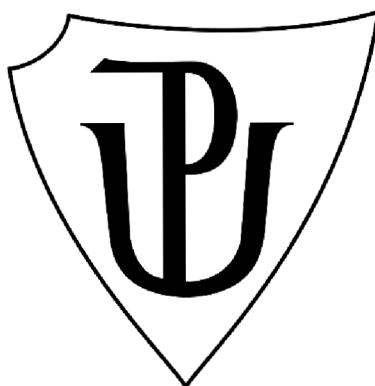


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Stanovení peroxidasy a polyfenoloxidasy v osemení
luštěnin**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autorka:	Veronika Černochová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Rok:	2024

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

.....

Podpis studentky

Poděkování

Za odborné vedení mé bakalářské práce, velkou míru trpělivosti a ochoty, lidský přístup a také za cenné a podnětné rady při zpracovávání bych ráda poděkovala své vedoucí Mgr. Janě Sekaninové, PhD. Děkuji také Mgr. Janě Balarynové, PhD. za příjemnou spolupráci, konzultaci výsledků a poskytnutí materiálů k tématu se vztahujících.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autorky	Veronika Černochová
Název práce	Stanovení peroxidasy a polyfenoloxidasy v osemení luštěnin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Luštěniny jsou pro lidstvo významným zdrojem potřebných živin, což z nich činí zajímavý podnět pro vědecké zkoumání. Studium aktivit peroxidasy a polyfenoloxidasy – enzymů hrajících klíčovou roli v oxidačních procesech semen rostlin – poskytuje cenné informace o jejich nutriční hodnotě a odolnosti vůči stresovým podmínkám a může tak objasnit jejich další fyziologické funkce. Tato bakalářská práce je zaměřena na stanovení aktivity peroxidasy a polyfenoloxidasy, dále pak na analýzu obsahu proteinů, koncentraci fenolických a flavonoidních substrátů a srovnává hodnoty stanovené v osemení vybraných genotypů cizrny, bobu, hrachu a čočky.

Klíčová slova	Peroxidasa, polyfenoloxidasa, enzymová aktivita, osemení, fenoly, flavonoidy, proteiny, hrách, bob, cizrna, čočka, luštěniny
Počet stran	55
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Veronika Černochová
Title	Determination of peroxidase and polyphenol oxidase activity in legume seed coat
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

Legumes represent a significant source of essential nutrients for humanity, making them an intriguing subject for scientific inquiry. Investigating the activities of peroxidase and polyphenoloxidase enzymes, which play a crucial role in the oxidative processes of plant seeds, provides valuable insights into their nutritional value and resilience to stressful conditions, thus elucidating further physiological functions. This bachelor thesis aims to determine the activity of peroxidase and polyphenoloxidase, as well as analyze protein content, concentration of phenolic and flavonoid substrates, and compare values determined in the seeds of selected genotypes of chickpea, faba bean, pea, and lentil.

Keywords	Peroxidase, polyphenol oxidase, enzyme activity, seed coat, phenols, flavonoids, proteins, pea, faba bean, chickpea, lentil, legume
Number of pages	55
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Luštěniny	2
2.1.1	Hrách.....	2
2.1.2	Cizrna.....	4
2.1.3	Čočka	5
2.1.4	Bob.....	6
2.2	Struktura semen.....	7
2.2.1	Struktura a vývoj semene.....	7
2.2.2	Embryo.....	8
2.2.3	Endosperm, perisperm	8
2.2.4	Osemení	8
2.3	Dozrívání semen	10
2.4	Tvorba pigmentu v osemení	11
2.5	Dormance semen	14
2.5.1	Dormance fyziologická.....	15
2.5.2	Dormance morfologická	15
2.5.3	Dormance morfo-fyziologická.....	15
2.5.4	Dormance fyzikální	16
2.5.5	Dormance kombinovaná.....	16
2.6	Enzymová aktivita v suchých semenech	16
2.7	Peroxidasy.....	17
2.8	Polyfenoloxidasa	19
2.9	Fenolické látky	20

3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Chemikálie	21
3.2	Přístroje a experimentální vybavení	22
3.3	Rostlinný materiál	23
3.4	Metodika	25
3.4.1	Extrakce rostlinného materiálu.....	25
3.4.2	Stanovení obsahu flavonoidů	26
3.4.3	Stanovení obsahu fenolů.....	27
3.4.4	Stanovení celkového obsahu proteinů pomocí Bradfordovy metody.....	28
3.4.5	Stanovení celkového obsahu proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové .	29
3.4.6	Stanovení aktivity peroxidasy	29
3.4.7	Stanovení aktivity polyfenoloxidasy	30
3.4.8	Separace proteinů nativní elektroforézou	30
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	33
4.1	Obsah fenolů	33
4.2	Obsah flavonoidů	35
4.3	Stanovení koncentrace proteinů.....	37
4.4	Aktivita peroxidasy	38
4.5	Aktivita polyfenoloxidasy	39
4.6	Detekce enzymů s peroxidasovou a polyfenoloxidasovou aktivitou	40
5	ZÁVĚR.....	42
6	LITERATURA	44
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	55

CÍLE PRÁCE

Teoretická část – literární rešerže na téma:

- Luštění se zaměřením na čočku, hrách, cizrnu a bob
- Struktura semen
- Dozrávání semen
- Tvorba pigmentů v osemení
- Dormance semen
- Enzymová aktivita v suchých semenech
- Peroxidasy (POX)
- Polyfenoloxidas (PPO)

Experimentální část:

- Zpracování rostlinného materiálu – homogenizace a extrakce suchých osemení planého a kulturního genotypu čočky, hrachu, cizrny a bobu
- Stanovení aktivity peroxidasy a polyfenoloxidas
- Stanovení koncentrace fenolických a flavonoidních látek
- Nativní elektroforéza, barvení enzymů

1 ÚVOD

Luštěniny (*Fabaceae*) jsou nejen hodnotným zdrojem živin pro člověka, ale také objekt studia obranných mechanismů a v oblasti rostlinné biochemie. S ohledem na jejich obrovský ekonomický význam přispělo mnoho studií k odhalení mechanismů, které ovlivňují růst, vývoj a výnosnost luštěnin.

Vývoj, dormance a klíčení semen jsou spojeny se změnami hladin metabolitů a regulační systém těchto jevů je velmi složitý. Rostliny jakožto přisedle žijící organismy si během vývoje osvojily několik mechanismů, které jim pomáhají reagovat na působící stresové faktory různého původu. Tyto faktory v rostlinách vyvolávají stresovou reakci, která je spojena se zvýšenou nebo sníženou produkcí různých metabolitů nebo se syntézou či de/aktivací enzymových nebo neenzymových antioxidantů.

Odpovědí na stresové podněty mohou být zvýšené nebo snížené aktivity enzymů peroxidasy a polyfenoloxidas. Peroxidas je v semenech rostlin zodpovědná za detoxikaci škodlivých reaktivních forem kyslíku, zatímco polyfenoloxidas, mimo podobné antioxidační funkce, svou činností zpevňuje vrstvy semene, čímž posiluje jeho integritu a chrání jej tak před škůdci nebo ostatními vnějšími vlivy.

Tyto enzymy spolu s dalšími faktory přispívají k efektivní obraně a správnému vývoji semen luštěnin.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

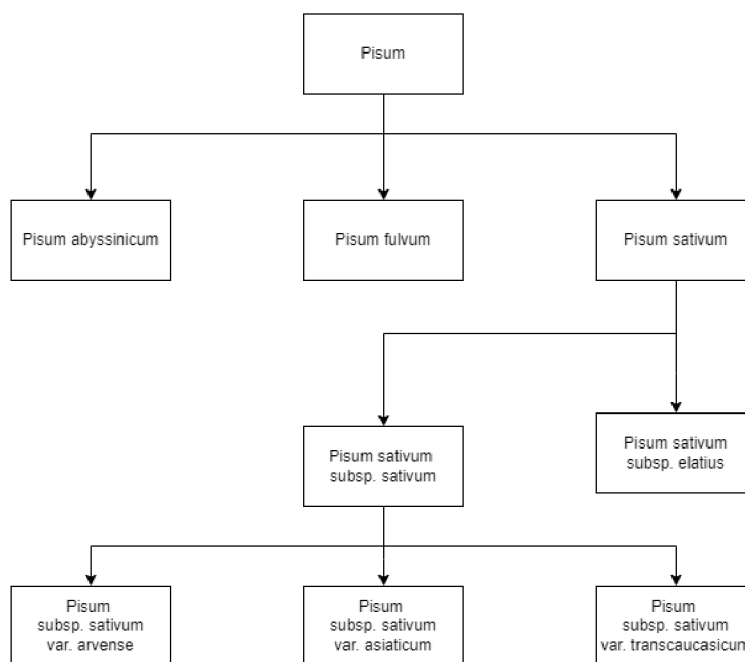
2.1 Luštěniny

Čeď bobovitých (*Fabaceae*) patří mezi základní složku výživy člověka jak z důvodu nutriční všestrannosti, tak kvůli snadné a udržitelné zemědělské produkci (Gonçalves et al., 2024). Luštěniny jsou vyhledávány pro své výjimečné nutriční složení, vyznačující se vysokým obsahem bílkovin, vlákniny, vitaminů, minerálů a esenciálních aminokyselin (Foyer et al., 2016).

Mimo jiné jsou luskoviny díky symbiotickému vztahu s nitrifikačními bakteriemi schopny fixovat atmosférický dusík, čímž dochází ke zvýšení úrodnosti půdy. Pěstování těchto plodin je tedy nedílnou součástí udržitelné zemědělské produkce (Adams et al., 2018).

2.1.1 Hrách

Hrách setý je typickým představitelem čeledi bobovitých. Je to samosprašná, krytosubná rostlina. Mezi významné druhy hrachu patří: *Pisum abyssinicum*, *Pisum fulvum* a *Pisum sativum*. Mezi poddruhy *Pisum sativum* se řadí *Pisum sativum subsp. sativum* a *Pisum sativum subsp. elatius*. Tři významné variety *Pisum sativum subsp. sativum* jsou: *Pisum subsp. sativum var. arvense*, *Pisum subsp. sativum var. asiaticum* a *Pisum subsp. sativum var. transcausicum* (Obr. 1) (Trněný et al., 2018).



Rostlina je členěna uzlinami. První vzniklé uzliny plní vegetativní funkci, zatímco později vzniklé uzliny mají funkci reprodukční. Jinými slovy se pomocí prvních vzniklých uzlin rostlina větví a z později vzniklých uzlin vyrůstají květy. Hrách setý má pětičetný květ, jehož okvěti se skládá z pavézy, dvou křídel a dvou srostlých okvětních lístků tvořící člunek. Plodem hrachu je lusk (Obr. 2). Počet semen v lusu se může lišit v závislosti na odrůdě a okolních podmínkách rostliny (Cousin, 1997).



Obrázek 2: Hrách setý, převzato z <https://www.thoughtco.com/domestication-history-of-peas-169376> (30.4.2024)

2.1.2 Cizrna

Cizrna je považována za jednu z prvních domestikovaných luštěnin, přičemž jedna z prvních oblastí, kde byla cizrna domestikována, je Turecko. Byla domestikována již okolo roku 5450 př. n. l. Cizrna se pěstuje v semiaridních oblastech tropického, subtropického a mírného pásu. Rozlišují se dva základní typy cizrny (Obr. 3). Variace s většími světlými semeny se nazývá kabuli, zatímco typ s menšími hranatými tmavými semeny se nazývá desi (Hannan et al., 2001). Obě variance pochází z druhu *Cicer reticulatum*, který je původní v oblasti jihovýchodního Turecka a severní Sýrie (Smýkal et al., 2015).

Listy jsou cizrny lichozpeřené a květy jsou, podobně jako u čočky, seskupeny v hroznovitém květenství. Všechny nadzemní části rostliny kromě okvěetí jsou pokryty žlaznatými trichomy. V lusku cizrny se nachází pouze jedno semeno. Výnosnost jedné rostliny nejvíce závisí na počasí a odrůdě, přičemž počasí ovlivňuje jak velikost semen, tak počet vyprodukovaných lusků (Singh, 1997).



Obrázek 3: Semena cizrny, vlevo typ desi, vpravo typ kabuli, převzato z: <https://pulses.org/pulse-hub/photo-gallery/3-chickpeas/detail/5-chickpeas?tmpl=component> (30.4.2024)

2.1.3 Čočka

Čočka (Obr. 4) byla poprvé domestikována někdy v 5. tisíciletí př. n. l. v oblastech blízkého východu a malé Asie a stala se významnou plodinou již v raném neolitu (Muehlbauer & McPhee, 2005). Rod *Lens* má 6 druhů, z čehož jen jediný je domestikovaný: *L. culinaris* Medikus (Sandhu & Singh, 2007).

Čočka je jednoletá keřovitá rostlina, jejíž povrch je pokryt jemnými trichomy. Má štíhlé stonky, které jsou na průřezu hranaté. Listy jsou sudozpeřené s úponkami na konci. 1-4 drobné květy jsou seskupeny v hroznovitém květenství. Lusky jsou ploché s 1-3 semeny uvnitř (Sandhu & Singh, 2007).



Obrázek 4: Čočka jedlá, převzato z: https://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/systematika/ucebni_text/system/krytosemenne/dvoud elozne/bobovite/Lens_culinaris.html (30.4.2024)

2.1.4 Bob

Bob zahradní (Obr. 5) je jedna z nejstarších zemědělských plodin na světě. Zároveň se jedná o třetí nejpěstovanější plodinu světa. Bob zahradní je považován za perspektivní plodinu kvůli jeho nízkým nárokům na klimatické podmínky a kvalitu půdy (Singh et al., 2013).

Jedná se o jednoletou rostlinu z čeledi bobovitých. Má hlavní bulvovitý kořen s postranními kořeny. Na stonku s listy se nachází hroznovité uskupení dvou až dvanácti bílých, hnědých nebo fialových květů. Z nich vyrůstají lusky. Počet a barva semen v lusku se odvíjí od odrůdy bobu (Duc, 1997).



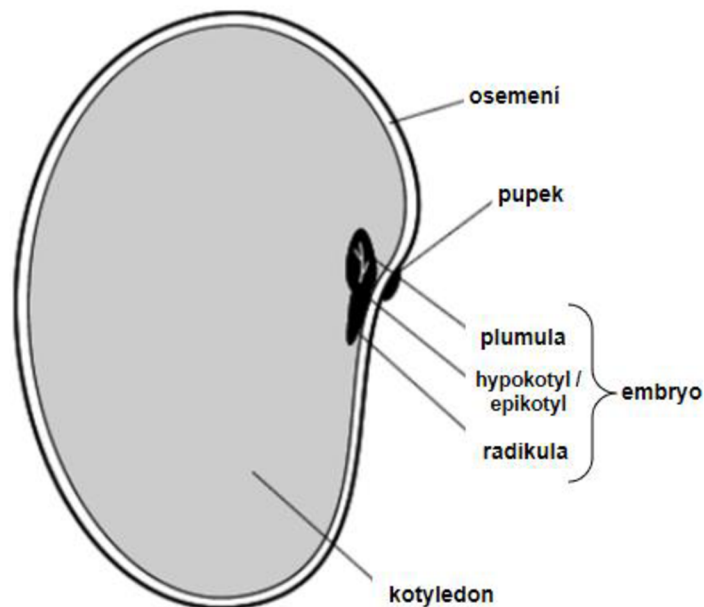
Obrázek 5: Bob zahradní, převzato z: <https://myplantin.com/plant/3312> (30.4.2024)

2.2 Struktura semen

2.2.1 Struktura a vývoj semene

Luštěniny patří mezi krytosemenné rostliny. Semeno (Obr. 6) je orgán diferencované struktury, který je nezbytný pro pohlavní rozmnožování rostlin. Tvoří jej embryo, endosperm – vnitřní živné pletivo; děložní listek a osemení. Endosperm a děložní listek jsou části obsahující vyživovací látky, které podporují růst a vývoj embrya. Embryo i zásobní segmenty jsou obaleny ochrannou vrstvou – osemením, které je čistě mateřského původu.

Růst a vývoj semene je komplexní a vysoce koordinovaný proces, pro který je potřeba sjednocení fyziologických, metabolických a signálních drah, které jsou ovlivňovány endogenními a enviromentálními signály a podněty. Vývoj semene je postupný, diskontinuální proces, během kterého nastupuje několik různých fází, které zajistí tvorbu funkčního reprodukčního orgánu. Proces vývoje krytosemenných rostlin začíná dvojitým oplodněním, při kterém jedno ze dvou haploidních pylových jader oplodní haploidní vajíčko, zatímco druhé haploidní pylové jádro oplodní centrální buňku uvnitř samičího gametofytu uvnitř vajíčka. Tímto procesem dochází k vytvoření diploidní zygoty a triploidního jádra endospermu. Tyto semenné orgány pak dále proliferují a tvoří většinu buněk tvořících embryo a endosperm v prostředí osemení mateřského původu (Sabelli, 2012, Vinter & Macháčková, 2013).



Obrázek 6: Struktura semene, převzato z <https://www.oakleafgardening.com/glossary-terms/structure-of-seeds/> (18.12.2023)

2.2.2 Embryo

Embryo se skládá z jedné nebo více děloh – kotyledonů a jedné embryonální osy. U dvouděložných rostlin jsou dobře rozlišitelné další části osy embrya: radikula – zárodek kořene; hypokotyl, na který doléhají dělohy; a vrchol – apex, na kterém je znatelný základ vrcholového pupenu – plumuly (Bewley et al., 2012).

Proces vývoje embrya začíná první mitózou zygoty. Během ní vznikají dvě asymetrické buňky – k mateřskému pletivu přichycená bazální buňka a od středu zárodečného vaku apikální buňka (Vinter, 2009). Z apikální buňky se pak dále vyvíjí embryo a bazální buňka dává vzniknout suspenzorovému systému a kořenové čepičce. Suspenzorový systém slouží převážně k transportu základních živin, růstových regulátorů a metabolitů z mateřského pletiva do vyvíjejícího se embrya (Romberger et al., 1993). Během jeho vývoje je embryo diferenciováno a polarizováno a směrem k suspenzoru se vyvíjí hypofýza – pól kořene; opačným směrem se vyvíjí epifýza – pól stonku.

V místě kolem epifýzy dochází k diferenciaci základů pro dělohy. Dále vzniká radikula, základ čepičky, plumula a hypokotyl. Z centrálního meristému vzniká prokambium – základ pro pletiva s vodivou funkcí a základní meristém, ze kterého se dále tvoří primární kůra. Finální fází vývoje embrya je pak postupné snižování obsahu vody, akumulace a uskladnění zásobních látek a útlum metabolické aktivity, čímž embryo dozrává (Vinter, 2009).

2.2.3 Endosperm, perisperm

Perisperm a endosperm v semeni zastupují zásobní pletiva. Perisperm vzniká z buněk vaječného pletiva a je diploidní. U většiny druhů rostlin krátce po oplození zaniká (Bewley et al., 2012).

Endosperm bývá ze začátku triploidní, v průběhu vývoje se skrz polyploidizačním procesům ploidie navyšuje. Vzhledem k tomu, že není přítomen v semenech všech druhů rostlin, jsou semena kategorizována podle jeho přítomnosti na endospermická a neendospermická. V některých případech bývají na konci vývoje endospermické buňky neživé, z vnitřní strany endospermu se ale zbývající živé buňky shromažďují a tvoří tak vrstvu produkující enzymy, které pak mobilizují zásobní látky (Bewley et al., 2012).

2.2.4 Osemení

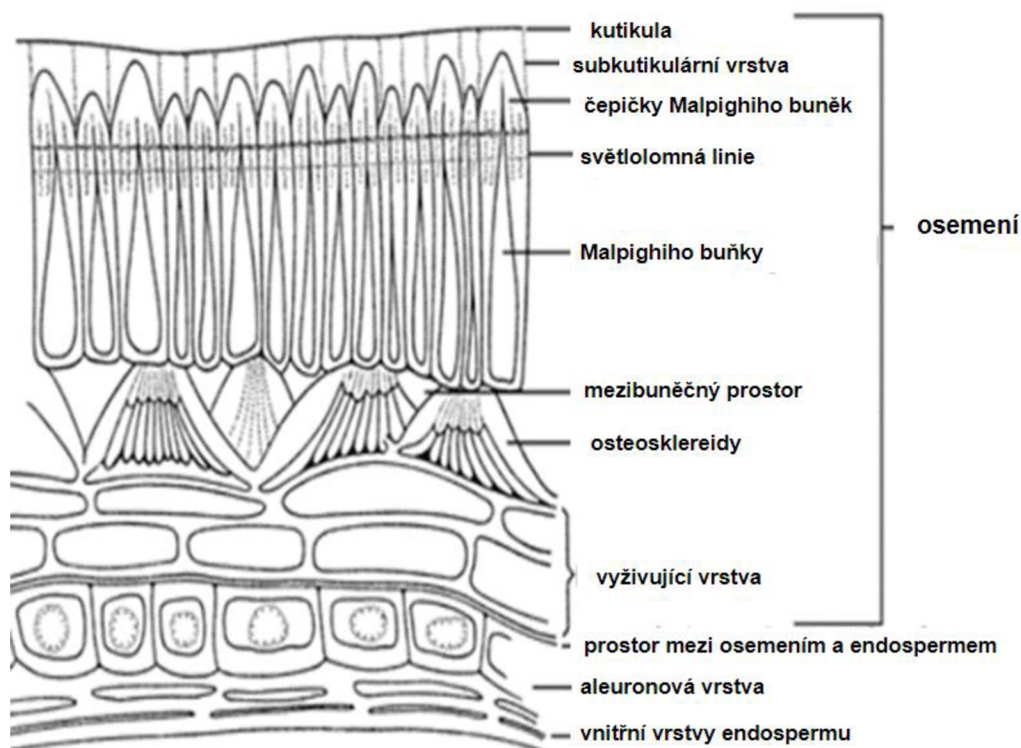
Osemení (Obr. 7) je hlavní ochranná bariéra na povrchu semene. V případě luštěnin se vyvíjí jako první a až když je obranná vrstva vyvinutá, dochází k vývoji embrya (Weber et al., 2005). Vnitřní vaječný obal během vývoje osemení zaniká a buňky vnějšího jsou

následně diferenciovány do několika vrstev a tvoří tak charakteristickou strukturu osemení.

Z vnější strany je jedna vrstva buněk – Malpighiho buňky – palisádově uspořádaná. Tyto buňky mají buněčnou stěnu různě zesílenou a na povrchu jsou kryty kutikulou, což tvoří typickou strukturu osemení. Přechod mezi terminální čepičkou – buněčnými stěnami specifického tvaru na vnější straně buněk epidermis – disponuje schopností stáčet světlo a nazývá se linea lucida neboli světlolomná linie. Tato linie je nepropustnou bariérou pro vodu a brání tak jejímu vstupu do osemení.

Pod epidermis jsou lokalizovány buňky tvaru kostí – osteosklereidy. Ty disponují poměrně tlustou buněčnou stěnou, velkou centrální vakuolou a velkými intercelulárními prostory. Tyto prostory pravděpodobně plní vysoušecí funkci v době vysychání semene, protože v nich dochází k výměně dýchacích plynů (Smýkal et al., 2014).

Na osemení luštěnin je diferenciováno několik typických struktur: pupek – hilum, otvor klový a semenný šev. Nediferenciovaná část je označována za extrahilární prostor. Pupek je jizva, která vznikla oddělením semene od poutka ve fázi zralosti. Otvor klový je prostor, ze kterého ve fázi klíčení prorůstá kořen. Semenný šev je struktura naproti pupku (Ma et al., 2004, Smýkal et al., 2014).



Obrázek 7: Struktura osemení, převzato z <https://biotecharticles.com/Agriculture-Article/The-Role-of-Seed-Coat-in-Seed-Longevity-and-Viability-3579.html> (18.12.2023)

2.3 Dozrávání semen

Dozrávání semen luštěnin je komplexní biochemická součást životního cyklu rostlin, která hraje klíčovou roli v zachování genetického materiálu. Po vyvrcholení této vývojové fáze je semeno připraveno ke klíčení a následnému růstu nové rostliny. Proces zrání semene zahrnuje mnoho biochemických a fyziologických kroků od opylení po dosažení zralosti.

Celý vývoj semene začíná fází embryogeneze, kdy se zralé embryo vyvine z jedné oplozené buňky kaskádou procesů souhrnně zvanou morfogeneze. Po ní se vyvíjející se semena dostávají do fáze zrání, která může být popsána jako období akumulace živných rezerv zahrnující reorganizaci metabolických drah. Dochází k syntéze zásobních látek – škrobu, zásobních proteinů a tuků.

Když je fáze akumulace dokončena, nastupuje poslední období zrání, a to fáze vysychání. Toto období je spojeno s velkou ztrátou vody, díky které je semeno připraveno pro setrvání v klidové fázi a pro následné klíčení v novou rostlinu. Mimo vysychání semen dochází také k aktivní genové expresi a metabolismu, v důsledku čehož semeno může a nemusí nabýt dormance, dozraje a následně může vyklíčit (Kermode et al., 1985; Angelovici et al., 2010).

Semena, která řádně vyschnou a jsou skladovatelná v suchu po dostatečně dlouhou dobu po období dozrání jsou schopny udržet si v klidovém stádiu životaschopnost a klíčivost, přejít po endogenní nebo exogenní iniciaci z dormantního do nedormantního stavu umožňujícího za příznivých podmínek klíčit (Roberts, 1973; Angelovici et al., 2010).

Během fáze dozrávání si semeno zachovává jen nízkou úroveň metabolické aktivity, která je ale i přes to schopná zachovat životaschopnost semen. Zároveň klesá obsah inhibitorů klíčení, dochází k alteraci některých membrán a degradaci proteinů, což vede ke zvýšení pravděpodobnosti vyklíčení (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Evolučně se semena vysycháním přizpůsobila životu v suchých oblastech, zatímco ta na obsah vody citlivější pochází spíše z lokalit bohatých na vodu. Pravděpodobně si rostliny vyskytující se na suchých stanovištích vyvinuly mechanismus pro oddálení klíčení semen do doby, než nastane chladnější vlhké období, které zvyšuje pravděpodobnost úspěšného vyklíčení (Leprince et al., 1993; Angelovici et al., 2010).

Procesy, kterými semeno během maturační fáze prochází, zahrnují akumulaci disacharidů a oligosacharidů, syntézu zásobních proteinů, heat shock proteinů, aktivaci antioxidantů

nebo změny struktury buněk (Leprince et al., 1993; Wehmeyer et al., 1996; Wolkers et al., 1999; Bailly et al., 2001; Bailly et al., 2004; Verdier & Thompson, 2008).

Od počátku akumulární fáze do fáze ztráty vody se semeno potýká s nedostatkem energie a kyslíku. Vzhledem k velmi silnému osemení a nepřítomnosti průduchů – faktorům, které příjem kyslíku razantně omezují, není kyslík k dispozici pro tvorbu energie v mitochondriích. Tyto nedostatky se projevují zejména v akumulární fázi, protože tvorba zásob je energeticky velmi náročná – kyslík a energie tedy chybí. Zároveň pronikání kyslíku brání také anatomické změny v buňkách v důsledku akumulace proteinových a olejových částic (Gibon et al., 2002; Goffman et al., 2005; Rolletschek et al., 2005; Schwender et al. 2006; Borisjuk & Rolletschek, 2009).

Přechod z akumulární fáze do fáze vysychání je mimo proces ztráty vody spojen také s významnými změnami genové exprese, což poukazuje na fakt, že i vysychání je velmi aktivním stádiem. Výzkum semen *Arabidopsis* ve fázi vysychání dokázal, že exprese 6963 genů, tedy 30 % celkového genomu *Arabidopsis*, je v tomto období významně pozměněna, z čehož 21 % těchto genů je pozměněno už v akumulární fázi. 43 % zmíněných genů zahrnuje geny pro heat shock proteiny a geny spojené s pozdní embryogenezí. Ty souvisí s klidovým obdobím, vysycháním a maturací (Guerriero et al., 2009; Angelovici et al., 2010).

2.4 Tvorba pigmentu v osemení

V osemení luštěnin může být obsažen tmavý pigment melanin. Jde o produkt oxidace a polymerace fenolických látek, který plní v rostlinách nejrůznější funkce. Proces tvorby rostlinného melaninu je spojen s enzymovým hnědnutím, ke kterému dochází v poškozených rostlinných pletivech, tedy v případě, kdy se v důsledku narušení buněčné celistvosti uvolní z chloroplastů enzymy polyfenoloxidas a interagují se svými substráty nacházejícími se ve vakuolách. Z těchto substrátů vznikají *o*-chinony, které následně polymerují na melanin. I přes to, že jde o poměrně zkoumanou oblast, ví se o procesu tvorby melaninu v semenech velmi málo (Glagoleva et al., 2020).

Téměř všechna semena planých rostlin jsou skvrnitá nebo tmavšího odstínu, což může sloužit například účinné kamufláži semen na povrchu půdy. Oproti těmto rostlinám slouží kulturní genotypy rostlin jak kulturním, tak kulinařským požadavkům a potřebám, což vede k odlišným nárokům při jejich výběru. Na příkladu sóji mají její plané formy semena tmavá, zatímco semena moderní kultivované sóji mívají převážně světlou barvu

(Jeong et al., 2019). Tento jev se vyskytuje u většiny luštěnin, včetně hrachu, cizrny nebo fazolí (Smýkal et al., 2015; Smýkal & Parker, 2023).

Jev pigmentace semen pravděpodobně souvisí také s ochranou proti patogenům a koncentrací fenolických látek v osemeni. Selektce barvy semen může mít souvislost také s vývojem chuti (Smýkal et al., 2018). Předpokládá se, že pigmentace je vlastnost získaná za nepříznivých podmínek, jakými jsou zima, sucho nebo vysoká nadmořská výška. Ovlivňuje teplotu pletiv, což souvisí s adaptací na pobyt v různých přírodních podmínkách. U kvetoucích rostlin vede velké množství dopadajícího UV záření k selekci takové pigmentace, která UV záření absorbuje například v okvětních lístcích chránících pyl a ovlivňuje tak termoregulaci květů. Mezi fenolické látky patří flavonoidy. Flavonoidy, zejména pak antokyany a proantokyanidiny, poskytují ochranu před nadměrným osvětlením a škodlivým UV zářením (Smýkal & Parker, 2023).

Některé fenolické látky mají podobné vlastnosti po vystavení oxidaci a polymeraci polyfenoloxidasami. Jde o vysoce fylogeneticky konzervovaný proces. V souvislosti s tmavším zabarvením lusků genotypů sóji byl pozorován fototermický efekt, při kterém dochází ke zvýšení teploty uvnitř lusku v důsledku vyšší absorpce světelného záření, což vede ke zvýšeným teplotám, zvýšenému vysychání a praskání lusků u genotypů s tmavými lusky (Balarynová et al., 2022; Lyu et al., 2023).

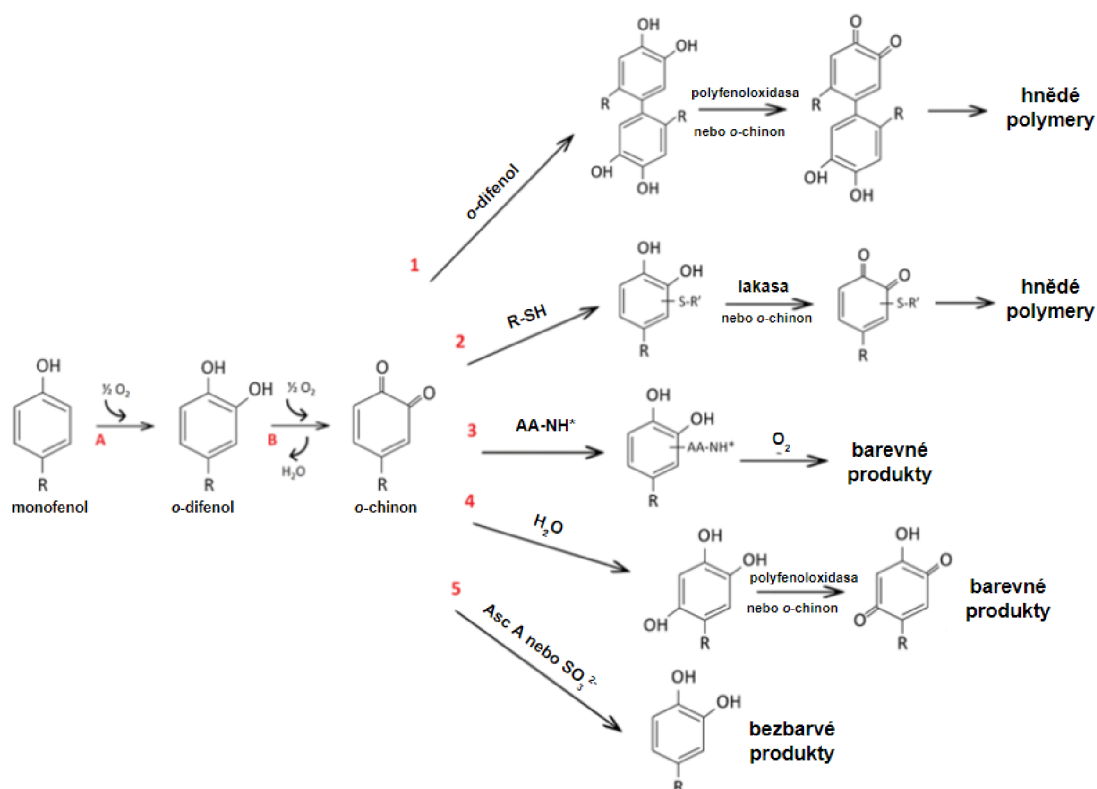
K tvorbě melaninu dochází intracelulárně – v plastidech a extracelulárně – v podobě fyto melaninové vrstvy. Ta je výsledkem katabolismu hypodermálních buněk a předpokládá se, že syntéza melaninu a tvorba fyto melaninové vrstvy jsou procesy různé a různě lokalizované a měly by být rozlišovány. Fyto melaninová vrstva byla popsána jako černý, tvrdý, odolný materiál vyplňující mezibuněčný prostor mezi hypodermis a sklerenchymem (Pandey & Dhakal, 2001; Shoeva et al., 2020).

Mimo pigmentové produkty, které vznikají při kontaktu polyfenoloxidas se substrátem (Obr. 8), tedy při poškození celistvosti buněk, se předpokládá, že polyfenoloxidas jsou hlavními enzymy podílejícími se na melanogenezi rostlin také v neporušených pletivech semen, což vyplývá z dat molekulární genetiky a z asociace tmavého zabarvení s geny kódujícími polyfenoloxidas (Fukuda et al., 2015).

Dále bylo na semenech ječmene prokázáno, že tmavě zabarvená semena disponují větším obsahem fenolických sloučenin a ligninu než ta bez zabarvení. Proto se předpokládá, že geny pro biosyntézu melaninu mohou být spjaty s metabolickými fenyylpropanoidními

drahami, mezi které patří například dráha pro flavonoidy nebo ligniny (Choo et al., 2005, Shoeva et al., 2016).

Ztráta integrity buněčných složek, která může být zapříčiněná poraněním, stárnutím, interakcí se škůdci a patogeny nebo manipulací během posklizňového zpracování a skladování, vede k uvolnění polyfenoloxidas z plastidů do cytoplasmy. Tyto enzymy tak přicházejí do kontaktu s vakuolárními fenolickými substráty a tvoří vysoce reaktivní *o*-chinony. Ty mohou reagovat dvojím způsobem – buď podléhají neenzymové polymeraci nebo interagují s jinými přítomnými sloučeninami, například thioley, aminokyselinami nebo peptidy a tvoří barevné produkty. Mohou také pomalu interagovat s vodou a tvořit tak trifenyly nebo podléhají redukcí a dochází k tvorbě původních fenolů (Taranto et al., 2017).



Obrázek 8: Reakce katalyzované polyfenoloxidasou (A, B) a reakce *o*-chinonu (1-5), převzato z Glagoleva et al., 2020

2.5 Dormance semen

Pojem dormance označuje období, ve kterém jsou v semeni zastaveny nebo omezeny fyziologické procesy i za stavu jinak pro klíčení vhodných podmínek, jakými mohou být například vlhkost, teplota nebo světelné podmínky. U semen to znamená, že je po přechodnou dobu inhibována jejich schopnost klíčit. Dormance vznikla jako evoluční ochranná reakce na častý výskyt semen v podmínkách omezujících jejich vyklíčení. Fáze klíčení je jednou z nejzranitelnějších v rámci života rostlinného organismu, proto je její správné načasování velmi důležité a rozhoduje o přežití rostliny (Baskin & Baskin, 1998; Smýkal, 2019).

Na počátku klíčení se z embrya začíná formovat kořen a prorůstá přes osemení. Pro tento úkon je potřeba, aby embryo překlenulo klidový stav, došlo k mobilizaci uložených zásobních látek, překonání bariéry pletiv nebo struktur osemení a obnovilo buněčné dělení a prodlužování buněk. Dormance se může projevit blokací kteréhokoliv z popsaných procesů. Uvolňování dormance je regulováno kombinací vlivu okolních podmínek s endogenními signály, které mají jak synergické, tak antagonistické účinky. Hlavními molekulami podílejícími se na udržování nebo uvolňování dormance jsou kyselina abscisová (ABA) a gibereliny (GA). Zatímco ABA navození a udržení dormantního stavu podporuje, GA iniciují vyklíčení. Signály z okolního prostředí regulují jejich rovnováhu tím, že modifikují expresi biosyntetických a katabolických enzymů. Výsledkem kombinace zmíněných vlivů je heterogenní odezva, která nabízí více časových možností, ve kterých mohou semena klíčit (Smýkal, 2019).

Dormantní semena typicky produkují plané rostliny, které tak mohou zvýšit pravděpodobnost přežití svého druhu v období přírodních katastrof, snížit konkurenci mezi jedinci stejného druhu nebo tak zamezí klíčení mimo vhodnou sezónu. Oproti tomu domestikované druhy rostlin byly v dlouhém časovém období selektovány pro své rychlé a jednotné klíčení následované rychlým založením semenáčků znamenající dobrý výnos (Finkelstein et al., 2008).

Za dobu výzkumu dormance bylo navrženo několik způsobů, jak ji členit. Většina využívaných klasifikací (Baskin & Baskin, 1998, 2014) byla odvozena od dělení zveřejněného v knize *The Physiology and biochemistry of seed dormancy and germination* (Nikolaeva, 1977), kde je uváděna v souvislostech s morfologií semen. Systém navržený Nikolaevou je dělen do pěti různých tříd – na dormanci morfológickou, fyziologickou, morfo-fyziologickou, fyzikální a kombinovanou (Baskin & Baskin 2004).

2.5.1 Dormance fyziologická

Nejrozšířenějším druhem je dormance fyziologická, která zahrnuje metabolismus kyseliny abscisové (ABA) a giberelinů (GA) – antagonisticky působících molekul. Předpokládá se, že ABA je zodpovědná za stav dormance, zatímco GA indukují počátek klíčení. Vzhledem k tomu, že jsou v semenech zastoupeny oba zmíněné regulátory, záleží na jejich vzájemném koncentračním poměru, který určí, jak dlouho semeno v dormantním stavu zůstane a kdy vyklíčí. Další významnou funkcí ABA je zamezení předčasnému klíčení, aby nenastalo ještě když je semeno součástí mateřské rostliny. I z toho důvodu jsou endogenní GA v embryu vyvíjejícího semene kumulovány ve vázané formě a uvolňují se teprve v přítomnosti vlhkosti, jak semeno bobtná. Hormonální regulaci ovlivňuje také ethylen, který ukončuje dormanci a stimuluje klíčení. Také interaguje s ABA a snižuje citlivost semene vůči ní (Finkelstein et al. 2008; Baskin & Baskin, 2004; Smýkal, 2019).

2.5.2 Dormance morfologická

Morfologická dormance se uplatňuje u semen s malým a nevyvinutým diferenciovaným embryem, kde lze rozlišit hypokotyl a děložní lístek. Taková semena vyžadují určitý čas pro růst a následné klíčení a není potřeba speciálního zásahu. Když panují příznivé podmínky, začnou se embrya v čerstvě zralých semenech v rozmezí několika dní až dvou týdnů prodlužovat a semena přibližně do měsíce vyklíčí (Baskin & Baskin, 1998, 2004; Smýkal, 2019).

2.5.3 Dormance morfo-fyziologická

Tento druh dormance předchozí dva druhy kombinuje. Semena mají málo vyvinutá embrya a zároveň jsou ovlivňovány fyziologickými podmínkami. Aby dormance pominula, vyžadují semena stratifikaci, tedy vystavení nejprve nízkým teplotám a následně vysokým nebo naopak. Při studené stratifikaci je odbourávána ABA a tím pak dojde ke zvýšení koncentrace GA. Jinak může být začátek klíčení iniciován aplikací giberelinů. U semen s touto formou dormance vývoj embrya nebo kořene vyžaduje delší dobu než např. semena s morfologickou dormancí (Baskin & Baskin, 1998, 2004; Smýkal, 2019).

2.5.4 Dormance fyzikální

Fyzikální dormance se projevuje tzv. tvrdosemenností – vývojem vrstev palisádových buněk osemení, které je tak nepropustné nejen pro vodu, ale i pro plyny. Tato nepropustnost je překonána narušením semenných obalů mechanickou nebo chemickou cestou (působením koncentrovaných kyselin dusičné nebo sírové). Přesný mechanismus v přírodě není znám, ale předpokládá se, že jde o změny teploty a vlhkosti, mechanické, ruční nebo půdní obrušování, působení mikroorganismů nebo např. průchod skrz zvířecí trávicí trakt. Tím dojde k vytvoření otvoru ve struktuře osemení, kterým voda přechází do embrya. Tento typ dormance je znám nejméně u sedmnácti rostlinných čeledí, mezi nimi i u bobovitých, nenachází se však i u nahosemenných rostlin. Podobně jako u jiných kulturních rostlin byla i u bobovitých tvrdosemennost odstraněna v procesu domestikace (Baskin et al., 2000; Smýkal, 2019).

2.5.5 Dormance kombinovaná

Semena vykazující kombinovanou dormanci mají osemení nepropustné pro vodu, a navíc je embryo fyziologicky dormantní. Ke klíčení dochází jen tehdy, pokud jsou překonány oba typy dormance. Semena rodu *Fabaceae* jsou více dormantní a vyžadují několik týdnů studené stratifikace poté, co fyzikální dormance pominula a semena jsou ještě před vyklíčením nasáklá vodou (Baskin & Baskin, 1998, 2004).

2.6 Enzymová aktivita v suchých semenech

Semena jsou po dozrání a oddělení se od mateřské rostliny extrémně vyschlá. Obsah vody se pohybuje jen mezi sedmi a deseti procenty. Takové množství je dostačující pro udržení buněk a funkčnosti membrán, metabolické procesy jsou ale úplně minimalizovány (Smýkal, 2019).

Tolerance takových podmínek pravděpodobně souvisí se změnami v rozpustných cukrech nebo s aktivitou hlavních antioxidačních enzymů, zejména superoxiddismutasy (superoxid:superoxid oxidoreduktasa, SOD, EC 1.15.1.1), katalasy (H₂O₂:H₂O₂ oxidoreduktasa, CAT, EC 1.11.1.6), askorbátperoxidasy (L-askorbát:H₂O₂ oxidoreduktasa, APX, EC 1.11.1.11) a glutathionreduktasy (glutathion:disulfid reduktasa, GR, EC 1.8.1.7). Nabytí tolerance k tak silnému vysychání také souvisí s akumulací sacharidů rafinosy, stachyosy a sacharosy – nejrozšířenějšího sacharidu, a naopak s poměrně nízkými koncentracemi monosacharidů.

Co se týká enzymů, suchá semena vykazovala vyšší aktivitu katalasy a glutathionreduktasy a sníženou aktivitu superoxiddismutasy a askorbátperoxidasy. Opačný jev byl pozorován v nevyzrálých semenech. Tyto výsledky naznačují, že metabolismus oligosacharidů a aktivita antioxidantních obranných enzymů se podílí na tolerování podmínek nedostatku vody během konečné fáze vývoje semen. Souvislost s celkovou vitalitou semen ale nebyla prokázána (Bailly et al., 2001).

Během dehydratace rostlinných tkání dochází k produkci reaktivních forem kyslíku – vysoce reaktivních molekul, které jsou schopny modifikovat a inaktivovat proteiny, lipidy, DNA a RNA a způsobují nejrůznější buněčné dysfunkce (Smirnov, 1993). Schopnost semen ztrátu vody zvládnout může souviset s jejich schopností reaktivní formy kyslíku vychytávat, čímž brání například nežádoucí peroxidaci lipidů (Hendry et al., 1992). Tyto obranné procesy zahrnují výše zmíněné enzymy a antioxidantní sloučeniny, jako redukovaný glutathion nebo askorbát (Bailly et al., 2000). I přes fakt, že jsou proteiny hlavními poškozovanými látkami v semenech v důsledku přítomnosti reaktivních forem kyslíku, nemusí být oxidační mechanismus nutně škodlivý – bývá totiž spojen s dokončováním procesu klíčení (Bailly et al., 2008; Rajjou & Debeaujon, 2008).

2.7 Peroxidas

Peroxidas (peroxid vodíku oxidoreduktasa, EC 1.11.1.7; POX) jsou klíčovou skupinou rostlinných enzymů, které katalyzují oxidaci elektron donorových substrátů za současného rozkladu toxického peroxidu vodíku, který se ve větší míře tvoří při reakci rostliny na působení stresových faktorů. Další možnou funkcí je katalýza polymerace monolignolů za tvorby ligninu. Jejich substrátem je nejčastěji p-kumarylalkohol, sinapylalkohol a koniferylalkohol, vykazují tedy poměrně širokou substrátovou specifitu (Tenhaken, 2015; Gundinger & Spadiut, 2017; Govender et al, 2017; Pandey et al., 2017). Ve většině zkoumaných rostlinných druhů se vyskytují specifické izoenzymy, které reagují na vnější faktory, jakými je poranění, stres nebo napadení patogeny (Veitch, 2004).

Peroxidas se v přírodě vyskytují v několika izoformách, které lze podle izoelektrického bodu dělit na kationtové a aniontové. Množství těchto izoenzymů je proměnlivé a závislé na aktuálních podmínkách prostředí. Transkripce peroxidas je v rostlinách rezistentních k suchu vyšší než v rostlinách, které na nedostatek vody citlivě reagují. Změna

koncentrace izoenzymů vede ke zvýšení množství ligninu v rostlinách (Lee et al, 2007; Tenhaken, 2015).

Jsou přítomny ve všech živých organismech – bakteriích, houbách, řasách, rostlinách i živočiších. Ke klíčovým funkcím rostlinné peroxidasy patří metabolismus buněčné stěny, růst a zrání plodů, lignifikace, metabolismus reaktivních forem kyslíku a dusíku a metabolismus auxinu. Proces lignifikace nastává u rostlin jak během běžného růstu, tak během ochranných reakcí. Lignin, který se tvoří v buněčné stěně, zabezpečuje pevnost, odolnost a tuhost vůči jak chemickým, tak fyzikálním nebo biologickým nepříznivým faktorům. V rostlinných buňkách je hladina peroxidu vodíku – jedné z reaktivních forem kyslíku – regulována enzymovou činností peroxidasy a katalasy. Tím je kontrolováno možné poškození buněk způsobené oxidací proteinů, peroxidací membránových lipidů, inhibice činnosti enzymů nebo poškození DNA. V době klíčení semen je peroxidasa aktivnější, protože se podílí na eliminaci toxických metabolitů. Dále se podílí na syntéze ethylenu – rostlinného hormonu podílejícím se na dozrávání plodů (Pandey et al., 2017).

Peroxidasy jsou podle aminokyselinových sekvencí rozdělovány do tří tříd – na glutathionperoxidasy, askorbátperoxidasy a peroxidasy III. třídy. Glutathionperoxidasy jsou skupina enzymů, která jako redukující substrát využívá glutathion a thioredoxin a je afinitní k peroxidu vodíku. Zároveň jsou schopny mimo peroxid vodíku eliminovat také lipidové peroxidy (Herbette et al., 2002).

Peroxidasy III. třídy jsou činné dvěma možnými reakčními mechanismy – peroxidačním a hydroxylovým cyklem. Peroxidační cyklus využívá peroxid vodíku nebo jiné peroxidy k oxidaci jejich substrátu a hydroxylový cyklus přeměňuje peroxid vodíku na jiné typy reaktivních forem kyslíku. Hem obsahující rostlinné peroxidasy zahrnují klasické nebo sekreční rostlinné peroxidasy a askorbátperoxidasy (L-askorbát:H₂O₂ oxidoreduktasa, APX, EC 1.11.1.11). Tyto dvě rozličné skupiny enzymů jsou klasifikačně rozdělené v množině rostlinných peroxidas. Askorbátperoxidasy, které se nacházejí hlavně v chloroplastech a cytosolu, se uplatňují především při zachytávání a detoxikaci peroxidu vodíku (Veitch, 2004).

Askorbátperoxidasy mají 5 izoform, které se vyskytují v cytosolu, mitochondriích, ve stromatech a thylakoidech chloroplastů, peroxisomech nebo navázané na buněčných membránách. Tyto izoenzymy nejsou zvláště efektivní v odstraňování lipidových hydroxyperoxidů a zvláště izoforma vyskytující se v chloroplastech je náchylná

k inaktivaci oxidací, když dojde ke snížení koncentrace askorbátu. V porovnání s chloroplastovou askorbátperoxidasou je cytosolová a peroxisomální izoforma odolnější (Miyake & Asada, 1996).

2.8 Polyfenoloxidasa

Polyfenoloxidasa (1,2-benzendioloxidoreduktasa, PPO, EC 1.10.3.1), jinak také polyfenolasa, kresolasa, katecholoxidasa nebo tyrozinasa patří do třídy oxidoreduktas, jejich činností jsou hydroxylovány monofenoly nebo přetváří difenoly na *o*-dichinony.

Tyto různorodé vysoce reaktivní molekuly následně už bez účasti enzymů zesítují buněčné složky, například aminy, amidy, indoly nebo imidazolové sloučeniny; nebo se kovalentně vážou s proteiny za vzniku melaninových pigmentů o vysoké molekulové hmotnosti. Produkty tohoto zesítování bývají většinou hnědé nebo černé a představují primární nežádoucí produkt polyfenoloxidasy v potravinářství (Mathew & Parpia, 1971; Glagoleva et al., 2020; Balarynová et al., 2022).

Zatímco biochemické účinky polyfenoloxidas jsou poměrně známé, úplné informace o jejich fyziologickém významu chybí. Předpokládá se, že mají také obrannou funkci vzhledem k jejich expresi vyvolané býložravci, patogeny nebo poraněním. Polyfenoloxidasy jsou lokalizovány v chloroplastech, zatímco jejich fenolické substráty se nacházejí ve vakuolách. K enzymovým reakcím tedy dochází při buněčném poškození, kdy enzym a substrát přijdou do kontaktu. Vzhledem k tomuto faktu se předpokládá, že polyfenoloxidasa je důležitou součástí obranného systému rostlin (Tran et al., 2012). S domestikací některých rostlin se pojí ztráta funkce genů kódujících polyfenoloxidasu. U kulturního genotypu hrachu se tento jev projevil sníženou aktivitou polyfenoloxidasy, která byla způsobena delecí v kódujícím genu a vedla tak ke vzniku předčasného stop kodonu. Na rozdíl od kulturního genotypu se u planých genotypů projevila její vysoká aktivita (Balarynová et al., 2022).

Luštěniny jsou řazeny mezi rostliny, které jsou poměrně bohaté na fenoly, z nichž velkou část tvoří antokyany, flavonoidy, izoflavonoidy a fenolové kyseliny (Fahim et al., 2019). Rostlinné polyfenoloxidasy hrají významnou roli v hnědnutí v důsledku tvorby melaninových pigmentů, což má negativní vliv na komerční stránku polní produkce. Intenzita hnědnutí je závislá na kvalitativním a kvantitativním složení fenolických substrátů (Tran et al., 2012). Společným faktorem PPO v organismech je potřeba katalytické aktivace enzymu. V rostlinách se PPO nachází jako latentní formy pre-PPO

(Balarynová et al., 2022). Aktivita PPO je závislá na hodnotě pH, která ovlivňuje vazbu substrátů a s tím související katalýzu. Optimální hodnota pH se pohybuje mezi 4,0 a 8,0 (Taranto et al., 2017). Z genomických analýz rostlin je zřejmé, že rodinu genů PPO má různé mezidruhové struktury a různé velikosti, což je způsobeno specifickými expanzemi nebo ztrátou genů (Tran et al. 2012).

Rostliny jsou během svého života vystaveny různým formám biotických a abiotických stresových faktorů, které individuálně nebo synergicky působí. Z toho důvodu musí být obranný systém rostlin dostatečně flexibilní. Peroxid vodíku, který PPO generuje, v rostlinách působí jako induktor biosyntézy fytoalexinu, produkce kyseliny salicylové a ethylenu nebo jako spouštěč buněčné smrti. Spuštěním buněčné smrti dochází k omezení destrukce v okolí zdravých pletiv, což může vést k vyvolání imunity rostlin (Thipyapong et al., 2007).

2.9 Fenolické látky

Fenolické sloučeniny patří do skupiny primárních i sekundárních metabolitů, které obsahují alespoň jeden hydroxylovaný aromatický kruh. Tyto látky, mezi které patří i melaniny a flavonoidy, mají antioxidační funkci, podílejí se na ochraně rostlin před UV zářením a reaktivními formami kyslíku (Cheynier et al., 2013).

Nejvíce zastoupeným rostlinným fenolovým polymerem je lignin. V osemeni, kutikule a cévním systému se ligniny a další fenolové polymery hromadí a zabezpečují tím ochranu semene proti vysychání (Barros et al., 2015).

Lignin je tvořen oxidační polymerací fenypropanoidů, které jsou produkovány buněčnými stěnami ve fenypropanoidní dráze a tvoří komplexní struktury, které jsou specifické různým druhům buněk (Terashima & Fukushima, 1988).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

BioRad, USA:

- persíran amonný

Honeywell Fluka, Rumunsko:

- Coomassie Brilliant Blue G-250;
- pefabloc® SC;
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Lachema, Česká republika:

- kvercetin

Lach-Ner, Česká republika:

- ethanol;
- glycerol;
- kyselina fosforečná;
- peroxid vodíku

Penta, Česká republika:

- kyselina chlorovodíková;
- octan draselný

ROTH, Německo:

- hovězí sérový albumin

Serva, Německo:

- kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová

Sigma-Aldrich, USA:

- 4-chlor-1-naftol;
- 4-methylcatechol;
- akrylamid (AA);
- bromfenolová modř;
- dihydrogenfosforečnan draselný;
- Folin-Ciocalteuovo činidlo;
- glycin;
- guajakol;

- hexahydrát chloridu hlinitého;
- hydrogenfosforečnan draselný;
- hydroxid sodný;
- katalasa;
- kyselina bicinchoninová;
- kyselina gallová;
- methanol;
- N,N'-metylenbisakrylamid,
- *n*-butanol;
- pentahydrát síranu měďnatého;
- polyvinylpolypyrrolidon;
- tetramethyldiamin (TEMED);
- uhličitan sodný

3.2 Přístroje a experimentální vybavení

BioRad, USA:

- elektroforetická aparatura

BioSan, Lotyšsko:

- elektromagnetická míchačka;
- termostatová třepačka;
- třepačka;
- vortex

Biotek Instruments, USA:

- reader Synergy HT

Denver Instrument, USA:

- analytické váhy

Eppendorf, Německo:

- automatické pipety;
- chlazená centrifuga 5415R

KERN, Německo:

- digitální předvážky

TPP, Švýcarsko:

- mikrodestičky Test plate 96 F

XS Instruments, Itálie:

- digitální pH metr

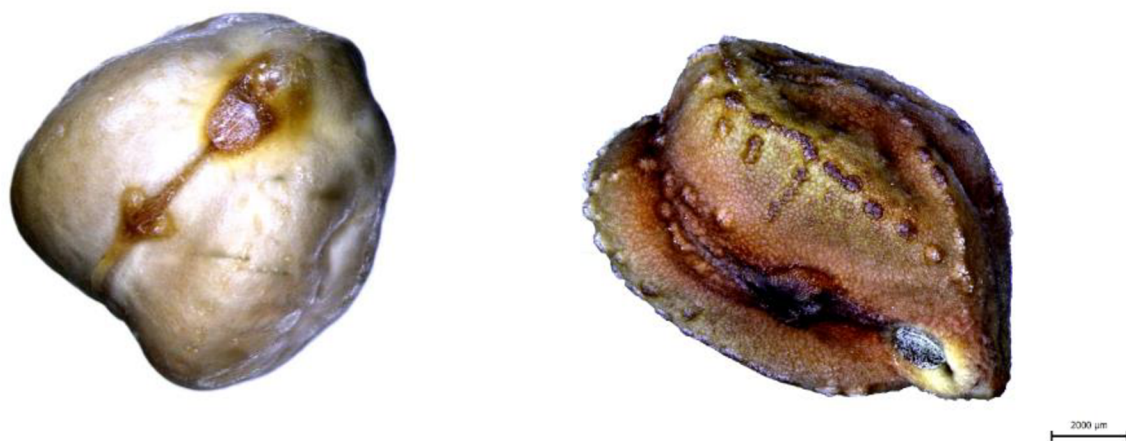
3.3 Rostlinný materiál

Pro potřeby bakalářské práce byly v experimentální části použity plané a kulturní genotypy čtyř druhů luštěnin – cizrny (Obr. 9), bobu (Obr. 10), hrachu (Obr. 11) a čočky (Obr. 12). Bližší specifikace rostlinného materiálu je uvedena v Tab. 1. V práci jsou dále pro testované genotypy používány názvy: Kabuli, ICC 4958, Augusta, Nordica, Fuego, Arkta, Trendy, JI 1794, 3339 a 72643. Semena luštěnin byla poskytnuta katedrou Botaniky Univerzity Palackého v Olomouci.

Studované biochemické parametry byly měřeny v extraktech připravených z osemení suchých semen studovaných luštěnin s výjimkou čočky 72643, kdy nebylo možné oddělit osemení od embrya, a proto byla pro analýzu využita celá semena.

Tabulka 1: Specifikace používaného rostlinného materiálu

luštěnina	latinský název	genotyp	kulturní / planý	poznámka	pigmentace osemení / hila
cizrna	<i>Cicer arietinum</i>	KABULI	kulturní	typ kabuli, nedormantní	ne
cizrna	<i>Cicer arietinum</i>	ICC 4958	kulturní	typ desi, nedormantní	ano
bob	<i>Vicia faba</i>	AUGUSTA	kulturní	nedormantní	ano
bob	<i>Vicia faba</i>	NORDICA	kulturní	nedormantní	ano
bob	<i>Vicia faba</i>	FUEGO	kulturní	nedormantní	ano
hrách	<i>Pisum sativum</i>	ARKTA	kulturní	nedormantní	ano
hrách	<i>Pisum sativum</i>	TRENDY	kulturní	nedormantní	ne
hrách	<i>Pisum elatius</i>	JI 1794	planý	dormantní	ano
čočka	<i>Lens culinaris</i>	3339	kulturní	nedormantní	ne
čočka	<i>Lens orientalis</i>	72643	planý	dormantní	ano



Obrázek 9: Vlevo cizrna Kabuli, vpravo cizrna ICC 4958



Obrázek 10: Vlevo bob Augusta, uprostřed bob Nordica, vpravo bob Fuego



Obrázek 11: Vlevo čočka 72643, vpravo čočka 3339



Obrázek 12: Vlevo hrách Arkta, uprostřed hrách JI 1794, vpravo hrách Trendy

3.4 Metodika

3.4.1 Extrakce rostlinného materiálu

3.4.1.1 Příprava methanolových extraktů pro stanovení obsahu fenolů a flavonoidů

Rostlinný materiál (osemení, příp. celá semena) byl homogenizován tekutým dusíkem a extrahován vychlazeným methanolem ve vychlazené třecí misce v poměru 1:7 (w:v). Extrakty byly následně zcentrifugovány při 4 °C, 14 000 RPM po dobu 25 minut. Po centrifugaci byl odebrán supernatant, který byl dále využit pro studium celkového obsahu flavonoidních a fenolických látek.

3.4.1.2 Příprava extraktů pro stanovení aktivity enzymů a obsahu proteinů

Pro analýzu aktivity enzymů a stanovování obsahu proteinů byl rostlinný materiál homogenizován tekutým dusíkem a extrahován extrakčním pufrem, skládajícího se z 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátového pufru o pH 7 a obsahujícího 1 % polyvinylpolypyrrolidonu a 0,5 mmol·l⁻¹ pefabloc. K-fosfátový pufr o pH 7 byl připraven smícháním 30,75 ml 1 mol·l⁻¹ K₂HPO₄ a 19,25 ml 1 mol·l⁻¹ KH₂PO₄. Po dolití na objem 450 ml a po kontrole pH na pH metru byl pufr dolit na objem 500 ml, čímž vznikl 0,1 mol·l⁻¹ roztok. V 10 ml K-fosfátového pufru bylo rozpuštěno 100 mg polyvinylpolypyrrolidonu a 1,1 mg pefablocu, který v systému funguje jako inhibitor proteas. Podle savosti byl rostlinný materiál extrahován pufrem v poměru 1:7 (w:v) nebo 1:10 (w:v), následně zcentrifugován při 4 °C, 14 000 RPM po dobu

25 minut. Po centrifugaci byl odebrán supernatant, který byl dále využit pro studium aktivity peroxidasy a polyfenoloxidas a pro stanovení obsahu proteinů.

3.4.2 Stanovení obsahu flavonoidů

Celkový obsah flavonoidních látek byl stanovován metodou kolorimetrické reakce využití roztoku chloridu hlinitého a octanu draselného. Za standard byl zvolen flavonoid kvercetin. Produkt reakce vykazuje maximální absorbanci při 415 nm (Tsaniklidis et al. 2021).

Zásobní roztok kvercetinu byl připraven rozpuštěním 1 mg kvercetinu v 1 ml methanolu. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada o koncentracích 0–175 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tab. 2). 10% roztok chloridu hlinitého byl připraven rozpuštěním 3,621 g hexahydrátu chloridu hlinitého ve 20 ml methanolu. 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok octanu draselného byl připraven rozpuštěním 1,962 g octanu draselného ve 20 ml methanolu.

Pro stanovení celkového obsahu flavonoidů bylo do mikrotitrační destičky napipetováno 140 μl destilované vody, 25 μl vzorku nebo standardu, 10 μl 10% roztoku chloridu hlinitého a 10 μl 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku octanu draselného. Směs byla inkubována po dobu 30 minut při teplotě 25 °C a následně proměřena při 415 nm.

Tabulka 2: Objemy zásobního roztoku kvercetinu a methanolu pro vytvoření kalibračních roztoků kvercetinu o koncentraci 0-175 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ křivky.

koncentrace kvercetinu [$\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$]	objem zásobního roztoku kvercetinu [μl]	objem methanolu [μl]
0	0	1000
25	25	975
50	50	950
75	75	925
100	100	900
125	125	875
150	150	850
175	175	825

3.4.3 Stanovení obsahu fenolů

Celkový obsah fenolických látek byl stanovován pomocí Folin-Ciocalteuovy kolorimetrické metody. Ta využívá reakce Folin-Ciocalteuova činidla s roztokem uhličitanu sodného. Po inkubaci je produkt proměřován při 750 nm (Tsaniklidis et al. 2021). Jako standard sloužil zásobní roztok kyseliny gallové, který byl připraven rozpuštěním 1 mg kyseliny gallové v 1 ml methanolu. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada o koncentracích 0–250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tab. 3).

7% roztok uhličitanu sodného byl připraven rozpuštěním 0,7 g uhličitanu sodného v 10 ml destilované vody.

Pro stanovení celkového obsahu fenolů bylo do mikrotitrační destičky napipetováno 75 μl destilované vody, 10 μl vzorku nebo standardu a 10 μl Folin-Ciocalteuova činidla. Směs byla inkubována 6 minut při 25 °C a poté bylo přidáno 125 μl 7% roztoku uhličitanu sodného. Směs byla inkubována po dobu 60 minut při teplotě 25 °C a následně proměřena při 750 nm.

Tabulka 3: Objemy zásobního roztoku kyseliny gallové a methanolu pro vytvoření kalibračních roztoků kyseliny gallové o koncentraci 0-250 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$.

koncentrace kyseliny gallové [$\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$]	objem zásobního roztoku kyseliny gallové [μl]	objem methanolu [μl]
0	0	100
50	5	95
100	10	90
150	15	85
200	20	80
250	25	75

3.4.4 Stanovení celkového obsahu proteinů pomocí Bradfordovy metody

Tato metoda je založena na tvorbě komplexu mezi přítomnými proteiny a barvivem Coomassie Brilliant blue G-250 v kyselém prostředí. Po navázání barviva na protein dochází k posunu absorpčního maxima G-250 ze 465 na 595 nm (Bradford, 1976).

Zásobní roztok Bradfordova činidla byl připraven rozpuštěním 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 ve 25 ml methanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečné. Směs byla doplněna destilovanou vodou do objemu 100 ml a uchovávána při 4 °C ve tmě. Pro vytvoření pracovního roztoku Bradfordova činidla byl zásobní roztok naředěn destilovanou vodou v poměru 1:4 (v:v). Jako standard sloužil zásobní roztok hovězího sérového albuminu (BSA), který byl připraven rozpuštěním 10 mg albuminu v 1 ml destilované vody. Z tohoto zásobního roztoku byla ředěním vytvořena kalibrační řada roztoků o koncentracích 0-1,4 mg·ml⁻¹ (Tab. 4).

Pro stanovení celkového obsahu proteinů pomocí Bradfordovy metody bylo do mikrodestičky napipetováno 45 μl destilované vody, 5 μl vzorku nebo standardu a 200 μl pracovního Bradfordova činidla. Směs byla 5 minut inkubována při pokojové teplotě a poté proměřena při 595 nm.

Tabulka 4: Objemy zásobního roztoku hovězího sérového albuminu (BSA) a vody pro vytvoření kalibračních roztoků o koncentraci 0-1,4 mg·ml⁻¹.

koncentrace BSA [mg·ml ⁻¹]	objem zásobního roztoku BSA [μl]	objem destilované vody [μl]
0	0	1000
0,2	20	980
0,4	40	960
0,6	60	940
0,8	80	920
1	100	900
1,2	120	880
1,4	140	860

3.4.5 Stanovení celkového obsahu proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové

Stanovení obsahu proteinů reakcí s kyselinou bicinchoninovou je založeno na tvorbě komplexu Cu^{2+} iontů s proteiny a jejich následná redukce na ionty Cu^+ . Kyselina bicinchoninová tvoří s Cu^+ ionty v zásaditém prostředí modrofialový komplex s maximální absorpční při 562 nm (Smith et al., 1985).

Rozpuštěním 4 g pentahydrátu síranu měďnatého ve 100 ml destilované vody vznikl $16 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok. Pracovní roztok kyseliny bicinchoninové byl připraven smícháním zásobního roztoku kyseliny bicinchoninové s připraveným roztokem síranu měďnatého v poměru 50:1 (v:v).

Pro sestavení kalibrační křivky byla využita stejná kalibrační řada hovězího sérového albuminu vycházející z Tab. 4.

Pro stanovení obsahu proteinů touto metodou bylo do mikrotitrační destičky napipetováno 10 μl vzorku nebo standardu a 200 μl pracovního roztoku kyseliny bicinchoninové. Směs byla ponechána při 37 °C po dobu 30 minut a následně proměřena při 562 nm.

3.4.6 Stanovení aktivity peroxidasy

Ke stanovení aktivity peroxidasy byla použita spektrofotometrická metoda využívající guajakol (Angelini et al., 1990). Při enzymové reakci, kde peroxid vodíku vystupuje jako substrát se peroxid rozkládá na kyslík a vodu. Vznikající kyslík pak oxiduje přítomný guajakol na 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylchinon, což se projevuje nárůstem absorpance při 436 nm. Molární absorpční koeficient produktu této reakce je $4500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

K-fosfátový pufr o pH 6 byl připraven smícháním 6,6 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K_2HPO_4 a 43,4 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 . Po dolití na objem 450 ml a po kontrole pH na pH metru byl pufr dolit na objem 500 ml, čímž vznikl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok.

Pro přípravu reakčního pufru obsahujícího $0,113 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ guajakolu byl 1,41 ml zásobního roztoku guajakolu o koncentraci $8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ doplněn $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátovým pufrem o pH 6 do objemu 100 ml.

Pro přípravu pracovního roztoku peroxidu vodíku bylo 0,204 ml zásobního roztoku o aktuální koncentraci $8,59 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ doplněno na objem 10 ml destilovanou vodou, čímž vznikl $0,175 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok.

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 155 μl reakčního pufru, 10 μl vzorku a 10 μl 0,175 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku peroxidu vodíku pro vzorky nebo 10 μl destilované vody pro blank. Následně byla měřena absorbance při 436 nm při 30 °C po dobu 1 minuty. Pro výpočet délky optické dráhy byla změřena absorbance při 900 a 977 nm.

3.4.7 Stanovení aktivity polyfenoloxidas

Ke stanovení aktivity polyfenoloxidas byla využita spektrofotometrická metoda, která využívá jako enzymový substrát 4-methylkatechol a v průběhu reakce je při vlnové délce 420 nm proměřována tvorba produktu jeho oxidace (Balarynová et al., 2022). Molární absorpční koeficient produktu této reakce je 1090 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Roztok 4-methylkatecholu o koncentraci 88 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 21,8 mg látky ve 2 ml destilované vody. Roztok katalasy byl připraven rozpuštěním 2,5 mg enzymu ve 2 ml destilované vody.

Do jamek na mikrodestičce bylo postupně napipetováno 180 μl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru o pH 7, 20 μl katalasy, 10 μl vzorku a 10 μl 88 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku methylkatecholu. V případě blanku byl objem methylkatecholu nahrazen stejným objemem destilované vody. Dalším potřebným měřením byla změna absorbance vzhledem k autooxidaci methylkatecholu. Do blanku methylkatecholu bylo napipetováno 180 μl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru o pH 7, 20 μl katalasy, 10 μl destilované vody a 10 μl 88 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku methylkatecholu.

Následně byla po dobu 1 hodiny měřena absorbance při 420 nm při 25 °C. Pro výpočet délky optické dráhy byla změřena absorbance při 900 a 977 nm.

3.4.8 Separace proteinů nativní elektroforézou

Nativní elektroforéza probíhá bez denaturačních činidel a zajišťuje separaci proteinů na základě jejich schopnosti pohybu v elektrickém poli. Vzorek se pohybuje v tenké vrstvě inertního polyakrylamidového gelu, který vzniká polymerací akrylamidu a N, N'-metylenbisdakrylamidu. Tuto polymeraci zahajují volné radikály vznikající při rozkladu persíranu amonného (APS). Do směsi se přidává také stabilizátor volných radikálů N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin. V nativní elektroforéze se využívá dvou typů gelů – dělicího a zaostřovacího. Pro nativní elektroforézu byl použit 8% dělicí a 4% zaostřovací gel. Tyto gely byly připraveny smícháním jednotlivých látek podle Tab.5.

Tabulka 5: Složení 8% dělicího a 4% zaostřovacího gelu

Typ gelu	AA/BIS 30% / 0,8% [ml]	Tris HCl 1,5 mol·l ⁻¹ , pH 8,8 [ml]	Tris HCl 0,5 mol·l ⁻¹ , pH 6,8 [ml]	voda [ml]	TEMED [ml]	APS [ml]
8% dělicí	2,6	2,5		4,6	0,01	0,15
4% zaostřovací	0,65		1,25	2,95	0,01	0,1

Vzorek pro nativní elektroforézu byl připraven smícháním 15 µl extraktu (viz 3.4.1.2 Příprava extraktů pro stanovení aktivity enzymů a obsahu proteinů) s 5 µl 60% glycerolu. Veškerá manipulace se vzorky probíhala z důvodu zachování maximální enzymové aktivity na ledu.

Jednotlivé roztoky byly připraveny následovně:

AA/BIS (30%/0,8%) byl připraven rozpuštěním 73 g akrylamidu a 2 g N,N'-metylenbisakrylaminu ve 250 ml destilované vody.

Tris HCl pufr (0,5 mol·l⁻¹, pH 6,8) do zaostřovacího gelu byl připraven rozpuštěním 3,03 g Tris ve 40 ml destilované vody, pH bylo pomocí HCl upraveno na 6,8 a roztok byl doplněn na objem 50 ml.

Tris HCl pufr (1,5 mol·l⁻¹, pH 8,8) do dělicího gelu byl připraven rozpuštěním 36,33 g Tris ve 150 ml destilované vody, pH bylo pomocí HCl upraveno na hodnotu 8,8 a objem byl doplněn na 200 ml.

10% persíran amonný byl připraven rozpuštěním 0,1 g persíranu amonného v 1 ml destilované vody.

Elektrodový pufr pro nativní elektroforézu byl připraven rozpuštěním 6,055 g Tris a 28,823 g glycinu v 1 l destilované vody a doplněním na objem 2 l.

60% glycerol byl připraven smícháním 6 ml glycerolu a 4 ml destilované vody.

Pro přípravu roztoku bromfenolové modři byl 1 g bromfenolové modře rozpuštěn v 1 ml 60% glycerolu a po přidání kapky hydroxidu sodného bylo barvivo připraveno k použití.

Barvicí roztok pro zobrazení aktivity peroxidasy byl připraven následovně: ke 4 mg 4-chloro-1-naftolu bylo přidáno 2,5 ml vychlazeného methanolu; 12,5 ml 0,1 mol·l⁻¹ Tris HCl o pH 7 a 20 µl 30% peroxidu vodíku.

Barvicí roztok pro zobrazení aktivity polyfenoloxidas byla připravena rozpuštěním 25 mg methylkatecholu ve 20 ml 50 mmol·l⁻¹ MES pufru o pH 6.

Po sestavení elektroforetické aparatury byl připraven a nanášen dělicí gel, který byl převrstven n-butanolem a ponechán k ztuhnutí. Po ztuhnutí byl n-butanol odstraněn, povrch gelu opláchnutý destilovanou vodou a vysušen filtračním papírem. Poté byl připraven a nanášen zaostřovací gel a mezi skla byl do gelu vložen hřebínek. Po ztuhnutí byl hřebínek vytažen, jamky propláchnuty destilovanou vodou a skla s gely byla vložena do elektroforetické aparatury. Po aplikaci 15 µl vzorků a bromfenolové modři byl do aparatury přidán elektrodotový pufr. Celá aparatura byla následně přenesena do chladničky a připojena ke zdroji proudu – po 10 minutách bylo napětí zvýšeno z původních 100 V na 180 V.

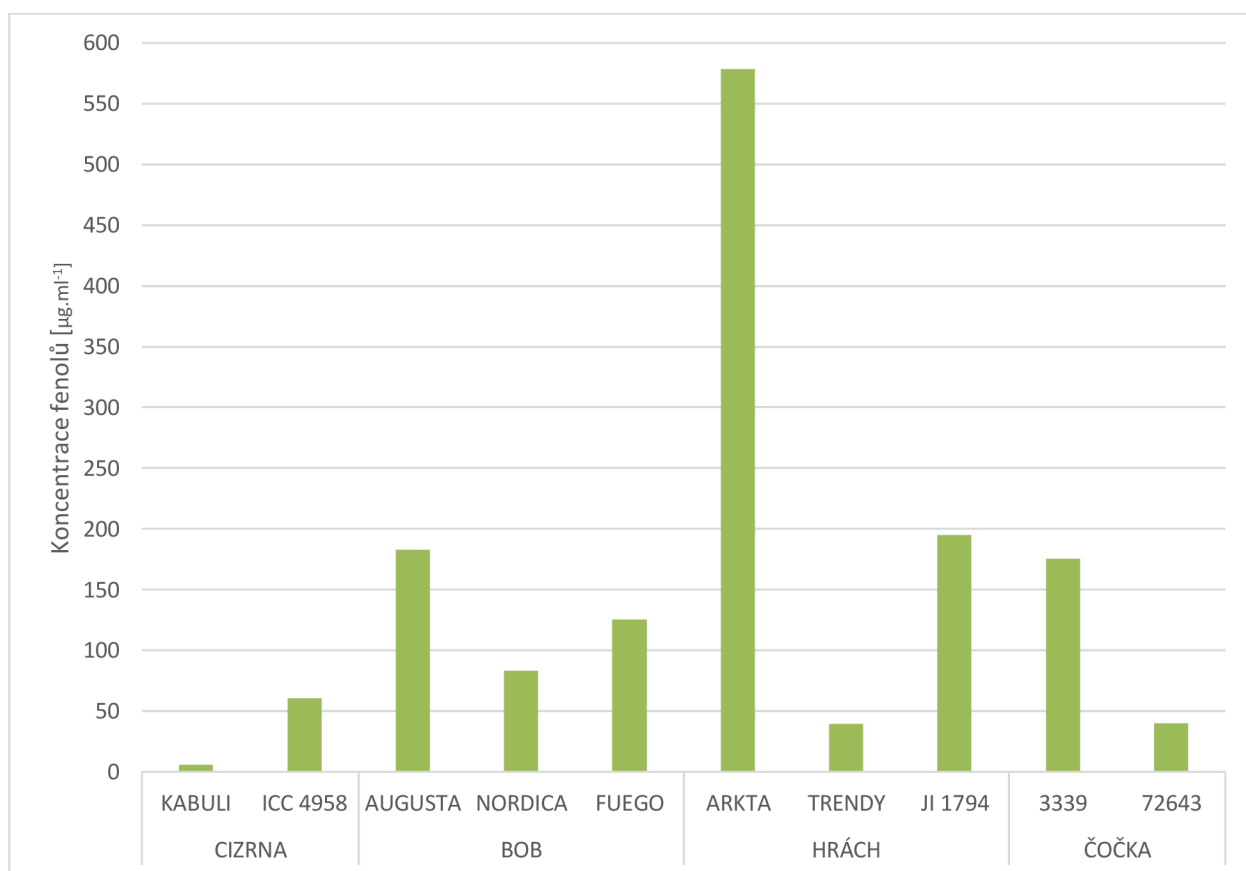
Po separaci byl zdroj odpojen, gely promyty destilovanou vodou a ponechány na třepačce k obarvení barvicími roztoky – v případě peroxidasy byly barveny roztokem 4-chlornaftolu, v případě polyfenoloxidas roztokem methylkatecholu. Barvení peroxidasy probíhalo cca 15 minut, gel pro detekci polyfenoloxidas byl v barvicím roztoku ponechán do druhého dne (cca 20 hodin). Po propláchnutí destilovanou vodou byly gely zdokumentovány.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Obsah fenolů

Celkový obsah fenolických látek byl stanovován pomocí reakce Folin-Ciocalteuova činidla s roztokem uhličitanu sodného (Tsaniklidis et al. 2021). Koncentrace fenolických látek byla vypočítána z rovnice přímky získané z kalibračního grafu závislosti absorbance při 750 nm na koncentraci standardu kyseliny gallové.

Vyšší koncentrace fenolických látek byly naměřeny v pigmentovaných osemeních, přičemž nejvyšší hladiny byly u genotypu Arkta ($578,333 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$) nebo JI 1794 ($194,667 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$). Oproti tomu obsahují nepigmentovaná osemení fenolů jen velmi málo – Kabuli ($5,833 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$) nebo Trendy ($39,833 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$). Nízké koncentrace vykazovala i planá čočka 72643 ($39,833 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$), kde ale může být stanovení ovlivněno, spíše než osemením, větší navázkou embrya. Významně vyšší koncentrace fenolů byla stanovena v osemení genotypu Arkta, kde je hodnota cca trojnásobně vyšší ve srovnání s ostatními vzorky. Všechny naměřené hodnoty fenolických látek zobrazuje Obr. 13.



Obrázek 13: Stanovené koncentrace fenolů v osemení jednotlivých genotypů luštěnin.

Mezi nejčastější fenolické látky přítomné v luštěninách patří fenolové kyseliny, stibeny, taniny a flavonoidy, z flavonoidů zejména katechiny a prokyanidiny. Většina fenolických látek je přítomna v osemení (Amarowicz & Shahidi, 2017). Katechiny a prokyanidiny představují téměř 70 % celkového obsahu fenolických látek přítomných v osemení fazole Borlotti a čočky, kyselina gallová a protokatechová jsou zase bohatě zastoupeny v červených fazolích a fazolích Mungo. Fenolické látky jsou důležitými determinanty barvy, chutě a vůně a významné jsou mimo jiné i díky jejich antioxidační kapacitě, která je přímo úměrná množství a poloze hydroxylových skupin přítomných ve struktuře molekul (Aguilera et al., 2011; Singh et al., 2017).

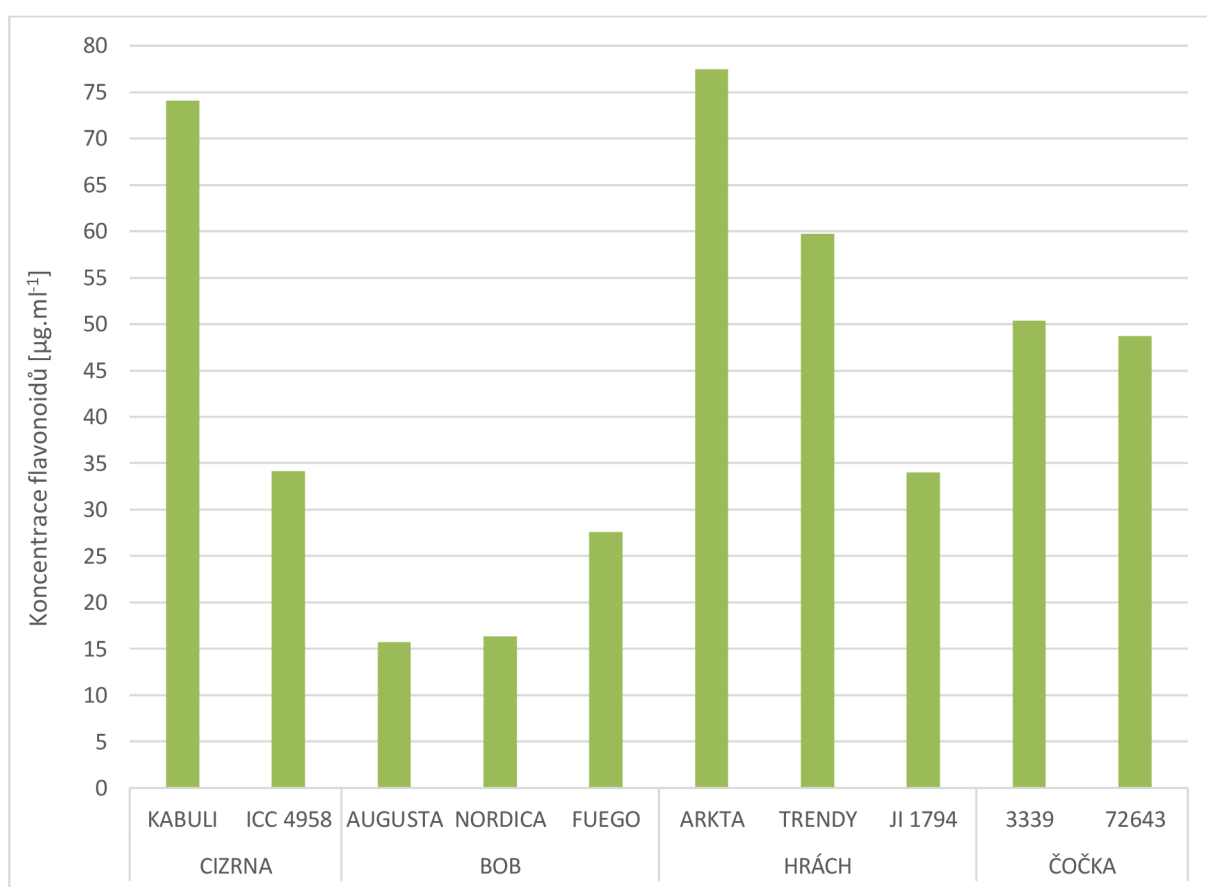
Naměřené hodnoty nelze srovnávat s jinými publikovanými daty, protože se zatím žádný výzkum nezabývá srovnáním těchto hodnot v suchých osemeních. V práci Giusti et al. (2019) se zabývali profilem fenolických látek v luštěninách a analyzovali případné ztráty ve vodě, ve které byly luštěniny namáčeny, a ve vodě po vaření. Voda z namáčení následně obsahovala různé typy fenolických látek, např. barevné antokyany nebo flavonoidy a taniny. Kyselina gallová byla detekována pouze ve vodě po namáčení černých fazolí. Tyto látky mohly být uvolněny z komplexnějších a strukturně složitějších fenolických polymerů, jakým je např. lignin (Giusti et al., 2019).

Zmíněná studie srovnává několik typů fazolí a cizrny a nelze z ní tedy doplnit poznatky související se zbylými typy luštěnin, které jsou využity v této práci. Pro případné pokračování experimentu by bylo přínosné doplnit např. srovnání hodnot fenolických látek, jak v suchém osemení, tak po namáčení a varu, eventuálně také stanovení a srovnání těchto látek přítomných v embryích. Dalším možným pokračováním je analýza konkrétních přítomných fenolických látek, např. kapalinovou chromatografií.

4.2 Obsah flavonoidů

Množství flavonoidních látek bylo analyzováno kolorimetrickou reakcí, která využívá roztok chloridu hlinitého a octanu draselného (Tsaniklidis et al., 2021). Koncentrace flavonoidních látek byla vypočítána z rovnice přímky získané z kalibračního grafu závislosti absorbance při 415 nm na koncentraci standardu kvercetinu.

Touto metodou byly zaznamenány významné rozdíly jak mezi studovanými druhy luštěnin, tak mezi jednotlivých genotypů. Ve srovnání s ostatními luštěninami vykazovaly nejnižší koncentrace boby – Augusta ($15,706 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$) a Nordica ($16,353 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$). V rámci druhu byly největší rozdíly v naměřených hodnotách pozorovány u cizrny, kde jsou obě studované cizrny jiného typu, a pak u hrachu, kde je pozorován významný rozdíl mezi kulturním a planým genotypem. U čočky ale tento rozdíl v závislosti na kulturnosti nebo dormanci pozorován není, na což může mít u plané čočky vliv velký podíl embrya v extraktu. Koncentrace flavonoidů v embryu není známa, tudíž může zjištěnou hodnotu navyšovat. Naměřené hodnoty zpřehledňuje Obr. 14.



Obrázek 14: Stanovené koncentrace flavonoidů v osemeni jednotlivých genotypů luštěnin

Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin, které chrání rostliny před různými biotickými a abiotickými stresy a jsou jim připisovány antioxidační vlastnosti. Oxidace flavonoidů, katalyzovaná zejména polyfenoloxidasami, přispívá k těmto biologickým a chemickým znakům a vede k tvorbě hnědých pigmentů (Pourcel et al., 2007). Flavonoidy se nacházejí ve většině semen. Typ, množství a lokalizace těchto molekul se liší podle rostlinných druhů a stadia vývoje pletiv, dalším modulátorem může být okolní prostředí (Shirley, 1998).

Hlavními typy flavonoidů v semenech jsou antokyany, flavonoly, flobafeny, isoflavony a proanthokyanidiny (Pourcel et al., 2007). Antokyany lze nalézt například v osemení fazolí (Beninger & Hosfield, 2003); flavonoly zase, společně s antokyany, přispívají k pigmentaci semen (Stafford, 1998). Isoflavony jsou bezbarvé flavonoidy, které patří mezi hlavní metabolity v embryu a osemení bobovitých (Graham, 1991).

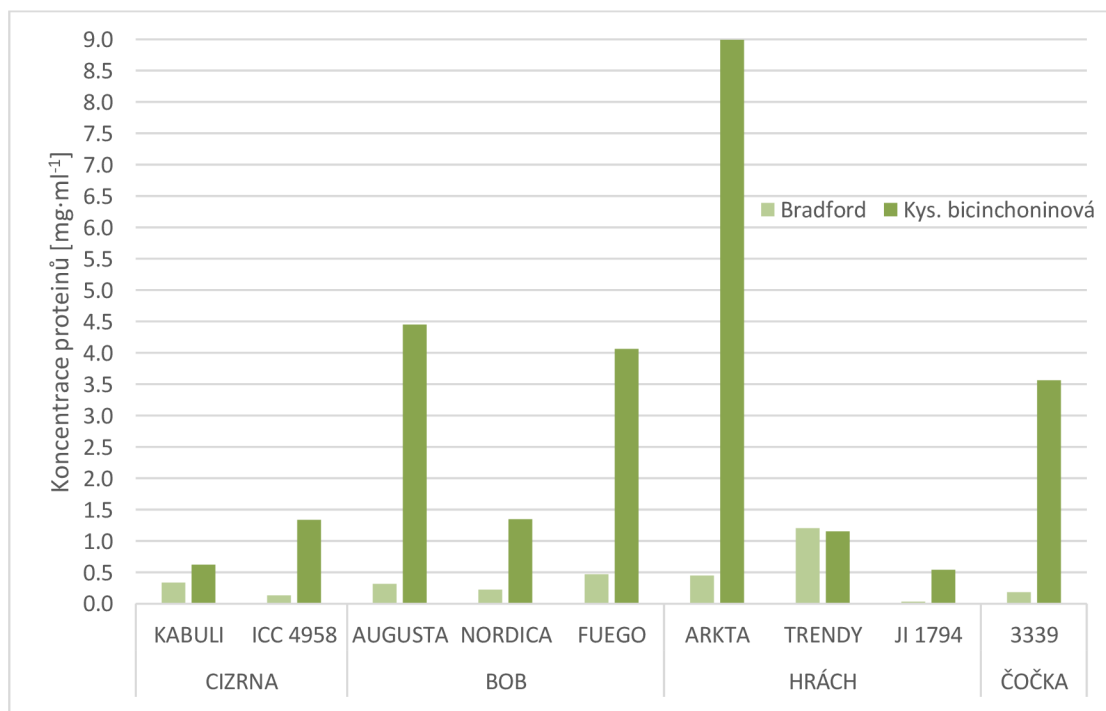
Vzhledem k vysoké hodnotě naměřené v případě nepigmentovaného osemení Kabuli by se dalo předpokládat, že větší zastoupení v tomto vzorku bude připadat právě na bezbarvé isoflavony, vysoké hodnoty Arktý zase svědčí o širším zastoupení flavonolů a/nebo antokyanů. Eum et al. (2020) však ve své studii na semenech sóji nezjistili žádnou souvislost mezi barvou a obsahem isoflavonů. Došli ale k závěru, že v malých nebo velkých semenech sóji závisel obsah isoflavonů na vývojovém stadiu semene a jejich koncentrace byla větší v případě menších semen sóji během klíčení.

V experimentu lze dále pokračovat stanovením konkrétního zastoupení flavonoidů nebo sledováním změn v jejich koncentraci v průběhu klíčení a vývoje semen.

4.3 Stanovení koncentrace proteinů

Množství proteinů bylo stanoveno dvěma způsoby – Bradfordovou metodou a pomocí kyseliny bicinchoninové. Využité metody vykázaly u plané čočky, kde se spíš jednalo o proteiny z embryí, velmi podobné hodnoty (Bradford: 12,152 mg·ml⁻¹, BCA: 13,506 mg·ml⁻¹). V osemení luštěnin byly obecně stanoveny velmi nízké koncentrace – mimo genotyp Arkta (případě stanovení pomocí BCA) se hodnoty pohybovaly mezi 0,035 – 4,454 mg·ml⁻¹.

Koncentrace proteinů s osemení stanovená kyselinou bicinchoninovou a Bradfordovou metodou se liší. Možným důvodem je aminokyselinové složení proteinů. Bradfordovo činidlo reaguje hlavně s bazickými aminokyselinami – argininem a lysinem. Nízké hodnoty naměřené Bradfordovou metodou naznačují, že je ve studovaných osemeních (příp. embryu) těchto bazických aminokyselin málo a koncentrace proteinů je tak podhodnocena. Kyselina bicinchoninová reaguje hlavně se snadno oxidovatelnými aminokyselinami – tyrosinem, cysteinem nebo tryptofanem. Vyšší koncentrace stanovená kyselinou bicinchoninovou může znamenat širší zastoupení těchto aminokyselin v přítomných proteinech. Z ostatních naměřených hodnot, kde bylo v extraktu jen osemení, je patrné, že většinový obsah proteinů je soustředěn v embryu. Naměřené hodnoty (z důvodu lepšího rozlišení bez plané čočky) jsou vyneseny v grafu v Obr. 15.



Obrázek 15: Porovnání stanovených koncentrací proteinů v jednotlivých genotypech. Z grafu byla odstraněna hodnota čočky 72643 (Bradford: 12,152 mg·ml⁻¹, BCA: 13,506 mg·ml⁻¹) z důvodu lepšího rozlišení naměřených hodnot pro ostatní vzorky

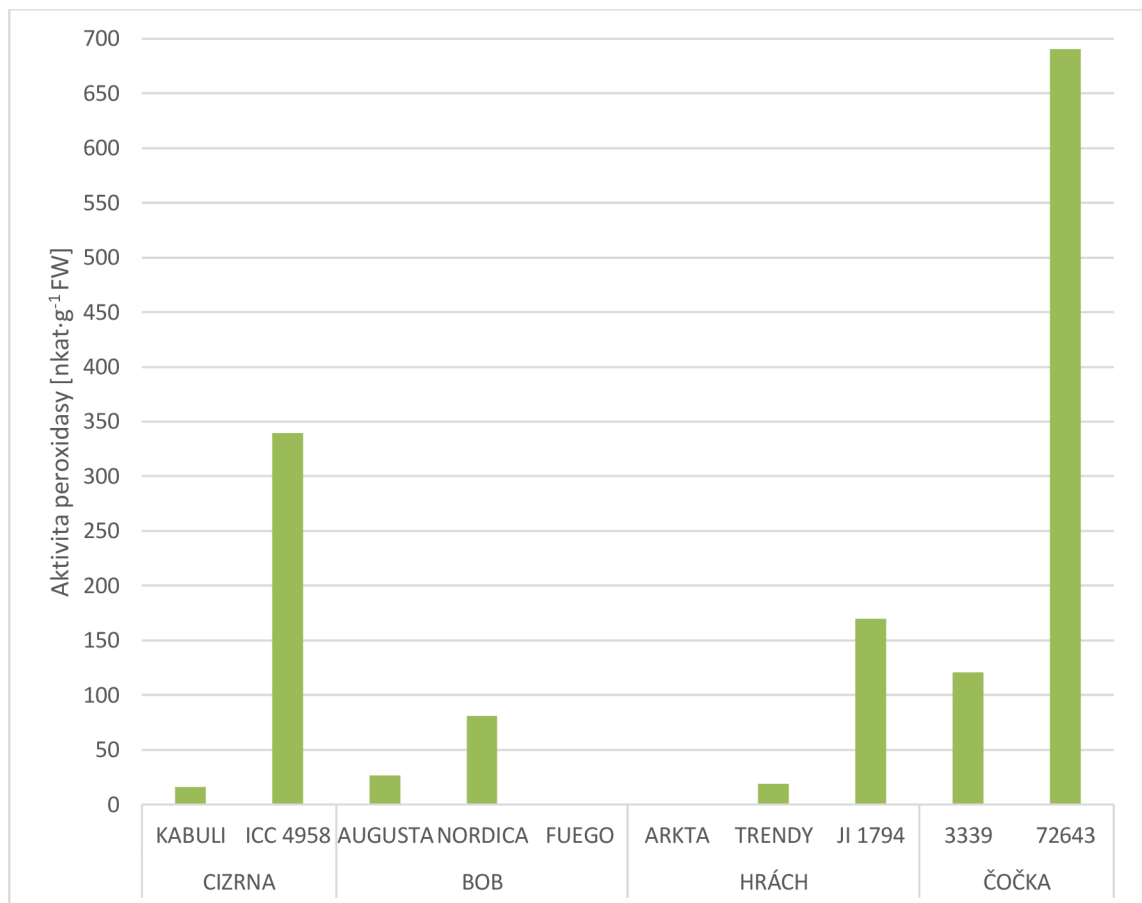
Hodnoty stanovené oběma metodami jsou téměř shodné v případě genotypu 72643, kde hraje velkou roli navážka embrya, a v případě genotypu Trendy. Ve zbylých případech rozdílné hodnoty poukazují na možné interference látek obsažených pouze v osemeni s jednou z použitých metod. V případě Bradfordovy metody může jít o hodnoty falešně podhodnocené, v případě kyseliny bicinchoninové naopak falešně nadhodnocené.

Z důvodu těchto nesrovnalostí by bylo vhodné měření alespoň 2x opakovat nebo doplnit jinou analytickou metodou, např. hmotnostní spektrometrií, čímž by došlo k objasnění, která z metod stanovení koncentrace je přesnější.

4.4 Aktivita peroxidasy

Ke stanovení aktivity peroxidasy byla použita spektrofotometrická metoda využívající guajakol (Angelini et al., 1990).

Aktivita peroxidasy měřená v suchých osemeních testovaných genotypů luštěnin byla naměřena pouze v případě některých vzorků. Nejaktivnější byl enzym ve směsném vzorku osemeni a embrya plané čočky. Tak vysoká hodnota může být zapříčiněna lokalizací enzymu právě v embryu. Pro získání vypovídajících výsledků by bylo vhodné doplnit měření aktivity v embryích studovaných genotypů a komentovat korelující jevy. Pouze v osemeni byl enzym aktivní u genotypu ICC 4958, JI 1794 a 3339 v pořadí s klesající aktivitou. Velký rozdíl v aktivitě je možné pozorovat ve zvolených typech cizrny, kde typ desi vykazuje mnohonásobně vyšší aktivitu POX oproti typu kabuli. U ostatních vzorků byla aktivita POX velmi nízká nebo nebyla vůbec naměřena. Naměřené hodnoty jsou vyneseny v Obr. 16.



Obrázek 16: Aktivita peroxidasy v jednotlivých genotypch luštěnin; v genotypch Arkta a Fuego nebyla aktivita peroxidasy detekována

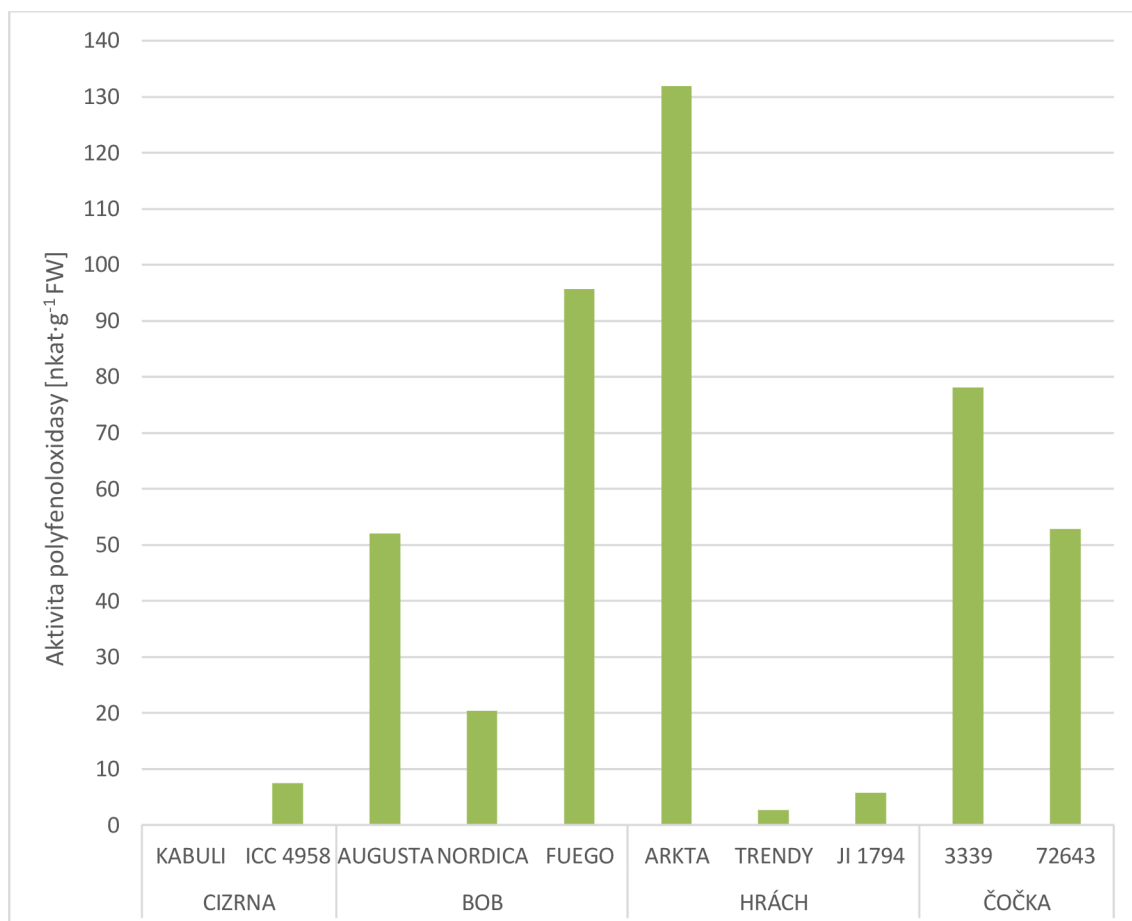
4.5 Aktivita polyfenoloxidas

Ke stanovení aktivity polyfenoloxidas byla využita spektrofotometrická metoda, která využívá jako enzymový substrát 4-methylkatechol a v průběhu reakce je při vlnové délce 420 nm proměřována tvorba produktu jeho oxidace.

Z dosavadních výzkumů na hrachu je patrné, že aktivita PPO souvisí s pigmentací hila. Funkční alela pro PPO byla detekována v planých genotypch, zatímco v kulturních genotypch s nepigmentovaným hilem byla jedna ze tří alel pro expresi PPO nefunkční (Balarynová et al., 2022). U ostatních druhů luštěnin používaných v této práci toto pravidlo není prozkoumáno a platit tak nemusí. Vzhledem k pigmentaci osemení genotypu JI 1794 se jeví naměřená nízká aktivita PPO jako chybně stanovená a pro eliminaci chyby měření by bylo vhodné analýzu alespoň 2x opakovat. U stanovených

aktivit PPO v případě cizrny výsledky korelují s pigmentací hila – Kabuli má světlé osemení a hilum bez pigmentace a aktivita PPO v něm nebyla vůbec detekována, naopak ICC 4958 s pigmentací aktivitu PPO, byť slabou, vykazoval.

Stanovené aktivity enzymu zřehledňuje následující graf (Obr. 17).

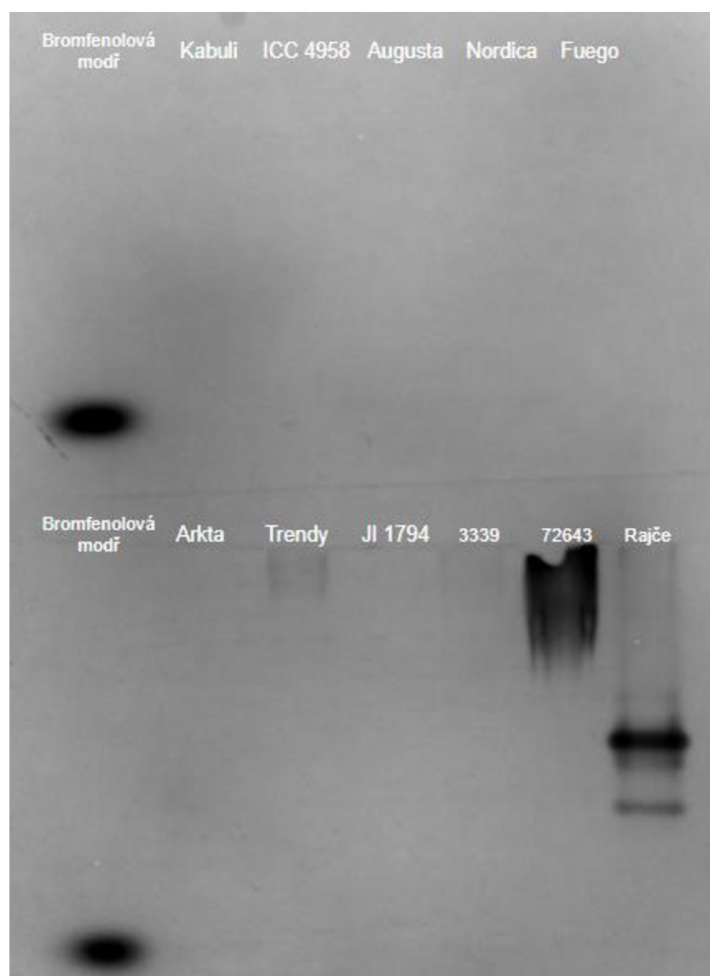


Obrázek 17: Aktivita polyfenoloxidas v jednotlivých genotypch luštěnin

4.6 Detekce enzymů s peroxidasovou a polyfenoloxidasovou aktivitou

Detekce peroxidas a polyfenoloxidas na gelech po elektroforéze za nativních podmínek byla provedena barvením gelů s roztoky obsahujícími peroxid vodíku a chlornaftol v případě POX a methylkatechol v případě PPO. Při stanovení POX aktivity byl na gel přidán extrakt z listů rajčete, který byl připraven stejným způsobem, jako vzorky osemení (viz 3.4.1.2 Příprava extraktů pro stanovení aktivity enzymů a obsahu proteinů) a sloužil jako pozitivní kontrola. Vzniklé bandy, odpovídající aktivitě izoenzymů POX, byly

zaznamenány pouze u pozitivní kontroly a u směšného vzorku celého semene plané čočky, kde aktivita POX může být opět původem z embrya. Aktivita POX ostatních vzorků byla nejspíš příliš nízká, což potvrzuje i spektrofotometrické stanovení (Obr. 18). Testovanou metodou barvení nebyla v žádném z vzorků pozorována aktivita PPO, což může být vysvětleno buď malým množstvím nanášeného vzorku, nízkou aktivitou PPO nebo nevhodně zvolenou koncentrací substrátu v barvicím roztoku.



Obrázek 18: Barvení peroxidasy po separaci proteinů nativní elektroforézou

5 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byl detailně zpracován vývoj a popis semen luštěnin. Semeno hraje klíčovou roli v pohlavním rozmnožování a skládá se z embrya, endospermu, děložního lístku a osemení. Celkový vývoj semene je komplexní a zahrnuje fáze absorpce živin, fotosyntetické neaktivity v počátečních stádiích a diferenciaci buněk embrya.

Dále byl zpracován proces dozrávání semen luštěnin. Fáze zrání semene zahrnuje vývoj zralého embrya a následně fázi akumulace živných rezerv, kdy probíhá syntéza škrobu, proteinů a tuků. Po ní následuje fáze vysychání, během které semeno ztrácí vodu a připravuje se na klíčení. V této fázi dochází k aktivní genové expresi, metabolismu a případnému nabytí dormance, což je termín označující období, kdy jsou fyziologické procesy v semeni omezeny nebo zastaveny, i když jsou splněny podmínky pro klíčení. Dormanci byla v textu věnována samostatná kapitola.

Další část textu byla zaměřena na přítomnost melaninu v osemení luštěnin a procesy s tím související. Melanin, tmavý pigment, vzniká oxidací a polymerací fenolických látek v plastidech a hypodermálních buňkách. Tento proces tvorby rostlinného melaninu je spojen s enzymovým hnědnutím, které nastává v poškozených pletivech. Skvrnitá nebo tmavší pigmentace semen, častá u planých rostlin, může sloužit ke kamufláži na půdě. Nicméně, u kulturních genotypů luštěnin se může projevit snížená aktivita melaninu způsobená delecí v kódujícím genu. Závěrečná část teoretické části byla věnována peroxidasám a polyfenoloxidasám jako klíčovým enzymům v ochraně a vývoji semen, na které je tato bakalářská práce zaměřena. Text zdůrazňuje jejich roli při oxidaci donorů elektronů, rozkladu peroxidu vodíku a tvorbě melaninu. Enzymy jsou citlivé na vnější podmínky, jakými jsou poranění, stres nebo patogeny, a jejich aktivita je variabilní. Jsou důležité pro metabolismus buněčné stěny, lignifikaci, metabolismus reaktivních forem kyslíku a dusíku a účastní na syntéze ethylenu.

V rámci experimentální části této práce byl homogenizován a extrahován rostlinný materiál luštěnin. Z cizrny byly zvoleny kulturní genotypy Kabuli a ICC 4958, z bobu kulturní genotypy Nordica, Fuego a Augusta. Planý genotyp hrachu zastupoval JI 1794, za kulturní genotypy byly zvoleny Trendy a Arkta. V případě kulturní čočky šlo o genotyp 3339 a jako planý byl zvolen genotyp 72643. Z extraktů těchto vzorků byl

následně stanoven celkový obsah proteinů, fenolů a flavonoidů a proměřena byla aktivita peroxidasy a polyfenoloxidas.

Ze stanovených výsledků lze vyvodit následující závěry:

- Fenolické látky – více fenolů je přítomno v pigmentovaných osemeních ve srovnání s nepigmentovanými, přičemž nejvíce jich bylo naměřeno v hrachu Arkta.
- Flavonoidy – nejmenší množství bylo stanoven u bobů, u ostatních luštěnin bylo množství podobné.
- Proteiny – vyšší koncentrace byly naměřeny metodou s BCA a hodnoty získané Bradfordovou metodou jsou pravděpodobně podhodnoceny. Koncentrace proteinů v celém semeni plané čočky byly stanoveny téměř stejně. Nejvíce proteinů obsahuje celé semeno plané čočky, pak osemení genotypu Arkta a osemení bobů. Vzhledem k odhadovanému většímu zastoupení některých aminokyselin v přítomných proteinech je metoda stanovení s kyselinou bicinchoninovou pravděpodobně přesnější.
- Peroxidasa – nejaktivnější byl enzym v celém semeni plané čočky, v cizrně ICC 4958 a v planém hrachu JI 1794.
- Polyfenoloxidasa – nejaktivnější byl enzym v osemení genotypu Arkta, v osemení bobů a v čočce.
- Detekce aktivity peroxidasy a polyfenoloxasy na gelech po nativní elektroforéze nebyla úspěšná

6 LITERATURA

Adams, M. A., Buckley, T. N., Salter, W. T., Buchmann, N., Blessing, C. H., & Turnbull, T. L. (2018). Contrasting responses of crop legumes and cereals to nitrogen availability. *New Phytologist*, 217(4), 1475-1483. <https://doi.org/10.1111/nph.14918>

Aguilera, Y., Estrella, I., Benitez, V., Esteban, R. M., & Martín-Cabrejas, M. A. (2011). Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Research International*, 44(3), 774-780. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.004>

Amarowicz, R., & Shahidi, F. (2017). Antioxidant activity of broad bean seed extract and its phenolic composition. *Journal of Functional Foods*, 38, 656-662. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.002>

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>

Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A. R., & Fait, A. (2010). Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science*, 15(4), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.003>

Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14(2), 93-107. <https://doi.org/10.1079/SSR2004159>

Bailly, C., Audigier, C., Ladonne, F., Wagner, M. H., Coste, F., Corbineau, F., & Côme, D. (2001). Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany*, 52(357), 701-708. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.701>

Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., & Côme, D. (2000). Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Science Research*, 10(1), 35-42. <https://doi.org/10.1017/S0960258500000040>

- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., & Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*, 331(10), 806-814. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.022>
- Balarynová, J., Klčová, B., Sekaninová, J., Kobrlová, L., Cechová, M. Z., Krejčí, P., Leonova, T., Gorbach, D., Ihling, C., Smržová, L., Trněný, O., Frolov, A., Bednář, P., & Smýkal, P. (2022). The loss of polyphenol oxidase function is associated with hilum pigmentation and has been selected during pea domestication. *New Phytologist*, 235(5), 1807-1821. <https://doi.org/10.1111/nph.18256>
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., & Pesquet, E. (2015). The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany*, 115(7), 1053-1074. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv046>
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (1998). Types of Seed Dormancy. In *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination* (1st ed., pp. 27-47). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012080260-9/50003-8>
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2014). Types of Seeds and Kinds of Seed Dormancy. *Seeds*, 37-77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416677-6.00003-2>
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1), 1-16. <https://doi.org/10.1079/SSR2003150>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1442-1984.2000.00034.x>
- Beninger, C. W., & Hosfield, G. L. (2003). Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7879-7883. <https://doi.org/10.1021/jf0304324>
- Bewley, J. D., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2012). *Seeds* (3rd ed.). Springer New York, NY.
- Borisjuk, L., & Rolletschek, H. (2009). The oxygen status of the developing seed. *New Phytologist*, 182(1), 17-30. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02752.x>

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cousin, R. (1997). Peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research*, 53(1-3), 111-130. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00026-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00026-9)
- Duc, G. (1997). Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research*, 53(1-3), 99-109. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00025-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00025-7)
- Eum, H. L., Park, Y., Yi, T. G., Lee, J. W., Ha, K. -S., Choi, I. -Y., Park, N. I., & Šiler, B. T. (2020). Effect of germination environment on the biochemical compounds and anti-inflammatory properties of soybean cultivars. *PLOS ONE*, 15(4), 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232159>
- Fahim, J. R., Attia, E. Z., & Kamel, M. S. (2019). The phenolic profile of pea (*Pisum sativum*): a phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 173-198. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9586-9>
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501-523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., & Steber, C. (2008). Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 387-415. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740>
- Foyer, C. H., Lam, H. M., Nguyen, H. T., Siddique, K. H. M., Varshney, R. K., Colmer, T. D., Cowling, W., Bramley, H., Mori, T. A., Hodgson, J. M., Cooper, J. W., Miller, A. J., Kunert, K., Vorster, J., Cullis, C., Ozga, J. A., Wahlqvist, M. L., Liang, Y., Shou, H., et al. (2016). Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. *Nature Plants*, 2(8), 1-10. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.112>
- Fukuda, A., Shimizu, H., Shiratsuchi, H., Yamaguchi, H., Ohdaira, Y., & Mochida, H. (2015). Complementary Genes That Cause Black Ripening Hulls in F 1 Plants of Crosses between Indica

and Japonica Rice Cultivars. *Plant Production Science*, 15(4), 270-273. <https://doi.org/10.1626/pps.15.270>

Gibon, Y., Vigeolas, H., Tiessen, A., Geigenberger, P., & Stitt, M. (2002). Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *The Plant Journal*, 30(2), 221-235. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01278.x>

Giusti, F., Capuano, E., Sagratini, G., & Pellegrini, N. (2019). A comprehensive investigation of the behaviour of phenolic compounds in legumes during domestic cooking and in vitro digestion. *Food Chemistry*, 285, 458-467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.148>

Glagoleva, A. Y., Shoeva, O. Y., & Khlestkina, E. K. (2020). Melanin Pigment in Plants: Current Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 11(770), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00770>

Goffman, F. D., Alonso, A. P., Schwender, J., Shachar-Hill, Y., & Ohlrogge, J. B. (2005). Light Enables a Very High Efficiency of Carbon Storage in Developing Embryos of Rapeseed. *Plant Physiology*, 138(4), 2269-2279. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063628>

Gonçalves, J. de P., Gasparini, K., Picoli, E. A. de T., Costa, M. D. -B. L., Araujo, W. L., Zsögön, A., & Ribeiro, D. M. (2024). Metabolic control of seed germination in legumes. *Journal of Plant Physiology*, 295(295), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024.154206>

Govender, N. T., Mahmood, M., Seman, I. A., & 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), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01395>

Graham, T. L. (1991). Flavonoid and Isoflavonoid Distribution in Developing Soybean Seedling Tissues and in Seed and Root Exudates. *Plant Physiology*, 95(2), 594-603. <https://doi.org/10.1104/pp.95.2.594>

Guerriero, G., Martin, N., Golovko, A., Sundström, J. F., Rask, L., & Ezcurra, I. (2009). The RY/Sph element mediates transcriptional repression of maturation genes from late maturation to

early seedling growth. *New Phytologist*, 184(3), 552-565. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02977.x>

Gundinger, T., & Spadiut, O. (2017). A comparative approach to recombinantly produce the plant enzyme horseradish peroxidase in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 248(20), 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.003>

Hannan, R., Açıkgöz, N., & Robertson, L. D. (2001). Chickpeas (*Cicer L.*). *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*, 39, 115-124. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9823-1_6

Hendry, G. A. F., Finch-Savage, W. E., Thorpe, C. P., Atherton, N. M., Buckland, S. M., Nilsson, K. A., & Seel, W. E. (1992). Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. *New Phytologist*, 122(2), 273-279. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb04231.x>

Herbette, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J. -L., Drevet, J. R., & Roeckel-Drevet, P. (2002). Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *European Journal of Biochemistry*, 269(9), 2414-2420. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02905.x>

Hradilová, I., Duchoslav, M., Brus, J., Pechanec, V., Hýbl, M., Kopecký, P., Smržová, L., Štefelová, N., Vaclávek, T., Bariotakis, M., Machalová, J., Hron, K., Pirintsos, S., & Smýkal, P. (2019). Variation in wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) seed dormancy and its relationship to the environment and seed coat traits. *PeerJ*, 7. <https://doi.org/10.7717/peerj.6263>

Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>

Choo, T. M., Vigier, B., Ho, K. M., Ceccarelli, S., Grando, S., & Franckowiak, J. D. (2005). Comparison of black, purple, and yellow barleys. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(2), 121-126. <https://doi.org/10.1007/s10722-003-3086-4>

- Jeong, S. -C., Moon, J. -K., Park, S. -K., Kim, M. -S., Lee, K., Lee, S. R., Jeong, N., Choi, M. S., Kim, N., Kang, S. -T., & Park, E. (2019). Genetic diversity patterns and domestication origin of soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(4), 1179-1193. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3271-7>
- Kermode, A.R., Gifford, D. J., & Bewley, J. D. (1985). The Role of Maturation Drying in the Transition from Seed Development to Germination. *Journal of Experimental Botany*, 36(12), 1928-1936. <https://doi.org/10.1093/jxb/36.12.1928>
- 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>
- Leprince, O., Hendry, G. A. F., & McKersie, B. D. (1993). The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research*, 3(4), 231-246. <https://doi.org/10.1017/S0960258500001859>
- Lyu, X., Li, Y. -hui, Li, Y., Li, D., Han, C., Hong, H., Tian, Y., Han, L., Liu, B., & Qiu, L. -juan. (2023). The domestication-associated L1 gene encodes a eucomic acid synthase pleiotropically modulating pod pigmentation and shattering in soybean. *Molecular Plant*, 16(7), 1178-1191. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.06.003>
- Ma, F. (2004). Cracks in the Palisade Cuticle of Soybean Seed Coats Correlate with their Permeability to Water. *Annals of Botany*, 94(2), 213-228. <https://doi.org/10.1093/aob/mch133>
- Mathew, A. G., & Parpia, H. A. B. (1971). Food Browning as a Polyphenol Reaction, 75-145. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60031-2)
- Miyake, C., & Asada, K. (1996). Inactivation Mechanism of Ascorbate Peroxidase at Low Concentrations of Ascorbate; Hydrogen Peroxide Decomposes Compound I of Ascorbate Peroxidase. *Plant Cell Physiol*, 37(4), 423-430. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a028963>
- Muehlbauer, F. J., & McPhee, K. E. (2005). Lentil (*Lens culinaris* Medik.). In *Genetic resources and chromosome engineering and crop improvement. Grain legumes* (1st ed., pp. 219-230). CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Nikolaeva, M. G., Khan, A. A. (Ed.). (1977). Factors controlling the seeds dormancy pattern. In (Ed.), *The Physiology and biochemistry of seed dormancy and germination* (2nd ed., pp. 51-74). Elsevier.
- Pandey, A., & Dhakal, M. R. (2001). Phytomelanin in compositae. *Current Science*, 80(4), 933-940.
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 06(01), 1-16. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
- POURCEL, L., ROUTABOUL, J., 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. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.006>
- Rajjou, L., & Debeaujon, I. (2008). Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies*, 331(10), 796-805. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.021>
- Roberts, E. H. (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, 1, 499 - 514.
- Rolletschek, H., Radchuk, R., Klukas, C., Schreiber, F., Wobus, U., & Borisjuk, L. (2005). Evidence of a key role for photosynthetic oxygen release in oil storage in developing soybean seeds. *New Phytologist*, 167(3), 777-786. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01473.x>
- Romberger, J. A., Hejnowicz, Z., & Hill, J. F. (1993). *Plant structure: function and development. A treatise on anatomy and vegetative development with special reference to woody plants.* Springer.
- Sabelli, P. A. (2012). Seed Development: A Comparative Overview on Biology of Morphology, Physiology, and Biochemistry Between Monocot and Dicot Plants. *Seed Development: OMICS Technologies toward Improvement of Seed Quality and Crop Yield*, 3-25. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4749-4_1

Sandhu, J., & Singh, S. (2007). History and Origin. In *Lentil An Ancient Crop for Modern Times* (1st ed., pp. 1-9). Springer, Dordrecht.

Shirley, B. W. (1998). Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Science Research*, 8(4), 415-422. <https://doi.org/10.1017/S0960258500004372>

Shoeva, O. Y., Mock, H. -P., Kukoeva, T. V., Börner, A., Khlestkina, E. K., & Perovic, D. (2016). Regulation of the Flavonoid Biosynthesis Pathway Genes in Purple and Black Grains of *Hordeum vulgare*. *PLOS ONE*, 11(10), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163782>

Shoeva, O. Y., Mursalimov, S. R., Gracheva, N. V., Glagoleva, A. Y., Börner, A., & Khlestkina, E. K. (2020). Melanin formation in barley grain occurs within plastids of pericarp and husk cells. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56982-y>

Schwender, J., Shachar-Hill, Y., & Ohlrogge, J. B. (2006). Mitochondrial Metabolism in Developing Embryos of *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45), 34040-34047. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606266200>

Singh, A. K., Bharati, R. C., Manibhushan, N. C., & Pedpati, A. (2013). An assessment of faba bean (*Vicia faba* L.) current status and future prospect. *African Journal of Agricultural Research*, 8(50), 6634-6641. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7335>

Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2017). Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, 101, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.026>

Singh, K. B. (1997). Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research*, 53(1-3), 161-170. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00029-4)

Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125(1), 27-58. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03863.x>

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein

using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

Smýkal, P. (2019). Klíčit, nebo spát? *Vesmír*, 98(6), 362-364.

Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., Berger, J., Greene, S. L., Nelson, M. N., Besharat, N., Vymyslický, T., Toker, C., Saxena, R. K., Roorkiwal, M., Pandey, M. K., Hu, J., Li, Y. H., Wang, L. X., Guo, Y., et al. (2015). Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 43-104. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897904>

Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., Berger, J., Greene, S. L., Nelson, M. N., Besharat, N., Vymyslický, T., Toker, C., Saxena, R. K., Roorkiwal, M., Pandey, M. K., Hu, J., Li, Y. H., Wang, L. X., Guo, Y., et al. (2014). Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 43-104. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897904>

Smýkal, P., Nelson, M., Berger, J., & Von Wettberg, E. (2018). The Impact of Genetic Changes during Crop Domestication. *Agronomy*, 8(7), 1-22. <https://doi.org/10.3390/agronomy8070119>

Smýkal, P., & Parker, T. (2023). Domestication-related changes in seed dispersal and pigmentation: Visual selection and functional trait? *Molecular Plant*, 16(8), 1240-1242. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.07.007>

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(351), 1 - 44. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00351>

Stafford, H. A. (1998). Teosinte to maize—some aspects of missing biochemical and physiological data concerning regulation of flavonoid pathways. *Phytochemistry*, 49(2), 285-293. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00175-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00175-7)

Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M., Pavan, S., & Montemurro, C. (2017). Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 1-16. <https://doi.org/10.3390/ijms18020377>

- Tenhaken, R. (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 5(771), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00771>
- Terashima, N., & Fukushima, K. (1988). Heterogeneity in formation of lignin?XI: An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin. *Wood Science and Technology*, 22(3), 259-270. <https://doi.org/10.1007/BF00386021>
- Thipyapong, P., Stout, M., & Attajarusit, J. (2007). Functional Analysis of Polyphenol Oxidases by Antisense/Sense Technology. *Molecules*, 12(8), 1569-1595. <https://doi.org/10.3390/12081569>
- Tran, L. T., Taylor, J. S., & Constabel, C. P. (2012). The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-395>
- Tměný, O., Brus, J., Hradilová, I., Rathore, A., Das, R., Kopecký, P., Coyne, C., Reeves, P., Richards, C., & Smýkal, P. (2018). Molecular Evidence for Two Domestication Events in the Pea Crop. *Genes*, 9(11), 1-20. <https://doi.org/10.3390/genes9110535>
- 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(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100002>
- Veitch, N. C. (2004). Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 3-18. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047799.17604.94>
- Verdier, J., & Thompson, R. D. (2008). Transcriptional Regulation of Storage Protein Synthesis During Dicotyledon Seed Filling. *Plant and Cell Physiology*, 49(9), 1263-1271. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn116>
- Vinter, V. (2009). *Rostliny pod mikroskopem: základy anatomie cévnatých rostlin* (2., dopl. vyd). Univerzita Palackého v Olomouci.
- Vinter, V., & Macháčková, P. (2013). *Přehled morfologie cévnatých rostlin: studijní opora e-learningových vzdělávacích modulů projektu Botaska*. Univerzita Palackého v Olomouci.

Weber, H., Borisjuk, L., & Wobus, U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 253-279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144201>

Wehmeyer, N., Hernandez, L. D., Finkelstein, R. R., & Vierling, E. (1996). Synthesis of Small Heat-Shock Proteins Is Part of the Developmental Program of Late Seed Maturation. *Plant Physiology*, 112(2), 747-757. <https://doi.org/10.1104/pp.112.2.747>

Wolkers, W. F., Tetteroo, F. A. A., Alberda, M., & Hoekstra, F. A. (1999). Changed Properties of the Cytoplasmic Matrix Associated with Desiccation Tolerance of Dried Carrot Somatic Embryos. An in Situ Fourier Transform Infrared Spectroscopic Study1. *Plant Physiology*, 120(1), 153-164. <https://doi.org/10.1104/pp.120.1.153>

Pea (Pisum sativum). (2019). ThoughtCo. Retrieved April 30, 2024, from <https://www.thoughtco.com/domestication-history-of-peas-169376>

Structure of seeds. (c2024). Oakleaf gardening. Retrieved April 10, 2024, from <https://www.oakleafgardening.com/glossary-terms/structure-of-seeds>

Fava-bean. (2024). PlantIn. Retrieved April 30, 2024, from <https://myplantin.com/plant/3312>

Čočka jedlá. (2024). <https://web2.mendelu.cz/>. Retrieved April 30, 2024, from https://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/systematika/ucebni_text/system/krytosemenne/dvoud elozne/bobovite/Lens_culinaris.html

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	akrylamid
ABA	kyselina abscisová
APS	persíran amonný
BIS	N,N'-metylenbisakrylamid
GA	gibereliny
POX	polyfenoloxidasa
PPO	peroxidasa
TEMED	tetramethylendiamin