

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Analýza aktivit vybraných antioxidačních enzymů a metabolitů v průběhu vývojových fází semen hrachu setého.**

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Markéta Dokoupilová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Jana Balarynová, PhD.
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a 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. Byl/a jsem seznámen/a 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 bakaláře*

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Janě Sekaninové, Ph.D. za cenné rady, ochotu a čas, který mi věnovala. Vážím si jejího vstřícného přístupu a trpělivosti. Dále děkuji Mgr. Janě Balarynové, PhD. za cenné připomínky a rady.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Markéta Dokoupilová
Název práce	Analýza aktivit vybraných antioxidačních enzymů a metabolitů v průběhu vývojových fází semen hrachu setého
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D
Rok obhajoby práce	2021

### Abstrakt

Reaktivní částice kyslíku se vyznačují dualitou jejich účinku. V závislosti na jejich koncentraci v buňce mohou fungovat jako signální molekuly nebo naopak vést k oxidačnímu poškození. V rostlinných buňkách jsou proto přítomny systémy regulující jejich koncentraci. Reaktivní částice kyslíku se podílí i na ukončení fyzikální dormance, která je typická pro bobovité rostliny. V této práci jsem se zaměřila na popis osemení, shrnutí dosud zjištěných informací o fyziologických účincích reaktivních forem kyslíku. Zabývala jsem se antioxidačními enzymy a jejich způsobem odstraňování reaktivních částic kyslíku. Aktivita vybraných antioxidačních enzymů měla být stanovena spektrofotometricky. Měly být měřeny parametry oxidačního stresu (celková antioxidační kapacita, lipidická peroxidace) a histochemickou metodou mělo být určeno místo produkce reaktivních částic kyslíku v osemení dormantních a nedormantních genotypů hrachu setého. Experimentální měření kvůli pandemické situaci spojené s Covid-19 onemocněním nemohlo být uskutečněno.

Klíčová slova	Reaktivní částice kyslíku, klíčení a dormance semen, antioxidační enzymy, hrách setý
Počet stran	56
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Markéta Dokoupilová
Title	Analysis of the activities of selected antioxidant enzymes and metabolites during the developmental stages of pea seeds
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D
The year of presentation	2021

### Abstract

Reactive oxygen species are characterized by their dual function in cells. According to the reactive oxygen species concentration, they can function as signal molecules, or they can lead to the oxidative damage. Therefore, there are antioxidant enzymes systems present in plant cells, regulating reactive oxygen species concentration. Reactive oxygen species are involved in releasing physical dormancy, which is typical for legumes. In this work, structure of testa was described, information about physiology effects of reactive oxygen species was summarized and manners of scavenging enzymes were characterized. Activity of chosen antioxidant enzymes was supposed to be measured spectrophotometrically. Parameters of oxidative stress (lipidic oxidation, total antioxidant capacity) should have been also measured. Localization of production of reactive oxygen species should have been detected using histochemical method. Found parameters should have been compared in testa of dormant and nondormant seeds of *Pisum sativum L.*

Keywords	Reactive oxygen species, germination and seed dormancy, antioxidant enzymes, pea
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Czech

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Reaktivní částice kyslíku</b> .....	2
<b>3</b>	<b>Produkce ROS</b> .....	3
3.1	Neenzymová produkce ROS .....	3
3.2	Enzymová produkce ROS .....	4
<b>4</b>	<b>Lokalizace produkce ROS</b> .....	5
4.1	Mitochondrie .....	5
4.2	Chloroplasty .....	6
4.3	Peroxisomy .....	6
4.4	Endoplazmatické retikulum .....	8
4.5	Plazmatická membrána .....	8
<b>5</b>	<b>Srovnání ROS</b> .....	10
<b>6</b>	<b>Fyziologické účinky ROS</b> .....	12
6.1	Vliv na klíčení a dormanci .....	12
6.2	Obranné mechanismy .....	13
6.3	Lipidická peroxidace .....	14
6.4	Poškození DNA .....	15
6.5	Poškození proteinů .....	15
<b>7</b>	<b>Katabolismus reaktivních částic kyslíku</b> .....	16
<b>8</b>	<b>Peroxidasy</b> .....	17
8.1	Gluthathionperoxidasa (GPX, EC 1.11.1.9 a EC 1.11.1.12) .....	17
8.2	Askorátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11) .....	20
8.3	Guajakolperoxidasa (GuPOX, EC 1.11.1.7) .....	22
<b>9</b>	<b>Katalasa (CAT, EC 1.11.1.6)</b> .....	23
<b>10</b>	<b>Superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1)</b> .....	24
<b>11</b>	<b>Vývoj a struktura semene</b> .....	25
11.1	Osemení .....	26
11.2	Endosperm a embryo .....	28
<b>12</b>	<b>Klíčení a dormance</b> .....	29
<b>13</b>	<b>Charakteristika studovaného rostlinného materiálu</b> .....	32
<b>14</b>	<b>Experimentální část</b> .....	33
14.1	Použité přístroje .....	33
14.2	Použité roztoky a chemikálie .....	33
14.3	Příprava rostlinného materiálu .....	34
14.4	Použité metody .....	35
14.4.1	Stanovení celkové antioxidační kapacity .....	35
14.4.2	Stanovení aktivity peroxidasy .....	37

14.4.3	Stanovení celkových proteinů dle Bradforda.....	37
14.5	Plánované metody .....	39
14.5.1	Stanovení aktivity askorbátperoxidasy .....	39
14.5.2	Histochemická detekce produkce ROS.....	39
14.5.3	Stanovení lipidické peroxidace metodou TBARS .....	39
<b>15</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>41</b>
<b>16</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>45</b>
<b>17</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>46</b>
<b>18</b>	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>55</b>
<b>19</b>	<b>Seznam grafických objektů .....</b>	<b>56</b>

## **Cíle práce**

Cílem teoretické části bakalářské práce byla literární rešerše s klíčovými slovy: dormance, reaktivní částice kyslíku, antioxidační enzymy, osemení, klíčení.

Experimentální část měla být věnována stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů v osemení dormantních a nedormantních genotypů hrachu setého, histochemickou metodou s využitím kryomikrotomu mělo být lokalizováno místo produkce reaktivních částic kyslíku v osemení studovaných genotypů, metodou TBARS měla být určena míra lipidické peroxidace a metodou dle Bradforda měla být stanovena koncentrace celkových proteinů ve vzorcích osemení. Kvůli pandemické situaci spojené s onemocněním Covid-19 nebylo možné experimentální část provést.



# 1 Úvod

Dlouhou dobu byly reaktivní částice kyslíku (ROS) považovány za toxické metabolity vznikající jako vedlejší produkty buněčného metabolismu. K jejich zvýšené produkci dochází převážně vystavením rostlin abiotickému či biotickému stresu. Zvýšené koncentrace ROS mohou vést k oxidačnímu poškození jako je lipidická peroxidace, oxidace proteinů, oxidace nukleových kyselin a v některých případech až k programované buněčné smrti (Møller *et al.*, 2007). Rostliny k udržování stálé koncentrace ROS vyvinuly řadu antioxidačních systémů, mezi které se řadí např. enzymy askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11) a guajakolperoxidasa (GuPOX, EC 1.11.1.7), jejichž aktivity měly být v rámci experimentální části měřeny. Bylo zjištěno, že reaktivní částice kyslíku mohou v rostlinách zastávat funkci signálních molekul, kontrolujících různé procesy jak ve vývoji semen, tak i v průběhu života rostliny. Jako signální molekula funguje převážně peroxid vodíku, který je schopný procházet přes biologické membrány (Bienert *et al.*, 2006).

Reaktivní částice kyslíku se také podílí na ukončení dormance (Oracz *et al.*, 2007). Dormance je klidové stádium, které předchází samotnému procesu klíčení. Existuje více druhů dormance. Uvolnění dormance je komplexní proces, na kterém se podílí řada faktorů, endogenních i exogenních. U fyzikální dormance, typické pro bobovité rostliny, je jedním z regulujících faktorů osemení semene. Bylo zjištěno, že osemení semene hrachu vykazuje antioxidační aktivitu (Troszyńska *et al.*, 2002).

Cílem práce bylo objasnit zapojení reaktivních částic kyslíku do procesu uvolnění fyzikální dormance u dormantních a nedormantních genotypů hrachu.

## 2 Reaktivní částice kyslíku

Molekulární kyslík je biradikál, jeho valenční orbitály jsou obsazeny nepárovými elektrony s paralelním spinem (Obr. 1). Aby byl molekulární kyslík v základním stavu schopný oxidovat atom nebo molekulu, musela by daná částice obsahovat nepárové elektrony s opačným spinem než má kyslík, což je málo pravděpodobné. Právě tato vlastnost činí molekulární kyslík málo reaktivním (Cadenas, 1989). Kyslík v základním stavu může být však přenosem energie nebo reakcemi elektronového přenosu převeden na reaktivnější formy. Mezi reaktivní formy kyslíku se řadí superoxidový anion radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), hydroxylový radikál ( $OH^{\cdot}$ ) a singletový kyslík ( $^1O_2$ ) (Klotz, 2002).

Reaktivní částice kyslíku (ROS) vyskytující se v rostlinné buňce se liší místem a důvodem vzniku. Některé ROS vznikají jako vedlejší produkty aerobních metabolismů, jiné jako buněčná odpověď na stres. ROS se významně podílí na stárnutí semene (Bailly, 2004).

ROS mohou být rostlinou produkovány i cíleně. Bylo zjištěno, že slouží jako signální molekuly kontrolující různé procesy jak ve vývoji semene, tak i v průběhu života rostliny. Tyto procesy zahrnují klíčení (Barba-Espín *et al.*, 2011), ukončení dormance (Oracz *et al.*, 2007), obranu proti patogenům (Hammond-Kosack a Jones, 1996), programovanou buněčnou smrt (Fath *et al.*, 2001), zavírání a otevírání průduchů (Zhang *et al.*, 2001) a gravitropismus (Joo *et al.*, 2001).

$2p\pi^*$	$\uparrow$ $\uparrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow$	$\uparrow\downarrow$ $\circ$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$
$2p\pi$	$\downarrow\uparrow$ $\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$ $\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$ $\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$ $\downarrow\uparrow$
$2p\sigma$	$\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$
$2s\sigma^*$	$\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$
$2s\sigma$	$\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$	$\downarrow\uparrow$
	$O_2$	$O_2^{\cdot-}$	$^1O_2$	$O_2^{2-}$

Obr. 1: Schematické znázornění elektronové konfigurace kyslíku, superoxidového anion radikálu, singletového kyslíku a peroxidové anionu (převzato a upraveno z Halliwell, 2006).

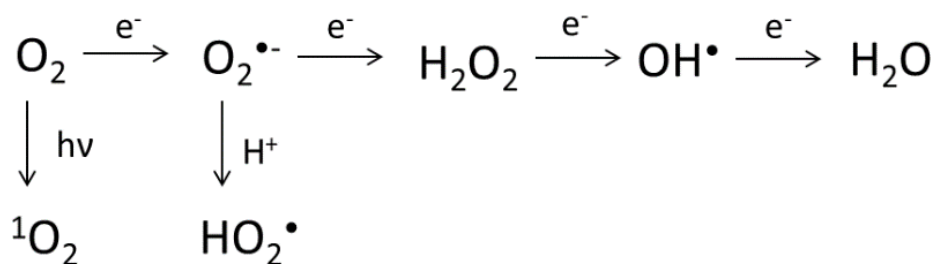
### 3 Produkce ROS

Produkce ROS v biologických systémech je možná enzymově nebo i bez účasti enzymů, záleží na vývojovém stádiu semene a obsahu vody (Mittler *et al.*, 2011). V podmínkách za nedostatku kyslíku (abiotický stres) je rozhodujícím faktorem pro tvorbu ROS právě koncentrace kyslíku. Neenzymová redukce kyslíku je možná ještě při koncentraci kyslíku  $c = 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ . Pro produkci superoxidového radikálu za pomoci enzymů je nutná koncentrace kyslíku vyšší než  $10^{-6} \text{ mol.l}^{-1}$  (Skulachev, 1997). ROS nemusí vznikat přímo v rostlině, ale mohou být rostlinou přijímány z okolí. Zdrojem ROS z prostředí je ozon nebo oxid siřičitý (Møller *et al.*, 2007).

#### 3.1 Neenzymová produkce ROS

Singletový kyslík vzniká z málo reaktivního atmosférického kyslíku přijetím dostatečně velké energie, která způsobuje obrácení spinu jednoho z nepárových elektronů (Klotz, 2002).

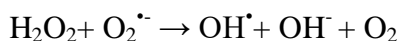
Jednotlivé formy ROS mohou být redukovány za vzniku jiných druhů ROS (Obr. 2). Kyslík může být aktivován jednoelektronovou redukcí za vzniku superoxidu. Superoxidový anion radikál vzniklý redukcí kyslíku je následnou redukcí převeden na peroxid vodíku, který může v tzv. Haber Weissově reakci tvořit hydroxylový radikál. Redukcí hydroxylového radikálu vzniká voda (Haber a Weiss, 1934).



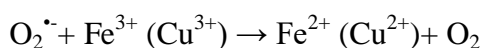
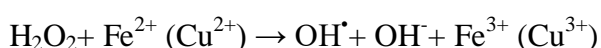
Obr. 2: Jednoelektronová redukce reaktivních částic kyslíku (převzato a upraveno z Apel a Hirt, 2004).

Haber Weissova reakce je založena na reakci peroxidu vodíku se superoxidovým anion radikálem. Je to pomalá reakce, která netvoří dostatečné množství hydroxylového radikálu. Vznik většího množství hydroxylového radikálu je umožněn zahrnutím oxidace iontů přechodných kovů, jako je železo nebo měď, v tzv. Fentonově reakci. Oxidované ionty kovů jsou regenerovány redukcí superoxidovým anion radikálem (Fenton, 1894).

Haber Weissova reakce:



Fentonova reakce:



Rostlinná buňka předchází nadbytečné tvorbě hydroxylového radikálu ve Fentonově reakci tím, že přechodné kovy jsou vázány na metalochaperony. Koncentrace jejich volné formy je touto vazbou snížena (Møller *et al.*, 2007).

### 3.2 Enzymová produkce ROS

Na vzniku reaktivních částic kyslíku se podílí i enzymy. V peroxisomech je za vznik superoxidového anion radikálu zodpovědná xantinoxidasa (EC.1.1.3.22). Superoxiddismutasa (SOD, EC.1.15.1.1) převádí superoxid na peroxid vodíku. Koncentrace peroxidu vodíku je regulována pomocí katalasy (CAT, EC 1.11.1.6) nebo peroxidasy, které jsou přítomny v téměř všech kompartmentech rostlinné buňky. To znamená, že některé enzymy se nejenom podílí na produkci ROS, ale zároveň i regulují koncentraci ROS. Fungují jako antioxidanty (Lamb a Dixon, 1997).

Dalším možným způsobem vzniku ROS je lipidická peroxidace. Lipoxygenasa (LOX, EC.1.13.11.12) katalyzuje dioxygenaci polynenasycených mastných kyselin (Rosahl, 1995). Vzniklé hydroperoxyderiváty mohou být autokatalyticky degradovány za vzniku volných radikálů (Kanofsky a Axelrod, 1986).

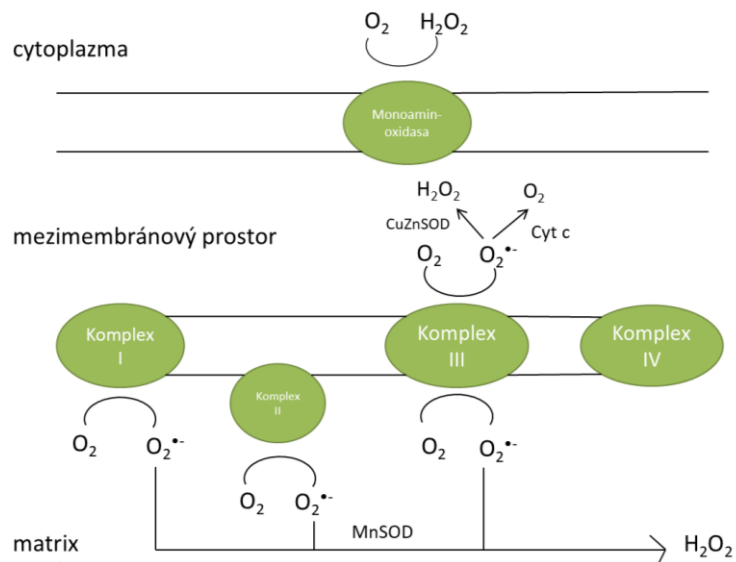
## 4 Lokalizace produkce ROS

Produkce a akumulace ROS v semenech rostlin je ovlivněna metabolickým a fyziologickým stavem daného semene. Důležitým faktorem je obsah vody v semenu. Hlavními zdroji ROS v hydratovaném stavu jsou mitochondrie, peroxisomy a plazmatická membrána. U suchých semen je enzymová aktivita velmi nízká a zdrojem ROS se tak stává lipidická peroxidace (Bailly 2004).

V zelených částech rostlin jsou obecně za jedny z nejvýznamnějších zdrojů reaktivních částic kyslíku považovány chloroplasty a peroxisomy (Foyer a Noctor, 2003). V nezelených částech rostlin jsou hlavním producentem ROS mitochondrie (Maxwell *et al.*, 1999).

### 4.1 Mitochondrie

Při vývoji nebo při klíčení semen jsou mitochondrie pravděpodobně jedním z hlavních producentů ROS. Elektrony z elektronového transportního řetězce mohou být uvolněny a zapříčinit redukci molekulárního kyslíku za vzniku superoxidového anion radikálu (Møller, 2001). Superoxidový anion radikál vzniká převážně v komplexu I a v komplexu III respiračního řetězce. Působením superoxidodismutasy dochází k přeměně superoxidu na peroxid vodíku. V matrix mitochondrie je přítomná superoxidodismutasa s manganem v aktivním místě, v mezimembránovém prostoru se nachází superoxidodismutasa s mědí a zinkem jako kofaktory (Obr. 3) (Turrens, 2003; Kowaltowski *et al.*, 2009). Vznik superoxidového anion radikálu v elektronovém transportním řetězci je podpořen nízkou teplotou (Shu-Hsien *et al.*, 2005).



Obr. 3: Schéma produkce ROS v mitochondriích. Hlavními místy produkce superoxidového anion radikálu v mitochondriích jsou komplex I a komplex II. Superoxidový anion radikál podléhá spontánní dismutaci, nebo dismutaci katalyzované superoxidddismutasou, vzniká peroxid vodíku. Superoxidový anion radikál může být také redukován cytochromem c na molekulární kyslík; MnSOD= superoxidddismutasa s manganem v aktivním místě, CuZnSOD= superoxidddismutasa s mědí a zinkem v aktivním místě (převzato a upraveno z Turrens, 2003).

## 4.2 Chloroplasty

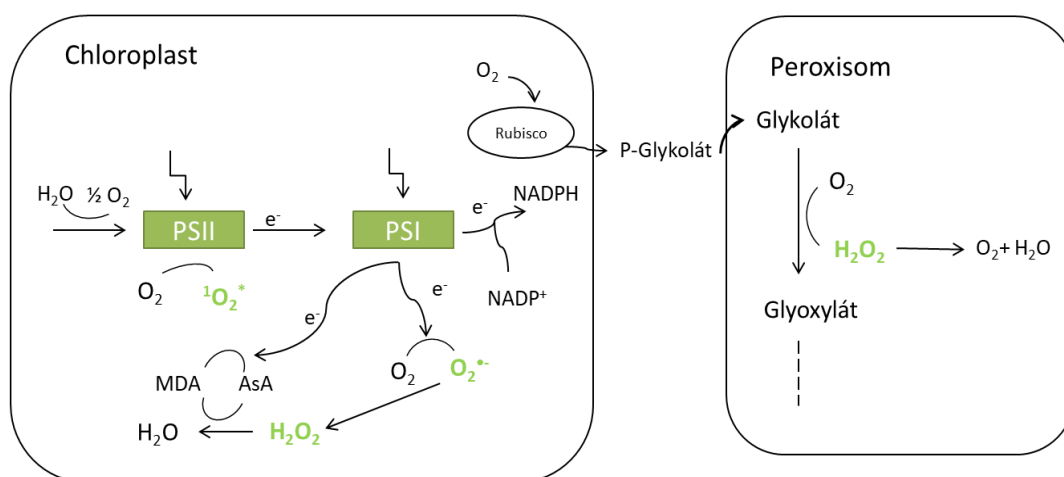
V souvislosti s vývojem semen jsou chloroplasty aktivní v tvorbě ROS pouze na počátku tohoto procesu, v průběhu se rychle stávají neaktivními (El-Maarouf-Bouteau a Bailly, 2008). Chloroplasty jsou pomocí chlorofylu schopné absorbovat světelná kvanta. Obsahují velké množství energie, která může být přenesena na kyslík v základním stavu za vzniku singletového kyslíku. Přenosem 4 elektronů z molekuly vody na reakční centrum fotosystému II dochází k uvolnění kyslíku v základním stavu. Vznikající kyslík může být redukován únikem elektronů z reakčního centra PS II nebo Mehlerovou reakcí ve fotosystému I, kde přijetím dostatečně velké energie dochází k obrácení spinu valenčního elektronu, vzniká singletový kyslík. (Mehler, 1951; Apel a Hirt, 2004). Primární produkt superoxidový anion radikál je následně přeměněn na hydroxylový radikál nebo na peroxid vodíku pomocí superoxidddismutasy nebo procesem spontánní dismutace (Makino *et al.*, 2002).

## 4.3 Peroxisomy

V peroxisomech vzniká superoxidový anion radikál jako vedlejší produkt metabolismu. Enzymově katalyzovanou oxidací xanthinu a hypoxanthinu v matrix peroxisomu vzniká kyselina močová a souběžně dochází k uvolňování právě superoxidového anion

radikálu. Superoxidový anion radikál vzniká také v membráně peroxisomu za účasti malého transportního řetězce tvořeného flavoproteinovou NADH: ferrichelátreduktasou (EC. 1.16.1.7) a cytochromem b (Bolwell a Wojtaszek, 1997).

V peroxisomech dochází ke tvorbě peroxidu vodíku jako vedlejšího produktu během  $\beta$ -oxidace, katalyzované enzymem acyl-CoA-oxidasou (EC 1.3.3.6) (Arent *et al.*, 2008), fotorespirace (Douce a Neuburger, 1999) a detoxifikace siřičitanů působením sulfitoxidasy (EC.1.8.3.1) (Hänsch *et al.*, 2006). Při fotorespiraci je glykolát oxidasou (EC 1.1.3.15) přeměňován glykolát, vzniklý v chloroplastech, na glyoxylát (Obr. 4) (Douce a Neuburger, 1999).



Obr. 4: Schéma produkce ROS v chloroplastech a peroxisomech. Kyslík je v PSI redukován na superoxid, který za katalýzy superoxididismutasy přechází v peroxid vodíku. Peroxid vodíku je pomocí askorbátperoxidasy redukován na vodu. Přijetím dostatečné energie v PSII vzniká singletový kyslík. V peroxisomu vzniká peroxid vodíku jako vedlejší produkt oxidace glykolátu; MDA= malondialdehyd, AsA= askorbát (převzato a upraveno z Apel a Hirt, 2004).

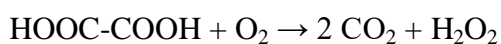
#### 4.4 Endoplazmatické retikulum

Endoplazmatické retikulum je systém tubulů. Probíhá zde skládání proteinů a posttranslační modifikace jako je například glykosylace a tvorba disulfidových můstků. Proteindisulfidisomerasa (PDI, EC 5.3.4.1) je enzym který se podílí na tvorbě disulfidových vazeb. V aktivním místě obsahuje cystein, který je během tvorby disulfidové vazby redukován za současné oxidace substrátu. Studie endoplazmatického retikula kvasinek prokázala přítomnost dalšího enzymu, ER oxidoreduktinu (ERO1), který oxiduje PDI. Samotný ERO1 je regenerován kyslíkem, vzniká tak peroxid vodíku. To znamená, že na tvorbě ROS se v endoplazmatickém retikulu podílí hlavně proteiny obsahující disulfidovou vazbu (Pollard *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 2001).

#### 4.5 Plazmatická membrána

Při napadení rostliny patogenem je hlavním místem výskytu ROS apoplast. Plazmatická membrána obsahuje četné imunitní receptory, aktivací těchto receptorů dochází k rychlé buněčné odpovědi ve formě zvýšení koncentrace vápenatých iontů uvnitř buňky, aktivace MAPkinas, alkalizace extracelulárního prostředí a právě také přechodného zvýšení produkce ROS. V plazmatické membráně vzniká superoxidový anion radikál jednoelektronovou redukcí kyslíku katalyzovanou rostlinným homologem savčí NADPHoxidasy (EC. 1.6.3.1), superoxid je uvolněn do extracelulárního prostředí. Donorem elektronů je NADPH. Superoxidový anion radikál je pak spontánně nebo pomocí superoxidodismutasy převeden na peroxid vodíku. (Morel *et al.*, 1991; Qi *et al.*, 2017).

Příkladem oxidasy přítomné v plazmatické membráně je oxalát oxidasa (EC 1.2.3.4), která katalyzuje dekarboxylaci oxalátu, vzniká oxid uhličitý a peroxid vodíku. Vysoké koncentrace solí, methyljasmonát a salicylát indukují expresi genů oxalát oxidasy (Hurkman a Tanaka, 1996).

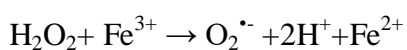
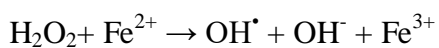
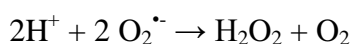
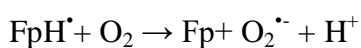
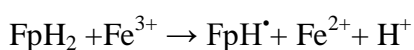


Inhibicí NADPHoxidasy se snižuje nebo úplně blokuje produkce superoxidového anion radikálu, která byla vyvolaná biotickým nebo abiotickým stresem (Allan a Fluhr,



1997). Jednou z hlavních funkcí ROS přítomných v apoplastu je regulace otevírání a zavírání stomat (Yao *et al.*, 2013).

Superoxidové anion radikály mohou také vznikat při oxidaci NADH pomocí flavoproteinů, který ve své struktuře obsahuje ionty železa. Redukovaný flavoprotein redukuje železité ionty, vzniklá radikálová forma flavoproteinů reaguje s kyslíkem za produkce superoxidového anion radikálu. Superoxidový anion radikál může dismutovat na peroxid vodíku, který reakcí s železnatými ionty produkuje hydroxylový radikál. Reakcí peroxidu vodíku s železitými ionty vzniká opět superoxidový anion radikál (Vianello *et al.*, 1990).



## 5 Srovnání ROS

Reaktivní formy kyslíku se liší svými vlastnostmi, reaktivitou a koncentrací, při které jsou pro buňku toxické. Toxicita ROS není ovlivněna pouze jejich odlišnou reaktivitou, ale je dána i jejich schopností procházet přes biologické membrány (Obr. 5) (Gus' kova *et al.*, 1984).

Peroxid vodíku je relativně stabilní, je schopný procházet přes membrány pomocí aquaporinů a jeho poločas rozpadu je oproti ostatním ROS delší. Právě tyto vlastnosti umožňují peroxidu vodíku fungovat jako signální molekula (Bienert *et al.*, 2006). V rostlinných buňkách hraje peroxid vodíku dvojí roli. V nízkých koncentracích funguje jako signální molekula, která spouští rostlinnou odpověď na stres. Ve vyšších koncentracích zapříčiňuje programovanou buněčnou smrt (van Breusegem a Dat, 2006).

Hydroxylový radikál je ve srovnání s peroxidem vodíku mnohem reaktivnější, jeho poločas rozpadu je kratší. V buňce neexistuje žádný antioxidační enzym, který by hydroxylový radikál přímo odstraňoval (Puntarulo *et al.*, 1988).

Superoxidový anion radikál je oproti hydroxylovému radikálu méně reaktivní. Nižší reaktivita koresponduje s délkou poločasu rozpadu. Redukuje chinony a komplexy železa a mědi, proto ovlivňuje převážně aktivitu enzymů obsahujících ionty těchto kovů. Neprochází přes biologické membrány a funguje jako oxidační i redukční činidlo. Superoxidový anion radikál se v živých systémech nachází i v protonované formě, jedná se o perhydroxylový radikál ( $O_2H^{\bullet}$ ). Na rozdíl od superoxidového anion radikálu je schopný procházet lipidovou dvojvrstvou biologických membrán, je totiž více hydrofobní. Podílí se na lipidické peroxidaci (Gusk'ova *et al.*, 1984; Vránová *et al.*, 2002). Singletový kyslík reaguje zejména s konjugovanými dvojnými vazbami (Møller *et al.*, 2007).

V suchých semenech je transport ROS omezen. Existují dvě hypotézy vysvětlující fungování ROS jako signální molekuly. První z nich navrhuje existenci hydratovaných kapes, ve kterých by byly ROS díky vodě schopné difuze. Druhá hypotéza tvrdí, že ROS jsou v suchém stádiu semena akumulovány na jednom místě a až po vstřebání vody semenem jsou schopny přenášet signál (El-Maarouf-Bouteau a Billy, 2008).

ROS	Prostupnost přes membrány	Poločas rozpadu	Biologický efekt
Peroxid vodíku	ano	1 ms	Inaktivace enzymů Calvinova cyklu, substrát oxidačních reakcí, signální molekula
Hydroxylový radikál	-	< 1 $\mu$ s	Velmi silné oxidační činidlo, peroxidace lipidů, degradace proteinů, NK
Superoxidový anion radikál	ne	2-4 $\mu$ s	Peroxidace lipidů, schopnost redukovat cytochrom c, ionty kovů, chinony
Singletový kyslík	-	4 $\mu$ s	Peroxidace lipidů, fotooxidace AMK

Obr. 5: Tabulka srovnání ROS. Přehled biologických efektů, poločasu rozpadu a prostupností přes membrány jednotlivých druhů ROS, u hydroxylového radikálu a singletového kyslíku nebyla zjištěna schopnost prostuposti (převzato a upraveno z Piterková *et al.*, 2005).

## 6 Fyziologické účinky ROS

Zvýšená koncentrace ROS způsobuje lipidickou peroxidaci, oxidaci proteinů, která může způsobovat např. změnu enzymové aktivity, a oxidaci nukleových kyselin vedoucí k mutagenезi nebo programované buněčné smrti (Masters, 1996; Valko *et al.*, 2006). Na druhou stranu jsou ROS považovány za signální molekuly, které jsou zapojeny do řady procesů. Je proto důležité udržovat rovnováhu mezi produkcí a odstraňováním ROS (Kapoor *et al.*, 2019).

### 6.1 Vliv na klíčení a dormanci

ROS interagují s rostlinnými hormony ovlivňujícími klíčení a dormanci. Mezi tyto hormony se řadí kyselina abscisová, gibereliny, ethylen a auxiny. Aktivita detoxifikačních enzymů je snižována gibereliny, které podporují klíčení a procesy následující po klíčení. Během klíčení se tedy obsah ROS v semenu zvyšuje. Kyselina abscisová naopak aktivitu antioxidantních systémů podporuje (Müller *et al.*, 2009). Produkce ROS a antioxidantů je také regulována auxiny (Tognetti *et al.*, 2010).

Reaktivní formy kyslíku se podílí na ukončení dormance semen a vyvolání klíčení také tím, že aktivují oxidační fázi pentosafosfátové dráhy. Působením ROS dochází ke karboxylaci proteinů, což je nevratný proces, který vede ke ztrátě funkce proteinu. Karboxylace proteinů je spojována s ukončením klíčení. Také byla prokázána korelace mezi koncentrací peroxidu vodíku a genovou expresí MAPkinas, které mají klíčovou roli v růstu a vývoji rostlin (Barba-Espín *et al.*, 2011).

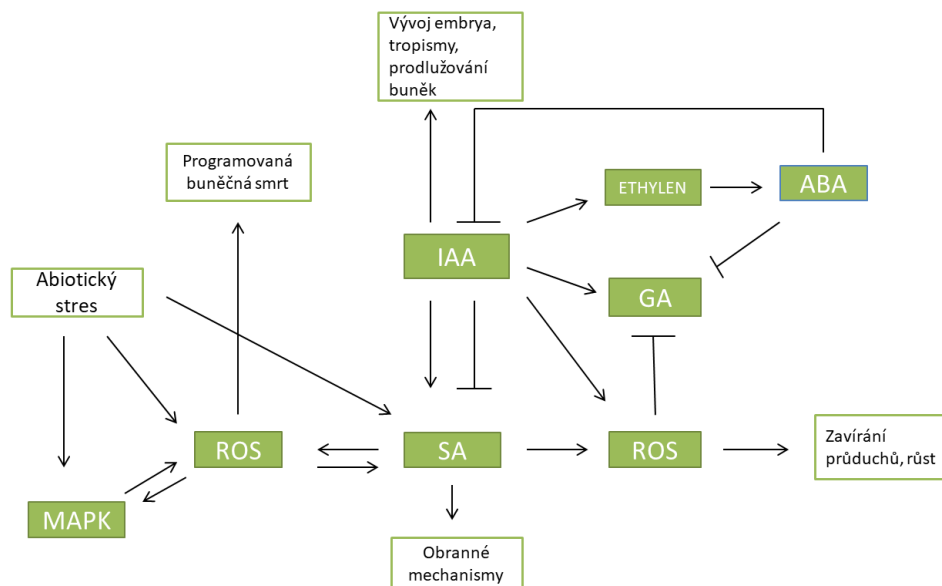
Buněčná stěna rostlinných buněk obsahuje polysacharidy. Hydroxylový radikál je schopný tyto polysacharidy oxidovat a tím je štěpit na kratší řetězce. Díky oxidačnímu štěpení polysacharidů dochází k rozvolňování buněčné stěny a následné elongaci buněk (Schweikert *et al.*, 2002). Produkce hydroxylového radikálu v buněčných stěnách je katalyzovaná apoplastickými peroxidasami (Liszkay *et al.*, 2003). Aktivita apoplastické askorbátperoxidasy je podpořena přítomností mědnatých iontů nebo peroxidu vodíku. Tím že snižuje dostupnost peroxidu vodíku pro jiné peroxidasy, udržuje plasticitu buněčné stěny. Působením askorbátperoxidasy dochází také k biosyntéze oxalátu. Oxalát odstraňuje vápenaté ionty z apoplastu, nepřítomnost vápenatých iontů vede ke snížení imobilizace pektinů závislých na vápenatých iontech. Následkem toho je snížení zpevnování buněčné stěny (Davey *et al.*, 2000).

## 6.2 Obranné mechanismy

Existuje řada obranných mechanismů rostlin vyvolaná útokem patogenů, která slouží buď k posílení a ochraně napadeného místa, nebo k přímému usmrcení patogenů. Mezi obranné mechanismy, které vedou k zabránění průniku patogenů, se řadí lignifikace, suberinizace a biosyntéza kalosy. Phytoalexiny, hydrolytické enzymy, deriváty chinonů a třísloviny slouží jako toxické sloučeniny poškozující nebo usmrcující patogeny.

Oxidace rostlinných fenolů je závislá na přítomnosti peroxidu vodíku, který slouží jako substrát pro peroxidasy a polyfenoloxidas, katalyzující poslední krok lignifikace. Peroxid vodíku a jeho deriváty se také podílí na posilování buněčné stěny tím, že zprostředkovávají oxidační zesíťování proteinů. Polyfenoloxida je považována za klíčový enzym asociovaný s oxidací rostlinných fenolů. Zvýšená aktivita může rostlině poskytnout větší rezistenci proti patogenům. V buňkách je totiž přítomno větší množství oxidovaných derivátů chinonů, které brání růstu patogenů (Bradley *et al.*, 1992, Tyagi *et al.*, 2000).

Zvýšené koncentrace ROS mohou iniciovat programovanou buněčnou smrt (Apostol *et al.*, 1989). Kyselina salicylová se také účastní obranných mechanismů a iniciace buněčné smrti. Zvýšené koncentrace ROS způsobují akumulaci právě kyseliny salicylové. Inhibicí biosyntézy kyseliny salicylové by bylo možné předcházet obranným mechanismům indukovaných pomocí ROS. To naznačuje provázanost působení těchto látek (Obr. 6)(Chamnongpol *et al.*, 1998). Metabolismus ROS a auxinů vede k morfologickým změnám, které napomáhají zabránit škodlivým vlivům prostředí, příkladem je zavírání průduchů vlivem sucha (Khokon *et al.*, 2011).



Obr. 6: Schéma demonstrující provázanost ROS s rostlinnými hormony. SA= kyselina salicylová, IAA= auxiny, GA= gibereliny, ABA= kyselina abscisová (převzato a upraveno z Mittler *et al.*, 2011)

### 6.3 Lipidická peroxidace

Lipidická peroxidace je metabolický proces, způsobený zvýšenou koncentrací ROS. Polynenasycené mastné kyseliny jsou součástí membránových lipidů. Hydroxylový radikál nebo singletový kyslík zahajují lipoperoxidaci tím, že reagují s methylenovou skupinou polynenasycených mastných kyselin, vznikají tak radikály polynenasycených mastných kyselin. Přeskupením vazeb takto vzniklých radikálů se tvoří konjugované dieny. Dieny reagují s kyslíkem za vzniku lipidových peroxylových radikálů. Lipidové peroxylové radikály jsou schopné reagovat s dalšími polynenasycenými mastnými kyselina za vzniku hydroperoxidů a dalších peroxylových radikálů (Smirnhoff, 1995). Vznikají také aldehydy, které mohou interagovat s DNA. Jedná se o malondialdehyd (MDA), který oxiduje guanin za tvorby dalšího aromatického kruhu (Wauchope *et al.*, 2018).

Vzniklé hydroperoxydy ovlivňují vlastnosti membrány, dochází ke snížení fluidity membrány, zvýšení propustnosti (Alonso *et al.*, 1997) a poškození membránových proteinů. Lipidická peroxidace je regulována už na úrovni výstavby membrány. Lipidy v lipidové dvojvrstvě jsou organizovány tak, aby bylo lipidické peroxidaci předcházeno. Mobilita a stupeň nenasycenosti lipidů jsou regulujícími faktory (Møller *et al.*, 2007).

Zkrácení délky života semen je připisována nadměrné akumulaci ROS a s tím spojenému oxidačnímu poškození. Ztráta schopnosti antioxidačních systémů detoxifikovat ROS vede během imbibice k nekontrolovanému oxidačnímu poškození (Bailly *et al.*, 2008).

## 6.4 Poškození DNA

Oxidace DNA způsobená působením ROS vede k modifikaci purinových a pyrimidinových bází. Nejreaktivnější je hydroxylový radikál. Singletový kyslík přednostně napadá guanin a peroxid vodíku se superoxidovým anion radikálem s DNA vůbec neinteragují. Nejčastěji pozorovanou modifikací je 8-hydroxyguanin. ROS mohou DNA modifikovat i nepřímo působením produktů již zmíněné lipidické peroxidace (Møller *et al.*, 2007). Malondialdehyd, produkt lipidické peroxidace, je elektrofil, který reaguje s DNA za tvorby různých aduktů. Nejhojněji vyskytující se adukt je M<sub>1</sub>DG (3- (2- deoxy-β-D-erythropentofuranosyl) pyrimido[1,2 – α]purin-10(3H)-1. Zvýšení oxidačního stresu vede k přímému zvýšení obsahu M<sub>1</sub>DG v mitochondriální DNA. Mitochondriální DNA podléhá oxidačnímu poškození snadněji než jaderná DNA a míra somatických mutací u mitochondriální DNA je 10-20krát vyšší než v případě jaderné DNA (Wauchope *et al.*, 2018).

## 6.5 Poškození proteinů

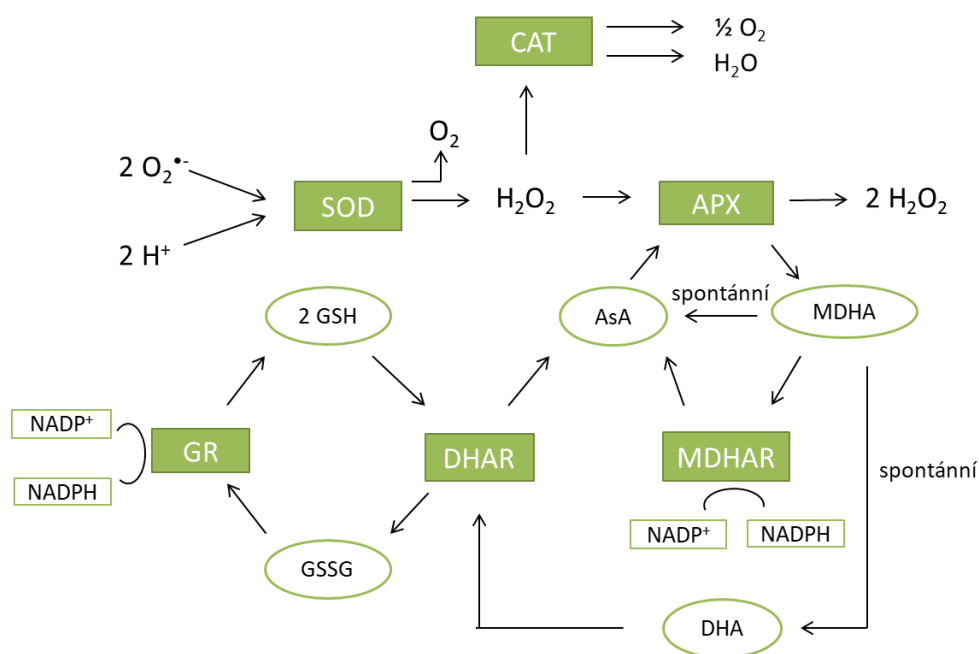
Superoxidový anion radikál je toxický pro proteiny obsahující vazbu Fe-S. Oxidací tyto proteiny inaktivuje, současně se uvolní železnaté ionty a peroxid vodíku. Uvolněné ionty železa a peroxidu vodíku mohou reagovat v Haber Weissově nebo Fentonově reakci za tvorby hydroxylového radikálu, který oxiduje proteiny, DNA a lipidy. Dojde k amplifikaci oxidačního poškození (Ott *et al.*, 2007).

## 7 Katabolismus reaktivních částic kyslíku

Pokud je rostlina vystavena biotickému nebo abiotickému stresu, dochází ke zvýšení koncentrace ROS. Důležitou roli v regulaci ROS hrají antioxidantní systémy. Jejich zvýšená aktivita vede k detoxifikaci ROS a redukci oxidačního poškození, ke kterému dochází zvýšením koncentrace ROS. (Young a Woodside, 2001).

Rostliny vyvinuly hned několik antioxidantních systémů, jak enzymových tak i neenzymových (Obr. 7). Mezi neenzymové antioxidanty se řadí karotenoidy, vitamín E, glutathion (GSH) a askorbát (AsA). Antioxidantní enzymy jsou superoxidodismutasa (SOD), katalasa (CAT), askorbátperoxidasa (APX) glutathionperoxidasa (GPX) a guajakolperoxidasa (GuPOX) (Kapoor *et al.*, 2019).

Redoxní ekvivalenty potřebné k redukci ROS jsou převážně získávány přímo nebo nepřímo z NADPH nebo ferredoxinu. Kromě SOD a CAT, které získávají energii přímo oxidací nebo redukcí jejich substrátů. Existují i antioxidantní systémy, které k odstranění ROS využívají vratnou oxidaci thiolových skupin proteinu (Møller *et al.*, 2007).



Obr. 7: Schéma zobrazující detoxifikaci ROS v rostlinných buňkách. CAT= katalasa, SOD= superoxidodismutasa, APX= askorbátperoxidasa, AsA= kyselina askorbová, MDHA= monodehydroaskorbát, MDHAR= monodehydroaskorbátreduktasa, DHA= dehydroaskorbát, DHAR= dehydroaskorbátreduktasa, GSH/GSSG= glutathion, GR= glutathionreduktasa (převzato a upraveno z Kapoor *et al.*, 2019)

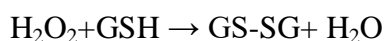


## 8 Peroxidasy

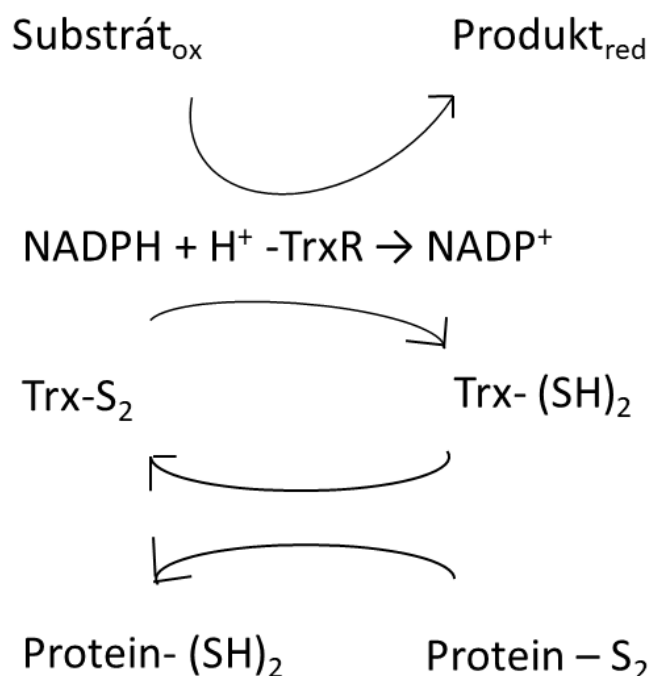
Peroxidasy se podílejí na fyziologických a vývojových procesech. Kontrolují buněčný růst (Liszkay *et al.*, 2003), účastní se destrukce flavonoidů, katabolismu auxinů (Gazaryan *et al.*, 1996) a biosyntézy sekundárních metabolitů. Peroxidasy mohou v aktivním místě obsahovat sloučeninu hemu, cysteinu nebo selenocysteinu. Řadí se mezi antioxidační enzymy, protože k oxidaci různých substrátů využívají peroxid vodíku nebo organické hydroperoxydly vzniklé právě působením ROS (de Gara, 2004; Bela *et al.*, 2015). Rostlinné peroxidasy jsou typicky glykoproteiny o velikosti 30- 60 kDa, lišící se v isoelektrickém bodě (Gijzen *et al.*, 1993).

### 8.1 Gluthathionperoxidasa (GPX, EC 1.11.1.9 a EC 1.11.1.12)

Gluthathionperoxidasa je obecné pojmenování pro skupinu izoenzymů, které katalyzují redukci peroxidu vodíku nebo organických hydroperoxidů na vodu nebo příslušné alkoholy s využitím gluthathionu (GSH) jako redukčního činidla (Obr. 9).



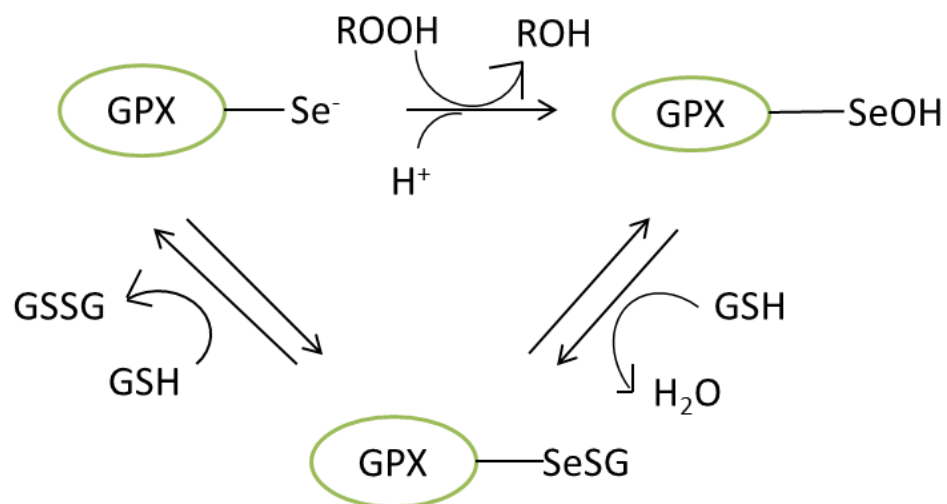
Řadí se mezi thiolové peroxidasy. V aktivním místě tedy neobsahují sloučeninu hemu, ale cystein nebo selenocystein. V případě rostlinné formy enzymu se jedná o cystein. Savčí forma gluthathionperoxidasy v aktivním místě obsahuje selenocystein, který je kódován TGA kodonem, což je normálně STOP kodon (Margis *et al.*, 2008). Oproti rostlinné formě enzymu vykazuje vyšší aktivitu, to je způsobeno nižším pK a větší nukleofilitou selenocysteinu (Eshdat *et al.*, 1997). Rostlinné enzymy obecně dávají přednost thioredoxinu jako redukčnímu činidlu před gluthathionem. Některé studované rostlinné gluthathionperoxidasy prokázaly schopnost oxidovat jak thioredoxin tak i gluthathion. K redukci hydroperoxidů avšak využívají thioredoxin regenerační systém (Obr. 8). Thioredoxiny jsou redoxní proteiny, lze tvrdit, že jako redukční činidla vykazují vyšší efektivitu.



Obr. 8: Thioredoxin regenerační systém; Trx-S<sub>2</sub>= oxidovaný thioredoxin, Trx- (SH)<sub>2</sub> = redukovaný thioredoxin, TrxR= thioredoxinreduktasa (převzato a upraveno z Arnér a Holmgren, 2000)

Dosud charakterizované rostlinné glutathionperoxidasy se vyskytovaly v monomerní formě a vykazovaly antioxidační aktivitu vůči organickým peroxidům, jako jsou například fosfolipidové hydroperoxydy. To naznačuje, že se podílí na ochraně membrán proti oxidačnímu stresu. Rostlinná forma enzymu není schopná odstraňovat peroxid vodíku (Arnér a Holmgren, 2000; Herbette *et al.*, 2002).

Gluthathion je nízkomolekulární látka, složená z glutamátu, cysteinu a glycinu. V rostlinných pletivech se nachází v milimolární koncentraci. Existuje v redukované i v oxidované formě. Pro oxidovanou formu je charakteristické spojení dvou identických řetězců pomocí disulfidických můstků. Redukovaná forma glutathionu obsahuje volné thiolové skupiny (Gill *et al.*, 2013). Je to hlavní antioxidant neenzymové povahy, podílí se na regeneraci askorbátu v askorbát-gluthathionovém cyklu. Gluthathion má v buňce i další funkce, slouží jako substrát pro glutathion-S-transferasu a tím pomáhá v odstraňování škodlivých látek z buněk. Jako odpověď po napadení buňky jsou exprimovány i geny pro glutathion-S-transferasu, která přenosem kyseliny skořicové ovlivňuje její koncentraci v daném místě (Diesperger a Sandermann, 1979; Edwards a Dixon, 1991; Marrs, 1996).



Obr. 9: Schéma katalýzy glutathionperoxidasy. Glutathionperoxidasa je oxidována hydrogenperoxydy, oxidovaná forma GPX je redukována pomocí dvou molekul glutathionu (převzato a upraveno z Forman *et al.*, 2014).

## 8.2 Askorátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11)

Askorbátperoxidasa je klíčovým enzymem podílejícím se na degradaci peroxidu vodíku, nachází se v cytosolu, chloroplastech a mitochondriích vyšších rostlin. V aktivním místě obsahuje hem. Spolu s dehydroaskorbátreduktasou (DHAR, EC 1.8.5.1), monodehydroaskorbátreduktasou (MDHAR, EC 1.6.5.4) a glutathionreduktasou (GR, EC 1.6.4.2) detoxifikuje peroxid vodíku v tzv. Foyer-Halliwell-Asadově dráze. (del Río *et al.*, 2002) Isoforma přítomná v chloroplastech je monomerní, askorbátperoxidasa v cytosolu je oproti tomu homodimer (Mittler a Zilinskas, 1991). Chloroplastová askorbátperoxidasa není pravděpodobně tolik zapojená do buněčných odpovědí na stres jako isoforma přítomná v cytosolu. Vlivem ostrého světla a sucha (abiotický stres) dochází ke snížení aktivity askorbátperoxidasy v chloroplastech. Působením nanomolárních koncentrací peroxidu vodíku za nepřítomnosti askorbátu je askorbátperoxidasa nacházející se v chloroplastech inaktivována. Tyto poznatky zpochybňují antioxidační schopnosti chloroplastové askorbátperoxidasy (de Gara, 2004).

Askorbát-gluthathionový cyklus, také nazývaný Foyerův-Halliwellův-Asadův cyklus, je efektivní způsob jak rostliny odstraňují peroxid vodíku z různých kompartmentů buňky, ve kterých není přítomna katalasa. Cyklus sestává z neenzymových antioxidantů askorbátu a glutathionu redukovaných v sérii reakcí katalyzovaných antioxidačními enzymy. Cyklus byl prokázán v chloroplastech, cytosolu, mitochondriích a i přes přítomnost katalasy v peroxisomech (Jiménez *et al.*, 1997; del Río *et al.*, 2002).

Díky askorbát-gluthathionovému cyklu (Obr. 10) nedochází v chloroplastech k akumulaci peroxidu vodíku. Superoxiddismutasa katalyzuje disproportionaci superoxid anion radikálu, vzniklého redukcí kyslíku (Obr 10., řádek 2), na peroxid vodíku a kyslík (Obr. 10, řádek 3). Peroxid vodíku je pomocí askorbátu redukován na vodu. Reakce je katalyzovaná askorbátperoxidasou (Obr. 10, řádek 4). Oxidovaná forma askorbátu, monodehydroaskorbát radikál (MDHA), je regenerována buď redukováním ferredoxinem (Obr. 10, řádek 5), nebo pomocí NAD(P)H. (Obr. 10, řádek 6) Může docházet ke spontánní disproportionaci MDHA na dehydroaskorbát (DHA) a askorbát. Následuje redukce DHA na askorbát pomocí redukováného glutathionu (Obr. 10, řádek 7). Regenerace ferredoxinu a NADP<sup>+</sup> probíhá ve fotosystému I (Obr. 10, řádek 8).

Polovina elektronů uvolněných fotolýzou vody je využita k univalentní redukci kyslíku a druhá polovina ke generaci redukčních činidel (Obr. 10, řádek 1)(Asada, 2006).

$2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{e}^- + \text{O}_2 + 4 \text{H}^+$ (PSII)	1
$2 \text{O}_2 + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{O}_2^\bullet$ (PSI)	2
$2 \text{O}_2^\bullet + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ (SOD)	3
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{AsA} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{MDHA}$ (APX)	4
$2 \text{MDHA} + 2 \text{redFd} \rightarrow 2 \text{AsA} + 2 \text{Fd}$ (spontánní)	5
$2 \text{MDHA} + \text{NAD(P)H} \rightarrow 2 \text{AsA} + \text{NAD(P)}^+$ (MDHAR)	6
$2 \text{MDHA} \rightarrow \text{AsA} + \text{DHA}$ (spontánní) $\text{DHA} + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{AsA} + \text{GSSG}$ (DHAR)	7
$\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$ (GR) $2 \text{Fd}$ nebo $\text{NADP}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow 2\text{redFd}$ nebo $\text{NADPH}$ (PSI)	8

Obr. 10: Jednotlivé reakce Askorbát-gluthathionového cyklu, popsáno v textu. SOD= superoxididismutasa, APX= askorbátperoxidasa, MDHA= monodehydroaskorbát, AsA= kyselina askorbová, Fd= ferredoxin, DHA= dehydroaskorbát, GSH/GSSG= gluthathion, MDHAR= monodehydroaskorbátreduktasa, DHAR= dehydroaskorbátreduktasa (Asada, 2006).

### 8.3 Guajakolperoxidasa (GuPOX, EC 1.11.1.7)

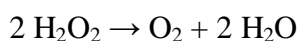
Guajakolperoxidasy jsou N-glykoproteiny, nacházející se ve vakuolách, cytosolu, buněčné stěně a v extracelulárním prostředí buněk. Přítomnost guajakolperoxidasy byla prokázána i v mitochondriích kukuřice (Prasad *et al.*, 1995).

Tyto enzymy se podílí na řadě fyziologických procesů, jako je například biosyntéza ligninu, degradace kyseliny indolyl-3-octové nebo biosyntéza ethylenu. Zvýšená aktivita guajakolperoxidasy byla pozorována ale i u rostlin vystavených abiotickému stresu. Příkladem může být nízká teplota, sucho, hypoxie, vysoká koncentrace kadmia nebo chloridu sodného v půdě.

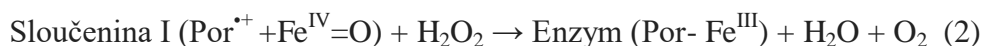
Oproti askorbátperoxidasám je charakteristická pro guajakolperoxidasu její široká specifita. Některé isoformy guajakolperoxidasy se nachází ve vakuolách, kde jsou současně přítomny i fenolické sloučeniny, které slouží jako donory elektronů. Askorbátperoxidasa se ve vakuolách nevyskytuje (Amako *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1995; van Doorn, 2014).

## 9 Katalasa (CAT, EC 1.11.1.6)

Katalasa je tetramerní enzym se sloučeninou hemu v aktivním místě, oproti askorbátperoxidase vykazuje sice vysokou reakční rychlost a nepotřebuje redukční činidlo, ale její afinita k peroxidu vodíku je nižší. Nachází se převážně v peroxisomech. Jejím působením dochází k rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Willekens *et al.*, 1997), nebo využívá peroxid vodíku jako oxidační činidlo k oxidaci substrátů jako je methanol, ethanol, formaldehyd, mravenčan, dusitany nebo rtuť (Havir a McHale, 1989).

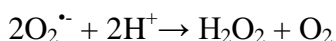


Navázáním peroxidu vodíku na katalasu vzniká sloučenina oxoferryl kation radikál (1), která je efektivnějším oxidačním činidlem než molekula peroxidu vodíku. Reakcí katalasy s navázaným peroxidem vodíku (oxoferryl kation radikálu) s další sloučeninou peroxidu vodíku dochází k přesunu jednoho elektronu, který zapříčiní rozštěpení peroxidu vodíku za současné produkce vody a kyslíku. (2) Izotopovým značením bylo prokázáno, že oba atomy kyslíku pochází ze stejné molekuly peroxidu vodíku. (Alfonso-Prieto *et al.*, 2009).



## 10 Superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1)

Tento enzym katalyzuje dismutaci superoxidového anion radikálu na peroxid vodíku.



Enzymově katalyzovaná dismutace je 10 000 krát rychlejší než spontánní dismutace. SOD existuje ve více formách. Obecně jsou klasifikovány tři typy podle kovového kofaktoru. Existuje superoxididmutasa s železem, manganem a zinkem s mědí. SOD s železem v aktivním místě se nachází ve stromatu chloroplastů, strukturně podobná SOD s manganem jako kofaktorem (MnSOD) je přítomná v mitochondriích. SOD s mědí a zinkem (CuZnSOD) v aktivním místě je hlavním rostlinným typem superoxididmutasy nacházející se v rostlinných pletivech. Vyskytuje se v chloroplastech, cytoplasmě a apoplastu. Strukturně se jedná o homodimer, v obou podjednotkách (16 kDa) je přítomný atom železa i mědi. Isoenzym CuZnSOD nacházející se v chloroplastech je vázaný na tylakoidní membránu v místě PSI, vazby se účastní hořčnaté ionty. Zmíněné typy SOD se liší v citlivosti na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a KCN. CuZnSOD je citlivá jak vůči H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tak i KCN, aktivita FeSOD je regulována pouze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a aktivita MnSOD není ovlivňována ani H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ani KCN (Bowler *et al.*, 1992; Asada, 1999). Disproporciační produkce peroxidu vodíku ze superoxid anion radikálu v apoplastu vyžaduje katalýzu pomocí SOD, není možná spontánní dismutace. Peroxid vodíku je klíčová signální molekula podílející se na aktivní odpovědi rostlin vyvolaných abiotickým a biotickým stresem, proto je možné, že i SOD je zapojena do obranných mechanismů rostlin. Bylo prokázáno, že superoxididmutasa přítomná v apoplastu hrachu kultivaru Midoriusui je CuZnSOD. Její aktivita je regulována elicitory patogenu. Signální molekuly pravděpodobně vyvolávají strukturní změnu v katalytické a /nebo vazebné doméně enzymu, která vyúsťuje ve změnu aktivity SOD (Kasai, 2006).

SOD je významným antioxidačním enzymem, přes to v závislosti na podmínkách se může pro buňku stát její vysoká aktivita toxickou. Pokud jsou ve stejném buněčném oddělení přítomny i železnaté ionty může docházet ke tvorbě hydroxylových radikálů jako produktu Fentonovy reakce. Za normálních podmínek je železo v méně reaktivní formě železitých iontů vázané na proteiny. Vlivem oxidačního stresu může docházet k uvolnění iontů železa a k produkci nadměrného množství peroxidu vodíku zvýšenou aktivitou SOD (Mao *et al.*, 1993).



## 11 Vývoj a struktura semene

Semena vznikají z oplodněných zárodečných vaků. Velikost a komplexnost zárodečného vaku určuje trvání a náročnost vývoje semen. Zárodečný vak je obklopen vaječnými obaly (integumenty), ze kterých se později vyvíjí osemení (Bewley a Black, 1983).

Vývoj semene je geneticky naprogramován. Studováním semen hrachu byly identifikované tři fáze růstu semene oddělené dvěma lag fázemi. V první fázi dochází k růstu endospermu a osemení, po lag fázi následuje růst embrya. Po ukončení embryogeneze dochází k druhé lag fázi, která je následovaná zráním semene (Weber *et al.*, 2005). Zrání semene začíná, když se buňky vyvíjejícího se embrya přestávají dělit a začínají se akumulovat zásobní látky, což je spojeno s růstem buněk. Poté dochází k vysušení semene, k tzv. desikaci. Během této fáze bylo pozorováno zvýšení aktivity katalasy, akumulace glutathionu a peroxiredoxinů, nebo dokonce k akumulaci proteinů, které slouží jako substrát pro oxidační karboxylaci, která je důležitá pro klíčení. Akumulované proteiny slouží také jako počáteční zdroj dusíku (Job *et al.*, 2005; Bailly *et al.*, 2008; Finkelstein *et al.*, 2002). Hlavním zásobním proteiny jsou globuliny (Smýkal *et al.*, 2014).

Při zrání semen dochází ke zvýšení hladiny kyseliny abscisové. Kyselina abscisová indukuje expresi genů inhibitoru cyklin dependentních kinas (ICK1). Inhibitor ICK1 zastavuje buněčný cyklus mezi G1 a S fází, buňky se tedy dále nedělí (Wang *et al.*, 1998).

Vývoj semene zahrnuje dělení buněk, buněčnou diferenciaci a následné ukládání zásobních látek. Raný vývoj semene je ovlivněn invertasou (EC 3.2.1.26), enzymem hydrolyzujícím sacharosu. Dělení buněk embrya je indukováno vysokou hladinou hexos. Diferenciace a biosyntéza zásobních látek je naopak vyvolána vysokými hladinami sacharózy, proto vysoká aktivita invertasy může inhibovat diferenciaci buněk. Naopak, nízká aktivita invertasy tuto diferenciaci buněk podporuje (Weber *et al.*, 1995; Sturm a Tang, 1999).

Semena krytosemenných rostlin se skládají z embrya, endospermu a osemení. Endosperm slouží jako zásobní pletivo. V případě hrachu setého dochází k buněčnému dělení embrya v rané fázi vývoje semene. Jakmile je semeno zralé, embryo zaplní celý vnitřní prostor semene. V posledních fázích zrání semene dochází obecně k redukci

metabolické aktivity kombinované s vysycháním semene a kompresí vrstev osemení. U zralých semen je tedy osemení tvořeno hlavně mrtvými buňkami, což dává vzniku efektivnímu ochrannému obalu. Zralá semena hrachu tedy neobsahují endosperm, pouze embryo se dvěma dělohami obklopené osemením (Bewley a Black, 1983).

## 11.1 Osemení

Osemení je vnější obal zralého semene. Jeho funkce není pouze mechanická ochrana embrya, ale tvoří i vnější bariéru proti škůdcům a patogenům, v průběhu vývoje semene dodává embryu živiny, zachovává integritu částí semen, reguluje výměny plynů mezi vnějším okolím a embryem a u některých druhů se dokonce podílí na šíření osiva. V neposlední řadě také reguluje příjem vody a tím pádem i ukončení dormance a celý proces klíčení (de Souza a Marcos-Filho, 2001). Do doby než je embryo schopné skladovat zásobní látky slouží osemení u hrachu jako přechodný zásobní orgán, akumuluje škrob a proteiny. Osemení zásobuje zygotu vodou, kyslíkem, minerály, aminokyselinami, sacharózou a určitými fytohormony jako je například kyselina abscisová a kyselina indolyl-3-octová (Smýkal *et al.*, 2014).

Osemení není v celém povrchu homogenní, některé části propouští vodu a plyny lépe než jiné. Součástí osemení je hilum (pupek), mikropyle a strophiole (elaiozóm). Propustnost souvisí i s barvou a pórovitostí. Tyto faktory ovlivňují také životaschopnost a odolnost semene (Smýkal *et al.*, 2014; Lazarevic *et al.*, 2017). U planého hrachu je propustnost a hnědnutí osemení mimo jiné ovlivněno také obsahem kyslíku v pozdějších fázích desikace (Rolston, 1978). Za hnědnutí je zodpovědná katecholoxidas (EC 1.10.3.1), která katalyzuje oxidaci fenolů. Vzniklé chinony spolu navzájem interagují, nebo interagují s proteiny přítomnými v buňkách a to způsobuje hnědnutí asociované s nepropustností osemení (Marbach a Mayer, 1974).

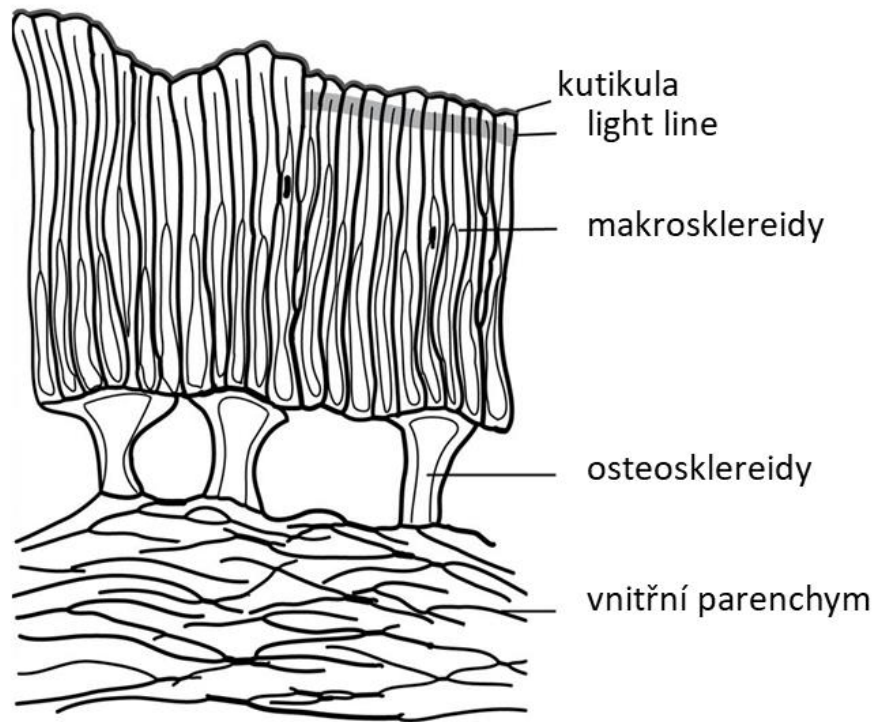
Osemení (testa) semen vzniká z vaječných obalů (integumentů). Obecně lze tvrdit, že se osemení skládá ze tří vrstev pokrytých kutikulou (Obr. 11). To co odlišuje jednotlivé druhy od sebe je mikrostruktura a chemické složení jednotlivých částí (de Souza a Marcos-Filho, 2001).

Vnější vrstva kutikuly představuje první bariéru proti vstřebávání vody a patogenům. Kutikula se u jednotlivých druhů bobovitých rostlin liší svoji tloušťkou. Pod kutikulou se nachází epidermis, ta je tvořena vrstvou protáhlých palisádově uspořádaných tlustostěnných buněk. Tyto buňky se nazývají makrosklereidy. Tloušťka

buněčné stěny makroklereid přispívá k mechanické odolnosti osemení. V makroklereidech lze pozorovat tzv. světlolomnou linii. Vyskytuje se jak u dormantních tak i u nedormantních druhů. Tloušťka světlolomné linie souvisí s permeabilitou osemení, u dormantních druhů funguje světlolomná linie jako efektivní bariéra proti vstupu vody, u nedormantních druhů není vstup vody světlolomnou linií inhibován. Permeabilita osemení je regulována akumulací nejrůznějších látek. V oblasti pupku (hilum) se můžou nacházet dvě vrstvy makroklereid. Pupek je jizva značící místo, kde bylo semeno připojeno pomocí poutka (funiculum) k mateřské rostlině. Hilum je hlavním regulujícím faktorem vysychání semene. Otevírá se, když je okolní vlhkost nízká, a naopak při vysoké vlhkosti okolí se zavírá. Není chráněno kutikulou (Harris, 1987; Jánská *et al.*, 2018). Na jedné straně hila je možné pozorovat strophiole. Strophiole se vyznačuje širší vrstvou parenchymatických buněk s tlustší buněčnou stěnou (Karakı *et al.*, 2012).

Pod epidermis se nachází hypodermis tvořená buňkami oddělenými velkými mezibuněčnými prostory. Na základě tvaru buněk a tloušťky buněčné stěny se buňky hypodermis označují jako osteosklereidy. Osteosklereida jsou tvořena hustou cytoplazmou a velkými vakuolami. Stejně jako buňky epidermis se i buňky hypodermis podílejí na celkové mechanické odolnosti osemení.

Jednou z funkcí osemení je dodávat živiny embryu v průběhu vývoje semene, tuto funkci zastává parenchymatická vrstva osemení, která přiléhá k osteosklereidám. Vrstva parenchymu je tvořena 6-8 vrstvami tenkostěnných buněk. V případě hrachu setého lze parenchym dělit na chlorchym, základní parenchym a aerenchym (Moise *et al.*, 2005; Smýkal *et al.*, 2014). Pro nejvnitřnější vrstvu, aerenchym, jsou typické malé nepravidelně tvarované buňky s velkými mezibuněčnými prostory. Mezibuněčné prostory mohou být naplněny plynem nebo kapalinou. Předpokládá se, že mezibuněčné prostory obsahující kapalinu zlepšují difuzi živin ze základního parenchymu k děložním lístkům. Chlorchym je tvořen velkými buňkami s chloroplasty. Ve vyvíjejících se semenech je fotosyntéza limitována, hlavní funkcí chloroplastů v chlorchymu je pravděpodobně přechodná akumulace škrobu. Základní parenchym se svojí stavbou podobá chlorchymu, jen obsahuje méně chloroplastů. Postupně se mění v aerenchym. Růstem děložních lístků dochází ke stlačování vrstev parenchymu, vzniká tak asi 30  $\mu\text{m}$  široká vrstva, která odděluje živé buňky parenchymu osemení a děložní lístky (van Dongen *et al.*, 2003).



Obr. 11: Struktura osemení (převzato a upraveno ze Smýkal *et al.*, 2014).

## 11.2 Endosperm a embryo

Endosperm je triploidní pletivo, které vzniká dvojitým oplozením. Dojité oplození je biologický proces, při kterém jedna spermatická buňka splývá s vajíčkem, vzniká embryo. Druhá haploidní spermatická buňka splývá s diploidním jádrem zárodečného vaku, vzniká tak triploidní endosperm. Toto pletivo obsahuje velké množství zásobních proteinů typů- globulinů, albuminů a prolaminů. Prolaminy jsou typické pro obiloviny, obsahují převážně prolin a glutamin, na rozdíl od globulinů jsou hydrofobní (Lopes a Larkins, 1993). U některých rostlin je přítomná aleuronová vrstva, což je vnější vrstva tvořená malými tlustostěnnými buňkami.

Tvar a umístění embrya uvnitř semene se mezi druhy liší, avšak stavba je podobná. Embryo je tvořeno hypokotylem, na který je napojen jeden nebo více děložních lístků, radikulou a plumulou. Endosperm slouží jako zásoba škrobu a proteinů. Ve zralých semenech, která neobsahují endosperm, přebírají funkci skladování dělohy (Bewley a Black, 1983).

## 12 Klíčení a dormance

Načasování klíčení je důležitým aspektem ovlivňujícím úspěšnost samotného procesu klíčení, některé druhy rostlin vyvinuly způsob jak jej oddálit a tím vyčkat na příznivé podmínky.

Dormance je klidové stádium, které předchází klíčení semene. Je to proces ovlivněný geneticky, prostředím a poměrem fytohormonů. Dormance je typická pro semena planých druhů rostlin. Poskytuje jim možnost přečkat nepříznivé podmínky, snižuje konkurenci mezi semeny téhož druhu a zabraňuje předčasnému klíčení. U semen domestikovaných druhů není dormance žádoucí. U jejich semen je požadováno rychlé, uniformní klíčení a pohotové zakládání klíčnicích rostlin. Rozdíl mezi dormantními a nedormantními semeny je tedy ten, že dormantní semena nejsou schopná započít proces klíčení do určité doby po nasátí vody, i přesto že okolní podmínky mohou být pro proces klíčení vyhovující (Finkelstein *et al.*, 2002; Clercx *et al.*, 2003). Délka dormance může být odlišná i pro semena pocházejících z jedné rostliny, odlišnost je způsobena stářím, výživovým stavem rostliny, velikostí, tvarem a umístěním semene na rostlině (Smýkal *et al.*, 2014).

Existuje více druhů dormance. V případě morfologické dormance je příčinou klidového stádia nedostatečný stupeň vývoje embrya. Embrya nejsou fyziologicky dormantní, potřebují se pouze plně vyvinout, aby bylo možné započít klíčení. Naopak při fyziologické dormanci jsou embrya plně vyvinutá, enzymové komplexy ale nejsou aktivní. Fyziologická dormance je regulována pomocí fytohormonů a malých molekul, jako jsou například ROS a sloučeniny dusíku. Za regulátory dormance jsou považovány látky, jejichž obsah v semenech koreluje s hloubkou dormance. V semenech jsou simultánně přítomny promotory i inhibitory klíčení, ukončení dormance je tedy ovlivněno poměrem těchto látek.

Mezi regulátory fyziologické dormance se řadí kyselina abscisová, která kromě dormance reguluje i syntézu zásobních proteinů, lipidů, inhibuje buněčné dělení a zvyšuje toleranci semen k desikaci. Exprimované geny regulované kyselinou abscisovou jsou jak hojně zastoupené transkripty, potřebné pro adaptaci rostlin na stres nebo syntézu zásobních látek, tak i transkripty s malým zastoupením, které slouží jako signální molekuly. Kyselina abscisová funguje jako inhibitor klíčení, je produkována embryem. Bylo prokázáno, že exogenní kyselina abscisová nebo kyselina abscisová

produkována mateřským pletivem je nedostatečná k indukci dormance (Karssen a Groot, 1987; Finkelstein *et al.*, 2002). V suchých dormantních semenech dochází k poklesu kyseliny abscisové působením specifických ABA 8'-hydroxylas (Okamoto *et al.*, 2006).

Gibereliny jsou antagonisty kyseliny abscisové, podněcují proces klíčení a to tak, že ovlivňují genovou expresi hydrolytických enzymů, které oslabují pletiva endospermu nebo osemení (Karssen a Groot, 1987). Potřebné množství giberelinů k iniciaci klíčení je přímo úměrné k obsahu kyseliny abscisové. Kyselina abscisová a gibereliny spolu přímo neinteragují (Baskin a Baskin, 2004). Do regulace klíčení a dormance jsou zapojeny další látky. Příkladem je ethylen, který ukončuje dormanci a stimuluje klíčení tím, že snižuje citlivost semene vůči kyselině abscisové (Beaudoin *et al.*, 2000).

Dalším typem dormance je fyzikální dormance, její příčinou je mechanicky odolné osemení, nepropustné pro vodu a plyny. Fyzikální dormance je typická pro bobovité rostliny. Nepropustnost osemení je způsobena akumulací nejrůznějších látek, například fenolických sloučenin. Tvrdost semene je podpořena aktivitou endo-1,4- $\beta$ -glukanasou. Vstup vody do semene může být umožněn mechanickým narušením osemení, rozkladem buněk osemení vlivem mikroorganismů, u některých druhů také pomocí přítomných struktur jako je hilum a /nebo strophiole. Otevírání hila a strophiole je ovlivněno teplotou. Zvýšením teploty dochází k oslabení pletiva strophiole a kolísání teplot je asociováno s uvolňováním a kontrakcí buněk strophiole (Karaki *et al.*, 2012; Baskin a Baskin 2014).

Dále lze také obecně rozlišovat dormanci vyvolanou embryem a dormanci způsobenou strukturami obalujícími embryo (Amen, 1968; Baskin a Baskin, 2004; Smýkal *et al.*, 2014; Hradilová *et al.*, 2017, Jánská *et al.*, 2018).

Po dozrání jsou semena v klidovém stádiu, jedná se o primární dormanci. K uvolnění dormance obvykle dochází za vhodných podmínek (voda, teplota). Pokud tyto faktory nejsou přítomny, klíčení je inhibováno. Tento stav se nazývá quiescence. Setrváváním semene ve stavu quiescence po delší časový úsek přechází semeno do sekundární dormance (Karssen, 1987). Přejít semene z klidového stádia (primární dormance/ quiescence/ sekundární dormance) do metabolicky aktivního stavu je spojen s tvorbou ROS. U některých druhů semen je produkován peroxid vodíku už během imbibice. Imbibice neboli bobtnání je proces vstřebávání vody semenem, proces

vysychání semene se nazývá desikace. Druhy semen, které procházejí fází desikace následovanou imbibicí, aby byly schopné klíčit, se nazývají ortodoxní. Rekalitrantní semena přecházejí ze stavu dormance do aktivního stavu bez fáze desikace. Superoxidový anion radikál a hydroxylový radikál jsou tvořeny až při samotném procesu klíčení (Gomes a Garcia, 2013). Mechanismus uvolnění dormance tedy nezahrnuje pouze faktory prostředí (voda, teplota), ale je ovlivněn i produkcí ROS, a s tím asociovanými cílenými změnami ve struktuře proteinů, které vznikají jejich karboxylací a změnami v kompozici v subkutikulárním vosku (fenolické sloučeniny, suberin) (Oracz *et al.*, 2007; Smýkal *et al.*, 2014; Jánská *et al.*, 2018).

Klíčení začíná nasátím vody (imbibice) suchým semenem a je dokončeno proniknutím radikuly přes pletiva obklopující embryo (Smýkal *et al.*, 2014). Schopnost semen klíčit je spojena s akumulací peroxidu vodíku. Produkce peroxidu vodíku je rozdílná v dormantních a nedormantních semenech. V nedormantních semenech je generována vyšší koncentrace peroxidu vodíku než v semenech dormantních. To naznačuje, že existují rozdílné regulující mechanismy a systémy v dormantních a nedormantních semenech (Bailly *et al.*, 2008). Hlavním regulujícím faktorem klíčení je teplota. Teplota nemusí být nutně stejná jako pro ukončení dormance, to poukazuje na oddělenost procesu klíčení a ukončení dormance (Karssen, 1987). Důležitým faktorem je také světlo, to stimuluje expresi genů pro 3- $\beta$  hydroxylasy, které kontrolují biosyntézu aktivních forem giberelinů (Yamaguchi *et al.*, 1998).

### 13 Charakteristika studovaného rostlinného materiálu

V experimentální části bakalářské práce měl být použit jako rostlinný materiál hrách setý (*Pisum sativum L.*). Konkrétně se jednalo o 4 genotypy: dva plané, dormantní (JI64 a JI1794) a dva kulturní, nedormantní (Cameor a JI92). Tato kapitola popisuje fyziologické vlastnosti zmíněných genotypů hrachu.

Hrách setý se řadí mezi jedny z nejstarších domestikovaných plodin. Dormance u planých zástupců hrachu je způsobena nepropustností osemení pro vodu a plyny (Cechová *et al.*, 2017).

Studované genotypy se liší v tloušťce, textuře povrchu a v pigmentaci osemení. A právě tyto rozdílnosti v osemení u hrachu ovlivňují délku dormance. Genetická variace a pigmentace osemení vede k odlišnostem v délce dormance a životaschopnosti semene. Pigmentaci osemení způsobují fenolické sloučeniny. Jako jsou například flavonoidy. Obecně jsou pigmentovaná semena více dormantní (Janská *et al.*, 2018).

Semena kultivovaných genotypů (Cameor, JI92) snadno vstřebávají vodu, klíčení nastává v průběhu 24 hodin. Semena planých genotypů hrachu (JI64, JI1794) jsou dormantní, proces klíčení u těchto druhů nastává až za určitých podmínek a/nebo po mechanickém narušení osemení.

Uvedené genotypy se liší zejména v délce palisádového parenchymu. Dormantní genotyp JI64 se vyznačuje silnějším osemením, jeho palisádová vrstva parenchymatických buněk je delší než u ostatních genotypů. Stejně jako ostatní dormantní genotypy, genotyp JI64 obsahuje v buněčných stěnách makrosklerid větší množství proanthokyanidiny (Janská *et al.*, 2018)

Povrch osemení je dán uspořádáním makrosklereidů, osemení genotypu JI64 je výrazně hrboilaté a pigmentované. Kutikula zmíněných genotypů se neliší, nachází se v ní prasklinky, nedormantní typy obsahují větší praskliny. Domestikovaný genotyp Cameor není oproti ostatním druhům pigmentovaný (Smýkal *et al.*, 2014; Hradilová *et al.*, 2017).

Důsledkem vyššího obsahu pektinů a nižšího obsahu celulosy a tříslovin je osemení nedormantních druhů tenčí, měkčí a více elastické. (Janská *et al.*, 2018). Distribuce mastných kyselin je v celém osemení homogenní. V osemení dormantního JI64 je jejich obsah větší než v osemení nedormantního JI92 (Cechová *et al.*, 2017).



## 14 Experimentální část

Vzhledem k pandemické situaci spojené s onemocněním Covid-19 nebylo možné provést experimentální měření. Vyzkoušela jsem si pouze orientačně extrakci rostlinného materiálu a některé plánované metody. Připravila a změřila jsem kalibrační řady pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda, a pro stanovení celkové antioxidační kapacity metodou ABTS. Pomocí multifunkčního spektrofotometru Reader jsem si vyzkoušela stanovit aktivitu peroxidas.

### 14.1 Použité přístroje

- Digitální předvážky- KERN, Německo
- Analytické váhy- Denver instrument, USA
- Centrifuga 5415R- Eppendorf, Německo
- Elektromagnetická míchačka- BioSan, Litva
- Digitální pH metr- XS Instruments, Itálie
- Sada automatických pipet- Eppendorf, Německo
- Mikrodestičky Test plate 96F- TPP, Švýcarsko
- Mikrodestičkový reader Synergy HT- BioTek Instruments, USA

### 14.2 Použité roztoky a chemikálie

- Trolox- *Sigma Aldrich (Německo)*
- 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- *Lach-Ner (Česká republika)*
- Persíran amonný - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Hydrogenfosforečnan draselný - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Dihydrogenfosforečnan draselný - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Guajakol - *Sigma- Aldrich (Německo)*
- Dithiotreitol – *Sigma- Aldrich (Německo)*
- EDTA-Na<sup>+</sup> - *Honeywell Fluka (Rumunsko)*
- Pefabloc - *Honeywell Fluka (Rumunsko)*
- Polyvinylpolypyrrolidon - *Sigma- Aldrich (Německo)*
- Coomassie Blue G-250 - *Sigma- Aldrich (Německo)*
- Hovězí sérový albumin BSA - *Sigma- Aldrich (Německo)*
- Methanol- *Lach-Ner (Česká republika)*

- Kyselina fosforečná- *Lach-Ner* (Česká republika)

### 14.3 Příprava rostlinného materiálu

Rostlinný materiál, osemení 4 genotypů hrachu setého ve 4 vývojových stádiích mi byl poskytnut Katedrou Botaniky, PřF UP (Tab. 1). Rostliny kulturních a planých zástupců hrachu byly pěstovány ve sklenících katedry Botaniky Univerzity Palackého v Olomouci v období leden až květen 2020. Mezi studovanými genotypy byly dva kulturní genotypy *Pisum sativum* subsp. *sativum* L., kultivar Cameor a genotyp JI92, krajová odrůda (landrace) z Afghánistánu. Z planých, dormantních zástupců hrachu *Pisum sativum* subsp. *elatius* (M. Bieb.) Asch. et Graebn. byly studovány genotypy JI64 a JI1794 (původem z Turecka). Semena JI92, JI64 a JI1794 byla poskytnuta z John Innes Pisum Collection (Norwich, UK), semena kultivaru Cameor z INRA France. Rostliny byly pěstovány v pětilitrových nádobách v substrátovém mixu rašelina-písek v poměru 90:10 (Florcom Profi, BB Com Ltd. CZ) s denímu a nočními teplotami pohybujícími se v rozmezí 35–20°C/18–12 °C. Fotoperioda byla prodloužena na 14 hodin s použitím dodatečného osvětlení pomocí sodíkových výbojek (Hortilux Schreder, Holland, svýbojkou Sylvania GroLux 600 W). Náhodně vybrané květy byly v den, kdy se otevřely, označeny štítkem s datem. Vzniklé lusky se semeny byly sklizeny v rozmezí 11 až 28 dní od otevření květů. Semena byla na ledu vyjmuta z lusků, vypreparovaná osemení a embrya byla okamžitě přenesena do tekutého dusíku a uložena do mrazicího boxu (-80°C).

Tab 1: Studované genotypy hrachu setého (*Pisum sativum* L.).

	Genotyp	Stádium (DAP- day after pollination)			
		Stádium 1	Stádium 2	Stádium 3	Stádium 4
Kulturní nedormantní	Cameor	13	17	23	28
	JI92	12	16	23	25
Plané dormantní	JI64	12	17	23	27
	JI1794	13	17	23	28

## 14.4 Použité metody

Cvičně bez měření reálných vzorků byly vyzkoušeny následující metody.

### 14.4.1 Stanovení celkové antioxidační kapacity

Antioxidační aktivitu je možné definovat jako schopnost dané sloučeniny inhibovat oxidační degradaci jiných sloučenin, příkladem oxidační degradace je lipidická peroxidace. Rozlišuje se antioxidační kapacita a antioxidační reaktivita. Antioxidační kapacita vyjadřuje délku trvání antioxidačního účinku antioxidantu, naopak antioxidační reaktivita popisuje počáteční dynamiku průběhu antioxidačního procesu při určité koncentraci antioxidantu. V posledních letech byly vyvinuty různé metody pro stanovení tzv. celkové antioxidační aktivity (Šulc et al., 2007).

Celková antioxidační kapacita může být stanovována spektrofotometricky nebo chemiluminiscenčně. Spektroskopické metody vycházejí z předpokladu schopnosti biologického vzorku zhaset vzniklý barevný radikál. Naměřená absorbance je porovnávána se standardem. Jako standardy se využívají Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) nebo vitamín C (kyselina askorbová). Spektrofotometrické metody se dají dělit na metody založené na přesunu vodíkového atomu a na metody zahrnující redoxní reakci s oxidantem, který slouží jako indikátor proběhnutí reakce. Příkladem spektroskopických metod je například ABTS metoda, nebo DPPH test. ABTS je zkratka pro 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonovou kyselinu, princip této metody je popsán níže. DPPH je 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl. Při této metodě reaguje organický radikál DPPH• s antioxidantem, dochází k změně zbarvení z fialové na žlutou. Je pozorováno zvýšení absorbance při vlnové délce  $\lambda=515$  nm.

#### 14.4.1.1 Spektrofotometrická metoda s ABTS

ABTS je zkratka pro 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonovou kyselinu. Tato metoda je založena na vzniku modrozeleného chromoforu ABTS<sup>•+</sup>, který je redukován antioxidanty přítomnými ve zkoumaném vzorku. Metoda je vhodná jak pro hydrofilní tak i lipofilní antioxidanty. Kation radikál ABTS vzniká oxidací ABTS persíranem amonným, jeho absorpční maximum je při vlnových délkách  $\lambda=645, 734$  a  $815$  nm. Redukcí ABTS<sup>•+</sup> antioxidačními enzymy dochází ke ztrátě zbarvení, snižuje se tedy i absorbance. Úbytek absorbance je porovnáván se standardem, jako standard

se využívá Trolox (Re *et al.*, 1998; Floegel *et al.*, 2011, Martysiak-Żurowska a Wenta, 2012). Kalibrační řada byla připravena ředěním roztoku 1mM roztok Troloxu. Ředění je uvedeno v tabulce č. 3. Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50  $\mu$ l připravených standardů Troloxu. Jako blank sloužilo 50  $\mu$ l methanolu. Stanovení probíhalo v trojím opakování. Postupně bylo do všech jamek napipetováno 50  $\mu$ l 372 $\mu$ M persíranu amonného. Reakce byla odstartována přidávkem 100  $\mu$ l 1,6mM radikálu ABTS. Směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 50 minut. Na multifunkčním spektrofotometru Reader byl změřen úbytek absorbance při  $\lambda=734$  nm.

V případě měření celkové antioxidační kapacity touto metodou u reálných vzorků hrachu, by extrakce probíhala s využitím vychlazeného methanolu v poměru 1:1 (w:v). Homogenizace a všechny ostatní operace by byly prováděny za chlazení při teplotě 4 °C. Homogenát by byl centrifugován po dobu 15 minut při 15 000 g a teplotě 4°C. Supernatant by byl použit pro následující měření celkové antioxidační kapacity.

Tab 2: Příprava kalibrační řady ředěním zásobního roztoku 1mM Troloxu methanolem.

Koncentrace Troloxu ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	10	20	40	60	80	100
Zásobní roztok Troloxu ( $\mu\text{l}$ )	10	20	40	60	80	100
Methanol ( $\mu\text{l}$ )	990	980	960	940	920	900

#### 14.4.2 Stanovení aktivity peroxidasy

Pro stanovení peroxidase aktivity byla použita spektrofotometrická metoda s guajakolem (Angelini *et al.*, 1990). Při vlastní enzymové reakci je  $\text{H}_2\text{O}_2$  substrátem pro peroxidasu za současné oxidace guajakolu na 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylchinon, což se projeví nárůstem absorbance při  $\lambda = 436$  nm. Molární absorpční koeficient pro 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylchinon je  $4500 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . POX byla extrahována z osemení genotypu Cameor a JI64. Práce s rostlinným materiálem probíhala při  $4^\circ\text{C}$ . Osemení byla rozetřena v třecí misce a extrakce byla provedena v poměru 1:2 (w:v) s extrakčním  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  K-fosfátovým pufrům o pH 7, který obsahoval  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  EDTA- $\text{Na}^+$ , 1% (w/v) polyvinylpolypyrrolidon (PVPP),  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  dithiotreitol a  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pefabloc. Homogenát byl přesunut do mikrozkuhavky a centrifugován po dobu 15 min při  $16000 \text{ g}$  a  $4^\circ\text{C}$ . Byl odebrán supernatant, který byl dále použit k měření aktivity POX a ke stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou.

Aktivita enzymu guajakolperoxidasy (GuPOX) byla stanovena na mikrodestičkovém readeru Synergy HT v 96-ti jamkovém uspořádání. Reakční směs obsahovala  $113 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  K-fosfátový pufr o pH = 6 a  $113 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  guajakol. Do jamek bylo postupně pipetováno  $155 \mu\text{l}$  této reakční směsi,  $10 \mu\text{l}$  extraktu a buď  $10 \mu\text{l}$  substrátu ( $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) anebo  $10 \mu\text{l}$  blanku (destilovaná voda). Jednotlivá stanovení probíhala v technickém triplikátu, kdy každý vzorek měl vlastní blank. Předem byl vytvořen protokol pro dané měření, ve kterém bylo nastaveno přehřátí readeru na  $30^\circ\text{C}$  a počáteční protřepání obsahu jamek (3 s). Pro stanovení aktivity GuPOX byly extrakty 100x zředěny. Měřila se kinetika reakce enzymu se substrátem v pravidelných časových intervalech (10 s) po dobu 1 min při  $\lambda = 436$  nm.

#### 14.4.3 Stanovení celkových proteinů dle Bradforda

Působením Van der Waalových sil a hydrofobních interakcí dochází k vytvoření barevného komplexu mezi proteiny a barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250. Vzniklý komplex je měřitelný spektrofotometricky. Vytvořením komplexu se absorpční maximum posouvá ze 465 na 595 nm (Bradford, 1976).

Zásobní roztok Bradfordova činidla byl naředěn destilovanou vodou v poměru 1:4. Ze zásobního roztoku BSA připravena koncentrační řada BSA o koncentraci 0,2-1,4  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Tab. 3) Do jamek na mikrodestičkovém readeru bylo vždy napipetováno  $45 \mu\text{l}$  destilované vody,  $5 \mu\text{l}$  standardu BSA a  $200 \mu\text{l}$  pracovního

Bradfordova činidla. Pro blank bylo namísto 5  $\mu\text{l}$  standardu BSA pipetováno 5  $\mu\text{l}$  vody. Směs byla lehce promíchána a inkubována po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Byla změřena absorbance při vlnové délce  $\lambda=595\text{ nm}$ .

Tab 3: Ředění zásobního roztoku BSA ( $10\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

Koncentrace BSA ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Zásobní roztok BSA ( $\mu\text{l}$ )	Voda ( $\mu\text{l}$ )
0,2	20	980
0,4	40	960
0,6	60	940
0,8	80	920
1,0	100	900
1,2	120	880
1,4	140	860

## 14.5 Plánované metody

Níže uvedené metody jsem si nestihla vyzkoušet ani orientačně. Uvádím zde alespoň jejich princip.

### 14.5.1 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy

Principem metody je schopnost askorbátperoxidasy katalyzovat redukci peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je redukován na vodu za současné oxidace askorbátu na monodehydroaskorbát. Úbytek askorbátu je měřen spektrofotometricky jako pokles absorbance při  $\lambda = 290$  nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu je  $2800 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Nakano a Asada, 1981).

### 14.5.2 Histochemická detekce produkce ROS

Jako indikátor ROS (především peroxidu vodíku) v buňkách se většinou používá 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetát (H<sub>2</sub>DCF DA), jinak nazývaný dichlorofluorescein diacetát. Acetátové skupiny nefluorescenční H<sub>2</sub>DCF DA jsou odštěpeny esterázami přítomnými v cytoplazmě, oxidací je potom nefluorescenční forma přeměněna na vysoce fluorescenční 2',7'-dichlorofluorescein (Kalyanaraman *et al.*, 2012).

Fluorescenční sonda 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H<sub>2</sub>DCF DA), která je vyžívána pro detekci RNS a ROS, má schopnost procházet přes buněčné membrány. Intracelulární esterasy odštěpující H<sub>2</sub>DCF DA acetátové skupiny, vzniklý produkt je v přítomnosti peroxidu vodíku, OH•, ROO•, NO• a NOO- oxidován na fluorescenční DCF. Po reakci je detekován fluorescenční signál ( $\lambda_{\text{exc}}$  - 498 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  - 522 nm) (Kojima *et al.*, 1999).

### 14.5.3 Stanovení lipidické peroxidace metodou TBARS

Během autooxidace nebo enzymové degradace PUFA v buňkách vzniká jako sekundární koncový produkt malondialdehyd (MDA). Tato metoda pro měření obsahu MDA využívá kyselinu thiobarbiturovou (TBA). Nukleofilní adicí v kyselém prostředí malondialdehydu se dvěma molekulami thiobarbiturové kyseliny vzniká růžovočervené zbarvení s maximem absorbance při 532 nm.

U rostlinných extraktů je možná interference látek jako jsou anthokyany a sacharidy, může tak dojít k nadhodnocení obsahu MDA (Taulavuori *et al.*, 2001). U korigované metody TBARS je odečítána absorbance ( $\lambda = 532$  nm) roztoku obsahujícího

rostlinný extrakt inkubovaný bez přídavku TBA od identického vzorku, jež TBA obsahoval (Hodges *et al.*, 1999).



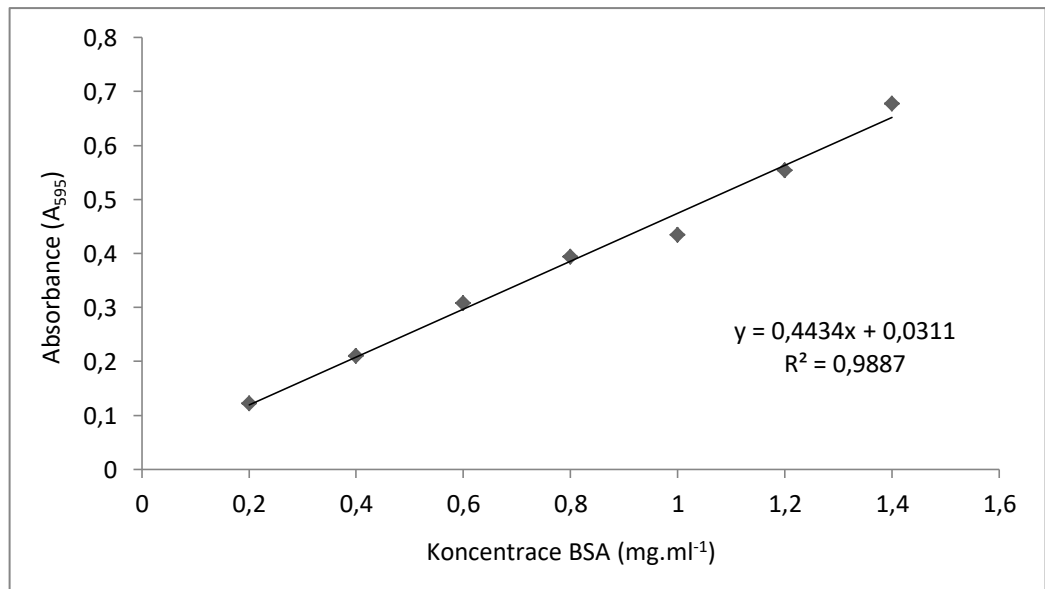
## 15 Výsledky a diskuze

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo stanovit aktivitu vybraných antioxidačních enzymů (POX a APX), stanovit parametry oxidačního stresu (celková antioxidační kapacita, míru lipidické peroxidace) a pomocí kryomikrotomu zhotovit řezy osemení, pomocí nichž mělo být zjištěno místo produkce reaktivních forem kyslíku. Kvůli pandemické situaci spojené s onemocněním Covid-19 nebylo možné experimentální měření provést. Některé metody byly cvičně vyzkoušeny, ale měření vzorků nebylo uskutečněno.

Byla připravena a změřena kalibrační řada pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda. Naměřené hodnoty absorbance jsou uvedeny v tabulce 4. Z naměřených hodnot absorbance byla sestrojena kalibrační přímka (Graf 1), dosazením naměřených hodnot absorbance rostlinných vzorků do získané rovnice  $y = 0,4434x + 0,0311$  by byly stanoveny koncentrace celkových proteinů ve vzorku.

Tab 4: Naměřené hodnoty absorbance pro koncentrační řadu standardu BSA.

Koncentrace roztoku BSA (mg.ml <sup>-1</sup> )	A <sub>595</sub>	A <sub>595</sub>	$\overline{A}_{595}$	$\overline{A}_{595} - \overline{A}_{blank}$
0,0 (blank)	0,846	0,854	0,850	-
0,2	0,981	0,962	0,972	0,122
0,4	1,072	1,048	1,060	0,210
0,6	1,148	1,168	1,158	0,308
0,8	1,253	1,235	1,244	0,394
1,0	1,295	1,274	1,285	0,435
1,2	1,405	1,402	1,404	0,554
1,4	1,548	1,508	1,528	0,678



Graf 1: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace celkových proteinů dle Bradfordovy metody.

Dále jsem si vyzkoušela extrakci a stanovení aktivity peroxidasy guajakolovou metodou u dvou náhodně vybraných vzorků osemení hrachu setého. Výsledky měření byly ovšem zatíženy velkou chybou pravděpodobně nepřesným pipetováním, tudíž nejsou v této práci prezentovány. Uvádím zde pouze teoretické vyhodnocení.

Aktivita enzymů (GuPOX, či APX) by byla vyhodnocována z lineární části grafu, který by byl zhotoven z nárůstu nebo poklesu naměřené absorbance. Délka optické dráhy ( $l$ ) by byla vypočítána s využitím následujícího vzorce:

$$l (cm) = \frac{A_{977} - A_{900}}{0,18}$$

Hodnota vypočítané optické dráhy by byla dosazena do vztahu pro výpočet aktivity enzymu dle následující rovnice:

$$a(kat) = \frac{\Delta A \cdot V(l)}{\varepsilon \cdot t (s) \cdot l(cm)}$$

Kde objem vzorku ( $V$ ) je dosazován v litrech, čas reakce ( $t$ ) v sekundách, extinkční koeficient pro stanovení aktivity peroxidasy je  $\varepsilon=4500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a extinkční koeficient pro stanovení aktivity askorbátperoxidasy je  $\varepsilon=2800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Rozdíl absorbance ( $\Delta A$ ) je bezrozměrná veličina, představuje změnu absorbance v daném časovém úseku. Pro výpočet specifické aktivity enzymu ( $\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteinu) by byla

vypočítána aktivita podělena množstvím proteinů ve vzorcích stanovených metodou dle Bradforda.

Reaktivní částice kyslíku, jako je peroxid vodíku, superoxidový anion radikál a hydroxylový radikál jsou produkovány v rámci buněčného metabolismu. Během různých vývojových stádií semene dochází k rozdílné akumulaci ROS. Zvýšení jejich koncentrace v semenu vede k uvolnění dormance. Načasování uvolnění dormance a následné klíčení je zásadní pro úspěšné založení klíčnicích rostlin (Oracz *et al.*, 2007; Buijs *et al.*, 2018). Ve výzkumu Barbra-Espín *et al.*, 2011 semena hrachu bobtnající v přítomnosti 20mmol.l<sup>-1</sup> peroxidu vodíku vykazovala mnohonásobně vyšší klíčivost ve srovnání s kontrolními semeny bobtnajícími pouze ve vodě. Klíčivost semen vystavených působením peroxidu vodíku byla po 24 hodinách bobtnání asi 75 %, zatímco u semen bobtnající ve vodě pouhých 14 %.

Není mnoho výzkumů, které by pojednávaly o ROS a antioxidační kapacitě osemení, proto diskutují hypotetické výsledky na semenech obecně. Po dozrání semen slunečnice, které vykazují dormanci vyvolanou embryem, dochází ke zdvojnásobení obsahu peroxidu vodíku a obsah superoxidového anion radikálu se zvýší o 50 % (Oracz *et al.*, 2007). Naopak v embryích semen ječmene nebylo po dozrání prokázáno zvýšení ROS, byla ale pozorována redukce glutathionu. To potvrzuje zapojení glutathionu do detoxifikace ROS (Bahin *et al.*, 2011). Semena slunečnice a ječmene se liší v anatomii, v zásobních proteinech a hlavně v druhu dormance. Rozdílný obsah ROS v semenech rostlin je možné pozorovat i u stejného druhu rostliny lišící se genotypem. Nedormantní druhy semen slunečnice vykazují oproti druhům dormantním vyšší obsah peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je akumulován převážně v embryonálním vrcholu (Oracz *et al.*, 2007). Ve výzkumu Leymarie *et al.* bylo zjištěno, že nedormantní nabobtnalá semena *Arabidopsis*, která podléhá fyziologické dormanci, obsahují vyšší koncentraci ROS a k akumulaci superoxidového anion radikálu dochází převážně v radikule. Naopak dormantní semena *Arabidopsis* jej akumulují nepravidelně. Byla také prokázána nižší aktivita antioxidačních enzymů u nedormantních semen *Arabidopsis*. Lze tedy tvrdit, že u dormantních a nedormantních semen se liší jak koncentrace tak i místo akumulace ROS. Rozdílná je i aktivita antioxidačních enzymů. Nebyly publikované žádné studie o lipidické peroxidaci, celkové antioxidační kapacitě ani o aktivitě APX a POX v osemení dormantních a nedormantních druhů bobovitých rostlin, které bych mohla využít pro porovnání

výsledků. Na základě dosud publikovaných výsledků lze předpokládat detekci vyšší obsahu peroxidu vodíku v osemeni nedormantních genotypů hrachu setého (Cameor, JI92) a současně nižší aktivitu vybraných studovaných antioxidačních enzymů. V následující experimentální práci budou tyto předpoklady ověřeny.

## **16 Závěr**

Cílem této bakalářské práce bylo více přiblížit proces dormance, objasnit rozdíly u dormantních a nedormantních genotypů hrachu setého (*Pisum sativum L.*). Teoretická část byla věnovaná literární rešerši s klíčovými slovy dormance, reaktivní formy kyslíku, antioxidační enzymy a osemení. Bohužel kvůli pandemické situaci spojené s onemocněním Covid-19 nebylo možné experimentální měření provést.

## 17 Literatura

- Alfonso-Prieto M., Biarnés X., Vidossich P., Rovira C. (2009): The molecular mechanism of the catalase reaction. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 11751-11761.
- Allan A. C., Fluhr R. (1997): Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *The Plant Cell* **9**, 1559-1572.
- Alonso A., Queiroz C. S., Magalhães A. C. (1997): Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1323**, 75-84.
- Amako K., Chen, G. X., Asada K. (1994): Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology* **35**, 497-504.
- 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**, 89-96.
- Amen R. D. (1968): A model of seed dormancy. *The Botanical Review* **34**, 1-31.
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399.
- Apostol I., Heinstejn P. F., Low P. S. (1989): Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction. *Plant physiology* **90**, 109-116.
- Arent S., Pye V. E., Henriksen A. (2008): Structure and function of plant acyl-CoA oxidases. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 292-301.
- Arnér E. S., Holmgren A. (2000): Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European journal of biochemistry* **267**, 6102-6109.
- Asada K. (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology* **50**, 601-639.
- Asada K. (2006): Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology* **141**, 391-396.
- Bahin E., Bailly C., Sotta B., Kranner I., Corbineau F., Leymarie J. (2011): Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant, cell & environment* **34**, 980-993.
- Bailly C. (2004): Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* **14**, 93-107.
- 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 biologiques* **331**, 806-814.
- Barba-Espín G., Diaz-Vivancoso P., Job D., Belghazi M., Job C., Hernández J. A. (2011): Understanding the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. *Plant, Cell & Environment* **34**, 1907-1919.
- Baskin, J. M., Baskin C. C. (2004): A classification system for seed dormancy. *Seed science research* **14**, 1-16.

- Beaudoin N., Serizet C., Gosti F., Giraudat J. (2000): Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *The Plant Cell* **12**, 1103-1115.
- Beckman J. S., Koppenol W. H. (1996): Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **271**, C1424-C1437.
- Bela K., Horváth E., Gallé Á., Szabados L., Tari I., Csiszár J. (2015): Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* **176**, 192-201.
- Bewley J. D. (1997): Seed germination and dormancy. *The plant cell* **9**, 1055.
- Bewley J.D., Black M. (1983): *Physiology and Biochemistry of Seeds*. 1st ed. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, Berlin 306 stran
- Bienert G. P., Schjoerring J. K., Jahn T. P. (2006): Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1758**, 994-1003.
- Bolwell G. P., Wojtaszek P. (1997): Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**, 347-366.
- Bowler C., Montagu M. V., Inze D. (1992): Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of Plant biology* **43**, 83-116.
- 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**, 248-254.
- Bradley D. J., Kjellbom P., Lamb C. J. (1992): Elicitor-and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**, 21-30.
- Buijs G., Kodde J., Groot S. P., Bentsink L. (2018): Seed dormancy release accelerated by elevated partial pressure of oxygen is associated with DOG loci. *Journal of experimental botany* **69**, 3601-3608.
- Cadenas E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry* **58**, 79-110.
- Cechová M., Válková M., Hradilová I., Janská A., Soukup A., Smýkal P., Bednář, P. (2017): Towards better understanding of pea seed dormancy using laser desorption/ionization mass spectrometry. *International journal of molecular sciences* **18**, 1-15.
- Clerkx E. J., Blankestijn-De Vries H., Ruys G. J., Groot S. P., Koornneef M. (2003): Characterization of green seed, an enhancer of *abi3-1* in *Arabidopsis* that affects seed longevity. *Plant physiology* **132**, 1077-1084.
- Compton S. J., Jones C. G. (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry* **151**, 369-374.
- Davey M. W., van Montagu M., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I. J., Strain J.J., Favel D., Fletcher J. (2000): Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 825-860.
- De Gara L. (2004): Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochemistry Reviews* **3**, 195-205.

- De Souza F. H., Marcos-Filho J. (2001): The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Brazilian Journal of Botany* **24**, 365-375.
- Del Río L. A., Corpas F. J., Sandalio L. M., Palma J. M., Gómez M., Barroso J. B. (2002): Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of experimental botany* **53**, 1255-1272.
- Diesperger H., Sandermann H. (1979): Soluble and microsomal glutathione S-transferase activities in pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Planta* **146**, 643-648.
- Doerge D. R., Divi R. L., Churchwell M. I. (1997): Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical biochemistry* **250**, 10-17.
- Douce R., Neuburger M. (1999): Biochemical dissection of photorespiration. *Current opinion in plant biology* **2**, 214-222.
- Edwards R., Dixon R. A. (1991): Glutathione S-cinnamoyl transferases in plants. *Phytochemistry* **30**, 79-84.
- El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C. (2008): Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant signaling & behavior* **3**, 175-182.
- Eshdat Y., Holland D., Faltin Z., Ben-Hayyim G. (1997): Plant glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum* **100**, 234-240.
- Fath A., Bethke P. C., Jones R. L. (2001): Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant physiology* **126**, 156-166.
- Fenton, H. J. H. (1894): LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **65**, 899-910.
- Finkelstein R. R., Gampala S. S., Rock C. D. (2002): Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* **14**, S15-S45.
- Floegel A., Kim D. O., Chung S. J., Koo S. I., Chun O. K. (2011): Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis* **24**, 1043-1048.
- Floegel A., Kim D. O., Chung S. J., Koo S. I., Chun, O. K. (2011): Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis* **24**, 1043-1048.
- Forman H. J., Ursini F., Maiorino M. (2014): An overview of mechanisms of redox signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology* **73**, 2-9.
- Foyer C. H., Noctor G. (2003): Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia plantarum* **119**, 355-364.
- Gazaryan I. G., Lagrimini L. M., Ashby G. A., Thorneley R. N. (1996): Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochemical Journal* **313**, 841-847.
- Gijzen M., van Huystee R., Buzzell R. I. (1993): Soybean seed coat peroxidase (a comparison of high-activity and low-activity genotypes). *Plant physiology* **103**, 1061-1066



- Gill S. S., Anjum N.A., Hasanuzzaman M., Gill R., Trivedi K. D., Ahmad I., Pereira E., Tuteja N.(2013): Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* **70**, 204-212.
- Gomes M., Garcia Q. (2013): Reactive oxygen species and seed germination. *Biologia* **68**, 351-357.
- Gus' kova R. A., Ivanov I. I., Kol'tover V. K., Akhobadze V. V., Rubin A. B. (1984): Permeability of bilayer lipid membranes for superoxide ( $O_2^-$ ) radicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **778**, 579-585.
- Haber F., Weiss J. (1934): The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences* **147**, 332-351.
- Halliwell B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* **141**, 312-322.
- Hammond-Kosack K. E., Jones J. D. (1996): Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* **8**, 1773-1791.
- Hänsch R., Lang C., Riebeseel E., Lindigkeit R., Gessler A., Rennenberg H., Mendel R. R. (2006): Plant sulfite oxidase as novel producer of  $H_2O_2$ : combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 6884-6888.
- Harris W. M. (1987): Comparative Ultrastructure of Developing Seed Coats of " Hard-Seeded" and " Soft-Seeded" Varieties of Soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Botanical Gazette* **148**, 324-331.
- Havir E. A., McHale N. A. (1989): Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley, and maize. *Plant Physiology* **91**, 812-815.
- 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**, 2414-2420.
- Hodges D. M., DeLong J. M., Forney C. F., Prange R. K. (1999): Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**, 604-611.
- Hradilová I., Trněný O., Válková M., Cechová M., Janská A., Prokešová L., Aamir K., Krezdom N., Rotter B., Winter P., Varshney R. K., Soukup A., Bednář P., Hanáček P., Smýkal P.(2017): A combined comparative transcriptomic, metabolomic, and anatomical analyses of two key domestication traits: pod dehiscence and seed dormancy in pea (*Pisum sp.*). *Frontiers in Plant Science* **8**, 542, 1-25.
- Hurkman W. J., Tanaka C. K. (1996): Effect of salt stress on germin gene expression in barley roots. *Plant Physiology* **110**, 971-977.
- Chamnongpol S., Willekens H., Moeder W., Langebartels Ch., Sandermann H., van Montagu M., Inzé D., van Camp W.(1998): Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by  $H_2O_2$  in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 5818-5823.
- Janská A., Pecková E., Sczepaniak B., Smýkal P., Soukup A. (2018): The role of the testa during the establishment of physical dormancy in the pea seed. *Annals of botany* **123**, 815-829.

- Jimenez A., Hernandez J. A., del Río L. A., Sevilla F. (1997): Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant physiology* **114**, 275-284.
- Job C., Rajjou L., Lovigny Y., Belghazi M., Job D. (2005): Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. *Plant Physiology* **138**, 790-802.
- Joo J. H., Bae Y. S., Lee, J. S. (2001): Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant physiology* **126**, 1055-1060.
- Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J.A., Dennerly P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Mann G.E., Moore K., Roberts L.J., Ischiropoulos H.(2012): Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free radical biology and medicine* **52**, 1-6.
- Kanofsky J. R., Axelrod B. (1986): Singlet oxygen production by soybean lipoxygenase isozymes. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 1099-1104.
- Kapoor D., Singh S., Kumar V., Romero R., Prasad R., Singh J. (2019): Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene* **19**, 1-13.
- Karaki T., Watanabe Y., Kondo T., Koike T. (2012): Strophiole of seeds of the black locust acts as a water gap. *Plant Species Biology* **27**, 226-232.
- Karssen C. M. (1987): The hormone balance theory of dormancy evaluated. *British Plant Growth Regulator Group, Monograph* **15**, 17-30.
- Karssen C. M., Groot S.P.C., Koorneet M. (1987): Hormone Mutani's and seed dormancy in Arabidopsis and Tomato. 120-133.
- Kasai T. (2006): Pea extracellular Cu/Zn-superoxide dismutase responsive to signal molecules from a fungal pathogen. *Journal of General Plant Pathology* **72**, 265-272.
- Khokon M. A. R., Okuma E., Hossain A., Munemasa S., Uraji M., Nakamura Y., Mori I.C., Murata Y.(2011): Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant, cell & environment* **34**, 434-443.
- Klotz L. O. (2002): Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biological chemistry* **383**, 443-456.
- Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T. (1999): Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angewandte Chemie International Edition* **38**, 3209-3212.
- Kowaltowski A. J., de Souza-Pinto N. C., Castilho R. F., Vercesi A. E. (2009): Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* **47**, 333-343.
- Kramer B., Ferrari D. M., Klappa P., Pöhlmann N., Söling H. D. (2001): Functional roles and efficiencies of the thioredoxin boxes of calcium-binding proteins 1 and 2 in protein folding. *Biochemical Journal* **357**, 83-95.
- Lamb C., Dixon R. A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 251-275.
- Lazarević J., Zoric L., Karagic D., Milošević B., Karanovic D., Milic D., Tepic A. Lukovic J.(2017): Anatomical and micromorphological characteristics of the seed coat of field pea

(*Pisum sativum* L.) genotypes in relation to cracks and damage of seeds. *Archives of Biological Sciences* **69**, 503-512.

Leymarie J., Vitkauskaitė G., Hoang H.H., Gendreau E., Chazoule V. Meimoun P., Corbineau F., El-Maarouf- Bouteau H., Bailly Ch.(2012): Role of reactive oxygen species in the regulation of Arabidopsis seed dormancy. *Plant and Cell Physiology* **53**, 96-106.

Liszak A., Kenk B., Schopfer P. (2003): Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* **217**, 658-667.

Lopes M. A., & Larkins B. A. (1993): Endosperm origin, development, and function. *The Plant Cell* **5**, 1383-1399

Makino A., Miyake C., Yokota A. (2002): Physiological functions of the water–water cycle (Mehler reaction) and the cyclic electron flow around PSI in rice leaves. *Plant and Cell physiology* **43**, 1017-1026.

Mao G. D., Thomas P. D., Lopaschuk G. D., Poznansky M. J. (1993): Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 416-420.

Marbach I., Mayer A. M. (1974): Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. *Plant physiology* **54**, 817-820.

Margis R., Dunand C., Teixeira F. K., Margis-Pinheiro M. (2008): Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *The FEBS journal* **275**, 3959-3970.

Marrs K. A. (1996): The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Biology* **47**, 127-158.

Martysiak-Żurowska D., Wenta W. (2012): A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta scientiarum polonorum technologia alimentaria* **11**, 83-89.

Masters C. J. (1996): Cellular signalling: the role of the peroxisome. *Cellular signalling* **8**, 197-208.

Maxwell D. P., Wang Y., McIntosh L. (1999): The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 8271-8276.

Mehler A. H. (1951): Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **34**, 339-351.

Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., van Breusegem F.(2011): ROS signaling: the new wave? *Trends in plant science* **16**, 300-309.

Mittler R., Zilinskas B. A. (1991): Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology* **97**, 962-968.

Moïse J. A., Han S., Gudynaitė-Savitch L., Johnson D. A., Miki B. L. (2005): Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **41**, 620-644.

- Møller I. M. (2001): Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 561-591.
- Møller I. M. Jensen P. E., Hansson A. (2007): Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 459-481.
- Morel F., Doussiere J. & Vignais P. V. (1991): The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells: physiological, molecular and pathological aspects. *European Journal of Biochemistry* **201**, 523-546.
- Müller K., Carstens A. C., Linkies A., Torres M. A. & Leubner-Metzger G. (2009): The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in Arabidopsis seed after-ripening. *New Phytologist* **184**, 885-897.
- Murray D. R. (1987): Nutritive role of seedcoats in developing legume seeds. *American Journal of Botany* **74**, 1122-1137.
- Nakano Y., Asada K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology* **22**, 867-880.
- Okamoto M., Kuwahara A., Seo M., Kushiro T., Asami T., Hirai N., Kamiya Y. Koshiha T. Nambara E.(2006): CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. *Plant physiology* **141**, 97-107.
- Oracz K., El-Maarouf Bouteau H., Farrant J.M., Cooper K., Belghazi M., Job C., Job D., Corbineau F., Bailly Ch.(2007): ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *The Plant Journal* **50**, 452-465.
- Ott M., Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. (2007): Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**, 913-922.
- Piterková J., Tomanková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005): Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy* **99**, 455-466.
- Pollard M. G., Travers K. J., Weissman J. S. (1998): Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell* **1**, 171-182.
- Prasad T. K., Anderson M. D., Stewart, C. R. (1995): Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings. *Plant Physiology* **108**, 1597-1605.
- Puntarulo S., Sánchez R. A., Boveris, A. (1988): Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant physiology* **86**, 626-630.
- Qi J., Wang J., Gong Z., Zhou J. M. (2017): Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current opinion in plant biology* **38**, 92-100.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine* **26**, 1231-1237.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine* **26**, 1231-1237.

- Rolston M. P. (1978): Water impermeable seed dormancy. *The botanical review* **44**, 365-396.
- Rosahl S. (1996): Lipoxygenases in plants-their role in development and stress response. *Zeitschrift für Naturforschung C* **51**, 123-138.
- Shu-Hsien H., Chih-Wen Y. U., Lin C. H. (2005): Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **46**, 1-10.
- Schweikert C., Liskay A., Schopfer P. (2002): Polysaccharide degradation by Fenton reaction- or peroxidase-generated hydroxyl radicals in isolated plant cell walls. *Phytochemistry* **61**, 31-35.
- Skulachev V. P. (1997): Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Bioscience reports* **17**, 347-366.
- Smirnoff N. (1998): Plant resistance to environmental stress. *Current opinion in Biotechnology* **9**, 214-219.
- Smýkal P., Vernoud V., Blair M. W., Soukup A., Thompson R. D. (2014): The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science* **5**, 1-19.
- Sturm A., Tang G. Q. (1999): The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in plant science* **4**, 401-407.
- Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horáčková V. (2007): Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení anti-oxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy* **101**, 584-591.
- Taulavuori E., Hellström E. K., Taulavuori K., Laine K. (2001): Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2375-2380.
- Tognetti V. B., van Aken O., Morreel K., Vandenbroucke K., van de Cotte B., De Clersq I., Chiwocha S., Fenske R., Prinsen E., Boerjan W., Genty B., Stubbs K.A., Inzé D., van Breusegem F. (2010): Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance. *The Plant Cell* **22**, 2660-2679.
- Troszyńska A., Estrella I., López-Amóres M. L., Hernández, T. (2002): Antioxidant activity of pea (*Pisum sativum* L.) seed coat acetone extract. *LWT-Food Science and Technology* **35**, 158-164.
- Turrens J. F. (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* **552**, 335-344.
- Tyagi M., Kayastha A. M., Sinha B. (2000): The role of peroxidase and polyphenol oxidase isozymes in wheat resistance to *Alternaria tritricina*. *Biologia Plantarum* **43**, 559-562.
- Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M. M., Mazur M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* **160**, 1-40.
- Van Breusegem F., Dat J. F. (2006): Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant physiology* **141**, 384-390.
- Van Dongen J. T., Ammerlaan A. M., Wouterlood M., Van Aelst A. C., Borstlap A. C. (2003): Structure of the developing pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. *Annals of Botany* **91**, 729-737.

- Van Doorn, W. G., Ketsa, S. (2014): Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase. *Postharvest biology and technology* **95**, 64-69.
- Vianello A., Zancani M., Macri F. (1990): Hydrogen peroxide formation and iron ion oxidoreduction linked to NADH oxidation in radish plasmalemma vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1023**, 19-24.
- Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F. (2002): Signal transduction during oxidative stress. *Journal of experimental botany* **53**, 1227-1236.
- Wang H., Qi Q., Schorr P., Cutler A. J., Crosby W. L., Fowke L. C. (1998): ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *The Plant Journal* **15**, 501-510.
- Wauchope O. R., Mitchener M.M., Beavers W.N., Galligan J.J., Camarillo J.M., Sanders W.D., Kingsley P.J., Shim H., Blackwell T., Luong T., deCaestecker M., Fessel J.P., Marnett L.J. (2018): Oxidative stress increases M1dG, a major peroxidation-derived DNA adduct, in mitochondrial DNA. *Nucleic acids research* **46**, 3458-3467.
- Weber H., Borisjuk L., Heim U., Buchner P., Wobus U. (1995): Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *The Plant Cell* **7**, 1835-1846.
- Weber H., Borisjuk L., Wobus U. (2005): Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**, 253-279.
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels Ch., van Montagu M., Inzé D., van Camp W. (1997): Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO journal* **16**, 4806-4816.
- Yamaguchi S., Smith M. W., Brown R. G., Kamiya Y., Sun T. P. (1998): Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell* **10**, 2115-2126.
- Yao Y., Liu X., Li Z., Ma X., Rennenberg H., Wang X., Li H. (2013): Drought-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in subsidiary cells is involved in regulatory signaling of stomatal closure in maize leaves. *Planta* **238**, 217-227.
- Young I. S., Woodside J. V. (2001): Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology* **54**, 176-186.
- Zhang X., Zhang L., Dong F., Gao J., Galbraith D.W., Song Ch. (2001): Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant physiology* **126**, 1438-1448.

## 18 Seznam použitých zkratk

ABA- kyselina abscisová

ABTS - 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonová kyselina

APX- askorbátperoxidasa

AsA- askorbát

BSA- hovězí sérový albumin

CAT- katalasa

CuZnSOD. Superoxiddismutasa s mědí a zinkem v aktivním místě

DPPH - 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

GA- gibereliny

GPX- glutathionperoxidasa

GSH- glutathion

GuPOX- guajakolperoxidasa

H<sub>2</sub>DCF DA - 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát

IAA- auxiny

LOX- lipoxygenasa

MDA- malondialdehyd

MnSOD- superoxiddismutasa s manganem v aktivním místě

NADH- nikotinamidadeninukleotid

NADPH- niktionamidadeninukleotidifostfát

TBA- kyselina thiobarbiturová

TBARS- thiobarbituric acid reactive substances

## 19 Seznam grafických objektů

### Seznam obrázků

Obr. 1: Schematické znázornění elektronové konfigurace kyslíku, superoxidového anion radikálu, singletového kyslíku a peroxidové anionu.....	2
Obr. 2: Jednoelektronová redukce reaktivních částic kyslíku.....	3
Obr. 3: Schéma produkce ROS v mitochondriích..	6
Obr. 4: Schéma produkce ROS v chloroplastech a peroxisomech.....	7
Obr. 5: Tabulka srovnání ROS. ....	11
Obr. 6: Schéma demonstrující provázanost ROS s rostlinnými hormony.....	14
Obr. 7: Schéma zobrazující detoxifikaci ROS v rostlinných buňkách.....	16
Obr. 8: Thioredoxin regenerační systém .....	18
Obr. 9: Schéma katalýzy glutathionperoxidasy .....	19
Obr. 10: Jednotlivé reakce Askorbát-gluthathionového cyklu.....	21
Obr. 11: Struktura osemení. ....	28

### Seznam grafů

Graf 1: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace celkových proteinů dle Bradfordovy metody. ....	42
---	----

### Seznam tabulek

Tab 1: Studované genotypy hrachu setého ( <i>Pisum sativum L.</i> ).....	34
Tab 2: Příprava kalibrační řady ředěním zásobního roztoku 1mM Troloxu methanolem.....	36
Tab 3: Ředění zásobního roztoku BSA (10 mg.ml <sup>-1</sup> ).....	38
Tab 4: Naměřené hodnoty absorbance pro koncentrační řadu standardu BSA. ....	41