

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2024

Bc. Lenka Slavičková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza kandidátního genu pro opad poutka u semen
hrachu (*Pisum sativum* L.)**

Diplomová práce

Bc. Lenka Slavíčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Lenka SLAVÍČKOVÁ
Osobní číslo: R220037
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Analýza kandidátního genu zapojeného v opadu poutka u semen hrachu (*Pisum sativum* L.)
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Literární rešerši na téma abscise plodů, listů a semen rostlin
2. PCR amplifikace a sekvenční analýza kandidátního genu
3. Anatomická charakterizace poutka, srovnání wt a *def* mutantní linie
4. Transkriptomická a biochemická analýza

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tisková**

Seznam doporučené literatury:

Ayeh KO, Lee Y, Ambrose MJ, Hvoslef-Eide AK. (2009) Characterization and structural analysis of wild type and a non-abscission mutant at the *development funiculus (Def)* locus in *Pisum sativum* L. *BMC Plant Biol.* 9:76.

Ayeh, K., Lee, Y., Ambrose, M.J. and Hvoslef-Eide, A.K. (2011). Growth, seed development and genetic analysis in wild type and *Def* mutant of *Pisum sativum* L. *BMC Res. Notes* 4: 489.

Hvoslef-Eide AK, Munster CM, Mathiesen CA, Ayeh KO, Melby TI, Rasolomanana P and Lee Y (2016) Primary and Secondary Abscission in *Pisum sativum* and *Euphorbia pulcherrima* –How Do They Compare and How Do They Differ? *Front. Plant Sci.* 6: 1204.

Lamichaney, A, Parihar, AK, Dixit, GP, et al. (2021) Intact funiculus in mature harvested seeds of field pea (*Pisum sativum* L.): preliminary investigation and possible implications. *Crop Science* 61: 2863–2871

Lee, Y., Ayeh, K.O., Ambrose, M. et al. (2016) Immunolocalization of pectic polysaccharides during abscission in pea seeds (*Pisum sativum* L.) and in abscission less *def* pea mutant seeds. *BMC Res Notes* 9, 427

Shi, C.-L.; Alling, R.M.; Hammerstad, M.; Aalen, R.B. (2019) Control of Organ Abscission and Other Cell Separation Processes by Evolutionary Conserved Peptide Signaling. *Plants* 8: 225.

Ventimilla, D., Velázquez, K., Ruiz-Ruiz, S. et al. (2021) IDA (INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION)-like peptides and HAE (HAESA)-like receptors regulate corolla abscission in *Nicotiana benthamiana* flowers. *BMC Plant Biol* 21: 226.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.**
Katedra botaniky

Datum zadání diplomové práce: 31. října 2022
Termín odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 3. listopadu 2022

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci „Analýza kandidátního genu pro opad poutka u semen hrachu (*Pisum sativum* L.)“ vypracovala samostatně s použitím odborné literatury a pramenů, které jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Olomouci, dne 26.4. 2024

.....

Bc. Lenka Slavičková

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Lenka Slavičková

Název práce: Analýza kandidátního genu pro opad poutka u semen hrachu (*Pisum sativum* L.)

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: Hrách setý (*Pisum sativum*), abscise, genová exprese

Počet stran: 56

Počet příloh: 4

Jazyk: čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Lenka Slavičková

Title: Analysis of the candidate gene involved in pea (*Pisum sativum* L.) seed abscission

Type of thesis: diploma

Department: Department of Cell biology and Genetics, FS UP in Olomouc

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

The year of presentation: 2024

Keywords: pea, *Pisum sativum*, abscission, gene expression

Number of pages: 56

Number of appendices: 4

Language: Czech

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá kandidátními geny pro opad poutka u semen hrachu (*Pisum sativum* L.). Konkrétně se jedná o geny *HAE* a *STK*. Gen *HAE* kóduje receptor-like protein kinázu HAESA. Gen *STK* vytváří komplex s korepresorem interagujícím s MADS-doménami transkripčních faktorů SEUSS (SEU) a společně tak potlačují lignifikaci v abscisní zóně.

V teoretické části se tato práce zabývá problematikou abscise a její definicí. Další část se věnuje poutku a jeho anatomické struktuře, roli při vývinu semen a následnému procesu opadu semene od poutka. Detailně je popsána abscisní zóna vznikající mezi semenem a poutkem a také molekulární procesy, které vedou k jejímu vzniku. V neposlední řadě je popsán i vliv látek jako jsou reaktivní formy kyslíku či oxid dusnatý a jejich vliv na opadávání rostlinných orgánů.

Praktická část obsahuje porovnání morfologie a anatomie semen včetně poutek mutantních genotypů a cv. Cameor. Byla provedena detekce molekul ROS a NO v místě abscisní zóny jak u mutantních genotypů, tak cv. Cameor pomocí fluorescenční mikroskopie. Další část se věnuje analýze kandidátních genů *HAE* a *STK* a hledání možných příčin vedoucích k neopadavému fenotypu jako je například jednonukleotidová záměna či chybný sestřih.

V neposlední řadě je zde uvedena analýza genové exprese vybraných kandidátních genů *HAE*, *STK*. K nim byly nově přidány geny *ALC*, *HEC3* a *SPT*, neboť jsou součástí kaskády, ve které je zapojen i gen *STK* a má na tyto geny vliv. Zjišťoval se rozdíl exprese kandidátních genů mezi mutantními genotypy a cv. Cameor. Dále se také zjišťovala jejich exprese napříč vývojovými stádii.

Summary

This diploma thesis deals with analysis of the candidate genes involved in pea (*Pisum sativum* L.) seed abscission. Specifically it concerns the genes *HAE* and *STK*. The *HAE* gene encodes the receptor-like protein kinase HAESA. The *STK* gene forms a complex with a corepressor interacting with the MADS domains of SEUSS transcription factors (SEU) and together they repress lignification in the abscisic zone.

The theoretical part of this thesis deals with the issue of abscission and its definition. The next part is devoted to the funicle, its anatomic structure, its role in seed development and the subsequent process of separating the seed from the funicle. Follows detail description of the abscission zone which is formed between the seed and the funicle, molecular processes leading to the formation of the abscission zone and the abscission itself. Finally, the influence of substances such as reactive oxygen species and nitric oxide and their effect on the abscission of the plant tissue is described.

The experimental part includes a comparison of seed and funicle morphology and anatomy between mutant genotypes *development funiculus (def)* and cv. Cameor. Then detection of ROS and NO molecules at the abscission zone was performed in both mutant genotype and cv. Cameor by fluorescence microscopy. The next part is devoted to the analysis of the candidate genes *HAE* and *STK* and the search for possible causes leading to non-detachment phenotype such as single nucleotide substitution or missplicing.

Finally, gene expression analysis of selected candidate genes *HAE*, *STK* is presented. *ALC*, *HEC3* and *SPT* genes have been newly added as they are part of a cascade in which the *STK* gene is involved and affects these genes. The difference in expression of candidate genes between mutant genotypes and cv. Cameor is analyzed. Genes expression across developmental stages was also investigated.

Poděkování

Děkuji prof. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za odborné vedení práce, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Balarynové Ph.D. a Mgr. Janě Sekaninové Ph.D. za ochotu, odborný dohled během práce v laboratoři a za dobré rady.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Buněčná separace.....	3
3.1.1	Abcise	4
3.1.2	Enviromentální příčiny abcise	6
3.2	Semena a plody	7
3.2.1	Původ neopadavého mutantu hrachu.....	8
3.2.2	Poutko (funiculus)	8
3.3	Molekulární příčiny abcise	10
3.3.1	Reaktivní formy kyslíku a abcise.....	13
3.3.2	Oxid dusnatý a abcise	14
4	Materiál a metody	15
4.1	Biologický materiál	15
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	16
4.3	Použité primery	17
4.4	Použité přístroje a zařízení	18
4.5	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	19
4.5.1	Záznam morfologie semene a poutka Cameoru a mutantního <i>def</i> genotypu.....	20
4.5.2	Podélné řezání poutka a pupku hrachu na ultramikrotomu.....	20
4.5.3	Barvení řezu poutka a pupku hrachu toluidinovou modří.....	20
4.5.4	Podélné řezání poutka a pupku na vibratomu	20
4.5.5	Barvení řezu poutka a pupku pomocí H ₂ DCF DA a DAF-FM DA	20
4.5.6	Izolace genomové DNA.....	21
4.5.7	Izolace RNA	21
4.5.8	Odstranění genomické DNA	22
4.5.9	Spektrofotometrické stanovení koncentrace	23
4.5.10	Přepis RNA do cDNA	23
4.5.11	Polymerázová řetězová reakce (PCR) pro analýzu kandidátního genu <i>HAE</i> (<i>Psat7g116520.1</i>) a <i>STK</i> (<i>Psat7g066560</i>).....	23
4.5.12	Horizontální agarózová elektroforéza	24
4.5.13	Přečištění a příprava vzorků na sekvenaci.....	24

4.5.14	Sekvenování DNA	25
4.5.15	Kvantitativní reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR).....	25
5	Výsledky	27
5.1	Morfologie semene a poutka Cameoru a mutantního <i>def</i> genotypu	27
5.2	Anatomická analýza poutka	28
5.3	Histochemická lokalizace molekul ROS a NO	30
5.4	Sekvenace kandidátního genu <i>HAE (Psat7g116520.1)</i> kulturního cv. Cameoru a mutantních genotypů <i>def</i>	32
5.5	Sekvenace cDNA kandidátního genů <i>HAE (Psat7g116520.1)</i> kulturního Cameoru a mutantních genotypů <i>def</i>	34
5.6	Sekvenace kandidátního genu <i>STK (Psat7g066560)</i> kulturního cv. Cameoru a mutantních genotypů <i>def</i>	36
5.7	Sekvenace cDNA kandidátního genů <i>STK (Psat7g066560)</i> kulturního Cameoru a mutantních genotypů <i>def</i>	39
5.8	Analýza exprese vybraných genů pomocí kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)	39
6	Diskuze.....	44
7	Závěr.....	49
8	Seznam literatury	50
9	Přílohy	56

Seznam symbolů a zkratek

ADPG Arabidopsis dehiscence zone polygalakturonase

ALC ALCATRAZ

b-HLH Basic helix-loop-helix

CO₂ Oxid uhličitý

DAP Days after pollination

DEF Development funiculus

H₂O₂ Peroxid vodíku

HAE HAESA

HSL2 HAESA-LIKE2

HEC3 HECATE3

IAA Kyselina indolyl-3-octová

IDA INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION

IND INDEHISCENT

NEV NEVERSHED

NO Oxid dusnatý

MADS-box Odvozeno od genů této rodiny: MCM1, Agamous, Deficiens, SRF1

MAPK Mitogen-aktivovaná proteinová kaskáda

PPO Polyfenol oxidáza

SEP3 SEPALLATA3

SERK SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINÁZA

SEU SEUSS

SPL/NZZPOROCYTELESS/NOZZLE

SHP SHATTERPROOF

SPT *SPATULA*

STK *SEEDSTICK*

RLK Receptor-like kináza

ROS Reaktivní formy kyslíku

Tx Tenax

Seznam obrázků

Obrázek 1: Mechanismus oddělení semene od mateřské rostliny	6
Obrázek 2: Vývin rozhraní mezi osemením a poutkem v místě hila.....	9
Obrázek 3: Porovnání molekulárních drah podílejících se na pukavosti lusku ve švu šesule a v abscisní zóně semene huseníčku	11
Obrázek 4: Signální kaskáda započatá ligandem IDA vázajícím se na receptor HAE/HSL2.	12
Obrázek 5: Působení reaktivních forem kyslíku při stresem vyvolané abscisi u listu.....	13
Obrázek 6: Semeno hrachu cv. Cameor s viditelným pupkem po opadu poutka.	27
Obrázek 7: Semeno hrachu mutantního <i>def</i> s neupadlým zaschlým poutkem	28
Obrázek 8: Průřez poutkem a částí semene opadavého kulturního hrachu cv. Cameor 16 DAP.	29
Obrázek 9: Průřez poutkem a částí semene neopadavého hrachu <i>def</i> 16 DAP.	29
Obrázek 10: Detekce ROS na řezu poutka a částí semene opadavého hrachu cv. Cameor ve stádiu 23 DAP s využitím fluorescenční sondy H ₂ DCF DA.....	30
Obrázek 11: Detekce ROS na řezu poutka a částí semene neopadavého hrachu <i>def</i> ve stádiu 21 DAP s využitím fluorescenční sondy H ₂ DCF DA.	31
Obrázek 12: Detekce NO na řezu poutka a částí semene opadavého kulturního hrachu cv. Cameor ve stádiu 23 DAP s využitím fluorescenční sondy DAF-FM DA.	31
Obrázek 13: Detekce NO na řezu poutka a částí semene neopadavého hrachu <i>def</i> ve stádiu 21 DAP s využitím fluorescenční sondy DAF-FM DA.	32
Obrázek 14: Sekvence genu <i>HAE</i> (<i>Psat7g116520.1</i>) gDNA kulturního cv. Cameoru a mutantních genotypů <i>def</i>	33
Obrázek 15: Elektroforetická separace cDNA a gDNA genu <i>HAE</i>	35
Obrázek 16: Sekvence genu <i>HAE</i> (<i>Psat7g116520.1</i>) gDNA kulturního cv. Cameoru a mutantních genotypů <i>def</i>	35
Obrázek 17: Elektroforetická separace gDNA genu <i>STK</i>	36
Obrázek 18: Sekvence genu <i>STK</i> (<i>Psat7g066560</i>) gDNA kulturního cv. Cameoru a mutantních genotypů <i>def</i>	37
Obrázek 20: Relativní exprese genu <i>HAE</i> (<i>Psat7g116520.1</i>) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a čtyř mutantních genotypů s neopadavým poutkem o stáří 20 až 25 DAP.	40
Obrázek 21: Relativní exprese genu <i>STK</i> (<i>Psat7g066560</i>) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a čtyř mutantních genotypů s neopadavým poutkem o stáří 20 až 25 DAP.	41

Obrázek 22: Relativní exprese genu <i>HAE</i> (<i>Psat7g116520.1</i>) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a mutantního genotypu <i>def</i> ve čtyřech vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP. ...	41
Obrázek 23: Relativní exprese genu <i>STK</i> (<i>Psat7g066560</i>) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a mutantního genotypu <i>def</i> ve čtyřech vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP. ...	42
Obrázek 24: Relativní exprese genu <i>ALC</i> (<i>Psat0s2139g0120</i>) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a mutantního genotypu <i>def</i> ve čtyřech vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP. ...	42
Obrázek 25: Relativní exprese genu <i>HEC3</i> (<i>Psat7g046520</i>) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a mutantního genotypu <i>def</i> ve čtyřech vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP. ...	43
Obrázek 26: Relativní exprese genu <i>SPT</i> (<i>Psat2g166760</i>) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a mutantního genotypu <i>def</i> ve čtyřech vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP. ...	43
Obrázek 27: Ukázka pozic kandidátních genů <i>STK</i> a <i>HAE</i> na chromozomu 7.	46

Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam dostupných <i>def</i> genotypů.....	15
Tabulka 2: Použité primery na PCR amplifikaci.....	17
Tabulka 3: Přehled použitých primerů při sekvenaci.....	17
Tabulka 4: Použité primery pro qRT-PCR.....	18
Tabulka 5: Teplotní program pro PCR amplifikaci.....	24
Tabulka 6: Teplotní program pro qRT-PCR.....	26
Tabulka 7: Analýza polymorfizmu genu <i>HAE</i> ve 21 <i>def</i> genotypech	34
Tabulka 8: Analýza polymorfizmu genu <i>STK</i> v 18 <i>def</i> genotypech.....	38

1 Úvod

Abscise neboli opad je přísně kontrolovaný proces, při kterém dochází k oddělení rostlinných orgánů od mateřské rostliny, které už nejsou dále potřebné. Jedná se zejména o reprodukční části rostliny, které po opylení opadají. Rostliny tak také mohou reagovat na změny prostředí jako je například změna teplot, nedostatek vody, světla či nutričních látek. K opadávání může docházet i po napadení škůdci. Mimo jiné abscise slouží také k opadu plodů, čímž je zaručena jejich disperze do okolí. Abscise má tedy zemědělský význam na produkci, výnos a sklizeň.

Předpokladem k průběhu abscise je přítomnost abscisní zóny. Ta je tvořena vrstvou malých buněk s bohatou cytoplazmou, které jsou navzájem propojeny plasmodezmaty. Tyto buňky se liší od okolních buněk. V místě, kde odpadl rostlinný orgán tak vzniká zacelená jizva, zabraňující vstupu různým škůdcům. V některých případech může dojít i ke vzniku sekundární abscisní zóny, která se zformuje v místě, kde se běžně nenachází. K tomuto jevu dochází většinou po zranění daného pletiva.

K abscisi semen od mateřské rostliny dochází po jejich dozrání. Semena jsou k mateřské rostlině připojena pomocí poutka. Vyvíjející se semeno potřebuje pro svůj růst spoustu živin v podobě organických látek, aminokyselin či draslíku, které poskytuje mateřská rostlina. Živiny jsou transportovány do semene pomocí cévního svazku vedoucím poutkem. Samotné poutko je místo, kde se odehrává mnoho důležitých metabolických procesů. Během vývoje semene se mezi poutkem a osemením vytváří abscisní zóna, ve které po dozrání semen proběhne abscise. Na osemení v místě, kde bylo připojeno poutko vznikne jizva neboli pupek. I přes to, že se jedná o velice rozšířený fenomén, nejsou molekulární mechanismy abscise zcela známy.

2 Cíl práce

- 1) Teoretická část – literární rešerše na téma abscise plodů, listů, semen rostlin.
- 2) Praktická část – Anatomická charakterizace poutka, srovnání wt a *def* mutantní linie hrachu. PCR amplifikace a sekvenční analýza kandidátních genů. Transkriptomická a biochemická analýza.

3 Literární přehled

3.1 Buněčná separace

Rostlinná pletiva jsou tvořená z buněk, které přiléhají těsně k sobě a jsou propojena střední lamelou pektinové povahy (Roberts *et al.*, 2000). Adheze mezi buňkami je základní znak mnohobuněčných organismů, který umožňuje jejich růst a vývoj. Mezibuněčná adheze se však mezi rostlinnými a živočišnými buňkami liší. Je to dáno již při dělení mateřské buňky na dceřiné, kdy u rostlinných buněk dochází ke vzniku střední lamely v místě dělení, která kromě kalózy obsahuje i celulózu, hemicelulózu a pektiny. Zatímco nově vznikající živočišné buňky se rozdělí postupným zaškrcením od okraje ke středu (Jarvis *et al.*, 2003).

Během určité části vývoje však dochází v některých částech rostliny k separaci buněk od těch sousedních. Tento jev se týká především procesů opadu a pukavosti. V těchto místech jsou buňky naprogramované tak, aby reagovaly na environmentální či hormonální signály spouštějící separaci (Roberts *et al.*, 2000). Tyto procesy se dějí ve specializovaných abscisních zónách nacházející se v místech, kde dochází k opadu rostlinných orgánů. Proces separace může být rozdělen na čtyři části, a to formování abscisní zóny, přizpůsobení buněk, aby mohly reagovat na signální molekuly, samotná buněčná separace, a nakonec vytvoření ochranné vrstvy (Shi *et al.*, 2019). Jakmile je zformovaná abscisní zóna, zpustí se díky etylenu kaskáda genetické exprese charakteristická pro opadávání. Produktem těchto genů jsou například enzymy polygalakturonáza nebo β (1,4)-D-glukanáza, které se podílí na degradaci cévních svazků. (Jarvis *et al.*, 2003). Obecná reakce na stimuly vyvolávající abscisi je multifaktoriální. Zahrnuje pokles biosyntézy a transportu hormonů inhibujících abscisi jako je auxin a cytokinin, současně se zvýšením etylenu a kyseliny abscisové, tedy hormonů urychlujících abscisi. Jak koncentrace těchto hormonů, tak citlivost receptorů buněk abscisní zóny jsou důležitými determinanty správného průběhu abscise (Taylor *et al.*, 2001).

Opadavé části rostliny jako je květ, plod či listy produkují etylen, který pak působí přímo v místě abscisní zóny (Botton *et al.*, 2019). Etylen reguluje enzymy zapojené do abscise jako jsou například celulózy a pektinázy, které hydrolyzují buněčnou stěnu, což vede k jejímu oslabení (Brown, 1997). U huseničku (*Arabidopsis thaliana*) se experimentálně dokázalo, že mutanti *ein2* and *etr1-1*, kteří jsou za normálních podmínek zapojeni v přenosu signálu etylenu, mají opožděnou abscisi (Jin *et al.*, 2015).

Genetická kaskáda zpuštěná etylenem se může i zpomalit auxinem. Antagonistický vztah etylenu a auxinu je evidentní v obecné interakci mezi těmito dvěma hormony. Stav auxinu v abscisní zóně řídí citlivost na etylen, tudíž jakýkoliv faktor ovlivňující transport

auxinu do abscisní zóny ovlivní také citlivost buněk na etylen. Na druhou stranu etylen je účinným inhibítorem auxinu a může zvýšit citlivost buněk abscisní zóny k sobě samému. Navíc auxin sám dokáže stimulovat produkci etylenu a tím urychlovat abscisi. Tedy regulace transportu auxinu z orgánu určeného k opadu hraje roli při kontrole schopnosti buněk abscisní zóny podstoupit abscisi (Taylor *et* Whitelaw, 2001, Botton *et* Ruperti, 2019). Nedávná studie ukázala, že mutací transkripčních faktorů ARF1 a ARF2 se oddaluje opad okvětních lístků u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) (Jin *et al.*, 2015).

3.1.1 Abscise

Pojem abscise pochází z latinského ab (pryč) a sciendere (odříznout). Jedná se o komplikovaný a vysoce regulovaný proces, ke kterému dochází během vývoje rostliny a zajišťuje kontrolovaný opad již nepotřebných rostlinných orgánů od mateřské rostliny (Olsson *et* Butenko, 2018).

Abscise reprodukčních částí rostliny nastává po opylení. U jednopohlavních, samčích květů dochází k jejich opadu po uvolnění pylu. V závislosti na druhu rostliny dochází buď k opadu celého květu anebo jednotlivých částí květu jako jsou okvětní lístky, pestíky a tyčinky. Hypotéza vysvětlující tento jev uvádí, že opad květů pomáhá snížit návštěvnost opylovačů, kterých zde již není potřeba (Doorn *et* Stead, 1997). Ukázalo se, že opadávání okvětních lístků probíhá rychleji než opadávání květů či listů. Například okvětní lístky pelargonie opadaly po jedné až dvou hodinách po vystavení etylenu (Eversen *et al.*, 1993). Naopak u listů došlo ke změnám spojené s abscisí po osmnácti až dvaceti čtyř hodinách po vystavení etylenu (Taylor *et* Whitelaw, 2001).

Opadávání listů a jeho načasování je důležitý znak pro sezónní aklimatizaci listnatých stromů. V mírném podnebném pásu probíhá abscise na podzim jakožto adaptace na zimu. Vnější podmínkou ke zpuštění signální kaskády vedoucí k abscisi je zkrácení fotoperiody. Důležitou roli při načasování opadu hrají rostlinné hormony auxin a etylen (Jin *et al.*, 2015).

Abscise je adaptivní strategie mateřské rostliny, která tak reaguje na změny prostředí. Může se jednat o změnu teplot, nedostatek vody, nutričních látek či světla nebo napadení škůdci. Avšak reakce na tyto změny se mohou mezi rostlinami lišit, například při vyšších teplotách dochází u papriky (*Capsicum annuum L.*) k opadu květů (Gonzalez-Dugo *et al.*, 2007) zatímco u zimolezu (*Lonicera maackii*) dochází k opadu plodu zase při nižších teplotách (Bartuszevige *et al.*, 2006). Rostliny obecně využívají abscisi plodů a květů k zajištění jejich šíření po okolí. Disperze plodů má však za následek možnou ztrátu úrody a byla proto v procesu

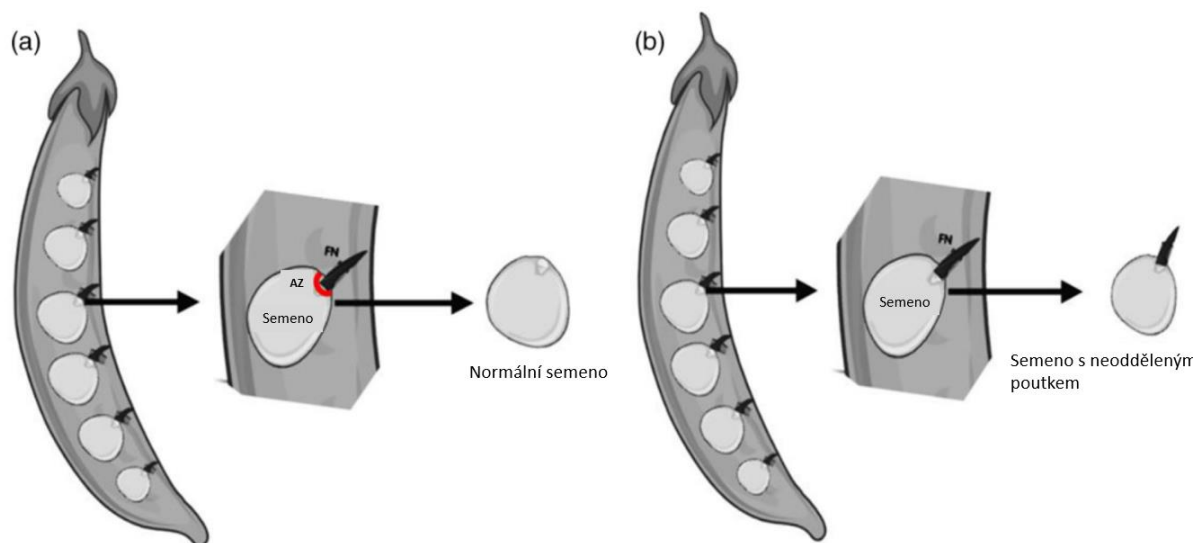
domestikace často redukována (Ayeh *et al.*, 2009, Smýkal *et al.*, 2018). Podle paleobiologů se znak opadavosti semen objevil v období devonu v prvohorách, tedy přibližně před 400 miliony let (Zelenov, 2013).

Existují dva druhy abscise: primární a sekundární. Sekundární se od primární liší tím, že vzniká na místech, kde by za normálních podmínek k opadu nedocházelo. Je to tedy abscise vyvolaná zraněním určité části rostliny (Hvoslef-Eide *et al.*, 2016).

Abscise spočívá ve vyvinutí abscisní zóny – vrstvy buněk, které při procesu opadu degenerují a tím vznikne v tomto místě vrstva buněk s tlustou, lignifikovanou buněčnou stěnou, které jsou odlišné od okolních buněk (Balanzà *et al.*, 2016; Hvoslef-Eide *et al.*, 2016). Počet vrstev buněk v abscisní zóně se mezi druhy liší. Například rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*) má pouze dvě vrstvy, kdežto bez černý (*Sambucus nigra*) má až padesát vrstev buněk (Hvoslef-Eide *et al.*, 2016).

Existují však mutanti, u kterých abscise neprobíhá. Tito mutanti byly popsáni u různých druhů jako například u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) (Butenko *et al.*, 2003), rajčete (*Solanum lycopersicum*) (Tigchelaar *et al.*, 1978), čočky (Tripathi *et al.*, 2019) a také hrachu (*Pisum Sativum* L.) (Ayeh *et al.*, 2009). Když semeno hrachu dozraje, oddělí se od poutka mateřské rostliny. Sklizená semena hrachu tudíž v normálních případech nemají poutko. Avšak u mutantní linie byla objevena semena hrachu, která na sobě nesla poutko, tedy zde neproběhla abscise (viz obrázek 1). Jednou z prvních zmínek o těchto mutantech pochází již z roku 1966, kdy Rozental identifikoval spontánní mutaci, která byla později nazvána jako *development funiculus (def)*. Křížením planého typu (*Def*) a mutantní linie (*def*) se zjistilo, že znak přítomného poutka je řízen monogenně recesivním genem označovaným *def*. Později se zjistilo, že *def* lokus se nachází na vazebné skupině VII, tedy na chromozomu 7 (Wolko *et al.* Święcicki, 1991; Ayeh *et al.* 2011).

Přítomnost poutka na sklizených semenech vede k pomalému příjmu vody, neboť přítomné poutko se stává fyzickou bariérou pro vstup vody do semene. Tato skutečnost pak může ovlivnit samotný průběh klíčení semen (Lamichaney *et al.*, 2021).



Obrázek 1: a) Mechanismus oddělení semene od mateřské rostliny b) Přítomnost poutka u mutantního hrachu. Legenda: AZ: abscisní zóna, FN: funikulus (převzato a upraveno z Lamichaney *et al.*, 2021).

3.1.2 Enviromentální příčiny abscise

Sezónní změny v prostředí jako jsou kratší dny a nižší teploty signalizují začátek typické senescence a opadávání listů. Stres, ať už je to napadení patogenem, poškození pletiv býložravci či nedostatek vody v okolí může vyvolat předčasný opad rostlinných orgánů (Taylor *et Whitelaw*, 2001). Je známo, že abscise je proces citlivý na teplotu a vyžaduje mírné fyziologické teploty, aby proběhla v pořádku. Extrémní teploty, jako je velký mráz, mohou poškodit abscisní zónu natolik, že zde nebude moct proběhnout abscise (Addicott, 1968).

Abscise je často spojována se senescencí. Obojí je iniciováno enviromentálními a stresovými faktory. Senescence je přirozený proces stárnutí rostliny, kdy dochází k degradaci buněčného obsahu, včetně chlorofylu. Ovšem je mnoho případů, kdy dochází pouze k abscisi bez doprovázené ztráty chlorofylu, například při napadení škůdci.

K senescenci a abscisi listu dochází, jakmile poklesne rychlost fotosyntézy pod určitou prahovou úroveň. Po zastavení fotosyntézy nastává série událostí zahrnující rozpad chloroplastů a s tím spojená ztráta chlorofylu, degradaci proteinů a odstranění aminokyselin. Endogenní hladiny auxinu, cytokininu a giberelinu klesají před a se zahájením senescence (Taylor *et Whitelaw*, 2001).

Během senescence listu byly pozorovány epigenetické regulace zahrnující remodelace a modifikace chromatinu. Důležitou roli zde hrají transkripční faktory, jejichž aktivace/inaktivace reaguje na environmentální signály (Li *et al*, 2018).

Další stresové podmínky jako je sucho či nedostatek vody mohou podporovat abscisi v důsledku poklesu růstu a vitality rostliny. Nedostatek vody vyvolává abscisi hlavně u opadavých druhů, které se opadem listů snaží regulovat transpiraci (výdej vody povrchem rostliny). Výdej vody lze regulovat uzavřením listových průduch, což má za následek pokles fotosyntézy, hromadění CO₂, vyčerpání O₂ a v neposlední řadě senescenci (Chaves, 1991; Taylor et Whitelaw, 2001).

Jak je výše uvedeno abscisi může způsobit napadení škůdci, či různá poranění rostlinných pletiv způsobené býložravci. Před samotnou abscisí se však rostlina snaží poškozené pletivo zahojit a zabránit tak vstupu patogenů. Zacelení rány probíhá různými mechanismy jako je ukládání kalózy, ligninu a glykoproteinů bohatých na hydroxyprolin do buněčných stěn. Dále rostlina syntetizuje antimikrobiální sloučeniny například fytoalexiny. Rostlina také produkuje inhibitory proteáz související s patogenezí jako jsou chitinázy a endo-p-1,3-glukanázy. Je-li i přes to obrana neúčinná, schyluje se rostlina k opadu infikovaného orgánu, aby zabránila dalšímu šíření patogenu. Signalizace o poranění rostliny je pravděpodobně zprostředkováno fragmenty oligosacharidů, které vznikají v důsledku mechanického poškození buněčné stěny (Taylor *et Whitelaw*, 2001).

3.2 Semena a plody

Semena a plody jsou výsledkem úspěšného rozmnožování rostlin. Semeno se vyvíjí z oplozeného vajíčka. Uvnitř obsahuje embryo, které je chráněno osemením, vznikající z jednoho nebo dvou vaječných obalů. Semeno obsahuje tedy embryo v různém stupni vývoje, různého tvaru a různé velikosti, které obsahuje základ kořínku a na opačné straně základ vzrůstného vrcholu

Na semeni lze také pozorovat různé útvary. Nápadný bývá pupek (hilum), což je stopa po poutku (funikulus), tedy místo, kde bylo semeno připevněno k placentě mateřské rostliny. Chlupovité útvary, blanité lemy, či různá křídla jsou na rozdíl od plodů u semen vzácné (Lhotská *et Kropáč*, 1984; Hayat, 2022). Ochranu semen dále zajišťuje plod (fructus), který vzniká přeměnou pestíku, hlavně jeho nejdolnější části – semeníku. Kromě ochranné funkce se plod může podílet na rozšiřování semen (Lhotská *et Kropáč*, 1984). Oplodí (pericarp) společně s osemením (testa) poskytuje semenu ochranu.

3.2.1 Původ neopadavého mutantu hrachu

Již v roce 1952 popsal A. Eglitis u druhé generace hybridů hrachu vlastnost neopadávání semen od poutka. Docílil toho křížením dvou genotypů hrachu *P. sativum* subsp. *sativum* var. *vitellinum* a var. *coronatum*. Později v roce 1966 Rozental identifikoval spontánní mutaci, která byla později nazvána jako *development funiculus (def)*. Semena těchto hybridů byla pevně připojena k lusku, a nevypadla ani po otevření lusku. Zaznamenány byly i anatomické odlišnosti poutka vzniklých mutantů. Mikroskopické pozorování ukázalo, že poutko ztratilo svůj typický nálevkovitý tvar a prostor mezi poutkem a osemením byl vyplněno meristémovým pletivem. Zkouška pevnosti připojení semen ukázala, že semena lze od lusku oddělit až při zatížení od 140 do 200 g, což je tisícinásobek hmotnosti jednoho semene. Tato mutace neměla mít vliv na vlastní produkci semen. Bylo však pozorováno že mutantní *def* linie hrachu tvoří méně lusků, které obsahují i snížený počet semen. Naopak tyto semena mají větší hmotnost než semena původních genotypů. Je to pravděpodobně dáno tím, že absencí abscisní zóny se zvyšuje délka zásobování semen živinami (Zelenov, 2013).

V.V. Khangildin stanovil monogenní recesivní dědičnost znaku neopadávání semen od poutka a označil ji jako *def* (development funiculus) (Khangildin, 1969). Lokus byl lokalizován v distální části chromozomu 7 (Wolko et Świecicky, 1991). Později N. A. Sobolev potvrdil genetickou charakteristiku znaku opadávání semen, ale navrhl pro něj označení *tx* (tenax) (Sobolev, 1975). V literatuře se však používá spíše označení *def*. Byly zjištěny i případy, kdy došlo u hrachu k reverzní mutaci *def* → *Def* (Zelenov, 2013).

3.2.2 Poutko (funiculus)

Semeno během vývoje spotřebuje hodně živin v podobě organických látek, aminokyselin či draslíku, které podporují jeho růst. Živiny semenu dodává mateřská rostlina pomocí cévního svazku vedoucím poutkem a dále do osemení, kde nadále dochází k distribuci živin do různých částí semene (Tan et al., 2016). Poutko je tedy místem, kde se odehrávají metabolické procesy, vedoucí ke správnému vývoji semene (Lamichaney et al., 2021). Mimo to ovlivňuje i prostorovou orientaci samotného semene a embrya během jeho vývoje (Khan et al. 2015).

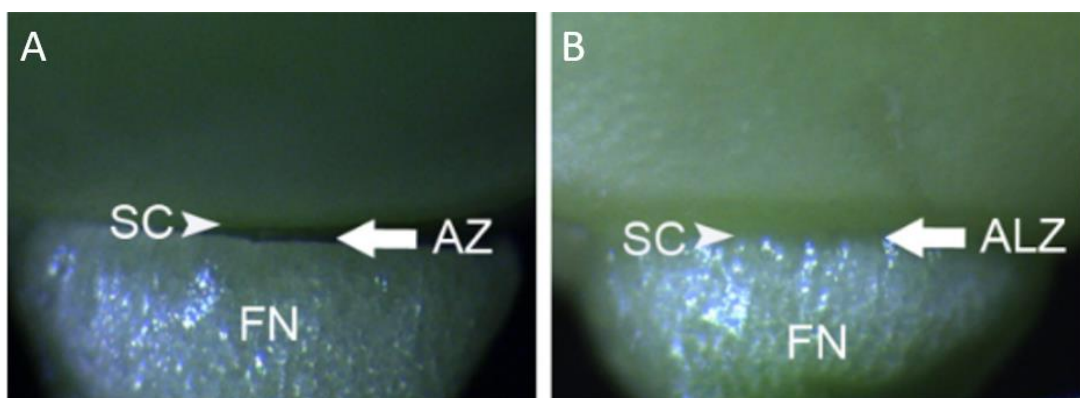
Poutko je na začátku vývoje bezbarvé, zelenou barvu získá později až vývojem chloroplastů. Nicméně kvůli nedostatku světla a CO₂ nedokážou chloroplasty v poutku dostatečně plnit svojí funkci. Ukázalo se, že poutko také obsahuje i škrobová zrna. Z nedávných

studií se zjistilo, že jsou zde exprimované geny zapojené do biosyntézy mastných kyselin (Khan *et al.*, 2015).

Paralelně s vývojem semene z vajíčka až do jeho globulární fáze vývoje dochází také k formování cévního svazku, především floému, který se zvětšuje díky zvyšování počtu cévních buněk. To pak usnadňuje přepravu metabolitů do semene a dává tak základ poutku (Tan *et al.*, 2016). Zatím jsou známy jen dva geny zapojené do vývoje poutka, a to jsou *SEEDSTICK (STK)* a *POROCYTELESS/NOZZLE (SPL/NZZ)*. *STK* reguluje buněčné dělení a proliferaci poutka a podílí se na tvorbě abscisní zóny u vyvinutého poutka. *SPL/NZZ* může kontrolovat buněčný růst poutka, ale zdá se, že jde o vedlejší účinek při zakládání integumentu – vnějšího obalu vajíčka (Balasubramanian *et Schneitz*, 2000; Pinyopich *et al.*, 2003).

Z anatomických studií u bobovitých rostlin se ukázalo, že všechny mají tři základní upořádání pletiv v poutku: vnější krycí pletivo epidermis, střední primární kůra neboli kortex a vnitřní cévní svazek. Toto uspořádání a organizace pletiv se může lišit napříč rostlinnými systémy. Stejně jako osemení, tak i epidermis poutka slouží jako obrana vůči patogenům. Zároveň má funkci i jako mechanická opora (Chan *et Belmonte*, 2013).

U většiny bobovitých rostlin, obal semene neboli osemení vzniká z integumentu a je tvořen palisádovými buňkami (Smýkal *et al.*, 2014). Nicméně v blízkosti pupku se objevuje palisádová vrstva původem z poutka. Právě v tomto místě také probíhá opad semene od poutka. Avšak existují případy, kdy se u mutantů netvoří jasné ohraničení mezi osemením a poutkem (viz obrázek 2). Tento jev je důvodem neproběhlé abscise (Lee *et al.*, 2016).



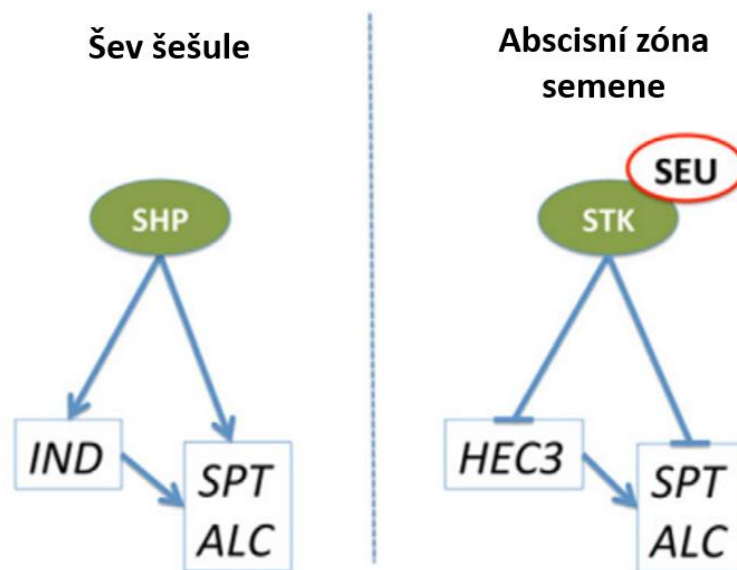
Obrázek 2: Vývin rozhraní mezi osemením a poutkem v místě hila A) u opadavého hrachu B) *def* mutanta. Legenda: SC: osemení, AZ: abscisní zóna, FN: poutko (převzato z Ayehe *et al.*, 2009).

3.3 Molekulární příčiny abscise

U většiny druhů spočívá disperze semen na dvou faktorech. Jedná se o puknutí plodu a následně oddělení semen. Molekulární mechanismy ovlivňující pukání a abscisi byly dobře popsány u rostlinného modelového organismu huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Po opylení dochází ke zrání a protahování šesule a zároveň i diferenciaci buněk a vzniku švu. Šev je tvořený z vrstvy lignifikovaných a přilehlých nelignifikovaných buněk, které jsou zodpovědné za mechanické otevření šesule během vysychání plodu. Tento proces pak nechává zralá semena odkryta, což umožňuje opad od mateřské rostliny a jejich následné šíření pomocí vektorů, jako je déšť nebo vítr (Spence *et al.*, 1996).

Za pukavost šesule je odpovědno několik genů. Dva z nich patří do skupiny MADS-box transkripčních faktorů. Jedná se o *SHATTEPROOF 1 (SHP1)* a *SHATTEPROOF 2 (SHP2)*, jejichž mutace vede k nepukavým plodům. SHP proteiny regulují expresi tří helix-loop-helix (bHLH) genů: *INDEHISCENT (IND)*, *ALCATRAZ (ALC)*, *SPATULA (SPT)* (viz obrázek 3). Ukázalo se, že *IND* je nezbytný pro specifikaci jak lignifikované, tak separační vrstvy ve švech, zatímco *ALC* a *SPT* se podílejí pouze na vytvoření separační vrstvy (Groszmann *et al.*, 2011). SHP1 a SHP2 jsou úzce spojeny s genem *SEEDSTICK (STK)*. U huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) se funkce *STK* kromě abscise studovala i ve spojitosti s vývojem osemení, a biosyntézy flavonoidů. *Seedstick* mutant se vyznačoval malými semeny s absencí opadu od mateřské rostliny (Balanzà *et al.*, 2016; Paolo *et al.*, 2021). *STK* působí také při vývoji vajíčka vytvořením heterodimeru s proteinem MADS-domény *SEPALLATA 3 (SEP3)*. Ukázalo se, že *STK* vytváří i komplex s korepresorem interagujícím s MADS-doménami transkripčních faktorů SEUSS (SEU) a společně tak potlačují lignifikaci v abscisní zóně (Balanzà *et al.*, 2016).

Nedávno byl popsán gen *HECATE 3 (HEC3)*, který pravděpodobně také hraje roli při abscisi semen, neboť semena *hec3* mutanta se neoddělují od poutka, a tudíž jsou stále součástí mateřské rostliny. Exprese genu *HEC3* ale i *SPT* či *ALC* je potlačena přímo genem *STK* (viz obrázek 3) (Balanzà *et al.*, 2016). Jak *HEC3*, tak *IND* interagují s geny *ALC* a *SPT* a mimo jiné sdílí několik cílových genů jako jsou polygalakturonázy ADPG1 a ADPG2, které se účastní vlastního procesu separace buněk (Ogawa *et al.*, 2009).



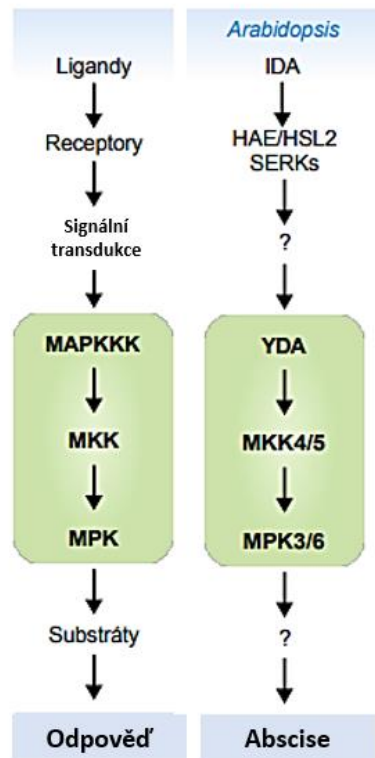
Obrázek 3: Porovnání molekulárních drah podílejících se na pukavosti lusku ve švu šesule a v abscisní zóně semene huseníčku (převzato a upraveno z Balanzà *et al.*, 2016).

Za regulaci abscise květních orgánů u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) je zodpovědný ligand – receptorový systém. Tento signální komplex se skládá ze sekretovaného IDA peptidu, který je kódovaný genem *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA)* a receptor-like kinázami (RLK) HAESA (HAE) a HAESA-LIKE2 (HSL2). Je-li zvýšena exprese těchto genů, dochází pak k opadu rostlinných orgánů podstatně dříve a zvětšuje se také abscisní zóna. Naopak mutace jak u genu *ida*, tak *hae* a *hsl2* zapříčiňuje setrvání květních orgánů na rostlině (Stø *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2019).

Nedávno se zjistilo, že opad listů huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) vlivem sucha probíhá obdobnými molekulárními mechanizmy, jako při opadu květních orgánů po opylení, neboť tyto molekulární procesy probíhající v abscisní zóně jsou vysoce konzervované.

Jak je již výše zmíněno u abscise květních orgánů ale i vadnoucích listů je potřeba receptor-like protein kinázy HAESA a HAESA-like 2 (HAE/HSL2), které jsou aktivovány peptidem *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (IDA)*. HAE/HSL2 následně aktivuje mitogen-aktivovanou protein kinázovou kaskádu (MAPK) (viz obrázek 4), která zase aktivuje transkripční MADS faktor *AGAMOUS-LIKE 15*, jenž umožňuje expresi genu *HAE* (Patharkar *et Walker*, 2016). Předpokládá se, že produkty vzniklé expesí *HAE*, jsou přepraveny do plazmatické membrány za pomoci ADP-ribosylačního faktoru GTPasa-aktivovaným proteinem NEVERSHED (NEV). Nedávno se ukázalo, že abscisní receptor kódovaný genem *HAE* využívá SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE kinázu

(SERK) jako koreceptor sloužící k rozpoznání IDA peptidu. Zjistilo se také, že biologicky aktivní IDA peptid vzniká štěpením delšího IDA proteinu působením subtilisin-like serin proteázy. Je zajímavé, že části této signální kaskády využívají i patogenní bakterie pro degradaci pektinu v listových pletivech, což umožní snazší vstup do rostliny (Patharkar *et al.*, 2017).

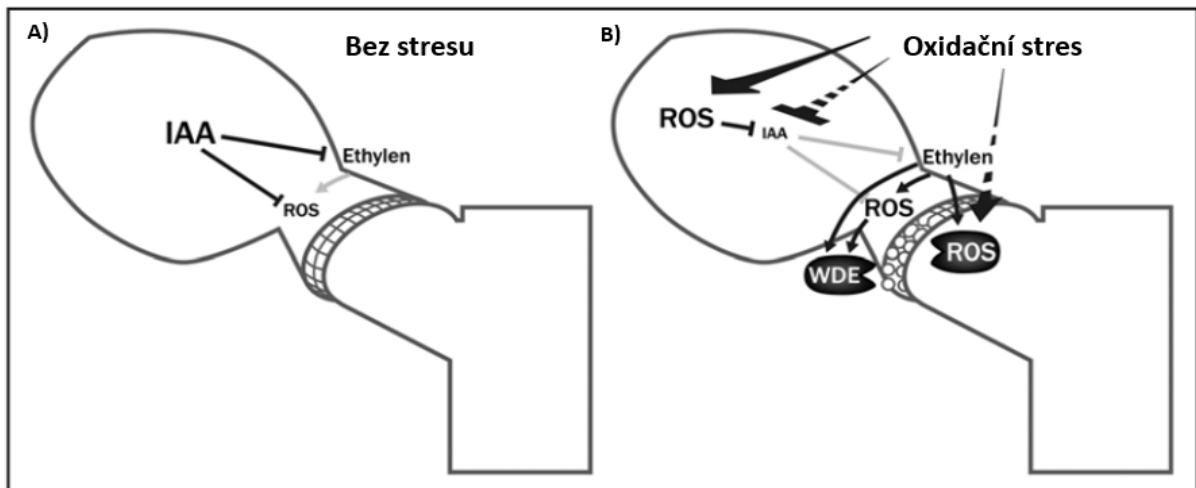


Obrázek 4: Signální kaskáda započatá ligandem IDA vázajícím se na receptor HAE/HSL2. Vlevo je zobrazený teoretický princip signální dráhy. Vpravo je kaskáda spuštěná konkrétně ligandem IDA u huseničky (*Arabidopsis thaliana*) (převzato a upraveno ze Sun *et Zhang*, 2022).

U pohanky (*Fagopyrum tataricum*) se křížením neopadavých a opadavých genotypů zjistilo, že všechny neopadavé linie nesou recesivní alely ve dvou nezávisle segregujících lokusech, které ovlivňují vývoj a funkci abscisní vrstvy. Recesivní homozygot kterékoliv z těchto lokusů potlačuje expresi dominantní alely toho druhého. Tento jev se nazývá recesivní epistáze. Ukazuje se, že tyto recesivní mutace brání vzniku abscisní vrstvy a zároveň potlačuje expresi dominantní alely lokusu *SHATTERING*. Tudiž u pohanky byly zjištěny nejméně tři nebo čtyři geny ovlivňující vývoj abscisní vrstvy (Fesenko, 2006).

3.3.1 Reaktivní formy kyslíku a abscise

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou produkovány ve vyšších koncentracích jako odpověď na různé enviromentální stresy jako je UV záření, chlad, zvýšená koncentrace solí či napadení patogeny. V návaznosti pak dochází k samotné abscisi rostlinných orgánů. V nedávné studii se ukázalo, že reaktivní formy kyslíku jsou součástí signální kaskády vedoucí k abscisi listu. Produkce peroxidu vodíku je potřeba k indukci exprese celulázy (EC 3.2.1.4) a enzymů degradujících buněčnou stěnu. Vliv na působení ROS má pravděpodobně i kyselina indolyl-3-octová (IAA) jejíž přítomnost snižuje aktivitu celulázy tedy zamezuje abscisi. Poklesem množství IAA kvůli enviromentálnímu stresu, dojde k větší produkci ROS vedoucí k abscisi (viz obrázek 5) (Sakamoto *et al.*, 2008).



Obrázek 5: Působení reaktivních forem kyslíku při stresem vyvolané abscisi u listu. A) Molekulární dráhy za normálních podmínek. B) Molekulární dráhy při oxidačním stresu (převzato a upraveno ze Sakamoto *et al.*, 2008).

Reaktivní formy kyslíku zahrnují skupinu molekul odvozených od molekulárního kyslíku, které vnikly oxidačně-redukční reakcí nebo elektronovou excitací. Chemická reaktivita ROS molekul se mezi sebou značně liší. Nejznámější z této skupiny je peroxid vodíku podílející se na redoxní regulaci biochemických aktivit. Stejně jako vápník je peroxid vodíku jednou z univerzálních signálních molekul (Sies *et Jones*, 2020). H_2O_2 spolu s dalšími druhými posly jako je oxid dusnatý, či sirovodík okamžitě reagují na receptorem zachycený signál. Druží poslové postupně aktivují kaskádu prostřednictvím specifických oxidací vedoucích k metabolické odpovědi buňky. Takto mohou být spuštěny i samotné transkripční faktory (Di Marzo *et al.*, 2018). Intracelulární koncentrace H_2O_2 je přísně kontrolována a pohybuje se

okolo 1–100 nmol.l⁻¹. Koncentrace větší jak 100 nmol.l⁻¹ vede k nespecifické oxidaci proteinů a jiných biomolekul, což může vést až k buněčné smrti. Produkce H₂O₂ je stimulována růstovými faktory nebo různými biotickými a abiotickými stresory (Sies a Jones, 2020).

Další důležitá molekula řadící se mezi reaktivní formy kyslíku je superoxid O₂⁻. Superoxid je zodpovědný za oxidační stres u organismů a vzniká jako vedlejší produkt dýchacího řetězce v mitochondriích. O₂⁻ je redukováná forma molekulárního kyslíku O₂ skládající se ze dvou atomů kyslíku se sedmnácti elektrony a má negativní elektrický náboj. Díky jeho náboji má nízkou membránovou propustnost a k transportu využívá pouze iontové kanály.

Jeho množství v organismu je regulováno dvěma enzymy superoxidemreduktázou (EC 1.15.1.2) a superoxidembismutázou (EC 1.15.1.1). Superoxid je nestálá molekula, ze které oxidační reakcí vzniká molekulární kyslík O₂ a redukční reakcí zase H₂O₂ (Andrés *et al.*, 2023).

3.3.2 Oxid dusnatý a abscise

Oxid dusnatý (NO) je v současné době považován za důležitou signální molekulu, která hraje roli nejen při rostlinném růstu ale i při stresových adaptacích a kontrole senescence. Studie ukazují, že volné molekuly NO slouží ke zprostředkování mnoha biochemických procesů související s velkou škálou fyziologických procesů zajišťující správné fungování rostlinného systému. NO cílí na mitochondriální i chloroplastové proteiny mimo jiné i na proteiny obsahující železo nebo na sloučeniny s aminy jako jsou například nukleové kyseliny. Produkci NO zajišťuje enzym NO syntáza (EC 1.14.13.39), který je regulován dočasnou změnou množství Ca²⁺ (Simontacchi *et al.*, 2015). Tento enzym byl prozatím identifikován pouze v živočišných buňkách. U rostlin se vyskytuje NOS-like enzym, který pravděpodobně zastává obdobnou funkci (Jeandroz *et al.*, 2016).

Během signalizace v návaznosti na endogenní podněty NO často interaguje s rostlinnými hormony jako jsou auxiny, gibereliny, cytokininy, kyselinou abscisovou, kyselinou salicylovou či etylenem za vzniku složitých komplexů. Právě etylen se účastní odpovědi na stres a urychluje stárnutí i opad rostlinných orgánů. Vzhledem k interakci etylenu s NO je možné že NO se účastní regulace opadávání. Studie ukázaly, že exogenním podáním NO se oddálilo opadávání jak vegetativních, tak generativních orgánů. NO inhibuje produkci etylenu snížením aktivity klíčových enzymů podílejících se na syntéze etylenu (Freschi, 2013).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro analýzu kandidátních genů zapojených do procesu opadavosti poutka byl použit kulturní genotyp hrachu (*Pisum sativum* L., cv. Cameor) a mutantní genotyp kulturního hrachu (*Pisum sativum* L., *def*) Neosypajuscisja 1 (05L0100528). Francouzská odrůda Cameor byla získána z pracoviště INRA, Dijon, Francie. Všechny v práci použité mutantní genotypy hrachu *def* byly získány z české genové banky z Prahy (<https://www.vurv.cz/vyzkum/odbor-genetiky-a-slechtění-rostlin/genova-banka/>). Rostliny byly pěstovány v 5 l květináčích se substrátovým mixem rašelina-písek (90:10) (Florcom Profi, BB Com Ltd., Letohrad, Česká republika) s hnojením (Kristalon Plod a Květ, Agro Ltd., Říkov, Česká republika), ve skleníku (leden–květen 2022) o denní teplotě 35–20 °C a noční teplotě 18–12 °C. Pěstování bylo doplněno světlem (Sylvania Grolux 600 W, Hortilux Schreder, Nizozemsko).

Pro izolaci genomové DNA byly vypěstovány mladé cca 2–3týdenní rostliny dostupných *def* genotypů. Ve výsledcích byly použity poslední tři číslice pro označení použitých genotypů. (seznam – viz tabulka 1).

Tabulka 1: Seznam dostupných *def* genotypů.

ECN	Položka-název	Označení
05L0100441	Orpela	441
05L0100520	Devulgatum 95/75	520
05L0100521	Deamkroglaukospermum 156/73	521
05L0100522		522
05L0100528	Neosypajuscisja 1	528
05L0100529	Deglaukospermum 161	529
05L0100599	Sonata	599
05L0100811	Determinatnyj	811
05L0100839	Sprut 2	839
05L0100842	Orlovcanin	842
05L0100843	Orlovcanin 2	843
05L0100844	Vjatic	844
05L0100883	US-90-3000	883
05L0100884	Batrak	884

ECN	Položka-název	Označení
05L0100885	LU-203-94	885
05L0100887	LU-213-94	887
05L0100904	L-228-96	904
05L0100908	Sustrik	908
05L0100918	AGT 96-1762	918
05L0100919	Aksajskij 10	919
05L0100951	US-93-1380	951
05L0100969	Areon C50	969

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

- 10 × TBE pufr (Na 1 litr 5,40 g TRIS báze; 2,75 g kyseliny borité; 2 ml 0,5 mol·l⁻¹ EDTA o pH 8,0; Sigma Aldrich, ČR)
- Agaróza (Bioline, kat. č. BIO-41025)
- Barvivo (Bluelight DNA, EZ-Vision, kat. č. 1B1680-0.5ML)
- Cryo-gel 12/case (Leica, kat. č. 39475237)
- DAF-FM DA (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát)
- DNáza I, bez RNáz (Top-Bio, kat. č. D061)
- DNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN, kat. č. 69106)
- Ethanol (VWR Chemicals, kat. č. 67-17-5)
- Exonukleáza I (Thermo Scientific, kat. č. EN0581)
- Fast Alkalická Fosfatáza pufr (Thermo Scientific, kat. č. EF0651)
- Fenol (Sigma, kat. č. 108-95-2)
- Glycerol (Tamda, kat. č. 13102004)
- H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát)
- Chloroform (Lachner, kat. č. 67-66-3)
- Isoamylalkohol (Roth, kat. č. 123-51-3)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, kat. č. 017-002-01-X)
- Kyselina octová (Tamda, kat. č. 01022010)
- Marker molekulové hmotnosti GeneRuler 100 bp DNA Ladder (0,5 µg·µl⁻¹, Thermo Scientific, kat. č. SM0241)
- Plant RNA Reagent (Thermo Scientific, kat. č. 12322-012)
- SentiFAST[™] cDNA synthesis kit (Bioline, kat. č. BIO-65054)

- SensiMix™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline, kat. č. QT650-05)
- Taq DNA polymeráza (5U/μl, MyTaq, kat. č. BIO-21105)
- Taq pufr (5x, MyTaq Red, Bioline, kat. č. 37112)
- Termosensitivní Alkalická Fosfatáza (Thermo Scientific, kat. č. EF0651)

4.3 Použité primery

Seznam použitých primerů při PCR amplifikaci, sekvenaci a RT-qPCR včetně jejich základní charakteristik jsou uvedeny v Tabulkách 2, 3 a 4.

Tabulka 2: Použité primery na PCR amplifikaci.

Primer	Foward/Reverse primer	Sekvence (5'–3')	Délka ampliconu
<i>Gen HAE</i> (<i>Psat7g116520.1</i>)	F	ACTAGTACCATGCGTAGCAAACC	1908 bp
	R	CTCCCATATCTTCTTCACAGCAA	
	F	ATGCAAAATGGTAGTCTCGGTGAT	1285 bp
	R	GTCACAATTTTGAAGCCACCTACC	
<i>Seedstick (STK)</i> (<i>Psat7g066560</i>)	F	TCAGCTTGCAACTATGAGTTTTCC	2349 bp
	R	ACCTGAGCATTAGTCTCAGAAGC	
	F	CGTACAACCTGTTCTTACTGCCAC	3940 bp
	R	TGTGTGATTGATCTTACCGCGAT	

Tabulka 3: Přehled použitých primerů při sekvenaci.

Primer	Foward/Reverse primer	Sekvence (5'–3')
<i>Gen HAE</i> (<i>Psat7g116520.1</i>)	F	ACTAGTACCATGCGTAGCAAACC
	F	TTGTTGGTGTCATTCCTGAAACTC
	F	CTCACTCCAGATAGTTTGGTCA
	F	ATGCAAAATGGTAGTCTCGGTGAT

Primer	Foward/Reverse primer	Sekvence (5'– 3')
<i>Seedstick (STK)</i> (<i>Psat7g066560</i>)	F	TCAGCTTGCAACTATGAGTTTCC
	F	CGTACAACCTGTTCTTACTGCCAC
	F	GCTTCTGAGACTAATGCTCAGGT
	F	CATGGAGGCACAACTTCGAGT

Tabulka 4: Použité primery pro qRT-PCR.

Primer	Foward/Reverse primer	Sekvence (5'– 3')	Délka amplikonu
<i>Gen HAE</i> (<i>Psat7g116520.1</i>)	F	GGTGATGTTGAGAAGGGTAGG	171 bp
	R	AAGCAAATCACCGAGACTACC	
<i>Seedstick (STK)</i> (<i>Psat7g066560</i>)	F	CCAGATGTCTCTTCAATTTGTGTAAG	143 bp
	R	AACTCTTCCCTTCTCAACCG	
<i>HEC3 homolog</i> (<i>Psat7g046520</i>)	F	TGACATCGTCTGGCCTTTTG	134 bp
	R	GTGAATGTGAATGTGGATGCG	
<i>SPT homolog</i> (<i>Psat2g166760</i>)	F	TCCTCTCAAACCCACTTCAAC	110 bp
	R	TTCATCCGTGTCGTTACCAC	
<i>ALC homolog</i> (<i>Psat0s2139g0120</i>)	F	AACTCTTCCACAACCATCCC	136 bp
	R	CAGCTCTGCTTCTCTTTGATG	
Referenční gen <i>Psat5g212520</i>	F	AGGTGTTTGGTGCTGAGTAC	163 bp
	R	TTCCCCTTGAGTTGCTTCC	
Referenční gen <i>Psat6g025120</i>	F	TGGGATTCTCTTCACTTGCG	136 bp
	R	GAAATCAACGGCCCATCTTC	

4.4 Použité přístroje a zařízení

- Centrifuga (Centrifuge 5415 R, Eppendorf)

- Elektroforéza (EasyCast B1, Thermo Scientific)
- Flowbox (PV – 100, TelSTAR)
- Fluorescenční mikroskop (Imager.Z, Zeiss)
- Homogenizátor (FastPrep-24, MP Biomedicals)
- Inkubátor (Melag, P-LAB a.s.)
- Lednice (No frost, Liebherr)
- Mikroskop Olympus BX60 (kamera Olympus DP72)
- Nanodrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific)
- Real – time systém (CFX Connect, Bio-Rad)
- Stolní centrifuga (Mini Star, VWR)
- Světelný mikroskop BX60 (Olympus)
- Stereomikroskop SZX16 (Olympus)
- Thermocycler (Mastercycler Pro S, Eppendorf)
- Třepačka (MS 3 basic, IKA)
- Inkubátor (ThermaCell CHB202, BIOER)
- Ultramikrotom CM 1950 (Leica)
- UV transiluminátor (FireReader Platinum HD7, Uvitec Cambridge)
- Váha 572 (Kern)
- Vibratom (Leica)
- Výrobník ledu (Ice flaker, Brema IceMacers)
- Zdroj stejnosměrného napětí (Minis-300, MS Major Science)

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

- MS Excel (verze 2016)
- Program CFX Maestro (verze 4.1.2433.1219., Bio-rad)
- Program Geneious (verze 7.1.9, Biomatters)
- Program FastPCR (PrimerDigital Ltd., Finsko)
- Program FireReader V4 (Uvitec)
- Program PHOTO Camera 3.0
- Program Primer3 (verze 0.4.0.)
- Software QuickPHOTO CAMERA (verze 3.2, Promicra)

4.6 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.6.1 Záznam morfologie semene a poutka Cameoru a mutantního *def* genotypu

Fotografie semen a poutek kulturního Cameor a mutantního genotypu *def* byly pořízeny pomocí stereomikroskopu SZX16 (Olympus).

4.6.2 Podélné řezání poutka a pupku hrachu na ultramikrotomu

1. Vypreparovat pomocí skalpelu poutko s pupkem a malou částí osemení a vložit to do předem připraveného kryogelu na hliníkovém disku.
2. Po ztuhnutí gelu vložit preparát do ultramikrotomu a příčně krájet 20 μm řezy.
3. Řezy pokládat na podložní sklíčko.

4.6.3 Barvení řezu poutka a pupku hrachu toluidinovou modří

1. Řezy na podložním sklíčku zakápnout toluidinovou modří a nechat minutu působit, poté opatrně smýt destilovanou vodou.
2. Takto nabarvené řezy překrýt krycím sklíčkem.

4.6.4 Podélné řezání poutka a pupku na vibratomu

1. Rozpustit v mikrovlnné troubě 4% agarosu v 0,1 M K-fosfátovém pufru o pH 7 a přelít do mističky.
2. Nechat vychladnout na 40 °C, vložit dovnitř poutka a nechat ztuhnout na ledu.
3. Vyříznout gel s preparátem do tvaru pyramidy, vložit do vibratomu a řezat na tenké plátky o 30 μm .

4.6.5 Barvení řezu poutka a pupku pomocí H₂DCF DA a DAF-FM DA

1. Pro detekci ROS připravit 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok H₂DCF DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát) ředěním zásobního 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku.
2. Pro detekci NO připravit 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok DAF-FM DA (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát) ředěním zásobního 5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku.
3. Všechny roztoky s fluorescenčními sondami uchovávat ve tmě.
4. Připravené řezy rostlinným materiálem inkubovat 5 minut s fluorescenčními sondami pro detekci ROS, respektive NO. Poté řezy minimálně 3x propláchnout 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátovým pufrům pH 7 a pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem.

4.6.6 Izolace genomové DNA

Pro izolaci DNA byly použity listy genotypů neopadavého mutantního (*def*) hrachu (viz tabulka 1) a kulturního cv. Cameor.

1. Do mikroskopické vložky vložit 100 mg listu spolu s 400 μ l pufru AP1 a 4 μ l RNázy A.
2. Homogenizovat kuličkou 2x po dobu 1 minut při maximální rychlosti pomocí homogenizéru FastPrep-24 a poté inkubovat 15 minut při 65 °C. Po dobu inkubace dvakrát opatrně promíchat.
3. Přidat pufr P3, zvortexovat a inkubovat 5 minut na ledu.
4. Poté centrifugovat 5 minut při 13 000 rpm.
5. Napipetovat lyzát do QIAshredder spin kolony s 2 ml mikroskopickou vložkou a centrifugovat 2 minut 13 000 rpm.
6. Přepipetovat 300 μ l proteklého vzorku do nové mikroskopické vložky a přidat 750 μ l pufru AW1. Promíchat pipetováním a zvortexováním.
7. Přemístit 650 μ l vzorku do DNeasy Mini spin kolony s 2 ml mikroskopickou vložkou a centrifugovat 1 minutu při 8 000 rpm. Zopakovat tento krok se zbývajícím vzorkem.
8. Umístit kolonu do nové 2 ml mikroskopické vložky, přidat 500 μ l pufru AW2 a centrifugovat 1 minutu při 8 000 rpm.
9. Odstranit proteklou tekutinu a znovu přidat 500 μ l pufru AW2 a centrifugovat 2 minuty při 13 000 rpm.
10. Přemístit kolonu do 1,5 ml mikroskopické vložky a přidat 100 μ l elučního AE pufru. Inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a poté centrifugovat 1 minutu při 8 000 rpm. Tento krok následně znovu zopakovat.

4.6.7 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byly použity poutka a osemení mutantního neopadavého *def* (viz tabulka 1) a kulturního Cameor.

1. Dát do mikroskopické vložky 0,5 ml PureLink® Plant RNA Reagent a cca 0,1 gramů zmrazeného homogenizovaného rostlinného materiálu.
2. Krátce zvortexovat a nechat inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Mikroskopické vložky horizontálně položit, aby byl povrch směsi co největší.
3. Centrifugovat 2 minuty při 12000 rpm, následně přenést supernatant do čisté mikroskopické vložky.
4. Přidat 0,1 ml 5 M NaCl a promíchat.

5. K promíchané směsi přidat 0,3 ml chloroformu, také důkladně promíchat.
6. Centrifugovat při 12000 rpm po dobu 10 minut při 4 °C, poté přepipetovat vodní fázi do čisté mikrozkušavky.
7. Přidat isopropyl alkohol o stejném množství jako je vodní fáze a nechat stát 10 minut při pokojové teplotě.
8. Centrifugovat při 12000 rpm po dobu 10 minut při 4°C.
9. Opatrně slít supernatant a ke vzniklému peletu poté přidat 1 ml 75% ethanolu.
10. Centrifugovat 1 minutu při 12000 rpm při pokojové teplotě.
11. Supernatant opatrně vylít a zbylou tekutinu odstranit pipetou.
12. Přidat k peletu 40 µl RNA-free vodu a rozpustit RNA.
13. Uchovávat při – 70 °C.

4.6.8 Odstranění genomické DNA

Před přepisem RNA do cDNA je zapotřebí odstranit všechny zbytky DNA, které by mohly vytvořit během následné PCR amplifikaci nespecifické produkty.

1. Nechat rozmrazit vzorky, po celou dobu pracovat na ledu.
2. Ke 40 µl vzorku přidat 4 µl 10× reakčního pufru, 4 µl Top-Bio DNázy, 1 µl ribonukleázového inhibitoru a nechat inkubovat při 37 °C po dobu 20 minut.
3. Doplnit každý vzorek vodou do 200 µl.
4. Přidat 200 µl fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) a zvortexovat.
5. Nechat rozdělit na dvě fáze a poté znovu promíchat zvortexováním a okamžitě centrifugovat při 13000 rpm po dobu 10 minut při 4 °C.
6. Přepipetovat vzniklou horní fázi do nové mikrozkušavky a přidat 300 µl chloroform:isoamylalkohol (24:1), promíchat vortexováním a centrifugovat 5 minut při 13000 rpm.
7. Přepipetovat vzniklou horní fázi do čisté mikrozkušavky a přidat 20 µl 1 M kyseliny octové a 550 µl 96% ethanolu, nechat inkubovat přes noc při – 80 °C.
8. Centrifugovat 30 minut při 13000 rpm při 4 °C.
9. Vylít supernatant a přidat 500 µl 70% ethanol, centrifugovat při 13000 rpm po dobu 5 minut při 4 °C.
10. Slít opatrně supernatant a přidat 96% ethanol, centrifugovat při 13 000 rpm po dobu 5 minut při 4 °C.

11. Opatrně vylít supernatant a centrifugovat 1 minutu, odstranit veškerou tekutinu a poté přidat 30 μl vody.

4.6.9 Spektrofotometrické stanovení koncentrace

Před samotným přepisem RNA do cDNA je potřeba proměřit koncentraci a čistotu vyizolované RNA pomocí NanoDropu.

1. Stanovit koncentraci a čistotu vyizolované RNA pomocí spektrofotometru NanoDrop.
2. Nejprve nanést 2 μl vody (blank), utřít čidlo buničinou a poté nanést 2 μl vzorku.
3. Mezi každým vzorkem otřít snímač.
4. Absorbanci proměřit na NanoDropu při 260 nm, 280 nm a 230 nm.

4.6.10 Přepis RNA do cDNA

Přepis RNA do cDNA byl proveden za pomoci dvoukrokové reverzní transkripce.

1. Naředit vzorky tak, aby každý z nich měl koncentraci 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, poté přidat 4 μl 5 \times TransAmp pufru, 1 μl reverzní transkriptázy, doplnit RNA-free vodou do 20 μl a pipetováním promíchat.
2. Vložit mikrozkušavky do přednastaveného PCR cycleru:
 - 25 °C: 10 minut
 - 42 °C: 15 minut
 - 48 °C: 15 minut
 - 85 °C: 5 minut
 - 4 °C: chlazení

4.6.11 Polymerázová řetězová reakce (PCR) pro analýzu kandidátního genu *HAE (Psat7g116520.1)* a *STK (Psat7g066560)*

Pro další analýzy kandidátních genů v mutantních genotypch (tabulka 1) a kulturního Cameor je nejdříve potřeba provést jejich amplifikaci pomocí PCR reakce. Pro tuto reakci byly použity navržené primery v programu FastPCR.

1. Navržené primery (viz tabulka 2) suspendovat v daném objemu vody na koncentraci 100 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a následně naředit 10 \times .
2. Připravit do 1,5ml mikrozkušavky reakční směs (pro jeden vzorek napipetovat: 4 μl pufru, 13 μl destilované vody, 1 μl mixu forward a reverse primeru (viz tabulka 2), 0,1 μl polymerázy).

3. Reakční směs rozpipetovat do stripů a přidat 2 μ l vzorku cDNA, popřípadě genomové DNA.
4. Desku vložit do termocykléru a nastavit program (viz tabulka 5).

Tabulka 5: Teplotní program pro PCR amplifikaci.

Průběh	Teplota [°C]	Počet cyklů	Čas [min]
Počáteční denaturace	95	1	5
Denaturace	95		0,5
Nasednutí primerů	55	35	0,5
Polymerace	72		2
Finální elongace	72	1	8
Udržování	15	-	-

4.6.12 Horizontální agarózová elektroforéza

Pro ověření správného průběhu PCR amplifikace byla provedena horizontální agarózová elektroforéza.

1. Pro přípravu 1 % agarózového gelu navážit 0,8 g agaru a přidat jej do 80 ml TBE pufru.
2. Směs za občasného zamíchání zahřívát do úplného rozpuštění agaru a poté nechat zchladnout.
3. Do zchladlé směsi přidat 5x koncentrovanou nanášecí barvičku a promíchat.
4. Nalít směs do předem připravené elektroforetické vany, vložit hřebínky a nechat ztuhnout.
5. Po ztuhnutí gelu vyjmout hřebínek, vaničku vložit do elektroforetické komůrky, kterou následně naplnit TBE pufrem, tak aby gel byl převrstven cca 5 mm pufru.
6. Napipetovat do jamek 5 μ l vzorku PCR produktu. Do první jamky přijde 2 μ l standardu molekulové váhy.
7. Zapojit zdroj stejnoměrného elektrického proudu. Zdroj nastavit na 100 V.
8. Po rozdělení vzorků vypnout zdroj a gel vložit do UV transluminátoru.

4.6.13 Přečištění a příprava vzorků na sekvenaci

Vzorky určené k sekvenaci byly potřeba nejdříve přečistit od dříve použitých PCR primerů, neboť by zkreslovaly výsledky sekvenace.

1. Připravit do 1,5ml mikrozkušavky reakční směs o výsledném objemu 5 μl (pro jeden vzorek napipetovat: 1 μl fast AP pufru, 3,45 μl destilované vody, 0,4 μl exonukleázy I, 0,15 μl AP termosenzitivní alkalické fosfatázy).
2. Směs propipetovat a inkubovat 15 minut při 37 °C.
3. Zastavit reakci zvýšením teploty na 85 °C na 15 minut.

4.6.14 Sekvenování DNA

Vzorky k osekvenování byly poslány do Laboratoře sekvenace DNA, PřF UK Praha. Pro sekvenaci byly použity primery uvedené v tabulce 3.

4.6.15 Kvantitativní reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)

V dalším kroku byla provedena qRT-PCR, kterou se zjišťuje množství transkriptu v reálném čase. K tomu je zapotřebí i referenční gen, přičemž pro tento účel byly použity dva referenční geny *Psat5g212520* a *Psat6g025120*. Měření bylo vztaženo ke kulturnímu genotypu Cameor, u vývojových stádiích vztaženo ke kulturnímu genotypu Cameor 8 DAP. Reakce proběhla v technických a biologických triplikátech.

qRT-PCR reakcí se stanovovala exprese genů *HAE (Psat7g116520.1)*, *STK (Psat7g066560)*, *ALC (Psat0s2139g0120)*, *HEC3 (Psat7g046520)* a *SPT (Psat2g166760)*.

1. Navržené primery suspendovat v daném objemu vody na koncentraci 100 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ zásobního roztoku a následně naředit 10 \times na výslednou koncentraci 10 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$
2. Připravit do 1,5ml mikrozkušavky reakční směs (pro jeden vzorek napipetovat: 10 μl SYBR, 1,2 μl forward primeru a 1,2 μl reverse primeru (viz tabulka 4), 3,6 μl destilované vody).
3. Reakční směs rozpipetovat do 96 jamkové PCR desky a přidat 4 μl 10 \times naředěného vzorku cDNA.
4. Desku vložit do termocykléru a nastavit program (viz tabulka 6).
5. Zpracování hodnot získané z termocykléru pomocí počítačového programu Microsoft Excel, přičemž je využita metoda $\Delta\Delta\text{Ct}$, která prezentuje změny na úrovni genové exprese, podle vzorce: Poměr = $\frac{(E_{\text{studovaný gen}})^{\Delta\text{Ct studovaný gen (kontrola-vzorek)}}}{(E_{\text{referenční gen}})^{\Delta\text{Ct referenční gen (kontrola-vzorek)}}$. Hodnota

Ct vyjadřuje prahový cyklus (počet cyklů), ve kterém se podařilo dosáhnout fixní hodnotu produktu (Pfaffl *et al.*, 2001). E vyjadřuje účinnost primerů, která byla vypočítána dle vzorce $E = 10^{\left(-\frac{1}{\text{slope}}\right)} - 1$. V programu Microsoft Excel byla rovněž vytvořena kalibrační řada ke zjištění účinnosti primerů.

Tabulka 6: Teplotní program pro qRT-PCR.

Průběh	Teplota [°C]	Počet cyklů	Čas [s]
Počáteční denaturace	95	1	600
Denaturace	95		15
Nasednutí primeru	60*	39	15
Polymerace	72		20

*Teplota nasednutí primeru byla pro geny *ALC*, *HEC3* a *SPT* 61 °C.

5 Výsledky

5.1 Morfologie semene a poutka Cameoru a mutantního *def* genotypu

Pro morfologickou analýzu semen a poutek byl použit cv. Cameor a mutantní genotyp *def* (viz tabulka 1). Snímky suchých dozrálých semen o stáří 30 DAP (Days after pollination) byly pořízeny pomocí stereomikroskopu SZX16 (Olympus). Semeno cv. Cameor (obrázek 6) má vytvořený pupek v místě kontaktu s poutkem. U semene mutantního genotypu s neupadlým poutkem se pupek nevytvořil (obrázek 7).



Obrázek 6: Semeno hrachu cv. Cameor s viditelným pupkem po opadu poutka.

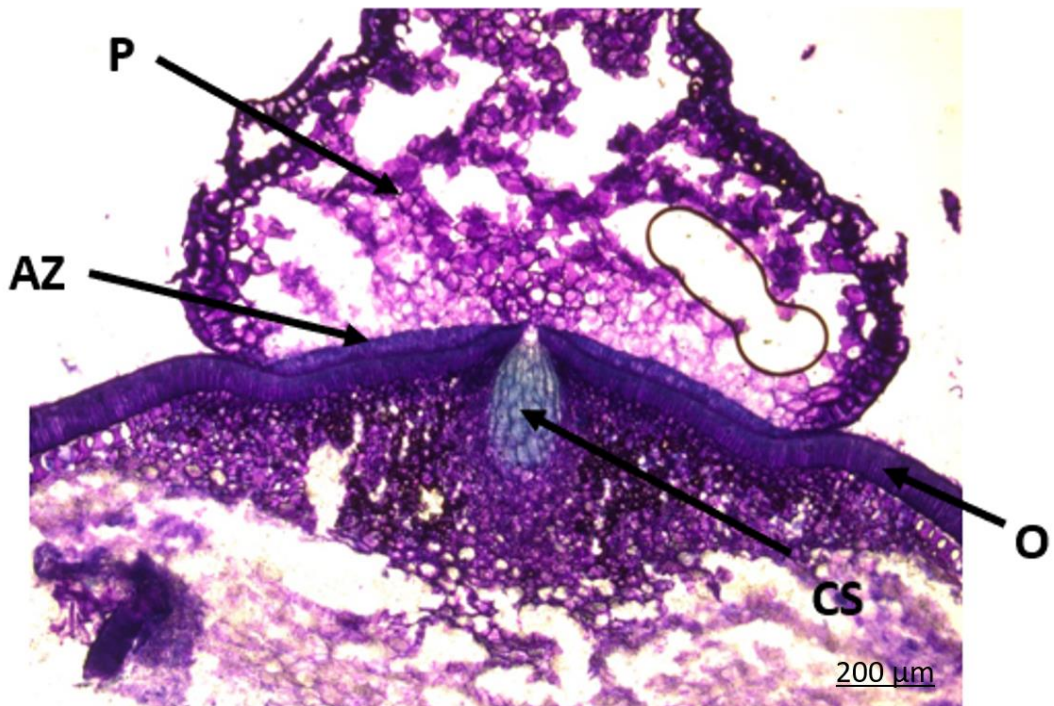


Obrázek 7: Semeno hrachu mutantního *def* s neupadlým zaschlým poutkem A) pohled z boku B) pohled ze shora.

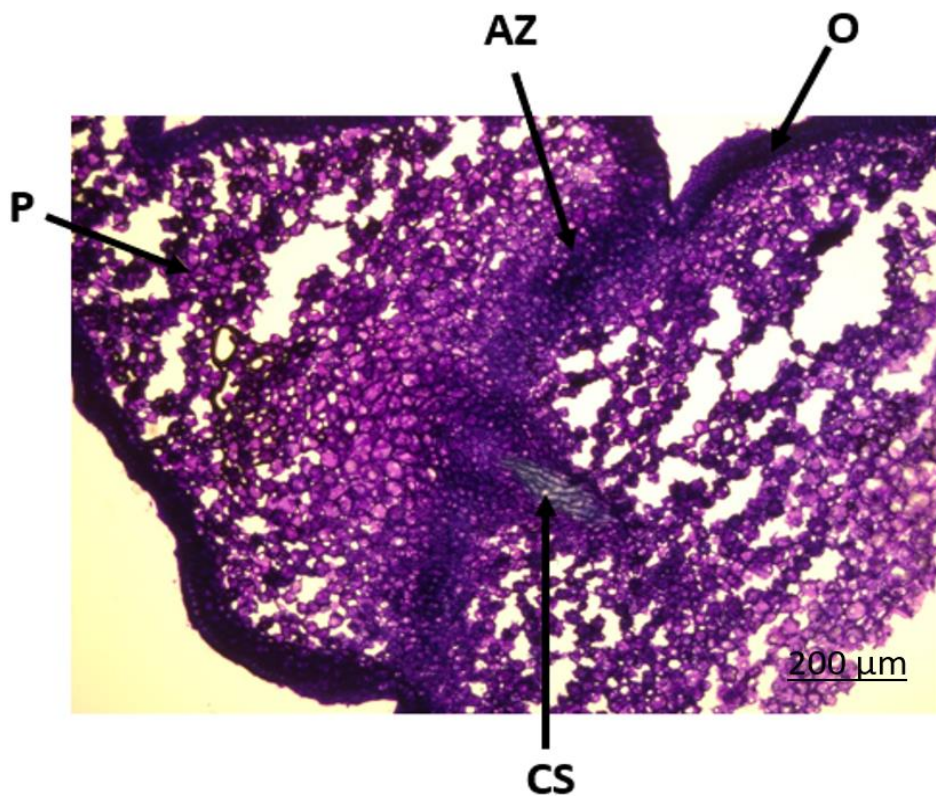
5.2 Anatomická analýza poutka

Pro anatomickou analýzu poutka byl použit opadavý genotyp kulturního hrachu *Cameor* a neopadavý genotyp hrachu *def*. Studované vzorky obou použitých genotypů byly stáří 16 DAP (days after pollination). Byly připraveny 20 µm silné řezy pomocí kryomikrotomu a následně barveny toluidinovou modří pro zviditelnění buněk.

Na obrázku 8 lze vidět na průřezu poutkem a částí semene hrachu cv. *Cameor* vzniklou abscisní zónu tvořenou palisádovými buňkami, ve které později dochází k oddělení semene od poutka. Na semeni se poté v tomto místě vytvoří jizva neboli pupek. Na obrázku 9 je průřez poutkem a částí semene neopadavého genotypu *def*, kde se jasné rozhraní mezi poutkem a semenem nevytvořilo a místo je vyplněno nediferenciovanými parenchymatickými buňkami.



Obrázek 8: Průřez poutkem a částí semene opadavého kulturního hrachu cv. Cameor 16 DAP.
 Legenda: AZ – abscisní zóna; CS – cévní svazek; O – osemení; P – poutko

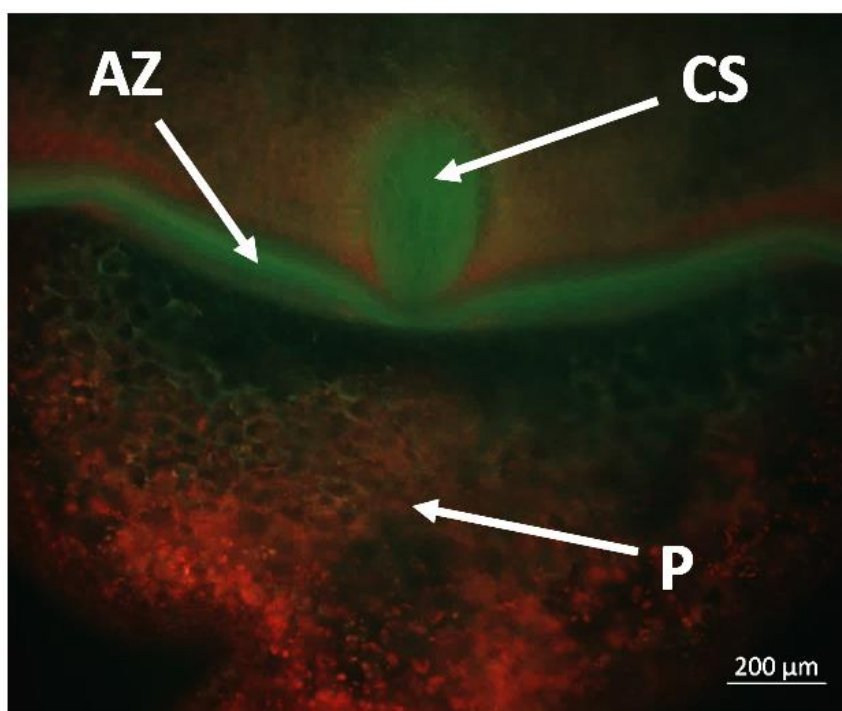


Obrázek 9: Průřez poutkem a částí semene neopadavého hrachu *def* 16 DAP. Legenda: AZ – abscisní zóna; CS – cévní svazek; O – osemení; P – poutko

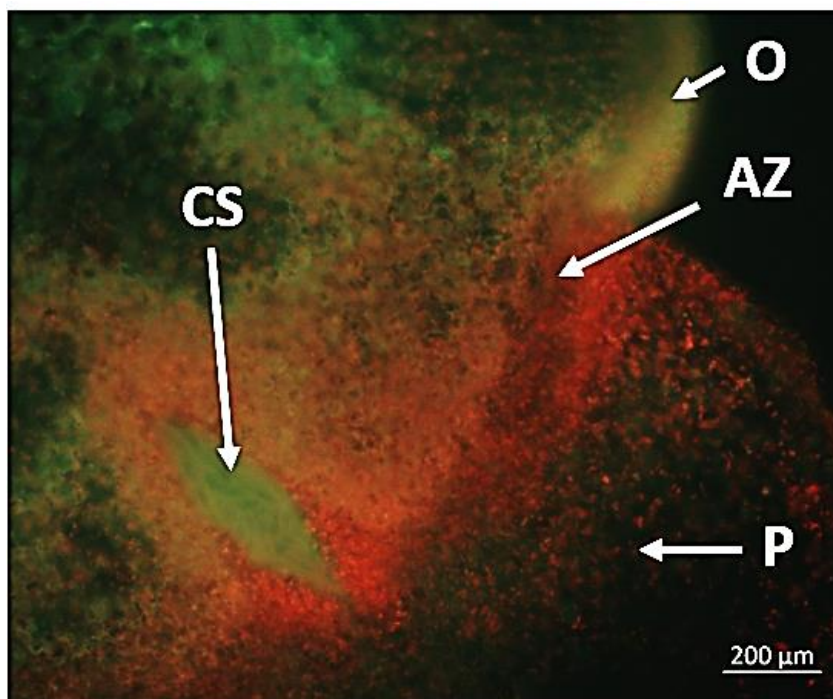
5.3 Histochemická lokalizace molekul ROS a NO

Pro detekci reaktivních sloučenin kyslíku a oxidu dusnatého v oblasti poutka byl rovněž použit opadavý genotyp kulturního hrachu *Cameor* a neopadavý genotyp hrachu *def*. *Cameor* byl ve stádiu 23 DAP a *def* byl ve stádiu 21 DAP. Řezy o tloušťce 30 μm byly připraveny pomocí vibratomu. Pro detekci ROS byl použit $\text{H}_2\text{DCF DA}$ (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát) a pro NO byl použit DAF-FM DA (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát). Řezy byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu.

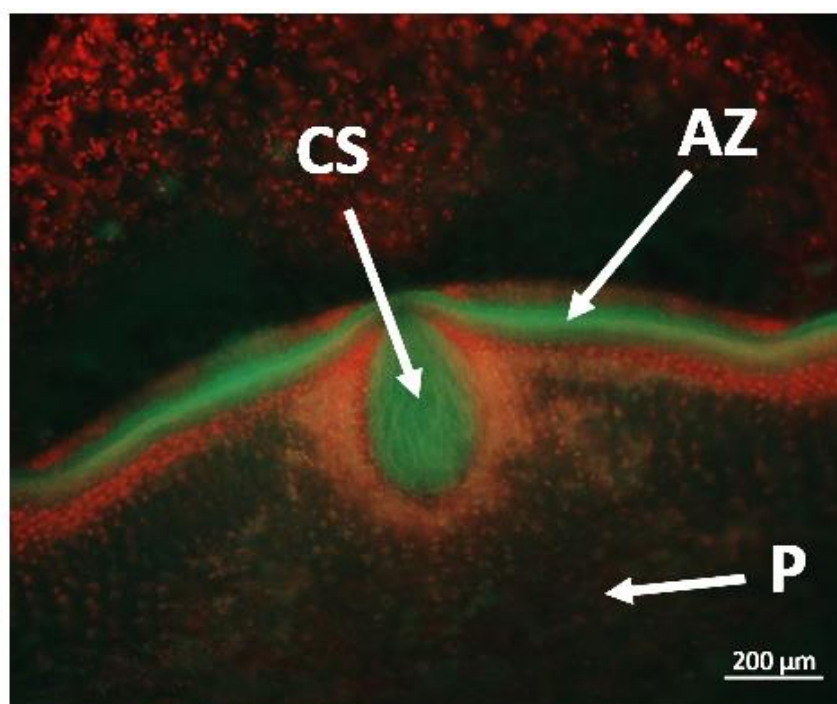
Na obrázku 10 lze vidět průřez poutkem a napojené části semene cv. *Cameor* u kterého nebyl detekovaný žádný signál značící přítomnost molekul ROS, zatímco detekce NO u cv. *Cameor* (viz obrázek 12) ukázala, že nejvíce fluorescenčního zeleného signálu, značící přítomnost molekul NO, je v místě abscisní zóny a také cévního svazku. Červený signál pak značí autofluorescenci chlorofylu. Naopak u řezů mutantního genotypu *def* nebyl detekován skoro žádný zelený signál, tedy zde není přítomnost molekul ROS a NO (viz obrázky 11 a 13).



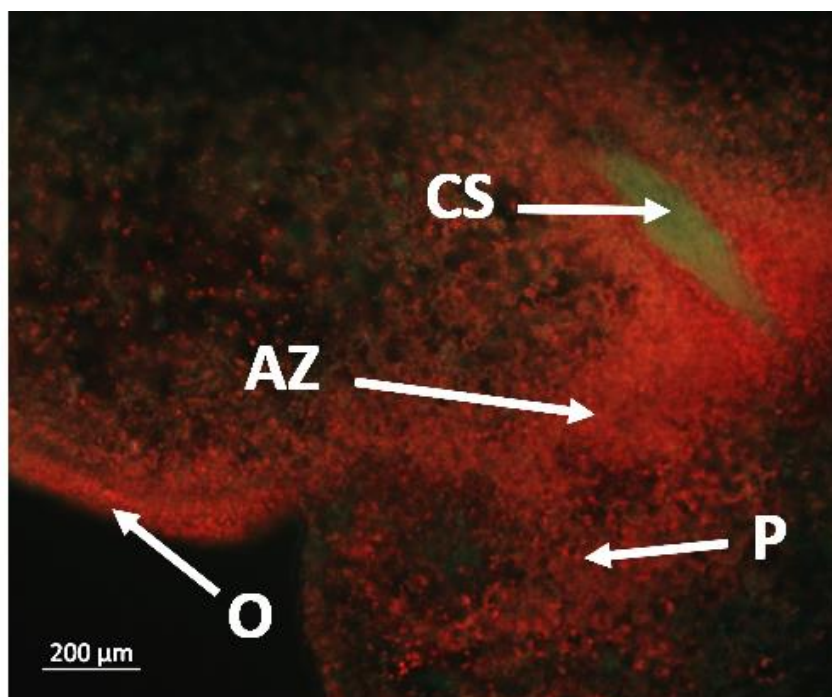
Obrázek 10: Detekce ROS na řezu poutka a části semene opadavého hrachu cv. *Cameor* ve stádiu 23 DAP s využitím fluorescenční sondy $\text{H}_2\text{DCF DA}$. Legenda: AZ – abscisní zóna; CS – cévní svazek; P – poutko



Obrázek 11: Detekce ROS na řezu poutka a části semene neopadavého hrachu *def* ve stádiu 21 DAP s využitím fluorescenční sondy H₂DCF DA. Legenda: AZ – abscisní zóna; CS – cévní svazek; O – osemení; P – poutko



Obrázek 12: Detekce NO na řezu poutka a části semene opadavého kulturního hrachu cv. Cameor ve stádiu 23 DAP s využitím fluorescenční sondy DAF-FM DA. Legenda: AZ – abscisní zóna; CS – cévní svazek; P – poutko



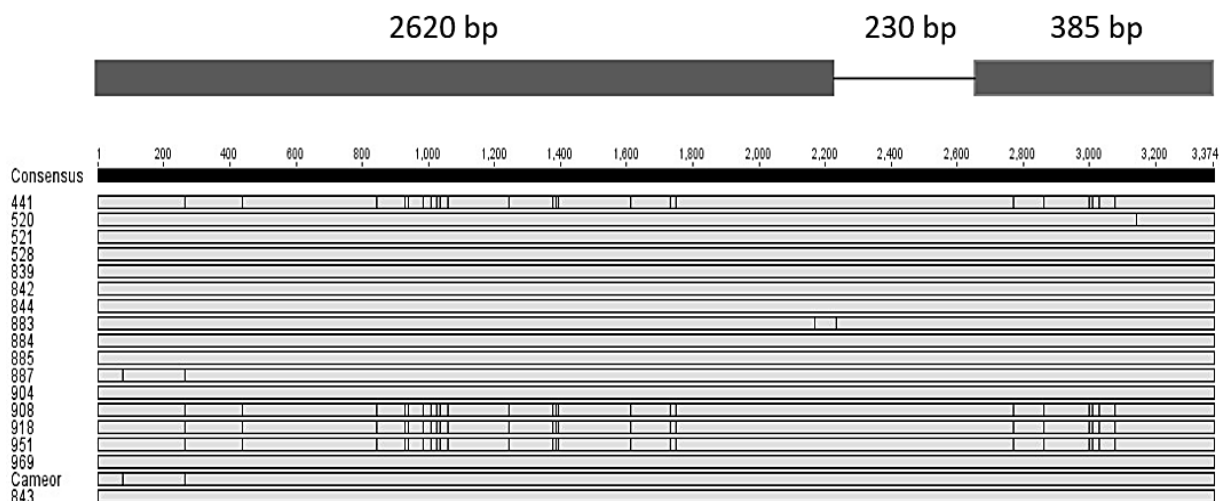
Obrázek 13: Detekce NO na řezu poutka a části semene neopadavého hrachu *def* ve stádiu 21 DAP s využitím fluorescenční sondy DAF-FM DA. Legenda: AZ – abscisní zóna; CS – cévní svazek; O – osemení; P – poutko.

5.4 Sekvenace kandidátního genu *HAE* (*Psat7g116520.1*) kulturního cv. Cameoru a mutantních genotypů *def*

Na základě homologie a lokalizace na chromosomu 7 bylo vybráno několik kandidátních genů. Jedním z nich byl gen *HAE* (*Psat7g116520.1*), který se nachází v pozici 191 193 307 bp v genomu cv. Cameor a obsahuje dva exony a intron o délce 230 bp (viz obrázek 14) a jeho translace vede ke vzniku receptor-like protein kinázi HLS1.

Pro hledání polymorfizmu mezi kulturním opadavým cv. Cameor a neopadavými mutantními genotypy *def* (viz tabulka 1) byly navrženy primery (viz tabulka 2), tak aby amplifikovaly dílčí části genu. Amplikony o velikostech 1908 bp a 1285 bp byly nejdříve přečištěny a poté poslány na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA, Biocev, PřF UK Praha. Použité primery pro sekvenaci jsou uvedené v tabulce 3. Získané sekvence byly díky jejich vzájemným překryvům poskládány a následně porovnávány s ostatními genotypy pomocí programu Geneious. Výsledné poskládané sekvence měly velikost 3374 bp (viz obrázek 14). Ze získaných dat byl zjištěn polymorfizmus v sekvencích mutantních genotypů *def*. Konkrétně bylo v různých místech sekvencí nalezeno 26 jednonukleotidových záměn z toho jedna byla

v intronu a zbytek v exonech (viz tabulka 7). Předpokládá se, že se jedná o jednu původní mutaci, která se následně nakřížila do dalších genotypů. Výchozí hypotézou je, že pokud by se jednalo o kauzální gen, zjištěný polymorfismus by byl u všech stejný. Avšak nebyl nalezen žádný polymorfismus napříč sekvencemi genotypu *def*, který by zapříčinil mutaci neopadavého genotypu *def*. Všechny polymorfizmy jsou synonymní, tedy záměna báze nevede ke kódování jiné aminokyseliny.



Obrázek 14: Sekvence genu *HAE* (*Psat7g116520.1*) gDNA kulturního cv. Cameoru a mutantních genotypů *def* (viz tabulka 1). Černé čáry v sekvencích zobrazují jednonukleotidové záměny. Nad sekvencemi je grafické znázornění genu. Obdélníky značí exony a tenká čára intron.

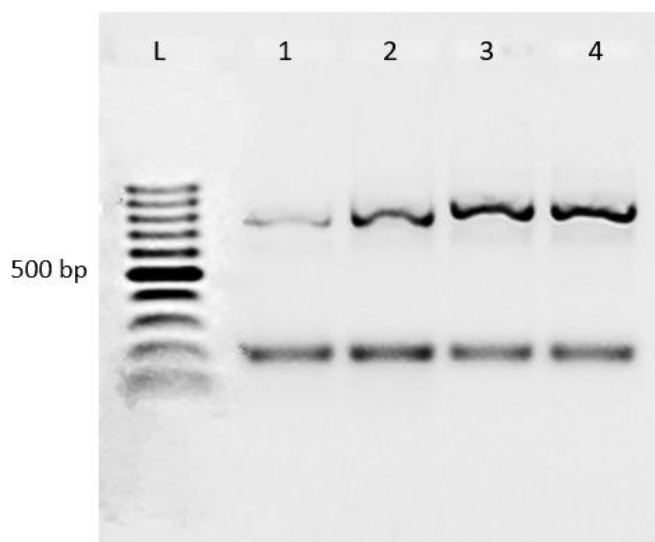
Tabulka 7: Analýza polymorfizmu genu *HAE* ve 21 *def* genotypěch.

Číslo polymorfizmu	Typy nukleotidů	Pozice od START kodonu (bp)	Četnost výskytu	Synonymní/Nesynonymní záměna
1	C/G	77	14,3 % C/85,7 % G	Synonymní
2	C/G	264	33,3 % C/66,7 % G	Synonymní
3	G/C	441	19 % G/81 % C	Synonymní
4	C/G	846	19 % C/81 % G	Synonymní
5	C/T	930	19 % C/81 % T	Synonymní
6	G/A	942	19 % G/81 % A	Synonymní
7	G/A	984	19 % G/81 % A	Synonymní
8	T/G	1008	19 % T/81 % G	Synonymní
9	A/G	1026	19 % A/81 % G	Synonymní
10	A/G	1035	19 % A/81 % G	Synonymní
11	G/A	1059	19 % G/81 % A	Synonymní
12	C/T	1243	19 % C/81 % T	Synonymní
13	A/G	1377	21 % A/79 % G	Synonymní
14	A/G	1389	21 % A/79 % G	Synonymní
15	G/A	1395	21 % G/79 % A	Synonymní
16	C/T	1614	19 % C/81 % T	Synonymní
17	G/C	1731	19 % G/81 % C	Synonymní
18	A/T	1751	19 % A/81 % T	Synonymní
19	G/C	2168	14,3 % G/85,7 % C	Synonymní
20	A/G	2235	14,3 % A/85,7 % G	Synonymní
21	C/T	2770	19 % C/81 % T	Synonymní
22	A/G	2861	19 % A/81 % G	Synonymní
23	G/A	2999	19 % G/81 % A	Synonymní
24	C/T	3008	19 % C/81 % T	Synonymní
25	C/G	3029	19 % C/81 % G	Synonymní
26	T/C	3075	19 % T/81 % C	Synonymní

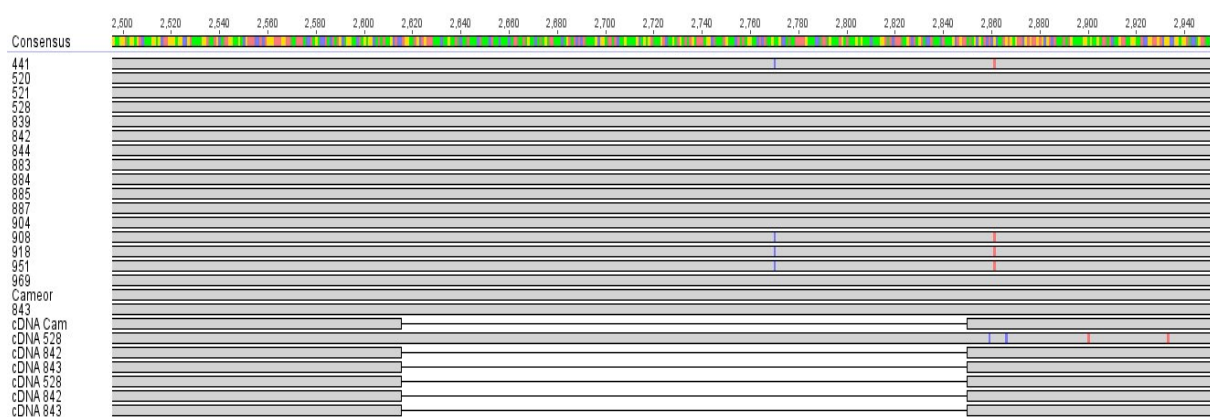
5.5 Sekvence cDNA kandidátního genu *HAE* (*Psat7g116520.1*) kulturního *Cameoru* a mutantních genotypů *def*

Pro analýzu potencionalního chybného sestřihu intronů byl taktéž použit kulturní opadavý genotyp cv. *Cameor* a neopadavý mutantní genotyp *def*. Byla izolována RNA, přepsána do cDNA a použita pro PCR amplifikaci. Tato cDNA byla porovnána s genomovou DNA pomocí agarózové elektroforézy, která naznačovala velikostní odchylku mezi cDNA cv. *Cameor* a mutantního genotypu *def* (viz obrázek 15). Pro potvrzení tohoto jevu byla potřeba provést sekvenace těchto cDNA.

Vzorky byly poslány na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA, Biocev, PřF UK Praha a následně porovnány mezi sebou v programu Geneious. Z výsledného sekvenování se ukázalo že velikost sestříhlého intronu, nacházejícího se v oblasti 2615–2845 bp činí 230 bp. V jednom z mutantních genotypů *def* byl intron nevystříhnut (viz obrázek 16).



Obrázek 15: Elektroforetická separace cDNA a gDNA genu HAE. Legenda: L – ladder 100 bp DNA GeneRuler, 1 – cDNA cv. Cameor, 2 – cDNA mutantního genotypu *def*, 3 – gDNA cv. Cameor, 4 – gDNA mutantního genotypu *def*.

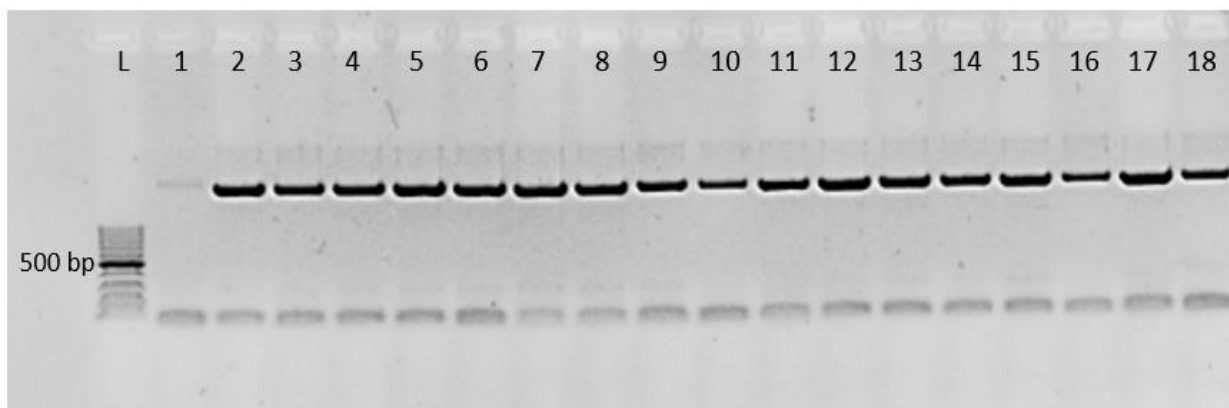


Obrázek 16: Sekvence genu *HAE* (*Psat7g116520.1*) gDNA kulturního cv. Cameoru a mutantních genotypů *def* (viz tabulka 1) a cDNA Cameoru a mutantních genotypů *def*. Černé čáry v sekvencích zobrazují jednonukleotidové záměny. Tenká čára mezi sekvencemi znázorňuje vystříhnuté introny.

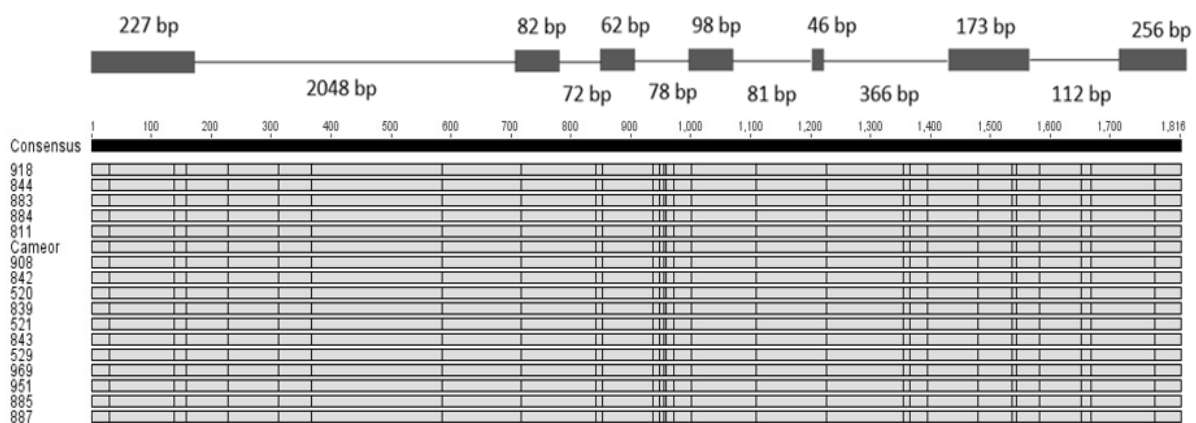
5.6 Sekvence kandidátního genu *STK* (*Psat7g066560*) kulturního cv. Cameoru a mutantních genotypů *def*

Podobně jak s genem *HAE* se postupovalo i u dalšího kandidátního genu *STK* (*Psat7g066560*), nacházejícího se rovněž na chromosomu 7 v pozici 107 071 077 bp v genomu cv. Cameor, který obsahuje sedm exonů a šest intronů o velikostech 2048 bp, 72 bp, 78 bp, 81 bp, 366 bp a 112 bp (viz obrázek 18), jejichž různé typy sestřihu mohou regulovat působení tohoto genu.

Pro amplifikaci genu byly použity primery uvedené v tabulce 2. Kontrola úspěšnosti PCR amplifikace byla provedena pomocí agarózové elektroforézy (viz obrázek 17). Získané amplikony z kulturního Cameor a mutantních genotypů *def* (viz tabulka 1) o velikosti 3940 bp byly nejdříve přečištěny a poté poslány na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA, Biocev, PřF UK Praha. Použité primery pro sekvenaci jsou uvedeny v tabulce 3. Získané sekvence byly poskládány a následně mezi sebou porovnávány pomocí programu Geneious. Ze získaných dat byl zjištěn polymorfismus v sekvencích mutantních genotypů *def*. Konkrétně bylo nalezeno 33 jednonukleotidových záměn, 23 z nich se nacházelo v intronech a 10 v exonech (viz obrázek 18). Podobně jako u genu *HAE* se zde očekával polymorfismus napříč sekvencemi genotypu *def* v jednom místě, který by byl možnou příčinnou mutace. Po porovnání sekvencí se však nic takového nenašlo. Všechny polymorfizmy (viz tabulka 8) byly synonymní a nijak neovlivnily pořadí aminokyselin.



Obrázek 17: Elektroforetická separace gDNA genu *STK*. Legenda: L – ladder 100 bp DNA GeneRuler, 1 – 17 gDNA mutantního genotypu *def*, 18 – gDNA cv. Cameor.



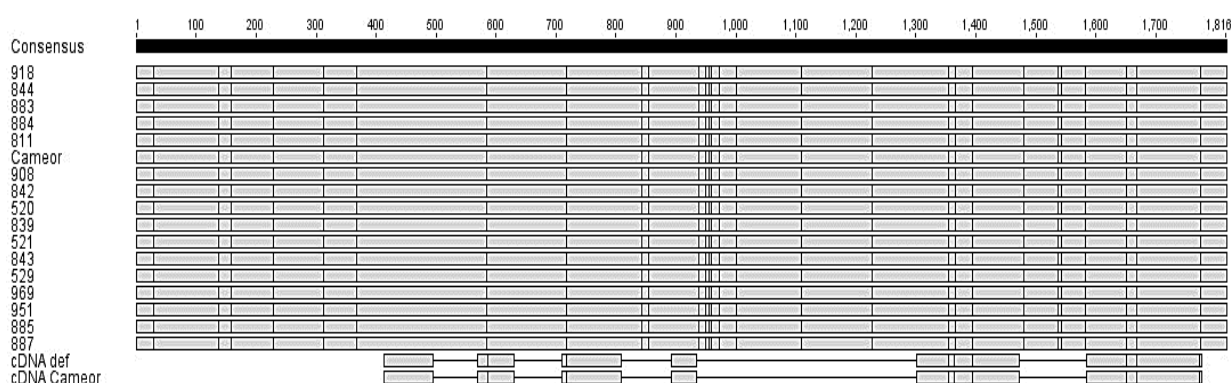
Obrázek 18: Sekvence genu *STK* (*Psat7g066560*) gDNA kulturního cv. Cameoru a mutantních genotypů def (viz tabulka 1). Černé čáry značí polymorfizmy. Nad sekvencemi je grafické znázornění genu. Obdélníky značí exony a tenké čáry introny.

Tabulka 8: Analýza polymorfizmu genu *STK* v 18 *def* genotypech.

Číslo polymorfizmu	Typy nukleotidů	Pozice od START kodonu (bp)	Četnost výskytu	Synonymní/Nesynonymní záměna
1	T/A	31	38,8 % T/61,2 % A	Synonymní
2	C/T	139	22,2 % C/77,8 % T	Synonymní
3	A/T	159	22,2 % A/77,8 % T	Synonymní
4	A/T	229	38,8 % A/61,2 % T	Synonymní
5	C/T	314	22,2 % C/77,8 % T	Synonymní
6	C/T	368	38,8 % C/61,2 % T	Synonymní
7	A/G	384	5,55 % A/94,45 % G	Synonymní
8	C/T	586	22,2 % C/77,8 % T	Synonymní
9	C/G	686	5,55 % C/94,45 % G	Synonymní
10	G/T	718	22,2 % G/77,8 % T	Synonymní
11	T/C	743	5,55 % T/94,45 % C	Synonymní
12	A/C	843	33,3 % A/66,7 % C	Synonymní
13	T/C	854	50 % T/ 50 % C	Synonymní
14	T/A	938	38,8 % T/61,2 % A	Synonymní
15	C/G	949	22,77 % C/ 77,23 % G	Synonymní
16	C/T	956	38,8 % C/61,2 % T	Synonymní
17	C/T	959	22,2 % C/77,8 % T	Synonymní
18	A/C	973	33,3 % A/66,7 % C	Synonymní
19	C/T	1001	22,2 % C/77,8 % T	Synonymní
20	G/A	1110	38,8 % G/61,2 % A	Synonymní
21	T/C	1227	33,3 % T/66,7 % C	Synonymní
22	A/C	1263	5,55 % A/94,45 % C	Synonymní
23	G/A	1353	38,8 % G/61,2 % A	Synonymní
24	G/A	1365	22,2 % G/77,8 % A	Synonymní
25	C/T	1395	33,3 % C/66,7 % T	Synonymní
26	G/A	1479	38,8 % G/61,2 % A	Synonymní
27	T/C	1499	5,55 % T/94,45 % C	Synonymní
28	T/C	1536	38,8 % T/61,2 % C	Synonymní
29	T/A	1543	38,8 % T/61,2 % A	Synonymní
30	A/G	1582	33,3 % A/66,7 % G	Synonymní
31	A/G	1651	22,2 % A/77,8 % G	Synonymní
32	G/A	1668	44,4 % G/55,6 % A	Synonymní
33	G/A	1774	38,8 % G/61,2 % A	Synonymní

5.7 Sekvence cDNA kandidátního genu *STK* (*Psat7g066560*) kulturního *Cameoru* a mutantních genotypů *def*

Prozkoumána byla i možnost chybného sestřihu intronů genu *STK* (*Psat7g066560*). Rovněž byl ke studiu použit kulturní opadavý genotyp *Cameor* a neopadavý mutantní genotyp *def* (viz tabulka 1). Vzorčky byly poslány na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA, Biocev, PřF UK Praha a následně porovnány mezi sebou v programu Geneious. Z výsledného sekvenování se ukázalo že velikosti pěti intronů činila 72 bp, 78 bp, 81 bp, 366 bp a 112 bp (viz obrázek 19).



Obrázek 19: Ukázka sekvence genu *STK* (*Psat7g066560*) gDNA kulturního cv. *Cameoru* a mutantních genotypů *def* (viz tabulka 1) a cDNA *Cameoru* a mutantního genotypu *def*. Černé čáry v sekvencích zobrazují jednonukleotidové záměny. Tenké čáry mezi sekvencemi znázorňují vystřižené introny.

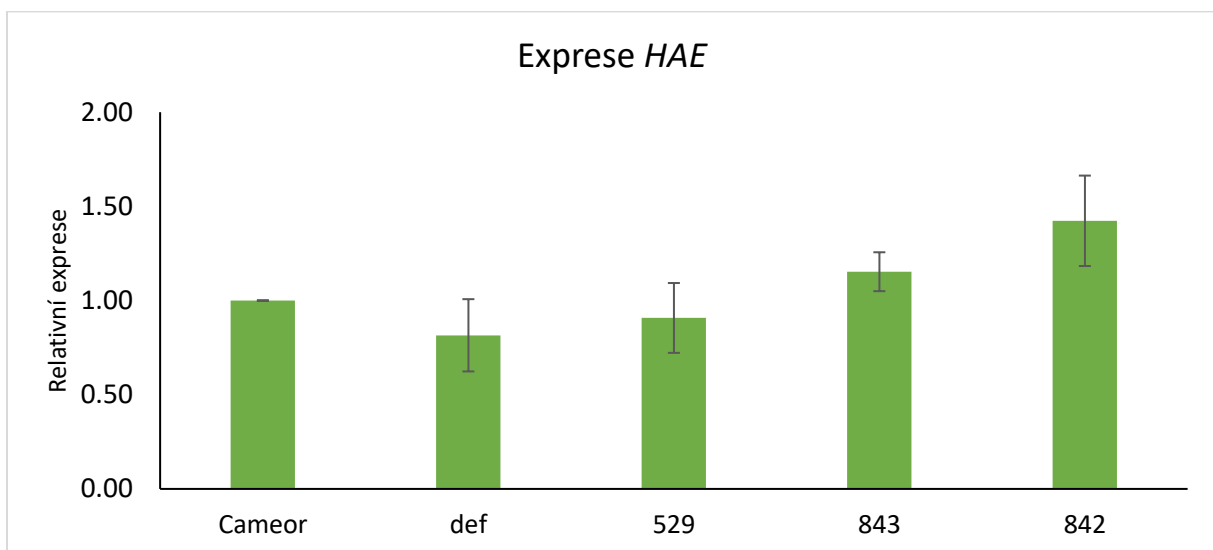
5.8 Analýza exprese vybraných genů pomocí kvantitativní reverzně-transkripční polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR)

Pro analýzu genové exprese vybraných kandidátních genů *HAE* (*Psat7g116520*) a *STK* (*Psat7g066560*) byl použit kulturní genotyp *Cameor* a mutantní genotypy hrachu s neopadavým poutkem označené jako 528, 843, 842 (viz tabulka 1). Pro analýzu exprese kandidátních genů *HAE*, *STK* a s *STK* souvisejících genů *ALC* (*Psat0s2139g0120*), *HEC3* (*Psat7g046520*) a *SPT* (*Psat2g166760*) byla použita poutka kulturního genotypu *Cameor* a mutantního, neopadavého genotypu *def* ve vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP.

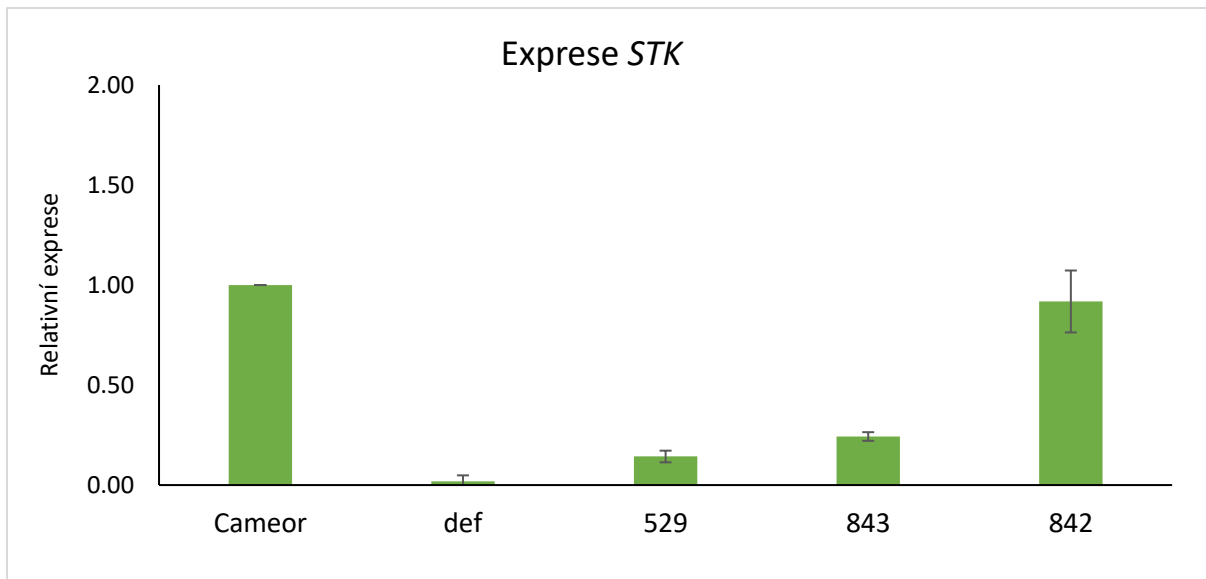
Expresní analýza ukázala, že exprese genu *HAE* se v kulturním genotypu a ve vybraných mutantních genotypech s neopadavým poutkem nelišila (viz obrázek 20), zatímco gen *STK* měl vyšší expresi v kulturním genotypu oproti genotypům mutantním, z nichž byla vyšší exprese tohoto genu zaznamenána pouze u genotypu 842 (viz obrázek 21). Expres vybraných

kandidátních genů byla měřena také ve vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP (obrázky 22 až 26).

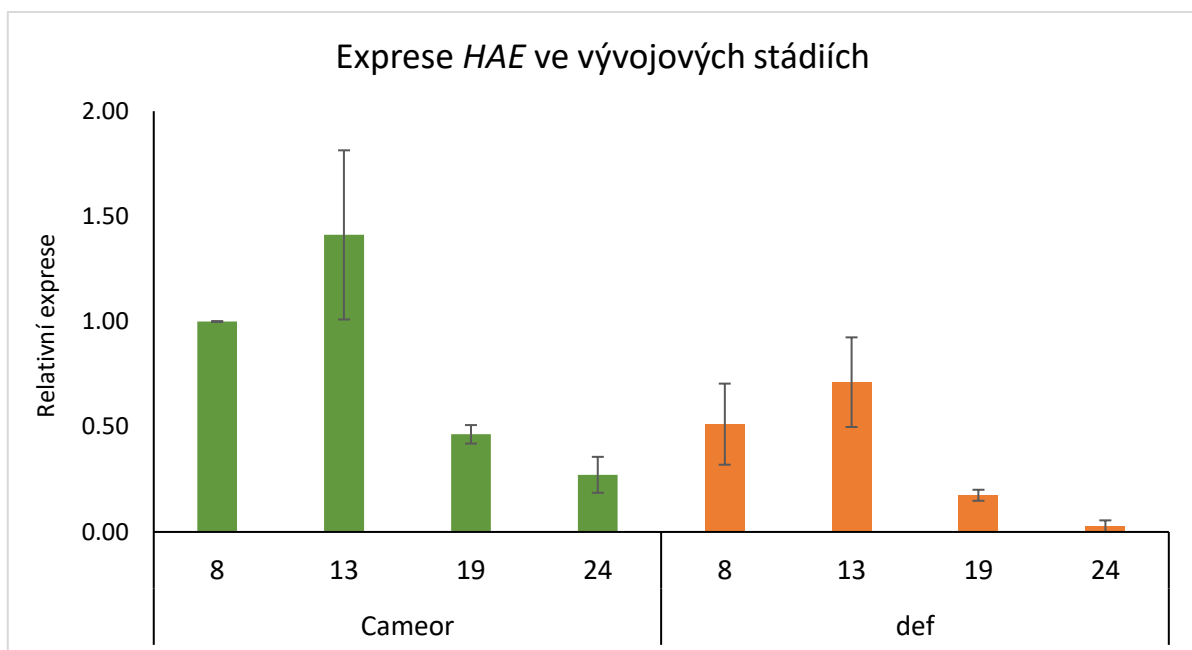
Výsledné grafy ukazují, že gen *HAE* je silně exprimován v kulturním genotypu především v mladších stádiích. Největší hodnota exprese byla zaznamenána ve vývojovém stádiu 13 DAP, poté exprese genu *HAE* klesá. Podobný fenomén byl pozorován i u mutantního, neopadavého genotypu, avšak exprese genu *HAE* je poloviční oproti kulturnímu genotypu (viz obrázek 22). U *STK* byly nejvyšší hodnoty exprese naměřeny ve vývojovém stádiu 19 DAP. Oproti tomu exprese v mutantních genotypech byla minimální napříč studovanými vývojovými stádii (viz obrázek 23). Expres genů jak *ALC*, tak *HEC3* a *SPT* byla vyšší v cv. Cameor oproti mutantnímu genotypu. Geny *ALC* a *SPT* se nejvíce exprimovaly v pozdějších vývojových stádiích (19 či 24 DAP), zatímco gen *HEC3* byl exprimován více v těch dřívějších (8 DAP) (viz obrázky 24 až 26).



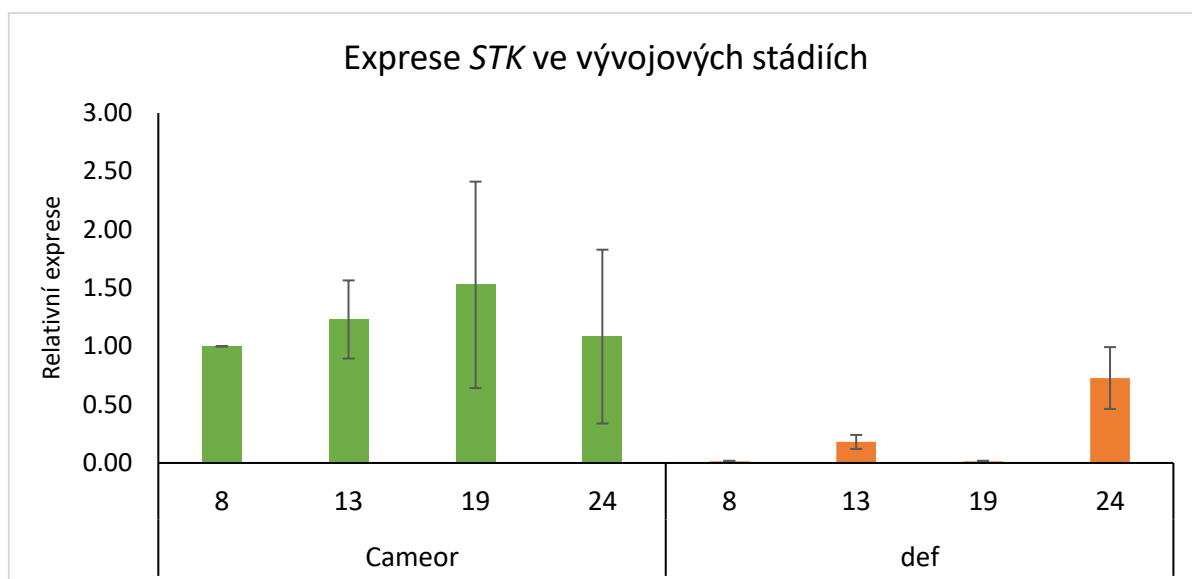
Obrázek 20: Relativní exprese genu *HAE* (*Psat7g116520.1*) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a čtyř mutantních genotypů s neopadavým poutkem (viz tabulka 1) o stáří 20 až 25 DAP. Jako referenční geny byly použity *Psat5g212520* a *Psat6g025120*. Vztaženo ke kulturnímu genotypu Cameor. Odchylka v relativní expresi technických a biologických triplikátů \pm střední chyba průměru (SE).



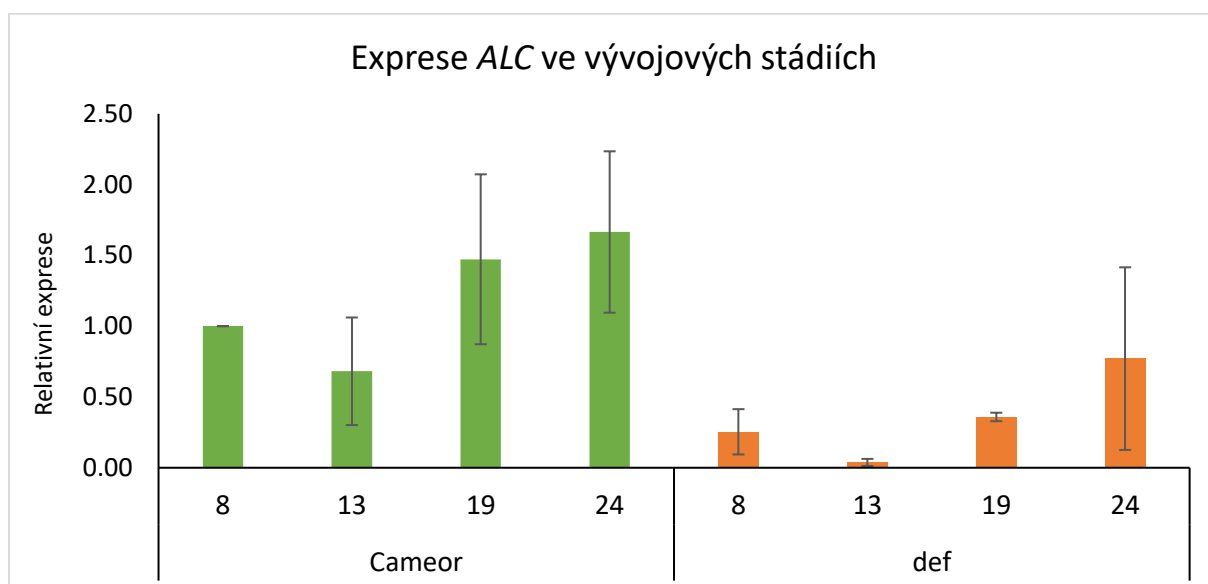
Obrázek 21: Relativní exprese genu *STK* (*Psat7g066560*) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a čtyř mutantních genotypů s neopadavým poutkem (viz tabulka 1) o stáří 20 až 25 DAP. Jako referenční geny byly použity *Psat5g212520* a *Psat6g025120*. Vztaženo ke kulturnímu genotypu Cameor. Odchylka v relativní expresi technických a biologických triplikátů \pm střední chyba průměru (SE).



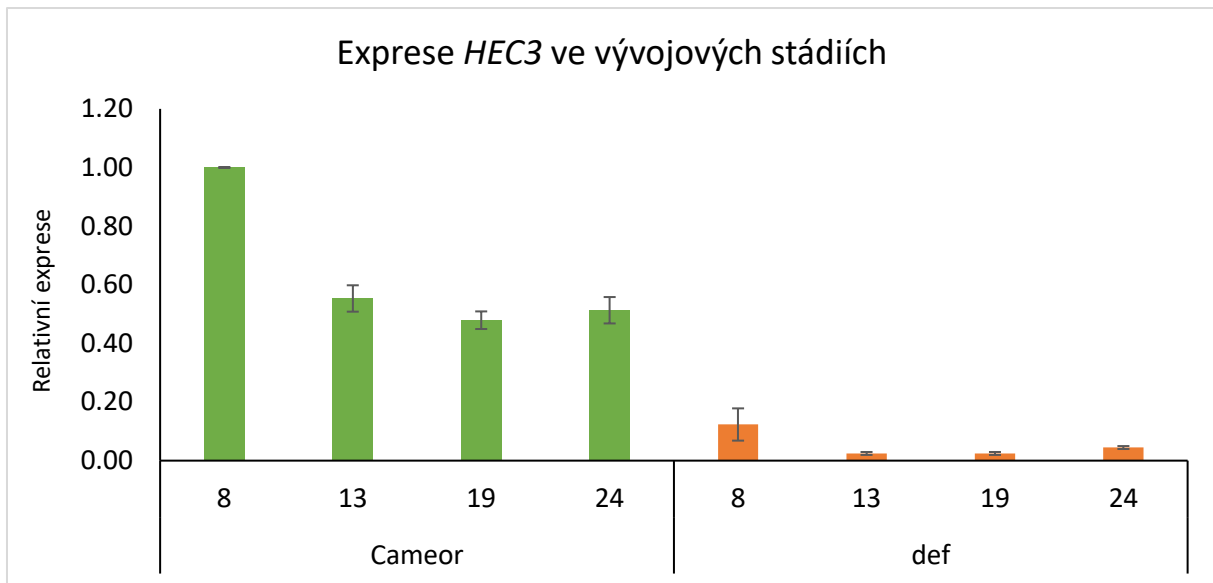
Obrázek 22: Relativní exprese genu *HAE* (*Psat7g116520.1*) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a mutantního genotypu *def* (528 – viz tabulka 1) ve čtyřech vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP. Jako referenční geny byly použity *Psat5g212520* a *Psat6g025120*. Vztaženo ke kulturnímu genotypu Cameor 8 DAP. Odchylka v relativní expresi technických a biologických triplikátů \pm střední chyba průměru (SE).



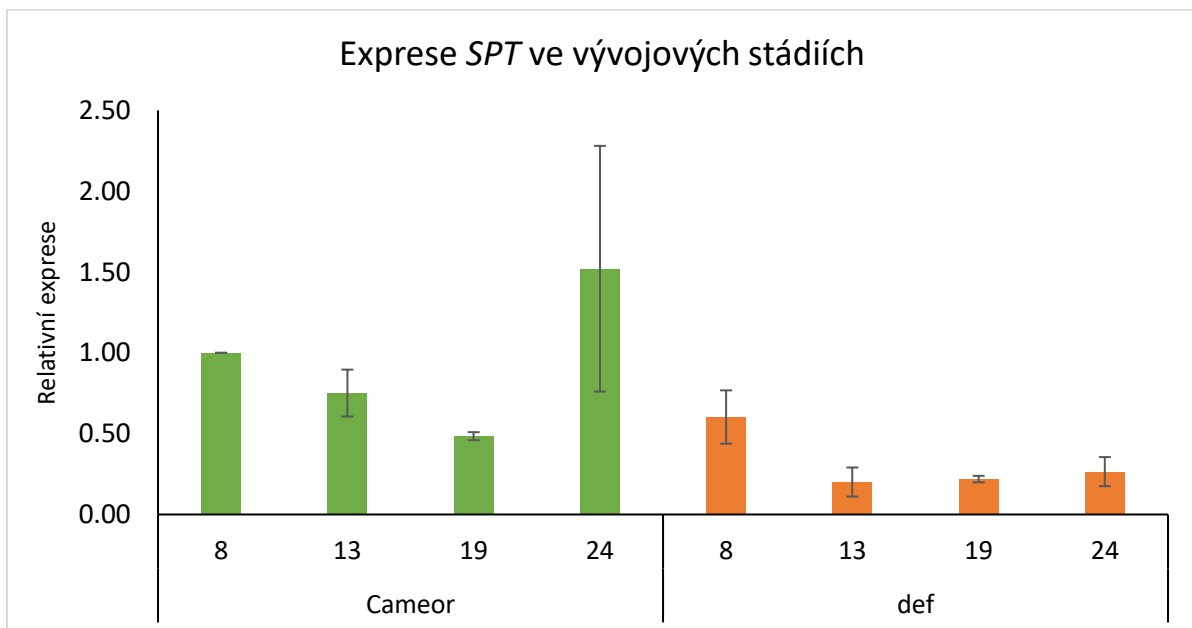
Obrázek 23: Relativní exprese genu *STK* (*Psat7g066560*) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a mutantního genotypu *def* (528 – viz tabulka 1) ve čtyřech vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP. Jako referenční geny byly použity *Psat5g212520* a *Psat6g025120*. Vztaženo ke kulturnímu genotypu Cameor 8 DAP. Odchylka v relativní expresi technických a biologických triplikátů \pm střední chyba průměru (SE).



Obrázek 24: Relativní exprese genu *ALC* (*Psat0s2139g0120*) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a mutantního genotypu *def* (528 – viz tabulka 1) ve čtyřech vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP. Jako referenční geny byly použity *Psat5g212520* a *Psat6g025120*. Vztaženo ke kulturnímu genotypu Cameor 8 DAP. Odchylka v relativní expresi technických a biologických triplikátů \pm střední chyba průměru (SE).



Obrázek 25: Relativní exprese genu *HEC3* (*Psat7g046520*) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a mutantního genotypu *def* (528 – viz tabulka 1) ve čtyřech vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP. Jako referenční geny byly použity *Psat5g212520* a *Psat6g025120*. Vztaženo ke kulturnímu genotypu Cameor 8 DAP. Odchylka v relativní expresi technických a biologických triplikátů \pm střední chyba průměru (SE).



Obrázek 26: Relativní exprese genu *SPT* (*Psat2g166760*) v poutku kulturního genotypu (Cameor) a mutantního genotypu *def* (528 – viz tabulka 1) ve čtyřech vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP. Jako referenční geny byly použity *Psat5g212520* a *Psat6g025120*. Vztaženo ke kulturnímu genotypu Cameor 8 DAP. Odchylka v relativní expresi technických a biologických triplikátů \pm střední chyba průměru (SE).

6 Diskuze

Pro rostliny je důležité šířit svá semena a předávat dále svou genetickou informaci. To zároveň také umožňuje kolonizovat nové oblasti. Šíření semen dává možnost rostlinám také získat větší přístup ke zdrojům živin, což může být klíčové v konkurenci s jinými rostlinami. Za šíření semen jsou odpovědní dva procesy: pukání a opadávání plodu. Puknutím plodu dojde k odhalení zralých semen a následnou abscisi dojde k jejich oddělení od mateřské rostliny (Lewis *et al.*, 2006).

Semeno je připojeno k mateřské rostlině poutkem, které tak mezi nimi zprostředkovává jedinou komunikaci. Během vývoje semene se vytváří v místě kontaktu poutka s osemením takzvaná abscisní zóna, ve které se po dozrání semeno odděluje od rostliny (Lamichaney *et al.*, 2021).

V této práci jsem provedla srovnávací analýzu semen kulturního hrachu cv. Cameor a mutantních genotypů (viz tabulka 1) s neopadavými semeny. Tyto genotypy pocházejí z původní mutantní linie nalezené ve Šlechtitelské a pokusné stanici Priekuli (Lotyšsko) a poprvé popsány byly v roce 1952 šlechtitelem hrachu A. Eglitsem (Zelenov, 2013). Tyto původní mutantní linie byly následně nakříženy do dalších genotypů a využity i pro získání komerčních odrůd.

Po porovnání morfologie semen byla jednoznačně vidět přítomnost poutka u semene mutantního genotypu *def*, zatímco semeno kulturního hrachu Cameor poutko postrádalo, neboť semeno z poutka odpadlo (viz obrázek 6 a 7). V tomto místě bylo vytvořené hilum, které je zachyceno na snímku. Podobně tomu tak je i huseničku (*Arabidopsis thaliana*), kde semena mutantních genotypů zůstávají přichycené k šesuli, kvůli neproběhlé abscisi. Semena musí z šesule kvůli jejich neopadavosti být odstraněna mechanicky (Balanzà *et al.*, 2016). Stejný fenomén u mutantních neopadavých genotypů hrachu zaznamenal Lamichaney *et al.* (2021), kde se navíc zjistil i rozdíl imbibice semen mutantních a kulturních genotypů. Ukázalo se, že přítomnost poutka snižuje rychlost příjmu vody semenem.

Jak je vidět na řezu poutka a částečně i osemení kulturního hrachu, vzniká jasné rozhraní mezi poutkem a osemením tvořené vrstvou palisádových buněk, které jsou odlišné od těch okolních (Smýkal *et al.*, 2014) (viz obrázek 8). Jsou však ale známé mutantní genotypy, u kterých nedochází k opadu semen. Z anatomické analýzy poutka lze vidět, že u mutantního genotypu hrachu *def* nedochází vůbec ke tvorbě abscisní zóny mezi poutkem a osemením. Tato část je pouze vyplněna nediferenciovanými parenchymatickými buňkami, ve kterých je

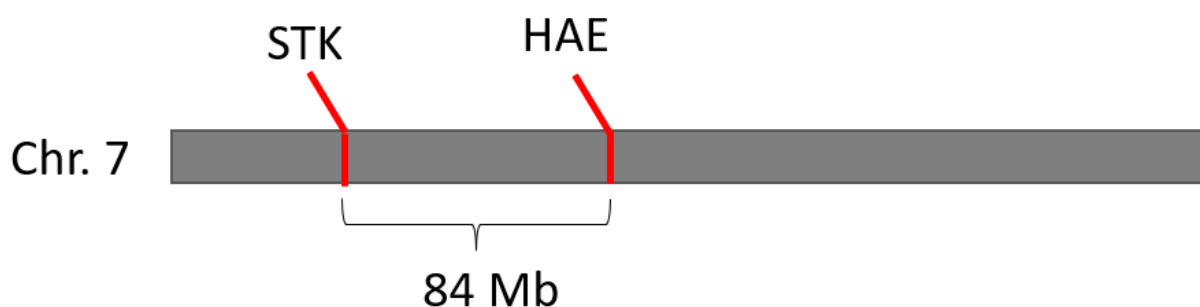
lokalizovaný cévní svazek (viz obrázek 9). Nevyvinutá abscisní zóna je tedy důvod, proč se dozrálé semeno neodděluje od mateřské rostliny.

Dále jsem se zabývala lokalizací produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a oxidu dusnatého (NO) v oblasti poutka a pupku osemení studovaných genotypů hrachu. Hlavním zástupcem reaktivních forem kyslíku je peroxid vodíku, který je stejně jako oxid dusnatý jednou z univerzálních signálních molekul. Jejich produkce je okamžitě zahájena, jakmile je zachycen signál receptorem. Následuje pak kaskáda specifických oxidací vedoucích k metabolické odpovědi buňky. Vyšší koncentrace těchto molekul jsou pro buňku toxické, a proto jsou odstraňovány antioxidačním systémem pro udržení homeostázy. Akumulace těchto signálních molekul však může vést k poškození ostatních biomolekul a následné buněčné smrti (Sies *et Jones*, 2020). ROS a NO jsou mimo jiné zapojeni v procesu abscise, například při indukci enzymů degradujících buněčnou stěnu (viz obrázek 5). V tomto místě lze právě zaznamenat jejich zvýšenou produkci.

U řezu poutka kulturního hrachu cv. Cameor byl detekován zelený signál pouze u molekul NO v abscisní zóně, kde dochází k programovanému odumírání buněk a následnému vzniku jizvy (viz obrázek 12 a 13). Přítomnost této molekuly značí správně probíhající procesy abscise. Molekuly ROS nebyly vůbec detekované u žádného z genotypů (viz obrázek 10 a 11), což koreluje s pozorováními, kdy se zjistilo, že se ROS tvoří pouze v ranných stádiích vývoje osemení, přičemž použitý dostupný preparát byl stáří 23 DAP. (El-Maarouf-Bouteau *et Baill*, 2008). V dalších pracích by bylo vhodné provést detekci molekul ROS a rovněž NO napříč vývojovými stádii.

Signál molekuly NO byl detekován v místě abscisní zóny (viz obrázek 12). Dále lze detekovat kromě zeleného signálu značící přítomnost NO i červený signál, což je zapříčiněno autofluorescencí chlorofylu. U mutantního genotypu v místě rozhraní poutka a semene nelze kromě autofluorescence chlorofylu detekovat žádný signál ukazující výskyt ROS a NO, což naznačuje, že se zde nevytváří abscisní zóna, která zajišťuje oddělení semene od mateřské rostliny (Hvoslef-Eide *et al.*, 2016).

Jelikož byl lokus opadavosti lokalizován na chromozomu 7 (Wolko *et Święcicki*, 1991) vybrala jsem na základě homologie dva kandidátní geny *HAE* (*Psat7g116520.1*) a *STK* (*Psat7g066560*) nacházející se v tomto místě, konkrétně gen *HAE* se nachází v oblasti 191,193,592 bp, gen *STK* v oblasti 107,071,078 a vzdálenost mezi tyto geny činí přibližně 84 Mb (viz obrázek 27).



Obrázek 27: Ukázka pozic kandidátních genů *STK* a *HAE* na chromozomu 7.

Nedávno se zjistilo, že do správného průběhu abscise je zapojena u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) receptor-like protein kináza HAESA (*HAE*), která je spouštěna peptidem INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION (*IDA*) (Stø *et al.*, 2015). Pomocí BLAST analýzy genu *HAE* se ukázalo, že homolog tohoto genu u kulturního hrachu *Cameor* v1.0 je lokalizován na chromozomu 7. Už dříve bylo zjištěno křížením planého typu (*Def*) a mutantní neopadavé linie (*def*), že znak přítomnosti poutka je řízen monogenně recesivním genem a že lokus označený *def* se nachází na vazebné skupině VII, tedy na chromozomu 7 (Wolko *et Świecicki*, 1991). Díky této skutečnosti byl jako kandidátní gen zodpovědný za abscisi vybrán gen *HAE* (*Psat7g116520.1*) a posléze byl přidán ještě gen *STK* (*Psat7g066560*). Poprvé byl tento gen popsán u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), kde se podílí na vývoji abscisní zóny a je klíčový pro syntézu ligninu v tomto místě (Balanzà *et al.*, 2016). Tento gen se rovněž nachází na chromozomu 7 (Balanzà *et al.*, 2016).

V první řadě byla osekvenována genomová DNA kandidátního genu *HAE* (*Psat7g116520.1*) kulturního hrachu cv. *Cameor* a všech získaných mutantních genotypů (viz tabulka 1). Z výsledného porovnání sekvencí bylo zjištěno celkem 26 jednonukleotidových záměn napříč sekvencemi z toho jedna v intronu a zbytek se nacházel v exonech. Očekával se polymorfismus ve stejné pozici u všech *def* linií. Předpokládá se, že se jedná o jednu původní mutaci, která se následně nakřížila do dalších genotypů a pokud by se tedy jednalo o kauzální gen, zjištěný polymorfismus by byl u všech stejný. Ve výsledku však nebyla nalezena žádná kauzální jednonukleotidová záměna, která by mohla být příčinou mutace vedoucí k neopadavosti.

Elektroforetické separace cDNA a gDNA genu *HAE* (*Psat7g116520.1*) odhalila velikostní odchytku mezi cDNA cv. *Cameor* a vybraného mutantního genotypu *def*. Proto jsem také sledovala možnost případného chybného sestřihu mRNA genu *HAE* (*Psat7g116520.1*)

obsahující intron o délce 230 bp, tak jak byl například popsán u genu *A* kódujícího bHLH transkripční faktor, který je zodpovědný za antokyanovou pigmentaci květů, kterou používal před více jak 150 lety Mendel při jeho studii dědičnosti. Bílé květy jsou totiž zapříčiněné tranzicí G na A v místě sestřihu, což vede k chybnému sestřihu intronu, posunutí čtecího rámce a vzniku předčasného stop kodonu. Vznikne tak nefunkční bHLH transkripční faktor, což má za následek bílé zbarvení květů (Hellens *et al.*, 2010). Ze sekvenční analýzy gDNA genu *HAE* kulturního hrachu *Cameor* a mutantních genotypů *def* a jejich výsledné cDNA se zjistilo, že nedochází k chybnému sestřihu, i když u jednoho z mutantních genotypů *def* byl nalezen nesestříhlý intron (viz obrázek 16). Později se však ukázalo, že šlo o kontaminaci vzorku genomovou DNA.

Osekvenovaná byla i genomová DNA kandidátního genu *STK* (*Psat7g066560*) kulturního hrachu *Cameor* a všech získaných mutantních genotypů (viz tabulka 1). Podobně jako u kandidátního genu *HAE* se hledal v sekvencích polymorfismus, který by mohl být možnou příčinou vedoucí k neopadavosti semen od poutek. Celkově bylo nalezeno 33 jednonukleotidových záměn, ale žádné z nich nebyly společné všem genotypům *def*. Všechny polymorfizmy byly synonymní a nijak neovlivnily pořadí aminokyselin. Gen *STK* je složen ze sedmi exonů a šesti intronů o velikostech 2048 bp, 72 bp, 78 bp, 81 bp a 366 bp, přičemž jejich různé typy sestřihu jejichž různé typy sestřihu mohou regulovat působení tohoto genu. Po porovnání sekvencí genomové DNA a cDNA se zjistilo, že rovněž nedochází k chybnému sestřihu.

Dále byla zkoumána exprese vybraných kandidátních genů *HAE* (*Psat7g116520.1*) a *STK* (*Psat7g066560*). Výsledná zjištěná exprese genu *HAE* a *STK* se mezi kulturním genotypem a vybranými mutantními genotypy zásadně nelišila. Je pravděpodobné, že se exprese těchto kandidátních genů může lišit i v různém stáří rostliny, proto byla měřena jejich exprese ve vývojových stádiích 8, 13, 19 a 24 DAP.

Z výsledných grafů vyplývá, že vysoká exprese genu *HAE* probíhá u kulturního genotypu v mladších stádiích. Největší hodnota byla ve 13 DAP poté jeho exprese klesá. Podobný fenomén se vyskytuje i u mutantního, neopadavého genotypu, avšak exprese genu *HAE* je poloviční oproti kulturnímu genotypu. Podobně tak bylo zjištěno i u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) kde výsledky ukázaly nižší expresi genu *HAE* u mutantů oproti wild type (Niederhuth *et al.*, 2013).

Expresa genu *STK* byla vysoká ve všech vývojových stádiích u kulturního genotypu. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny ve vývojovém stádiu 19 DAP. Oproti tomu exprese u mutantních genotypů je zcela minimální napříč vývojovými stádii. V nedávné studii se

zjistilo, že u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) gen *STK* potlačuje expresi genů *HEC3* (*Psat7g046520*), *SPT* (*Psat2g166760*) a *ALC* (*Psat0s2139g0120*) (Balanzà *et al.*, 2016). Proto byla zjišťována i jejich exprese v návaznosti na nízkou expresi *STK* ve vývojových stádiích. Na výsledných grafech qRT-PCR lze vidět, že exprese ani jednoho z těchto tří genů nedosahuje v mutantním, neopadavém genotypu vysokých hodnot, zatímco v kulturních genotypech je jejich exprese o více než polovinu větší. Předpokládalo se, že vzhledem k nízké expresi *STK*, který funguje jako supresor exprese u genů *ALC*, *HEC3* a *SPT* budou hodnoty těchto genů vyšší, což se neprokázalo. Naopak u kulturních genotypů je exprese těchto tří genů vysoká i přes to, že zároveň probíhá exprese *STK*. Je to pravděpodobně dáno tím, že *STK* vytváří nejprve komplex s korepresorem interagujícím s MADS-doménami transkripčních faktorů SEUSS (SEU) (viz obrázek 3) a společně tak potlačují lignifikaci v abscisní zóně (Balanzà *et al.*, 2016). Tudiž hodnoty exprese genu *STK* mohou být vysoké, ale není-li přítomen korepresor, tak nemusí na geny *ALC*, *HEC3* a *SPT* působit.

I přes to, že výsledky neukázaly možné příčiny vzniku neopadavých mutantů, tak stále nebyly prověřeny všechny možnosti. Vzhledem k rozdílům v expresi je možné, že jsou regulovány na úrovni promotorové sekvence, a tedy v následujících studiích by se mohlo zaměřit právě na promotor, neboť mutace v těchto místech by mohli rovněž ovlivnit výsledný projev, jak je tomu například u genu kódujícího enzym polyfenol oxidázu (PPO) u bobu obecného (*Vicia faba*) (Jayakodi *et al.*, 2023). Zatímco u hrachu je za produkci enzymu zodpovědný pouze jeden gen, tak bob obecný má v genomu 10 kopií tohoto genu vedle sebe. V případě hrachu je nefunkčnost výsledného proteinu způsobena bodovou mutací (Balarynová *et al.*, 2022), zatímco u bobu dochází k inzerci MITE retrotranspozonu v oblasti promotoru, která vede k vypnutí daného PPO genu (Jayakodi *et al.*, 2023). Je tedy možné, že k něčemu podobnému mohlo dojít i v případě kandidátních genů *HAE* nebo *STK*.

V rámci práce nebylo možné ověřit správnosti lokalizace *def* lokusu na chromosomu 7, což vyžaduje vytvoření mapovací populace křížením wild typ hrachu (třeba cv. Cameor) s *def* mutantních genotypem. Ayeh *et al.* (2011) také zkoumali dědičnost intaktního poutka pomocí F2 a F3 populací vzniklých zkřížením planého typu (*Def*) a mutantního (*def*), kdy štěpení proběhlo podle mendelovské genetiky 3:1. Výsledky ukázaly, že znak neopadavosti je řízen monogenně recesivním genem označovaným *def*. Později zjistili, že *def* lokus se nachází na vazebné skupině VII, tedy na chromozomu 7. V této práci byl preferován chromozom 7, vzhledem k popsanému *def* lokusu. Je však možné, že tohle není přesné, a proto je potřeba v budoucnu lokalizaci prověřit.

7 Závěr

Tato diplomová práce se věnovala analýze kandidátních genů zapojených do procesu opadu semene. V první řadě proběhlo potvrzení rozdílu morfologické struktury semene včetně poutka kulturního genotypu a mutantního genotypu. U opadavého genotypu cv. Cameor se oddělilo semeno od poutka a v tomto místě došlo poté k vytvoření pupku. U mutantního genotypu k takovému jevu nedošlo a poutko zůstalo připojené až do zralosti semene. Anatomická analýza toto potvrdila, a na řezu poutkem a částí semene neopadavého mutantního genotypu ukázala absenci abscisní zóny v místě opadu semene od poutka. Následně detekce molekul ROS a NO v místě abscisní zóny ukázala, že nejvíce signálu, značící přítomnost molekul ROS a NO bylo v místě vzniklé abscisní zóny u cv. Cameor, zatímco u mutantního genotypu nebyl detekován skoro žádný signál vzhledem k nepřítomnosti abscisní zóny.

Sekvenační analýza kandidátních genů *HAE* a *STK* odhalila v genomové DNA velké množství polymorfizmů, avšak se nenašla žádná kauzální jednonukleotidová záměna ve stejné pozici u všech *def* linií. Tyto polymorfismy mimo jiné neměli vliv na kódované aminokyseliny. Ani sekvenace cDNA obou kandidátních genů neodhalila chybný sestřih mRNA, který by mohl mít za následek výslednou mutaci.

V neposlední řadě byla zkoumána exprese vybraných kandidátních genů *HAE* a *STK*. Ukázalo se, že nejvíce je gen *HAE* exprimovaný v mladších stádiích a že jeho exprese v mutantním genotypu *def* je poloviční oproti cv. Cameor. Exprese druhého kandidátního genu *STK* je zase nejvyšší ve starším vývojovém stádiu 19 DAP u cv. Cameor. Exprese tohoto genu v mutantním genotypu je zcela minimální. Zjišťovala se i exprese genů interagujících s genem *STK* a to *HEC3*, *SPT* a *ALC*. Ukázalo se, že exprese ani jednoho z těchto tří genů nedosahuje v mutantním genotypu vysokých hodnot a u kulturního genotypu je jejich exprese o více než polovinu větší, než je v mutantním genotypu.

8 Seznam literatury

- Addicott F. T. (1968): Environmental Factors in the Physiology of Abscission. *Plant Physiology* 43: 1471–1479.
- Andrés C. M. C., Pérez de la Lastra J. M., Juan C. A., Plou F. J., Pérez-Lebeña E. (2023): Superoxide Anion Chemistry—Its Role at the Core of the Innate Immunity. *International Journal of Molecular Science* 24: 1841.
- Ayeh K. O., Lee Y., Ambrose M. J., Hvoslef-Eide A. K. (2009): Characterization and structural analysis of wild type and a non-abscission mutant at the development funikulus (Def) locus in *Pisum sativum* L. *BMC Plant Biology* 9: 76.
- Ayeh K. O., Lee Y., Ambrose M. J., Hvoslef-Eide A. K. (2011): Growth, seed development and genetic analysis in wild type and Def mutant of *Pisum sativum* L. *BMC Plant Biology* 4:489.
- Balanzà V., Roig-Villanová I., Di Marzo M., Masiero S., Colombo L. (2016): Seed abscission and fruit dehiscence required for seed dispersal rely on similar genetic networks. *Development* 143: 3372–3381.
- Balarynová J., Klečová B., Sekaninová J., Kobrolová L., Zajacová Cechová M., Krejčí P., Leonová T., Gorbach D., Ihling C., Smržová L., Trněný O., Frolov A., Bednář P., Smýkal P. (2022): The loss of polyphenol oxidase function is associated with hilum pigmentation and has been selected during pea domestication. *New Phytologist* 235:1807–1821.
- Balasubramanian S., Schneitz K. (2000): NOOZLE regulates proximal-distal pattern formation, cell proliferation and early sporogenesis during ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 127: 4227–4238.
- Bartuszevige AM, Hughes MR, Bailer AJ, Gorchov DL (2006): Weather related patterns of fruit abscission mask patterns of frugivory. *Canadian Journal of Botany* 84:869-875
- Botton A., Ruperti B. (2019): The Yes and No of the Ethylene Involvement in Abscission. *Plants* 8: 187.
- Brown K. M. (1997): Ethylene and abscission. *Physiologia Plantarum*. 100: 567–576.
- Butenko M. A., Patterson S. E., Grini P. E., Stenvik G. E., Amundsen S. S., Mandal A., Aalen R. B. (2003): INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION Controls Floral Organ

Abscission in Arabidopsis and Identifies a Novel Family of Putative Ligands in Plants. *The Plant Cell* 15: 2296–2307.

Chan A., Belmonte M. F. (2013): Histological and ultrastructural changes in canola (*Brassica napus*) funicular anatomy during the seed lifecycle. *Botany* 91: 671–679.

Chaves M. M. (1991): Effect of water deficits on carbons assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42: 1–16.

Di Marzo N., Chisci E. Giovannoni R. (2018): The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells* 7: 156.

Doorn W. G., Stead A. D. (1997): Abscission of flowers and floral parts. *Journal of Experimental Botany* 48: 821–837.

El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C. (2008): Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling & Behavior*, 3: 175-182.

Eversen K. B., Clark D. G., Singh A. (1993): Rapid Ethylen-induced Gene Expression during Petal Abscission. *Cellular, molecular aspects of the plant hormone ethylene*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 278–283.

Fesenko I.N. (2006): Non-shattering accessions of *Fagopyrum tataricum* Gaertn. carry recessive alleles at two loci affecting development of functional abscission layer. *Fagopyrum* 23: 7–10.

Freschi L. (2013): Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* 4: 398.

Gonzalez-Dugo V., Orgaz F., Fereres E. (2007): Responses of pepper to deficit irrigation for paprika production. *Scientia Horticulturae* 114: 77–82.

Groszmann M., Paicu T., Alvarez J. P., Swain S. M., Smyth D. R. (2011): SPATULA and ALCATRAZ, are partially redundant, functionally diverging bHLH genes required for Arabidopsis gynoecium and fruit development. *The Plant Journal* 68: 816–829.

Hayat E. (2022): The seed and the metabolism regulation. *Biology* 11:168.

Hellens R. P., Moreau C., Lin-Wang K., Schwinn K. E., Thomson S. J., Fiers M. W. E. J., Frew T. J., Murray S. R., Hofer J. M. I., Jacobs J. M. J., Davies K. M., Allan A. C., Bendahmane A.,

Coyne C. J., Timmerman-Vaughan G. M., Ellis T. H. N. (2010): Identification of Mendel's White Flower Character. PLoS ONE 10:e13230.

Hvoslef-Eide A. K., Munster C. M., Mathiesen C. A., Ayeh K. O., Melby T. I., Rasolomanana P., Lee YeonKyeong (2016): Primary and Secondary Abscission in *Pisum sativum* and *Euphorbia pulcherrima*—How Do They Compare and How Do They Differ? Frontiers in Plant Science 6:1204.

Jarvis M. C., Briggs S. P. H., Knox J. P. (2003): Intercellular adhesion and cell separation in plants. Plant, Cell and Environment 26: 977–989.

Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D. J., Lamattina L, Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter J., Wong G. K., Wendehenne D. (2016): Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in plant kingdom. Plant Biology 9: 417.

Jin X., Zimmermann J., Polle A., Fischer U. (2015): Auxin is a long-range signal that acts independently of ethylene signalling on leaf abscission in *Populus*. Frontiers in Plants Sciences 6: 636.

Jayakodi M., Golicz A. A., Kreplak J., Fечete L. I., Angra D., Bednář P., Bornhofen E., Zhang H., Boussageon R., Kaur S., Cheung K., Čížková J., Gunglach H., Hallab A., Imbert B., Keeble-Gagnère G., Koblížková A., Kobrlová L., Krejčí P., Mouritzen T. W., Neumann P., Nadzieja M., Nielsen L. K., Novák P., Orabi J., Padmarasu S., Robertson-Shersby-Harvie T., Robledillo L. Á., Schiemann A., Tanskanen J., Törönen P., Warsame A. O., Wittenberg A. H. J., Himmelbach A., Aubert G., Courty P., Doležel J., Holm L. U., Janss L. L., Khazaei H., Macas J., Mascher M., Smýkal P., Snowdon R. J., Stein N., Stoddard F. L., Stougaard J., Tayeh N., Torres A. M., Usadel B., Schubert I., O'Sullivan D. M., Schulman A. H., Uggerø J. A. (2023): The giant diploid faba genome unlocks variation in global protein crop. Nature 615: 652–659.

Хангильдин В.Х., Хангильдин В.В. (1969): Некоторые результаты генетических исследований с горохом // Труды Башкирского НИИСХ 40–61.

Khan D., Millar J.L., Girard I. J., Chan A., Kirkbride R. C., Pelletier J.M., Kost S., Becker M. G., Yeung E. C., Stasolla C., Goldberg R. B., Harada J. J, Belmonte M. F. (2015): Transcriptome atlas of the Arabidopsis funiculus—a study of maternal seed subregions. The Plant Journal 82: 41–53.

- Lamichaney A., Parihar A. K., Dixit G. P., Singh A. K., Kumar N., Revanasidda, Singh N. P. (2021): Intact funiculus in mature harvested seeds of field pea (*Pisum sativum* L.): preliminary investigation and possible implications. *Crop Science* 1–9.
- Lee Y., Ayeh K. O., Ambrose M., Hvoslef-Eide A. K. (2016): Immunolocalization of pectic polysaccharides during abscission in pea seeds (*Pisum sativum* L.) and in abscission less def pea mutant seeds. *BMC Research Notes* 9: 427.
- Lewis M. W., Leslie M. E., Liljegren S. J. (2006): Plant separation: 50 ways to leave your mother. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 59–65.
- Lhotská M., Kropáč Z. (1984): Kapesní atlas semen/plodů a klíčnicích rostlin. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Li Z. Woo H. R., Guo H. (2018): Genetic redundancy of senescence-associated transcription factors in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 69: 811–823.
- Niederhuth C. E., Patharkar O. R., Walker J. C. (2013): Transcriptional profiling of the *Arabidopsis* abscission mutant *hae hsl2* by RNA-Seq. *BMC Genomics* 14:37.
- Ogawa M. Kay P., Wilson S., Swain S. M. (2009): *Arabidopsis* dehiscence zone POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 Are Polygalacturonases Required for Cell Separation during Reproductive Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 216–233.
- Olsson V., Butenko M. A. (2018): Abscission in plants. *Current Biology* 28: 329–341.
- Paolo D., Rotasperti L., Schnittger A., Masiero S., Colombo L., Mizzotti C. (2021): The *Arabidopsis* MADS-Domain Transcription Factor SEEDSTICK Controls Seed Size via Direct Activation of E2Fa. *Plants* 10: 192.
- Patharkar O.R., Gassmann W., Walker J. C. (2017): Leaf shedding as an anti-bacterial defense in *Arabidopsis* cauline leaves. *Genetics* 1–18.
- Patharkar O.R., Walker J. C. (2016): Core Mechanisms Regulating Developmentally Timed and Environmentally Triggered Abscission. *Plant Physiology* 172: 510–520.
- Pfaffl, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 45.

- Pinyopich A., Ditta G.S., Savidge B., Liljegren S. J., Baumann E., Wisman E., Yanofsky M. F. (2003): Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424: 85–88.
- Roberts J. A., Whitelaw C. A., Gonzalez-Carranza Z. H., McManus M. T. (2000): Cell Separation Processes in Plants—Models, Mechanisms and Manipulation. *Annals of Botany* 86: 223–235.
- Sakamoto M., Munemura I., Tomita R., Kobayashi K. (2008): Reactive oxygen species in leaf abscission signaling. *Plant Signaling & Behavior* 3: 1014–1015.
- Sies H., Jones D. P. (2020): Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews* 21: 363–365.
- Simontacchi M., Galatro A., Ramos-Artuso F., Santa-María G. E. (2015): Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science* 6: 977.
- Shi Ch., Alling R. M., Hammerstad M., Aalen R. B. (2019): Control of Organ Abscission and Other Cell Separation Processes by Evolutionary Conserved Peptide Signaling. *Plants* 8:225.
- Smýkal P., Vernoud V., Blair M. W., Soukup A., Thompson R. D. (2014): The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science* 5: 351.
- Smýkal P., Nelson M. N., Berger J. D., Wettberg E. J. B. (2018): The Impact of the Genetic Changes during Crop Domestication. *Agronomy* 8(7): 119.
- Соболев Н.А. (1975): Особенности наследования признака прочного срастания семножки с семенем у гороха // Бюллетень НТИ ВНИИЗБК.— Орёл., 41–45
- Spence J., Vercher Y., Gates P., Harris N. (1996): ‘Pod shatter’ in *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *B. juncea*. *Journal of Microscopy* 181: 195–203.
- Stø I. M., Orr R. J. S., Fooyontphanich K., Jin X., Knutsen J. M. B., Fischer U., Tranbarger T. J., Nordal I., Aalen R. B. (2015): Conservation of the abscission signaling peptide IDA during Angiosperm evolution: withstanding genome duplications and gain and loss of the receptors HAE/HSL2. *Frontiers in Plant Science* 6: 931.

Sun T., Zhang Y. (2022): MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. *EMBO Reports* 23: e53817.

Tan H., Xiang X., Tang J. Wang X. (2016): Nutritional functions of the funiculus in *Brassica napus* seed maturation revealed by transcriptome and dynamic metabolite profile analyses. *Plant Molecular Biology* 92: 539–553.

Taylor J. E., Whitelaw C. A. (2001): Signals in abscission. *New Phytologist* 151: 323–339.

Tigchelaar E. C., McGlasson W. B., Buescher R. W. (1978): Genetic Regulation of Tomato Fruit Ripening. *Horticulture Science* 13: 508–513.

Tripathi K., Gore P. G., Pandey A., Bhardwa R., Singh N., Chawla G., Kumar A. (2019): Seed morphology, quality traits and imbibition behaviour study of atypical lentil (*Lens culinaris* Medik.) from Rajasthan, India. *Genetic Resources and Crop Evolution* 66:697–706.

Wolko B., Świącicki W. K. (1991): Linkages inn *Pisum* L. VI. Lokus for the gene *def* (fuliculum connected. *Genetica Polonica* 32: 95–101.

Zelenov A. N. (2013): О ПРИЗНАКЕ НЕОСЫПАЕМОСТИ СЕМЯН У ГОРОХА. *Зернобобовые и крупяные культуры* 2(6): 79–85.

9 Přílohy

1. Schéma referenčního genu *Psat7g116520.1* o velikosti 3378 bp genotypu Cameor.
2. Schéma referenční cDNA genu *Psat7g116520.1* o velikosti 740 bp genotypu Cameor.
3. Schéma proteinu kódovaného genem *Psat7g116520.1*.
4. Schéma referenčního genu *Psat7g066560* o velikosti 3725 bp.
5. Schéma referenční cDNA genu *Psat7g116520* o velikosti 740 bp.
6. Schéma proteinu kódovaného genem *Psat7g116520*.

>Psat7g116520 protein kináza, chr7LG7:191193307..191197607 (+ strand) Cameor v1.0 cDNA

```
ATGCAAAATGGTAGTCTCGGTGATTTGCTTCATAGCAGTAAAGGAGGGTTGTTGGAATGGCCAACAAGATAACAAGATAGCTGTG
GATGCTGCGGATGGACTCTTATCTCCATCATGACTGTGTTCCCGCAATCGTTCATAGAGATGTTAAATCTAACAAATATCTTGTG
GATGGTGACTTTGGTGAAGGGTGGCCGATTTTGGATTAGCTAAGGTTGTCGAAACCACAGGGAAAGGAATTAATCCATGTCC
ATCATAGCTGGTTCATGTGGCTATATTGCACCAGGAATATGCGTACACGCTTAGAGTGAACGAGAAGAGCGACATTTATAGTTTT
GGTGTGTAATACTTGAATTGGTTACCGGAAGACGGCCGGTGGATCTGAATTCGGTGAGAAAAGATTTGGTAAAAATGGGTTTGC
ACTACATTGGATCAGAAAGGTGTGGATCATGTAATTGACTCGAGGCTGGATTATGTTCAAAGATGAAATTTGCAAGGTTTTCA
ACATTGGCCTAATGTGCACTAGTCTCTTCCAATCAACCGGCCTTCAATGAGAAGAGTAGTGAAGATGTTGCAAGAGGTAGGAAT
AGAGAACCAAATGAAACCTGCCAAGAAAGATGGAAAATTAACCCCTTATTACTATGATGATGCCTCAGATCATGGAAGTGTGTT
TGA
```

Obrázek 16: Schéma referenční cDNA genu *Psat7g116520.1* o velikosti 740 bp genotypu Cameor získaného z Know Pulse databáze.

```
1      10      20      30      40      50      60      70      80
MEEKHKPFLMFCILLSMLSLPTNVSSLNQDGLYLYQFKLTLDDPDSLSLSSWNPDTTTPCNWYGVRCDSNTTVTELDLSDTNIQGFETA
90      100     110     120     130     140     150     160     170
SILCRLBNLSSINLFNNSINQTFPLQISLCKNLLHLDLSQNLTLTGLPLPESLPTLNLRYLDLTFGNNFSGNIPLSFGTFQKLVLSLVS
180     190     200     210     220     230     240     250     260
LLEGTIPLPSLGNITTLKMLNLSYNPFPPGRIPESELGNLTNLEVLWLTLQCNLVGVVPEETLGKLLKLDLALNDLYGSIPLSSTELTSL
270     280     290     300     310     320     330     340     350
RQIELYNNLSLSELEPRGMGKLTSLRLLDASMNHLTGRIPEELCSLPLESLNLYENRFEGELPASIADSPNLYELRLEFGNRLTGKLEENL
360     370     380     390     400     410     420     430     440
GKRSPLRWLDVSSNQFWGSIPTSLCDLGELELLMIYNLFTGEIPASLGTQSLSRVRLGYNRFSGEVVPAGIWLGLPHVYLLELAHNSFS
450     460     470     480     490     500     510     520     530
GSISKTIAGAGNLSLLILSKNNFSGTVPEDEVGWLENLVFESAADNMFSGSLPDSLVNLGQLGILD FHNRLSGELPKGIHSWKKLNDLN
540     550     560     570     580     590     600     610     620
LANNGIGGKIPEDEIGSLSVLNFELDLERNQFAGKIFHGLQNLKLNQLNFSFNRLSGELPPQLAKEMYKSSFLGNPGLCGDLKGLCDGRNE
630     640     650     660     670     680     690     700     710
VKNLGYVWLLRAIFLLAVLVFLVGVVWFYFRYKNEKAKRAIDKSKWTLMSFHKLGFGEDEILNCLDEDNVIGSGSSGKVVYKVLNSGE
720     730     740     750     760     770     780     790     800
AVAVKKIWWGARKEVESGDVEKGRVQDNADFDAEVETLGRKIRHKNIVKLVCCCTTRDCQLLVYEQNGSLGDLHSSKGGLEENPTRYK
810     820     830     840     850     860     870     880     890
IAVDAADGLSYLHHDVPAIVHRDVKSNNILLDGDFGARVADFGAKVVEETGKGIKSMSSIIAGSCGYIAPYAYTLRVNEKSDIYSFG
900     910     920     930     940     950     960     970
VVILELVTGRRPVDPEFGEKDLVKWVCTTLDQKGVVDHVIDSRRLDSCFKDEICKVFNIGLMCTSELPIINRPSMRRVVKMLQEVGIENQMK
980     990     1,002
PAKKDGLKLPYYYDDASDHGSVV
```

Obrázek 17: Schéma proteinu kódovaného genem *Psat7g116520.1*.

```

>Psat7g066560 MADS doména, chr7LG7:107071077..107075651 (- strand) v genomu Comeor v1.0
TCAGCTTGCAACTATGAGTTTTCCAAATGAATCCATGCCTGattctcctcagagaaagattggaaggggaaagattgagatcaaga
ggattgaaaacacaacaaatcgccaagttaccttctgcaaacgtagaaaaggcttgcttaagaagggcatatgagttatctgtgctt
tgtgatgcagaagttgctctttagtcttttgcactcgtggccgctctatgaatatgcaataacagggtaattagttgagaaatt
ttcaaccttttggcggttcttttttggttggttggtttctctatttggtttgcagtttttgatgagtcgaagaaatgtctttgtgctt
ctttttgggaacatttgagttcatatataaaaagttcatgttagtagatcttttgaaggagttagtttaacttcttctaaagagagta
atcatttttgggttaatttttctcttttgggtgctgcttttctgcaaccatggttctacttgggttggtttctctctattttggcctc
tttttttacaaaacttctatgaaacttttcaagtccttctctctatctaccctttttctttagtctataaacaattgttcttgg
tttggtgaccatatagatagatctgggttacttggtagtagcaagtagcaacaaggtaagaatttttggaggatttgaacaag
gattgtgagatcattcattcaacccttaatttctcctctctcattttgttctttaaacttttcttcttcttcttcttcttcttctt
ttctattattccccttaagaaaagcctaaagcaagtggaagaaagctatttgcattgagtagataaacttgtaaaaaaaatggcaag
ggttacttagggttgggttaaaagcctaaaattatagttcctcatagatttttgcagaagttctcttttttaattcatcacata
aaatctgattaggaatacacaaccccatataaagattttcaattctgaaattgacaaagggttttttccccaaatctcttctatc
catgtgcaggatcttcttggataaagcaatagccctaaaatttagggttttgggttctcgaatttttagatgggtaagaac
taatcaagaggataattgatgaagaaaagaaataaacttctgaaataaatattcaaaagggtattgaaatctgatactagcttctg
gttagggcttaaatgagtcacttctatagctctataggttctctattttgtcttgggtgaaagaatctaattagtcagtcacaagt
gaattttcttaaagttgatcttctatagctgtttaattaatcaatctctttagggtaaacaaaactaaaaattcattcttttcat
agcttttaactaatcattctctttagggtaaaaaaactaaaagttcattcttttcatagttagaaaaacaacaaagatgaagtaa
gaagaggttagttgataaagcctaaaattatagttcctcatagatttttgcagaagttgaaattgcaacaagatcttcttctcaca
atagatcaaatctgtgaaagttatagactgaggaagaaaaggaagggttttcttctaaagctcaatgaatgatgaaatggagg
cagagacaacgtacgacaatttggtagcagccaatgaaattgttatgatcatttttggcttcttccatgatcaccaagcgtacaac
tggttctactgccacatctattgcagtgcaattcaacggctgtgatttaactcagactgaaaaaactagctacttttataatatt
ttaataagctttggattgaatcaaggtggttaataaagtgtagttaagagattatccactgtgttttagatgggttcttcatagg
gtagagaaaataataaaaaaggtctaaaaatgggtgaaccaatcatatttaggaacctgtgccagcgtggcaggaacaaccaat
cagtagctcgaggaaattaaggtatcagagattgaacataactgaaaaaggaaaaagatttttttcttcttctttatcacattaca
tatccaatcaacttgattaaacatcatatcaactttgaggtcaaggtttgagctgaggaatgagatctttttagtgtagttttt
caagattgtgctttaaggttcagctggatgatttgaccacagatttatgattaaattcagattaatttattacttaacttttgg
ttcttggtttttaatatgatttgaatgatagtgatgatgattttcagTGTGAAAGCTTCTATTGAGAGGTATAAGAAAGCA
TGTTCTGATACTTCTGGTGCTAAATCAGCTTCTGAGACTAATGCTCAGgtattcatctagcaaaaaatggaaattttatagtaat
ataatgattaatgaaacatgattgtataatctcagTATTATCAGCAAGAAGCCGCGAAACTGCGAGTGCAAATCAGTAATTTGCAG
AATCATAACAGGcgagtcgaattagtcctcgtagtttcatatttttaaatgtttgaaattggcgatgaaaaattttaagagt
gcagGCAAATGATGGGTGAAGCTTTGAGCAATATGAACGGTAAGGAACTCAGAAACCTCGAGAGTAAATTAGAAAAAGGAATTAGC
CGAATTCGCTCCAAGAAGgtacttataaatttaacacatgttctttaaataactataatccttttgataaataactatctcctttgt
ttgtgctacatcagAATGAAATGCTATTTGCAGAAATTTGAGTACATGCAGAAAAGGgtaaatatttctctctattcatctataaa
tcaattttccaacttaattttcttggctatgtcagcgttagttgggttagtactcattggaatggaagcatgtcttaccaaaaga
aagttgtttgataaataattagcttcaaatcgaagatataatattttgataagaacaagatttgtataagataactaaaatg
tacatacatatataacaggagatagagttgcataatagcaatcaggctcttagagcaaaggtttgtgggtatttctctgtctgtc
ctatacgaaggtttttgagtcgtcgtttcgattataaatttcaactttttattttttttttggatgagtagatctagATCTCAGA
AAATGATCAGAGGAACAACCATAATGTTAATGTGTTGCATGGAGGCACAAACTTCGAGT

```

Obrázek 18: Schéma referenčního genu *Psat7g066560* o velikosti 3725 bp genotypu Comeor. Žlutě jsou označeny navržené primery. Velkým písmem jsou znázorněny exony a malým písmem introny.

```

>Psat7g066560 MADS doména, chr7LG7:107071077..107075651 (- strand) v genomu Comeor v1.0
cDNA
TCAGCTTGCAACTATGAGTTTTCCAAATGAATCCATGCCTG|GTGAAAGCTTCTATTGAGAGGTATAA
GAAAGCATGTTCTGATACTTCTGGTGCTAAATCAGCTTCTGAGACTAATGCTCAG|TATTATCAGCAAG
AAGCCGCGAAACTGCGAGTGCAAATCAGTAATTTGCAGAATCATAACAG|SCAAATGATGGGTGAAGCT
TTGAGCAATATGAACGGTAAGGAACTCAGAAACCTCGAGAGTAAATTAGAAAAAGGAATTAGCCGAAT
TCGCTCCAAGAAG|AATGAAATGCTATTTGCAGAAATTTGAGTACATGCAGAAAAGG|ATCTCAGAAAATG
ATCAGAGGAACAACCATAATGTTAATGTGTTGCATGGAGGCACAAACTTCGAGT

```

Obrázek 19: Schéma referenční cDNA genu *Psat7g116520* o velikosti 740 bp. Žlutě jsou označeny místa navržených primerů. Červeně jsou označeny START a STOP kodony. Červené čáry mezi sekvencemi značí místa, kde byl vystřihnut intron.

1 10 20 30 40 50 60 70 80
M S F P N E S M E D S P Q R K I G R G K I E I K R I E N T T N R Q V T F C K R R N G L L K K A Y E L S V L C D A E V A L I V F S T R G R L Y E Y A N N S V K A S I E R Y K K A C S
90 100 110 120 130 140 150 160 170
D T S G A K S A S E T N A Q Y Y Q Q E A A K L R V Q I S N L Q N H N R Q M M G E A L S N M N G K D L R N L E S K L E K G I S R I R S K K N E M L F A E I E Y M Q K R E I E L H N S
180 190 200 210 220 230 240 244
N Q V L R A K I S E N D Q R N N H N A N M L H G G T N F E C M Q P Q Q Q F D S R S Y F Q V N E L Q E N N Q Y A R Q D H Q M S L Q F V

Obrázek 20: Schéma proteinu kódovaného genem *Psat7g116520*.