

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2016**

**Tereza Buchtová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Analýza mutantních linií vojtěšky (*Medicago truncatula* Gaertn.) pro studium funkce genů aktivních během vývoje osemení**

**Bakalářská práce**

**Tereza Buchtová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**

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

## **Čestné prohlášení**

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

V Olomouci .....

.....

Tereza Buchtová

## **Poděkování**

Mé poděkování patří všem, kdo měli trpělivost a ochotu mi pomáhat a vést mě k úspěšnému dokončení této práce.

Děkuji.

## **Anotace**

### **Analýza mutantních linií vojtěšky (*Medicago truncatula* Gaertn.) pro studium funkce genů aktivních během vývoje osemení**

V post-genomické době je největším úkolem zjištění funkce genů. Tolice srpovitá (*Medicago truncatula* Gaertn.) je modelová bobovitá rostlina, s přečteným genomem o velikosti 375 Mbp. Pro studium funkce genů byl vytvořen soubor mutantních linií, s inzercí tabákového retrotranspozonu *Tnt1*. Tato práce si klade za cíl provést genetickou analýzu vybraných linií vojtěšky, nesoucí inzerci v genech exprimovaných během vývoje osemení. Jejich potenciální funkcí je impregnace buněčných stěn navozující nepropustnost osemení pro vodu a výsledně pak dormanci semen. V mutantních liniích bude analyzováno místo inzerce *Tnt1* elementu a budou identifikovány homozygotní linie. V případě získání dostatečného počtu semen bude sledován fenotypový projev na úrovni struktury osemení a histochemického důkazu akumulace proantokyanidinů.

**Klíčová slova:** *Medicago truncatula*, *Tnt1*, inzerce, mutagenese, proantokyanidiny

## **Annotation**

### **Analysis of medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) mutant lines to study the function of seed coat expressed genes**

In the post-genomic epoch the biggest challenge is determination of the gene function. Medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) is one of the model legume plants with the sequenced genome of about 375 Mbp. In order to study the gene function the set of mutant lines with tobacco retrotransposon insertion *Tnt1* has been created. The goal of this work is molecular analysis of the selected lines of medic, which carry insertion in the genes expressed during the seed coat development. These genes have potential function in cell walls impregnation causing the seed coat water impermeability ultimately resulting in seed dormancy. In mutant lines the insertion site of *Tnt1* element will be analyzed and homozygous lines will be identified. In case of sufficient seed set, the expression of mutated genes and seed phenotype at the level of seed coat structure and histochemical evidence of proanthocyanidin accumulation will be observed.

**Key words:** *Medicago truncatula*, *Tnt1*, insertion, mutagenesis, proanthocyanidins

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>MUTAGENEZE</b> .....	<b>11</b>
3.1	HISTORIE MUTAGENEZE .....	11
3.2	IDENTIFIKACE FUNKCE GENU .....	12
3.3	CHEMICKÁ A RADIAČNÍ MUTAGENEZE.....	12
3.3.1	<i>Targeting induced local lesions in genomes</i> .....	13
3.4	RNA INTERFERENCE .....	13
3.5	MÍSTNĚ SPECIFICKÁ MUTAGENEZE .....	14
3.6	INZERČNÍ MUTAGENEZE .....	15
3.6.1	T-DNA <i>tagging</i> .....	15
3.6.2	Transpozony a retrotranspozony .....	16
3.6.2.1	<i>Tnt1 retrotranspozon</i> .....	17
<b>4</b>	<b>FABACEAE</b> .....	<b>19</b>
4.1	TOLICE ( <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> GAERTN.) .....	20
4.1.1	<i>M. truncatula</i> jako modelová luskovina.....	21
4.1.2	Semena tolíce .....	21
4.1.2.1	<i>Látkové složení semen tolíce</i> .....	23
4.1.2.2	<i>Morfogeneze semene tolíce</i> .....	23
4.1.2.3	<i>Dormance semen</i> .....	24
4.1.3	Genomická data <i>M. truncatula</i> .....	25
<b>5</b>	<b>FLAVONOIDY</b> .....	<b>27</b>
5.1	BIOSYNTÉZA PROANTOKYANIDINŮ .....	28
5.2	URIDINDIFOSFÁT GLUKOSYLTRANSFERÁZA .....	29
5.3	KOMPLEX TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ MYB, BHLH, <i>HELIX-LOOP-HELIX</i> A WD40 (MBW).....	30
5.3.1	MtWD40-1 transkripční faktor .....	30
5.3.2	MYB transkripční faktory .....	31
5.3.2.1	<i>Transparent testa 2 transkripční faktor (TT2)</i> .....	31
5.3.2.2	<i>Medicago truncatula proantokyanidinový regulátorový transkripční faktor (MtPAR)</i> .....	31
5.3.2.3	<i>MYB5 transkripční faktor</i> .....	32
5.3.3	Transparent testa 8 transkripční faktor .....	32
5.4	<i>MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION</i> TRANSPORTÉR (MATE1) .....	33
5.5	OXIDACE PROANTOKYANIDINŮ .....	34
5.5.1	Transparent testa 10 polyfenoloxidáza.....	34
<b>6</b>	<b>MATERIÁLY A METODY</b> .....	<b>35</b>
6.1	IZOLACE GENOMOVÉ DNA.....	37
6.2	ŠPEKTROFOTOMETRICKÉ MĚŘENÍ DNA .....	38
6.3	AMPLIFIKACE POLYMERÁZOVOU ŘETĚZOVOU REAKCÍ (PCR) .....	38
6.4	HORIZONTÁLNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA NA AGARÓZOVÉM GELU .....	40
6.5	SEKVENOVÁNÍ.....	40
6.6	BARVENÍ DMACA.....	41
6.7	ANALÝZA OSEMENÍ SKENOVACÍM ELEKTRONOVÝM MIKROSKOPEM.....	42
6.8	BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA A PROGRAMOVÉ NÁSTROJE.....	42
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>43</b>
7.1	URČENÍ PŘÍTOMNOSTI INZERTU <i>Tnt 1</i> VYBRANÝCH LINÍ <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> .....	43
7.2	POPIS FENOTYPOVÉHO PROJEVU – ANALÝZA OSEMENÍ.....	47
7.2.1	Histochemická detekce celkových proantokyanidinů pomocí DMACA barvení .....	47
7.2.2	Struktura povrchu osemení <i>M. truncatula</i> .....	48
7.3	SEKVENOVÁNÍ AMPLIFIKOVANÝCH FRAGMENTŮ .....	52
7.4	SCHÉMA GENŮ S INZERCÍ <i>Tnt1</i> RETROTRANSPOZONU .....	54

<b>8</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>60</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>61</b>
<b>11</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>64</b>



# 1 ÚVOD

Genetická mutace a identifikace mutovaného genu je základním přístupem k pochopení funkce genu (Tadege a kol., 2005), ale i pro odhalení jeho způsobu dědičnosti, organizace a struktury. K tomuto účelu slouží například uměle vytvořené mutantní linie (Alberts a kol., 2002). Pro studium celých skupin organismů se vybírají modelové druhy. Jejich blízký fylogenetický vztah a genomická syntenie s jinými organismy značně zjednodušují studium těchto příbuzných druhů. Jsou to organismy s nevhodnějšími vlastnostmi pro studium. U rostlin se vybírají druhy s malým genomem, s malým počtem malých chromozomů, krátkým životním cyklem, možností transformace, aj. (Flavell, 2009).

*Medicago truncatula* je modelovým druhem luskovin s téměř celým osekvenovaným genomem (Tang a kol., 2014; The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc., 2014). Ke studiu funkce genů se vytvořily mutantní linie. Největší potenciál z aplikovaných metod měla inzerční mutagenese. Tolice se mutagenizovala pomocí *Tnt1* retrotranspozonu pocházejícího z tabáku. U *Tnt1* retrotranspozonu se ukázala preference pro genově bohaté oblasti a aktivitu během *in vitro* podmínek (Tadege a kol., 2008). Retrotranspozonové mutace jsou zároveň stabilní díky jejich způsobu pohybu po genomu: *copy-and-past* (Kidwell, 2005).

Tato práce je zaměřená na analýzu inzerčních linií genů zapojených do proantokyanidinové metabolické dráhy, která je spojená s vývojem osemení a potenciálně i s dormancí semen. Kromě přítomnosti a umístění inzerce v genomu se dále provedlo prvotní fenotypové hodnocení vlivu inaktivace daného genu na strukturu osemení a hromadění rozpustných proantokyanidinů.

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je analýza vybraných inzerčních linií *Tnt1* retrotranspozonu *Medicago truncatula*. Tato práce si klade za cíl provést genetickou analýzu vybraných linií vojtěšky, nesoucích inzerci v genech exprimovaných během vývoje osemení. Všechny zvolené linie nesou mutaci ve vybraných genech zapojených do proantokyanidinové metabolické dráhy, které mají souvislost s vývojem osemení a potencionálně i dormancí semene. Jejich potenciální funkcí je impregnace buněčných stěn navozující nepropustnost osemení pro vodu a výsledně pak dormanci semen. V mutantních liniích bylo analyzováno místo inzerce *Tnt1* elementu a byly identifikovány homo(hetero)zygotní linie. V případě získání dostatečného počtu semen byl sledován fenotypový projev osemení.

# 3 MUTAGENEZE

## 3.1 Historie mutagenese

Studium a snaha indukce mutagenese se objevuje od počátku 20. století. Neúspěšně s ní začal T. H. Morgan, který se snažil vyvolat mutaci u octomilky (*Drosophila* sp.) za pomoci éteru a alkoholu (Auerbach, 1973). Student T. H. Morgana, H. J. Muller sledoval, že změnou (mutací) v genu dojde ke změně heterokatalytické funkce DNA, nikoliv však autokatalytické (Muller, 1922; Falk, 2010). H. J. Muller jako první představil v roce 1927 indukci mutací u octomilky (*Drosophila* sp.) za pomoci rentgenového záření (Muller, 1927). Souběžně s H. J. Mullerem prováděl pokusy L. Stadler, který v roce 1928 publikoval úspěšnou mutagenesi ječmene (Stadler, 1928). Od tohoto období je mutagenese nástrojem pro studium funkce genů (Falk, 2010). V roce 1940 B. McClintock objevila transpozony (Zhu a kol., 2011), které sledovala na variacích pigmentace kukuřičných obilek a pojmenovala je *Ac*-autonomní element a *Dc*-neautonomní element (McClintock, 1950). Dalším centrem zájmu se stala chemická mutagenese, kterou poprvé na octomilce a myši úspěšně provedli C. Auerbach s J. M. Robsonem v roce 1941 (Auerbach, 1973). Od 60. let se zakládaly společnosti pro výzkum a praktické využití radiační mutagenese v zemědělství a od 80. let se rozvíjela inzerční indukovaná mutagenese (Kharkwal, 2011), u rostlin umožněná transgenozí pomocí *Agrobacterium* (Schell a Van Montagu, 1977). V roce 2000 se poprvé přečetl genom vyšší rostliny, a to huseníčku, *Arabidopsis thaliana* L. (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) následovanou rýží *Oryza sativa* L. skupiny Indica a Japonica v letech 2002 až 2005 (International Rice Genome Sequencing Project, 2005; Kharkwal, 2011). Od roku 2005 se zřizují databáze mutantních linií (Kharkwal, 2011).

Rostlinná mutagenese je důležitá nejen pro studium funkce genů, ale také vzhledem k aplikačnímu potenciálu, ve šlechtění rostlin. Mezi první úspěchy spontánních mutací ve šlechtitelství byly *semi-dwarf* mutanti pšenice a rýže s vyšším výnosem a kratší dobou pěstování, čímž započala *Green Revolution* (Forster a Shu, 2011), tedy zaměření na šlechtění obilnin se znaky: zakrslý vzrůst a ranost kvetení (Sangwan a kol., 2011). Dále také například vznikl *mid-rib* mutant kukuřice s nižším obsahem ligninu, díky čemuž se stala využívanou pícevní (Forster a Shu, 2011). Příklady prvních indukovaných mutantních odrůd jsou: tabák odrůdy Chlorina (1936, Indonésie), tulipán odrůdy Faraday (1949, Nizozemsko), hořčice setá odrůdy Primex (1950, Švédsko), (Forster a Shu, 2011),

ječmen odrůdy Diamant (1965, Československo); (Bouma, 1967), aj. První indukovaná mutace v ovocné plodině byla provedena na třešni za vzniku odrůdy Compact Lambert (1964, Kanada); (Forster a Shu, 2011). Mutageneze se stala řešením především pro rostliny bez genetické variability, které se rozmnožují vegetativně, kvůli jejich sterilitě a ztrátě možnosti rekombinace. Genetická variabilita se u těchto druhů navozuje například radiální nebo chemickou mutagenezí. Patří sem významné plodiny, jako je banán a cukrová třtina (Novak a Brunner, 1992).

### 3.2 Identifikace funkce genu

Zpočátku se geny identifikovaly pouze postupem tzv. *forward* genetiky, tedy od fenotypu směrem k sekvenci, ale s objevy (se znalostí genomu) vznikl systém *reverse* genetiky, tj. od znalosti sekvence ke sledování fenotypu (Beutler, 2003). V obou případech se analýza mutovaných organismů za účelem identifikace genů neobejde bez indukce mutací. Screening spontánních mutací by vyžadoval mnohonásobně více jedinců (Alberts a kol., 2002). Mutagenizují se vegetativně mikropropagované rostliny, axilární a adventivní pupeny, apikální meristémy, kalusové kultury, prašníky, pylová zrna, embrya a semena (Novak a Brunner, 1992; Ahloowalia a Maluszynski, 2001) za vzniku recesivních popř. dominantních mutací.

**Recesivní mutace** souvisí se ztrátou funkce genů (Lodish a kol., 2000) a jsou nejběžnějším typem mutace. Projevují se ve fenotypu pouze v homozygotním stavu, často zůstávají v genotypu skryté.

**Dominantní mutace** se nejvíce spojují se získáním nebo ztrátou funkce genu (Lodish a kol., 2000). Dominantní mutace se ve fenotypu projevují okamžitě, protože se projevují jak v homozygotním tak heterozygotním stavu.

Četnost recesivních mutací je 90–100 % oproti dominantním, kterých je 0–6 % (Forster a Shu, 2011).

Základní rozdělení mutagenezí používaných pro určování funkce genu je: chemická, radiální a inzerční (Alberts a kol., 2002; Tadege a kol., 2005).

### 3.3 Chemická a radiální mutageneze

Nejznámější chemický mutagen je etylmetansulfonát (EMS). EMS působí jako alkylační činidlo a vytváří bodové mutace – tranzice (Penmetsa a Cook, 2000). Principem působení EMS je nejčastěji přidávání etylové skupiny na guanin, z kterého se stává

O<sup>6</sup>-etylguanin, analog adeninu (Kim a kol., 2006). Z původního páru bází G-C se tedy stává T(O<sup>6</sup>-etG)-A. Kromě ztráty funkce genu může nastat situace získání funkce, popřípadě změna funkce genu (Penmetsa a Cook, 2000). Zejména mutace v nekódujících regulačních oblastech způsobuje změny v genové expresi tedy *up*- nebo *down*-regulaci (Sikora a kol., 2011). Příklady dalších chemických mutagenů používaných pro rostliny jsou azid sodný, metylnitrosomočovina, popřípadě jejich kombinace. Výsledkem působení je opět tranzice (Sikora a kol., 2011). Velmi známé mutageny jsou analogy bází, například: 5-bromuracil (analog thyminu) a 2-aminopurin (analog adeninu).

Mutace radiací je zprostředkována ionizujícím zářením (rychlé neutrony,  $\gamma$ - a X-záření); (Koornneef a kol., 1982), kterým vznikají chromozomové přestavby (Bruggemann a kol., 1996). Metoda je žádoucí u tandemových repetitivních rodin genů (Tadege a kol., 2005).

U obou mutagenezí je problematické nalézt rovnováhu mezi mírou mutace a plodností. Naopak výhodou metod je, že nejsou považovány za transgenní a je možné je použít v zásadě na jakýkoliv organismus (Tadege a kol., 2005).

### 3.3.1 *Targeting induced local lesions in genomes*

*Targeting induced local lesions in genomes* (TILLING) patří k nástrojům reverzní genetiky, který identifikuje nukleotidové změny u chemických mutací (McCallum a kol., 2000). Základem bylo objevení enzymu nukleázy CEL I z celeru (Oleykowski, 1998). Nukleáza se inkubuje s PCR produktem (Colbert a kol., 2001) za rozpoznání *mismatch* lokusu v heteroduplexu a toto místo štěpí na 3' konci, přičemž štěpení je jednovláknové. CEL I je tedy mutace a polymorfismus specifický enzym (Oleykowski, 1998). Po štěpení vznikají vlákna dvou velikostí, z kterých je možné zjistit místo a rozsah mutace (Oleykowski, 1998) provedením elektroforézy s analyzačním systémem. Použité primery na PCR jsou odlišně fluorescenčně značeny a výsledek se vizualizuje skenerem ve dvou kanálech za použití infračerveného záření, což je nejčastěji používaným systémem detekce typu LI-COR (Colbert a kol., 2001). Metoda je účinná s fragmenty o velikosti do 1 kbp (Oleykowski, 1998).

## 3.4 RNA interference

RNA interference (RNAi) je proces probíhající v eukaryotické buňce, který má dvě funkce: 1) regulaci množství daného transkriptu v buňce a 2) obranu proti cizorodé RNA. Běžně je zprostředkována malými RNA (smRNA) o velikosti okolo 20 bp. Jsou popsány

dva typy smRNA: miRNA a siRNA. Jejich funkcí je navazování na mRNA dle komplementarity a vyřazení mRNA z funkce. Vzniklý komplex dvouvláknové RNA (dsRNA) je signálem pro degradaci. Tento princip se využívá pro cílené vyřazení transkriptu z funkce, což má stejný výsledek jako vyřazení genu z funkce. Pro požadovaný efekt se do buňky zavádí dsRNA (Lee a kol., 2011).

**Virus induced gene silencing (VIGS)** je metoda využívající rekombinovaný virus, který nese sekvenci genu pro cílené umlčení. Interference je zaměřená jak na virovou částici, tak na komplementárně navázanou mRNA (Velásquez, 2009). Pro úspěch je důležitý vhodný virový vektor. Transformace není nezbytná, neboť virus může být vnesen mechanicky (Tadege a kol., 2005), ale může být použit i *Agrobacterium* a jeho Ti plazmid (Velásquez, 2009). VIGS je poměrně nová metoda reverzní genetiky, která ale není dosud aplikovatelná na *Medicago truncatula* (Cheng a kol., 2014).

### 3.5 Místně specifická mutageneze

Mutageneze probíhá v konkrétním místě genomu, ale vyžaduje znalost sekvence genu (Osakabe, Saika a kol., 2011). Využívají se reparační mechanismy buňky, jako jsou **homologous recombination** a **one-sided invasion**. V rámci indukované mutageneze slouží *Agrobacterium* jako vektor k vnesení jednovláknové DNA (transferred DNA) s požadovanou změnou, ta se převede na dvouvláknovou (u *one-sided invasion* zůstává jednovláknová); (Puchta a kol., 1996; Osakabe, Saika a kol., 2011). Specifickou endonukleázou se v požadovaném genu vytvoří *double-strand-break* za vyvolání *homologous recombination* nebo *one-sided invasion* (Puchta a kol., 1996; Osakabe, Endo a kol., 2011). Poškozené vlákno se přepisuje podle šablony T-DNA (Osakabe, Saika a kol., 2011). *One-sided invasion* je zakončená *non-homologous end joining* (NHEJ); (Osakabe, Endo a kol., 2011).

**Zing finger nucleases (ZNFs)** jsou chimérické proteiny se syntetickou sekvencí – *zing finger*. ZNFs nasedají podle komplementarity na obě vlákna DNA a nukleázovou doménou vzniká zlom (Osakabe, Saika a kol., 2011).

**Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)** je taktéž místně specifická nukleáza (Gaj a kol., 2013).

ZNFs a TALENs se dále fúzí s proteiny rekombinázou (Gerbach a kol., 2011; Gaj a kol., 2011), transpozázou (Yant a kol., 2007), methyl- a acetyltransferázou, aktivátory a represory, které je zbavují závislosti na *homologous recombination* a NHEJ (Gaj a kol., 2013).

*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)/CRISPR associated-based RNA-guided DNA endonuclease (Cas) by mohlo být alternativou pro ZFNs a TALENs. DNA se integruje do lokusu CRISPR za transformace na CRISPR RNA. Specificky dále nasedá na patogenní DNA a proteinovou jednotkou Cas ji rozštěpí. CRISPR RNA by mohla být navržena tak, aby štěpila cílové místo mutagenese (Gaj a kol., 2013).

**Chimérické oligo**-zprostředkovaná mutagenese je navržena pro jednonukleotidové mutace. Chimérické oligo se skládá z DNA sekvence komplementární k cílovému místu a metylované RNA. Vlášenska se vkládá mezi vlákna DNA a na obě nasedá podle komplementarity. Pomocí *mismatch* se provede mutace (Osakabe, Saika a kol., 2011).

### 3.6 Inzerční mutagenese

Inzerční mutagenese je založená na vložení externí sekvence DNA (T-DNA, transpozony a retrotranspozony) do genomu studovaného organismu (Tadege a kol., 2005). Pokud se inzertuje v místě genu nebo jeho regulační sekvence, výsledkem je vyřazení nebo změna genové funkce (Alberts a kol., 2002). Inzert sám o sobě slouží jako marker, neboť je jeho sekvence známá. K tomuto účelu nejčastěji slouží transpozony, retrotranspozony, bakteriální plazmidy (Tadege a kol., 2005) a retroviry (Amsterdam a kol., 1999). Inzerční mutagenese spolu s TILLING jsou v současnosti nejrozšířenějšími reverzními genetickými nástroji pro nalezení a identifikaci funkce genu (Cheng a kol., 2014).

#### 3.6.1 T-DNA tagging

T-DNA *tagging* (*transferred DNA*) vyřazuje a označuje geny prostřednictvím inzertu. U těchto mutagenesí je nezbytná transformace a regenerace prostřednictvím *in vitro* kultury (Tadege a kol., 2005). Do rostliny se DNA transformuje pomocí bakterie *Agrobacterium*, která ve svém Ti plazmidu obsahuje T-DNA. Vektor se vybírá podle velikosti plazmidu, restrikčního místa pro klonování a přítomných genů rezistence jak v rostlině tak bakterii, které slouží jako marker. T-DNA se skládá z pravého a levého okraje (*repetice*), markerového genu, promotoru, transgenu a terminální sekvence (Sangwan, 2011). Při transformaci se z plazmidu enzymaticky vystřihne T-DNA a ta se integruje do genomové DNA hostitele. Úspěšně transformované rostliny se od ostatních selektují na selekčním médiu s herbicidem nebo antibiotikem dle typu selekčního genu. Protože je mutace většinou recesivní, projeví se až při druhé generaci. Často vznikají i chiméry, tedy rostliny z části mutantní a z části bez mutace. T-DNA není místně

specifická a vkládá se do genomu zcela náhodně (Sangwan, 2011). Metoda je závislá na velikosti genomu, tj. čím větší je genom, tím více je potřeba inzertů pro jeho saturaci (Tadege a kol., 2005). Pomocí T-DNA se kromě inzerční mutagenese vnáší promotory a enhancery pro expresi a zvýšení exprese genu. T-DNA obsahuje mimo enhanceru a promotoru, pravý a levý okraj, reportérový gen a marker pro vložení do genomu, lokalizaci a selekci. Metoda slouží k identifikaci enhanceru, který zesiluje expresi GUS reportérového genu. Projevem exprese je fluorescenční nebo barevný produkt (Jack, 2002).

### 3.6.2 Transpozony a retrotranspozony

Transpozony/retrotranspozony neboli skákající geny (*jumping genes*) jsou DNA sekvence schopné se přemístit nebo zkopírovat se do jiné části genomu (Sangwan a kol., 2011). Při inzerci se duplikují krátké sekvence v místě inzerce (Zhu a kol., 2011).

Transpozony se dělí na autonomní a neautonomní elementy (řízeny autonomními); (Kidwell, 2005; Zhu a kol., 2011) a v genomu se pohybují pomocí *cut-and-paste* mechanismu (Tadege a kol., 2005). To znamená, že dochází k vystřížení a přemístění na jiné místo v genomu. Dělí se na DNA transpozony, *Rolling-circle* DNA transpozony (Kidwell, 2005) a *Miniature inverted repeat elements* (MITEs), (Zhang a kol., 2000, Kidwell, 2005).

**Autonomní DNA** transpozony obsahují transponázu, umožňující přemísťování. Neautonomní elementy vznikají delecí autonomního (Zhu a kol., 2011). Obsahují otevřený čtecí rámec s funkcí rozpoznávací, katalytickou a vázající (Kidwell, 2005). Pro DNA transpozony jsou typická koncová převrácená opakování (TIRs); (Kidwell, 2005; Zhu a kol., 2011).

**Rolling-circle DNA transpozony**, taktéž kódují enzym helikázu, replikační iniciační protein a protein vázající jednovláknovou DNA (*single-stranded DNA binding protein*). Transpozon je z jedné strany lemován TC dinukleotidem a na druhé vlásenkovou strukturou a CT dinukleotidem (Kidwell, 2005).

**MITEs** jsou bez kódující sekvence obklopené pouze TIRs (Zhang a kol., 2000).

Retrotranspozony se pohybují pomocí *copy-and-paste* mechanismu (Kumar a Bennetzen, 1999; Tadege a kol., 2005). Nedochozí tedy k vystřížení, ale pouze k přepisu do mRNA a zpětné reverzní transkripci a následného vložení do jiného místa v genomu. Tyto mutace jsou proto stabilní. Dělí se na endogenní retroviry (ENVs), *long terminal repeats* (LTR) a *non-LTR* retrotranspozony. *Non-LTR* retrotranspozony se dále dělí na



*Long Interspersed Nuclear Elements* (LINEs) a *Short Interspersed Nuclear Elements* (SINEs); (Kidwell, 2005).

**Autonomní LTR retrotranspozony** kromě LTR sekvence obsahuje geny s funkcí tvorby specifických antigenů, polymerázy (schopnost reverzní transkripce, integrázy, endonukleázy) a proteázy. LTR retrotranspozony se od **ENVs** liší nepřítomností genu, který kóduje obalovací proteiny. **Neautonomnímu LTR** chybí část nebo úplná kódující sekvence. **LINEs** obsahují sekvence, které odpovídají funkci promotoru, otevřeného čtecího rámce a transpozici, endonukleázové aktivitě a reverzní transkripci a jsou zakončeny jednonukleotidovou *poly(A)* repeticí. **SINEs** patří mezi neautonomní elementy. Obsahuje pol III promotor a jednonukleotidovou *poly(A)* repetici (Kidwell, 2005; Zhu a kol., 2011).

### 3.6.2.1 *Tnt1* retrotranspozon

*Tnt1* je LTR retrotranspozon (Grandbastien a kol., 1989) identifikovaný u tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). *Tnt1* nejeví místní ani *hot spots* specifickou (d'Erfurth a kol., 2003), avšak upřednostňují genově bohaté oblasti s preferencí pro transkribující regiony. Genom *M. truncatula* je AT bohatý. GC kompozice je menší, ale větší část se nachází v genově bohatých oblastech, což se předpokládá být preferencí *Tnt1* (Tadege a kol., 2008). Do *M. truncatula* se tento retroelement transformoval za použití *Agrobacterium tumefaciens* (d'Erfurth a kol., 2003). Samotná transpozice se indukovala *in vitro* resp. stresovými podmínkami při somatické embryogenezi z listových explantátů (Tadege a kol., 2008).

#### **Postup tvorby linií tolíce s *Tnt1* retroelementem je následující:**

Listové explantáty se kultivují *in vitro* na živném médiu (Schenk and Hildebrandt, 1972) doplněného auxiny a cytokininy. Vzniklé kalusy se přenesou do média indukujícího somatickou embryogenezi a poté do média bez hormonů pro regeneraci rostliny. Transpozice nastane v prvních 2–3 týdnech tvorby kalusu. Četnost inzertů na linii se pohybuje od 6–59 s průměrem 25. Jeden inzert na linii je většinou získán opakovaným zpětným křížením, popřípadě fenotypovou segregací v R1 potomstvu (Tadege a kol., 2008). Po vyklíčení semen se izoluje genomová DNA (g-DNA) každé linie. Dalším krokem je tzv. *g-DNA pooling*. Malý *pool* (1 ml) se vytvoří smíšením g-DNA z 10 vzorků. Odebere se množství DNA z 10 těchto *pools* za produkce středního *pool* (5 ml). Smícháním části z 5 středních *pools* vzniká velký *pool* (10 ml). Jeden velký *pool* obsahuje g-DNA z 500 linií. Dále se navrhuje *forward* a *reverse* primery (*Tnt1* a genově specifické

primery) potřebné pro PCR a sekvenování (Cheng a kol., 2014), což umožňuje využití inzertu jako marker (Alberts a kol., 2002; Tadege a kol., 2005). Odvozují se buď z g-DNA, nebo z cDNA a *Expressed sequence tags* (ESTs). Amplifikace může selhat, pokud primery z cDNA nebo ESTs překrývá exon/intron oblast. Po provedení první PCR s velkým *pool* vzorkem se na základě PCR produktu udělá druhá *nested-PCR*. Následně se provádí elektroforéza na agarózovém gelu. Osekvují se pouze ty vzorky, které jsou pozitivní (Cheng a kol., 2014). Sekvence se srovnává se zájmovým genem k potvrzení identity v internetové databázi mutantních linií (Alberts a kol., 2002).

Příklady databází srovnávající tyto sekvence, tedy *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) jsou:

<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>

<http://www.plantgdb.org/prj/GenomeBrowser/>

<http://www.plantgdb.org/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Databáze *Tnt1* mutantních linií *M. truncatula* s funkcí BLAST jsou např.:

<http://blast.jcvi.org/er-blast/index.cgi?project=mtbe>

<http://medicago-mutant.noble.org/mutant/blast/blast.php>

Některé další stránky jsou uvedeny v kapitole **Genomická data *M. truncatula***.

V případě potvrzení vložení inzertu do konkrétního genu, se provádí další screening na středních *pools* se stejnými primery. V tomto kroku není nutná sekvenace. U *pools* s pozitivním nálezem se provádí další screening na malých *pools* a od malých *pools* na konkrétních liniích. Poslední PCR produkt se osekvuje a opět se potvrdí identita produktu od velkých *pools*. Celým procesem se získá informace o počtu a lokaci vložení *Tnt1* inzertů v jednom genu. Pro snížení ztrát izolované DNA se testuje více genů najednou (Cheng a kol., 2014).

Prvním krokem pro determinaci genové funkce je roztřídění na základě fenotypu, který je určen genotypem. Rozlišení znemožňuje případný letální účinek (v homozygotním stavu) při přerušení genu, v tomto případě se volí jiná metoda pro studium funkce genu. Dále také možná mutace v různých genech se stejným fenotypovým projevem. Rozlišení je umožněno komplementačními testy homozygotních jedinců. Jejich křížením se odhalí inserce ve stejném nebo v odlišném genu. Dále se zkoumá přesná funkce, lokace, čas působení a vztah k jiným genům. K tomuto účelu slouží další mutanti, popřípadě dvojité mutanti. Jejich funkce je možné i předpovědět na základě homologie s jiným již známým genem v databázi (Alberts a kol., 2002).

Užitečným nástrojem pro studium jsou reportérové geny (Alberts a kol., 2002). Příkladem jsou geny *GUS* a *GFP*.  $\beta$ -glukuronidázový (*GUS*) gen pochází z *Escherichia coli* (Jefferson a kol., 1987). *Green fluorescent protein (GFP)* pochází z medúzy *Aequorea victoria* (Kain a kol., 1995). Sekvence zájmového genu se nahrazuje reportérovým genem, který je regulován regulační sekvencí původního genu. Aktivita enzymu se měří fluorescenčně nebo barevně a je analogická k aktivitě původního genu. Exprese obou genů se sledují *in vivo* a v reálném čase za získání dat o místě, kvantitě a časovém působení (Alberts a kol., 2002).

Kromě vyřazení genu z funkce, existují další způsoby jak odhalit funkci určitého genu, patří sem pozměnění regulační nebo kódující sekvence, za výsledného zvýšení exprese (*overexpression*) nebo změny lokace a času (*misexpression*). Mutovaný gen se do buněk vpravuje virovými vektory, elektroporací nebo metodou bombardování částicemi (*particle bombardment*); (Alberts a kol., 2002). Při vnesení upraveného genu do buňky se většinou, místo nahrazení původního genu, nový gen inzertuje. Ale je možné dosáhnout vzniku dominantního negativního mutanta. Nově syntetizovaná mRNA je *anti-sense* k originální *sense* mRNA a dojde k hybridizaci a vyřazení z funkce. Metoda napodobuje RNA interferenci (RNAi). Jiný případ dominantního negativního mutanta je u proteinových komplexů. Mutovaný gen představuje složku komplexu a inaktivuje ho. Kromě ztráty funkce může nastat i získání funkce (*gain-of-function*). Ke zvýšení exprese dojde buď mnohonásobným zkopírováním genu do genomu, nebo vzniká účinnější protein (Alberts a kol., 2002).

Kombinací některých výše zmíněných metod se vytvořilo více než 21000 linií s přibližně 520000 inzercemi, které saturují 90 % genů *M. truncatula* (The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc., 2016).

## 4 *FABACEAE*

Bobovité rostliny jsou pro člověka druhé ekonomicky nejvýznamnější rostliny hned po obilninách (Graham and Vance, 2003, Smýkal a kol. 2015). Jejich klíčovou rolí je fixace vzdušného dusíku bakteriemi *Rhizobium*. V zemědělství se tím snižuje množství potřebných chemických hnojiv a následně tak znečištění životního prostředí. Kulturní bobovité rostliny se pěstují převážně pro semena obsahující vysoký podíl bílkovin (20–40 % váhy semene), případně celé rostliny slouží jako píce pro dobytek (Tadege a kol., 2005, Smýkal a kol. 2015). Většina luskovin má velké a složité genomy. To je

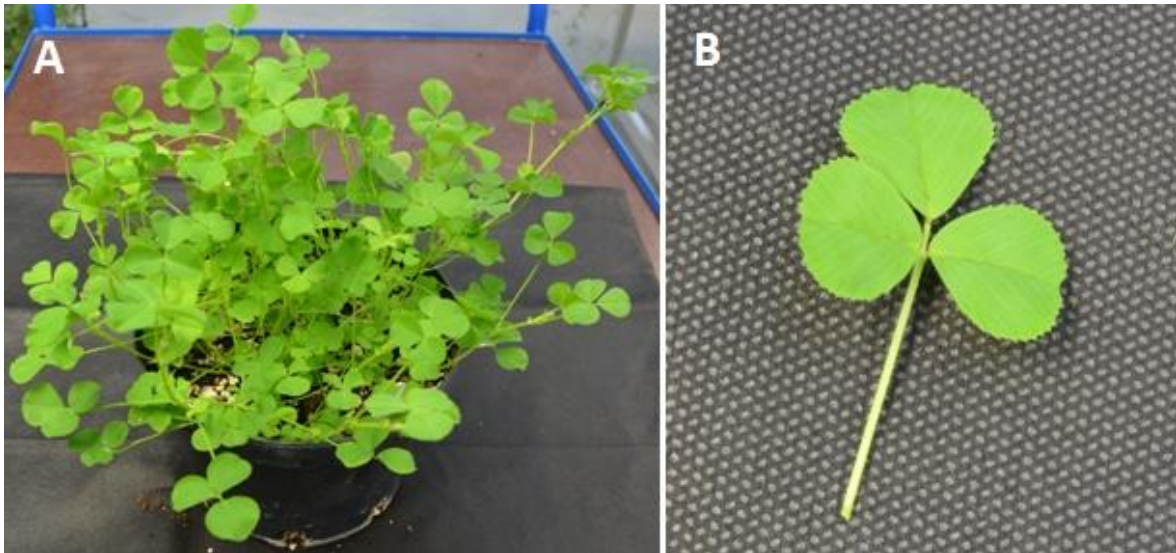
způsobeno retrotranspozony, nekódujícími repetitivními sekvencemi (Tadege a kol., 2005), případně i polyploidii (např.: autotetraploidní genom soji); (Schmutz a kol., 2010).

Mezi bobovité rostliny s relativně malým diploidním genomem (Cook a kol., 1997) patří *Lotus japonicus* Regel. (Štírovník růžkatý) o velikosti genomu 500 Mbp (PlantGDP, 2015) a *Medicago truncatula* Gaertn. (Tolice srpovitá) o velikosti genomu 454-526 Mbp (Roe, 2011). Oba druhy mají krátkou generační dobu, jsou samosprašné a produkují velké množství malých semen. Je možné je vypěstovat z buněčných kultur a transformovat bakteriemi (Cook a kol., 1997). Byly proto vybrány jako modelové bobovité rostliny a následně byl přečten jejich genom.

*Medicago truncatula* databáze genomu verze 4.0 je k nalezení na internetové stránce <http://medicago.jcvi.org/MTGD/?q=home> a dalších stránkách zmíněných v kapitole **Genomická data *M. truncatula***. Celkem z 8 chromozomů, bylo 6 chromozomů přečtených v USA a 2 chromozomy v Evropě (Krishnakumar a kol., 2014). Odhad pro celkovou velikost genové oblasti je 100 Mbp z celkových přibližně 500 Mbp (Frugoli a Harris, 2001). Sekvence genomu verze 3.0 *Lotus japonicus* je k dispozici na internetové stránce <http://www.kazusa.or.jp/lotus/> a jeho sekvenování bylo dokončeno v roce 2008 (Sato a kol., 2008).

#### **4.1 Tolice (*Medicago truncatula* Gaertn.)**

*Medicago truncatula* patří mezi dvouděložné a samosprašné bobovité rostliny fylogeneticky příbuzné k hrachu (Gallardo a kol., 2006). Pochází z oblasti Středozemního moře a využívá se jako pícnina (Young a Udvardi, 2009). Je to planě rostoucí druh, který neprošel procesem domestikace. Potvrzují to malá semena, obtížnost získávání semen z lusku a vysoký podíl oligosacharidů náležících k rodině rafinóz, které jsou pro člověka nestravitelné (Gallardo a kol., 2006). Existuje velká sbírka různých ekotypů (Young a Udvardi, 2009), kterých je v současnosti 384 osekvenovaných v rámci projektu HapMap, <http://www.medicago-hapmap.org> (Guhlin, 2015).



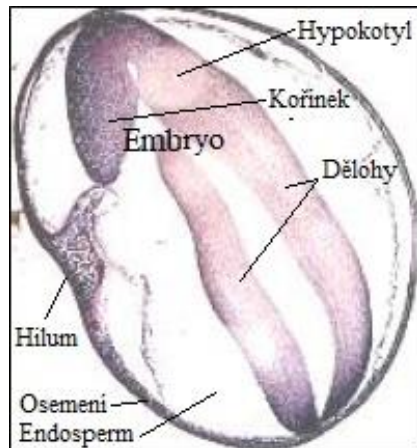
**Obrázek 1:** Tolice (*wild type*) **A** Celá rostlina a **B** List.

#### 4.1.1 *M. truncatula* jako modelová luskovina

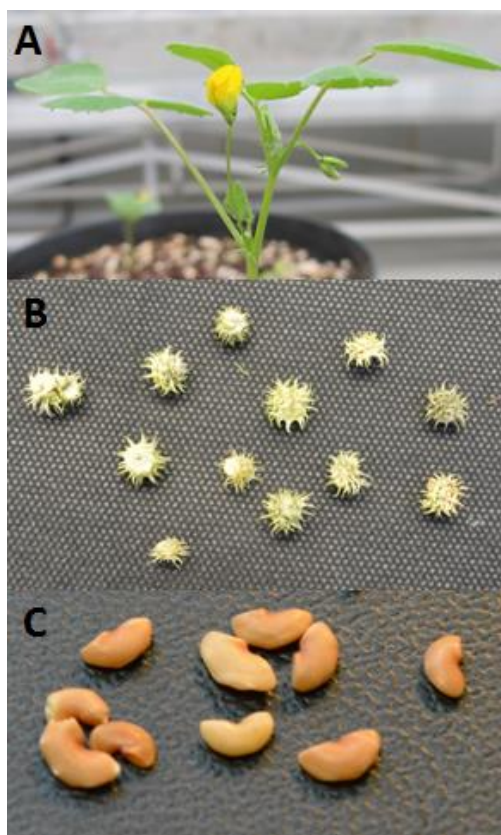
Tolice se stala jednou z modelových rostlin pro bobovité díky blízkému fylogenetickému vztahu k jiným bobovitým plodinám mírného pásu (hrachu, hrachoru, vikvi, vojtěšce) a možnostem genetických a genomických studií. *M. truncatula* se také zvolila jako modelová rostlina kvůli malému diploidnímu genomu, krátké generační době, snadné transformaci a regeneraci (Cook, 1999). Huseníček (*Arabidopsis thaliana*) je fylogeneticky nedostatečně homologní k bobovitým, konkrétně mikrosyntenie mezi *A. thaliana* a *M. truncatula* je pouze 8–10 %. Dalším důvodem nedostatečnosti *A. thaliana* je absence klíčových genů rezistence u luskovin (Frugoli a Harris, 2001) a především pak absence symbiotického vztahu s bakteriemi fixujícími vzdušný dusík (Penmetza a Cook, 2000). Mikrosyntenie *M. truncatula* na základě markerů značně zjednodušuje mapování fylogeneticky příbuzných bobovitých rostlin, jako je hrách, čočka a bob (Frugoli a Harris, 2001).

#### 4.1.2 Semena tolíce

Zralá semena se skládají ze tří hlavních částí: osemení, embrya a endospermu. Embryo zaujímá do 92 % z celého semene (Děložní listy zaujímají okolo 90 % a hypokotyl s kořínkem od 1–2 %.). Osemení a endosperm obsazují zbylých 8–9 % (Wolf, 1977; Gallardo a kol., 2006).



**Obrázek 2:** Semeno tolíce (stáří 14 DAP; upraveno dle Gallardo a kol., 2006).



**Obrázek 3:** **A** Květ, **B** Lusky a **C** Semena tolíce (*wild type*).

Semena tolíce se tvoří v lusku většinou pokrytém bodlinatými výrůstky, který se stáčí do spirály (obrázek 3B). Lusk zastává funkci ochrany semen, poskytuje jim živiny a udržuje dormanci. Semena zrají na bazálním konci rychleji než na distálním (Gallardo a kol., 2006). Mezi semeny je značná variabilita co do velikosti, tak do počtu na lusk v závislosti na genotypu. V jednom lusku se jich objevuje od 1–20 (Lesins a Lesins, 1979). Klíčení je epigeické (Moreau, 2006).

Fylogeneticky se semena tolíce blíží hrachu (*Pisum sativum* L.), cizrně (*Cicer arietinum* L.), čočce (*Culinaris lens* Medik.) a bobu (*Vicia faba* L.); (Young a Udvardi, 2009). Naopak svým složením se blíží k sóji (*Glycine max* L.) a lupině (*Lupinus* L.); (Gallardo a kol., 2006).

#### **4.1.2.1 Látkové složení semen tolíce**

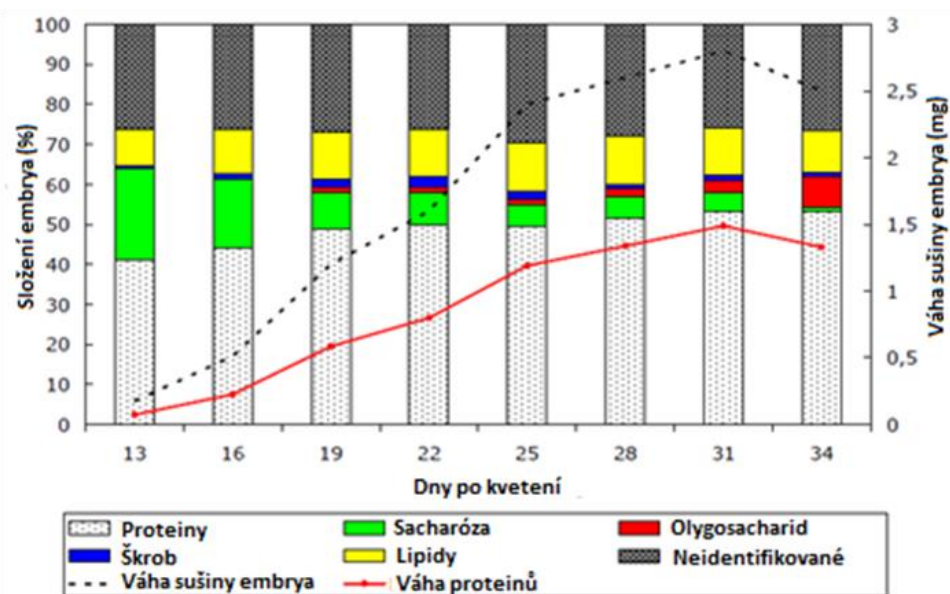
Semena tolíce jsou jako všechny bobovité bohatá na proteiny (32–42 %), (Djemel a kol., 2005), lipidy (10 %) a rozpustné sacharidy (10 %). Škrobu je méně než 1 %. Přítomny jsou rovněž i polysacharidy z rodiny rafinóz a polysacharidy buněčných stěn. Minerálních látek je méně než 3 %. Hlavními aminokyselinami ve zralých semenech jsou Gln, Asn, Arg a Glu, esenciálními aminokyselinami jsou Arg, Tyr a Asn (Gallardo a kol., 2006). Obsah zásobních proteinů je variabilní během vývoje semene a jedná se o proteiny ze skupiny vicilinů, leguminů a konvicilinů. Jejich proteinová sekvenční homologie s hrachem a jinými luskoviny je 70–85 % (Gallardo a kol., 2003). Z aminokyselin se dále syntetizují enzymy a cytotoxické peptidy (Gallardo a kol., 2006). Mastné kyseliny se v semeni vyskytují nejprve nasycené a později polynenasycené. 75 % z nich patří do rodiny triacylglyceridů (Djemel a kol., 2005). Během vývoje se v semenech objevují sacharidy z rodiny rafinóz. Nejprve je přítomna stachióza, jejíž množství stoupá s přibývajícím koncentrací rafinózy (Djemel a kol., 2005). Tyto sacharidy slouží jako zdroj uhlíku a zapojují se do tolerance k vysoušení (Gallardo a kol., 2006). Jinými přítomnými sacharidy jsou galaktomanany, které se ukládají zejména v endospermu (Buckeridge a kol., 2000). Při hydrolýze poskytují embryu energii a slouží jako zdroj uhlíku. Rovněž se zde vyskytuje verbaskóza a sacharóza (Gallardo a kol., 2006).

#### **4.1.2.2 Morfogeneze semene tolíce**

Během vývoje semen dochází k biochemickým a fyzikálním změnám. Patří mezi ně akumulace zásobních látek, získávání klíčivosti, tolerance k vysoušení, vysychání při zrání a zavedení vegetačního klidu. Semena získávají schopnost klíčit již 12–14 dní po opylení (Days after pollination, DAP), ale až po 20 DAP jsou semena schopna přežít vysychání (Gallardo a kol., 2006). 3 DAP je semeno rozlišeno na epidermis, hypodermis, parenchym a nucelus. 6 DAP je již embryo rozeznatelné a 8–10 DAP získává tvar torpéda. Do 12 DAP dochází k aktivnímu dělení endospermu (přetrvává i u zralých semen) a semena obsahují okolo 90 % vody (Gallardo a kol., 2006). 12–14 DAP nastává buněčný růst a ukládání látek. Diferenciace embrya postupuje od adaxiálního regionu k abaxiálnímu. Buňky se již



nedělí, ale svým růstem vyplňují prostor v osemeni. Formuje se cévní svazek, který vstupuje do vajíčka v chalazální oblasti. 14–20 DAP se do zásobních vakuol embrya ukládají proteiny. Povrch semene je do 16 DAP pokryt slizovým obalem. Dále se přeměňuje na kolumelu, která je schopná sekretovat sliz. Do 20 DAP lignifikuje epidermis vnějšího integumentu a formují se osteoklasty hypodermu. Parenchym obsahuje amyloplasty a nejvnitřnější část osemení tvoří endothelium, do kterého se ukládají také antokyanové pigmenty. Endothelium od endospermu odděluje aleuronová vrstva (Gallardo a kol., 2006). Od 20 DAP semena vyžrávají, probíhá desikace a ukládají se proteiny a 30 DAP je vývoj dokončen. Embryo je v kontaktu s osemením. Některé buňky osemení jsou vstřebány a osemení se stává tenčí. Semeno plynule přechází do dormance (Gallardo a kol., 2006).



**Obrázek 4:** Závislost složení semene a jeho váhy na dni po kvetení (upraveno dle Gallardo a kol., 2006).

#### 4.1.2.3 Dormance semen

Dormance je proces, který dočasně blokuje klíčení zdravých semen za příznivých podmínek (Bewley, 1997) a umožňuje přizpůsobit klíčení do období s nejnižším rizikem uhynutí (Smýkal a kol., 2014). K ukončení dochází až v přítomnosti podmínek vyžadovaných pro klíčení (Finch-Savage a Leubner-Metzger, 2006). Je tedy závislá na faktorech prostředí, ale zároveň je podmíněna geneticky (Gallardo a kol., 2006). Dormantní semena *Medicago truncatula* musí být vystavena suchu a teplu i několik měsíců pro ukončení období klidu (Gallardo a kol., 2006). Tento krok je možné nahradit inkubací



v koncentrované kyselině sírové a chladu (4 °C); (Faria a kol., 2005; Hanan a kol., 2006). Dále semena naklíčí do dvou dnů na vlhké buničině při 20–22 °C (Gallardo a kol., 2006).

Dormanci lze rozlišit na několik typů: Fyzikální, fyziologickou, morfologickou, morfo-fyziologickou a kombinovanou (Baskin a Baskin, 2000, 2004).

U **fyzikální dormance** se jedná o fyzickou bariéru průniku vody do semene. Lze ji zrušit mechanickým, chemickým narušením osemení nebo tepelnými změnami (Baskin a Baskin, 2000).

**Fyziologická dormance** je nejčastější typ dormance. Podle hloubky dormance, jí lze ukončit kyselinou gibberelovou (GA). K ukončení dochází po teplé nebo studené stratifikaci v teple nebo chladu (Baskin a Baskin, 2004). Je zprostředkována zejména hormonálním působením kyseliny abscisové (AHA); (Smýkal a kol., 2014).

**Morfologická dormance** nastává u nevyvinutých embryí. Embrya jsou již diferenciována, ale proces zrání ještě nebyl dokončen (Finch-Savage a Leubner-Metzger, 2006).

**Morfofyziologická dormance** je kombinací morfologické a fyziologické dormance (Baskin a Baskin, 2004).

**Kombinovaná dormance** kombinuje fyziologickou a fyzickou dormanci (Baskin a Baskin, 2004).

Nejčastější příčinou a zároveň požadavkem pro ukončení dormance je vysoká teplota, popřípadě změny v teplotách. Dalšími předpoklady klíčení semene je voda, kyslík, GA a je případně ovlivňováno, půdou, světlem a některými chemickými látkami (Finch-Savage a Leubner-Metzger, 2006; Smýkal a kol., 2014)

Klíčení semen začíná po absorpci vody. Voda se pohybuje ve směru nižšího vodního potenciálu, tedy do semene. Příjem vody je závislý na propustnosti osemení (Smýkal a kol., 2014). U některých druhů rostlin je proto nutné nejprve narušit osemení, ale až po prasknutí endospermu (pokud je přítomný) dochází k průniku vody k radikule (Finch-Savage a Leubner-Metzger, 2006)

#### **4.1.3 Genomická data *M. truncatula***

Pro přečtení celého genomu se využila metoda BAC-by-BAC (Young a Udvardi, 2009) tedy pracnější, ale přesnější postup. *Medicago truncatula* genomový projekt začal již v roce 2003 a v roce 2014 se zveřejnila verze přečteného genomu 4.0, která představuje 93 % sekvence (Tang a kol., 2014; The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc., 2014).

Genomová data jsou efektivní při vývoji markerů, pro genové klonování, genové objevy (Gallardo a kol., 2006) a srovnávání bobovitých. Usnadňují propojení mapování napříč bobovitými druhy, dává základ pro sekvenování příbuzných druhů, aj. (Young a Udvardi, 2009). Sekvence genomu *M. truncatula* verze 4.0 popř. 3.5 je k dispozici na stránkách:

<http://www.genome.ou.edu/medicago.html>

<http://medicago.jcvi.org/medicago/index.php>

<http://cnrgv.toulouse.inra.fr/Library/Medicago>

Konkrétně sekvence daného genu poskytuje poznatky o praktickém významu genových rodin specifických pro bobovité, zjednodušuje shromažďování sekvenčních dat a mapování genomu v úzce souvisejících taxonech a také identifikuje regulační sekvence, které se mohou použít v genovém inženýrství (Young a Udvardi, 2009).

Na základě transkriptomických dat se vyvinul genově expresní atlas (Benedito a kol., 2008). Atlas se kompletuje z dat získaných z Affymetrix GeneChip (Benedito a kol., 2008). Atlas se věnuje expresi jednotlivých genů a shromažďuje jejich sekvenční data z jednotlivých rostlinných orgánů. Předpoklad využití databáze je identifikace funkce genu (The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc., 2014). Databáze se nachází na internetové stránce: <http://mtgea.noble.org/v3/>. Mezi další transkriptomické analyzační prostředky patří: EST knihovna (Young a Udvardi, 2009, Alberts, 2002), dále se využívá *real-time* PCR (qPCR), (Young a Udvardi, 2009) a NGS technologie.

Dostupnost dat pro rozlišení genové exprese na úrovni semene, tkáně a organely za účelem studia vývoje semene, zrání a klíčení, vlivu stresu a mutací byla závislá na využití transkriptomiky, proteomiky, metabolomiky a ionomiky (Thompson a kol., 2009).

Funkční genomika slouží k určení biologického významu daného genu/genového produktu. Vyhodnocuje transkriptomická, proteomická a metabolická data k určení funkce daného genu/genového produktu a k ověření hypotézy využívá reverzní genetiky. Určuje funkci genu od fenotypu mutované rostliny s mutací právě v tomto genu. Funkční genomika zahrnuje ztrátu funkce genu (*loss-of-function*), snížení nebo naopak zvýšení exprese daného genu prostřednictvím regulačních mechanismů (*down-* a *upregulation*); (Young a Udvardi, 2009), zvýšení exprese (*overexpression*), získání funkce (*gain-of-function*) a expresi genu v jiném čase/místě (*misexpression*); (Alberts a kol., 2002). V rámci reverzní genetiky se vytvořily *Medicago truncatula* mutantní linie pro identifikaci funkce genu (Young a Udvardi, 2009). Funkčně genomická data jsou k nalezení:

<http://mtgea.noble.org/v3/>

<http://medicago-mutant.noble.org/mutant/>

<http://195.220.91.17/legumbase/index.php?mode=0&id=>

Další databáze poskytující různé funkce jsou na:

<http://www.plantgdb.org/>

<https://www.legoo.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=medicago+truncatula>

<http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/RNA/MIRMED/LeARN/cgi-bin/learn.cgi>

Na tvorbu databáze sekvenčních variant se zaměřuje HapMap projekt. Sekvenují se jednotlivé inbrední linie s rozdíly v inzercích, delecích, jednonukleotidových polymorfismech a duplikacích. Výsledná data podávají informace o druhové diverzitě a poskytují zdroj sekvenčních údajů (Guhlin, 2015). Detaily jsou k nalezení na internetové stránce: <http://www.medicagohapmap.org/>

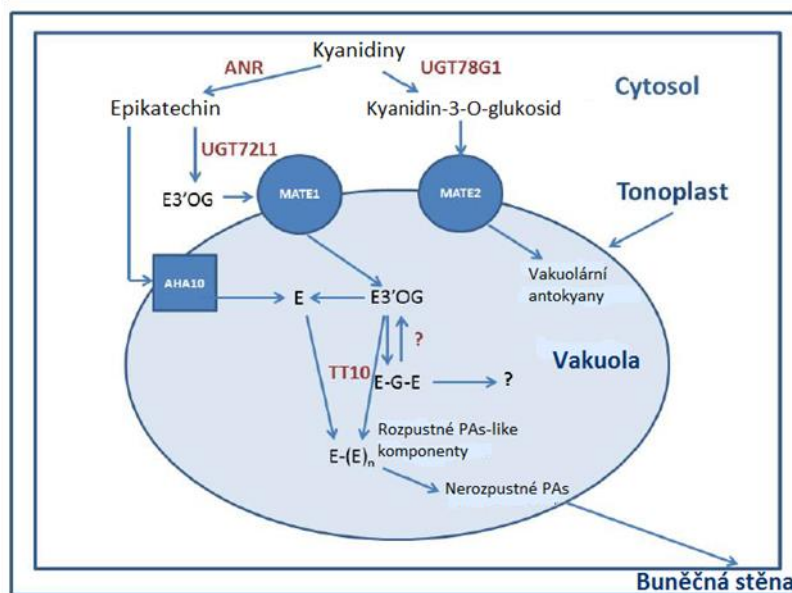
## 5 FLAVONOIDY

Flavonoly, antokyany a proantokyany (PAs) jsou tři hlavní flavonoidové skupiny, které jsou široce zastoupené v rostlinné říši. Tyto látky jsou syntetizovány fenylypropanovou dráhou (Liu a kol., 2014). Flavonoly chrání rostlinu před UV zářením (Li a kol., 1993) a ve spojení s antokyany dobarvují květy a listy (Bloor, 1997). Antokyany obarvují červeně, fialově a modře zejména květy, listy, plody a semena (Liu a kol., 2014). Katechin a epikatechin jsou flavan-3-ol monomery (Pang a kol., 2007) jejich oligo- a polymery jsou proantokyany (PAs) nebo také kondenzované taniny (Pang a kol., 2008). Mimo to jsou tvořeny i epigallokatechinem, gallokatechinem, epiafzelechinem a afzelechinem (Smýkal a kol., 2014). Hlavním místem akumulace PAs je osemení (Pang a kol., 2007, Smýkal a kol., 2014). Oxidázy (Marbach a Mayer, 1974) se podílejí na oxidaci rozpustných PAs a mění je tak na nerozpustné a chrání semeno proti biotickým a abiotickým stresům (Pourcel a kol., 2005). Tato oxidace uděluje semenům hnědou barvu (Liu a kol., 2014). Dále jsou PAs lokalizované v listech, květech, kůře a plodech rostlin, a chrání je před herbivory a patogeny (Dixon a kol., 2005) a zapojují se do funkce dormance a viability (Lepiniec a kol., 2006). PAs se projevují negativně trpkou a hořkou chutí, ale na druhou stranu jsou uznávané pro jejich příznivý vliv na zdraví člověka i zvířat (Xie a kol., 2003). U zvířat působí proti nadýmání, tím že se váží na proteiny, zpomalují jejich kvašení a snižuje se tak tvorba metanu. Snižují vylučování

dusíku a zlepšují vstřebávání esenciálních aminokyselin (Dixon a kol., 2005). Pomáhají také bránit se proti střevním parazitům (Pang a kol., 2008). Je proto velký zájem o výzkum PA biosyntézy v rámci biotechnologií, neboť nejvíce pěstované píce obsahují jen malé množství PAs (Verdier a kol., 2011).

## 5.1 Biosyntéza proantokyanidinů

Metabolická dráha proantokyanidinů začíná v endoplazmatickém retikulu, pokračuje v cytosolu a zakončuje se ve vakuole. První křižovatka v biosyntéze se objevuje u leukoantokyanidinu, z kterého vzniká antokyanidin pomocí antokyanidin syntázy (Liu a kol., 2014), z kterého dále aktivitou antokyan-reduktázy (ANR) vzniká (-)-epikatechin (Xie a kol., 2003) nebo je glykosylován pomocí glukosyltransferázy UGT78G1 na kyanidin-3-O-glukosid (Pang a kol., 2013). Působením leukoantokyanidin reduktázy se leukoantokyanidin redukuje i na katechin (Tanner a kol., 2003). (-)-Epikatechin je glykosylován uridindifosfát glukosyltransferázou (UGT72L1) na epikatechin-3'-O-glukosid (Pang a kol., 2008), který je přenesen přes tonoplast MATE1 transportérem do vakuoly (Zhao a Dixon 2009), a stejně tak kyanidin-3-O-glukosid je přenesen MATE2 transportérem do vakuoly (Lepiniec a kol., 2006, Pang a kol., 2013). Neglykosylovaný epikatechin se taktéž může přenášet do vakuoly pomocí AHA10 transportéru (Zhao a Dixon 2009). U epikatechinu a epikatechin-3'-O-glukosidu následuje enzymatická nebo neenzymatická polymerizace, jejíž mechanismus není znám (He a kol., 2008), ale předpokládá se, že probíhá ve vakuole (Abrahams a kol., 2003). Enzymaticky by polymerizace pravděpodobně probíhala pomocí lakázy (*laccase-like 14*), enzymu kódovaného *TT10* genem (Pourcel a kol., 2005) na rozpustné proantokyanidiny. Popřípadě vznikají epikatechin dimerní sloučeniny. Přeměna může u proantokyanidinu z epikatechin-3'-O-glukosidu pokračovat po transportu do apoplastu, kde zoxiduje na nerozpustný proantokyanidin pravděpodobně působením apoplastické polyfenoloxidázy (Pang a kol., 2013). Z kyanidin-3-O-glukosidu se stává vakuolární antokyanin (Pang a kol., 2013). Flavonoidy se přenášejí ve formě glykosidů. U antokyanidinů se nejprve glykosyluje 3-O-poloha na C heterocyklu a dojde tak ke stabilizaci molekuly (Zhao a Dixon 2009).

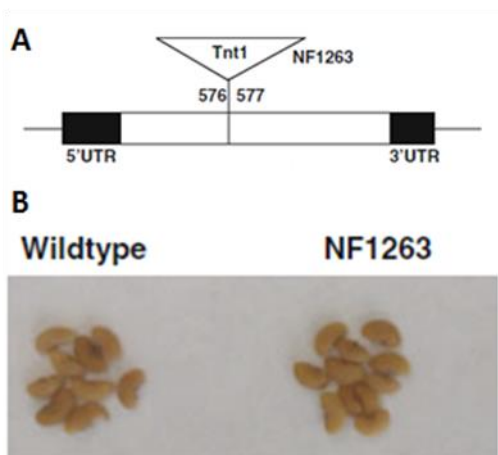


**Obrázek 5:** Model PAs polymerizace (upraveno dle Pang a kol., 2013).

## 5.2 Uridindifosfát glukosyltransferáza

UGT72L1 je enzym patřící do rodiny rostlinných glukosyltransferáz (GTs), které mohou působit v procesu xenobiotické detoxifikace (Hefner a kol., 2002; Pang a kol., 2013) a přednostně se exprimuje v osemeni. Enzym má vysokou afinitu k epikatechinu s *cis* stereochemií na druhém a třetím C a glykosyluje B kruh na poloze 3' (Pang a kol., 2008). Promotory a částečně i exprese se u genů *ANR* a *UGT72L1* překrývají, ale exprese probíhá odlišně. Proteiny se lokalizují v cytosolu (Pang a kol., 2008; Pang a kol., 2013) na rozdíl od lakázy, která působí ve vakuole. Expese obou promotorů je různá v odlišných částech rostlin a dokonce v jiných vývojových stádiích. Nejvyšší expresi oba geny vykazují v raném vývoji semene (Pang a kol., 2013). Zvýšením exprese *UGT72L1* dojde k částečnému snížení epikatechinu, epikatechin-3'-O-glukosidu a rozpustných PAs v semenech. Naopak dochází k akumulaci nerozpustných PAs. Přesto není jasné, jestli je UGT72L1 nezbytný pro biosyntézu PAs (Pang a kol., 2013). Expresí *UGT72L1* nebo *ANR* nebo jejich kombinací se snižuje akumulace antokyanů a naopak se zvyšuje množství nerozpustných PAs (Pang a kol., 2013). Linie NF 1263 *Medicago truncatula*, má inzert v otevřeném čtecím rámci genu pro UGT72L1. Zaznamenala se snížená transkripce *UGT72L1* genu, ale ve srovnání s *wild type* (nemutovaný původní genotyp) rostlinami měla semena podobně hnědou barvu. Rozpustných PAs bylo méně, ale nerozpustných bylo téměř stejné množství. Dále se snížila hladina epikatechinu a epikatechin-3'-O-glukosidu (Pang a kol., 2013).

Při použití *transparent testa 2* mutanta (TT2, transkripční faktor *A. thaliana*) došlo k mnohem výraznějšímu výskytu epikatechinu a epikatechin-3'-O-glukosidu a akumulaci rozpustných a nerozpustných PAs v kořenech. To naznačuje, že *ANR* a *UGT72L1* nejsou jedinými geny zapojenými v tomto článku biosyntézy (Pang a kol., 2008).



**Obrázek 6:** **A** Schéma inzerce *Tnt1* v genu *UGT72L1*. **B** Fenotypové srovnání *wild typ* a mutantních semen linie NF 1263 *M. truncatula* (upraveno dle Pang a kol., 2013).

### 5.3 Komplex transkripčních faktorů MYB, bHLH, *Helix-loop-helix* a WD40 (MBW)

Komplex transkripčních faktorů MBW reguluje syntézu antokyanů a proantokyanidinů. Skládá se z MYB (TT2), bHLH *Helix-loop-helix* (TT8) a WD40 (MtWD40-1); (Baudry a kol., 2004; Liu a kol., 2014).

#### 5.3.1 MtWD40-1 transkripční faktor

Zvýšení exprese *M. truncatula MtWD40-1* genu (Pang a kol., 2009) má za následek zvýšení hladiny antokyanů, ale ne PAs. Mutace v tomto genu vede k částečně shodnému snížení exprese genů pro PA biosyntézu s *mtpar* mutanty (Verdier a kol., 2011). Inzercí ve *WD40-1* se nijak neovlivňuje funkce *MtPAR* (Pang a kol., 2009). Oba transkripční faktory patří do stejné regulační skupiny (Verdier a kol., 2011). MYB5 a PAR aktivují WD40 promotor, ale ne *ANR* gen, což znamená, že je potřeba dalších faktorů pro spuštění dráhy (Liu a kol., 2014).

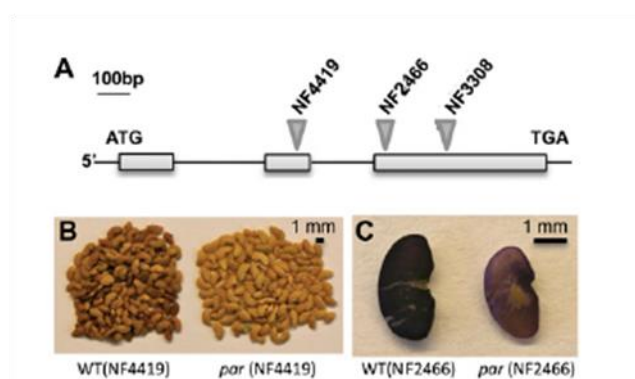
## 5.3.2 MYB transkripční faktory

### 5.3.2.1 *Transparent testa 2* transkripční faktor (TT2)

TT2 patří do rodiny MYB proteinů (Pang a kol., 2008). TT2 transkripční faktor zvyšuje indukci *UGT72L1* a *ANR* za spotřeby ATP (Zhao a Dixon, 2009). *Up*-reguluje i mnoho jiných genů potřebných pro PA biosyntézu, jako je gen pro syntézu prekurzorů, transport, oligomeraci/polymeraci a akumulaci. Nejvyšší aktivita byla pozorována v osemení (Pang a kol., 2008). Inzertní mutanti *A. thaliana* TT2 transkripčního faktoru ztrácí funkci akumulace PA v osemení (Nesi a kol., 2001).

### 5.3.2.2 *Medicago truncatula* proantokyanidinový regulátorový transkripční faktor (*MtPAR*)

*Medicago truncatula* proantokyanidinový regulátor (*MtPAR*) je homologní k TT2 *A. thaliana* a jedná se o pozitivní regulátor PA biosyntézy v osemení. *Mtpar* mutantní linie akumuluje méně PAs v osemení než *wild type*. Hladina antokyanů zůstává nepozměněná. Nejvíce ovlivněné je množství kyseliny kumarové, kumarinů, triterpenových saponinů, epikatechinů a flavonoidových glykosidů. Epikatechinu je méně, což vede k nižšímu množství rozpustných PAs. Flavonoidových glykosidů je naopak více. Rostliny však nemají pozorovatelné fenotypové změny (Verdier a kol., 2011). Při ektopické expresi genu *MtPAR* v kořenech naopak dochází k výrazně vyšší akumulaci PAs oproti normálu. *MtPAR* se *over*-exprimuje při *mis*-expresi WD40 (Verdier a kol., 2011).

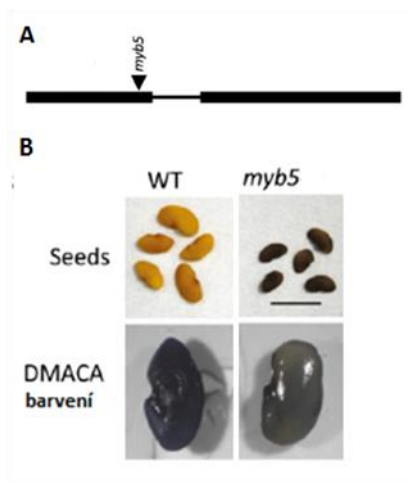


**Obrázek 7:** A Schéma inserce *Tnt1* v genu *MtPAR*. B Fenotypové a DMACA srovnání *wild type* a mutantních semen linií NF 4419, NF 2466, NF 3308 *M. truncatula* (upraveno dle Verdier a kol., 2011).

### 5.3.2.3 MYB5 transkripční faktor

MYB5 transkripční faktor zejména zvyšuje tvorbu slizovitého obalu semen a větvení trichomů spíše než PA biosyntézu (Liu a kol., 2014).

Mutanti *MYB5* mají *down*-regulované geny biosyntézy flavonoidů a metabolismu sacharidů (některé geny enzymů pro biosyntézu buněčných stěn a slizovitého obalu). Výsledkem je nízká akumulace PAs a tvorba slizovitého obalu semen. Mimo jiné se *down*-reguluje i antokyanový represor, což je spojeno s *up*-regulací některých genů biosyntézy antokyanů (Liu a kol., 2014). Mutanti inzerční linie NF 13006 *MYB5* genu vykazují tmavě červenou barvu semen, na rozdíl od žluté barvy *wild type* semen, morfologické změny epidermálních buněk osemení a právě deficienci v tvorbě slizovitého obalu. Pomocí histochemického případně kolorimetrického barvení DMACA lze sledovat hladinu akumulace PAs (30 % z obsahu *wild type* rostliny). Červená barva semen je způsobena antokyanany. Rostlina samotná nejeví fenotypové rozdíly od *wild type*. Největší exprese je v semenech, ale také se projevuje v květech a kořenech. Ektopickou *up*-regulací *MYB5* v kořenech se vyvolává mnohonásobně vyšší exprese některých genů zapojených do PA a antokyanové biosyntézy (Liu a kol. 2014).



**Obrázek 8:** A Schéma inzerce *Tnt1* v genu *MYB5*. B Fenotypové a DMACA srovnání *wild type* a mutantních semen linie NF13006 *M. truncatula* (upraveno dle Liu a kol., 2014).

### 5.3.3 Transparent testa 8 transkripční faktor

Je to transkripční faktor patřící do rodiny bHLH (Baudry a kol., 2006). Působí v kombinaci s ostatními MYB (*TT2*, *PAP1*) faktory (Goff a kol., 1992). *bHLH* i *MYB* jsou kontrolovány *WD40* (*TTG1* – *Transparent testa glabra 1*); (Baudry a kol., 2006). Zároveň při zvýšení exprese *MYB* (*TT2*, *PAP1*) faktoru dochází k ektopické akumulaci mRNA *TT8*



(Tohge a kol., 2005). Z toho se vyvozuje důležitá role kontroly *bHLH* genové exprese pro flavonoidovou akumulaci jinými transkripčními faktory (Baudry a kol., 2006).

TT8 je hlavním regulátorem pro expresi flavonoidových strukturních genů a genů pro slizovitý obal semen u *A. thaliana*. Působí různě podle typu buněk, jak v semenech, tak ve vegetativních částech rostliny. V semenech pozitivně reguluje *BANYULS* (*BAN*), případně ortologní gen *ANR* v *M. truncatula*, akumulaci PAs a tvorbu slizovitého obalu. Ve vegetativních částech rostlin reguluje akumulaci antokyanů (Baudry a kol., 2006). Opačně, inzercí v genu pro MYB (*tt2* mutant) transkripční faktor nedochází ke snížení mRNA TT8 v semenech. *Wdr* (*ttg1*) mutant zcela vyřazuje expresi TT8 v semenech a snižuje transkript ve vegetativních částech rostliny (Baudry a kol., 2006). Inzerce v genu pro TT8 odhaluje, že v některých typech buněk dochází k autoregulaci (Baudry a kol., 2006). Inzercí v jednotlivých genech se vždy detekuje určité množství TT8, což naznačuje přítomnost dalších transkripčních faktorů (Baudry a kol., 2006).

#### **5.4 *Multidrug and toxic compound extrusion* transportér (MATE1)**

MATE1 slouží v *M. truncatula* jako vakuolární transportér lokalizovaný na tonoplastu. Gen je lokalizován na chromozomu 5 a je na proteinové úrovni ze 70 % homologní s TT12 (*A. thaliana* vakuolární transportér), (Zhao a Dixon 2009), který však upřednostňuje jako substrát kyanidin-3-O-glukosid (Marinova a kol., 2007). Transportér je antiport, jehož funkce je zprostředkována pH gradientem závislým na H<sup>+</sup>. Předpokládá se u něj 12 transmembránových domén. MATE1 přednostně transportuje epikatechin-3'-O-glukosid, prekurzor PAs (Zhao a Dixon 2009). Inzercí v genu *MATE1* transportéru se potvrdila jeho role v PA biosyntéze. Došlo ke snížení rozpustných i nerozpustných PAs (Zhao a Dixon 2009). *MATE1* gen se převážně exprimuje v květech, luscích a osemení, naopak velmi málo se exprimuje v listech, kořenech, stoncích, pupenech a řapíku (Zhao a Dixon 2009). V kořenech *M. truncatula* se běžně vyskytují antokyaniny a flavonoidové glykosidy, ale žádné PAs. K akumulaci dojde až po expresi *TT2* genu (transkripční faktor) (Pang a kol. 2008). Při studiu složek se zjistil aktivní transportér pro kyanidin-3-O-glukosid. V buňkách s aktivním TT2 byl aktivní MATE1, který upřednostňuje epikatechin-3'-O-glukosid, tudíž došlo k akumulaci PAs (Zhao a Dixon 2009).

## 5.5 Oxidace proantokyanidinů

Oxidace proantokyanidinu je umožněna fenoloxidázami a peroxidázami. Oxidázy působí s využitím O<sub>2</sub> molekul na rozdíl od peroxidáz, které potřebují H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dehon a kol., 2002). Lakázy patří do rodiny enzymů polyfenoloxidáz obsahujících měď a jsou to glykoproteiny (Messerschmidt a Huber, 1990; Pourcel a kol., 2005) s nízkou specifitou pro substrát (Mayer a Staples, 2002).

### 5.5.1 Transparent testa 10 polyfenoloxidáza

TT10 je *laccase-like* polyfenol oxidázový enzym. Má čtyři domény s navázanou mědí (Bertrand a kol., 2002; Pourcel a kol., 2005). Lokalizuje se v apoplastu. Po interakci se substrátem proantokyanidinem dojde k oxidaci (Pourcel a kol., 2005). Exprimuje se nejvíce v semenech, ale i v jiných rostlinných orgánech. Fenotypovým projevem působení enzymu je hnědé zbarvení semen, způsobené oxidací substrátu, PAs (Pourcel a kol., 2005). Mutanti s inzercí v tomto genu akumulují monomery epikatechinu a rozpustné proantokyanidiny více než *wild type* rostliny. Nerozpustné PAs, a tedy i zhnědnutí semen, se objevují se zpožděním. Předpoklad pro existenci nerozpustných PAs v mutantních rostlinách se odůvodňuje oxidací vzdušným kyslíkem (Pourcel a kol., 2005). Při dysfunkci *TT10* genu jsou vyřazeny z oxidace i ostatní oxidázy nebo peroxidázy (Pourcel a kol., 2005).

## 6 MATERIÁLY A METODY

**Přístroje:** Centrifuga (*Centrifuge 5415 R, Eppendorf*); Elektroforéza (*Widi Mini Sub; Bio Rad*); Digitální kamera (*DP73, Olympus*); Homogenizátor (*FastPrep-24; MP Biomedicals*); Nanodrop (*NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific*); Naprašovačka (*Q150T ES, Quorum Technologies*); Skenovací elektronový mikroskop (*VEGA3 LMU, TESCAN*); Termocycler (*PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research*); UV transiluminátorem (*FireReader; Uvitec Cambridge*); Váha (*572; Kern*); Zdroj stejnosměrného napětí (*PowerPac Basic; Bio-Rad*)

**Chemikálie:** Agaróza (*SERVA, Německo*); AP fosfatáza/Thermosensitive Alkaline Phosphatase (*1 U/μl, Thermo Scientific, USA*); Destilovaná voda; DMACA barvení – *p*-Dimethylaminocinnamaldehyde (*1%, Sigma Aldrich, USA*), Metanol a HCl (*1:1, Lach-Ner s.r.o., ČR*), Etanol (*70%, Lach-Ner s.r.o., ČR*); Exo 1/Exonuclease I (*20 U/μl, Thermo Scientific, USA*); Fast AP/Fast Alkaline Phosphatase pufr (*10x, Thermo Scientific, USA*); Fluorescenčního barviva pro DNA (*GelRed™; Biotium, USA*); Invisorb Spin Plant Mini Kit (*Invisorb, Stratec, Německo*) – *Lysis Buffer P, Proteinasy K, Binding Buffer A, Wash Buffer I, Wash Buffer II, Elution Buffer D*; Primery (*5 μM, Generi Biotech, ČR*); RNáza A (*Sigma Life Science, Sigma Aldrich, USA*), Standardu molekulové hmotnosti/GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (*0,5 μg/μl, Thermo Scientific, USA*); Taq DNA polymeráza (*5U/μl, MyTaq, Bioline*); Taq pufr (*5x, MyTaq, Bioline, UK*); TBE pufr (*1x; Tris, kyselina boritá a EDTA; Sigma Aldrich, ČR*)

**Rostlinný materiál:** *Medicago truncatula* mutantní linie (tabulka 1).

V této práci se použilo celkem 8 různých linií *Medicago truncatula*. U linií se identifikovaly, popřípadě ověřovaly inserce *Tnt1* retrotranspozony metodami PCR, gelovou elektroforézou na agarózovém gelu a sekvenováním. Fenotypový projev se analyzoval DMACA barvením a skenovacím elektronovým mikroskopem.

**Tabulka 1:** Seznam použitých linií v této práci.

Použité linie	Zájmový gen	Funkce proteinu	Původ
NF 3308-2WT	<i>PAR</i>	transkripční faktor	J. Verdier, Shanghai Center for Plant Stress Biology, China
NF 3308-5Ho	<i>PAR</i>	transkripční faktor	J. Verdier, Shanghai Center for Plant Stress Biology, China
NF 4419-6WT	<i>PAR</i>	transkripční faktor	J. Verdier, Shanghai Center for Plant Stress Biology, China
NF 4419-1Ho	<i>PAR</i>	transkripční faktor	J. Verdier, Shanghai Center for Plant Stress Biology, China
NF 2466-1WT	<i>PAR</i>	transkripční faktor	J. Verdier, Shanghai Center for Plant Stress Biology, China
NF 2466-2Ho	<i>PAR</i>	transkripční faktor	J. Verdier, Shanghai Center for Plant Stress Biology, China
NF 12661-R <sub>1</sub>	<i>MATE1</i>	transportér	The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc.
NF 0679-R <sub>1</sub>	<i>Laccase-14/TT10</i>	polyfenoloxidáza	The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc.
NF 17248-R <sub>0</sub>	<i>TT8</i>	transkripční faktor	The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc.
NF 1263-R <sub>1</sub>	<i>UDP-Glu</i>	uridindifosfát glukosyltransferáza	The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc.
NF 13006-R <sub>1</sub>	<i>Myb-5</i>	transkripční faktor	The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc.

Semena jednotlivých linií byla vložena do Petriho misek na vlhkou buničitou vatu. Petriho misky se vložily do lednice a semena se nechala 3–4 dny vernalizovat za tmy při 4 °C. Poté se nechala klíčit při pokojové teplotě (25 °C). Semena, která po několika dnech nejevila známky vyklíčení ani nabobtnání byla broušena o brusný papír. Opět se nechala v Petriho miskách na vlhké buničině při pokojové teplotě.

Semena, která vyklíčila, byla zaseta do pěstebního substrátu (PROFI výsevní substrát, Florcom) v 8x8cm kontejnerech. Inkubovala se ve fytotronu při 24 °C s 16h/8h den/noc, se světlem na 200  $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a při 40% vlhkosti. Po 7–14 dnech byly květináče přeneseny do skleníku za sníženého zalévání. Každá rostlina byla označena cedulkou s popisem.

**Tabulka 2:** Přehled pěstování tolíce.

Linie	Celkem vyseto	Vyklíčilo ihned	Vyklíčilo po skarifikaci	Celkový počet rostlin
NF 3308-2WT	15	1	0	1
NF 3308-5Ho	13	3	0	3
NF 4419-6WT	13	1	2	3
NF 4419-1Ho	19	6	1	7
NF 2466-1WT	13	3	0	2
NF 2466-2Ho	26	4	2	6
NF 12661-R <sub>1</sub>	10	0	10	5
NF 0679-R <sub>1</sub>	10	5	5	5
NF 17248-R <sub>0</sub>	10	0	10	4
NF 1263-R <sub>1</sub>	10	4	6	5
NF 13006-R <sub>1</sub>	10	3	7	5

Po vzniku několika pravých trojčetných listů se provedl odběr celého jednoho oddílu listu do zkumavek se závitem (Extra Low Binding, MB Bio) s homogenizačními kuličkami (Ceramic Sphere 1/4", zirconium oxide, Life Science, MP Bio). Z listu se bezprostředně izolovala DNA.

## 6.1 Izolace genomové DNA

Před samotnou izolací se listy homogenizovaly v homogenizátoru FAST Prep, který využívá rychlého vícesměrného pohybu.

K izolaci DNA se použil Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK), což je komerčně vyráběný a používaný kit založený na adsorpci DNA na silikát. Izolace se řídila návodem od výrobce:

1. Popis zkumavky.
2. Ke 100 mg homogenizovaného materiálu přidat 400  $\mu$ l *Lysis Buffer P* a 20  $\mu$ l Proteinasy K. Zvortexovat a inkubovat 30 min. při 65 °C.
3. Přelít obsah zkumavky na *Prefilter* kolonku ve zkumavce a centrifugovat 1 min. při 12000 otáčkách.
4. Připipetovat 10  $\mu$ l RNázy A a inkubovat 15 minut při pokojové teplotě.
5. Připipetovat 200  $\mu$ l *Binding Buffer A* a zvortexovat.

6. Obsah zkumavky pod kolonkou přelit do *Spin Filter* kolonky na zkumavce. Inkubovat 1-2 minuty při pokojové teplotě a následně centrifugovat při 12000 otáčkách 1 min.
7. Vylít vše, co proteče skrz kolonku. Do kolonky napipetovat 550  $\mu$ l *Wash Buffer I*. a centrifugovat 1 min. při 12000 otáčkách.
8. Vylít vše, co proteče skrz kolonku. Do kolonky napipetovat 550  $\mu$ l *Wash Buffer II*. a centrifugovat 1 min. při 12000 otáčkách. Krok opakovat.
9. Vylít vše, co proteče skrz kolonku. Centrifugovat 2 min. při 12000 otáčkách.
10. Přenést kolonku do nové mikrozkušavky (1,5 ml). Napipetovat 100 $\mu$ l *Elution Buffer D* (65 °C), inkubovat 3 minuty a centrifugovat 1 min. při 12000 otáčkách. Krok opakovat.
11. Získanou genomovou DNA uskladnit dle potřeby při 4 °C nebo -20 °C.

## 6.2 Spektrofotometrické měření DNA

Na přístroji NanoDrop se měřila koncentrace a čistota genomové DNA. Po každém měření se očistil snímač přístroje buničitou vatou. Nanesly se 2  $\mu$ l *Elution Buffer D* (blank) a poté po 2  $\mu$ l vzorky. Každý vzorek se proměřil při 260 nm a 280 nm. Počítač zaznamenal hodnoty čistoty a koncentrace DNA.

## 6.3 Amplifikace polymerázovou řetězovou reakcí (PCR)

Pro identifikaci genotypu, tj. jestli je vybraný gen inzertovaný *Tnt1* retrotranspozonem byl daný úsek amplifikován PCR metodou. Převzaly se, popřípadě navrhly, primery ohraničující úsek s předpokládaným inzertem.

**Tabulka 3:** Seznam primerů.

Gen (inzert)	F/R	Sekvence primerů (5'–3')	Délka produktu [bp]	Jméno a původ primerů
<i>PAR</i>	F	TGGAGTAGGTTTAAAGCGGTGTGG	521	286; Verdier a kol., 2012
	R	TAGGCTTTGGAGCTTCTGGTGCTA		287; Verdier a kol., 2012
<i>Myb5</i>	F	GAGACGTGGATCTCAGGGTG	826	Vlastní navržené primery
	R	GTTCTGGGATCAATCCCTTGG		
<i>MATE1</i>	F	ATTCCGAACAGTGAGTGAAGTGG	801	
	R	GCAATGTTATGCACATTGCTGC		
<i>Laccase-14</i>	F	GTGTCAAAGGATGTGCCGTT	669	
	R	GTTCACTAGCTGCAAACC		
<i>TT8</i>	F	GATGGTCACTCTTTGCCGCCA	454	
	R	GCAAATTACCCACCGTTCTT		
	F	GATGGTCACTCTTTGCCGCCA	724	
	R	TGAATCTAATGACCAGCCAGC		
<i>UDP-Glu</i>	F	TGTTCCAGGTGTCGGGTATGGAC	1414	UGT72L1TR1; Pang a kol., 2013
	F	AGTTGGCTACCAATCCAACAAG (chybný)		UGT72L1TL1; Pang a kol., 2013
	R	GAAGCAAAAGAATTCCTTAAATCTGGT		
<i>Tnt1</i>	F	GCATTCAAACACTAGAAGACAGTGCTACC	/	<i>Tnt1</i> 3; Tadege a kol., 2008
	R	CTCCAGACATTTTTATTTTTTCACCAAG		<i>Tnt1</i> 5; Tadege a kol., 2008

Lyofilizované primery dodané od výrobce se rozpustily v destilované vodě dle pokynů na zkumavce za vzniku zásobního 100  $\mu$ M roztoku primerů, ty byly dále 20x ředěny pro PCR amplifikaci.

Pro PCR reakci se napipetovaly reakční směsi, jejichž varianty se s jednotlivými vzorky DNA pipetovaly do stripů po 8 mikrozkušavkách nebo do 96-ti jamkové mikrotitrační desky. Reakční směs pro PCR se skládala z:

**Tabulka 4:** Reakční směs pro PCR.

Chemikálie	Koncentrace zásobního roztoku	Množství na 1 test ( $\mu$ l)	Objem reakce
Taq pufr	5x	4	20
Voda		13	
Primery (F/R)	5 $\mu$ M	1	
Taq DNA polymeráza	5U/ $\mu$ l	0,1	
Vzorek		2	

Takto připravené směsi se vložili do PCR termocycleru s programem:

**Tabulka 5:** PCR program se změnami v čase podle délky předpokládaného produktu.

Průběh	Teplota [°C]	Čas [min]			Cykly
Iniciační denaturace	94	5	5	5	1x
Denaturace	94	0,5	0,5	0,5	35x
Nasedání primerů	55	1	0,75	0,5	
Prodlužování	72	3	2,5	2,5	
Finální prodlužování	72	10	10	10	1x
Udržování	7				

#### 6.4 Horizontální gelová elektroforéza na agarózovém gelu

K ověření přítomnosti PCR produktu a identifikaci genotypu se provedla gelová elektroforéza na agarózovém gelu. Postup přípravy, použití a vizualizace gelu:

1. Navážit na 1,5% gel pro 80 ml gelu 1,2 g agarózy.
2. Napustit do odměrného válce 80 ml 1x TBE pufr.
3. Obě složky přesunout do Erlenmayerovy baňky a rozvařit v mikrovlnné troubě.
4. Po vychlazení na cca 60 °C přidat 1 µl fluorescenčního barviva pro DNA a promíchat.
5. Gel rozlít do elektroforetické vany a umístit hřebínky.
6. Po vychladnutí hřebínky z gelu vytáhnout. Vanu umístit do elektroforézy s TBE pufrem.
7. Napipetovat cca 4 µl standardu molekulové hmotnosti a do ostatních jamek po cca 9 µl vzorku PCR produktu. PCR produkt je obarven MyTaq pufrem, a proto ho není nutné smíchat s nanášecím pufrem.
8. Připojit elektroforézu ke zdroji stejnosměrného napětí a spustit. Standardně nastavit cca 30 minut, 100-120 V.
9. Prohlédnout a vyfotografovat gel pod UV transiluminátorem, prostřednictvím programu FireReader V4.

#### 6.5 Sekvenování

V případě amplifikace inzertovaného genu se určilo pořadí nukleotidů vybraného úseku Sangerovým sekvenováním. Před odesláním vzorku pro sekvenaci (Laboratoř



analýzy DNA, PšF UK Praha) se ověřila přítomnost inzertu PCR amplifikací a horizontální gelovou elektroforézou. PCR produkt se purifikoval podle AP/EXO protokolu s využitím alkalické fosfatázy a exonukleázy pro degradaci přebytku primerů.

**Tabulka 6:** Reakční směs pro purifikaci PCR produktu před sekvenací.

Chemikálie	Směs pro 1 vzorek [ $\mu$ l]
10x Fast AP pufr	1,00
voda	3,45
AP fosfatáza	0,15
Exo 1	0,40
Celkem	5,00
PCR produkt	5,00

**Tabulka 7:** PCR program pro přečištění PCR produktu.

Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas [min]
37	15
85	15

Takto přečištěné PCR produkty se připravily a odeslaly v reakční směsi pro sekvenování za použití příslušného *forward* (F) primeru:

**Tabulka 8:** Reakční směs pro sekvenování na jeden vzorek.

PCR produkt	F primer	Voda
4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	3 $\mu$ l

## 6.6 Barvení DMACA

Barvivo p-Dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA); (Peel a Dixon, 2007; Pang a kol., 2013) se použilo pro určení hladiny extrahovatelných proantokyanidinů v osemeni.

Postup barvení:

1. Namíchat 1% barvivo smísením barviva, metanolu a HCl (1:1).
2. Vybraná semena v mikrokumavkách po 4 kusech namočit na 2 hod. do vody.
3. Odpipetování vody.
4. Napipetovat 400  $\mu$ l barviva.
5. 1 hod. odbarvovat 70% etanolem.

Semena se nasnímal digitální kamerou Olympus DP73 propojenou s počítačovým programem cellSense. Na podkladu se převrstvila vodou a snímala se při zvětšení 10x a 25x.

## **6.7 Analýza osemení skenovacím elektronovým mikroskopem**

Semena se pozorovala pomocí SEM (VEGA3 LMU, TESCAN) s LaB<sub>6</sub> katodou na katedře experimentální fyziky PřF UPOL.

Celá nebo půlená semena se nalepila na držák oboustrannou lepicí páskou. Držák se vložil do nosníku/stolku, který se mechanicky zasunul do mikroskopu. Po vytvoření vakua se snímal povrch semene. Kvalita fotografie závisela na době expozice. Některá semena se před mikroskopováním nechala pozlatit naprašovačkou (Q150T ES, Quorum Technologies) pro dosažení lepšího rozlišení.

## **6.8 Bioinformatická analýza a programové nástroje**

Objednané linie byly vyhledány pomocí BLAST *search* v databázi mutantů Noble Foundation na internetové stránce <http://medicago-mutant.noble.org/mutant/>. Dále se využíval BLAST program na stránkách NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> pro ověření identity sekvence genu. Pro kontrolu inzercí, alignmentu sekvencí a navrhovaných či převzatých primerů byla využívána internetová stránka [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_multalinan.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html). Samotné primery byly navrhovány v programu FAST PCR (Primer Digital, Finsko), program byl dále využíván pro editaci sekvencí.

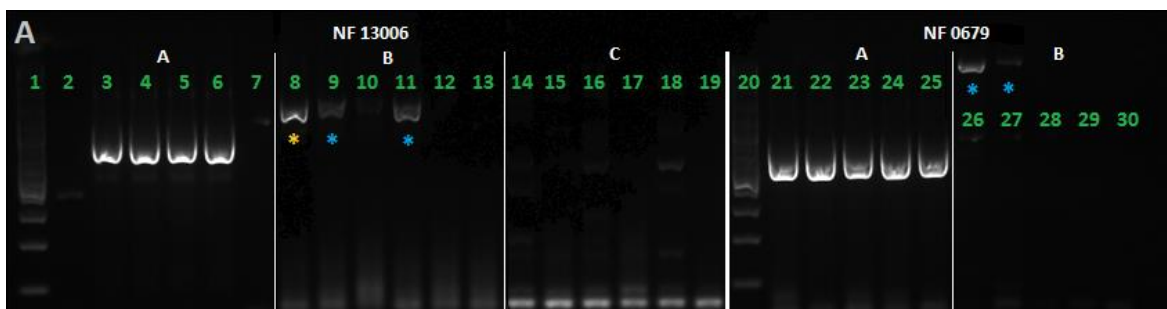
## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Určení přítomnosti inzertu *Tnt 1* vybraných linií *Medicago truncatula*

Na 8 vybraných liniích *Medicago truncatula* s *Tnt1* inzertem pro sledované geny byla pomocí PCR provedena analýza přítomnosti, popřípadě potvrzení jejich inzertu v daném genu. Nejprve se provedla izolace genomové DNA všech vypěstovaných rostlin (46) od všech linií. Poté následovala PCR amplifikace DNA s navrženými *forward* a *reverse* primery pro intaktní sledované geny a s *forward* a *reverse Tnt1* primery pro předpokládané inzertované geny. Na 1,5% agarózovém gelu se provedla elektroforéza každého PCR produktu a vzdálenost doputování vzorku se odečetla od standardu molekulární hmotnosti.

Na obrázku 9 a 10 jamky odpovídaly pěti rostlinám od každé linie, případná šestá jamka náležela vodě jako negativní kontrole PCR amplifikace. V prvních jamkách byly napipetované standardy molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; Thermo Scientific).

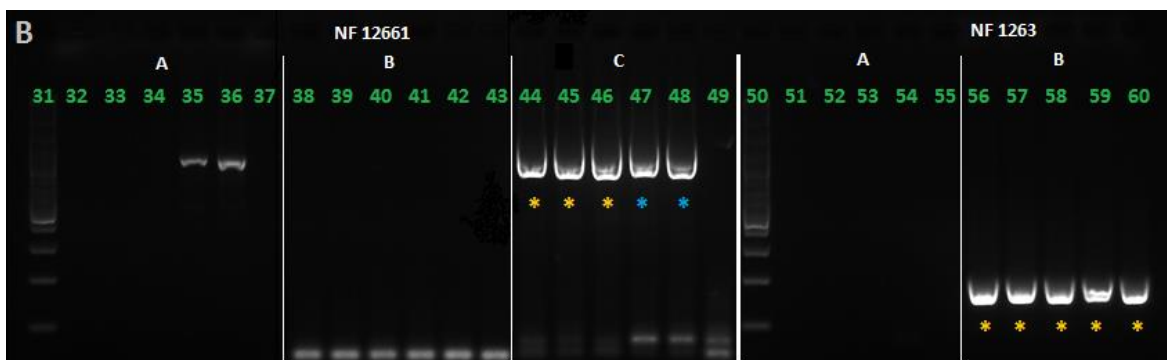
Bylo zjištěno, že z izolovaných rostlin linie **NF 13006** byla první rostlina homozygotní, druhá se čtvrtou heterozygotní a třetí s pátou bez inzertu, u linie **NF 0679** byla první a druhá rostlina heterozygotní a zbylé tři bez inzertu, v linii **NF 12661** byly první, druhá a třetí rostlina homozygotní a čtvrtá s pátou heterozygotní. V linii **NF 1263** se všechny vypěstované rostliny jevíly homozygotní.



**Obrázek 9:** A Snímek agarózového gelu s PCR produkty na vzorcích linií 13006, 0679.

**Legenda:** A Kombinace primerů F/R; B Kombinace primerů F/*Tnt1* F; C Kombinace primerů F/*Tnt1* R;

■ – Homozygot; ■ – Heterozygot; Dále jamky: 1, 20 Standard molekulové hmotnosti; 2–6, 8–12, 14–18 PCR produkty linie NF 13006 (5 rostlin testovaných ve stejném pořadí); 21–25, 26–30 PCR produkty linie NF 0679 (5 rostlin testovaných ve stejném pořadí); 7, 13, 19 Voda



**Obrázek 10: B** Snímek agarózového gelu s PCR produkty na vzorcích linií 12661, 1263.

**Legenda:** **A** Kombinace primerů F/R; **B** Kombinace primerů F/Tnt1 F; **C** Kombinace primerů F/Tnt1 R;

■ – Homozygot; ■ – Heterozygot; Dále jamky: **31, 50** Standard molekulové hmotnosti; **32–36, 38–42, 44–48** PCR produkty linie NF 12661 (5 rostlin testovaných ve stejném pořadí); **50–55, 56–60** PCR produkty linie NF 1263 (5 rostlin testovaných ve stejném pořadí); **37, 43, 49** Voda

**Tabulka 9:** Shrnutí výsledků z obrázků č. 9 a 10

Linie	Číslo vypěstované rostliny	F/R	F/Tnt1 F	F/Tnt1 R
NF 13006	1 (Ho)	–	+	–
	2 (He)	+	+	–
	3 (Wt)	+	–	–
	4 (He)	+	+	–
	5 (Wt)	+	–	–
NF 0679	1 (He)	+	+	
	2 (He)	+	+	
	3 (Wt)	+	–	
	4 (Wt)	+	–	
	5 (Wt)	+	–	
NF 12661	1 (Ho)	–	–	+
	2 (Ho)	–	–	+
	3 (Ho)	–	–	+
	4 (He)	+	–	+
	5 (He)	+	–	+
NF 1263	1 (Ho)	–	+	
	2 (Ho)	–	+	
	3 (Ho)	–	+	
	4 (Ho)	–	+	
	5 (Ho)	–	+	

**Legenda:** **Ho** homozygot, **He** heterozygot, **Wt** wild type, + přítomnost ampliconu, – nepřítomnost ampliconu.

Linie **NF 1263** byla převzata z publikace Pang a kol. (2013) spolu s původními navrženými primery UGT72L1TR1 a UGT72L1TL1. Pomocí bioinformatické analýzy se ukázalo, že F primer UGT72L1R1 neodpovídal žádné sekvenci v okolí genu, a proto se musel navrhnout nový F primer. Při následné PCR a elektroforéze byly u linie z pěti vypěstovaných rostlin identifikovány třetí a pátá jako heterozygotní mutant a ostatní byly bez inzertu (tabulka 10).

**Tabulka 10:** Detekce produktů pro PCR reakční směsi u linie NF 1263 pomocí elektroforézy na agarózovém gelu.

Číslo vypěstované rostliny	F/R	F/Tnt1 F	F/Tnt1 R	R/Tnt1 F	R/Tnt1 R
1 (Wt)	+	–	–	–	–
2 (Wt)	+	–	–	–	–
3 (He)	+	–	+	–	–
4 (Wt)	+	–	–	–	–
5 (He)	+	–	+	–	–

**Legenda:** **He** heterozygot, **Wt** *wild type*, + přítomnost ampliconu, – nepřítomnost ampliconu.

U získaných semen linií *par* mutantů byla přítomnost jejich inzerce známá a provedlo se pouze jejich ověření. Vypěstovalo se celkem 22 rostlin: sedm z linie **NF 4419-1 Ho**, tři z linie **NF 4419-6 Wt**, šest z linie **NF 2466-2 Ho**, dvě z linie **NF 2466-1 Wt**, 3 z linie **NF 3308-5 Ho** a jedna z linie **NF 3308-2 Wt**. U všech se potvrdila přítomnost nebo absence inzerce v *PAR* genu, jak je znázorněno v tabulce 11.

**Tabulka 11:** Potvrzení přítomnosti/absence inzertu v genu *PAR* linií NF 4419, 2466 a 3308 elektroforézou na agarózovém gelu.

Linie	Číslo vypěstované rostliny	F/R	F/ <i>Tnt1</i> F	R/ <i>Tnt1</i> R	F/ <i>Tnt1</i> R
NF 4419-1 Ho	1	-	+	+	-
	2	-	+	+	-
	3	-	+	+	-
	4	-	+	+	-
	5	-	+	+	-
	6	-	+	+	-
	7	-	+	+	-
NF 4419-6 Wt	1	+	-	-	-
	2	+	-	-	-
	3	+	-	-	-
NF 2466-2 Ho	1	-	-	-	+
	2	-	-	-	+
	3	-	-	-	+
	4	-	-	-	+
	5	-	-	-	+
	6	-	-	-	+
NF 2466-1 Wt	1	+	-	-	-
	2	+	-	-	-
NF 3308-5 Ho	1	-	+	+	-
	2	-	+	+	-
	3	-	+	+	-
NF 3308-2 Wt	1	+	-	-	-

**Legenda:** **Ho** homozygot, **Wt** *wild type*, + přítomnost ampliconu, - nepřítomnost ampliconu.

Analýzou linie **NF 17248** s předpokládanou inzercí v genu *TT8* se opakovanou analýzou i nově navrženými primery podařila potvrdit pouze přítomnost sledovaného genu, ale žádná inzerce v daném genu (tabulka 12).

**Tabulka 12:** Potvrzení přítomnosti/absence inzertu v genu *TT8* linií NF 17248 elektroforézou na agarózovém gelu.

Číslo vypěstované rostliny	F/R	F/ <i>Tnt1</i> F	F/ <i>Tnt1</i> R	R/ <i>Tnt1</i> F	R/ <i>Tnt1</i> R
1 (Wt)	+	–	–	–	–
2 (Wt)	+	–	–	–	–
3 (Wt)	+	–	–	–	–
4 (Wt)	+	–	–	–	–

**Legenda:** Wt *wild type*, + přítomnost ampliconu, – nepřítomnost ampliconu.

## 7.2 Popis fenotypového projevu – analýza osemení

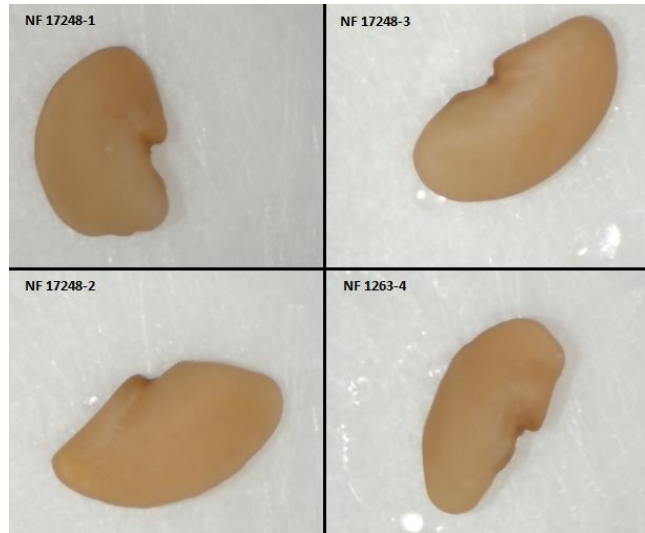
### 7.2.1 Histochemická detekce celkových proantokyanidinů pomocí DMACA barvení

Úroveň extrahovatelných proantokyanidinů byla orientačně určena pomocí DMACA barvení. Semena se barvila ve zkumavkách po čtyřech. Z vybraných linií nebyla reakce pozitivní u semen získaných z rostlin linií NF 17248-1, NF 17248-2, NF 17248-3, NF 1263-4 (obrázek 11). U ostatních rostlin se alespoň dvě semena ze čtyř obarvila, (tabulka 13).

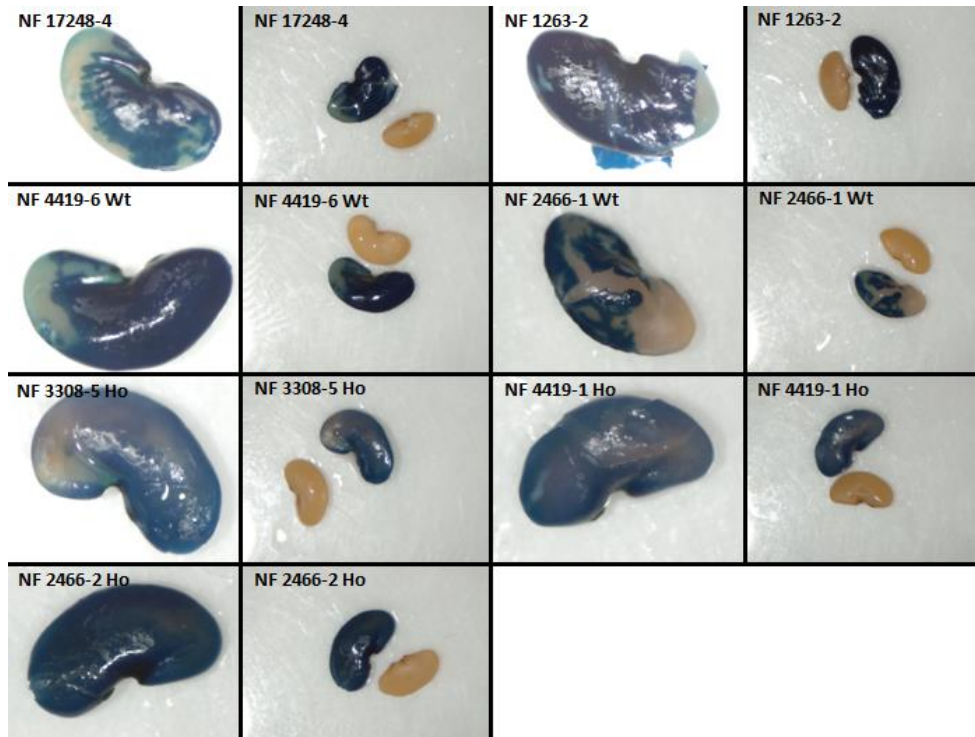
U semen s pozitivní DMACA reakcí došlo v důsledku přítomnosti HCl a etanolu zpravidla k nabobtnání, přičemž došlo až k narušení osemení při jejich manipulaci. Obarvení nebylo vždy rovnoměrné, některá semena se barvila pouze lokálně (obrázek 12).

**Tabulka 13:** Souhrn počtu semen s pozitivní a negativní DMACA reakcí.

Linie s číslem rostliny	Počet semen s pozitivní DMACA reakcí	Počet semen s negativní DMACA reakcí
17248-1	0	4
17248-2	0	4
17248-3	0	4
17248-4	3	1
1263-2	2	2
1263-4	0	4
4419-6 Wt	2	2
2466-1 Wt	3	1
3308-5 Ho	2	2
4419-1 Ho	2	2
2466-2 Ho	3	1



**Obrázek 11:** Barvení DMACA: Semena, u kterých nedošlo k pozitivní DMACA reakci. Zvětšení snímku 2,5x pod mikroskopem DP73 Olympus.



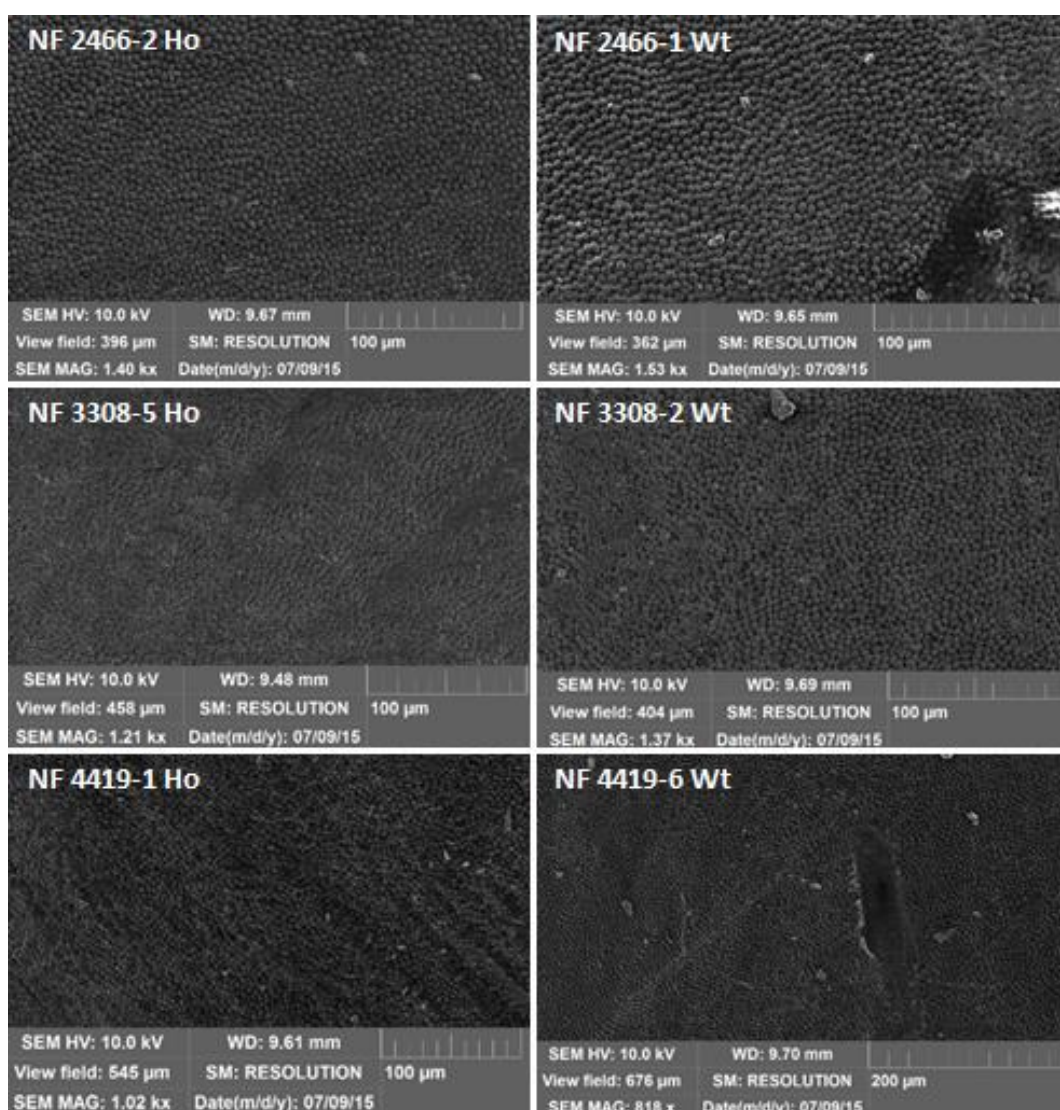
**Obrázek 12:** Semena s pozitivní DMACA reakcí vybraných semen a linií ve srovnání s neobarvenými semeny. Zvětšení snímku u jednotlivých semen 2,5x, u párových semen 10x pod mikroskopem DP73 Olympus.

### 7.2.2 Struktura povrchu osemení *M. truncatula*

Osemení vizualizované pomocí skenovacího elektronového mikroskopu bylo u všech linií tvořeno papilami z jednotlivých buněk palisádového parenchymu. Uspořádání a vyklenutí papil se lišilo mezi liniemi. Mezi liniemi **NF 2466** se u *wild type* jeví papily

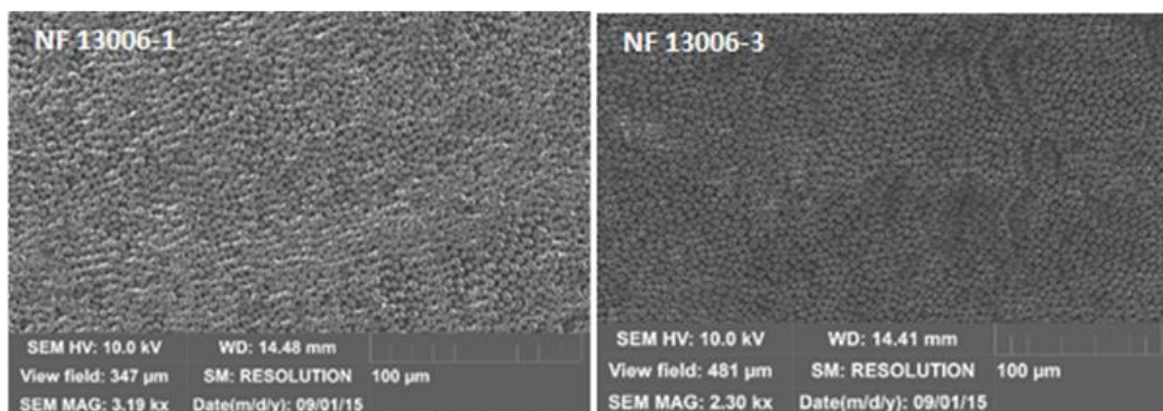


více vystouplé oproti homozygotnímu mutantu. Homozygotní mutant měl papily propojené vystouplými hřbety, které byly u *wild type* méně zřetelné (obrázek 13). U linie **NF 3308** *wild type* bylo osemení zřetelně vystouplé oproti homozygotnímu mutantu, a papily jevíly náznak propojení hřbety. Papily homozygotní linie **NF 3308** se zdály až ploché a v některých místech mezery mezi papilami zcela zanikly za tvorby provazcovitých vzorů. Homozygotní linie **NF 4419** měla buňky papil velmi blízko u sebe, na rozdíl od *wild type*, některé se v jednom směru propojily, až srostly, což při širším pohledu tvořilo rozeznatelný lineární vzor uspořádání buněk. *Wild type* osemení bylo rovnoměrné a bez propojení a srůstů.



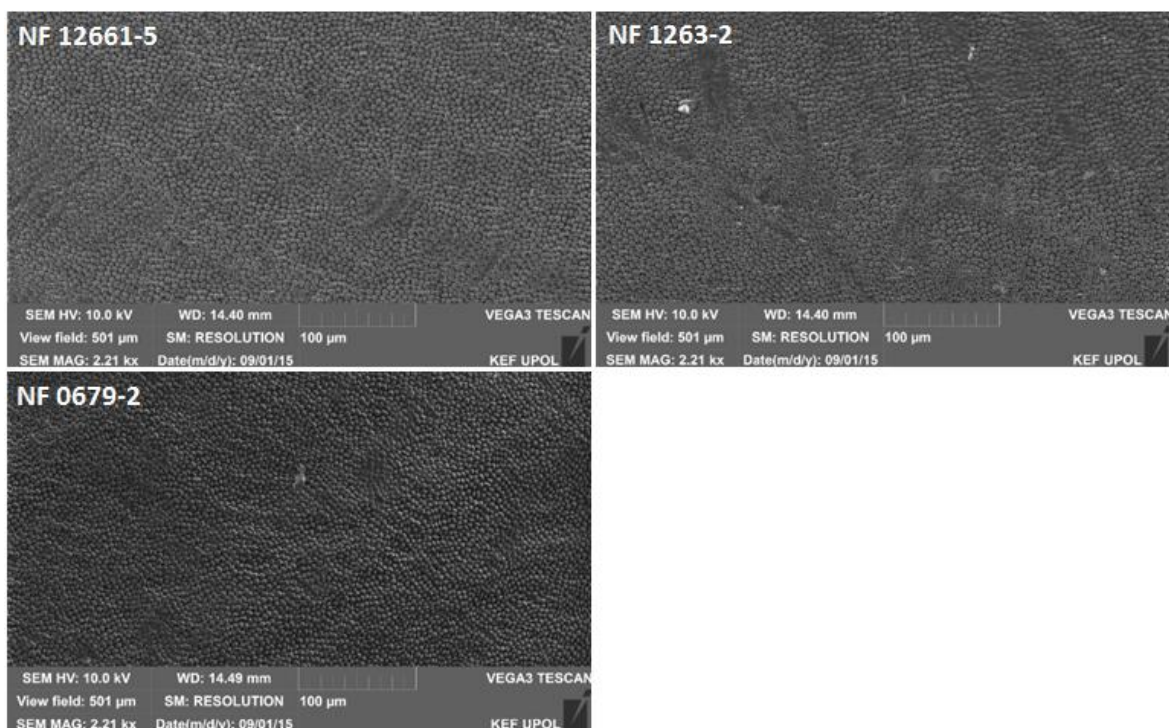
**Obrázek 13:** Snímky linií NF 2466, 3308 a 4419 ze skenovacího elektronového mikroskopu VEGA3 LMU (TESCAN).

Semena rostlin NF **13006-1** jsou homozygotní pro inzerci, tedy fenotypově mutantní, na rozdíl od NF **13006-3**, která jsou heterozygotní, tedy fenotypově *wild type*. Osemení homozygotní linie mělo mezi papilami hřbety, které buď vyplňovaly prostor mezi papilami, nebo jednotlivé papily propojovaly. Osemení heterozygotních semen mělo papily vystouplé a oddělené zřetelnými mezerami, v širším pohledu se jevilo poloměsíčné uspořádání papil (obrázek 14).



**Obrázek 14:** Snímky linie NF 13006 ze skenovacího elektronového mikroskopu VEGA3 LMU (TESCAN).

Dále se pod skenovacím elektronovým mikroskopem analyzovaly *wild type* či heterozygotní rostliny pro inzerci v daném genu u linií NF **12661-5** (He), NF **1263-2** (Wt) a NF **0679-2** (He). Všechny jevily fenotyp – více vystouplé papily než předešlí analyzovaní homozygoti jiných linií, zřetelné mezery a rovnoměrné uspořádání a propojení papil vystouplými hřbety s výjimkou linie NF 12661, která měla zanedbatelné propojení papil. Na linii NF 1263 jsou viditelné provazcovité vzory (obrázek 15).



**Obrázek 15:** Snímky linií NF 12661, 1263 a 0679 ze skenovacího elektronového mikroskopu VEGA3 LMU (TESCAN).

**Tabulka 14:** Shrnutí fenotypů osemení mezi liniemi.

Linie	Papily	Mezery mezi papilami	Vzor na osemení
NF 2466-2 Ho	méně vystouplé	propojení papil vystouplými hřbety	rovnoměrné uspořádání
NF 2466-1 Wt	více vystouplé	vzácně propojení vystouplými hřbety	rovnoměrné uspořádání
NF 3308-5 Ho	ploché	náznak propojení hřbety	provazcovitý vzor
NF 3308-2 Wt	více vystouplé	až zánik mezer	rovnoměrné uspořádání
NF 4419-1 Ho	méně vystouplé	blízko u sebe až srůsty	lineární vzor
NF 4419-6 Wt	více vystouplé	zřetelné mezery, žádné srůsty	rovnoměrné uspořádání
NF 13006-1 (Ho)	méně vystouplé	hřbety mezi papilami, nebo propojené hřbety	rovnoměrné uspořádání
NF 13006-3 (Wt)	více vystouplé	zřetelné mezery	poloměsíčitý vzor
NF 12661-5 (He)	více vystouplé	zřetelné mezery	rovnoměrné uspořádání
NF 1263-2 (Wt)	více vystouplé	náznak propojení hřbety	provazcovitý vzor
NF 0679-2 (He)	více vystouplé	propojení hřbety	rovnoměrné uspořádání

### 7.3 Sekvenování amplifikovaných fragmentů

Po identifikaci *wild type* a homozygotních linií byly pro ověření některé vzorky poslány na osekvenování. Vzorky se nejprve očistily od F/R primeru podle AP/EXO protokolu, viz kapitola **Materiály a metody**. Vzorky *wild type* linií i vzorky s inzertem se sekvenovaly s *forward* primerem genu.

Srovnáním sekvence NCBI BLAST *search* funkcí byla potvrzena identita všech testovaných genů (tabulka 15). U rostlin 12661-1, 13006-1 byly zároveň identifikovány inzerty *Tnt1* v zájmových genech (tabulka 16).

Při sekvenaci PCR produktu rostliny 1263-3 s *forward* primerem UGT72L1TR1 se NCBI databází identifikovala sekvence *Tnt1* retrotranspozonu. Po následném vložení samostatné sekvence primeru do NCBI databáze bylo zjištěno, že primer náleží *Tnt1* retrotranspozonu, nikoliv ke genu UDP-Glu linie 1263.

**Tabulka 15:** Shrnutí sekvenovaných linií.

NF linie	Číslo rostliny	Zájmový gen	Primer použitý pro sekvenování	Accession number pro oblast genu	Max score	Total score	Query cover	E value	Identita	Identita genu potvrzena
12661	4 (He)	<i>MATE-1</i>	F MATE-1	XM_003617269.2	549	1015	48%	5e-152	99%	ano
12661	1 (Ho)			XM_003617269.2	540	540	26%	3e-149	99%	ano
13006	3 (Wt)	<i>Myb-5</i>	F Myb-5	XM_003601561.2	601	774	35%	1e-167	98%	ano
13006	1 (Ho)			XM_003601561.2	532	532	26%	5e-147	97%	ano
0679	2 (He)	<i>Laccase-14/TT10</i>	F Laccase-14/TT10	XM_003593104.2	931	1363	79%	0,0	98%	ano
0679	2 (He)			XM_003593104.2	1616	1616	82%	0,0	97%	ano
1263	2 (Wt)	<i>UDP-Glu</i>	F UDP-Glu	XM_013588490.1	1921	1921	98%	0,0	98%	ano
1263	3 (He)			XM_013588490.1	407	407	33%	3e-109	85%	ano
1263	3 (He)		F UDP-Glu (UGT72L1TR1)							
17248	2 (Wt)	<i>TT8</i>	F TT8	KM892777.1	689	1067	88%	0,0	97%	ano
17248	2 (Wt)			KM892777.1	667	667	53%	0,0	96%	ano
17248	1 (Wt)			KM892777.1	728	728	36%	0,0	97%	ano

**Tabulka 16:** Shrnutí sekvenováním identifikovaných inzertů.

NF linie	Číslo vypěstované rostliny	Zájmový gen	Primer použitý pro sekvenování	Accession number <i>Tnt1</i> elementu	Max score	Total score	Query cover	E value	Identita
12661	1 (Ho)	<i>MATE-1</i>	F MATE-1	X13777.1	1221	2340	59%	0,0	99%
13006	1 (Ho)	<i>Myb-5</i>	F Myb-5	X13777.1	1000	1994	54%	0,0	95%
1263	3 (He)	<i>UDP-Glu</i>	F UDP-Glu (UGT72L1TR1)	X13777.1	276	905	77%	3e-70	98%

## 7.4 Schéma genů s inzercí *Tnt1* retrotranspozonu

### *Par* mutanti

Gen pro proantokyanidinový regulátor je umístěn na osmém chromozómu a skládá se ze tří exonů o celkové délce cDNA 762 bp a celkové délce 1244 bp. Byly objednány tři linie: **NF 4419** s inzercí mezi 498 a 499 bp druhého exonu; **NF 2466** s inzercí mezi 732 a 733 bp a **NF 3308** s inzercí mezi 844 a 845 bp ve třetím exonu (obrázek 16).

### *Mate1* mutant

Gen pro MATE1 transportér je umístěn na pátém chromozómu a skládá se z devíti exonů o celkové délce cDNA 1716 bp a o celkové délce 2861 bp. Objednala se linie **NF 12661** s inzercí v intronu mezi prvním a druhým exonem na pozici mezi 335 a 336 bp (obrázek 17).

### *Myb5* mutant

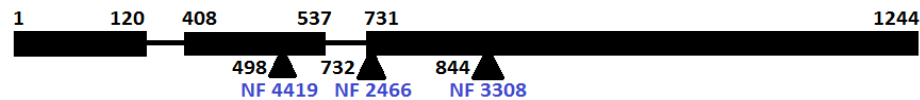
Gen pro Myb5 transkripční faktor je umístěn na třetím chromozómu a skládá se ze dvou exonů o celkové délce cDNA 915 bp a o celkové délce 1050 bp. Objednala se linie **NF 13006** s inzercí v prvním exonu na pozici mezi 318 a 319 bp (obrázek 18).

### *Laccase-14* mutant

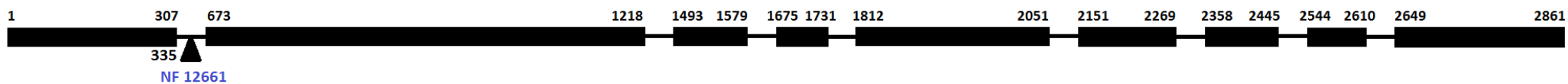
Gen pro polyfenoloxidázu je umístěn na druhém chromozómu a skládá se z šesti exonů o celkové délce cDNA 1728 bp a o celkové délce 2774 bp. Objednala se linie **NF 0679** s inzercí v pátém exonu na pozici mezi 2324 a 2325 bp (obrázek 19).

### *UDP-glu* mutant

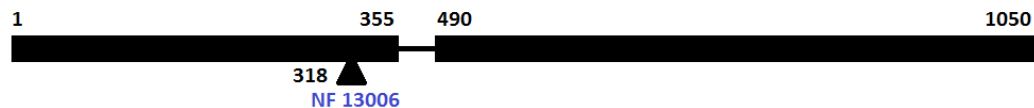
Gen pro uridindifosfát glukosyltransferázu je umístěn na osmém chromozómu a skládá se z jednoho exonu o celkové délce cDNA i genomové DNA 1449 bp. Objednala se linie **NF 1263** s inzercí v exonu na pozici mezi 576 a 577 bp (obrázek 20).



Obrázek 16: Schéma inzerce *par* mutantů linií NF 4419, NF 2466 a NF 3308.



Obrázek 17: Schéma inzerce *mate1* mutanta linie 12661.



Obrázek 18: Schéma inzerce *myb5* mutanta linie 13006.



Obrázek 19: Schéma inzerce *laccase-14* mutanta linie 0679.



Obrázek 20: Schéma inzerce *UDP-glu* mutanta linie 1263.



## 8 DISKUZE

Z objednaných a vypěstovaných semen 8 mutantních linií se u 7 linií podařilo identifikovat inzert ve sledovaném genu. Dále se určilo přesné místo inserce *Tnt1* retrotranspozonu. U semen testovaných rostlin, které byly v dostatečném množství, se analyzovalo osemení DMACA barvením a skenovacím elektronovým mikroskopem. Výsledky ze SEM jsou dosud nepublikovanými zjištěními.

*Par* mutanti třech linií, kteří byli získáni od J. Verdier ze Shanghai Center for Plant Stress Biology (Čína) byly již dříve analyzovanými a publikovanými genotypy ve Verdier a kol. (2011), a proto se výsledky pouze ověřovaly. Ke každé linii s homozygotní inzertovanou formou genu byl získán i odpovídající *wild type* protějšek, což představuje segreganta dané linie bez inserce ve sledovaném genu. U linií NF 3308, NF 4419 a NF 2466 nesoucích nezávislé inserce v *PAR* genu, se provedlo PCR s převzatými primery z publikace Verdier a kol. (2011). U všech vypěstovaných rostlin byla potvrzena homozygotnost (z mutantních semen) nebo *wild type* forma (z *wild type* semen).

Analýzou skenovacím elektronovým mikroskopem byly identifikovány obecné rozdíly mezi povrchem osemení mutantních homozygotních linií a *wild type* rostlinami. Všechny *par* homozygotní mutantní linie jeví méně vystouplé papily. U homozygotních semen bylo zaznamenáno propojování papil vystouplými hřbety, případné srůsty papil (u *wild type* NF 3308 byly papily téměř bez mezer), což se u *wild type* rostlin projevvalo v menší míře. Na rozdíl od mutantních semen, kromě homozygotní NF 2644 linie, měly všechny *wild type* rovnoměrně uspořádané papily osemení.

Z těchto výsledků lze soudit, že *wild type* osemení má výrazně vystouplé papily, které jsou rovnoměrně uspořádány. A je možné vyvodit závěr, že proatokyanidinový transkripční faktor (*PAR*) je nezbytný pro správný vývoj osemení.

DMACA barvením se zabarvilo od každého genotypu (NF 3308 *wild type* nebyl testován) minimálně 50 % semen. Podle Verdier a kol. (2011) inserce v *PAR* genu vede ke snížené akumulaci extrahovatelných/rozpustných proatokyanidinů v osemení. Výsledkem barvení jsou nepatrně světleji zabarvená *wild type* semena, což odpovídá publikaci. Možným důvodem, proč jsou některá semena neobarvená, je nerovnoměrná vyzrállost semen, případně vzácně se vyskytující cizosprašení.

Všechny následující linie byly objednány přímo ze The Samuel Roberts Noble Foundation, Inc. (Oklahoma, USA). Linie byly vybrány na základě publikací: Pang a kol., 2013 (*UDP-Glu*, NF 1263), Liu a kol., 2014 (*Myb-5*, NF 13006), dále se vybrala podobná



linie k Zhao a Dixon, 2009 (*MATE1*, NF 12661) a nově se vybraly *laccase-14* mutant (NF 0679) a *tt8* mutant (NF 17248), publikované zatím jen u *Arabidopsis*. Vzhledem ke smluvním podmínkám daných ve Standard Material Transfer Agreement (SMTA) není možné získat již analyzované linie přímo od autorů, je potřeba provést vždy vlastní identifikaci a analýzu segregujícího materiálu z poskytnutých 20 semen dané mutantní linie (většinou R1 generace).

Z linie NF 12661 s předpokládanou inzercí v *MATE1* genu se podařily všechny vypěstované rostliny identifikovat jako mutantní (homozygotní i heterozygotní). Osekvenoval se úsek genomové DNA s *forward* primerem, díky čemuž bylo identifikováno přesné místo inserce. U heterozygotního semene se provedla analýza skenovacím elektronovým mikroskopem a fenotyp odpovídal *wild type* osetení.

U linie NF 13006 s předpokládanou inzercí v *Myb5* genu se vypěstovaly mutované i *wild type* rostliny pro daný gen a sekvenováním vybraného úseku se určilo přesné místo inserce, které se shoduje se schématem v publikaci Liu a kol. (2014). Analyzováním pod skenovacím elektronovým mikroskopem byly zjištěné podobné fenotypové projevy jako u *par* mutantů s rozdílem v uspořádání papil, které je zde rovnoměrné u homozygotního mutantu a ne u *wild type*. Pro vysvětlení jiného uspořádání papil u *wild type* by bylo nutné provést širší analýzu na více semenech. Stejně jako PAR i Myb5 transkripční faktor je dle výsledků nedílnou součástí vývoje osetení, ale na rozdíl od PAR neovlivňuje samotné uspořádání papil. Podle publikace Liu a kol. (2014) tento transkripční faktor více ovlivňuje tvorbu slizovitého obalu spíše než akumulaci proantokyanidinů, což může být vysvětlením pro odlišný projev růstu papil u homozygotních mutantů na rozdíl od *par* mutantů. Zároveň červená barva semen odpovídá publikaci, podle které se inzercí ovlivňuje antokyanový represor.

S předpokládanou inzercí v *laccase-14* genu se objednala linie NF 0679. U této linie se sice vypěstovaly i mutantní rostliny, ale žádná homozygotní, proto se daná mutace neprojevila na fenotypu. Osekvenováním úseku s inzercí, se ale osekvenovalo pouze přibližně 700 bází od místa hybridizace *forward* primeru, což nedosahovalo k místu inserce retrotranspozonu. Primery pro retrotranspozon se navrhly oba přibližně 700 bází od konců retrotranspozonu, tudíž se touto cestou místo inserce nedalo zjistit. Internetové stránky The Samuel Roberts Noble Foundation poskytují referenční sekvence, které z jedné strany hraničí s místem inserce. Přesné místo inserce bylo určeno pomocí vylučovací metody s osekvenovaným úsekem, referenční sekvencí a přibližnou délkou produktu získanou elektroforézou. Pod elektronovým mikroskopem byly pozorovány

vystouplé papily s mezerami, rovnoměrně uspořádanými, ale se zřetelným propojením hřbety. Opět pro vysvětlení propojení papil u heterozygotního mutantu, by bylo nutné provést širší analýzu na více semenech.

Linie NF 1263 se zájmovým genem *UDP-Glukosyltransferazy* se objednala podle publikace Pang a kol. (2014) i s autory navrženými primery. Vzhledem k získání nesmyslných výsledků z PCR amplifikace a elektroforézy se provedla bioinformatická analýza primerů z publikace, za zjištění, že publikovaný F primer neodpovídá žádnému místu v oblasti genu. K R funkčnímu primeru se navrhnul nový F primer, díky kterému se identifikovaly některé vypěstované rostliny jako mutantní, i když jen heterozygotní. Pozdější bioinformatickou analýzou se zjistilo, že původní F primer, který nehybridizoval s genem, odpovídá *Tnt1* retrotranspozonu. Autor publikace pravděpodobně zaměnil sekvence při vypisování seznamu primerů.

Pod skenovacím elektronovým mikroskopem struktura osemení jevila provazcovité vzory se slabými propojeními hřbety. Podle publikace Pang a kol. (2013) je *UDP-Glu* gen negativním regulátorem pro akumulaci rozpustných proantokyanidinů, naopak úroveň nerozpustných se nepatrně zvyšuje. Z toho bylo vyvozeno, že DMACA barvením by měly být *wild type* semena světlejší než homozygotní a fenotyp nebarvených semen bez větších rozdílů. DMACA barvením se barvila pouze *wild type* semena a k obarvení došlo u 25 %. K potvrzení výsledků z publikace by byla nutná analýza homozygotních semen. Důvody proč jsou některá semena neobarvená, to znamená, nejeví známky akumulace rozpustných proantokyanidinů, jsou zmíněny již u *PAR* výsledků.

Poslední linie NF 17248 s předpokládanou inzercí v genu *TT8* byla po vypěstování analyzována a nenašla se žádná inzerce v zájmovém genu i po opakovaném testování i navržením dalších F a R primerů. Sada vyšetřovaných semen byla tedy identifikována jako bez inzertu. Dalším vysvětlením by mohlo být, že mutantní rostliny nejsou životaschopné, neboť na začátku vyklíčilo 10 semen, ale ze semenáčků vyrostly pouze 4. Podle publikace Baudry a kol. (2006) inzercí v genu u *Arabidopsis* dojde pouze ke snížení akumulace proantokyanidinů a zejména tvorby slizovitého obalu.

Semena se od každé rostliny DMACA barvila a pouze 19 % bylo s pozitivní reakcí tedy s akumulací rozpustných proantokyanidinů. Většina semen se neobarvila, což mohou vysvětlovat výše zmíněné faktory: nedozrálá semena a cizosprašnost.

Fenotypová data v souvislosti s genotypem jsou důležitá pro pochopení funkce genu, ale i jeho interakce s geny jinými. Touto prací se navázalo na výsledky prací, které potvrzují úzký vztah některých článků proantokyanidinové metabolické dráhy na výsledný

fenotyp osemení a i vztah jednotlivých genů k ukládání rozpustných proantokyanidinů v osemení. Nově získaná data o umístění retrotranspozonu je možné zařadit do databází, což napomůže budoucímu výzkumu této problematiky.

## 9 ZÁVĚR

Tato práce se zaměřila na shrnutí metod mutagenese v rámci funkční genomiky, tedy určování funkce genů. Dále se zaměřila také na využití *Medicago truncatula* jakožto modelového druhu luskovin a studium proantokyanidinové dráhy se souhrnem dosavadních výsledků výzkumu funkce a interakce vybraných genů proantokyanidivé dráhy *Medicago truncatula*, případně *Arabidopsis thaliana*, pokud tyto geny ještě nebyly u *Medicago* studovány. Hlavním cílem práce bylo: identifikace přesného místa inserce retroelementu a získání homozygotních mutantních linií pro studium vlivu PAs na strukturu a funkci osemení v kontextu s fyzikálním typem dormance.

Vlastním výzkumem se analyzovalo osm linií tolíce s předpokládanou insercí *Tnt1* retrotranspozonu v zájmovém genu proantokyanidinové metabolické dráhy. U sedmi linií mimo NF 17248 se identifikovalo přesné místo inserce. U linií, kde byli získáni mutanti s insercí v daném genu v homozygotní konstituci a v dostatečném množství semen, se identifikovaly zřetelné rozdíly ve fenotypu osemení od *wild type* nebo heterozygotních semen. Všechny tyto výsledky popisu fenotypu jsou předběžné a budou dále studovány s větším dostupným množstvím semen.

Vliv na vývoj osemení byl potvrzen u genu *PAR*, a to u všech třech mutantních linií, a u genu *Myb5*. U dalších linií buď nebyli získáni homozygotní mutanti, nebo se nezískalo dostatečné množství semen. Linie NF 17248 je možná letální v homozygotním stavu, protože z původních deseti rostlin se dožily dospělosti jen čtyři a všechny se potvrdily jako *wild type*.

Práce poskytuje úvod do výzkumu interakcí a funkcí genů proantokyanidinové metabolické dráhy, která se stala studovaným tématem díky pozitivnímu vlivu proatokyanidinů na zdraví, ale i díky svému vlivu na vývoj osemení a s tím spojenou dormancí.

## 10 SEZNAM ZKRATEK

ABA	<i>Abscisic acid</i>
Ac	<i>Activator</i>
AHA10	<i>Autoinhibited H(+)-ATPase isoform 10</i>
ANR	<i>Anthocyanidin reductase</i>
AP	<i>Alkaline phosphatase</i>
AP/EXO	<i>Alkaline phosphatase/exonuclease</i>
Arg	<i>Arginine</i>
Asn	<i>Asparagine</i>
AT	<i>Adenine thymine</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BAN	<i>BANYULS</i>
bHLH	<i>Basic helix–loop–helix</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	<i>Base pair</i>
C	<i>Carbon</i>
Cas	<i>CRISPR associated associated-based RNA-guided DNA endonuclease</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CEL I	<i>Celery endonuclease I</i>
CRISPR	<i>Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats</i>
CT	<i>Cytosine thymine</i>
DAP	<i>Days after pollination</i>
<i>Ds</i>	<i>Dissociation</i>
DMACA	<i>p-Dimethylaminocinnamaldehyde</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EMS	<i>Ethyl methanesulfonate</i>
ESTs	<i>Expressed sequence tags</i>
ENVs	<i>Endogenous retroviruses</i>
EXO	<i>Exonuclease</i>

F	<i>Forward</i>
GA	<i>Gibberellic acid</i>
g-DNA	<i>Genome DNA</i>
GFP	<i>Green fluorescein protein</i>
Gln	<i>Glutamine</i>
Glu	<i>Glutamic acid</i>
GTs	<i>Glucosyltransferase</i>
GUS	<i><math>\beta</math>-Glucuronidase</i>
HCl	<i>Hydrogen chloride</i>
He	<i>Heterozygot</i>
Ho	<i>Homozygot</i>
LINES	<i>Long interspersed nuclear elements</i>
LaB <sub>6</sub>	<i>Lanthanum hexaboride</i>
LTR	<i>Long terminal repeats</i>
MATE	<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
MITEs	<i>Miniature inverted repeat elements</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MYB	<i>Myeloblastosis</i>
NF	<i>Noble Foundation</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NOS	<i>Nopaline synthase</i>
PAs	<i>Proanthocyanidins</i>
PAP	<i>Poly(A) polymerase</i>
PAR	<i>Proanthocyanidin regulator</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	<i>Potential of hydroge/pondus hydrogenia</i>
Pol	<i>Polymerase</i>
<i>Poly(A)</i>	<i>Polyadenin</i>
qPCR	<i>Quantitative PCR</i>
R	<i>Reverse</i>
R1	<i>Progeny populations/firts selfed generations</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

RNAi	<i>RNA interference</i>
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
SINEs	<i>Short interspersed nuclear elements</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
smRNA	<i>Small RNA</i>
TALENs	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>Tris-Borate-EDTA</i>
TC	<i>Thymine cytosine</i>
T-DNA	<i>Transferred DNA</i>
TILLING	<i>Targeting induced local lesions in genomes</i>
Ti plasmid	<i>Tumour inducing plasmid</i>
TIRs	<i>Terminal inverted repeats</i>
TTG1	<i>Transparent testa glabra 1</i>
TT	<i>Transparent testa</i>
Tyr	<i>Tyrosine</i>
TM	<i>TradeMark</i>
<i>Tnt1</i>	<i>Transposable element of Nicotiana tabacum cell type1</i>
UGT/UDP-Glu	<i>Uridine diphosphate glucosyltransferase</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
VIGS	<i>Virus induced gene silencing</i>
WDR	<i>Tryptophan aspartic acid repeat</i>
Wt	<i>Wild type</i>
ZNFs	<i>Zing finger nucleases</i>

# 11 LITERATURA

ABRAHAM S., LEE E., WALKER A. R., TANNER G. J., LARKIN P. J., ASHTON A. R. (2003) The *Arabidopsis* TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant J.*, **35**, 624–636.

AHLOOWALIA B. S., MALUSZYNSKI M. (2001) Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, **118**, 167–173.

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. (2002) Studying Gene Expression and Function. In: *Molecular Biology of the Cell*, 4. ed. New York: Garland Science. ISBN -10: 0-8153-4072-9.

AMSTERDAM A., BURGESS S., GOLLING G., CHEN W., SUN Z., TOWNSEND K., FARRINGTON S., HALDI M., HOPKINS N. (1999) A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes and Dev.*, **13**, 2713-2724.

ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815.

AUERBACH CH. (1973) History of Research on Chemical Mutagenesis. *Chemical mutagens*, **3**, 1–19.

BASKIN J. M., BASKIN C. C. (2000) Taxonomy, anatomy and 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**, 1–16.

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

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

BENEDITO V. A., TORRES-JEREZ I., MURRAY J. D., ANDRIANKAJA A., ALLEN S., KAKAR K., WANDREY M., VERDIER J., ZUBER H., OTT T., MOREAU S., NIEBEL A., FRICKEY T., WEILLER G., HE J., DAI X., ZHAO P. X., TANG Y.,



UDVARDI M. K. (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.*, **55**, 504-513.

BERTRAND T., JOLIVALT C., BRIOZZO P., CAMINADE E., JOLY N., MADZAK C., MOUGIN C. (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*, **41**, 7325–7333.

BEUTLER B., DU X., HOEBE K. (2003) From Phenomenon to Phenotype and from Phenotype to Gene: Forward Genetics and the Problem of Sepsis. *J. Infect. Dis.*, **187**, 321–326.

BEWLEY J. D. (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, **9**, 1055–1066.

BLOOR S. J. (1997) Blue flower colour derived from flavonol: anthocyanin copigmentation in *Ceanothus papillosus*. *Phytochemistry*, **45**, 1399–1405.

BOUMA J. (1967) New variety of spring barley “Diamant” in Czechoslovakia. In: Induzierte Mutationen und ihre Nutzung, Erwin Baur Gedächtnisvorlesungen IV, Abh. Dt. Akad. Wiss. Berl., Akademie, Berlin, **2**, 177–182

BRUGGEMANN E., HANDWARGER K., ESSEX C., STORZ G. (1996) Analysis of fast neutron-generated mutants at the *Arabidopsis thaliana* HY4 locus. *Plant J.*, **10**, 755–760.

BUCKERIDGE M. S., SANTOS H. P. TINÉ M. A. S. (2000) Mobilisation of storage cell wall polysaccharids in seeds. *Plant Physiol. Biochem.*, **38**, 141–156.

CHABAUD M., LICHTENZVEIG J., ELLWOOD S., PFAFF T., JOURNET E. P. (2006) Vernalization, crossings and testing for pollen viability. In: The *Medicago truncatula* handbook. ed. Mathesius U., Journet E. P., Sumner L. W. ISBN 0-9754303-1-9.

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

COLBERT T., TILL B. J., TOMPA R., REYNOLDS S., STEINE M. N., YEUNG A. T., MCCALLUM C. M., COMAI L., HENIKOFF S. (2001) High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.*, **126**, 480–484.

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

COOK D. R., VANDENBOSCH K., DE BRUIJN F. J., HUGUET T. (1997) Model legumes get the nod. *Plant Cell*, **9**, 275–280.

DEHON L., MACHEIX J. J., DURAND M. (2002) Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. *J. Exp. Bot.*, **53**, 303–311.

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

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

DJEMEL N., GUEDON D., LECHEVALIER A., SALON C., MIQUEL M., PROSPERI J. M., ROCHAT C. BOUTIN J. P. (2005) Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiol. Biochem.*, **43**, 557–66.

FALK R. (2010) Mutagenesis as a Genetic Research Strategy. *Genetics*, **185**, 1135–1139.

FARIA J. M. R., BUITINK J., VAN LAMMEREN A. A. M., HILHORST H. W. M (2005) Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *J. Exp. Bot.*, **56**, 2119-2130.

FINCH-SAVAGE W. E., LEUBNER-METZGER G. (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.*, **171**, 501–523.

FLAVELL R. (2009) Role of Model Plant Species. *Methods Mol. Biol.*, **513**, 1–18.

FORSTER B. F., SHU Q. Y. (2011) Plant Mutagenesis in Crop Improvement: Basic Terms and Applications. In: *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. ed. Shu Q. Y., Forster B. P., Nakagawa H. FAO. ISBN 978-92-5-105000-0.

FRUGOLI J. AND HARRIS J. (2001) *Medicago truncatula* on the move. *Plant Cell*, **13**, 458–463.

GAJ T., MERCER A. C., GERSBACH C. A., GORDLEY R. M., BARBAS III. C. F. (2011) Structure-guided reprogramming of serine recombinase DNA sequence specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 498–503.

GAJ T., GERBACH C. A., BARBAS C. F. (2013) ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.*, **31**, 397–405.

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 Physiol.*, **133**, 664–82.

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

GARCIA J., DAVID G., JOURNET B., JOURNET E. P. (2006) Seed storage and germination. In: The *Medicago truncatula* handbook. ed. Mathesius U., Journet E. P., Sumner L. W. ISBN 0-9754303-1-9.

GERSBACH C. A., GAJ T., GORDLEY R. M., MERCER A. C., BARBAS III. C. F. (2011) Targeted plasmid integration into the human genome by an engineered zinc-finger recombinase. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7868–7878.

GOFF S.A., CONE K.C. AND CHANDLER V.L. (1992) Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev.*, **6**, 864–875.

GRAHAM P. H., VANCE C. P. (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.*, **131**, 872–877.

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

GUHLIN J. (2015) *Medicago truncatula* HapMap Project. Online databáze [cit. 2016-22-02]. Dostupné z: <http://www.medicagohapmap.org/>

HANAN J., BUCCIARELLI B., VANCE C. P. (2006) Sharing phenotypic data: A coding system and a developmental model. In: The *Medicago truncatula* handbook. ed. Mathesius U., Journet E. P., Sumner L. W. ISBN 0-9754303-1-9.

HE F., PAN Q. H., SHI Y., DUAN C. Q. (2008) Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Molecules*, **13**, 2674–2703.

HEFNER T., AREND J., WARZECHA H., SIEMS K., STOCKIGT J. (2002) Arbutin synthase, a novel member of the NRD1-beta glycosyltransferase family, is a unique multifunctional enzyme converting various natural products and xenobiotics. *Bio. Org. Med. Chem.*, **10**, 1731–1741.

INTERNATIONAL RICE GENOME SEQUENCING PROJECT (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, **436**, 793-800.

JACK T. (2002) T-DNA Generated Enhancer Traps in Arabidopsis. Online [cit. 2016-22-02]. Dostupné z: <http://www.dartmouth.edu/~tjack/et.html#T-DNA>  
Generated

JEFFERSON E. A., KAVANAGH T. A., BEVAN M. W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, **6**, 3901–3907.

KAIN S. R., ADAMS M., KONDEPUDI A., YANG T. T., WARD W. W., KITTS P. (1995) Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques*, **19**, 650-655.

KHARKWAL M. C. (2011) *A Brief History of Plant Mutagenesis*. In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology. ed. Shu Q. Y., Forster B. P., Nakagawa H. FAO. ISBN 978-92-5-105000-0.

KIDWELL M. G. (2005) Transposable elements. In: The Evolution of the Genome. ed. Gregory T. R. Elsevier Inc. ISBN 0-12-301463-8.

KIM Y., SCHUMAKER K. S., ZHU J. K. (2006) EMS Mutagenesis of *Arabidopsis*. *Methods in Mol. Biol.*, **323**, 101–103.

KOORNNEEF, M. DELLAERT L. W. M., VAN DER VEEN J. H. (1982) EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Heynh. Mutat. Res.*, **93**, 109–123.

KRISHNAKUMAR V., KIM M., ROSEN B. D., KARAMYCHEVA S., BIDWELL S. L., TANG H., TOWN C. D. (2014) MRGD: The *Medicago truncatula* Genome Database. *Plant and Cell Physiol.*, **56**, e1.

KUMAR A., BENNETZEN J. L. (1999) Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 479–532.

LEE S., COSTANZO S., JIA Y. (2011) The Structure and Regulation of Genes and Consequences of Genetic Mutations. In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology. ed. Shu Q. Y., Forster B. P., Nakagawa H. FAO. ISBN 978-92-5-105000-0.

LEPINIEC L., DEBEAUJON I., ROUTABOUL J. M., BAUDRY A., POURCEL L., NESI N., CABOCHE M. (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 405–430.

LESINS K. A. LESINS I. (1979) A taxogenetic study. In: Genus *Medicago* (Leguminosae). The Hague Boston London. ISBN-13: 978-94-009-9636-6.

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.

LIU CH., JUN J. H., DIXON R. A. (2014) MYB5 and MYB14 play pivotal roles in seed coat polymer biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, **165**, 1424–1439.

LODISH H., BERK A., ZIPURSKY S. L., MATSUDAIRA P., BALTIMORE D., DARNELL J. (2000) *Molecular Cell Biology, Mutations: Types and Causes*. 4. ed. New York: W. H. Freeman. ISBN-10: 0-7167-3136-3.

MARBACH I., MAYER A. M. (1974) Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. *Plant Physiol.*, **54**, 817–820.

MARINOVA K., POURCEL L., WEDER B., SCHWARZ M., BARRON D., ROUTABOUL J. M., DEBEAUJON I., KLEIN M. (2007) The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H<sup>+</sup> antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *Plant Cell*, **19**, 2023–2038.

MAYER A. M., STAPLES R. C. (2002) Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, **60**, 551–565.

MCCALLUM C. M., COMAI L., GREENE E. A., HENIKOFF S. (2000) Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* **123**, 439–442.

McCLINTOCK, B. (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **36**(6), 344–355.

MESSERSCHMIDT A., HUBER R. (1990) The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin — Modelling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.*, **187**, 341–352.

MOREAU D. (2006) Morphology, development and plant architecture of *M. truncatula*. In: *The Medicago truncatula handbook*. ed. Mathesius U., Journet E. P., Sumner L. W. ISBN 0-9754303-1-9.

MULLER, H. J. (1922) Variation due to change in the individual gene. *Amer. Natur.* **56**, 32–50.

MULLER, H. J. (1927) Artificial transmutation of the gene. *Science*. **66**, 84–87.

NESI N., JOND C., DEBEAUJON I., CABOCHE M., LEPINIEC L. (2001) The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell*, **13**, 2099–2114.

NOVAK F. J., BRUNNER H. (1992) Plant breeding: Induced mutation technology for crop improvement. *IAEA BULLETIN*. **34**, 25–33.

OLEYKOWSKI C. A., BRONSON MULLINS C. R., GODWIN A. K., YEUNG A. T. (1998) Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4597–4602.

OSAKABE K., ENDO M., TOKI S. (2011) Double-Stranded DNA Break, Repair and Associated Mutations. In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology. ed. Shu Q. Y., Forster B. P., Nakagawa H. FAO. ISBN 978-92-5-105000-0.

OSAKABE K., SAIKA H., OKUZAKI A., TOKI S. (2011) Site-Directed Mutagenesis in Higher Plants. In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology. ed. Shu Q. Y., Forster B. P., Nakagawa H. FAO. ISBN 978-92-5-105000-0.

PANG Y., PEEL G. J., WRIGHT E., WANG Z. Y., DIXON R. A. (2007) Early steps in proanthocyanidin biosynthesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, **145**, 601–615.

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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14210–14215.

PANG Y., WENGER J. P., SAATHOFF K., PEEL G. J., WEN J., HUHMANN D., ALLEN S. N., TANG Y., CHENG X., TADEGE M., RATET P., MYSORE K. S., SUMNER L. W., MARKS M. D., DIXON R. A. (2009) A WD40 repeat protein from *Medicago truncatula* is necessary for tissue-specific anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis but not for trichome development. *Plant Physiol.*, **151**, 1114–1129.

PANG Y., CHENG X., HUHMANN D. V., MA J., PEEL G. J., YONEKURA-SASAKIBARA K., SAITO K., SHEM G., SUMNER L. W., TANG Y., WEN J., YUN J., DIXON R. A. (2013) *Medicago* glucosyltransferase UGT72L1: potential roles in proanthocyanidin biosynthesis. *Planta.*, **238**, 139–154.

PEEL G. J., DIXON R. A. (2007) Detection and quantification of engineered proanthocyanidins in Transgenic plants. *Nat. Prod. Commun.*, **2**:1009–1014

PENMETSA R. V., COOK D. R. (2000) Production and characterization of diverse developmental mutants of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, **123**, 1387-1397.

PLANTGDP (2015) LjGDP. Online database [cit. 2016-22-02]. Dostupné z: <http://www.plantgdb.org/LjGDB/>

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

PUCHTA, H., B. DUJON, AND B. HOHN (1996) Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5055–5060.

ROE B. (2011) Sequencing *Medicago truncatula* Cultivar Jemalong A17 at the University of Oklahoma. Online [cit. 2016-22-02]. Dostupné z: <http://www.genome.ou.edu/medicago.html>

SANGWANA R. S., OCHATTB S., NAVA-SAUCEDOA J. E., SANGWAN-NORREELA B. (2011) T-DNA Insertion Mutagenesis. In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology. ed. Shu Q. Y., Forster B. P., Nakagawa H. FAO. ISBN 978-92-5-105000-0.

SATO S., NAKAMURA Y, KANEKO T., ASAMIZU E., KATO T., NAKAO M., SASAMOTO S., WATANABE A., ONO A., KAWASHIMA K., FUJISHIRO T., KATOH M., KOHARA M., KISHIDA Y., MINAMI C., NAKAYAMA S., NAKAZAKI N., SHIMIZU Y., SHINPO S., TAKAHASHI C., WADA T., YAMADA M., OHMIDO N., HAYASHI M., FUKUI K., BABA T., NAKAMICHI T., MORI H., TABATA S. (2008) Genome Structure of the Legume, *Lotus japonicus*. *DNA res.*, **15**, 227–239.

SCHELL J., VAN MONTAGU M. (1977) The Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*, a natural vector for the introduction of *nif* genes in plants? *Basic life sci.*, **9**, 159–79.

SCHENK R. U., HILDEBRANDT A. C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, **50**, 199–204.

SCHMUTZ J., CANNON S. B., SCHLUETER J. MA J. a kol. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, **463**, 178–183.

SIKORA P., CHAWADE A., LARSSON M., OLSSON J., OLSSON O. (2011) Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *Inter. Journ. Pl. Gen.*, **2011**, 1–13.

SMÝKAL P., VERNOUD V., BLAIR M. W., SOUKUP A., THOMPSON R. D. (2014) The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Front. Plant Sci.*, **5**, 351.

SMÝKAL P., COYNE C., AMBROSE M. J., MAXTED N., SCHAEFER H., BLAIR M. W., BERGER J., GREENE S. L., NELSON M. N., BESHARAT N., VYMYSLICKÝ T., TOKER C., SAXENA R. K., ROORKIWAL M., PANDEY M. K., HU J., LI Y. H., WANG L. X., GUO Y., QIU L. J., REDDEN R. J., VARSHNEY R. K.

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

STADLER L. J. (1928) Mutations in barley induced by X-ray and radium. *Science*, **68**, 186–187.

SUPRASANNA P. A NAKAGAWA H. (2011) Mutation Breeding of Vegetatively Propagated Crops. In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology. ed. Shu Q. Y., Forster B. P., Nakagawa H. FAO. ISBN 978-92-5-105000-0.

TADEGE M., RATET P., MYSORE K. S. (2005) Insertional mutagenesis: a Swiss Army knife for functional genomics of *Medicago truncatula*. *Trends Plant Sci.*, **10**, 229–235.

TADEGE M., WEN J., HE J., TU H., KWAK Y., ESCHSTRUTH A., CAYREL A., ENDRE G., ZHAO P. X., CHABAUD M., RATET P., MYSORE K. S. (2008) Large-scale insertional mutagenesis using the *Tnt1* retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.*, **54**, 335-347.

TANG H., KRISHNAKUMAR V., BIDWELL S., ROSEN B., CHAN A., ZHOU S., GENTZBITTEL L., CHILDS K. L., YANDELL M., GUNDLACH H., MAYER K. F. X., SCHWARTZ D. C., TOWN C. D. (2014) An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*, **15**, 312.

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. *J. Biol. Chem.*, **278**, 31647–31656.

THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION, INC. (2014) *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas. Online databáze [cit. 2016-23-02] Dostupné z: <http://mtgea.noble.org/v3/>

THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION, INC. (2016) *Medicago truncatula* mutant database. Online databáze [cit. 2016-22-02] Dostupné z: <http://medicago-mutant.noble.org/mutant/>

THOMPSON R., BURSTIN J., GALLARDO K. (2009) Post-Genomics Studies of Developmental Processes in Legume Seeds. *Plant Physiol.*, **151**, 1023–1029.

TOHGE T., NISHIYAMA Y., HIRAI M.Y., NAKAJIMA J., AWAZUHARA M., INOUE E., HIDEKI TAKAHASHI H., DAYAN B. GOODENOWE D. B., MASAHIKO KITAYAMA M., MASAOKI NOJI M., MAMI YAMAZAKI M., KAZUKI SAITO K.



(2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants overexpressing an MYB transcription factor. *Plant J.*, **42**, 218–235.

VELÁSQUEZ A. C., CHAKRAVARTHY S., MARTIN G. B. (2009) Virus-induced Gene Silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *J Vis. Exp.*, **28**, 1292.

VERDIER J., ZHAO J., TORRES-JEREZ I., GE S., LIU CH., HE X., MYSORE S., DOXIN R. A., UDVARDI M. K. (2011) MtPAR MYB transcription factor acts as an on switch for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1766–1771.

WOLF W. J. (1977) Legumes: Seed Composition and Structure, Processing into Protein Products and Protein Properties. In: Food Proteins. ed. Whitaker J. R., Tannenbaum S. R. AVI Publishing Co., Inc, Westport, Connecticut. ISBN 10:0870552309.

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**, 396–399.

YANT S. R., HUANG Y., AKACHE B., KAY M. A. (2007) Site-directed transposon integration in human cells. *Nucleic Acids Res.*, **35**, e50.

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

ZHANG Q., ARBUCKLE J., WESSLER S. R. (2000) Recent, extensive, and preferential insertion of members of the miniature inverted-repeat transposable element family Heartbreaker into genic regions of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1160–1165.

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

ZHU Q. H., UPADHYAYA N. HELLIWELL C. (2011) Transposon Mutagenesis for Functional Genomics. In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology. ed. Shu Q. Y., Forster B. P., Nakagawa H. FAO. ISBN 978-92-5-105000-0.