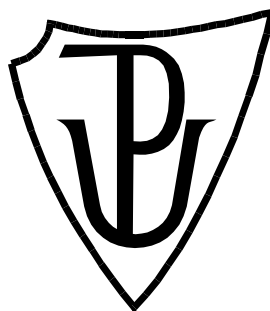


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Zapojení enzymů a metabolitů fenypropanoidní dráhy v reakci hrachu setého na salinitní stres

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jana Horníčková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Sekaninová Ph.D.
Konzultantka:	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
Rok:	2022

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce Mgr. Janě Sekaninové, Ph.D. za vedení, všestrannou pomoc a rady, které mi poskytovala při vypracování své bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. a Mgr. Janě Balarynové, Ph.D. za cenné připomínky a návrhy pro vylepšení bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Horníčková
Název práce	Zapojení enzymů a metabolitů fenylypropanoidní dráhy v reakci hrachu setého na salinitní stres
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Sekaninová Ph.D.
Konzultantka	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium odezvy hrachu setého (*Pisum sativum* L.) na salinitní stres. Teoretická část je věnována rostlinnému stresu obecně, následně abiotickému a salinitnímu stresu. Následuje stručný popis fenylypropanoidní dráhy spolu s charakteristikou enzymů cinnamylalkoholdehydrogenasa, fenylalaninamoniaklyasa, peroxidasa a polyfenoloxidas. Na konci jsou charakterizovány role polyfenolů u rostlin.

Experimentální část je zaměřena na určení vlivu salinitního stresu na celkovou antioxidační kapacitu, koncentraci flavonoidů a aktivitu peroxidasy a polyfenoloxidas u dvou genotypů hrachu, kulturního *P. sativum* subsp. *sativum* Trendy a planého *P. sativum* subsp. *elatius* IG52565. Studované parametry byly testovány v osemení, embryu a kořenech obou genotypů ve dvou vývojových stádiích. V důsledku vystavení rostlin salinitnímu stresu došlo ke změnám v celkové antioxidační kapacitě i aktivitě obou enzymů, především v embryu a osemení. Flavonoidy byly spektrofotometrickou metodou stanoveny pouze v osemení studovaných genotypů.

Klíčová slova	Fenylypropanoidní dráha, salinitní stres, hrách setý, fenoly, flavonoidy, cinnamylalkoholdehydrogenasa, fenylalaninamoniaklyasa, peroxidasa, polyfenoloxidas
Počet stran	48
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jana Horníčková
Title	Involvement of enzymes and metabolites of the phenylpropanoid pathway in the response of <i>Pisum sativum</i> exposed to salinity stress
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Sekaninová Ph.D.
Consultant	Mgr. Jana Balarynová Ph.D.
The year of presentation	2022

Abstract

This bachelor thesis is focused on the study of the response of pea (*Pisum sativum* L.) to salinity stress. The theoretical part is devoted to plant stress in general, followed by salinity stress. The following is a brief description of the phenylpropanoid pathway along with the characteristics of the enzymes cinnamyl alcohol dehydrogenase, phenylalanine ammonia lyase, peroxidase and polyphenol oxidase. Finally, the roles of polyphenols in plants are characterized.

The experimental part is focused on determining the effect of salinity stress on the total antioxidant capacity, flavonoid concentration and peroxidase and polyphenol oxidase activity in two genotypes of pea, cultural *P. sativum* subsp. *sativum* Trendy and wild *P. sativum* subsp. *elatius* IG52565. The studied parameters were tested in the seed coat, embryo and roots of both genotypes in two developmental stages. As a result of plant exposure to salinity stress, there were changes in the total antioxidant capacity and activity of both enzymes, especially in the embryo and seed coat. Flavonoids were determined by the spectrophotometric method only in the seeds of the studied genotypes.

Keywords	Phenylpropanoid pathway, salt stress, <i>Pisum sativum</i> , phenols, flavonoids, cinnamyl alcohol dehydrogenase, phenylalanin ammonia lyase, peroxidase, polyphenol oxidase
Number of pages	48
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Stres u rostlin	2
2.1.1 Abiotický stres	3
2.1.2 Salinitní stres	4
2.1.3 Vliv salinitního stresu na hrách	7
2.2 Fenylypropanoidní dráha	8
2.2.1 Fenylyalaninamoniaklyasa	10
2.2.2 Cinnamylalkoholdehydrogenasa	10
2.2.3 Peroxidasy	11
2.2.4 Polyfenoloxidas	11
2.3 Fyziologické role polyfenolů u rostlin	13
2.3.1 Role ligninu	13
2.3.2 Role lignanů	14
2.3.3 Role fenolových kyselin	14
2.3.4. Role flavanonů	14
2.3.5 Role isoflavonů	15
2.3.6 Role flavan-3-olů	16
2.3.7 Role flavanolů	16
2.3.8 Role anthokyaninů	16
2.3.9 Role stilbenoidů	17
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
3.1 Chemikálie	18
3.2 Přístroje, experimentální vybavení	18
3.3 Rostlinný materiál	19
3.4 Metody	20
3.4.1 Pěstování a sklizeň hrachu	20
3.4.2 Příprava extraktů	20
3.4.2.1 Extrakty pro stanovení celkové antioxidační kapacity a obsahu flavonoidů	20
3.4.2.2 Extrakty pro stanovení aktivity peroxidasy a polyfenoloxidas	20

3.4.3 Stanovení celkové antioxidační kapacity	21
3.4.4 Stanovení obsahu flavonoidů	22
3.4.5 Stanovení aktivity peroxidasy	23
3.4.6 Stanovení aktivity polyfenoloxidas	24
3.4.7 Vyhodnocení výsledků	24
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	25
4.1 Celková antioxidační kapacita	25
4.1.1 Celková antioxidační kapacita kontrolního rostlinného materiálu	25
4.1.2 Vliv salinity na celkovou antioxidační kapacitu	26
4.2 Koncentrace flavonoidů	30
4.3 Aktivita peroxidasy	33
4.3.1 Aktivita peroxidasy kontrolního rostlinného materiálu	33
4.3.2 Vliv salinity na aktivitu peroxidasy	34
4.4 Aktivita polyfenoloxidas	38
4.4.1 Aktivita polyfenoloxidas kontrolního rostlinného materiálu	38
4.4.2 Vliv salinity na aktivitu polyfenoloxidas	39
5 ZÁVĚR	42
6 LITERATURA	44
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	48

CÍLE PRÁCE

1. Vypracování přehledné rešerše s klíčovými slovy:
 - salinitní stres,
 - hrách setý,
 - fenylpropanoidní dráha,
 - fenoly, flavonoidy,
 - cinnamylalkoholdehydrogenasa, fenylalaninamoniaklyasa, peroxidasa, polyfenoloxidasa.
2. Cílem experimentální části je:
 - napěstovat rostlinný materiál (klíčící rostliny hrachu setého vystavené působení salinitního stresu),
 - stanovit aktivity vybraných enzymů: peroxidasa, polyfenoloxidasa,
 - stanovit koncentraci flavonoidů a celkovou antioxidační kapacitu.

1 ÚVOD

Přisedle žijící rostliny jsou během svého života vystaveny měnícím se enviromentálním podmínkám. Životní podmínky nemusí rostlinnému organismu vyhovovat a mohou mít negativní dopad na růst a vývoj. Nevhodné podmínky, označované jako stresory (stresové faktory), jsou děleny na abiotické a biotické. Abiotickými faktory jsou fyzikální a chemické vlastnosti životního prostředí, zatímco biotické faktory jsou reprezentované jinými živými organismy. Působení stresových faktorů velmi často vyvolává oxidační stres, který je spojen se zvýšenou produkcí škodlivých reaktivních forem kyslíku. Jako odpověď na oxidační stres rostlina syntetizuje nebo aktivuje enzymové a neenzymové antioxidanty, případně stimuluje lignifikaci buněčné stěny.

Vyšší míra zasolení půd, salinitní stres, způsobuje osmotickou nerovnováhu vedoucí ke zhoršenému příjmu vody s živinami. Rostliny se snaží zmíněnou nerovnováhu vyvážit akumulací osmoticky aktivních látek v cytoplasmě. Rovněž dochází ke zvýšenému příjmu iontů solí, které se mohou v rostlinách hromadit v toxických koncentracích. Rostliny se brání vysokým intracelulárním koncentracím sodných kationtů syntézou transportérů, které přenášejí Na^+ do extracelulárního prostoru nebo do vakuol. Díky zvýšené hladině reaktivních forem kyslíku dochází k poškození fotosyntetických pigmentů, zavírají se stomata, snižuje se stomatální vodivost a efektivita fotosyntézy.

Rostliny produkují velké množství sekundárních metabolitů, jednou skupinou jsou fenolické látky syntetizované ve fenylypropanoidní dráze. Za katalýzy enzymů vytváří rostliny monolignoly, jejich polymerací lignin, dále stilbenoidy a flavonoidy zahrnující chalkony, aurony, flavanony, isoflavony, flavony, flavanoly, dihydroflavanoly, anthokyanidiny, laukoanthokyanidiny a flavan-3-oly.

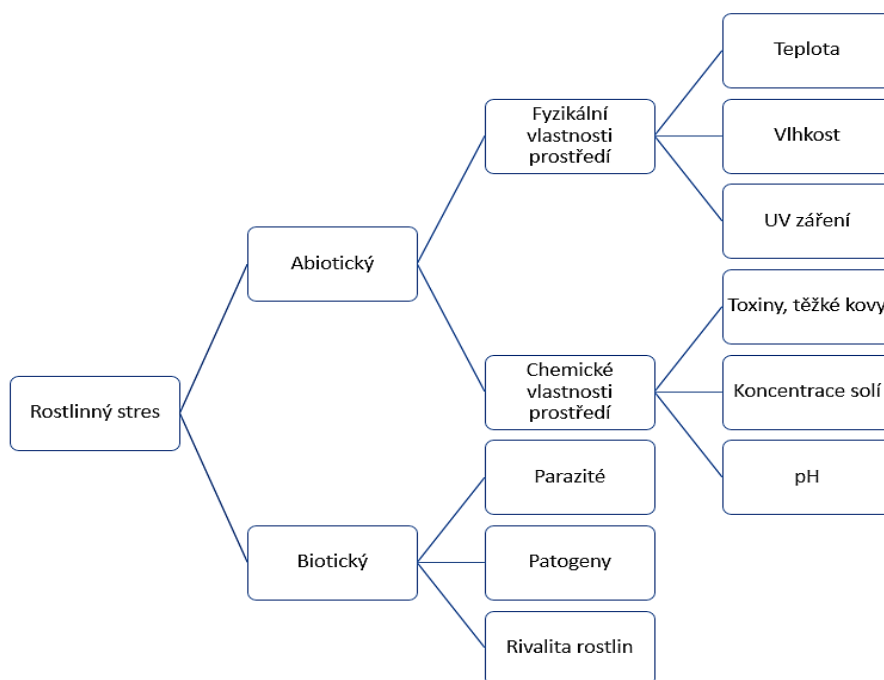
Produkty fenylypropanoidní dráhy plní mnoho významných rolí v rostlinách. Jednou z nich je lignifikace buněčné stěny zabraňující nadměrným ztrátám vody a znemožňující průnik patogenů. Další úlohou je podíl na vychytávání škodlivých reaktivních forem kyslíku, atomů kovů. Některé sloučeniny fungují jako přirozené insekticidy a působí proti patogenům a škůdcům.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Stres u rostlin

Rostliny jsou během svého života vystaveny často se měnícím životním podmínkám. Tyto podmínky mohou být jak příznivé pro růst, vývoj a reprodukci, tak i nepříznivé, které nejenže ohrožují zdravý vývoj, ale mohou ohrozit samotné přežití rostlin. Tyto podmínky, které svým působením na organismus vyvolávají stres, se označují jako stresové faktory nebo-li stresory. Protože rostliny nejsou schopny aktivního pohybu, žijí přisedle, musely vyvinout účinné obranné mechanismy, které jim pomáhají se se stresem vyrovnat.

Stresové faktory lze rozdělit do dvou skupin (Obr. 1). První skupinou je stres abiotický, který je dán chemickými a fyzikálními podmínkami životního prostředí. Mezi nepříznivé abiotické podmínky se řadí sucho, přemokření, působení vysokých a nízkých teplot, extrémní hodnoty pH, přítomnost toxinů a těžkých kovů, nadměrné UV záření a zasolení půd, které je momentálně nejrozšířenějším problémem. Uvádí se, že zvýšenou salinitou je zasaženo asi 20 % veškeré světové zemědělské půdy. Druhou skupinou je biotický stres, který nastává v důsledku působení jiných živých organismů. Může se jednat o napadení různými parazity a patogeny, rivalitu s ostatními rostlinami o živiny, vodu, světlo, nebo i poranění býložravci (Zeeshan *et al.*, 2020; Ahmad *et al.*, 2020).



Obr. 1 Dělení rostlinného stresu na jednotlivé skupiny.

Rostliny si vytvořily dva obecné obranné mechanismy obrany před stresem. Jedním mechanismem je zabránění působení stresu („stress avoidance“). Mezi takové způsoby ochrany a obrany patří vytváření mechanických bariér, jako je silnější vrstva kutikuly a impregnace buněčné stěny, které brání působení negativních podmínek životního prostředí uvnitř buňky. Dalším způsobem ochrany jsou mechanismy snižující negativní dopady stresu („stress tolerance“). Do této kategorie řadíme mnohé mechanismy bránící nadměrné ztrátě vody, jako je zavírání průduchů, vytvoření silné vrstvy kutikuly; dále akumulaci osmoticky aktivních látek pro snížení vodního potenciálu buněk usnadňující příjem vody, aktivaci syntézy antioxidantů, stimulaci vývoje kořenového systému zvětšujícího absorpční plochu, vylučování solí listy nebo jejich ukládání do vakuol (Tokarz *et al.*, 2020; Adámková *et al.*, 2006).

Mnohé rostliny vykazují dobrou odolnost vůči jednomu typu stresu, ale v přírodě dochází často k působení více typů stresorů najednou. Někdy může působení více stresů na rostlinu indukovat toleranci vůči jinému stresovému faktoru. V těchto případech hovoříme o tzv. cross-toleranci. Negativní vliv jednotlivě působících faktorů se v mnoha případech sčítá, ale některé rostliny jsou dokonce vůči kombinovanému stresu odolnější než vůči působení pouhého jednoho typu (Ben Rejeb *et al.*, 2014).

Jelikož stresové faktory negativně ovlivňují růst a vývoj rostlin, snižuje se tak jejich schopnost přežití a klesají i výnosy u pěstovaných plodin až o 50 %. Z důvodu rostoucí antropogenní aktivity je působení stresorů čím dál častější, dochází k obecnému oteplování atmosféry, častěji se objevují období sucha následované vytrvalým deštěm a vlivem nevhodného zemědělství a průmyslu se zvyšuje i míra zasolení půd. Z tohoto důvodu se mnohé výzkumy zabývají zkoumáním vlivu stresových faktorů na rostliny, aby se mohly v budoucnu pěstovat odolné kultivary zemědělsky významných plodin (Le Gall *et al.*, 2015, Sharma *et al.*, 2019).

2.1.1 Abiotický stres

Mezi abiotické stresové faktory zahrnujeme vliv chemických a fyzikálních vlastností životního prostředí rostlin. Tyto stresory svým působením modifikují mnoho fyziologických a biochemických procesů, které vedou k omezenému vývoji a menší úrodě. Vystavení tomuto stresu rovněž ztěžuje i klíčivost a vývoj semen. Z tohoto důvodu se řada výzkumných projektů zaměřuje na ošetřování semen („priming“) využívající

mnoha látek, např. fytohormonů, které by dokázaly učinit semena rezistentními vůči abiotickému stresu (Sharma *et al.*, 2019; Ahmad *et al.*, 2020).

Jedním z efektů abiotického stresu je narušení redoxní rovnováhy buňky. Dochází k nadměrné produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), mezi které řadíme peroxid vodíku H_2O_2 , superoxidový radikál $O_2\cdot$, hydroxidový radikál $OH\cdot$ a singletový kyslík 1O_2 . Jejich zvýšená hladina vede k poškození proteinů, lipidů, nukleových kyselin, fotosyntetických membrán, fotosyntetických pigmentů, plazmatické membrány a buněčné stěny. Následkem toho je poškození nebo smrt rostlinné buňky (Le Gall *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2019).

V reakci na stres rostlina syntetizuje nebo aktivuje řadu antioxidantních systémů. Enzymové antioxidanty zahrnují superoxidodismutasu (superoxid:superoxid oxidoreduktasa, EC 1.15.1.1), katalasu ($H_2O_2:H_2O_2$ oxidoreduktasa, EC 1.11.1.6), peroxidasu (fenolický donor: H_2O_2 oxidoreduktasa, EC 1.11.1.7, POX). Mezi neenzymové řadíme tokoferoly, karotenoidy, kyselinu askorbovou a fenoly. Dále rostlina vytváří tzv. sekundární metabolity, jako jsou polyfenoly, terpenoidy, alkaloidy aj., přičemž syntéza fenolů, flavonoidů a kalosy byla potvrzena i při působení abiotického i biotického stresu (Piwowarczyk *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2019).

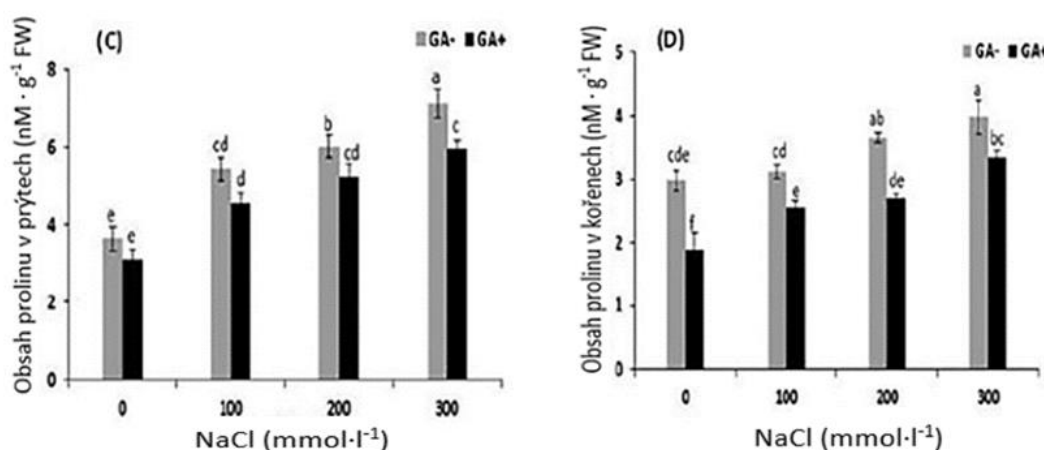
U rostlin vystavených abiotickému stresu byla také pozorována vyšší míra lignifikace buněčné stěny, vedoucí k menšímu růstu, nižšímu obsahu živin a k horší stravitelnosti. Některé rostliny produkují pektinové polymery rhamnogalaktouronan I a II s větším počtem vedlejších řetězců. Tento děj může mít spojitost s hydratovanými gely, které chrání buňky před poškozením (Lee *et al.*, 2007; Tenhaken 2015).

2.1.2 Salinitní stres

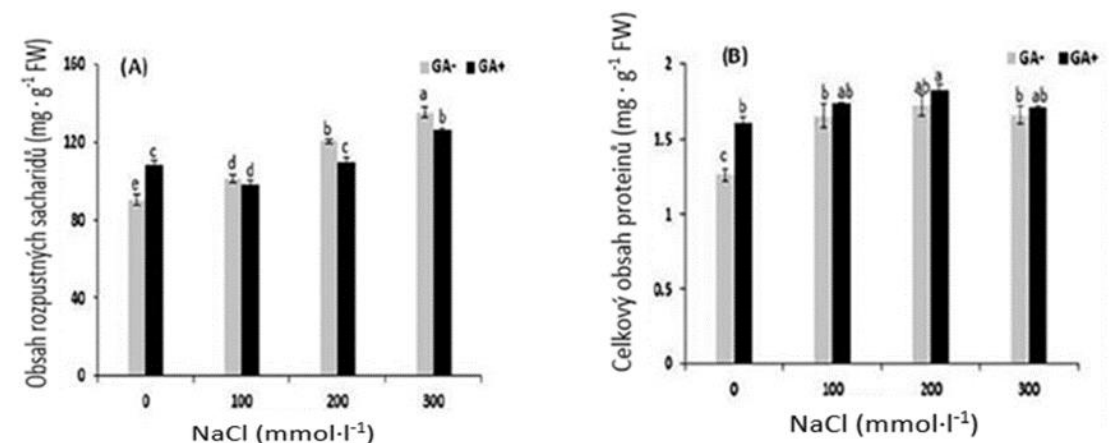
V důsledku vystavení rostlin salinitnímu stresu je negativně ovlivněno klíčení semen, růst, vývoj, buněčný metabolismus a urychluje se senescence. Vysoká salinita je příčinou vzniku osmotické nerovnováhy, která ztěžuje příjem vody kořeny a je tak důvodem zpomaleného růstu. Ten se projevuje především u nadzemních částí, u kterých se zkracuje stonek, zmenšuje se velikost a počet listů. Tato změna se poté projevuje jako menší hmotnost sušiny. Naopak u kořenů byl zaznamenán výraznější vývoj, zatímco elongační zóna se spíše zmenšuje (Piwowarczyk *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021).

Jedním z důvodů zpomalení růstu může být narušení buněčné membrány v důsledku lipoperoxidace a vytěsnění iontů Ca^{2+} a K^+ kationtem sodíku. Jiným důvodem může být akumulace Na^+ ve vnitrobuněčném prostoru, který vytváří zásaditější prostředí. Takto zvýšené pH intracelulárního prostředí již neleží v pH optimu expanzinů a remodelačních enzymů, které se tak stávají neaktivními a rostlina nevykazuje růst (Piwowarczyk *et al.*, 2016; Byrt *et al.*, 2018).

U rostlin vystavených působení salinitního stresu byla prokázána vyšší akumulace osmoticky aktivních látek v cytoplazmě buněk (Obr. 2). Obvykle se v cytosolu hromadí glycinbetain a prolin společně s rozpustnými sacharidy a proteiny (Obr. 3). Výskyt vyššího obsahu prolinu je obecně spojován s rostlinami, které tolerují vyšší obsah solí. Ošetření semen může poměry obsahu těchto látek v cytosolu změnit. Například priming semen fytohormonem kyselinou gibberelovou (GA_3) sice vede k akumulaci rozpustných proteinů, ale i ke snížení hladiny rozpustných sacharidů a prolinu (Piwowarczyk *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2020, Kim *et al.*, 2021).



Obr. 2 Obsah prolinu v lodyhách a kořenech rostliny *Pisum sativum* bez ošetření GA_3 a po ošetření GA_3 ($0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{GA}_3$), vystavené salinitnímu stresu (upraveno dle Ahmad *et al.*, 2020).



Obr. 3 Obsah rozpustných sacharidů a celkový obsah proteinů v rostlinách *Pisum sativum* bez ošetření kyselinou giberelovou a po ošetření kyselinou giberelovou (0,5 mmol·l⁻¹ GA₃), vystavených salinitnímu stresu (upraveno dle Ahmad *et al.*, 2020).

Zasolení půd také negativně ovlivňuje fotosyntézu. Vlivem salinity se snižuje efektivita fotosyntézy a snižuje se obsah fotosyntetických barviv z důvodu aktivovaného oxidačního stresu. Z uvedených barviv bývá největší pokles zaznamenán u karotenoidů, chlorofylu a a b, a to až o 42 % u rostlin *Pisum sativum* vystavovaných působení 300 mmol·l⁻¹ NaCl. U rezistentních rostlin byl pozorován méně výrazný pokles obsahu fotosyntetických pigmentů. Dále jsou salinitou zasažena i stomata, která se uzavírají tím více, čím větší koncentrace solí na rostlinu působí. Díky těmto změnám dochází ke snížení stomatální vodivosti, transpirační rychlosti, redukuje se také intracelulární obsah CO₂ (Ahmad *et al.*, 2020; Piwowarczyk *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2019).

Vlivem vysoké koncentrace půdního sodíku bývá narušen poměr celulárních iontů. Rostliny proto syntetizují větší množství několika druhů transportérů.

- Přenašeče HKT představují integrální membránové proteiny, jejichž úkolem je vylučovat Na⁺ do extracelulárního prostoru v pletivech citlivých na zvýšenou koncentraci Na⁺, jako je xylém. Tyto transportéry přenášejí ionty pasivně otočením se v membráně podle elektrofyziologického gradientu (Zeeshan *et al.*, 2020; Waters *et al.*, 2013).
- Transportéry NHX, vakuolární Na⁺/H⁺ antiportery, přenášejí ionty sodíku do vakuol. Po vystavení rostliny vysoké salinitě dochází obecně ke zvýšení exprese těchto transportérů a zvyšuje se tím rezistence (Brini *et al.*, 2007).

- Transportéry SOS1 spojené s Na^+/H^+ antiporterem přenášejí Na^+ především na dlouhé vzdálenosti. Transport Na^+ do extracelulárního prostoru probíhá až po vniknutí iontu dovnitř buňky. U tohoto transportéru nelze jednoznačně tvrdit, že při zvýšené salinitě dochází k jeho zvýšené expresi, poněvadž různé druhy rostlin reagují různými způsoby (Zeeshan *et al.*, 2020).

2.1.3 Vliv salinitního stresu na hrách

Salinitní stres významně ovlivňuje klíčení semen hrachu setého. Procento klíčících semen se snižuje s rostoucí koncentrací solí v půdě. V případě vysoké míry zasolení může dojít až k úplnému zastavení klíčení. Zmíněný jev je spojován s pravděpodobně nedostatečnou hydratací proteinů a narušením funkce enzymů zodpovědných za mobilizaci živin a energie v semenech. Dalším důvodem špatného klíčení může být i modifikovaná hladina fytohormonů. Předpokládá se, že během salinitního stresu dochází k útlumu syntézy auxinů, cytokininů a giberelinů, jinou možnou příčinou zhoršeného klíčení by mohla být zrychlená degradace nebo přeměna fytohormonů na neaktivní formy. (Shahid *et al.*, 2012; Tsegay a Gebreslassie, 2014; Hussein *et al.*, 2006).

Salinitní stres taktéž způsobuje změny poměrů iontů v buňkách. Citlivé genotypy mohou mít hladinu Na^+ v listech vyšší až o 67 % za současného snížení obsahu K^+ a Ca^{2+} . S klesajícím poměrem K^+/Na^+ a $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ se snižuje hmotnost sušiny a zmenšuje se délka nadzemních částí. Snížení hmotnosti sušiny je spojováno s klesající efektivitou fotosyntézy, která umožňuje produkci sacharidů tvořících biomasu rostlin (Shahid *et al.*, 2012).

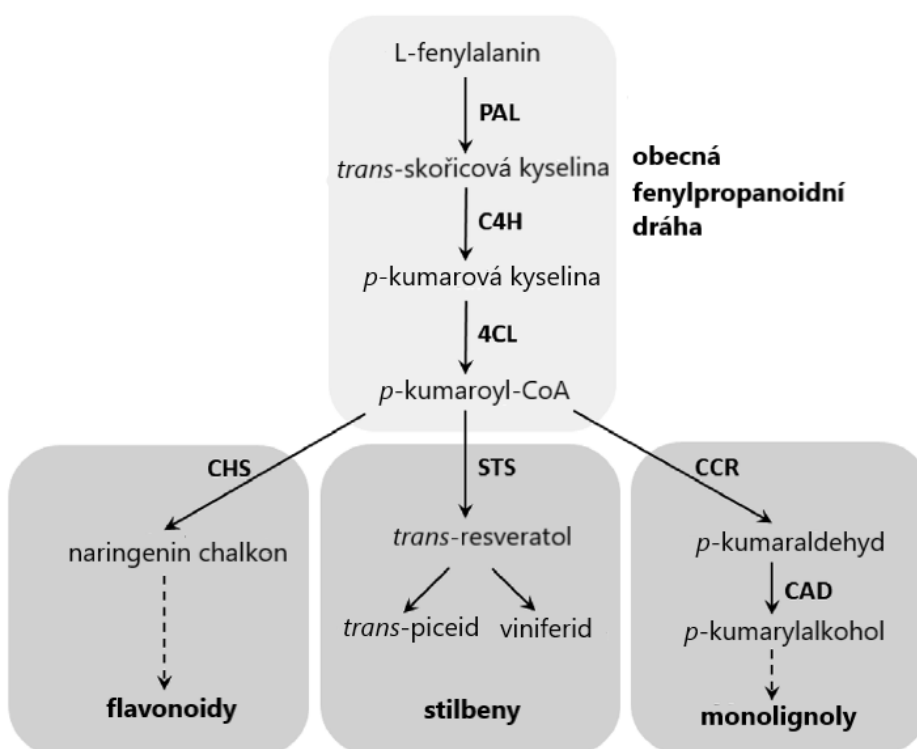
2.2 Fenylypropanoidní dráha

V rostlinách probíhá velké množství enzymově katalyzovaných chemických reakcí, které jsou spřáhány do metabolických drah. Dráhy primárního metabolismu slouží především k syntéze stavebních prekurzorů a k tvorbě energie, zatímco dráhy sekundárního metabolismu produkují různorodé skupiny látek rozdílných vlastností. Mezi dráhy produkující sekundární metabolity řadíme fenylypropanoidní dráhu zahrnující řadu chemických reakcí vedoucích k syntéze vysokého počtu produktů spadajících do skupin flavonoidů a ligninu. Produkty mají významný vliv na rostlinu. Některé z nich plní mechanickou funkci, jiné napomáhají transportu vody a v ní rozpuštěných živin, další pomáhají rostlinám odolat stresům nebo zajišťují správný růst a vývoj. Sekundární metabolity plní důležité role rovněž u bobovitých rostlin, u kterých zodpovídají mimo jiné za barvu semen, jejich chuť a vůni. U pěstovaných kultivarů se světlejšími semeny můžeme pozorovat nižší hladinu alkaloidů a taninů, proto nejsou jejich semena hořké chuti. Na druhou stranu jsou uvedené typy rostlin kvůli změnám v hladině sekundárních metabolitů náchylnější vůči biotickému i abiotickému stresu v porovnání s divoce rostoucími druhy bobovitých (Govender *et al*, 2017; Ku *et al*, 2020; Dong a Lin, 2021).

Fenylypropanoidní dráha (Obr. 4) zahrnuje řadu chemických reakcí. Dráha je zahájena deaminací L-fenylyalaninu, produktu tzv. šikimátové dráhy, za vzniku *trans*-skořicové kyseliny. Tato reakce je katalyzována enzymem fenylyalaninamoniaklyasou (L-fenylyalaninamoniaklyasa (tvořící kyselinu *trans*-skořicovou); EC 4.3.1.24; PAL). Následuje hydroxylace katalyzovaná cinamát-4-hydroxylasou (*trans*-cinamát, (redukovaný NADPH-hemoprotein reduktasa):O₂ oxidoreduktasa (4-hydroxylující) EC 1.14.14.91; C₄H) a navázání molekuly na koenzym A (CoA) za účasti 4-kumarát-CoA ligasy (4-kumarát:CoA ligasa (AMP tvořící), EC 6.2.1.12, 4CL). Popsaným mechanismem vzniká *p*-kumaroyl-CoA. Tento produkt může být přeměněn na dva možné produkty, na chalkon nebo *p*-kumaroyl-šikimát, které slouží k syntéze flavonoidů a ligninu. Molekula *p*-kumaroyl-šikimátu podléhá během syntézy ligninu několika hydroxylacím za generování hydroxyskořicových alkoholů katalýzou enzymem cinnamylalkoholdehydrogenasou (cinnamylalkohol:NADP⁺ oxidoreduktasa; EC 1.1.1.195; CAD). Do kategorie hydroxyskořicových alkoholů náleží kafeylalkohol, koniferylalkohol, 5H koniferylalkohol, sinapylalkohol a *p*-kumarylalkohol. Následuje polymerace zmíněných alkoholů za pomoci enzymů peroxidasy (donor:H₂O₂ oxidoreduktasa, EC 1.11.1.7; POX) a/nebo lakasy (benzendiol:O₂ oxidoreduktasa,

EC 1.10.3.2; LAC) za tvorby výsledného produktu, ligninu (Govender *et al*, 2017; Dong a Lin, 2021).

Další skupinou látek syntetizovaných z *p*-kumaroyl-CoA jsou flavonoidy. Flavonoidy vytvářejí početnou skupinu zahrnující chalkony, aurony, flavanony, isoflavony, flavony, flavanoly, dihydroflavanoly, anthokyanidiny, laukoanthokyanidiny a flavan-3 oly. Počátečním krokem syntézy uvedených sloučenin je přeměna *p*-kumaroyl-CoA pomocí enzymů chalkonsynthasy (malonyl-CoA:4-kumaroyl-CoA malonyltransferasa (cyklizující), EC 2.3.1.74; CHS) a stilbensynthasy (malonyl-CoA:4-kumaroyl-CoA malonyltransferasa (cyklizující), EC 2.3.1.95; STS) za tvorby chalkonu a stilbenu. Chalkon je dále přeměňován ve sledu reakcí katalyzovaných isomerasami, hydroxylasami, reduktasami, synthasami a dalšími enzymy, které vedou k produkci již zmíněných flavonoidů (Dong a Lin, 2021).



Obr. 4 Zjednodušené schéma fenylopropanoidní dráhy. PAL fenyloalaninamoniaklyasa; C4H cinamát-4-hydroxylasa; 4CL 4-kumarát-CoA ligasa; CHS chalkonsynthasa; STS stilbensynthasa; CCR cinamoyl-CoA reduktasa (cinamaldehyd:NADP⁺ oxidoreduktasa (tvořící CoA-cinamoyl), EC 1.2.1.44); CAD cinamylalkoholdehydrogenasa (upraveno dle Pietrowska-Borek *et al*, 2020).

2.2.1 Fenylalaninamoniaklyasa

Fenylalaninamoniaklyasa (L-fenylalaninamoniaklyasa (tvořící kyselinu *trans*-skořicovou); EC 4.3.1.24; PAL) katalyzuje první reakci fenylpropanoidní dráhy, deaminaci fenylalaninu za uvolnění amoniaku a kyseliny *trans*-skořicové. Jedná o významný enzym, který je v rostlinách kódován více geny a vyskytuje se v různých izoformách. Jednotlivé izoformy se od sebe liší nejen lokalizací v rostlině, ale i aktivitou a substrátovou specifitou. Kromě deaminace fenylalaninu může enzym katalyzovat deaminaci tyrosinu za vzniku *p*-hydroxyskořicové kyseliny. Zároveň byly u některých isoform pozorovány rozdílné funkce, některé z nich slouží výlučně pro syntézu flavonoidů, jiné pro syntézu ligninu (Adámková *et al*, 2006; Jeong *et al*, 2012; Valifard *et al*, 2015).

Obecně lze tvrdit, že aktivita PAL roste u stresovaných rostlin a zároveň dochází ke zvýšení syntézy produktů fenylpropanoidní dráhy, na základě čehož se usuzuje, že PAL je schopná regulovat aktivitu dalších enzymů fenylpropanoidní dráhy. Zvýšení aktivity PAL vlivem vysoké salinity může dosahovat až 90 % u kořenů sóji. Z tohoto důvodu se enzym označuje jako stresový marker. PAL je zpětnovazebně inhibována kyselinou skořicovou. V rostoucích částech rostlin, kde je kyselina skořicová aktivně odčerpávána pro syntézu látek potřebných pro růst, je enzym nejvíce aktivní. U nerostoucích pletiv se ale kyselina skořicová vyskytuje ve vyšších hladinách a aktivita PAL je inhibována (Jeong *et al*, 2012; Valifard *et al*, 2015; Dong a Lin, 2021).

2.2.2 Cinnamylalkoholdehydrogenasa

Enzym cinnamylalkoholdehydrogenasa (cinnamylalkohol:NADP⁺ oxidoreduktasa; EC 1.1.1.195; CAD) katalyzuje poslední reakci tvorby monolignolů, umožňuje redukci aldehydů na kafeylalkohol, koniferylalkohol, sinapylalkohol, *p*-kumarylalkohol, ze kterých je následně polymerací syntetizován lignin v buněčné stěně (Dong a Lin, 2021).

CAD patří mezi metaloenzymy, obsahuje ve své struktuře vazebná místa pro napojení 2 atomů zinku a dále pro molekulu NADPH. Nejvyšší aktivita enzymu byla prokázána v prostředí o pH 6-7, CAD náleží do skupiny cytosolárních enzymů (Choi *et al*, 2016).

U nahosemenných rostlin je CAD kódován pouze jedním genem a je afinitní především ke koniferaldehydu, zatímco u dvouděložných rostlin je enzym kódován

několika geny a je afinitní k více substrátům. Hladiny jednotlivých izoform v rostlině značně kolísají v závislosti na pletivu a vývojové fázi. Některé isoenzymy mohou být dokonce neaktivní z důvodu absence vazebného místa pro Zn nebo NADPH nebo kvůli modifikaci vazebného místa pro substrát. Obecným rysem je zvýšená exprese CAD u rostlin stresovaných zvýšenou salinitou (Obr. 5), což naznačuje, že tvorba ligninu má významnou roli při překonání stresu. Zvýšená aktivita byla zaznamenána i po podání fytohormonů kyseliny abscisové nebo salicylové (Obr. 5) (Kim *et al*, 2010; Choi *et al*, 2016; Park *et al*, 2018).

2.2.3 Peroxidasy

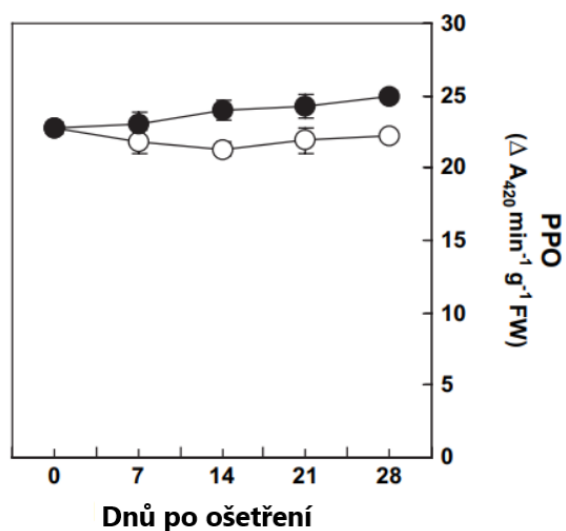
Peroxidasy (donor:H₂O₂ oxidoreduktasa, EC 1.11.1.7; POX) plní v rostlinných buňkách více úloh. Jednou z nich je vylučování toxického peroxidu vodíku, jehož zvýšená produkce je spojena s reakcí rostliny na působení stresových faktorů, např. působení osmotického stresu. Další funkcí je katalýza oxidační polymerace monolignolů za tvorby ligninu. V porovnání s LAC vykazují POX širší substrátovou specifitu. Jako substrát využívají nejčastěji *p*-kumarylalkohol, sinapylalkohol a koniferylalkohol (Tenhaken, 2015; Govender *et al*, 2017).

Enzymy se nachází v několika izoformách, které mohou být podle izoelektrického bodu rozlišeny na isoformy aniontové a kationtové. Hladina isoenzymů se může u rostlin měnit v závislosti na životních podmínkách. Obecným rysem je, že úroveň transkripce POX je v rostlinách rezistentních k suchu vyšší než v rostlinách citlivých na nedostatek vody. U jetele plazivého (*Trifolium repens* L.) byla pozorována vyšší hladina isoenzymů katalyzujících polymeraci koniferylalkoholu, sinapylalkoholu a kafeylalkoholu po vystavení jetele nedostatku vody. Tato změna hladiny vyústila ke zvýšení obsahu ligninu v rostlinách (Lee *et al*, 2007; Tenhaken, 2015).

2.2.4 Polyfenoloxidas

Polyfenoloxidas (1,2-benzendiol:kyslík oxidoreduktasa, EC 1.10.3.1.; PPO) katalyzuje oxidaci fenolických látek na molekulu *o*-chinon za současné spotřeby kyslíku. PPO je lokalizována v chloroplastech, zatímco substráty nalézáme ve vakuolách. Samotná reakce nastává v důsledku poškození buněk, vznikající reaktivní chinony se následně polymerují za vzniku barviv, jež jsou zodpovědné za hnědnutí nebo černání rostlin. Tato změna zabarvení není jen vzhledově nevábna, je také spojována s poklesem nutričních hodnot

plodin kvůli současné oxidace kyseliny askorbové. Uvedený způsob pigmentace ovšem nezávisí jen na aktivitě PPO, ale také na pH, teplotě, přítomnosti kyslíku, redukčních činidel nebo i kovových iontů. Aktivita enzymu je rovněž ovlivněna vystavením rostlin stresových podmínek. Aktivita PPO byla zkoumána v listech jetele plazivého (Obr. 5), který na sucho reagoval zvýšením aktivity tohoto enzymu (Doğan *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Zhang a Shao, 2016).



Obr. 5 Aktivita polyfenoloxidasy (PPO) v listech kontrolních rostlin jetele plazivého (černé body) a rostlin vystavených suchu (světlé body) (upraveno dle Lee *et al.*, 2007).

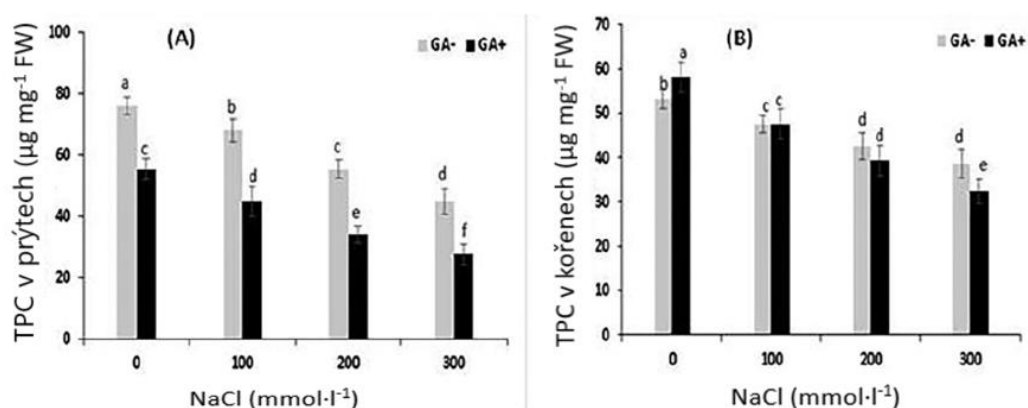
2.3 Fyziologické role polyfenolů u rostlin

2.3.1 Role ligninu

Polymerní sloučenina lignin plní v rostlinném organismu mnoho funkcí. Syntéza ligninu je zodpovědná za mechanickou pevnost buňky a celého organismu, zároveň usnadňuje transport vody s živinami. S tím také souvisí menší růst rostliny v odpovědi na nižší míru lignifikace. Lignin zároveň vytváří mechanickou bariéru, která chrání buňky před napadením patogeny a herbivory. Zvýšená syntéza ligninu indukuje u rostlin odolnost vůči chorobám, např. kukuřice je rezistentní vůči patogenům způsobujícím nemocnění listů (Dong a Lin, 2021).

Dále se lignin významně podílí i na rozmnožování. Můžeme jej nalézt v prašníku, ve vrstvě zvané endothecium. Deficience ligninu v endotheciu způsobuje jeho zvrásnění. Následkem toho se vrstva neprotrhne po dozrání pylu a rostlina se stává prakticky sterilní. Lignin se nachází rovněž v semenech, kde určuje jejich velikost. V případě jeho nízké hladiny vznikají malá semena, některá nemusí ani obsahovat osemení (Dong a Lin, 2021).

Lignin se taktéž uplatňuje v odpovědi na abiotický stres. U stresovaných rostlin lze pozorovat výraznější tloušťku sekundární buněčné stěny. Tloušťka umožňuje rostlinám zabránit nadměrné ztrátě vody a udržení turgoru během sucha, zároveň pomáhá vypořádat se se salinitním stresem. Z tohoto důvodu můžeme u rostlin pozorovat změny v hladinách fenolických látek, které mohou být ovlivněny ošetřením rostlin fytohormony (Obr. 6) (Ahmad *et al.*, 2020; Dong a Lin, 2021).



Obr. 6 Obsah fenolických látek (TPC) v lodyhách a kořenech hrachu setého (*Pisum sativum*), bez ošetření kyselinou giberelovou GA₃ a po ošetření GA₃ (0,5 mmol·l⁻¹ GA₃), vystavených salinitnímu stresu (upraveno dle Ahmad *et al.*, 2020).

2.3.2 Role lignanů

Lignany patří mezi fenolické látky, jedná se o nízkomolekulární polyfenoly, které nacházíme především v květech a osemení. Lignany se od ligninu liší nízkou molekulovou hmotností a jsou rozpustné ve vodě. Lignany vykazují antioxidační, antibakteriální, antivirové, antitumorové a biocidní účinky, díky čemuž nacházejí využití ve farmaceutickém průmyslu. Zmíněných účinků jsou lignany schopné díky inhibici enzymů patogenů, jako jsou celulasylasy (EC 3.2.1.4., 4-β-D-glukan 4-glukanohydrolasa), glukosidasylasy (3.2.1.20., α-D-glukosid glukohydrolasa) a lakasylasy. Lignany jsou také schopny negativně ovlivňovat endokrinní systém hmyzu, což z nich dělá přírodní insekticidy. Lignany taktéž pomáhají rostlinám přečkat abiotický stres pomocí vychytávání ROS, stimulaci syntézy ligninů a tloušťnutí buněčné stěny (DellaGreca *et al.*, 2013; Šamec *et al.*, 2021).

2.3.3 Role fenolových kyselin

Skupina fenolových kyselin zahrnuje kyselinu kávovou, gallovou, ferulovou a vanilovou. Jejich hlavní funkcí je vychytávání ROS, proto zastoupení fenolových kyselin roste s vystavením rostlin abiotickému stresu. Zvýšená hladina kyseliny vanilové u rajčete je spojována s rezistencí vůči zasolení půd. Rajčata díky kyselině vanilové akumulují větší množství osmoticky aktivního prolinu, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, kyseliny askorbové, zároveň byly u rajčat pozorovány vyšší aktivity antioxidačních enzymů superoxidismutasy (superoxid:superoxid oxidoreduktasa, EC 1.15.1.1.) a katalasy (peroxid vodíku:peroxid vodíku oxidoreduktasa, EC 1.11.1.6.) (Šamec *et al.*, 2021).

Kyseliny gallová a ellagová vytvářejí hydrolyzovatelné taniny, které chrání rostliny před mikroby, hmyzem, herbivory, pomáhají rostlinám přečkat sucho, nadměrné ozáření UV-B zářením a vážou těžké kovy (Šamec *et al.*, 2021).

2.3.4 Role flavanonů

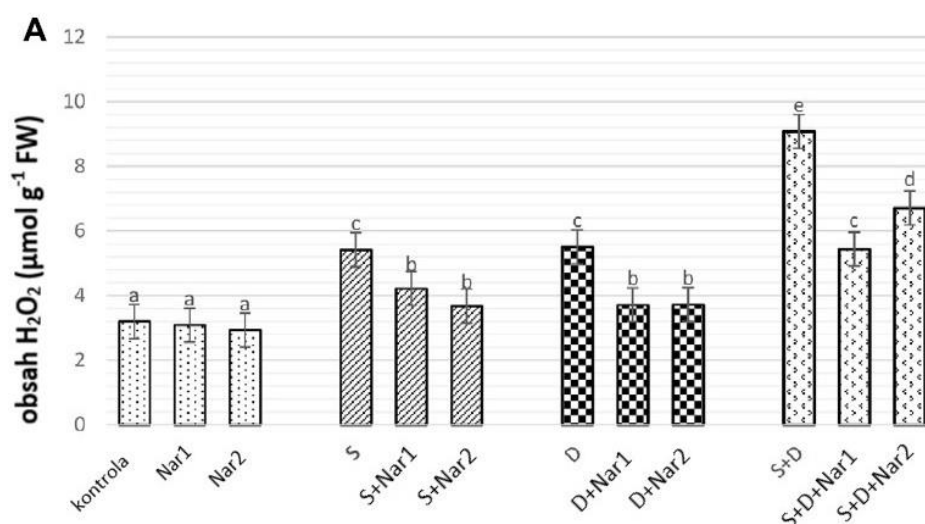
Mezi flavanony řadíme hesperetin, naringenin, eridiktyol, sylibin a isosakuratenin, které hrají důležité role v průběhu biotického i abiotického stresu. Pokud jsou rostliny vystavené suchu, hladiny sloučenin se mění, ale změny jednotlivých flavanonů se liší v závislosti na druhu rostliny. Například u tabáku je vyšší hladina naringeninu spojována s tolerancí sucha, podobný účinek byl pozorován u fazolu, u které naringenin zmírnil negativní dopad zasolení půd i sucha. Zmíněná sloučenina je totiž schopna částečně

zvrátit negativní dopady vysoké salinity, jelikož je schopna snížit hladinu peroxidu vodíku (Obr. 7), zvyšuje aktivitu antioxidantních enzymů a tím snižuje peroxidaci lipidové dvojvrstvy tvořící cytoplazmatickou membránu buněk. U bobovitých rostlin (cizrny) stimuluje naringenin s hesperetinem také kolonizaci kořenů symbiotickými bakteriemi (Yildiztugay *et al.*, 2020; Šamec *et al.*, 2021).

2.3.5 Role isoflavonů

Isoflavony, jako jsou daidzein, genistein a formononetin, jsou syntetizovány především bobovitými rostlinami. Také u této skupiny flavonoidů byly pozorovány změny hladin po vystavení rostlin různým abiotickým stresům. Třeba u sóji dlouhodobě stresované suchem bylo pozorováno snížení hladiny isoflavonů, zatímco u rostliny kozince způsobilo vystavení nízkým teplotám a zasolení zvýšení jejich hladiny. Z tohoto důvodu jsou isoflavony považovány za marker tolerance salinity. Tato skupina látek je rovněž spojována s vychytáváním kovů a s antioxidantní aktivitou (Šamec *et al.*, 2021).

Další neméně důležitou funkcí isoflavonů je zprostředkování interakce mezi bobovitými rostlinami a symbiotickými rhizoidními bakteriemi. Isoflavony fungují jako chemické atraktanty pro bakterie, u kterých stimulují expresi *nod* genů a tím usnadňují kolonizaci kořenového systému bobovitých symbiotickými bakteriemi. Isoflavony slouží také jako prekurzory pro syntézu fytoalexinů, které mají významný vliv na vývoj a ochranu rostlin před stresem (Yu *et al.*, 2020).



Obr. 7: Efekty exogenně podaného naringeninu Nar (Nar1, 0,1 mmol·l⁻¹ a Nar2, 0,4 mmol·l⁻¹) na obsah H₂O₂ v listech fazolu obecného vystaveného salinitnímu stresu (S, 100 mM NaCl), suchu (D, 10% PEG6000) a kombinaci salinitního stresu a sucha (S+D, 100 mmol·l⁻¹ NaCl a 10% PEG6000) (upraveno dle Yıldiztugay *et al.*, 2020).

2.3.6 Role flavan-3-olů

Tato skupina látek zahrnuje především katechin a epikatechin. Uvedené sloučeniny působí v rostlinách převážně jako vychytávače ROS, dále plní důležitou roli při obraně před škůdci. Známá je rovněž cílená inhibice růstu okolních rostlin, které by mohly rostlinnému organismu potenciálně konkurovat v příjmu živin nebo v nárocích na životní prostor. Hladiny katechinu a epikatechinu se mění v souvislosti s vystavením stresu, např. u pšenice byla zaznamenána vyšší hladina epikatechinu v reakci na nedostatek vody (Šamec *et al.*, 2021).

Flavan-3-oly plní i roli ochrany před patogeny. U topolu černého infikovaného rzí bylo pozorováno výrazné zvýšení hladiny katechinu a mírné zvýšení epikatechinu, které se vyskytují v listech převážně v místech vystavení infekci. Následně bylo potvrzeno, že oba flavan-3-oly inhibují klíčení spor houby a jejich následný vývoj. Z toho důvodu jsou genotypy topolu černého s přirozeně vyšší hladinou flavan-3-olů odolnější vůči napadení patogenní houbou (Ullah *et al.*, 2017).

2.3.7 Role flavanolů

Mezi flavanoly řadíme kvercetin, kempferol a myricetin. Molekuly slouží jako antioxidanty, které chrání rostliny před negativními vlivy UV-B záření, také pomáhají s adaptací na výraznější změny teplot. Flavanoly jsou schopné i tvorby chelátů navázáním atomů těžkých kovů (Šamec *et al.*, 2021).

2.3.8 Role anthokyaninů

Anthokyaniny jsou glykosylované molekuly flavonoidů. Ve vodě rozpustné pigmenty jsou zodpovědné za zbarvení rostlinných orgánů, díky kterým fungují zbarvené květy jako atraktanty pro opylovače. Takto se anthokyaniny podílí nejen na opylení, ale i na rozšiřování semen. Hladiny zmíněných látek se výrazně mění při vystavení rostlin patogenům nebo abiotickému stresu. Řesný způsob odpovědi se ale liší od druhu rostliny. Látky taktéž fungují jako vychytávače ROS, slouží jako stresové signály a chrání fotosyntetické pigmenty před poškozením (Šamec *et al.*, 2021).

2.3.9 Role stilbenoidů

Stilbenoidy, hydroxylované deriváty stilbenu, vykazují významné antibakteriální, antivirové a antifungální účinky, také jsou schopny vychytávání ROS. Stilbenoidy pomáhají rostlinám vypořádat se s biotickým i abiotickým stresem, protože jejich hladina po vystavení rostlin stresu obecně stoupá (Šamec *et al.*, 2021).

Stilbenoid resveratrol a jeho deriváty chrání rostlinné organismy před patogeny, jako je tabáková mozaika, ale i před fytopatogenními houbami. Resveratrol vykazuje mnohé další vlastnosti, mezi které řadíme antitumorové, antibakteriální, antivirové i antioxidační vlastnosti (Song *et al.*, 2021).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Sigma-Aldrich (Německo): methanol, Trolox, persíran amonný (APS), 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoliin-6-sulfonová kyselina (ABTS), polyvinylpyrrolidon (PVPP), 4-methylcatechol, katalasa

Lach-Ner (Česká republika): chlorid sodný, peroxid vodíku, hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan draselný

Honeywell Fluka (Rumunsko): pefabloc, hexahydrát chloridu hlinitého

PENTA s.r.o. (Česká republika): octan draselný

Lachema (Česká republika): kvercetin

3.2 Přístroje, experimentální vybavení

Analytické váhy (Denver instrument, USA), digitální předvážky (KERN, Německo), chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), automatické pipety (Eppendorf, Německo), digitální pH metr (XS Instruments, Itálie), elektromagnetická míchačka (BioSan, Litva), vortex (BioSan, Litva), reader Synergy HT (Biotek Instruments, USA), mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko), automatické pipety (Eppendorf, Německo)

3.3 Rostlinný materiál

V experimentální části práce byla použita jako rostlinný materiál pro studium vlivu salinitního stresu semena hrachu setého *Pisum sativum*. Konkrétně se jednalo o dva kontrastní genotypy hrachu: kulturní, nedormantní *P. sativum* subsp. *sativum* Trendy (v práci zkrácený název Trendy) a planý, dormantní *P. sativum* subsp. *elatius* IG52565 (v práci dále používán zkrácený název IG52565). Semena hrachů byla poskytnuta katedrou Botaniky, PřF UP a firmou Selgen.

Genotyp Trendy má typické světlé osemení, hilum, místo připojení semena k mateřské rostlině, je také světle zbarveno, tedy bez pigmentace. Osemení je na povrchu hladké.

Osemení planého genotypu IG52565 je oproti kulturnímu genotypu výrazně silnější, na povrchu členité a je pigmentované, stejně tak i hilum. Pro IG52565 je typická nízká dormace, klíčivost se pohybuje okolo 72 %.

3.4 Metody

3.4.1 Pěstování a sklizení hrachu

Semena obou studovaných genotypů byla po skarifikaci pěstována na navlhčených ubrouscích ve čtvercových plastových Petriho miskách (12 x 12 cm). Z každého genotypu byly pěstovány vždy 3 skupiny, které byly zavlažovány vodou, 25 mmol·l⁻¹ roztokem NaCl (připraveného rozpuštěním 1,461 g NaCl v 1 l destilované vody) a 50 mmol·l⁻¹ roztokem NaCl (připraveného rozpuštěním 2,922 g NaCl v 1 l destilované vody). Semena byla pěstována ve fytotronu při 23 °C za světelných podmínek 16 hodin světlo a 8 hodin tma. V průběhu pěstování byly pravidelně vyměňovány Petriho misky s navlhčenými ubrousky a semena byla pravidelně zavlažována.

Rostlinný materiál byl sklizen v různých stádiích vývoje. Jeden den po umístění semen na navlhčený ubrousek v Petriho misce bylo z nabobtnaného semene získáno embryo a osemení od obou odrůd (stádium 1), po 2 dnech u Trendy a po 3 dnech u IG52565 bylo z naklíčeného semene získáno osemení, kořínek a zbytek embrya (stádium 2), po 4 dnech u Trendy a 7 dnech u IG52565 bylo odebráno osemení, kořínek, nadzemní část a zbytek embrya (stádium 3).

3.4.2 Příprava extraktů

3.4.2.1 Extrakty pro stanovení celkové antioxidační kapacity a obsahu flavonoidů

Rostlinný materiál byl extrahován vychlazeným methanolem ve vychlazené třecí misce v poměru 1:5 (w:v). Vzorky byly následně centrifugovány při 4 °C, 14 000 RPM po dobu 20 minut. Poté byl odebrán supernatant, který sloužil pro stanovení celkové antioxidační kapacity a obsahu flavonoidů.

3.4.2.2 Extrakty pro stanovení aktivity peroxidasy a polyfenoloxidas

Rostlinný materiál byl extrahován v 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátovém pufru pH 7 obsahujícím 0,1% polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) a 0,5 mmol·l⁻¹ pefabloc. Pufr byl připraven smícháním 61,5 ml 1 mol·l⁻¹ K₂HPO₄ a 38,5 ml 1 mol·l⁻¹ KH₂PO₄, po upravení pH na pH-metru doplněn do 1 litru destilovanou vodou. V 10 ml pufru bylo rozpuštěno 100 mg PVPP (fungující jako vychytávač polyfenolů) a 1,1 mg pefablocu (inhibitor proteas).

Extrakce byla prováděna v poměru 1:3 (w:v) nebo 1:4 (w:v) podle potřeby. Následovala centrifugace při 4 °C, 14 000 RPM po dobu 20 minut. Pro stanovení enzymové aktivity POX a PPO byl použit supernatant.

3.4.3 Stanovení celkové antioxidační kapacity

Metoda využívá schopnosti antioxidačních látek zhaset radikály. V metodě se používá ABTS (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)), který je zdrojem kation-radikálu $ABTS^{\cdot+}$, jehož typické zbarvení je modrozelené s absorbcí při 734 nm. Tvorba radikálu je umožněna oxidací ABTS pomocí APS (persíran amonný). Jako standard se používá synteticky připravený Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) s antiradikálovou aktivitou. Výsledná antioxidační kapacita je následně vyjádřena jako ekvivalent Troloxu (Paulová *et al.*, 2004).

Nejprve byly připraveny potřebné roztoky. 0,1 mol·l⁻¹ fosfátový pufr o pH 7 smícháním 61,5 ml 1 mol·l⁻¹ K₂HPO₄ a 38,5 ml 1 mol·l⁻¹ KH₂PO₄, po upravení pH na pH metru doplněn do 1 litru destilovanou vodou. 1 mmol·l⁻¹ roztok Troloxu rozpuštěním 2,5 mg Troloxu v 10 ml methanolu; 1,6 mmol·l⁻¹ ABTS rozpuštěním 8,78 mg ABTS v 10 ml 0,1 mol·l⁻¹ fosfátového pufru o pH 7; 1,86 mmol·l⁻¹ roztok APS rozpuštěním 21,2 mg APS v 50 ml 0,1 mol·l⁻¹ fosfátového pufru o pH 7.

Poté byla připravena kalibrační řada Troloxu o koncentracích 10, 20, 40, 60, 80 a 100 μmol·l⁻¹ smícháním zásobního 1 mmol·l⁻¹ roztoku Troloxu a methanolu (Tab 1).

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 25 μl blanku (methanol)/standardu/vzorku, 25 μl 1,86 mmol·l⁻¹ APS a 50 μl 1,6 mmol·l⁻¹ ABTS. Směs byla inkubována po dobu 25 minut při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při 734 nm.

Tab. 1: Objemy zásobního roztoku Troloxu a methanolu pro vytvoření kalibrační řady Troloxu.

Koncentrace Troloxu ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	μl zásobního $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku Troloxu	μl methanolu
10	10	990
20	20	980
40	40	960
60	60	940
80	80	920
100	100	900

3.4.4 Stanovení obsahu flavonoidů

Stanovení obsahu flavonoidů bylo provedeno metodou kolorimetrické reakce využívající AlCl_3 v roztoku H_2O a octanu draselného. Jako standard je využíván flavonoid kvercetin. Reakcí vzniká produkt s maximální absorbcí při 415 nm (Tsaniklidis *et al.*, 2021).

Byly připraveny potřebné roztoky. 10% roztok chloridu hlinitého v methanolu byl připraven rozpuštěním 0,3621 g hexahydrátu chloridu hlinitého ve 2 ml methanolu, $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok octanu draselného v methanolu rozpuštěním 0,1962 g octanu draselného ve 2 ml methanolu, zásobní roztok standardu rozpuštěním 1 mg kvercetinu v 1 ml methanolu.

Následně byla připravena kalibrační řada kvercetinu o koncentracích 0 -175 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ smícháním zásobního roztoku standardu a methanolu (Tab. 2).

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 140 μl vody, 25 μl vzorku nebo standardu, 10 μl 10% roztoku AlCl_3 a 10 μl $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku octanu draselného. Reakční směs byla inkubována po dobu 30 minut při 25 °C. Následně byla změřena absorbance při 415 nm.

Tab. 2: Objemy zásobního roztoku kvercetinu a methanolu pro vytvoření kalibrační řady.

Koncentrace kvercetinu ($\mu\text{g/ml}$)	μl zásobního roztoku kvercetinu	μl methanolu
0	0	1000
2,5	2,5	997,5
5	5	995
7,5	75	992,5
10	10	990
15	15	985
20	20	980
25	25	975
50	50	950
75	75	925
100	100	900
125	125	875
150	150	850
175	175	825

3.4.5 Stanovení aktivity peroxidasy

Metoda využívá oxidačně redukční reakce. Během reakce je redukován H_2O_2 za katalýzy peroxidasy a guajakol je oxidován na 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylochinon, který vykazuje nejvyšší absorbanci při 436 nm. Molární absorpční koeficient pro 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylochinon je $4500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Angelini *et al.*, 1990).

0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátový pufr o pH 6 byl připraven smícháním 13,2 ml 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K_2HPO_4 a 86,8 ml 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 , po upravení pH na pH metru doplněn do 1 litru destilovanou vodou. Reakční směs vznikla smícháním 10 ml 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru pH 6 a 143,3 μl guajakolu.

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 155 μl reakčního pufru, 10 μl extraktu a 10 μl 175 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 . Následně byla měřena absorbance při 30 °C po dobu 1 minuty.

3.4.6 Stanovení aktivity polyfenoloxidas

Metoda využívá 4-methylkatechol jako substrát polyfenoloxidas, který je přeměněn na produkt s absorbcí při 420 nm. V reakční směsi se nachází také katalasa, která oxiduje případný peroxid vodíku (Paul a Gowda, 2000).

Roztok katalasy byl připraven rozpuštěním 5 mg CAT ve 4 ml destilované vody. 88 mmol·l⁻¹ roztok 4-methylkatecholu byl připraven rozpuštěním 21,8 mg ve 2 ml destilované vody.

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 180 µl 0,05 mol·l⁻¹ K-fosfátového pufru o pH 7, 20 µl CAT, 10 µl vzorku nebo vody (do blanku), 10 µl 88 mmol·l⁻¹ 4-methylkatecholu nebo vody (do blanku). Poté byla měřena absorbance při 25 °C a 420 nm po dobu 60 minut.

3.4.7 Vyhodnocení výsledků

Používaný rostlinný materiál byl napěstován ve třech biologických replikátech. Koncentrace či aktivity studovaných parametrů byly měřeny v technických triplikátech. Výsledky jsou tedy průměrem minimálně devíti hodnot, stejně tak směrodatná odchylka. Celková antioxidační kapacita a enzymové aktivity byly přepočítány na relativní jednotky, kdy kontrolním vzorkům obou genotypů v obou stádiích byla přidělena hodnota 1 a ostatní vzorky byly dopočítány jako násobky 1.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V bakalářské práci byl studován vliv salinitního stresu na celkovou antioxidační kapacitu, obsah flavonoidů, na aktivitu peroxidasy a polyfenoloxidasu u dvou genotypů hrachu, kulturního Trendy a planého IG52565. Získaná data byla porovnáována s kontrolním rostlinným materiálem, který byl v průběhu pěstování zaléván vodou bez obsahu NaCl. Z důvodu ovlivnění klíčících semen ve 3. stádiu vývoje stresem ze sucha bylo toto stádium z výsledkové části experimentů vyloučeno.

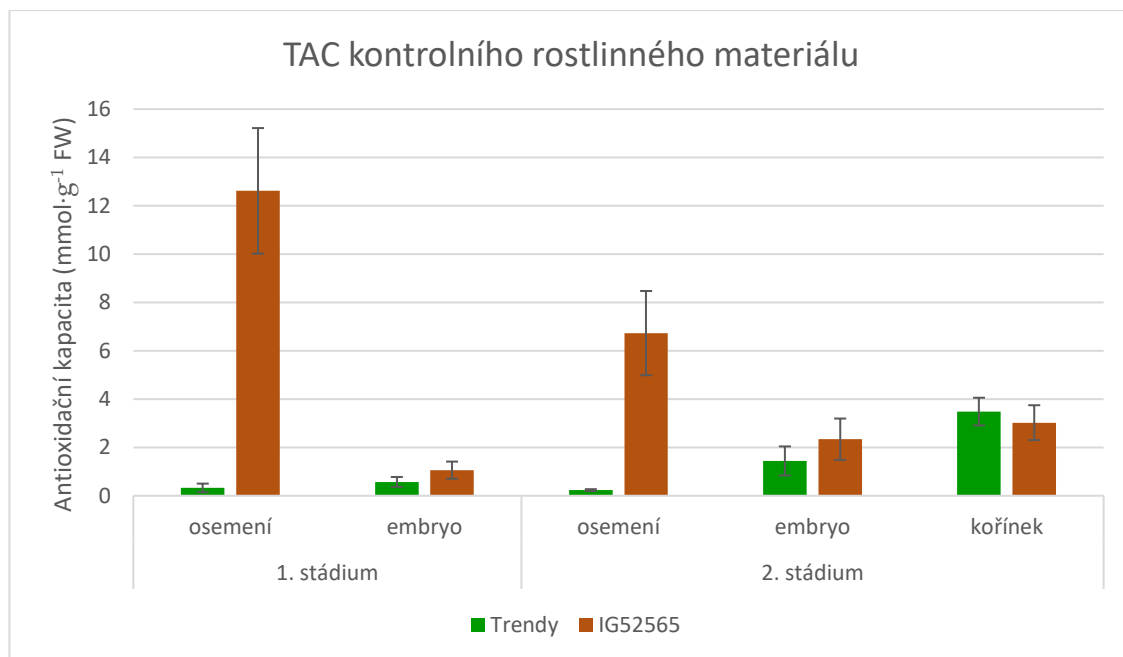
4.1 Celková antioxidační kapacita

Rostliny v reakci na stres syntetizují mnohé látky s antioxidačními vlastnostmi. Těmito vlastnostmi nazýváme schopnost látek snižovat hladinu a tím i negativní dopady volných radikálů v rostlinném těle. Mezi antioxidační látky se řadí flavonoidy, katechiny, fenolické sloučeniny, mnohé vitamíny a další (Paulová *et al.*, 2004).

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity (TAC, z anglického „Total Antioxidant Capacity“) byla využita schopnost látek zhaset kationradikál ABTS⁺, který vzniká oxidací pomocí persíranu amonného. Děj je spojován s poklesem absorbance při 734 nm (Paulová *et al.*, 2004).

4.1.1 Celková antioxidační kapacita kontrolního rostlinného materiálu

V experimentu byla stanovena TAC osemení, embrya a kořínku obou studovaných genotypů pěstovaných v kontrolních podmínkách, tedy bez přídavku NaCl (Obr. 8). U osemení (Obr. 8) byla detekována mnohonásobně vyšší TAC u planého genotypu ve srovnání s kulturním genotypem, ale také při porovnání TAC v embryu a kořínku. TAC osemení planého genotypu vykazovala klesající trend v průběhu vývoje. V 1. stádiu byla detekována TAC osemení planého genotypu okolo 12,6 mmol·l⁻¹·g⁻¹ FW, v dalším stádiu přibližně 6,7 mmol·l⁻¹·g⁻¹ FW. V 1. stádiu vývoje kulturního genotypu dosahovala TAC osemení hodnoty okolo 0,32 mmol·l⁻¹·g⁻¹ FW, v následujícím stádiu jen kolem 0,23 mmol·l⁻¹·g⁻¹ FW.



Obr. 8 Celková antioxidační kapacita (TAC) v osemeni, embryu a kořínku rostlinného materiálu v kontrolních podmínkách (bez přidavku NaCl) v 1. a 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

V případě embrya kulturního genotypu Trendy dosahovala TAC hodnoty kolem $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ v 1. stádiu, zatímco v 2. stádiu kolem $1,44 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ (Obr. 8). Také u planého genotypu byl pozorován nárůst, a to z hodnoty okolo $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ na přibližně $2,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$. U obou genotypů dochází ke zvýšení celkové antioxidační kapacity v embryu v průběhu vývoje semen.

V kořincích obou genotypů (Obr. 8) dosahovala celková antioxidační kapacita podobných hodnot, u Trendy to bylo okolo $3,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ a u IG52565 cca $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$.

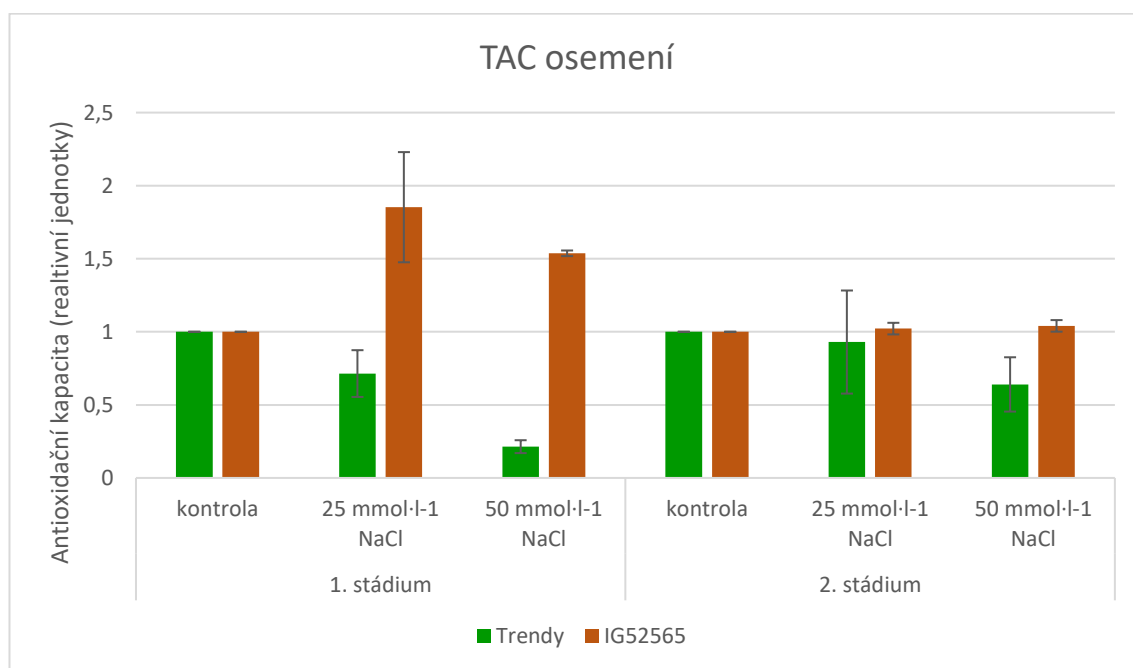
4.1.2 Vliv salinity na celkovou antioxidační kapacitu

V experimentální části bakalářské práce byl dále sledován vliv různé míry zasolení ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) na celkovou antioxidační kapacitu studovaného rostlinného materiálu (embryo, osemení, kořínek) v různých stádiích vývoje (Obr. 9, 10 a 11). Naměřené hodnoty byly přepočítány na relativní jednotky.

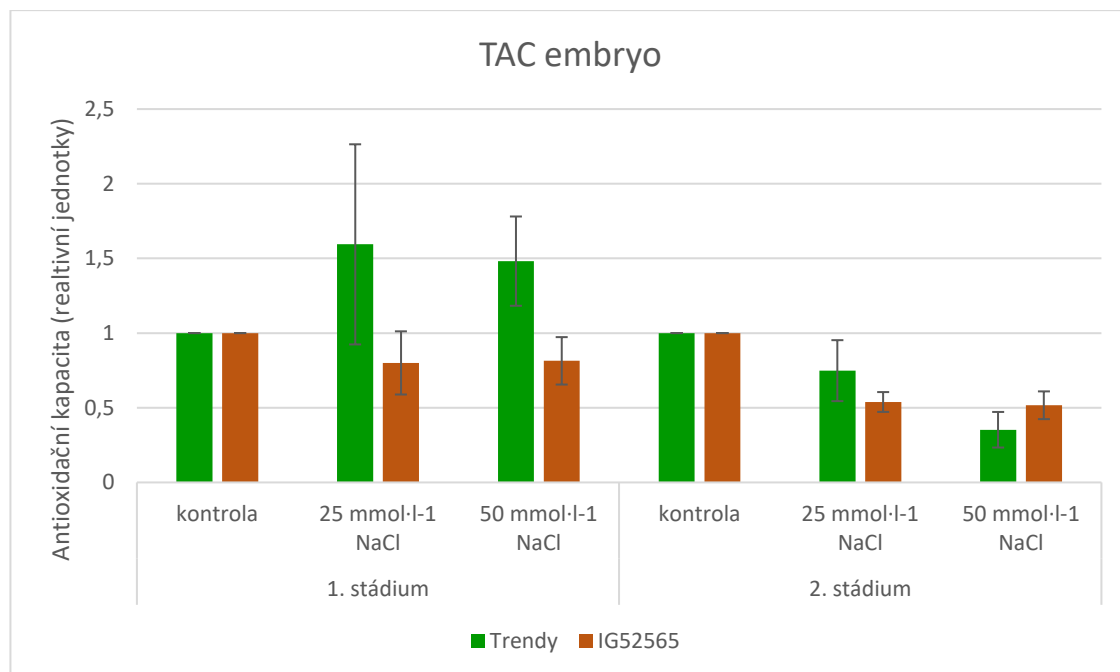
TAC se měnila v reakci na salinitní stres v osemeni genotypu Trendy (Obr. 9). V obou fázích vývoje došlo k poklesu antioxidační kapacity u vzorků vystavených salinitnímu stresu. Jiná situace byla pozorována u osemeni planého genotypu. Zde se

v 1. stádiu celková antioxidační kapacita zvýšila, zatímco v dalším stádiu vývoje se významně neměnila u rostlinného materiálu stresovaného zasolením (Obr. 9).

Vystavení salinitnímu stresu mělo efekt na celkovou antioxidační kapacitu embrya kulturního genotypu (Obr. 10), a to takový, že v 1. stádiu vývoje byla zjištěna vyšší antioxidační kapacita u vzorků vystavených soli, zatímco v 2. stádiu došlo k poklesu kapacity, který se prohluboval s rostoucí koncentrací NaCl. Embryo planého genotypu reagovalo na salinitní stres snížením celkové antioxidační kapacity v porovnání s kontrolou, a to zejména v 2. stádiu vývoje (Obr. 10). V případě embrya byl očekáván nárůst TAC u semen vystavených salinitnímu stresu, ke kterému ale nedošlo. Jedním z důvodů je možnost, že místo produkce látek s antioxidačními vlastnostmi reaguje embryo aktivací jiných obranných mechanismů. Další možností je, že ochranu embrya přejímá vznikající kořínek, který je zodpovědný za přímé nasávání vody s obsahem soli. Kořínek pak může reagovat na salinitní stres zvýšením aktivity antioxidačních enzymů.

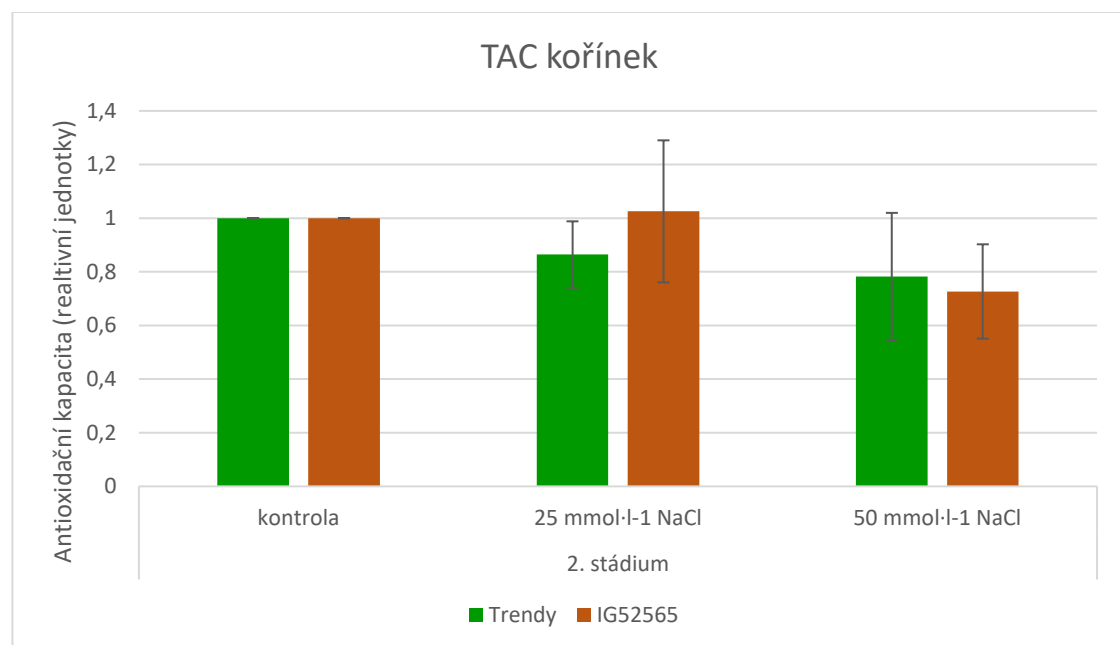


Obr. 9 Vliv salinity na celkovou antioxidační kapacitu (TAC) osemení kulturního genotypu Trendy a planého genotypu IG52565 v 1. a 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.



Obr. 10 Vliv salinity na celkovou antioxidační kapacitu (TAC) embrya kulturního genotypu Trendy a planého genotypu IG52565 v 1. a 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

Celková antioxidační kapacita byla stanovena i v kořincích obou studovaných genotypů (Obr. 11). Kulturní i planý genotyp zareagovaly na salinitu mírným snížením TAC.



Obr. 11 Vliv salinity na celkovou antioxidační kapacitu (TAC) kořínku kulturního genotypu Trendy a planého genotypu IG52565 v 1. a 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

V rámci stanovení celkové antioxidační kapacity u rostlinného materiálu studovaných genotypů vystavených salinitnímu stresu bychom mohli očekávat zvýšení produkce antioxidačních látek (a tedy i TAC) v důsledku vyšší potřeby detoxikovat ROS, jejichž koncentrace vlivem stresu narůstá v porovnání s kontrolním rostlinným materiálem. Zvýšená produkce antioxidantů v důsledku salinitního stresu byla publikována např. v práci Baatour *et al.* (2018), který byl zaměřen na určení vlivu salinitního stresu na rostliny *Trigonella foenum graecum* L. Rostliny byly během růstu vystaveny různým koncentracím soli, konkrétně 50, 100 a 150 mmol·l⁻¹ NaCl. Bylo zjištěno, že TAC se v listech postupně zvyšuje. Nárůst nebyl příliš patrný u koncentrací do 100 mmol·l⁻¹, u vysoké koncentrace byl již nárůst výraznější. V našem případě byl zaznamenán nárůst TAC pouze v osemeni planého genotypu v prvním stádiu vývoje, zatímco ve všech ostatních případech jsme zaznamenali naopak pokles TAC.

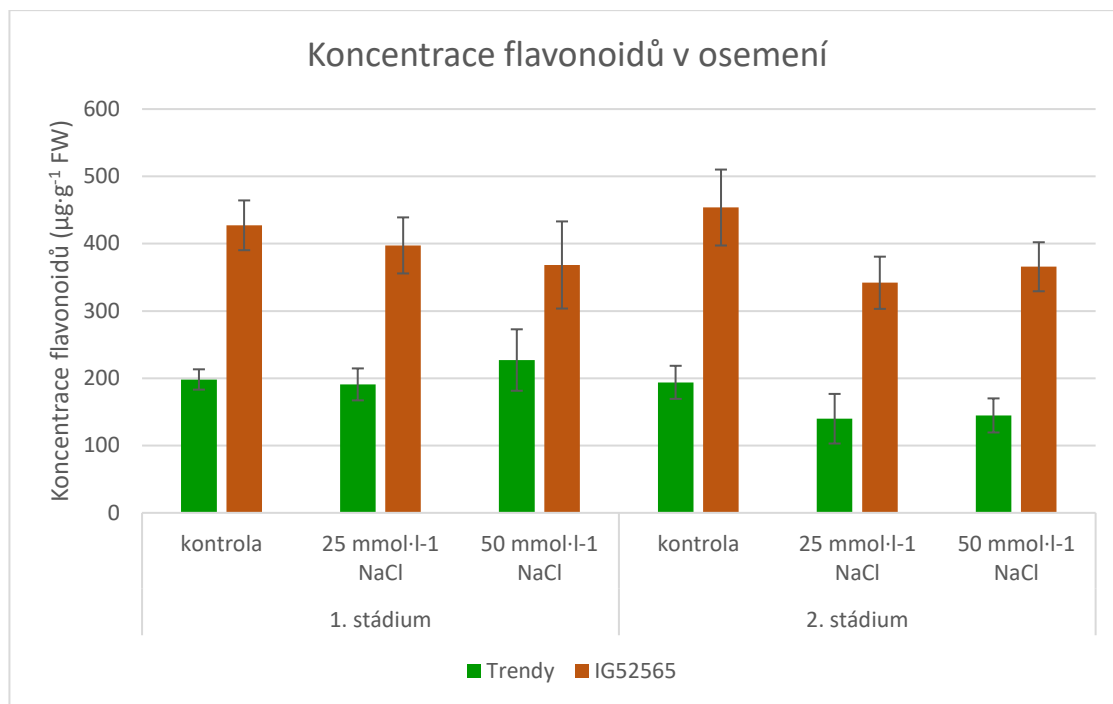
4.2 Koncentrace flavonoidů

Flavonoidy představují skupinu sekundárních metabolitů rostlin. Jedná se o polyfenolické sloučeniny, které podle chemické struktury dělíme na flavony, isoflavony, flavan-3-oly, flavanony, anthokyanidiny a flavonoly. V rostlinách plní mnoho fyziologických rolí. Některé sloučeniny fungují jako chemické atraktanty pro symbiotické bakterie kolonizující kořenový systém bobovitých rostlin, další jsou zodpovědné za pigmentaci květů a plodů, flavonoidy jsou rovněž schopny vychytávání ROS, jejichž zvýšená hladina je spojena s vystavením rostlin působení stresu (Yu *et al.*, 2000; Šamec *et al.*, 2021).

Množství flavonoidů bylo určeno reakcí flavonoidů přítomných ve vzorcích s chloridem hlinitým. Výsledkem reakce je produkt s maximální absorbcí při 415 nm. Jako standard byl využit kvercetin (Tsaniklidis *et al.*, 2021).

V experimentální části byl zkoumán vliv salinitního stresu (25 a 50 mmol·l⁻¹ NaCl) na koncentraci flavonoidů v osemeni, embryu a kořínku studovaných genotypů hrachu ve dvou vývojových stádiích.

U obou zkoumaných genotypů byly flavonoidy zvolenou spektrofotometrickou metodou detekovány pouze v osemeni (Obr. 12). Genotypy se od sebe výrazně liší, neboť u planého genotypu byl stanoven prakticky dvojnásobně vyšší obsah flavonoidů v porovnání s kulturním genotypem. Hladina zmíněných polyfenolických látek v osemeni kontrolních semen dosahuje kolem 200 μg·g⁻¹ FW u genotypu Trendy a okolo 430 μg·g⁻¹ FW u planého genotypu. V průběhu vývoje se hladina polyfenolických sloučenin příliš neměnila ani u jednoho ze zkoumaných genotypů.



Obr. 12 Vliv salinity na koncentraci flavonoidů v osemení kulturního genotypu Trendy a planého genotypu IG52565 v 1. a 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

Mírné zvýšení koncentrace flavonoidních látek v důsledku salinitního stresu bylo zaznamenáno pouze v osemení semen kulturního genotypu pěstovaných v prostředí 50 mmol·l⁻¹ NaCl v 1. stádiu vývoje, ve druhém stádiu byl u tohoto genotypu detekován pokles zastoupení flavonoidů. Pokles produkce flavonoidů v osemení semen vystavených salinitním podmínkám v obou vývojových stádiích byl charakteristický pro planý genotyp.

Námi získané výsledky nelze porovnávat přímo s výsledky jiných studií, protože ještě neexistují publikace zabývající se koncentrací flavonoidů v osemení. Podobnou studii, zabývající se určením obsahu flavonoidů v listech, nikoli v osemení, provedl Farroq *et al.* (2021). Výzkum byl zaměřen na zkoumání vlivu salinitního stresu na obsah flavonoidů v listech hrachu setého, konkrétně genotypů Climax, Green Grass a Meteor. Rostliny byly zavlažovány 50, 75 a 100 mmol·l⁻¹ NaCl. Výsledkem práce bylo zjištění, že obsah flavonoidů se v listech hrachu zvyšuje v reakci rostlin na rostoucí koncentraci soli. Nejvýraznější odpověď rostlin na salinitní stres byla pozorována u genotypu Climax.

Další podobná studie pod vedením Zhou *et al.* (2018) se zabývala určením vlivu salinity na obsah flavonoidů rostliny *Schizonepeta tenuifolia* (zlateň indická). Rostliny byly pěstovány v prostředí 25, 50, 75 a 100 mmol·l⁻¹ NaCl. V tomto případě byl zjištěn

nárůst hladiny flavonoidů v listech rostlin u $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, ale s rostoucí koncentrací solí byl naopak pozorován pokles.

4.3 Aktivita peroxidasy

Enzym peroxidasa plní v rostlinném organismu několik důležitých rolí. Jednou z nich je vychytávání toxického peroxidu vodíku, jehož hladina narůstá vystavením rostliny stresu, další neméně důležitou funkcí je katalýza oxidační polymerace monolignolů za vytvoření ligninu. Z důvodu antioxidační aktivity enzymu je zvýšená exprese genů kódujících peroxidasu spojována s rezistencí rostlin vůči stresu, především vůči nedostatku vody (Tenhaken, 2015; Govender *et al.*, 2017).

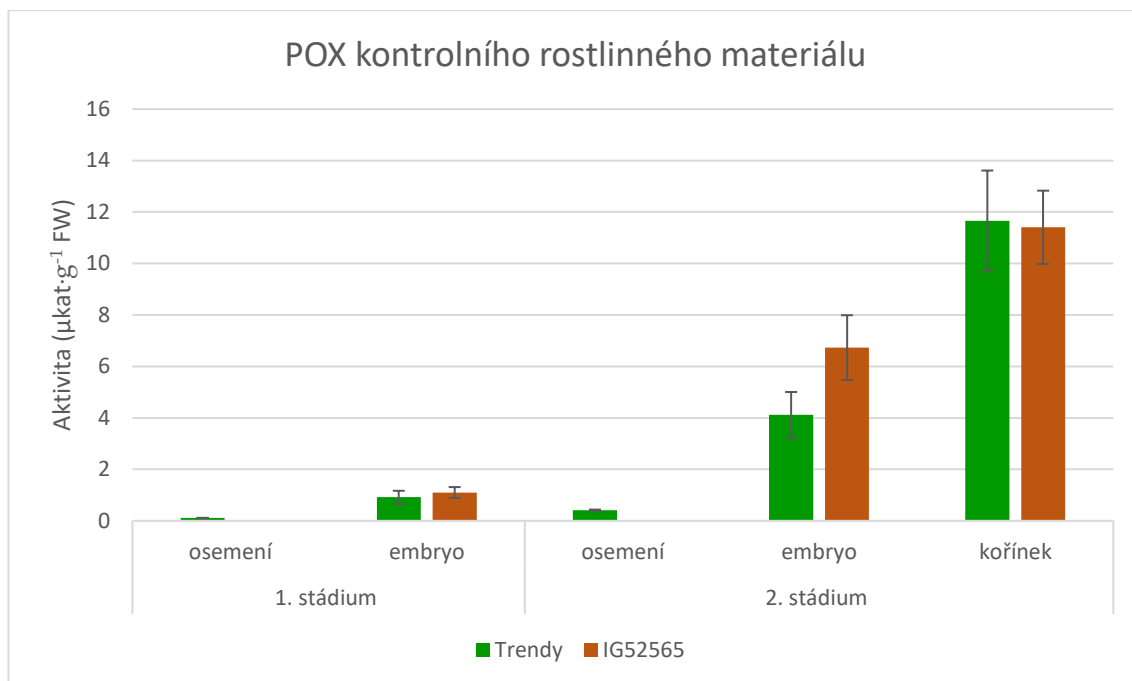
Pro stanovení aktivity peroxidasy byla využita reakce redukce peroxidu vodíku za současné oxidace guajakolu, která je katalyzovaná studovaným enzymem (Angelini *et al.*, 1990).

4.3.1 Aktivita peroxidasy kontrolního rostlinného materiálu

V experimentu byla stanovena aktivita peroxidasy v osemení, embryu a kořínku obou genotypů hrachu pěstovaných v kontrolních podmínkách (Obr. 13).

V případě osemení byla detekována pouze minimální aktivita enzymu u kulturního kultivaru Trendy, zatímco u planého genotypu nebyla aktivita POX vůbec zaznamenána (Obr. 13). V případě kulturního genotypu lze pozorovat zvýšení aktivity POX v průběhu vývoje, a to z přibližně $0,1 \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ FW v 1. stádiu na $0,4 \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ FW ve 2. stádiu vývoje.

V embryu byla pozorována aktivita POX v prvním stádiu okolo $0,9 \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ FW u kulturního genotypu Trendy a kolem $1,1 \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ FW u planého genotypu IG52565, zatímco ve 2. stádiu dosahovala aktivita cca $4,1 \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ FW u genotypu Trendy a cca $6,7 \mu\text{kat}\cdot\text{g}^{-1}$ FW u planého genotypu (Obr. 13). V obou případech lze pozorovat významné zvýšení aktivity enzymu v průběhu vývoje semen. Důvod, proč aktivita POX v embryu u průběhu vývoje roste, může být fakt, že během růstu semena dochází k prasknutí osemení. Embryo je pak v přímém kontaktu s vnějším prostředím. Také dochází k intenzivnějšímu metabolismu, spotřebě zásobních látek potřebných k vývoji klíčící rostlinky, což může být doprovázeno vyšší produkcí ROS.



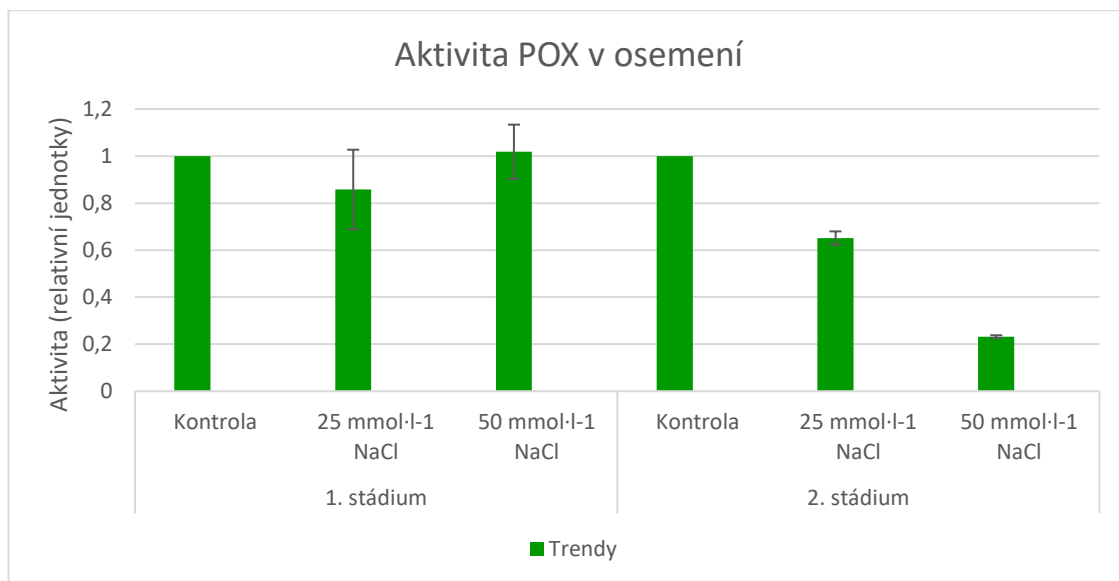
Obr. 13 Aktivita peroxidasy (POX) v osemení, embryu a kořínku rostlinného materiálu pěstovaného v kontrolních podmínkách (bez přídavku NaCl) v 1. a 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

Aktivita enzymu byla rovněž stanovena v kořincích obou genotypů (Obr. 14). Aktivita enzymu v kořincích byla mnohem vyšší v porovnání s jinými částmi semen studovaných genotypů. Rozdíly v aktivitě POX mezi studovanými genotypy nebyly v případě kořínků významné. Vysoká aktivita POX může být vysvětlena tak, že kořen plní v rostlinách významnou funkci, umožňuje příjem vody s živinami. Jelikož se jedná o životně důležitý rostlinný orgán, tak jej rostlina potřebuje chránit. Tuto ochranu zajišťuje vysoká aktivita antioxidantních enzymů. Enzym POX se také významně podílí na intenzivní lignifikaci v průběhu vývoje.

4.3.2 Vliv salinity na aktivitu peroxidasy

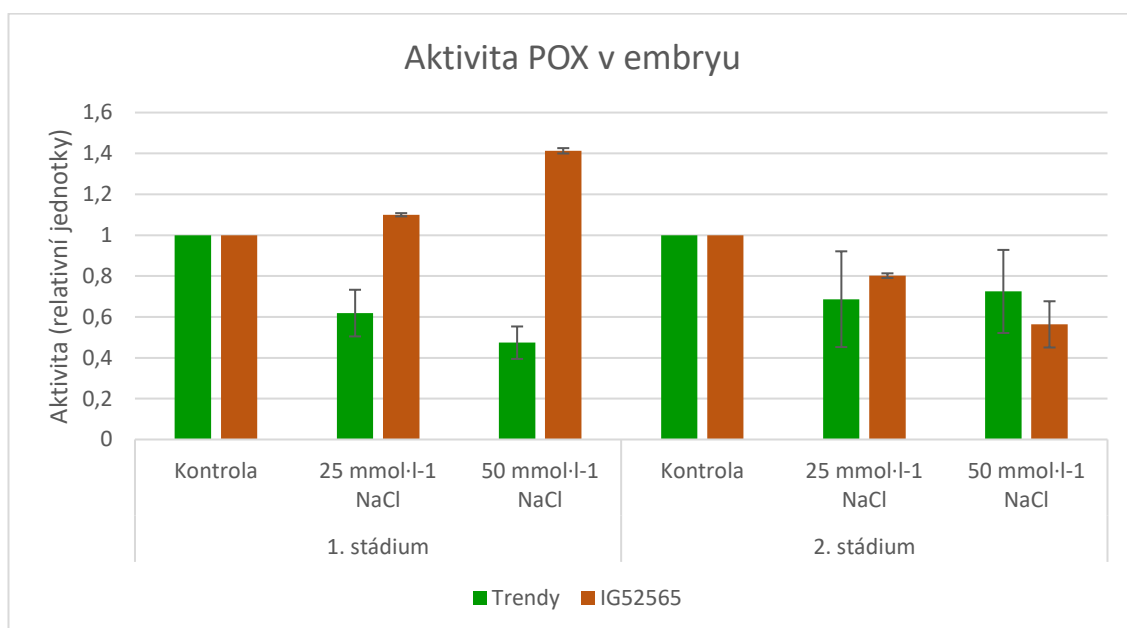
V experimentální části bakalářské práce byl sledován vliv různých koncentrací NaCl (25 mmol·l⁻¹ a 50 mmol·l⁻¹) na aktivitu peroxidasy v osemení, embryu a kořínku obou studovaných genotypů Trendy a IG52565 v různých stádiích vývoje (Obr. 14, 15 a 16).

POX aktivita v osemení byla detekována pouze u kulturního genotypu Trendy (Obr. 14). Vlivem působení salinity nebyly zaznamenány signifikantní změny v POX aktivitě v osemení 1. stádiu. Ve 2. stádiu vývoje reagovalo osemení kulturního genotypu na salinitní stres významným snížením aktivity POX v korelaci s rostoucí koncentrací NaCl.



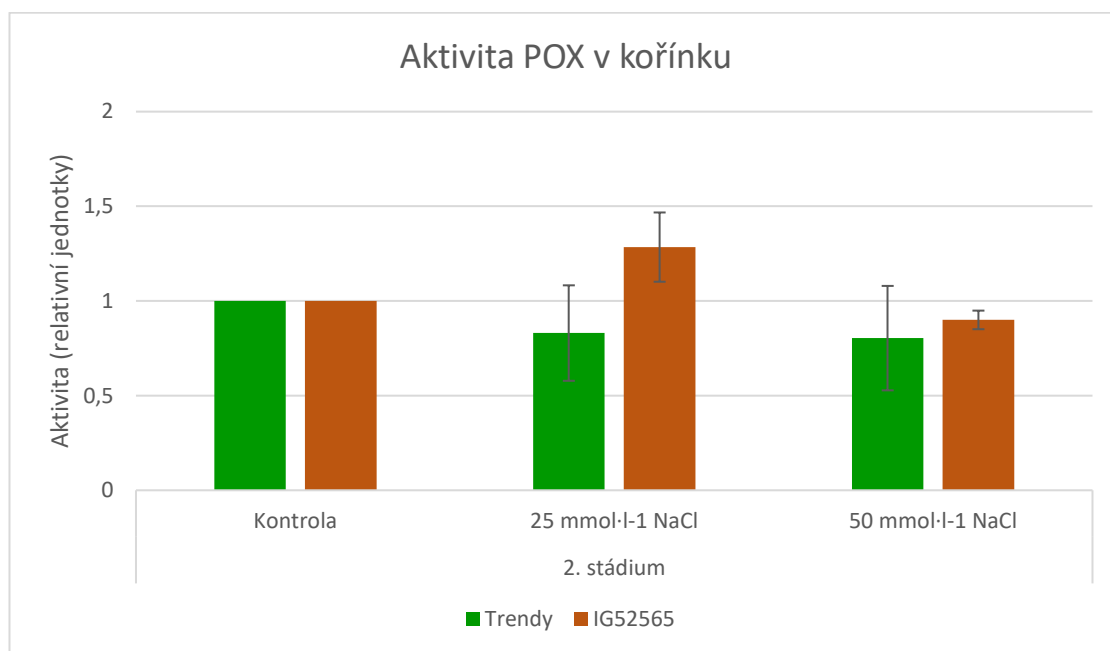
Obr. 14 Vliv salinity na aktivitu peroxidasy (POX) v osemeni kulturního genotypu Trendy v 1. a 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

Vliv různých koncentrací chloridu sodného na aktivitu POX byl pozorován v embryích obou zkoumaných genotypů (Obr. 15). Kulturní genotyp Trendy reagoval na salinitní stres snížením aktivity enzymu v obou stádiích vývoje, výraznější pokles POX aktivity byl detekován v 1. stádiu vývoje. Planý genotyp IG52565 odpověděl na salinitní stres zvýšením aktivity POX v případě 25 mmol·l⁻¹ i 50 mmol·l⁻¹ NaCl v 1. stádiu. V následujícím stádiu je ale patrný pokles aktivity enzymu, zde se pokles prohlubuje s vyšší koncentrací soli ve srovnání s kontrolou.



Obr. 15 Vliv salinity na aktivitu peroxidasy (POX) v embryu kulturního genotypu Trendy a planého genotypu IG52565 v 1. a 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

Vliv salinitního stresu na aktivitu POX v koříncích není tak výrazný. V případě kulturního genotypu došlo k mírnému poklesu aktivity po vystavení salinitnímu stresu ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$), u planého genotypu bylo naopak pozorováno zvýšení aktivity. V případě vyšší koncentrace soli ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$), bylo patrné mírné snížení aktivity POX ve srovnání s kontrolou (Obr. 16).



Obr. 16 Vliv různých koncentrací NaCl na aktivitu peroxidasy (POX) v koříncích kulturního genotypu Trendy a planého genotypu IG52565 ve 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

Námi získané výsledky nelze přímo porovnávat s jinými studiemi, protože ještě nebyly provedeny experimenty pro určení TAC v semenech rostlin. Námi podobný výzkum prováděl Li (2008), který zkoumal vliv salinitního stresu na aktivitu antioxidantních enzymů u rostlin *Limonium bicolor*. Výstupem práce bylo zjištění, že vystavení rostlin vyšším koncentracím solí způsobuje výrazné zvýšení aktivity POX ve výhoncích. V porovnání s kontrolní skupinou činil nárůst aktivity $80,30 \%$, $124,03 \%$, $170,32 \%$ u rostlin vystavených koncentracím 100 , 200 a $400 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$.

Efekt salinitního stresu na aktivitu POX v listech, nikoliv v semenech, byl zkoumán také v práci Abdí *et al.* (2019). Předmětem výzkumu byly rostliny hrachu setého, jejichž kořenový systém byl inokulován symbiotickými bakteriemi *Rhizobia*. Aktivita peroxidasy byla stanovena v listech, které byly sklizeny z rostlin po 10, 20, 30, 40 a 50 dnech po inokulaci bakteriemi. Studovaný hrách byl během růstu vystaven 100 a $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$. V průběhu vývoje byl pozorován malý nárůst aktivity POX, nárůst

se dokonce zastavil 20 dnů a 50 dnů po inokulaci. Vystavení rostlin salinitnímu stresu významně neovlivnilo aktivitu POX.

Podobný výzkum byl realizován pod vedením Shahid *et al.* (2012), ve kterém byly studovány odezvy různých genotypů hrachu setého na salinitní stres. Testované rostliny byly v průběhu experimentu zalévány 25, 50 a 75 mmol·l⁻¹ NaCl. Vystavení rostlin salinitnímu stresu způsobilo zvýšení aktivity POX rovněž ve všech genotypech v závislosti na koncentracích NaCl. Ze zkoumaných genotypů reagovaly nejvíce genotypy Samarina Zard a Climax.

4.4 Aktivita polyfenoloxidas

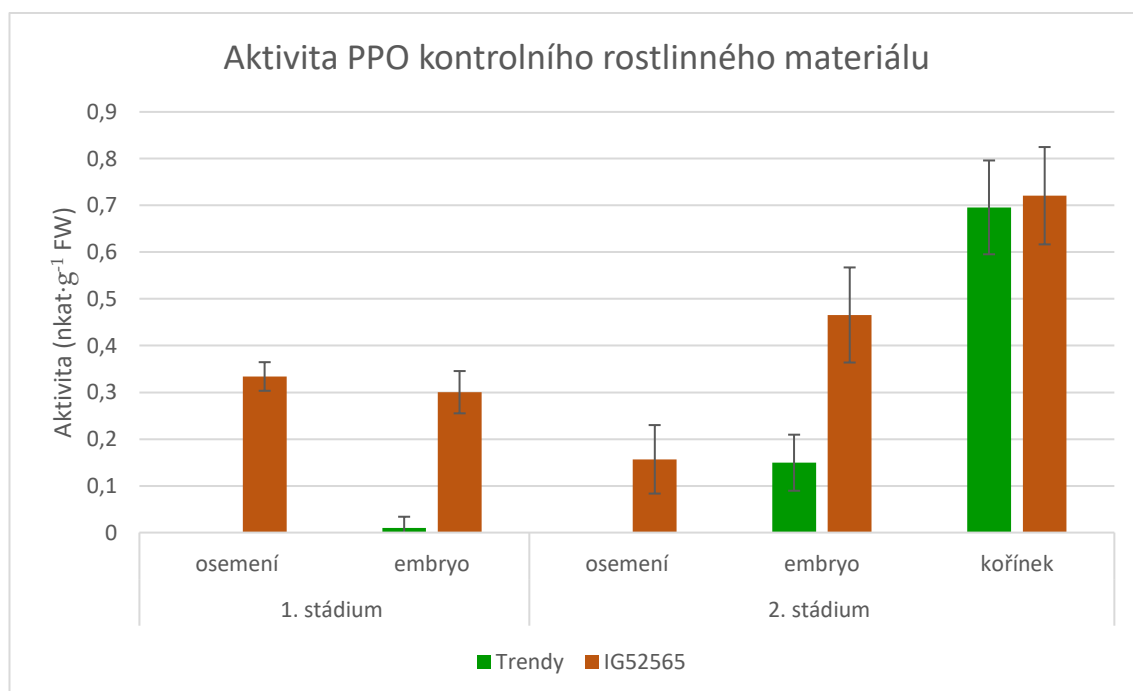
Polyfenoloxidasa je metaloprotein obsahující měď, který je zodpovědný za tvorbu pigmentů rostlin. Katalyzovanou reakcí je oxidace fenolů na o-chinon za současné spotřeby kyslíku (Doğan *et al.*, 2005).

Metoda stanovení aktivity polyfenoloxidas využívá 4-methylcatechol jako substrát enzymu, který je přeměněn na produkt s absorbancí při 420 nm (Paul a Gowda, 2000).

4.4.1 Aktivita polyfenoloxidas kontrolního rostlinného materiálu

V experimentální části bakalářské práce byla stanovena aktivita PPO v kontrolním rostlinném materiálu. Aktivita enzymu byla stanovena v osemení, embryu a kořínku obou studovaných genotypů (Obr. 17).

V osemení byla aktivita PPO detekována pouze u planého genotypu IG52565 (Obr. 17). V tomto případě dosahovala aktivita enzymu v 1. stádiu okolo $0,3 \text{ nkat}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$ a ve 2. stádiu byla cca $0,16 \text{ nkat}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$. U planého genotypu můžeme pozorovat snížení aktivity PPO v průběhu vývoje.



Obr. 17 Aktivita polyfenoloxidas (PPO) v osemení, embryu a kořínku rostlinného materiálu pěstovaného v kontrolních podmínkách (bez přidavku NaCl) v 1. a 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

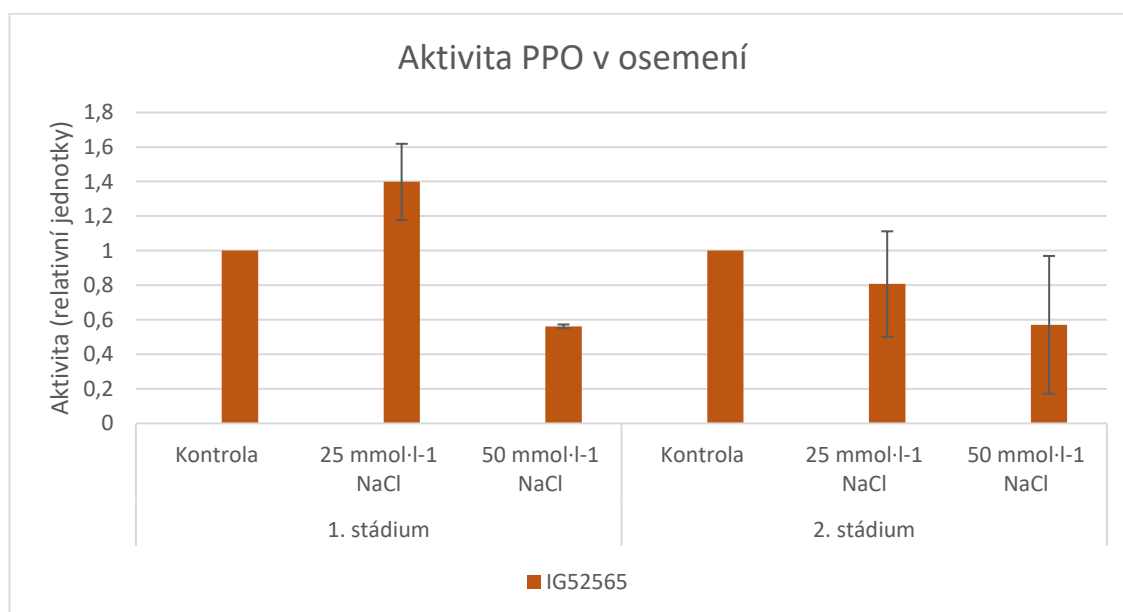
Dále byla aktivita PPO zkoumaná v embryu kontrolního rostlinného materiálu (Obr. 17). V případě kulturního genotypu byla aktivita v 1. stádiu velmi nízká, ale v 2. stádiu vývoje již aktivita dosahovala hodnoty cca $0,14 \text{ nkat}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$. U planého genotypu IG52565 byl enzym aktivní již v 1. stádiu a jeho aktivita s vývojem taktéž narůstala.

Enzym polyfenoloxidasa byl aktivní také v kořincích obou zkoumaných genotypů, kde byla aktivita PPO významně vyšší v porovnání s osemením a embryem (Obr. 17). Aktivita PPO dosahovala hodnot okolo $0,69 \text{ nkat}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$ u Trendy a $0,72 \text{ nkat}\cdot\text{g}^{-1} \text{ FW}$ u IG52565. Mezi jednotlivými genotypy nelze pozorovat výrazné rozdíly v aktivitě tohoto enzymu v kořenové části.

4.4.2 Vliv salinity na aktivitu polyfenoloxidasy

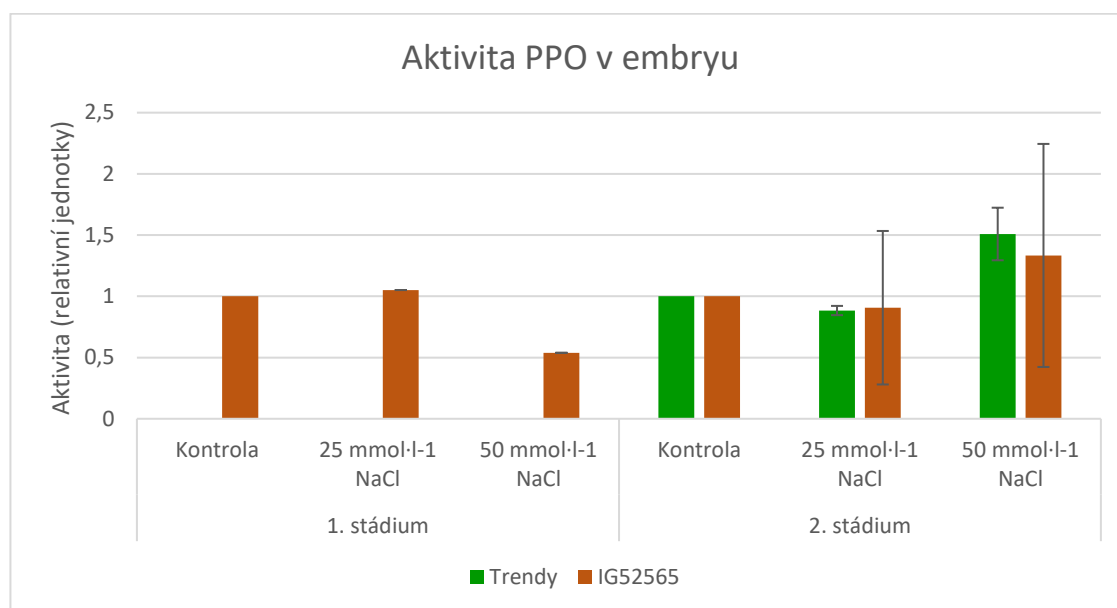
V experimentální části byl sledován vliv různých koncentrací NaCl ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) na aktivitu PPO v kulturním genotypu Trendy a planém genotypu IG52565 v jednotlivých stádiích vývoje (Obr. 18, 19 a 20).

Salinitní stres rovněž ovlivnil aktivitu PPO v osemení planého genotypu IG52565 (Obr. 18). V prvním stádiu vývoje došlo ke zvýšení aktivity po vystavení $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl a výraznému poklesu po vystavení $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. Naproti tomu ve 2. stádiu se aktivita enzymu postupně snižovala s rostoucí koncentrací soli. V případě kulturního genotypu nebyla aktivita enzymu detekována.



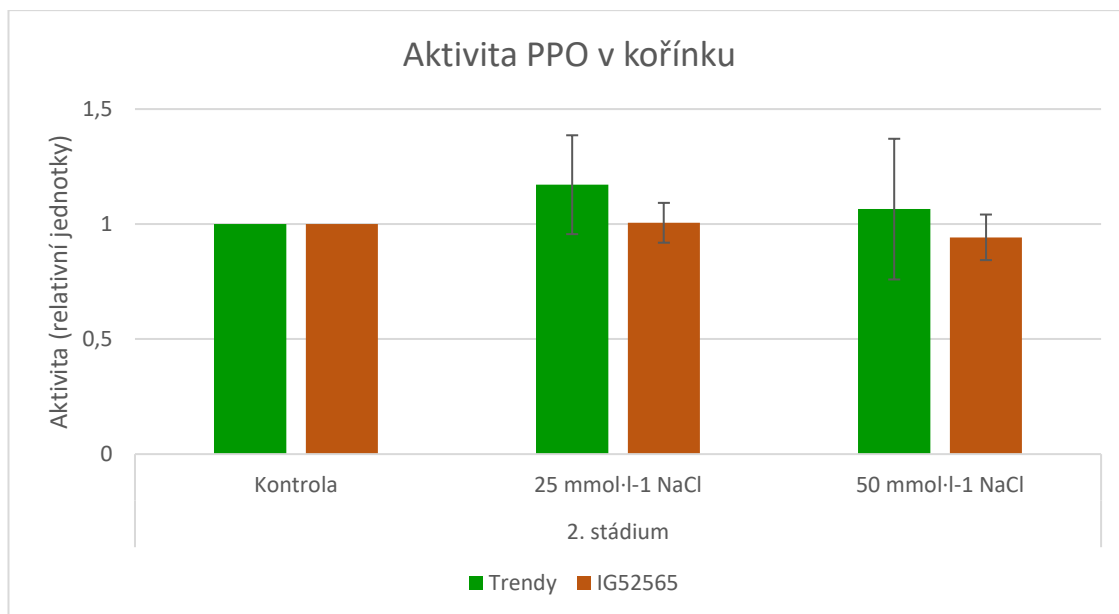
Obr. 18 Vliv různých koncentrací NaCl na aktivitu polyfenoloxidasy (PPO) v osemení planého genotypu IG52565 v 1. a 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

Salinitní stres ovlivnil aktivitu PPO v embryu obou genotypů (Obr. 19). V případě kulturního genotypu Trendy byla aktivita enzymu detekována až ve 2. stádiu, kde nedošlo k patrným změnám po vystavení 25 mmol·l⁻¹ NaCl, zatímco u rostlin vystavených 50 mmol·l⁻¹ NaCl došlo k nárůstu aktivity enzymu. Aktivita PPO genotypu IG52565 v 1. stádiu vývoje nebyla příliš ovlivněna 25 mmol·l⁻¹ NaCl, ale u vyšší koncentrace došlo k poklesu aktivity. Ve 2. stádiu byl očekáván nárůst společně s rostoucí salinitou, vzhledem k vysokým odchylkám ale není možné tuto domněnku potvrdit.



Obr. 19 Vliv různých koncentrací NaCl na aktivitu polyfenoloxidasy (PPO) v embryu kulturního genotypu Trendy a planého genotypu IG52565 v 1. a 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

Salinitní podmínky významně neovlivnily aktivitu PPO v kořincích studovaných genotypů hrachu (Obr. 20).



Obr. 20 Vliv různých koncentrací NaCl na aktivitu polyfenoloxidas (PPO) v kořincích kulturního genotypu Trendy a planého genotypu IG52565 ve 2. stádiu vývoje. Data představují průměr \pm SD ze tří experimentů.

Podobný výzkum byl prováděn pod vedením Abdi *et al.* (2019). Ve výzkumu byl sledován vliv salinitního stresu na aktivitu polyfenoloxidas u rostlin hrachu setého, jehož kořenový systém byl kolonizován symbiotickými rhizoidními bakteriemi. V průběhu růstu byla pozorována zvýšená aktivita PPO jak u kontrolního rostlinného materiálu, tak u rostlin vystavených zasolení, a to z hodnot okolo $1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM na hodnotu $11 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ FM. Výjimkou byl 30. den po inokulaci, kdy došlo ke snížení aktivity PPO u kontrolního rostlinného materiálu a rostlin zavlažovaných $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl.

Výzkum Dash a Panda (2001) byl zaměřen na vliv salinitního stresu na PPO u semen rostliny *Phaseolus mungo*. Studovaná semena byla zalévána 1, 2 a 3% roztokem NaCl a sklízena po 3, 6, 9 a 12 dnech po vysetí. Výsledkem práce bylo zjištění, že aktivita PPO v průběhu vývoje rostliny roste, z hodnot $2,6 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ FM až na $22 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ FM. Působení salinitního stresu na semena mělo opačný efekt, aktivita se snižovala společně s rostoucí koncentrací soli. Nejmenší aktivita byla zaznamenána u vzorků 12 dnů po výsevu, které byly zalévány 3% roztokem NaCl. Zde dosahovala aktivita PPO jen $0,5 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ FW.

5 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše zaměřující se na salinitní stres. Nejprve byl obecně charakterizován stres u rostlin společně se základními mechanismy obrany rostlin. Následovala charakteristika abiotického stresu se zaměřením na salinitní stres a jeho vlivu na růst a vývoj rostlin. Rovněž byla stručně popsána fenylpropanoidní dráha, včetně charakterizace vybraných enzymů této metabolické dráhy: cinnamylalkoholdehydrogenasa, fenylalaninamoniaklyasa, peroxidasa a polyfenoloxidasa. Na závěr byly shrnuty fyziologické role jednotlivých skupin polyfenolů u rostlin, mezi které patří lignin, lignany a flavonoidy.

Experimentální část byla zaměřena na určení vlivu salinitního stresu na celkovou antioxidační kapacitu, koncentraci flavonoidů a aktivitu vybraných enzymů fenylpropanoidní dráhy (POX, PPO) v rostlinách hrachu setého, *Pisum sativum*, a to kulturního genotypu Trendy a planého genotypu IG52565. Ze získaných výsledků vyplývá:

1. V osemení planého genotypu byly stanoveny významně vyšší hladiny TAC, flavonoidů a aktivita PPO v porovnání s kulturním genotypem v obou vývojových stádiích. Tento jev může mít spojitost s pigmentací osemení planého genotypu.
2. Během procesu klíčení semen v průběhu vývoje narůstá v embryu TAC, aktivita PPO i POX. Změny jsou výraznější u planého genotypu.
3. V kořínku byla detekována nejvyšší aktivita PPO a POX v porovnání s ostatním studovaným materiálem. V koříncích jednotlivých genotypů nebyly patrné významné rozdíly v TAC, PPO a POX.
4. V 1. stádiu vývoje se zvyšující se koncentrací NaCl u planého genotypu se snižuje TAC i aktivita PPO v embryu a naopak v osemení se TAC zvyšuje. PPO se v osemení při nižším salinitním stresu rovněž zvyšuje, ale se zvyšující se intenzitou salinity dochází k významnému poklesu aktivity PPO. U kulturního genotypu se v 1. stádiu vývoje významně snižuje aktivita POX u embrya.
5. Ve 2. stádiu vývoje je shodný vliv salinitního stresu na aktivitu POX, PPO a TAC. Se zvyšující se koncentrací NaCl se snižuje aktivita PPO, POX i TAC v embryu u obou genotypů. V osemení se se zvyšující se koncentrací NaCl snižuje aktivita v případě POX u genotypu Trendy a PPO u planého genotypu, TAC u obou genotypů.

Z důvodu některých nepřesných výsledků (viz. velké odchylky, např. v Obr. 19) budou experimenty v následných pokusech ověřeny. Pro přesnější určení změn v TAC, koncentraci flavonoidů a aktivitě POX a PPO je doporučeno pěstování za vyšších koncentrací NaCl, např. 25, 50, 75 a 100 mmol·l⁻¹ NaCl.

6 LITERATURA

- Adámková Š., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2006): Role L-fenylalaninamoniumlyasy při obranné reakci rostlin. *Chemické listy*, 100, 486-494. http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_07_486-494.pdf (1.12.2021)
- Abdi, N., Ltaief, B., Hemissi I. (2019). Oxidative Stress in Pea (*Pisum sativum* L.)-Rhizobia Symbiosis is Induced under Conditions of Salt Stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 21(4), 957-968. https://www.researchgate.net/publication/332321291_Oxidative_Stress_in_Peas_Pisum_sativum_L-Rhizobia_Symbiosis_Is_Induced_Under_Conditions_of_Salt_Stress (3.5.2022)
- Ahmad, F., Kamal, A., Singh, A., Ashfaq, F., Alamri, S., Siddiqui, M. H, Khan, M. I. R. (2021). Seed priming with gibberellic acid induces high salinity tolerance in *Pisum sativum* through antioxidants, secondary metabolites and up-regulation of antiporter genes. *Plant Biology*, 23(1), 113-121. <https://doi.org/10.1111/plb.13187>
- Angelini, R., Manes F, Federico, R. (1990). Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta*, 182(1), 89-96. <https://doi.org/10.1007/BF00239989>
- Baatour, O., Maha, Z., Nada, B., Zeineb, O. A. (2018). Effects of NaCl on plant growth and antioxidant activities in fenugreek (*Trigonella Foenum Graecum* L.). *Bioscience Journal*, 34(3), 683-696. <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n3a2018-38069>
- Berhanu, A. T., Berhane, G. (2014). The effect of salinity (NaCl) on germination and early seedling growth of *Lathyrus sativus* and *Pisum sativum* var. *abyssinicum*. *African Journal of Plant Science*, 8(5), 225-231. <https://doi.org/10.5897/AJPS2014.1176>
- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G., & Masmoudi, K. (2006). Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNH1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 301-308. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl251>
- Byrt, C., Munns, R., Burton, R. A., Gilliam, M., Wege, S. (2018). Root cell wall solutions for crop plants in saline soils. *Plant Science*, 269, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.12.012>
- Dash, M., Panda, S. K. (2001). Salt Stress Induced Changes in Growth and Enzyme Activities in Germinating *Phaseolus mungo* Seeds. *Biologia Plantarum*, 44(4), 587-589. <https://doi.org/10.1023/A:1013750905746>
- DellaGreca, M., Zuppolini, S., Zarrelli, A. (2013). Isolation of lignans as seed germination and plant growth inhibitors from Mediterranean plants and chemical synthesis of some analogues. *Phytochemistry Reviews*, 12(4), 717-731. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9311-7>
- Doğan, S., Turan, Y., Ertürk, H., Arslan, O. (2005). Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 776-785. <https://doi.org/10.1021/jf049053g>
- Dong, N.-Q., Lin, H.-X. (2021). Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant–environment interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 180-209. <https://doi.org/10.1111/jipb.13054>
- Farooq, M., Ahmad, R., Shahzad, M., Sajjad, Y., Hassan, A., Shah, M. M., Naz, S., Khan, S. A. (2021). Differential variations in total flavonoid content and antioxidant enzymes

- activities in pea under different salt and drought stresses. *Scientia Horticulturae*, 287. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110258>
- Govender, N., Mahmood, M., Seman, I., Wong, M.-Y. (2017). The Phenylpropanoid Pathway and Lignin in Defense against *Ganoderma boninense* Colonized Root Tissues in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Frontiers in Plant Science*, 8:1395. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01395>
- Hussein, M. M., EL-Geready, N. H. M., EL-Desuki, M. (2006): Role of Putrescine in Resistance to Salinity of Pea Plants (*Pisum sativum* L.). *Journal of Applied Science Research*, 2(9), 598 – 604 <http://www.aensiweb.com/old/jasr/jasr/2006/598-604.pdf> (3.12.2021)
- Choi, B., Chung, J. Y., Bae, H. J., Bae, I., Park, S., Bae, H. (2016): Functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase during developmental stages and under various stress conditions in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Bioresources*, 11(1), 105-125. <https://doi.org/10.15376/biores.11.1.105-125>
- Ibrahim, W., Zhu, Y.-M., Chen, Y., Qiu, C.-W., Zhu, S., Wu, F. (2019). Genotypic differences in leaf secondary metabolism, plant hormones and yield under alone and combined stress of drought and salinity in cotton genotypes. *Physiologia Plantarum*, 165(2), 343-355. <https://doi.org/10.1111/ppl.12862>
- Jeong, M.-J., Choi, B. S., Bae, D. W., Shin, S. C., Park, S. U., Lim, H.-S., Kim, J., Kim, J. B., Cho, B.-K., Bae, H. (2012): Differential expression of kenaf phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ortholog during developmental stages and in response to abiotic stresses. *Plant Omics Journal* 5(4), 392–399. https://www.researchgate.net/publication/233753274_Differential_expression_of_kenaf_phenylalanine_ammonia-lyase_PAL_ortholog_during_developmental_stages_and_in_response_to_abiotic_stresses (10.12.2021)
- Kim, N. S., Kim, J. K., Sathasivam, R., Park, H. W., Nguyen, B. V., Kim, M. C., Cuong, D. M., Chung, Y. S., Park, S. U. (2021). Impact of Betaine Under Salinity on Accumulation of Phenolic Compounds in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Sprouts. *Natural Product Communications*, 16(5), 1-9. <https://doi.org/10.1177/1934578X211015090>
- Kim, Y.-H., Bae, J., Huh, G.-H. (2010). Transcriptional regulation of the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from sweetpotato in response to plant developmental stage and environmental stress. *Plant Cell Reports*, 29(7), 779-791. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0864-2>
- Ku, Y.-S., Contador, C., Ng, M.-S., Yu, J., Chung, G., Lam, H.-M. (2020). The Effects of Domestication on Secondary Metabolite Composition in Legumes. *Frontiers in Genetics*, 11:581357. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.581357>
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J.-M., Gillet, F., Pelloux, J., Rayon, C. (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants*, 4(1), 112-166. <https://doi.org/10.3390/plants4010112>
- Lee, B.-R., Kim, K.-Y., Jung, W.-J., Avice, J.-C., Ourry, A., Kim, T.-H. (2007). Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany*, 58(6), 1271-1279. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl280>
- Li, Y. (2008). Kinetics of the antioxidant response to salinity in the halophyte *Limonium bicolor*. *Plant, Soil and Environment*, 54(11), 493-497. <https://doi.org/10.17221/434-PSE>

- Park, H., Kim, T., Bhoo, S., Lee, T., Lee, S.-W., Cho, M.-H. (2018). Biochemical Characterization of the Rice Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Gene Family. *Molecules*, 23(10), 2659. <https://doi.org/10.3390/molecules23102659>
- Paul, B., Gowda, L. R. (2000). Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seeds of Field Bean (*Dolichos lablab*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3839-3846. <https://doi.org/10.1021/jf000296s>
- Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E. (2004). Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy*, 98, 174-179. http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf (15.3.2022)
- Pietrowska-Borek, M., Wojdyła-Mamoń, A., Dobrogojski, J., Młynarska-Cieślak, A., Baranowski, M., Dąbrowski, J., Kowalska, J., Jemielity, J., Borek, S., Pedreño, M. A., Guranowski, A. (2020). Purine and pyrimidine dinucleoside polyphosphates differentially affect the phenylpropanoid pathway in *Vitis vinifera* L. cv. Monastrell suspension cultured cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 147, 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.12.015>
- Piwowarczyk, B., Tokarz, K., Kamińska, I. (2016). Responses of grass pea seedlings to salinity stress in *in vitro* culture conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(2), 227-240. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0887-z>
- Rejeb, I. B., Pastor, V., Mauch-Mani, B. (2014). Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants*, 3(4), 458-475. <https://doi.org/10.3390/plants3040458>
- Shahid, M. A., Balal, R. M., Pervez, M. A., Abbas, T., Ashfaq, M., Ghazanfar, U., Afzal, M., Rashid, A., Garcia-Sanchez, F., Mattson, N. S. (2012). Differential response of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes to salt stress in relation to the growth, physiological attributes antioxidant activity and organic solutes. *Australian Journal of Crop Science*, 6(5), 828-838. https://www.researchgate.net/publication/236960517_Differential_response_of_pea_Pisum_sativum_L_genotypes_to_salt_stress_in_relation_to_the_growth_physiological_attributes_antioxidant_activity_and_organic_solutes (3.5.2022)
- Shahid, M. A., Pervez, M. A., Balal, R. M., Abbas, T., Ayyub, C. M., Mattson, N. S., Riaz, A., Iqbal, Z. (2012). Screening of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes for salt tolerance based on early growth stage attributes and leaf inorganic osmolytes. *Australian Journal of Crop Science*, 6(9), 1324-1331. https://www.researchgate.net/publication/287594540_Screening_of_pea_Pisum_sativum_L_Genotypes_for_salt_tolerance_based_on_early_growth_stage_attributes_and_leaf_inorganic_osmolytes (13.12.2021)
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B. (2019). Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*, 24(13):2452. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Song, P., Yu, X., Yang, W., Wang, Q. (2021). Natural phytoalexin stilbene compound resveratrol and its derivatives as anti-tobacco mosaic virus and anti-phytopathogenic fungus agents. *Scientific Reports*, 11(1):16509. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96069-1>
- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., Salopek-Sondi, B. (2021). The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants*, 10(1):118. <https://doi.org/10.3390/plants10010118>
- Tenhaken, R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 5:771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00771>

- Tokarz, B., Wójtowicz, T., Makowski, W., Jędrzejczyk, R. J., Tokarz, K. M. (2020). What is the Difference between the Response of Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.) to Salinity and Drought Stress?—A Physiological Study. *Agronomy*, 10(6), 833. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060833>
- Tsaniklidis, G., Chatzistathis, T., Fanourakis, D., Nikoloudakis, N., Kotsiras, A., Delis, C., Tzortzakakis, E. A. (2021). Leaf antioxidant machinery stimulation by *Meloidogyne javanica* infestation: A case study on *Cucumis melo* seedlings. *Plant Stress*, 1:100002. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100002>
- Ullah, C., Unsicker, S. B., Fellenberg, C., Constabel, C. P., Schmidt, A., Gershenzon, J., Hammerbacher, A. (2017). Flavan-3-ols Are an Effective Chemical Defense against Rust Infection. *Plant Physiology*, 175(4), 1560-1578. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00842>
- Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Niazi, A., Moghadam, A. (2015): Phenylalanine ammonia lyase isolation and functional analysis of phenylpropanoid pathway under salinity stress in *Salvia* species. *Australian Journal of Crop Science*, 9(7), 656–665. https://www.researchgate.net/publication/280600519_Phenylalanine_ammonia_lyase_isolation_and_functional_analysis_of_phenylpropanoid_pathway_under_salinity_stress_in_Salvia_species/link/55bd1feb08aed621de108952/download (13.12.2021)
- Waters, S., Gilliam, M., Hrmova, M. (2013). Plant High-Affinity Potassium (HKT) Transporters Involved in Salinity Tolerance: Structural Insights to Probe Differences in Ion Selectivity. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7660-7680. <https://doi.org/10.3390/ijms14047660>
- Yildiztugay, E., Ozfidan-Konakci, C., Kucukoduk, M., Turkan, I. (2020). Flavonoid Naringenin Alleviates Short-Term Osmotic and Salinity Stresses Through Regulating Photosynthetic Machinery and Chloroplastic Antioxidant Metabolism in *Phaseolus vulgaris*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 682. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00682>
- Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croes, R. A., Fader, G. M., McGonigle, B., Odell, J. (2000). Production of the Isoflavones Genistein and Daidzein in Non-Legume Dicot and Monocot Tissues. *Plant Physiology*, 124(2), 781-794. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.781>
- Zeeshan, M., Lu, M., Naz, S., Sehar, S., Cao, F., Wu, F. (2020). Resemblance and Difference of Seedling Metabolic and Transporter Gene Expression in High Tolerance Wheat and Barley Cultivars in Response to Salinity Stress. *Plants*, 9(4), 519. <https://doi.org/10.3390/plants9040519>
- Zhang, X., Shao, X. (2016). Characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase and the role in browning of loquat fruit. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(2), 109-117. <https://doi.org/10.17221/384/2014-CJFS>
- Zhou, Y., Tang, N., Huang, L., Zhao, Y., Tang, X., Wang, K. (2018). Effects of Salt Stress on Plant Growth, Antioxidant Capacity, Glandular Trichome Density, and Volatile Exudates of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 252. <https://doi.org/10.3390/ijms19010252>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

4CL	4-kumarát-CoA ligasa
ABA	kyselina abscisová
ABTS	2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoliin-6-sulfonová kyselina
APS	persíran amonný
C4H	cinamát-4-hydroxylasa
CAD	cinnamylalkoholdehydrogenasa
CoA	koenzym A
FW	čerstvá hmotnost
GA ₃	kyselina gibberelová
CHS	chalkonsynthasa
LAC	lakasa
Nar	naringenin
PAL	fenylalaninamoniaklyasa
POX	peroxidasa
PPO	polyfenoloxidasa
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
ROS	reaktivní formy kyslíku
STS	stilbensynthasa
TAC	celková antioxidační kapacita
TPC	obsah fenolických látek