

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Radka Vaculíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Studium genu pro polyfenol oxidázu ve
vývoji osemení hrachu (*Pisum* sp.)**

Diplomová práce

Radka Vaculíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

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

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Radka Vaculíková

Název práce: Studium genu pro polyfenol oxidázu ve vývoji osemení hrachu (*Pisum* sp.)

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

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

Rok obhajoby práce: 2021

Klíčová slova: hrách, lakáza, lignifikace, ochrana, osemení, polyfenol oxidáza

Počet stran: 60

Počet příloh: -

Jazyk: čeština

SOUHRN:

Předložená diplomová práce se zabývá zejména genem kódujícím polyfenol oxidázu. Jedná se o enzym, který je důležitý jak pro ochranu rostliny, semene před patogeny, v procesech lignifikace a má také hlavní roli v procesech enzymatického hnědnutí u rostlin.

Teoretická část pojednává o vývoji semene a jeho jednotlivých částích. Další část je věnována především enzymům, které se podílí na ochraně rostlin. Jedním z nejdůležitějších enzymů je polyfenol oxidáza, spadající do velké rodiny „multi-copper“ oxidáz, které obsahují: katechol oxidázu, lakázu, tyrozinázu (krezolázu) a askorbát oxidázu. Polyfenol oxidáza využívá molekulární kyslík k oxidaci fenolických látek za vzniku reaktivních o-chinonů, které mají za následek hnědnutí, ale i mohou vytvářet bariéry zesíťováním molekul.

Praktická část obsahuje *in silico* analýzu genomu hrachu pomocí homologních lakázových (LAC 1 -17) genů *Arabidopsis thaliana*. Dále byla analyzována genová exprese nalezených genů ve vybraných pletivech hrachu – listu, kořene, květu, osemení a embrya. Přítomnost různých transkriptů byla ověřena pomocí specifických primerů. Jelikož mezi potencionální substráty polyfenol oxidázy patří i látky ze skupiny flavonoidů, bylo měřeno množství rozpustných a nerozpustných proantokyanidinů v osemení jak planých, tak kulturních genotypů hrachu. Produkty jejich oxidace, kam patří i taniny, mají za následek hnědnutí pletiv rostlin. Při sekvenování bylo analyzováno celkem 90 genotypů geograficky různě pěstovaného kulturního hrachu a byla odhalena

souvislost mezi funkčností polyfenol oxidázy a zbarvení hila. Mezi další testy, které byly provedeny v rámci práce byla analýza obsahu ligninu pomocí acetyl bromidové metody a také byla testována aktivita polyfenol oxidázy u celých semen hrachu. Vztah mezi funkčností polyfenol oxidázy a barvou hila byl testován na rekombinantních inbredních liniích.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Radka Vaculíková

Title: Study of polyphenol oxidase during the pea (*Pisum* sp.) seed coat development

Type of thesis: Master

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: doc. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Keywords: cell wall, laccase, lignification, pea, polyphenol oxidase, protection, seed coat

Number of pages: 60

Number of appendices: -

Language: czech

SUMMARY:

The master master thesis focuses on gene encoding polyphenol oxidase in pea. It is an important enzyme for the protection of plants and seeds against pathogens, plays a role in lignification processes and also in enzymatic browning.

Introduction part describes the development and structure of the seed. The next part is devoted to the enzymes that are involved in plant protection. One of the most important enzymes is polyphenol oxidase, which belongs to a large family of "multi-copper" oxidases, which include: catechol oxidase, laccase, tyrosinase (cresolase) and ascorbate oxidase. Polyphenol oxidase uses molecular oxygen to oxidize phenolic substances and form reactive o-quinones, which result in browning but can also form barriers by crosslinking molecules.

The practical part contains *in silico* analysis of the pea genome using *Arabidopsis thaliana* laccase (LAC 1 -17) genes. Furthermore, the gene expression of selected pea homologous genes was analyzed in selected pea tissues - leaf, root, flower, seed and embryo. Since flavonoids are among potential substrates of polyphenol oxidase, the content of soluble and insoluble proanthocyanidins was measured in the seed coats of both wild and cultured pea genotypes. The products of their oxidation including tannins, has a consequences the browning of plant tissues. Sequencing analysis was analyzed of 90 genotypes of geographically spaced cultivated pea has revealed

connection between polyphenol oxidase functionality and hilum color. Furthermore the content of lignin using the acetyl bromide method was also determined as well as polyphenol oxidase activity in whole pea seeds. The relationship between functionality of polyphenol oxidase and hilum colour has been tested in recombinant inbred lines.

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Petra Smýkala, Ph.D. s použitím uvedených zdrojů.

V Olomouci dne

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu práce doc. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D., za odborné rady, veškerou obětavou pomoc a trpělivost během vypracování práce. Další poděkování patří všem pracovníkům katedry botaniky, PřF UPOL, kteří mi pomohli a poskytli příjemné pracovní prostředí. Diplomová práce vznikla za podpory projektů Grantové agentury ČR (19-07155S) a Grantové agentury UP Olomouc (PrF-2020-003).

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Cíle práce.....	2
3 Literární přehled	3
3.1 Vývoj semene	3
3.1.1 Embryo	3
3.1.2 Endosperm.....	4
3.1.3 Osemení.....	4
3.2 Dormance semen.....	5
3.2.1 Klasifikace typů dormance	6
3.3 Složení a ochrana semene	8
3.3.1 Složení semene	8
3.3.2 Ochrana semene.....	9
3.4 Polyfenol oxidáza (PPO)	11
3.4.1 Složení PPO enzymu	12
3.4.2 Proteinová struktura PPO	15
4 Materiál a metody.....	18
4.1 Biologický materiál.....	18
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	19
4.2.1 Použité soupravy	20
4.2.2 Použité roztoky a jejich příprava	20
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	21
4.4 Použitý software	22
4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	22
4.5.1 <i>In silico</i> identifikace a charakterizace <i>Pisum sativum</i> lakázových genů.....	22
4.5.2 Izolace RNA	22
4.5.3 Odstranění zbytků genomické DNA	23
4.5.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace.....	24
4.5.5 Přepis RNA do cDNA	24
4.5.6 Polymerázová řetězová reakce	24
4.5.7 Horizontální gelová elektroforéza	26
4.5.8 Sekvenování	27
4.5.9 Analýza rozpustných proantokyanidinů	27

4.5.10 Analýza nerozpustných proantokyanidinů	28
4.5.11 Analýza ligninu	28
4.5.12 Analýza celých semen pro aktivitu PPO	29
5 Výsledky	30
5.1 <i>In silico</i> analýza	30
5.2 Analýza genové exprese v jednotlivých pletivech.....	35
5.3 Měření množství proantokyanidinů	36
5.4 Analýza ligninu.....	37
5.5 Analýza celých semen pro aktivitu polyfenol oxidáz.....	38
5.6 Sekvenování.....	41
6 Diskuze	46
7 Závěr	50
8 Použitá literatura	51

Seznam zkratek

BLAST	basic local alignment search tool
bp	páry bází
cDNA	komplementární DNA
DAP	dny po opylení (days after pollination)
DMACA	4-(dimethylamino)cinnamaldehyd
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
LAC	lakáza
PA	proantokyanidiny (rozpuštěné taniny)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPO	polyfenol oxidáza
RIL	rekombinantní inbrední linie
RNA	ribonukleová kyselina
RNA-Seq	RNA sekvenování

Seznam obrázků

Obrázek 1: Reakce enzymatického hnědnutí	12
Obrázek 2: Zjednodušený reakční mechanismus oxidace lakáz	14
Obrázek 3: Chromozomová lokalizace polyfenol oxidáz, askorbát oxidáz a lakáz (pozice jsou číslovány od spodní části chromozomu)	31
Obrázek 4: „Multiple alignment“ aminokyselinových sekvencí hrachových lakáz	32
Obrázek 5: Fylogenetická analýza 17 LAC genů <i>Arabidopsis thaliana</i> a jejich 23 LAC <i>Pisum</i> sp. homologů.....	33
Obrázek 6: Fylogenetická analýza LAC homologů a její rozdělení	34
Obrázek 7: Elektroforetické rozdělení RT-PCR produktů exprese sledovaných genů.	35
Obrázek 8: Měření rozpustných PA v osemeni hrachu.....	36
Obrázek 9: Měření nerozpustných proantokyanidinů v osemeni hrachu	37
Obrázek 10: Analýzu ligninu v jednotlivých vývojových stádiích.....	38
Obrázek 11: Ukázka sekvencí s inzercí a delecí v pozicích 101 a 156 vede k předčasnému STOP kodonu.....	42
Obrázek 12: Fylogenetická analýza proteinových sekvencí studovaných genotypů ...	43
Obrázek 13: Ukázka zbarvení hila kulturní x plané (horní část obrázku kulturní, spodní část plané genotypy)	45
Obrázek 14: Ukázka zbarvení hila <i>pl a</i> (vlevo) a <i>PL A</i> (v pravo) (foto: genové banka John Innes Centrum, Norwich, Velká Británie)	45

Seznam tabulek

Tabulka 1: Složení semen kulturního hrachu	8
Tabulka 2: Vývojová stádia genotypů.....	18
Tabulka 3: Seznam primerů	25
Tabulka 4: Objemy jednotlivých reagensů pro přípravu reakční směsi	26
Tabulka 5: Teplotní průběh reakce.....	26
Tabulka 6: Objemy jednotlivých reagensů pro přečištění DNA před sekvenováním ..	27
Tabulka 7: Testované linky s informacemi o zbarvení a typu PPO alely (Alela A odpovídá JI64 a alela B genotypu JI92).....	39
Tabulka 8: Analýza polymorfismů v 90 genotypech.....	41
Tabulka 9: Funkčnost PPO genu v souvislosti se zbarvením hila v jednotlivých genotypech.....	44

1 Úvod

Rostliny si během evoluce našly různé mechanismy přizpůsobení k podmínkám prostředí. Důležitým bodem je strategie semene vyklíčit ve správnou dobu, tak aby nedošlo k uhynutí celé rostliny vlivem nepříznivých podmínek. Jedním z důležitých mechanismů regulující klíčení semen, je mechanismus dormance. Existuje několik typů dormance semen, kde fyzikální typ je zprostředkován regulací vstupu vody do semene. Semeno vzniká procesem dvojitého oplození, kdy postupně vzniká embryo, endosperm a osemení. Právě osemení má velmi důležitou úlohu v ochraně embrya před biotickými a abiotickými faktory, zároveň zprostředkovává komunikaci s okolím a embryem. Ochrannou funkci může zastupovat osemení jako takové, protože na svém povrchu může mít nepropustnou vrstvu suberinu. Osemení také může být vyztuženo ligninem, ale obsahuje i jiné fenolické látky. Polyfenol oxidáza (PPO) je jedním z důležitých enzymů v rostlině. Podílí na oxidaci o-difenolů za vzniku o-chinonů, které následně mohou polymerovat a vytvářet hnědo-černý pigment. Podílí se také na lignifikaci buněčné stěny, vykazují antimikrobiální aktivitu a tvoří kyslíkové radikály. PPO patří do širší skupiny enzymů (multi-copper oxidases), společně s lakázami, katechol oxidázami, krezolázami (tyrozinázami) a askorbát oxidázami. „Multi-copper“ oxidázy patří mezi superrodinu oxidoreduktáz, které jsou schopné katalyzovat oxidaci různých aromatických sloučenin s doprovodnou redukcí kyslíku na vodu. Na rozdíl od peroxidáz neobsahují jako kofaktor železo, ale obsahují atomy mědi. Katalytické centrum tvoří čtyři měďnaté ionty.

Cílem předložené diplomové práce je analyzovat genovou expresi a enzymatickou aktivitu polyfenol oxidázy v osemení planého (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) a kulturního hrachu (*Pisum sativum* subsp. *sativum*).

2 Cíle práce

- 1) Teoretická část: literární rešerše na téma vývoje semen a klíčení.
- 2) Praktická část: sekvenční analýza genu pro polyfenol oxidázu (PPO) ve vybraných genotypech hrachu, analýza genové exprese během vývoje semen pomocí, detekce PPO enzymu.

3 Literární přehled

3.1 Vývoj semene

Hrách setý (*Pisum sativum* L.) patří mezi krytosemenné rostliny do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Stejně jako u ostatních krytosemenných rostlin vzniká semeno procesem dvojitého oplození, kdy se z oplozené vaječné buňky vyvine diploidní zygota (embryo) a z oplozeného diploidního jádra vznikne triploidní endosperm. Vaječné obaly zahrnují na jednom konci otvor klovy (mikropolární pól), kterým vnikla pylová láčka během procesu oplodnění a po tomto otvoru zůstane na semeni jizva. Druhý konec vaječných obalů obsahuje chalázu (chalazální pól), kde se vajíčko připojuje k poutku a zde se vytváří tzv. pupek (hilum). Z vaječných obalů se tvoří osemení. Poslední složkou semene je perisperm, který vzniká z nucelu. Semeno je jak geneticky, tak i fyziologicky heterogenní, protože obsahuje osemení mateřského původu a embryo, které je hybridního mateřského a otcovského původu (Weber *et al.*, 2005).

Vývoj semene u krytosemenných rostlin zahrnuje tři stádia. 1) Stádium morfogeze, kdy probíhá vývoj embrya, endospermu, perispermu a osemení. 2) Stádium zrání (maturace) při kterém dochází k akumulaci zásobních látek a k zvětšování semene. 3) V konečné fázi (vysychání - desikace) probíhá dehydratace semene, které se následně postupně se uvolňuje od mateřské rostliny a může přejít do klidového stádia dormance (Vinter, 2009).

Vývoj semene hrachu odpovídá tomuto schématu. Byly také identifikovány tři stádia se dvěma zpozdžujícími se fázemi. První fáze je spojena s vývojem endospermu a osemení, druhá fáze s vývojem embrya. Třetí fáze je období zrání a zvětšování buněk díky ukládání zásobních látek jako jsou polysacharidy a proteiny (Weber *et al.*, 2005).

3.1.1 Embryo

Po oplození zárodečné mateřské buňky a následných mitózách vzniká apikální buňka a bazální buňka. Z apikální buňky vzniká značná část embrya a z bazální buňky se vyvine suspensor, kterým je embryo připojeno ke stěně zárodečného vaku. Vývoj embrya se skládá z několika fází: lineární, globulární, srdčitá, hruškovitá a jsou zakončena zralým embryem (Vinter, 2009).

Vlastní embryo se skládá ze dvou děloh, v nichž se během embryogeneze ukládají zásobní látky. Jádra těchto děložních buněk jsou často polyploidní. Dále v embryu najdeme hypokotyl, ke kterému jsou připojeny dělohy, plumulu, která se nachází mezi dvěma dělohami a radikulu, což je meristematický základ kořene. Diferenciace embrya je druhově různorodá, ale u čeledi bobovitých, kde většinou není ve zralém semeni přítomen endosperm, embryo vyplňuje téměř celý obsah semene (Vinter, 2009; Bewley *et al.*, 2013).

3.1.2 Endosperm

Endosperm je pletivo, které vyživuje embryo během vývoje. Vzniká z centrální buňky zárodečného vaku. U bobovitých se endosperm téměř nevyskytuje, protože je spotřebován embryem během zrání semene a zásobní látky jsou uloženy přímo v dělohách (Vinter, 2009; Lackey, 2010).

3.1.3 Osemení

Osemení vzniká z vaječných obalů (integumenta) vajíčka, bobovité rostliny mají jen dva vaječné obaly a během vývoje vnitřní obal zmizí. Vývoj osemení je započat ihned po oplození a vzniku embrya, avšak jeho vývoj není závislý na vývoji embrya nebo endospermu (Chaudhury *et al.*, 2001). Osemení hraje důležitou roli při vývoji, klíčení a dormanci semen (Moïse *et al.*, 2005).

Slouží jako ochranná bariéra mezi embryem a vnějším prostředím. Vnější vrstvy osemení jsou často impregnované nepropustnými tuky/vosky (např. suberin) a pokrývají celé semeno, kromě pupku. Dále se pod kutikulou nachází epidermis, hypodermis a vnitřní parenchym. Buňky osemení mohou být mechanicky vyztuženy ligninem, také mohou obsahovat polyfenolické nebo obsahovat krystalické látky určené k ochraně. Tyto překážky neslouží jen k ochraně, ale také tvoří bariéru proti průniku vody a vzduchu dovnitř semene (Bewley *et al.*, 2013).

Buňky epidermis jsou protažené v radiálním směru (makroklereidy, Malphighiho buňky), jsou nepravidelně ztloustlé a vytvářejí palisády (Vinter, 2009), které jsou pokryty suberinem a kutinem. Tloušťka osemení se mění během jeho vývoje (Verdier *et al.*, 2013). Koncová čepička makroklereid je od zbytku buněk oddělená světlolomnou vrstvou tzv. *light line* nebo *linea lucida* (LL), která se zdá být hlavní

bariérou průniku vody (Bhalla *et al.*, 1984; Harris, 1987; Smýkal *et al.*, 2014; Jánská *et al.*, 2019).

Subepidermální vrstva se dělí na osteosklereidy a lagenosklereidy. Obsahuje mezibuněčné prostory vyplněné vzduchem a s tím souvisí výměna plynů a vysoušení semene (Smýkal *et al.*, 2014).

Vnitřní vrstva neboli „živná vrstva“ (Van Dongen *et al.*, 2003) se skládá z parenchymatických buněk, které jsou ve více vrstvách (5-12 buněčných vrstev) a naléhají přímo k endospermu (Hamly, 1932). Některé druhy mají tuto vrstvu silně protkanou cévními svazky, ale v případě bobovitých se zde nachází jen jeden cévní svazek s dvěma větvemi (Spurný, 1963). Kalóza vyskytující se v parenchymu, tvoří bariéru pro absorpci vody, u hrachu však nebyla nalezena (Jánská *et al.*, 2019).

Barva a struktura osemení je většinou pro daný druh typická, což je dáno geneticky, ale její vývoj může být ovlivněn podmínkami prostředí. Na povrchu mohou vzniknout malé útvary nebo chemické sloučeniny, které jsou atraktivní pro zvířata, jenž pak pomáhají s jejich rozšířením (Bewley *et al.*, 2013).

3.2 Dormance semen

Dormance je dočasný klidový stav semene, kdy ve velké míře dochází k omezení fyziologických dějů. Dormantní rostliny nemusí vyklíčit, i když mají pro růst příznivé podmínky (Baskin *et al.* 2004). Jedná se o strategii rostliny, kdy klíčení a růst probíhá v tu nejlepší dobu za účelem, aby klíčení neskončilo úhynem. Během evoluce dormance se vyvinula u mnoha druhů a čeledí rostlin, jako odezva na nepříznivé podmínky prostředí (extrémní chlad, vlhko či vysoké teploty). V závislosti na typu dormance existuje geografický gradient. Nejčastěji se objevuje u druhů vzdálenějších od rovníku, protože zde častěji dochází k výkyvům teplot a srážek (období dešťů x období sucha, sezonalita) (Baskin *et al.*, 1998; Bewley *et al.*, 2013).

Dormance je kvantitativní znak, který je podmíněný více geny a také je ovlivněn různými faktory, jakou jsou vhodná teplota a vlhkost, přítomnost kyslíku, množství a kvalita (složení) světla i mnoho hormonálních procesů (Koornneef *et al.*, 2002). Jednou z hormonálních a zároveň inhibičních látek je kyselina abscisová (ABA), její vysoká hladina v případě fyziologického typu dormance souvisí s dormancí. Právě inhibiční látky, jako např. fenolické látky, mohou být důvodem proč semena neklíčí. Přítomnost

fenolických látek a aktivita katechol oxidázy, vykazují pozitivní korelaci s nepropustností osemení (Smýkal *et al.*, 2014). Nepřekonatelné mechanické překážky, nevyvinuté embryo a pigmentace osemení také ovlivňují klíčení semen (Bewley, 1997; Tůma *et Tůmová* 1998; Bradford *et Nonogaki*, 2007; Smýkal *et al.*, 2014).

Některé druhy jsou schopné zůstat v dormantním stavu několik měsíců, roků, století až tisíciletí. Svědčí o tom i důkazy v podobě semen palmy datlové (*Phoenix dactylifera*), která byla nalezena v Izraeli u ní se stáří datuje do prvního staletí našeho letopočtu. Na Sibiři v permafrostu byla nalezena semena silenky (*Silene stenophylla*), která byla stará dokonce 31 tisíc let. I takto prastará semena klíčila, rostla jako normální současná rostlina a ty byly schopny dále vyprodukovat životaschopná semena. (Sallon *et al.*, 2008, Yashina *et al.*, 2012). V půdě může být skryto mnoho nevyklíčených semen, formujících tzv. půdní semennou banku. Tato semena začnou klíčit po určitých specifických podmínkách jako jsou například zaplavení, oheň apod. (Campbeel *et al.*, 2008; Finkelstein *et al.*, 2008).

3.2.1 Klasifikace typů dormance

Mezi prvními, kdo začal rozřazovat dormanci do několika skupin byl Harper (1977) který rozlišil tři typy. **Primární neboli vrozený typ**, mají semena dormantní již na mateřské rostlině a nejsou schopna vyklíčit. Pro vyklíčení je potřebné semena vystavit takovým podmínkám, aby byly schopny dormanci překonat (Begon *et al.*, 1997). **Sekundární dormance** je způsobena nepříznivými vnějšími podmínkami, které klíčení zastaví. Posledním typem je **dormance indukovaná**, která je fyziologicky podobná primární. K ukončení takové dormance nestačí jen příznivé podmínky, ale další impuls navíc (Baskin *et Baskin* 1998; Šerá, 2012).

Dále můžeme dormanci klasifikovat do pěti tříd: fyziologická (physiological dormancy - PD), morfologická (morphological dormancy - MD), morfofyziologická (morphophysiological dormancy - MPD), fyzická (physical dormancy - PY) a kombinovaná (PY + PD) (Baskin *et Baskin*, 2004).

Dormance fyziologická (PD)

Jedná se o nejrozšířenější formu dormance zahrnující hormonální metabolismus kyseliny abscisové (ABA) a giberelinů (GA). Tyto dva hormony působí protichůdně, předpokládá se, že kyselina abscisová podporuje dormanci naopak gibereliny indukují

klíčení. Oba tyto fytohormony tak navzájem regulují začátek, udržování a ukončení vegetačního klidu. Pro tyto účinky je důležitý správný poměr koncentrací hormonů, např. když máme nízkou hladinu ABA, tak pro začátek klíčení stačí nízká koncentrace GA. Další fytohormonem podílejícím se na ukončení dormance je ethylen, působící především při dozrávání plodů, klíčení a opadu listů, ale také reaguje s ABA a snižuje citlivost semene k této kyselině (Tůma *et* Tůmová 1998; Baskin *et* Baskin, 2004). Fyziologický typ dormance se vyskytuje u celé řady rozmanitých čeledí: *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Plantaginaceae*, *Solanaceae* (Ainsley *et al.*, 2008; Baskin *et* Baskin, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

Dormance morfologická (MD)

Objevuje se u semen, kde není řádně vyvinuté embryo a potřebuje delší čas pro ukončení vývoje a následné klíčení. Pro ukončení této dormance není potřeba specifických podmínek. Za normálních podmínek dozrají během pár dnů a následně vyklíčí do 30 dnů (Baskin *et* Baskin, 1998; Baskin *et* Baskin, 2004). Tento typ dormance zahrnuje čeledi: *Apiaceae*, *Arecaceae*, *Orchidaceae*, *Ranunculaceae* atd. (Vandelook *et al.*, 2009; Jaganathan, 2020).

Dormance morfo-fyziologická (MPD)

Kombinace obou předchozích typů, zahrnuje fyziologické podmínky způsobující dormanci, ale také semena s nevyvinutým embryem. Zahrnuje čeledi, které mohou mít oba předchozí typy dormance: *Apiaceae*, *Arecaceae*, *Liliaceae*, *Ranunculaceae* atd. (Vandelook *et al.*, 2009; Dhyani *et al.*, 2013; Baskin *et* Baskin, 2020; Jaganathan, 2020). Stratifikací lze ukončit toto období vegetačního klidu. Jedná se o vystavení semen nejprve nízké teplotě a následně vysoké nebo naopak. Při studené stratifikaci dochází k odbourávání ABA, a tak dojde k následnému zvýšení GA, nebo začátek klíčení může být podpořen aplikací giberelinů (Nikolaeva, 1977; Baskin *et* Baskin, 1998; Baskin *et* Baskin, 2004).

Dormance fyzická (PY)

Fyzická dormance je způsobena tzv. tvrdosemeností. V osemení se nachází vrstva palisádových buněk, které nepropustí jak vodu, tak plyny. Vyskytuje se nejméně u 17 čeledí např. *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Cannaceae*, *Convolvulaceae* atd. PY lze najít jen u předků kulturních plodin těchto čeledí, protože domestikací tento typ byl odstraněn

(Baskin *et al.*, 2000; Finch-Savage *et al.*, 2006; Smýkal *et al.*, 2014). Fyzickou dormanci lze narušit změnou podmínek, zvýšením vlhkosti, mechanickým obrušováním, ručním nebo půdním obrušováním, mikrobiálním působením nebo průchodem přes zvířecí trávící systém, které mohou obsahovat silné kyseliny (Baskin *et al.*, 2000; Jánská *et al.*, 2019).

Dormance kombinovaná (PY + PD)

Osemení není propustné pro vodu a zároveň mají semena dormantní embrya. Klíčení může započít jedině tehdy, když jsou překonány oba typy dormance (Barton, 1934; Baskin, *et Baskin*, 1998; 2004).

3.3 Složení a ochrana semene

3.3.1 Složení semene

Semena hrachu setého obsahují velké množství důležitých živin jako jsou bílkoviny, vláknina, škrob, vitamíny, minerály (viz Tabulka č. 1) a proto jsou využívány pro výživu člověka a krmení hospodářských zvířat.

Tabulka 1: Složení semen kulturního hrachu (převzato a upraveno z Dahl *et al.*, 2012)

Složka	Koncentrace (%)
Bílkoviny	21,2 – 32,9
Škrob	36,9 – 49,0
Rezistentní škrob	2,1 – 6,3
Amylóza	20,7 – 33,7
Celková vláknina	14,0 – 26,0
Nerozpustná vláknina	10,0 – 15,0
Rozpustná vláknina	2,0 – 9,0
Rozpustné cukry	5,3 – 8,7
Celkové lipidy	1,2 – 2,4
Popeloviny	2,3 – 3,4

Obsah bílkovin velmi kolísá a pohybuje se od 13,7 do 30,7 % v závislosti na genetickém faktoru i podmínkách prostředí. Avšak jeho průměrná hodnota se pohybuje kolem 22 %, většinu tvoří zásobní proteiny, globuliny (legumin, vicinin)

(Tzitzikas *et al.*, 2016). Bílkoviny hrachu obsahují esenciální aminokyseliny jako jsou lysin, leucin, tryptofan, které se vyskytují ve větším množství (Dahl *et al.*, 2012). Největší zastoupení mají sacharidy, především pak škrob a vláknina. Škrob je složený z amylózy, lineárního glukanu a amylopektinu. Právě na poměru amylózy a amylopektinu závisí stravitelnost škrobu. Mezi další sacharidy můžeme řadit hlavně sacharózu a její deriváty rafinózu (trisacharid), stachyózu (tetrasacharid) a verbaskózu (pentasacharid), jenž pomáhají se vyrovnat rostlině s abiotickým stresem (Chibbar *et Baga*, 2003; Dahl *et al.*, 2012). Naopak v nejnižším množství jsou zastoupeny lipidy, jejichž obsah je okolo 1 %. Z minerálních látek můžeme v semenu hrách najít draslík (1,04 %), fosfor (0,39 %), hořčík (0,1 %) a vápník (0,08 %) (Dahl *et al.*, 2012). Jako ostatní luštěniny, tak i hrách obsahuje různé fenolické sloučeniny (taniny, fenolové kyseliny a flavonoidy), fytáty, saponiny. (Dahl *et al.*, 2012). Fenolové sloučeniny hrají zřejmě důležitou roli v nepropustnosti osemení. Marbach a Mayer (1974) usuzovali, že podmínky během vysychání semen mají vliv na pigmentaci osemení a následnou propustnost osemení. Tmavě pigmentovaná semena byla nepropustná pro vodu, ale pro vznik pigmentace byla nutná přítomnost vzduchu při sušení. Pro hnědnutí je tedy důležitá přítomnost kyslíku. Jedním z enzymů způsobující hnědnutí je katechol polyfenol oxidáza, která se více vyskytuje v osemení planého hrachu a také hraje důležitou roli v ochraně semene.

3.3.2 Ochrana semene

Rostliny při napadení, využívají několik mechanismů obrany. Mohou si vytvořit fyzickou bariéru, díky které semena nejsou přístupná pro patogeny. Dále k obranným mechanismům patří rychlé klíčení a asociace s mikroorganismy (Dalling *et al.*, 2011). V kombinaci s fyziologickou dormancí, lze aplikovat i biochemickou ochranu založenou na enzymech. Mezi ochranné enzymy patří polyfenol oxidázy, peroxidázy, chitinázy a oxalát oxidázy nacházející se v osemení. Tyto enzymy se mohou rovněž zapojovat do metabolismu kyslíku, vytvářet kyslíkové radikály, přispívat k zesíťování extracelulární matrice (Fuerst *et al.*, 2014).

Peroxidázy

Enzymy se skupiny oxidoreduktáz, jenž se dělí na hemové peroxidázy a nehemové peroxidázy. Hemová peroxidázy se dále dělí na dvě superrodiny, které mají hemovou skupinu vytvořenou z protoporfyrinu IX a Fe (III) (Banci, 1997, Pollard, 2018). U rostlin se vyskytují 3 typy peroxidáz sdílející podobnou proteinovou strukturu, ale mají jinou

aminokyselinovou sekvenci. První typ zahrnuje cytochrom-c peroxidázu, askorbát peroxidázu a kataláza peroxidázu. Ve třídě II najdeme houbové peroxidázy mající hlavní roli v biodegradaci ligninu. Peroxidázy typu III jsou glykoproteiny, které jsou sekretovány do buněčných stěn a vakuol. Obsahují dva ionty Ca^{2+} pro větší strukturní stabilitu, katalyzují jedoelektronovou oxidaci od různých donorů vodíku (fenoly, prekuzory ligninu, auxin), čímž snižují H_2O_2 . Patří sem peroxidázy křenu (HRP), arašídovou peroxidázu (PNP), sójovou peroxidázu (SBP) atd. Hrají klíčovou roli v životním cyklu rostlin, podílí se na ochraně rostlin při napadení patogenem nebo při poranění. Produkce kyslíkových radikálů patří mezi aktivní ochranu, kdežto pasivní obrana zahrnuje lignifikaci prostřednictvím zesílení a inhibuje penetraci hyf (Fuerst *et al.*, 2014; Pandey *et al.*, 2017; Pollard, 2018).

Chitinázy

Chitin je hojně přítomen v houbách, v některých buněčných stěnách řas, v bakteriích a v exoskeletu bezobratlých. Chitináza je glykosylhydroláza, která katalyzuje štěpení β -1,4-glykosidické vazby chitinu (Fuerst *et al.*, 2014). V rostlinách se chitinázy podílejí na ochraně před biotickým a abiotickým stresem, tak i v růstových a vývojových procesech. Klasifikace je velmi složitá vzhledem k velké rozmanitosti enzymů, specifické molekulární struktury, velikosti, umístění v organismu, specifitě substrátu a katalytickému mechanismu. Většina rostlinných chitináz jsou endochitinázy, které se náhodně štěpí uvnitř polymeru a produkty jsou nízkomolekulární oligomery: chitotrióza a chitotetraóza (Grover, 2012).

Podskupinou chitináz jsou proteiny, které jsou spojeny s patogenezí (PR proteiny). PR proteiny byly původně objeveny jako proteiny, které jsou indukovány v hostitelských buňkách v reakci na patogenezí, následně se ukázalo, že PR proteiny jsou také indukované v reakci na různé abiotické stresy (sucho, sůl, chlad, těžké kovy a UV světlo) a podílejí se na regulaci růstu rostlin. Další možností, jak se mohou rostliny chránit, je posílením vztahů s prospěšnými mikroby. Tímto způsobem mohou zvýšit ochrannou kapacitu na povrchu semen. Rostlinné chitinázy také napomáhají skladování vápníku, což může zvýšit stabilitu nebo poskytnout rezervoár vápníku k využití pro mechanismy ochrany semen (Grover, 2012; Pollard, 2018).

Oxalát oxidáza

Jednou ze dvou podskupin v rámci rodiny germinálních proteinů (kupiny) jsou oxalát oxidázy. Jsou někdy označovány jako „pravé germiny“ a jsou kódovány velkou homogenní skupinou genů přítomných jen v obilovinách. Druhou skupinou jsou germin-like proteiny, které jsou na rozdíl od pravých germinů kódovány heterogenní skupinou genů, nacházejících se u různých druhů rostlin a vykazují funkce v organismu. Všechny oxalát oxidázy jsou glykoproteiny skládající se ze šesti monomerů a jako kofaktor je mangan (II). Katalyzují dvouelektronovou oxidační dekarboxylaci endogenního oxalátu na peroxid vodíku a oxid uhličitý. Nerozpustný krystalický oxalát vápenatý přítomný v rostlinných vakuolách a buněčných stěnách je dalším substrátem, jehož oxidace také poskytuje volný Ca^{2+} . Peroxid vodíku je jak přímo toxický pro patogeny, tak způsobuje peroxidační zesíťování a tím posiluje buněčnou stěnu (Requena *et Bornemann*, 1999; Pollard, 2018).

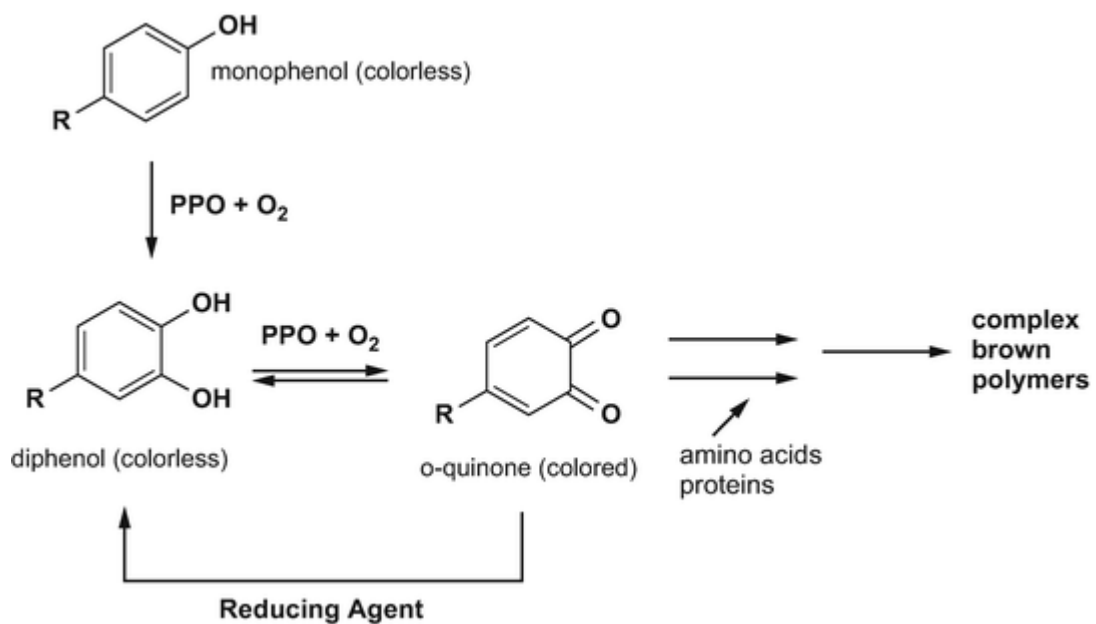
3.4 Polyfenol oxidáza (PPO)

Flavonoidy jsou široce rozšířené rostlinné sekundární metabolity odvozené z fenylypropanoidní dráhy, které chrání rostlinu před patogeny, predátory, UV zářením a mohou zvyšovat dormanci u semen. Vyznačují se dvěma aromatickými cykly spojené jedním heterocyklem, zahrnující flavonoly, antokyany a flavan-3-oly. Flavan-3-oly vedou k formaci proantokyanidinů (PA) neboli konzervovaných taninů, které se hromadí v integumentu nebo v chaláze. PAs jsou oxidovány do hnědých komplexů. Tyto hnědnoucí procesy jsou způsobeny oxidací fenolických sloučenin. V rostlinách mohou být katalyzovány polyfenol oxidázami (Dixon *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005; 2006; Liu *et al.*, 2014).

Rostlinné polyfenol oxidázy (PPO) jsou skupina enzymů, jejichž aktivita může vést k tvorbě hnědo-černých melaninových pigmentů. PPO enzymů se vyskytují napříč všemi druhy, zahrnující téměř všechny suchozemské rostliny a vykazují odlišné vzorce exprese. Rozmanitost v počtu genů, sekvenci, tkáňové a substrátové specifitě v rostlinných druzích naznačují, že PPO má dlouhodobou roli ve fitness (Tran *et al.*, 2012). Nejčastější rolí v organismech je ochrana před biotickým a abiotickým stresem, i když v posledních letech se objevují se různé další funkce. Enzymatické hnědnutí je důsledkem dvou oxidací, kdy v první fázi dochází k oxidací

monofenolů na o-difenoly a dále těchto produktů na o-chinony (viz Obrázek č.1). O-chinony se podílejí na lignifikaci buněčné stěny, snižují dostupnost živin zesíťováním molekul, tvorbu hnědých pigmentů, antimikrobiální aktivitu a tvorbu kyslíkových radikálů (Tran *et al.*, 2012; Boeckx *et al.*, 2015; Taranto *et al.*, 2017; Pollard, 2018).

V současnosti není jisté, jestli aktivita PPO je pro rostlinu přínosná nebo naopak škodlivá. Souvisí totiž i s akumulací reaktivních forem kyslíku a s celkovou hodnotou redoxního potenciálu. Disproporcionace o-chinonů může vést k tvorbě semichinonových radikálů, tyto radikály interagují mezi sebou a O₂, což vede k tvorbě superoxidových aniontů a regeneraci o-chinonu. Superoxidové anionty jsou velmi nestabilní a rychle dismutují za vzniku peroxidu vodíku (Grant *et Loake*, 2000). Důsledky jsou modifikace, včetně zesílení proteinů, peroxidace lipidů, poškození nukleových kyselin, případně až smrt buňky (Mayer *et al.*, 2006; Boeckx *et al.* 2015).



Obrázek 1: Reakce enzymatického hnědnutí (převzato z Jukanti, 2017)

3.4.1 Složení PPO enzymu

PPO je často chybně pojmenována a zaměňována za jiné enzymy s názvy tyrosináza, polyfenoláza, fenoláza, katechol oxidáza, kresoláza a katecholáza (Yoruk *et Marshall*, 2003). Složitější pojmenování může být i proto, že se nejedná o jeden enzym, ale patří do tří skupin: katechol oxidáza, lakáza a kresoláza neboli tyrozináza.

Krezoláza a tyrozináza

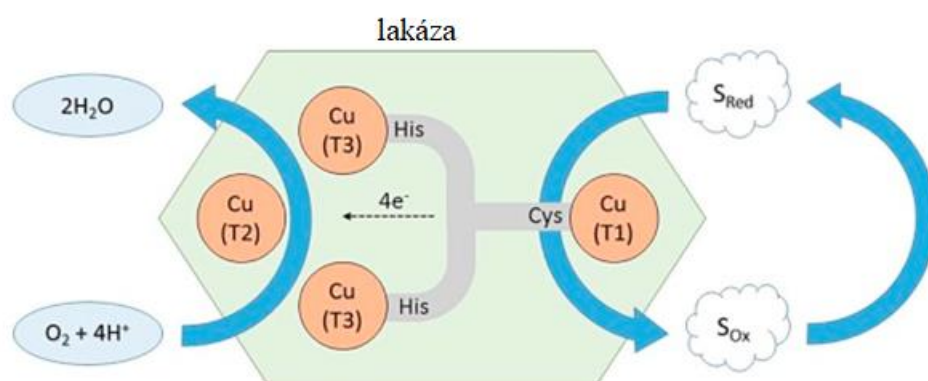
Krezoláza a tyrozináza jsou enzymy, jenž mají stejnou funkci a jedná se prakticky o jeden stejný enzym, který je různě pojmenován u zvířat (tyrozináza) a u rostlin (krezoláza) (Aniszewski *et al.*, 2008; Kaintz *et al.*, 2014). Katalyzují hydroxylaci a oxidaci monofenolů na o-difenoly a oxidaci difenolů na odpovídající o-chinony (Mayer *et al.*, 2006).

Katechol oxidáza

Katechol oxidáza katalyzuje oxidaci monofenolů na o-difenoly, ale i o-difenoly na o-chinony. Jedná se o glykosylované proteiny vázající měď ve dvou doménách za přítomnosti kyslíku jako kofaktoru (Marusek *et al.*, 2006). Z fyziologického hlediska je enzym velmi blízkým příbuzným lakázám, i právě proto je možné, že se v *Arabidopsis* katechol oxidáza nevyskytuje (Pourcel *et al.*, 2005).

Lakáza

Lakázy jsou různorodá skupina enzymů se širokou substrátovou specificitou, které katalyzují oxidaci širokého spektra fenolických substrátů. Podílí se na ochranné funkci v rostlinách, houbách, bakteriích a hmyzu, nenachází se jen v anaerobních organismech (Giardina *et al.*, 2010; Janusz *et al.*, 2020). Enzym byl poprvé izolován v roce 1883 z mízy čínského stromu *Rhus vernififera* (Yoshida, 1883). Lakázy obvykle obsahují dvě až tři domény. Tři domény najdeme u hub, hmyzu, rostlin a některých bakterií), dvě domény u jednoduchých bakterií (Komori *et* Higuchi, 2015). Aminokyselinová homologie je mezi těmito doménami velmi nízká, ale celkové uspořádání aktivních míst je vysoce konzervované. Lakázy obsahující tři koordinační centra (konkrétně typy I (T1), II (T2) a III (T3)), mají aktivní místo složené ze čtyř atomů mědi. Domény II a III váží O₂ a redukují ho na vodu, doména I neváže O₂, ale slouží k přenosu elektronů.



Obrázek 2: Zjednodušený reakční mechanismus oxidace lakáz (převzato a upraveno: Rodríguez *et al.*, 2015)

Lakázy se podílejí jak na anabolických, tak i katabolických reakcích. Katabolické procesy zahrnují degradaci ligninu a humusu, mezi anabolické reakce patří např. syntéza polymerních pigmentů, sklerotizaci kutikuly, syntézu polyflavonoidů a lignifikace (Dwivedi *et al.*, 2011; Janusz *et al.*, 2020).

V rostlinách má důležitou roli v biologických procesech, podílejících se na prodlužování buněk, lignifikaci, pigmentaci, hojení ran, na metabolismu železa, biosyntéze flavonoidů v posklizňové stabilitě na kvalitě vláken bavlny (McCaig *et al.*, 2005; Turlapati *et al.*, 2011).

U *Arabidopsis thaliana* (*At*) bylo identifikováno 17 *LAC* genů, které lze rozdělit do 6 fylogenetických tříd (McCaig *et al.*, 2005). *AtLAC* 15 se podílí hlavně na zbarvení osemení a prodlužování kořenů, *AtLAC* 8 a 2 regulují dobu kvetení a prodlužování kořene, *AtLAC* 4, 11, 15, 17 mají funkce při polymeraci ligninu, *AtLAC* 2, 5, 6, 12, 13, 14, 16 regulují různé hormony a jsou exprimovány v reakci na stres (Cai *et al.*, 2006; Turlapati *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2020). Na základě bioinformatické analýzy se ukázalo, že většina lakáz může být regulovaná jak na transkripční (antisense transkripty, histon a methylace DNA), tak i na posttranskripční (mikroRNA) úrovni (Turlapati *et al.*, 2011).

Transparentní testa 10 (TT10) mutant byl identifikován pomocí mutagenese. Jedná se o lakázu (*AtLAC15*) spouští oxidaci epikatechinu a rozpustného proantokyanidinu (PA), což má za následek hnědnutí osemení během vysychání semene u *A. thaliana*. *AtLAC15* se nachází ve dvou vrstvách osemení, kde se podílí na metabolismu flavonů

a taninů. (Pourcel *et al.*, 2005; 2006). Substráty pro AtLAC15 jsou jak flavonoly, tak i PA, ale pouze PA zodpovídají za tvorbu hnědého zbarvení během oxidace. Během vývoje semene dochází k akumulaci AtLAC15, zároveň dochází k syntéze epikatechinu. Aktivita promotoru je silně indukovaná u časně abortovaných semen, což značí, že je transkripčně indukován buněčnou smrtí. Epikatechin a PAs se hromadí ve vakuole, ale pokud dojde ke smrti buňky, tak tyto dvě reagentie jsou sekretovány do apoplastu, kde mohou interagovat s AtLAC15, a tak dojde k oxidaci a polymerizaci. Důsledek aktivity AtLAC15 je zvýšený poměr nerozpustných k rozpustných PA (Kitamura *et al.*, 2004; Pourcel *et al.*, 2005; Bidzinski, 2009).

AtLAC15 kóduje protein, který vykazuje velkou podobnost s polyfenol oxidázou lakázového typu, protože obsahuje čtyři histonově bohaté měď-vázající domény (L1-L4) a šest exonů a pět intronů. (Kumar *et al.*, 2003; Pourcel *et al.*, 2006). Protein AtLAC15 můžeme najít v apoplastu, po štěpení transitního peptidu.

Fyziologické funkce AtLAC15 jsou hlavně obrana proti biotickým a abiotickým stresům (Pourcel *et al.*, 2006, Bidzinski, 2009).

Ačkoliv jsou lakázy jednou ze tří skupin PPO, tak ale nemusí znamenat, že rostliny, které obsahují lakázy, automaticky mají i PPO. Oxidační enzymy se mohly vyvinout během přechodu rostlin na souš, což dokazuje fakt, že v zelených řasách se PPO nenachází. Genom *A. thaliana* obsahuje 17 lakáz, ale neobsahuje žádnou PPO, i když se jedná o „suchozemskou“ rostlinu. Geny PPO nejsou nutné pro primární metabolickou funkci, a tak mohly být během evoluce částečně nebo úplně eliminovány. Tuto eliminaci lze najít u *A. thaliana* nebo příbuzné řepky (*Brassica napus*), kdy je PPO nahrazeno právě lakázami, jenž provádějí podobnou oxidaci pomocí molekulárního kyslíku (Pourcel *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2012).

3.4.2 Proteinová struktura PPO

PPO se skládá ze tří domén: N-terminální chloroplastového transitního peptidu (cTP), domény s vazbou na Cu a C-terminální oblasti. N-terminální transitní peptid obvykle zajišťuje transport dvojitou translokací závislou na argininu do thylakoidů a obsahuje vysoký podíl serotoninových zbytků, přilehlé k této sekvenci je thylakoidní transferová doména (TTD) s alaninovým štěpným motivem (AxA). Některé rostliny, ale neobsahují cTP, ale k syntéze dochází v sekreční dráze „no-plastidic-PPO“. Měďnaté centrum se skládá ze dvou měď-vázajících domén, každá z nich obsahuje tři histidinová residua,

kteře koordinují ionty mědi a vytvářejí aktivní místo. Každá z těchto dvou domén obsahuje cca 50 aminokyselin, které jsou odděleny linkerem. Doména CuA obsahuje na začátku motivu HXXXC (nečastější kombinace HCAYC), kdežto CuB má HXXXH sekvenci na začátku motivu. Doména A je mnohem variabilnější než doména B. C-terminální doména je citlivá pro proteolytické štěpení, a to usnadňuje aktivaci latentní PPO (Marusek *et al.*, 2006; Pourcel *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2012).

Některé rostlinné druhy s PPO obsahují introny, převážně pak jednoděložné rostliny. U dvouděložných rostlin introny téměř nenajdeme nebo ve velmi omezené míře. Introny v PPO genech většinou mají unikátní sekvence a nejběžněji se vyskytují v linkeru, který odděluje CuA a CuB, jen zřídka se vyskytuje ve funkční doméně. Délky intronů se pohybují v rozmezí od 39 do 2203 nukleotidů (Tran *et al.*, 2012).

Umístění a aktivace

Většina PPO v zelených rostlinách se nachází v chloroplastu, zatímco jejich substráty jsou umístěny ve vakuole, takže jednotlivé substráty se nemohou standardně dostat do kontaktu. Jednou a dlouho uznávanou možností kontaktu bylo při porušení buňky. V posledních letech se ukazuje, že některé substráty nejsou lokalizované v plastidech, ale mají svou sekreční dráhu nebo k aktivaci dochází jinou cestou (Constabel *et al.*, 1996). Regulace PPO je složitá a enzym může být přítomný v aktivní i latentní formě. Po transportu do lumenu a odštěpení N-terminálního tranzitního peptidu je zpočátku přítomen PPO jako dvoudoménový protein sestávající z vazebného místa pro měď a C-terminální doménou. C-terminální doména je propojena vysoce flexibilní peptidovou strukturou, která je navržena k pokrytí aktivního místa a za určitých podmínek je schopná podstoupit konformační změnu. Dalšími možnostmi aktivace enzymu je proteolytickým štěpením v C-terminální doméně (Constabel *et al.*, 2008; Fuerst *et al.*, 2014; Boeckx *et al.*, 2015). V *in vitro* podmínkách aktivace latentního PPO zahrnuje vystavení mastným kyselinám, proteolýze, mírnému teplu, SDS a síranu amonnému. Aktivace zprostředkovaná o-difenolem je nepřímý mechanismus aktivace, přičemž výsledné o-chinony interagují s latentní PPO, čímž se mění jejich struktura a dojde k odkrytí aktivního místa. Tento mechanismus platí při poškození tkáně, buď jako výsledek napadení patogeny nebo v souvislosti se stárnutím buněk (Boeckx *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2016).

Substrátová specifita

Rostlinné PPO se obvykle vyznačují svou substrátovou specificitou. Vyšší aktivita enzymu byla pozorována u substrátů, které mají katecholovou kruhovou strukturu a funkční skupinu (-R) v meta poloze vzhledem k -OH skupině. Se zvětšením velikosti funkční skupiny (-R) nebo absence této funkční skupiny snižuje aktivitu enzymu. Většina substrátů s kruhovou strukturou katecholu a funkční skupiny v jiné poloze kruhu vykazovaly velmi malou aktivitu nebo absenci aktivity (Mishra *et al.*, 2016). Typickými substráty PPO jsou o-difenoly, protože obsahují snadno oxidovatelné OH-skupiny. Mezi substráty PPO patří antokyany, flavanoly, flavony, flavonoly a isoflavonoidy z flavonoidních polyfenolů, kyselina hydroxybenzoová a kyselina hydroxykyselnicová (Parveen *et al.*, 2010; Boeckx *et al.*, 2015).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro analýzu genové exprese byly vybrány 4 různé genotypy hrachu (*Pisum sp.*): dva kulturní (*P. sativum* subsp. *sativum*: Cameor, JI92) a dva plané (*P. sativum* subsp. *elatius*: JI1794, JI64). Francouzská odrůda Cameor byla poskytnuta z INRA, Dijon, Francie. Genotypy JI92, JI64 a JI1794 byly získány z genové banky John Innes Centrum, Norwich, Velká Británie.

Pro enzymovou analýzu byly přidány ještě dva genotypy: JI261 (*P. sativum* subsp. *elatius*), který byl poskytnut také z genové banky John Innes Centrum, Norwich, Velká Británie a PI358617 (*P. abyssinicum*) z United States Department of Agriculture (USDA, USA). Květy byly označeny v momentě otevření a následně byla izolována semena 4 vývojových stádií a semena suchá (viz Tabulka č. 2).

Tabulka 2: Vývojová stádia genotypů

Genotyp	Dny po opylení (days after pollination, DAP)			
Cameor	13	17	20	25
JI92	12	16	20	25
JI64	12	17	20	25
JI1794	13	17	23	25
JI261		19	23	26
PI358617	13	16	22	27

Aktivita PPO s celými semeny byla měřena na mapovací populaci rekombinantních inbredních linií (RIL) F₁₁ generace odvozené z JI64 a JI92 (North *et al.*, 1989), genotypové informace o nich pochází z generace F_{5:6} (Hradilová *et al.*, 2017), takže do jisté míry mohlo dojít k segregaci.

Vzorky z jedné rostliny by měli být geneticky uniformní, vzhledem ke skutečnosti, že u hrachu dochází k samoopylení (Smýkal *et al.*, 2018).

Semena byla vyseta do 5-ti litrových květináčů se substrátem Proficom Ltd., CZ. Experimentální rostliny byly pěstovány ve skleníku katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období únor až květen 2020.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Agaróza (Serva, kat. číslo: 9012-36-6);

Marker molekulové hmotnosti – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (0,5 µg/µl, Thermo Scientific, kat. číslo: 10488058);

Taq DNA polymeráza (5U/µl, MyTaq, Bioline, kat. číslo: BIO-21105);

Taq pufr (5x, MyTaq Red, Bioline, kat. číslo: 37112);

Procyanidin A2 (Sigma-Aldrich, kat. číslo: 41743-41-3);

Aceton (VWR Chemicals, kat. číslo: 67-64-1);

Ethanol (VWR Chemicals, kat. číslo: 64-17-5);

Ledová kyselina octová (Tamda, kat. číslo: 190510);

Butanol (Lach-Ner, kat. číslo: 71-36-3)

Kyselina chlorovodíková 37% (VWR Chemicals, kat. číslo: 7647-01-0);

4-dimethylaminocinnamaldehyd (DMACA, Sigma-Aldrich, kat. číslo: 6203-18-5);

Exonukleáza I (20 U/µl, Thermo Scientific, kat. číslo: EN0581);

Termosensitivní alkalická fosfatáza (1 U/µl, Thermo Scientific, kat. číslo: EF0651);

Fast Alkaline Phosphatase pufr (10x, Thermo Scientific, kat. číslo: EF0651);

Reakční pufr (10X Baseline-ZERO™ DNase Reaction Buffer, Thermo Scientific, kat. číslo: DB0715K);

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

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

AMV reverzní transkriptáza (Promega, kat. číslo: M515A);

5x reakční pufr (Promega, kat. číslo: M515A);

Oligo(dT)15 primer (Promega, kat. číslo: C1101);

Ribonukleázový inhibitor (Ribonuclease Inhibitor kat. číslo: N2511);

Chloroform (Lach-Ner, kat. číslo:67-66-3);
2-propanol (VWR Chemicals, kat. číslo: 67-63-0);
Isoamylalkohol (CarlRoth, kat. číslo: 123-51-3);
Hydrogenfosforečnan draselný (Tamda, kat. číslo: 310101);
Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, kat. číslo: 7778-77-0);
Chlorid sodný (Lach-Ner, kat.číslo: 7647-14-5);
Hydroxid sodný (Mach chemikálie, kat. číslo: 1310-73-2);
Triton-X (Fluka, Biochemika, kat. číslo: 9002-93-1);
Acetylbromid (SigmaAldrich, kat. číslo: 506-96-7);
Hydroxyamin-HCl (SigmaAldrich, kat. číslo: 5470-11-1);
Lignin, alkalický (SigmaAldrich, kat. číslo: 8068-05-1);
MOPS (SigmaAldrich, kat. číslo: 1132-61-2);
4-methylcatechol (SigmaAldrich, kat. číslo: 452-86-8);

4.2.1 Použité soupravy

- PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, kat. číslo: 12322012)

4.2.2 Použité roztoky a jejich příprava

- 10 × TBE pufr: Na 1 litr 5,40 g TRIS báze; 2,75 g kyseliny borité; 2 ml 0,5 mol·l⁻¹ EDTA o pH 8,0; Sigma Aldrich, ČR)
- Extrakční činidlo: Smíchat 375 ml acetonu s 122,5 ml deionizované vody a 2,5 ml ledové kyseliny octové
- Ethanolický roztok kyseliny chlorovodíkové (ERK): Smíchat 62,5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové se 62,5 ml deionizované vody a 375 ml ethanolu
- 0,1% roztok 4-dimethylaminocinnamaldehydu, DMACA (RDMAC): Navážit přesně 0,1 g DMAC do 100 ml odměrné baňky, přidat 10 ml ERK a doplnit ERK po rysku.

- Butanol-kyselina chlorovodíková (BHC): Smíchat se 190 ml *n*-butanolu s 10 ml koncentrované HCl
- 5M NaCl: navážit 2,92 g NaCl a rozpustit v 100 ml vody

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Homogenizátor (FastPrep-24; MP Biomedicals);

Nanodrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific);

Centrifuga (Centrifuge 5415 R, Eppendorf);

Centrifuga (Centrifuge 5404 R, Eppendorf);

Lyofilizátor (Heto PowerDry PL3000, Thermo Fisher Scientific);

Elektroforéza (Widi Mini Sub; Bio-Rad);

Zdroj stejnosměrného napětí (Electrophoresis Power Supply EPS-601, Amersham Pharmacia);

UV transiluminátor (FireReader Platinum HD7; Uvitec Cambridge);

Thermocycler (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research);

Váha (572; Kern);

Třepačka (Mixing Block MB102, Bioer);

Thermocycler (Master cycler Pro, Eppendorf);

Minicentrifuga (Spectrafuge Mini, Labnet);

Flowbox (PV - 102, TelSTAR);

Třepačka (MS2 Minishaker, IKA);

Ultrazvuková čistička (S 10, Elmasonic);

Spektrofotometr (DU 730, Beckman Coulter);

pH metr 3320, Jenway

4.4 Použitý software

Program FastPCR

Program FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>), který sloužil k navrhování primerů použitých při analýze genové exprese.

Program Genious (verze 7.1.9, Biomatters)

V programu byly upraveny a analyzovány sekvence.

Program MEGA X

Program MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>), byl použit při vytváření fylogenetických analýz.

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.5.1 *In silico* identifikace a charakterizace *Pisum sativum* lakázových genů

Vycházelo se ze článku Turlapati *et al.*, 2011 a Simões *et al.*, 2020.

1. Najít a vykopírovat 17 LAC genů *Arabidopsis thaliana* (https://www.arabidopsis.org/servlets/Search?action=new_search&type=gene).
2. Následně tyto sekvence byly prohledávány metodou BLAST proti genomu hrachu v1.0 genome assembly (<https://urgi.versailles.inra.fr/blast/>).

4.5.2 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byly použity mladé listy, květy, kořeny klíčnicích rostlin, osemení a embryo čtyř genotypů (Cameor, JI92, JI64, JI1794). U vzorku JI1794 se nepodařilo posbírat květy. Osemení a embryo bylo získáno ze stádia 20 DAP. Vzorky byly uchovány v mrazícím boxu a před izolací byly umístěny do ledu.

1. Dát do šroubovací mikrozkuhavky 0,5 ml PureLink® Plant RNA Reagent a cca 0,1 gramů zmrazeného rostlinného materiálu a přidat keramické kuličky.
2. Homogenizovat v homogenizátoru 2× po 1 minutě s 5-ti minutovou pauzou.
3. Centrifugovat při 10000 rpm 2 minuty při pokojové teplotě, poté přenést supernatant do čisté mikrozkuhavky.
4. Přidat 0,1 ml 5 M NaCl a promíchat.
5. K promíchané směsi přidat 0,3 ml chloroformu a také řádně promíchat.

6. Centrifugovat při 12000 rpm po dobu 10 minut při 4 °C, následně přepipetovat vodní fázi do čisté mikrozkušavky.
7. Přidat stejné množství jako vodní fáze isopropyl alkoholu a nechat stát při pokojové teplotě 10 minut.
8. Centrifugovat 10 minut při 4 °C při 12000 rpm
9. Opatrně slít supernatant a k peletu přidat 1 ml 75% ethanolu.
10. Centrifugovat při 12000 rpm po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.
11. Vylít supernatant a opatrně pipetou odstranit zbylou tekutinu.
12. Přidat 20 µl RNA-free vody a resuspendovat pelet.
13. Uchovávat při – 70 °C.

4.5.3 Odstranění zbytků genomické DNA

Před přepisem RNA do cDNA je nutné odstranit veškeré zbytky DNA, které by mohly vytvářet nespecifické produkty při následné PCR amplifikaci.

1. Rozmrazit vzorky, po celou dobu pracovat na ledu.
2. Přidat vody na celkový objem 50 µl a k tomu přidat 6 µl 10 × Baseline-Zero DNase Reaction pufru, 3 µl Baseline-Zero DNase a 1 µl ribonukleázového inhibitoru a nechat inkubovat při 37 °C 1 hodinu.
3. Přidat 200 µl fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1) a promíchat. Nechat rozdělít na dvě fáze a pak promíchat znovu a okamžitě centrifugovat při 13000 rpm po dobu 10 minut při 4 °C.
4. Přepipetovat supernatant do nové mikrozkušavky a přidat 300 µl chloroform:isoamylalkohol (24:1) a pořádně promíchat a centrifugovat při 13000 rpm po dobu 5 minut při 4 °C.
5. Přepipetovat supernatant do nové mikrozkušavky a přidat 20 µl kyseliny octové a 550 µl 96% ethanolu a nechat inkubovat přes noc.
6. Nechat centrifugovat 30 minut při 13000 rpm při 4 °C.
7. Vylít supernatant a přidat 500 µl 70% ethanolu a centrifugovat 5 minut při 13000 rpm a při 4 °C.
8. Slít opatrně supernatant a přidat 96% ethanol a centrifugovat 5 minut při 13000 rpm a při 4 °C.
9. Vylít supernatant a nechat 1,5 minuty centrifugovat pro odstranění veškeré tekutiny a po odstranění přidat a resuspendovat ve 30 µl vody.

4.5.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace

Pomocí spektrofotometru NanoDrop byla stanovena koncentrace a čistota RNA z vyizolovaného rostlinného materiálu. Nejprve nanést na spektrofotometr 2 μl vody (blank) a poté 2 μl vzorku, mezi každým vzorkem otřít buničitou vatou snímač. Proměřit na Nanodropu absorbanci při 260 nm a 280 nm a zaznamenat koncentraci a čistotu vzorku.

4.5.5 Přepis RNA do cDNA

Přepis RNA byl proveden pomocí dvoukrokové reverzní transkripce.

1. Nejprve je nutné všechny vzorky zředit na danou koncentraci 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Poté přidat 1 μl oligo(dT) primeru.
2. Následně vložit vzorky do cycleru a nechat inkubovat 5 minut při 70 °C.
3. Přidat ke každému vzorku 13 μl vody, 8 μl 5 \times AMV pufru, 2,5 μl dNTP, 0,5 μl ribonukleazového inhibitoru a 1 μl MVRT polymerázy.
4. Vložit do cycleru na 60 minut při 42 °C.

4.5.6 Polymerázová řetězová reakce

Pro zjištění přítomnosti jednotlivých transkriptů v různých pletivech byly navrženy specifické primery pomocí programu FastPCR (viz Tabulka č. 3).

Tabulka 3: Seznam primerů

Transkript RNA atlas [Gen – hrachový genom (Cameor verze 1.0)]	Forward/Reverse primer	Sekvence (5 - 3')
Pscam050297 (Psat3g153280)	F	cctcaaatacggcgacattactgt
	R	tttcagtccatactccgaaatcca
Pscam033729 (Psat4g070480)	F	acagggatcattcagatatggttcc
	R	tcaagtgataggtatgcatcttgg
Pscam037168 (Psat7g178880)	F	acaaggttcgtaccactacggta
	R	caatgtgccaactttggactatact
Pscam036736 (Psat5g262040)	F	cgcaaggatcttaccattatggtt
	R	gtgccaagactgcacagtatctt
Pscam036606 (Psat5g010800)	F	cacaaggatcctaccattacggtc
	R	caagatgatagctctgaacgatgtt
Pscam050630 (Psa6gt000080)	F	agatacgcgattaacagtgtctctt
	R	gccatcaagatgatagctttgaaga
Pscam006831 (Psat3g113960)	F	tacctaagatgaccacgtagtt
	R	tgtctaagagggttcccatgaa
Pscam027023 (Psat1g217840)	F	tgctcaactgtactcacgataagc
	R	aatgaacagggtgattatcacttgc
Pscam045576 (Psat3g140800)	F	catgtcaagggtcccaatggaaca
	R	catagttaccgaatccttgtccga
Pscam036641 (Psat1g206360)	F	gttgattggaccaggaatactgagtt
	R	tgacaagtcctttccacatcttgga

1. Navržené primery rozsuspenzovat v daném objemu vody na koncentraci 100 pmol·μl⁻¹ pak dále naředit 10×.
2. Připravit reakční směs z termostabilní Taq polymerázy, konkrétních primerů, vody a pufru (viz. Tabulka č. 4).

Tabulka 4: Objemy jednotlivých reagensů pro přípravu reakční směsi

Jednotlivé reagensie	Objem na jednu reakci (μl)
MyTaq RED 5× pufr	3
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
MyTaq polymeráza	0,07
Deionizovaná voda	9
Celkový objem reakce	13
Objem vzorku DNA	2

3. Připravenou reakční směs se vzorkem řádně promíchat a lehce stočit na centrifuze.
4. Poté vložit do thermocycleru s programem (viz Tabulka č. 5).

Tabulka 5: Teplotní průběh reakce

Průběh	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2	1 ×
Denaturace	95	0,5	
Nasedání primerů	60	0,5	35 ×
Elongace	72	0,5	
Finální elongace	72	5	1 ×
Udržování	4	∞	

4.5.7 Horizontální gelová elektroforéza

Výsledné PCR produkty byly ověřeny gelovou elektroforézou.

1. Nejprve je nutné připravit 1,5% agarózový gel, pro přípravu 80 ml navážit 1,2 g agarózy a přidat 80 ml TBE pufru.
2. Směs zahřívát do úplného rozpuštění a pak částečně zchladit.
3. Nalít do připravené do elektroforetické vany, vložit hřebínky a nechat ztuhnout.
4. Po ztuhnutí vyjmout hřebínky a vložit do elektroforézy a přelít TBE puftrem.
5. Do jedné jamky napipetovat 4 μl standart molekulové hmotnosti a do ostatních dát 8 μl PCR produktu.

6. Připojit ke zdroji stejnosměrného napětí a nechat běžet 30 minut při 100 V.
7. Po uplynutí času gel zdokumentovat UV transluminátorem.

4.5.8 Sekvenování

Před sekvenováním je nutné odstranit přebytečné primery a nečistoty pomocí komerčně dostupného kitu. Poměry purifikační směsi jsou uvedeny v Tabulce č. 6.

Tabulka 6: Objemy jednotlivých reagensií pro přečištění DNA před sekvenováním

Reagencie	Objem na jednu reakci (μl)
Exonukleáza Exo 1 (4 U/μl)	0,4
Alkalická fosfatáza Fast AP (1 U/μl)	0,15
Fast AP pufr 10×	1
Voda	3,45
Celkem	5

Reakční směs rozpipetovat po 5 μl a bylo přidáno vždy 5 μl vzorků. Samotná purifikační reakce probíhala v thermocycleru 15 min při 37 °C a poté 1 min při 85 °C. Poté napipetovat 5 μl PCR produktů s 5 μl sekvenačního primeru (5 pmol·μl⁻¹). Vzorky odeslat na sekvenační analýzu pomocí BigDye Terminator kit (Thermo Fisher Scientific) do Laboratoře sekvenace DNA, PřF UK Praha.

4.5.9 Analýza rozpustných proantokyandinů

Analýza proantokyandinů byla vybrána proto, že mohou být *in vivo* substrátem pro studovanou polyfenol oxidázou. Pro analýzu bylo vybráno celkem 6 genotypů, od každého bylo vybráno 5 vývojových stádií. U genotypu JI261 se nepodařilo zajistit vzorky z prvního a posledního stádia.

1. Vzorky vysušit lyofilizací a navážit 5 mg do mikrozkuřavky.
2. Rozemlít na prášek pomocí keramických kuliček na homogenizátoru a poté přidat 2 ml extrakčního činidla (aceton, deionizovaná voda, ledová kyselina octová), zároveň zpracovat i slepý vzorek.
3. Následně pořádně promíchat a nechat sonifikovat 1 hodinu při laboratorní teplotě.
4. Pro měření je nutné si připravit vzorky kalibrační řady – do 10 ml baňky navážit přesně 1 mg standartu procyanidinu A2. Doplnit ethanolem po rysku a promíchat. Takový roztok ředit 10 × (koncentrace 10, 1 a 0,1 mg·l⁻¹.)

5. Při přípravě barevného derivátu napipetovat do 2 ml zkumavek 0,5 ml každého extraktu a přidat 1,5 ml RDMAC.
6. Vzniklé zbarvení měřit při 640 nm.

4.5.10 Analýza nerozpustných proantokyanidinů

1. Nerozpustný zbytek po analýze rozpustných proantokyanidinů nechat vysušit lyofilizací.
2. Připravit činidlo butanol-kyselina chlorovodíková (BHC: Smíchat se 190 ml *n*-butanolu s 10 ml koncentrované HCl).
3. K vysušenému vzorku přidat 1 ml BHC činidla a nechat 1 hodinu sonifikovat v ultrazvukové lázni.
4. Poté uplynutí doby vzorky nechat zcentrifugovat 10 minut při 2500 g.
5. Připravit kalibrační řadu – do 10 ml baňky navážit přesně 1 mg standartu procyanidinu A2. Doplnit BHC činidlem po rysku a promíchat a vzorek naředit BHC činidlem na koncentrace 10, 1 a 0,1 mg·l⁻¹.
6. Odebrat 800 µl supernatantu a změřit absorbanci při 550 nm.
7. Po změření vrátit zpět do zkumavky a zahřívat přesně 1 hodinu při teplotě 95 °C.
8. Následně vzorky nechat zchladit a znovu proměřit při 550 nm.

4.5.11 Analýza ligninu

Pro kvantifikaci ligninu je důležité odstranit všechny složky, které by mohly absorbovat záření při 208 nm.

1. Nechat vysušit osemení pomocí lyofilizátoru a pak zhomogenizovat.
2. Přidat 7 ml 50 mM draselno-fosfátového pufru (pH =7), nechat vzorek centrifugovat 5 minut při 1400g a vylít supernatant, tento krok opakovat s následujícími chemikáliemi:
 - 2 × draselno-fosfatovým pufrem (pH 7.0; 7 ml)
 - 3 × 1% (v/v) Triton X-100 in pH 7.0 buffer (7 ml)
 - 2 × 1 M NaCl in pH 7.0 buffer (7 ml)
 - 2 × destilovanou vodou (7 ml)
 - 2 × acetonem (5 ml).
3. Vypipetovat aceton a nechat pelet vysušit přes noc při 60 °C.
4. Navážit cca 8 mg a přidat 0.5 ml 25% acetyl bromidu (v/v v ledové kyselině octové), inkubovat 30 minut při 70 °C.

5. Po uplynutí času rychle vzorky zchladit a pak smýchat s 0.9 ml 2 M NaOH, 0.1 ml 5 M hydroxylamin-HCl, a objemem ledové kyseliny octové (4 ml).
6. Centrifugovat 5 minut při 1400 g a následně změřit absorbanci při 280 nm.
7. Kalibrační křivku připravit s alkalickým ligninem.

4.5.12 Analýza celých semen pro aktivitu PPO

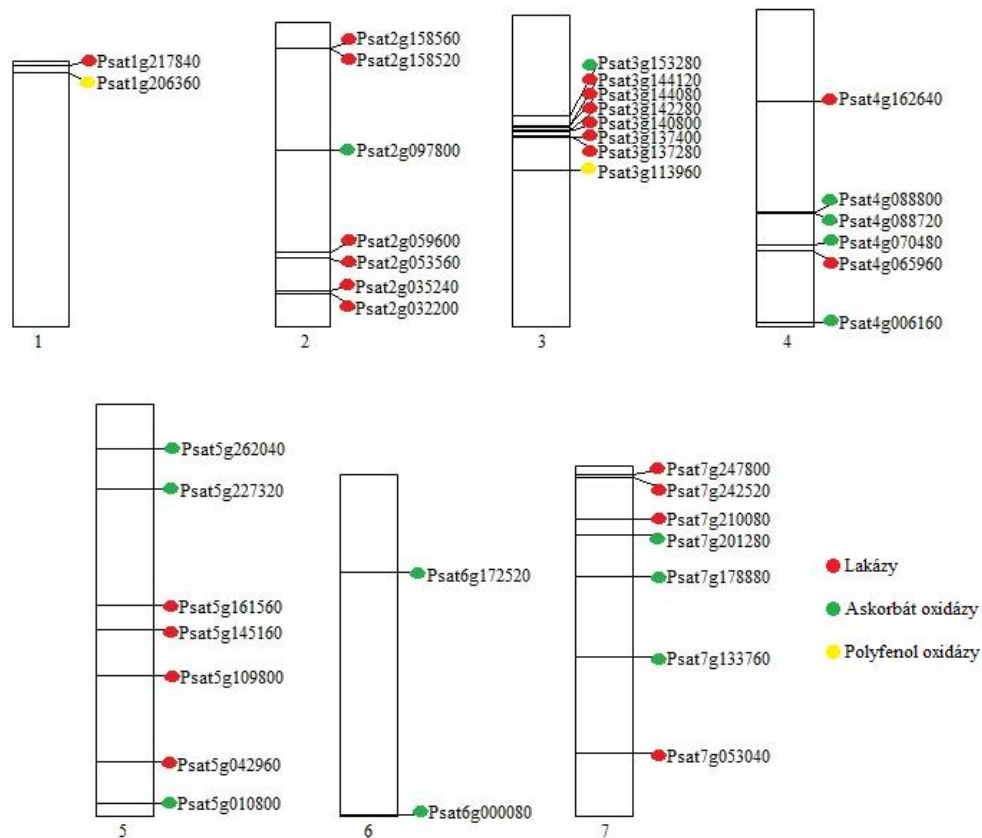
Pro analýzu byly vybrány vzorky rekombinantních inbredních linií (RIL) (A:JI92 x JI64 a B:JI64 x JI92) a jako kontrolní vzorky Cameor, JI92 a JI64. Dormance byla stanovena Hradilová *et al.*, 2017. Měření probíhalo v Petriho miskách s filtračními papíry se zvlhčením 3 ml vody a necháno inkubovat s teplotou 25 °C. Imbibice byla hodnocena během 24 hodin s intervaly založených na změnách bobtnání a klíčení semen. Z toho bylo vypočteno procento bobtnání/klíčivosti po dobu 7 dní.

1. Do každé jamky vložit dvě celá semena od každého vybraného RIL linie.
2. Přes noc nechat nabobtnat, druhý den nabrousit nenabobtnalá semena.
3. Semena společně se substrátem 4 – methylkatechol v roztoku 50 mM MOPS nechat působit po dobu 30, 60 a 120 minut a měřit při 475 nm.

5 Výsledky

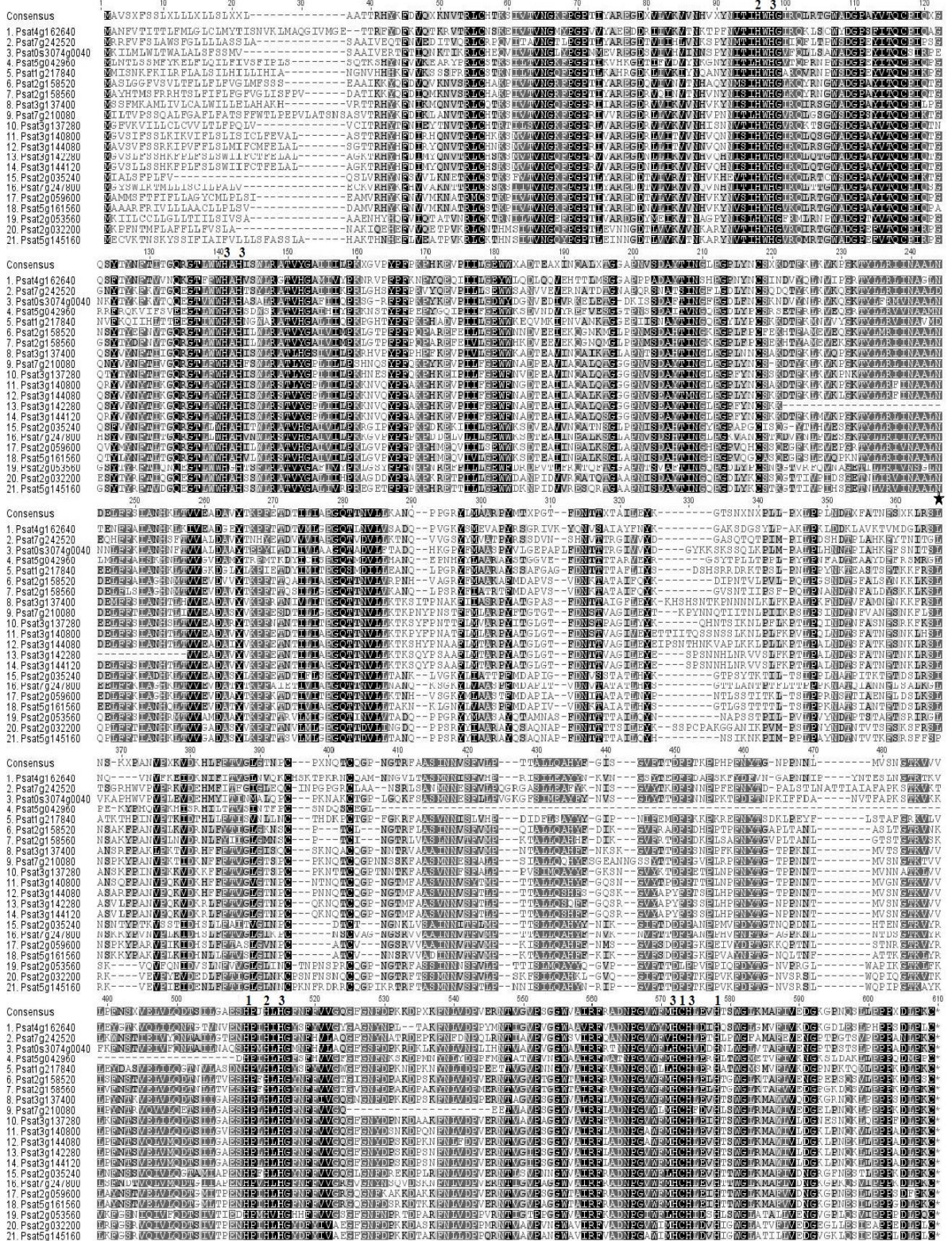
5.1 *In silico* analýza

Byly použity LAC 1 – 17 geny z *Arabidopsis thaliana* a pomocí metody BLAST bylo v genomu hrachu (Cameor v1.0 genome assembly) nalezeno 50 – 51 homologů pro každý LAC gen. Po detailním přezkoumání bylo zjištěno, že tyto homology se mezi jednotlivými LAC1-17 překrývají nebo jsou úplně identické, selekcí bylo vybráno 40 homologů. Těchto 40 homologů lze rozdělit do tří skupin – polyfenol oxidázy (PPO), askorbát oxidázy (AO) a lakázy (LAC). Genom hrachu obsahuje tři polyfenol oxidázy, dvě PPO se nachází na chromozomech 1 a 3 (Psat1g206360, Psat3g113960) a třetí PPO na scaffoldu (scaffold01919). Lakáz bylo identifikováno 23 a nejvíce byly zastoupeny na druhém (6 lakáz) a třetím chromozomu (6 lakáz). Na třetím chromozomu byly všechny lakázy umístěny v jednom klastru. Po čtyřech lakázách mají chromozomy 5 a 7, pátý chromozom má lakázy rozmístěné rovnoměrně po chromozomu, kdežto chromozom sedm má tři lakázy umístěny v jednom bodě na konci chromozomu. Pouze jedna lakáza se nachází chromozomu čtyři a na chromozomu 6 se nevyskytuje ani jednou. Askorbát oxidáz bylo nalezeno celkem 14, různě rozmístěným na chromozomech. Největší výskyt byl na chromozomu 4, kdežto na prvním chromozomu nebyla přítomná žádná askorbát oxidáza (viz Obrázek č. 2).



Obrázek 3: Chromozomová lokalizace polyfenol oxidáz, askorbát oxidáz a lakáz (pozice jsou číslovány od spodní části chromozomu)

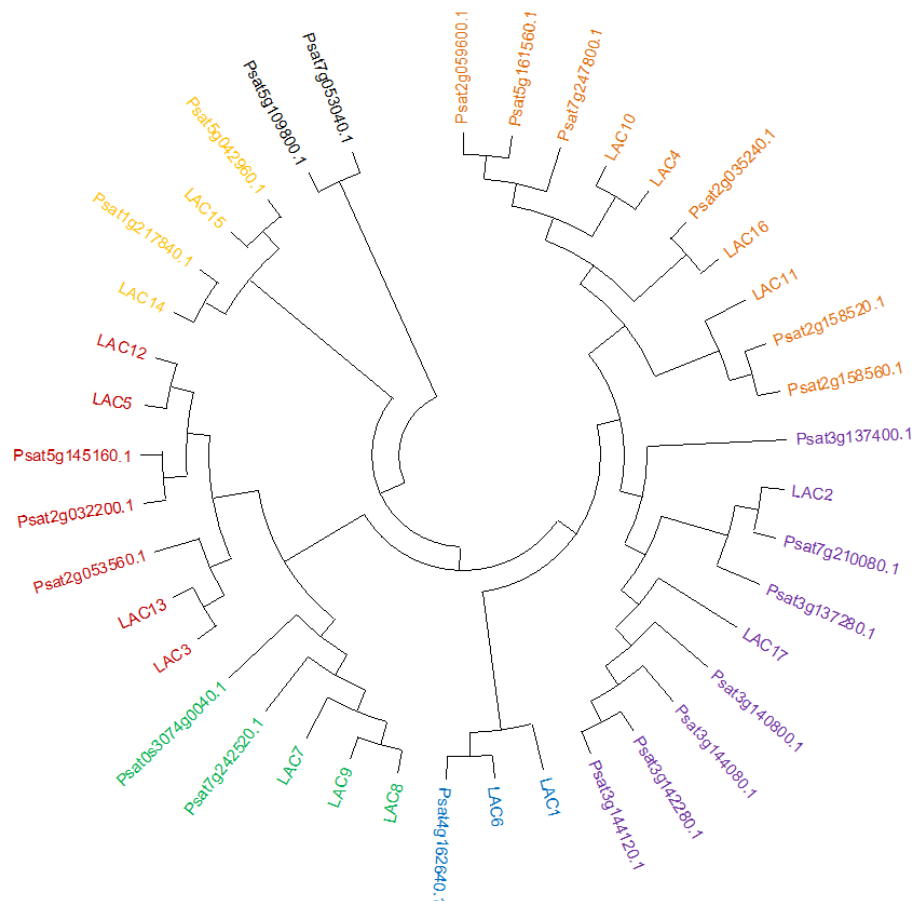
Hrachové LAC homology byly seřazeny v programu Geneious (Biomatters) pomocí „multiple alignment“ proteinových sekvencí. Bylo nalezeno 10 konzervovaných histidinů a jeden cysteinový zbytek, které se podílejí na koordinaci tří center (1,2,3) se čtyřmi atomy mědi (viz Obrázek č. 3). N-terminální signální peptid se vyskytuje hned na počátku sekvence do místa 37. Na C-konci se nachází axiální ligand blízkosti vazebného místa T1 Cu (HCH-X3-H-X3-G) a ovlivňuje redoxní potenciál lakáz (Dittmer *et al.*, 2004). Rostlinné lakázy mají konzervovaný asparaginový zbytek, který silně interaguje s se substráty a také ovlivňuje optimální pH (Madzak *et al.*, 2006). V hrachových lakázách se vyskytuje ve stejné poloze, kromě Psat1g217840 a Psat7g242520, které mají v této pozici kyselinu asparagovou a Psat3g142280, která nemá žádnou aminokyselinu v této pozici.



Obrázek 4: „Multiple alignment“ aminokyselinových sekvencí hrachových laků (koordinací centra označeny 1,2,3, axiální ligand označen ▲ a asparaginový zbytek pro optimální pH je označen ★)

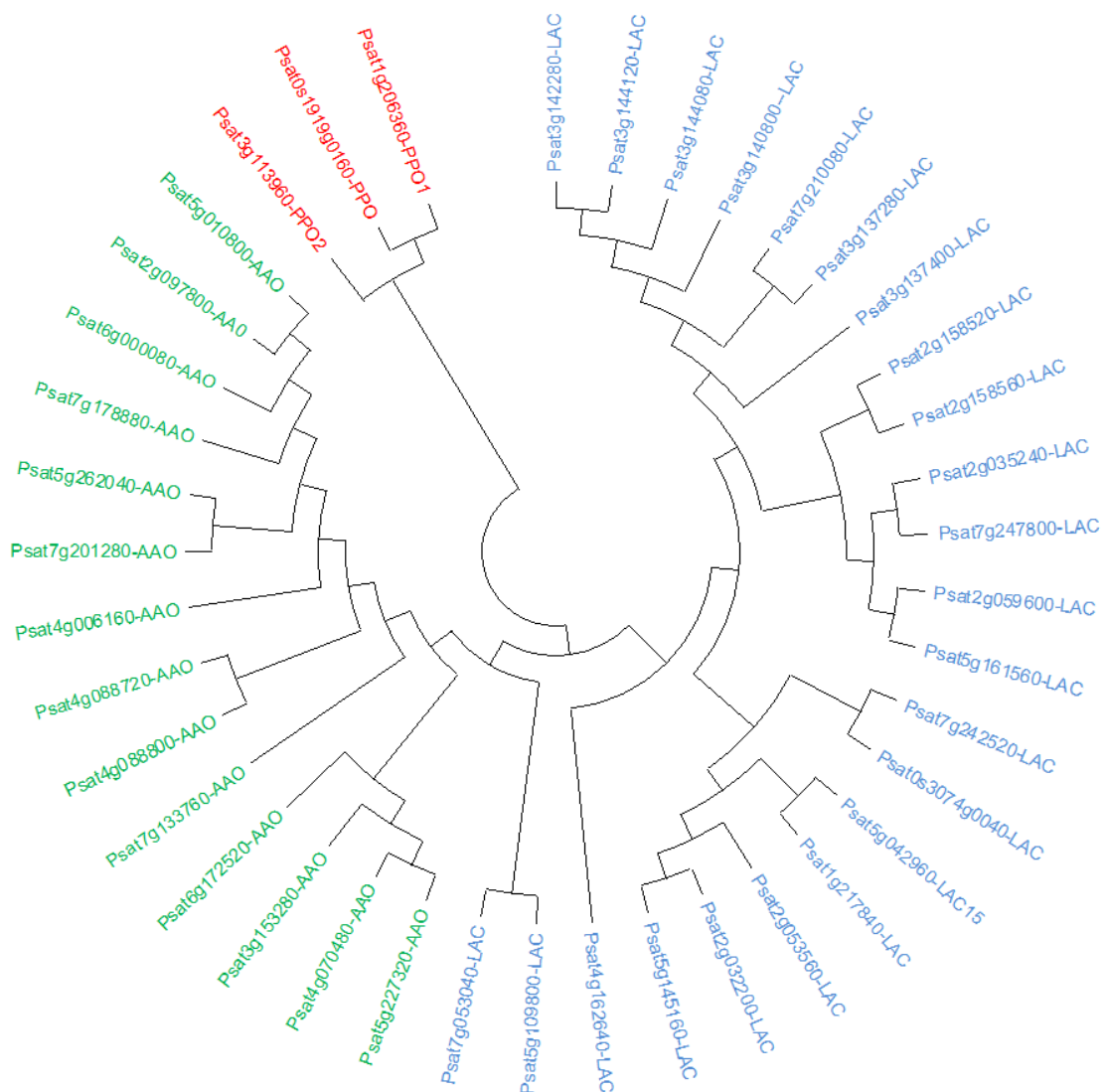
Fylogenetická analýza

Fylogenetické stromy byly vytvořeny v programu MEGA X pomocí metody „Maximum likelihood“. Na základě sekvenční podobnosti můžeme hrachové lakázy rozdělit do šesti, potažmo sedmi tříd (McCaig *et al.*, 2005; Turlapati *et al.*, 2011). Dva homology představující sedmou třídu, jsou lakázy vysoce příbuzné askorbát oxidázám, tudíž je nepovažujeme za součást šesti tříd. Největší množství hrachových lakáz se vyskytuje v první a druhé třídě. V první třídě najdeme sedm hrachových lakáz společně se dvě huseníčkovými lakázami (AtLAC2, 17). Druhá třída zahrnuje šest hrachových lakáz a čtyři huseníčkové lakázy (AtLAC 4, 10, 11, 16). Čtvrtá třída obsahuje dvě huseníčkové lakázy (AtLAC14 a 15), které mají nízký redoxní potenciál stejně jako dvě hrachové lakázy (Psat1g217840 a Psat5g042960), patřící do této třídy (Turlapati *et al.*, 2011) (viz Obrázek č. 5).



Obrázek 5: Fylogenetická analýza 17 LAC genů *Arabidopsis thaliana* a jejich 23 LAC *Pisum* sp. homologů

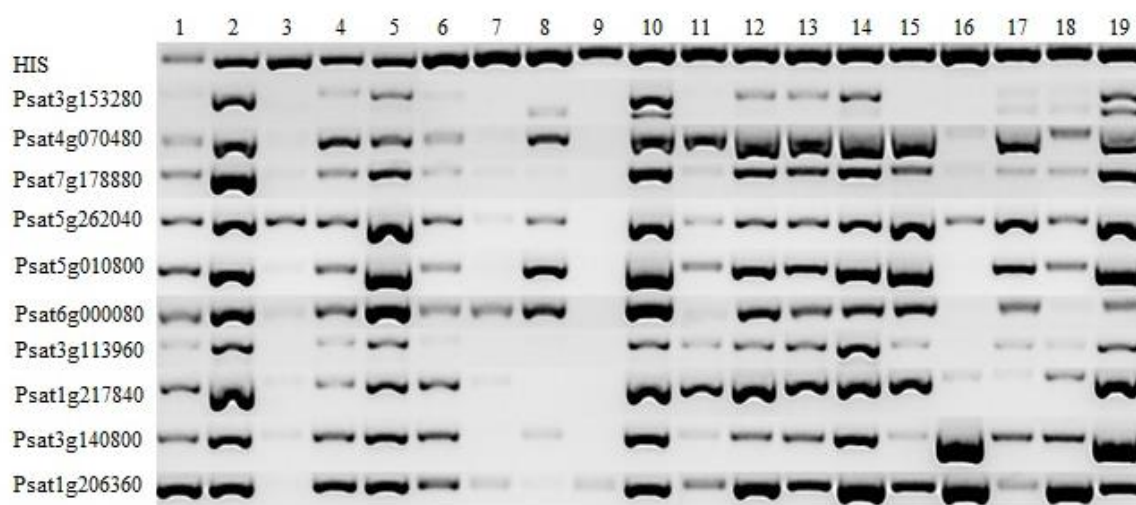
Další provedená fylogenetická analýza potvrzuje rozdělení do tří skupin: polyfenol oxidázy, askorbát oxidázy a lakázy (viz Obrázek č. 6). Tři PPO jsou sekvenčně odlišné od ostatních homologů. Ovšem dvě lakázy (Psat7g053040 a Psat5g109800) jsou příbuznější askorbát oxidázám než k lakázám. Lakázy na chromozomu 3 nejsou zajímavé jenom tím, že se nachází v jednom klastru, ale i tím že jsou sekvenčně podobné, k těmto sekvencím je nejvíce příbuzná lakáza na chromozomu 7 (Psat7g210080). Ze šesti lakáz na chromozomu 2, jsou čtyři (Psat2g158520, Psat2g158560, Psat2g035240, Psat2g059600), které se nachází v jednom kládu společně s lakázami z 5 a 7 chromozomu (Psat5g161560, Psat7g247800).



Obrázek 6: Fylogenetická analýza LAC homologů a její rozdělení (červeně zbarvené polyfenol oxidázy, modře jsou vyznačeny lakázy a zelenou značí askorbát oxidázy)

5.2 Analýza genové exprese v jednotlivých pletivech

Na základě z dat RNAseq bylo vybráno 10 homologů na které byly navrženy specifické primery. Z 10 homologů byly 2, které reprezentovali PPO geny v hrachu. V těchto vzorcích byla zkoumána exprese v jednotlivých pletivech (list, květ, kořen, osemení a embryo). U osemení a embrya byly použity semena, která byla 20 DAP (days after pollination). U JI1794 bohužel nebyly nasbírány květy. Nejdříve byla provedena izolace RNA z jednotlivých pletiv, po přečištění a přepisu do cDNA, byla provedena PCR analýza pro zjištění genové exprese. Jako referenční gen byl použit histon. Vzorky pletiv nemají rovnoměrné zastoupení transkriptů.



Obrázek 7: Elektroforetické rozdělení RT-PCR produktů exprese sledovaných genů

Legenda:

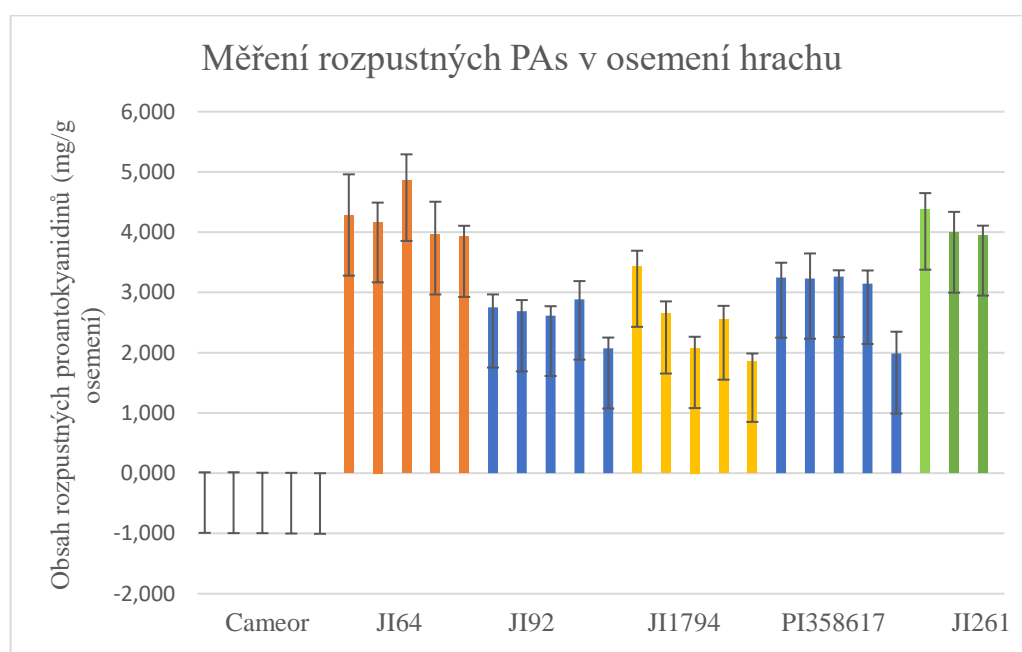
1 – Cameor list, 2 – Cameor květ, 3 – Cameor kořen, 4 – Cameor osemení, 5 – Cameor embryo, 6 – JI92 list, 7 – JI92 květ, 8 – JI92 kořen, 9 – JI92 osemení, 10 – JI92 embryo, 11 – JI64 list, 12 – JI64 květ, 13 – JI64 kořen, 14 – JI64 osemení, 15 – JI64 embryo, 16 – JI1794 list, 17 – JI1794 kořen, 18 - JI1794 osemení, 19 – JI1794 embryo

V jednotlivých vzorcích se ne vždy vyskytoval zadaný transkript. V kulturních genotypech najdeme přítomnost všech transkriptů u embrya a u listů. Cameor vykazuje vysokou přítomnost transkriptů v květech a osemení. Naopak téměř žádný ze sledovaných genů není exprimován v kořenech Cameoru, kromě jedné výjimky Psat5g262040. Naopak u kulturního JI92 není přítomná žádná exprese v osemení a téměř žádná u květů. Genotyp planého hrachu JI64 vykazuje expresi téměř u všech transkriptů.

U JI1794 byla přítomnost některých transkriptů v listech nízká nebo téměř nulová. Zajímavý rozdíl je v expresi mezi listy a květy daných genotypů, protože květ je orgán semenných rostlin tvořený přeměněnými listy. Transkript Psat3g153280 vykazuje u některých vzorků dva produkty, které byly následně sekvenovány. Sekvenováním daných PCR produktů bylo zjištěno, že se může jednat o jinou alelu nebo jiný transkript díky alternativnímu sestřihu.

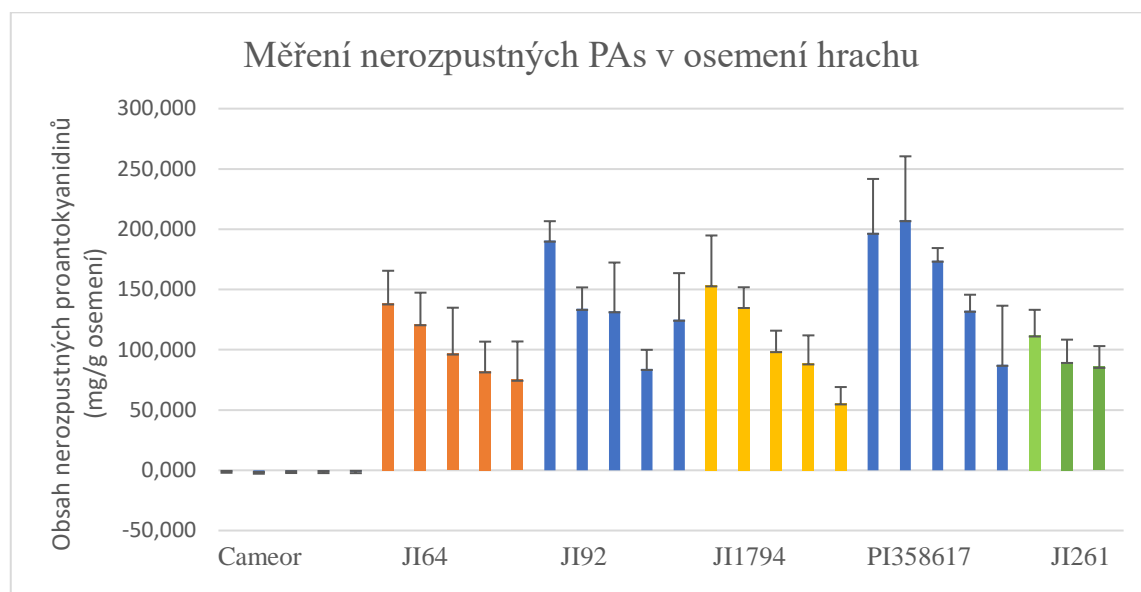
5.3 Měření množství proantokyanidinů

Pro analýzu byly vybráno 6 genotypů s 5 vývojovými stádii (kromě JI261). Cameor a JI92 představují kulturní genotypy a JI64, JI1794, JI261 jsou plané (*P. elatius*) hrachy, poslední genotyp PI358617 je kulturní *P. abyssinicum*. Byly provedeny celkem 4 opakování z každého vývojového stádia. Po analýze byly vypsány absorbance jednotlivých vzorků a kalibrační řady. Byla zkonstruována kalibrační křivka a z rovnice lineární regrese byla spočítána koncentrace v jednotlivých vzorcích vztahovaná na výchozí hmotnost. Z těchto hodnot byl spočítán průměr měření a směrodatná odchylka. Z měření rozpustných proantokyanidinů (PA) bylo zjištěno, že v Cameoru se nenachází téměř žádné barvivo. Rozdíly mezi jednotlivými vývojovými stádii u některých genotypů není zřejmý, spíše má podobný obsah ve všech stádiích, ale celkově vykazují klesající tendenci. Z dat lze nalézt souvislost mezi množstvím pigmentů a dormantními genotypy (JI64, JI1794, JI261).



Obrázek 8: Měření rozpustných PA v osemeni hrachu

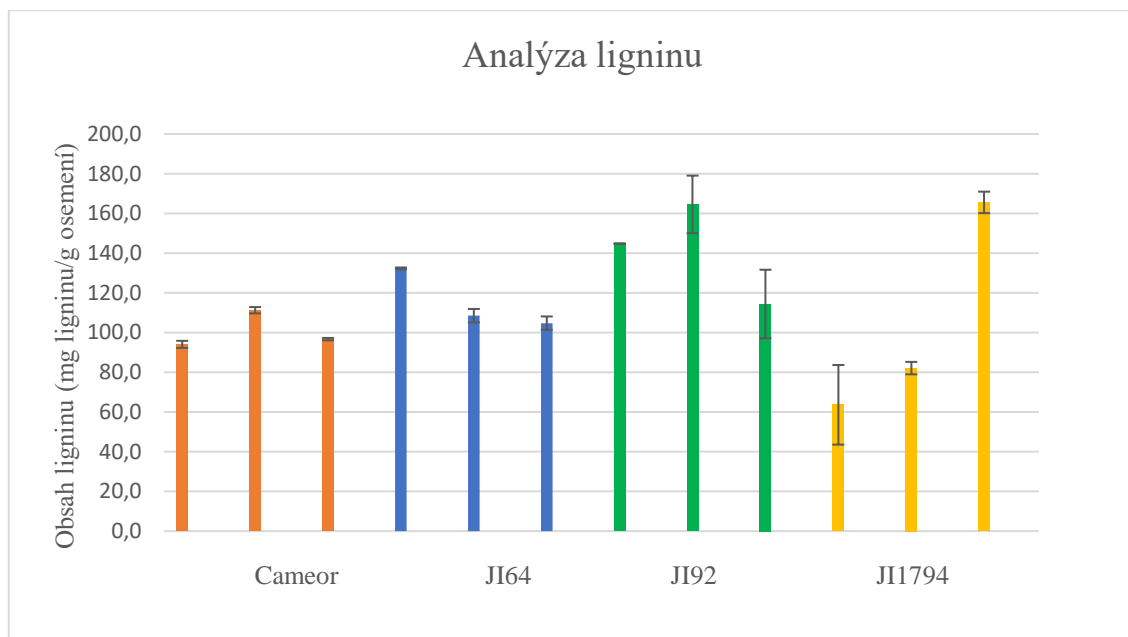
Z měření nerozpustných proantokyanidinů bylo potvrzeno, že se v Cameoru nenachází žádné PA. Celkový obsah nerozpustných je oproti rozpustným PA několikrát vyšší. Graf jasně ukazuje, že obsah PA s vyžívajícím osemním klesá, jen u genotypu JI92 má vyšší obsah v předposledním stádiu než v posledním.



Obrázek 9: Měření nerozpustných proantokyanidinů v osemní hrachu

5.4 Analýza ligninu

Analýza ligninu probíhala podle protokolu ze článku Moreira *et al.*, 2014. Pro analýzu bylo nutné se zbavit všech proteinů a látek, které by interferovali při měření 280 nm, proto bylo nutné každý vzorek promýt 11 × s různými chemikáliemi. Byly vybrány čtyři genotypy Cameor, JI92, JI64 a JI1794 a od každého byly použity tři vývojová stádia ve dvou opakování. Při měření obsah ligninu se příliš nelišil jak mezi jednotlivými genotypy, tak i mezi vývojovými stádii. Pouze genotyp JI1794 vykazoval zvyšující tendenci od jednotlivých stádii, kdy mezi suchým semenem bylo značné zvýšení obsahu oproti třetímu stádiu (viz Obrázek č. 10).



Obrázek 10: Analýzu ligninu v jednotlivých vývojových stádiích

5.5 Analýza celých semen pro aktivitu polyfenol oxidáz

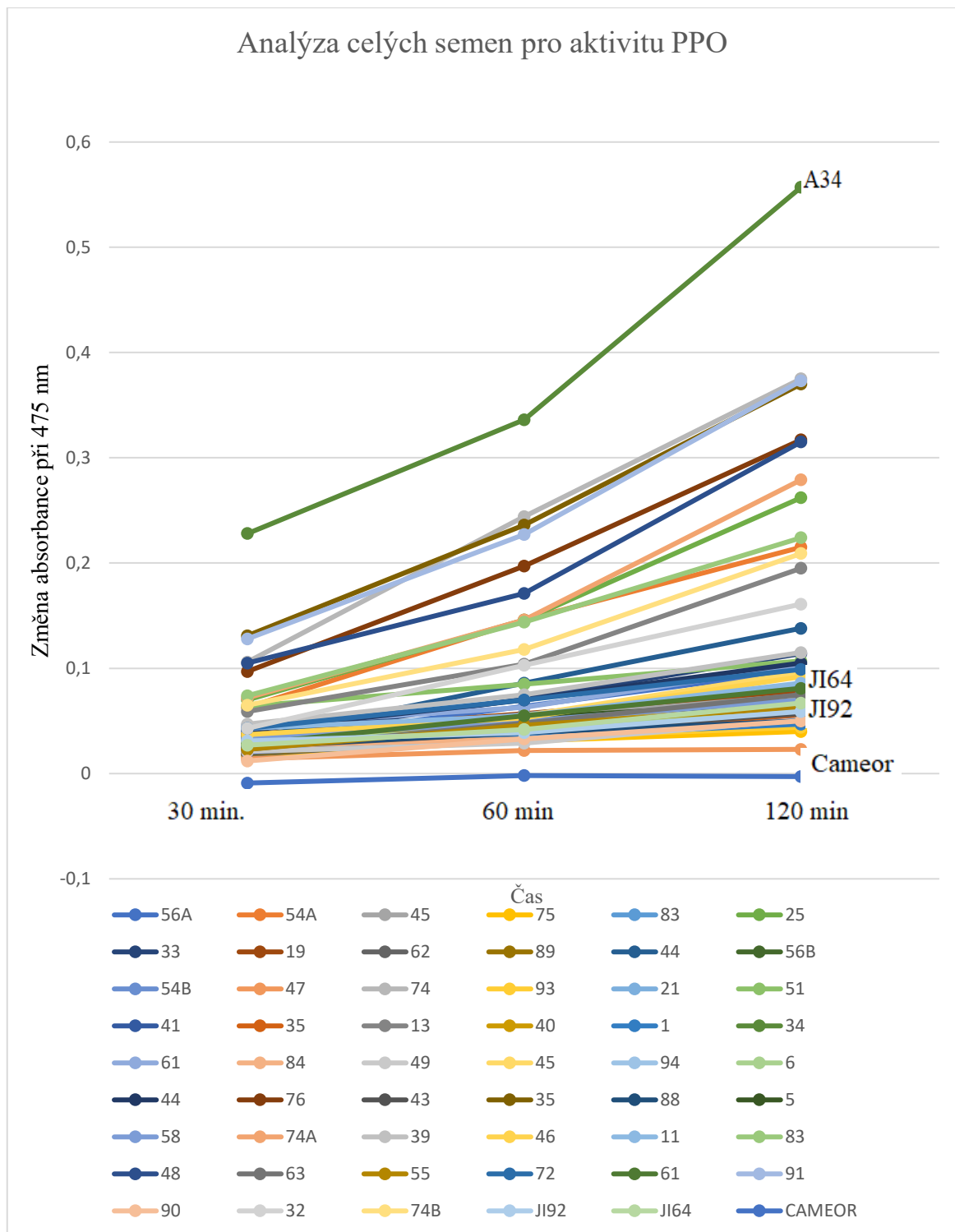
Pro analýzu bylo vybráno celkem 52 RIL linií a tři kontroly (JI92, JI64, Cameor). Soubor linií ve směru křížení JI92×JI64 obsahovala 28 vzorků, soubor ve druhém směru křížení B obsahoval 25 vzorků. Byly zvoleny kontrastní linie ve smyslu dormance. Pro soubor A bylo zvoleno dormantních linií 12, u souboru B 16. Pro testování PPO aktivity byl vybrán substrát 4 – methylcatechol. Na základě sekvenační analýzy byl odvozen PCR-CAPS test, díky přítomnosti/absenci štěpného místa pro restriční enzym HindIII. Alela A odpovídá JI64 a alela B genotypu JI92, která je HindIII, tedy se štěpným místem. Kromě míry dormance bylo sledováno zbarvení pupku (hila) před i po testu, zda barva souvisí s alelou daného rodiče. U 52 linií zbarvení pupku odpovídalo u 47 vzorků detekované alele, u zbývajících 5 vzorků mohlo dojít k rekombinaci a segregaci, protože genotypizační údaje pocházejí z DNA odebrané v 6 generaci (aktuálně 11 generace) (viz Tabulka č. 7).

Tabulka 7: Testované linky s informacemi o zbarvení a typu PPO alely (Alela A odpovídá JI64 a alela B genotypu JI92)

A (92x64)	Linka	Hilum	PPO alela	B (64X92)	Linka	Hilum	PPO alela
Dormantní linky (do 40 %)				Dormantní linky (do 40 %)			
	56A	Krémové	B	45	Černé	A	
	54A	Krémové	B	94	Černé	A	
	45	Krémové	B	6	Černé	A	
	75	Černé	A	44	Krémové	B	
	83	Černé	A	76	Černé	A	
	25	Krémové	B	43	Černé	A	
	29	Krémové	B	35	Černé	A	
	33	Krémové	B	88	Černé	A	
	19	Krémové	A	5	Černé	A	
	62	Černé	A	58	Černé	A	
	89	Krémové	B	74A	Černé	A	
	44	Černé	A	39	Černé	A	
Nedormantní linky (nad 80 %)				46	Černé	A	
	56B	Černé	A	11	Černé	A	
	54B	Černé	A	83	Černé	A	
	47	Černé	B	48	Černé	A	
	74	Krémové	B	Nedormantní linky (nad 80 %)			
	93	Krémové		63	Krémové	B	
	21	Krémové	B	55	Krémové	A	
	51	Černé	B	72	Krémové	B	
	41	Krémové	B	61	Černé	B	
	35	Černé	A	91	Krémové	B	
	13	Krémové	B	90	Černé	A	
	40	Krémové	B	32	Černé	A	
	1	Černé	A	74B	Černé	A	
	34	Černé	A				
	61	Krémové	B	Kontroly	JI92	Krémové	B
	84	Krémové	B		JI64	Černé	A
	49	Černé	A		CAMEOR		B

Vzorky byly sledovány během 30, 60 a 120 minut. Aktivita během uplynulé doby stoupala rovnoměrně, téměř u každého vzorku. Výsledná aktivita PPO u zvolených vzorků byla různorodá a nedá se s jednoznačností určit, jestli alela nebo zbarvení hila souvisí s vyšší aktivitou enzymu. V každé sadě bez ohledu na tyto souvislosti se objevily vzorky, které měli vyšší aktivitu než ostatní. Zdaleka nejvyšší aktivitu měl nedormantní vzorek A34 s černým hilem. Některé vzorky v přechozích experimentech byly rozděleny

na dva podjedince. Vzorky B74A a B74B byly od sebe rozděleny během křížení, ale u aktivity PPO se data nelišila. Kdežto rozdělené vzorky A54A a A54B vykazovaly značný rozdíl v aktivitě PPO (viz Graf č. 1).



Graf 1: Aktivita PPO v závislosti na čase (30, 60 a 120 minut) se substrátem 4-methylcatechol

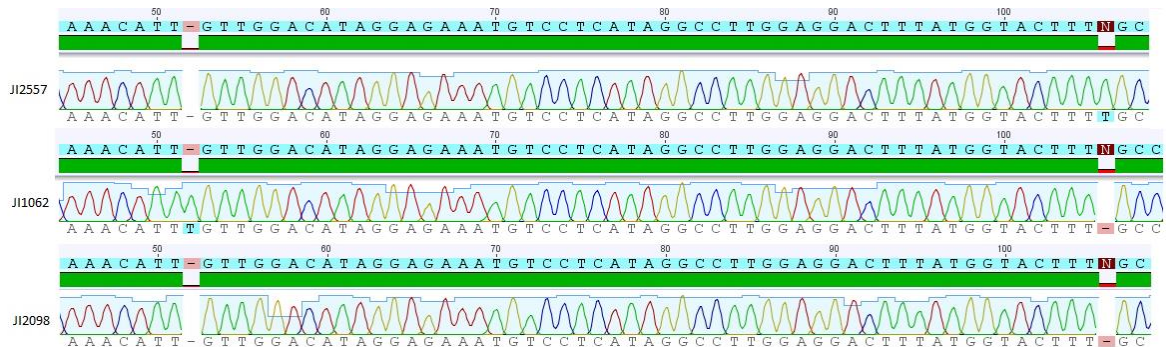
5.6 Sekvenování

Pro sekvenční analýzu bylo vybráno 90 genotypů. Byla provedena amplifikace pomocí primerů pPPO-817F – ACATTTCCCCTTCTTTGCTTCCA, pPPO-1709R – TCTACTGATCCAGGACCGGGAT, části PPO (Psat1g206360) genu 49 bp od START kodonu (ATG). Délka celkové získané sekvence činila 910-912 bp. Sekvence byly nahrány do programu Geneious, kde byly editovány a identifikovány záměny. Bylo zjištěno 12 záměn, které měli v dané pozici alespoň 3 genotypy. První dva polymorfismy měly inzerci nebo delecii v daných pozicích. Ostatní obsahovaly jednonukleotidový polymorfismus (viz Tabulka č. 8).

Tabulka 8: Analýza polymorfismů v 90 genotypech

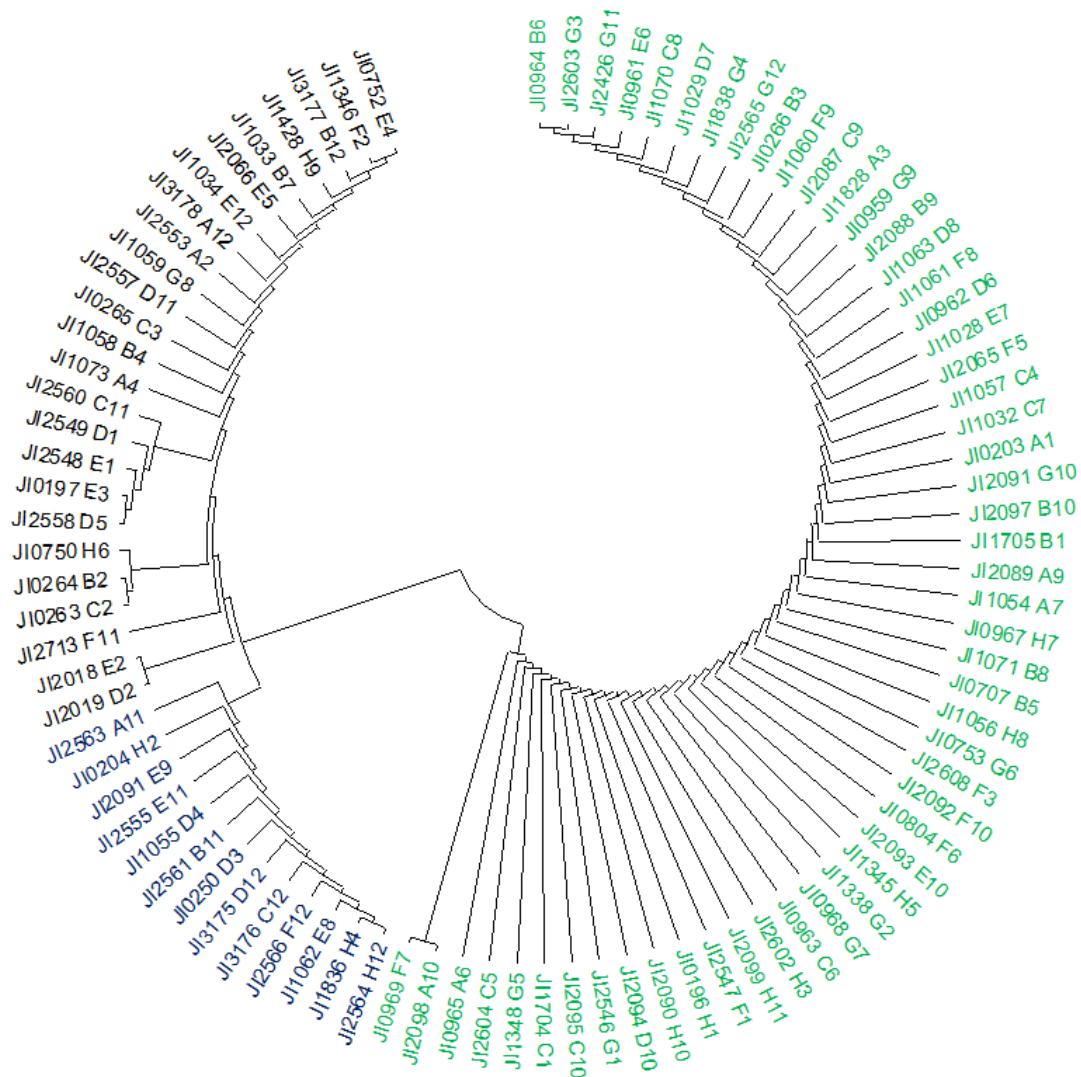
Číslo polymorfismu	Typy nukleotidů	Délka (bp)	Pozice od START kodonu (bp)	Četnost výskytu v 90 vzorcích	Synonymní/nesynonymní záměna
1	T/-	1	101	13,3 % T /86,7 % -	-
2	T/-	1	156	27,8 % T /72,2 % -	-
3	T/C	1	191	96,7 % T /3,3 % C	synonymní
4	T/C	1	290	94,5 % T /5,5 % C	synonymní
5	T/C	1	551	87,8 % T /12,2 % C	synonymní
6	A/T	1	572	85,6 % A /14,4 % T	synonymní
7	C/T	1	600	86,7 % C /13,3 % T	synonymní
8	G/A	1	621	94,5 % G /5,5 % A	nesynonymní
9	C/T	1	623	87,8 % C /12,2 % T	synonymní
10	G/A	1	711	91,2 % G /8,8 % A	synonymní
11	C/T	1	758	96,7 % C /3,3 % T	synonymní
12	A/T	1	760	93,4 % A /6,6 % T	nesynonymní

K důležitým místům patří záměny na pozicích 101 a 156, které rozhodují o tom, zda vedou k STOP kodonu nebo mají funkční PPO alelu. Pokud v místě 101 není přítomný thymin, ale v pozici 156 ano, tak alela PPO je funkční. V ostatních případech znamená, že dané inserce nebo delecce v sekvenci vedou ke STOP kodonu (viz Obrázek č. 11).



Obrázek 11: Ukázka sekvencí s insercí a delecí v pozicích 101 a 156 vedoucí k předčasnému STOP kodonu

Po převedení z nukleotidové do aminokyselinové podoby se ukázalo, zda jednotlivé záměny vedou k STOP kodonu. Byly rozlišeny tři varianty: 25 genotypů má funkční PPO bez STOP kodonu, 12 genotypů má STOP kodon téměř na počátku a poslední variantou 53 sekvencí, které mají STOP kodon v pozici 43. Na základě těchto výsledků, byla provedena fylogenetická analýza pomocí metody „Maximum likelihood“ (viz Obrázek č.12).

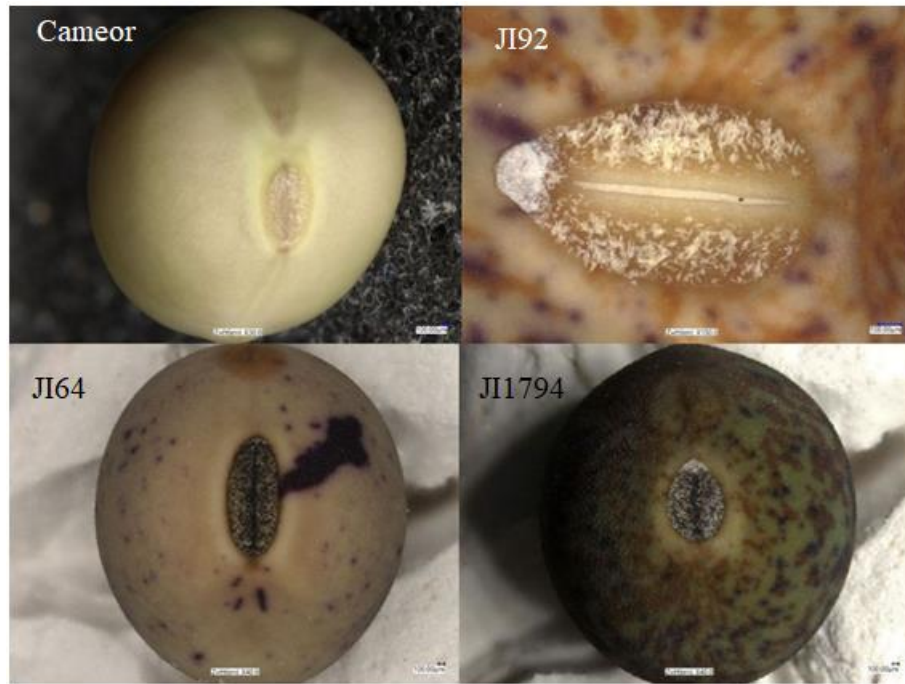


Obrázek 12: Fylogenetická analýza proteinových sekvencí studovaných genotypů (zeleně a modře označené genotypy mají nefunkční PPO, černě zbarvené vzorky vlastní funkční alelu)

Následně byly v databázi (<https://www.seedstor.ac.uk/>) vyhledány informace o zbarvení hila a osemení. Výsledky poukazují, že barva hila souvisí s funkčností PPO. Z 25 funkčních genotypů má černé hilum 100 % genotypů, výjimky existují u genotypů, které mají ve své sekvenci STOP kodon. Z 66 vzorků má 8 černé hilum, což odpovídá 12,1 % z celkového počtu (viz Tabulka č. 9). Kulturní genotypy hrachů obsahují krémové/bílé hilum, zatímco plané mají hilum černé (viz Obrázek č. 13).

Tabulka 9: Funkčnost PPO genu v souvislosti se zbarvením hila v jednotlivých genotypech

Genotyp	Funkčnost ORF	Barva hilum	Barva osemení	Genotyp	Funkčnost ORF	Barva hilum	Barva osemení
J12553	Funkční	černá	zelená	J12097	stop	hnědá	zelená
J11073	Funkční	černá	šedá	J11704	stop	hnědá	krémová
J13178	Funkční	černá	zelená	J12087	stop	hnědá	zelená
J10264	Funkční	černá	hnědá	J12095	stop	hnědá	hnědá
J11058	Funkční	černá	krémová	J11063	stop	hnědá	krémová
J11033	Funkční	černá	krémová	J10961	stop	hnědá	krémová
J13177	Funkční	černá	krémová	J12547	stop	hnědá	zelená
J10263	Funkční	černá	hnědá	J11060	stop	hnědá	hnědá
J10265	Funkční	černá	krémová	J12603	stop	hnědá	zelená
J12560	Funkční	černá	hnědá	J12565	stop	hnědá	hnědá
J12549	Funkční	černá	zelená	J12602	stop	hnědá	zelená
J12019	Funkční	černá	hnědá	J11056	stop	hnědá	hnědá
J12558	Funkční	černá	zelená	J12090	stop	hnědá	zelená
J12557	Funkční	černá	zelená	J11828	stop	krémová	krémová
J12548	Funkční	černá	zelená	J10965	stop	krémová	krémová
J12018	Funkční	černá	hnědá	J11054	stop	krémová	krémová
J10197	Funkční	černá		J10964	stop	krémová	krémová
J10752	Funkční	černá	krémová	J11057	stop	krémová	zelená
J12066	Funkční	černá	krémová	J12604	stop	krémová	zelená
J11034	Funkční	černá	hnědá	J11032	stop	krémová	krémová
J11346	Funkční	černá	krémová	J11070	stop	krémová	zelená
J12713	Funkční	černá	zelená	J10962	stop	krémová	krémová
J11059	Funkční	černá	krémová	J11029	stop	krémová	zelená
J10750	Funkční	černá	krémová	J12094	stop	krémová	krémová
J11428	Funkční	černá	hnědá	J11028	stop	krémová	krémová
J10204	stop	černá	šedá	J12093	stop	krémová	zelená
J12564	stop	černá	hnědá	J12608	stop	krémová	zelená
J13175	stop	černá	šedá	J12065	stop	krémová	krémová
J12563	stop	černá	krémová	J10969	stop	krémová	krémová
J12561	stop	hnědá	zelená	J11061	stop	krémová	krémová
J12091	stop	hnědá	zelená	J12092	stop	krémová	krémová
J10250	stop	hnědá	šedá	J11338	stop	krémová	zelená
J12555	stop	hnědá	zelená	J11838	stop	krémová	zelená
J11836	stop	hnědá	hnědá	J11348	stop	krémová	zelená
J13176	stop	krémová	krémová	J10753	stop	krémová	krémová
J11062	stop	krémová	krémová	J10968	stop	krémová	krémová
J11055	stop	krémová	krémová	J10959	stop	krémová	krémová
J10203	stop	hnědá	zelená	J12426	stop	krémová	zelená
J10804	stop	hnědá	krémová	J11345	stop	krémová	krémová
J12089	stop	hnědá	zelená	J10967	stop	krémová	krémová
J12098	stop	hnědá	zelená	J12099	stop	krémová	krémová
J11705	stop	hnědá	krémová/zelená	J10196	stop	černá	krémová/zelená
J10707	stop	hnědá	krémová/zelená	J12546	stop	černá	zelená
J11071	stop	hnědá	krémová	J10963	stop	černá	hnědá
J12088	stop	hnědá	šedá	J10266	stop	černá	hnědá



Obrázek 13: Ukázka zbarvení hila kulturní x plané (horní část obrázku kulturní, spodní část plané genotypy)

Spojení mezi barvou hilu a funkcí genu PPO vyvolalo otázku, zda existuje genetická souvislost. Lock (1907) popsal černé hilum, Lamprecht (1948) ho umístil na konec prvního chromozomu (LGVI). Święcicki shrnul informace (The Catalogue of *Pisum* genes, 2019, p. 128), kde *pl A* má hnědé hilum, *PL A* a *PL a* mají černé, zatímco *pl a* má krémové hilum (viz Obrázek č. 13).



Obrázek 14: Ukázka zbarvení hila *pl a* (vlevo) a *PL A* (v pravo) (foto: Noam Chayut: genové banka John Innes Centrum, Norwich, Velká Británie)

6 Diskuze

Práce byla založena na analýze genu kódující polyfenol oxidázu (PPO), homologních genů hrachu a studiu funkce PPO v semeni. PPO je důležitým enzymem patřící do skupiny „multi-copper oxidáz“, který můžeme najít v rostlinách, houbách, ale i v živočiších. Hraje velmi důležitou roli v ochraně rostlin před biotickým a abiotickým stresem (Tran *et al.*, 2012). PPO patří do širší skupiny enzymů společně s lakázami, katechol oxidázami a tyrozinázami (krezolázami). Lakázy patří do multigenové rodiny, jejíž počty se mezi druhy značně liší, *A. thaliana* (17 genů; McCaig *et al.*, 2005), *Brachypodium distachyon* (29 genů; Wang *et al.*, 2015), *Oryza sativa* (30; Liu *et al.*, 2017), *Zea mays* (22, Liu *et al.*, 2020), *Glycine max* (49, Liu *et al.*, 2020), *Setaria viridis* (52, Simões *et al.*, 2020). Pokud daný organismus má geny kódující lakázy, tak nutně nemusí znamenat, že má i PPO geny. *In silico* analýzou bylo zjištěno, že *Arabidopsis thaliana* je jednou z těchto rostlin. Obsahuje celkem 17 LAC genů, ale ani jednu polyfenol oxidázu. Zastoupení polyfenol oxidáz je celkově mnohem nižší oproti samotným lakázám, *B. distachyon* má pouze 6, *O. sativa* 2, *Z. mays* 6, *G. max* 11 PPO genů. Z 40 hrachových LAC homologů byly objeveny pouze 2 PPO geny na chromozomech a třetí na scaffoldu. Homology hrachových lakáz můžeme rozdělit na základě sekvence do šesti (sedmi) tříd. Liu *et al.*, 2020 rozděluje lakázy do sedmi tříd, kdežto Simões *et al.*, 2020 do šesti tříd. Zastoupení hrachových lakáz bylo podle fylogenetické analýzy rozděleno do sedmi tříd, ale poslední sedmá třída odpovídá sekvenčně askorbát oxidázám než lakázám, takže se můžeme řídit rozdělením do šesti tříd, jak u Simões *et al.*, 2020. Největší zastoupení lakáz je ve třídě, hrachových homologů nalezneme 7, ale u ostatních druhů je zastoupení variabilní *B. distachyon* má nejvíce LAC v páté třídě, *O. sativa* v 5, *Z. mays* 5, *M. truncantula* 1 a *A. thaliana* v 1 a 2 stejně (Simões *et al.*, 2020). Jak bylo zmíněno výše, zastoupení lakáz je mnohem častější než PPO. Tato skutečnost může souviset vystoupením rostlin na souš. Geny LAC hrají roli v prodloužení buněk, lignifikaci, pigmentaci a biosyntéze sekundární buněčné stěny (Liu *et al.*, 2020). Kdežto PPO slouží pravděpodobně k ochraně rostlin, geny PPO nejsou nutné pro primární metabolickou funkci, a tak mohly být během evoluce částečně nebo úplně eliminovány.

Substrátem pro PPO jsou různé fenolické látky: antokyany, flavanoly, flavony, flavonoly a isoflavonoidy z flavonoidních polyfenolů, kyselina hydroxybenzoová a kyselina hydroxyskořicová (Parveen *et al.*, 2010; Boeckx *et al.*, 2015). Flavonoidy jsou

sekundární metabolity fenyylpropanidní dráhy a plní důležitou roli v první linii při ochraně rostlin. Mezi flavonoidy patří i flavan-3-oly, které vedou k formaci proantokyanidinů (PA) neboli kondenzovaných taninů (Pourcel *et al.*, 2005; 2006; Liu *et al.*, 2014). Proantokyanidiny jsou primárně složeny z trans flavan-3-olu a cis flavan-3-olu. Výjimku tvoří *A. thaliana* a *M. truncatula*, kteří nesyntetizují trans flavan-3-oly (Jun *et al.*, 2018). Tito autoři sledovali množství PA napříč stádii, stejně jako v mé diplomové práci. Obsah rozpustných PA klesal během vývoje osemení. Naopak přesně opačný průběh vykazovalo měření nerozpustných PA v osemení hrachu, než v případě s *M. truncatula* (Jun *et al.*, 2018).

Všechny „multi-copper“ oxidázy mají tři vysoce konzervované domény N-terminální chloroplastový transitní peptid (cTP), doménu s vazbou na Cu a C-terminální oblast. Doména s vazbou na Cu se skládá z dvou aktivních míst obsahující dva ionty mědi, každý vázaný na tři histidinové postranní řetězce (Marusek *et al.*, 2006; Aniszewski *et al.*, 2008). N-terminální transitní peptid obvykle zajišťuje transport do thylakoidů nebo i nejspíše do vakuolárního lumenu (Tran *et al.*, 2011). Na C-konci se nachází axiální ligand v blízkosti vazebného místa T1 Cu (HCH-X3-H-X3-G) ovlivňuje redoxní potenciál (Ditmer *et al.*, 2004). Přítomnost methioninu, fenyllalaninu nebo leucinu rozhoduje o redoxním potenciálu. Mutace v methioninu za leucin vede ke zvýšení redoxního potenciálu o 100 mV (Jořenek *et Zajoncová*, 2013). PPO využívá molekulární kyslík k oxidaci monofenolů až na o-chinony. O-chinony následně polymerizují a vytvářejí hnědé pigmenty. Autoři Marbach, Mayer a Werker (Marbach *et Mayer*, 1974; Werker *et al.*, 1979) v 70. letech zkoumali vztah pigmentace a aktivity PPO. V této práci byl testován vliv oxidace, tj. přítomnosti kyslíku na vznik hnědých fenolických pigmentů. Pravděpodobně díky funkci PPO (nebo katechol oxidázy). Otázkou je, zda - li semena dozrálá ve vakuu, nebo v dusíkové atmosféře jsou schopné života, nebo u nich zůstaly jen fyzikální procesy jako bobtnání. Každopádně bylo zjištěno, že vyšší aktivita PPO se vyskytovala u dormantních tj. planých genotypů, více než u nepigmentovaných nedormantních semen hrachu. Tyto výsledky odpovídají našim měřením kontrastních rodičovských genotypů. V testu aktivity celých semen bylo potvrzeno, že nepigmentovaný Cameor nevykazuje žádnou aktivitu PPO, kdežto pigmentované JI92 a JI64 aktivitu vlastní. Rozdíl mezi JI92 (kulturním, nedormantním) a JI64 (planým, dormantním) nebyl velký, i přesto vyšší aktivitu PPO vykazoval planý genotyp JI64. Smržová (2019) uvádí, že genotypy JI92 a JI64 mají sekvenčně shodné

aminokyselinové složení. Ačkoliv JI92 patří mezi kulturní hrachy, tak má podle sekvenční úrovně funkční PPO. Takže regulace tohoto genu může být i promotorové části nebo jiné regulační oblasti.

Jelikož se o-chinony uplatňují při lignifikaci, a ta může mít roli při propustnosti osemení, hraje právě lignin významnou roli. Ligninový polymer vzniká po oxidaci spojováním monolignolových radikálů (Onnerud *et al.*, 2002). Místa depozice suberinu a ligninu na příčném řezu kořenem jsou označována jako tzv. Casparyho proužky, které vznikají během rané fáze impregnace radiální buněčné stěny endodermis. Tyto nepropustné složky jsou tvořené ligninem a jsou velmi důležitou stránkou při ochraně rostlin, protože zvyšují odolnost vůči enzymatické a chemické degradaci (Nasser *et al.*, 2012). Lakázy LAC4, LAC 11 a LAC17 mají důležitou roli v procesu lignifikace. Pokud tyto lakázy jsou v důsledku mutací nefunkční, dochází k rozsáhlým deformacím a nezpracované monolignolové radikály působí toxicky na celý organismus. Avšak lignifikace není ovlivněna v Casparyho proužcích, kde hlavní úlohu ve funkčnosti mají naopak peroxidázy (Zhao *et al.*, 2013). Obsah ligninu napříč stádii byl stejný, a tak se zdá že peroxidázy působí společně s lakázami.

Funkčnost daného genu může být dána ztrátou nebo vložením jedné báze, což může vést k předčasnému STOP kodonu. V diplomové práci Lucie Smržové (2019) byla objevena inserce/delece, která vedla k posunutí čtecího rámce a tvorbě STOP kodonu. Všechny kulturní hrachy (14 vzorků) analyzované v práci L. Smržové měly nefunkční PPO, ale naopak u všech planých genotypů byla alela funkční. Výjimku tvoří kulturní *P. abyssinicum*, původem z Etiopie, který neobsahoval inserci/deleci. Tato skutečnost podporuje pravděpodobnou druhou nezávislou domestikaci hrachu, a rovněž popírá spojitost mezi funkcí PPO a dormancí semen. V mé práci mělo z 90 analyzovaných genotypů funkční PPO celkem 25 vzorků. Tyto vzorky pocházely z oblasti Střední Asie (Pákistánu, Afganistánu, Nepálu a Číny). Celkem u kulturních 66 genotypů vedla jedna delece k předčasnému STOP kodonu a tím i ke ztrátě funkce. Delece v genu PPO může způsobit ztrátu funkce nebo i změnu barvy semene u vodního melounu (Liu *et al.*, 2020). Ztráta funkce genů PPO byla detekována u několika zemědělských plodin, jako je proso (Inou *et al.*, 2015; Fukunaga *et al.*, 2020), rýže (Yu *et al.*, 2008) a ječmen (Taketa *et al.*, 2010). Změna funkčnosti alely byla způsobena vložením jedné báze nebo celého transpozonu. Rozdíl mezi funkčností PPO genu se vyskytuje mezi dvěma poddruhy kulturní rýže. Rýže indická (*O. sativa* subsp. *indica*) při delším skladování

zhnědne, kdežto rýže japonského poddruhu (*O. sativa* subsp. *japonica*) zůstane bílá. Během domestikace tak působila pravděpodobně selekce jak lidská (kulturní preference), tak možná i v kontextu s ochranou před patogeny, kdy právě v tropičtějších oblastech byla zapotřebí mít funkční PPO gen. Hnědnoucí (oxidační) proces může připomínat změnu barvy pšenice (*Triticum aestivum*), která je také katalyzována polyfenol oxidázami (PPO) (Anderson *et Morris*, 2001; Simeone *et al.*, 2002). Za hnědnutí je zodpovědný gen *Phr*, který kóduje PPO protein. Tento gen je defektní u rýže japonské, takže nemůže způsobovat hnědnutí zrn, a během domestikace došlo k defektům v *Phr* genu celkem třikrát (Yu *et al.*, 2008). Spotřebitelé preferují bílou barvu zrn, šlechtění pšenice si kladlo za cíl snížit nebo eliminovat změnu barvy obilí. Lidský faktor má nezastupitelnou roli v při selekci hnědnoucích nebo nepigmentovaných druhů. Lidé často odsuzují některé potraviny jen pro jejich barvu nebo chuť (hnědnutí obilovin – chléb, nudle, těstoviny) (Yu *et al.*, 2008).

Semena mají vyvinuté fyzikální, chemické a biologické mechanismy v ochraně před škůdci. První linii stojí osemení jako takové, protože na svém povrchu může mít nepropustnou vrstvu suberinu, díky které semena nejsou přístupná pro patogeny. Dále k obranným mechanismům patří rychlé klíčení a asociace s mikroorganismy (Dalling *et al.*, 2011; Bewley *et al.*, 2013). Mezi složky biochemické ochrany patří enzymy: chitinázy, peroxidázy, oxalát oxidázy a polyfenol oxidázy. Pro přežití semene je důležité, aby obranné enzymy byly přítomné ve vnějším osemení. Fuerst *et al.*, 2018 potvrzuje, že ve vnějším osemení se nacházejí jak polyfenol oxidázy, peroxidázy, chitinázy, ale ne oxalát oxidázy. Funkční polyfenol oxidáza vede k tvorbě hnědých melaninových pigmentů. Aktivní *Phr* gen najdeme především v tropických a subtropických oblastech, zatímco neaktivní *Phr* gen se nachází v mírných oblastech (Inoue *et al.*, 2015). Což může souviset s tím, že PPO hraje výraznou roli v ochraně před patogeny, houbovým onemocněním a v teplejších oblastech může přispívat k udržení vegetačního klidu (dormanci) semen. Jako důkaz slouží semena divokého prosa (*Setaria italica*) s aktivním PPO složí jako ochrana proti chorobám (Fuerst *et al.*, 2014). Při sekvenování bylo potvrzeno, že v planých semenech hrachu je PPO funkční. Ječmen, proso ale i hrách mají více jak jeden gen PPO. Funkčnost genů může být způsobena diversifikací duplikovaných genů. Rozmanitost v počtu genů, sekvenci, tkáňové a substrátové specifitě v rostlinných druzích naznačují, že PPO má dlouhodobou roli ve fitness (Tran *et al.*, 2012).

7 Závěr

Diplomová práce byla věnována studiu polyfenol oxidázy. Byla provedena *in silico* analýza lakázových genů, kdy sekvence byly prohledávány BLAST analýzou vůči genomu hrachu. Bylo zjištěno, že v genomu hrachu se nachází pouze 2 geny kódující polyfenol oxidázy, potenciálně třetí polyfenol oxidáza přítomná na scaffoldu. Lakáz bylo identifikováno 23 a nejvíce byly zastoupeny na druhém (6 lakáz) a třetím chromozomu (6 lakáz) a askorbát oxidáz bylo nalezeno 14 s největším zastoupením na chromozomu 4. Dále byla provedena analýza genové exprese v jednotlivých pletivech – listu, kořeni, květu, osemení a embryu. V různých pletivech a genotypech se exprese lišila. Všechny transkripty analyzovaných genů byly detekovány v embryu. Bylo provedeno testování rozpustných a nerozpustných proantokyanidinů, jelikož flavonoidy patří mezi substráty polyfenol oxidáz. Bylo zjištěno, že obsah proantokyanidinů s vývojem semene klesá, a to jak rozpustných, tak v nerozpustných. Naopak analýza obsahu ligninu nezjistila výrazné rozdíly mezi vývojovými stádii nebo genotypy. Při testování aktivity polyfenol oxidázy u celých semen hrachu byly použity rekombinantní inbrední linie. Byl sledován vztah mezi obsahem proantokyanidinů, aktivitou a původem. Výsledná aktivita PPO u zvolených vzorků byla různorodá a nedá se s jednoznačností určit, jestli alela, nebo zbarvení hila souvisí s vyšší aktivitou enzymu. Při sekvenování 90 genotypů bylo zjištěno, že delece v pozicích 101 a 156 bp od START kodonu vedou k vytvoření předčasného STOP kodonu a následně nefunkčnosti PPO. Funkční PPO bylo zjištěno u 25 vzorků. Výsledky naznačují genetickou vazbu mezi pigmentací hila a funkcí PPO. Černé hilum je morfologickým znakem, jehož pozice je na prvním chromozomu a odpovídá pozici PPO genu.

8 Použitá literatura

- Ainsley P., Jones M., Erickson T. (2008): Overcoming physiological dormancy in *Prostanthera eurybioides* (Lamiaceae), a nationally endangered Australian shrub species. Australian Journal of Botany 56: 3
- Anderson J. V., Morris C. F. (2001): An improved whole-seed assay for screening wheat germplasm for polyphenol oxidase activity. Crop Science 41(6): 1697-1705
- Aniszewski T., Lieberei R., Culewicz K. (2008): Research on catecholases, laccases and cresolases in plants. Recent progress and future needs 50: 1
- Banci L. (1997): Structural properties of peroxidases. Journal of Biotechnology 53(2-3): 253-63
- Barton L. V. (1934): Dormancy in Tilia seeds. Contrib. Boyce Thompson Institute. 6: 69-89
- Baskin C. C., Baskin J. M. (1998): Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, Elsevier
- Baskin C. C., Baskin J. M. (2020): Breaking Seed Dormancy during Dry Storage: A Useful Tool or Major Problem for Successful Restoration via Direct Seeding? Plants 9(5): 636
- Baskin J. M., Baskin C. C. (1991): "Nondeep complex morphophysiological dormancy in seeds of *Osmorhiza claytonii* (Apiaceae)." American Journal of Botany 588-593
- 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
- Begon M., Harper J. L., Townsend, C. R. (1997): Ekologie, jedinci, populace a společenstva. Vydavatelství UP, Olomouc
- Bewley J. D. (1997): Seed Germination and Dormancy. The Plant cell 9(7): 1055–1066
- Bewley J. D., Bradford K., Hilhorst H. (2013): Seeds: physiology of development, germination and dormancy, 3rd edition. Springer

- Bhalla P. L., Slattery H. D. (1984): Callose Deposits Make Clover Seeds Impermeable to Water. *Annals of Botany* (53): 125–128
- Bidzinski P. (2009): Flavonoid oxidation in *Arabidopsis thaliana* seeds. Functional analysis of the TRANSPARENT TESTA 10 gene encoding a polyphenoloxidase of the laccase type. *Molecular biology*. Universite Paris XI Orsay
- Boeckx T., Winters A. L., Webb K. J., Kingston-Smith A. H. (2015): Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization? *Journal of Experimental Botany* 66(12): 3571-9
- Bradford K. J., Nonogaki H. (2007): *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell Publishing Ltd 13: 978-14051-3983-0
- Cai X., Davis E.J., Ballif J., Liang M., Bushman E., Haroldsen V., Torabinejad J., Wu Y. (2006): Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 57(11):2563-9
- Campbell N. A., Reece J. B. (2008): *Biologie*. Computer Press a.s.
- Campos-Vega R., Loarca-Piña G., Oomah B. D. (2010): Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*. 43(2): 461-482
- Constabel, C. P., Barbehenn R. (2008): Defensive Roles of Polyphenol Oxidase in Plants. *Induced Plant Resistance to Herbivory* pp. 253-270
- Constabel P. C., Yip L., Patton J. J., Christopher M. E (2000): Polyphenol Oxidase from Hybrid Poplar. Cloning and Expression in Response to Wounding and Herbivory. *Plant Physiology* 124(1): 285-296
- Dalling J., Davis A., Schutte B., Arnold A. (2011): Seed survival in soil: Interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. *Journal of Ecology* 99: 89 - 95
- Dahl W. J., Foster L. M., Tyler R. T. (2012): Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition* 108(S1): S3-10
- Dhyani A., Phartyal S., Nautiyal B. P., Nautiyal, M. C. (2013): Epicotyl morphophysiological dormancy in seeds of *Lilium polyphyllum* (*Liliaceae*). *Journal of Biosciences* 38(1): 13-9

- Dittmer N. T., Suderman R. J., Jiang H., Zhu Y. C., Gorman M. J., Kramer K. J., Kanost M. R. (2004): Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34(1): 29-41
- Dixon R. A., Xie D. Y., Sharma S. B. (2005): Proanthocyanidins-a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* 165(1): 9-28
- Dwivedi U. N., Singh P., Pandey V. P., Kumar A. (2011): Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic* 68, 117–128
- Finch-Savage W. E., Leubner-Metzger G. (2006): Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501–523
- Finkelstein R., Reeves W., Arizumi T., Steber C. (2008): Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* 59: 387-415
- Fuerst E. P., James M. S., Pollard A. T., Okubara P. A. (2018): Defense Enzyme Responses in Dormant Wild Oat and Wheat Caryopses Challenged with a Seed Decay Pathogen. *Frontiers in Plant Science* 23(8): 2259.
- Fuerst E. P., Okubara P. A., Anderson J. V., Morris C. F. (2014): Polyphenol oxidase as a biochemical seed defense mechanism. *Frontiers in Plant Science* 5: 689
- Fukunaga K., Nur M., Inoue T., Taketa S., Ichitani K. (2020): Phylogenetic analysis of the Si7PPO gene in foxtail millet, *Setaria italica*, provides further evidence for multiple origins of the negative phenol color reaction phenotype. *Genes and genetic systems* 95: 191-199
- Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G. (2010): Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(3): 369-85
- Grant J. J., Loake G. J. (2000): Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124: 21–29
- Grover A. (2012): Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1): 57-73

- Hamly D. H. (1932): Softening of the seeds of *Melilotus alba*. Botanical Gazette XCII: 345-375
- Harper J. L. (1957): The ecological significance of dormancy its importance in weed control. Proceedings of the IVth International Congress of Crop Protection pp. 415- 420
- 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
- Hradilová I., Trněný O., Válková M., Cechová M., Janská A., Prokešová L., Aamir K., Krezdorn N., Rotter B., Winter P., Varshney R. K., Soukup A., Bednář P., Hanáček P., Smýkal P. (2017): A combined comparative transcriptomic, metabolomic, and anatomical analyses of two key domestication traits: Pod dehiscence and seed dormancy in pea (*Pisum* sp.). Frontiers in Plant Science 8: 542e
- Inoue T., Yuo T., Ohta T., Hitomi E., Ichitani K., Kawase M., Taketa S., Fukunaga K. (2015): Multiple origins of the phenol reaction negative phenotype in foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv., were caused by independent loss-of-function mutations of the *polyphenol oxidase* (Si7PPO) gene during domestication. Molecular Genetics and Genomics 290(4): 1563-74
- Chaudhury A. M., Koltunow A., Payne, T., Luo M., Tucker M. R., Dennis E. S., Peacock W. J. (2001): Control of early seed development. Annual Review of Cell and Developmental Biology 17: 677–699.
- Chibbar R. Båga M. (2003): Genetic modification of primary metabolism: Carbohydrates. Encyclopedia of Applied Plant Sciences pp.449-459
- Jaganathan G. K. (2020): Defining correct dormancy class matters: morphological and morphophysiological dormancy in *Arecaceae*. Annals of Forest Science 77: 10
- Janská, A., Pecková, E., Sczepaniak, B., Smýkal, P., Soukup, A. (2018): The role of the testa during the establishment of physical dormancy in the pea seed. Annals of Botany XX: 1–15

- Janusz G., Pawlik A., Świdarska-Burek U., Polak J., Sulej J., Jarosz-Wilkolażka A., Paszczyński A. (2020): Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution International Journal of Molecular Sciences 21(3): 966
- Jořenek M., Zajoncová L. (2013): Biotechnologická význam lakázy a její charakteristika. Chemické listy 107: 921–928
- Jukanti A. (2017): Polyphenol Oxidase(s): Importance in Food Industry. In Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants. Springer, Singapore
- Jun J., Xiao X., Rao X., Dixon R. (2018): Proanthocyanidin subunit composition determined by functionally diverged dioxygenases. Nature Plants. 4: 1034–1043
- Kaintz C., Molitor C., Thill J., Kampatsikas I., Michael C., Halbwirth, H., Rompel A. (2014): Cloning and functional expression in *E. coli* of a polyphenol oxidase transcript from *Coreopsis grandiflora* involved in aurone formation. FEBS Letters 588(18): 3417-26
- Kitamura S., Shikazono N., Tanaka A. (2004): Transparent testa 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. Plant Journal 37(1): 104-14
- Komori H., Higuchi Y. (2015): Structural insights into the O₂ reduction mechanism of multicopper oxidase. Journal of Biochemistry 158: 293–298
- Koornneef M., Bentsink L., Hilhorst H. (2002): Seed dormancy and germination. Current Opinion in Plant Biology 5: 33–36
- Kumar S. V., Phale P. S., Durani S., Wangikar P. P. (2003): Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. Biotechnology and Bioengineering. 83(4): 386-94
- Lackey J. A. (2010): Endosperm Size Diversity in Domesticated, Wild, and Semiwild Soybean. Crop Science 50(1): 168-176
- Lamprecht H. (1948): The variation of linkage and the course of crossingover. Agri Hort. Genet. 6:10-48
- Liu M, Dong H, Wang M, Liu Q. (2020): Evolutionary divergence of function and expression of laccase genes in plants. Journal of Genetics 99(1): 23

- Liu Q., Luo L., Wang X., Shen Z. Zheng L. (2017): Comprehensive analysis of rice laccase gene (*OsLAC*) family and ectopic expression of *OsLAC10* enhances tolerance to copper stress in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences* 18(2): 209
- Lock R. H. (1907): On the Inheritance of Certain Invisible Characters in Peas. *Proceeding of the Royal Society B*: lxxix
- Marbach I., Mayer A. M. (1974): Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. *Plant Physiology* 54, 817–820
- Marusek C. M., Trobaugh N. M., Flurkey W. H., Inlow J. K. (2006): Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of the Inorganic Biochemistry* 100(1):108-23
- Mayer A. M. (2006): Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? *Phytochemistry* 67: 2318–2331
- McCaig B. C., Meagher R. B., Dean J. F. (2005): Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 221(5): 619-36
- Mishra B. B., Gautam S. (2016): Polyphenol Oxidases: Biochemical and Molecular Characterization, Distribution, Role and its Control. *Enzyme Engineering* 5: 1
- Moïse J. A., Han S., Gudynaite-Savitch L., Johnson D.A., Miki B. L. A. (2005): Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41(5): 620-644
- Moreira-Vilar F. C., Siqueira-Soares R., Finger-Teixeira A., de Oliveira D. M., Ferro A. P., da Rocha G. J., Ferrarese M., dos Santos W. D., Ferrarese-Filho O. (2014): The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than Klason and thioglycolic acid methods. *PlosS One* 9(10): e110000
- Naseer S., Lee Y., Lapierre C., Franke R., Nawrath C., Geldner N. (2012): Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proceedings of the National Academy of Science of U.S.A* 109(25): 10101-6
- Nikolaeva M. G. (1977): Factors controlling the seeds dormancy pattern. In: KAHN, A. A. ed. *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Amsterdam: North-Holland Publ. Co., s. 51-74

- North N., Casey R., Domoney C. (1989): Inheritance and mapping of seed lipoxygenase polypeptides in *Pisum*. *Theoretical and Applied Genetic* 77: 805–808
- Onnerud H., Zhang L., Gellerstedt G., Henriksson G. (2002): Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. *Plant Cell* 14(8): 1953-62
- Pandey V., Awasthi M., Singh S., Tiwari S., Dwivedi U. (2017): A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 6: 1-16
- Parveen I., Threadgill M. D., Moorby J. M., Winters A. (2010): Oxidative phenols in forage crops containing polyphenol oxidase enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 1371–1382
- Pelikán J., Hutýrová H., Knotová D., Raab S., Vymyslický T. (2012): Atlas semen druhů čeledi bobovité (*Fabaceae* L.). Olomouc: Petr Baštan
- Pollard A. (2018): Seeds vs fungi: An enzymatic battle in the soil seedbank. *Seed Science Research* 28(3): 197-217
- Pourcel L., Routaboul J. M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon, I. (2007): Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* 12(1): 29–36.
- Pourcel L., Routaboul J. M., Kerhoas L., Caboche M., Lepiniec L., Debeaujon I. (2005): Transparent testa 10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell* 17(11): 2966-80
- Requena L., Bornemann S. (1999): Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme. *The Biochemical Journal* 343(Pt1): 185-90
- Rodríguez M., Aleman G., Rodríguez-Delgado J. M., Dieck-Assad G., Martínez-Chapa S. O., Barceló D., Parra R. (2015): Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *Trends in Analytical Chemistry* 74: 21-45
- Sallon S., Solowey E., Cohen Y., Korchinsky R., Egli M., Woodhatch I., Simchoni O., Kislev M. (2008): Germination, Genetics, and Growth of an Ancient Date Seed. *Science* 320(5882): 1464

- Simeone R., Pasqualone A., Clodoveo M. L., Blanco A. (2002): Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7(2B): 763-9
- Simões M. S., Carvalho G. G., Ferreira S. S., Hernandez-Lopes J., de Setta N., Cesarino I. (2020): Genome-wide characterization of the laccase gene family in *Setaria viridis* reveals members potentially involved in lignification. *Planta* 251(2): 46
- Smržová L. (2019): Asociační mapování znaku dormance semen *Pisum* sp. a *Medicago truncatula*. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Smýkal P., Nelson M. N., Berger J. D., Von Wettberg E. J. B. (2018): The impact of genetic changes during crop domestication. *Agronomy* 8: 119
- 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
- Spurný M. (1963): Cell wall structure of epidermal cells of the pea seed coat (*Pisum sativum* L.) studied by microcinematography. *Mikroskopie* 18: 272-279
- Święcicki W. (2019): The Catalogue of *Pisum* Genes: Gene Resources Maintained at the Polish *Pisum* Genebank. Agencja Reklamowa Kreatiff
- Šerá B. (2012): Dormance semen u planě rostoucích rostlinných druhů se zřetelem k problematice plevelů, In: Bláha L., Šerá B. (eds) *Vybrané kapitoly z fyziologie rostlin a zemědělského výzkumu*, pp. 130-137, Praha
- Taketa S., Matsuki K., Amano S., Saisho D., Himi E., Shitsukawa N., Yuo T., Noda K., Takeda K. (2010): Duplicate polyphenol oxidase genes on barley chromosome 2H and their functional differentiation in the phenol reaction of spikes and grains. *Journal of Experimental Botany* 61(14): 3983-93
- Taranto F., Pasqualone A., Mangini G., Tripodi P., Miazzi M. M., Pavan S., Montemurro C. (2017): Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *International Journal of Molecular Sciences* 18(2): 377
- Tran L., Taylor J., Constabel C. P. (2012): The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC genomics* 13: 395

- Tůma A, J., Tůmová L. (1998): Fyziologie rostlin. První vydání. Gaudeamus. Hradec Králové
- Turlapati P. V., Kim K. W., Davin L. B., Lewis N. G. (2011): The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta* 233(3): 439–470
- Tzitzikas E. N., Vincken J. P., de Groot J., Gruppen H., Visser R. G. (2006): Genetic variation in pea seed globulin composition. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* 54(2): 425-33
- Vandelook F., Bolle N., Van Assche J. (2009): Morphological and physiological dormancy in seeds of *Aegopodium podagraria* (*Apiaceae*) broken successively during cold stratification. *Seeds Science Research* 19(2): 115-123
- Van Dongen J. T., Ammerlaan A. M., Wouterlood M., Van Aelst A. C., Borstlap A. C. (2003): Structure of the developing pea seed coat the post-pholem transport pathway of nutrients. *Annals of Botany* (93): 729–737
- Verdier, J., Dessaint, F., Schneider, C., Abirached-Darmency, M. (2013): A combined histology and transcriptome analysis unravels novel questions on *Medicago truncatula* seed coat. *Journal of Experimental Botany* 64(2), 459–470
- Vinter V. (2009): Rostliny pod mikroskopem. Základy anatomie cévnatých rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
- Wahler D., Gronover C. S., Richter C., Foucu F., Twyman R. M., Moerschbacher B. M., Fischer R., Muth J., Prüfer D. (2009): Polyphenoloxidase silencing affects latex coagulation in *Taraxacum* species. *Plant Physiology* 151(1): 334-46.
- Wang Y., Bouchabke-Coussa O., Lebris P., Antelme S., Soulhat C., Gineau E., Dalmais M., Bendahmane A., Morin H., Mouille G., Legée F., Cézard L., Lapierre C., Sibout R. (2015): LACCASE5 is required for lignification of the *Brachypodium distachyon* Culm. *Plant physiology* 168(1): 192–204
- Weber H., Borisjuk L., Wobus U. (2005): Molecular physiology of legume seed development. *Annual Review of Plant Biology* (56): 253–279.

Werker E., Marbach I., Mayer A.M., (1979): Relation Between the Anatomy of the Testa, Water Permeability and the Presence of Phenolics in the Genus *Pisum*. *Annals of Botany* 43: 765–771

Yashina S., Gubin S., Maksimovich S., Yashina A., Gakhova E., Gilichinsky D. (2012): Regeneration of whole fertile plants from 30,000-y-old fruit tissue buried in Siberian permafrost. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109(10): 4008-13

Yoruk R., Marshall M. (2003): Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase. *Journal of Food Biochemistry* 27: 361-422

Yoshida H. (1883): Chemistry of Lacquer (Urushi) Part 1. *Journal of the Chemical Society*, 43: 472-486

Yu Y., Tang T., Qian Q., Wang Y., Yan M., Zeng D., Han B., Wu C-I., Shi S., Li, J. (2008): Independent Losses of Function in a Polyphenol Oxidase in Rice: Differentiation in Grain Discoloration between Subspecies and the Role of Positive Selection under Domestication. *Plant Cell* 20: 2946–2959

Zhao Q., Nakashima J., Chen F., Yin Y., Fu C., Yun J., Shao H., Wang X., Wang Z. Y., Dixon R. A. (2013): Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25(10): 3976–3987

Zhang K., Zhang Y., Ji Y., Walck J. L., Tao J. (2020): Seed Biology of *Lepidium apetalum* (*Brassicaceae*), with Particular Reference to Dormancy and Mucilage Development. *Plants* 9(3): 333