

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2016

Tereza Vojtková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza genové exprese během vývoje osemení
planého a kulturního hrachu (*Pisum sp.*).**

Bakalářská práce

Tereza Vojtková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

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

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

V Olomouci

Tereza Vojtková

Souhrn

Proces postupné přeměny z planých na kulturní formy rostlin (domestikace) se projevil v morfologických změnách (domestikační syndrom) zahrnující znaky jako: zvýšení počtu semen, změny velikosti a tvaru semen, zlepšení fertility a klíčivosti, změny v architektuře rostlin, zmenšení dormance, omezení vypadávání semen, změny v době kvetení, eliminace toxických nebo inhibujících látek, pigmentů semen apod.

Během procesu domestikace hrachu byla odstraněna dormance semen, umožňující příjem vody a klíčení semen. Mechanismus řídící tento proces je zprostředkován anatomickou strukturou a chemickým složením osemení. Je pravděpodobné, že exprese genů během vývoje osemení je jedním z rozhodujících faktorů. Analýza genové exprese (transkriptomika) je důležitou metodou vedoucí k pochopení funkce genů. Práce si klade za cíl provést srovnávací transkriptomickou analýzu vybraných genů během vývoje semene planých a kulturních forem hrachu (*Pisum sativum* L.).

Summary

The process of progressive conversion from wild plants to cultured forms of plants (domestication) has been reflected in changes (domestication syndrome) including traits: increase in the number of seeds, changes in the size and shape of seeds, improvement of fertility and germination, changes in the architecture of plants, reduction of dormancy, loss of seeds shattering, changes in flowering time, elimination of toxic substances, seed pigments etc.

During the process of pea domestication the seed dormancy was removed, allowing water intake and seed germination. The mechanism governing this process is mediated by anatomical structure and chemical composition of seed coat. It is likely that gene expression during the seed coat development is one of the crucial factors. The analysis of gene expression (transcriptomics) is an important method leading to gene function comprehension. This work aims to accomplish a comparative transcriptomical analysis of selected genes during the seed development of wild and cultivated forms of pea (*Pisum sativum* L.).

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za odborné vedení a vstřícný přístup. Mé obrovský díky patří také Mgr. Ivetě Hradilové za odbornou pomoc a cenné rady v průběhu celé práce.

Tato práce byla prováděna a financována v rámci projektu Grantové agentury České republiky č. 14-11782S „Dormance semen a pukavost lusků jako klíčové domestikační znaky luskovin“.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Vývoj semene a osemení	9
2.1	Embryo.....	9
2.2	Endosperm a perisperm.....	9
2.3	Osemení.....	10
2.4	Vývoj semene.....	12
3	Dormance.....	13
3.1	Klasifikace dormance.....	14
4	Biosyntetická dráha proanthokyanidinů v osemení.....	15
5	Transkriptomika během vývoje semen a osemení bobovitých.....	20
5.1	Charakteristika genomu hrachu.....	20
5.2	Transkriptomické analýzy semen bobovitých rostlin.....	20
6	Materiál a metody.....	23
6.1	Rostlinný materiál.....	23
6.2	Odběr vzorků.....	23
6.3	Laboratorní vybavení.....	23
6.4	Chemikálie a roztoky.....	24
6.5	Izolace RNA.....	24
6.6	Měření koncentrace RNA.....	25
6.7	Odstranění zbytkové DNA.....	25
6.8	Reverzní transkripce (RT-PCR).....	25
6.9	Amplifikace vybraných genů.....	27
6.10	Kvantitativní real-time PCR.....	27
6.11	Gelová elektroforéza.....	28
7	Výsledky.....	29
8	Diskuze.....	37
9	Závěr.....	39
10	Seznam zkratk.....	40
11	Reference.....	41

1 Úvod

Hrách (*Pisum* sp.) byl modelovým objektem genetických analýz již před prací J.G. Mendela (Smýkal, 2014), ale především vzhledem k velikosti genomu byl nahrazen jinými modelovými organismy.

Hrách patří mezi významné zemědělské plodiny. Jeho semena jsou důležitou součástí lidské výživy, hlavně kvůli vysokému obsahu proteinů. Kulturní hrách během dějin prošel procesem domestikace, v rámci čehož došlo mimo jiné ke ztrátě dormance semen. Semena kulturních forem se tak vyznačují mnohem úspěšnější klíčivostí. Je to způsobeno změnou ve struktuře osemení – u planých forem je výrazně tlustší a hůře propustné pro vodu.

Plané a některé kulturní formy se vyznačují pigmentací semen, která je způsobena akumulací proanthokyanidinů, derivátů flavonoidů v osemení. Vzhledem k jejich inhibičnímu vlivu na proces trávení byly v procesu domestikace odstraněny. Tyto látky jsou rovněž významné z hlediska výživy (mají antioxidační vlastnosti), uvažuje se však i o jejich roli v dormanci semen. V bakalářské práci bylo vybráno 5 genů zapojených do biosyntetické dráhy proanthokyanidinů a byla u nich provedena srovnávací analýza jejich exprese pomocí kvantitativní real-time PCR. Kvantitativní real-time PCR je modifikací klasické PCR, která měří nárůst množství produktů v reálném čase. Relativní kvantifikace byla vypočítána pomocí metody $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Bylo testováno osemení čtyř různých genotypů hrachu, dva zástupci kulturního (*Pisum sativum* subsp. *sativum*) a dva planého (*Pisum sativum* subsp. *elatius*).

2 Vývoj semene a osemení

Semena krytosemenných rostlin vznikají na základě procesu dvojitého oplození. Jedna samčí spermatická buňka oplodní samičí vaječnou buňku a vznikne tak embryo, druhá spermatická buňka splyne s diploidním jádrem zárodečného vaku za vzniku triploidního jádra, které dává základ endospermu. Semeno se pak obvykle skládá z embrya, endospermu, perispermu a osemení (Baskin and Baskin, 2000).

2.1 Embryo

Embryo se skládá z embryonální osy a jedné (jednoděložné, Liliopsida) nebo více (dvouděložné, Magnoliopsida) děloh (kotyledonů). U dvouděložných rostlin lze snadno rozpoznat další části tvořící osu embrya – základ kořene (radicula), hypokotyl, na který navazují dělohy, a vzrostný vrchol (apex), na němž je patrný základ vrcholového pupene (plumula) (Bewley *et al.*, 1994). U různých rostlinných druhů se embryo nachází v různém stupni diferenciaci, např. u *Orchideaceae* je zcela nediferencované a naopak u čeledí *Fabaceae* a *Asteraceae* vyplňuje téměř celý vnitřní prostor semene.

Vývoj embrya je započat první mitózou zygoty, při níž vznikají dvě asymetrické buňky – směrem do středu zárodečného vaku je to menší apikální buňka a k mateřskému pletivu v oblasti mikropyle přichycená větší, bazální buňka (Vinter, 2008). Až na výjimky, z apikální buňky vzniká embryo a z bazální buňky vzniká suspenzorový systém a někdy i kořenová čepička. Suspenzorový systém má několik funkcí, hlavně pak transport živin, metabolitů nebo růstových regulátorů z mateřského pletiva k rostoucímu embryu (Romberger *et al.*, 2005). Postupně dochází k diferenciaci a polarizaci embrya, kdy se směrem k suspenzoru diferencuje hypofýza (kořenový pól) a na opačné straně epifýza (stonkový pól). V oblasti přilehlé k epifýze se diferencují základy děloh. Dalším vývojem vzniká plumula, radícula se základem čepičky (kalyptry) a hypokotyl, první podděložní článek (oblast mezi radiculou a místem inzerce děloh). Následně z centrálního meristému vzniká prokambium, jež je základem vodivých pletiv a základní meristém, který pak tvoří primární kůru. Nakonec se v embryu snižuje množství vody, akumulují se zásobní látky, snižuje se metabolická aktivita a embryo dozrává (Vinter, 2008).

2.2 Endosperm a perisperm

Endosperm a perisperm patří mezi zásobní pletiva. Perisperm vzniká z buněk vaječného pletiva nucellu a je, stejně jako nucellus, diploidní. U většiny rostlin se však perisperm buď

vůbec nevyvíjí, nebo se diferencuje na krátce po oplození a zanedlouho zaniká. Výjimkou jsou některé rostliny, např. kaktusy, u nich perisperm zastupuje roli hlavního zásobního pletiva (Bewley *et al.*, 1994). Endosperm je většinou zpočátku triploidní, během svého vývoje se jeho ploidy kvůli polyploidizačním procesům výrazně navyšuje (Chamberlin *et al.*, 1993). Nevyskytuje se však u všech rostlin. Podle jeho přítomnosti se semena dělí na endospermická a neendospermická. Může se také stát, že většina buněk endospermu je na konci svého vývoje neživá. Na jeho vnější straně však zůstává vrstva živých buněk, která produkuje enzymy sloužící k mobilizaci zásobních látek (Bewley *et al.*, 1994).

2.3 Osemení

Osemení tvoří povrch semene a má především ochrannou funkci. U bobovitých se osemení vyvíjí jako první, společně s endospermem, až následně dochází k vývoji embrya (Weber *et al.*, 2005). Je odvozeno od vnějších nebo vnitřních vaječných obalů (integumentů), popř. od obou (Bewley *et al.*, 1994), záleží na konkrétním druhu rostliny. Osemení bobovitých se vyvíjí z obou integumentů. Vnitřní během vývoje téměř zaniká a buňky vnějšího integumentu se diferencují do několika vrstev, které jsou pro strukturu osemení charakteristické. Epidermis vnějšího integumentu je tvořena jednou vrstvou buněk – sklereid (také nazývány makrosklereidy, palisádové buňky nebo Malpighiho buňky). Tyto buňky jsou palisádově uspořádány a mají silně a nepravidelně ztloustlou buněčnou stěnu. Na povrchu jsou pokryté kutikulou. Buněčná stěna na vnější straně buněk epidermis je díky svému tvaru a modifikacím označována jako terminální čepička. Společně s kutikulou a voskovou vrstvou tvoří typickou strukturu povrchu osemení (Smýkal *et al.*, 2014). Rozhraní mezi terminální čepičkou a zbytkem buněčné stěny tvoří linie, která se, díky své schopnosti opticky lámat světlo, nazývá „light line“ (Bhalla and Slattery, 1984) nebo taky *linea lucida* (Smýkal *et al.*, 2014). Právě tato linie je pravděpodobně hlavním faktorem způsobující nepropustnost osemení pro vodu (Harris, 1987). U sóji bylo prokázáno, že kutikula semen, které mají osemení propustné pro vodu, je mechanicky slabá a obsahuje malé trhliny, jimiž může procházet voda. Naopak kutikula semen s osemením nepropustným pro vodu je mechanicky silnější a za normálních podmínek se v ní trhliny netvoří (Ma *et al.*, 2004).

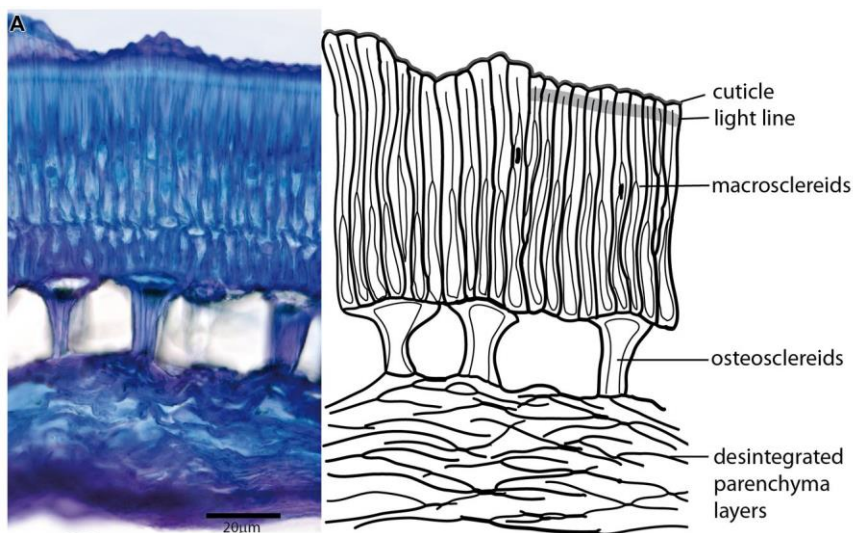
Pod epidermis se nachází vrstva osteosklereid, což jsou buňky charakteristického tvaru přesýpacích hodin nebo také kosti, podle čehož byly nazvány (Smýkal *et al.*, 2014). Mají tlustou buněčnou stěnu, velkou centrální vakuolu, ale, na rozdíl od makrosklereid, jsou mezi nimi velké intercelulární prostory. Nadále však zůstávají spojeny plasmodesmaty (Miller *et al.*, 2010).

Funkcí intracelulárních prostor je pravděpodobně výměna dýchacích plynů při vysoušení semene (Smýkal *et al.*, 2014).

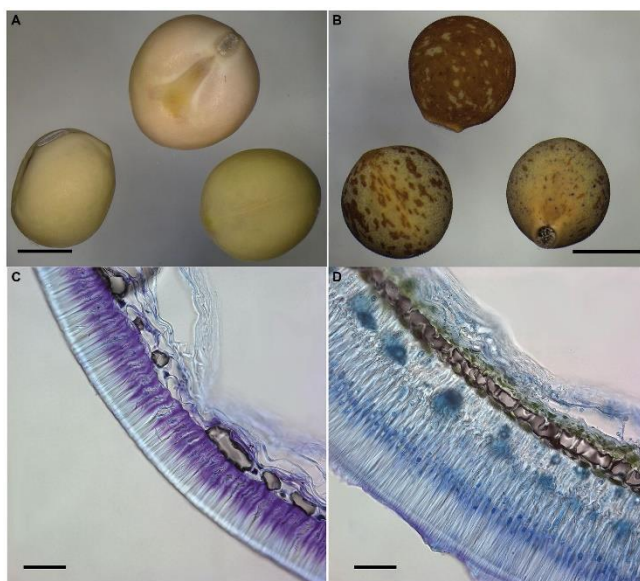
Vnitřní vrstva osemení, někdy nazývána živná vrstva (Hamly, 1932), je složena z parenchymatických buněk. Nachází se zde také cévní systém, který rozvádí produkty fotosyntézy v rámci osemení (Offler and Patrick, 1993). Lze ji ještě rozlišit na tři podvrstvy – chlorchym, spodní parenchym a větvený parenchym. Celá parenchymatická vrstva je charakteristická intercelulárními prostory, největší jsou u větveného parenchymu. Jsou vyplněny buď tekutinou, nebo vzduchem. Chlorchym tvoří velké buňky obsahující chloroplasty a plynule přechází v podobný přízemní parenchym, ve kterém se však nachází méně chloroplastů. Větvený parenchym tvoří malé buňky nepravidelného tvaru. S postupným růstem embrya tyto buňky spolu s nejbližšími vrstvami přízemního parenchymu ustupují (Van Dongen *et al.*, 2003). Živná vrstva nemá souvislost s nepropustností osemení pro vodu, kromě případů, kdy obsahuje větší množství kalózy, která pak částečně brání proniknutí vody (Bhalla and Slattery, 1984).

Na osemení bobovitých nalezneme několik typických oblastí – pupek (hilum), klokový otvor (mikropyle) a semenný šev (raphe), zbytek se označuje jako extrahilární region. Hilum je jizva, která vzniká, jakmile se semeno v době zralosti odtrhne od poutka. Klokový otvor je místo, z kterého při klíčení vyrůstá kořínek. Semenný šev je mírně snížené místo na opačné straně od hilu než se nachází klokový otvor. Zatím nepanuje shoda, zda se tyto tři struktury podílejí na příjmu vody či nikoliv (Ma, *et al.*, 2004).

Obr. č. 1: Struktura osemení bobovitých. Znázorněn příčný řez osemením planého hrachu (*Pisum sativum* subsp. *elatius*; převzato od Smýkal *et al.*, 2014).



Obr. č. 2: Srovnání struktury osemení kulturního a planého hrachu. Vlevo se nachází kulturní forma hrachu, kultivar Cameor, vpravo pak planá forma hrachu, genotyp JI64, u něhož je patrný drsnější (griffy) povrch (převzato od Smýkal *et al.*, 2014)



2.4 Vývoj semene

Vývoj semene, zahrnující růst jak osemení (původem z mateřské rostliny), tak embrya a endospermu bobovitých rostlin, je na genetické i fyziologické úrovni heterogenní (Weber *et al.*, 2005). V první fázi vývoje dochází k buněčnému dělení a expanzi růstu, dále dochází k expanzi zásobních buněk a uložení zásobních látek do nich, což je následováno zráním a vysycháním semene (Bewley *et al.*, 2012). U *Medicago* je první fáze vývoje charakterizována 90% obsahem vody, embryogenezí, tkáňovou diferenciací a také neschopností klíčit. Pro druhou fázi je typický nárůst obsahu sušiny (tedy syntézou zásobních látek) a získání schopnosti klíčit. Poslední fáze je charakterizována výrazným poklesem obsahu vody v semeni, což může změnit zaměření aktivity buněk z těch orientovaných na tvorbu semene na pochody zaměřené na klíčení a růst (Gallardo *et al.*, 2003). U hrachu byly definovány tři fáze růstu semene, oddělené dvěma zpožďujícími se fázemi. První fáze je zaměřena na osemení a endosperm, druhá fáze je spojována s embryem a končí až se závěrem embryogeneze. Do této doby embryo roste díky buněčnému dělení. Třetí fáze je obdobím zrání semene a je typická zvětšováním buněk. Tyto fáze jsou alespoň částečně identické s obecným systémem, který rozděluje vývoj semen na tři části: buněčné dělení, zrání a vysychání (Weber *et al.*, 2005).

Velikost semene je u hrachu stejně jako u ostatních rostlin podmíněna především geneticky, ale s vlivem podmínek prostředí, ve kterých roste mateřská rostlina. Koreluje s velikostí děloh, která je dána počtem jejich buněk. Počet buněk je určován četností buněčných cyklů, což je

regulováno osemením, které produkuje metabolické signály (Weber *et al.*, 1996). Invertázy v buněčné stěně zvyšují hladinu hexózy a hrají roli ve výživě embrya (Weber *et al.*, 2005). Všeobecně jsou invertázy spojovány se zráním a ukládáním zásobních látek (Sturm and Tank, 1999). Jakmile je ukončeno buněčné dělení, embryo se mění z pletiva podobného meristému na vysoce diferencovaný orgán. Tento proces je řízen signální dráhou zahrnující sacharidy, kyselinu abscisovou (ABA) a SnrK1 kinázy (Weber *et al.*, 2005). ABA ovlivňuje zrání semen, nezáleží přitom, jestli je maternálního původu – z osemení, nebo se vytváří v embryu (Frey *et al.*, 2004), u bobovitých však nebyl prokázán přímý vliv maternální ABA na diferenciaci embrya (Weber *et al.*, 2005).

V semenech rostlin čeledi bobovitých dochází k ukládání jak škrobu, tak i proteinů, proto jsou důležitým zdrojem proteinů pro lidi i zvířata. Proteiny jsou syntetizovány v kotyledonech během střední a pozdní fáze vývoje. Aminokyseliny potřebné k jejich syntéze jsou dopravovány floémem do maternálních tkání semene, odkud putují do apoplastu až k symplasticky izolovanému embryu. Syntéza zásobních látek je pak regulována embryem (Golombek *et al.*, 2001). Zásobní proteiny jsou v buňkách kotyledonu uloženy nejprve na vnitřní straně vakuoly, později ji celou vyplňují proteinová tělíska. Vakuolizace a distribuce zásobních proteinových tělísek indikuje stupeň buněčné diferenciaci (Weber *et al.*, 2000). Hlavními zásobními proteiny bobovitých jsou legumin a vicilin (Vitale and Bollini, 1995), výjimkou je sója, u níž jsou hlavními zásobními proteiny conglycinin a glycinin (Kinsella, 1979).

3 Dormance

Aby semeno vyklíčilo, musí na něj působit příznivá kombinace faktorů vnějšího prostředí. Dormance je jev, kdy semeno neklíčí, přestože vnější podmínky by to umožňovaly (Baskin and Baskin, 2004). Děje se tak proto, aby semeno nevyklíčilo předčasně v nevhodných podmínkách a zabránilo se tak smrti potomstva. Tato strategie se projevuje několika způsoby (Bewley *et al.*, 1994.). Jedna z možností je, že semena z jedné mateřské rostliny jsou produkována ve více morfologicky odlišných formách, tím pádem se nacházejí v různém stádiu dormance a neklíčí tak současně. Zvětšuje se tak pravděpodobnost přežití alespoň části potomstva. Morfologické rozdíly mohou zahrnovat např. rozdíly ve zbarvení, různý tvar semen nebo tloušťku osemení (Bewley *et al.*, 1994, Wang, 2012). Tento fenomén je relativně častý, vyskytuje se u asi 18 rostlinných čeledí, největší podíl v zastoupení mají čeledi *Asteraceae* a *Chenopodiaceae* (Imbert, 2002).

Další strategií je odsunutí začátku klíčení v čase, kdy je ukončení dormance závislé na podmínkách vnějšího prostředí, které jsou samy časově podmíněné. Jako příklad lze uvést některé rostliny, jejichž semena vyžadují pro vyklíčení působení nízkých teplot po delší časové období, tj. v zimě. Je tak zajištěno, že semena začnou klíčit až na jaře, kdy jsou pro růst rostliny vhodné podmínky.

Dormance také přináší možnost prostorovému rozšíření semen. Semena nevyklíčí hned a mohou tak být zanesena do větších vzdáleností pomocí vody, větru nebo živočichů (Bexley *et al.* 1994). Ukončení dormance musí být v souladu s přítomností vhodných vnějších faktorů, jež podmiňují klíčení (Baskin *et al.*, 2000).

3.1 Klasifikace dormance

Baskin and Baskin (2004) vytvořili systém klasifikace dormance semen. Tento systém má tři úrovně – třídu, úroveň a typ, přičemž existuje základních 5 tříd dormance – fyziologická (PD), morfologická (MD), morfo-fyziologická (MPD), fyzikální (PY) a kombinovaná (PY + PD). Nejvíce členěná je třída dormance fyziologické a morfo-fyziologické.

Dormance fyziologická (PD)

Dormance fyziologická je podmíněna hormonálně. Souvisí zejména s metabolismem gibberelinů (GA) a kyseliny abscisové (ABA) (Baskin and Baskin, 2004).

Předpokládá se, že ABA indukuje dormanci, kdežto GA jsou zodpovědné za počátek klíčení. Pokud je semeno slabě dormantní, a obsahuje tedy nízkou dávku ABA, vyžaduje ke klíčení i nízkou dávku GA. Naopak pokud bylo v semeni průběhu jeho vývoje produkováno větší množství ABA, ke klíčení je zapotřebí rovněž větší množství GA (Baskin and Baskin, 2004). ABA mimo jiné zabraňuje předčasnému klíčení semene během jeho vývoje; stejné účinky má i osmotický tlak okolního prostředí nebo jejich kombinace (Berry and Bewley, 1992).

Hormonální regulaci dormance také ovlivňuje ethylen. U mnoha rostlinných druhů bylo prokázáno, že ukončuje dormanci a stimuluje klíčení (Kępczynski *et al.*, 1997). Ethylen interaguje s ABA a patrně snižuje citlivost semene k ní (Baskina and Baskin, 2004).

Dormance morfologická (MD)

Morfologickou dormanci pozorujeme u semen, která nemají dostatečně diferencované embryo. Nejsou fyziologicky dormantní, pouze potřebují čas, aby se embryo plně vyvinulo. Za

příznivých podmínek trvá toto období několik dnů, nanejvýš dva týdny, semena pak klíčí do zhruba třiceti dnů (Baskin and Baskin, 2004).

Dormance morfofyziologická (MPD)

Kombinace dormance morfologické a fyziologické se nazývá morfo-fyziologická dormance. Semena mají nevyvinutá embrya a jsou fyziologicky dormantní – k ukončení dormance vyžadují zvláštní podmínky, jako např. vlhko a nízké teploty. Počátek klíčení je podmíněn jak prolomením MPD, tak určitou kritickou velikostí embrya (Baskin and Baskin, 1991).

Dormance fyzikální

Čtvrtým typem dormance je dormance fyzikální. Vyskytuje se pravděpodobně u devíti řádů a patnácti čeledí, jako např. *Fabaceae*, *Malvaceae* a *Rhamnaceae*; někteří jejich zástupci však produkují i nedormantní semena (Baskin *et al.*, 2000). Pozorujeme ji u planých předků bobovitých. Její příčinou je přítomnost vrstvy nebo více vrstev nepropustných pro vodu v osemeni nebo oplodí. Jsou to vrstvy buněk palisádového parenchymu obsahující fenolické látky a suberin (Smýkal *et al.*, 2014).

Až na výjimky, semena vyznačující se fyzikální dormancí začnou klíčit, jakmile se jejich osemeni nebo oplodí stane propustné pro vodu. To může být způsobeno např. výkyvy teplot, suchem, průchodem trávicím traktem živočichů, mrazem, vysokými teplotami (i ohněm) nebo naopak teplotami nízkými. Pokud takové semeno ukončí dormanci – propuštěním vody, nemůže se už vrátit do původního stavu (Baskin and Baskin, 1998).

Vrstva osemeni, jež nepropouští vodu, je složena z palisádových nebo radiálně prodloužených buněk (Baskin *et al.*, 2000)

Dormance kombinovaná (PY + PD)

Semena vyznačující se kombinovanou dormancí mají pro vodu nepropustné osemeni a současně vykazují fyziologickou dormanci (Baskin and Baskin, 2004).

4 Biosyntetická dráha proanthokyanidinů v osemeni

Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin a jsou hlavními červenými, modrými a nachovými pigmenty. Základní funkcí těchto pigmentů je přilákání opylovačů a živočichů roznášejících semena. Také hrají klíčovou roli v signalizaci mezi rostlinami a mikroorganismy,

u některých druhů ovlivňují fertilitu samčích jedinců, působí proti patogenům a škůdcům a chrání před UV zářením. Flavonoidy reprezentují relativně různorodou skupinu aromatických uhlovodíků odvozenou od fenylalaninu a malonylkoenzymu A. U vyšších rostlin lze nalézt šest podskupin: flavony, flavonoly, flavonoidy, chalkony, anthokyaniny a proanthokyanidiny; sedmou, a ne tolik rozšířenou, skupinou jsou aurony (Winkel-Shirley, 2001). Biosyntézu flavonoidů katalyzují tři hlavní skupiny enzymů: oxoglutarát-dependentní dioxygenázy (např. F3H a flavonolsyntáza), NADPH-dependentní reduktázy (DFR, LCR) a cytochrom P450 hydroxylázy (např. F39H, F3959H a IFS) (Dixon and Steele, 1999).

Proanthokyanidiny (PA), někdy také nazývané kondenzované taniny (Ferraro *et al.*, 2014), se vyskytují v kůře, listech, plodech a semenech mnoha rostlinných druhů, kde plní funkci ochrany před škůdci. Také jsou příčinou trpké chuti u vína, čaje, ovocných džusů a dalších nápojů a byl prokázán jejich pozitivní účinek na lidské zdraví. Jejich přítomnost je jedním z hlavních faktorů, které pozitivně ovlivňují kvalitu píce (Dixon *et al.*, 2005).

V osemeni hrachu se podjednotky proanthokyanidinů skládají z *cis*-flavan-3-olů a *trans*-flavan-3-olů. U různých kultivarů se liší jak kvantitativně, tak kvalitativně, např. stupněm hydroxylace a polymerizace (Ferraro *et al.*, 2014). Všeobecně je struktura PA variabilní, závisí i na stereochemických vlastnostech nebo na přítomnosti či nepřítomnosti modifikací, jako je třeba esterifikace 3-hydroxylové skupiny (Dixon *et al.*, 2005). Zajímavé je, že na rozdíl od hrachu, se v příbuzné *Medicago truncatula* a modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* *trans*-flavan-3-olové podjednotky nevyskytují (Ferraro *et al.*, 2014). V průběhu dozrávání a vysychání semen dochází k tvorbě hnědého pigmentu, který dává semenu zbarvení (Lepiniec *et al.*, 2006). Děje se tak u mrtvých buněk, ve kterých došlo k desintegraci cytoplazmy a kde byly PA oxidovány, za vzniku komplexů hnědého zbarvení (Pourcel *et al.*, 2005).

Biosyntéza proanthokyanidinů probíhá prostřednictvím fenylpropanoidové dráhy. Reakce probíhají na vnější straně membrány endoplazmatického retikula, výsledné produkty (PA) jsou pak uskladněny ve vakuole. Do ní se dostávají ve formě monomerů pomocí MATE transportérů (multi-drug and toxic compound extrusion) lokalizovaných v tonoplastu (Zhao and Dixon, 2009). Před průchodem transportérem musí být glykosylovány. Byl však pozorován i transport prostřednictvím vezikul (Kitamura, 2010).

U *Arabidopsis thaliana* byly k výzkumu akumulace flavonoidů využity *transparent testa* (*tt*) mutanti (Koorneef, 1990, Appelhagen *et al.*, 2014). Produkty biosyntetické dráhy flavonoidů jsou monomerické anthokyaniny a polymerické proanthokyanidiny (Tanner *et al.*, 2003). Dráha začíná postupnou přeměnou fenylalaninu až na naringenin, který je hydroxylován. Poloha hydroxylové skupiny B-prstence naringeninu (buď na pozici 3', nebo na 3',5v) pak

zapříčiňuje diverzitu výsledných proanthokyanidinů. Její umístění na naringeninu určují tyto enzymy: cytochromy P450, flavonoid-3'-hydroxyláza (F3'H) a flavonoid-3'5'-hydroxyláza (F3'5'H). Dále probíhají reakce katalyzované flavanon-3-hydroxylázou (F3H) a dihydroflavonal-4-reduktázou (DFR), které dávají vznik flavan-3,4-diolům, neboli leukoanthokyanidinům. Ty jsou bezbarvé a jsou v několika dalších reakcích přeměněny pomocí anthokyanidin syntázy (ANS) a anthokyanidin reduktázy (ANR) na *cis*-flavan-3-oly. Vznik *trans*-flavan-3-olů z leukoanthokyanidinů je katalyzován leukoanthokyanidin reduktázou (LAR) (Ferraro *et al.*, 2014). ANR je kódována genem BANYULS (BAN) (Xie *et al.*, 2003). Transkripce tohoto genu je regulována třemi typy transkripčních faktorů: MYB (myeloblastická rodina transkripčních faktorů), bHLH proteiny (basic-helix-loop-helix) a WD40 proteiny (Baudry *et al.*, 2004).

U *Medicago trunculata* byl charakterizován gen MtPAR, který patří do rodiny MYB transkripčních faktorů. Tento gen je ve zralých semenech exprimován pouze v osemeni a ne v embryu. Bylo prokázáno, že tento gen pozitivně reguluje kódující enzymy flavonoid-proanthokyanidinové dráhy. Nejbližším homologem MtPAR je TF MYB zjištěný u sóji luštěnaté (*Glycine max*), jehož funkce je však zatím nejasná (Verdier, *et al.*, 2012).

Posledním krokem při biosyntéze PA je polymerizace jejich monomerů. Zatím nebylo zjištěno, který enzym tuto reakci katalyzuje, byl však testován gen TT10, který má funkci podobnou flavonoid oxidázám typu lakáza. Bylo zjištěno, že tento gen zodpovídá za oxidaci PA za tvorby hnědého pigmentu, jeho přímý vliv na polymerizaci flavan-3-olů však prokázán nebyl (Pourcel *et al.*, 2005). Lakázy patří společně s askorbát oxidázami a ceruloplasminem do skupiny enzymů nazývaných modré oxidázy, které ve své struktuře obsahují molekulu mědi. Tyto enzymy katalyzují redukci molekulárního kyslíku na vodu. Lakázy nejsou velmi specifické k substrátu (na rozdíl od třeba askorbát oxidáz), oxidují monofenoly, difenoly, polyfenoly, aminofenoly i diaminy. Jsou široce rozšířeny mezi rostlinami i houbami (Messerschmidt and Huber, 1990).

U semen *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že mnoho genů zapojených do proanthokyanidinové biosyntetické dráhy má vliv na dormanci. Flavonoidy, nacházející se v osemeni těchto semen, jsou významnými faktory, které jsou s dormancí silně asociovány (Debeaujon *et al.*, 2000). U bobovitých zatím podobný vliv těchto genů prokázán nebyl (Smýkal *et al.*, 2014).

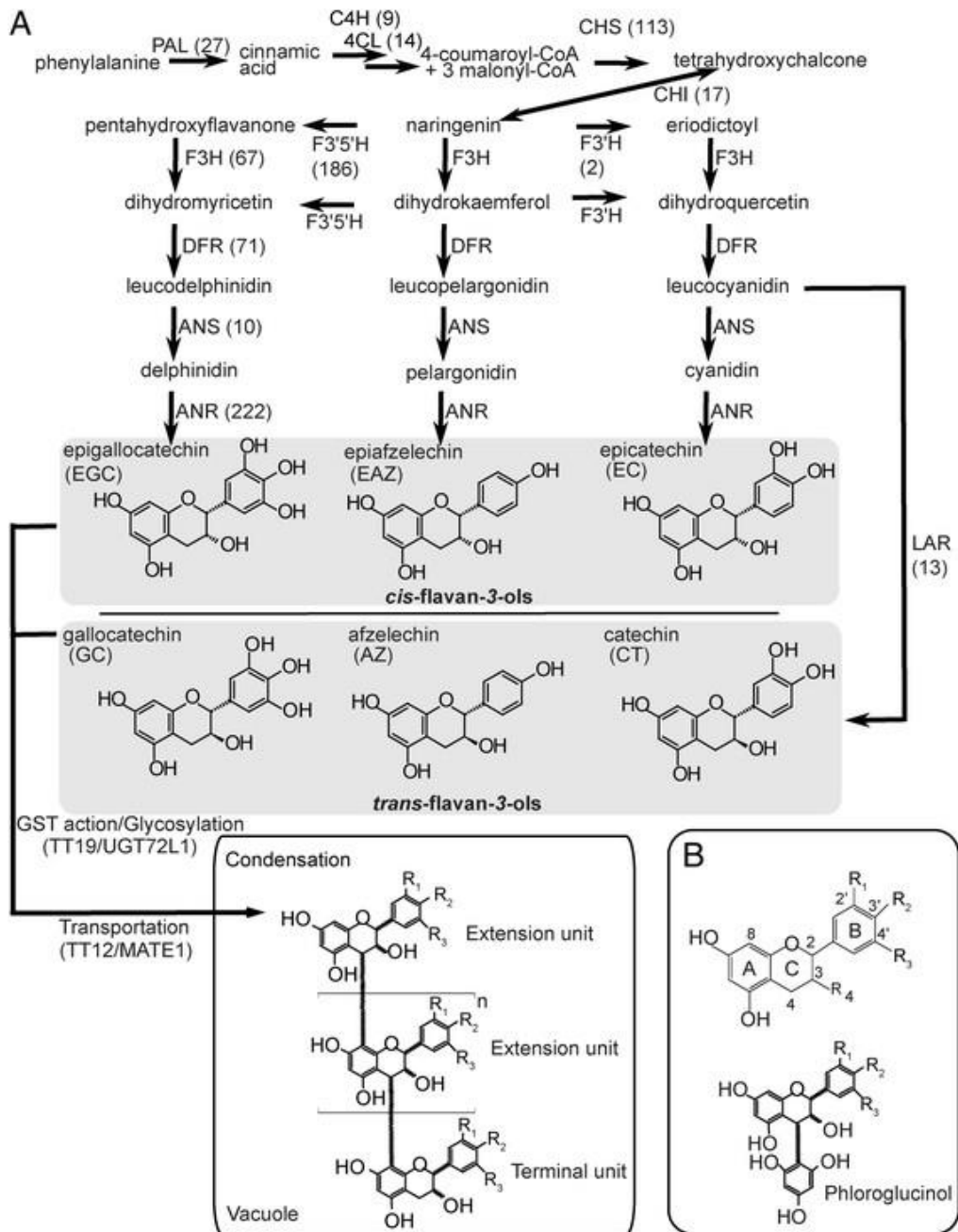
Enzymy biosyntetické dráhy, jako např. DFR, LAR a BAN, stejně jako substrát NADPH se nacházejí v cytoplazmě, proto syntéza monomerů probíhá právě tam. Polymerizace PA

probíhá ve vakuole, pravděpodobně se tak děje kvůli tomu, že polymerizované PA silněji interagují s proteiny, než jak je tomu u monomerů (Abrahams, 2003).

Ferraro *et al.* (2014) analyzovali metabolismus proanthokyanidinů v osemeni kulturního hrachu. Bylo provedeno next-generation sekvenování (NGS) cDNA z osemeni kultivaru Courier a byl tak získán transkriptom specifický pro osemení. Byla izolována cDNA kódující anthokyanidin reduktázu (PsANR), leukoanthokyanidin reduktázu (PsLAR) a dihydroflavanol reduktázu (PsDFR). Transkripty PsANR a PsLAR se nejhojněji vyskytovaly v časných vývojových stádiích. Také bylo zjištěno, že podjednotky PA jsou produkovány ve specifických buňkách osemení v časných fázích vývoje a jsou polymerizovány následně. Nejvíce PA bylo v osemeni akumulováno 20 dnů po vykvetení (Days after anthesis, DAA). PsANR je kódována čtecím rámcem dlouhým 1 017 bp a vykazuje 84% aminokyselinovou identitu s *M. truncatula* ANR a 60% aminokyselinovou identitu s ANR u *Arabidopsis*. Sekvence kódující PsDFR má velikost 1 029 bp a její aminokyselinová sekvence je z 89 % identická s DFR *M. truncatula* a ze 70 % s DFR *Arabidopsis*. PsLAR pak má velikost 1 056 bp, s LAR *M. truncatula* vykazuje 85% aminokyselinovou identitu a s LAR *Arabidopsis* 67%.

PA se v hrachu vyskytují v epidermálních pletivech a v pletivech spodní parenchymatické vrstvy, a to hlavně intracelulárně, ve vakuole. Postupem času, kdy semeno zraje, epidermální buňky se postupně sklerifikují a tím se zmenšuje intracelulární prostor i vakuola. PA jsou pak viditelné na vnitřní straně epidermis (Ferraro *et al.*, 2014).

Obr. č. 3: Schéma biosyntetické dráhy proanthokyanidinů (převzato od Ferraro *et al.*, 2014)



5 Transkriptomika během vývoje semene – osemení bobovitých

5.1 Charakteristika genomu hrachu

Hrách je diploidní organismus, počet jeho chromozomů lze vyjádřit jako $2n = 2x = 14$ (Sudheesh *et al.*, 2015). Velikost jeho genomu se odhaduje na asi 4 300 Mb. Je to přibližně 10x víc než u příbuzné *Medicago truncatula*, modelové rostliny čeledi bobovitých, jejíž genom má velikost jen asi 500 Mb. DNA hrachu totiž obsahuje daleko více repetitivních sekvencí, uvádí se 75 – 97 % jaderné DNA (Macas *et al.*, 2007). Kódující exonové oblasti zaujímají daleko menší část celého genomu např. u *Medicago truncatula* a *Lotus japonicus* L. Je tedy nevýhodné testovat přímo DNA sekvenci, lepší je provádět výzkum nepřímo – pomocí transkriptomické analýzy částí genomu v daném typu pletiva a vývojovém období (Sudheesh *et al.*, 2015). Semena obsahují velké množství zásobní mRNA, u *Arabidopsis* se dokonce exprimuje více než polovina všech genů. Tato mRNA pravděpodobně hraje roli v syntéze proteinů během raných fází klíčení (Nakabayashi, 2005).

Při studiu bobovitých je kladen velký důraz na transkriptomickou analýzu semen a lusků. Semena jsou totiž důležitá z agronomického hlediska pro vysoký obsah zásobních proteinů. Celogenomová transkriptomická analýza umožňuje změřit aktivitu většiny genů a také zaměřit se na genovou regulaci v různém biologickém kontextu (Garg, 2013).

Procesy spojené s růstem semene, jeho vysycháním a dormancí jsou regulovány jak na transkripční, tak na posttranskripční úrovni. Posttranskripční úpravy zahrnují např. alternativní sestřih, kdy je z jednoho lokusu produkováno více kódujících nebo nekódujících transkriptů. K pochopení těchto regulačních procesů je potřeba identifikovat další regulátory (proteiny, RNA atd.), což se provádí za pomoci transkriptomických a bioinformatických analýz (Aghamirzaie *et al.*, 2015).

5.2 Transkriptomické analýzy semen bobovitých rostlin

Transkriptomická analýza je běžná technika ve funkční genomice a molekulární biologii. Jsou popisovány tři základní postupy: metody založené na hybridizaci, metody založené na PCR a metody založené na sekvenování. Pokrok v bioanalytických metodách a postupně se snižující cena vedly ke vzniku rozsáhlých transkriptomických datasetů, které zahrnují jak různé tkáně a orgány, tak i vývojová stádia (Junker *et al.*, 2012). Některé techniky, jako je např. laserová mikrodisekce, umožňují pro další analýzu oddělit jen určité typy buněk, které obsahují

specifickou RNA, proteiny nebo další metabolity, lišící se od buněk okolního pletiva nebo tkáně (Nelson *et al.*, 2006), případně lze oddělit i jednotlivé buňky (Nelson *et al.*, 2008).

Efektivní metodou pro celogenomovou transkriptomickou analýzu je RNA sekvenování (RNA-Seq) (Sudheesh *et al.*, 2015). Ukázalo se, že je vhodnější než dříve používané metody (např. microarrays), neboť zohledňuje biologicky důležité izoformy a identifikuje geneticky odlišné varianty, jako třeba alternativní alely (Zhao *et al.*, 2014).

Na semenech hrachu bylo provedeno mnoho transkriptomických analýz. Chen *et al.* (2013) se zabývali stárnutím semen hrachu, konkrétněji vztahem mezi životaschopností semen, genovou expresí a glutathionového redoxního stavu během umělého stárnutí semen hrachu. Provedli rozsáhlou transkriptomickou analýzu pomocí mikročipů (microarrays), doplněnou o qRT-PCR analýzu vybraných genů a víceúrovňovou analýzu antioxidantu glutathionu. Výzkum ukázal, že u stárnutí těchto semen byly na molekulární úrovni klíčové změny v transkripci, které ovlivňovaly rozvoj programované buněčné smrti a snížení antioxidačních schopností, což vedlo k nižší viabilitě semen.

Alves-Carvalho *et al.* (2015) vytvořili set exprimovaných sekvencí hrachu v databázi Unigene, který byl použit k vytvoření genového atlasu RNA sekvencí a k identifikaci potenciálních regulátorů symbiózy spojené s fixací dusíku u hrachu. Autoři provedli high-throughput Illumina sekvenování 20 cDNA knihoven, které zahrnovaly různá nadzemní i podzemní pletiva, vývojová stadia i rozdílnou výživu během pěstování.

Sudheesh *et al.* (2015) vytvořili obsáhlé transkriptomické datasety generované ze dvou genotypů kulturního hrachu (Kaspa a Parafield) za použití RNA-Seq. Vzorky pletiv byly odebrány z různých vývojových stadií, osekvenováno bylo celkem 23 cDNA knihoven. 407 milionů a 352 milionů transkriptů z genotypů Kaspa a Parafield bylo spojeno do 129 282 a 149 272 contigů, z kterých bylo nakonec vybráno 126 335 contigů u genotypu Kaspa a 145 730 u genotypu Parafield. Výběr probíhal na základě faktorů, jako jsou známé genové anotace, přítomnost otevřených čtecích rámců a míra překryvu. 87 % contigů bylo exprimováno v obou kultivarech, malá část byla specifická pro každý z nich. Výsledná data mohou být využita k identifikaci rozdílů v DNA sekvencích a následně v šlechtění kulturního hrachu.

Podobné analýzy byly provedeny i na sóji. Redekar *et al.* (2015) provedli komplexní srovnání genové exprese u normálních a low phytic acid (*lpa*) mutantních semen sóji (*Glycine max*). Mutantní rostliny obsahují nižší hladinu kyseliny fytové, mj. přispívají k redukci znečištění fosfáty. Mutace jsou přímo nebo nepřímo spojeny s biosyntetickou dráhou kyseliny fytové a s jejím ukládáním v semenech. Tyto rostliny však mají sníženou klíčivost semen a tím i jejich pěstování ve větším. Proto byla provedena komplexní srovnávací analýza genové

exprese normálních linií sóji a *lpa* mutantních linií v pěti vývojových stádiích za použití RNA-Seq. Po osekvenování třiceti knihoven bylo identifikováno 4235 rozdílně exprimovaných genů, které zahrnovaly i 512 transkripčních faktorů. Ukázalo se, že *lpa* mutace hrají roli v navozování a potlačování obranných reakcí rostliny během časných a pozdních fází vývoje semen.

Transkriptomické analýzy byly provedeny i na bobu (*Vicia faba* L.). Ray *et al.* (2014) vytvořili knihovny k next-generation sekvenování, aby maximalizovali informace vedoucí k objasnění dráhy vicinu a konvicinu (farmaceutické faktory, které jsou schopny u citlivých jedinců vyvolat hemolýzu) a dalších markerů a genů. Experimenty byly prováděny na třech kultivarech bobu. Byl sestaven profil genové exprese tří typů tkání: kořene, etiolizovaného epikotylu a vyvíjejícího se osemení. Asi $1,2 \times 10^6$ transkriptů bylo přečteno a složeno do contigů. U kultivaru s nízkým obsahem taninů byl prokázán výrazný deficit v expresi anthokyanidin reductázy. Všechny tyto sekvence mohou přispět k rozšíření genetických map tohoto druhu.

Pang *et al.* (2008) provedli analýzu exprese transkripčních faktorů genové rodiny transparent testa 2 (TT2) MYB. Analýza transgenních kořenových vlásků overexprimujících TT2 gen pomocí mikročipu ukázala, že TT2 indukuje expresi genů pro biosyntetickou dráhu flavonoidů a proanthokyanidinů, transkripčních faktorů a také množství genů neznámé funkce. Pomocí druhého mikročipu byly identifikovány geny preferenčně exprimované v osemení *Medicago truncatula*. Srovnáním takto získaných dat určili do té doby neznámé klíčové geny některých kroků v biosyntetické dráze PA a jejich akumulaci. Jeden z těchto genů byl gen pro glukosyltransferázu (UGT72L1), která vykazovala specifickou aktivitu k prekurzoru PA, epikatechinu. Exprese genu pro tuto glykosyltransferázu během vývoje semen korelovala s přítomností epikatechinu glukosidu a akumulací PA. UGT72L1 také může být zapojena do produkce epikatechin 3'-O-glukosidu v osemení, což je klíčový krok v biosyntéze PA.

6 Materiál a metody

6.1 Rostlinný materiál

V rámci bakalářské práce proběhla analýza exprese vybraných genů z osemení čtyř různých genotypů hrachu. Dva byly kulturní (*P. sativum* subsp. *sativum*: Cameor, JI92) a dva plané (*P. sativum* subsp. *elatius*: VIR320, JI64), vždy jeden s pigmentovaným oseměním (JI64, JI92) a druhý s nepigmentovaným (Cameor, VIR320). Z rostliny každého genotypu byly odebírány 4 vzorky osemení různého stáří. JI64 a JI92 pochází z genové banky John Innes Centra, Norwich, UK, VIR320 z Vavilova institutu v St.Petersburgu, Rusko a cv. Cameor je francouzská odrůda poskytnutá z INRA, Dijon použitá pro sekvenování genomu hrachu.

Rostliny byly pěstovány ve sklenících katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Semena byla vyseta po 4 v 3l kontejnerech, do substrátu PROFI výsevnický substrát (Florcom). Rostliny byly pěstovány v průběhu roku 2014 a 2015, v měsících březnu až červnu.

6.2 Odběr vzorků

V praktické části práce byly použity dvě sady vzorků. První byly využity pro zkušební reakce. Pro ně byly odebrány z genotypu Cameor čtyři typy pletiv: list, květ (korunní lístky, bílé), prašníky + semeník a kořen. Z genotypu VIR320 byly odebrány dva typy pletiv: lusk a květ (korunní lístky, růžové).

Pro konečnou analýzu byly použity vzorky ze všech čtyř genotypů hrachu. Pro analýzu bylo odebíráno oseměnění ze čtyř vývojových stádií semen: 10, 15, 20 a 30 DAA (days after anthesis – dny po opylení). V různé fázi vývoje totiž dochází k rozdílné míře exprese různých genů.

6.3 Laboratorní vybavení:

Laboratorní váhy (572-35), homogenizátor FastPrep-24 (MP Biomedicals), homogenizační keramické kuličky (Ceramic Sphere ¼“, zirconium oxide, Life science, MP Bio), třepačka Mixing Block MB102, třepačka laboratorní (IKA MS2), centrifuga Eppendorf 5415, spektrofotometr (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo scientific) termocyklér (Base unit Ix DNA), mikrocentrifuga MCF 2360, termocyklér (LightCycler Nano Instrument, Roche), elektroforéza (Widi Mini Sub; Bio Rad), zdroj stejnosměrného napětí (PowerPac Basic; Bio-Rad), UV transiluminátor (FireReader; Uvitec Cambridge), třecí miska

6.4 Chemikálie a roztoky

Epicentre (USA): reakční pufr (10X Baseline-ZERO™ DNase Reaction Buffer), DNáza (Baseline-ZERO™ DNase), STOP pufr (10X Baseline-ZERO™ DNase Stop Solution); Promega (USA): AMV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer (M515A), Enzyme Storage Buffer, RNasin Plus RNase Inhibitor; primery (Oligo(dT)15 Primer); Bionline (USA): MyTaq RED 5x pufr, Taq polymeráza (5U/μl); SensiFAST SYBR No-ROX, agaróza (SERVA, Německo), TBE pufr, barvivo GelRed™ (Biotium, USA), standart molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (0,5 μg/μl), Thermo Scientific, USA); dNTP (10 nM, KAPA BIOSYSTEMS); primery (5μM, Generi Biotech, ČR) voda ošetřená DEPC (diethyl pyrokarbonát)

6.5 Izolace RNA

Nejprve proběhla izolace zkušebních vzorků pomocí několika komerčních izolačních kitů a protokolů. Pracovalo se s kity značek: RNA isolation from plant (NucleoSpin RNA Plant, Macherey-Nagel, Německo), PowerPlant RNA Isolation Kit with DNase (MoBio, USA) a BioTeke Plant Total RNA Extraction Kit (Čína). Další metody byly guanidium thiokyanát-fenol-chloroformová (GITC) extrakce (Chomczynski and Sacchi, 1987) a izolace pomocí Tris/SDS (John Innes Centre protokol, UK). Pro izolace bylo odebráno 100 (+/- 10 %) mg pletiva homogenizovaného v tekutém dusíku.

Postup (pro BioTeke Plant Total RNA Extraction Kit, Čína)

1. Rostlinný materiál homogenizovat v třecí misce s kapalným dusíkem.
2. Asi 100 mg rostlinného materiálu umístit do 1,5ml zkumavky spolu s 1 ml Lysis Buffer PL předeřhřátým na 65 °C.
3. Ke vzorku přidat keramickou kuličku a obsah ještě jednou homogenizovat, pomocí homogenizátoru FastPrep-24 (1 min, síla 6).
4. Vzorky zahřívát v inkubátoru 5 min při 65 °C.
5. Zkumavky centrifugovat 10 min při 12 000 rpm.
6. Supernatant přenést na filtrační kolonku.
7. Centrifugovat 1 min při 12 000 rpm.
8. Filtrát přenést do 1,5ml zkumavky a přidat stejný objem 70% ethanolu (700 μl).
9. 700 μl směsi nanést na kolonku Spin-column AC a centrifugovat 1 min při 10 000 rpm.

10. Filtrát odstranit, na kolonku nanést zbývajících 700 µl směsi a opět centrifugovat 1 min při 10 000 rpm.
11. Odstranit filtrát, na kolonku nanést 500 µl Buffer RE, centrifugovat 1 min při 12 000 rpm a opět odstranit filtrát.
12. Přidat 700 µl Buffer RW, centrifugovat 1 min při 12 000 rpm a odstranit filtrát.
13. Přidat 500 µl Buffer RW, centrifugovat 1 min při 12 000 rpm a odstranit filtrát.
14. Centrifugovat 2 min při 12 000 rpm a odstranit filtrát.
15. Kolonku přenést do nové zkumavky, přidat 50 µl RNase-free vody a nechat stát 2 min.
16. Centrifugovat 1 min při 12 000 rpm.
17. Přidat 20 µl RNase-free vody a centrifugovat 1 min při 12 000 rpm.
18. Vyizolovanou RNA uchovávat v mrazáku při -20 °C.

6.6 Měření koncentrace RNA

Pomocí spektrofotometru NanoDrop byla změřena koncentrace vyizolované RNA.

Postup:

1. Na NanoDrop napipetovat 2 µl destilované vody a proměřit blank.
2. Na NanoDrop napipetovat 2 µl vzorku RNA změřit koncentraci RNA.

6.7 Odstranění zbytkové DNA

Před samotnou transkripcí RNA do cDNA je zapotřebí degradovat veškerou zbytkovou DNA, která by mohla způsobovat nespecifickou reakci v dalších krocích. DNA je sice odstraněna už během samotné izolace, může se však stát, že malé množství ve vzorku zůstane. Vzorky se tedy musí vystavit působení DNázy.

Postup:

1. Do PCR mikrozkuvek napipetovat 65 µl vzorku RNA, 7,6 µl reakčního pufru a 3,8 µl DNázy.
2. Inkubovat 20 min, při 37 °C.
3. Přidat 7,6 µl STOP pufru a inkubovat 10 min při 65 °C.

6.8 Reverzní transkripce (RT-PCR)

Reverzní transkripce se skládala z několika po sobě následujících kroků. Vzorky bylo potřeba vhodně naředit, aby do reakce vstupovalo stejné množství RNA. Ředění proběhlo na

základě výsledků měření koncentrace spektrofotometrem NanoDrop. Následovala inkubace vzorků s oligo dT primerem a nakonec samotná reverzní transkripce. Na závěr byly vzorky zředěny vodou ošetřenou DEPC v poměru 1:1. Protože je RNA velmi náchylná na degradaci, veškerá práce s ní probíhala ve sterilním prostředí flowboxu.

Postup:

1. Inkubace vzorků s primerem

- Do PCR mikrozkušavek napipetovat 9 μ l vody, 5 μ l zředěného vzorku RNA a 1 μ l primeru (*Tab. č. 1*).
- Umístit do termocykléru na 5 min a teplotu nastavit na 70 °C. Po vytažení umístit na led.

2. Reverzní transkripce

- Do mikrozkušavky připravit reakční směs složenou z: 12,5 μ l vody ošetřené DEPC, 8 μ l pufru, 2,5 μ l dNTP, 1 μ l inhibitoru ribonukleáz a 1 μ l AMV reverzní transkriptázy
- Přidat 25 μ l reakční směsi ke každému vzorku z předcházejícího kroku.
- Vzorky vložit do termocykléru na 60 min a teplotu nastavit na 42 °C.

Tab. č. 1: Primery použité v bakalářské práci (Generi Biotech)

Název	Sekvence	Accession number	Délka (bp)	Zdroj
PsDFR	F: CGTTCGCGATCCAGATAACGTGAA R: ACCCTCTTCAGCAAGATCAGCCTT	KF516484	102	Ferraro <i>et al.</i> , 2014
PsANR	F: TCAGAATACCTGTGTTCCCGAGCTTG R: CCTTGCGGCAATCCTCGAATTTAGT	KF516483	90	Ferraro <i>et al.</i> , 2014
PsLAR	F: TCCTGTGGAGCCAGGTTTAGCAAT R: AGTAAGGCCAAGATGCGATGGAGT	KF516485	119	Ferraro <i>et al.</i> , 2014
Lakáza	F: AATCACCTGTTCATTTGCATGG R: CCTTGAATCTGATAGCAACCCAAC	PsCam02702	163	vlastní
MtMyb5 homolog	F: CGTCTTTGTGGGAATCGCAA R: GCATCATGAATCTGTCCCGT	PsCTri1E003845	94	vlastní
MtPAR homolog	F: AGATAACCTTTTGGATGTGGAGC R: AGCCAAGTGAGTTGGGAATC	PsCam050441	123	vlastní
Vicilin	F: GTATCAATGCCGAGAACAACG R: GAAGATCCAGGAAATGCAAGC	X67428	86	Chinoy <i>et al.</i> , 2011
Aktin	F: TTCTCACTGAAGCTCCGCTTAACC R: CAATACCAGTTGTACGGCCACTAGC	PSU81047	144	Ferraro <i>et al.</i> , 2014
β-tubulin	F: GCTCCCAGCAGTACAGGACTCT R: TGGCATCCACATTTGTTGA	X54844	59	Die <i>et al.</i> , 2010

6.9 Amplifikace vybraných genů

Postup: Do zkumavek napipetovat reakční směs (4,8 µl pufru, 15,6 µl vody, 1,2 µl F/R primeru (5 pmol), 0,1 µl Taq polymerázy a 2 µl DNA vzorku), vložit do termocykléru a spustit program (Tab. č. 2).

Tab. č. 2: Teplotní program pro PCR

Fáze	Teplota (°C)	Počet cyklů	Čas (min)
denaturace	95	1	4
syntéza	95	35	0,5
	55		0,5
	72		1,5
Konečná syntéza	72	1	8
udržování	15	1	-

6.10 Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)

Tato metoda slouží ke kvantifikaci DNA a transkripce. Je to modifikace klasické PCR, založená na předpokladu, že v každé zkumavce je stejné počáteční množství nukleové kyseliny, které se amplifikuje se shodnou účinností. K normalizaci se používá genová sekvence, která je obsažena ve všech vzorcích v relativně konstantním množství (Heid *et al.*, 1996).

Po provedení qRT-PCR byl její správný průběh ověřen gelovou elektroforézou a pozorováním průběhu křivky teploty tání.

Následovala relativní kvantifikace exprese vybraných genů podle metody $2^{-\Delta\Delta C_T}$, kterou popsali Livak a Schmittgen (2001). Hodnota C_T je charakterizována jako prahový cyklus, tedy číslo označující počet cyklů, při kterém dosáhne množství amplifikovaného produktu fixní hodnoty (Livak a Schmittgen, 2001) Výpočet byl proveden tak, že od hodnoty C_T studovaného genu byla odečtena hodnota C_T referenčního genu, čímž byla získána ΔC_T . Hodnota $\Delta\Delta C_T$ byla definována jako rozdíl ΔC_T studovaného genu a kontroly. Následně byla tato hodnota dosazena do vzorce $2^{-\Delta\Delta C_T}$, výsledky z obou opakování byly zprůměrovány a byla vypočítána směrodatná odchylka. Jako referenční gen byl využit gen pro aktin, jako kontrola sloužila hodnota ΔC_T prvního vývojového stadia kultivarů Cameor.

Postup: Do 1,5ml mikrozkušavky napipetovat jednotlivé složky reakční směsi (7,5 µl pufru, 4,3 µl vody, 1,2 µl primeru a 2 µl vzorku cDNA). Reakční směs nazpipetovat do PCR mikrozkušavek a přidat µl vzorku cDNA. Mikrozkušavky vložit do termocykléru a spustit program (Tab. č. 3).

Tab. č. 3: Teplotní program qRT-PCR

Fáze	Teplota (°C)	Počet cyklů	Čas (s)
Denaturace	95	1	600
Syntéza	95	45	10
	55		30
	72		20
Udržování	72	1	300
Melting analýza	60 °C – 97 °C po 0,1 °C/s		

6.11 Gelová elektroforéza

Po provedení některých kroků bylo nutné ověřit, jestli vznikly odpovídající produkty. Metodou, jak výsledné produkty vizualizovat, je gelová elektroforéza. Elektroforéza probíhala v 1,5% a 2% agarózovém gelu v prostředí TBE pufru. Napětí bylo nastaveno na 100 V po dobu 30 min.

Postup:

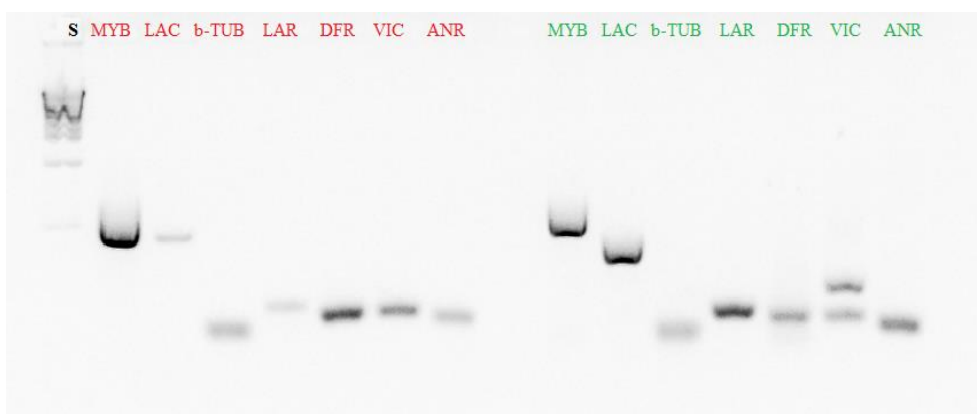
1. Navážit 0,9 g agaru, rozpustit v 60 ml TBE pufru a rozvařit v mikrovlnné troubě.
2. Po zchladnutí přidat 2 µl barviva GelRedTM a přelít do elektroforetické vany.
3. Vložit hřebínky a nechat asi 30 min tuhnout.
4. Vytáhnout hřebínky a gel vložit do elektroforetické komůrky naplněné TBE pufrem.
5. Do první jamky v každé řadě napipetovat 3 µl standartu molekulové hmotnosti.
6. Z každého vzorku odebrat 7,5 µl, smíchat s 1 µl nanášecího pufru Loading Buffer a přenést do jamek.
7. Připojit ke zdroji elektrického napětí a spustit.
8. Po ukončení elektroforézy gel vyjmout a výsledek vyhodnotit prostřednictvím transiluminátoru.

7 Výsledky

Prvním krokem praktické části bakalářské práce bylo testování funkčnosti izolace RNA a správné funkce primerů. První izolace byly provedeny pomocí komerčního kitu MoBio, a to z těchto vzorků: list, květ (korunní lístky, bílé), prašníky + semeník a kořen – vše z hrachu kultivaru Cameor, a lusk a květ (korunní lístky, růžové) z genotypu VIR320. Výsledky byly po provedení reverzní transkripce a PCR amplifikace daných genů ověřeny gelovou elektroforézou (Obr. č. 4).

Obr. č. 4: Amplifikované geny pocházející z květu a lusku kultivaru VIR320.

S: standard molekulové hmotnosti, MYB – MYB5, LAC – lakáza, b-TUB – β -tubulin, LAR – leukoanthokyanidin reduktáza, DFR – dihydroflavanol-4-reduktáza, VIC – vicilin, ANR – anthocyanidin reduktáza, červeně: geny izolované z květu, zeleně: geny izolované z lusku



Následovala separace osemení od embrya ze vzorků odebraných ze všech čtyř testovaných genotypů hrachu. Bylo nutné zvolit izolační kit nebo protokol, který by zabezpečil největší výtěžek kvalitní RNA použitelné pro přepis do cDNA. Zkušební izolace byly provedeny se vzorky osemení genotypů JI64 a Cameor, a to pomocí komerčních izolačních kitů RNA isolation from plant (NucleoSpin RNA Plant, Macherey-Nagel) PowerPlant RNA Isolation Kit with DNase (MoBio) a BioTeke Plant Total RNA Extraction Kit. Další metody byly guanidium thiokyanát-fenol-chloroformová extrakce (Chomczynski and Sacchi, 1987) a izolace pomocí Tris/SDS (John Innes Centre protokol). Po vyzolování RNA bylo provedeno ověření výtěžku a její kvality (Tab. č. 4), jako nejefektivnější z hlediska jak výtěžku, tak čistoty RNA, byl zvolen izolační kit BioTeke, který pak byl použit v práci.

Tab. č. 4: Srovnání výtěžku RNA a její čistoty u různých izolačních kitů a protokolů

Kit/protokol	Vzorek	Výtěžek z ± 100 mg materiálu (µg)	A(260)/A(280)
BioTeke	Cameor	57,4	2,15
	JI64	9,2	2,14
Macherey-Nagel	Cameor	9,4	2,16
	JI64	0,3	1,72
MoBio	Cameor	4,5	2,09
	JI64	3,2	1,92
Fenol/chloroform	Cameor	174	1,4
	JI64	20,5	2,13
GITC	Cameor	42,3	1,84
	JI64	21,7	1,39

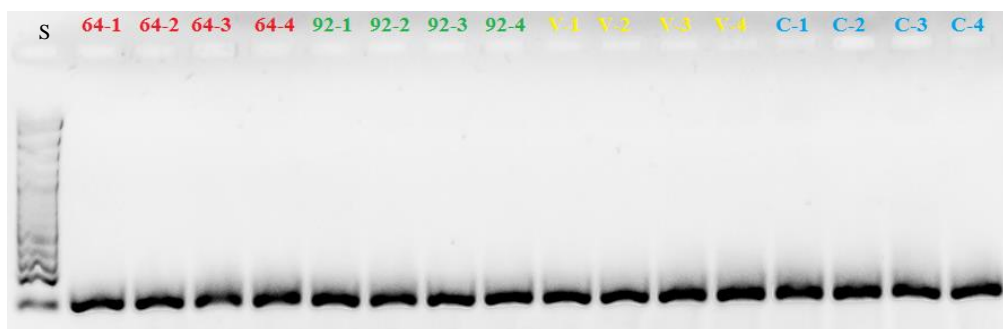
Izolace RNA ze všech dalších vzorků osetení byla tedy prováděna pomocí izolačního kitu BioTeke Plant Total RNA Extraction Kit. Koncentrace a čistota byla opět kontrolována pomocí spektrofotometru NanoDrop. Hodnoty koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 50 do 900 ng/µl. Poměr absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm (A260/A280) se pohyboval okolo 2,1. Z tabulky č. 4 je zřejmé, že vzorky osetení planého druhu hrachu JI64, vykazují ve všech použitých protokolech nižší výtěžek a většinou i horší kvalitu RNA.

Metodou reverzní transkripce byla RNA převedena na cDNA. Vybrané geny byly amplifikovány pomocí PCR za použití specifických primerů. Úspěšnost amplifikace genů byla ověřena provedením gelové elektroforézy v agarózovém gelu.

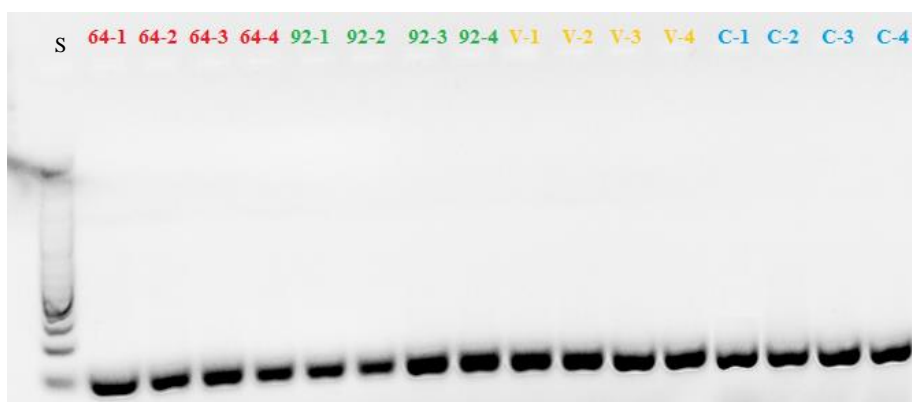
Dalším krokem byla qRT-PCR, kdy bylo měřeno množství templátové DNA. Správný průběh reakce byl ověřen gelovou elektroforézou v agarózovém gelu (*Obr. č. 5, 6*) a také pomocí křivky teploty tání produktů (*Obr. č. 7*). V této fázi byly z analýzy vyloučeny geny pro PsPAR a β-tubulin, jelikož reagovaly nespecificky. Na elektroforetogramu byly produkty jejich amplifikace slabě viditelné a nebyly ostře ohraničené. Většina z nich byla rozdělená na dva i více produktů.

Reakce proběhla celkem ve třech opakováních, z nichž byly vybrány dvě přibližně stejné hodnoty, se kterými se dále pracovalo. Poté proběhla relativní kvantifikace exprese vybraných genů metodou $2^{-\Delta\Delta CT}$, podle Livaka a Schmittgena (2001). Výsledky byly zpracovány do tabulky (*Tab. č. 5*) a grafů.

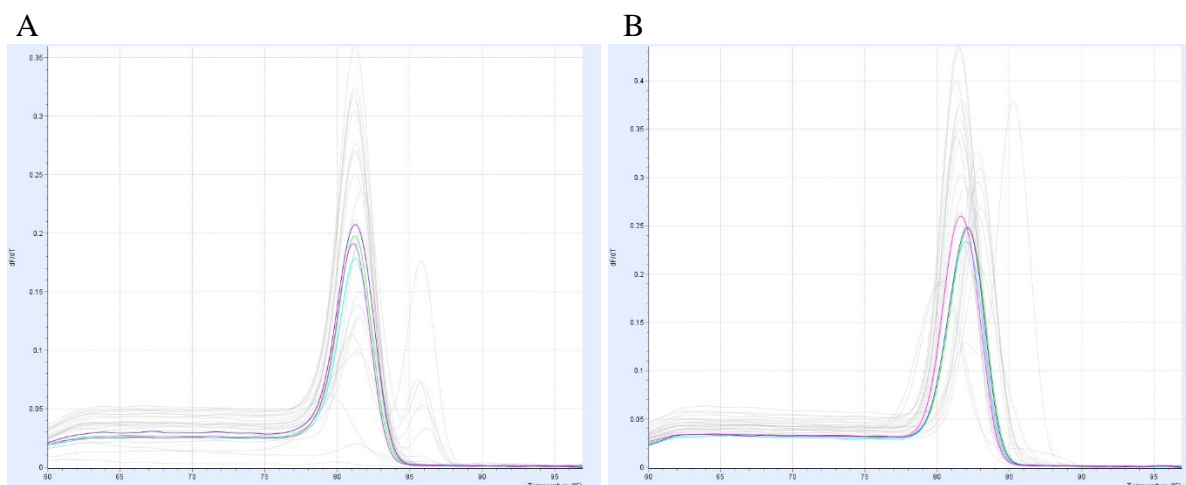
Obr. č 5: Gen pro vicilin amplifikovaný v průběhu qRT-PCR u čtyř stadií čtyř genotypů hrachu. S: standard molekulové hmotnosti, 64: JI64 (stadia 1 – 4), 92: JI92 (stadia 1 – 4), V: VIR320 (stadia 1 – 4), C: Cameor (stadia 1 – 4)

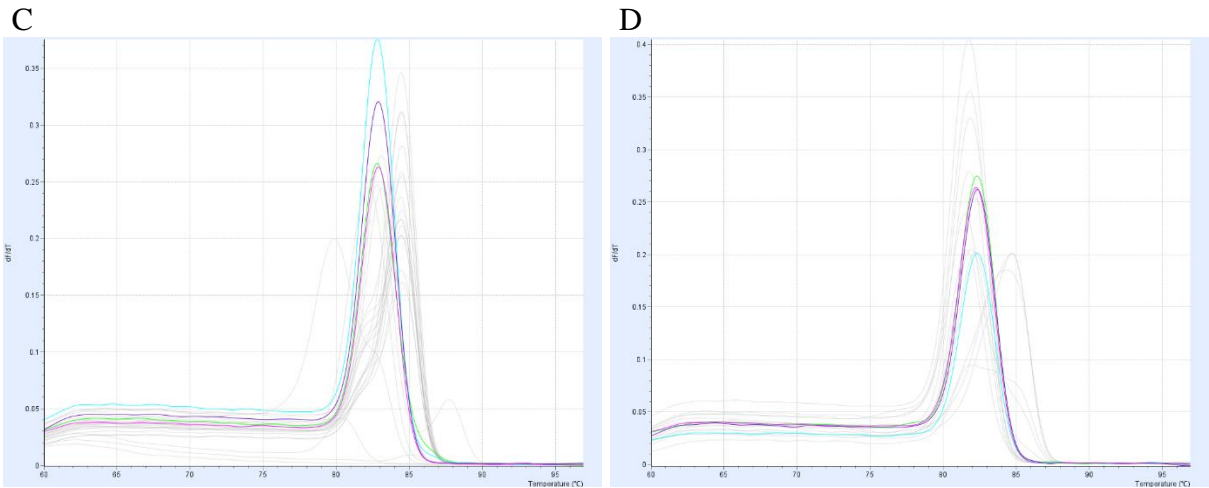


Obr. č. 6: Gen pro anthokyanidin reduktázu amplifikovaný v průběhu qRT-PCR u čtyř stadií čtyř genotypů hrachu. S: standard molekulové hmotnosti, 64: JI64 (stadia 1 – 4), 92: JI92 (stadia 1 – 4), V: VIR320 (stadia 1 – 4), C: Cameor (stadia 1 – 4)



Obr. č. 7: Křivka teploty tání (T_m): T_m PsANR u JI64 (A), T_m vicilinu u JI64 (B), T_m PsDFR u JI64 (C), T_m MtMYB5 u VIR320 (D)

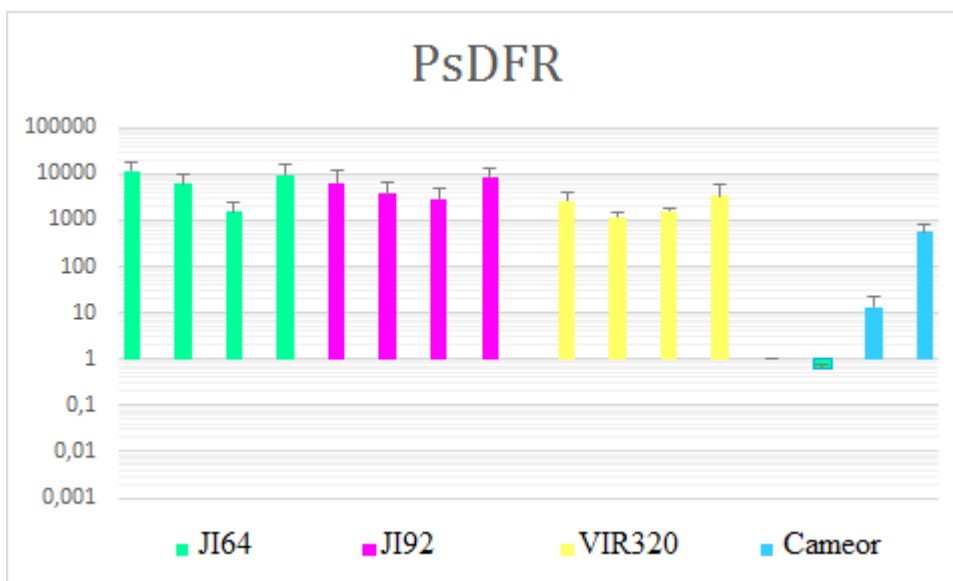




Na základě této analýzy bylo zjištěno, že z testovaných genů byl nejvíce exprimován gen pro PsDFR, naopak nejméně byl exprimován gen pro PsANR (*Tab. č. 5*).

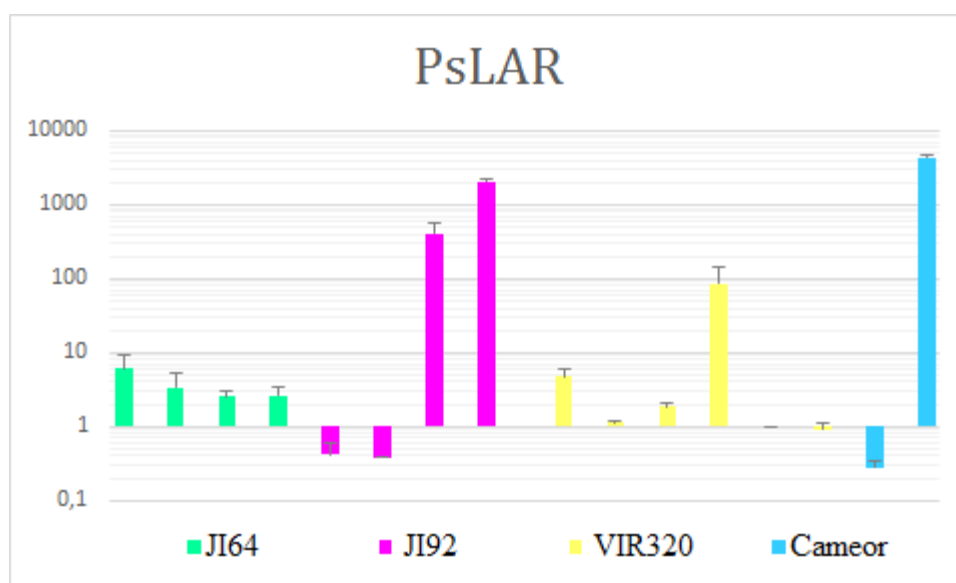
Gen pro PsDFR byl hojně exprimován u genotypů s pigmentovaným osemením (JI64 a JI92) a u planého nepigmentovaného VIR320, u každého z nich ve všech 4 stádiích relativně ve stejné míře. U kultivaru nepigmentovaného hrachu Cameor byla pozorována rostoucí tendence od nejmladšího vývojového stadia po nejstarší, u prvních tří stádií však byla exprese oproti ostatním vzorkům velmi nízká (*Graf č. 1*).

Graf č. 1: Relativní exprese genu pro PsDFR u čtyř genotypů hrachu. Sloupce každého genotypu (JI64, JI92, VIR320 a Cameor) jsou seřazeny od nejmladšího vzorku po nejstarší (10, 15, 20 a 30 DAA)



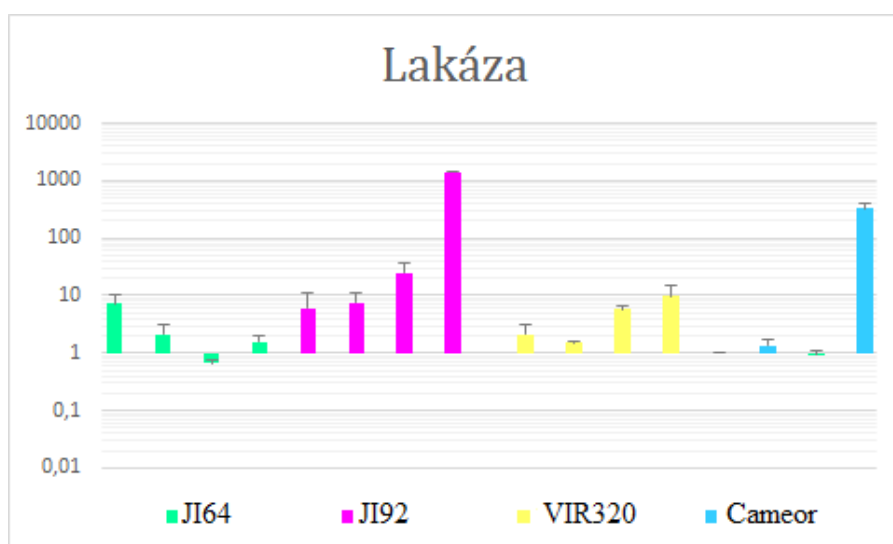
Expresse genu pro PsLAR se u jednotlivých genotypů i vývojových stádií relativně lišila. U genotypu planého hrachu JI64 byla pozorována spíše klesající tendence ve směru od nejmladšího k nejstaršímu vývojovému stádiu, celkově však byla exprese genu pro LAR u tohoto genotypu velmi nízká. U genotypu JI92 – kulturního hrachu s pigmentovaným osemením, byl pozorován prudký nárůst exprese u dvou nejstarších vzorků. Genotyp planého hrachu VIR320 a kulturní kultivar Cameor (oba s nepigmentovaným osemením) vykazovaly největší expresi tohoto genu až u nejstaršího vývojového stádia, u prvních tří byla exprese velmi nízká (Graf č. 2).

Graf č. 2: Relativní exprese genu pro PsLAR u čtyř genotypů hrachu. Sloupce každého genotypu (JI64, JI92, VIR320 a Cameor) jsou seřazeny od nejmladšího vzorku po nejstarší (10, 15, 20 a 30 DAA)



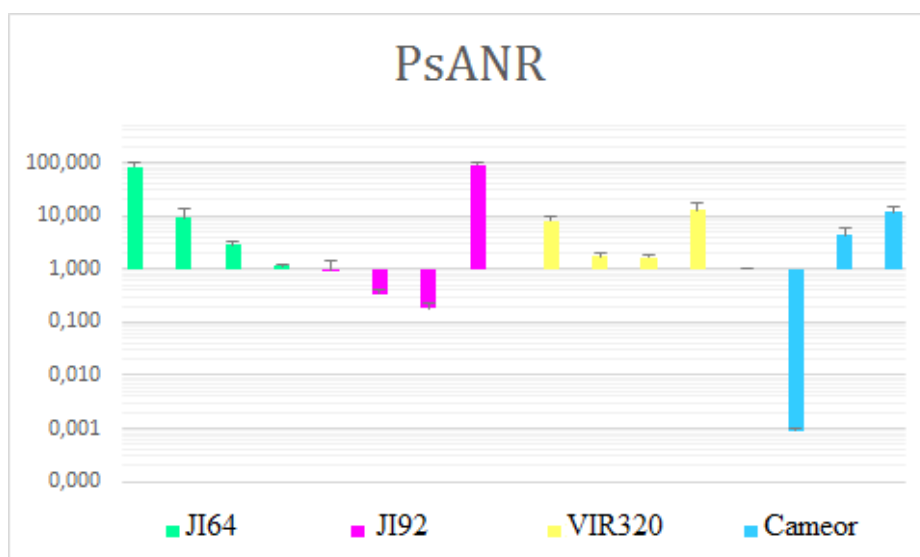
U genu pro lakázu byla pozorována podobná tendence jako u genu pro LAR (ve smyslu vývoje exprese od nejmladšího vzorku po nejstarší). U genotypu planého hrachu s pigmentovaným osemením JI64 byla exprese velmi nízká a měla převážně klesající tendenci. U ostatních genotypů se stárnutím osemení narůstala. Strmý nárůst byl patrný u nejstaršího vzorku genotypů JI92 a Cameor (Graf č. 3).

Graf č. 3: Relativní exprese genu pro lakázu u čtyř genotypů hrachu. Sloupce každého genotypu (JI64, JI92, VIR320 a Cameor) jsou seřazeny od nejmladšího vzorku po nejstarší (10, 15, 20 a 30 DAA)



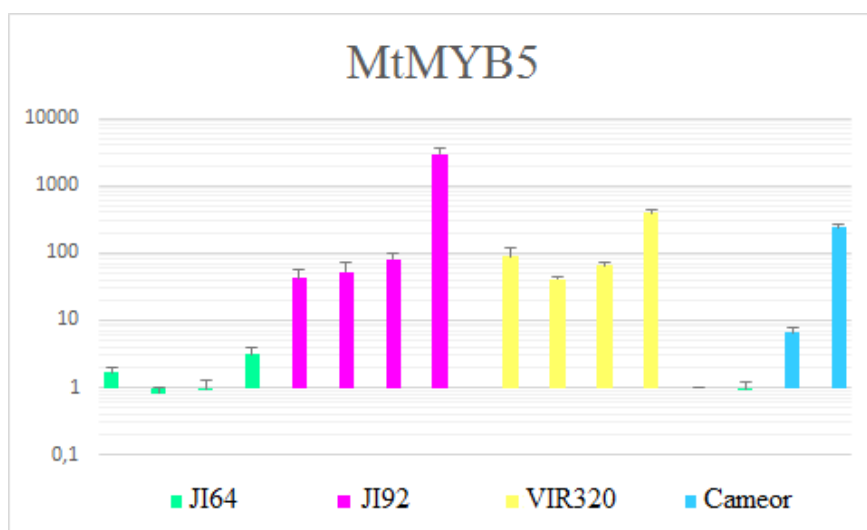
Podobný vývoj exprese byl pozorován u genu pro ANR. U genotypu planého hrachu s pigmentovaným oseměním JI64 se se stárnutím semene exprese tohoto genu snižovala. Kulturní genotypy JI92 (pigmentovaný) a Cameor (nepigmentovaný) vykazovaly postupný nárůst exprese. Vývoj exprese u planého genotypu s nepigmentovaným oseměním VIR320 byl málo průkazný, nejvyšší hodnoty byly naměřeny u prvního a posledního vývojového stadia (10 a 30 DAA). Míra exprese ANR ve všech genotypech však byla oproti ostatním genům velmi nízká (Graf č. 4).

Graf č. 4: Relativní exprese genu pro PsANR u čtyř genotypů hrachu. Sloupce každého genotypu (JI64, JI92, VIR320 a Cameor) jsou seřazeny od nejmladšího vzorku po nejstarší (10, 15, 20 a 30 DAA)



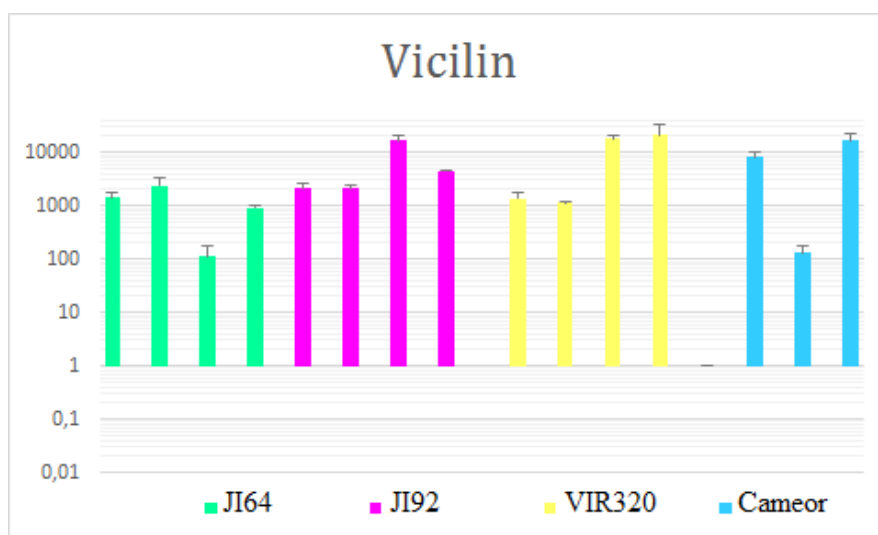
Expresse genu MtMYB5 u všech genotypů s věkem semene narůstala. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u genotypů JI92 a VIR320. U genotypu JI64 byla exprese tohoto genu na rozdíl od ostatních velmi nízká. Stejně tak nízké hodnoty vykazovala i první dvě stádia genotypu Cameor, u dalších dvou se míra exprese zvýšila (*Graf č. 5*).

Graf č. 5: Relativní exprese genu pro MtMYB5 u čtyř genotypů hrachu. Sloupce každého genotypu (JI64, JI92, VIR320 a Cameor) jsou seřazeny od nejmladšího vzorku po nejstarší (10, 15, 20 a 30 DAA)



Gen pro vicilin vykazoval relativně vysokou míru exprese u všech 4 stádií a genotypů. Souvislost mezi stářím semene a expresí tohoto genu nebyla pozorována (*Graf č. 6*).

Graf č. 6: Relativní exprese genu pro vicilin u čtyř genotypů hrachu. Sloupce každého genotypu (JI64, JI92, VIR320 a Cameor) jsou seřazeny od nejmladšího vzorku po nejstarší (10, 15, 20 a 30 DAA)



Tab. č. 5: Relativní exprese daných genů pro jednotlivá stadia všech genotypů a směrodatná odchylka (výpočet ze 2 opakování)

		Genotyp	Vývojové stadium	DFR	LAR	ANR	Lakáza	MYB5	Vicilin
Kulturní	Pigmento vané	JI92	1	6437,45 ± 5941,1	0,418193 ± 0,186132	0,959 ± 0,49854	6,124315 ± 4,78393	41,43454 ± 14,0582	2149,6 ± 501,1116
			2	3736,7 ± 2666,95	0,375414 ± 0,0046	0,336 ± 0,08048	7,402458 ± 3,71345	51,62972 ± 20,2325	2081,2 ± 425,4323
			3	2920,76 ± 1908,03	405,0874 ± 166,4116	0,178 ± 0,03946	24,74765 ± 12,83671	80,90911 ± 16,53884	16464 ± 3704,347
			4	8550,75 ± 5189,62	2073,491 ± 148,2501	91,438 ± 8,63671	1409,053 ± 7,596761	2953,022 ± 568,1632	4463,9 ± 244,92
	Nepigmentované	Cameor	1	1	1	1	1	1	1
			2	0,62003 ± 0,1315	0,916787 ± 0,186963	0,001 ± 6,6E-05	1,358471 ± 0,371456	0,92362 ± 0,254295	8078,6 ± 1763,638
			3	13,0369 ± 9,18989	0,275999 ± 0,062496	4,308 ± 1,51319	0,977169 ± 0,142219	6,509353 ± 1,321221	133,89 ± 45,73497
			4	554,862 ± 284,272	4297,306 ± 336,6526	11,848 ± 2,52411	330,4728 ± 68,97944	241,0098 ± 32,15248	17024 ± 6245,306
Plané	Nepigmentované	VIR320	1	2599,76 ± 1383,65	4,72643 ± 1,332471	8,118 ± 1,95442	2,131654 ± 1,066605	89,23704 ± 32,043	1388,3 ± 394,0142
			2	1154,38 ± 252,01	1,134963 ± 0,022806	1,688 ± 0,21867	1,512796 ± 0,067451	40,73873 ± 3,271105	1125,1 ± 67,78531
			3	1608,28 ± 212,213	1,858376 ± 0,249726	1,628 ± 0,19743	5,868029 ± 0,967697	65,17071 ± 5,583017	17852 ± 2346,835
			4	3347,42 ± 2502,15	86,37019 ± 59,37603	12,445 ± 5,16845	9,791062 ± 4,814937	392,6207 ± 58,28469	21439 ± 12352,85
	Pigmento vané	JI64	1	11499,6 ± 5461,02	6,096897 ± 3,139184	81,730 ± 18,0377	7,158362 ± 3,368245	1,679479 ± 0,362626	1431,8 ± 322,8327
			2	6009,65 ± 3421,09	3,327535 ± 1,841908	8,983 ± 4,7924	2,08403 ± 1,088943	0,826218 ± 0,205187	2414,3 ± 936,2681
			3	1523,96 ± 814,289	2,565225 ± 0,467611	2,857 ± 0,41306	0,654154 ± 0,117352	0,943796 ± 0,310172	112,61 ± 67,66561
			4	9345,9 ± 7278,12	2,602509 ± 0,87939	1,135 ± 0,02614	1,550753 ± 0,42769	3,077574 ± 0,792044	912,27 ± 138,0788

8 Diskuze

V bakalářské práci byla provedena komparativní analýza exprese vybraných genů zapojených do biosyntetické dráhy proanthokyanidinů. Testování probíhalo na vzorcích ze čtyř genotypů hrachu, z nichž dva byly kulturní s nedormantními semeny (Cameor, JI92) a dva plané s dormantními (VIR320, JI64), od každé skupiny pak jeden s pigmentovaným osemením (JI64, JI92) a druhý s nepigmentovaným (Cameor, VIR320).

Z rostliny každého genotypu byly odebrány 4 časově odlišná vývojová stadia lusků resp. semen (10-15-20-30 DAP). Toto rozdělení je však do jisté míry relativní, neboť každý sledovaný genotyp má odlišnou rychlost vývoje, tj. plané formy rostou a vyvíjejí se rychleji (VIR320, JI64) než kulturní (Cameor, JI92).

Osemení obsahuje velké množství sacharidů (Castell *et al.*, 1996) a fenolických látek, byla v něm zjištěna jejich největší koncentrace v rámci bobovitých (Dueñas *et al.*, 2004). Kvůli těmto složkám byla izolace RNA obtížnější, než u jiných pletiv. To také pravděpodobně způsobilo nižší výtěžek a kvalitu RNA u planého hrachu – má silnější osemení a tím pádem i více těchto látek. Proto bylo vyzkoušeno několik kitů a protokolů. Nejvíce se osvědčil izolační kit firmy BioTeke, jak z hlediska výtěžku, tak i čistoty RNA, naopak nejmenší výtěžek byl získán prostřednictvím kitu firmy MoBio.

Homolog genu Myb5, MtMYB5 byl vybrán z důvodu, že se jedná o jeden z faktorů ovlivňujících tvorbu proanthokyanidinů v osemení. Společně s MtMYB14 aktivují v přítomnosti MtTT8 and MtWD40-1 promotor ANR a LAR a pomocí mutantní linie *Medicago truncatula* bylo prokázáno, že ovlivňují formování osemení (Liu *et al.* 2014).

Analýza tohoto genu ukázala, že nejvíce byl exprimován u pigmentovaného kulturního JI92. Naopak u pigmentovaného planého JI64 byly naměřené hodnoty překvapivě velmi nízké, dokonce nižší než u obou nepigmentovaných genotypů (Cameor a VIR320). Toto zjištění je potřeba ještě prověřit zopakováním analýzy na novém materiálu.

Gen pro MtPAR v *Medicago truncatula* pozitivně ovlivňuje geny kódující enzymy zapojené do flavonoid-proanthokyanidinové dráhy (Verdier *et al.*, 2012). Měl by být tedy hojně exprimován u forem hrachu s pigmentovaným osemením. Amplifikace tohoto genu však neproběhla specificky, bylo to možná způsobeno tím, že nebyl zvolen přesný homolog. Bude potřeba provést další analýzy s použitím jiného homologního genu nebo navrhnout jiné primery.

Gen pro PsDFR byl nejvíce exprimován u pigmentovaných forem hrachu (JI64 a JI92), což odpovídá skutečnosti, že jde o klíčový gen uplatňující se v průběhu biosyntetické dráhy

proanthokyanidinů. Dále bylo pozorováno, že exprese tohoto genu v čase narůstala pouze u kulturního nepigmentovaného Cameoru. U genotypů JI64, JI92 a VIR320 nebyly pozorovány průkazné změny související se stářím semene. V publikaci Ferrara *et al.* (2014) byl pozorován podobný efekt u kultivaru Courier, což je kulturní hrách podobný v naší práci použitému genotypu JI92, ve kterém se akumulují PA (má pigmentované osemení). Exprese genu pro PsDFR byla stabilní od 6 do 20 DAA, pouze s jednou odchylkou, a to prudkým nárůstem a následným poklesem kolem 10 DAA.

Exprese genu pro PsLAR u planého pigmentovaného genotypu JI64 se stářím semene klesala, u ostatních tří genotypů měla rostoucí tendenci. Ferraro *et al.* (2014) analyzovali změny v expresi tohoto genu u kultivaru Courier, Exprese PsLAR v něm klesala, asi 12 DAA už dosahovala téměř nulových hodnot. Ve srovnání s genotypem JI92 testovaným v této bakalářské práci, který je také kulturní a pigmentovaný, je vývoj exprese tohoto genu opačný. V největší míře byl tento gen exprimován u kulturních genotypů (JI92 a Cameor). Teoreticky by však měl být exprimován nejvíce u forem s pigmentovaným osemením – opět se totiž jedná o gen zapojený do biosyntetické dráhy PA.

Ve stejné publikaci (Ferraro *et al.*, 2014) byl také pozorován pokles exprese genu PsANR s rostoucím stářím semene hrachu kultivaru Courier. Pokles však nebyl tak strmý jako u PsLAR. V této bakalářské práci byla snižující se exprese pozorována opět u planého a pigmentovaného JI64; u kulturního pigmentovaného JI92 a kulturního nepigmentovaného Cameoru měla exprese genu pro PsANR víceméně rostoucí tendenci. U planého nepigmentovaného genotypu VIR320 byla největší exprese tohoto genu naměřena ve vzorcích odebraných 10 a 30 DAA, naopak ve vzorcích odebraných 15 a 20 DAA byla zjištěna exprese nižší. Vzhledem ke srovnání s ostatními vzorky je pravděpodobné, že tato skutečnost byla způsobena technickou chybou, než že by se jednalo o fyziologický jev. Bude proto nutné další ověření na novém materiálu. Obecně byla největší exprese tohoto genu pozorována u kulturních forem (JI92 a Cameor), stejně jako u předchozího genu (PsLAR). Největší exprese byla předpokládána u spíše pigmentovaných genotypů, a ne u nepigmentovaného Cameoru, jak ukázala analýza.

U *Arabidopsis thaliana* byl charakterizován gen TT10, který kóduje protein velmi podobný polyfenoloxidázám typu lakáza. U tohoto genu byl prokázán vliv na oxidativní polymerizaci epikatechinu za tvorby žlutého a hnědého pigmentu, nebyl však potvrzen přímý vliv na polymerizaci flavan-3-olů na neoxidované formy PA. Během vývoje semen huseníčku pak exprese tohoto genu narůstala (Pourcel *et al.*, 2005). U bobovitých, včetně modelové tolice (*Medicago truncatula*), dosud nebyl homologní gen sledován.

Gen testovaný pro lakázu byl v této práci vybrán na základě Pea RNA Atlasu (INRA, Coelho 2014/15), kde je exprimován v dozrávajících semen hrachu (cv. Cameor). Není přitom zcela jisté, zda je vybraný homolog skutečně nejbližší homologní gen. Toto bude možné ověřit až po zveřejnění genomu hrachu (červen 2016). Výsledky komparativní analýzy ukázaly, že tento gen byl exprimován ve velmi nízké míře u všech genotypů. Výjimkou byl pouze prudký nárůst exprese 30 DAA u pigmentovaného kulturního genotypu JI92.

Vicilin je zásobní protein, který se nachází v embryonálním pletivu semen luskovin (Hauxwell, 1990), v této práci však exprese genu pro vicilin byla zjištěna v osemení všech testovaných genotypů; nezáleželo přitom na stáří semene. Je možné, že jde o kontaminaci vzorku zbytky děloh nebo embrya během preparace osemení, a nebo se opravdu jedná o nově zjištěnou expresi tohoto genu v pletivu osemení.

9 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo provést transkriptomickou analýzu genů exprimovaných během vývoje osemení planého (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) a kulturního (*Pisum sativum* subsp. *sativum*) hrachu, konkrétně těchto genotypů: planý s pigmentovaným osemením JI64, planý s nepigmentovaným osemením VIR320, kulturní s pigmentovaným osemením JI92 a kulturní kultivar s nepigmentovaným osemením Cameor. Podařilo se kvantifikovat expresi vybraných genů biosyntetické dráhy proantokyanidinů: PsDFR, MtMYB5, PsANR, PsLAR, lakázy, genu pro zásobní protein vicilin, aktinu byl použit jako referenční gen.

Komparativní transkriptomickou analýzou bylo zjištěno, že gen pro PsLAR, podílející se na tvorbě *trans*-flavan-3-olů z leukoanthokyanidinů byl nejvíce exprimován u kulturních forem hrachu, a to jak u genotypu s pigmentovaným osemením (JI92), tak i u kultivaru s osemením nepigmentovaným (Cameor). U obou byla rovněž naměřena největší exprese genu pro PsANR, který katalyzuje vznik *cis*-flavan-3-olů. Bylo zjištěno, že gen pro lakázu (jejíž homolog u *Arabidopsis* zprostředkovává oxidativní polymerizaci epikatechinu a tím tvorbu pigmentu) byl exprimován v překvapivě nízké míře u všech genotypů, výjimkou byl pouze prudký vzestup exprese u posledního vývojového stadia kulturního genotypu s pigmentovaným osemením (JI92). Gen pro PsDFR, který se zapojuje v počátcích biosyntetické dráhy PA, byl nejvíce exprimován u genotypů s pigmentovaným osemením (JI64 a JI92). Exprese genu pro MtMYB5 (jenž slouží jako transkripční faktor pro ANR) byla nejvyšší u pigmentovaného kulturního JI92

a naopak překvapivě nízká u pigmentovaného planého JI64. Gen pro vicilin byl exprimován ve velké míře u všech stádií všech genotypů hrachu.

10 Seznam zkratk

ABA – kyselina abscisová

ANR – anthokyanidin reduktáza

ANS – anthokyanidin syntáza

DAA – days after anthesis (dnů po vykvetení)

DEPC - diethyl pyrokarbonát

DFR – dihydroflavonal-4-reduktáza

F3H – flavanon-3-hydroxyláza

GA – gibereliny

GITC – guanidium thiokyanát-fenol-chloroform

LAR – leukoanthokyanidin reduktáza

MATE – multi-drug and toxic compound extrusion

MD – morfologická dormance

MPD – morfo-fyziologická dormance

MYB – myeloblastosis

NGS – next-generation sequencing

PA – proanthokyanidin

PCR – polymerázová řetězová reakce

PD – fyziologická dormance

PY – fyzikální dormance

qRT-PCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

SDS – dodecylsírán sodný

TBE – Tris + kyselina boritá + EDTA

TT – transparent testa

11 Reference

- Abrahams, 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. *The Plant Journal*, 35(5), 624-636.
- Aghamirzaie, D., Batra, D., Heath, L. S., Schneider, A., Grene, R., & Collakova, E. (2015). Transcriptome-wide functional characterization reveals novel relationships among differentially expressed transcripts in developing soybean embryos. *BMC Genomics*, 16(1), 1.
- Alves-Carvalho, S., Aubert, G., Carrère, S., Cruaud, C., Brochot, A. L., Jacquin, F., & Silva, C. (2015). Full-length de novo assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. *The Plant Journal*, 84(1), 1-19.
- Appelhagen, I., Thiedig, K., Nordholt, N., Schmidt, N., Huep, G., Sagasser, M., & Weisshaar, B. (2014). Update on transparent testa mutants from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of new alleles from an isogenic collection. *Planta*, 240(5), 955-970.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (1998). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Elsevier.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1), 1-16.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Li, X. (2000). Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*, 15(2), 139-152.
- Baskin, Jerry M., and Carol C. Baskin. "Nondeep complex morphophysiological dormancy in seeds of *Osmorhiza claytonii* (Apiaceae)." *American Journal of Botany* (1991): 588-593.
- Baudry, A., Heim, M. A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B., & Lepiniec, L. (2004). TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 39(3), 366-380.
- Berry, T., & Bewley, J. D. (1992). A role for the surrounding fruit tissues in preventing the germination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. A consideration of the osmotic environment and abscisic acid. *Plant Physiology*, 100(2), 951-957.
- Bewley, J. D., Bradford, K., & Hilhorst, H. (2012). *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. Springer Science & Business Media.
- Bewley, J. Derek, and Michael Black. *Seeds*. Springer Us, 1994.

- Bhalla, P. L., & Slattery, H. D. (1984). Callose deposits make clover seeds impermeable to water. *Annals of Botany*, 53(1), 125-128.
- Castell, A. G., Guenter, W., & Igbasan, F. A. (1996). Nutritive value of peas for nonruminant diets. *Animal Feed Science and Technology*, 60(3), 209-227.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M., & Lepiniec, L. (2003). Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *The Plant Cell*, 15(11), 2514-2531.
- Die, J. V., Román, B., Nadal, S., & González-Verdejo, C. I. (2010). Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta*, 232(1), 145-153.
- Dixon, R. A., & Steele, C. L. (1999). Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 4(10), 394-400.
- Dixon, R. A., Xie, D. Y., & Sharma, S. B. (2005). Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?. *New Phytologist*, 165(1), 9-28.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 15(10), 573-581.
- Dueñas, M., Estrella, I., & Hernández, T. (2004). Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). *European Food Research and Technology*, 219(2), 116-123.
- Ferraro, K., Jin, A. L., Nguyen, T. D., Reinecke, D. M., Ozga, J. A., & Ro, D. K. (2014). Characterization of proanthocyanidin metabolism in pea (*Pisum sativum*) seeds. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1.
- Frey, A., Godin, B., Bonnet, M., Sotta, B., & Marion-Poll, A. (2004). Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana glauca*. *Planta*, 218(6), 958-964.
- Gallardo, K., Le Signor, C., Vandekerckhove, J., Thompson, R. D., & Burstin, J. (2003). Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiology*, 133(2), 664-682.
- Garg, R. (2013). Transcriptome analyses in legumes: A resource for functional genomics. *The Plant Genome*, 6(3).
- Golombek, S., Rolletschek, H., Wobus, U., & Weber, H. (2001). Control of storage protein accumulation during legume seed development. *Journal of Plant Physiology*, 158(4), 457-464.

- Hamly, D. H. (1932). Softening of the seeds of *Melilotus alba*. *Botanical Gazette*, VolumeXCII, 345-375.
- Harris, W. M. (1987). Comparative Ultrastructure of Developing Seed Coats of " Hard-Seeded" and " Soft-Seeded" Varieties of Soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Botanical Gazette*, 324-331.
- Hauxwell, A. J., Corke, F. M., Hedley, C. L., & Wang, T. L. (1990). Storage protein gene expression is localised to regions lacking mitotic activity in developing pea embryos. An analysis of seed development in *Pisum sativum* XIV. *Development*, 110(1), 283-289.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994.
- Chamberlin, M. A., Horner, H. T., & Palmer, R. G. (1993). Nuclear size and DNA content of the embryo and endosperm during their initial stages of development in *Glycine max* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 1209-1215.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Imbert, E. (2002). Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 5(1), 13-36.
- Junker, A., Rohn, H., & Schreiber, F. (2012). Visual analysis of transcriptome data in the context of anatomical structures and biological networks. *Frontiers in Plant Science*, 3, 252.
- Kępczynski, J., Bihun, M., & Kępczynska, E. (1997). Ethylene involvement in the dormancy of *Amaranthus* seeds. *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*, 113-122.
- Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 242-258.
- Kitamura, S., Matsuda, F., Tohge, T., Yonekura-Sakakibara, K., Yamazaki, M., Saito, K., & Narumi, I. (2010). Metabolic profiling and cytological analysis of proanthocyanidins in immature seeds of *Arabidopsis thaliana* flavonoid accumulation mutants. *The Plant Journal*, 62(4), 549-559.
- Koornneef, M. (1990). Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service*.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., & Caboche, M. (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 405-430.

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

Ma, F., Cholewa, E. W. A., Mohamed, T., Peterson, C. A., & Gijzen, M. (2004). Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. *Annals of Botany*, 94(2), 213-228.

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

Messerschmidt, A., & Huber, R. (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *European Journal of Biochemistry*, 187(2), 341-352.

Miller, S. S., Jin, Z., Schnell, J. A., Romero, M. C., Brown, D. C. W., & Johnson, D. A. (2010). Hourglass cell development in the soybean seed coat. *Annals of Botany*, 101.

Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiha, T., Kamiya, Y., & Nambara, E. (2005). Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *The Plant Journal*, 41(5), 697-709.

Nelson, T., Gandotra, N., & Tausta, S. L. (2008). Plant cell types: reporting and sampling with new technologies. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(5), 567-573.

Nelson, T., Tausta, S. L., Gandotra, N., & Liu, T. (2006). Laser microdissection of plant tissue: what you see is what you get. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 181-201.

Offler, C. E., & Patrick, J. W. (1993). Pathway of photosynthate transfer in the developing seed of *Vicia faba* (L.): a structural assessment of the role of transfer cells in unloading from the seed coat. *Journal of Experimental Botany*, 44(4), 711-724.

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

Pourcel, L., Routaboul, J. M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2005). TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Cell*, 17(11), 2966-2980.

Ray, H., Bock, C., & Georges, F. (2015). Faba Bean: Transcriptome analysis from etiolated seedling and developing seed coat of key cultivars for synthesis of proanthocyanidins, phytate, raffinose family oligosaccharides, vicine, and convicine. *The Plant Genome*, 8(1) 1-11.

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

Romberger, J. A., Hejnowicz, Z., & Hill, J. F. (1993). *Plant structure: function and development. A treatise on anatomy and vegetative development with special reference to woody plants*. Springer-Verlag GmbH & Co. KG.

Smýkal, P., Vernoud, V., Blair, M. W., Soukup, A., & Thompson, R. D. (2014). The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 1-19.

Sturm, A., & Tang, G. Q. (1999). The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science*, *4*(10), 401-407.

Sudheesh, S., Sawbridge, T. I., Cogan, N. O., Kennedy, P., Forster, J. W., & Kaur, S. (2015). *De novo* assembly and characterisation of the field pea transcriptome using RNA-Seq. *BMC Genomics*, *16*(1), 611.

Tanner, G. J., Francki, K. T., Abrahams, S., Watson, J. M., Larkin, P. J., & Ashton, A. R. (2003). Proanthocyanidin biosynthesis in plants purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(34), 31647-31656.

Van Dongen, J. T., Ammerlaan, A. M., Wouterlood, M., Van Aelst, A. C., & Borstlap, A. C. (2003). Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. *Annals of Botany*, *91*(6), 729-737.

Verdier, J., Zhao, J., Torres-Jerez, I., Ge, S., Liu, C., He, X., ... & Udvardi, M. K. (2012). MtPAR MYB transcription factor acts as an on switch for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, *109*(5), 1766-1771.

Vinter, V. (2008). Rostliny pod mikroskopem. *Základy anatomie cévnatých rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta*.

Vitale, A., & Bollini, R. (1995). Legume storage proteins. *Seed Development and Germination*, 73-102.

Wang, H. L., Wang, L., Tian, C. Y., & Huang, Z. Y. (2012). Germination dimorphism in *Suaeda acuminata*: a new combination of dormancy types for heteromorphic seeds. *South African Journal of Botany*, *78*, 270-275.

Weber, H., Borisjuk, L., & Wobus, U. (1996). Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *The Plant Journal*, *10*(5), 823-834.

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

Weber, H., Rolletschek, H., Heim, U., Golombek, S., Gubatz, S., & Wobus, U. (2000). Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing seeds of *Vicia narbonensis* moderately decreases starch but increases protein content and affects seed maturation. *The Plant Journal*, *24*(1), 33-43.

Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, *126*(2), 485-493.

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

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