2 je možným uzlovým regulátorem. Genomická analýza genu GLABRA2 však ukázala, že nekoreluje s dormancí semene. Dle transkriptomické analýzy byl gen hojně exprimován u genotypu planého nepigmentovaného VIR320, nejvíce u staršího stádia. Stejně tak u planého kultivaru JI64 byla pozorována vyšší exprese u staršího stádia, což nesouhlasí s popsanou expresí u *Medicago truncatula*. Je však možné, že hrachový homolog, s nímž byla provedena qPCR není nejbližší k *Medicago* GLABRA2 genu, což se opět ukáže až s dostupným genomem hrachu.

8 Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
ANR	anthokyanidin reduktáza
ANS	anthokyanidin syntáza
AP/EXO	alkaline phosphatase/exonuclease
BAN	BANYULS
bHLH	basic helix–loop–helix
BLAST	basic local alignment search tool
bp	páry bází
C	jedna úplná kopie jaderného genomu
cDNA	complementary DNA
cM	centimorgan, jednotka relativní vzdálenosti genů na chromozomu
cv.	kultivar
DAA	days after anthesis
DArTseq	Diversity Arrays Technology
DEG	diferenciálně exprimovaný gen
DEPC	diethyl pyrokarbonát
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
F	forward
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
GA	giberelin
GITC	guanidium thiokyanát-fenol-chloroform
GL2	GLABRA2
GO	gene orthology
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LAR	leukoanthokyanidin reduktáza
LG	vazebná skupina
MACE	Massive Analysis of cDNA Ends
MATE	multi-drug and toxic compound extrusion
MYB	myeloblastosis

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	next-generation sequencing
<i>P.</i>	rod <i>Pisum</i>
PA	proanthokyanidin
PCR	polymerázová řetězová reakce
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
QTL	lokusy kvantitativních znaků
R	reverse
RIL	rekombinantní inbrední linie
RNA	ribonucleic acid
RNA-Seq	RNA sekvenování
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
subsp. (= ssp.)	poddruh (subspecies)
TBE	Tris + kyselina boritá + EDTA
TT	TRANSPARENT TESTA
TTG1	TRANSPARENT TESTA GLABRA 1
<i>vs.</i>	<i>versus</i>
WDR	tryptophan aspartic acid repeat

9 Literatura

Abbo, S., Lev-Yadun, S., Gopher, A. (2012): Plant domestication crop evolution in the Near East: on events processes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31: 241-257.

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 grain legumes. *Trends Plant Sci.* in press. doi.org/10.1016/j.tplants.2013.12.002.

Aghamirzaie, D., Batra, D., Heath, L. S., Schneider, A., Grene, R., Collakova, E. (2015): Transcriptome-wide functional characterization reveals novel relationships among differentially expressed transcripts in developing soybean embryos. *BMC Genomics* 16 (1): 1.

Alves-Carvalho, S., Aubert, G., Carrère, S., Cruaud, C., Brochot, A. L., Jacquin, F., Silva, C. (2015): Full-length de novo assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. *The Plant Journal* 84 (1): 1-19.

Baskin, J. M. Baskin, C. C. (1985): The annual dormancy cycle in buried weed seeds: a continuum. *BioScience* 35: 492-498.

Baskin, C. C., Baskin, J. M., Li, X. (2000): Taxonomy, anatomy evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Spec. Biol.* 15: 139-152.

Baskin, J. M., Baskin, C. C. (2004): A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14 (1): 1-16.

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.

Baudry, A., Heim, M. A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B., Lepiniec, L. (2004): TT2, TT8, TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 39: 366-380.

Baudry, A., Caboche, M., Lepiniec, L. (2006): TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 46: 768-779.

Benedito, V. A., Torres-Jerez, I., D Murray, J. D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., Moreau, S., Niebel, A., Frickey, T., Weiller, G., He, J., Dai, X., Zhao, P. X., Tang, Y., Udvardi, M. K. (2008): A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 55: 504-513.

Bernhardt, C., Zhao, M., Gonzalez, A., Lloyd, A., Schiefelbein, J. (2005): The bHLH genes *GL3* and *EGL3* participate in an intercellular regulatory circuit that controls cell patterning in the *Arabidopsis* root epidermis. *Development* 132: 291-298.

Berry, T., Bewley, J. D. (1992): A role for the surrounding fruit tissues in preventing the germination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. A consideration of the osmotic environment and abscisic acid. *Plant Physiology* 100 (2): 951-957.

Bevilacqua, L. R., Fossati, F., Dondero G. (1987): 'Callose' in the impermeable seed coat of *Sesbania punicea*. *Ann. Botany* 59: 335-341.

Bevilacqua, L. R., Roti-Mihelozzi, G., Modenesi, P. (1989): The watertight dormancy of *Melilotus alba* seeds: further observations on the palisade cell wall. *Can. J. Botany* 67: 3453-3456. *Botan. Nederl.* 35: 475-487.

Bewley, J. D., Black, M., Halmer, P. (2006): *The encyclopedia of seeds: science, technology and uses*. Cabi Series. CABI: 203.

Bewley, J. D., Bradford, K., Hilhorst, H., Nonogaki, H. (2013): *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3rd edition.

Bhalla, P. L., Slattery, H. D. (1984): Callose Deposits Make Clover Seeds Impermeable to Water. *Ann. Botany* 53: 125-128.

Bogdanova, V. S., Galieva, E. R., Kosterin, O. E. (2009): Genetic analysis of nuclear-cytoplasmic incompatibility in pea associated with cytoplasm of an accession of wild subspecies *Pisum sativum subsp. elatius* (Bieb.). *Schmahl. Theor Appl Genet* 118: 801-809.

Bradford, K., Nonogaki, H. (2009): *Seed Development, Dormancy and Germination*. *Annual Plant Reviews* 27.

Castell, A. G., Guenter, W., Igbasan, F. A. (1996): Nutritive value of peas for nonruminant diets. *Animal Feed Science and Technology* 60 (3): 209-227.

Cook, D. R., Vandenbosch, K., De Bruijn, F. J., Huguet, T. (1997): Model legumes get the nod. *Plant Cell* 9: 275-280.

Cook, D. R. (1999): *Medicago truncatula* – a model in the making! *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 301-304.

- Dahl, W. J., Foster, L. M., Tyler, R. T. (2012): Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition* 108: 3-10.
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K. M., Koornneef, M. (2000): Influence of the testa on seed dormancy, germination, longevity in *Arabidopsis*. *PlantPhysiol.* 122: 403-414. doi:10.1104/pp.122.2.403.
- Dixon, R. A., Xie, D. Y., Sharma, S. B. (2005): Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165: 9-28.
- Dolejší, A. (1987): Zelenina na zahrádce. SZN Praha: 166-168.
- Dueñas, M., Sun, B., Hernández, T., Estrella, I., Spranger, M. I. (2003): Proanthocyanidin Composition in the Seed Coat of Lentils (*Lens culinaris* L.). *J Agr Food Chemy* 51: 7999-8004.
- 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.
- 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.
- Finch-Savage, W. E., Leubner-Metzger, G. (2006): Seed dormancy the control of germination. *New Phytol.* 171: 501-523.
- Gallardo, K., Lesignor, K., Darmency, M., Burstin, J., Thompson, R., Rochat, C., Boutin, J. P., Kuester, H., Buitink, J., Leprince, O., Limami, A., Grusak, M. A. (2006): Seed Biology of *Medicago truncatula*. The *Medicago truncatula* handbook. ed. Mathesius, U., Journet, E. P., Sumner, L. W. ISBN 0-9754303-1-9.
- Gil, J., Cubero, J. I. (1993): Inheritance of Seed Coat Thickness in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its Evolutionary Implications. *Plant Breeding* 111: 257-260. doi:10.1111/j.1439-0523.1993.tb00639.x.
- Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G., Soppe, W. J. J. (2012): Molecular mechanisms of seed dormancy. *Pl. Cell Environ.* 35: 1769-1786.
- Güneş, F. (2013): Seed characteristics testa textures of *Pratensis*, *Orobon*, *Lathyrus*, *Orobastrum* *Cicercula* sections from *Lathyrus* (*Fabaceae*) in Turkey. *Plant. Syst. Evol.* 299: 1935-1953.

Fuller, D. Q., Allaby, R. G. (2009): Seed Dispersal and Crop Domestication: shattering, germination and seasonality in evolution under cultivation. Fruit development and Seed Dispersal. Annual Plant Reviews Volume 38: 238-295.

Ferraro, K., Jin, A. L., Nguyen, T. D., Reinecke, D. M., Ozga, J. A., Ro, D. K. (2014): Characterization of proanthocyanidin metabolism in pea (*Pisum sativum*) seeds. BMC Plant Biology 14 (1): 1.

Hamly, D. H. (1932): Softening of the seeds of *Melilotus alba*. Bot. Gaz. 93: 345-375.

Hamly, D. H. (1935): The light line in *Melilotus alba*. Bot. Gaz. 96: 753-757.

Hammer, K. (1984): Das Domestikations syndrom. Kulturpflanze 11: 11-34.

Hardman, A. R. (1976): Structural aspects of pathways of nutrient flow to developing embryo cotyledons of *Pisum sativum* L. Aust. J. Botany 24: 711-721.

Harlan, J. R. (1992): Crops and Man. American Society of Agronomy Crop Science Society of America, Madison, WI USA: 284.

Harper, J. L. (1957): The ecological significance of dormancy its importance in weed control. Proceedings of the IVth International Congress of Crop Protection: 415- 420.

Harris, W. M. (1983): On the development of macrosclereids in seed coats of *Pisum sativum* L. Amer. J. Botany 70: 1528-1535.

Hellens, R. P., Moreau, C., Lin-Wang, K., Schwinn, K. E., Thomson, S. J. (2010): Identification of Mendel's White Flower Character. PLoS ONE 5 (10).

Hradilová, I., Trnený, O., Válková, M., Cechova, M., Janská, A., Khan, A. W., Prokešová, L., Winter, P., Rotter, B., Krezdorn, N., Varshney, R. K., Hanáček, P., Soukup, A., Bednár, P., Smýkal, P. (2017): A combined comparative transcriptomic, metabolomic and anatomical analyses of two key domestication traits: pod dehiscence and seed dormancy in pea (*Pisum sp.*). Front. Plant Sci. 8: 542. doi:10.3389/fpls.2017.00542.

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

Chen, H., Osuna, D., Colville, L., Lorenzo, O., Graeber, K. (2013): Transcriptome-Wide Mapping of Pea Seed Ageing Reveals a Pivotal Role for Genes Related to Oxidative Stress and Programmed Cell Death. PLoS ONE 8 (10).

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.

Jones, S. I., Vodkin, L. O. (2013): Using RNA-Seq to profile soybean seed development from fertilization to maturity. PLoS ONE 8.

Junker, A., Rohn, H., Schreiber, F. (2012): Visual analysis of transcriptome data in the context of anatomical structures and biological networks. Frontiers in Plant Science 3: 252.

Kahl, G., Molina, C., Rotter, B., Jüngling, R., Frank, A., Krezdorn, N. (2012): Reduced representation sequencing of plant stress transcriptomes. J. Plant Biochem. Biotechnol. 21: 119-127. doi: 10.1007/s13562-012-0129-y

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 .

Kępczynski, J., Bihun, M., Kępczyńska, E. (1997): Ethylene involvement in the dormancy of *Amaranthus* seeds. Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene: 113-122.

Koornneef, M., Dellaert, L. W. M., Van Der Veen, J. H. (1982): EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.). Heynh. Mutat. Res. 93: 109123.

Le, B. H., Cheng, C., Bui, A. Q., Wagmaister, J. A., Henry, K. F., Pelletier, J., Goldberg, R. B. (2010): Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107 (18): 8063-8070.

Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., Caboche, M. (2006): Genetics biochemistry of seed flavonoids. Ann. Rev. Plant Biol. 57: 405-430.

Li, J., Ou-Lee, T. M., Raba, R., Amundson, R. G., Last, R. L. (1993): Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. Plant Cell 5: 171-179.

Li, S. F., Milliken, O. N., Pham, H., Seyit, R., Napoli, R., Preston, J., Koltunow, A. M., Parish, R. W. (2009): The *Arabidopsis* MYB5 Transcription Factor Regulates Mucilage Synthesis, Seed Coat Development, and Trichome Morphogenesis. The Plant Cell 21: 72-89.

Li, P., Chen, B., Zhang, G., Chen, L., Dong, Q., Wen, J., Mysore, K. S., Zhao, J. (2016): Regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis by *Medicago truncatula* bHLH transcription factor MtTT8. *New Phytol.* 210: 905-921.

Liu, Ch., Jun, J. H., Dixon, R. A. (2014): MYB5 and MYB14 play pivotal roles in seed coat polymer biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 165: 1424-1439.

Liu, N., Zhang, G., Xu, S., Mao, W., Hu, Q., Gong, Y. (2015): Comparative Transcriptomic Analyses of Vegetable and Grain Pea (*Pisum sativum* L.) Seed Development. *Front. Plant Sci.* 6: 1039. doi: 10.3389/fpls.2015.01039.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25 (4): 402-408.

Ma, F., Cholewa, E., Mohamed, T., Peterson, C. A., Gijzen, M. (2004): Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. *Ann. Botany* 94: 213-228.

Maas, B. L. (2005): Changes in seed morphology, dormancy germination from wild to cultivated hyacinth bean germplasm (*Lablab purpureus*: *Papilionoideae*). *Genetic Resources Crop Evolution* 53: 1127-1135.

Macas, J., Neumann, P., Navrátilová, A. (2007): Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) Genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 8 (1): 1.

Matilla, A., Gallardo, M., Puga-Hermida, M. I. (2005): Structural, physiological molecular aspects of heterogeneity in seeds: a review. *Seed Sci. Res.* 15: 63-76.

Marbach I., Mayer A. M. (1974): Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. *Plant Physiol.*, 54, 817-820.

Marinos, N. G. (1970): Embryogenesis of the pea (*Pisum sativum*) I. The cytological environment of the developing embryo. *Protoplasma* 70: 261-279.

Masucci, J. D., Rerie, W. G., Foreman, D. R., Zhang, M., E. Galway, M. E., Marks, M. D., Schiefelbein, J. W. (1996): The homeobox gene *GLABRA 2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 122: 1253-1260.

Maxted, N., Ambrose, M. (2001): Peas (*Pisum* L.). *Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean* 10: 181-191.

Mikic', A., Smýkal, P., Kenicer, G., Vishnyakova, M., Sarukhanyan, N. (2013): The bicentenary of the research on 'beautiful' vavilovia (*Vavilovia formosa*), a legume

crop wild relative with taxonomic and agronomic potential. *Botanical Journal of the Linnean Society* 172: 524-531.

Millan, T., Winter, P., Jungling, R., Gil, J., Rubio, J., Cho, S., Cobos, M. J., Iruela, M., Rajesh, P. N., Tekeoglu, M., Kahl, G., Muehlbauer, M. J. (2010): A consensus genetic map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) based on 10 mapping populations. *Euphytica* 175: 175-189. doi 10.1007/s10681-010-0157-4.

Miller, S. S., Jin, Z., Schnell, J. A., Romero, M. C., Brown, D. C. W., Johnson, D. A. (2010): Hourglass cell development in the soybean seed coat. *Ann. Botany* 106: 235-242.

Ministerstvo zemědělství České republiky (2014): Situační a výhledová zpráva LUSKOVINY.

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

Nakamura, M., Katsumata, H., Abe, M., Yabe, N., Komeda, Y., Yamamoto, K.T., Takahashi, T. (2006): Characterization of the class IV homeodomain-leucine zipper gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141: 1363-1375.

Nikolaeva, M. G. (1969): Physiology of deep dormancy in seeds. *Nauka*.

Nikolaeva, M. G. (1977): Factors controlling the seed dormancy pattern. The physiology biochemistry of seed dormancy germination: 51-74.

Offler, C. E., J. W. Patrick (1984): Cellular structures, plasma-membrane surface-areas plasmodesmatal frequencies of seed coats of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to photosynthate transfer. *Aus. J. Plant Physiol.* 11: 79-99.

Offler, C. E., Nerlich, S. M., Patrick, J. W. (1989): Pathway of photosynthate transfer in the developing seed of *Vicia faba* L. Transfer in relation to seed anatomy. *J. Exp. Bot.* 40: 769-780.

Oka, T., Nemoto, T., Jigami, Y. (2006): Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* RHM2/MUM4, a multi domain protein involved in UDP-d-glucose to UDP-l-rhamnose conversion. *J. Biol. Chem.* 282: 5389-5403.

Pang, Y., Peel, G. J., Sharma, S. B., Tang, Y., Dixon, R. A. (2008). A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 105 (37).

Pang Y., Cheng X., Huhman D. V., Ma J., Peel G. J., Yonekura-Sasakibara K., Saito K., Shem G., Sumner L. W., Tang Y., Wen J., Yun J., Dixon A. (2013): *Medicago*

glucosyltransferasa UGT72L1: potential roles in proanthocyanidin biosynthesis. *Planta*. 238: 139-154.

Penmetsa, R. V., Carrasquilla-Garcia, N., Bergmann, E. M., Vance, L., Castro, B., Kassa, M. T., Sarma, B. K., Datta, S., Farmer, A. D., Baek, J.-M., Coyne, C. J., Varshney, R. K., von Wettberg, E. J. B., Cook, D. R. (2016): Multiple post-domestication origins of kabuli chickpea through allelic variation in a diversification-associated transcription factor. *New Phytologist* 211: 1440-1451.

Plitmann, U., Kislev, M. E. (1989): Reproductive changes induced by domestication. *Advances in Legume Biology, Missouri Bot. Gard* 29: 487-503.

Pourcel, L., Routaboul, J. M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2005): TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Cell* 17 (11): 2966-2980.

Pradhan, S., Bandhiwal, N., Shah, N., Kant, C., Gaur, R., Bhatia, S. (2014): Global transcriptome analysis of developing chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Front. Plant Sci.* 5: 698.

Probert, R. J. (2000): The role of temperature in the regulation of seed dormancy germination. *Seeds. The ecology of regeneration in plant communities.* CABI: 261-292.

Quinlivan, B. J. (1971): Seed coat impermeability in legumes. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 37: 283-295.

Ranathunge K., Shao S., Qutob D., Gijzen M., Peterson C. A., and Bernards M. A. (2010): Properties of the soybean seed coat cuticle change during development. *Planta* 231: 1171-1188. doi: 10.1007/s00425-010-1118-9.

Redekar, N. R., Biyashev, R. M., Jensen, R. V., Helm, R. F., Grabau, E. A., Maroof, M. S. (2015): Genome-wide transcriptome analyses of developing seeds from low and normal phytic acid soybean lines. *BMC Genomics* 16 (1): 1-16.

Rerie, W. G., Feldmann, K. A., Marks, M. D. (1994): The *GLABRA2* gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 8: 1388-1399.

Severin, A. J., Woody, J. L., Bolon, Y. T., Joseph, B., Diers, B. W., Farmer, A. D. (2010): RNA-Seq Atlas of *Glycine max*: a guide to the soybean transcriptome. *BMC Plant Biol.* 10: 160.

Shao, S., Meyer, C. J., Ma, F., Peterson, C. A., Bernards, M. A. (2007): The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition function during imbibition. *J. Exp. Botany* 58: 1071-1082.

Smýkal, P. (2009): Domestikace rostlin z pohledu současné genetiky. *ŽIVA* 1.

Smýkal, P. (2009): Jak si člověk „ochočil“ rostliny. 21. století.

Smýkal, P., Kenicer, G., Flavell, A. J., Corer, J., Kosterin, O., Redden, R. J., Ford, R., Coyne, C. J., Maxted, N., Ambrose, M. J., Ellis, T. H. N. (2011): Phylogeny, phylogeography genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genet Res* 9: 4-18.

Smýkal, P. (2011): Fylogeneze a diverzita hrachu. *ŽIVA* 4.

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. doi:10.3390/agronomy2020074.

Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J. (2014): Legume crops phylogeny genetic diversity for science breeding. *Critic.Rev. Plant Sci.* doi:10.1080/07352689.2014.897904.

Smýkal, P., Vernoud, V., Blair, M. W., Soukup, A., Thompson, R. D. (2014): The role of the testa during development in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-14.

Smýkal, P., Coyne, C., 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. (2015) Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critic. Rev. Plant Sci.* 34: 43-104.

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

Sreenivasulu, N., Wobus, U. (2013): Seed-development programs: a systems biology-based comparison between dicots and monocots. *Annu Rev Plant Biol.* 64: 189-217.

Steinbach, G. (1997): Lexikon užitkových rostlin. Knižní klub, Praha.

Sudheesh, S., Sawbridge, T. I., Cogan, N. O., Kennedy, P., Forster, J. W., Kaur, S. (2015). *De novo* assembly and characterisation of the field pea transcriptome using RNA-Seq. *BMC Genomics*: 16 (1): 611.

Szymanski, D. B., Jilk, R. A., Pollock, S. M., Marks, M. D. (1998): Control of *GL2* expression in *Arabidopsis* leaves and trichomes. *Development* 125: 1161-1171.

Tanner, G. J., Francki, K. T., Abrahams, S., Watson, J. M., Larkin, P. J., Ashton, A. R. (2003): Proanthocyanidin biosynthesis in plants purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *Journal of Biological Chemistry* 278 (34): 31647-31656.

Thorne, J. H. (1981): Morphology ultrastructure of maternal seed tissues of soybean in relation to the import of photosynthate. *Plant Physiol.* 67: 1016-1025.

Troníčková, E. (1985): Zelenina. *Artia Praha*: 117-119.

Usadel, B., Kuschinsky, A. M., Rosso, M.G., Eckermann, N., Pauly, M. (2004): RHM2 is involved in mucilage pectin synthesis and is required for the development of the seed coat in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 286-295.

Van Dongen, J. T., Ammerlaan, A. M., Wouterlood, M., Van Aelst, A. C., Borstlap, A. C. (2003): Structure of the developing pea seed coat the post-phloem transport pathway of nutrients. *Ann. Botany* 93: 729-737.

Vavilov, N. I. (1926): Studies on the Origin of Cultivated Plants. *Bull of Applied Botany* 16.

Verdier, J., Dessaint, F., Schneider, C. (2013): A combined histology and transcriptome analysis unravels novel questions on *Medicago truncatula* seed coat. *Journal of experimental botany* 2: 459-470.

Vleeshouwers, L. M., Bouwmeester, H. J., Karssen, C. M. (1995): Redefining seed dormancy: An attempt to integrate physiology ecology. *J. Ecol.* 83: 1031-1037.

Vojtková, T. (2016): Analýza genové exprese během vývoje osemení planého a kulturního hrachu (*Pisum sp.*). *Bakalářská práce UP Olomouc*

Walker, A. R., Davison, P. A., Bolognesi-Winfield, A. C., James, C. M., Srinivasan, N., Blundell, T. L., Esch, J. J., Marks, M. D., Gray, J. C. (1999): The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 11: 1337-1349.

Wan, L., Li, B., Pandey, M. K., Wu, Y., Lei, Y., Yan, L., Dai, X., Jiang, H., Zhang, J., Wei, G., Varshney, R. K., Liao, B. (2016): Transcriptome Analysis of a New Peanut Seed Coat Mutant for the Physiological Regulatory Mechanism Involved in Seed Coat Cracking and Pigmentation. *Front. Plant Sci.* 7: 1491.

Wang, C. S., Vodkin, L. O. (1994): Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA. *Plant Mol Biol Rep* 12: 132.

Weeden, N. F. (2007): Genetic Changes Accompanying the Domestication of *Pisum sativum*: Is there a Common Genetic Basis to the 'Domestication Syndrome' for Legumes? *Ann. Botany* 100: 1017-1025.

Western, T. L., Young, D. S., Dean, G. H., Tan, W. L., Samuels, A. L., Haughn, G. W. (2004): *MUCILAGE-MODIFIED4* encodes a putative pectin biosynthetic enzyme developmentally regulated by *APETALA2*, *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*, and *GLABRA2* in the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiol.* 134: 296-306.

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

Winkel-Shirley, B. (2001): Flavonoid Biosynthesis. A colourful model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, Biotechnology. *Plant Physiol.* 126: 485-493.

Xie, D. Y., Sharma, S. B., Paiva, N. L., Ferreira, D., Dixon, R. A. (2003): Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. *Science* 299 (5605): 396-399.

Xue, L. J., Zhang, J. J., Xue, H. W. (2012): Genome-Wide Analysis of the Complex Transcriptional Networks of Rice Developing Seeds. *PLoS ONE* 7 (2).

Zawada, A. M., Rogacev, K., Müller, S., Rotter, B., Winter P., Fliser, D. (2014): Massive analysis of cDNA ends (MACE) and miRNA expression profiling identifies proatherogenic pathways in chronic kidney disease. *Epigenetics* 9: 161-172. doi: 10.4161/epi.26931

Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, C. T., Lloyd, A. (2003): A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development* 130: 4859-4869.

Zhao, J., Dixon, R. A. (2009). MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21 (8): 2323-2340.

Zhao, J., Pang, Y., Dixon, R. A. (2009): The mysteries of proanthocyanidin transport polymerization. *Plant Physiol.* 153: 437-443.

Zhao, S., Tuan, P. A., Li, X., Kim, Y. B., Kim, H., Park, C. G., Yang, J., Li, C. H., Park, S. U. (2013): Identification of phenylpropanoid biosynthetic genes and phenylpropanoid accumulation by transcriptome analysis of *Lycium chinense*. *BMC Genomics* 14: 802. doi: 10.1186/1471-2164-14-802.

Zhao, S., Fung-Leung, W. P., Bittner, A., Ngo, K., Liu, X. (2014): Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. PLoS ONE 9 (1).

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

Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E. (2012): Domestication of plants in the Old World. Oxford University Press: Oxford, UK, 4th edition.

Internetové zdroje:

<http://oregonstate.edu/instruct/css/330/two/>

<http://bar.utoronto.ca/efpmedicago/cgi-bin/efpWeb.cgi>

http://bar.utoronto.ca/efp_seedcoat/cgi-bin/efpWeb.cgi