

**UNIVERZITA PALACKÉHO
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Genová exprese během vývoje osemení hrachu
(*Pisum sativum* L.)**

Bakalářská práce

Vendula Krátká

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

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

Konzultant: Mgr. Iveta Hradilová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením pana Doc. Ing. Petra Smýkala, Ph.D. a Mgr. Ivety Hradilové a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

.....

Vendula Krátká

Souhrn

Krátce po oplození, obaly vajíčka začínají formovat osemení, které poskytuje vyvíjejícímu se embryu jak mechanickou ochranu, tak zároveň slouží jako přechodné zásobní pletivo zprostředkující tok živin z mateřské rostliny. Osemení se proto podílí na určení kvality semene, jako je velikost, složení semene, propustnost pro vodu a hormonální regulaci.

Pro pochopení genetických mechanismů řídících funkci a strukturu osemení je důležitá znalost genové exprese v jednotlivých stádiích vývoje. Analýza genové exprese (transkriptomika) je důležitou metodou vedoucí k pochopení funkce genů. Bylo zjištěno několik set diferenciálně exprimovaných genů během vývoje osemení hrachu.

V práci byla analyzována genová exprese 9 vybraných genů v osemení během tří vývojových stadií čtyř kontrastních, dvou kulturních (cv. Cameor a JI92) nedormantních a dvou planých (JI64 a L100) dormantních genotypů hrachu (*Pisum sativum* L. subsp. *sativum* a subsp. *elatius*). Výsledky potvrdily výchozí MACE analýzy a ukázaly dynamiku genové exprese během vývoje osemení.

Summary

Shortly after fertilization, the egg shells begin to form seed coat that provide mechanical protection of the developing embryo. The seed coat is also an important temporary storage tissue that mediates the flow of nutrients from the parent plant. The seed coat also contributes to determining seed quality such as size, seed composition, water permeability and hormonal regulation.

In order to understand the genetic mechanisms controlling the function and the structure of seed coat, knowledge of gene expression in the various stages of development is important. Analysis of gene expression (transcriptomics) is an important method for understanding the function of genes. Several hundred differentially expressed genes have been detected during the development of pea seed coat.

The gene expression of 9 selected genes during the three developmental stages of the seed coat was analyzed on four contrasting pea genotypes, two cultivated (cv. Cameor and JI92) nedormant and two wild (JI64 and L100) dormant ones (*Pisum sativum* L. subsp. *sativum* and subsp. *elatius*). The results have confirmed MACE analyses and showed dynamic pattern of developmentally regulated gene expression.

Poděkování

Děkuji Doc. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za odborné vedení práce a vstřícnost při konzultacích bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Ivetě Hradilové za odborný dohled během práce v laboratoři, za dobré rady a věcné připomínky.

Obsah

1 ÚVOD	1
2 CÍL PRÁCE.....	4
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	5
3.1. Hrách setý (<i>Pisum sativum</i> L.)	5
3.1.2. Původ.....	5
3.1.3. Taxonomické zařazení.....	5
3.1.4. Botanický popis	7
3.1.5. Genom hrachu	7
3.1.6. Karyotyp hrachu	8
3.1.7. Domestikace	9
3.2. Vývoj semene a osemení bobovitých	10
3.2.1. Semeno bobovitých	10
3.2.2. Embryo	11
3.2.3. Endosperm a perisperm	12
3.2.4. Osemení.....	12
3.2.6. Růst a vývoj.....	14
3.3 Genová exprese během vývoje semen.....	15
4 MATERIÁL A METODY	20
4.1. Biologický materiál	20
4.2. Použité chemikálie	20
4.3. Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	21
4.4. Pomůcky.....	22
4.5. Metody	23
4.5.1. Izolace RNA.....	23
4.5.2 Měření koncentrace RNA.....	24
4.5.3. Odstranění zbytkové genomové DNA.....	24
4.5.4 Přepis RNA do cDNA metodou dvoukrokové reverzní transkripce (RT-PCR).....	25
4.5.5. Amplifikace vybraných genů	25
4.5. 6. Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)	27
4.5.7 Horizontální agarózová elektroforéza	28
5 VÝSLEDKY	29
6 DISKUZE.....	35
7 ZÁVĚR.....	43
8 REFERENCE.....	44

Seznam symbolů a zkratek

5S rDNA - oblast DNA kódující 5S rRNA protein

A - absorbance

ABA - kyselina abscisová

ABH - alpha/beta hydrolase

ABI3 - ABA insensitive mutant

ANR; MtANR - anthokyanidin reduktáza

ANS; MtANS - anthokyanidin syntáza

bHLH - basic helix-loop-helix transkripční faktor

C - množství jaderné DNA reprezentující jednu úplnou kopii jaderného genomu

CCD - charge-coupled device

cDNA - complementary DNA

cM - centimorgan, jednotka relativní vzdálenosti genů na chromozomu

CoA - koenzym A

Ct; Cq - cyklus, ve kterém dochází k nárůstu fluorescence nad prahovou hodnotu

DAP - dny po opylení (days after pollination)

DEPC – diethyl pyrokarbonát

DMACA - 4-(dimethylamino)cinnamaldehyd

dNTP - deoxyribonukleotid trifosfát

F - forward sekvence primeru

FISH - fluorescenční in situ hybridizace

GAPDH - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

GA - giberellin

LAP1; MtLAP1 - transkripční faktor Legume anthocyanin production

LAR - leukoanthokyanidin reduktáza

lpa - low phytic acid

MACE - Massive Analysis of cDNA Ends

MBW - uskupení tří transkripčních faktorů rodin MYB, bHLH a WD40

ml. - mladší

MtRR1 – *Medicago truncatula* response regulator 1

MYB-2, -5 (Mt) - transkripční faktory patřící do myeloblastosis rodiny

myb5 - označení rostliny či linie s defektním genem (Mt)MYB5, mutant

MYBL2 - myeloblastosis oncogene-like 2 transkripční faktor

PA - proanthokyanidiny

par - označení orgánu, rostliny či linie s defektním genem (Mt)PAR

PAR; MtPAR - transkripční faktor (*Medicago truncatula*) proanthocyanidin regulator

PCR - polymerázová řetězová reakce

R - reverse sekvence primeru

rpm - otáčky za minutu (revolutions per minute)

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

Tnt1 - typ tabákového retrotranspozonu

Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethan

TT8-12; MtTT8 - transkripční faktor transparent testa

UDP - uridindifosfát

UTR - oblast mRNA nepřekládaná do struktury proteinu (untranslated region)

UV - ultrafialové záření

WD40; MtWD40-1 - transkripční faktor s beta-transducin repeat strukturním motivem

wild-type - planá forma

μE - μEinstein (jednotka osvětlení - Einstein)

Seznam obrázků

Obrázek 1: Fylogenetický strom podčeledi Fabae	6
Obrázek 2: Schematické znázornění karyotypu hrachu	8
Obrázek 3: Centra původu kulturních rostlin.....	10
Obrázek 4: Příčné řezy osemením v extrahilní oblasti barvené DMACA pro polycyklické protoantokyany	13
Obrázek 5: Příčné řezy semeny genotypu JI64 od nejmladšího po nejstarší stadium	20
Obrázek 6: Srovnání amplifikace DNA se specifickými primery a primery s nízkou specifitou.....	30
Obrázek 7: Elektroforetické rozdělení produktů qRT-PCR při využití referenčního genu aktinu.....	31
Obrázek 8: Výsledek analýzy křivky tání produktu vzniklého amplifikací za použití primeru MACE-209, srovnání s aktinem	31

Seznam tabulek

Tabulka 1: Vybrané geny a jejich homologové z MACE transkriptomické analýzy	26
Tabulka 2: Primery použité v bakalářské práci.....	26
Tabulka 3: Teplotní program pro PCR	26
Tabulka 4: Teplotní program pro qRT-PCR	27
Tabulka 5: Koncentrace vyizolované RNA u jednotlivých vzorků a stadií.....	29
Tabulka 6: Relativní míra exprese genů vyjádřená hodnotou $2^{-\Delta\Delta C_t}$ a relativní odchylkou	32

Seznam grafů

Graf 1: Relativní exprese genu MACE-214 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu	33
Graf 2: Relativní exprese genu MACE-201 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu	34
Graf 3: Relativní exprese genu MACE-202 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu.....	34
Graf 4: Relativní exprese genu MACE-207 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu.....	35
Graf 5: Relativní exprese genu MACE-208 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu	36
Graf 6: Relativní exprese genu MACE-209 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu.....	36
Graf 7: Relativní exprese genu MACE-210 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu.....	37
Graf 8: Relativní exprese genu MACE-211 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu.....	38
Graf 9: Relativní exprese genu MACE-214 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu.....	38

1 ÚVOD

Hrách setý (*Pisum sativum* L.) patří mezi důležité kulturní plodiny. Je pěstován v mírném pásu převážně jako jarní plodina. Luskoviny patří do čeledi bobovitých (*Fabaceae*), třetí největší čeledi kvetoucích krytosemenných rostlin, která zahrnuje více než 650 rodů a 18 000 druhů (Levis *et al.*, 2005). V celosvětovém měřítku tvoří luštěniny přibližně jednu třetinu přímého příjmu bílkovin a zároveň slouží jako důležitý zdroj potravy a krmiv pro zvířata, a také jedlých a průmyslových olejů (Phillips *et al.*, 1980).

Hrách pochází z Eurasie a je pěstován již nejméně 12 000–10 000 let (Smýkal *et al.*, 2015, 2017). Nejstarší archeologické nálezy hrachu pocházejí z neolitické Sýrie, Turecka a Jordánska. Na konci poslední doby ledové, na Středním východě a v Evropě, byl hrách každodenní složkou stravy lovců a sběračů (Zohary *et al.*, 2000). Plané druhy hrachu zaujímaly území od Íránu a Turkmenistánu přes přední Asii, severní Afriku a jižní Evropu (Makasheva *et al.*, 1979; Maxted *et al.*, 2000; Maxted *et al.*, 2010; Smýkal *et al.*, 2017). Vzhledem k časnému pěstování hrachu je však obtížné určit přesnou polohu centra diverzity, zejména kvůli měnícím se klimatickým podmínkám a změnám způsobených lidskou činností. Spolehlivé zdroje navíc často chybějí, nebo jsou neúplné (Smýkal *et al.*, 2011).

Hrách setý díky vysokému obsahu vlákniny, bílkovin, vitaminů (folát, vitamin C), minerálů (železo, hořčík, fosfor a zinek) a luteinu patří mezi významné zemědělské plodiny. Je konzumován nebo využíván jako krmivo jak ve formě zralých suchých semen, tak i ve formě zelených lusků. Semena mají asi 2x větší obsah bílkovin než obiloviny, přičemž tyto bílkoviny jsou obsaženy průměrně ve 25 % sušiny semene. Významnou vlastností je také schopnost fixovat vzdušný dusík. Fixace vzdušného dusíku umožňuje zpřístupnění fosforu, a to vše díky symbiotickým houbám a bakteriím. Tím zároveň dochází ke zlepšení fyzikálního stavu půdy (Selgen a.s., 2012).

V současné době je hrách pěstován téměř ve všech zemích mírného pásu a ve výše položených částech pásu tropického. Ve vrchovinách východní části střední Afriky, dále ve východní a jižní Africe je hrách taktéž intenzivně pěstován (Messiaen *et al.*, 2017). V současnosti jsou hlavními pěstiteli a vývozci hrachu Kanada, Francie a Čína. Kanada se zaměřuje na evropský trh s krmivem a v posledních letech na trh s potravinami v Indii. Australský vývoz je soustředěn na trh s potravinami a krmivem. Nejvýznamnějšími vývozci krmiva jsou Španělsko, Bangladéš, Belgie, Indie, Čína, Kolumbie, Spojené arabské emiráty a Malajsie (Messiaen *et al.*, 2017).

Hrách vyžaduje relativně chladné klima s průměrnou teplotou mezi 7–24 °C, ačkoliv maximální rychlost vývoje a vegetativního růstu je dosažena při výrazně vyšších teplotách. Tuto plodinu lze pěstovat jak ve vyšších nadmořských výškách (1000 m.n.m.) v blízkosti rovníku, tak v nižších nadmořských výškách, i v pobřežních oblastech během chladné sezóny. Optimální hodnota srážek je 800–1000 mm/rok (Abbo *et al.*, 2011; Messiaen *et al.*, 2017).

Planý hrách je citlivý na denní délku a světlo, přičemž delší dny podporují kvetení. V průběhu domestikace byla tato fotoperiodická závislost odstraněna, což následně umožnilo rozšíření hrachu do severnějších oblastí, kde se hrách nyní pěstuje jako jarní plodina (Weller *et al.*, 2012). Semena hrachu klíčí při okolní teplotě 4–24 °C, přičemž 13–18 °C je optimální. U hrachu zahradního trvá doba květu 2–3 týdny u kultivarů pro mechanické sklizení a až 1 měsíc u zahradních kultivarů. Doba od výsevu až po sklizeň suchých semen polního hrachu trvá v rozmezí 3–6 měsíců v závislosti na odrůdě a prostředí. Roční výnosy se pohybují od méně než 1 t/ha v Africe a Jižní Americe, až po 4 t/ha v Evropě. Průměrný světový výnos se pohybuje kolem 1,7 t/ha (FAOSTAT, 2016; Messiaen *et al.*, 2017).

Velikost genomu hrachu je přibližně 10x větší, než genom příbuzné modelové rostliny *Medicago truncatula* (Smýkal *et al.*, 2012). Tato velikost je způsobena repetitivními sekvencemi, které tvoří 75–97 % jaderné DNA (Macas *et al.*, 2007). Vlastní kódující oblasti (geny) zaujímají pouze nepatrnou část genomu, proto je výhodnější výzkum transkriptomickou analýzou částí genomu, než přímé testování sekvence DNA (Sudheesh *et al.*, 2015).

Transkriptomická analýza vývoje semen je důležitá pro pochopení podílu genové exprese a vzájemných vztahů. Tato analýza vede ke zjištění aktivity většiny genů a také k objasnění regulace těchto genů, která se děje na transkripční i posttranskripční úrovni (Garg, 2013).

Vývoj semen se vyznačuje postupnou diferenciací orgánů a tkání. Celý proces je citlivý k metabolickému řízení a odlišné profily metabolitů určují stav diferenciaci. Časný vývoj embrya je kontrolován maternálně, zatímco přechod do maturace je řízen autonomně. Signální síť zahrnující cukry, kinázy, kyselinu abscisovou (ABA) a jednu z podrodiny serin/threonin kináz (SnRK1) upravuje zrání. Postupy dozrávání jsou aktivovány změnou úrovně kyslíku, energie nebo měnícího se výživového stavu, který vyvolává odpovědi na úrovni transkripce a fosforylace proteinů. Tímto způsobem se metabolismus semene přizpůsobuje měnícím se podmínkám. Transgenní luštěniny se změněnými metabolickými drahami a složením osiva

poskytují vhodné modely pro studium metabolické kontroly a současně mohou vykazovat lepší kvalitu semen a vyšší výnosy (Weber *et al.*, 2005).

2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce s názvem „Genová exprese během vývoje osemení hrachu (*Pisum sativum* L.)“ je napsat literární rešerši na toto téma. Praktická část si klade za cíl izolovat RNA z osemení hrachu čtyř různých genotypů (Cameor, L100, JI64, JI92) a tří vývojových stadií, dále její analýzu pomocí metody kvantitativní real-time PCR. Genová exprese bude následně vyhodnocena pomocí statistické analýzy dat.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Hrách setý (*Pisum sativum* L.)

3.1.2. Původ

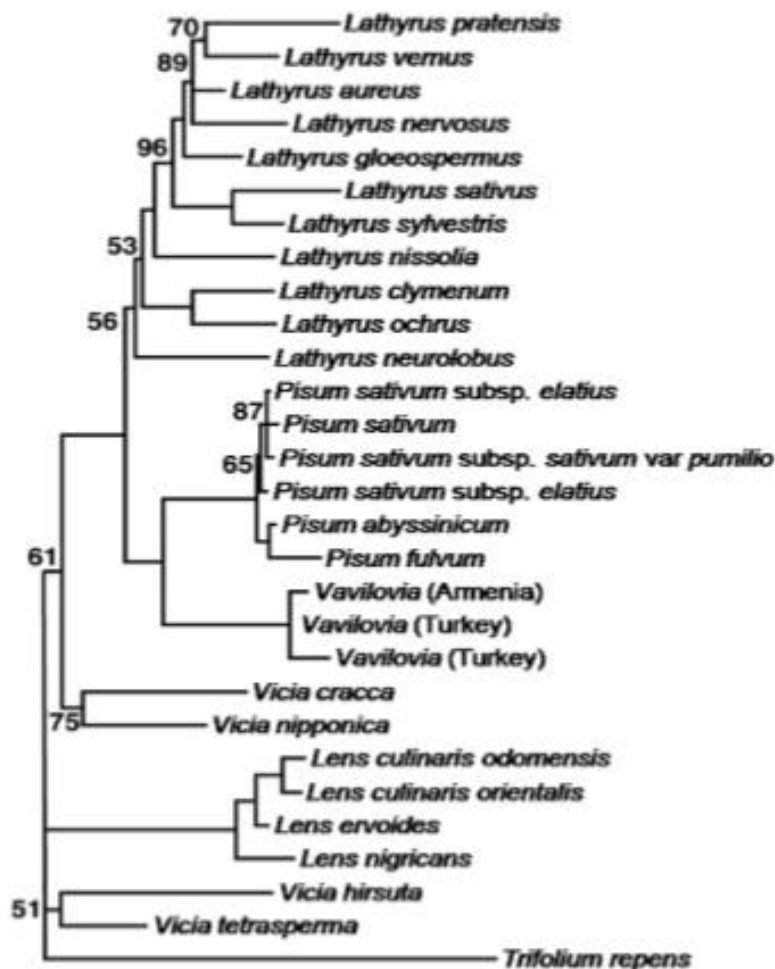
Hrách setý je významná kulturní plodina konzumovaná po celém světě. Jako střediska původu rodu *Pisum* jsou považovány Středomořská oblast, střední Asie a Etiopie (Smýkal *et al.*, 2017). Podle nálezů byl rozšířen již v mladší době kamenné a bronzové v Malé Asii a v době kolových staveb ve Švýcarsku (Hopf *et Zohary*, 2000). Nejstarší doklady o pěstování luskovin jsou uváděny z Předního východu (Vavilov. N. I., 1960). V Egyptě se důkazy o hrachu datují od cca 4 800–4 400 př.n.l. (Singla *et al.*, 2006). Do Evropy byl hrách rozšířen z Asie, a to již v období neolitu. Lidé nejprve pěstovali odrůdy drobnozrnné, později preferovali odrůdy se zrnky velkými. Tato luštěnina byla rozšířena zejména díky Římanům a jejich vojenským výpravám (Skládanka, Vrzalová, 2006). Později byl však hrách považován za tak cennou potravinu, že jej mohli konzumovat pouze lidé z nejvyšších společenských vrstev. Dostupnou potravinou se hrách stal teprve v 19. století. Postupně byly vyšlechtěny odrůdy hrachu se zvýšeným potenciálem výtěžnosti, modifikovanou zralostí, odolností vůči přilnavosti a zvýšenou nutriční hodnotou.

Produkce hrachu v Evropě se značně zvýšila od poloviny sedmdesátých let a na konci let osmdesátých se stabilizovala přibližně na 4 milionech tun (Bastianelli *et al.*, 1998), následně však vzhledem k dovozu sóji došlo k výraznému poklesu. V roce 2009 pak celosvětová produkce hrachu činila 16 milionů tun a dalších 10,5 milion tun sklizeného sušeného hrachu (FAOSTAT, 2011). Dnes patří první místo v produkci a exportu hrachu Kanadě, odkud je tato potravina vyvážena do celého světa ve formě semen, hrachové mouky, škrobu, hrachové bílkoviny nebo vlákniny (Pulse Canada, 2017).

3.1.3. Taxonomické zařazení

Hrách setý je řazen do čeledi *Fabaceae* (*Leguminosae*), podčeledi *Fabae*. Tato podčeď zahrnuje druhy *Lathyrus*, *Lens*, *Vicia*, *Vavilovia* a *Pisum*, do níž řadíme právě hrách setý (Mikić *et al.*, 2013). V rodu *Pisum* rozlišujeme 3 druhy hrachu: *Pisum sativum* (subsp. *sativum*, což je kulturní, a subsp. *elatius*, což je planý předchůdce), *Pisum fulvum* (planý) a *Pisum abyssinicum* (kulturní) (Maxted *et Ambrose*, 2001).

Obrázek 1: Fylogenetický strom podčeledi *Fabae* (převzato z Mikic' *et al.*, 2013)



Jak již bylo zmíněno výše, v rámci kulturního druhu *Pisum sativum* je tradičně dle agronomického využití a dle morfologických znaků rozlišováno několik typů, forem. Vhodnější je však klasifikace v kultivarových skupinách. Skupina *sativum* je pěstována po celém světě, včetně tropické Afriky. Skupina *abyssinicum* se pěstuje v severní a jihovýchodní části Etiopie a dále v Jemenu. Tato skupina má lehce lesklá semena s černým hilem, která mohou zrát mnohem dříve, než semena skupiny *sativum* (Messiaen *et al.*, 2017).

Pisum sativum má velkou genetickou rozmanitost a díky šlechtitelským programům je dnes rozlišováno mnoho odrůd, jako například zimní a jarní odrůdy, listové a bezlisté, rané nebo pozdní atd. Semena mohou být světle zelená, žlutá, hnědá, skvrnitá, hladká nebo vrásčitá, a také mohou mít různou velikost (Hickling, 2003; Gatel *et al.*, 2007; Kosev *et al.*, 2010).

3.1.4. Botanický popis

Hrách setý je jednoletá bylina. Stonkem je popínavá, dutá a lysá lodyha, která dorůstá délky 30–120 cm a je dělena uzlinami (nody) na články (internody). Hlavní kořen je silný a křivý a jeho délka dosahuje až 1 m. Boční kořeny, vyvíjející se z primárního kořene, jsou slabé, avšak mají výborné sorpční schopnosti. Tyto kořeny žijí v symbioze s bakteriemi rodu *Rhizobium*, které jsou schopny fixace vzdušného dusíku. Bakterie se vyskytují v kořenových hlízkách. Listy jsou tvořeny 1–3 páry listů, zároveň jsou sudozpeřené s úponky a palisty na bázi řapíků. Některé odrůdy však mohou mít i lichozpeřené listy a výjimkou nejsou ani odrůdy bezlístkové, tzv. afile typy, které jsou v současnosti nejrozšířenější (ČZU, 2017). Palisty jsou velké, objímavé a srdčité. Květenství je hrozen, květy jsou oboupohlavné. Květ je pětičetný a skládá se ze srostlého zeleného kalichu, bílé koruny (pavézy), dvou křídel, člunku, deseti tyčinek a svrchního semeníku. Tyčinky jsou dvoubratré. Mechanismus opylení je kartáčový. Působením tlaku hmyzu dochází k vysunutí čnělky a blizny z člunku. Čnělka je porostlá chloupky, které slouží k zachycení pylu. Květy jsou cizosprašné a opylovačem je převážně včela medonosná (Pelikán, Hýbl, 2012). Kvetení je postupné od května do října, dozrávání plodů proto nerovnoměrné. Hrách má hypogeické klíčení, a proto musí mít hlubší výsev (ČZU, 2017). Plodem je lusk se 3–10 semeny, skládající se ze dvou chlopní. Semena se nachází u hřbetní strany lusku, a to ve dvou řadách.

3.1.5. Genom hrachu

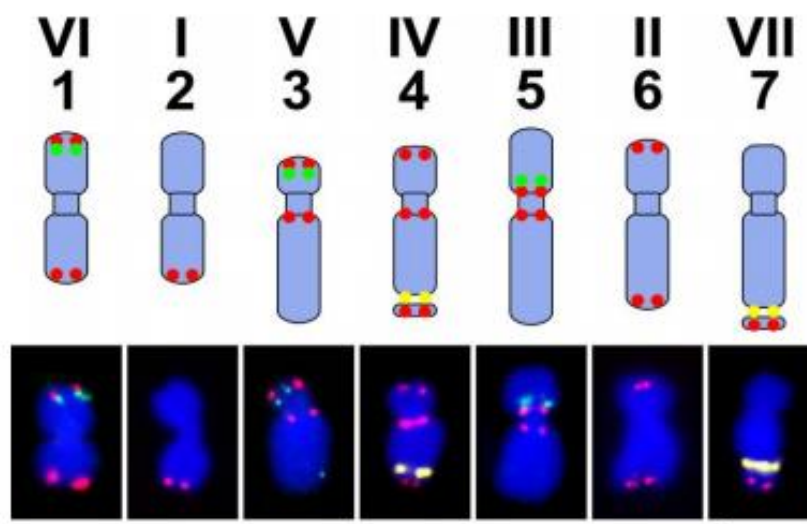
Velikost jaderného genomu hrachu je odhadována na 4,45 Gbp tvořících haploidní (1C) genom, což odpovídá přibližně 9,09 pg DNA nacházejícím se ve stadiu 2C (Smýkal *et al.*, 2012). Tato velikost převyšuje několikanásobně velikost genomu již sekvenovaných rostlin, jako je huseníček či rýže, a je srovnatelná s genomem člověka (Smýkal, 2006). V průběhu roku 2018 je očekáváno publikování a zpřístupnění genomu hrachu, a to díky dlouholetému úsilí International Pea Genome Sequencing Consortium. Velkou část genomu, a to přibližně 85 %, zahrnují repetitivní sekvence. Mezi tyto sekvence řadíme transpozony. Jedná se o mobilní elementy, které jsou schopny měnit svou pozici a kopírovat se v genomu. Další složkou genomu jsou retrotranspozony, které jsou schopny přepisu vlastní DNA do RNA a následně reverzní transkripcí zpět do DNA. Následně jsou stejně jako již zmiňované transpozony kopírovány a přesouvány v genomu. U hrachu bylo objeveno nejméně 30 rodin retroelementů typu *Ty1 - copia* s počtem 30–30 000 rodin na genom. Další skupinou jsou retrotranspozony *Ty3 - gypsy*, které představují asi 50–60 % genomu (Smýkal, 2006).

Mezi fylogeneticky příbuzné druhy patří *Medicago truncatula*. Jedná se o dvouděložnou samosprašnou modelovou rostlinu, patřící do čeledi bobovitých (Gallardo *et al.*, 2006). Velikost genomu je 454–526 Mbp (Roe, 2011). Karyotyp je složen z 8 chromozomů, přičemž 6 z nich bylo přečteno v USA a zbývající 2 chromozomy byly přečteny v Evropě (Krishnakumar *et al.*, 2014). Mikrosyntenie tohoto modelového organismu tak umožňuje jednodušší mapování fylogeneticky příbuzných druhů rostlin, jako je právě hrách (Frugoli *et Harris*, 2001).

3.1.6. Karyotyp hrachu

Karyotyp hrachu je tvořen 7 páry chromozomů ($2n = 14$) (Smýkal *et al.*, 2012). Tyto chromozomy lze částečně odlišit dle morfologických znaků a především pomocí *in situ* hybridizace. Chromozomy 1 a 2 jsou submetacentrické (Ellis *et Poyser*, 2002). Ostatní chromozomy jsou akrocentrické. Dlouhá raménka chromozomů 4 a 7 nesou oblasti sekundární konstriktce, které odpovídají repetitivním sekvencím genů kódujících 45S rRNA. Číslování těchto chromozomů je neobvyklé, neboť čísla chromozomů se liší od čísel vazebných skupin, nacházejících se na daných chromozomech. Proto byl sestaven speciální systém, v němž čísla arabská přísluší konkrétním chromozomům a čísla římská jsou přiřazena vazebným skupinám: 1 = VI, 2 = I, 3 = V, 4 = IV, 5 = III, 6 = II, 7 = VII (Neumann *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 1998; Smýkal *et al.*, 2012).

Obrázek 2: Schematické znázornění karyotypu hrachu (převzato ze Smýkal *et al.*, 2012)



Legenda: horní část obrázku - lokusy pro PisTR-B (červená), 5S rDNA (zelená) a 45S rDNA (žlutá), spodní část obrázku - metafázní chromozomy s identickými lokusy detekovanými FISH, měřítko = 5 μ m

3.1.7. Domestikace

Počátek domestikace rostlin můžeme datovat do mladší doby kamenné. Archeologický a genetický výzkum uvádí, že hrách byl domestikován lidmi, kteří účelně dávali přednost hrachu s tenším oseměním a kratší vegetační dobou. Tento proces byl pravděpodobně nejprve neuvědomělý, později však došlo cíleným působením člověka k vyšlechtění kulturního hrachu z planých druhů. Zároveň bylo využito pouze malé množství vybraných jedinců, což se dnes odráží v malé genetické diverzitě pěstovaných rostlin (Harlan, 1992, Smith, 1998; Smýkal, 2009).

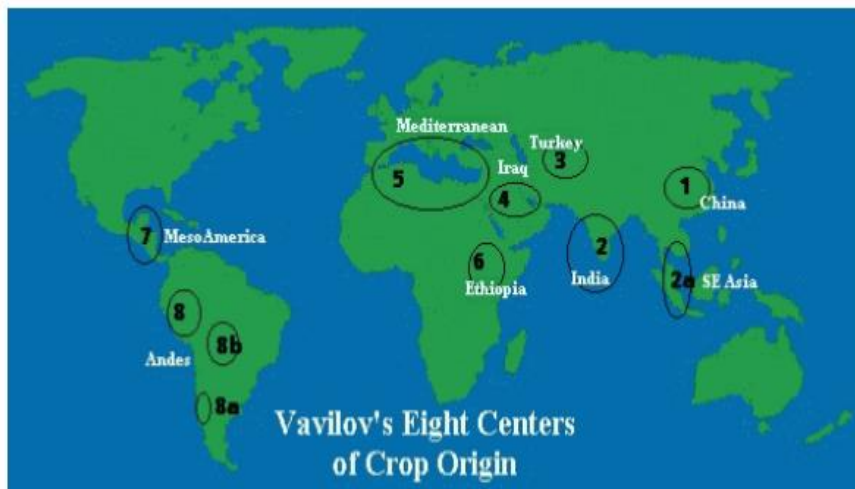
V čeledi *Fabaceae* se nachází nejvyšší počet domestikovaných plodin z celé říše rostlin (Harlan, 1992). Hrách byl pro domestikaci vybrán z důvodu velkého zájmu genetických studií. Domestikované rostliny se liší od svých planých předků v několika morfofyziologických znacích (tzv. domestikační syndrom), z nichž většina je spojena s šířením semen, klíčením, velikostí, zbarvením semen a jejich požitelností (Hammer, 1984).

Domestikace přinesla změny, jako adaptaci druhu ke kultivaci a sklizni, ale také změny genetické. Mezi dva základní domestikační znaky, které jsou klíčové pro úspěšnost pěstování patří ztráta dormance semen a ztráta volného šíření semen (Fuller *et al.*, 2009).

Domestikaci lze rozdělit do tří fází (Harris, 1989). První fází je sběr volně rostoucích jedlých plodů, druhou fází je pěstování volně rostoucích rostlin (tzv. pre-domestikace) a třetí fází je fixace domestikačního syndromu (Allaby, 2010). Ten představuje trvalá změna fenotypu, která odlišuje plané druhy od kulturních. Kulturní druh plodiny může mít poté větší zásobní orgány, jiný tvar plodu a semen, nižší obsah toxických látek a mnoho dalších vlastností. Domestikaci divokých rostlin můžeme chápat jako zrychlenou evoluci (Abbo *et al.*, 2012, 2014).

Proces postupné domestikace planých forem rostlin na kulturní proběhl v geografických místech, centrech původu kulturních rostlin, která definoval ruský botanik N. I. Vavilov (1926). Centra původu jsou Čína, severovýchodní Asie, Indie, Turecko, Irák, Středoazie, Etiopie, střední Amerika a jižní Amerika (Obrázek 3). Oblasti Středoazie a především Blízký východ jsou považovány za území prvotní domestikace hrachu. Přesnou polohu prvotní genetické diverzity a domestikace však většinou dnes nelze určit, neboť tyto oblasti čelily změnám klimatu a lidské činnosti (Smýkal *et al.*, 2012).

Obrázek 3: Centra původu kulturních rostlin (N. I. Vavilov, 1926) (převzato z <http://oregonstate.edu/instruct/css/330/two/>)



3.2. Vývoj semene a osemení bobovitých

3.2.1. Semeno bobovitých

Semeno je složitá struktura skládající se ze tří hlavních složek, z nichž každá má svůj vlastní genotyp. První strukturou je embryo nesoucí jeden mateřský a jeden otcovský ekvivalent genomu. Další strukturou je endosperm, který je triploidní a nese dva mateřské a jeden otcovský ekvivalent. Poslední částí, obklopující embryo a endosperm, je osemení, které je mateřského původu (Marinos, 1970; Hardman, 1976).

Vývoj semene krytosemenných rostlin začíná dvojím oplozením. Haploidní buňka vajíčka a diploidní centrální buňka zárodečného vaku samičího gametofytu splynou každá se spermií v zygotu. Z vaječné buňky (zygoty) vzniká po oplození embryo (zárodek), z centrální buňky vaječného vaku vzniká triploidní endosperm, z nucellu perisperm, z vaječných obalů (integumentů) dochází ke vzniku osemení (testa). Povrch osemení je lesklý, rýhovaný, hladký nebo štětinatý. Pokud jsou semena rozšiřována pomocí zvířat (zoochorie), jejich povrch je opatřen výrůstky nebo háčky (Marinos, 1970; Hardman, 1976).

Na povrchu osemení lze také rozlišit cikatrikulu. Jedná se o malou jizvu, která vzniká v mikropylárním otvoru vajíčka. Nachází se zde také pupek (hilum) a radikula. V místě srůstu obalu vajíčka s poutkem se vyskytuje semenný šev (Marinos, 1970; Hardman, 1976).

Přibližně 70 % veškerých potravin určených k lidské spotřebě pochází přímo ze semen, nejčastěji z obilovin a luštěnin. Chemické složení semen je v konečném důsledku určeno

genetickými faktory, a proto se mezi druhy a jejich odrůdami a kultivary liší. Některé změny složení mohou vyplývat z agronomických postupů nebo mohou být způsobeny podmínkami prostředí, které převládají při vývoji a zrání semen. Hlavními skladovacími rezervami většiny semen jsou sacharidy, nejčastěji ve formě škrobu (obiloviny). Častý je také výskyt oligosacharidů, jejichž poměry jsou druhově specifické. Semena dále obsahují triacylglyceroly, fosfolipidy, glykolipidy a steroly. Zásoby triacylglycerolů jsou uloženy v subcelulárních organelách, které jsou nazývány lipidová tělíska, oleozomy nebo sférozomy o velikosti 0,2–6 μm . Tato tělíska jsou ohraničena monovrstvou fosfolipidové membrány, ve které se nachází i několik unikátních proteinů - oleosinů. Velikost olejového tělíska obvykle koreluje s množstvím přidruženého oleosinu. Skladovací proteiny jsou obvykle uloženy ve speciálních vakuolách pro skladování bílkovin, dříve označovaných jako proteinová tělíska. Jejich velikost je od 0,1 do 25 μm . Během vývoje jsou obklopeny membránou, která pochází z buněčného endomembránového systému. Mohou se zde vyskytovat i inkluze, a to ve formě krystaloidů a globoidů. Krystaloidy jsou nerozpustné proteinové inkluze, zatímco globoidy slouží jako místa ukládání fytinu, draselných, hořčíkových a vápenatých solí kyseliny fytové. PSV mohou obsahovat pouze jeden typ skladovacího proteinu. Některé luštěniny například obsahují pouze albumin, vicilin nebo legumin, ale většina z nich obsahuje jak vicilin, tak legumin. Pokud je ve stejné PSV více proteinů, může být jejich distribuce nerovnoměrná (Bewley *et al.*, 1994).

3.2.2. Embryo

Embryo se skládá ze dvou hlavních orgánových systémů. Prvním z nich je osa, z níž je později odvozeno tělo vegetativní rostliny, a druhým z nich jsou děložní lístky (kotyledon), které často fungují jako úložný orgán pro makromolekulární rezervy u dvouděložných druhů. Osa se skládá z embryonálního kořene (radikuly), hypokotyly, ke kterému jsou připojeny děložní lístky, a vrcholu výhonku s primárním lístkem (plumule). Ty se nachází spíše v endospermu. U bobovitých je tomu však jinak a kotyledon tak představuje embryonální skladovací tkáň, která tvoří téměř veškerou hmotnost semene (Marinos, 1970; Hardman, 1976).

Mitotickým dělením zygoty dojde ke vzniku apikální a bazální buňky. Buňka apikální, z níž vzniká embryo, směřuje do středu zárodečného vaku, zatímco buňka bazální je ukotvena v oblasti mikropyle mateřského pletiva (Vinter, 2008). Z buňky bazální se vyvíjí v suspenzorový systém, který slouží k transportu živin, růstových regulátorů nebo metabolitů z mateřského pletiva do vyvíjejícího se embrya (Romberger *et al.*, 2005). Embryo prochází postupnou diferenciací a polarizací a dochází tak ke vzniku kořenového (hypofýza) a stonkového pólu (epifýza). V oblasti stonkového pólu dochází k diferenciaci děloh.

Následující vývoj představuje vznik plumuly, radicy, hypokotylu a prvního podděložního článku. Z centrálního meristému dochází ke vzniku prokambia, jakožto základu vodivých pletiv a primární kůry. Závěrečná část vývoje embrya je charakteristická snižováním množství vody, akumulací zásobních látek a snížením metabolické aktivity embrya (Vinter, 2008).

Na základě rozdílného obsahu zásobních látek v kotyledonech hrachu jsou rozlišována semena kulatá (obsahující škrob) a svařštělá (obsahující volný cukr). Periferní buněčná vrstva kotyledonu u kulatých semen obsahuje hustou protoplazmu s několika oválnými škrobovými zrny, která nepřesahují velikost 0,06 mm. Ve vnější vrstvě jsou zrna o velikosti 0,2 mm, ve vnitřní vrstvě dosahuje velikost zrn až 0,34 mm. Škrobová zrna vrásčitých semen jsou ve vnější vrstvě buněk kotyledonu stejně velká, jako u semen kulatých. Zrna jsou však odlišného typu. Jedná se o nepravidelně vyskytující se kulaté útvary s několika středy, čímž vznikají složená zrna s tendencí rozpadat se na menší části. Vnitřní vrstva kotyledonu obsahuje zrna o průměru 0,2 mm (Griga, 2002).

3.2.3. Endosperm a perisperm

Během vývoje semene vzniká endosperm a perisperm. Jedná se o triploidní zásobní pletiva. Endosperm obklopuje a vyživuje embryo. Toto pletivo je během vývoje často triploidní, avšak ploidie je během diferenciacce často dále zvyšována (Chamberlin *et al.*, 1993).

Perisperm se diferencuje z buněk nucellu. Toto pletivo někdy vytěsňuje endosperm, často se však vyvíjí obě současně (Bewley *et al.*, 1994).

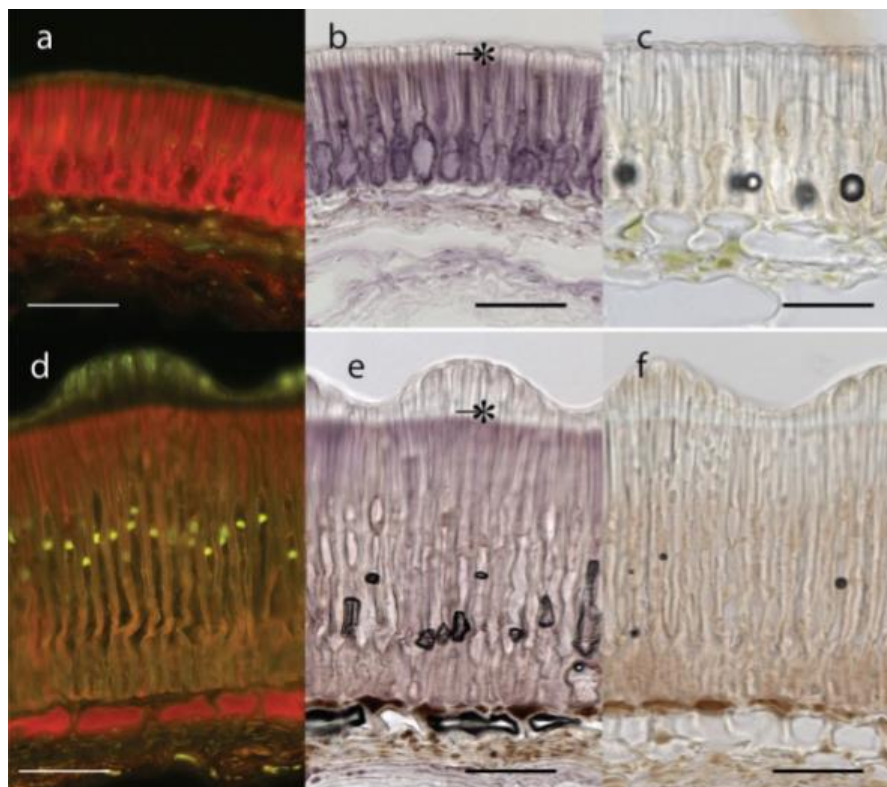
3.2.4. Osemení

Osemení představuje ochrannou bariéru mezi embryem a vnějším prostředím. Chrání embryo a endosperm proti poškození, a také plní funkci při regulaci klíčení a šíření semen. Jeho velká variabilita navíc slouží v taxonomii k rozlišení druhů a poddruhů. Osemení vzniká z vnitřních a vnějších vaječných obalů (integumentů) a je složeno ze čtyř vrstev (Bewley *et al.*, 1994). Povrch osemení tvoří vnější a vnitřní kutikula, která je často impregnována vosky, nejčastěji suberinem, pod ní se nachází epidermis, hypodermis a vnitřní parenchym. Oblast epidermis je tvořena sklereidy, které jsou někdy nazývány jako palisádové buňky, makrosklereidy nebo Malpighiho buňky. Sklereidy mají silnou a nepravidelně ztloustlou buněčnou stěnu (Smýkal *et al.*, 2014).

V oblasti mezi buněčnou stěnou a termální čepičkou dochází k optickému lomu světla (tzv. *linea lucida*), který pravděpodobně způsobuje nepropustnost osemení pro vodu (Harris,

1987; Smýkal *et al.*, 2014; Hradilová *et al.*, 2017). Pod vrstvou epidermis se nachází osteosklereidy, které mají sloupcovitý tvar, a dále lagenosklereidy, jejichž tvar je baňkovitý (obrázek 4).

Obrázek 4: Příčné řezy osemením v extrahilní oblasti barvené DMACA pro polycyklické proanthokyanidy (převzato z Hradilová *et al.*, 2017)



Legenda: horní řada: JI92, spodní řada: JI64; červená fluorescence DMACA po excitaci modrým světlem (a,d); fialové barvení ve světlém poli (b,e); stejné sekce po alkalické hydrolyze barvené DMACA (c,f); měřítko = 50 μm

Vrstva je prostoupena velkým množstvím mezibuněčných prostor, které jsou propojeny plasmodesmaty (Harris, 1983). Vnitřní část osemení je složena z buněk parenchymu, které taktéž vytváří mnoho mezibuněčných prostor. V průběhu embryonálního vývoje plní významnou funkci, a proto je tato oblast často nazývána jako „živná vrstva“ (van Dongen *et al.*, 2003). Je zde zabudován také cévní systém, který je tvořen jedním svazkem cévním a dvěma bočními větvemi (Spurný, 1963). Lze jej rozdělit na chlorchym, spodní parenchym a větvený parenchym. Chlorchym je tvořen buňkami s chloroplasty. Tyto buňky přechází v přízemní parenchym, který během vývoje embrya postupně ustupuje. Buňky větveného parenchymu jsou nepravidelného tvaru (Bhalla *et al.*, 1984).

3.2.6. Růst a vývoj semene

Vývoj semene bobovitých rostlin zahrnuje růst embrya, endospermu a osemení (Weber *et al.*, 2005). První fáze vývoje je zahájena buněčným dělením a růstovou expanzí. Obsah vody v semenu je až 90 % a v této fázi nedochází ke klíčení. Následuje expanze zásobních buněk, do kterých jsou ukládány zásobní látky (Bewley *et al.*, 2012). Nyní semeno získává schopnost klíčit. V poslední fázi dochází naopak k poklesu obsahu vody v semeni, buňky jsou zaměřeny na klíčení a růst (Gallardo *et al.*, 2003).

U hrachu je první fáze vývoje spojována s osemením a endospermem, zatímco fáze druhá je zaměřena na embryo a závěr embryogeneze. Následuje období zrání, pro nějž je typické zvětšování buněk (Weber *et al.*, 2005). Velikost semene je podmíněna geneticky, ale i vlivem prostředí. Velikost zároveň souvisí s velikostí děloh, která je určena počtem buněk. Četnost buněčných cyklů je regulována osemením (Weber *et al.*, 1996). S ukládáním zásobních látek jsou spojeny také invertázy v buněčné stěně, které zvyšují hladinu hexóz a podílí se na vývoji embrya. Po ukončení buněčného dělení se embryo změní z pletiva v orgán. To je řízeno signální dráhou, která zahrnuje cukry, kyselinu abscisovou (ABA) a SnRK1 kinázy (Weber *et al.*, 2005).

V semenech je ukládán škrob a proteiny. K syntéze proteinů dochází v kotyledonech během střední a pozdní fáze vývoje. Pro tuto syntézu jsou potřebné aminokyseliny, které jsou floémem dopraveny do maternální tkáně semene, později putují do apoplastu k embryu (Golombek *et al.*, 2001).

Semena cukrového a zahradního hrachu jsou připravena ke sklizni 8–12 týdnů od výsevu, semena polního hrachu o měsíc později. Následkem pozdější sklizně hrachu může být hniloba lusků a poškození semen. Z tohoto důvodu je vhodné sklizeň provádět, jakmile listy začnou blednout a obsah vlhkosti semen je snížen na 16–18 %. Počáteční vlhkost semen hrachu by měla být před skladováním snížena na požadovanou úroveň 12 %. Optimální vlhkost snižuje míru poškození při skladování a zabraňuje nebo snižuje napadení plísněmi a hmyzem. Semena by měla být skladována v suchých a chladných místech, a měla by být chráněna před škůdci a absorbováním vlhkosti z okolí. V tropické Africe nejsou z tohoto důvodu semena skladována déle než jednu sezónu (Messiaen *et al.*, 2017).

3.3 Genová exprese během vývoje semen

Transkriptomika je vědním oborem zabývajícím se genovou expresí. Genová exprese zahrnuje transkripci, přepis RNA do DNA, a translaci - přepis RNA do proteinů. Transkriptomická analýza je dnes běžnou technikou užívanou v molekulární biologii. Mnoho biologických procesů, včetně vývoje semen je také regulováno post-transkripčně, například pomocí alternativního sestřihu. Ten může poskytovat proteiny s pozměněným počtem a typem funkčních domén, což vede k tvorbě více než jednoho kódujícího nebo nekódujícího sense transkriptu vzniklého z jediného lokusu. Ke studiu genové exprese se používaly nebo používají metody založené na hybridizaci, v současnosti pak nejčastěji postupy založené na kvantitativní real-time PCR (Aghamirzaie *et al.*, 2015).

První pokusy o studium celého transkriptu začaly na počátku 90. let 20. století. Technologický pokrok od konce 90. let minulého století učinil transkriptomiku širokou disciplínou. Nyní existují dvě klíčové techniky, a to mikročipy a RNA-sekvenování. Měření exprese genů v různých tkáních organismů, v odlišných časových úsecích a podmínkách poskytuje informace o tom, jak jsou geny regulovány. Může také pomoci odvodit funkce doposud neannotovaných genů. Analýza genové exprese umožňuje detekci trendů, které nemohou být zjištěny jinými cílenými testy (Lowe *et al.*, 2017).

Vhodnou transkriptomickou analýzou se stalo i RNA sekvenování, které je založeno na next-generation sequencing (Sudheesh *et al.*, 2015). Tato metoda klade důraz na biologicky důležité izoformy a geneticky odlišné varianty (alternativní alely) (Zhao *et al.*, 2014). Studium genové exprese během vývoje semene bylo provedeno u sóji (Severin *et al.*, 2010, Jones *et al.*, 2013), rýže (Xue *et al.*, 2012), cizrny (Pradhan *et al.*, 2014), modelové rostlině *Arabidopsis* (Le *et al.*, 2010), *Medicago truncatula* (Gallardo *et al.*, 2006) a hrachu (Alves-Carvalho, 2015).

Aghamirzaie *et al.* (2015) předložili integrovaný výpočetní rámec, který předpovídá funkce specifické pro izoformy rostlinných transkriptů. Tento rámec zahrnuje nový strojový klasifikátor CodeWise, který předpovídá kódovací potenciál transkriptů s přesností více než 96 %, a dále několik dalších nástrojů umožňujících globální sekvenční podobnost, funkční doménu a koexpresní síťové analýzy. Tento rámec byl aplikovaný na všechny detekované transkripty, z nichž 13 % bylo předpovězeno klasifikátorem CodeWise jako nekódující RNA při vývoji embryí sóji. Dále byla zkoumána úloha alternativního sestřihu při vývoji embryí sójových bobů. Analýzy ukázaly, že alternativní sestřih vedl ke globálním změnám v počtu,

typech a rozsahu zkrácení funkčních domén v proteinových variantách. Isoformově specifická analýza odhalila potenciální interakce mezi složkami vybraných signálních drah, které souvisí se zráním a vysycháním semen. Tyto signální cesty zahrnovaly transkripty související s kyselinou abscisovou a genem FUSCA3, přičemž některé byly klasifikovány jako nekódující nebo antisense transkripty, a byly koexprimovány s odpovídajícími kódujícími transkripty. Nekódující a antisense transkripty pravděpodobně hrají důležitou regulační roli při signalizaci zrání a vysoušení semen u sóji (Aghamirzaie *et al.*, 2015).

Redekar *et al.* (2015) provedli analýzy transkriptomů v genomu sóji, a to během vývoje normálních a low phytic acid (*lpa*) mutantních semen. Byla vybrána metoda RNA-Seq, pro niž bylo vybráno celkem pět vývojových stupňů semen z celkem 30 knihoven, a ty byly použity pro analýzu exprese. Podařilo se identifikovat celkem 4 235 diferencially exprimovaných genů. Dále bylo zaznamenáno 18 genů, podílejících se na biologických procesech, jako je apoptóza, metabolismus glukanů, buněčný transport, fotosyntéza. Během vývoje semen bylo popsáno i 9 rodin transkripčních faktorů. Geny spojené s apoptózou, metabolismem glukanů a buněčným transportem vykazovaly zvýšenou expresi v počátečních stádiích vývoje *lpa* mutantních semen, zatímco geny související s fotosyntézou vykazovaly expresi sníženou, a to v pozdních vývojových stádiích. Výsledky naznačují, že *lpa*, způsobující mutace, hrají roli v indukci a potlačení reakcí na obranu rostlin během raných a pozdních fází vývoje semen sóji (Redekar *et al.*, 2015).

Chen *et al.* (2013) studovali vztah mezi životaschopností osiva, genovou expresí a redoxním stavem glutathionu během dozrávání semen hrachu. Analýza transkriptomu byla doplněna qRT-PCR analýzou vybraných genů a víceúrovňovou analýzou antioxidačního glutathionu. Již od počátku uměle navozeného stárnutí semen při 60% vlhkosti a 50 °C byla identifikována částečná degradace DNA a RNA. Po 25 dnech stárnutí se změnila hodnota glutathionového redoxního stavu k pozitivnějším hodnotám. Tato analýza odhalila skutečnost, že během stárnutí semen dochází ke změnám transkripce a tím i k ovlivnění programované buněčné smrti a poklesu antioxidační schopnosti, která způsobuje nižší životaschopnost semen (Chen *et al.*, 2013).

Pang *et al.* (2008) zjistili, že overexprese transkripčního faktoru z rodiny MYB vede k masivní akumulaci proanthokyanidů (PA) v transgenních kořenových vláscích *Medicago truncatula*. Microarray analýza ukázala, že dochází k indukci genů, které zodpovídají za biosyntézu flavonoidů. Další analýza prokázala geny, které jsou exprimovány

přednostně v semeni *Medicago truncatula*. Bylo zjištěno, že klíčovým krokem v biosyntéze PA je produkce epikatechinu 3'-O-glukosidu v osemeni (Pang *et al.*, 2008).

Liu *et al.* (2014) zkoumali geny MYB5 a MYB14 a prokázali jejich klíčovou roli v biosyntéze polymerních vrstev osemeni *Medicago truncatula*. Jejich nadměrná exprese silně indukuje akumulaci PA v kořenových vláscích *Medicago truncatula*. Mutanty *myb5* a *myb14* vykazují tmavší barvu osemeni, než rostliny divokého typu. U mutantu *myb5* zároveň nedochází k dostatečné biosyntéze slizu. Transkriptomická analýza také ukázala, že MtMYB5 reguluje větší soubor genů, než MtMYB14. Dalším zjištěním bylo, že tyto dva proteiny spolu fyzicky interagují a aktivují promotory anthokyanidin-reduktázy a leucoanthocyanidin-reduktázy, klíčových genů, které vedou k biosyntéze PA v přítomnosti MtTT8 a MtWD40-1. Tyto výsledky tak poskytly nový pohled na komplexní regulaci PA a biosyntézu slizu v osemeni *Medicago truncatula* (Liu *et al.*, 2014).

Liu *et al.* (2015) provedli transkriptomickou analýzu během vývoje semen hrachu. Ve své studii použili RNA-Seq analýzy a bioinformatiky ke zkoumání změn v expresi genů při vývoji semen hrachu polního (hromadícího škrob) a zahradního (hromadícího volné sacharidy). Pomocí RNA-Seq získali 18,7 G dat, které poté sestavili do 77 273 jednotek s průměrnou délkou 930 bp. Ukázalo se, že transkripční kontrola při vývoji semen hrachu je velmi koordinovaný proces. Během různých fází vývoje dochází k naprosto odlišné expresi 459 a 801 genů. Srovnávací analýza genů, podílejících se na biosyntéze cukru a škrobu, ukázala, že rozdílná exprese příbuzných genů v pozdních vývojových stádiích má za následek negativní korelaci mezi rozpustným cukrem a biosyntetickým tokem škrobu v zrnech polního a zahradního hrachu (Liu *et al.*, 2015).

Szymanski *et al.* (1998) sledovali expresi GLABRA2 (GL2) genu u listů, trichomů a také osemeni *Arabidopsis thaliana*. Pro správnou iniciaci, rozestup a morfogenezi trichomů je zapotřebí více než 20 genů. Počáteční výběr prekurzorů trichomů vyžaduje aktivitu obou genů GLABROUS1 (*GL1*) a TRANSPARENT TESTA GLABROUS (*TTG*). Pro následné fáze trichomální morfogeneze je potřebný gen GLABRA2 (GL2). Jedná se o transkripční faktor, který je zodpovědný za expanzi buněk, rozvětvení a zrání buněčné stěny trichomů. Byly identifikovány dvě promotorové domény, které jsou exprimovány v trichomech. *GL2*, stejně jako *GL1* byly identifikovány v rozvíjejících se trichomech, a také v buňkách, které obklopují trichomy během časných fází vývoje. Na rozdíl od *GL1*, exprese *GL2* přetrvává i ve zralých

trichomech. Přítomnost funkčního *GL1* nebo *TTG* znamená zvýšení exprese *GL2* v buňkách bez trichomů (Szymanski *et al.*, 1998).

Tanner *et al.* (2003) se věnovali biosyntéze proanthocyanidinu v rostlinách, purifikaci leukoanthocyanidin-reduktázy a molekulárního klonování její cDNA u *Arabidopsis thaliana*. Leukoanthocyanidin-reduktáza (LAR) katalyzuje syntézu katechinu, iniciačního monomeru kondenzované syntézy taninu nebo proanthokyanidinu (PA) z 3,4-cis-leukokyanidinu, a je tedy prvním krokem v biosyntéze PA. Zdá se, že *Arabidopsis* produkuje spíše epikatechin než PA na bázi katechinu (Tanner *et al.*, 2003).

Usadel *et al.* (2004) se věnovali výzkumu genu *RHM2*, který je zapojen do syntézy slizu a vývoje osemení u *Arabidopsis thaliana*. *RHM2* byl prvním kandidátním genem podílejícím se na syntéze pektinového rhamnogalakturonanu I. Studium exprese s promotorovým konstruktem β -glukuronidázy ukazuje, že *RHM2* je exprimován ve všech pletivech. Byly identifikovány *RHM2* T-DNA inserční mutantní linie, u kterých byla odhalena silná redukce rhamnogalakturonanu I ve slizu, a také pokles jeho molekulové hmotnosti (Usadel *et al.*, 2004).

Distribuce proteinů a transkriptů v různých částech semene potvrdila významný vliv osemení na výživu embrya a potvrdila výskyt proteáz v osemení, což značí význam proteolýzy jako doplňkového zdroje aminokyselin (Gallardo *et al.*, 2006). Buněčné pochody, které jsou základem diferenciací semenných vrstev u *Medicago truncatula*, studovali Wang a Grusak (2005). Struktura semene *M. truncatula* odpovídá typickému semenu bobovitých rostlin s osemením, včetně makroklereid, osteosklereid ve vnějším obalu, a parenchymu s endothelem ve vnitřním obalu (Wang a Grusak, 2005, Gallardo *et al.*, 2006).

Ve studii Verdier *et al.* (2012) byl analyzován transkriptom osemení v klíčových stadiích vývoje, vedoucí k identifikaci možných cílových genů, které řídí konečné vlastnosti semen. Byly provedeny také anatomické analýzy pomocí světelné a elektronové mikroskopie, a byly zjištěny morfologické změny ve vztahu k transkriptomickým datům. Histologické změny byly spojeny s dozráváním embryí. Jednalo se o expanzi buněk s pravděpodobným zahájením endopolyploidie, tvorbou kutikuly a zesilování buněčné stěny ve vnějších integumentech, které interferují s biologii semen a regulací propustnosti semen. Imunolokalizace ABA v plastidech parenchymových buněk při raném zrání semen ukázala, že tato endogenní ABA by mohla být zapojena do přechodu do fáze dozrávání semen. Při raném vývoji semen byla anatomie

a tloušťka osemení rovnoměrná, přičemž palisádový epidermis byl nejvýznamnější. Zastavení buněčného dělení bylo kompenzováno prodloužením buněk v osemení. V analyzovaných jádrech byly zjištěny tři různé stupně ploidie, což značí, že prodlužování buněk může korelovat s indukcí endopolyploidie. Transkriptomická analýza také odhalila, že při pozdní embryogenezi jsou exprimovány geny nukleotidového metabolismu pravděpodobně v kontextu s endopolyploidii (Verdier *et al.*, 2012).

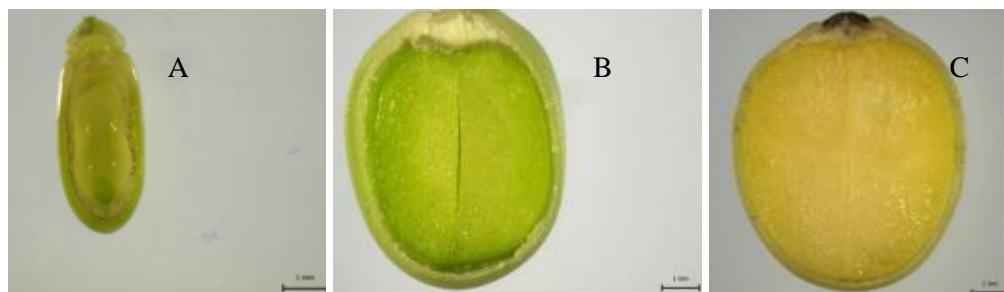
Signální síť řízené ABA zahrnují u *Arabidopsis* až 10 % genů. U semen jsou odpovědi ABA spojené s dozráváním embryí (Finkelstein *et al.*, 2002). ABA hraje klíčovou roli v regulaci vývoje embryí a dozrávání semen prostřednictvím interakce genů ABI3, FUS3, LEC2 a LEC1 (Verdier *et Thompson*, 2008). U semen tabáku (*Nicotiana tabaccum*) studie s mutanty ukázaly, že ABA je nejprve syntetizována v mateřských vegetativních pletivech, a poté je translokována do semen, kde zahajuje jejich časný vývoj. Druhá fáze syntézy ABA, která je potřebná pro dospívání embryí, je lokalizována v osemení (Frey *et al.*, 2004).

4 MATERIÁL A METODY

4.1. Biologický materiál

Pro analýzu genové exprese byly vybrány čtyři různé genotypy hrachu, přičemž dva byly kulturní a dva plané. Kulturní genotypy představovaly vzorky *Pisum sativum* subsp. *sativum* cv. Cameor (nepigmentované osemení) a JI92 (pigmentované osemení, nedormantní). Z planých genotypů byly vybrány vzorky *Pisum sativum* subsp. *elatius* JI64 (dormantní) a L100. Francouzská odrůda Cameor byla poskytnuta z INRA, Dijon, Francie a byla využita pro sekvenování genomu hrachu. Genotypy JI64, JI92 a L100 poskytla genová banka John Innes Centra, Norwich, UK. Rostliny byly pěstovány ve fytotronu (Photon System Instruments, Drásov, CZ) s řízenou teplotou (22/15 °C), vlhkostí 40 % a osvětlením (14 hod den, 170 μE) v kontejnerech o objemu 5 l naplněných substrátem (Proficom Ltd., CZ). Květy byly označeny v den otevření a poté sklizeny v odpovídajících časových intervalech, a to: genotyp Cameor: C1 - 10 DAP, C2 - 20 DAP, C3 - 27 DAP; genotyp L100: L1 - 10 DAP, L2 - 20 DAP, L3 - 27 DAP; genotyp JI92: 92-1 - 10 DAP, 92-2 - 20 DAP, 92-3 - 24 DAP; genotyp JI64: 64-1 - 8 DAP, 64-2 - 19 DAP, 64-3 - 27 DAP. Z jednotlivých rostlin byly získány tři vzorky osemení, přičemž každý vzorek byl jiného stáří.

Obrázek 5: Příčné řezy semení genotypu JI64 seřazené od nejmladšího po nejstarší stadium



Legenda: nejmladší stadium (8 DAP) JI64-1 (A), prostřední stadium (19 DAP) JI64-2 (B), nejstarší stadium (27 DAP) JI64-3 (C), měřítko = 1 mm

4.2. Použité chemikálie

Agaróza (SERVA, kat. č.: 11404.07)

Bromfenolová modř v 30% glycerinu (Promega)

DNáza (Baseline-ZERO™ DNase, EpicentreBio, kat. č.: DB0711K)

Epicentre: reakční pufr 10X Baseline-ZERO™ DNase Reaction Buffer (Thermo Scientific, kat.č.: B43)

Fluorescenční barvivo pro DNA Simply Safe™ (EurX, kat.č.:E4600-01)

STOP pufr 10X Baseline-ZERO™ DNase Stop Solution (Epicentre, kat.č.: DB0715K)

Promega: AMV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer (Promega, kat.č.: M515A)

RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega, kat.č.: N2111)

primery (Oligo(dT)15 (Promega, kat.č.: C1101)

primery (Generi Biotech)

MyTaq™ RED Mix (Bioline, kat.č.: BIO-250043)

5x koncentrovaný pufr MyTaq™ Reaction Buffer s obsahem 15mmol/l MgCl₂, 5mmol/l dNTPs a nanášecího barviva (Bioline, UK, kat.č.: BIO-37111)

TBE pufr 10x (na 1 litr 5,40 g TRIS báze; 2,75 g kyseliny borité; 2 ml 0,5mol/l EDTA o pH 8,0; Sigma Aldrich, ČR)

SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline, kat.č.: BIO-98005)

Standard molekulové hmotnosti GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder 0,5 µg/µl (Thermo Scientific, Biogen, kat. č. SM0241)

BioTeke Plant Total RNA Extraction kit (BioTeke, kat.č.: RP3301)

Voda ošetřená DEPC

4.3. Seznam použitých přístrojů a zařízení

Automatická pipeta (Eppendorf Research plus, Biohit)

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

Digitální fotoaparát s oranžovým filtrem (EDAS 290, Kodak)

Elektroforetická vana a forma na gel (Owl A6, Thermo Scientific; Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad)

Flowbox (PV - 102, TelSTAR)

Homogenizátor (FastPrep-24, MP Biomedicals)

Laboratorní váhy (572-35),

Mikrocentrifuga stolní (Spectrafuge Mini, Labnet)

Předvážky (572, Kern)

Spektrofotometr (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific)

Termoblok (Termo Block MB - 102, BIOER.)

Termocykler (PTC-200 Peltier Thermal Cyclor, MJ Research)

Termocykler (CFX96TM Real-Time Detection System, Bio-Rad)

Třepačka laboratorní (IKA MS2)

UV transiluminátor (FireReader; Uvitec Cambridge)

Vortex (MS2 Minishaker, IKA)

Zdroj stejnosměrného napětí (PowerPac Basic; Bio-Rad)

4.4. Pomůcky

Buničitá vata

500ml Erlenmayerova baňka

Homogenizační keramické kuličky (FastPrep, kat.č.: 116540443)

Hřebeny pro elektroforézu

Kádinka

Plastová lžička

Pinzeta

Silikonová chňapka

Stereolupa

Špičky

Zkumavkové stripy (Trefflab, Switzerl)

2ml zkumavky (Eppendorf)

96jamková deska na PCR (4titude)

4.5. Metody

4.5.1. Izolace RNA

Pro izolaci RNA bylo použito osemení hrachu tří různých vývojových stadií příslušejících konkrétnímu genotypu (Cameor, L100, JI64, JI92). Jeden vzorek o konkrétním genotypu a vývojovém stadiu tak představovala všechna semena, respektive osemení, z daného lusku. Osemení bylo vypreparováno na ledu a následně zamrazeno pomocí tekutého dusíku.

Izolace RNA proběhla pomocí izolačního kitu čínské společnosti BioTeke Plant Total RNA Extraction Kit (Spin-column). Tento kit využívá metody adsorpce na silikát. Bylo použito 100 mg rostlinného pletiva (+/- 10 %), které bylo homogenizováno v 1 ml Lysis Buffer PL (BioTeke).

Postup dle protokolu výrobce:

1. Do 1,5ml zkumavky umístit asi 100 mg rostlinného pletiva, přidat 1 ml Lysis Buffer PL předeřtý na 65 °C
2. Do zkumavky přidat keramickou kuličku a nechat homogenizovat 1 min pomocí homogenizátoru
3. Vzorky vložit do termobloku a nechat zahřívát po dobu 30 min při 65 °C
4. Vzorky centrifugovat po dobu 10 min při 12 000 rpm
5. Supernatant přepipetovat na filtrační kolonu
6. Centrifugovat 1 min při 12 000 rpm
7. Filtrát přenést do 1,5 ml zkumavky a přidat stejný objem 70% ethanolu
8. Na kolonku Spin-column AC přenést 700 µl směsi a centrifugovat 1 min při 10 000 rpm
9. Odstranit filtrát, na kolonku nanést zbývajících 700 µl směsi a centrifugovat 1 min při 10 000 rpm
10. Odstranit filtrát, na kolonku nanést 500 µl Buffer RE, centrifugovat 1 min při 12 000 rpm
11. Odstranit filtrát
12. Přidat 700 µl Buffer RW, centrifugovat 1 min při 12 000 rpm a poté odstranit filtrát

13. Přidat dalších 700 μl Buffer RW, centrifugovat 1 min při 12 000 rpm a poté odstranit filtrát
14. Centrifugovat 2 min při 12 000 rpm a odstranit filtrát
15. Kolonu přenést do nové zkumavky, přidat 50 μl RNase-free vody a nechat stát 2 min
16. Centrifugovat 1 min při 12 000 rpm
17. Přidat 20 μl RNase-free vody a centrifugovat 1 min při 12 000 rpm
18. Vyizolovanou RNA uchovat v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (krátkodobě), při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (dlouhodobě)

4.5.2 Měření koncentrace RNA

Koncentrace vyizolované RNA byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop. Koncentrace byla získána z poměru absorbancí RNA při vlnových délkách 260 nm a 280 nm.

Postup:

1. Na NanoDrop napipetovat 2 μl destilované vody a proměřit blank
2. Na NanoDrop napipetovat 2 μl vzorku RNA změřit koncentraci RNA
3. Po každém měření snímač očistit buničitou vatou

4.5.3. Odstranění zbytkové genomové DNA

Aby ve vzorku nezůstala zbytková genomová DNA, která by v následujících krocích mohla způsobit nespecifickou PCR amplifikaci, bylo nutno tuto DNA vystavit působení DNázy.

Postup:

1. Do PCR mikrozkuvek napipetovat 65 μl vzorku RNA, 7,6 μl reakčního pufru a 3,8 μl DNázy
2. Mikrozkuvky nechat inkubovat 20 min při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. Přidat 7,6 μl STOP pufru a inkubovat 10 min při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.5.4 Přepis RNA do cDNA metodou dvoukrokové reverzní transkripce (RT-PCR)

Před samotnou RT-PCR bylo nutné vzorky vhodně naředit. Ředění proběhlo podle výsledků měření koncentrace tak, aby do reakce vstupovalo stejné množství RNA. Vzorky byly následně inkubovány s primery (oligodT, Promega) a po ukončení inkubace okamžitě zchlazeny na ledu. Poté proběhla samotná reverzní transkripce.

Postup:

Inkubace vzorků s primery:

1. Do PCR mikrokumavek napipetovat 9 μ l DEPC vody, 5 μ l zředěného vzorku RNA (1 μ g) a 1 μ l primeru
2. Mikrokumavky umístit do termocykleru na 5 min při 70 °C
3. Mikrokumavky umístit na led

Reverzní transkripce:

1. Připravit reakční směs složenou z: 12,5 μ l deionizované vody, 8 μ l pufru, 2,5 μ l dNTP (10 nM), 1 μ l inhibitoru ribonukleáz a 1 μ l AMV reverzní transkriptázy
2. 25 μ l reakční směsi přidat ke každému vzorku
3. Vzorky vložit do termocykleru na 60 min při 42 °C

4.5.5. Amplifikace vybraných genů z MACE transkriptomické analýzy

Na základě MACE transkriptomické analýzy, která byla provedena vedoucím a konzultantem bakalářské práce, byly vybrány diferenciólně exprimované geny (tabulka 1) během vývoje osetení.

Pro ověření funkčnosti vybraných primerů (tabulka 2) se vzorky cDNA byla provedena PCR. Reakční směs obsahovala 18 μ l PCR premixu a 2 μ l ředěného vzorku cDNA. Reakce byly provedeny v 8-jamkových 0,2ml stripech dle teplotního profilu (tabulka 3).

Postup: Do zkumavek napipetovat reakční směs: 4,0 μ l pufru, 13,0 μ l vody, 1,0 μ l primeru (tabulka 2), 0,1 μ l Taq polymerázy a 2 μ l DNA vzorku, vložit do termocykleru a spustit program (tabulka 3).

Tabulka 1: Vybrané geny a jejich homologové z MACE transkriptomické analýzy

Gen	Homolog z MACE analýzy	Typ
MACE-201	<i>PsCam005065</i>	transkripční faktor, GATA type (<i>Medicago truncatula</i>)
MACE-202	<i>PsCam039069</i>	alpha/beta hydrolase
MACE-207	<i>PsCam009776</i>	cellulose synthase
MACE-208	<i>PsCam049765</i>	GDP-L-galactose phosphorylase
MACE-209	<i>PsCam060108</i>	transkripční faktor, NAC (<i>Medicago truncatula</i>)
MACE-210	<i>PsCam036389</i>	transkripční faktor, GRAS (<i>Medicago truncatula</i>)
MACE-211	<i>PsCam059413</i>	phospholipid/glycerol acetyltransferase
MACE-213	<i>PsCam049394</i>	transkripční faktor, OS (<i>Medicago truncatula</i>)
MACE-214	<i>PsCam000456</i>	transkripční faktor, leucine zipper (<i>Medicago truncatula</i>)

Tabulka 2: Primery použité v bakalářské práci (Generi Biotech)

Název	Sekvence (5'-3')	Délka amplikonu (bp)	Zdroj
Aktin	F: TTCTCACTGAAGCTCCGCTTAACC R: CAATACCAGTTGTACGGCCACTAGC	144	Ferraro et al., 2014
MACE-201	F: CCTTCCAATTACATAGCACATGAGG R: GTCATGATCACCTTCAAGCTGG	105	vlastní
MACE-202	F: GATATGAATCGGTTCCACGTGC R: AGACAAACACAGTTCTTGAGGCT	167	vlastní
MACE-207	F: GCTTTCAAGGGATCTGCACCA R: ATACCAAAGTGGACAATGGCGACTC	111	vlastní
MACE-208	F: TATGCAGAGAAACAAGCTCTCGGA R: TCCAAGCATTGGCTTCAGACG	142	vlastní
MACE-209	F: TGGTGGTGATCAAAAGAGCGA R: CTACTCCTGTTTGAGCCATGTC	266	vlastní
MACE-210	F: TGGCCTTGTCTCATTGAGCGT R: TGCAGTACTTCTCAAGTCGCCGAC	142	vlastní
MACE-211	F: GAAAAGCTCTTTCCAGGGTTATGC R: TCCGTCTTTTCAGGCTGAGGT	106	vlastní
MACE-213	F: GGCAGATTTTCAGTAGGTCCGA R: TGATCATTCCTTACCGGGAGC	120	vlastní
MACE-214	F: GGCTAATGGTTCGCCCAA R: ATCCGAAGCATCTGTTGC	157	vlastní

Tabulka 3: Teplotní program pro PCR

Fáze	Teplota [°C]	Počet cyklů	Čas
denaturace	95	1	5 min
Denaturace	95	35	30 s
	Annealing		55
Extenze			72
Udržování	72	1	-

4.5.6. Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)

Metoda qRT-PCR slouží ke kvantifikaci DNA a transkripce. V každé reakci je stejné množství DNA, které je amplifikováno se shodnou účinností (Heid *et al.*, 1996). Standardizace byla provedena na tzv. konstitučně exprimovaném genu aktinu, a poté na vybraném vývojovém stadiu C1 - nejmladší vývojové stadium genotypu Cameor.

Průběh qRT-PCR byl ověřen gelovou elektroforézou a vyhodnocením křivky tání. Data získaná z termocykleru (CFX96TM, Bio-Rad) byla zpracována pomocí počítačového programu Microsoft Excel. Relativní kvantifikace exprese genů byla provedena pomocí metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Hodnota Ct představuje prahový cyklus. Toto číslo značí počet cyklů, při kterém je dosaženo fixní hodnoty amplifikovaného produktu (Livak *et Schmittgen*, 2001). Tato hodnota je tak získána výpočtem, přičemž od hodnoty Ct genu je odečtena hodnota Ct referenčního genu. Tím je získána ΔCt . Rozdílem ΔCt studovaného genu a kontroly získáme $\Delta\Delta Ct$, a tuto hodnotu dosadíme do vzorce $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Výsledky ze tří opakování jsou následně zprůměrovány a lze tak vypočítat směrodatnou odchylku.

Postup:

1. Do 1,5ml mikrozkušavky napipetovat jednotlivé složky reakční směsi podle počtu vzorků (pro jednu reakci: 5 μ l pufru SYBR Green, 2,2 μ l DEPC vody, 0,8 μ l primeru (Generi Biotech))
2. Reakční směs rozpipetovat do 96jamkové PCR desky a přidat 2 μ l vzorku cDNA (ředění s vodou 1 : 9)
3. Desku vložit do termocykleru (CFX96TM, Bio-Rad) a nastavit program qRT-PCR (tabulka 4), primer MACE-210 annealing při 58 °C

Tabulka 4: Teplotní program pro qRT-PCR

Fáze	Teplota	Počet cyklů	Čas
Denaturace	95	1	600
Denaturace	95	10	10
Annelaing	55	30	30
Extenze	72	20	20
Udržování	72	4	300

4.5.7 Horizontální agarózová elektroforéza

Pomocí gelové elektroforézy bylo ověřeno, zda u některých předešlých kroků vznikly odpovídající produkty. Elektroforéza probíhala v prostředí TBE pufru, a to v 2% gelu. Bylo nastaveno napětí 120 V po dobu 40 min. Gel byl vyhodnocen pomocí UV transiluminátoru při vlnové délce 302 nm a následně zdokumentován pomocí digitálního fotoaparátu s oranžovým filtrem. Následovalo zpracování počítačovým systémem FireReader V4.

Postup:

1. Navážit 5,0 g agaru a nechat rozpustit v 250 ml TBE pufru
2. Nechat rozvařit v mikrovlnné troubě
3. Po zchladnutí přidat 2 μ l barviva SimplySafe EUR_X a gel přelít do elektroforetické vany
4. Vložit hřebínky a gel nechat ztuhnout
5. Hřebínky odstranit a gel vložit do elektroforetické komůrky naplněné TBE pufrem
6. Do krajní jamky v každé řadě napipetovat 3 μ l standardu molekulové hmotnosti
7. 5,5 μ l vzorku smíchat s 1 μ l nanášecího pufru a přenést do jamek
8. Elektroforetickou komůrku připojit ke zdroji elektrického napětí (120 V) a spustit, elektroforetickou separaci nechat probíhat asi 40 min
9. Po ukončení elektroforézy gel vizualizovat pomocí transiluminátoru

5 VÝSLEDKY

Pro transkriptomickou analýzu byly vybrány kontrastní linie planého a kulturního hrachu, a to genotypy Cameor, L100, JI64 a JI92. Od každého genotypu byla odebrána tři vývojová stadia: genotyp Cameor: C1 - 10 DAP, C2 - 20 DAP, C3 - 27 DAP; genotyp L100: L1 - 10 DAP, L2 - 20 DAP, L3 - 27 DAP; genotyp JI92: 92-1 - 10 DAP, 92-2 - 20 DAP, 92-3 - 24 DAP; genotyp JI64: 64-1 - 8 DAP, 64-2 - 19 DAP, 64-3 - 27 DAP. Linie se lišily jak dormancí semen, tak pigmentací osemení. Pomocí stereolupy a tekutého dusíku byla provedena separace osemení od embrya všech čtyř testovaných genotypů hrachu. Následovala izolace RNA z osemení, která byla provedena pomocí BioTeke Plant Total RNA Extraction kitu. Čistota a koncentrace vyizolované RNA byla ověřena pomocí spektrofotometru NanoDrop. Hodnoty koncentrace (nejnižší naměřené) u planých genotypů (L100, JI64) byly nižší, než hodnoty koncentrace genotypů kulturních (Cameor, JI92). To je pravděpodobně způsobeno vysokým obsahem sekundárních metabolitů, fenolických látek a oligosacharidů u planých genotypů, a tudíž obtížnější izolací RNA. Hodnoty koncentrace RNA se u jednotlivých genotypů a stadií značně lišily (tabulka 5). Poměr absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm byl 2, což ukazuje na dobrou čistotu vzorku. Pomocí elektroforetické separace byla ověřena úspěšnost izolace, kvalita a množství RNA.

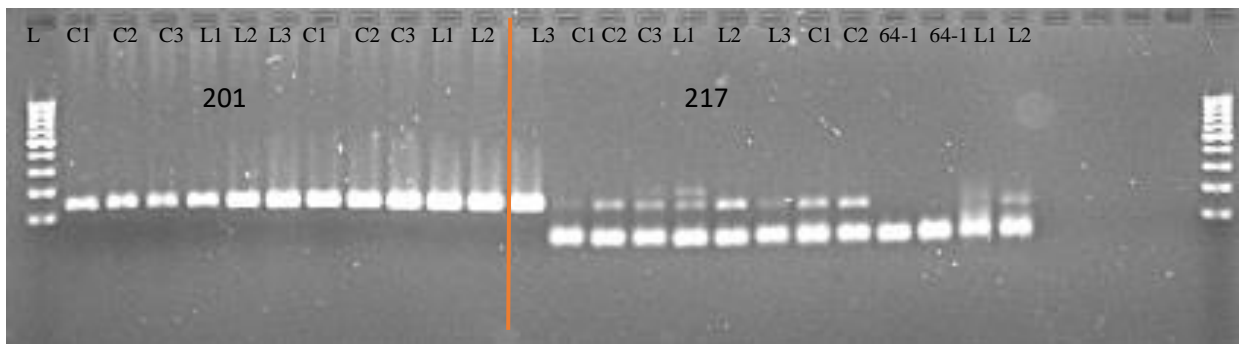
Tabulka 5: Koncentrace vyizolované RNA u jednotlivých vzorků a stadií

Genotyp	Koncentrace [ng/μl]
C1	621,7
C2	532,8
C3	108,9
L1	326,7
L2	103,8
L3	169,7
64-1	1556,6
64-2	1099,1
64-3	159,6
92-1	332,9
92-2	207,2
92-3	210,1

Následně byla RNA převedena do cDNA metodou dvoukrokové reverzní transkripce. Získaná cDNA byla amplifikována metodou PCR, a to za účelem ověření funkčnosti a specifčnosti testovaných primerů. Pro MACE analýzu bylo vybráno celkem 9 genů z původních 18 genů, přičemž 9 genů bylo z analýzy vyřazeno kvůli nízké specifitě amplifikace. Produkty těchto vyloučených primerů (primer MACE-217) nebyly na elektroforetogramu dobře viditelné, popřípadě tvořily více produktů (obrázek 6).

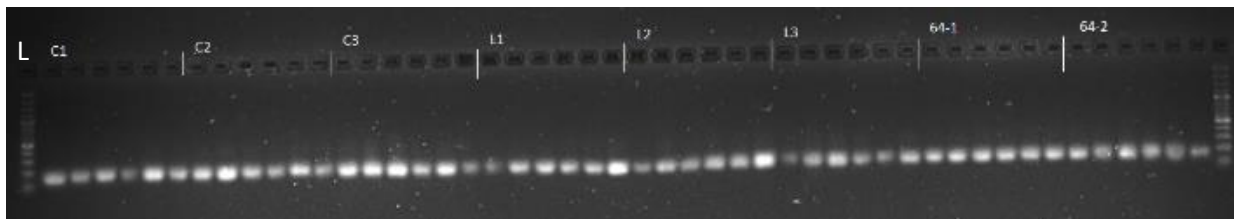
Poté byla provedena analýza množství transkriptů ve vzorcích metodou qRT-PCR. Reakce proběhla ve třech opakováních a její správný průběh byl ověřen pomocí gelové elektroforézy a analýzy křivky tání (obrázek 8). Jako referenční gen byl použit aktin (obrázek 7), jako kontrola byl použit genotyp Cameor ve stádiu C1 (nejmladší stádium). Následovala relativní kvantifikace metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ podle Livaka a Schmittgena (2001). Výsledky byly zpracovány do grafů a tabulek (tabulka 6ý), přičemž zeleně jsou zvýrazněny hodnoty exprese 0–4,0, modře 4,1–8,0 a červeně 8,1 a vyšší.

Obrázek 6: Srovnání amplifikace DNA se specifickými primery a primery s nízkou specifitou



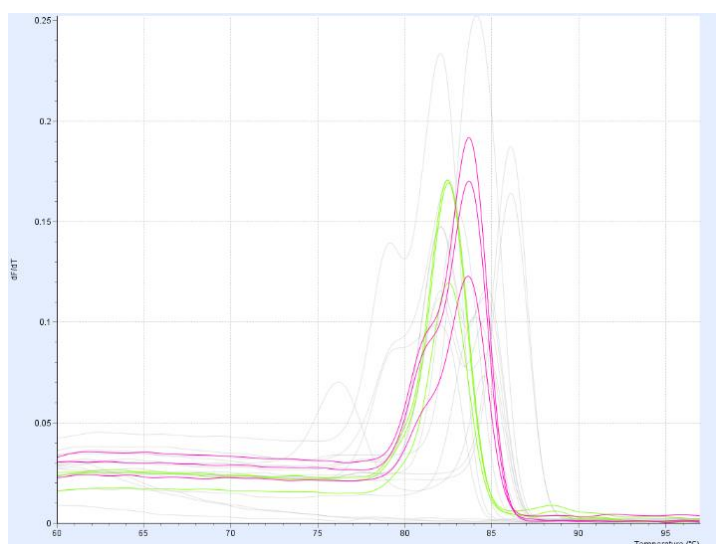
Legenda: L - standard molekulové hmotnosti (100 bp MW marker); vlevo primer MACE-201; vpravo vyloučený primer MACE-217; C1–C3 genotyp Cameor; L1–L3 genotyp L100; 64-1 genotyp JI64

Obrázek 7: Elektroforetické rozdělení produktů qRT-PCR při využití referenčního genu aktinu



Legenda: L - standard molekulové hmotnosti (100bp MW marker); C1–C3 genotyp Cameor (od nejmladšího po nejstarší stadium); L1–L3 genotyp L100 (od nejmladšího po nejstarší stadium); 64-1–64-2 genotyp JI64 (nejmladší a prostřední stadium)

Obrázek 8: Výsledek analýzy křivky tání produktu vzniklého amplifikací za použití primeru MACE-209, srovnání s aktinem



Legenda: primer MACE-209 zeleně; aktin růžově

Tabulka 6: Relativní míra exprese genů vyjádřená hodnotou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a relativní odchylkou

Genotyp	Vývojové stadium	MACE-201	MACE-202	MACE-207	MACE-208	MACE-209	MACE-210	MACE-211	MACE-213	MACE-214
Cameor	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	0,496 ± 0,188	0,1 ± 0,04	0,309 ± 0,051	11,799 ± 5,907	8,151 ± 2,024	3,847 ± 0,749	7,592 ± 0,642	3,96 ± 0,202	23,177 ± 4,899
	3	0,846 ± 0,413	0,54 ± 0,06	1,541 ± 0,226	6,821 ± 2,194	2,07 ± 0,667	6,933 ± 0,679	4,733 ± 0,987	5,334 ± 0,916	17,63 ± 1,017
L100	1	3,272 ± 0,738	9,91 ± 2,58	2,194 ± 0,579	0,77 ± 0,181	0,182 ± 0,045	1,204 ± 0,1	0,464 ± 0,079	1,06 ± 0,226	0,822 ± 0,163
	2	0,833 ± 0,06	0,99 ± 0,05	1,201 ± 0,22	1,171 ± 0,068	1,443 ± 0,535	1,886 ± 0,046	2,237 ± 0,14	1,21 ± 0,069	4,506 ± 0,286
	3	0,582 ± 0,108	0,36 ± 0,06	0,524 ± 0,053	5,327 ± 0,443	6,812 ± 0,36	13,757 ± 4,629	10,621 ± 2,157	7,415 ± 1,249	41,016 ± 5,404
JI-64	1	3,89 ± 0,83	4,02 ± 1,38	4,672 ± 0,702	1,542 ± 0,238	1,915 ± 0,323	7,793 ± 0,611	1,475 ± 0,213	1,212 ± 0,38	2,044 ± 0,826
	2	0,382 ± 0,072	1,38 ± 0,23	0,474 ± 0,036	7,123 ± 3,567	3,694 ± 0,482	2,078 ± 0,031	6,368 ± 0,587	3,456 ± 0,375	11,064 ± 3,691
	3	0,017 ± 0,003	0,07 ± 0,02	0,025 ± 0,011	1,936 ± 0,71	2,168 ± 0,701	5,722 ± 0,364	5,234 ± 0,507	5,974 ± 1,166	21,782 ± 6,342
JI-92	1	2,064 ± 0,455	0,31 ± 0,1	4,007 ± 0,286	2,959 ± 1,437	3,257 ± 0,8	3,643 ± 1,442	1,259 ± 0,428	2,833 ± 1,042	3,98 ± 1,849
	2	1,779 ± 0,561	0,94 ± 0,08	0,97 ± 0,08	18,957 ± 2,454	8,07 ± 2,471	7,639 ± 1,156	8,124 ± 0,566	6,875 ± 1,176	27,873 ± 5,531
	3	1,637 ± 0,068	2,51 ± 0,46	2,446 ± 0,75	4,227 ± 0,51	3,484 ± 0,957	23,249 ± 7,067	1,273 ± 0,649	5,417 ± 2,252	10,955 ± 4,28

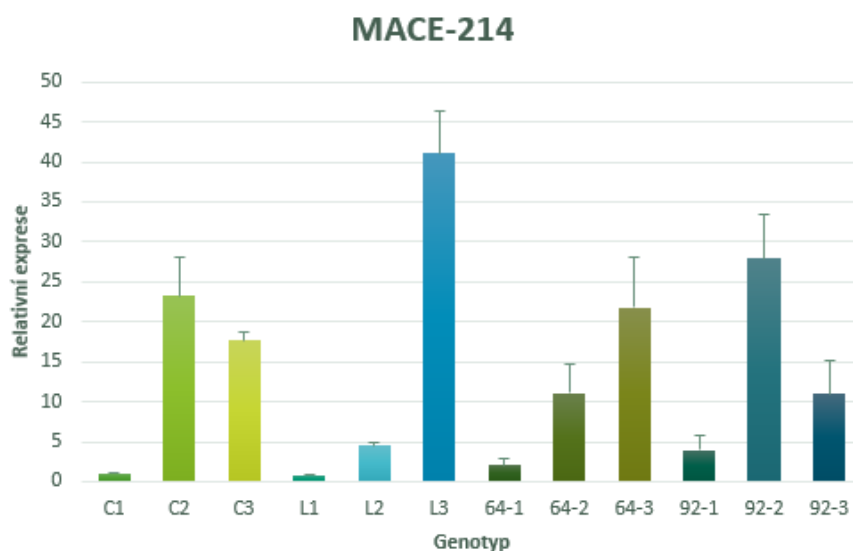
Bylo zjištěno, že z testovaných genů byl nejvíce exprimován MACE-214 (graf 1), naopak k nejnižší expresi docházelo u genu MACE-201 (graf 2).

U genu MACE-214 docházelo k postupně zvyšující se expresi u genotypů L100 a JI64 (plané formy), přičemž tento gen byl nejvíce exprimován ve stadiích L3 a 64-3, což jsou stadia nejstarší. U genotypů Cameor a JI92 (kulturní formy) docházelo k nejvyšší expresi u stadia prostředního, naopak expresi nejnižší vykazovalo nejmladší stadium (graf 1).

Expresie genu MACE-201 (transkripční faktor, GATA) se postupně se stářím semene snižovala, s výjimkou genotypu Cameor, kde v nejmladším a nestarším stadiu byla vyšší, zatímco ve stadiu prostředním nejnižší. Nejvyšší expresie genu byla naměřena u genotypů JI64 a L100 (planá forma) a jejich nejmladšího stadia (graf 2).

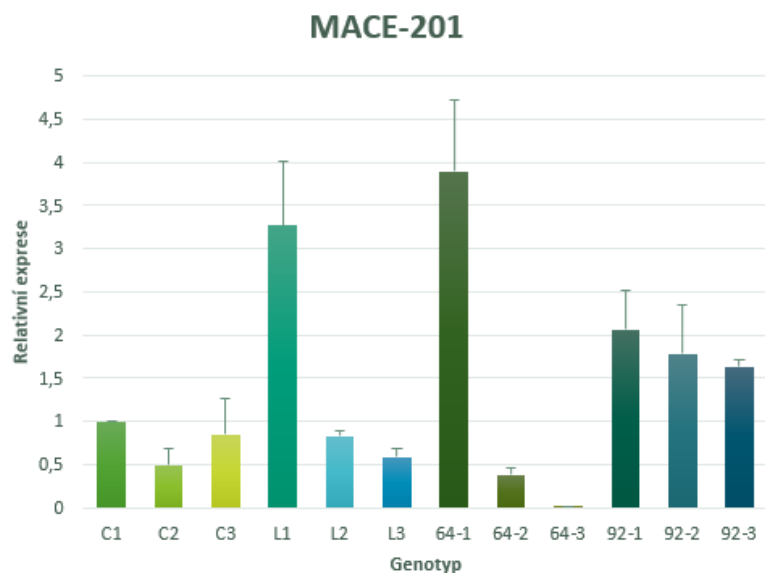
Gen MACE-202 (alpha/beta hydrolase) byl u genotypů L100 a JI64 down-regulovaný, expresie u nejmladšího stadia byla nejvyšší. U genotypu JI92 byly naměřeny nejvyšší hodnoty u stadia nejstaršího. Nejvyšší hodnoty expresie u genotypu Cameor byly pozorovány u nejmladšího stadia, ve stadiu prostředním byly naopak nejnižší, a ve stadiu nejstarším byla expresie opět vyšší (graf 3).

Graf 1: Relativní expresie genu MACE-214 ve třech vývojových stadiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



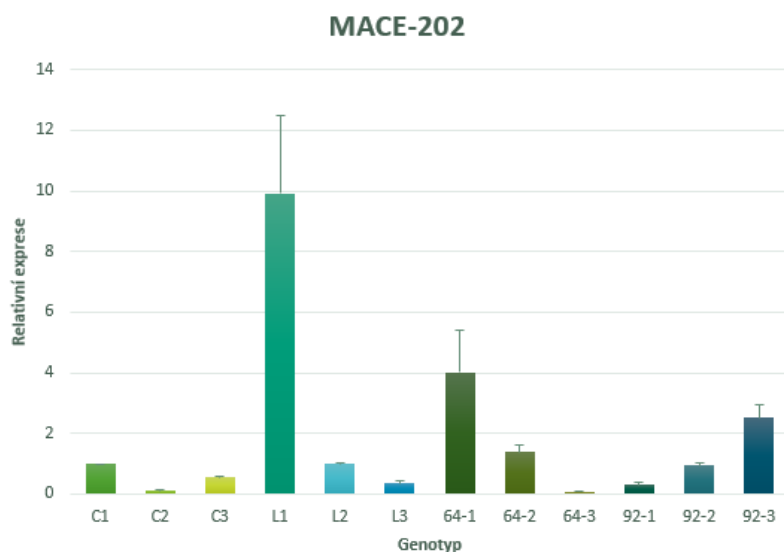
Legenda: C - Cameor (nejstarší stadium C3); L - L100 (nejstarší stadium L3); 64 - JI64 (nejstarší stadium 64-3); 92 - JI92 (nejstarší stadium 92-3)

Graf 2: Relativní exprese genu MACE-201 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



Legenda: C - Cameor (nejstarší stadium C3); L - L100 (nejstarší stadium L3); 64 - JI64 (nejstarší stadium 64-3); 92 - JI92 (nejstarší stadium 92-3)

Graf 3: Relativní exprese genu MACE-202 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu

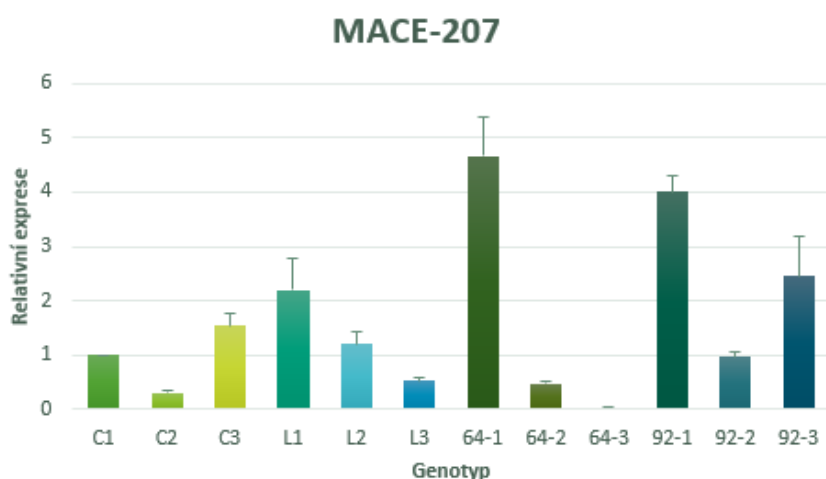


Legenda: C - Cameor (nejstarší stadium C3); L - L100 (nejstarší stadium L3); 64 - JI64 (nejstarší stadium 64-3); 92 - JI92 (nejstarší stadium 92-3)

U genotypů L100 a JI64 byl gen MACE-207 (cellulose synthase) down-regulovaný. Nejvyšší hodnoty exprese byly naměřeny u nejmladšího stadia. Nejnížší hodnoty u genotypů Cameor a JI92 byly naměřeny u nejmladšího stadia. Nejvyšší hodnoty exprese se u těchto genotypů však lišily. Zatímco u genotypu Cameor byla nejvyšší hodnota zaznamenána ve stadiu nejstarším, u genotypu JI92 vykazovalo nejvyšší hodnotu exprese stadium nejmladší (graf 4).

Nejvyšší exprese genu MACE-208 (GDP-L-galactose phosphorylase) byla naměřena v prostředním stadiu u všech genotypů, kromě genotypu L100, který vykazuje nejvyšší hodnotu exprese ve stadiu nejstarším. Nejmladší stadia všech genotypů, kromě genotypu L100, vykazovala hodnoty nejnížší (graf 5).

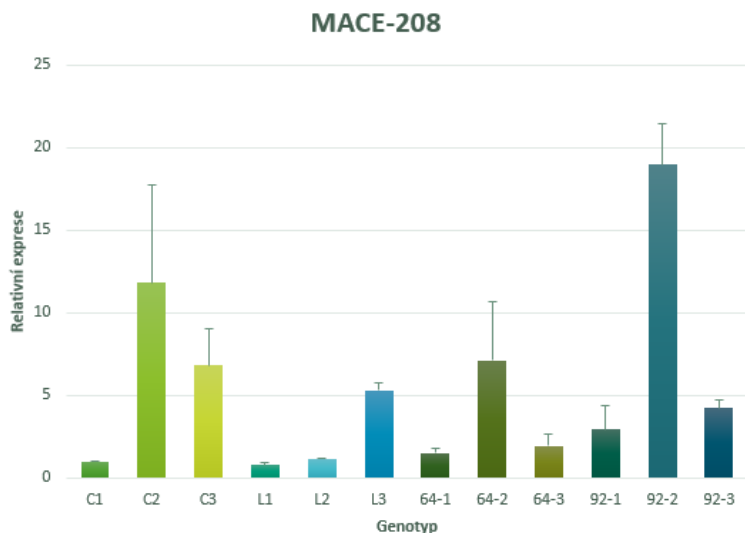
Graf 4: Relativní exprese genu MACE-207 ve třech vývojových stadiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



Legenda: C – Cameor (nejstarší stadium C3); L - L100 (nejstarší stadium L3); 64 - JI64 (nejstarší stadium 64-3); 92 - JI92 (nejstarší stadium 92-3)

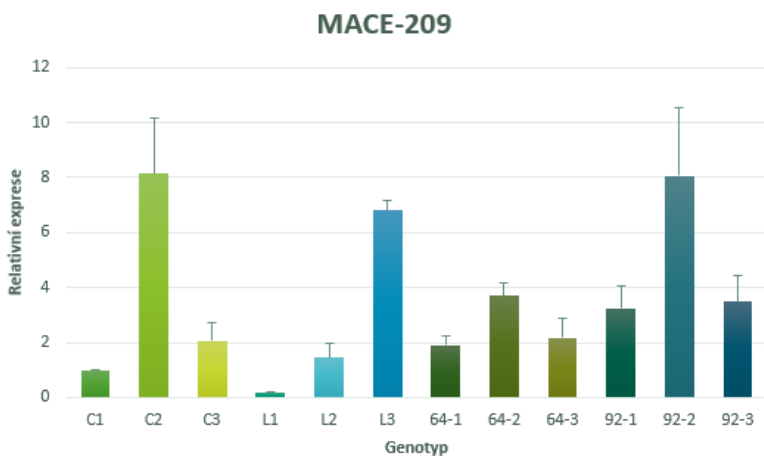
U genu MACE-209 (transkripční faktor, NAC) byla naměřena nejvyšší exprese v prostředním stadiu, a to u genotypů Cameor, JI64 a JI92. Nejnížší exprese byla zaznamenána v nejmladším stadiu těchto genotypů. Expresse genu MACE-209 u genotypu L100 byla nejvyšší u nejstaršího stadia, nejnížší pak u stadia nejmladšího (graf 6).

Graf 5: Relativní exprese genu MACE-208 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



Legenda: C - Cameor (nejstarší stadium C3); L - L100 (nejstarší stadium L3); 64 - JI64 (nejstarší stadium 64-3); 92 - JI92 (nejstarší stadium 92-3)

Graf 6: Relativní exprese genu MACE-209 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



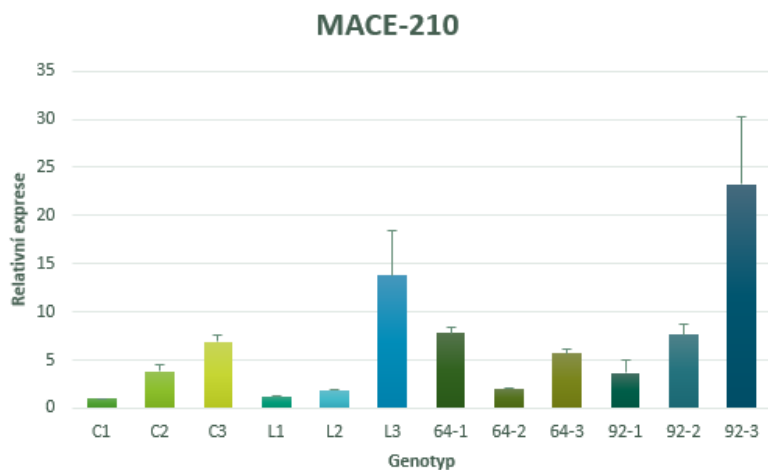
Legenda: C - Cameor (nejstarší stadium C3); L - L100 (nejstarší stadium L3); 64 - JI64 (nejstarší stadium 64-3); 92 - JI92 (nejstarší stadium 92-3)

Třetí stadium všech genotypů, kromě JI64, vykazovalo nejvyšší hodnoty exprese genu MACE-210 (transkripční faktor, GRAS). Tento gen byl nejvíce exprimován u genotypu JI92. Nejnížší hodnoty byly naměřeny u stadií nejmladších. U genotypu JI64 byla naměřena nejvyšší hodnota exprese u stadia nejmladšího, nejnížší hodnota pak u prostředního stadia (graf 7).

Gen MACE-211 (phospholipid/glycerol acetyltransferase), byl nejvíce exprimován v prostředním stadiu, a to u všech genotypů, kromě genotypu L100. Nejnížší hodnoty exprese byly naměřeny u nejmladších stadií všech genotypů. Nejvyšší hodnota exprese genotypu L100 byla zjištěna u nejstaršího stadia, zatímco nejnížší hodnota u stadia nejmladšího (graf 8).

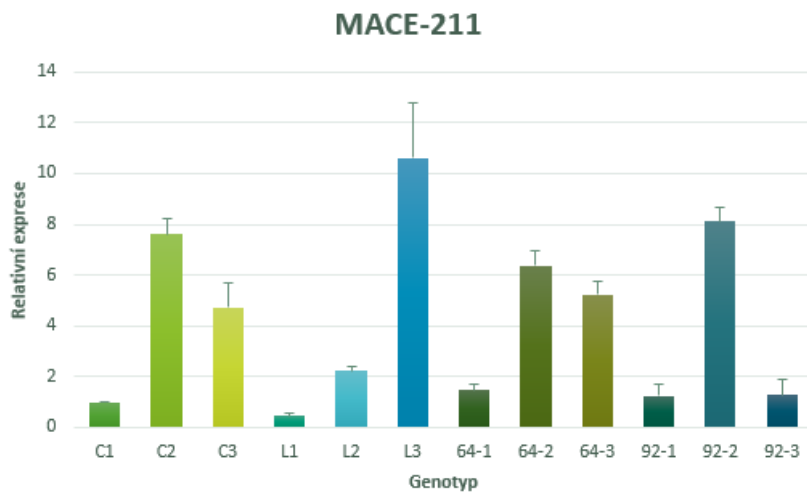
U genu MACE-213 (transkripční faktor, OS), docházelo k nejvyšší expresi v nejstarších stadiích všech genotypů, kromě genotypu JI92, který vykazoval nejvyšší expresi v prostředním stadiu. Nejnížší hodnoty exprese genu byly naměřeny u všech genotypů v nejmladším stadiu. Gen MACE-213 byl tedy u genotypů Cameor, L100 a JI64 up-regulovaný (graf 9).

Graf 7: Relativní exprese genu MACE-210 ve třech vývojových stadiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



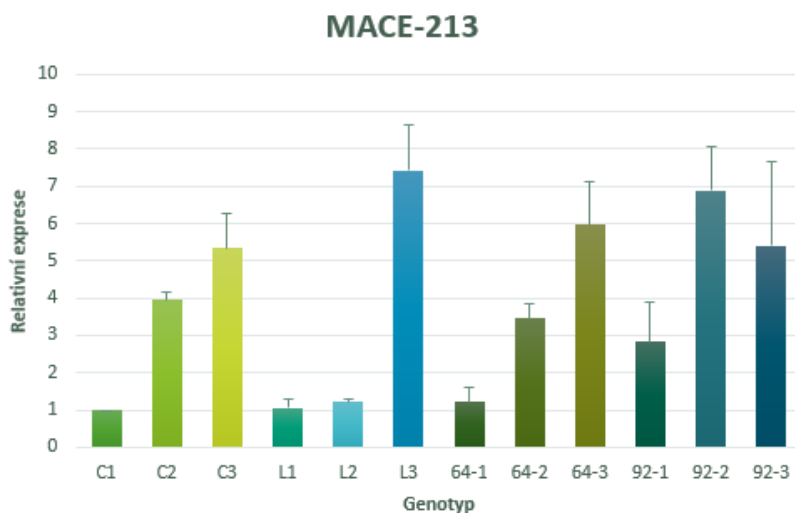
Legenda: C – Cameor (nejstarší stadium C3); L - L100 (nejstarší stadium L3); 64 - JI64 (nejstarší stadium 64-3); 92 - JI92 (nejstarší stadium 92-3)

Graf 8: Relativní exprese genu MACE-211 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



Legenda: C - Cameor (nejstarší stádium C3); L - L100 (nejstarší stádium L3); 64 - JI64 (nejstarší stádium 64-3); 92 - JI92 (nejstarší stádium 92-3)

Graf 9: Relativní exprese genu MACE-213 ve třech vývojových stádiích u čtyř analyzovaných genotypů hrachu



Legenda: C - Cameor (nejstarší stádium C3); L - L100 (nejstarší stádium L3); 64 - JI64 (nejstarší stádium 64-3); 92 - JI92 (nejstarší stádium 92-3)

6 DISKUZE

Vývoj semen byl předmětem zájmu mnoha studií, které byly zaměřeny především na vývoj embrya. Ve většině z nich však byly provedeny transkriptomické analýzy celého semene, nebo embrya, zatímco v této bakalářské práci byly studovány geny, které jsou exprimovány v osemení. Z tohoto rostlinného pletiva lze však izolovat RNA s velkými obtížemi, a to kvůli výskytu vysokého množství inhibujících látek. Mezi tyto látky jsou řazeny sacharidy, fenolické látky a pigmenty (Castell *et al.*, 1996). Především u pigmentovaných semen je izolace RNA obtížná, protože jsou na ni vázány proanthokyanidy, které zabráňují její extrakci (Wang *et Vodkin*, 1994). Standardní metody izolace RNA z osemení, jako je například fenol/chloroformová metoda nebo metoda na bázi guanidium thiokyanátu, nejsou v případě osemení příliš efektivní (Vojtková, 2016). Proto jsou dnes používány izolační kity, které umožňují dosažení vyššího výtěžku a lepší kvality RNA. U každého genotypu je však pozorována odlišná tloušťka osemení, tím pádem i rozdílné množství již zmíněných inhibičních látek, a to pravděpodobně vedlo k nižšímu výtěžku RNA u planých forem L100 a JI64.

Vývoj semen je geneticky naprogramován, koreluje se zvýšenou metabolickou aktivitou a je řízen komplexními regulačními sítěmi genů (Liu *et al.*, 2015). Studie prováděné na *Medicago truncatula* ukázaly, že přibližně polovina genů regulovaných osemením, je řazena k metabolickým drahám (Benedito *et al.*, 2008). Při vývoji semen hrají zásadní roli také hormony (Holdsworth *et al.*, 2008). Podrobná analýza, kterou provedli Liu *et al.* (2015), odhalila jak up-regulaci, tak i down-regulaci hormonálního metabolismu. Většina genů, podílejících se na biosyntéze auxinu a signálové transdukci, byla v pozdním stadiu down-regulována, což naznačuje význam auxinu právě v raném stadiu vývoje semen. Srovnávací analýza genů podílejících se na biosyntéze cukru a škrobu u planého a kulturního hrachu ukázala, že rozdílná exprese příbuzných genů v pozdních vývojových stadiích má za následek negativní korelace mezi rozpustným cukrem a biosyntetickým tokem škrobu v tkáních zrna i celé rostliny (Liu *et al.*, 2015).

V bakalářské práci byla provedena transkriptomická analýza exprese zájmových genů, které byly vybrány na základě MACE analýzy. Byly zvoleny čtyři genotypy hrachu, a to Cameor a L100 s nepigmentovaným osemením, dále pak JI64 a JI92 s pigmentovaným osemením. Cameor a JI92 zároveň představují kulturní odrůdu, zatímco L100 a JI64 jsou odrůdy plané. Z rostliny každého genotypu byla odebrána tři vývojová stadia lusků.

Rychlost vývoje těchto čtyř genotypů je však odlišná, plané odrůdy se vyvíjejí pomaleji než kulturní, a proto je toto rozdělení částečně relativní. Výsledky byly porovnány se studií Hradilová *et al.* (2017), která se zabývala transkripční analýzou vybraných genů v kontextu s domestikací a dormancí semen. Zároveň byla v této studii provedena komplexní metabolická a anatomická analýza, která porovnávala semena hrachu kulturního a planého v rámci ztráty dormance semen a pukavosti lusku. Expresi genů u genotypu L100 však s touto studií nebylo možno srovnat, protože zde tento genotyp nebyl testován.

Expresi genu MACE-201 se postupně se stářím semene snižovala, s výjimkou genotypu Cameor. Transkripční faktor (GATA type), testovaný ve studii Hradilová *et al.*, (2017) byl nejvíce exprimován rovněž u genotypu Cameor (Hradilová *et al.*, 2017).

U genu MACE-202 (alpha/beta hydrolase) byla pozorována rozdílná míra exprese u planých a kulturních forem. U planých forem (L100 a JI64) byl gen down-regulovaný, přičemž nejvyšší hodnoty byly naměřeny u nejmladšího stadia. Genotyp Cameor vykazoval nejvyšší hodnoty exprese u nejmladšího stadia, stejně jako L100. Expresi genu MACE-202 je tedy u odrůd s nepigmentovaným osemením nejvyšší v nejmladším stadiu. Alpha/beta hydroláza (ABH) se vyskytuje v signálních drahách giberellinů, strigolaktonů a karrikinů v rostlinách. ABH je také zodpovědná za hydrolýzu peptidových a esterových vazeb, dále se podílí na štěpení vazeb C-C, dekarboxylačních reakcích a dioxygenaci aromatických heterocyklů. ABB se u rostlin podílí také na růstu, vývoji, metabolismu a fitness rostliny (Mindrebo *et al.*, 2016).

Gen MACE-207 vykazoval u planých a kulturních forem rozdílnou expresi. Zatímco u planých forem docházelo k nejvyšší expresi u nejmladšího stadia, u kulturních odrůd byl gen nejvíce exprimován ve stadiu nestarším. Studie Hradilová *et al.* (2017) uvádí rozdílnou expresi genu *PsCam009776* (cellulose synthase) u forem planých a kulturních. Tento enzym společně s enzymy pectate lyase (EC: 4.2.2.2) a pectin methylesterase (EC: 3.1.1.11) může interferovat s enzymy biosyntézy ligninu, která vede k rozdílnému složení buněčné stěny (Hradilová *et al.*, 2017). To vysvětluje rozdílnou expresi genu u planých a kulturních forem, u kterých se liší právě tloušťka buněčné stěny.

Gen MACE-208 kóduje GDP-L-galactose phosphorylasu. Jeho nejvyšší exprese byla pozorována u prostředního stadia JI92, naopak exprese nejnižší byla zaznamenána u genotypu L100 a jeho nejmladšího stadia. U všech genotypů kromě L100 byl gen v nejmladším stadiu exprimován nejméně, ve stadiu prostředním probíhala exprese maximálně, a poté se

v nejstarším stadiu výrazně snížila. Expresi dvou genů kódujících GDP-L-galactose phosphorylasu studovali Gayo *et al.* (2011), a to u mutantů *Arabidopsis thaliana*. GDP-L-galactose phosphorylasa je kritická pro biosyntézu askorbátu. Ten byl akumulován v kotyledonech během klíčení všech testovaných genotypů *Arabidopsis thaliana* (Gayo *et al.*, 2011).

Transkripční faktor MACE-209 (NAC) vykazoval nejvyšší expresi v prostředním stadiu genotypů Cameor, JI64 a JI92. Naopak v nejmladším stadiu byla exprese nejnižší. Ve studii Hradilová *et al.* (2017) byly pozorovány obdobné exprese u genu *PsCam060108*, transkripční faktor (NAC), ten byl však studován během vývoje lusků hrachu (Hradilová *et al.*, 2017).

Dalším studovaným transkripčním faktorem byl gen MACE-210 (GRAS), přičemž nejvyšší expresi vykazoval genotyp JI92 v nejstarším stadiu vývoje. Exprese genu u odrůdy Cameor byla taktéž nejvyšší v nejstarším stadiu. Gen MACE-210 je tedy u kulturních odrůd up-regulovaný. U planých genotypů je tomu však jinak. Zatímco u L100 byla naměřena nejvyšší exprese ve stadiu nejstarším, u JI64 ve stadiu nejmladším.

Gen MACE-211 vykazoval nejvyšší hodnoty exprese v prostředním stadiu všech genotypů, kromě genotypu L100. Jedná se o gen kódující phospholipid/glycerol acetyltransferasu. Phospholipid/glycerol acetyltransferasa se podílí na syntéze triacylglycerolu v rostlinných pletivech. Studie Beisson *et al.* (2007) charakterizovala knockout mutanty *Arabidopsis thaliana* pro gen glycerol-3-fosfát acyltransferázy 5 (*GPAT5*). Mezi fenotypové vlastnosti *gpat* mutantů pak byla řazena zvýšená propustnost osemení a snížená klíčivost semen. Abnormální růst kořenů při stresových podmínkách naznačoval, že *GPAT5* hraje klíčovou roli při biogenezi v semeni a kořenech (Beisson *et al.*, 2007).

Triacylglycerol je také prekurzor pro syntézu glykolipidů, které se nacházejí ve fotosyntetických membránách. Tato syntéza probíhá prostřednictvím eukaryotické dráhy (Roughan *et Slack*, 1982; Ohlrogge *et Browse*, 1995; Somerville *et Browse*, 1996), ačkoli rozsah, v němž eukaryotická dráha přispívá k sestavení thylakoidních lipidů, se liší v závislosti na druhu a tkáni v rostlině. Například v rostlinách *Pisum sativum* (Mongrand *et al.*, 1998) a ve vývoji semen *Arabidopsis thaliana* (Xu *et al.*, 2005) převládá eukaryotická dráha syntézy tylakoidních lipidů, zatímco v listech *Arabidopsis* a špenátu (*Spinacia oleracea*) asi polovina fotosyntetických membránových lipidů pochází z eukaryotické dráhy a polovina z prokaryotické dráhy (Browse *et al.*, 1986). To by mohlo vysvětlovat skutečnost, že nejvyšší

exprese genu MACE-211 nebyla naměřena ve stadiu nejmladším, ale ve stadiu prostředním, případně nejstarším.

Gen MACE-213 (transkripční faktor, OS) byl nejvíce exprimován v nejstarších stadiích, a to u všech genotypů, kromě JI92. Naopak exprese nejnižší byla zjištěna u všech genotypů v nejmladším stadiu. Zároveň byl gen up-regulovaný u genotypů Cameor, L100 a JI64.

Transkripční faktor MACE-214 (leucine zipper) vykazoval u planých odrůd (L100, JI64) postupně zvyšující se expresi, nejvyšší hodnoty byly tedy zjištěny u nejstarších stadií. Kulturní formy (Cameor a JI92) vykazovaly expresi nejvyšší ve stadiu prostředním. Obdobné trendy byly pozorovány i u genu *PsCam000456*, transkripčního faktoru, který byl studovaný v kontextu exprese během vývoje lusků (Hradilová *et al.* 2017).

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo provést transkriptomickou analýzu vybraných genů aktivních během vývoje osemení hrachu (*Pisum sativum* L.). V literární rešerši jsou shrnuty základní poznatky o semenech, a dále jsou popsány studie, které přispěly k pochopení funkce genů exprimovaných v osemení hrachu.

V experimentální části práce byla provedena izolace RNA z osemení hrachu čtyř genotypů, a to konkrétně Cameor a JI92 (kulturní odrůdy), L100 a JI94 (plané odrůdy), přičemž každý genotyp byl studován ve třech stadiích vývoje. Izolovaná RNA byla následně přepsána do cDNA metodou dvoukrokové reverzní transkripce (RT-PCR). Pro transkripční analýzu byly na základě předem provedené MACE analýzy vybrány geny diferenciólně exprimované během vývoje osemení. Následovala amplifikace těchto genů a také kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR).

Genová exprese byla vyhodnocena pomocí statistické analýzy dat. Relativní kvantifikace exprese genů byla provedena pomocí metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Bylo zjištěno, že z testovaných genů byl nejvíce exprimován MACE-214 (transkripční faktor, leucine zipper), naopak k nejnižší expresi docházelo u genu MACE-201 (transkripční faktor, GATA type).

Tato práce napomohla validaci transkriptomických dat získaných z transkriptomické MACE analýzy vybraných genů. Zároveň se podařilo potvrdit výsledky z MACE analýzy, které ukázaly, že vybrané geny jsou během vývoje osemení exprimovány v sestupném, nebo vzestupném trendu. Tato práce může sloužit jako výchozí pro další podrobnější studium genů exprimovaných během vývoje osemení hrachu, a zároveň také pro srovnání planých a kulturních forem odlišujících se dormancí semen, zprostředkovanou právě osemením.

REFERENCE

Abbo S., Saranga Y., Peleg Z., Kerem Z., Lev-Yadun S., Gopher A. (2009): Reconsidering domestication of legumes versus Cereals in the ancient near east. *The Quarterly Review of Biology* 84(1): 29–50.

Abbo S., Rachamim E., Zehavi Y., Zezak I., Lev-Yadun S., Gopher A. (2011): Experimental growing of wild pea in Israel and its bearing on Near Eastern plant domestication. *Annals of Botany* (107): 1399–1404.

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

Abbo S., van-Oss R. P., Gopher A., Saranga Y., Ofner I., Peleg Z. (2013): Plant domestication versus crop evolution: a conceptual framework for cereals and grain legumes. *Trends in Plant Science* (19): 351–360.

Adams S., Vinkenoog R., Spielman M., Dickinson H., Scott R. (2000): Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana* require DNA methylation. *Development* (127): 2493–2502.

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

Allaby R. G. (2008): *The rise of plant domestication: life in the slow lane*. University of Warwick, UK *Biologist* 55(2): 94–99.

Allaby R. G. (2010): Integrating the processes in the evolutionary system of domestication. *Journal of Experimental Botany* (61): 935–944.

Albert S., Delsenyand M. (1997): A novel negative regulator of flavonoid biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Journal* (11): 289–299.

Alves-Carvalho S., Aubert G., Carrère S., Cruaud C., Brochot A. L., Jacquin F., Klein A., Martin C., Boucherot K., Kreplak J., da Silva C., Moreau S., Gamas P., Wincker P., Gouzy J., Burstin J. (2015): Full-length de novo assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. *The Plant Journal* 84 (1): 1–19.

Aapola A. A., Knesek J. E., Mink, G. I. (1974): The Influence of Inoculation Procedure on the Host Range of Pea Seed-Borne Mosaic Virus. *Phytopathology* (64): 1003–1006.

Ashby J. W. (1984): *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* 286: 5pp.

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

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

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

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

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

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

Benedito V. A., Torres-Jerez I., Murray J.D., Andriankaja A., Allen S., Kakar K. (2008): A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* (55): 504–513.

Beisson F., Li Y., Bonaventure G., Pollard M., Ohlrogge J. (2007): The Acyltransferase GPAT5 Is Required for the Synthesis of Suberin in Seed Coat and Root of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19 (1): 351–368

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

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

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

Bewley J. D., Bradford K., Hilhorst H. (2012): *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. Springer Science & Business Media.

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

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

Boccardo G., Lisa V., Milne R. G. (1983): In, R. W. Compans and D. H. L. Bishop (eds). *Double-Stranded RNA Viruses*. Elsevier, Amsterdam, New York: pp. 425–430.

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

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

Bos L. (1981): In, K. Maramorosch and K. F. Harris (eds). *Plant Diseases and Vectors. Ecology and Epidemiology*. Academic Press. New York: pp. 1–33.

Bos L., Hampton R. O., Makkouk K. M. (1988): Viruses and virus diseases of pea, lentil, faba bean and chickpea. In: Summerfield R. J. (eds) *World crops: Cool season food legumes. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, vol 5. Springer, Dordrecht: pp. 591–615.

Browse J., Warwick N., Somerville C. R., Slack C.R. (1986): Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the ‘16:3’ plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* (235): 25–31.

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

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

Cook D. R. (1999): *Medicago truncatula* – a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology* (2): 301–304.

Dahl W. J., Foster L. M., Tyler R. T. (2012): Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition* (108): 3–10.

Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K. M., Koornneef M. (2000): Influence of the testa on seed dormancy, germination, longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* (122): 403–414.

Dixon R. A., Xie D. Y., Sharma S. B. (2005): Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research. *New Phytologist* (165): 9–28.

Dolejší A. (1987): Zelenina na zahrádce. SZN Praha: 166–168.

Dueñas M., Sun B., Hernández T., Estrella I., Spranger M. I. (2003): Proanthocyanidin Composition in the Seed Coat of Lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (51): 7999–8004.

Duffus J. E. (1979): Legume yellows virus, a new, persistent aphid transmitted virus of legumes from California. *Phytopathology* (69): 217–221.

Ellis T. H. N., Poyser S. J. (2002): An integrated and comparative view of pea genetic and cytogenetic maps. *New Phytologist* (153): 17–25.

Ellis T. H. N., Hofer J. M. I., Timmerman-Vaughan G. M., Coyne C. J., Hellens R. P. (2011): Mendel, 150 years on. *Trends in Plant Science* (16): 590–596.

Endo Y., Choi B. H. C., Ohashi H., Delgado-Salinas A. (2008): Phylogenetic Relationships of New World *Vicia* (*Leguminosae*) Inferred from nrDNA Internal Transcribed Spacer Sequences and Floral Characters. *Systematic Botany* (33): 356–363.

Finch-Savage W. E., Leubner-Metzger G. (2006): Seed dormancy the control of germination. *New Phytologist* (171): 501–523.

Frowd J. A. and Bernier C. C. (1977): Seed shattering in a wild sorghum is conferred by a locus unrelated to domestication. *Canadian Journal of Plant Science* (57): 845–852.

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

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

Gallardo K., Le Signor C., Vandekerckhove J., Thompson R. D., Burstin J. (2003): Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. Plant Physiology, 133(2): 664–682.

Gallardo K., Lesignor K., Darmency M., Burstin J., Thompson R., Rochat C., Boutin J. P., Kuester H., Buitink J., Leprince O., Limami A., Grusak M. A. (2006): Seed Biology of *Medicago truncatula*. The *Medicago truncatula* handbook. ed. Mathesius U., Journet E. P., Sumner L. W. ISBN 0-9754303-1-9.

Gao Y., Badejo A., Shibata H., Sawa Y., Maruta T., Shigeoka S., Page M., Smirnoff N., Ishikawa T. (2017): Expression analysis of the VTC2 and VTC5 genes encoding GDP-L-galactose phosphorylase, an enzyme involved in ascorbate biosynthesis, in *Arabidopsis thaliana*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 75(9):1783–1788.

Golombek S., Rolletschek H., Wobus U., Weber H. (2001): Control of storage protein accumulation during legume seed development. Journal of Plant Physiology 158(4): 457–464.

Griga M. (2002): Morphology and anatomy of *Pisum sativum* somatic embryos. Biologia Plantarum 45(2): 173–182.

Grünwald N. J., Chen W., Larsen R.C. (2004): Pea Diseases and their Management. In: Naqvi S.A.M. H. (eds) Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II. Springer, Dordrecht

Hamly D. H. (1932): Softening of the seeds of *Melilotus alba*. Botanical Gazette 93: 345–375.

Hamly D. H. (1935): The light line in *Melilotus alba*. Botanical Gazette (96): 753–757.

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

Hardman A. R. (1976): Structural aspects of pathways of nutrient flow to developing embryo cotyledons of *Pisum sativum* L. Australian Journal of Botany (24): 711–721.

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

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

Harris W. M. (1983): On the development of macrosclereids in seed coats of *Pisum sativum* L. American Journal of Botany (70): 1528–1535.

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

Hradilová I., Trněný O., Válková M., Čechová 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): 542.

Hebblethwaite P. D., Heath M. C., Dawkins T. C. K. (1985): The pea crop: a basis for improvement. Proceedings of the university of Nottingham 40th Easter school in agricultural science, held at Sutton Bonington from 2–6 April 1984. Butterworths, London, United Kingdom. 486 pp.

Holdsworth M. J., Bentsink L., and Soppe W. J. J. (2008): Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. New Phytologist (179): 33–54.

Chai M., Zhou C., Molina I., Fu C., Nakashima J., Li G., Zhang W., Park J., Tang Y., Jiang Q., Wang Z. Y. (2016): A class II KNOX gene, KNOX4, controls seed physical dormancy. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 113 (25): 6997–7002.

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

Chomczynski P., and Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry (162): 156–159.

Jing R., Vershinin A., Grzebyta J., Shaw P., Smýkal P., Marshall D., Ambrose M. J., Ellis T. H. N., Flavell A. J. (2010): The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evolutionary Biology* (10): 1–20.

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

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

Kahl G., Molina C., Rotter B., Jüngling R., Frank A., Krezdorn N. (2012): Reduced representation sequencing of plant stress transcriptomes. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* (21): 119–127.

Käss E., Wink M. (1996): Molecular evolution of the leguminosae: Phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL*-sequences. *Biochemical Systematics and Ecology* (24): 365–378.

Kaiser W. J. and Hannan, R. M. (1983): Epidemiology and seed transmission of two tobacco streak virus pathotypes associated with seed increases of legume germ plasm in eastern Washington. *Plant Disease* (67): 1354–1357.

Kaloo G. (1993): Pea, *Pisum sativum* L. In: Kaloo, G. & Bergh, B. O. (Editors). Genetic improvement of vegetable crops. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom. pp. 409–425.

Kraft J. M., Larsen R. C., Inglis D.A. (1998): Diseases of pea. In: Allen, D. J. & Lenné, J.M. (Editors). The pathology of food and pasture legumes. CAB International, Wallingford, United Kingdom. pp. 325–370.

Lahola. (1990): Luskoviny - pěstování a využití. SZN, Praha, 1–224.

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

Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J. M., Baudry A., Pourcel L., Nesi N., Caboche M. (2006): Genetics biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* (57): 405–430.

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

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

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

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

Liu N., Zhang G., Xu S., Mao W., Hu Q., Gong Y. (2015): Comparative Transcriptomic Analyses of Vegetable and Grain Pea (*Pisum sativum* L.) Seed Development. *Frontiers in Plant Science* (6): 1039.

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

Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. (2017): Transcriptomics technologies. *PLoS Computational Biology* 18;13(5): e1005457.

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.

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

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

- Makasheva R. K. (1983): The pea. A. A. Balkema, Rotterdam, Netherlands. 267 pp.
- Marinos N. G. (1970): Embryogenesis of the pea (*Pisum sativum*) I. The cytological environment of the developing embryo. *Protoplasma* (70): 261–279.
- Maxted N., Ambrose M. (2001): Peas (*Pisum L.*). Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean (10): 181–191.
- Mikic' A., Smýkal P., Kenicer G., Vishnyakova M., Sarukhanyan N. (2013): The bicentenary of the research on 'beautiful' vavilovia (*Vavilovia formosa*), a legume crop wild relative with taxonomic and agronomic potential. *Botanical Journal of the Linnean Society* (172): 524–531.
- Miller S. S., Jin Z., Schnell J. A., Romero M. C., Brown D. C. W., Johnson D. A. (2010): Hourglass cell development in the soybean seed coat. *Annals of Botany* (106): 235–242.
- McCarty D. R. (1986): A simple method for extraction of DNA from maize tissue. *Maize Genetics Coop. Newsletter* 60, 61.
- McPhee K. (2003): Dry pea production and breeding: a mini review. *Journal of Food, Agriculture and Environment* (1): 64–69.
- Messiaen C. M., Seif A., Jarso M., Keneni, G. (2006): *Pisum sativum L.* In: Brink, M. & Belay, G. (Editors). *PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale)*, Wageningen, Netherlands. Accessed 27 September 2017.
- Mindrebo T., Nartey Ch., Seto Y., Burkart M., Noel J. (2016): Unveiling the functional diversity of the Alpha-Beta hydrolase fold in plants. *Current Opinion in Plant Biology* (41): 233–246.
- Mongrand S., Bessoule J., Cabantous F., Cassagne C. (1998). The C-16:3/C-18:3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry* (49): 1049–1064.
- Musil M., Kvičala B., Lešková O. (1981): Diagnostika vírusov strukovín a d'atelovín. Veda, Bratislava, 1981, 1–175.
- Ohlrogge J., Browse J. (1995): Lipid biosynthesis. *Plant Cell* (7): 957–970.

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

Pang Y., Cheng X., Huhman D. V., Ma J., Peel G. J., Yonekura-Sasakibara K., Saito K., Shem G., Sumner L. W., Tang Y., Wen J., Yun J., Dixon A. (2013): *Medicago* glucosyltransferase UGT72L1: potential roles in proanthocyanidin biosynthesis. *Planta* (238): 139–154.

Pelikán J., Hýbl M. (2012): Rostliny čeledi *Fabaceae* LINDL. (bobovitě) České republiky. Troubsko: Baštan, 2012. ISBN 978-80-905080-2-6.

Pradhan S., Bandhiwal N., Shah N., Kant Ch., Gaur R., Bhatia S. (2012): Global analysis of developing chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Frontiers in Plant Science* (5):698.

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

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

Rochow W. F., Duffus J. E. (1981): In, E. Kurstak (ed.). *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. Elsevier/North Holland Biomedical Press: pp. 147–170.

Roughan P. G., Slack C. R. (1982): Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* (33): 97–132.

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

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

Sharma R., Sharma K., Munshi A. D. (1998): Breeding for *Fusarium* wilt resistance in pea (*Pisum sativum* L.). *Annual Plant Protection Science*. 6. 1, 1998, 1–10.

- Smýkal P. (2009): Domestikace rostlin z pohledu současné genetiky. *ŽIVA* (1): 6.
- Smýkal P. (2009): Jak si člověk „ochočil“ rostliny. 21. století. 2.
- Smýkal P., Kenicer G., Flavell A. J., Corer J., Kosterin O., Redden R. J., Ford R., Coyne C. J., Maxted N., Ambrose M. J., Ellis T. H. N. (2011): Phylogeny, phylogeography genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources* (9): 4–18.
- Smýkal P. (2011): Fylogeneze a diverzita hrachu. *ŽIVA* (4): 151.
- Smýkal P., Aubert G., Burstin J., Coyne C. J., Ellis N. T. H., Flavell A. J., Ford R., Hýbl M., Macas J., Neumann P., McPhee K. E., Redden R. J., Rubiales D., Weller J. L., Warkentin T. D. (2012): Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era. *Agronomy* (2): 74–115.
- Smýkal P., Coyne C. J., Ambrose M. J. (2014): Legume crops phylogeny genetic diversity for science breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* (34): 43–104.
- Smýkal P., Vernoud V., Blair M. W., Soukup A., Thompson R. D. (2014): The role of the testa during development in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science* (5): 1–14.
- Smýkal P., Coyne C., Ambrose M. J., Maxted N., Schaefer H., Blair M. W., Berger J., Greene S. L., Nelson M. N., Besharat N., Vymyslický T., Toker C., Saxena R. K., Roorkiwal M., Pandey M. K., Hu J., Li Y. H., Wang L. X., Guo Y., Qiu L. J., Redden R. J., Varshney R. K. (2015): Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences* (34): 43–104.
- Spurný M. (1963): Cell wall structure of epidermal cells of the pea seed coat (*Pisum sativum* L.) studied by microcinematography. *Mikroskopie* (18): 272–279.
- Sreenivasulu N., Wobus U. (2013): Seed-development programs: a systems biology-based comparison between dicots and monocots. *Annual Review of Plant Biology* (64): 189–217.
- Steinbach G. (1997): *Lexikon užitečných rostlin*. Knižní klub, Praha.
- Sudheesh S., Sawbridge T. I., Cogan N. O., Kennedy P., Forster J. W., Kaur S. (2015): De novo assembly and characterisation of the field pea transcriptome using RNASeq. *BMC Genomics*: 16 (1): 611.
- Somerville C., Browse J. (1996): Dissecting desaturation: Plants prove advantageous. *Trends in Cell Biology* (6): 148–153.

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

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

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

Tiwari K. R., Penner G. A., Warkentin T. D. a RASHID K. Y.(1997): Pathogenic variation in *Erysiphe pisi*, the causal organism of powdery mildew of pea. *Canadian Journal of Plant Pathology* (19): 267–271.

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

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

Vavilov N. I.: Mirovije očagi važnejšich kulturnych rastěnij. Izbrannyje trudy. Tom II. IAN SSSR Moskva - Leningrad, 1960, 29–57.

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

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

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

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

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

Weber H., Borisjuk L., Wobus U. (1996): Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *The Plant Journal* (10): 823–834.

Weber H., Borisjuk L., Wobus U. (2005): Molecular physiology of legume seed development. *Annual Review of Plant Biology* (56): 253–279.

Weller J. L., Liew L. C., Hecht V. F., Rajandran V., Laurie R. E., Ridge S., et al. (2012): A conserved molecular basis for photoperiod adaptation in two temperate legumes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* (109): 21158–21163.

Xu C., Fan J., Froehlich J. E., Awai K., Benning C. (2005): Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* (17): 3094–3110.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Internetové zdroje:

<http://www.fao.org/faostat/en/#home>

<http://selgen.cz/agrotechnicka-doporuceni-2/hrach-sety/>

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