

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2017

Bc. Barbora Mičová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Analýza myb5 a par mutantních linií tolíce
(Medicago truncatula Gaertn.) v souvislosti
s vývojem osemení a dormancí semen

Diplomová práce

Bc. Barbora Mičová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

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

Čestné prohlášení

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

V Olomouci dne 28. dubna 2017

.....

Bc. Barbora Mičová

Souhrn

Diplomová práce se zabývá molekulární analýzou *myb5* a *par* mutantních linií tolice *Medicago truncatula* Gaertn.

V úvodu literární rešerše je charakterizována modelová rostlina bobovitých *Medicago truncatula*, přičemž stěžejní důraz je kladen na popis stavby a vývoje semene. Zmíněna je funkce osemení a jeho význam v souvislosti s dormancí a germinací semen. Dále je popsána funkce proanthokyanidinů v rostlinách a jejich biosyntetická dráha, včetně možností její regulace na transkripční úrovni. V závěru teoretické části je zmíněn význam inzerční mutagenese pro studium funkce genů.

Experimentální část práce se věnuje zejména transkriptomické analýze vzorků semen *Medicago truncatula* metodou qRT-PCR, zaměřené na zjištění míry ovlivnění exprese genů souvisejících s biosyntetickou drahou proanthokyanidinů mutací v genech transkripčních faktorů MtPAR a MtMYB5. Doplnkově byla provedena také předběžná anatomická studie osemení a ve spolupráci s katedrou analytické chemie také analýza jeho složení s důrazem na rozpustné proanthokyanidiny.

Zjištěné poznatky přispěly k charakterizaci genů aktivních během vývoje osemení *Medicago truncatula*, pravděpodobně řízených MtMYB5 a MtPAR transkripčními faktory.

Summary

This diploma thesis is focused on the molecular analysis of *myb5* and *par* mutant lines of *Medicago truncatula* Gaertn.

The theoretical part at first characterizes the model legume *Medicago truncatula*, with the emphasis on seed structure and development. The seed-coat function is mentioned and its relation to seed dormancy and germination is explained. Subsequently, the importance of proanthocyanidins in plants is described, including their biosynthesis pathway and methods of its transcription regulation. At the end, the significance of insertion mutagenesis on the field of gene function study is underlined.

The main focus of the experimental section of the thesis is on qRT-PCR transcriptome analysis of selected *Medicago truncatula* seeds, with the intension of evaluating changes in the expression of genes related to proanthocyanidin biosynthesis pathway, modified by *Tnt1* mutation in MtPAR and MtMYB5 transcription factors. Additionally, preliminary anatomic study of the seed-coat was performed, and in co-operation with the Department of Analytical Chemistry the content of soluble proanthocyanidins in the seed-coat was noted.

The findings of this diploma thesis have made a contribution to the characterization of genes expressed during the development of *Medicago truncatula*'s seed-coat, presumably regulated by MtPAR and MtMYB5 transcription factors.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Doc. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za odborné vedení. Mé upřímné poděkování směřuje také k Mgr. Ivetě Hradilové, a to za neskutečnou ochotu, vstřícný přístup a za trpělivost, kterou nikdy neztratila ani při mých nekonečných otázkách a prosbách. Cení si také všech dalších, kdo mi na cestě k sepsání mé diplomové práce podali pomocnou ruku.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Cíle práce	10
3	Současný stav řešené problematiky.....	11
3.1	Modelová rostlina <i>Medicago truncatula</i>	11
3.1.1.	Fylogenetické zařazení.....	12
3.1.2.	Struktura genomu	12
3.1.3.	Stavba a složení semene	13
3.1.3.1.	Morfogeneze semene.....	14
3.1.3.2.	Osemení.....	15
3.1.3.3.	Dormance a klíčení semen	18
3.2	Flavonoidy - proanthokyanidiny	20
3.2.1.	Chemické vlastnosti proanthokyanidinů	20
3.2.2.	Funkce proanthokyanidinů v rostlinách	20
3.3	Biosyntetická dráha proanthokyanidinů.....	22
3.3.1.	Regulace biosyntézy proanthokyanidinů.....	24
3.3.1.1.	Transkripční faktor MtMYB5	25
3.3.1.2.	Transkripční faktor MtPAR.....	26
3.4	Mutantní linie <i>Medicago truncatula</i>	27
4	Materiál a metody.....	29
4.1	Rostlinný materiál	29
4.2	Analýza <i>Tnt1</i> inzerce.....	29
4.3	Izolace celkové RNA	30
4.4	Spektrofotometrická analýza RNA	31
4.5	Odstranění zbytkové genomové DNA	32
4.6	Přepis RNA do cDNA metodou dvoukrokové reverzní transkripce	32
4.7	Elektroforetická separace RNA, PCR produktů a produktů RT-qPCR.....	33
4.8	Testované geny biosyntetické dráhy proanthokyanidinů	34
4.9	PCR amplifikace	36

4.10	Kvantitativní RT-PCR.....	37
4.11	Hodnocení získaných dat	37
4.12	Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS).....	38
4.13	Barvení semen DMACA a rutheniovou červení	39
4.14	Seznam použitého vybavení a chemikálií	40
5	Výsledky	42
5.1	Genotypizace vzorků a příprava cDNA	42
5.2	Transkriptomická analýza	43
5.3	Metabolomická analýza.....	50
5.4	Histochemická analýza.....	52
6	Diskuze.....	54
7	Závěr	62
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	63
9	Literatura	66
10	Přílohy	79

1 ÚVOD

Bobovité rostliny (*Fabaceae*), mezi něž se řadí i rostliny rodu *Medicago*, jsou hospodářsky významnou skupinou pěstovaných rostlin využívaných jako luštěniny nebo pícniny. *Medicago truncatula* je modelová rostlina bobovitých se známým genomem a řadou dostupných mutančních linií. Neprošla domestikačním procesem, což se mimo jiné projevuje dormancí semen způsobenou nepropustností osemení. Omezený příjem vody semenem souvisí nejen s touto mechanickou bariérou, ale pravděpodobně také s flavonoidními látkami, jako jsou proanthokyanidiny, pro něž představuje osemení hlavní místo syntézy i akumulace. Studium biosyntetické dráhy těchto látek by tak mohlo objasnit, jak je fyzikálně daná dormance semen regulována.

Diplomová práce se zabývá analýzou exprese transkripčních faktorů MtMYB5 a MtPAR, o nichž se předpokládá, že hrají důležitou roli v regulaci syntézy proanthokyanidinů. Na základě porovnání projevů mutančních rostlin a rostlin s intaktními geny MtMYB5 a MtPAR bylo zjišťováno, do jaké míry tyto transkripční faktory vznik proanthokyanidinů regulují, a zda ovlivňují i syntézu anthokyanidinů.

Získané poznatky práce přispívají k bližší charakterizaci genů aktivních během vývoje osemení *Medicago truncatula*, pravděpodobně řízených MtMYB5 a MtPAR transkripčními faktory.

2 CÍLE PRÁCE

- Literární rešerše na téma stavby a vývoje semene *Medicago truncatula* a biosyntetické dráhy proanthokyanidinů v kontextu vývoje osemení.
- Molekulární analýza sledovaných homozygotních mutantních linií tolice, kvantitativní RT-PCR vybraných genů, statistické vyhodnocení zjištěných dat.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 MODELOVÁ ROSTLINA *MEDICAGO TRUNCATULA*

Luskoviny jsou ekonomicky významnou skupinou pěstovaných rostlin, nejen vzhledem k produkci semen obsahujících vysoký podíl bílkovin, ale také díky schopnosti symbioticky fixovat vzdušný dusík. Většina zástupců luskovin má však velký genom obsahující vysoký počet repetitivních sekvencí, vykazují složitou ploidii či problémy s pěstováním transgenních rostlin (Cook 1999).

S ohledem na výše napsané se v devadesátých letech minulého století objevila ve vědeckých kruzích snaha o nalezení modelové rostliny, která by umožnila jak bližší studium procesu fixace dusíku, tak zkoumání sekundárního metabolismu, rezistence k biotickým i abiotickým vlivům a v neposlední řadě také genomický, proteomický, transkriptomický či metabolomický výzkum (Cook 1999; Cheng *et al.* 2014; Young *et al.* 2009). V roce 1990 byla skupinou francouzských laboratoří jako modelový organismus bobovitých navrhuta tolice *Medicago truncatula* (tolice srpovitá či pobřežní; Barker *et al.* 1990), o dva roky později vybrali ke stejnému účelu Handberg *et al.* (1992) *Lotus japonicus* (štírovník růžkatý). Jak však podotkl ve svém komentáři Cook (1999), zájem o využití *M. truncatula* jako modelové rostliny se začal zvyšovat teprve několik let před milénium, a to vzhledem k nově dostupným genovým zdrojům z různých ekologických podmínek či geografických oblastí a rozšířeným možnostem genetické transformace a získání mutantních linií.

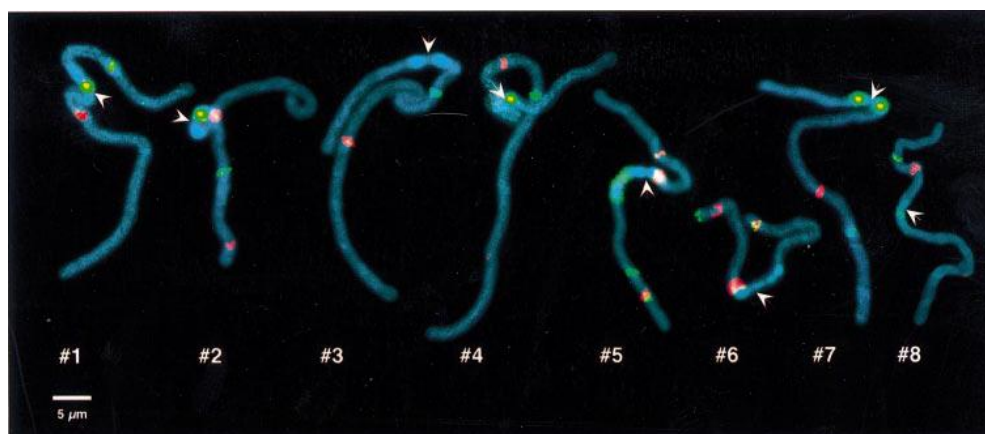
Rostlina *M. truncatula* (obr. P1 v příloze) je převážně samosprašná, důsledkem čehož je vysoce homozygotní. Má poměrně krátkou generační dobu 9-14 týdnů v závislosti na ekotypu, výhodná je existence řady ekotypů a relativně účinné možnosti transformace, vedoucí ke vzniku mutantních populací (Cook 1999; Hoffmann *et al.* 1997; Young *et al.* 2009). Navíc se jedná o planě rostoucí druh, disponující velkou genetickou variabilitou (Gallardo *et al.* 2006).

3.1.1. Fylogenetické zařazení

Rod *Medicago* (tolice) označuje dvouděložné rostliny patřící do čeledi *Fabaceae* (bobovité). Fylogenetický původ *Medicago* sahá do středomořské oblasti, odkud byla rostlina rozšířena na další území s podobným klimatem (jižní Afrika, Chile) a náhodně zavlečena také do Austrálie. V současnosti se pěstuje zejména za hospodářským účelem jako krmná plodina pro dobytek (Bonnin *et al.* 1996; Frame *c*2017; Ronfort *et al.* 2006). Rod je blízce příbuzný s řadou pěstovaných luskovin, jako je hrách (*Pisum*), čočka (*Lens*), cizrna (*Cicer*) nebo bob (*Vicia*), ačkoli od těchto se linie *Medicago* fylogeneticky oddělila během posledních 25 milionů let. Historicky původnější základ sdílí s rody štírovník (*Lotus*; předpokládané oddělení před 50 miliony let) a sója (*Glycine*; předpokládané oddělení před 60 miliony let). U všech výše jmenovaných plodin je s ohledem na jejich vzájemnou fylogenetickou příbuznost pozorována genomová syntenie a kolinearita a poznatky zjištěné u *M. truncatula* jsou přenositelné i na další luskoviny (Gallardo *et al.* 2006; Lavin *et al.* 2005; Young *et al.* Udvardi 2009; Young *et al.* 2011).

3.1.2. Struktura genomu

Diploidní genom *M. truncatula* je středně velký a odpovídá 500 - 550 Mbp. Karyotyp tvoří 8 párů menších chromozomů (obr. 1), korespondujících s osmi vazebnými skupinami. Chromozomy 2, 5, 6 a 8 jsou metacentrické (na chromozomu 5 je přítomna sekundární konstriktce), ostatní jsou submetacentrické (Kulikova *et al.* 2001). Chromosomy sestávají z poměrně zřetelně oddělených odlišných oblastí - heterochromatinu, tvořeného zejména repetitivními sekvencemi, a euchromatinu, bohatého na genové sekvence. Repetice přitom výrazně převažují, většina genů (počet odhadován na 29 000 a více) je kódována pouhými 20 - 40 % celkové genomové sekvence (Young *et al.* 2003). V závislosti na ekotypu je genom *M. truncatula* při průměrné hodnotě $1C = 0,55$ pg tvořen přibližně z 38,6 % GC bázemi (Blondon *et al.* 1994; Cook 1999).



Obrázek 1. Pachytenní chromozomy *Medicago truncatula* zobrazené metodou FISH. Na snímku zvýrazněny lokusy 5S rDNA (červená) a MtRR1 (zelená), šipky označují umístění centromer (převzato z Kulikova *et al.* 2001).

3.1.3. Stavba a složení semene

M. truncatula není kulturní plodinou a neprošla tak procesem domestikace jako jiné bobovité (Abbo *et al.* 2009). S tím souvisí relativně malá velikost semen (v období zralosti 2 - 3 mm), obtížnost jejich preparace z lusku, vysoká míra dormance nebo zvýšený obsah rafinóz, které jsou pro člověka nestravitelné (Gallardo *et al.* 2006). Stejně jako u dalších luskovin se semena *M. truncatula* vyvíjejí v luscích utvořených ze semeníku, které zastávají zejména ochrannou (Small *et al.* 1982) a metabolickou funkci (Setia *et al.* 1987; Thorne 1979). Lusk *M. truncatula* má spirální strukturu, přičemž již během 3 dnů po opylení (*days after pollination*, DAP) je utvořeno jeho finálních pět až šest závitů (z apikálního konce pravotočivá orientace) a od této doby již pouze zvětšuje svoji velikost na konečných 8 mm (Wang *et al.* 2005). Podobně jako se v rámci rodu *Medicago* různá přesná morfologie lusku (Small *et al.* 1987), je u jednotlivých druhů rozdílné také množství semen v jednom lusku, pohybující se od 1 do 22 kusů (Lesins *et al.* 1979).

Látkové složení semen *M. truncatula* je bližší olejnatým luštěninám, jako je sója, než fylogeneticky příbuznějšímu hrachu či bobu. Zralá semena obsahují v sušině 32-34 % proteinů, 8-10 % mastných kyselin a 6-10 % sacharidů (Djemel *et al.* 2005; Gallardo *et al.* 2006). Hlavními zásobními proteiny jsou globuliny, přičemž v sestupném pořadí dle obsahu převažují vicilin, legumin a konvicilin. V těchto je obsaženo 70 % dusíku v semeni, což je klíčové zejména v přechodném období vývoje, kdy ještě nedochází k symbiotické fixaci

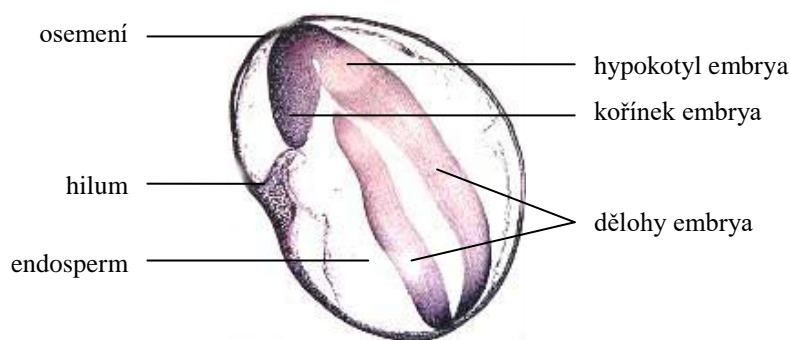
dusíku a embryo je závislé pouze na jeho vnitřních zdrojích. Z tuků převažují v semeni palmitát, linolenát a linoleát. Zásobními sacharidy jsou galaktomannany, škrob tvoří méně než 1 % sušiny. Stopovou složkou semene jsou minerální látky, které představují méně jak 3 % sušiny, avšak jsou esenciální pro buněčné procesy a podporují růst a raný vývoj kořenových a stonkových pletiv (Gallardo *et al.* 2006; Smýkal *et al.* 2014).

3.1.3.1. Morfogeneze semene

Po dvojím oplození dochází k vývoji embrya z vaječné buňky, triploidního živného endospermu z centrální buňky zárodečného vaku, perispermu z nucellu a osemení z vaječných obalů (obr. 2; Brink *et Cooper* 1940). Osemení a endosperm vznikají jako první, následuje vývoj embrya, maturace (dozrávání) osemení a maturace embrya (Moïse *et al.* 2005). Vývoj semene *M. truncatula* je velmi podobný vývoji semen dalších bobovitých rostlin, jediný výrazný rozdíl se týká přítomnosti endospermu, který se u zralých semen jiných bobovitých již nenachází (Djemel *et al.* 2005). Časový profil vývoje po oplození se různí v závislosti na umístění semene v lusku (bazální semena rostou rychleji). Dokončení embryogeneze nastává 10-12 DAP, semena jsou plně zralá kolem 30 DAP. Po 39 DAP již dochází k vysychání semen i osemení, vedoucí ke ztrátě hmotnosti, jež do tohoto bodu narůstala (Gallardo *et al.* 2006; Wang *et Grusak* 2005).

Tři dny po oplození (**3 DAP**) je embryo v proembryotické fázi a není identifikovatelné, **6 DAP** se již nachází v globulární fázi a je připojeno k zárodečnému vaku suspenzorem, který mizí v další fázi embryonálního vývoje. Ve stejné době dochází ke kompartmentalizaci endospermu v jednotlivé buňky a ten následně funguje jako zdroj nutrientů pro embryo. Ještě **10 DAP** má embryo velmi malé rozměry a je obklopeno tekutým endospermem, po **12 DAP** se však rapidně snižuje míra buněčného dělení a nastává zvětšování objemu buněk provázené akumulací zásobních látek. Nárůst velikosti je patrný jak u osemení, tak u embrya, které získává srdčitý tvar. V této době lze také zaznamenat největší nárůst sušiny. Osemení (viz dále) je již téměř plně vyvinuto, jeho cévní svazky jsou diferencovány ve floém a xylém, epidermis je tvořena uniformní palisádovou vrstvou makroklereid, které jsou radiálně prodlouženy a na vnější straně pokryty silnou vrstvou kutikuly. V souvislosti s růstem emrya je **15 DAP** patrný jen pozůstatek endospermu, jehož zásobní látky byly již téměř zcela využity. Vrstvy endospermu, které byly v kontaktu s embryem, degenerují, avšak ostatní zůstávají neporušeny a diferencují se v tzv. aleuronovou

vrstvu, plnicí zásobní funkci. Vyvíjející se kotyledony embrya přitom začínají zevnitř vyvíjet tlak na osemení, díky čemuž dochází ke zploštění vnitřních vrstev jeho buněk. S postupem času získávají semena schopnost klíčení, která kulminuje kolem **20 DAP**, a stávají se odolnější vůči vysychání. 20 DAP se semeno dostává do fáze zralosti, **28 DAP** je v embryu akumulována sušina a začíná vysychání semene, vedoucí k plné zralosti. V osemení dochází k degradaci chlorofylu a to tak ztrácí zelenou barvu. Ukončení vývoje semene nastává **30 DAP**, kdy je povrch dospělého embrya v přímém kontaktu s osemením. Ačkoli se osemení reabsorpcí některých buněk ztenčuje, jeho impregnace dosud ne zcela identifikovanými látkami stále dostačuje k velkému zabránění průniku vody, což přispívá k dormanci (Buitink *et al.* 2006; Djemel *et al.* 2005; Gallardo *et al.* 2006; Chai *et al.* 2016; Ma *et al.* 2004; Moïse *et al.* 2005; Smýkal *et al.* 2014; Van Dongen *et al.* 2003; Wang *et al.* Grusak 2005).



Obrázek 2. Průřez čtrnáctidenním semenem *Medicago truncatula*, zachycující vývoj endospermu v polovině embryotické fáze (upraveno dle Gallardo *et al.* 2006).

3.1.3.2. Osemení

Osemení obklopuje embryo, rozlišuje jednu generaci rostliny od druhé a zajišťuje přežití potomstva. Vyvíjí se z jednoho či z obou vaječných obalů a jelikož je tato diference kritickým bodem vývoje semene, je proces přísně regulován specifickými transkripčními faktory. Anatomická struktura osemení *M. truncatula* je velmi podobná jako u sóji a vyjma oblasti chalázy je po celém obvodu stejnorodá (Moïse *et al.* 2005; Smýkal *et al.* 2014). Hilum (pupek) je oválné či kruhové místo v oblasti chalázy obsahující cévní svazek, kterým do semene vstupují výživné látky. Mimo protekci vyvíjejícího se embrya je tak hlavní funkcí osemení také transport nutrientů k embryu floémem. Na povrchu hila je patrná příčná jizva

tvořená lignifikovanými tracheidami, která odkazuje na dřívější spojení vajíčka s placentou poutkem (Smýkal *et al.* 2014; Van Dongen *et al.* 2013; Wang *et Grusak* 2005). V oblasti hila se nachází méně buněčných vrstev, což může způsobovat vyšší náchylnost semen ke stresovým vlivům. Předpokládá se, že toto místo umožňuje svým rozevřením v případě malé relativní vlhkosti vysychání semene, zatímco při vysoké vlhkosti se uzavírá za účelem prevence absorpce přílišné vlhkosti (Lush *et Evans* 1980; Moïse *et al.* 2005).

Záhy po oplození vaječné buňky dochází k přeměně původně nediferencovaných pletiv osemení v epidermální vrstvu makrosklereid, hypodermální vrstvu osteosklereid a ve tři typy parenchymatických buněk, tvořících vnitřní vrstvu (Van Dongen *et al.* 2013; Wang *et Grusak* 2005). Jednovrstevná **epidermis** je kryta kutikulou formující celistvou vrstvu, která pokrývá celé osemení mimo hilum a determinuje tak výsledný povrch semene. 10 DAP nejsou buňky epidermis plně diferencovány, obsahují hustou cytoplazmu, v níž je rozmístěno několik menších vakuol. V průběhu dalšího vývoje se prodlužují a mění v palisádovou vrstvu epidermálních makrosklereid pokrytých kutikulou. Zejména kutikula je potom spojována s dormancí, která může být narušena případnou tvorbou prasklin v kutikulárním povrchu v průběhu vývoje semene (Ma *et al.* 2004; Moïse *et al.* 2005; Smýkal *et al.* 2014; Van Dongen *et al.* 2013; Wang *et Grusak* 2005). Pod epidermální vrstvou se nachází **hypodermis**, jejíž buňky se po 10 DAP diferencují v tlustostěnné osteosklereidy. V souvislosti s tímto přispívá i tato jediná hypodermální vrstva buněk k mechanické odolnosti osemení, pravá podstata její funkce však dosud nebyla odhalena. Vnitřní část osemení je tvořena třemi typy parenchymatických buněk s velkými mezibuněčnými prostory. Přesný počet buněčných vrstev se po obvodu semene liší, v oblasti naproti hila je parenchym nejtenčí. Vrstva nejbliže hypodermis je charakteristická velkými buňkami s chloroplasty a některými autory je označována jako **chlrenchym**. Spíše než fotosyntetická aktivita je však jejich hlavní funkcí akumulace škrobu. Pod chlrenchymem jsou buňky **palisádového parenchymu**, jež se strukturou podobají buňkám předchozí vrstvy, avšak obsahují menší množství chloroplastů. V oblasti hila se vyskytuje ještě třetí parenchymatická vrstva osemení, nazývaná **aerenchym**. Skládá se z malých buněk nepravidelného tvaru, které jsou v průběhu dozrávání a růstu embrya utlačovány, ve finální fázi vývoje degenerují a stávají se pro embryo hlavním zdrojem živin. Předpokládá se, že právě na základě tohoto impulsu začíná skladovací fáze embryogenetického vývoje (Moïse *et al.* 2005; Van Dongen *et al.* 2013; Wang *et Grusak* 2005).

Parenchymatické vrstvy osemení jsou pro vývoj semene nesmírně důležité. Nachází se v nich systém cévních svazků, díky čemuž osemení představuje pro vyvíjející se embryo významnou metabolickou tkáň schopnou transportu a produkce asimilátů i dalších složek (Offler *et al.* 1993). Během fáze buněčného zvětšování jsou nutrienty shromažďovány v apoplastu, odkud se difuzí přemísťují do kotyledonu, hlavního zásobního orgánu luskovin (Patrick *et al.* 2001). Jak však bylo zmíněno v práci Van Dongen *et al.* (2003), tyto látky se nejprve symplastickou cestou dostávají do parenchymatických buněk osemení, zejména potom do vrstvy chlorenchymu a aerenchymu. Transportní funkce osemení se však netýká jen asimilátů, spolu s endospermem zde dochází také k důležitému přenosu signálů z mateřských buněk do embrya. Vnitřní vrstvy osemení jsou ve vývoji semene klíčové také z důvodu syntézy obranných látek a fytohormonů, mezi buňkami embrya a osemení je patrná zejména výměna kyseliny abscisové, jejíž syntéza sice začíná v mateřských pletivech, avšak po započetí vývoje semene už vzniká v osemení a indukuje jeho dozrávání (Frey *et al.* 2004; Moïse *et al.* 2005; Van Dongen *et al.* 2003). V parenchymatických pletivech osemení se akumuluje také většina fenolických látek obsažených v semeni, jejichž přítomnost má negativní dopad na buněčný růst a vývoj. Mezi tyto látky patří také proanthokyanidiny (PA), pro něž představují vnitřní vrstvy osemení hlavní místo syntézy. PA jsou zodpovědné za opožďování vývoje semene snižováním dostupnosti či degradací proteinů a škrobu (dle Salunkhe 1982 pravděpodobně inaktivací hydrolytických enzymů), omezují příjem vody semenem a v souvislosti s dříve zmíněnou schopností vázat proteiny pravděpodobně fungují i jako mechanická bariéra, zabraňující objevení prvního kořínku (Debeaujon *et al.* 2000; Moïse *et al.* 2005; Smýkal *et al.* 2014; Van Dongen *et al.* 2003; Wada *et al.* 2011).

Z uvedených poznatků vyplývá, že osemení *M. truncatula*, obsahující vysoké množství fenolických látek, přispívá velkou měrou k dormanci semen a k oddálení germinace (Baskin *et al.* 2014, 2000; Wada *et al.* 2011). Místo, kudy do osemení vstupuje voda, je stále otázkou dohadů. V práci Smýkal *et al.* (2014) bylo shrnuto, že snížená propustnost vody osemením může souviset s více faktory, jako jsou modifikace vnějších stěn palisádových buněk, absence prohlubní a prasklin v povrchu osemení, uzavřené hilum nebo tloušťka osemení. V případě *M. truncatula* je však osemení relativně tenké, tvořené pouze několika vrstvami buněk. Předpokládá se tedy, že inhibice absorpce vody souvisí s dvojitou vrstvou makroklereid a osteosklereid (Wang *et al.* 2005).

3.1.3.3. Dormance a klíčení semen

Jak bylo naznačeno v úvodu, *M. truncatula* není kulturní plodinou a neprošla tak domestikacním procesem zvyhodňujícím mimo jiné raný vývoj semene a ztrátu inhibitorů germinace (klíčení). Její semena jsou tedy v porovnání s jinými plodinami poměrně značně dormantní (Abbo *et al.* 2009).

Dormance je fyziologická adaptace rostlin na proměnlivost vnějších podmínek, sloužící k optimálnímu načasování germinace za účelem minimalizace rizika úhynu (Foley 2001). Jedná se o kvantitativní znak silně závislý na vnějších faktorech, avšak s podloženým genetickým základem (Koinange *et al.* 1996; Ladizinsky 1985; Weeden 2007). Vzhledem k odlišným definicím dormance a s odkazem na kvantitativní povahu znaku však její přesná míra nemůže být změřena (Smýkal *et al.* 2014). Harper (1957) rozeznal dormanci vrozenou, indukovanou (někdy nazývána sekundární dormancí) a vynucenou. V současnosti se využívá klasifikace navrhnutá Baskin *et Baskin* (2004), rozlišující tři hlavní kategorie dormance a jejich kombinace. 1) **Morfologická dormance** se objevuje u semen, jež mají nevyvinuté embryo a potřebují delší čas k růstu a germinaci. 2) **Fyziologická dormance** označuje případ, kdy jsou semena schopna přijmout vodu, avšak nejsou schopna germinace nebo klíčí jen velmi pomalu. Velmi často přitom hrají roli rostlinné hormony, zejména vliv abscisové kyseliny a gibberlinů. 3) **Fyzická dormance** souvisí s vývojem osemení, které zásadně zpomaluje proces absorpce vody a inhibuje růst semene. V některých pracech jsou výše uvedené typy dormance, včetně jejich kombinací, označovány jako dormance primární. Pojem sekundární dormance potom označuje jev, kdy klíčící semena některých rostlin mohou v případě nepříznivých podmínek germinaci přerušit a znovu vstoupit do dormantní fáze (Gallardo *et al.* 2006).

K narušení dormance vede několik cest. Semena mohou začít absorbovat vodu a klíčit po narušení struktury osemení mikrobiální činností nebo trávením v traktu zvířat (Smýkal *et al.* 2014), stejný účinek má také mechanické poškození osemení, kterého se využívá i v praxi (skarifikace; Kaye *et Kuykendall* 2001). Nejběžnější příčinou přerušování dormantní fáze však bývá vystavení semene vysokým teplotám (Rolston 1978; Taylor 1981). Dle dalších podmínek prostředí se potom rozhodne, kolik semen z lasku bude klíčit v daném čase (Smýkal *et al.* 2014).

Po překonání dormantní fáze nastává klíčení semen, začínající příjmem vody do semene a končící proražením osemení kořínkem. Stěžejním faktorem je přítomnost vody,

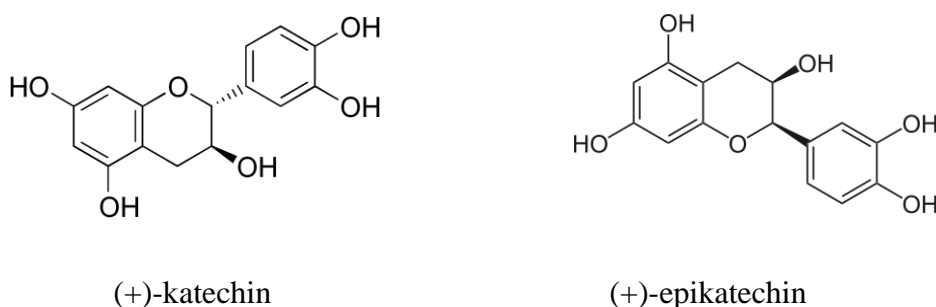
přičemž rychlost klíčení se zvyšuje se snižujícím se vodním potenciálem. Vliv na časový profil klíčení má také okolní teplota (optimum mezi 20 a 22 °C), světelné podmínky regulující aktivitu fytochromů, případně kyslík a další plyny (Buitink *et al.* 2003; Gallardo *et al.* 2006; Smýkal *et al.* 2014).

3.2 FLAVONOIDY - PROANTHOKYANIDINY

Flavonoidy jsou sekundárními metabolity syntetizovanými v řadě rostlin fenyylpropanovou cestou. Díky velké škále barevných projevů mají mnohdy zásadní podíl na pigmentaci mnoha rostlinných orgánů, významnou roli hrají také v ochraně rostlin proti různým druhům stresu. V posledních letech vzrůstá zájem o studium flavonoidů díky jejich časté antioxidační, protizánětlivé či jinak protektivní aktivitě (Janićijević *et al.* 2007; Liu *et al.* 2014). Mezi flavonoidy patří několik skupin látek (Iwashina 2000), hlavními z nichž jsou flavonoly, anthokyaniny a proanthokyanidiny (PA). S ohledem na pojetí diplomové práce bude v následujících odstavcích zájem věnován pouze PA.

3.2.1. Chemické vlastnosti proanthokyanidinů

PA, někdy také označovány jako kondenzované tanniny, se svou chemickou strukturou řadí nejčastěji mezi oligomery flavan-3-ol jednotek. Jejich základními stavebními jednotkami jsou katechin a epikatechin (obr. 3; Dixon *et al.* 2005). Jedná se o bezbarvé látky, které však mohou díky oxidaci hnědnout a kyselou hydrolyzou dochází k jejich štěpení na modře až červeně zbarvené anthokyanidiny. PA tak podobně jako další flavonoidy ovlivňují pigmentaci řady rostlinných orgánů, ve kterých se nacházejí (Porter 1989). Nejčastějším místem jejich výskytu bývají listy, stonky, květy, kůra, plody a zejména potom osemení vyšších rostlin (Liu *et al.* 2014).



Obrázek 3. Chemická struktura katechinu a epikatechinu

3.2.2. Funkce proanthokyanidinů v rostlinách

Sledování přítomnosti a obsahu PA v hospodářských plodinách nabývá na významu, mimo druhotné ovlivnění barevnosti orgánů totiž PA zastávají v rostlinách pomyslnou první

linii v obraně proti škůdcům a mikrobiálním patogenům (Cook 1999; Stafford 1997). Důležitým zjištěním jsou také jejich pozitivní účinky v oblasti lidského zdraví (tab. I).

Tabulka I. Příklady potenciálních pozitivních účinků proanthokyanidinů a flavan-3-ol derivátů na lidské zdraví (upraveno dle Dixon *et al.* 2005).

účinek	zdroj	chemická látka	publikace
protirakovinný	zelený čaj	epigallokatechin gallát	Ahmad <i>et al.</i> (2000)
protirakovinný	brusinky	katechin, epikatechin, gallokatechin dimer, epigallokatechin dimer, oligomery	Kandil <i>et al.</i> (2002)
antioxidační	semena hroznového vína	extrakt bohatý na proanthokyanidiny	Bagchi <i>et al.</i> (2000)
antioxidační	čokoláda	epikatechin	Serafini <i>et al.</i> (2003)
ochrana před renálním selháním	hroznové víno	ProBP1	Avramovic <i>et al.</i> (1999)
analgetický, protizánětlivý	<i>Polypodium feei</i>	shellegueain A	Subarnas <i>et Wagner</i> (2000)
prevence aterosklerózy	semena hroznového vína	extrakt bohatý na proanthokyanidiny	Vinson <i>et al.</i> (2002)
antimutagenní	kůra <i>Hamamelis virginiana</i>	proanthokyanidiny	Dauer <i>et al.</i> (2003)
inhibice syntézy cholesterolu	zelený čaj	epigallokatechin gallát	Abe <i>et al.</i> (2000)

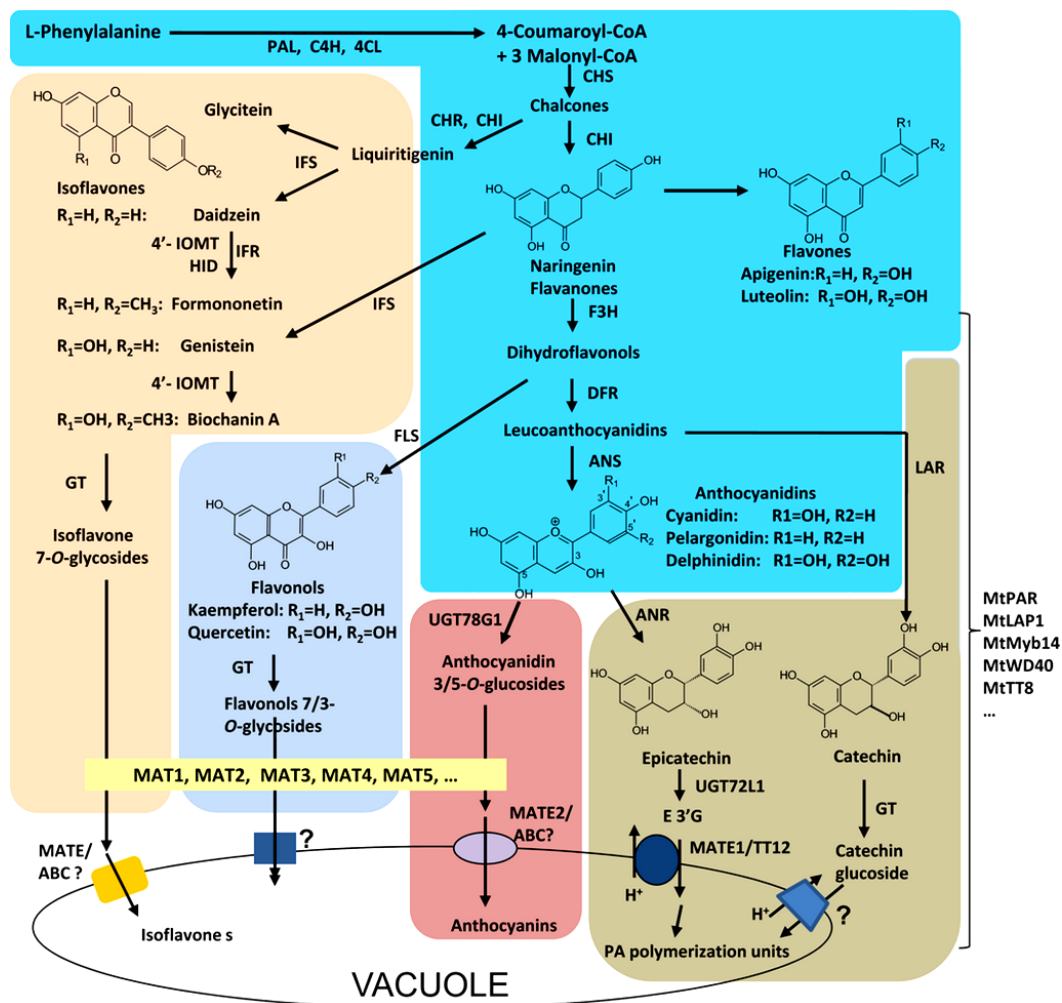
Výskyt PA je výhodný u plodin s vysokým obsahem proteinů. Tyto bývají v trávicím traktu hospodářských zvířat příliš rychle fermentovány, což vede nejen k nižší nutriční využitelnosti krmiva a následné zvýšené exkreci dusíku močí, ale také k možnému nadýmání (Dixon *et al.* 2005). Jak bylo popsáno v práci Mangan (1959), velké množství proteinů v trávicím traktu přežvýkavců vede k vytvoření stabilní proteinové pěny, bránící úniku fermentačních plynů, což může vést v případě přílišného zvětšení povrchu bachoru i k úhynu zvířete. PA mají schopnost se s proteiny vázat, destabilizovat vznikající proteinovou pěnu, a zabránit tak uvedeným negativním dopadům (Tanner *et al.* 1995). Jak ukázaly experimenty

Niezen *et al.* (1993) nebo Wright *et al.* (2016), PA mohou být využity také k nechemickému způsobu potírání střevních parazitů dobytka. Přiměřený obsah PA ve stravě přežvýkavců je tedy žádoucí. S ohledem na absorpci esenciálních aminokyselin stanovili Aerts *et al.* (1999) jako ideální množství PA v sušině 2 - 4 %. Vyšší procento již souvisí s přílišnou degradací proteinů, zapříčiňuje horší biodostupnost některých mikronutrientů, snižuje stravitelnost kvůli schopnosti PA vázat se s polysacharidy buněčné stěny a v neposlední řadě díky trpké chuti často hned na začátku odrazuje býložravce od konzumace (Dixon *et al.* 2005; Liu *et al.* 2014). Niezen *et al.* (2002) zjistili, že rostliny *Medicago* obsahují ve svých listech a stoncích pouze stopové množství PA (řád setin) a podobně je na tom většina dalších hospodářských plodin (Verdier *et al.* 2012). Na základě předchozích odstavců, zmiňujících benefity související s akumulací PA, a s ohledem na důležitost příbuzné *Medicago sativa* (tolice vojtěška) jako krmné plodiny je patrné, že zvýšení množství PA v této rostlině by mělo velký nutriční význam.

3.3 BIOSYNTETICKÁ DRÁHA PROANTHOKYANIDINŮ

Geny kódující enzymy PA biosyntézy mají ve vyvíjejícím se semeni *M. truncatula* časově a místně přesně definovanou expresi. Dosažení maximální hladiny transkriptů nastává mezi 10 a 12 DAP, načež se míra exprese většiny genů pozvolna snižuje (Pang *et al.* 2007). Ve tvorbě aktuálních modelů syntézy PA u této modelové bobovité rostliny jsou často nápomocny poznatky získané studiem *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní), u níž jsou jak dráha samotná, tak způsoby její regulace relativně dobře prozkoumány (Lepiniec *et al.* 2006). Jak je patrné z obrázku 4, biosyntetická dráha PA sdílí řadu kroků s drahou pro syntézu anthokyaninů. Předpokládá se tedy, že velkou roli v syntéze PA hraje právě kompetice mezi těmito dvěma paralelními cestami o sdílené prekurzory, leukoanthokyanidiny, ze kterých jsou oba koncové produkty odvozeny (He *et al.* 2008; Li *et al.* 2016a,b).

Metabolická dráha PA začíná v endoplazmatickém retikulu, pokračuje v cytoplazmě a zakončuje se ve vakuole. Stěžejním bodem syntézy flavonoidů je enzymatická kondenzace čtyř derivátů CoA, katalyzovaná **chalkon syntázou (CHS)** lokalizovanou na membráně endoplazmatického retikula, za vzniku naringerin chalkonů. Tyto látky jsou posléze izomerizovány spontánně či **chalkon izomerázou (CHI)** na flavonoidy liquiritigeniny, prekurzory izoflavonů, a naringeniny. CHI svou aktivitou ovlivňuje také intramolekulární



Obrázek 4. Schéma biosyntézy flavonoidů u *Medicago truncatula*. Větev vedoucí k produkci proanthokyanidinů je podbarvena šedozeleně, větev vedoucí k produkci anthokyaninů červeně. PAL - fenylalanin ammonium lyáza; C4H - cinnamát 4-hydroxyláza; 4CL - 4-kumarát CoA ligáza; CHS - chalcon syntáza; CHI - chalcon izomeráza; CHR - chalcon reduktáza; IFS - izoflavon syntáza; IOMT - izoflavonoid *O*-methyltransferáza; HID - 2-hydroxyizoflavanon dehydratáza; F3H - flavanon 3-hydroxyláza; FLS - flavonol syntáza; DFR - dihydroflavonol 4-reduktáza; ANS - anthokyanidin syntáza; ANR - anthokyanidin reduktáza; OMT - *o*-methyltransferáza; UGT - UDP glykosyltransferáza; MAT - malonyl/acetyltransferáza; MATE1 - multidrug and toxic extrusion protein transportér 1; TT12 - transparent testa 12. Převzato z Li et al. (2016).

cyklizaci chalconů, vedoucí ke vzniku flavonů. Pro vznik PA a anthokyanidinů jsou naringeniny konvertovány aktivitou **flavonoid hydroxyláz (F3'H, F3'5'H)** na dihydroflavonoly (mj. dihydroquercetin), které **dihydroflavonol 4-reduktázy (DFR)** redukují na leukoanthokyanidiny. V prvním kritickém kroku biosyntetické kaskády, kdy dochází k nasměrování prekurzorů mezi PA nebo anthokyaninovou cestu, figurují cytosolické enzymy **leukoanthokyanidin reduktáza (LAR; Tanner et al. 2003)**, jejímž účinkem dochází

k redukci leukoanthokyanidinů na katechiny, a **anthokyanidin syntáza (ANS;** někdy označována jako leukokyanidin dioxygenáza, LDOX), oxidující leukoanthokyanidiny na anthokyanidiny. Protože se flavonoidy přenášejí přes membrány organel pouze ve formě glykosidů, jsou anthokyanidiny dále glykosylovány **UDP glukosyltransferázou (UGT78G1;** Modolo *et al.* 2009) na anthokyanidin-3/5-O-glukosidy, nebo redukovány na flavan-3-oly (mj. epikatechin) enzymem **anthokyanidin reduktázou (ANR;** Xie *et al.* 2004). Epikatechiny mohou být následně glykosylovány **UDP glukosyltransferázou (UGT72L1)** na epikatechin-3'-O-glukosidy a ty bývají transportovány přes tonoplast do vakuoly **multidrug and toxic compound extrusion transportérem (MATE1)**. Ve vakuole se shromažďují také anthokyaniny, které zde vznikají po přenosu anthokyanidin-3/5-O-glukosidů z cytosolu pomocí **multidrug and toxic compound extrusion transportéru (MATE2)**. Epikatechin-3'-O-glukosidy mohou být spolu s katechiny, jež byly syntetizovány v dřívějším kroku dráhy a které byly do vakuoly transportovány ve formě glukosidu neznámým mechanismem, kondenzační reakcí pravděpodobně enzymatického charakteru (předpokládá se katalýza **lakázou;** Pourcel *et al.* 2005) polymerovány za vzniku PA oligomerů (He *et al.* 2008; Lepiniec *et al.* 2006; Li *et al.* 2016a; Liu *et al.* 2014; Pang *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2009).

3.3.1. Regulace biosyntézy proanthokyanidinů

Regulace výše popsaných biosyntetických drah je úzce kontrolována na transkripční úrovni. Nejvýznamnějším regulačním mechanismem, který zodpovídá také za odlišení obou cest volbou enzymů v posledních krocích kaskády, je tzv. MBW ternární komplex. Jedná se o uskupení tří transkripčních faktorů rodin MYB (myeloblastosisfamily), bHLH (basic helix-loop-helix) a WD40 (beta-transducin repeat, strukturní motiv řady aminokyselin), které se váže se obvykle do promotorové oblasti genů, jenž mají být transkribovány (Baudry *et al.* 2004; Li *et al.* 2016a,b; Liu *et al.* 2014; Walker *et al.* 1999; Xu *et al.* 2013, 2014). Transkripční faktor WD40, v případě *M. truncatula* MtWD40-1, figuruje v obou větvích biosyntetické dráhy flavonoidů a ovlivňuje tak tvorbu PA i anthokyaninů (Pang *et al.* 2009). Preferenci anthokyaninové či PA cesty určují transkripční faktory rodiny bHLH (u *M. truncatula* MtTT8; Li *et al.* 2016b) a ve větší míře potom MYB transkripční faktory, které mohou determinovat funkční specifitu utvořeného MBW komplexu k promotoru konkrétního genu (Baudry *et al.* 2004; Liu *et al.* 2014; Verdier *et al.* 2012). U *M. truncatula*

bylo z rodiny MYB dosud identifikováno několik transkripčních faktorů, hrajících úlohu v regulaci PA dráhy - MtLAP1, MtPAR, MtMYB5 a MtMYB14. Bylo potvrzeno, že za volbu větve vedoucí k biosyntéze anthokyaninů je odpovědný MYB faktor MtLAP1 (legume anthocyanin production1; Peel *et al.* 2009). Jeho konstitutivní exprese v *M. truncatula* mimo jiné výrazně indukuje transkripci genů UGT78G1 a MATE2, mající za následek masivní produkci anthokyanidinů a jejich následných derivátů. Za indukci biosyntézy PA zodpovídá více MYB faktorů, přičemž byly dosud potvrzeny role již zmíněných MtPAR, MtMYB5 a MtMYB14. Tyto budou s ohledem na zaměření diplomové práce více popsány dále v textu. Nedávné poznatky však ukázaly, že MYB faktory nemusejí regulovat biosyntézu PA pouze pozitivně. Nově charakterizovaný transkripční faktor MtMYB2 (Jun *et al.* 2015) se ukázal být při zformování MBW komplexu represorem anthokyaninové i PA dráhy, což otevírá možnosti úvahám zabývajícím se zpětnou regulací celé kaskády syntézy flavonoidů.

3.3.1.1. Transkripční faktor MtMYB5

MtMYB5 transkripční faktor *M. truncatula*, patřící do rodiny R2R3 MYB, byl nalezen a studován na základě ortologie k AtMYB5 genu *Arabidopsis thaliana* týmem Liu *et al.* (2014). AtMYB5 gen hraje v *Arabidopsis* pouze minoritní roli v procesu biosyntézy PA, avšak u *M. truncatula* je gen MtMYB5 výrazně exprimován v semenech a jeho důležitost je značná (Liu *et al.* 2014). Barva osemení *M. truncatula myb5* mutantních rostlin je tmavě červená, jednoznačně odlišitelná od světle žlutých semen planých (*wild-type*) rostlin (obr. P2A,B v příloze). V kontrastu s hladkým povrchem *wild-type* semen, tvořeným úzce přilehlými epidermálními buňkami, vykazují mutantní semena mnoho povrchových prasklin a jejich epidermální buňky mají nepravidelný tvar. Fenotypový projev vegetativních orgánů není mutací ovlivněn (Liu *et al.* 2014). V případě přítomnosti faktorů MtTT8 a MtWD40-1 z ternárního komplexu se MtMYB5 spolu s nimi podílí na aktivaci transkripce genů MtANR a LAR. Experiment s rostlinami overexprimujícími MtMYB5 však potvrdil zvýšené množství transkriptů i u řady dalších genů figurujících v biosyntetické kaskádě vedoucí ke vzniku PA, mezi něž patří UGT72L1, MtANS, CHS a F3'H, a překvapivě také transkripční faktory MtWD40-1 a MtTT8 (Liu *et al.* 2014). Na základě těchto poznatků a s ohledem na barvu mutantních semen je MtMYB5 předpokládaným induktorem biosyntézy PA, přičemž jeho efekt na syntézu anthokyaninů je jen minimální. Liu *et al.* (2014) popsali kromě MtMYB5 také transkripční faktor MtMYB14, přičemž poznatky týkající se jeho exprese, vlivu na

fenotypový projev rostliny, tvorby MBW komplexu i role v regulaci PA dráhy byly u obou těchto faktorů velmi podobné. Efekt vyvolaný expresí MtMYB14 však nikdy nebyl tak silný, jako v případě MtMYB5. Zajímavým zjištěním, vybízejícím k dalším studiím, však je, že se MtMYB5 a MtMYB14 mohou spojit s MtWD40-1 a MtTT8 za vzniku kvartérního komplexu, jehož efekt na indukci transkripce klíčových genů převyšuje indukční schopnost ternárních komplexů obsahujících buď MtMYB5 nebo MtMYB14.

3.3.1.2. Transkripční faktor MtPAR

MtPAR (*Medicago truncatula* proanthocyanidin regulator) patřící do rodiny R2R3 MYB transkripčních faktorů byl charakterizován Verdier *et al.* (2012) a označen jako klíčový pozitivní regulátor biosyntézy PA u rostlin *M. truncatula*. MtPAR je specificky exprimován v osemeni zralých semen *M. truncatula*. Barva osemení *wild-type* rostlin je žlutá, mutantní *par* rostliny mají semena také žlutá, avšak světlejší (obr. P2c,d v příloze). K ovlivnění fenotypového projevu jiných orgánů u *par* mutantních rostlin nedochází (Verdier *et al.* 2012). Podobně jako v případě MtMYB5 interaguje MtPAR s transkripčními faktory MtTT8 a MtWD40-1 za vzniku ternárního komplexu MBW, aktivujícího transkripci genu MtANR navázáním se na jeho promotor. Ektopická exprese MtPAR (Li *et al.* 2016a; Verdier *et al.* 2012) vede k výraznému zvýšení transkripce genů zahrnutých v biosyntéze flavonoidů, zejména potom v PA dráze. Vyšší počet transkriptů se týká genů CHS, CHI2, F3'H a MtDFR, zahrnutých na počátku flavonoidové cesty, které generují PA, izoflavonové i anthokyaninové prekurzory. Upregulace (zvýšení exprese) byla pozorována také u genů MtANS, MtANR, UGT72L1 a MATE1, zodpovědných za poslední kroky v biosyntetické dráze vedoucí ke vzniku epikatechinu. Snad nejvýznamnější je ale zjištění, že exprese MtPAR výrazně koreluje s množstvím transkriptů MtWD40-1, což vede k hypotéze, že MtPAR reguluje geny kódující enzymy PA biosyntézy skrz přímé ovlivnění exprese MtWD40-1, související s tvorbou MBW komplexu (Pang *et al.* 2009; Verdier *et al.* 2012). Vzhledem k tomu, že ektopická exprese MtPAR nepotlačuje expresi genů spojených se syntézou anthokyaninů, je hlavní funkcí MtPAR redirekce prekurzorů do PA dráhy indukcí PA-specifických enzymů. Li *et al.* (2016a) však objevili ještě jeden překvapivý mechanismus, kterým MtPAR zvyšuje PA produkci. Zmíněný transkripční faktor je schopen fungovat i jako represor transkripce IFR1, IFR2 a IFS genů přímým navázáním na jejich promotorové sekvence, čímž potlačuje biosyntézu izoflavonoidů. Přesměrování prekurzorů k PA dráze je tak ještě umocněno.

Je jisté, že k úplnému pochopení mechanismů ovlivňujících syntézu flavonoidů a zejména pak těch, které zodpovídají za aktuální preferenci anthokyaninové či PA cesty v konečných fázích kaskády, bude zapotřebí další studium. Jak podotkli Dixon *et al.* (2005), pokroky znesnadňuje časová či místní separace těchto cest, díky čemuž může docházet k přehlížení komplexnějších jevů. Jejich návrhem je proto studium systémů, v nichž volba jedné cesty neznamená potlačení druhé, takových, kde funguje biosyntéza anthokyaninů i PA současně. Mnoho výše prezentovaných poznatků navíc vychází ze studií využívajících transgenní rostliny *M. truncatula*, overexprimující zájmové geny v orgánech a pletivech, kde běžně k akumulaci PA nedochází či jen v minimálním množství. Ačkoli se tento fakt dá interpretovat pozitivně, a to možností docílit něčeho v přírodě nepozorovaného, mohou být takto zjištěné závěry zkresleny. I z tohoto důvodu pracuje tato diplomová práce se semeny, orgánem, v němž se PA vyskytují nejvíce, s předpokladem získání poznatků odpovídajících realné situaci.

3.4 Mutantní linie *Medicago truncatula*

Ke tvorbě rostlinných mutantních populací lze využít bezpočet různých přístupů, jejichž množství se s pokroky vědy stále rozšiřuje. Mimo radiačního záření, neutronového bombardování, chemické mutagenese pomocí EMS či třeba nejnovějšího editování TALENs, se využívá inserční mutagenese pomocí T-DNA *Agrobacterium tumefaciens* nebo retrotranspozonů (Cheng *et al.* 2014). Metoda T-DNA byla s úspěchem využita při tvorbě alternovaných linií u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (Alonso *et al.* 2003; Feldmann 1991). Takzvaný T-DNA tagging se zde ukázal jako jeden z nejúčinnějších nástrojů k určení funkce genů a již v roce 2003 (Alonso *et al.*) byla publikována informace o saturační mutagenese téměř 75 % genů *A. thaliana*. Vzhledem ke všeobecně malé frekvenci integrace T-DNA do genomu (průměrný počet 1,5 inserce na linii; Alonso *et al.* 2003) není však tento způsob mutagenese příliš vhodný u rostlin s větším genomem, jelikož by bylo k plné saturaci genetické informace nutno modifikovat příliš velkou populaci. Toto platí i v případě *M. Truncatula*, jak odhadnuli Tadege *et al.* (2008), při předpokladu průměrné délky genu 2,2 kb (Young *et al.* 2011), bylo by při volbě T-DNA coby mutagenu nutno více než 1,3 milionů inzercí k dosažení 99% saturace takto velkého genomu.

Využití inserční mutagenese tabákovým retrotranspozonem *Tnt1* se pro vznik mutantních linií *M. truncatula* ukázalo jako mnohem výhodnější a rychlejší metoda. *Tnt1* je

velmi dobře charakterizovaný tabákový retroelement, patřící do transpozonů třídy I (d'Erfurth *et al.* 2003; Grandbastien *et al.* 1989). Tyto využívají ke svému šíření v genomu reverzní transkripce a duplikačního mechanismu „copy and paste“, vedoucí, na rozdíl od mechanismu „cut and paste“ u transpozonů třídy II, ke vzniku stabilních nových inzercí (Tadege *et al.* 2008; Wessler 2006). Dle některých studií (Mhiri *et al.* 1997; Vernhettes *et al.* 1997) je navíc transkripce *Tnt1* indukována řadou stresových situací či chemickou cestou, což urychluje tvorbu mutantních linií. V rostlinách *M. truncatula* je *Tnt1* velmi aktivní a v tkáňové kultuře se v prvních 2 - 3 týdnech vývoje kalusu obvykle transponuje v několika kopiích (d'Erfurth *et al.* 2003; Tadege *et al.* 2008). Z výzkumu Tadege *et al.* (2008), zabývajícím se tvorbou více než 7 600 nezávislých mutantních linií *M. truncatula* s přibližně 190 000 *Tnt1* inzercemi, vyplynula zajímavá data. Vzhledem k mírné preferenci *Tnt1* pro GC báze, které se v kódujících oblastech vyskytují v o 8 % větší míře, než je jejich průměrná míra výskytu v AT-bohatém genomu *M. truncatula*, se tento tabákový retrotranspozon jeví jako výhodný inzerční mutagen. Při průměrném počtu 25 inzercí na linii by bylo třeba pro dostatečnou saturaci genomu *M. truncatula* mutacemi vytvořit 14 - 16 000 mutantních linií, což není nedosažitelné číslo (Tadege *et al.* 2008). Mutantní linie *M. truncatula* vytvořené inzercemi *Tnt1* retrotranspozonu se široce využívají pro studium různých mechanismů vývoje či biosyntetických drah. Pislariu *et al.* (2012) hledali v 9 300 liniích defekty v symbiotické fixaci dusíku. Cheng *et al.* (2014) analyzovali u více než 21 700 linií s 525 000 nezávislými inzercemi metodami reverzní genetiky 840 genů různých funkčních kategorií. Velmi důležitá je zejména existence několika databází, shromažďujících informace získané vědeckými skupinami. Dle informace z počátku roku 2017 by mělo v dohledné době dojít ke spojení dat z americké *Medicago truncatula* Mutant Database (<http://medicago-mutant.noble.org/mutant/>) a poznatků získaných evropskými laboratořemi (<http://www.eugrainlegumes.org/>). Poté by bylo k dispozici více jak 22 000 *Tnt1* mutantních linií, zajišťujících téměř 90% saturační mutagenезi genů *Medicago truncatula* (The Samuel Roberts Noble Foundation c2008-2017). Čím dál reálněji se tedy začíná rýsovat situace, kdy bude vyhledání inzerčního mutantu pro jakýkoliv zájmový gen pouze otázkou několika kliknutí na internetu a objednání odpovídajících semen.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL

Soubor tří mutantních linií *Medicago truncatula*, vzniklých inzercí tabákového retrotranspozonu *Tnt1* do genu MtPAR (linie NF2466 a NF4419; J. Verdier, Shanghai Center for Plant Stress Biology, China) nebo MtMYB5 (linie NF13006; The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc.), a jedné *wild-type* linie NF4419 s intaktním MtPAR i MtMYB5 genem. Přesné umístění *Tnt1* retrotranspozonu v genech je uvedeno v příloze na obrázcích P3A a P3B. Rostliny byly pěstovány v areálu katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci ve skleníkových podmínkách, v období od března do května roku 2016 a od října do dubna roku 2017. Rostliny byly umístěny samostatně, v plastových třilitrových květináčích naplněných zahradnickým substrátem (FlorcomProfi zahradnický substrát, BB Com s.r.o., Česká republika), smíchaným s perlitem (10 - 20 % objemu). Ze všech rostlin byly odebrány vzorky lusků, ze kterých byla následně pomocí stereolupy, preparačních jehel a pinzet mechanicky vypreparována semena dvojího stáří (mladší semena stará 12 DAP, starší semena stará 25 DAP) pro izolaci celogenomové RNA, nezbytné k provedení následných molekulárních analýz. Po dobu vypracování diplomové práce byly vzorky RNA uchovávány v mrazu při teplotách -20 °C nebo -70 °C.

4.2 ANALÝZA *Tnt1* INZERCE

U vybraných linií *M. truncatula* byla provedena genotypizace DNA za účelem zjištění homozygotního či heterozygotního založení *Tnt1* inzerce v zájmovém genu MtPAR a MtMYB5. DNA byla izolována z čerstvých listů NaOH/Tris metodou (Collard *et al.* 2007) dle níže uvedeného postupu a se vzorky byla následně provedena PCR (viz bod 4.9). U vzorků linie NF13006 byly pro reakci použity primery MtMYB5 a *Tnt1*, u vzorků linií NF2466 a NF4419 byly použity primery MtPAR a *Tnt1* (sekvence v tab. IV). Orientace *Tnt1* inzerce ve sledovaných liniích byla zjištěna a popsána v bakalářské práci Terezy Buchtové (2016). PCR amplifikace byla provedena dle tabulky VI s Phire Taq polymerázou za teplotního profilu uvedeného v tabulce II. Amplifikované fragmenty byly následně

separovány horizontální elektroforézou dle postupu v bodu 4.7 a na základě výsledků separace byly vybrány experimentální rostliny vhodné k další analýze.

Postup

1. K malé části listu o přibližné velikosti 2 x 2 mm napipetovat 100 µl 0,5mol/l NaOH.
2. Přidat 1,4 ml 0,1mol/l Tris o pH 8,0, centrifugovat 10 min. při 14 000 rpm.
3. Lyzát uchovat při -20 °C nebo ihned použít pro PCR reakci.

Tabulka II. Teplotní profil PCR reakce

krok	čas	teplota [° C]	počet cyklů
počáteční denaturace DNA	2 min	95	1
denaturace DNA	30 s	95	
annealing	30 s	55	35
extenze	30 s	72	
finální extenze	5 min	72	1

4.3 IZOLACE CELKOVÉ RNA

Celková RNA ze 7 vzorků různého stáří, získaných ze 4 experimentálních rostlin *M. truncatula*, byla izolována přibližně z 25 mg čerstvě preparovaných semen. V případě mladších semen byly pro dosažení zmíněné hmotnosti preparovány 3 lusky, u starších semen postačoval jediný lusk. Před izolací byl rostlinný materiál homogenizován lyzačními kuličkami v homogenizátoru, využívajícím kombinovaný systém vícesměrného pohybu. K izolaci byl použit kolonový Universal Plant Total RNA Extraction Kit (Spin-column) čínské společnosti BioTeke, založený na metodě adsorpce na silikát. Postupováno bylo dle návodu výrobce.

Postup

1. Před použitím předeřtít Lysis Buffer PL na 65 °C.
2. Řádně označit veškeré zkumavky popisem.
3. Zhomogenizovat vzorky spolu s 500 µl Lysis Buffer PL (1 ml pro 50-100mg) v homogenizátoru a inkubovat lyzovaný materiál při 65 °C alespoň po dobu 30 min.

4. Centrifugovat 10 min. při 12 000 rpm za pokojové teploty pro odstranění genomické DNA. Supernatant přepipetovat do RNase-free filtrační kolony.
5. Centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm a zachytit filtrát do 1,5ml RNase-free centrifugační mikrozkuřavky.
6. K filtrátu přidat stejný objem 70% ethanolu, důkladně protřepat a přelit suspenzi i s případným precipitátem na Spin-column AC kolonu pro absorpci celkové RNA. V případě přílišného množství suspenze nanést její zbytek v následující aplikaci na stejnou kolonu a filráty spojit.
7. Centrifugovat 1 min. při 10 000 rpm, vylít filtrát a dále používat Spin-column AC i sběrnou mikrozkuřavku.
8. Napipetivat 500 μ l Buffer RE pro odstranění proteinů, centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm, vylít filtrát.
9. Napipetivat 700 μ l Buffer RW, centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm, vylít filtrát.
10. Napipetivat 500 μ l Buffer RW, centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm, vylít filtrát.
11. Centrifugovat 2 min. při 12 000 rpm pro odstranění zbytkové kapaliny.
12. Přemístit Spin-column AC do nové 1,5ml mikrozkuřavky zbavené RNáz. Aplikovat 30 μ l RNase-free water předehřáté na 65 °C pro eluci celkové RNA a nechat inkubovat 2 min. při pokojové teplotě.
13. Centrifugovat 1 min. při 12 000 rpm. Zopakovat předchozí krok s 20 μ l RNase-free water a slít eluáty.
14. Získanou celkovou RNA pro krátkodobou potřebu uskladnit při teplotě -20 °C, dlouhodobě při teplotě -70 °C.

4.4 SPEKTROFOTOMETRICKÁ ANALÝZA RNA

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

4.5 ODSTRANĚNÍ ZBYTKOVÉ GENOMOVÉ DNA

U každého vzorku bylo zbylých 43 μl získané celkové RNA ošetřeno Baseline-ZERO™ DNázou, degradující zbytkovou DNA, vyizolovanou spolu s celkovou RNA. Postupováno bylo dle níže uvedeného protokolu výrobce, přičemž množství chemikálií bylo modifikováno z původních hodnot stanovených pro 17 μl vzorku na použitých 43 μl vzorku.

Postup

1. K 43 μl celkové RNA eluované v destilované vodě zbavené RNáz přidat 5 μl 10x Baseline-ZERO DNase Reaction Buffer a 2,5 μl Baseline-ZERO DNase.
2. Inkubovat směs při 37 °C po dobu 20 min.
3. Po skončení inkubace zastavit probíhající reakci přidáním 5 μl 10x Baseline-ZERO Stop Solution.
4. Inkubovat při 65 °C po dobu 15 min.

4.6 PŘEPIS RNA DO cDNA METODOU DVOUKROKOVÉ REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Pro přepis do cDNA bylo na základě koncentračních údajů získaných ze spektrofotometru použito takové množství DNázované RNA jednotlivých vzorků, aby její výsledná koncentrace v 15 μl směsi prvního kroku přepisu odpovídala 200 ng/ μl . V prvním kroku reverzní transkripce byl ke 14 μl každého příslušně zředěného vzorku RNA přidán 1 μl Oligo(dT)15 primeru o koncentraci 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Směs o celkovém objemu 15 μl byla inkubována 5 minut při teplotě 70 °C, po ukončení inkubace byla okamžitě zchlazena na ledu. Ve druhém kroku přepisu byla dle níže uvedené tabulky III připravena reakční směs. Ze směsi bylo ke každému 15 μl vzorku připipetováno 25 μl , takto připravené vzorky byly inkubovány 60 minut při teplotě 42 °C a následně zchlazeny na ledu. Pro následnou molekulární práci byly vzorky cDNA zředěny destilovanou vodou v poměru 1:10 (Hradilová *et al.* 2017).

Tabulka III. Složení reakční směsi o celkovém objemu 40 μl pro druhý krok reverzní transkripce.

	koncentrace pracovního roztoku	pro 1 test [μl]	pro 10 testů [μl]
AMV RT 5x Buffer	5x	8,0	80
destilovaná voda		12,5	125
dNTP	10 mM	2,5	25
RNasin Plus RNase inhibitor	40 U/ μl	1,0	10
AMV Reverse Transcriptase	10 U/ μl	1,0	10

4.7 ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE RNA, PCR PRODUKTŮ A PRODUKTŮ RT-qPCR

Ke kontrole integrity získané celkové RNA a k ověření správnosti průběhu následně provedených PCR a RT-qPCR amplifikací byla využita separace vzorků horizontální elektroforézou ve 2,0% agarózovém gelu. Gely s výsledky elektroforézy byly hodnoceny v UV dokumentačním systému s CCD kamerou a zpracovány počítačově systémem FireReader V4.

Postup

1. Rozvařit 5,0 g agarózy v 250 ml 0,5x TBE pufru v mikrovlnné troubě. V případě odpaření části roztoku doplnit destilovanou vodou na původní hmotnost.
2. V případě separace produktů PCR nebo RT-qPCR přidat 5 μl fluorescenčního barviva EUR_x[®] SimplySafe a důkladně promíchat. Při separaci celkové RNA barvu nepřidávat, protože RNA nanášecí barvivo již obsahuje ethidium bromid a formamid.
3. Nalít agarózu vychladlou na 50 - 60 °C do vaničky určené na horizontální elektroforézu, ve které jsou umístěny hřebeny. Nechat ztuhnout do konzistence gelu.
4. Po ztuhnutí umístit vaničku s gelem do elektroforetické komory, převrstvit TBE pufrem a vyjmout hřebeny.
5. Do jamek nanést 2 μl (příp. 4 μl , dle velikosti jamek) standardu molekulové hmotnosti, při separaci RNA v bezbarvém gelu přidat ke standardu RNA nanášecí barvivo. Obarvené vzorky nanášet po 5 μl (příp. 8 μl), v případě bezbarvých vzorků

nanést směs vzorku s bromfenolovou modří (v poměru 5:2 ve prospěch vzorku) o stejném objemu, vzorky RNA nejprve smísit s RNA nanášecím barvivem.

6. Zapojit elektrické pole nastavené na napětí 100 - 120 V (příp. 280 - 320 V, dle rozměrů elektroforetické komory), nechat probíhat elektroforézu asi 35 min.
7. Odpojit elektroforetickou komoru od zdroje napětí a prohlédnout gel v UV transiluminační komoře, zdokumentovat.

4.8 TESTOVANÉ GENY BIOSYNTETICKÉ DRÁHY PROANTHOKYANIDINŮ

Vzhledem k charakteristice studované biosyntetické dráhy PA (viz obr. 4 výše), kdy dochází ke sdílení prekurzorů pro vznik PA i anthokyaninů, bylo záměrem diplomové práce porovnat míru exprese u genů kódujících produkty, jež ovlivňují závěrečné kroky sdílené biosyntetické dráhy. Tedy u těch, které se podílejí na okamžité preferenci anthokyanidinové či PA dráhy. Za tímto účelem bylo k testování zvoleno 11 genů, uvedených v tabulce IV. 10 z nich reprezentovalo zájmové geny, u nichž byla zjišťována míra exprese, gen MSC27 (konstitutivně exprimovaný translačně regulovaný homolog nádorového proteinu; Kapros *et al.* 1992) byl zvolen jako normalizační (Heid *et al.* 1996).

Je namístě zmínit, že použité primery byly ve všech případech navrženy spíše na 3'konec, případně i 3'UTR oblast, sledovaných genů. Velikost produktů amplifikační reakce se u všech primerů pohybovala mezi 50-250 bp.

Tabulka IV. Seznam a sekvence primerů použitých v diplomové práci

gen	genem kódovaný produkt	sekvence primeru (3'-5'); forward (F), reverse (R)	reference
MtANS	anthokyanidin syntáza	F - GGTTGGAAGGTGGAAGGTTA R - CCCATTTGCCCTCATAGAAA	Li <i>et al.</i> 2016a
MtANR	anthokyanidin reduktáza	F - GCAGTTTCTATCGGGTTCAA R - CTGAGGGTATCGTTTGCTGA	Verdier <i>et al.</i> 2012
MtDFR1	dihydroflavonol 4-reduktáza	F - TCGTCCACTTGGATGATCTTTG R - CTCCTTCTACTTCCATATGCTCAA	Li <i>et al.</i> 2016a
MtDFR2	dihydroflavonol 4-reduktáza	F - TTCAAAAACCCTGGCAGAAC R - GGTGGCATTGAAGGCATAAT	Li <i>et al.</i> 2016a
UGT72L1	uridindifosfát glukosyltransferáza	F - GGAGAATCCACATGATTCTTTT R - TCTGAATGAGAATTCAGGGAAA	Li <i>et al.</i> 2016a
UGT78G1	uridindifosfát glukosyltransferáza	F - GTTTTGGCATTCCCATTGG R - GAGCCTCTGTAGCAATTTTTTTCAC	Li <i>et al.</i> 2016a
MATE1	<i>multidrug and toxic compound extrusion</i> transportér	F - CAAGCGCAGAACATTGTTAATCC R - GAAGCGCATGAAGAAGGAGAAC	Zhao <i>et</i> Dixon 2009
MtMYB2	transkripční faktor	F - CAAATAATCACAACTACACAAAGGC R - CACACGACTTGATGGAGAGTT	Li <i>et al.</i> 2016a*
MtMYB5	transkripční faktor	F - ATCTTATCTGCTGCACCACC R - CCGTCTTGGTTTTGGGTGAA	Li <i>et al.</i> 2016a
MtPAR	transkripční faktor	F - AGCCAACATCATCATCATTGCCA R - AGGCTTTGGAGCTTCTGGTGCT	Verdier <i>et al.</i> 2012
MSC27	homolog nádorového proteinu	F - TTGAAGTAGACATTGGTGCTAACG R - AGCTGAGTCATCAACACCCTCAT	Verdier <i>et al.</i> 2012
<i>Tnt1</i>	tabákový retrotranspozon 1	F - GCATTCAAACACTAGAAGACAGTGCTACC R - CTCCAGACATTTTTATTTTTTCACCAAG	Tadege <i>et al.</i> 2008

* v příloze práce Li *et al.* (2016) je sekvence primerů pro MtMYB2 uvedena chybně pod MtMYB3

4.9 PCR AMPLIFIKACE

Před provedením RT-qPCR byly k ověření funkčnosti zvolených primerů provedeny testy těchto primerů s vybraným vzorkem cDNA metodou PCR. PCR byla využita také pro genotypizaci vzorků (viz výše bod 4.2). Složení reakční směsi o celkovém objemu 15 μ l je zaznamenáno v tabulce VI. Ke 13 μ l PCR premixu bylo vždy přidáno po 2 μ l ředěného vzorku cDNA. Použité primery uvádí tabulka IV. Reakce probíhaly v termocycleru v 8-jamkových stripech o objemu 0,2 ml dle teplotního profilu uvedeného v tabulce V.

Postup

1. Do mikrozkušavky připravit dle tabulky VI potřebné množství PCR reakční směsi, odpovídající počtu prováděných reakcí.
2. Do řádně popsanych mikrotitračních destiček nebo zkumavkových stripů rozpipetovat reakční směs po 13 μ l, následně přidat po 2 μ l testovaného vzorku DNA.
3. Umístit mikrotitrační desky nebo zkumavkové stripy do PCR termocycleru, nastavit teplotní profil dle tabulky V.
4. Amplifikovaný PCR produkt uskladnit pro krátkodobou potřebu při teplotě 4 $^{\circ}$ C, dlouhodobě při teplotě -20 $^{\circ}$ C.

Tabulka V. Teplotní profil PCR reakce

krok	čas	teplota [$^{\circ}$ C]	počet cyklů
počáteční denaturace DNA	5 min	95	1
denaturace DNA	30 s	95	
annealing	30 s	55	35
extenze	30 s	72	
finální extenze	10 min	72	1

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

	koncentrace pracovního roztoku	pro 1 test [μ l]
pufr	5X	3
destilovaná voda		9,23
primer mix (F/R)	5 mmol/l	0,7
MYTAq RED	5 U/ μ l	0,07

4.10 Kvantitativní RT-PCR

S vybranými primery byla u sedmi vzorků cDNA provedena kvantitativní RT-PCR v reálném čase (RT-qPCR) pro zjištění hodnot C_q a analýzu křivek teplot tání. Průběh RT-qPCR (tab. VII) a postup přípravy reakční směsi (tab. VIII) byl analogický s postupem standardní PCR uvedeným výše. Reakce probíhala v 8- jamkových stripech, uzpůsobených pro kvantitativní amplifikaci, ve specializovaném qPCR termocyleru LightCycler® Nano Instrument, Roche.

Tabulka VII. Teplotní profil RT-qPCR reakce

krok	čas	teplota [° C]	počet cyklů
udržování	10 min	95	1
denaturace DNA	10 s	95	
annealing	30 s	55	45
extenze	20 s	72	
udržování	5 min	72	1
analýza teplot tání	60 °C - 90 °C při nárůstu 0,05 °C/s		

Tabulka VIII. Složení RT-qPCR reakční směsi o celkovém objemu 10 μ l

	koncentrace pracovního roztoku	pro 1 reakci [μ l]
SybrGreen	2x	5
destilovaná voda		2,2
primer mix (F/R)	5 mmol/l	0,8
vzorek cDNA		2

4.11 HODNOCENÍ ZÍSKANÝCH DAT

Data získaná RT-qPCR byla ukládána ve formátu odpovídajícímu výstupu z Roche cycleru a dále zpracovávána ve formě tabulek v počítačovém programu Microsoft Excel. Pro analýzu rozdílů v expresi studovaných genů byla využita metoda relativní kvantifikace, porovnávací míru exprese zájmových genů u mutantních a *wild-type* rostlin (Livak *et* Schmittgen 2001), která je s ohledem na účel experimentu výhodnější, než by byla metoda absolutní kvantifikace. Zjištěné hodnoty C_q (v současnosti termín “*quantification*”

cycle C_q” nahrazuje dříve používaný “*threshold cycle C_T*”; Bustin *et al.* 2009), označující cyklus, ve kterém dochází k nárůstu fluorescence nad prahovou hodnotu, byly po trojnásobném opakování měření přepočítány metodou $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak *et Schmittgen* 2001) dle matematických vzorců

$$\Delta_T = \text{průměrná } C_q \text{ zájmového genu} - \text{průměrná } C_q \text{ normalizačního genu}$$

$$\Delta\Delta_T = \Delta_T \text{ studovaného vzorku} - \Delta_T \text{ referenčního vzorku}$$

pozn.: normalizační gen - MSC27; referenční vzorek - semena *wild-type* linie NF2466

za účelem zjištění relativních změn v genové expresi mezi mutantními liniemi a *wild-type* linií. K výpočtům byly použity tři hodnoty C_q , lišící se maximálně o 1,5 cyklu. Pro zjištění míry variability výsledků byly ze získaných dat vypočteny směrodatné odchylky.

4.12 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE S HMOTNOSTNÍM SPEKTROMETREM (LC-MS)

Za účelem zjištění rozdílů v obsahu rozpustných PA v osemeni mutantních a *wild-type* semen byla provedena LC-MS analýza, ke které byla vybrána plně vyvinutá semena *myb5* mutantní a *wild-type* linie NF13006 a *par* mutantní a *wild-type* linie NF4419. Ze semen byly ve třech biologických opakováních extrahovány PA tak, že k 25 mg vysušených semen bylo přidáno 10 ml extrakčního činidla (7,5 ml acetonu, 2,45 ml deionizované vody, 0,05 ml ledové kyseliny octové), směs byla následně sonifikována 1 h při laboratorní teplotě a protřepána. Následná prekoncentrace extraktů lyofilizací a LC-MS analýza vzorků byla provedena v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci Doc. RNDr. Petrem Bednářem, Ph.D. a Mgr. Monikou Cechovou za následujících podmínek:

Vzorky byly analyzovány na přístroji Acquity UPLC (Waters) PDA detektorem spojeným s hmotnostním spektrometrem SYNAPT G2S, pro analýzu byla použita kolona Raptor ARC-18 (100x2.1mm, 2.7 μ m) (Restek), temperovaná na 25 °C. Při průtoku 0,2 ml/min byla provedena gradientová eluce mobilními fázemi A (voda + 0,1% kyselina mravenčí) a B (acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí) dle schématu 0 min 100% A; 20 min 100% B; 25,5 min 100% B; 30 min 100% A. Dávkovaný objem vzorků činil 2 μ l. Analýza

hmotnostním spektrometrem byla provedena ionizací elektrosprejem v pozitivním modu s teplotou zdroje 120 °C v rozsahu m/z 50 – 1200. Měření proběhlo ve 4 opakováních, kvantifikace katechinu, epikatechinu a rutinu byla provedena s využitím katechinu jako vnějšího standardu a uvedené obsahy látek v extraktech vyjadřují jeho přepočtené ekvivalenty. Plochy byly získány integrací rekonstruovaného chromatogramu pro odpovídající m/z hodnotu (rutin - 611,16; katechin a epikatecin - 291,09).

4.13 BARVENÍ SEMEN DMACA A RUTHENIOVOU ČERVENÍ

Vzorky semen *myb5* mutantní linie NF13006, *par* mutantních linií NF4419 a NF2466 a dvou příslušných *wild-type* linií byly ve fázi plné zralosti vypreparovány z vyschlých lusků a nabarveny DMACA (4-(dimethylamino)cinnamaldehyd; Liu *et al.* 2014; Peel *et al.* 2007; Verdier *et al.* 2012) za účelem vizualizace hladiny extrahovatelných PA v osemení. Se stejnými vzorky semen bylo dle protokolu uvedeného v práci McFarlane *et al.* (2014) provedeno také barvení rutheniovou červení, které zvýrazní slizový obal produkovaný osemením a umožní tak detekci rozdílů v hydrataci mutantních a *wild-type* semen. Nabarvená semena byla nasnímána na pracovišti genové banky Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Olomouci stereomikroskopem Olympus SZ61 vybaveným digitální kamerou Olympus E-410, fotografie byly zpracovány v programu QuickPHOTO MICRO 3.1.

Postup barvení DMACA

1. Namíchat 1% barvivo smísením DMACA, methanolu a HCl (1:1).
2. Vzorky semen namočit při pokojové teplotě na 2 hodiny do vody.
3. Odpipetovat vodu, přidat 800 µl barviva a za mírného protřepávání nechat barvit po dobu 1 hodiny.
4. Nabarvené vzorky odbarvovat 1 hod. 70% etanolem.

Postup barvení rutheniovou červení

1. Vzorky semen namočit při pokojové teplotě na 2 hodiny do vody.
2. Odpipetovat vodu, přidat 800 µl 0,01% roztoku rutheniové červeně a za mírného třepání inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě.
3. Odpipetovat roztok rutheniové červeně a nabarvené vzorky odbarvit v deionizované vodě.

4.14 SEZNAM POUŽITÉHO VYBAVENÍ A CHEMIKÁLIÍ

PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

homogenizátor FastPrep-24, MB Biomedicals; **Universal Plant Total RNA Extraction Kit (Spin-column)**, BioTeke Corporation; **třepačka** Vortex mixer ZXClassic, VELP Scientifica; **termoblok** MB-102, BIOER; **centrifuga** Centrifuge 5415 R, Eppendorf; **minicentrifuga** Spectrafuge Mini, Labnet; **NanoDrop** 1000, Thermo Scientific; **sterilní box** PV-102, TelSTAR; **PCR termocycler** PTC-200, MJ Research; **real-time PCR termocycler** LightCycler[®] Nano Instrument, Roche; **soupravy pro horizontální gelovou elektroforézu** Owl A6, Thermo Scientific a Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad; **elektroforetický zdroj napětí** PowePac[™] Basic Power Supply, Bio-Rad; **dokumentační systém** FireReader V4, UVITEC Cambridge; **sonifikátor** Elmasonic S10, Elma; **stereolupa** SZ51, Olympus; **stereomikroskop** SZ61, Olympus.

LABORATORNÍ VYBAVENÍ

automatické pipety Research Plus, Eppendorf; automatické pipety F1, Thermo Scientific; plastové špičky; kádinky; Erlenmeyerovy baňky; odměrný válec; mikrocentrifugační zkumavky; 8-jamkové zkumavkové stripy a víka; laboratorní předvážky; navažovací lžičky; buničitá vata; ochranné rukavice; stojany; ledová tříšť; homogenizační kuličky, Mobio; LightCycler 8-Tube strips, Roche; preparační jehly, pinzety, Petriho misky.

CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

agaróza BIO-41025 Molecular Grade, Bioline; **standardy molekulové hmotnosti** GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific a GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific; **nanášecí barvivo** 2x RNA Loading Dye, ThermoFisher Scientific; 0,1% **bromfenolová modř** v 30% glycerinu, Promega; **fluorescenční barvivo** SimplySafe, EUR_X[®]; 10x **TBE pufr** (108 g TRIS báze, 55 g kyseliny borité, 40 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0), doplnit destilovanou vodou do objemu 1 l); **destilovaná a deionizovaná voda**; **polymerázy** MyTaq[™] RED DNA, Bioline a 10U/ μl AMV Reverse Transcriptase, Promega; Phire[™] Hot Start II DNA Polymerase, ThermoFisher Scientific a Baseline-ZERO[™] DNase, Epicentre; **pufr** 5x MyTaq[™] Reaction Buffer Red, Bioline (s obsahem 15mmol/l MgCl₂, 5mmol/l dNTPs a nanášecího barviva) a 5x AMV RT Buffer, Promega a 10x Baseline-ZERO DNase Reaction Buffer, Epicentre; **primery** Oligo(dT)15, Promega a primery uvedené

v tabulce IV Generi Biotech; 10x Baseline-ZERO **Stop Solution**, Epicentre; **inhibitory RNáz** RNasin Plus RNase inhibitor, Promega a RNaseZAP, Sigma; **reakční premix** SensiFAST SYBR No-ROX Kit, Bioline; 99,9% **aceton**, Lach:ner; 99% **ledová kyselina octová**, Lach:ner; **4-(dimethylamino)cinnamaldehyd**, Sigma; 35% **HCl**, Lach:ner, 99,5% **methanol**, Lach:ner; 96% **ethanol**, Lach:ner, 98% **NaOH**, Lach:ner; 0,01% roztok **rutheniové červeně**, Sigma.

5 VÝSLEDKY

5.1 GENOTYPIZACE VZORKŮ A PŘÍPRAVA cDNA

Metodou PCR byla u vybraných rostlin *M. truncatula* linií NF13006, NF2466 a NF4419 analyzována přítomnost *Tnt1* retrotranspozonové inserce a její homozygotní či heterozygotní založení (viz obr. P4 v příloze). Pro následnou práci byla vybrána jedna *wild-type* linie NF2466, u níž nebyla v genu MtPAR ani MtMYB5 detekována přítomnost inzertu, jedna *myb5* mutantní linie NF13006 s homozygotně založenou *Tnt1* insercí v genu MtMYB5 a dvě *par* mutantní linie (NF4419 a NF2466) s homozygotně založenou *Tnt1* insercí v genu MtPAR.

Z mladších (12 DAP) a starších (25 DAP) semen těchto rostlin byla za použití izolačního kitu získána celková RNA, jejíž integrita byla zkontrolována horizontální gelovou elektroforézou. Ačkoliv byla zřetelná částečná degradace ribonukleové kyseliny, na základě vizualizace fragmentů odpovídajících rRNA pro malou a velkou ribozomální podjednotku, jejichž přítomnost se považuje za stěžejní znak integrity RNA (Taylor *et al.* 2010), byla potvrzena vhodnost použití izolované RNA k další experimentální práci (viz obr. P5 v příloze). Spektrofotometrickou analýzou na přístroji NanoDrop 1 000 byla zjištěna koncentrace izolované RNA, pohybující se v rozmezí 115,4 až 1 019,0 ng/μl, přičemž nižší hodnoty byly naměřeny u izolátů ze semen pokročilejších fází embryonálního vývoje. Pro průběh kvantitativní RT-PCR se za ideální koncentrace RNA považují hodnoty 200 ng/μl či vyšší (Taylor *et al.* 2010), s výjimkou RNA izolované ze starších *par* mutantních semen linie NF2466 (115,4 ng/μl) byla tato podmínka splněna. Čistota RNA, získaná z poměru absorbancí A260/280, činila 2,08 - 2,18, což poukazuje na RNA mírně znečištěnou proteiny či aromatickými látkami. Izolovaná RNA byla za účelem minimalizace nespecifických reakcí zbavena zbytkové DNA DNázou, a takto ošetřená RNA byla posléze převedena metodou dvoukrokové reverzní transkripce do stabilnější cDNA formy, použitelné pro následnou amplifikační analýzu.

5.2 TRANSKRIPTOMICKÁ ANALÝZA

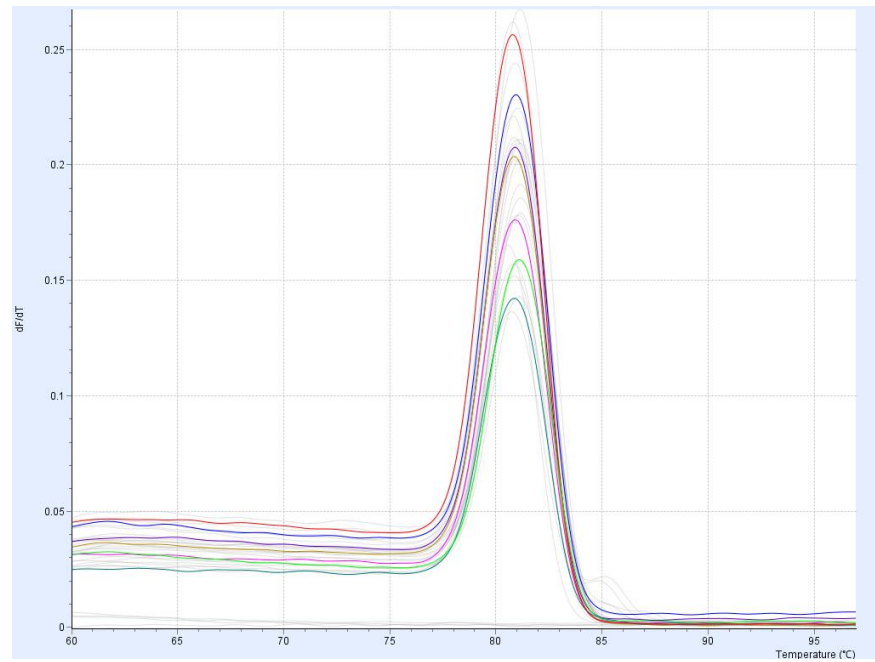
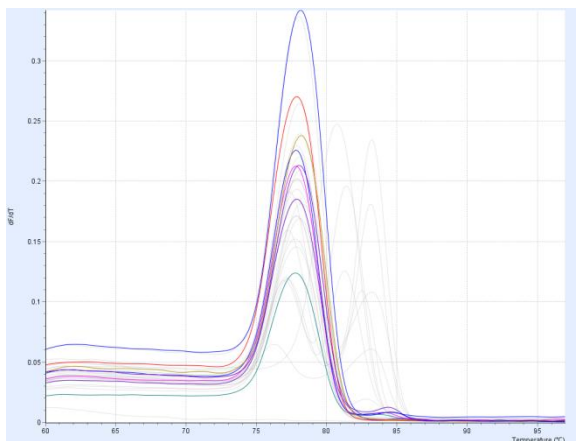
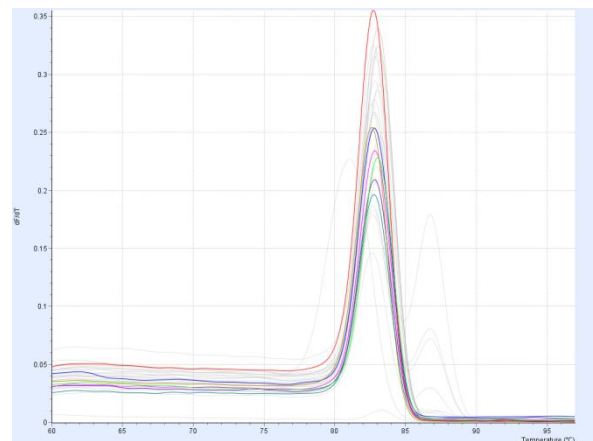
Na základě provedení PCR reakcí se získanou cDNA, vedoucích k ověření funkčnosti a specifičnosti amplifikace testovaných primerů, bylo pro analýzu množství transkriptů ve vzorcích metodou RT-qPCR zvoleno celkem 10 párů primerů, reprezentujících zájmové geny ovlivňující průběh biosyntézy PA a anthokyanidinů, a jeden pár primerů pro normalizační gen MSC27 (pro sekvenci viz tab. IV výše). Vyloučeny byly primery navržené pro gen LAR, tři sady primerů pro normalizační gen aktin (viz obr. P6 v příloze) a jedna sada primerů pro normalizační gen GAPDH, při jejichž použití docházelo ke tvorbě nespecifických produktů. Testované primery pro normalizační gen PDF2 poskytovaly specifické produkty, v práci však byl nakonec pro tento účel upřednostněn gen MSC27. Sekvence primerů, které nevyhovovaly potřebám práce a které nebyly dále používány, jsou uvedeny v příloze v tabulce PTI.

U všech sedmi vzorků byly pro každý z 11 genů ve trojím opakování změřeny hodnoty C_q (tab. IX výše) a analyzovány křivky teplot tání. Správnost průběhu RT-qPCR byla ověřována analýzou křivek teplot tání a kontrolní separací produktů amplifikace horizontální gelovou elektroforézou ve 2% agarózovém gelu. Ostré píky a jednotná teplota tání produktů amplifikace byly dosaženy v případě použití primerů **MSC27**, **MtANR**, **MtANS**, **UGT78G1** a **MtDFR1** (viz obr. 5A,B,C), stejně tak elektroforetická separace těchto produktů RT-qPCR ve 2% agarózovém gelu potvrdila specifičnost amplifikace vizualizací fragmentů o stejné délce (obr. 7). V případě amplifikace genu **UGT72L1** byly křivky tání ve vzorku mladších *par* semen NF4419 odlišné od ostatních vzorků ve všech třech měřeních, což vylučuje chybu pipetování, a jelikož amplifikace s jinými primery proběhly u tohoto vzorku správně, také možnou chybu vzorku. Analogické výsledky byly zjištěny s primery **MATE1** a **MtDFR2**, při jejichž použití poukázala analýza křivek teplot tání na nespecifickou amplifikaci u vzorku starších *myb5* mutantních semen NF13006. Problémy s amplifikací se objevily u stěžejních genů analýzy. Křivky teplot tání získaných RT-qPCR s primery **MtMYB2** detekovaly u různých vzorků vznik produktů o rozdílných teplotách tání, kontrolní elektroforetickou separací však nebyl zjištěn mezi fragmenty různých vzorků signifikantní rozdíl. V případě **MtMYB5** (obr. 6) vykazovaly produkty vzniklé amplifikací u vzorků mladších i starších *myb5* mutantních semen NF13006 teplotu tání odlišnou od ostatních vzorků a provedením kontrolní elektroforetické separace (obr. 8) byla u těchto vzorků ve všech třech replikátech nečekaně zjištěna amplifikace fragmentů o jiné délce, než u ostatních vzorků. S ohledem na stejný způsob fragmentace ve všech třech opakováních a s přihlédnutím k tomu, že se jednalo o *myb5* mutantní linie a byly použity primery pro gen MtMYB5, je nepravděpodobná náhoda

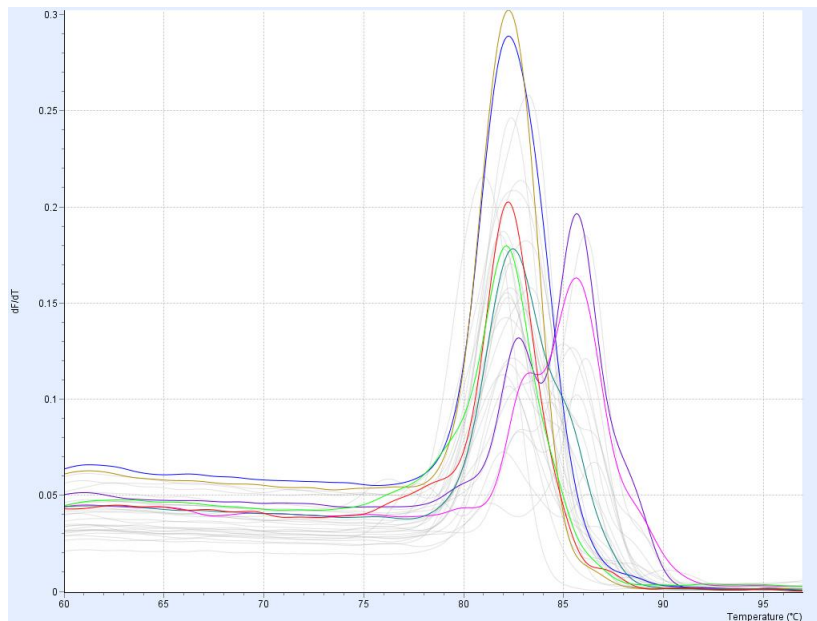
nedostatečně čistých vzorků a amplifikace genomové DNA. Vyhodnocení křivek teplot tání získaných RT-qPCR s primery pro gen **MtPAR** ukázalo nespecifitu amplifikace u většiny vzorků, píky nebyly ostré, často se objevovaly píky dvojité. U mladších semen obou *par* mutantních linií se objevil vznik produktů o odlišné teplotě tání, s ohledem na výše zmíněné je však interpretovatelnost tohoto zjištění oproti ostatním sadám primerů snížena.

Tabulka IX. Hodnoty C_q naměřené RT-qPCR ve trojím opakování pro 7 studovaných vzorků cDNA při použití 11 vybraných primerů.

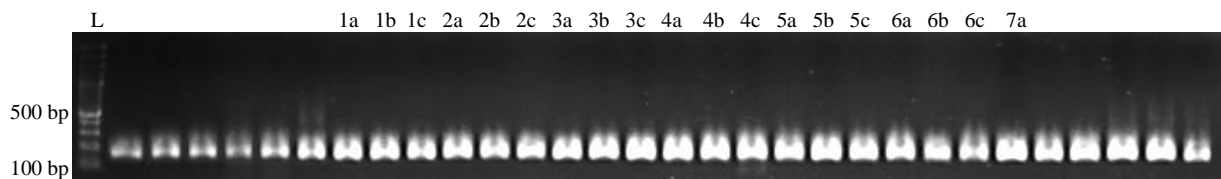
typ linie	stáří semen	MSC27			MtANS			MtANR		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
NF2466 <i>wild-type</i>	ml	23,473	23,526	23,663	26,499	27,257	27,051	25,048	26,001	26,183
NF13006 <i>myb5</i>	ml	20,293	20,525	20,592	21,012	21,382	21,579	21,970	22,426	22,878
NF13006 <i>myb5</i>	st	20,869	20,967	20,892	24,011	24,506	24,714	24,751	25,106	24,903
NF2466 <i>par</i>	ml	19,151	19,951	19,839	22,378	22,135	22,426	23,421	23,052	23,303
NF2466 <i>par</i>	st	22,234	22,278	21,834	31,657	30,823	31,784	31,039	30,848	31,313
NF4419 <i>par</i>	ml	20,512	20,509	20,335	23,687	23,818	24,175	21,595	21,313	21,399
NF4419 <i>par</i>	st	28,644	28,508	28,398	32,633	32,492	33,131	28,156	28,538	27,671
typ linie	stáří semen	MtDFR1			MtDFR2			MATE1		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
NF2466 <i>wild-type</i>	ml	24,042	24,903	24,964	29,101	30,320	30,343	31,599	32,154	31,977
NF13006 <i>myb5</i>	ml	20,833	21,192	20,906	25,232	25,733	25,792	28,303	29,098	29,287
NF13006 <i>myb5</i>	st	22,067	22,745	23,224	28,492	29,252	29,425	33,409	33,043	33,251
NF2466 <i>par</i>	ml	20,897	21,432	21,590	24,205	25,343	25,413	27,777	28,100	27,905
NF2466 <i>par</i>	st	24,847	25,096	25,144	30,281	30,446	30,558	35,264	34,544	35,050
NF4419 <i>par</i>	ml	21,033	20,931	20,880	25,357	25,796	26,436	27,604	27,704	28,090
NF4419 <i>par</i>	st	30,287	30,784	30,482	32,961	32,82	33,357	33,764	33,991	34,817
typ linie	stáří semen	UGT72			UGT78G1			MtMYB2		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
NF2466 <i>wild-type</i>	ml	27,330	27,374	27,378	31,414	31,875	32,283	30,030	30,711	31,108
NF13006 <i>myb5</i>	ml	24,028	24,060	24,411	27,608	27,500	27,779	31,379	31,676	31,201
NF13006 <i>myb5</i>	st	24,540	25,713	24,893	28,706	29,132	29,063	34,456	34,628	34,476
NF2466 <i>par</i>	ml	24,643	24,385	24,710	27,780	27,994	27,989	28,566	27,792	28,488
NF2466 <i>par</i>	st	27,688	28,044	28,087	31,792	32,727	32,625	31,606	31,787	31,600
NF4419 <i>par</i>	ml	23,747	23,050	23,735	29,728	29,507	29,569	26,821	26,794	27,520
NF4419 <i>par</i>	st	30,729	30,454	30,875	32,442	32,009	31,709	32,071	32,595	31,365
typ linie	stáří semen	MtMYB5			MtPAR					
		1	2	3	1	2	3			
NF2466 <i>wild-type</i>	ml	30,666	29,651	29,755	29,203	29,390	30,546			
NF13006 <i>myb5</i>	ml	29,607	29,547	29,220	26,198	26,181	26,386			
NF13006 <i>myb5</i>	st	31,304	31,596	30,667	26,885	27,065	27,036			
NF2466 <i>par</i>	ml	25,765	25,558	26,351	27,113	27,840	27,619			
NF2466 <i>par</i>	st	29,339	29,739	30,348	25,915	24,414	25,38			
NF4419 <i>par</i>	ml	25,546	25,790	26,245	29,396	29,636	28,864			
NF4419 <i>par</i>	st	30,564	31,019	30,776	19,92	20,51	20,875			

A**B****C**

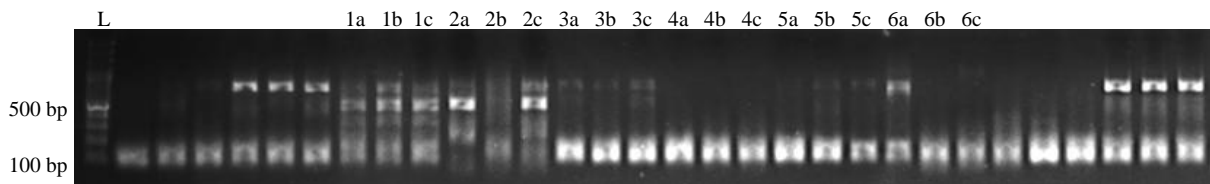
Obrázek 5A,B,C. Výsledek analýzy teplot tání produktů vzniklých RT-qPCR amplifikační reakcí za použití primerů pro gen UGT78G1 (obr. 5A), MtANR (obr. 5B), MtDFR1 (obr. 5C). NF2466 *wild-type* ml. - zelená; NF13006 *myb5* ml. - fialová; NF13006 *myb5* st. - růžová; NF2466 *par* ml. - tmavě modrá; NF2466 *par* st. - žlutá; NF4419 *par* ml. - světle modrá; NF4419 *par* ml. - červená.



Obrázek 6. Výsledek analýzy teplot tání produktů vzniklých RT-qPCR amplifikační reakcí za použití primerů pro gen MtMYB5. NF2466 *wild-type* ml. - zelená; NF13006 *myb5* ml. - fialová; NF13006 *myb5* st. - růžová; NF2466 *par* ml.-tmavě modrá; NF2466 *par* st.- žlutá; NF4419 *par* ml.- světle modrá; NF4419 *par* ml.- červená.



Obrázek 7. Elektroforetické rozdělení RT-qPCR produktů sledovaných vzorků při využití primerů pro gen MtANR. L - standard molekulové hmotnosti; 1a-c - NF13006 *myb5* ml.; 2a-c - NF13006 *myb5* st.; 3a-c - NF2466 *par* ml.; 4a-c - NF2466 *par* st.; 5a-c - NF4419 *par* ml.; 6a-c - NF4419 *par* st.; 7a-c - NF2466 *wild-type* ml.



Obrázek 8. Elektroforetické rozdělení RT-qPCR produktů sledovaných vzorků při využití primerů pro gen MtMYB5. L - standard molekulové hmotnosti; 1a-c - NF13006 *myb5* ml.; 2a-c - NF13006 *myb5* st.; 3a-c - NF2466 *par* ml.; 4a-c - NF2466 *par* st.; 5a-c - NF4419 *par* ml.; 6a-c - NF4419 *par* st.; 7a-c - NF2466 *wild-type* ml.

Z průměrných hodnot C_q byly metodou $2^{-\Delta\Delta C_T}$ vypočítány relativní změny v genové expresi mezi 12 DAP a 25 DAP starými semeny mutantních linií a 12 DAP semeny referenční *wild-type* linie NF2466. Souhrnná data jsou uvedena v tabulce X. V tabulce XI je doplňkově uvedena míra exprese zájmových genů po normalizaci (viz výše Δ_T). Nižší číslo poukazuje na dosažení stejného množství transkriptů v dřívějším cyklu amplifikační reakce, tj. na upregulaci genu.

Tabulka X. Relativní míra exprese studovaných genů v osemeni různého stáří u sledovaných mutantních rostlin a *wild-type* rostliny, vyjádřená hodnotou ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) a relativní odchylkou.

typ linie		stáří semen	MtANS	MtANR	MtDFR1	MtDFR2	MATE1
NF2466	<i>wild-type</i>	ml	1,000				
NF13006	<i>myb5</i>	ml	5,854 ± 1,290	1,199 ± 0,279	1,546 ± 0,487	2,468 ± 0,749	0,963 ± 0,171
NF13006	<i>myb5</i>	st	0,935 ± 0,201	0,291 ± 0,080	0,631 ± 0,135	0,294 ± 0,055	0,066 ± 0,023
NF2466	<i>par</i>	ml	1,845 ± 1,030	0,441 ± 0,256	0,702 ± 0,246	2,095 ± 0,579	1,096 ± 0,352
NF2466	<i>par</i>	st	0,019 ± 0,014	0,010 ± 0,004	0,286 ± 0,071	0,272 ± 0,103	0,049 ± 0,027
NF4419	<i>par</i>	ml	0,991 ± 0,314	2,445 ± 0,926	1,554 ± 0,467	2,019 ± 0,722	2,074 ± 0,614
NF4419	<i>par</i>	st	0,582 ± 0,231	6,373 ± 2,776	0,531 ± 0,053	3,788 ± 1,610	6,866 ± 2,755
typ linie		stáří semen	UGT72L1	UGT78G1	MtMYB2	MtMYB5	MtPAR
NF2466	<i>wild-type</i>	ml	1,000				
NF13006	<i>myb5</i>	ml	1,087 ± 0,156	2,278 ± 0,639	0,036 ± 0,032	0,179 ± 0,048	1,389 ± 0,653
NF13006	<i>myb5</i>	st	0,831 ± 0,301	1,192 ± 0,153	0,006 ± 0,006	0,076 ± 0,031	1,113 ± 0,482
NF2466	<i>par</i>	ml	0,479 ± 0,174	1,081 ± 0,405	0,258 ± 0,333	1,224 ± 0,414	0,332 ± 0,178
NF2466	<i>par</i>	st	0,256 ± 0,080	0,260 ± 0,057	0,114 ± 0,102	0,549 ± 0,458	9,165 ± 4,628
NF4419	<i>par</i>	ml	1,752 ± 0,642	0,568 ± 0,134	1,020 ± 0,941	2,465 ± 1,764	0,179 ± 0,122
NF4419	<i>par</i>	st	3,170 ± 0,721	28,703 ± 10,988	5,812 ± 4,931	21,344 ± 15,008	19 680,559 ± 4 165,466

Tabulka XI. Relativní míra exprese studovaných genů v osemeni různého stáří u sledovaných rostlin po normalizaci genem MSC27. Červené podbarvení značí downregulaci, zelené upregulaci genu v porovnání s referenčními *wild-type* semeny NF2466.

	<i>wild-type</i>	<i>par</i>				<i>myb5</i>	
	2466 ml.	2466 ml.	2466 st.	4419 ml.	4419 st.	13006 ml	13006 st
MtANS	3,382	2,666	9,306	3,441	4,235	0,854	3,501
MtANR	2,190	3,612	8,951	0,984	-0,395	1,955	4,011
MtDFR1	1,082	1,659	2,914	0,496	2,001	0,507	1,769
MtDFR2	6,367	5,340	8,313	5,411	4,529	5,116	7,954
MATE1	8,356	8,280	12,837	7,347	5,674	8,426	12,325
UGT72L1	3,807	4,932	5,824	3,059	2,169	3,696	4,139
UGT78G1	8,303	8,274	10,266	9,149	3,537	7,159	8,058
MtMYB2	4,550	8,635	9,549	6,593	3,494	10,949	13,611
MtMYB5	6,470	6,244	7,693	5,408	2,270	8,988	10,280
MtPAR	6,159	7,877	3,121	8,847	-8,082	5,785	6,086

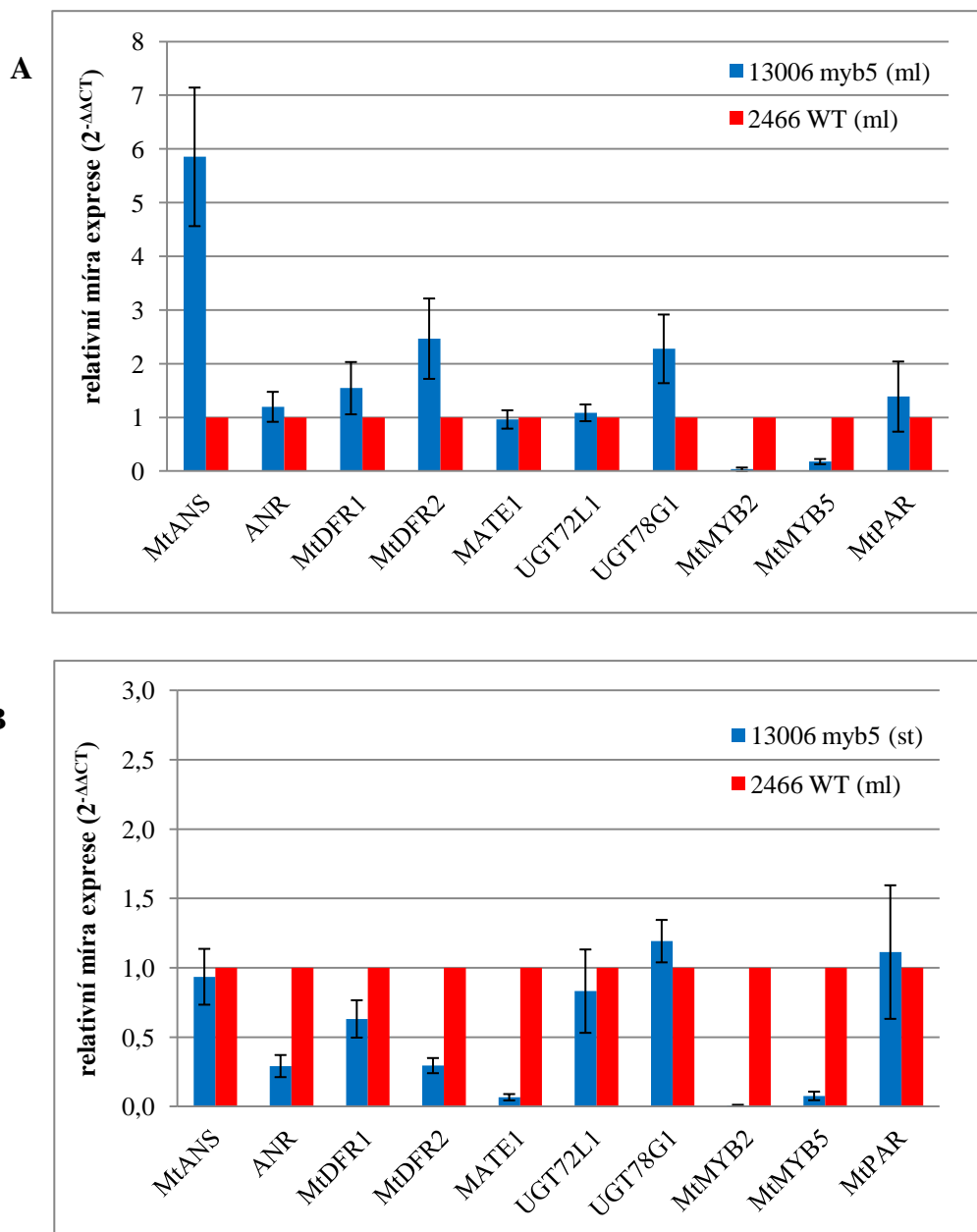
U mladších semen *myb5* mutantní linie NF13006 byl nejvíce upregulovaným genem **MtANS**, u něž byl počet transkriptů 5,854x vyšší, než v případě mladších semen referenční *wild-type* rostliny (graf IA). Více než dvojnásobné zvýšení množství transkriptů pak bylo detekováno také u genů **MtDFR2** (2,468x) a **UGT78G1** (2,278x). Markantní snížení množství transkriptů bylo zaznamenáno u genů **MtMYB2** ($2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,036$, tj. 27,8-násobný pokles) a **MtMYB5** ($2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,179$, tj. 5,6-násobný pokles). Geny **MtANR**, **MtDFR1**, **MATE1**, **UGT72L1** a **MtPAR** nebyly mutací signifikantně ovlivněny.

Ve starších semenech *myb5* linie NF13006 nebyl v porovnání s mladšími *wild-type* semeny výrazněji upregulován žádný gen, oproti výsledkům zjištěným u mladších semen naopak došlo ke snížení počtu všech studovaných transkriptů (graf IB). U genů **MtANS**, **MtDFR2** a **UGT78G1**, jež byly v mladších *myb5* mutantních semenech upregulovány, se míra exprese snížila na hladinu blížící se hladině změřené u referenčních mladších *wild-type* semen NF2466. Razantní snížení hladiny transkriptů však bylo detekovatelné i u genů **MATE1** ($2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,066$, tj. 15,2-násobný pokles oproti referenčním *wild-type* semenům, 14,6-násobný pokles oproti mladším semenům *myb5* linie), **MtANR** ($2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,291$, tj. 3,4-násobný pokles oproti referenčním *wild-type* semenům, 4,1-násobný pokles oproti mladším semenům *myb5* linie) a **MtDFR1** ($2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,631$, tj. 1,6-násobný pokles oproti referenčním *wild-type* semenům, 2,5-násobný pokles oproti mladším semenům *myb5* linie). Míra exprese genů **MtPAR**, **MtMYB2**, **MtMYB5** a **UGT72L1** v průběhu dozrávání semen poklesla jen zvolna.

Mladší semena obou zkoumaných *par* mutantních linií vykazovala v porovnání s kontrolními mladšími semeny *wild-type* linie NF2466 snížení exprese genu **MtPAR** (viz v příloze grafy PGIA, PGIIA). V případě *par* linie NF2466 se jednalo o 3-násobné snížení ($2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,332$), u *par* linie NF4419 o 5,6-násobné snížení ($2^{-\Delta\Delta C_T} = 0,179$). Opačně došlo v porovnání s kontrolními *wild-type* semeny u semen obou *par* mutantních linií ke zvýšení transkripce genu **MtDFR2**, a to 2,095x u linie NF2466 a 2,019x u linie NF4419. Zbytek zkoumaných genů byl v mladších semenech *par* linií exprimován odlišně. Největší rozdíly byly zaznamenány u genu **UGT72L1** - oproti referenčním mladším *wild-type* semenům došlo u *par* linie NF2466 k 2,1-násobnému snížení exprese, u *par* linie NF4419 zase k 2,019-násobnému zvýšení exprese - a u genu **MtMYB2**, jehož exprese nebyla v *par* linii NF4419 v porovnání s *wild-type* semeny výrazně ovlivněna, avšak v mutantní linii NF2466 byla míra transkriptů 3,9x snížena.

Při analýze relativní míry genové exprese u starších semen obou *par* mutantních linií se tendence snižování počtu transkriptů sledovaných genů ve starších stádiích embryonálního vývoje, která byla patrná v případě *myb5* mutantních semen linie NF13006, potvrdila pouze u mutantní linie NF2466 (viz v příloze grafy PGIB a PGIIB). Výjimkou byl gen **MtPAR**, u něž došlo v případě starších semen mutantní linie NF2466 k 9,165-násobnému zvýšení relativní míry jeho exprese v porovnání s kontrolním vzorkem *wild-type* semen a k 27,6-násobnému zvýšení exprese v porovnání s mladšími semeny stejné mutantní linie. K výraznému zvýšení relativní míry exprese genu **MtPAR** došlo v porovnání s mladšími *wild-type* semeny také u linie NF4419, kde bylo množství transkriptů navýšeno 19 680,560x. Zjištění týkající se upregulace **MtPAR** genu ve starších *par* mutantních semenech jsou v kontrastu s detekovaným snížením relativní míry jeho exprese u mladších mutantních semen i v kontrastu s předpokládaným narušením jeho funkce a exprese v obou studovaných *par* liniích. S výjimkou genů **MtANS** a **MtDFR1**, jejichž relativní míra exprese byla v porovnání referenčními *wild-type* semeny v obou vzorcích starších *par* mutantních semen snížena (pouze u linie NF2466 však s jistotou více jak 2x), bylo u starších semen obou *par* linií všech 7 ostatních zájmových genů exprimováno nesourodě a bez možnosti interpretace jejich společné up- či downregulace.

Graf IA,B. Relativní míra exprese studovaných genů v osemeni různého stáří (A - mladší, B - starší) u *myb5* mutantních rostlin NF13006 a *wild-type* rostliny NF2466, vyjádřená jako hodnota $2^{-\Delta\Delta CT}$.



5.3 METABOLOMICKÁ ANALÝZA

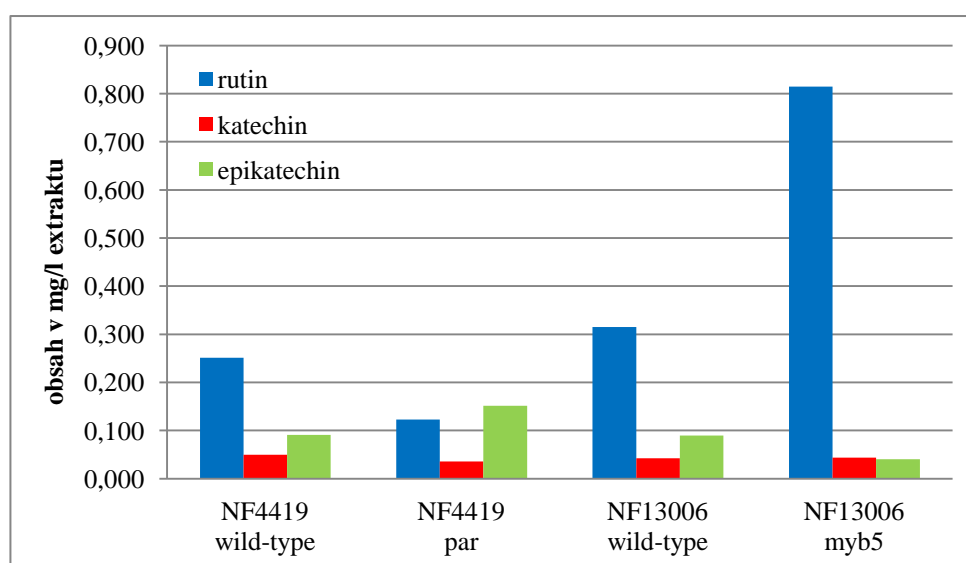
LC-MS analýzou *myb5* mutantních a *wild-type* semen linie NF13006 a *par* mutantních a *wild-type* semen linie NF4419, provedenou Doc. RNDr. Petrem Bednářem, Ph.D. a Mgr. Monikou Cechovou v Regionálním centru pokročilých technologií a materiálů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, byly zjištěny obsažené koncentrace extrahovatelného katechinu a epikatechinu (prekurzory PA) a rutinu

(glykosylovaný flavonoid hojně rozšířený v rostlinách a často analyzovaný ve studiích; Nithiyantham *et al.* 2012; Routaboul *et al.* 2006) v extraktech semen *M. truncatula* (tab. XII). S výjimkou mutantních semen NF4419 byla koncentrace rutinu ve všech vzorcích znatelně vyšší, než koncentrace katechinu a epikatechinu (graf II), nejvíce jej potom bylo obsaženo v mutantní linii NF13006 (0,815 mg/l). Koncentrace rutinu v obou *wild-type* liniích byly obdobné (u NF4419 0,251 mg/l a u NF13006 0,315 mg/l). Obsah katechinu nebyl u žádného ze sledovaných vzorků výrazněji odlišný (0,036 mg/l - 0,050 mg/l), viditelné rozdíly v koncentraci mezi jednotlivými vzorky však byly zjištěny v případě epikatechinu, jehož obsah byl v porovnání s oběma *wild-type* liniemi v semenech *myb5* mutantní linie NF13006 o 50 mg/l snížen a v *par* mutantních semenech linie NF4419 o 62 mg/l zvýšen. Doplňková data týkající se LC-MS analýzy, jež nebyla v této diplomové práci uvedena, jsou k dispozici u Doc. RNDr. Petrem Bednáře, Ph.D.

Tabulka XII. Obsah rutinu, katechinu a epikatechinu v extraktech *wild-type* a mutantních semen linií NF4419 a NF13006 *Medicago truncatula*, vyjádřený v mg/l extraktu a relativní odchylkou.

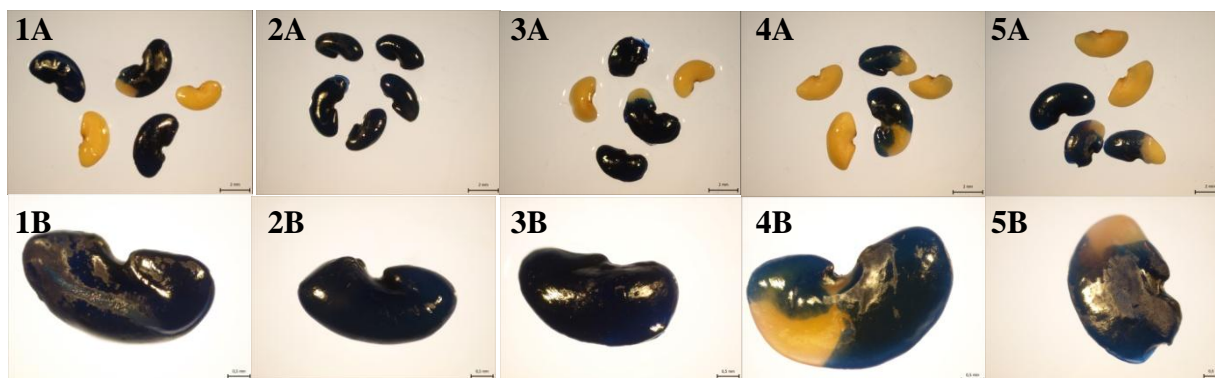
typ linie	rutin	katechin	epikatechin
NF4419 <i>wild-type</i>	0,251 ± 0,004	0,050 ± 0,001	0,091 ± 0,003
NF4419 <i>par</i>	0,123 ± 0,003	0,036 ± 0,000	0,152 ± 0,002
NF13006 <i>wild-type</i>	0,315 ± 0,004	0,043 ± 0,001	0,090 ± 0,002
NF13006 <i>myb5</i>	0,815 ± 0,007	0,044 ± 0,001	0,040 ± 0,001

Graf II. Obsah rutinu, katechinu a epikatechinu v extraktech *wild-type* a mutantních semen linií NF4419 a NF13006 *Medicago truncatula*.

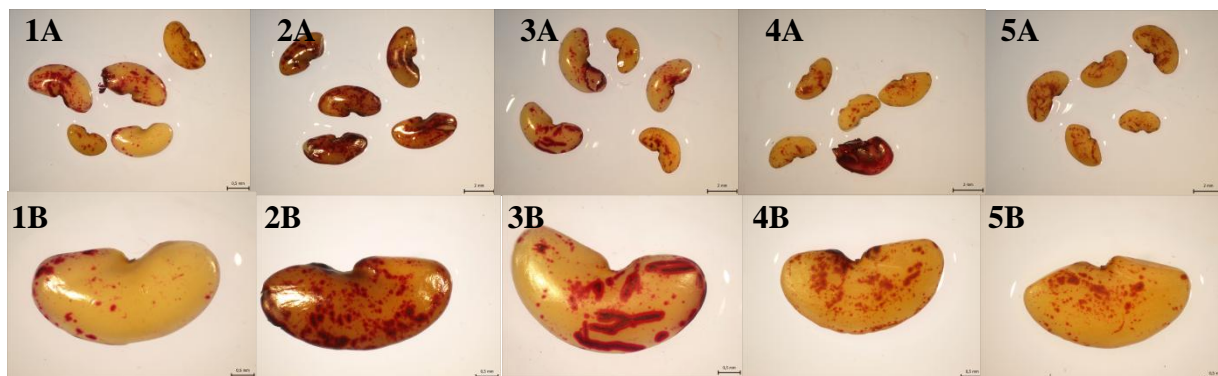


5.4 HISTOCHEMICKÁ ANALÝZA

Využitím barvení DMACA u vzorků semen jedné *myb5* mutantní (NF13006), dvou *par* mutantních (NF4419, NF2466) a dvou příslušných *wild-type* linií (NF13006, NF4419) došlo k orientační histochemické detekci celkového množství extrahovatelných proantokyanidinů v osemení (obr. 9). Specifickou reakcí DMACA s flavan-3-oly (PA) došlo ke vzniku sytě modrého až černého zbarvení osemení u obou *wild-type* linií a u *myb5* linie, u žádné z *par* mutantních linií nevznikly tolik intenzivně zbarvené produkty. S ohledem na přítomnost HCl a ethanolu v barvicí směsi došlo u semen ve většině případů k nabobtnání. Barvení rutheniovou červení detekovalo odlišné množství pektinových látek (slizu) na povrchu semen *wild-type* a mutantních rostlin. Žádný ze vzorků nebyl obarven celistvě, u všech byly patrné místní rozdíly v akumulaci pektinů. Intenzivnější červené zbarvení bylo pozorováno pouze u vzorku *myb5* mutantních semen, mezi *wild-type* vzorky ani *par* mutantními semeny obou linií výraznější rozdíl v barvení nebyl (obr. 10). V případě obou histochemických metod byly mezi jednotlivými semeny stejné linie viditelné rozdíly ve způsobu či intenzitě barvení. Toto souvisí s charakterem osemení a jeho propustností, která se může mezi semeny lišit, a to často i když se jedná o semena pocházející ze stejného lusku.



Obrázek 9: Výsledek barvení mutantních a *wild-type* semen *Medicago truncatula* metodou DMACA, detekující množství rozpustných proanthokyanidinů v osemení. 1A,B - *wild-type* semena linie NF13006; 2A,B - *myb5* semena linie NF13006; 3A,B - *wild-type* semena linie NF4419; 4A,B - *par* semena linie NF4419; 5A,B - *par* semena linie NF2466. Zvětšení mikroskopu 10x (vzorky A), 30x (vzorky B).



Obrázek 10: Výsledek barvení mutantních a *wild-type* semen *Medicago truncatula* rutheniovou červení, detekující množství pektinových látek na povrchu semene. 1A,B - *wild-type* semena linie NF13006; 2A,B - *myb5* semena linie NF13006; 3A,B - *wild-type* semena linie NF4419; 4A,B - *-par* semena linie NF4419; 5A,B - *-par* semena linie NF2466. Zvětšení mikroskopu 10x (vzorky A), 30x (vzorky B).

6 DISKUZE

Přestože se může zdát, že je izolace RNA rutinní a bezproblémovou záležitostí, opak je často pravdou. Především v rostlinné říši existuje množství pletiv a orgánů, z nichž je velmi obtížné získat dostatečné množství kvalitní RNA. Mezi taková pletiva patří i osemení, obsahující často vysoké množství inhibujících látek, jako jsou pigmenty, polysacharidy či fenoly. Wang *et Vodkin* (1994) při práci s pigmentovaným osemením sóji (*Glycine max*) zjistili, že právě proanthokyanidinové pigmenty interagují s RNA. Přestože byly v laboratoři souběžně s touto diplomovou prací testovány různé metody izolace RNA z osemení planého hrachu (*Pisum*), podobajícího se svým složením osemení *Medicago*, vyskytly se v roce 2016 nečekané problémy se získáním celkové RNA ze studovaných semen *M. truncatula*. Ačkoli bylo vyzkoušeno více izolačních protokolů a kitů (PowerPlant RNA Isolation Kit with DNase, MoBio; Universal Plant Total RNA Extraction Kit, BioTeke; klasické izolační postupy na bázi guanidium thiokyanátu (Chomczynski *et Sacchi* 1987) či fenolické extrakce společně s přidáním BSA a PVP (Wang *et Vodkin* 1994), kvalita získané RNA nebyla uspokojivá. Při kontrolní elektroforetické separaci nebyly patrné fragmenty odpovídající velké a malé podjednotce ribozomální RNA, jejichž přítomnost se považuje za určující znak kvality izolované ribonukleové kyseliny (Taylor *et al.* 2010), koncentrace získané RNA byla většinou velmi nízká, což bylo viditelné jak z výsledků elektroforézy, tak ze spektrofotometrického měření na NanoDropu. K podobným problémům docházelo také při izolaci RNA stejnými postupy z osemení planého hrachu. Jedním z možných vysvětlení je přítomnost velkého množství RNáz v laboratoři běžně izolující genomovou DNA rostlin, kde dochází k častému použití RNázy A k odstranění nadbytku RNA. Alternativním vysvětlením by mohl být vliv doby skladování izolačního kitu čínské firmy BioTeke (přestože výrobcem uváděná doba použitelnosti nebyla překročena), který se dosud neprodává mimo území Číny a byl získán díky osobním kontaktům přímo od výrobce. Zdá se, že většině izolačních postupů a kitů činí největší problém právě interferující látky přítomné v osemení, jež interagují s RNA během homogenizace vzorku a následné izolace. Toto bylo překonáno až získáním nového izolačního kitu firmy BioTeke na konci roku 2016, což se projevilo zpožděním v návazné hlavní části diplomové práce, zabývající se měřením genové exprese pomocí RT-qPCR.

Při kvantifikaci genové exprese je velmi důležité použít vhodný, nejlépe ve sledovaných podmínkách konstitutivně exprimovaný, gen. V případě *M. truncatula*, jsou jako normalizační geny nejčastěji využívány geny pro aktin nebo GAPDH, použité i pro

transkriptomickou analýzu osemení ve Verdier *et al.* (2012) a Liu *et al.* (2014). V rámci diplomové práce byly testovány tři sady primerů pro aktin (Liu *et al.* 2014; Verdier *et al.* 2012) a jedna sada primerů pro GAPDH (korespondence s V. Vernoud, INRA, Francie). Ačkoliv analýza křivek teplot tání při testování těchto primerů nepoukazovala na nespecifickou amplifikaci, při kontrolní elektroforetické separaci amplifikovaných produktů překvapivě došlo vždy k vizualizaci více fragmentů o různé délce (obr. P6 v příloze). Není známo, zda byly publikované primery autory testovány a byla-li jimi prováděna elektroforetická separace produktů, v žádné z výše uvedených publikací nebyla tato poznámka uvedena. Je tedy otázkou k zamyšlení, jaké testy a analýzy je nutno vykonat před zveřejněním poznatků pro zaručení správnosti a hodnověrnosti výsledků. Pro normalizaci získaných dat byl nakonec vybrán konstitutivně exprimovaný gen MSC27, u nějž ukázala RT-qPCR analýza křivek teplot tání i kontrolní elektroforéza vznik jednotných fragmentů.

V souvislosti s výběrem primerů pro zájmové geny byl z důvodu nedostatečné amplifikace ze studie vyřazen gen LAR, figurující v alternativní biosyntetické větví PA díky expresi reduktázy, katalyzující vznik katechinu. Výběr vhodných sekvencí primerů byl kritickým bodem také u genu MtPAR, kdy byly vyřazeny z důvodu nespecifické amplifikace dvě jejich sady. Jak se však později ukázalo, problémy nebyly překonány ani s konečným návrhem sekvence primerů, když analýza křivek tání ukázala vznik nesourodých produktů o různých teplotách tání, přestože při testování na zkušebních vzorcích bylo dosaženo PCR amplifikace produktů jednotné délky. V konečných fázích práce se potom objevil zajímavý vzorec RT-qPCR amplifikace při využití primerů pro gen MtMYB5 - analýzou teplot tání produktů byla zjištěna odlišnost obou *myb5* mutantních vzorků linie NF13006, jejichž amplifikované produkty vykazovaly oproti produktům ostatních vzorků rozdílnou teplotu tání. Stejně tak bylo v těchto dvou případech při kontrolní elektroforetické separaci produktů RT-qPCR ve 2% agarózovém gelu detekováno více fragmentů odlišných délek, ačkoliv při testování vhodnosti navržených primerů PCR docházelo u zkušebních vzorků k amplifikaci fragmentů jednotné délky. S ohledem na nepravděpodobnost chyby ve vzorku a amplifikaci fragmentů jednotné délky u ostatních vzorků není jasná příčina této nesrovnalosti.

Stěžejní praktickou částí diplomové práce byla RT-qPCR analýza exprese vybraných genů, zapojených v biosyntetické dráze PA. V řadě dostupných publikací, zabývajících se transkriptomickou analýzou rostlin, se k výzkumu využívá transgenních populací overexprimujících zájmový gen, a to často v odlišném pletivu. Stejně tak tomu bylo v pracích Verdier *et al.* (2012), Liu *et al.* (2014) a Li *et al.* (2016a), z nichž byly první dvě jmenované

stěžejními předlohami pro tuto diplomovou práci, kde bylo využito ke studiu vlivu genů MtPAR a MtMYB5 na biosyntetickou dráhu PA rostlin *M. truncatula* overexpresi zajímavých genů v kořincích, tedy v orgánu, v němž se PA u *M. truncatula* za běžných okolností neakumulují. Práce Verdier *et al.* (2012) i Liu *et al.* (2014) byla založena na měření genové exprese pomocí Affymetrix chipů, pracujících na principu hybridizace vzorku s oligonukleotidovou sondou pro sledovaný gen. Autoři zjistili, že jak při overexpresi genu MtMYB5, tak při overexpresi MtPAR, dochází k indukci genů biosyntetické dráhy PA, přičemž mezi více jak dvojnásobně exprimovanými geny byly MtANR, MtANS, UGT72L1, MATE1, MtDFR a LAR.

Pro získání poznatků o reálném stavu regulace PA dráhy v osemeni *M. truncatula* byla v této diplomové práci, na rozdíl od výše zmíněných studií, pro analýzu genové exprese zvolena metoda RT-qPCR a porovnání planého (*wild-type*) a mutančního stavu ve dvou genech, regulujících biosyntetickou dráhu PA (*par* a *myb5* mutantní semena). Stejný rostlinný materiál byl využit také v pracích Verdier *et al.* (2012) - 20 DAP semena *par* mutantní linie NF4419 a NF2466 - a Liu *et al.* (2014) - 12 DAP semena *myb5* mutantní linie NF13006, avšak získané poznatky zde byly prezentovány spíše okrajově. Navíc, zatímco Verdier *et al.* (2012) zvolili pro analýzu *par* mutantních semen RT-qPCR, Liu *et al.* (2014) využili i v tomto případě Affymetrix chipů a vyvozené závěry se tak mohou lišit. Cílem diplomové práce bylo provést RT-qPCR analýzu na obdobném výběru genů, jaký zvolili výše zmínění autoři, a zvolit postup umožňující porovnání dat.

V souvislosti s *Tnt1* inzerací v **MtMYB5** genu byl u mladších i starších *myb5* mutantních semen NF13006 v porovnání s referenčními mladšími *wild-type* semeny NF2466 detekován více jak pětinasobný pokles transkriptů MtMYB5 genu. Toto zjištění je v souladu s výsledky Liu *et al.* (2014) a poukazuje na fakt, že *Tnt1* inzerce v kódující části genu MtMYB5 se projevuje pravděpodobně terminací přepisu či vznikem aberantního transkriptu, jenž je následně buňkou rezeznán a degradován. Zajímavým zjištěním se stalo významné snížení exprese genu **MtMYB2**, které bylo ještě markantnější než u mutovaného MtMYB5. Dle Liu *et al.* (2014) byl MtMYB2 silně (až 80x) upregulován v případě MtMYB5 overexprimujících kořenů a jak bylo ve stejné práci podotknuto, gen MtMYB2 (Mt5g079670) je transkripčním represorem regulujícím expresi MtMYB5, vykazujícím silnou homologii ke známému represoru *Arabidopsis thaliana* MYBL2 (Dubos *et al.* 2008). Zjištění, že MtMYB2 je více downregulován než mutovaný MtMYB5, je tak v souladu s daty prezentovanými v Liu *et al.* (2014). V souvislosti s funkcí MtMYB2 jako represoru PA biosyntetické dráhy by

mělo snížení počtu jeho transkriptů vést ke zvýšení exprese genů následujících v biosyntetické kaskádě. V souladu s tímto byl především u mladších *myb5* semen zjištěn mírný nárůst počtu transkriptů u genů společných PA i anthokyanidinové biosyntetické dráze (**MtDFR1**, **MtDFR2**, **MtANS**) a u **UGT78G1**, zahrnutém ve větvi vedoucí k syntéze anthokyanidinů. Oproti datům publikovaným v práci Liu *et al.* (2014) však nebyl zaznamenán pokles míry transkriptů genů zahrnutých v posledních fázích syntézy PA, tj. **MtANR**, **UGT72L1** a **MATE1**. Ačkoli minimální změny v expresi genu **MtANR** nebyly příliš vzdálené předpokladu pouze mírného projevu jeho downregulace, výrazné snížení transkripce genů **UGT72L1** a **MATE1** nebylo v této práci potvrzeno. V souvislosti s poklesem míry genové exprese v pozdějších fázích embryogenetického vývoje semene bylo ve starších *myb5* semenech u zájmových genů v porovnání s mladšími *myb5* semeny patrné až 8-násobné snížení množství transkriptů. K výraznějšímu snížení exprese genů žádné části PA biosyntetické dráhy však nedošlo, s výjimkou genu **MATE1**, který byl ve starších exprimován 16x méně, než v mladších.

Výsledky studie Liu *et al.* (2014), sledující expresi genů v osemení 12 DAP *myb5* mutantních semen využitím Affymetrix chipu, vedly ke zjištění downregulace genů flavonoidní dráhy (PAL, CHS, F3H, FDR, LAR, UGT72L1) a genů, podílejících se na biosyntéze buněčné stěny a slizové vrstvy (v této diplomové práci nestudovány) u mutantních semen. Při porovnání výsledků zjištěných v rámci diplomové práce s poznatky zmíněné studie Liu *et al.* (2014) se nepotvrdil předpoklad negativního ovlivnění transkripce genů zahrnutých v posledních krocích biosyntetické dráhy PA vlivem mutace v genu **MtMYB5**.

Druhým hlavním cílem diplomové práce bylo porovnání exprese stejných genů, jako u *myb5* mutantních semen, v semenech *par* mutantních linií, využitých v práci Verdier *et al.* (2012). Je zde třeba podotknout, že Verdier *et al.* (2012) použili v případě *par* mutantů RNA izolovanou pouze z osemení, kdežto v této diplomové práci byla s ohledem na množství dostupného materiálu využita celá semena, díky čemuž se mohou vyvozené závěry odlišovat.

Zjištěné výsledky analýzy exprese zájmových genů u vzorku starších *par* mutantních semen linie NF4419 ukázaly v porovnání s ostatními vzorky s výjimkou genů **MtANS** a **MtDFR1** nepřiměřeně vysokou upregulaci. S ohledem na možnou přítomnost reziduální genomové DNA v daném vzorku a vysokou míru nejistoty relevantní interpretace dat byl tento vzorek vyloučen z vyvození obecných závěrů diplomové práce a poznatky, týkající se

starších *par* mutantních semen, byly omezeny pouze na linii NF2466. Je však namístě zmínit, že obě *par* mutanční linie jsou zastupitelné, rozdíl je pouze v místě *Tnt1* inzerce (Buchtová 2016; Verdier *et al.* 2012). Při analýze genové exprese u vzorků mladších *par* mutantních semen NF4419 a NF2466 se dle předpokladu projevila v porovnání s mladšími *wild-type* semeny NF2466 více jak 3-násobná downregulace genu **MtPAR**. Verdier *et al.* (2012) detekovali v mutanční linii v porovnání s *wild-type* vzorkem více jak 5-násobně sníženou hladinu exprese genu MtPAR. U ostatních zájmových genů byly mezi liniemi patrné rozdíly v expresi, avšak při zohlednění pouze dvou- či vícenásobných změn nebyly v diplomové práci u genů zahrnutých ve společné části biosyntetické dráhy (**MtDFR1**, **MtDFR2**, **MtANS**), ani u **UGT78G1**, klíčového pro anthokyanidin-biosyntetickou větev, zjištěny žádné zásadní změny, a to jak mezi *par* liniemi samotnými, tak při porovnání genové exprese *par* linií s *wild-type* linií. Detekovaná míra exprese výše uvedených genů ve starších semenech linie NF2466 potvrdila tento závěr. Množství transkriptů u starších *par* semen NF2466 se v porovnání s mladšími semeny snížilo nejvíce 7x, což analogicky odpovídá případu starších a mladších *myb5* mutantních semen NF13006. Výjimkou byl gen **MtANS**, u nějž bylo ve vzorku starších *par* semen NF2466 zjištěno 18-násobné snížení exprese oproti mladším *par* semenům NF2466. Všechna tato zjištění potvrdila závěry Verdier *et al.* (2012) a analýzou genové exprese **MtANR**, **UGT72L1** a **MATE1** byla u vzorků mladších i starších *par* semen NF2466 potvrzena také downregulace PA biosyntetické dráhy vlivem mutace v genu MtPAR, prezentovaná stejnými autory. Při porovnání s referenčními *wild-type* semeny NF4419 bylo u mladších semen NF2466 zjištěno méně než poloviční množství transkriptů **MtANR** a **UGT72L1**, přičemž ve starším stadiu embryogenetického vývoje stejné *par* mutanční linie se exprese těchto genů ještě markantněji snížila (u MtANR dokonce 40x v porovnání s mladšími *par* semeny NF2466) a downregulace byla již velmi zřetelná i u genu **MATE1** (22-násobné snížení množství transkriptů v porovnání s mladšími semeny NF2466). V případě mladších semen *par* linie NF4419 byla zjištěna dvojnásobná upregulace genů zahrnutých v PA biosyntetické dráze.

Ačkoli nebyly v diplomové práci analyzovány geny regulující dřívější kroky obou biosyntetických drah, na základě poznatků získaných studiem exprese genů ovlivňujících závěrečné fáze biosyntézy je možno souhlasit s Verdier *et al.* (2012) v tom, že MtPAR reguluje biosyntézu PA bez výraznějšího vlivu na syntézu anthokyanidinů. Zajímavým poznatkem je snížená míra exprese PA represoru MtMYB2, která je zaznamenána u obou stadií *par* mutantních semen linie NF2466.

Při porovnání dat získaných analýzou transkripce genů v liniích *M. truncatula*, jenž mají mutovaný MtPAR nebo MtMYB5 gen, a dat zjištěných studiem linií overexprimujících tyto zájmové geny v geneticky modifikovaných kořincích (Li *et al.* 2016a; Liu *et al.* 2014; Verdier *et al.* 2012), lze vidět většinou korelaci výsledků ve smyslu downregulace genů v *par* či *myb5* vzorcích, které byly v liniích overexprimujících gen MtPAR či MtMYB5 upregulovány. Z porovnání však vyplývá také omezená přenositelnost těchto dat, která je patrná například u genu MtANR, jenž vykazoval v MtMYB5 overexprimujících liniích největší nárůst transkriptů (225x; Liu *et al.* 2014), zatímco v *myb5* semenech bylo snížení míry transkripce jen minimální (Liu *et al.* 2014). Rozdíly však mohou být podpořeny také volbou kořínků, u nichž se PA běžně neakumulují, coby overexprimujícího orgánu. S ohledem na různé metody analýzy (Affymetrix chipy, RT-qPCR), odlišnost studovaných orgánů, variabilitu rostlinného materiálu nebo individuální způsob normalizace a interpretace získaných dat je otázkou, do jaké míry se dají zjištěné poznatky integrovat k vyvození společných závěrů. Jak bylo navíc podotknuto v Liu *et al.* (2014), řada ze zvolených zájmových genů je v případě *M. truncatula* součástí multigenových rodin, přičemž pouze část genů z dané rodiny je v mutantních semenech downregulována. Možným návrhem pro další studie, který by vedl k přesnějším poznatkům, by tedy mohla být současná analýza exprese více genů patřících do stejné multigenové rodiny.

Jelikož mutace často vedou také k viditelnému fenotypovému projevu, bylo provedeno i předběžné hodnocení semen vybraných mutantů. V případě *myb5* mutantní linie NF13006 byla v souladu s prací Liu *et al.* (2014) zjištěna výrazná fenotypová změna – semena byla menší a velmi tmavě hnědě zbarvená, na rozdíl od světle žlutých semen *wild-type* rostliny. Ačkoli je tmavé zbarvení *myb5* semen v kontrastu s nižším obsahem rozpustných PA detekovaným LC-MS, dle Liu *et al.* (2014) toto odpovídá výraznému snížení množství transkriptů MtMYB2 represoru, naznačující tak jeho výraznou roli ve směřování metabolického toku biosyntézy PA. Stejní autoři navíc spekulují o roli MtMYB5 genu v transportu epikatechinu či jeho následné kondenzaci do nerozpustných forem PA.

Za účelem orientačního zjištění množství rozpustných PA, obsažených v osemení *par* a *myb5* mutantních a *wild-type* vzorků, bylo provedeno histochemické DMACA barvení zralých semen. V souladu s poznatky Verdier *et al.* (2012) byl u *par* mutantních vzorků v porovnání s *wild-type* vzorky patrný snížený obsah rozpustných PA z důvodu narušení jejich biosyntetické dráhy vlivem *Tnt1* inserce v genu MtPAR, který se projevil méně sytým zbarvením *par* a *myb5* semen. Výsledky barvení *myb5* mutantních semen snížené množství

PA v osemení oproti *wild-type* semenům nepotvrdily, což je v rozporu se studií Liu *et al.* (2014). Toto však odpovídá výsledkům zjištěných analýzou genové exprese, kdy v *myb5* mutantních semenech nebyla pozorována represe biosyntetické dráhy PA. Z důvodu nedostatečného technického a metodického vybavení nebyly v práci detekovány nerozpustné, na buněčnou stěnu vázané PA, v jejichž akumulaci by se mezi *wild-type* a mutantními vzorky neměly projevit výraznější rozdíly. Detekce pektinových látek ve stejných pěti vzorcích semen barvením rutheniovou červení podpořilo výsledky publikované v Liu *et al.* (2014), *myb5* mutantní semena vykazovala změny v sacharidovém složení buněčné stěny, což se projevilo v porovnání s ostatními vzorky jejich zvýšenou barvitelností. V případě *M. truncatula* se však nejednalo o tolik výraznou změnu jako při defektu genu MYB5 v *Arabidopsis*, u níž je pektinová složka buněčné stěny významnější (Li *et al.* 2009).

Kromě stěžejní analýzy genové exprese v semenech *M. truncatula* byla za velkého přispění Doc. RNDr. P. Bednáře, Ph.D. a Mgr. M. Cechové provedena kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) extraktů semen *myb5* mutantní a *wild-type* rostliny linie NF13006 a *par* mutantní a *wild-type* rostliny linie NF4419. Zajímavé bylo zejména porovnání koncentrace epikatechinu, prekurzoru PA, u mutantních a *wild-type* semen linie NF4419. Oproti původnímu předpokladu narušení biosyntetické dráhy PA vlivem mutace v MtPAR genu, vedoucímu k poklesu koncentrace epikatechinu či katechinu, ke kterému analogicky došlo u *myb5* mutantních semen linie NF13006, byla koncentrace epikatechinu v mutantních semenech NF4419 v porovnání s *wild-type* semeny NF4419 o více než polovinu původní hodnoty zvýšena. Tento fakt je v rozporu také se zjištěním publikovaným Verdier *et al.* (2012), v jejichž studii byl celkový obsah epikatechinu v *par* mutantních semenech o více jak polovinu nižší. V této souvislosti se u stejného vzorku objevuje také znatelný nárůst rutinu (2,6x), přičemž v práci Verdier *et al.* (2012) byl zjištěný obsah flavonol glykosidů v *par* mutantních semenech téměř o čtvrtinu nižší, než v semenech *wild-type* linie. Vzhledem k tomu, že rutin je cukerný (β -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukosa) derivát quercetinu, naznačují tato data propojení PA a biosyntetické dráhy sacharidů, což přispívá k hypotézám a závěrům práce Liu *et al.* (2014). Ačkoli není jasný důvod rozporu dat diplomové práce a Verdier *et al.* (2012), zjištění by mohlo korespondovat s výsledky analýzy genové exprese *par* mutantních semen stejné linie, u nichž se v případě mladších i starších semen objevila nečekaná podpora PA biosyntetické dráhy na úkor biosyntetické větve vedoucí ke vzniku anthokyanidinů. Ve starších semenech bylo navíc detekováno zvýšené množství transkriptů u samotného genu MtPAR, jenž měl být inzercí *Tnt1* retrotranspozonu

knockoutován. LC-MS analýza *par* mutantních semen linie NF2466, u níž se v pokročilejších fázích embryonálního vývoje také nepředpokládaně objevila vysoká upregulace genu MtPAR, nebyla provedena z důvodu nedostatku experimentálního materiálu. V následujících měsících se předpokládá optimalizace metody a provedení nové, obsáhlejší, LC-MS analýzy, která by detekovala i další metabolity obsažené v extraktech semen *M. truncatula*.

Nad rámec zadání byl ve spolupráci s Mgr. M. Švécarovou, Ph.D. proveden pokus o histologickou analýzu stavby semen mutantních a *wild-type* linií NF4419 a NF13006. Vzhledem k technickým možnostem pracoviště byl zvolen postup využívající zalití materiálu do vosku (Steedman's Wax), což se ukázalo vzhledem k tvrdosti a strukturním vlastnostem semen *Medicago* jako nevyhovující. Problémy byly z větší části překonány volbou mladších semen, která neměla plně vyvinuté osemení a médium tak mohlo snáze prostoupit do pletiv. Přesto se však stále projevovala nestandardní tvrdost semen a na většině získaných snímků bylo patrné mechanické poškození osemení vlivem nože, který i přes dostatečnou ostrost nesnadně pronikal materiálem. Z časových důvodů se potom nepodařilo optimalizovat metodu barvení mikroskopických řezů toluidinovou modří, kdy byla semena příliš sytě nabarvena a získané snímky nebyly optimální. Z těchto důvodů zde s výjimkou snímku P7 v příloze nejsou výsledky prezentovány. Další možností by bylo využití technik elektronové mikroskopie, umožňující zobrazení povrchu.

Vzhledem k tomu, že tématem práce laboratoře Doc. Ing. P. Smýkala, Ph.D. je studium mechanismu fyzikální dormance semen bobovitých rostlin, cílem jejího výzkumu je testování vlivu defektnosti vybraných genů (mj. typu PAR a MYB5) na bobtnání a klíčení semen. Jelikož je však pro tento účel zapotřebí většího množství rostlinného materiálu, nebyla dosud získána statisticky hodnotitelná data. Z předběžných pokusů se zdá, že *myb5* mutantní semena na rozdíl od planých semen postrádají dormanci, tj. ochotněji přijímají vodu, bobtnají a klíčí (Dixon R.; Smýkal P. – osobní sdělení). Podobně byla nedávno publikována práce, kde přerušení genu KNOX4 vedlo ke kompletnímu odstranění dormance semen *Medicago* (Chai *et al.* 2016), přičemž se zdá, že odpovědným mechanismem je modifikace lipidického složení buněčné stěny osemení, což je v souladu s daty zjištěnými při studiu planého hrachu (Hradilová *et al.* 2017). Je tedy pravděpodobné, že způsobů modifikace osemení může být více, obdobně jako v případě dobře studovaného modelu *Arabidopsis*, u nějž je charakterizováno velké množství mutantních rostlin (Appelhagen *et al.* 2014; Debeaujon *et al.* 2000).

7 ZÁVĚR

V literární rešerši diplomové práce jsou shrnuty základní poznatky o semenech *Medicago truncatula* s důrazem na význam osemení v souvislosti s dormancí a germinací semen. Popsána je také biosyntetická dráha proanthokyanidinů, jež jsou s osemením úzce spjaty. Experimentální část práce se zabývá transkriptomickou analýzou sedmi vzorků mutantních a planých semen *Medicago truncatula*, doplňkově je zmíněna také předběžná anatomická studie osemení a analýza jeho složení.

Získaná data byla statisticky vyhodnocena a byly zjištěny změny v expresi deseti genů zahrnutých v biosyntetické dráze proanthokyanidinů, ke kterým došlo u rostlin s defektními geny MtMYB5 nebo MtPAR, kódujícími transkripční faktory. Poznatky většinou odpovídaly publikovaným závěrům. Bylo potvrzeno, že exprese MtMYB5 ani MtPAR výrazněji neovlivňuje biosyntetickou dráhu anthokyanidinů a je pravděpodobné, že gen MtPAR podporuje vznik proanthokyanidinů. Oproti původnímu předpokladu však nebylo zjištěno negativní ovlivnění transkripce genů proanthokyanidinové kaskády vlivem mutace v MtMYB5. Výsledky histochemické analýzy *myb5* i *par* mutantních semen byly v souladu s poznatkami získanými analýzou genové exprese.

Zjištěné poznatky přispěly k bližšímu poznání genů aktivních během vývoje osemení *Medicago truncatula*, pravděpodobně řízených MtMYB5 a MtPAR transkripčními faktory. Pro navazující výzkumnou činnost se nabízí studium genů ovlivňujících dřívější kroky biosyntetické dráhy proanthokyanidinů, případně rozšíření počtu analyzovaných genů o jejich další formy, patřící do stejné multigenové rodiny. Velkým přínosem bude také provedení obsáhlejší analýzy složení osemení, na níž ve spolupráci s Doc. Bednářem již nyní laboratoř Doc. Smýkala pracuje.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

4CL	4-kumarát CoA ligáza
5S rDNA	oblast DNA kódující 5S rRNA protein
A	absorbance
ANR; MtANR	anthokyanidin reduktáza
ANS; MtANS	anthokyanidin syntáza
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i> transkripční faktor
bp	páry bází
BSA	bovinní sérový albumin
C	množství jaderné DNA reprezentující jednu úplnou kopii jaderného genomu
C4H	cinnamát 4-hydroxyláza
CCD	<i>charge-coupled device</i>
cDNA	DNA uměle syntetizovaná dle templátu mediátorové RNA
CoA	koenzym A
C_i; C_q	cyklus, ve kterém dochází k nárůstu fluorescence nad prahovou hodnotu
DAP	dny po opylení (<i>days after pollination</i>)
DFR1,-2	dihydroflavonol 4-reduktázy
DMACA	4-(dimethylamino)cinnamaldehyd
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EMS	ethylmethan sulfonát
F	forward sekvence primeru
F3'H	flavonoid hydroxyláza
FDR	flavan 3,4-diol reduktáza
FLS	flavonol syntáza
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
HCl	kyselina chlorovodíková
HID	2-hydroxyizoflavon dehydratáza
CHI	chalkon izomeráza
CHR	chalkon reduktáza
CHS	chalkon syntáza
IFR1, IFR2	izoflavon reduktázy

IFS	izoflavon syntázy
IOMT	izoflavonoid O-methyltransferáza
KNOX4	<i>KNOTTED-like homeobox</i> gen II. třídy
LAP1; MtLAP1	transkripční faktor <i>Legume anthocyanin production</i>
LAR	leukoanthokyanidin reduktáza
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
LDOX	viz ANS
M.	rod <i>Medicago</i>
MATE-1, -2	<i>multidrug and toxic compound extrusion</i> transportéry
MBW	uskupení tří transkripčních faktorů rodin MYB, bHLH a WD40
ml.	mladší
MtRR1	<i>Medicago truncatula response regulator 1</i>
MYB-2, -5 (Mt)	transkripční faktory patřící do <i>myeloblastosis</i> rodiny
myb5	označení orgánu, rostliny či linie s defektním genem (Mt)MYB5
MYBL2	<i>myeloblastosis oncogene-like 2</i> transkripční faktor
MSC27	konstitutivně exprimovaný translačně regulovaný homolog nádorového proteinu
NaOH	hydroxid sodný
OMT	o-methyltransferáza
PA	proanthokyanidiny
PAL	fenylalanin ammonium lyáza
par	označení orgánu, rostliny či linie s defektním genem (Mt)PAR
PAR; MtPAR	transkripční faktor (<i>Medicago truncatula</i>) proanthocyanidin regulator
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDA	detektor diodového pole
PDF2	protodermální faktor 2
PVP	polyvinylpyrrolidon, 1-ethenyl-2-pyrrolidon
R	reverse sekvence primeru
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu (<i>revolutions per minute</i>)
rRNA	ribozomální RNA
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
st.	starší

TALENs	transkripčním aktivátorům podobné efektorové nukleázy
TBE	Tris-borátový pufr
T-DNA	transferová DNA, vnášená do genomu hostitelské buňky vektorem <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>Tnt1</i>	typ tabákového retrotranspozonu
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TT8-12; MtTT8	transkripční faktor <i>transparent testa</i>
UDP	uridindifosfát
UGT78G1,-72L1	uridindifosfát glukosyltransferázy
UTR	oblast mRNA nepřekládaná do struktury proteinu (<i>untranslated region</i>)
UV	ultrafialové záření
WD40; MtWD40-1	transkripční faktor s <i>beta-transducin repeat</i> strukturním motivem
<i>wild-type</i>	planá forma

9 LITERATURA

ABBO S., SARANGA Y., PELEG Z. (2009) Reconsidering Domestication Of Legumes Versus Cereals In The Ancient Near East. *The Quarterly Review of Biology*, **84**, 29-50.

ABE I., SEKI T., UMEHARA K., MIYASE T., NOGUCHI H., SAKAKIBARA J., ONO T. (2000) Green Tea Polyphenols: Novel and Potent Inhibitors of Squalene Epoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268, 767-771.

AERTS R.J., BARRY T.N., MCNABB W.C. (1999) Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **75**, 1-12.

AHMAD N., GUPTA S., MUKHTAR H. (2000) Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate Differentially Modulates Nuclear Factor κ B in Cancer Cells versus Normal Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376, 338-346.

ALONSO J.M., STEPANOVA A.N., LEISSE T.J., KIM C.J., CHEN H., SHINN P., STEVENSON D.K., ZIMMERMAN J., BARAJAS P., CHEUK R., GADRINAB C., HELLER C., JESKE A., KOESEMA E., MEYERS C.C., PARKER H., PREDNIS L., ANSARI Y., CHOI N., DEEN H., GERALT M., HAZARI N., HOM E., KARNES M., MULHOLLAND C., NDUBAKU R., SCHMIDT I., GUZMAN P., AGUILAR-HENONIN L., SCHMID M., WEIGEL D., CARTER D.E., MARCHAND T., RISSEEUW E., BROGDEN D., ZEKO A., CROSBY W.L., BERRY C.C., ECKER J.R. (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.

APPELHAGEN I., THIEDIG K., NORDHOLT N., SCHMIDT N., HUEP G., SAGASSER M., WEISSHAAR B. (2014) Update on transparent testa mutants from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of new alleles from an isogenic collection. *Planta*, **240**, 955–970.

AVRAMOVIC V., VLAHOVIC P., MIHAILOVIC D., STEFANOVIC V. (1999) Protective effect of a bioflavonoid proanthocyanidin-BP1 in glycerol-induced acute renal failure in the rat: renal stereological study. *Renal Failure*, 21, 627-634.

BAGCHI D., BAGCHI M., STOHS S.J., DAS D.K., RAY S.D., KUSZYNSKI C.A., JOSHI S.S., PRUESS H.G. (2000) Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148, 187-197.

BARKER D.G., BIANCHI S., BLONDON F., DATTÉE Y., DUC G., ESSAD S., FLAMENT P., GALLUSCI P., GÉNIER G., GUY P., MUEL X., TOURNEUR J., DÉNARIÉ J., HUGUET T. (1990) *Medicago truncatula*, a Model Plant for Studying the Molecular Genetics of the Rhizobium-Legume Symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 8, 40-49.

BASKIN C.C., BASKIN J.M. (2014) *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination* Second edition. USA: Academic Press.

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

BASKIN J.M., BASKIN C.C., LI X. (2000) Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, 15, 139–152.

BAUDRY A., HEIM M.A., DUBREUCQ B., CABOCHE M., WEISSHAAR B., LEPINIEC L. (2004) TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 39, 366–380.

BLONDON F., MARIE D., BROWN S., KONDOROSI A. (1994) Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*, 37, 264-270.

BONNIN I., HUGUET T., GHERARDI M., PROSPERI J.M., OLIVIERI I. (1996) High Level of Polymorphism and Spatial Structure in a Selfing Plant Species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), Shown Using RAPD Markers. *American Journal of Botany*, 83, 843-855.

BRINK R.A., COOPER D.C. (1940) Double Fertilization and Development of the Seed in Angiosperms. *Botanical Gazett*, 102, 1-25.

BUCHTOVÁ T. (2016) Analýza mutantních linií vojtěšky (*Medicago truncatula* Gaertn.) pro studium funkce genů aktivních během vývoje osemení. Bakalářská práce. Olomouc.

BUITINK J., LEGER J.J., GUISLE I., VU B.L., WUILLÈME S., LAMIRAULT G., BARS A.L., MEUR N.L., BECKER A., KÜSTER H., LEPRINCE O. (2006) Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *The Plant Journal*, 47, 735–750.

BUITINK J., LY VU B., SATOUR P., LEPRINCE O. (2003) The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. *Seed Science Research*, **13**, 273–286.

BUSTIN S.A., BENES V., GARSON J.A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J., WITTEWER C.T. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical chemistry*, **55**, 611–622.

COOK D.R. (1999) *Medicago truncatula* — a model in the making!. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**, 301-304.

COLLARD B.C.Y., DAS A., VIRK P.S., MACKILL D.J. (2007) Evaluation of „quick and dirty“ DNA extraction methods for marker assisted selection in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding*, **126**, 47–50

DAUER A., HENSEL A., LHOSTE E., KNASMÜLLER S., MERSCH-SUNDERMANN V. (2003) Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis. *Phytochemistry*, **63**, 199-207.

DEBEAUJON I., LÉON-KLOOSTERZIEL K.M., KOORNNEEF M. (2000) Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **122**, 403–413

D'ERFURTH I., COSSON V., ESCHSTRUTH A., LUCAS H., KONDOROSI A., RATET P. (2003) Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *The plant journal*, **34**, 95-106.

DIXON R.A., XIE D.-Y., SHARMA S.B. (2005) Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, **165**, 9-28.

DJEMEL N., GUEDON D., LECHEVALIER A., SALON C., MIQUEL M., PROSPERI J.-M., ROCHAT C., BOUTIN J.-P. (2005) Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**, 557-566.

DUBOS C., LE GOURRIEREC J., BAUDRY A., HUEP G., LANET E., DEBEAUJON I., ROUTABOUL J.M., ALBORESI A., WEISSHAAR B., LEPINIEC L. (2008) MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 55, 940-53.

FELDMANN K.A. (1991) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *The Plant Journal*, 1, 71-82.

FOLEY M.E. (2001) Seed dormancy: an update on terminology, physiological genetics, and quantitative trait loci regulating germinability. *Weed Science*, 49, 305-317.

FRAME J. (c2017) *Medicago truncatula* Gaertn., In *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Available at: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gbase/data/meditrunc.htm> [Accessed February 27, 2017].

FREY A., GODIN B., BONNET M., SOTTA B., MARION-POLL A. (2004) Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*, 218, 958–964.

GALLARDO K., LESIGNOR K., DARMENCY M., BURSTIN J., THOMPSON R., ROCHAT C., BOUTIN J. P., KUESTER H., BUITINK J., LEPRINCE O., LIMAMI A., GRUSAK M. A. (2006) Seed Biology of *Medicago truncatula*. In: *The Medicago truncatula handbook*. ed. Mathesius U., Journet E. P., Sumner L. W. ISBN 0-9754303-1-9.

GRANDBASTIEN M.-A., SPIELMANN A., CABOCHE M. (1989) Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics. *Nature*, 337, 376-380.

HANDBERG K., STOUGAARD J. (1992) *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2, 487-496.

HARPER J.L. (1957) The ecological significance of dormancy and its importance in weed control, In *Proceedings of the Fourth International Congress of Crop Protection*, pp. 415-420. Hamburg.

HE F., PAN Q.-H., SHI Y., DUAN C.-Q. (2008) Biosynthesis and Genetic Regulation of Proanthocyanidins in Plants. *Molecules*, 13, 2674-2703.

HEID C.A., STEVENS J., LIVAK K.J., WILLIAMS P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-994.

HOFFMANN B., TRINH T.H., LEUNG J., KONDOROSI A., KONDOROSI E. (1997) A New *Medicago truncatula* Line with Superior in Vitro Regeneration, Transformation, and Symbiotic Properties Isolated Through Cell Culture Selection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10, 307-315.

HRADILOVÁ I., TRNĚNÝ O., VÁLKOVÁ M., CECHOVA M., JANSKÁ A., KHAN A.W., PROKEŠOVÁ L., WINTER P., ROTTER B., KREZDORN N., VARSHNEY R.K., HANÁČEK P., SOUKUP A., BEDNÁŘ 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.

CHAI M., ZHOU C., MOLINA I., F, C., NAKASHIMA J., LI G., ZHANG W., PARK J., TANG Y., JIANG Q., WANG Z.Y. (2016) A class II KNOX gene, KNOX4, controls seed physical dormancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 6997–7002.

CHENG X., WANG M., LEE H.-K., TADEGE M., RATET P., UDVARDI M., MYSORE K.S., WEN J. (2014) An efficient reverse genetics platform in the model legume *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 201, 1065-1076.

CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.

IWASHINA T. (2000) The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research*, 113, 287-299.

JANIĆJEVIĆ J., TOŠIĆ S., MITROVIĆ T. (2007) Flavonoids in plants. *9th Symposium on Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions*, 153-156.

JUN J.H., LIU C., XIAO X., DIXON R.A. (2015) The Transcriptional Repressor MYB2 Regulates Both Spatial and Temporal Patterns of Proanthocyanidin and Anthocyanin Pigmentation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 27, 2860-2879.

- KANDIL F.E., SMITH M.A.L., ROGERS R.B., PÉPIN M.-F., SONG L.L., PEZZUTO J.M., SEIGLER D.S. (2002)** Composition of a Chemopreventive Proanthocyanidin-Rich Fraction from Cranberry Fruits Responsible for the Inhibition of 12- O -Tetradecanoyl Phorbol-13-acetate (TPA)-Induced Ornithine Decarboxylase (ODC) Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1063-1069.
- KAPROS T., BOGRE L., NEMETH K., BAKÓ L., GYORGYEY J., WU S.C., DUDITS D. (1992)** Differential Expression of Histone H3 Gene Variants during Cell Cycle and Somatic Embryogenesis in Alfalfa. *Plant Physiology*, 98, 621-625.
- KAYE T.N., KUYKENDALL K. (2001)** Effects of scarification and cold stratification on germination of *Lupinus sulphureus* ssp. *kincaidii*. *Seed Science and Technology*, 29, 663-668.
- KOINANGE E.M.K., SINGH S.P., GEPTS P. (1996)** Genetic Control of the Domestication Syndrome in Common Bean. *Crop Science*, 36, 1037-1045.
- KULIKOVA O., GUALTIERI G., GEURTS R., KIM D.-J., COOK D., HUGUET T., DE JONG J.H., FRANSZ P.F., BISSELING T. (2001)** Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 27, 49-58.
- LADIZINSKY G. (1985)** The genetics of hard seed coat in the genus *Lens*. *Euphytica*, 34, 539–543.
- LAVIN M., HERENDEEN P., WOJCIECHOWSKI M. (2005)** Evolutionary Rates Analysis of Leguminosae Implicates a Rapid Diversification of Lineages during the Tertiary. *Systematic Biology*, 54, 575-594.
- LEPINIEC L., DEBEAUJON I., ROUTABOUL J.-M., BAUDRY A., POURCEL L., NESI N., CABOCHE M. (2006)** Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 405-430.
- LESINS K.A., LESINS I. (1979)** *Genus Medicago (Leguminosae): A Taxogenetic Study*. The Netherlands: Junk.
- LI P., DONG Q., GE S., HE X., VERDIER J., LI D., ZHAO J. (2016A)** Metabolic engineering of proanthocyanidin production by repressing the isoflavone pathways and redirecting anthocyanidin precursor flux in legume. *Plant Biotechnology Journal*, 14, 1604-1618.

LI P., CHEN B., ZHANG G., CHEN L., DONG Q., WEN J., MYSORE K.S., ZHAO J. (2016B) Regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis by *Medicago truncatula* bHLH transcription factor MtTT8. *New Phytologist*, 210, 905-921.

LIU C., JUN J.H., DIXON R.A. (2014) MYB5 and MYB14 Play Pivotal Roles in Seed Coat Polymer Biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 165, 1424-1439.

LI S.F., MILLIKEN O.N., PHAM H., SEYIT R., NAPOLI R., PRESTON J., KOLTUNOW A.M., PARISH R.W. (2009) The Arabidopsis MYB5 Transcription Factor Regulates Mucilage Synthesis, Seed Coat Development, and Trichome Morphogenesis. *The Plant Cell*, 21, 72–89.

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25, 402-408.

LUSH W.M., EVANS L.T. (1980) The seed coats of cowpeas and other grain legumes: Structure in relation to function. *Field Crops Research*, 3, 267-286.

MA F., CHOLEWA E., MOHAMED T., PETERSON C.A., GIJZEN M. (2004) Cracks in the Palisade Cuticle of Soybean Seed Coats Correlate with their Permeability to Water. *Annals of Botany*, 94, 213-228.

MANGAN J.L. (1959) Bloat in cattle. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 2, 47-61.

McFARLANE H.E., GENDRE D., WESTERN T.L. (2014) Seed Coat Ruthenium Red Staining Assay. *Bio-protocol*, 4, e1096

MHIRI C., MOREL J.-B., VERNHETTES S., CASACUBERTA J.M., LUCAS H., GRANDBASTIEN M.-A. (1997) The promoter of the tobacco Tnt1 retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Molecular Biology*, 33, 257-266.

MODOLO L.V., LI L., PAN H., BLOUNT J.W., DIXON R.A., WANG X. (2009) Crystal Structures of Glycosyltransferase UGT78G1 Reveal the Molecular Basis for Glycosylation and Deglycosylation of (Iso)flavonoids. *Journal of molecular biology*, 392, 1292-1302.

MOÏSE J.A., HAN S., GUDYNAITE-SAVITCH L., JOHNSON D.A., MIKI B.L.A. (2005) Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 41, 620-644.

NIEZEN J.H., CHARLESTON W.A.G., ROBERTSON H.A., SHELTON D., WAGHORN G.C., GREEN R. (2002) The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 105, 229-245.

NIEZEN J.H., WAGHORN T.S., WAGHORN C.G., CHARLESTON W.A.G. (1993) Internal parasites and lamb production - a role for plants containing condensed tannins? *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 53, 235-238.

NITHIYANANTHAM S., SELVAKUMAR S., SIDDHURAJU P. (2012) Total phenolic content and antioxidant activity of two different solvent extracts from raw and processed legumes, *Cicer arietinum* L. and *Pisum sativum* L. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27.

OFFLER C.E., PATRICK J.W. (1993) Pathway of Photosynthate Transfer in the Developing Seed of *Vicia faba* L: A Structural Assessment of the Role of Transfer Cells in Unloading from the Seed Coat. *Journal of Experimental Botany*, 44, 711-724.

PANG Y., PEEL G.J., SHARMA S.B., TANG Y., DIXON R.A. (2008) A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 14210–14215.

PANG Y., PEEL G.J., WANG Z., DIXON R.A. (2007) Early Steps in Proanthocyanidin Biosynthesis in the Model Legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 145, 601-615.

PANG Y., WENGER J.P., SAATHOFF K., PEEL G.J., WEN J., HUHMANN D., ALLEN S.N., TANG Y., CHENG X., TADEGE M., RATET P., MYSORE K.S., SUMNER L.W., MARKS M.D., DIXON R.A. (2009) A WD40 Repeat Protein from *Medicago truncatula* Is Necessary for Tissue-Specific Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis But Not for Trichome Development. *Plant Physiology*, 151, 1114-1129.

PATRICK J.W., OFFLER C.E. (2001) Compartmentation of transport and transfer events in developing seeds. *Journal of Experimental Botany*, 52, 551-564.

PEEL G.J., PANG Y., MODOLO L.V., DIXON R.A. (2009) The LAP1 MYB transcription factor orchestrates anthocyanidin biosynthesis and glycosylation in *Medicago*. *The Plant Journal*, 59, 136–149.

PISLARIU C.I., D. MURRAY J., WEN J., COSSON V., MUNI R.R.D., WANG M., A. BENEDITO V., ANDRIANKAJA A., CHENG X., JEREZ I.T., MONDY S., ZHANG S., TAYLOR M.E., TADEGE M., RATET P., MYSORE K.S., CHEN R., UDVARDI M.K. (2012) A *Medicago truncatula* Tobacco Retrotransposon Insertion Mutant Collection with Defects in Nodule Development and Symbiotic Nitrogen Fixation: 900 let od první písemné zprávy : 1104-2004. *Plant Physiology*, **159**, 1686-1699.

PORTER L.J. (1989) Tannins, In *Plant phenolics: Methods in Plant Biochemistry*, pp. 389-419. New York: Academ. Press.

POURCEL L., ROUTABOUL J. R., KERHOAS L., CABOCHE M., LEPINIEC L., DEBEAUJON I. (2005) TRANSPARENT TESTA10 Encodes a Laccase-Like Enzyme Involved in xydative Polymerization of Flavonoids in Arabidopsis Seed Coat. *Plant Cell*, **17**, 2966–2980.

ROLSTON M.P. (1978) Water impermeable seed dormancy. *The Botanical Review*, **44**, 365–396.

RONFORT J., BATAILLON T., SANTONI S., DELALANDE M., DAVID J.L., PROSPERI J.-M. (2006) Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, **6**, 28-.

ROUTABOUL J.-M., KERHOAS L., DEBEAUJON I., POURCEL L., CABOCHE M., EINHORN J., LEPINIEC L. (2006) Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **224**, 96–107.

SALUNKHE D.K., JADHAV S.J., KADAM S.S., CHAVAN J.K., LUH B.S. (1982) Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **17**, 277-305.

SERAFINI M., BUGIANESI R., MAIANI G., VALTUENA S., DE SANTIS S., CROZIER A. (2003) Plasma antioxidants from chocolate. *Nature*, **424**, 1013-1013.

SETIA R.C., SETIA N., MALIK C.P. (1987) The podwall structure and function in relation to seed development in some legumes. *Phyton*, **27**, 205-220.

SMALL E., BROOKES B. (1982) Coiling of alfalfa pods in relation to resistance against seed chalcids. *Canadian Journal of Botany*, **62**, 131-135.

- SMALL E., LASSEN P., BROOKES B.S. (1987)** An Expanded Circumscription of *Medicago* (Leguminosae, Trifolieae) Based on Explosive Flower Tripping. *Willdenowia*, **16**, 415-437.
- 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**, 1-19.
- STAFFORD H.A. (1997)** Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots. *The Botanical Review*, **63**, 27-39.
- SUBARNAS A., WAGNER H. (2000)** Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin shelleagueain A from *Polypodium feei* METT. *Phytomedicine*, **7**, 401-405.
- TADEGE M., WEN J., HE J., TU H., KWAK Y., ESCHSTRUTH A., CAYREL A., ENDRE G., ZHAO P.X., CHABAUD M., RATET P., MYSORE (2008)** *The Plant Journal*, **54**, 335-347.
- TANNER G.J., FRANCKI K.T., ABRAHAMS S., WATSON J.M., LARKIN P.J., ASHTON A.R. (2003)** Proanthocyanidin Biosynthesis in Plants: PURIFICATION OF LEGUME LEUCOANTHOCYANIDIN REDUCTASE AND MOLECULAR CLONING OF ITS cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 31647-31656.
- TANNER G.J., MOATE P.J., DAVIS L.H., LABY R.H., LI Y.G., LARKIN P.J., LI Y.G. (1995)** Proanthocyanidins (condensed tannin) destabilise plant protein foams in a dose dependent manner. *Australian Journal of Agricultural Research*, **46**, 1101-1109.
- TAYLOR G.B. (1981)** Effect of Constant Temperature Treatments Followed by Fluctuating Temperatures on the Softening of Hard Seeds of *Trifolium subterraneum* L. *Australian Journal of Plant Physiology*, **8**, 547 - 558.
- TAYLOR S., WAKEM M., DIJKMAN G., ALSARRAJ M., NGUYEN M. (2010)** A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, **50**, S1-S5.
- THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION (C2008-2017)** Welcome to the database of *Medicago truncatula* mutants, In *The Samuel Roberts Noble Foundation*, Ardmore. Available at: <https://medicago-mutant.noble.org/mutant/> [Accessed April 24, 2017].

THORNE J.H. (1979) Assimilate redistribution from soybean pod walls during seed development. *Agronomy Journal*, **71**, 812-817.

VAN DONGEN J.T., AMMERLAAN A.M.H., WOUTERLOOD M., VAN AELST A.C., BORSTLAP A.C. (2003) Structure of the Developing Pea Seed Coat and the Post-phloem Transport Pathway of Nutrients. *Annals of Botany*, **91**, 729–737.

VERDIER J., ZHAO J., TORRES-JEREZ I., GE S., LIU C., HE X., MYSORE K.S., DIXON R.A., UDVARDI M.K. (2012) MtPAR MYB transcription factor acts as an on switch for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 1766-1771.

VERNHETTES S., GRANDBASTIEN M.-A., CASACUBERTA J.M. (1997) In vivo characterization of transcriptional regulatory sequences involved in the defence-associated expression of the tobacco retrotransposon Tnt1. *Plant Molecular Biology*, **35**, 673-679.

VINSON J.A., MANDARANO M.A., SHUTA D.L., BAGCHI M., BAGCHI D. (2002) *Molecular and Cellular Biochemistry*, **240**, 99-103.

WADA S., KENNEDY J.A., REED B.M. (2011) Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. *Scientia Horticulturae*, **130**, 762-768

WALKER A.R., DAVISON P.A., BOLOGNESI-WINFIELD A.C., JAMES C.M., SRINIVASAN N., ESCH J.J., MARKS M.D., GRAY J.C. (1999) The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 Locus, Which Regulates Trichome Differentiation and Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis*, Encodes a WD40 Repeat Protein. *The Plant Cell*, **11**, 1337-1349.

WANG C.S., VODKIN L. (1994) Extraction of RNA from Tissues Containing High Levels of Procyanidins that Bind RNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, **12**, 132-145.

WANG H.L., GRUSAK M.A. (2005) Structure and Development of *Medicago truncatula* Pod Wall and Seed Coat. *Annals of Botany*, **95**, 737–774. Available at: <https://academic.oup.com/aob/article-lookup/doi/10.1093/aob/mci080>.

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

WESSLER S.R. (2006) Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 17600-17601.

WRIGHT C., PERKINS D., DAWOD A., MIN B.R., TERRILL T.H., MILLER J.E., VINES T., GURUNG N. (2016) The Effects of Phytochemical Tannin Containing Diets on Meat Goat Performance and Drug Resistant *Haemonchus contortus* Control. *International Journal of Veterinary Health Science*, 4, 104-109.

XIE D.-Y., SHARMA S.B., DIXON R.A. (2004) Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 422, 91–102.

XU W., GRAIN D., BOBET S., LE GOURRIEREC J., THÉVENIN J., KELEMEN Z., LEPINIEC L., DUBOS C. (2014) Complexity and robustness of the flavonoid transcriptional regulatory network revealed by comprehensive analyses of MYB-bHLH-WDR complexes and their targets in *Arabidopsis* seed. *New Phytologist*, 202, 132–144.

XU W., GRAIN D., LE GOURRIEREC J., HARSCOËT E., BERGER A., JAUVION V., SCAGNELLI A., BERGER N., BIDZINSKI P., KELEMEN Z., SALSAC F., BAUDRY A., ROUTABOUL J.-M., LEPINIEC L., DUBOS C. (2013) Regulation of flavonoid biosynthesis involves an unexpected complex transcriptional regulation of TT8 expression, in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 198, 59–70.

YOUNG N.D., DEBELLÉ F., OLDROYD G.E.D., GEURTS R., CANNON S.B., UDVARDI M.K., BENEDITO V.A., MAYER K.F.X., GOUZY J., SCHOOF H., VAN DE PEER Y., PROOST S., COOK D.R., MEYERS B.C., SPANNAGL M., CHEUNG F., DE MITA S., KRISHNAKUMAR V., GUNDLACH H., ZHOU S., MUDGE J., BHARTI A.K., MURRAY J.D., NAOUMKINA M.A., ROSEN B., SILVERSTEIN K.A.T., TANG H., ROMBAUTS S., ZHAO P.X., ZHOU P., BARBE V., BARDOU P., BECHNER M., BELLEC A., BERGER A., BERGÈS H., BIDWELL S., BISSELING T., CHOISNE N., COULOUX A., DENNY R., DESHPANDE S., DAI X., DOYLE J.J., DUDEZ A.-M., FARMER A.D., FOUTEAU S., FRANKEN C., GIBELIN C., GISH J., GOLDSTEIN S., GONZÁLEZ A.J., GREEN P.J., HALLAB A., HARTOG M., HUA A., HUMPHRAY S.J., JEONG D.-H., JING Y., JÖCKER A., KENTON S.M., KIM D.-J., KLEE K., LAI H., LANG C., LIN S., MACMIL S.L., MAGDELENAT G., MATTHEWS L., MCCORRISON J., MONAGHAN E.L., MUN J.-H., NAJAR F.Z., NICHOLSON C., NOIROT C., O'BLENESS M., PAULE C.R., POULAIN J., PRION F., QIN B., QU C., RETZEL E.F., RIDDLE C., SALLET E., SAMAIN S., SAMSON N., SANDERS I., SAURAT O., SCARPELLI C., SCHIEX T., SEGURENS B., SEVERIN A.J., SHERRIER D.J., SHI R.,

SIMS S., SINGER S.R., SINHARROY S., STERCK L., VIOLLET A., WANG B.-B., WANG K., WANG M., WANG X., WARFSMANN J., WEISSENBACH J., WHITE D.D., WHITE J.D., WILEY G.B., WINCKER P., XING Y., YANG L., YAO Z., YING F., ZHAI J., ZHOU L., ZUBER A., DÉNARIÉ J., DIXON R.A., MAY G.D., SCHWARTZ D.C., ROGERS J., QUÉTIER F., TOWN C.D., ROE B.A. (2011) The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, 480, 520-524.

YOUNG N.D., MUDGE J., ELLIS T.H.N. (2003) Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 199-204.

YOUNG N.D., UDVARDI M. (2009) Translating Medicago truncatula genomics to crop legumes. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 193-201.

ZHAO J., DIXON R.A. (2009) MATE Transporters Facilitate Vacuolar Uptake of Epicatechin 3'-O-Glucoside for Proanthocyanidin Biosynthesis in Medicago truncatula and Arabidopsis. *The Plant Cell*, **21**, 2323-2340.

10 PŘÍLOHY



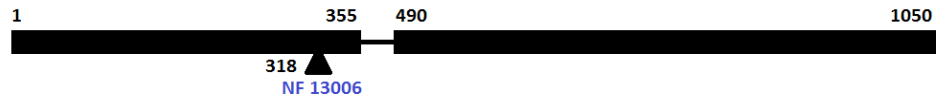
Obrázek P1. Rostlina *Medicago truncatula* v období mezi květenstvími.



Obrázek P2A,B,C,D. Fenotypové srovnání semen *Medicago truncatula* s ohledem na přítomnost mutace v zájmových genech. A - *wild-type* semeno linie NF13006 s funkčním genem MtMYB5; B - semeno linie NF13006 s defektním genem MtMYB5; C - *wild-type* semeno linie NF4419 s funkčním genem MtPAR; D - semeno linie NF4419 s defektním genem MtPAR. Zvětšení mikroskopu 10x (C, D), 30x (A, B).



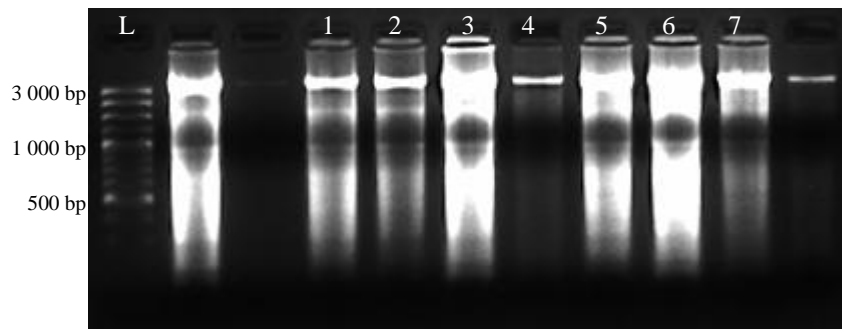
Obrázek P3a. Schematické znázornění inserce *Tnt1* retrotranspozonu v genu MtPAR u linií NF2466 a NF4419. Gen je umístěn na osmém chromozomu *M. truncatula*, skládá se ze tří exonů o celkové délce cDNA 762 bp. Retrotranspozon je v linii NF4419 umístěn ve druhém exonu mezi pozicemi 198 a 499 bp, v linii NF2466 je umístěn ve třetím exonu mezi pozicemi 732 a 733 bp (převzato z Buchtová 2016).



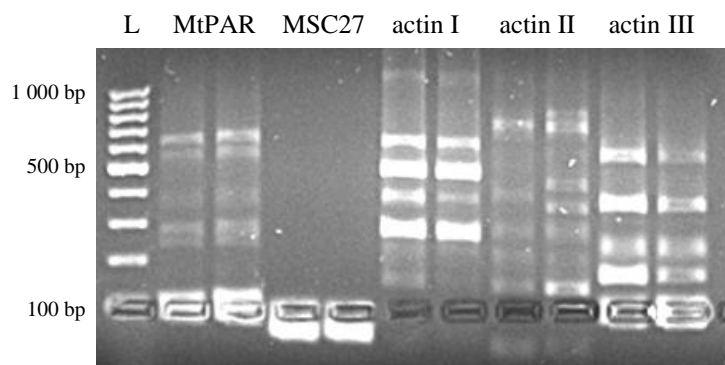
Obrázek P3b. Schematické znázornění inserce *Tnt1* retrotranspozonu v genu MtMYB5 u linie NF13006. Gen je umístěn na třetím chromozomu *M. truncatula*, skládá se ze dvou exonů, přičemž celková délka jejich cDNA je 915 bp. Retrotranspozon je umístěn v prvním exonu mezi pozicemi 318 a 319 bp (převzato z Buchtová 2016).



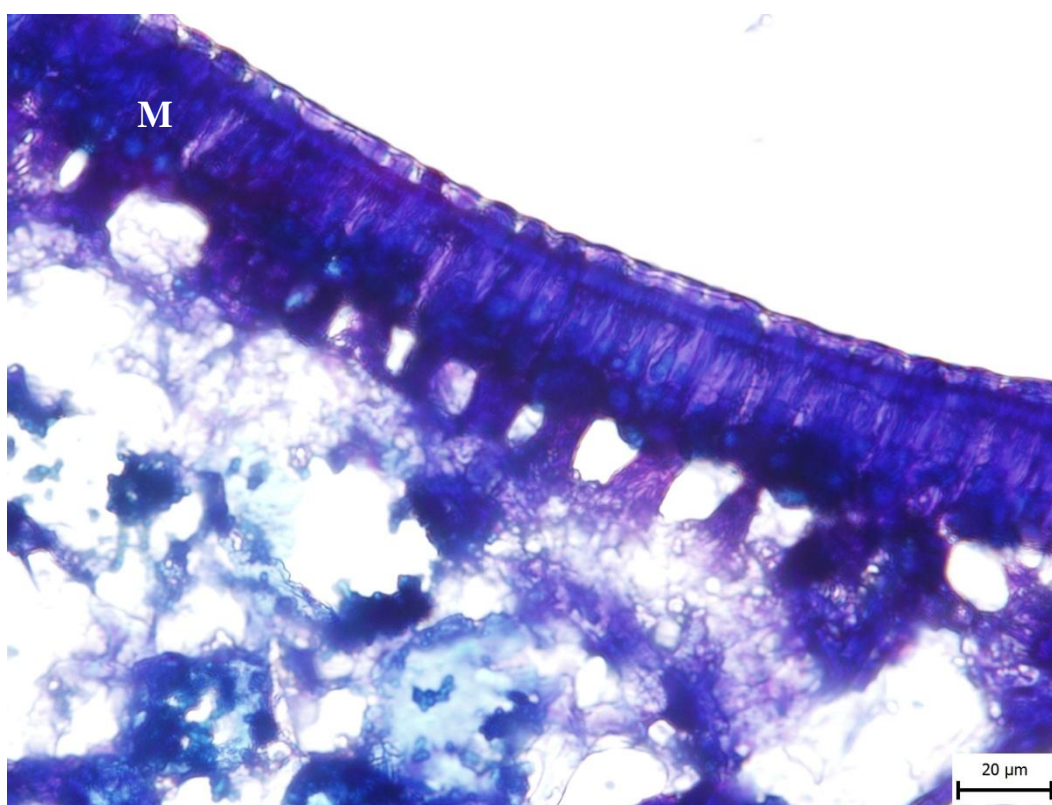
Obrázek P4. Vizualizace elektroforetické separace fragmentů PCR amplifikace vzniklých při použití primerů MtMYB5 F + R (vzorky číslo 1-12) a MtMYB5 F + *Tnt1*F (vzorky 13-24), provedené pro určení přítomnosti či absence *Tnt1* inzertu v genu MtMYB5 u dvanácti vzorků rostlin *Medicago truncatula*.



Obrázek P5. Vizualizace kontrolní elektroforetické separace RNA izolované ze studovaných rostlin *Medicago truncatula*. L - standard molekulové hmotnosti; 1 - NF13006 *myb5* ml.; 2 - NF13006 *myb5* st.; 3 - NF2466 *par* ml.; 4 - NF2466 *par* st.; 5 - NF4419 *par* ml.; 6 - NF4419 *par* st.; 7 - NF2466 *wild-type* ml.

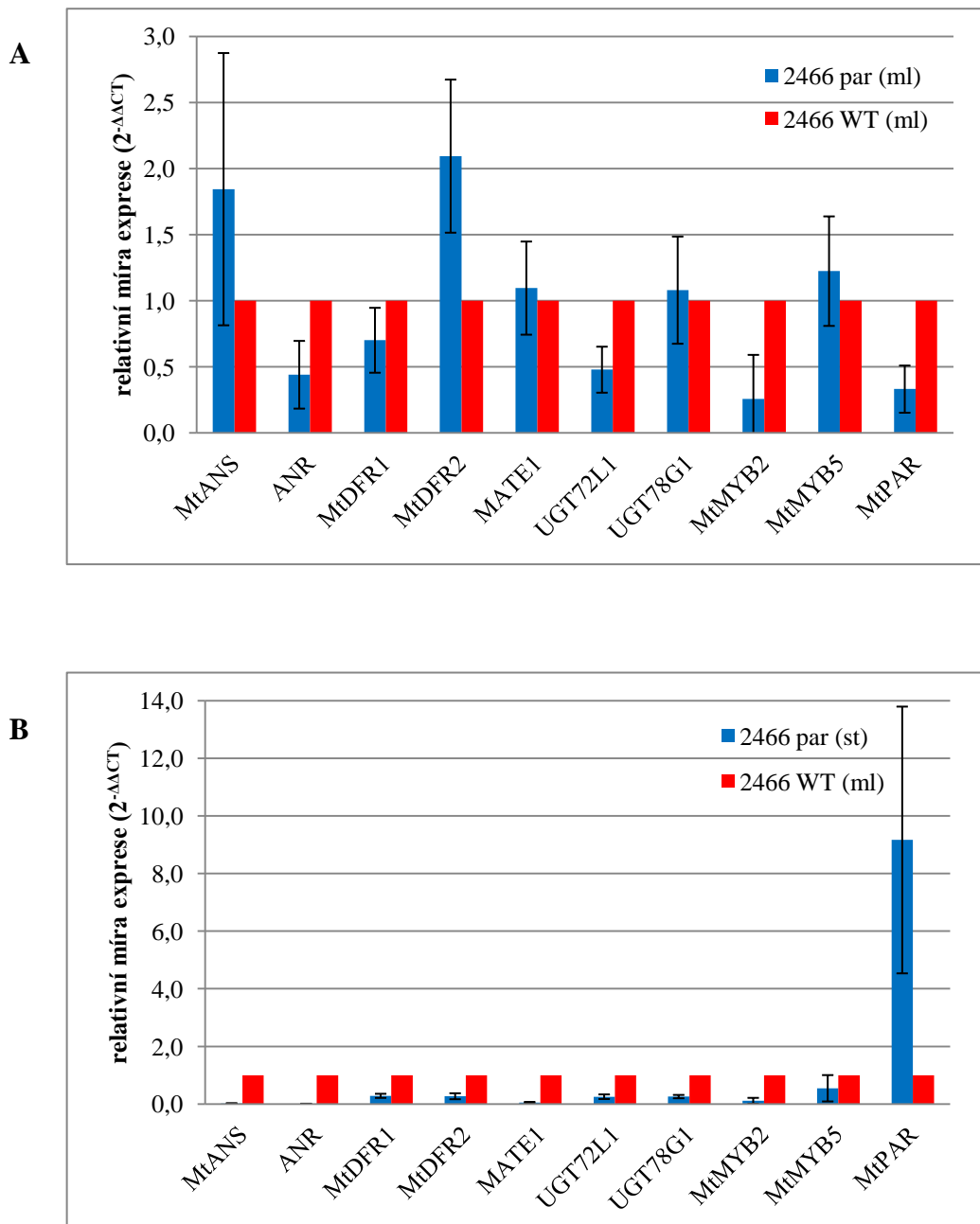


Obrázek P6. Fragменты vzniklé elektroforetickou separací produktů PCR amplifikace s primery MtPAR, MSC27 a se třemi návrhy primerů pro gen actin. Každý primer byl testován na dvou různých vzorcích cDNA, získaných ze semen *Medicago truncatula*. L - standard molekulové hmotnosti.

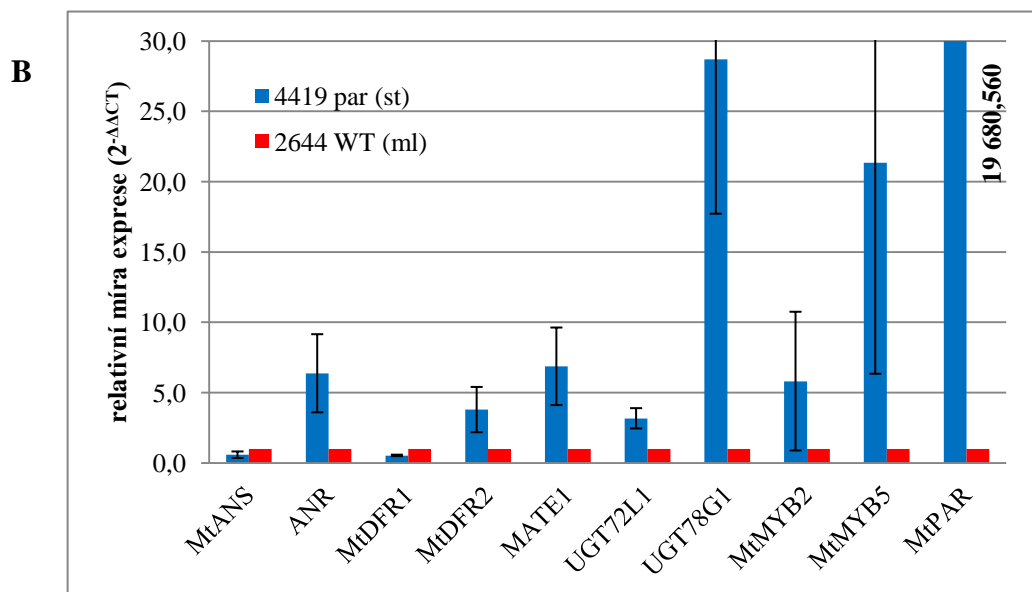
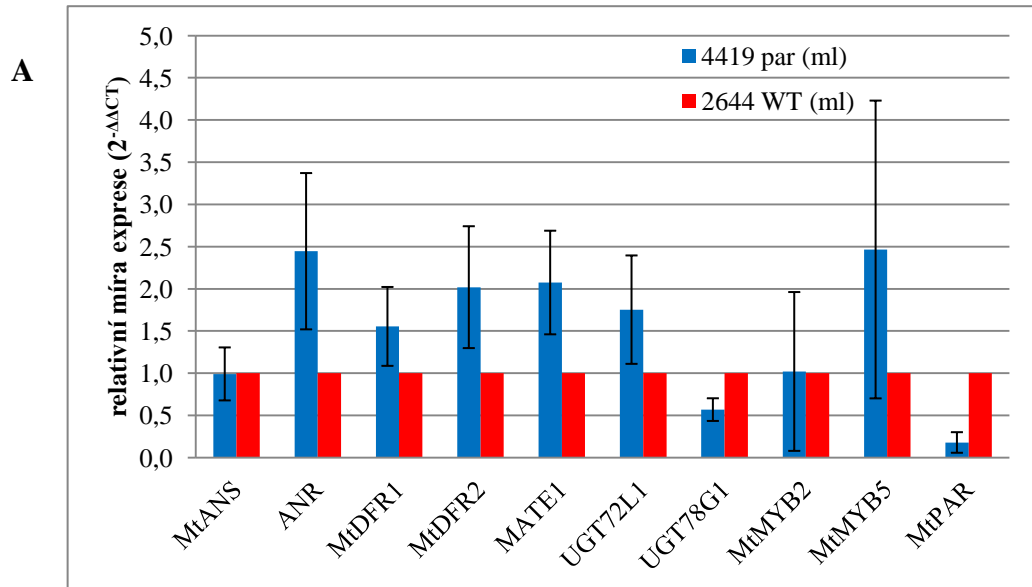


Obrázek P7. Mikroskopický obraz průřezu 12 DAP semenem *Medicago truncatula* po barvení toluidinovou modří. Neoptimalizovanou metodou barvení došlo zejména ke zvýraznění makroklereid osemení (M), na zbytku buněk je patrné mechanické poškození při tvorbě mikroskopických řezů. Zvětšení 400x.

Graf PGIA,B. Relativní míra exprese studovaných genů v osemeni různého stáří (A - mladší, B - starší) u *par* mutantních rostlin NF2466 a *wild-type* rostliny NF2466 vyjádřená jako hodnota $2^{-\Delta\Delta C_T}$.



Graf PGIIA,B. Relativní míra exprese studovaných genů v osemeni různého stáří (A - mladší, B - starší) u *par* mutantních rostlin NF4419 a *wild-type* rostliny NF2466 vyjádřená jako hodnota $2^{-\Delta\Delta C_T}$. U genu MtPAR v grafu B byl pro přehlednost zvolen menší rozsah stupnice na svislé ose, relativní míra exprese genu je popsána vedle příslušného modrého pole.



Tabulka PTL. Seznam primerů testovaných v diplomové práci, které nebyly dále využity.

gen	genem kódovaný produkt	sekvence primeru (3'-5'); forward (F), reverse (R)	reference
aktin	aktin	F - AGCTGAGTCATCAACACCCTCAT R - ACTCACACCGTCACCAGAATCC	Verdier <i>et al.</i> 2012
aktin	aktin	F - TCAATGTGCCTGCCATGTATGT R - ACTCACACCGTCACCAGAATCC	V. Vernoud, INRA, Francie
aktin	aktin	F - ACTCACACCGTCACCAGAATCC R - TCAATGTGCCTGCCATGTATGT	Li <i>et al.</i> 2016
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza	F - TGCCTACCGTCGATGTTTCAGT R - TTGCCCTCTGATTCCTCCTTG	V. Vernoud, INRA, Francie
PDF2	protodermální faktor 2	F - GTGTTTTGCTTCCGCCGTT R - CCAAATCTTGCTCCCTCATCTG	Verdier <i>et al.</i> 2012
LAR	leukoanthokyanidin reduktáza	F - GGAATAGCCGCAGAAAATTG R - CATGGCAACAAAGCTCTCAA	Li <i>et al.</i> 2016