

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalárska práca

Olomouc 2022

Laura Žabková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Laboratórium rastových regulátorov



**Transkriptomická analýza génov aktívnych behom
vývoja osemenia hrachu**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor: Laura Žabková
Študijný program: E1501 Experimentálna biológia
Študijný odbor: Experimentálna biológia
Vedúci práce: Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
Konzultant: prof. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.
Rok: 2022

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Laura Žabková
Názov práce	Transkriptomická analýza génov aktívnych behom vývoja osemenia hrachu
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Laboratórium rastových regulátorov
Vedúci práce	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
Konzultant	prof. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.
Rok obhajoby	2022

Abstrakt

Po oplodnení sa počas vývoja semena v procese embryogenézy formuje plán embrya a jednotlivé extraembryonálne štruktúry, endosperm a osemenie. Osemenie je pre semeno nesmierne dôležité, pretože nie len, že slúži ako zásobné pletivo a sprostredkováva komunikáciu medzi osemením a vonkajším prostredím, ale taktiež slúži pre semeno ako ochrana. Jedným z mechanizmov zabezpečujúcich ochranu semena je biochemická ochrana, ktorá je sprostredkovaná enzýmami, napríklad polyfenoloxidázou. V tejto bakalárskej práci sme sa zamerali na určenie relatívnej expresie polyfenoloxidázy. Expresia bola analyzovaná na štyroch genotypoch, a to na kultúrnych nedormantných genotypoch Cameor, ATC7025 a PI181958 a planom dormantnom genotype JI261. Expresná analýza ukázala, že polyfenoloxidáza je exprimovaná v najväčšej miere u planého pigmentovaného genotypu JI261 a v menšej miere aj u kultúrneho pigmentovaného genotypu ATC7025. U kultúrneho nepigmentovaného genotypu PI181958 bola len veľmi malá expresia polyfenoloxidázy a u kultúrneho genotypu Cameor nebola detekovaná takmer žiadna expresia. Túto skutočnosť sme potvrdili aj pomocou detekcie aktivity polyfenoloxidázy na rezoch osemením a hilom, pričom sme potvrdili aktivitu polyfenoloxidázy len na reze genotypom JI261 a genotypom ATC7025, u genotypov PI181958 a Cameoru nebola aktivita polyfenoloxidázy detekovaná.

Kľúčové slová	polyfenoloxidáza, osemenie, hilum, obrana, hrach, semeno
Počet strán	56
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Laura Žabková
Title of thesis	Transcriptomic analysis of pea seed coat development
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
Consultant	prof. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.
The year of presentation	2022

Abstract

After fertilization, the plan of the embryo and individual extraembryonic structures, endosperm and testa, is formed. Testa is extremely important structure for the seed. It has not only the function as a storage tissue, exchanging information between the embryo and the external environment, but it also serves as protection for the seed. One of the mechanisms ensuring seed protection is biochemical protection, which is mediated by enzymes, for example by polyphenol oxidase. In this bachelor's thesis, we focused on determining the relative expression of gene encoding polyphenol oxidase. The polyphenol oxidase expression was analyzed in seed coats of four genotypes, namely the non-dormant genotypes Cameor, ATC7025, PI181958 and the dormant genotype JI261. The gene expression analysis showed that polyphenol oxidase was expressed to the greatest extent in the wild pigmented genotype JI261 and to a lesser extent in the cultivated pigmented genotype ATC7025. Polyphenol oxidase expression was very low in the non-pigmented genotype PI181958 and almost no expression was detected in the Cameor genotype. The activity of the polyphenol oxidase enzyme was also detected on the testa sections. We detected the polyphenol oxidase activity only on sections of JI261 and ATC7025, polyphenol oxidase activity was not detected for genotypes PI181958 and Cameor.

Keywords	polyphenol oxidase, seed coat, hilum, protection, pea, seed
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Slovak

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, pod vedením pani Mgr. Jany Balarynovej, Ph.D. s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev.

V Olomouci dňa

.....

Laura Žabková

Pod'akovanie

Na prvom mieste by som sa chcela poďakovať vedúcej mojej bakalárskej práce Mgr. Jane Balarynovej, Ph.D. za odborné vedenie, podnetné rady, trpezlivosť a pomoc pri spracovaní práce. Taktiež by som sa chcela poďakovať konzultantovi prof. Ing. Petrovi Smýkalovi, Ph.D. a Mgr. Lucii Kobllovej, Ph.D. za pomoc a cenné rady pri práci na bakalárskej práci.

Obsah

1 Úvod	12
2 Literárny prehľad	13
2.1. Vývoj semena	13
2.1.1. Fázy vývoja semena	13
2.2. Osemenie.....	15
2.2.1. Vrstva sklereíd	16
2.2.2. Parenchymatická vrstva.....	17
2.2.3. Mikropyla a hilum	17
2.2.4. Dormancia semien	18
2.3. Ochrana semena	19
2.3.1. Fyzikálna ochrana	19
2.3.2. Chemická ochrana	20
2.3.3. Biochemická ochrana	20
2.3.4. Rozdiely medzi kultúrnymi a planými genotypmi.....	21
2.4. Polyfenoloxidáza	22
2.4.1. Reakčný mechanizmus	23
2.4.2. PPO a hnednutie plodov.....	23
2.4.3. Genomické a genetické aspekty PPO	24
2.4.4. Zvýšená a znížená expresia PPO	25
2.4.5. Fenolové zlúčeniny.....	25
3 Materiál a metódy.....	26
3.1. Biologický materiál.....	26
3.2. Použité chemikálie	27
3.3. Použité prístroje a zariadenia.....	28
3.4. Použité prístroje a zariadenia.....	29
3.5. Pomôcky	29
3.6. Metódy	30
3.6.1. Izolácia RNA	30
3.6.2. Odstránenie zvyškov genomickej DNA.....	31
3.6.3. Syntéza cDNA	32
3.6.4. Kvantitatívna PCR (qRT-PCR)	33
3.6.5. Rezy na kryomikrotome a farbenie preparátov.....	35
4 Výsledky	36
4.1. Expresia génu kódujúceho polyfenoloxidázu v priebehu vývoja osemenia... 36	
4.2. Histochemická lokalizácia aktivity polyfenoloxidázy v osemeni	38

5 Diskusia	43
6 Záver	46
Použitá literatúra	47

Ciele práce

Ciele tejto bakalárskej práce zahŕňajú vypracovanie literárnej rešerše na tému génovej expresie enzýmu polyfenoloxidázy, počas vývoja semien, a rovnako vypracovanie literárnej rešerše na tému vývoja a štruktúry osemenia hrachu.

Cieľom praktickej časti bakalárskej práce je vykonanie qRT-PCR pre stanovenie expresie génov kódujúcich polyfenoloxidázu v osemení hrachu na kultúrnych vzorkách Cameoru, ATC7025 a PI181958 a planých vzorkách JI261.

Taktiež je našim cieľom s využitím farbenia zviditeľniť štruktúry na reze osemením a na reze hila a detekovať aktivitu polyfenoloxidázy na reze osemením vybraných planých a kultúrnych genotypoch hrachu.

1 Úvod

Po dvojitom oplodnení semien dochádza k vývoju embrya a embryonálnych štruktúr. Endospermu, ktorý neskôr zaniká a osemenia, ktoré poskytuje ochranu, obmedzuje straty a príjem vody, uľahčuje šírenie semien a zabezpečuje fyzikálnu dormanciu. Pričom dormancia je charakterizovaná ako dočasný stav, kedy je semeno v klúde a má obmedzené fyziologické funkcie, čo zabezpečuje, aby semeno vykličilo v správnom čase a vo vhodných podmienkach.

Keďže sú semená kritickými zložkami pre prežitie rastliny, je preto nutné aby mali vyvinutých viacero mechanizmov ochrany, akými sú napríklad fyzikálna, chemická a biochemická ochrana. Fyzikálna ochrana je zabezpečovaná pevnosťou osemenia. Chemická ochrana je forma ochrany, na ktorú sa semená počas vývoja spoliehajú najviac a je zabezpečená fenolmi a ich nerozpustnými polymérmi, alkaloidmi a glukozinolátmi. Medzi fenolové látky patria flavanoidy, ktoré zabezpečujú pigmentáciu semien. Biochemická ochrana je zabezpečená enzýmami, ktoré sú prirodzene obsiahnuté v osemeni.

Dôležitým enzýmom zabezpečujúcim ochranu je enzým polyfenoloxidáza (PPO), ktorá patrí do skupiny enzýmov spolu s lakázami a askorbát oxidázami. Vo svojej štruktúre obsahuje dva meďnaté ionty, ktoré tvoria katalytické jadro. PPO zabezpečuje oxidáciu o-difenolov na o-chinóny, a následne pri polymerizácií o-chinónov dochádza k vzniku hnedých pigmentov. Avšak ukázalo sa, že niektoré kultúrne genotypy stratili v priebehu domestikácie funkčnosť génov pre PPO, zatiaľ čo plané genotypy si funkciu PPO zachovali.

2 Literárny prehľad

2.1. Vývoj semena

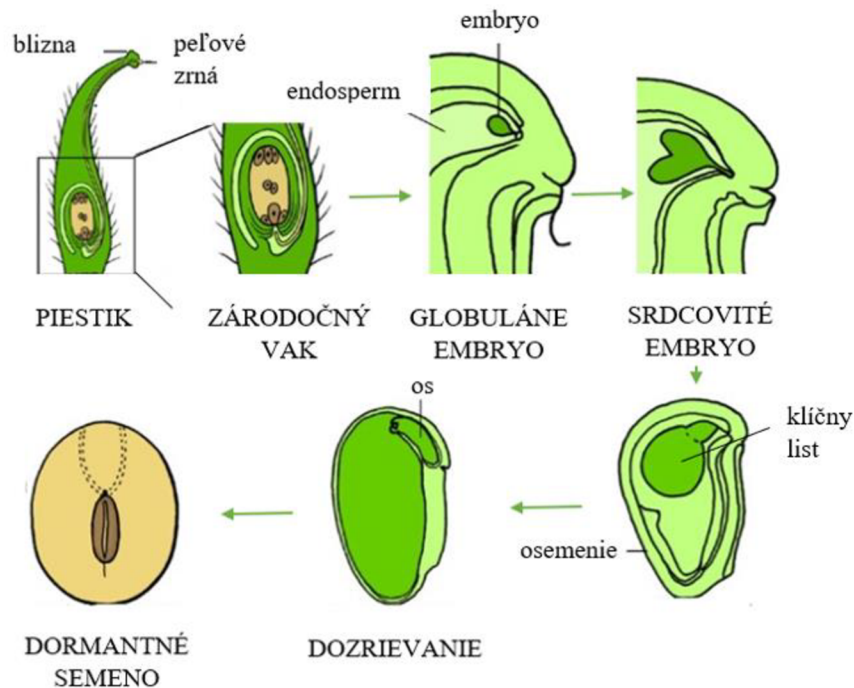
Semená majú dve hlavné funkcie, a tými sú reprodukcia rastlín a šírenie rastlinných druhov na veľké vzdialenosti (*Zablatzká a kol., 2021*). Hrach siaty (*Pisum sativum* L.) je jedna z najstarších kultúrnych plodín a najrozšírenejších bôbovítých rastlín na svete a jeho semená sú dôležitým zdrojom bielkovín (*Bastianelli a kol., 1998*). Patrí medzi jednoročné krytosemenné rastliny z čeľade bôbovítých (*Fabaceae*). Semená krytosemenných rastlín vznikajú pohlavným rozmnožovaním pomocou dvojitého oplodnenia (*Roszak a Köhler, 2011*). Embryo vzniká fúzaním vaječnej bunky (oosféry) s jadrom spermatickej bunky, zatiaľ čo endosperm sa vyvíja fúziou medzi dvoma centrálnymi bunkovými jadrami zárodočného vaku a druhým jadrom spermatickej bunky za vzniku triploidnej štruktúry. Osemenie (alebo inak aj testa, príp. obal semena) je čisto materského pôvodu (*Roszak a Köhler, 2011; Vinter a Macháčková, 2013*) a dochádza v ňom k vývoju embrya.

2.1.1. Fázy vývoja semena

Vývoj semien prebieha v troch samostatných, ale zároveň nepretržitých fázach embryogenézy. V skorej embryogenéze dochádza k aktivite bunkového delenia (*Srivastava a kol., 2002*). Na začiatku fázy dochádza k predĺženiu oplodnenej vaječnej bunky a po viacnásobnom bunkovom delení sa vyvinú dve osi, a to apikobazálna a radiálna (*Peris a kol., 2010*). Takto je stanovený vnútorný plán embrya, pričom v tejto fáze dochádza aj k vývoju endospermu a ostatných extraembryonálnych štruktúr, tými sú perisperm a osemenie (Obrázok 1). Morfogenéza extraembryonálnych štruktúr a plodu má istý časový náskok pred morfogenezou embrya (*Vinter a Macháčková, 2013*). V strednej fáze embryogenézy, ktorú nazývame aj fázou maturácie dochádza k intenzívnej a veľmi rozmanitej biochemickej aktivite, k ďalšiemu deleniu buniek a k vytvoreniu primordií, čo sú základné orgány, ktoré sú dôležité pre postembryonálny vývoj (*Peris a kol., 2010*). Embryo a v niektorých semenách aj endosperm expandujú a dosiahnu svoju konečnú veľkosť. V tejto fáze sa taktiež ukladajú zásoby látok v endosperme, perisperme a v kľúčnych

listoch embrya (*Vinter a Macháčková, 2013*). Medzi tieto zásobné látky patria napríklad proteíny, lipidy, pričom mnohé semená ukladajú taktiež toxické látky, akými sú napríklad lektíny, fenoly a inhibítory amyláz. (*Srivastava a kol., 2002*). Tieto syntetické aktivity prebiehajú až do tretej fázy, ktorú nazývame aj fázou dezikácie, kedy semená strácajú vodu, vysychajú a dostávajú sa do štádia dormancie (*Srivastava a kol., 2002*). V tejto fáze dochádza aj k oddeľovaniu semena od pletív materskej rastliny v mieste funikulu za vzniku hila (*Vinter a Macháčková, 2013*).

Ako bolo vyššie spomenuté semeno sa skladá z dvoch produktov oplodnenia, a to z embrya a endospermu, tie sú obklopené treťou zložkou, a to osemením, ktoré je odvodené od matky. Ich úspešná interakcia je podmienkou pre to, aby semeno dokončilo svoj vývoj a došlo k produkcii životaschopných embryí a k založeniu novej generácie rastlín (*Lafon-Placette a Köhler, 2014*). V priebehu vývoja semien niektorých druhov, napríklad hrachu, endosperm postupne zaniká, takže embryo sa dostáva do priameho kontaktu s osemením (Obrázok 1).



Obrázok 1: Fázy vývoja semena sóje (*Glycine max (L.) Merrill*), kedy v prvej fáze je naznačený vývoj embrya, endospermu a ostatných extraembryonálnych štruktúr. V druhej fáze dochádza k vytvoreniu základných orgánov, k expandovaniu embrya a endospermu. V poslednej fáze je zrelé plne vyvinuté semeno, ktorého endosperm bol absorbovaný embryom, a preto dochádza k priamemu kontaktu osemenia a embria (Obrázok je prevzatý a upravený z práce Le a kol., 2007).

2.2. Osemenie

Osemenie pochádza z bunkových vrstiev, ktoré obklopujú vajíčko (Haughn a Chaudhury, 2005). Úlohou osemenia je, že poskytuje ochrannú vrstvu pre vyvíjajúcu sa zygotu, obmedzuje príjem vody behom dormancie a klíčenia, uľahčuje šírenie semien (Zablatzká a kol., 2021) a funguje ako kanál pre prenos enviromentálnych podnetov do vnútra semena, aby bolo schopné reagovať na zmeny vo vonkajšom prostredí. Ukázalo sa, že v osemení sa nachádzajú enzýmy, ktoré v osemení pretrvávajú desaťročia a uvoľnia sa až pri hydratácii semena. Schopnosť osemenia obmedzovať stratu vody a zabezpečovať semenu obranu pred mechanickým poškodením pretrváva aj po tom, ako semeno plne dozrie vďaka sklerenchýmu (Lanning a Eleuterius, 1992).

U hrachu sú behom vývoja osemenie a aj zárodok fotosynteticky aktívne (Radchuk a Borisjuk, 2014; Zablitzká a kol., 2021). U bôbových rastlín je osemenie tvorené dvomi integumentmi, pričom bunky z oboch integumentov podliehajú rýchlemu rastu a diferenciacii po oplodnení vajíčka a tieto procesy sú koordinované s endospermom. (Zablitzká a kol., 2021). Vnútoraná vrstva počas vývoja čiastočne mizne, zatiaľ čo vonkajšia vrstva vytvára niekoľko odlišných vrstiev a vytvára štruktúru osemenia (Obrázok 2) (Esau a kol., 1965). Pre bôbovité rastliny je typická viacvrstvomá štruktúra osemenia, ktorá vo svojej vonkajšej vrstve zahŕňa makro- a osteosklereidy a parenchymatické pletivo vo vnútornej vrstve (van Dongen a kol., 2003).

2.2.1. Vrstva sklereíd

Vrchná vrstva osemenia je tvorená jednou vrstvou tesne zhustenej palisády radiálne pretiahnutých sklereíd, ktoré môžeme inak nazvať aj ako palisádové bunky, či makrosklereidy, pre ktoré je typické, že majú nerovnomerne zhrubnuté bunkové steny.

Vo vrstve makrosklereíd sa taktiež nachádza priehľadná oblasť stien, ktorá oddeľuje koncové časti od ich bazálnych častí. Túto líniu, ktorá sa tiahne cez makrosklereidy nazývame svetlá čiara (linea lucida) a jej farba je pripisovaná modifikáciám v ukladaní polysacharidov a impregnácii bunkovej steny (Hamly a kol., 1935; Smýkal a kol., 2014). Vrstva buniek pod makrosklereidami sa diferencuje na osteosklereidy alebo lagenosklereidy. Vo vrstve osteosklereíd sa taktiež nachádzajú nápadné vzduchom naplnené medzibunkové priestory, ktoré vznikajú počas diferencie osemenia v miestach, v ktorých došlo k bunkovej smrti. (Ranathunge a kol., 2010). V okolí hila sa vrstva osteosklereíd spája s hrubostenným parenchýmom a vytvára tvar hviezdy (Smýkal a kol., 2014).

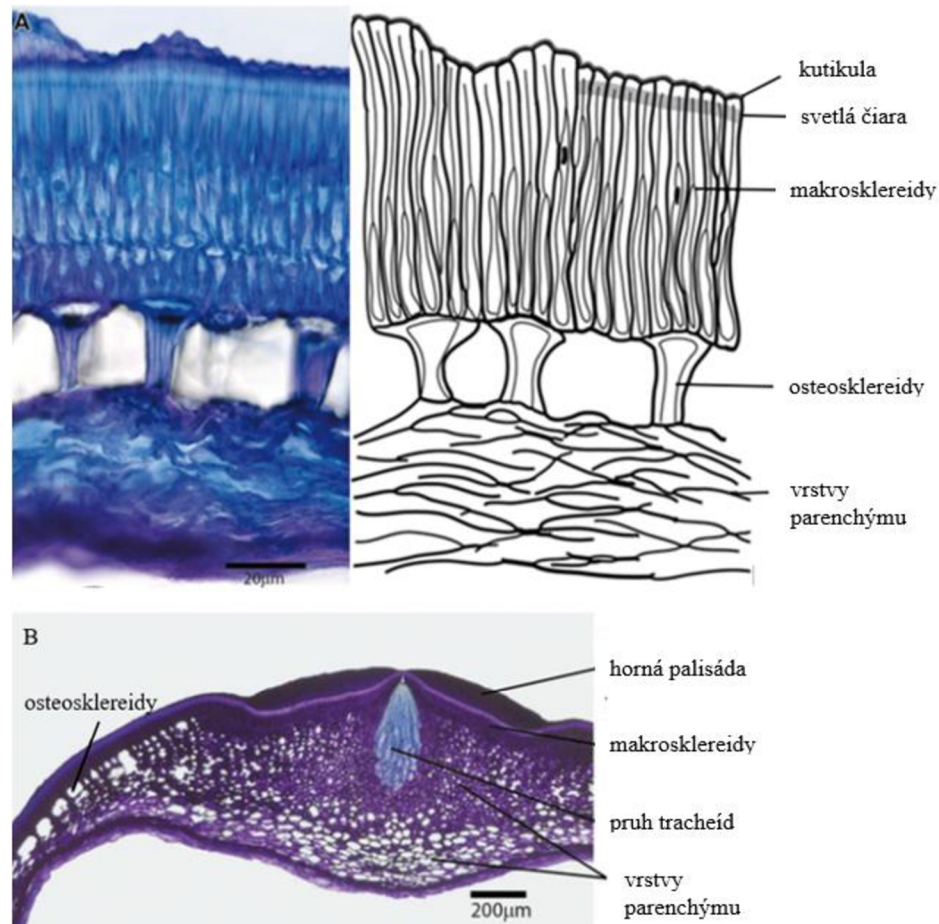
Vonkajšie bunkové steny sú pokryté vrstvou kutikuly a ich tvar spolu s voskovými usadeninami určuje textúru povrchu osemenia (Güne a kol., 2013). Kutikula pokrýva semeno, okrem hila a tvorí súvislú vrstvu. Taktiež sa považuje za najvzdialenejšiu bariéru príjmu vody (Smýkal a kol., 2014).

2.2.2. Parenchymatická vrstva

Najvnútornejšia časť osemenia tvorená parenchymatickými bunkami, ktoré sú predĺžené v tangenciálnom smere a nachádzajú sa v nich vzduchom naplnené medzibunkové priestory. Parenchymatické bunky sa v osemeni nachádzajú vo viacerých vrstvách, ktoré priliehajú k endospermu (*Hamly a kol., 1932*). Táto vrstva je niekedy taktiež označovaná aj ako vyživovacia vrstva vďaka jej funkcii, ktorú zastáva pri vývoji embrya (*Van Dongen a kol., 2003*). V parenchymatickej vrstve sú taktiež zapustené cievne systémy osemenia, ktoré sú u hrachu relatívne jednoduché s jedným chalazálnym cievnym zväzkom a dvoma bočnými vetvami, ktoré ústia do osemenia. Počas dozrievania osemenia strácajú parenchymatické bunky protoplast a môže dôjsť k rozdrveniu najvnútornejších vrstiev (*Smykal a kol., 2014*).

2.2.3. Mikropyla a hilum

Hilum uvoľneného semena je výrazne oválna alebo okrúhla abscisná jazva, ktorá sa nachádza v chalazálnej oblasti semena a je pozostatkom spojenia s materskou rastlinou cez funikulus. V tejto oblasti sa nachádza aj ďalšia zvyšková vrstva palisádových buniek funikulárneho pôvodu, ktoré sú označované ako horná palisáda alebo kontrapalisáda (z angl. counter-palisade) a sú súčasťou hilovej jazvy (*Lackey a kol., 1981*). V palisádovej vrstve hila sa nachádza centrálna puklina, ktorú nazývame hilová štrbina. Štrbina hila prekrýva pruh tracheíd v oblasti medzi mikropylou a ovulárnym zväzkom na druhej strane (Obrázok 2). Úlohou tejto štrbiny je, že funguje ako hygroskopicky aktivovaný ventil. V priebehu dozrievania semien je štrbina otvorená v prípade, že je vlhkosť veľmi nízka a semeno vysychá, naopak keď je vlhkosť vysoká, tak sa trhlina uzavrie a semeno vlhkosť neabsorbuje (*Smykal a kol., 2014*).



Obrázok 2: Zloženie osemenia u bôbovitých rastlín. (A) Vľavo, priečny rez osemenia *Pisum sativum*, so schematickým nákresom, vpravo; vrstva makrosklereíd pokrytá vrstvou kutikuly, pričom vonkajšie časti makrosklereíd sú od vnútorných častí oddelené svetlou čiarou. Ústrednú časť osemenia tvoria osteosklereidy. Najvnútornejšia časť osemenia je tvorená vrstvami parenchymatických buniek. (B) Priečny rez osemením *P. sativum* v oblasti hila. Makrosklereidy sú pokryté hornou palisádou (kontrapalisádou). V oblasti hila sa nachádza hilová štrbina, ktorú obklopujú vrstvy parenchýmu a tie sa prepájajú s medzibunkovými priestormi osteosklereíd (Obrázok prevzatý a upravený z práce Smýkal a kol., 2014).

2.2.4. Dormancia semien

Dormancia semien je vrodená vlastnosť smena, ktorá definuje, kedy má semeno vhodné podmienky prostredia a je pripravené na klíčenie. Vďaka dormancii dochádza k načasovaniu klíčenia tak, aby nedošlo k skorému klíčeniu a následnému úhynu klíčiacej rastliny. Chráni semená pred nepriaznivým

počasím, pred bylinožravcami alebo pred sezónnou konkurenciou ostatných rastlín (*Finch-Savage a kol., 2006*). Dormanciu delíme na: fyzikálnu, morfológickú a fyziologickú.

Fyzikálna dormancia je zabezpečená obalmi semena (osemením) alebo plodu, ktoré obsahujú palisádu radiálne pretiahnutých lignifikovaných buniek, ktoré sú nepriepustné pre vodu. Vyvíja sa behom dozrievania a vysychania semien alebo plodov (*Baskin a Baskin, 2000*). Semeno zostáva v pokoji do chvíle, kým niektoré z vonkajších faktorov neumožnia rozrušenie ochranných obalov, a tie sa stanú priepustnými pre vodu. Medzi tieto faktory patria napríklad teplota (vysoké alebo kolísavé teploty), oheň, kolísanie vlhkosti, mrazenie alebo prechod tráviacim traktom zvierat (*Baskin a Baskin, 2000*).

Morfologická dormancia je typom dormancie, kedy je semeno malé, nedostatočne vyvinuté a diferencované (*Baskin a Baskin, 2000*). Semená, však nie sú spiacimi a nepotrebujú žiaden vonkajší zásah aby došlo k prerušeniu dormancie a začiatku klíčenia. Semená, však potrebujú čas k tomu aby dorástli do plnej veľkosti, a až potom dôjde ku vyklíčeniu (*Baskin a Baskin, 2004*).

Fyziologická dormancia zahŕňa vo svojich procesoch rastové regulátory, kľúčový je pomer kyseliny abscisovej (ABA) a giberelínov (*Coleman a kol., 1987*).

2.3. Ochrana semena

Semená sú kritickými zložkami pre prežitie väčšiny rastlín, a preto je nutné aby boli dostatočne chránené. (*Zangerl a Bazzaz, 1992*). V pôde semená pretrvávajú životaschopné v nevyklíčenom stave (*Schafer a Chilcote, 1969*), pričom tento stav pokoja je zachovávaný pomocou dormancie, ktorá bráni klíčeniu počas nepriaznivého obdobia (*Dalling a kol., 2011*). Semená majú fyzikálne, chemické a biochemické ochranné mechanizmy, ktoré chránia semená nie len pred nepriaznivými podmienkami, ale taktiež aj pred rozkladom mikroorganizmami a bylinožravcami (*Fuerst a kol., 2014*).

2.3.1. Fyzikálna ochrana

Fyzikálna ochrana je zabezpečená hrúbkou a odolnosťou proti prasknutiu uzatváracích štruktúr, ktoré chránia semeno (*Tiansawat a kol., 2014*).

Nepriepustnosť semena spôsobujú nerozpustné polyméry fenolových látok. V ich polymerácii hrajú dôležitú rolu, peroxidázy, či polyfenoloxidázy (Hradilová a kol., 2019). Medzi fenolové látky, ktoré sa nachádzajú v osemeni, tvoria fyzickú ochranu a ovplyvňujú pigmentáciu semena patria napríklad flavonoidy.

Flavonoidy sú sekundárne metabolity a patria sem flavonoly, antokyány, izoflavóny a taníny, pričom v osemeni hrachu sa dokázala prítomnosť proantokyanidínov, ktoré tvoria základ pre kondenzované taníny (Dixon a kol., 2005; Zhao a kol., 2010). Tieto polyfenolové zlúčeniny sú schopné ovplyvňovať priepustnosť vody do semien (Moïse a kol., 2005).

2.3.2. Chemická ochrana

Je forma ochrany, na ktorú sa semená počas dozrievania spoliehajú najviac, pretože v týchto štádiách ešte nie sú fyzikálne ochranné štruktúry úplne vyvinuté. Chemická ochrana zapríčiňuje zhoršenie chuti semien, zníženie pravdepodobnosti mikrobiálnej infekcie a zrýchlenie vývoja semien (Aide a Londono, 1989; Tewksbury a kol., 2008). Medzi látky zabezpečujúce chemickú obranu rastlín patria glukozinoláty, alkaloidy, terpenoidy, fenoly, saponíny, inhibítory proteáz a pod., ktoré sú veľmi účinné proti bylinožravcom, hmyzu a majú aj antibakteriálnu a antifugálnu aktivitu (Mayer a kol., 2004). V koreňoch a stonkách je chemická ochrana pomerne dobre preštudovaná, avšak v semenách a listoch je pohľad na chemickú obranu brzdený nedostatkom štúdií, ktoré porovnávajú chémiu listov a semien. Pri štúdiu na rastline *Macaranga* bola pozorovaná zvýšená diverzita fenolov v listoch (približne trikrát), zatiaľ čo u semien je chemická ochrana viac špecializovaná, a taktiež sa zistilo, že semená majú väčší obsah amidov, než listy (Whitehead a kol., 2013).

2.3.3. Biochemická ochrana

V tejto bakalárskej práci sa ďalej zameriame hlavne na biochemickú ochranu. Predpokladáme, že semená majú biochemickú ochranu založenú na enzýmoch, ktorých obsah v semenách je často v oveľa vyšších koncentráciách, než v iných častiach rastlín (Terras a kol., 1995). Medzi tieto enzýmy vyskytujúce sa v osemeni patria polyfenoloxidázy (PPO), peroxidázy, oxalát oxidázy a chitinázy. Peroxidázy tvoria rodinu rastlinných izoenzýmov.

Sú to monomérne glykoproteíny, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú hem a pri reakciách využívajú peroxid vodíka alebo kyslík na oxidáciu širokého spektra molekúl (Yoshida a kol., 2003). V rastlinách sa podieľajú na mnohých bunkových procesoch, napríklad pri vývoji semien, biosyntéze lignínu, reakciách na stres a pri obranných reakciách (Jouili a kol., 2011). Oxalát oxidázy vytvárajú peroxid vodíka degradáciou kyseliny šťaveľovej, pričom sa podieľajú na regulácii bunkového vývoja, diferenciácie, signalizácie a obranných systémov rastlín (Requena a Bornemann, 1999). Chitinázy patria medzi glykosidázy, ktoré zabezpečujú degradáciu chitínu, a tým prispievajú k tvorbe uhlíka a dusíka (Hamid a kol., 2013). Pri výskume ovsu hluchého bolo indukované uvoľnenie obranných enzýmov do prostredia okolo semena (Fuerst a kol., 2018). Všetky štyri enzýmy sa podieľajú na hostiteľovi asociovannej obrane (Hückelhoven a kol., 2007) a tvoria prvú líniu pri obrane voči patogénom.

2.3.4. Rozdiely medzi kultúrnymi a planými genotypmi

Kultúrne rastliny sa líšia od svojich príbuzných planých genotypov v mnohých znakoch (domestikačný syndróm). Domestikačný syndróm popisuje vlastnosti, ktoré vznikli na základe preferencií človeka pre zisk ľahkej úrody a iných výhod rastu zapríčinených ľudským množením rastlín. Samotné výsledky domestikácie rastlín sú formované selekciou, ktorá bola riadená človekom, postupmi v pestovaní a prostredím, v ktorom sú pestované (Smýkal a kol., 2018). Rovnako sú zmeny pozorovateľné aj u semien, ktoré sa menili v priebehu domestikácie. Prevažne sú preferované genotypy, ktoré majú napríklad chutnejšie semená (Smýkal a kol., 2018).

Našlo sa mnoho rozdielov medzi semenami planých (dormantných) a kultúrnych (nedormantných) hrachov. Jeden z prvých zistených rozdielov bol rozdiel v hrúbke osemenia, pričom plané genotypy majú podstatne hrubšie osemenie, než kultúrne (Hradilová a kol., 2019). Predpoklad bol, že hrúbka osemenia ovplyvňuje mieru dormancie u semien hrachu, nakoľko dormancia, ktorá sa prejavuje nepriepustným obalom semien je typická pre plané genotypy bôbových rastlín, a táto vlastnosť sa u kultúrnych genotypov stratila v priebehu domestikácie (Janská a kol., 2019).

Rozdielom je taktiež odlišnosť v chemickom zložení osemenia, kedy sa dokázalo, že v planom genotype sú v osemeni vo vysokých koncentráciách zastúpené diméry a triméry gallokatechínu, kvercetínu, myricetínových ramnozidov, hydroxylovaných mastných kyselín a ďalších látok, zatiaľ čo v kultúrnych genotypoch sú zastúpené v oveľa nižšej miere (*Hradilová a kol., 2019*).

Ďalším rozdielom je množstvo pigmentov, ktoré sa nachádzajú v osemeni (proanthocynidíny, PA). V osemeni dormantných semien sa ukázalo, že obsah PA je priemerne 2,18 mg/g a u nedormantných semien je 1,77 mg/g. U bôbovitéch rastlín sa ukázala asociácia medzi pigmentáciou a priepustnosťou vody v semenách, kedy nepigmentované semená prepúšťajú vodu rýchlejšie ako pigmentované semená, a preto dochádza k ich rýchlejšiemu a jednoduchšiemu klíčeniu (*Hradilová a kol., 2019*). V tejto práci budeme pracovať ako s kultúrными tak aj s planými genotypmi.

2.4. Polyfenoloxidáza

Polyfenoloxidáza (EC1.10.3.1, PPO) je často nazývaná aj ako tyrozináza, polyfenoláza, creoláza alebo katecholoxidáza. Patrí medzi medené oxidoreduktázy (*Balarynová a kol., 2022*), ktoré pozostávajú z N-terminálneho chloroplastového a tylakoidného tranzitného peptidu, dvoch atómov medi, po ktorých nasleduje neusporiadaný linker a C- koniec tieniacej domény (*Marusek a kol., 2006; van Gelder a kol., 1997*). Tieniaca doména obsahuje reziduálnu náhradu, ktorá tvorí miesto oxidácie neprístupné pre pre-PPO (*Li a Steffens, 2002*). Rastlinná PPO je aktivovaná pri nízkom pH ~3,5 alebo detergentmi proteolytického štiepenia (*Leufken a kol., 2015*).

Rastlinné polyfenoloxidázy tvoria homo- alebo oligodiméry (*Dirks-Hofmeister a kol., 2012; Molitor a kol., 2016*). Spoločnou črtou PPO v organizmoch je, že je potrebná katalytická aktivácia enzýmu. V rastlinách sa PPO nachádzajú ako latentné pre-PPO.

Ukázalo sa, že s domestikáciou niektorých plodín sa spája strata funkcie génov pre PPO. Čo sa u kultúrneho genotypu hrachu prejavilo zníženou aktivitou PPO, ktorá bola spôsobená deléciou v géne *PPO* a vedie k vzniku predčasného stop kodónu. Zatiaľ, čo väčšina kultúrnych genotypov nemá

funkčnú PPO, u planých genotypov sa ukázala jej vysoká aktivita (*Balarynová a kol., 2022*). Keďže k vyvolaniu aktivity PPO často dochádza pri poranení alebo napadnutí patogénmi sa všeobecne verí, že PPO zohráva dôležitú úlohu v obrane rastlín (*Sullivan a kol., 2015*).

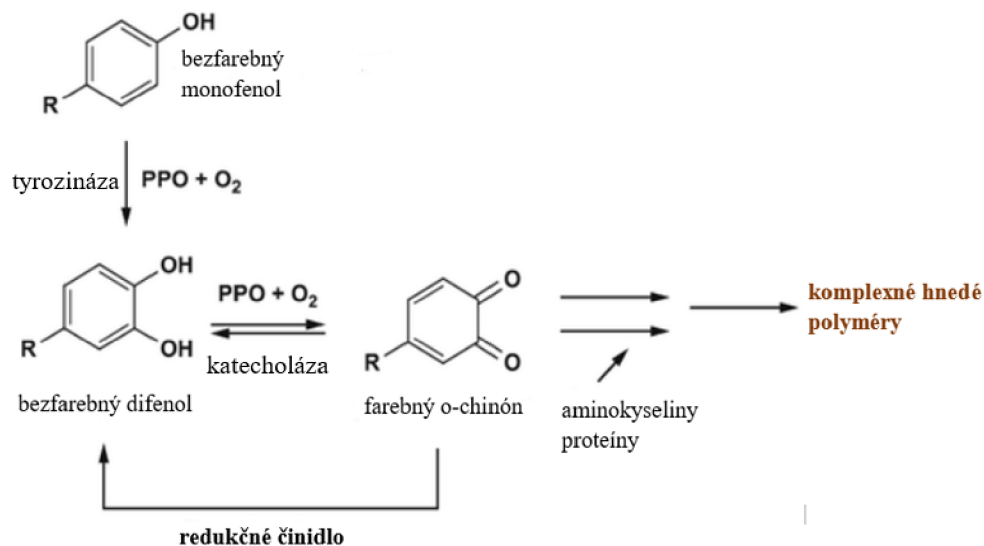
2.4.1. Reakčný mechanizmus

Enzymatická aktivita PPO závisí od dvojjadrového medeneho páru, ktorý je koordinovaný 6 histidínovými zvyškami. PPO je najmenej účinná oxidáza medzi fenoloxidázami, pričom najlepšie fungujú v rozmedzí pH 5 – 6,5 a pri teplotách 20 – 40 °C (*Queiroz a kol., 2008*). PPO u hrachu sú schopné oxidovať orto-difenoly alebo katecholy na orto-chinóny (*Solomon a kol., 1996*). Chinóny, ktoré sú vytvárané PPO sú veľmi vysoko reaktívne a sú schopné zosieťovať alebo alkylovať proteíny, čo vedie k bežne pozorovaným hnedým pigmentom (Obrázok 3), ktoré sa prejavujú pri mechanickom poškodení rastlinných pletív (*Constabel a Barbehenn, 2008*). Vďaka týmto mechanizmom oddeľujeme PPO na tyrozinázy, ktoré katalyzujú obe vyššie spomenuté reakcie a katecholoxidázy, ktoré majú iba difenolázovú aktivitu (*Solomon a kol., 1996*).

Rastlinné PPO majú ako trieda širokú substrátovú špecifickosť (*Sullivan a kol., 2015*) a ich kľúčovými substrátmi sú fenoly, medzi ktoré patria napríklad katechol, 4-metylkatechín, katechín, epikatechín, DOPA (3,4- dihydroxyfenylalanín) a kyselina kávová (*Mayer a kol., 2006*).

2.4.2. PPO a hnednutie plodov

Rastlinné PPO sú známe tým, že hrajú úlohu v hnednutí v dôsledku tvorby melanínových pigmentov (Obrázok 3), čo negatívne ovplyvňuje komerčnú hodnotu mnohých poľnohospodárskych výrobkov. Kvalitatívne a kvantitatívne zloženie PPO fenolických substrátov je medzi druhmi rôzne a má za následok rôznu intenzitu hnednutia. Enzymatické hnednutie závisí hlavne na pôsobení tyrozináz a lakáz, ktoré vznikajú napríklad v hrozne a plesniach (*Solomon a kol., 1996; Taranto a kol., 2017; Tran a kol., 2012*).



Obrázok 3: Enzymatické hnednutie plodov spôsobené účinkami PPO (Obrázok prevzatý a upravený z práce Jukanti a kol., 2017).

2.4.3. Genomické a genetické aspekty PPO

Dostupné genomické informácie pre rastliny naznačujú, že rodina génov *PPO* má rozdielne medzidruhové štruktúry a rôzne veľkosti, čo je spôsobené líniovo špecifickými expanziami a v dôsledku straty génov (Tran a kol., 2012). Avšak napríklad v prípade rastliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. neboli nájdené žiadne predpokladané gény pre PPO. V rôznych homológoch *PPO* môže dôjsť k asociácii s odlišnými regulačnými vzormi a profilmi expície. (Thipyapong a kol., 2004).

Sója (*Glycine max*) je druh s veľkou rodinou génov pre PPO, ktoré by mohli byť vytvorené duplikáciou tandemového génu, tento predpoklad vychádza z toho, že sa gény pre PPO nachádzajú na chromozóme v tesnej blízkosti a aj z toho, že sa v sóji takmer tri štvrtiny génov nachádzajú ako duplikáty alebo viaceré kópie, pričom niektoré sú usporiadané v tandeme (Schmutz a kol., 2010). V sóji sa nachádza veľké množstvo rôznorodých fenolov a flavanoidov, z čoho vychádza aj vysoká aktivita PPO (Constabel a kol., 2010; Yu O a kol., 2003).

Rodinu génov *PPO* u rajčiaka tvorí 7 členov, a to *PPO A, A', B, C, D, E* a *F* zoskupených na 8 chromozóme. Ako u väčšiny génov pre PPO ani gény u rajčiaka neobsahujú intróny. Gény sú vysoko konzervované a vykazujú

priestorovo a časovo rozdielnu expresiu vo vegetatívnych a reprodukčných orgánoch rastliny (*Thipyapong a kol., 2004*).

2.4.4. Zvýšená a znížená expresia PPO

Rastliny sú počas svojho života vystavené veľkému množstvu biotických a abiotických stresových faktorov, ktoré môžu zasahovať individuálne alebo súčasne, a preto musí byť obrana rastlín dostatočne flexibilná (*Thipyapong a kol., 2007*). Toto si môžeme dokázať na štúdií transgénnych rajčiakov: antisense PPO rastliny s potlačenou aktivitou PPO a sense PPO s nadmerne exprimujúcou aktivitou PPO a obe nesú kópie T-DNA (*Hunt a kol., 1993*). Pričom pri bežnom pestovaní a raste v skleníku nezohrávala zmena expresie žiadnu rolu v raste rastlín. Pri napadnutí transgénnych rajčiakov baktériou *Pseudomonas syringae* so zníženou expresiou PPO patogénmi došlo k zvýšenej citlivosti na patogény a to spôsobilo až desať násobne vyšší počet lézií (*Thipyapong a kol., 2004*). Pri päť až desať násobne zvýšenej expresii PPO u rajčiaka došlo až k pätnásť násobne nižšiemu počtu lézií a až sto násobne nižšiemu rastu *P. syringae* (*Thipyapong a kol., 2007*). Za použitia toho istého patogénu na kultivary fazule došlo pri rastlinách so zvýšenou rezistenciou k rovnakému výsledku (*Campos a kol., 2004*). Prehnaná odpoveď v mieste infekcie sa často prejavuje ako nekrotické lézie, ktoré vyplývajú zo smrti hostiteľskej bunky (*Dempsey a kol., 1999; Staskawicz a kol., 1995*).

Experiment ďalej dokázal, že peroxid vodíka, ktorý je generovaný PPO môže pôsobiť ako induktor biosyntézy fytoalexínu a produkcie kyseliny salicylovej a etylénu, rovnako, ako spúšťača bunkovej smrti, ktorá vedie k obmedzeniu lézií v okolí zdravých pletív a tak môžu vyvolať imunitu rastlín (*Thipyapong a kol., 2007*). PPO sa podieľa na rezistencii voči patogénom vďaka vysoko reaktívnym chinónom, ktoré prechádzajú sekundárnymi reakciami, a to: 1,4 adíciou o-chinónov k bunkovým nukleofilom a obrátenou disproporcionáciou chinónov na semichinónové radikály.

2.4.5. Fenolové zlúčeniny

Fenolové zlúčeniny tvoria veľkú heterogénnu skupinu primárnych a sekundárnych metabolitov, v ktorých sa nachádza aspoň jeden hydroxylovaný aromatický kruh. Fenolové zlúčeniny, medzi ktoré patria melaníny a flavonoidy

sú antioxidanty, ktoré chránia rastliny pred UV žiarením a reaktívnymi formami kyslíka (Carletti a kol., 2014; Cheynier a kol., 2013). V kutikule, osemeni a cievnom systéme sa hromadia ligníny a iné štruktúrne fenolické polyméry, ktoré zabezpečujú ochranu voči vysychaniu a bylinožravcami. Väčšina známych jednoduchých fenolových metabolitov a aromatických kyselín v rastlinách pochádza zo šikimátovej dráhy. Aminokyseliny fenylalanín a tyrozín sú východiskovým bodom rastlinnej fenylpropanoidovej dráhy, ktorej polymerizačné reakcie sú katalyzované peroxidázami (PRX), lakázami (LAC) a polyfenoloxidázami (PPO). Najviac zastúpeným fenolovým polymérom je lignín v cievnatých rastlinách (Barros a kol., 2015). Lignín pochádza z oxidatívnej polymerizácie fenylpropanoidov, ktoré sú produkované bunkovými stenami a tvoria spolu komplexné štruktúry špecifické pre rôzne typy buniek (Terashima a Fukushima, 1988). Okrem vývojových procesov, niektoré polyfenoly vznikajú špecificky, ako odpoveď na poranenie (Decker a Terwilliger, 2000).

3 Materiál a metódy

3.1. Biologický materiál

Pre transkriptomickú analýzu génov boli vybrané 4 genotypy hrachu (*Pisum sp.*): jeden planý genotyp (*Pisum elatius M. Bieb.*) JI261 a tri kultúrne genotypy (*Pisum sativum L.*) Cameor, PI181958 a ATC7025. Odroda Cameoru bola získaná z génovej banky INRA, Francúzsko, genotyp JI261 bol získaný z John Innes Pisum Collection, Norwich, Anglicko, sýrsky genotyp PI181958 bol získaný z génovej banky United States Department of Agriculture, Pullman, USA a čínsky genotyp ATC7025 bol získaný z Australian Grains Genebank, Horsham, Austrália.

Rastliny boli pestované v päťlitrových nádobách v substrátovom mixe rašelina-piesok v pomere 90:10 (Florcom Profi, BB Com Ltd. CZ) s dennými a nočnými teplotami pohybujúcimi sa v rozmedzí 35 – 20°C/ 18- 12°C v skleníkoch katedry Botaniky Univerzity Palackého v Olomouci v období január až máj 2021. Fotoperiódou bola predĺžená na 14 hodín s použitím dodatočného osvetlenia pomocou sodíkových výbojok (Hortilux Schreder,

Holland, s výbojkou Sylvania GroLux 600 W). Náhodne vybrané kvety boli označené štítkom s dátumom v deň keď sa otvorili. Vzniknuté lusky so semenami boli zbierané v rozmedzí 13, 17, 23 a 28 dní od otvorenia kvetov (days after pollination, DAP) (Tabuľka č. 1). Semená boli na ľade vyňaté z luskov, vypreparované osemenia a embryá boli okamžite prenesené dotekutého dusíku a uložené do mrazáku (-80°C).

Pre rezy na kryomikrotóme boli suché semená všetkých 4 genotypov (Cameor, JI261, PI181958 a ATC7025) ponechané imbibovať v tme po dobu 24 hodín vo vode pri laboratórnej teplote aby dostatočne napučali a bolo možné ich narezať a farbiť.

Tabuľka č. 1: Vývojové štádia študovaných genotypov

	Študované genotypy			
	Kultúrny		Planý	
	Cameor	PI181958	ATC7025	JI261
Štádium (DAP)	13	13	13	13
	17	17	17	17
	23	23	23	23
	28	28	28	29

3.2. Použité chemikálie

4-metylkatechol (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Agaróza (Bioline, UK)

Baseline-ZERO DNAase (Epicentre Bio, USA)

Baseline-ZERO DNAase Reaction Buffer (Epicentre Bio, USA)

Cryo-Gel (Leica Biosystems, USA)

Etanol (VWR International, USA)

EZ-Vision® Bluelight DNA dye (VWR International, USA)

Fenol saturovaný 0,1 M citrátovým pufrom pH 4,3 (Sigma-Aldrich, Nemecko)

GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

Glycerol (Tamda, Česká republika)

Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Chloroform (Lach-Ner, Česká republika)

Izoamylalkohol (Lach-Ner, Česká republika)

Izopropylalkohol (VWR International, USA)

Kyselina boritá (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Kyselina octová (Tamda, Česká republika)

Primery Psat1g206360, Psat5g212520 a Psat6g025120 (Generi Biotech, s.r.o., Hradec Králové, ČR)

PureLink® Plant RNA Reagent Invitrogen (Invitrogen, USA)

RiboSafe RNase Inhibitor (RRI) (Bioline, UK)

RNase-free voda

SensiFAST cDNA Synthesis KitSensiMix™ SYBR® Low-ROX Kit (Bioline, UK)

SensiMix™ SYBR® Low-ROX Kit (Bioline, UK)

Tris base (Sigma-Aldrich, Nemecko)

3.3. Použité roztoky

Fenol: chloroform: izoamylalkohol (v pomere 25:24:1)

Chloroform: IAA (v pomere 24:1)

TBE pufor (40 mM Tris base, 45mM kyselina boritá, 1 mM EDTA)

Toluidine Blue O (0,01% vo vode, Sigma-Aldrich, Nemecko)

3.4. Použité prístroje a zariadenia

Centrifúga (Centrifuge 5415 R, Eppendorf; MPS 1000 Mini PCR Plate Spinner, Labnet)

Centrifúga (VWR ® PCR Plate Spinners, Avantor)

Flowbox (PV – 102, TelSTAR)

Kryomikrotóm (Leica CM1950, Leica Biosystems)

Laboratórne váhy (572-35)

Mikroskop (CX31 Upright Microscope, Evident)

Nanodrop (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™)

Termocykler (CFX96™ Real-Time Detection System, Bio-Rad)

Termocykler (The Mastercycler ® nexus X2, Eppendorf)

Termocykler (ThermoCell MixingBlock MB-102, Bioer)

Trepačka (MS2 Minishaker, IKA)

Termoblock (Termo Block MB – 102, BIOER.)

Vortex (Wizard X Vortex Mixer F202A0125 w/ Sensor, Velp Scientifica)

3.5. Pomôcky

Buničitá vata

Hrebene pre elektroforézu

Kadičky

Špachtľa

Pinzeta

Špičky

96jamková doska na PCR

Mažiar a tĺčik

2 ml skúmavky (Eppendorf)

Skalpel

Kovové terčiky ku kryomikrotómu

3.6. Metódy

3.6.1. Izolácia RNA

Pre izoláciu RNA boli použité osemenia hrachu štyroch vývojových štádií (DAP), štyroch rôznych genotypov (Cameor, JI261, PI181958, ATC7025). Osemenie bolo vypreparované na ľade a následne uložené do tekutého dusíku, kde bola prevedená homogenizácia materiálu pomocou mažiara a tĺčiku.

Izolácia RNA bola prevedená pomocou PureLink® Plant RNA Reagent kitu. Využíva sa pre izoláciu RNA z $\leq 0,1$ g rastlinného pletiva.

Postup podľa protokolu výrobcu:

1. Do skrutkovacej skúmavky pridať 0,5 ml PureLink® Plant RNA Reagentu k približne 0,1 g zmrazeného rastlinného materiálu a vortexovať, kým sa vzorka úplne rozsuspenduje.
2. Skúmavku horizontálne položiť a inkubovať pri izbovej teplote 5 minút.
3. Centrifugovať pri 12000 rpm 2 minúty pri izbovej teplote. Preniesť supernatant do čistej mikroskúmavky.
4. K supernatantu pridať 100 μ l 5M NaCl a 300 μ l chloroformu a vzorku vortexovať.
5. Centrifugovať pri 12000 rpm 10 minút pri teplote 4°C. Odobrať hornú vodnú fázu a prepipetovať ju do novej mikroskúmavky.
6. K supernatantu pridať 500 μ l izopropylalkoholu, vortexovať a nechať stáť 10 minút pri izbovej teplote.

7. Centrifugovať pri 12000 rpm pri teplote 4°C 10 minút. Odpipetovať supernatant a k peletu pridať 1000 µl 75% etanolu.
8. Centrifugovať 1 minútu pri izbovej teplote a supernatant vyliat' do odpadnej kadičky.
9. Pridať k peletu 40 µl RNase-free voda. Prepipetovávať, kým sa pelet úplne resuspenduje. Pokiaľ vznikli bublinky je nutné vzorku centrifugovať 1 minútu pri izbovej teplote. Vzorky následne uložiť do -80°C.

3.6.2. Odstránenie zbytkov genomickej DNA

Pred prepisom RNA na cDNA je nutné prečistenie vzorky aby boli odstránené všetky zbytky DNA, ktoré by mohli brániť správnej PCR amplifikácií tým, že dochádza k vzniku nešpecifických produktov.

Postup:

1. Vzorky rozmraziť na ľade, na ktorom je nutné pracovať po celú dobu.
2. K 40 µl vzorky RNA pridať 6 µl 10x Baseline-Zero DNase Reaction pufru, 3 µl Baseline-Zero DNase a 1 µl ribonukleázového inhibítora a vzorku inkubovať pri 37°C 20 minút.
3. Vzorky doplniť vodou na 200 µl.
4. K vzorke pridať 200 µl fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1) a vortexovať. Vzorku ponechať na ľade aby sa sformovali 2 fáze a následne zvortexovať. Okamžite centrifugovať pri 13000 rpm 10 minút pri 4°C.
5. Supernatant preniesť do novej mikroskúmavky, pridať 300 µl chloroformu:izoamylalkoholu (24:1) poriadne zvortexovať a následne centrifugovať 5 minút pri 13000 rpm pri teplote 4°C.
6. Prepipetovať supernatant do novej mikroskúmavky a pridať 20 µl kyseliny octovej a 550 µl 96% etanolu a nechať inkubovať v -80 °C cez noc.
7. Po inkubácii nechať centrifugovať 30 minút pri 13000 rpm a pri teplote 4°C.

8. Vyliať supernatant a pridať 500 μ l 70% etanolu a následne centrifugovať 5 minút pri 13000 rpm pri teplote 4°C.
9. Supernatant opatrne zliať a pridať 96% ethanol a centrifugovať 5 minút pri 13000 rpm pri teplote 4°C.
10. Vyliať supernatant a nechať 1,5 minúty centrifugovať pre odstránenie tekutiny a po odstránení pridať a resuspendovať v 30 μ l vody.

3.6.3. Syntéza cDNA

Prepis RNA do cDNA je uskutočnený na základe reverznej transkripcie.

Postup:

1. Vzorky rozmraziť na ľade, na ktorom je nutné pracovať po celú dobu.
2. Vortexovať vzorky a následne centrifugovať pri izbovej teplote po dobu 1 minúty.
3. Pripraviť reakčnú zmes napipetovaním 4 μ l 5x TransAmp pufru a 1 μ l RTázy.
4. Doplniť na objem 20 μ l pomocou vody a vzoriek RNA prepočtom na základe koncentrácií RNA na 1 μ g v jednotlivých vzorkách.
5. Premiešať pomocou jemného prepipetovania.
6. Inkubovať reakčnú zmes na nasledujúcom programe v termocyklery (Tabuľka č. 2):

Tabuľka č. 2: Teplotný priebeh syntézy cDNA

Fáza	Teplota [°C]	Čas [min]
Naväzovanie primerov	25	10
Reverzná transkripcia	42	15
Voliteľný program (pre vysoko štruktúrované RNA)	48	15
Inaktivácia	85	5
Udržiavanie	4	Ako dlho je potrebné

3.6.4. Kvantitatívna PCR (qRT-PCR)

Metóda qRT-PCR slúži ku kvantifikácii mRNA, pričom vo svojom jadre využíva postupy a princípy konvenčnej PCR za využitia špecifických primerov s rôznymi hodnotami účinnosti (Tabuľka č. 3) a fluorescenčného farbiva (SYBR Green I). Pri PCR v reálnom čase sa akumulácia produktu meria počas priebehu reakcie v reálnom čase s kvantifikáciou produktu po každom cykle. Detekcia je umožnená pridaním fluorescenčnej reportérovej molekuly, ktorá umožňuje pozorovanie zvýšenej fluorescence v jamkách so zvyšujúcim obsahom DNA produktu, pričom namerané hodnoty fluorescence sú úmerné celkovému množstvu amplikónu. Výsledky qRT-PCR môžu byť kvalitatívne, kedy určujú, či je sekvencia v skúmanej vzorke prítomná alebo kvantitatívne, kedy určujú počet kópií.

Tabuľka č. 3: Účinnosti a sekvencie primerov použitých pri qRT-PCR

Gén	Účinnosť primerov	Forward primer	Reverse primer
Psat1g206360	0,95	GGTGATTGGACC AGGGAATACTGA GTT	TGACAAGTCCTTT CCCACATCT TGGTA
Psat6g025120	1,04	TGGGATTCTC TTCACCTTGCG	GAAATCAACG GCCCATCTTC
Psat5g212520	0,90	AGGTGTTTGG TGCTGAGTAC	TTCCCCTTGAG TTGCTTCC

Ct hodnoty získané z termocyklieru sú spracovávané pomocou počítačového programu Microsoft Excel, pričom je využívaná metóda $\Delta\Delta C_t$, ktorá prezentuje zmeny na úrovni génovej expície, podľa vzorca:

$$pomer = \frac{(E_{\text{študovaný gén}})^{\Delta CP_{\text{študovaný gén}}(\text{kontrola-vzorka})}}{(E_{\text{referenčný gén}})^{\Delta CP_{\text{referenčný gén}}(\text{kontrola-vzorka})}}$$

Hodnota Ct vyjadruje prahový cyklus, takže počet cyklov, v ktorom sa podarilo dosiahnuť fixnú hodnotu produktu (Pfaffl a kol., 2001). Pri metóde $\Delta\Delta C_t$ najskôr pre každý gén odčítavame hodnotu Ct kontroly (v našom prípade vzorky Cameor v prvom vývojovom štádiu, Cameor 13) od Ct vzorky, čím získame ΔC_t , a následne k sebe vzťahujeme hodnotu účinnosti umocnenú na ΔC_t študovaného génu k tej istej hodnote pre kontrolný gén. Tým je získaná hodnota relatívnej expície študovaného génu. Výsledné hodnoty sú potom v grafoch uvádzané ako priemery dvoch meraní a strednej chyby priemeru (SE).

Postup:

1. Do prázdnej mikroskúmavky napipetovať jednotlivé zložky reakčnej zmesi, pričom na 1 vzorku použijeme: 4,5 µl DEPC vody, 1,5 µl forward primeru, 1,5 µl reverse primeru a 12,5 µl farbiva SYBR Green.
2. cDNA je 10x nariadená DEPC vodou.
3. Následne zmes napipetovať do 96jamkovej PCR dosky tak, že napipetujeme 20 µl reakčnej zmesi a 4 µl nariadenej cDNA.
4. Dosku vložiť do termocyklieru a nastaviť program pre správny priebeh qRT-PCR (Tabuľka č. 4):

Tabuľka č. 4: Teplotný program pre qRT-PCR

Fáza	Teplota [°C]	Počet cyklov	Čas [s]
Aktivácia polymerázy	95	1	600
Denaturácia	95		15
Naväzovanie primerov	55-60	40	15
Predlžovanie	72		15

3.6.5. Rezy na kryomikrotome a farbenie preparátov

Kryomikrotóm je prístroj používaný na rezanie zmrazených vzoriek, nakoľko jeho znížená teplota zvyšuje tvrdosť vzoriek, a tým je možné dosiahnuť menšiu hrúbku rezov a zlepšiť vizualizáciu štruktúry daného preparátu.

Postup:

1. Nastaviť na kryomikrotome teplotu -20 °C a hrúbku rezov 20 µm.
2. Následne naniest' na terčičky gél (Leica) a vložiť do prístroja zamrznúť.

3. Kým terčičky chladnú, skalpelom narezat' časti osemenia a hila na malé štvorce a vypreparovať ich pomocou pinzety z pripravených genotypov hrachu.
4. Na schladené terčičky naniest' kvapku gélu a pomocou pinzety vložiť pripravené preparáty do gélu a opäť vložiť na zmrazenie do kryomikrotómu.
5. Po schladení narezat' preparáty, dať na podložné sklíčko a rozdeliť preparáty do 3 skupín pre následné farbenie.
6. Na jednu skupinu sklíčok, ktoré obsahujú osemenie a hilum prikvapnúť Pasteurovou pipetou toluidínovú modrú, nechať pôsobiť približne 30 sekúnd a opatrne opláchnuť destilovanou vodou tak, aby sme si neodmyli preparáty.
7. Druhú skupinu sklíčok tvoria sklíčka pre stanovenie aktivity polyfenoloxidázy, ku ktorým je nutné pridať MOPS (kyselina 3-(N-morfolino)-propánsulfonová) s 1-metylkatecholom a nechať pôsobiť hodinu. Po hodinovej inkubácii opláchnuť destilovanou vodou.
8. Treťou skupinou sú kontrolné sklíčka pre stanovenie aktivity polyfenoloxidázy. Na sklíčka kvapnúť čistý MOPS (kyselina 3-(N-morfolino)-propánsulfonová) bez 1-metylkatecholu a nechať inkubovať hodinu. Po inkubácii omyť sklíčka destilovanou vodou.
9. Na takto pripravené omyté sklíčka prikvapnúť 20% glycerol a prikryť krycím sklíčkom a pozorovať pod mikroskopom.

4 Výsledky

Experimentálna časť bakalárskej práce bola zameraná na stanovenie expresie génu kódujúceho polyfenoloxidázu (PPO) v priebehu vývoja osemenia planého a kultúrneho hrachu a histochemickú lokalizáciu aktivity tohoto enzýmu v osemení imbibovaných semien.

4.1. Expresia génu kódujúceho polyfenoloxidázu v priebehu vývoja osemenia

Pre potreby našej práce pri transkriptomickej analýze boli v štyroch rôznych štádiách vývoja osemenia (13, 17, 23 a 28 DAP, Tabuľka č. 1) navzorkované vybrané genotypy hrachu. Dva kontrastné genotypy, a to planý

genotyp JI261 (s funkčným génom kódujúcim polyfenoloxidázu) a kultúrny genotyp Cameor (nefunkčný gén kódujúci polyfenoloxidázu) (Balarynová a kol., 2022). Ďalšie dva genotypy sú kultúrne genotypy pochádzajúce zo Sýrie (PI181958) a Číny (ATC7025) líšiace sa pigmentáciou osemenia, hila aj funkčnosťou génu kódujúceho polyfenoloxidázu (Tabuľka č. 5)

Tabuľka 5: Popis vlastností použitých genotypov

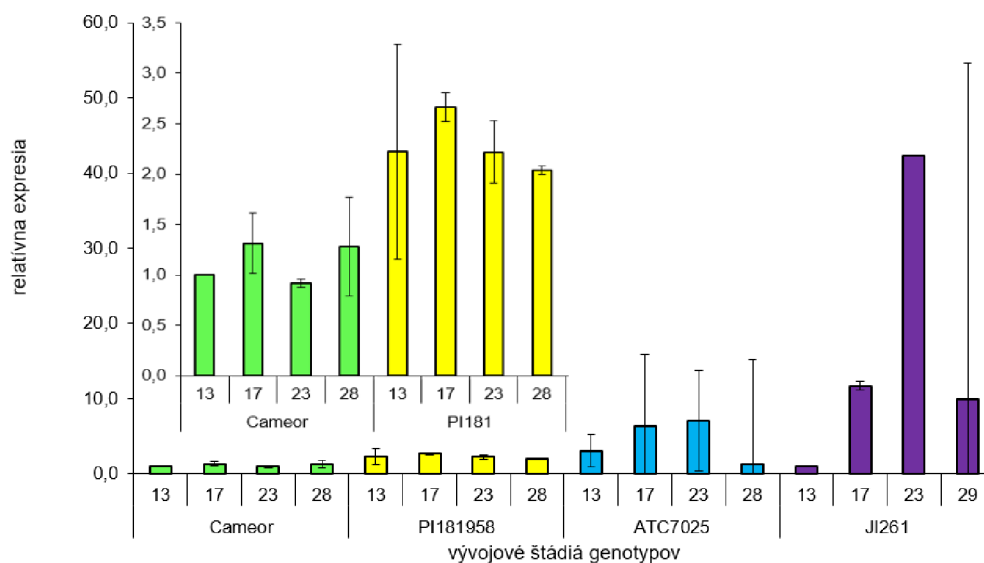
	Cameor	PI181958	ATC7025	JI261
Kultúrny/ planý	Kult.	Kult.	Kult.	Planý
Pigmentácia osemenia	Nepigment.	Nepigment.	Pigment.	Pigment.
Pigmentácia hila	Nepigment.	Nepigment.	Pigment.	Pigment.
Dormancia	Nedormant.	Nedormant.	Nedormant.	Dormant.
Funkčnosť PPO	Nefunkčná	Nefunkčná	Funkčná	Funkčná

Po PCR analýze a vyhodnotení dát pomocou metódy $\Delta\Delta C_t$ sme určili zmeny na úrovni génovej expície nasledovne (Graf 1):

U kultúrneho, nedormantného nepigmentovaného genotypu Cameor nebola detekovaná takmer žiadna expresia PPO. Expresia PPO bola vo všetkých štyroch študovaných štádiách rovnaká. Podobne aj u genotypu PI181958, ktorý je rovnako ako Cameor kultúrny a nepigmentovaný bola jeho expresia PPO nízka a porovnateľná vo všetkých vývojových štádiách.

Vyššie hodnoty expície génu *PPO* boli namerané u kultúrneho genotypu ATC7025, ktorý má pigmentované osemenie a hilum a navyše funkčný gén kódujúci PPO. Namerané hodnoty relatívnej expície boli najvyššie v druhom a treťom štádiu.

U planého genotypu JI261 bola expresia génu *PPO* najvyššie, čím sa potvrdila funkčnosť PPO u tohto genotypu. Najvyššia relatívna expresia bola v treťom vývojovom štádiu.



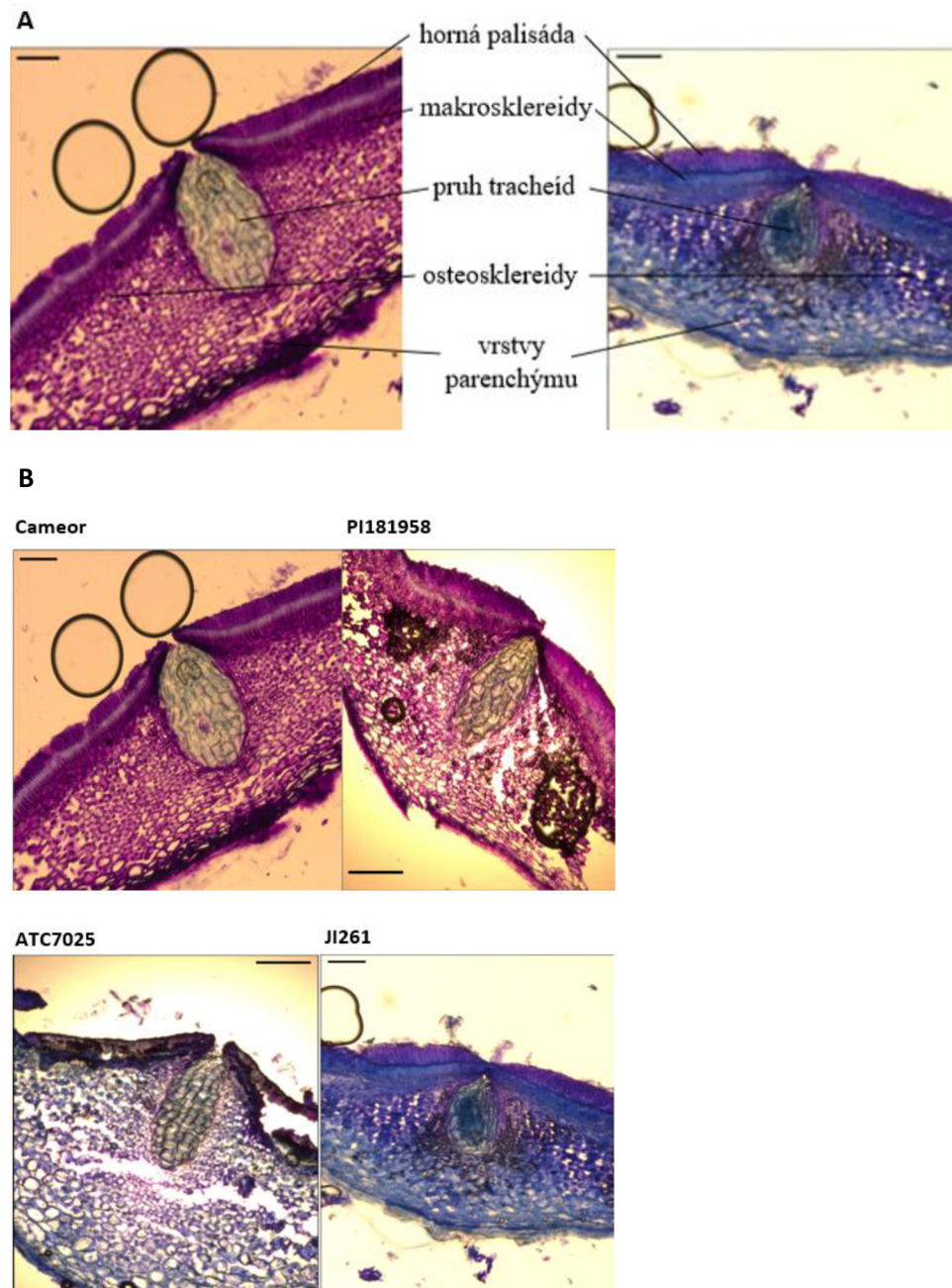
Graf 1: Relatívna expresia génu *PPO* troch kultúrnych (Cameor, PI181958, ATC7025) a jedného planého (JI261) genotypu hrachu v štyroch štádiách vývoja osemenia. Dáta ukazujú výsledky dvoch experimentov.

4.2 Histochemická lokalizácia aktivity polyfenoloxidázy v osemení

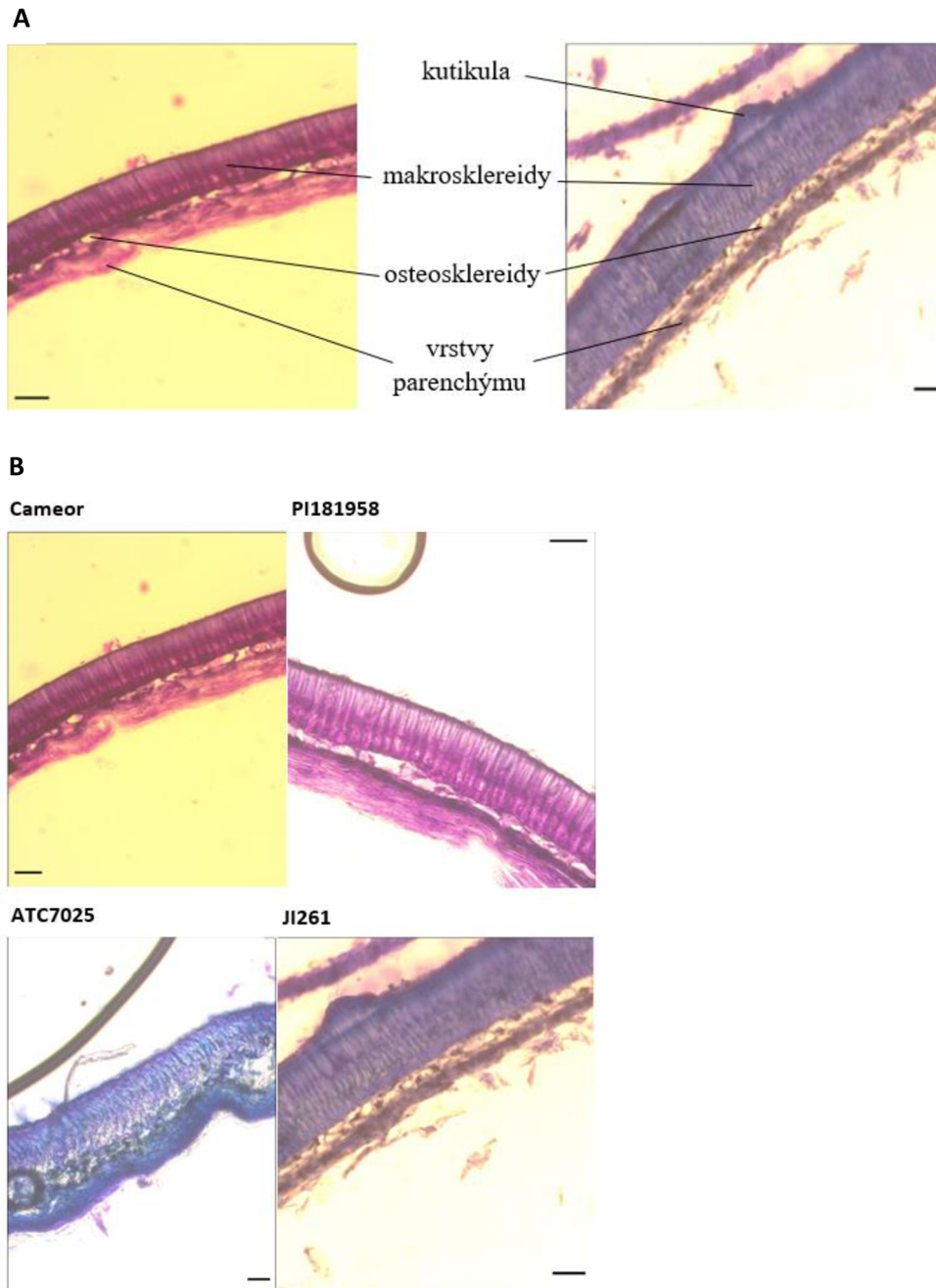
Po rezoch osemení a hilom jednotlivých genotypov a farbením toluidínovou modrou sme pozorovali štruktúru osemenia a hila u kultúrnych a planých genotypov. (Obrázok 5 a 6). Pozorovali sme, že povrch hila nie je pokrytý kutikulou, a taktiež pozorujeme aj pruh tracheíd, ktorý sa nachádza len v oblasti hila. Ako uvádza práca Hradilová a kol. (2017), najtenšie osemenie bolo viditeľné u kultúrneho genotypu Cameoru, zatiaľ čo osemenia dormantných genotypov sú hrubšie, pretože sa od nedormantných genotypov líšia dĺžkou palisádových buniek.

Farbenie toluidínovou modrou ukázalo, že u genotypu Cameor a PI181958 došlo k zafarbeniu pletiva na ružovo, zatiaľ čo osemenia genotypov ATC7025 a JI261 boli sfarbené na modro. Rozdiel medzi zafarbením genotypov by sa dal interpretovať rozdielnym obsahom pektínu v bunkových stenách, nakoľko toluidínová modrá zabezpečuje nielen dobrý kontrast štruktúr ale taktiež poskytuje informácie o vlastnostiach farbeného materiálu. Bunkové steny

s nízkym obsahom pektínu sa pomocou toluidínovej modrej farbia na modro, zatiaľ čo bunkové steny s vysokým obsahom pektínov sa zafarbia na ružovo alebo fialovo (Soukup a kol., 2019).



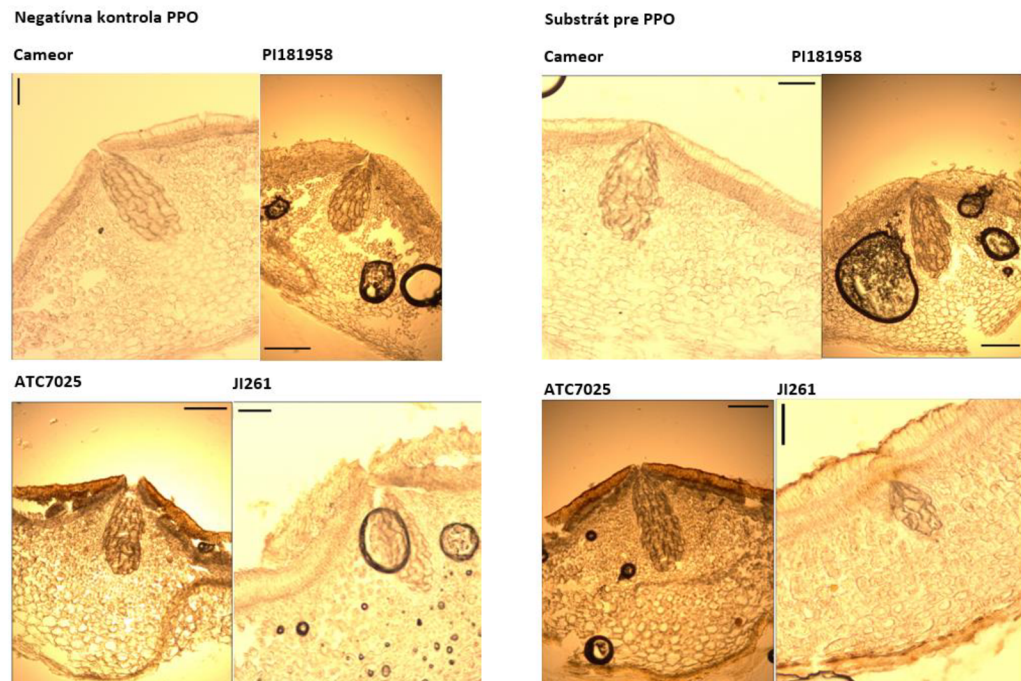
Obrázok 5: Štruktúra osemenia v oblasti hila po farbení toluidínovou modrou u kutúrneho genotypu Cameoru (vľavo) a planého genotypu JI261 (vpravo) (A) Priechny rez hilom u jednotlivých genotypov hrachu zľava: Cameor, PI181958, ATC7025 a JI261. (B) (mierka je v 50 μ m).



Obrázok 6: Štruktúra osemenia po farbení toluidínovou modrou u kultúrneho genotypu Cameoru (vľavo) a planého genotypu JI261 (vpravo) (A) Priečny rez osemením u jednotlivých genotypov hrachu, zľava: Cameor, PI181958, ATC7025 a JI261. (B) (mierka je v 50 μm)

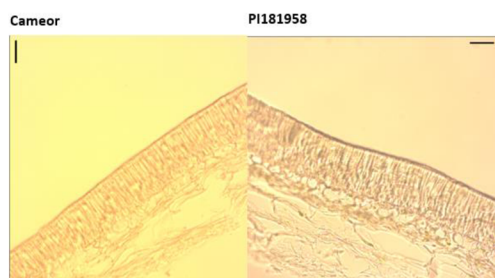
Taktiež sme sa zamerali aj na lokalizáciu aktivity PPO pomocou farbenia roztokom 4-metylkatecholu. (Obrázok 7 a 8) Zafarbenie v oblasti hila bolo pozorované u genotypu JI261, pričom došlo k zafarbeniu vrstvy parenchýmu a hornej palisády (Obrázok 7). U ostatných genotypov (Cameor, PI181958

a ATC7025) nebolo pozorované zafarbenie žiadnej časti osemenia v oblasti hila. V osemeni sme pozorovali zafarbenie štruktúr u genotypov ATC7025 a JI261, pričom došlo k zafarbeniu oblasti osteosklereíd. U genotypov PI181958 a Cameoru nedošlo k zafarbeniu žiadnej časti osemenia (Obrázok 8).

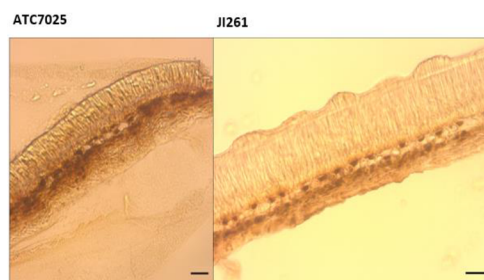
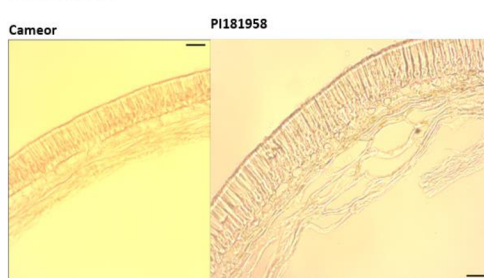


Obrázok 7: Lokalizácia aktivity PPO po farbení pomocou 4-metylkatecholu na pričných rezoch osemení v oblasti hila u jednotlivých genotypov hrachu, zľava: Cameor, PI181958, ATC7025 a JI261. Aktivita PPO bola viditeľná len u genotypu JI261, u ostatných genotypov nie je viditeľné sfarbenie štruktúr hila na hnedo ani po inkubácií so substrátom pre PPO. (mierka je v 50 μm)

Negatívna kontrola PPO



Substrát pre PPO



Obrázok 8: Lokalizácia aktivity PPO po farbení pomocou 4-metylkatecholu na pričných rezoch osemnia u jednotlivých genotypov kultúrneho a planého hrachu, zľava: Cameor, PI181958, ATC7025 a JI261. Aktivita PPO bola viditeľná u genotypov ATC7025 a JI261, u genotypov Cameor a PI181958 nie je viditeľné hnedé sfarbenie štruktúr osemnia. (mierka je v 50 μm)

5 Diskusia

Naša práca bola zameraná na určenie relatívnej expresie PPO v jednotlivých genotypoch hrachu, a to troch kultúrnych Cameor (nepigmentovaný, nedormantný), PI181958 (nepigmentovaný, nedormantný), ATC7025 (pigmentovaný, nedormantný) a jedného planého genotypu JI261 (pigmentovaný, dormantný). PPO je enzým patriaci do skupiny medených oxidoreduktáz obsahujúci vo svojej štruktúre dva meďnaté ionty a pre jej aktiváciu je nutná katalytická aktivácia enzýmu (*Balarynová a kol., 2022*). Reakčný mechanizmus PPO je založený na oxidácii o-difenolov na o-chinóny (*Solomon a kol., 1996*), a ako substráty využíva napríklad katechol, 4-metylkatechín, katechín, epikatechín, DOPA (3,4-dihydroxyfenylalanín) a kyselinu kávovú (*Mayer a kol., 2006*).

V tejto bakalárskej práci bola expresia PPO skúmaná na cDNA získanej prepisom z RNA. Porovnaním koncentrácií bolo zistené, že koncentrácie RNA izolované z planých genotypov boli nižšie, než koncentrácie získané z kultúrnych genotypov, čo bolo pravdepodobne spôsobené tým, že plané genotypy majú v osemeni vyššie zastúpenie fenolických látok a iných sekundárnych metabolitov. Tieto látky spôsobujú obťažnejšiu izoláciu, a taktiež nutnosť viacnásobného prečisťovania, čím môže dôjsť k väčším stratám RNA.

Osemenie je hlavná ochranná vrstva, ktorej úlohou je mimo obrany aj obmedzenie príjmu vody (*Záblatzká a kol., 2021*), taktiež funguje ako kanál pre prenos informácií medzi embryom a prostredím. V osemeni sa nachádzajú enzýmy, ktoré v ňom pretrvávajú desaťročia a využívajú sekundárne metabolity uložené v osemeni ako substráty (*Raviv a kol., 2017*). Medzi tieto enzýmy patrí aj nami skúmaná PPO.

Ukázalo sa, že nasávanie vody a dormancia môže v niektorých prípadoch súvisieť s pigmentáciou osemenia a aktivitou PPO u mnohých strukovín, akými sú napríklad fazuľa obyčajná (*Caldas a Blair, 2009*), či sója (*Tuteja a kol., 2004*). U hrachu bol vzťah medzi pigmentáciou semena, dormanciou a aktivitou PPO skúmaný už Marbachom a Mayerom (1974), kde vznikol predpoklad, že dormantné, plané genotypy majú vyššiu aktivitu PPO ako kultúrne nedormantné

genotypy. Avšak zo súčasných poznatkov vyplýva, že u hrachu sa vylučuje súvislosť medzi dormanciou a prítomnosťou funkčného génu pre *PPO*, ktorú pôvodne navrhovali štúdie Marbach a Mayer, (1974) a Werker a kol. (1979), nakoľko sa aj u kultúrnych, nedormantných genotypov vyskytujú funkčné gény pre *PPO* (Balarynová a kol., 2022).

Pigmentáciu osemenia a hila, zabezpečuje prítomnosť *PPO*, ktorá oxiduje látky prítomné v osemeni a spôsobuje hnedé sfarbenie (Jukanti a kol., 2017). Avšak vzťah medzi pigmentáciou a dormanciou je veľmi zložitý, nakoľko niektoré pigmentované genotypy, ako napríklad v našom prípade genotyp ATC7025, nevykazujú dormanciu. Porovnaním aktivity *PPO* v hile s aktivitou *PPO* v osemeni ukazuje, že aktivita *PPO* je výrazne vyššia v oblasti hila než v osemeni bez hila. V prípade genotypov, ktoré majú nepigmentované hilum aj osemenie (Cameor, PI181958) nebol zistený rozdiel v aktivite *PPO*, zatiaľ čo pri genotypoch s pigmentovaným hilom bola pigmentácia hila vždy spojená so zvýšenou aktivitou *PPO*. Bolo teda preukázané, že pigmentácia hila súvisí s aktivitou *PPO*, a to tak, že pokiaľ je hilum pigmentované je aj *PPO* v osemeni aktívna (Balarynová a kol., 2022).

Z našich výsledkov vyplýva, že u kultúrneho, nedormantného nepigmentovaného genotypu Cameor nebola detekovaná takmer žiadna expresia *PPO*. Podobné hodnoty boli namerané aj u genotypu PI181958, ktorý je rovnako ako Cameor kultúrny a nepigmentovaný. Vyššie hodnoty dokazujúce aktivitu *PPO* boli namerané u kultúrneho genotypu ATC7025, ktorý má pigmentované osemenie a hilum. Namerané hodnoty relatívnej expresie boli najvyššie v druhom a treťom štádiu. U planého genotypu JI261 boli hodnoty preukázateľne najvyššie. Najvyššia relatívna expresia bola nameraná v treťom vývojovom štádiu. Naše výsledky potvrdzuje aj práca Balarynová a kol. (2022), kde pri skúmaní planých genotypov hrachu (JI64 a JI1794) bola potvrdená vyššia expresia *PPO* než u kultúrnych genotypov (Cameor, JI92), ktoré mali výrazne nižšie hladiny expresie *PPO*.

Aktivitu *PPO* u genotypov ATC7025 a JI261 sa nám podarilo potvrdiť aj na základe farbenia substrátom pre *PPO*, kedy v prípade týchto 2 genotypov došlo po hodinovej inkubácii k zhnednutiu preparátu, zatiaľ čo v prípade

Cameoru a PI181958 nedošlo k žiadnej farebnej zmene. Pri farbení pomocou toluidínovej modrej a následnom pozorovaní rozdielov medzi jednotlivými genotypmi sme zistili, že u kultúrnych genotypov Cameor a PI181958 došlo k zafarbeniu na ružovo, zatiaľ čo u kultúrneho genotypu ATC7025 a planého genotypu JI261 došlo k zafarbeniu na modro. Sfarbenie osemenia súvisí s obsahom pektínov v bunkových stenách (*Soukup a kol., 2019*), pričom sme zistili, že nepigmentované genotypy Cameor a PI181958 obsahujú vysoké množstvo pektínov, a preto došlo k zafarbeniu bunkovej steny na ružovo, zatiaľ čo pigmentované genotypy JI261 a ATC7025 obsahujú nižšie množstvo pektínov a preto došlo k zafarbeniu na modro. Na túto skutočnosť poukázala aj iná práca (*Hradilová a kol., 2017*), ktorá pri farbení nepigmentovaného genotypu Cameor toluidínovou modrou taktiež odhalila vysokú hladinu polyaniónových pektínov a na druhej strane pri farbení pigmentovaného genotypu pozorovala nižší obsah polyaniónových pektínov.

6 Záver

Analýza génovej expresie vzoriek osemení štyroch rôznych genotypov hrachu: Cameor (kultúrny, nepigmentovaný), PI1818958 (kultúrny, nepigmentovaný), ATC7025 (kultúrny, pigmentovaný) a JI261 (planý, pigmentovaný) s rozdielnou funkčnosťou génu *PPO*, kde v genotypoch Cameor a PI1818958 je gén pre *PPO* nefunkčný, zatiaľ čo u genotypov ATC7025 a JI261 je gén pre *PPO* funkčný, ukázala, že najvyššia expresia *PPO* bola nameraná u genotypu JI261 a následne u ATC7025. U PI1818958 boli detekované veľmi nízke hodnoty expresie *PPO* a najnižšie hodnoty sme namerali u Cameoru.

Podarilo sa potvrdiť súvislosť medzi pigmentáciou hila a aktivitou *PPO* v osemení a to tak, že pigmentované semená vykazovali vyššiu expresiu génu *PPO* a rovnako bola detekovaná aktivita tohoto enzýmu na rezoch ich osemením. U nepigmentovaných semien bola expresia génu *PPO* nízka a pri detekcii aktivity *PPO* na rezoch nebol zaznamenaný žiadny signál. Práca prispela k podrobnejšiemu štúdiu aktivity *PPO* u ďalších genotypov hrachu, a taktiež pre porovnanie kultúrnych a planých genotypov, čo by mohlo neskôr viesť k zlepšeniu výnosnosti a ochrany poľnohospodárskych plodín v súvislosti s ochrannou funkciou *PPO*.

Použitá literatura

Aide, T.M., and Londoño, E.C. (1989): The Effects of Rapid Leaf Expansion on the Growth and Survivorship of a Lepidopteran Herbivore. *Oikos*, 55(1), 66–70. <https://doi.org/10.2307/3565873>

Balarynová, J., Klčová, B., Sekaninová, J., Koblíková, L., Cechová, M. Z., Krejčí, P., Leonova, T., Gorbach, D., Ihling, C., Smržová, L., Trněný, O., Frolov, A., Bednář, P., and Smýkal, P. (2022): The loss of polyphenol oxidase function is associated with hilum pigmentation and has been selected during pea domestication. *The New phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.18256>

Barros, J., Serk, H., Granlund, I., and Pesquet, E. (2015): The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of botany*, 115(7), 1053–1074. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv046>

Baskin, C.C., and Baskin, J.M. (2014): Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. *Academic Press*, San Diego, 150-162.

Baskin, J.M., and Baskin, C.C. (2000): Evolutionary considerations of claims for physical dormancy-break by microbial action and abrasion by soil particles. *Seed Science Research* 10, 409–413.

Baskin, J.M., and Baskin, C.C. (2004): A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1), 1-16. doi:10.1079/SSR2003150

Baskin, J.M., Baskin, C.C., and Li, X. (2000): Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, 15, 139-152. <https://doi.org/10.1046/j.1442-1984.2000.00034.x>

Bastianelli, D., Grosjean, F., Peyronnet, C., Duparque, M., and Régnier, J. (1998): Feeding value of pea (*Pisum sativum*, L.) 1. Chemical composition of different categories of pea. *Animal Science*, 67(3), 609-619. doi:10.1017/S1357729800033051

Caldas, G.V., and Blair, M.W. (2009): Inheritance of seed condensed tannins and their relationship with seed-coat color and pattern genes in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische*

und angewandte Genetik, 119(1), 131–142. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1023-4>

Campos, A.D., Ferreira, A.G., Hampe, M.M.V., Antunes, I.F., Brancão, N., Silveira, E.P., Osório, V.A., and Augustin, E. (2004): Peroxidase and polyphenol oxidase activity in bean anthracnose resistance. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39, 637-643.

Carletti, G., Nervo, G., and Cattivelli, L. (2014): Flavonoids and Melanins: a common strategy across two kingdoms. *International journal of biological sciences*, 10(10), 1159–1170. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9672>

Coleman, W.K. (1987): Dormancy release in potato tubers: a review. *American Journal of Potato Research*, 64(2), 57-68. doi: 10.1007/BF02853438

Constabel, C.P., and Barbehenn, R. (2008): Defensive Roles of Polyphenol Oxidase in Plants. 10.1007/978-1-4020-8182-8_12.

Constabel, C.P. and Lindroth, R. (2010): The Impact of Genomics on Advances in Herbivore Defense and Secondary Metabolism in Populus. 10.1007/978-1-4419-1541-2_13.

Dalling, J.W., Davis, A.S., Schutte, B.J. and Arnold, E.A. (2011): Seed Survival in Soil: Interacting Effects of Predation, Dormancy and the Soil Microbial Community. *Journal of Ecology*, 99, 89-95. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01739.x>

Decker, H., and Terwilliger, N. (2000): Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of experimental biology*. 203, 1777-82. 10.1242/jeb.203.12.1777.

Dempsey, D.A., Shah, J. and Klessig, D.F. (1999): Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18, 547-575. <http://dx.doi.org/10.1080/07352689991309397>

Dirks-Hofmeister, M.E., Inlow, J.K., and Moerschbacher, B.M. (2012): Site-directed mutagenesis of a tetrameric dandelion polyphenol oxidase (PPO-6) reveals the site of subunit interaction. *Plant molecular biology*, 80(2), 203–217. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9943-9>

- Dixon, R.A., Xie, D.Y., and Sharma, S.B. (2005). Proanthocyanidins-a final frontier in flavonoid research?. *The New phytologist*, 165(1), 9–28. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01217.x>
- Esau, K. (1965): Plant Anatomy. 2nd Ed. New York: John Wiley. *Print*
- Finch-Savage, W.E., and Leubner-Metzger, G. (2006): Seed dormancy and the control of germination. *The New phytologist*, 171(3), 501–523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- Fuerst, F., Kontokosta, C., and McAllister, P. (2014): Determinants of Green Building Adoption. *Environment and Planning B: Planning and Design*, 41(3), 551–570. <https://doi.org/10.1068/b120017p>
- Fuerst, E.P., James, M.S., Pollard, A.T., and Okubara, P.A. (2018): Defense Enzyme Responses in Dormant Wild Oat and Wheat Caryopses Challenged with a Seed Decay Pathogen. *Frontiers in plant science*, 8, 2259. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02259>
- Güneş, F. (2013): Seed characteristics and testa textures of *Pratensis*, *Orobon*, *Lathyrus*, *Orobastrum* and *Cicercula* sections from *Lathyrus* (Fabaceae) in Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 299. 10.1007/s00606-013-0849-z.
- Hamid, R., Khan, M.A., Ahmad, M., Ahmad, M.M., Abdin, M.Z., Musarrat, J., and Javed, S. (2013): Chitinases: An update. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 5(1), 21–29. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.106559>
- Hamly, D.H. (1932): Softening of the Seeds of *Melilotus alba*. *Botanical Gazette*, 93(4), 345–375. <http://www.jstor.org/stable/2471446>
- Hamly, D.H. (1935): The Light Line in *Melilotus alba*. *Botanical Gazette*, 96(4), 755–757. <http://www.jstor.org/stable/2471467>
- Haughn, G., and Chaudhury, A. (2005): Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trends in plant science*, 10(10), 472–477. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.08.005>

Hradilová, I. (2019): Dormance semen jako klíčový domestikační znak bobovitých rostlin [online]. Olomouc, [cit. 2022-08-02] Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce doc. Ing. Petr Smýkal, Ph. D.

Hradilová, I., Trněný, O., Válková, M., Cechová, M., Janská, A., Prokešová, L., Aamir, K., Krezdorn, N., Rotter, B., Winter, P., Varshney, R. K., Soukup, A., Bednář, P., Hanáček, P., & Smýkal, P. (2017): A Combined Comparative Transcriptomic, Metabolomic, and Anatomical Analyses of Two Key Domestication Traits: Pod Dehiscence and Seed Dormancy in Pea (*Pisum* sp.). *Frontiers in plant science*, 8, 542. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00542>

Hunt, M.D., Eannetta, N.T., Yu, H., Newman, S.M., and Steffens, J.C. (1993): cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant molecular biology*, 21(1), 59–68. <https://doi.org/10.1007/BF00039618>

Hückelhoven R. (2007): Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual review of phytopathology*, 45, 101–127. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094325>

Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., and Martens, S. (2013): Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant physiology and biochemistry*, 72, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>

Janská, A., Pecková, E., Sczepaniak, B., Smýkal, P., and Soukup, A. (2019): The role of the testa during the establishment of physical dormancy in the pea seed. *Annals of botany*, 123(5), 815–829. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy213>

Jouili, H., Bouazizi, H., and El Ferjani, E. (2011): Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 2075-2082.

Jukanti, A.K. (2017): Polyphenol Oxidase(s): Importance in Food Industry. [10.1007/978-981-10-5747-2_6](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5747-2_6).

Lackey, J.A. (1981): Systematic Significance of the Epihilum in Phaseoleae (Fabaceae, Faboideae). *Botanical Gazette*, 142(1), 160–164. <http://www.jstor.org/stable/2474798>

Lafon-Placette, C., and Köhler, C. (2014): Embryo and endosperm, partners in seed development. *Current opinion in plant biology*, 17, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.11.008>

Lanning, F.C., and Eleuterius, L.N. (1992): Silica and Ash in Seeds of Cultivated Grains and Native Plants. *Annals of Botany*, 69(2), 151–160. <http://www.jstor.org/stable/42770455>

Le, B.H., Wagmaister, J.A., Kawashima, T., Bui, A.Q., Harada, J.J., and Goldberg, R.B. (2007): Using genomics to study legume seed development. *Plant physiology*, 144(2), 562–574. <https://doi.org/10.1104/pp.107.100362>

Leufken, C.M., Moerschbacher, B.M., and Dirks-Hofmeister, M.E. (2015): Dandelion PPO-1/PPO-2 domain-swaps: the C-terminal domain modulates the pH optimum and the linker affects SDS-mediated activation and stability. *Biochimica et biophysica acta*, 1854(2), 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.11.007>

Li, L., and Steffens, J.C. (2002): Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215(2), 239–247. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0750-4>

Marbach, I., and Mayer, A.M. (1974): Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. *Plant physiology*, 54(6), 817–820. <https://doi.org/10.1104/pp.54.6.817>

Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., and Inlow, J.K. (2006): Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of inorganic biochemistry*, 100(1), 108–123. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.10.008>

Mayer, A.M. (2006): Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318–2331. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.006>

Mayer, A.M. (2004): Resistance to herbivores and fungal pathogens: Variations on a common theme? A review comparing the effect of secondary metabolites,

induced and constitutive, on herbivores and fungal pathogens. *Israel Journal of Plant Sciences*, 52, 279-292.

Moïse, J.A., Han, S., Gudynaitė-Savitch, L., Johnson, D.A., and Miki, B.L.A. (2005): Seed Coats: Structure, Development, Composition, and Biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 41(5), 620–644.

Molitor, Ch., Mauracher, S., and Rompel, A. (2016): Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Doi:[10.1073/pnas.1523575113](https://doi.org/10.1073/pnas.1523575113)

Peris, C.I., Rademacher, E.H., and Weijers, D. (2010): Green beginnings – pattern formation in the early plant embryo. *Current topics in developmental biology*, 91, 1–27. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91001-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91001-6)

Pfaffl, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Radchuk, V., and Borisjuk, L. (2014): Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Frontiers in plant science*, 5, 510. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00510>

Ranathunge, K., Shao, S., Qutob, D., Gijzen, M., Peterson, C.A., and Bernards, M.A. (2010): Properties of the soybean seed coat cuticle change during development. *Planta*, 231(5), 1171–1188. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1118-9>

Raviv, B., Aghajanyan, L., Granot, G., Makover, V., Frenkel, O., Gutterman, Y., and Grafi, G. (2017): The dead seed coat functions as a long-term storage for active hydrolytic enzymes. *PloS one*, 12(7), e0181102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181102>

Requena, L., and Bornemann, S. (1999): Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme. *The Biochemical journal*, 343, 185–190.

Roszak, P., and Köhler, C. (2011): Polycomb group proteins are required to couple seed coat initiation to fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(51), 20826–20831. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117111108>

Queiroz, Ch., Mendes Lopes, M.L., Fialho, E., and Valente-Mesquita, V.L. (2008): Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*, 24:4, 361-375. DOI: [10.1080/87559120802089332](https://doi.org/10.1080/87559120802089332)

Schafer, D.E., and Chilcote, D.O. (1969): Factors Influencing Persistence and Depletion in Buried Seed Populations. I. A Model for Analysis of Parameters of Buried Seed Persistence and Depletion.1. *Crop Science*, 9, 417-419.

Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., ... Jackson, S.A. (2010): Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, 463(7278), 178–183. <https://doi.org/10.1038/nature08670>

Smýkal, P., Nelson, M., Berger, J., and Wettberg, E. (2018): The Impact of Genetic Changes during Crop Domestication. *Agronomy*. 8(7), 119. <https://doi.org/10.3390/agronomy8070119>

Smýkal, P., Vernoud, V., Blair, M.W., Soukup, A., and 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00351>

Solomon, E.I., Sundaram, U.M., and Machonkin, T.E. (1996): Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical reviews*, 96(7), 2563–2606. <https://doi.org/10.1021/cr950046o>

Soukup, A. (2019): Selected Simple Methods of Plant Cell Wall Histochemistry and Staining for Light Microscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1992, 27–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9469-4_2

Srivastava, L.M. (2002): Plant Growth and Development: Special Features of Plant Development. *Academic Press*, 1, 3-22, <https://doi.org/10.1016/B978-012660570-9/50141-6>.

Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., and Jones, J.D. (1995): Molecular genetics of plant disease resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5211), 661–667. <https://doi.org/10.1126/science.7732374>

Sullivan, M. L. (2015): Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Frontiers in plant science*, 5, 783. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00783>

Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M.M., Pavan, S., and Montemurro, C. (2017): Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *International journal of molecular sciences*, 18(2), 377. <https://doi.org/10.3390/ijms18020377>

Terasjima, N., Fukushima, K. (1988): Heterogeneity in formation of lignin – XI: An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin. *Wood Sci. Technol*, 22, 259-270. <https://doi.org/10.1007/BF00386021>

Terras, F.R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S., Van Leuven, F., and Vanderleyden, J. (1995): Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant cell*, 7(5), 573–588. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.5.573>

Tewksbury, J.J., Reagan, K.M., Machnicki, N.J., Carlo, T.A., Haak, D.C., Peñaloza, A.L., and Levey, D.J. (2008): Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), 11808–11811. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802691105>

Thipyapong, P., Melkonian, J., Wolfe, D.W., Steffens, J.C. (2004): Suppression of Polyphenol Oxidases Increases Stress Tolerance in Tomato. *Plant Science*, 167(4), 693-703. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.008>

Thipyapong, P., Stout, M.J., and Attajarusit, J. (2007): Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1569–1595. <https://doi.org/10.3390/12081569>

- Tiansawat, P., Davis, A.S., Berhow, M.A., Zalamea, P.C., and Dalling, J.W. (2014): Investment in seed physical defence is associated with species' light requirement for regeneration and seed persistence: evidence from *Macaranga* species in Borneo. *PLoS one*, 9(6), e99691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099691>
- Tran, L.T., Taylor, J.S., and Constabel, C.P. (2012): The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC genomics*, 13, 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-395>
- Tuteja, J.H., Clough, S.J., Chan, W.C., and Vodkin, L.O. (2004): Tissue-specific gene silencing mediated by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max*. *The Plant cell*, 16(4), 819–835. <https://doi.org/10.1105/tpc.021352>
- Van Dongen, J.T., Ammerlaan, A.M., Wouterlood, M., Van Aelst, A.C., and Borstlap, A.C. (2003): Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. *Annals of botany*, 91(6), 729–737. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg066>
- van Gelder, C.W., Flurkey, W.H., and Wichers, H.J. (1997): Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45(7), 1309–1323. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)00186-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00186-6)
- Vinter, V., and Macháčková, P. (2013): Přehled morfologie cévnatých rostlin: studijní opona e-learningových vzdělávacích modulů projektu Botaska. Univerzita Palackého v Olomouci. 1.vyd., 198, 66-70.
- Werker, E., Marbach, I., and Mayer, A.M. (1979): Relation Between the Anatomy of the Testa, Water Permeability and the Presence of Phenolics in the Genus *Pisum*. *Annals of Botany*, 43(6), 765–771.
- Whitehead, S.R., Jeffrey, C.S., Leonard, M.D., Dodson, C.D., Dyer, L.A., and Bowers, M.D. (2013): Patterns of secondary metabolite allocation to fruits and seeds in *Piper reticulatum*. *Journal of chemical ecology*, 39(11-12), 1373–1384. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0362-4>

- Yoshida, K., Kaothien, P., Matsui, T., Kawaoka, A., and Shinmyo, A. (2003): Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(6), 665–670. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1157-7>
- Yu, O., Shi, J., Hession, A.O., Maxwell, C.A., McGonigle, B., and Odell, J.T. (2003): Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. *Phytochemistry*, 63(7), 753–763. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(03\)00345-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00345-5)
- Zablatzká, L., Balarynová, J., Klčová, B., Kopecký, P., & Smýkal, P. (2021): Anatomy and Histochemistry of Seed Coat Development of Wild (*Pisum sativum* subsp. *elatius* (M. Bieb.) Asch. et Graebn. and Domesticated Pea (*Pisum sativum* subsp. *sativum* L.). *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4602. <https://doi.org/10.3390/ijms22094602>
- Zangerl, A.R., and Bazzaz, F.A. (1992): Theory and pattern in plant defense allocation. In: Fritz, R. and Simms, E.L., Eds., *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens*, University of Chicago Press, Chicago, 363-392.
- Zhao, J., Pang, Y., and Dixon, R. A. (2010): The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant physiology*, 153(2), 437–443. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155432>