

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Štúdium aktivity enzýmov fenypropanoidnej dráhy behom dozrievania semien hrachu

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor: Lucia Gazdiková
Študijný program: R20321 Biochémia
Študijný obor: Biochémia
Forma štúdia: Prezenčná
Vedúci práce: Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Rok: 2024

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

.....

Podpis študenta

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa rada poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce Mgr. Jane Sekaninovej, Ph.D. za trpezlivosť, ľudský a pedagogický prístup. Ďakujem taktiež ostatným členom Katedry Biochémie UP, ktorý mi v prípade potreby poradili. V neposlednom rade by som rada spomenula mojich spolužiakov, priateľov, spolubývajúcich a rodinu, nakoľko mi boli skutočnou oporou počas písania tejto práce.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Lucia Gazdiková
Názov práce	Štúdium aktivity enzýmov fenylypropanoidnej dráhy hrachu siateho
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

V rámci vývoja hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) dochádza ku rozličným dejom, ktoré sú predmetom štúdia tejto práce. Na dozrievanie semena a jeho vlastnosti majú vplyv látky fenylypropanoidnej dráhy – flavonoidy a lignín, ktoré sú v rámci semena významné hlavne vďaka svojej ochrannej funkcii. Oxidáciou flavonoidov pomocou enzýmov ako peroxidáza a polyfenoloxidáza vzniká fenolický heterogénny pigment melanín. Enzým cinnamylalkoholdehydrogenáza sprostredkúva posledný krok biosyntézy monolignolov, ktoré sú pomocou peroxidázy polymerizované na lignín. V rámci tejto práce boli ako modelové organizmy použité kultúrne genotypy hrachu líšiace sa pigmentáciou – bezfarebný PI a Cameor a pigmentovaný ATC. Stanovenia obsahu celkových fenolov, flavonoidov a aktivít daných enzýmov ukázalo rozdiely medzi pigmentovanými a nepigmentovanými genotypmi. Histochemická lokalizácia reaktívnych foriem kyslíka spolu s proteínovou analýzou dotvára obraz o zmenách počas štyroch vývojových štádií.

Kľúčové slová	peroxidáza, polyfenoloxidáza, cinnamylalkoholdehydrogenáza, fenylypropanoidná dráha, flavonoidy, fenoly, pigmentácia, osemenie, embryo, <i>Pisum sativum</i> , histochemická lokalizácia, reaktívne formy kyslíka
Počet strán	59
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Lucia Gazdiková
Title	Study of phenylpropanoid pathway enzyme activity during pea seed ripening
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

The development of pea seeds (*Pisum sativum* L.) involves various processes that are the subject of this study. The maturation and properties of the seed are influenced by phenylpropanoid pathway substances - flavonoids and lignin, which are important within the seed mainly due to their protective function. Oxidation of flavonoids by enzymes such as peroxidase and polyphenoloxidase produces a phenolic heterogeneous pigment melanin. The enzyme cinnamylalcohol dehydrogenase mediates the last step in the biosynthesis of monolignols, which are polymerized to lignin by peroxidase. In this work, cultured pea genotypes differing in pigmentation - colorless PI and Cameor and pigmented ATC were used as model organisms. Determinations of total phenol and flavonoid content together with activities of these enzymes showed differences between pigmented and non-pigmented genotypes. Histochemical localization of reactive oxygen species together with protein analysis completes the picture of changes during four developmental stages.

Keywords	peroxidase, polyphenol oxidase, cinnamyl alcohol dehydrogenase, phenylpropanoid pathway, flavonoids, phenols, pigmentation, seed coat, embryo, <i>Pisum sativum</i> , histochemical localization, reactive oxygen species
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	2
2.1	Vývoj a štruktúra semena	2
2.1.1	Vznik a vývoj semena	2
2.1.2	Obecná štruktúra semena	3
2.1.3	Špecifiká štruktúry semena hrachu siateho	5
2.2	Maturácia semien hrachu	7
2.2.1	Význam sacharidov v procese maturácie	8
2.2.2	Význam hormónov v procese maturácie	9
2.2.3	Syntéza zásobných proteínov	9
2.2.4	Tolerancia voči desikácií	10
2.2.5	Dormancia	11
2.3	Fenylpropanoidná dráha a flavonoidy	12
2.3.1	Všeobecná fenylpropanoidná dráha	12
2.3.2	Flavonoidy	14
2.4	Peroxidázy	16
2.4.1	Peroxidázy – trieda III	16
2.4.2	Peroxidatívny cyklus peroxidáz	17
2.4.3	Hydroxylový cyklus peroxidáz	18
2.5	Polyfenoloxidázy	19
2.5.1	Tyrosináza	19
2.5.2	Katechoxidáza	20
2.5.3	Lakáza	20
2.5.4	Štruktúra polyfenoloxidáz	20
2.6	Cinnamylalkoholdehydrogenáza	22
2.6.1	Kategorizácia cinnamylalkoholdehydrogenáz	22
2.6.2	Štruktúra cinnamylalkoholdehydrogenáz	22

2.6.3	Hospodársky vplyv cinnamylalkoholdehydrogenázy	23
2.7	Úloha reaktívnych foriem kyslíka pri dozrievaní semien.....	24
2.7.1	Reaktívne formy kyslíka	24
2.7.2	Zdroje reaktívnych foriem kyslíka	24
2.7.3	Vplyv reaktívnych foriem kyslíka na klíčenie a dormanciu	25
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	26
3.1	Prístroje a vybavenie	26
3.2	Chemikálie a činidlá	26
3.3	Príprava pufrov	27
3.4	Rastlinný materiál.....	27
3.4.1	Rastlinný materiál použitý pri mikroskopii.....	28
3.4.2	Rastlinný materiál použitý pri spektrofotomertrickom stanovení.....	28
3.5	Použité metódy	28
3.5.1	Extrakty pre stanovenia fenolov a flavonoidov	28
3.5.2	Extrakty pre stanovenia aktivity enzýmov a koncentrácie proteínov	28
3.5.3	Stanovenie koncentrácie fenolov	29
3.5.4	Stanovenie koncentrácie flavonoidov	29
3.5.5	Stanovenie koncentrácie proteínov pomocou Bradfordovho činidla	30
3.5.6	Stanovenie koncentrácie proteínov pomocou bicinchonínovej metódy.....	30
3.5.7	Stanovenie celkovej aktivity peroxidázy	31
3.5.8	Stanovenie celkovej aktivity polyfenoloxidázy	31
3.5.9	Stanovenie celkovej aktivity cinnamylalkoholdehydrogenázy	31
3.5.10	Príprava priečných rezov pomocou vibratómu	32
3.5.11	Lokalizácia, pozorovanie a fotodokumentácia reaktívnych foriem kyslíka.....	32
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	34
4.1	Stanovenie množstva celkových fenolov a flavonoidov	34
4.2	Stanovenie množstva celkových proteínov	37

4.3	Stanovenie aktivity peroxidázy	40
4.4	Stanovenie aktivity polyfenoloxidázy	41
4.5	Stanovenie aktivity cinnamyl alkohol dehydrogenázy	42
4.6	Histochemická lokalizácia reaktívnych foriem kyslíka.....	43
5	ZÁVER	46
6	LITERATÚRA.....	48
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	59

Ciele práce

Teoretická časť: literárna rešerš na témy

- Dozrievanie semien
- Fenylypropanoidná dráha a flavonoidy
- Peroxidázy (POX)
- Polyfenoloxidáza (PPO)
- Cinnamylalkoholdehydrogenáza (CAD)
- Úloha enzýmov fenylypropanoidnej dráhy a reaktívnych foriem kyslíka (ROS) pri dozrievaní semien

Experimentálna časť:

- Spracovanie rastlinného materiálu- semená dvoch kultúrnych hrachov líšiacich sa pigmentáciou osemenia (homogenizácia, extrakcia)
- Stanovenie aktivity POX, PPO a CAD v osemeniach a kľúčnych listoch
- Stanovenie koncentrácie fenolických a flavonoidných látok a celkového obsahu proteínov
- Histochemická lokalizácia ROS

1 ÚVOD

Semená hrajú dôležitú úlohu v procese rozmnožovania rastlín a zároveň sú pre svoju nutričnú hodnotu dôležitou súčasťou potravinového reťazca. Počiatkom existencie semien je tzv. dvojité oplodnenie, kedy dochádza ku splynutiu 1 samčej a samičej pohlavnej bunky do zygoty. Zygota dáva základ embryu, z ktorého sa neskôr vyvinú kľúčne listy. Druhá samčia bunka splýva s centrálnou bunkou zárodočného vaku za vzniku endospermu. U strukovín je endosperm „pohltený“ kľúčnymi listami, ktoré preberajú jeho funkciu zásobného orgánu. Premenu vaječných obalov vzniká osemenie, ktoré poskytuje embryu ochranu a je zároveň miestom aktívneho metabolizmu. Po diferenciácii embrya nasleduje štádium dozrievania (maturácie), počas ktorého semeno: 1. akumuluje, syntetizuje a ukladá zásobné látky, 2. embryo naďalej rastie bunkovou expanziou, 3. vstupuje do štádia metabolického stíšenia (dormancie) 4. vytvára si toleranciu voči vysychaniu. Procesy stíšenia a vysychania zlepšujú životaschopnosť semien. Medzi látky, ktoré ovplyvňujú vývin, dozrievanie a vlastnosti semien patria produkty fenylpropanoidnej dráhy- flavonoidy a lignín. Syntéza týchto látok vychádza z fenylalanínu a metabolizuje ho na *p*-kumaroyl CoA. Od tejto látky sa metabolická dráha vetví na syntézu flavonoidov a lignínu. Oxidáciou flavonoidov pomocou enzýmov ako peroxidáza (POX) a polyfenoloxidáza (PPO) vzniká heterogénny pigment – melanín. Tvorba melanínu sa predovšetkým spája s oxidačným poškodením pletiva, má však aj ochrannú funkciu, napríklad pred UV-B žiarením. V lignínovej dráhe je významným enzýmom cinnamylalkoholdehydrogenázu (CAD), ktorá sprostredkúva posledný krok syntézy monolignolov. Tie sú pomocou voľných radikálov spájané do lignínu – heterogénneho aromatického polyméru. Lignín má úlohu v spevňovaní sekundárnej bunkovej steny, čo v semene spôsobuje mechanickú ochranu a vodeodolnosť. POX hrajú úlohu v polymerizácii rozpustných fenolov na nerozpustný lignín. Dôležitou vlastnosťou peroxidáz je schopnosť regulácie reaktívnych foriem kyslíka (ROS). V dvoch rôznych katalytických cykloch sú schopné ich produkcie a zároveň zneškodňovania, čím udržiavajú vhodnú koncentráciu ROS. Akumulácia ROS je škodlivá – oxidujú lipidy, znehodnocujú enzýmy a poškodzujú štruktúru DNA, čo má za následok starnutie semien, alebo znižovanie schopnosti klíčenia. V primeranom množstve však pôsobia aj ako pozitívne regulátory– sú zodpovedné za oslabovanie bunkovej steny (podporujú predlžovanie buniek), aktivujú syntézu gibberelínov, alebo oxidujú zásobné proteíny, čo má za následok ukončenie dormancie a stimuláciu klíčenia pri vhodných podmienkach.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Vývoj a štruktúra semena

Semená hrajú dôležitú rolu v procese pohlavného rozmnožovania cievnatých rastlín. Spôsob reprodukcie pomocou semien je využívaný ich druhovo najpočetnejšími líniami - krytosemenné a nahosemenné. Tieto rastliny majú výraznú evolučnú výhodu - semená umožňujú adaptáciu na nepriaznivé podmienky rastu a napomáhajú ich rozširovaniu. (Steeves, 1983). Vznik semena si preto priblížime v popise ontogenézy krytosemenných rastlín, nakoľko ide o oddelenie, do ktorého radíme objekty záujmu tejto práce – hrach siaty (*Pisum sativum*).

2.1.1 Vznik a vývoj semena

Individuálny vývoj vyšších rastlín prechádza zmenou dvoch generácii – sporofytom a gametofytom, ktorých vzájomné striedanie nazývame metagenéza (rodozmena). Tento významný jav bol pozorovaný Wilhelmom Hofmeisterom a publikovaný už v roku 1851 (Kaplan & Cooke, 1996). Sporofyt je prevažujúce diploidné štádium rastliny tvoriace kormus (rastlinné telo). Sporofytom sú preto všetky rastlinné pletivá a orgány vrátane samčích a samičích reprodukčných orgánov – tyčinky a piestika. Ich úlohou je produkcia gametofytov, teda príslušných haploidných buniek, ktoré procesom oplodnenia splývajú do diploidnej zygoty. Práve zygotu považujeme za najranejšie štádium nového sporofytu, nakoľko sa z nej vyvíja embryo (ako súčasť semena), z embrya výhonok a následne rastlinné telo produkujúce sporogénnymi pletivami pohlavných orgánov opäť haploidné gametofyty, čím sa pomyselný kruh metagenézy uzatvára (Gifford & Foster, 1989; Vinter & Macháčková, 2013). Samotnému oplodneniu samičej pohlavnej bunky (vajíčka) samčou bunkou (peľové zrnko) predchádza proces opelenia, kedy peľové zrnko pristane na blizne piestika. Tu dochádza ku jeho hydratácii, čím je iniciovaný rast peľovej láčky (*sipho*) tvorenej rapídne rastúcou generatívnou bunkou, ktorá na svojom konci nesie dve spermatické bunky (McCormick, 2004). Funkciou peľovej láčky je teda prenos nepohyblivých spermatických buniek do blízkosti samičej gaméty (Doyle, 2006). Peľová láčka prerastá čnelkou do semenníka až ku klovému otvoru vajíčka (*micropyle*). Tento otvor umožní láčke vstup do zárodočného vaku, kde na vrchole filiformného aparátu prenikne do pomocnej bunky (synergidy), tá praská a láčka do nej uvoľňuje svoj obsah, ktorý pozostáva z dvoch spermatických buniek a jadra vegetatívnej bunky peľového zrnka. (Diboll, 1968). Nasleduje tzv. dvojité oplodnenie, čím rozumieme karyogamiu

a plazmogamii vaječnej bunky s jednou spermatickou bunkou za vzniku zygoty a splynutie druhej spermatickej bunky s dvojjadrovou centrálnou bunkou zárodočného vaku - výsledkom je jadro primárneho endospermu. Z oplodneného vajíčka teda dostávame základ pre tvorbu semena –zygotu, endosperm, a vaječné obaly (integumenty) dávajúce základ osemeniu (Gifford & Foster, 1989). Aby takéto semeno dosiahlo stav zrelosti, musí podstúpiť procesy ďalšieho vývoja. V mnohých prípadoch nedochádza ku neodkladnému klíčeniu a to ani v prípade priaznivých podmienok okolia (Bewley, 1997). Semeno sa naopak dostáva do kľudového štádia- tzv. dormancie a v procese desikácie vysychá (Jiang & Kermode, 1994). Vďaka obmedzenému metabolizmu v anhydrobiotickom prostredí dokáže takéto semeno prečkať až stovky rokov (Lerman & Cigliano, 1971). S následným príjmom vody dochádza ku reaktivácii metabolizmu a syntéze nových komponentov, čo vedie ku bunkovej expanzii a deleniu – koreň sa predlžuje a semeno začína klíčiť (Jiang & Kermode, 1994).

2.1.2 Obecná štruktúra semena

Premenou vaječných komponentov po oplodnení získavame základ obcej štruktúry semena, ktorá pozostáva z embrya, endospermu a osemenia (Boesewinkel & Bouman, 1984).

2.1.2.1 Osemenie

Osemenie je ochranná štruktúra obklopujúca embryo a endosperm. Na začiatku vývoja je osemenie metabolicky aktívne – podporuje napríklad syntézu zásobných látok prenosom organických látok z floému do filiálneho pletiva (Hungria & Stacey, 1997). Počas expanzie a desikácie semena dochádza ku senescencii buniek osemenia a ku mechanickému spevneniu vďaka syntéze sekundárnych bunkových stien, ktoré sú impregnované tukmi, voskami a rôznymi polyfenolmi (Zablatzká et al., 2021). Osemenie teda obsahuje množstvo látok, ktoré poskytujú semenu rôzne fyzikálne a chemické bariéry voči nepriaznivým vplyvom okolia a chránia ho pred narušením infekciami a mikroorganizmami. Napríklad obsah lignínu koreluje s mechanickou odolnosťou semena, flavonoly chránia embryo pred UV-B žiarením, proantokyandíny (PAs) odpudzujú a usmrcujú larvy chrobákov (Griffen et al., 2004; Capeleti et al., 2005; Lattanzio et al., 2005). Okrem ochrany však má testa aj významnú úlohu v ovplyvňovaní dormancie a taktiež poskytuje semenu výživu počas vývoja (Vitale & Bollini, 1955; Muralidhara et al., 2015).

Dôležitou súčasťou osemenia je chazálna oblasť, kde sa semeno spája s vaskulárnymi pletivami materského funikulu. Po odpojení funikulu vzniká jazva, tzv. hilum (alebo pupok) (Lersten & Gunn, 1981).

2.1.2.2 Endosperm

Endosperm je výživné pletivo špecifické pre krytosemenné rastliny (Friedman & Floyd, 2001). Jadro primárneho endospermu vzniká splynutím samčej spermatickej bunky s dvojitou (dvojjadrovou) centrálnou bunkou zárodočného vaku. Nakoľko je každé z troch splývajúcich jadier buniek haploidné, výsledný primárny endosperm je triploid (Raven et al., 2013). Rápidným mitotickým delením jadra primárneho endospermu vzniká endosperm, ktorého funkciou je výživa rastúceho embrya. Iným výživným pletivom niektorých druhov môže byť perisperm, ktorý vzniká premenou nucellu vajíčka. (Mauseth, 2014). V prípade, že sú v semene prítomné obe tieto pletivá, nazývame ich súborne bielkom (albumen) bohatým na tuky, škrob a proteíny. Príkladom rastlín so semenami s vysokým obsahom endospermu sú jačmeň, kakaové či ricínové bôby (Forbis et al., 2002; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). V mnohých prípadoch je však väčšina výživných pletív absorbovaných vyvíjajúcim sa embryom. Takéto embryá si neskôr tvoria zásobáreň proteínov, tukov a sacharidov vo forme klíčnych listov. Typickým znakom pre hrach a fazuľu je takmer úplná redukcia endospermu na úkor klíčnych listov, ktoré zaberajú väčšinu priestoru semena (Tegeder et al., 1999).

2.1.2.3 Embryo

Štruktúra zrelého embrya je variabilne diferencovaná v závislosti od druhu rastliny. Napríklad orchidei a príslušníci čeľade broméliovitých majú drobné semienka, ktorých embryo tvorí len niekoľko buniek (Swamy, 1943). V prípade krytosemenných rastlín na konci embryogenézy rozlišujeme osu nesúcu 2 klíčne, poprípade 1 klíčny list, ak ide o čeľaď jednoklíčnoslosté. Na opačných stranách osi nachádzame apikálne meristémy korenia a výhonku. Vývoj zrelého embrya začína totipotentnou zygotou a jeho prvotné štádiá sú prakticky rovnaké pre všetky krytosemenné rastliny (Raven et al., 2013). Zygota ako výrazne polárna bunka podstupuje asymetrické mitotické delenie na menšiu apikálnu a väčšiu bazálnu bunku, čím sa udáva polarita embrya (Jurgens, 2001).

Nasleduje lineárna fáza embryogenézy, ktorá zahŕňa diferenciaciu bazálnej bunky na funikulus, ktorým je embryo pripojené ku stene zárodočného vaku. (Vinter & Macháčková, 2013). Suspensor má okrem upevňovacej funkcie aj metabolický význam-

zásobujú vyvíjajúce sa embryo živinami a rastovými regulátormi (giberelínmi). Táto štruktúra má krátku životnosť a podstupuje programovanú bunkovú smrť v priebehu torpédového vývoja embrya a nie je preto prítomná v zrelom semene.

V rámci globulárnej, srdčitej a torpédovitej vývojovej fázy dochádza k deleniu apikálnej bunky a diferenciácii protomeristémov na protoderm -dáva základ vzniku pokožke (*epidermis*), prokambium (vzniká z neho xylém a floém) a základný meristém. V prípade, že sa nad kľúčnymi listami nachádza stonkový výhonok s jedným alebo viacerými mladými lístkami a apikálnym meristémom, hovoríme o takzvanom embryonálnom pupeni (*plumula*). Ako hypokotyl označujeme v časť výhonku smerom od kľúčnych listov smerom dolu ku radikule (Raven et al., 2013).

2.1.3 Špecifická štruktúra semena hrachu siateho

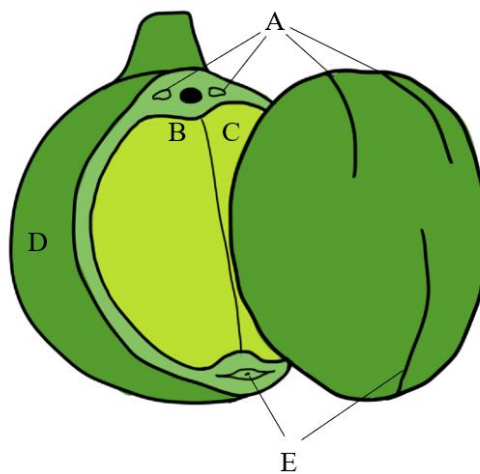
Pre hrach a iné strukoviny je charakteristickým znakom postupnosť vývoja komponentov semena - vývoj embrya nasleduje až po vývine osemenia a endospermu (Smýkal et al., 2014). Živiny importované floémom sú u strukovín uvoľnené do apoplastu a následne prijaté kľúčnymi listami na úkor endospermu, čím preberajú funkciu hlavného zásobného orgánu semena (Tegeder et al., 1999). Kľúčne listy hrachu teda zaberajú veľkú časť semena (Patrick, 1997). Nakoľko sa v rámci tejto práce zaoberáme najmä osemením, bude práve táto časť semena hrachu detailnejšie spracovaná v nasledujúcich riadkoch.

Osemenie strukovín sa vyvíja z dvoch vaječných obalov, pričom vnútorný obal v priebehu vývoja takmer celý zaniká. Vonkajší obal podstupuje diferenciáciu na vrstvy buniek, ktoré definujú typickú štruktúru osemenia.

Najvrchnejšou vrstvou sú tesne priliehajúce palisádové bunky (iným názvom aj sklereidy, Malpighiho bunky, alebo makrosklereidy) (Smýkal et al., 2014). Majú hrubé sekundárne bunkové steny a zároveň ich pokrýva kutikula a voskové usadeniny, ktoré spolu tvoria faktory determinujúce textúru povrchu semena (Harris, 1983). V rámci palisádových buniek môžeme pozorovať tenkú svetlolomnú líniu, tzv. *linea lumina*, ktorá je spôsobená lokálnou modifikáciou zloženia polysacharidov alebo impregnáciou bunkových stien (Hamly, 1932; Bhalla & Slatery, 1984). Hrúbka svetlolomnej línie má súvis s nepriepustnosťou vody cez osemenie (Serrato-Valenti et al., 1990).

Medzi palisádovými bunkami a parenchýmom sa nachádza vrstva osteosklereidov tvarom pripomínajúcich kosť, od čoho bol odvodený ich názov. Medzi nimi je možné sledovať nápadne veľké intercelulárne priestory (Miller et al., 2010).

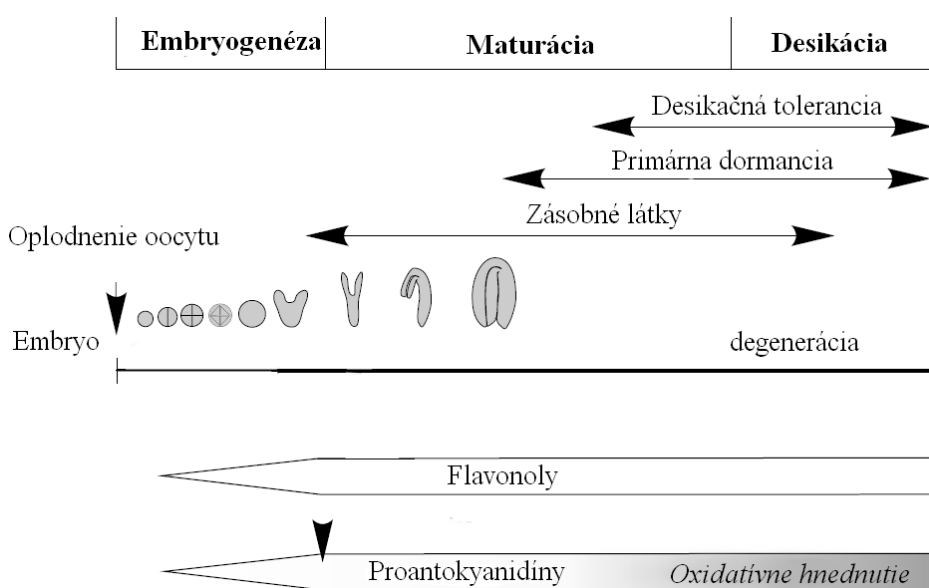
Najvnútornejšiu časť osemenia (*endothelium*) tvorí vrstva parenchymatických buniek, ktoré sú v priamom kontakte s endospermom (Hamly, 1932). Táto vrstva je metabolicky aktívna a je hlavným miestom syntézy proantokyanidínov (Smýkal et al., 2014). U hrachu dokážeme rozlíšiť tri typy parenchýmu: chlarenchým, základný meristém a vetvený meristém, pričom prechodne dochádza ku ukladaniu škrobu v plastidoch týchto pletív (Rochat & Boutin, 1991; Smýkal et al., 2014). V parenchýme je umiestnený vaskulárny systém osemenia, pričom v prípade hrachu ide o systém v porovnaní s fazuľou (*Phaseolus vulgaris*) podstatne jednoduchší s jedným chazálnym vaskulárnym zväzkom a dvoma krátkymi laterálnymi zväzkami (Hardham, 1976; Patrick & Offler, 1995). Vaskulárny systém je zobrazený v Obr.1. Počas embryonálneho vývoja má táto vrstva výživovú funkciu, neskôr tieto bunky strácajú protoplast a ich najvnútornejšie vrstvy môžu byť postupne utlačené rastúcim embryom (Bhalla & Slattery, 1984).



Obr. 1: Výrez zrelého semena hrachu siateho. Zväzok dvoch krátkych bočných vetiev, obsahujúcich floém (A), klíčne listy (B, C), osemenie (D), chazálna žila siahajúca do dvoch tretín semena (E). Prevzaté od Van Dongen (2003).

2.2 Maturácia semien hrachu

Zrelosť semena je dôležitým aspektom vitality, ktorá významne vplyva na skorý rast semenáčka a následne celej rastliny. Z agronomického hľadiska je semeno zrelé v momente dosiahnutia maxima suchej váhy (označovná ako: Fresh Weight, FW) a teda v maxime agronomického výťažku (Shaw & Loomis, 1950). Napriek dosiahnutiu takejto zrelosti však v semene naďalej pokračujú fyziologické a morfológické procesy zrenia – maturácie. Tieto zmeny prispievajú s zlepšenej životnosti semena a nazývajú sa štádiom neskorej maturácie (Groot, 2022). Maturácia je proces, počas ktorého dochádza v rámci semena ku dôležitým dejom, akými sú 1. akumulácia a syntéza zásobných látok, 2. založenie dormancie a 3. nadobudnutie tolerancie voči desikácii. Tieto udalosti súčasne sprevádzajú zmeny v hladinách hormónov a pomere sacharidov, ako aj v zmene z materskej kontroly na filiálnu a sú zobrazené v Obr.2. (Roberts et al., 1993; Wobus & Weber, 1999; Weber et al., 2005).



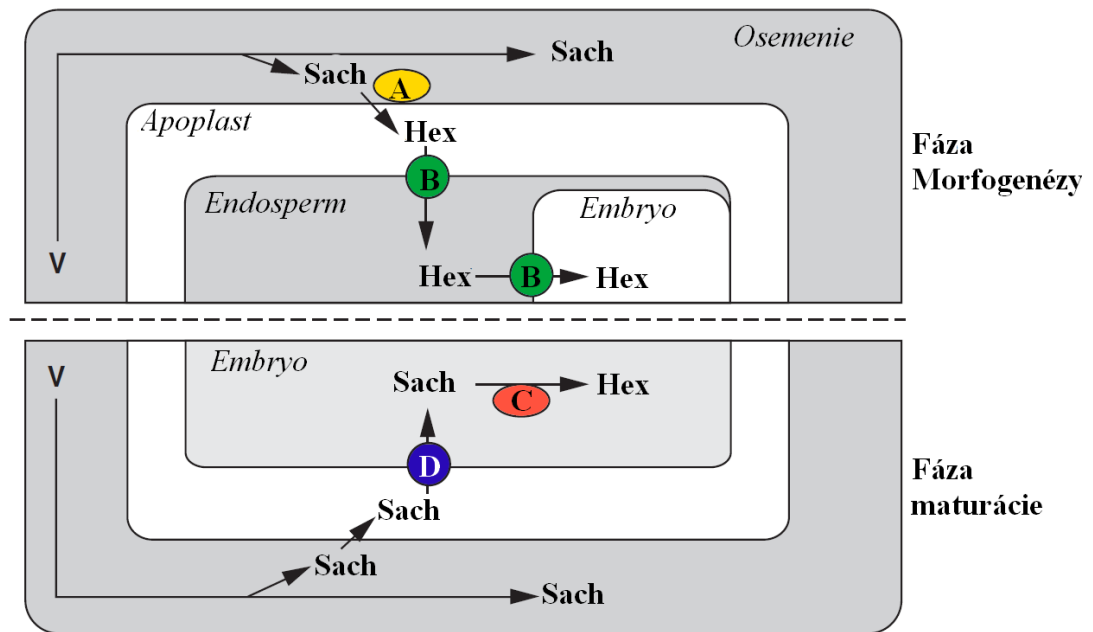
Obr. 2: Prehľad udalostí počas vývoja semena *A.Thaliana*. Od oplodnenia vajíčka (oocyty) prechádza semeno diferenciaciou a rastie bunkovým delením až do štádia maturácie. V rámci maturácie rast embrya pokračuje, tentokrát ale bunkovou expanziou. Zároveň dochádza ku syntéze, akumulácii a tvorbe zásobných látok, ku nastoleniu primárnej dormancie a deikačnej tolerancie. Koncentrácia flavonolov a proantokynidínov počas vývoja semena rastie približne do konca štádia embryogenézy. Oxidatívne hndnutie semena je spôsobené postupnou oxidáciou porantokyanidínov. Prevzaté od Debejaun et at., (2007).

Aby bolo možné proces maturácie časovo ohraničiť, musíme stručne spomenúť priebeh vývoja semena. Štúdie vykonané na semenách hrachu siateho určili tri fázy rapidného rastu, oddelených dvoma lag fázami. Prvá fáza je charakteristická rastom embrya

a endospermu. Druhá fáza predchádza maturácii– je asociovaná s ďalším rastom embrya bunkovým delením a trvá do ukončenia embryogenézy (Wang & Hedley, Casey, Davies, 1993). Tretia fáza zahŕňa proces maturácie, pre ktorú je charakteristický rast bunkovou expanziou. Popísané fázy rastu je možné aspoň približne zlúčiť so všeobecne uznaným systémom, ktorý delí vývoj semena na fázu bunkového delenia/ morfogenézy, fázu maturačnú/ uskladňovaciu, a desikačnú (Weber et al., 2005).

2.2.1 Význam sacharidov v procese maturácie

Prechod z fázy bunkového delenia do zásobnej fázy je v embryu sprevádzaný zmenou pomeru hexózy ku sacharóze, spolu s dramatickým nárastom čerstvej váhy, ktorá sa rovná hmotnosti. Primárnym zdrojom sacharidov je pre vyvíjajúce sa semeno sacharóza, ktorá je transportovaná do parenchýmu osemenia. Následne je metabolizovaná dvoma možnými spôsobmi, ktoré závisia od vývojového štádia. Počas fázy morfogenézy je väčšina sacharózy hydrolyzovaná na hexózy (glukózu a fruktózu) pomocou invertázy (β -D-fruktofuranozid: fruktohydroláza, EC 3.2.1.26) viazanej na bunkovú stenu. Daná invertáza je lokalizovaná v najvnútornejšej vrstve osemenia, v tenkostennom parenchýme. Produkované hexózy sú transportérmí prevedené do endospermu a embrya. V rámci skorého vývinu semena sú to teda hexózy, ktoré sa primárne akumulujú v ebyru. Počas maturácie dochádza ku rozdrveniu vnútorného parenchýmu osemenia rastúcim embryom, čo je miesto výskytu invertázy. Následkom toho sa znižuje aktivita invertázy, s čím klesá premena sacharózy na hexózy. Sacharóza je preto priamo transportovaná do embrya pomocou sacharózového transportéru a je ďalej metabolizovaná sacharóza syntázou (NDP- α -D-glukóza:D-fruktóza 2- α -D-glukozyltransferáza ((konfiguráciu-zachovávajúca)), EC 2.4.1.13) (Ohto et al., 2007). Môžeme povedať, že stav sacharidov pôsobí ako kontrolný element vo vývoji semena. Vysoký pomer hexóz ku sacharóze je prítomný počas mitotickej aktivity kľúčnych listov. Zmena nastáva postupnou stratou invertázovej aktivity v osemení a klesá, až kým zväčšujúce sa embryo nepríde do kontaktu s parenchýmom testy a embryo získava schopnosť priameho importu sacharózy (Weber et al., 1995). Tento proces je znázornený v Obr. 3.



Obr. 3: Schéma transportu sacharidov počas vývoja semena v strukovinách. Horná časť reprezentuje hlavnú dráhu importu a metabolizmu sacharózy (Sach) počas morfogenetickkej fázy vývoja. Sacharóza je importovaná z materskej rastliny cez vaskulárny systém (V). Aktivita invertázy (A) asoiovanej s osemením je v tomto období vysoká, následkom čoho dochádza ku konverzii sacharózy na hexózy (Hex). Hexózy sú transportované do embrya cez hexózové transportéry (B). Spodná časť reprezentuje maturačnú fázu. Invertázová aktivita je nízka, sacahróza je preto priamo prijímaná emryom. Sacharóza-syntáza (C) katalyzuje rozklad sacharózy na hexózy. Prevzaté od Ohto et al., (2007).

2.2.2 Význam hormónov v procese maturácie

Kyselina abscisová (ABA) má v rastlinnom tele vplyv na širokú škálu procesov. V rámci semena je prvotne produkovaná pletivami materskej rastliny v osemení, neskôr embryom (Karszen et al., 1983). Na začiatku vývoja podporuje rast a predchádza potratu embrya (Frey et al., 2004). Počas maturácie stúpa jej hladina, čo má za následok indukciu inhibítora expresie cyklín-dependentných kináz. Výsledkom je zastavenie bunkového cyklu, ABA teda má vplyv na diferenciáciu embrya (resp. jej koniec) a je teda indikátorom maturácie (Wang et al., 1998).

Antagonistami funkcie kyseliny abscisovej v semenách sú giberelíny syntetizované vo filiálnych pletivách. Podporujú bunkovú expanziu plodov hrachu, klíčenie, a ich nedostatok sa prejavuje v mutantoch spomaleným rastom alebo potratom v prechodnej fáze (Swain et al., 1995; Ozga et al., 2002).

2.2.3 Syntéza zásobných proteínov

Jedným zo znakov maturácie semena je syntéza a akumulácia zásobných látok, ktoré sú syntetizované zo sacharózy v kľíčných listoch. Markerom maturácie je expresia

zásobných proteínov. Gradient expresie týchto proteínov je pozorovaný vo vyvíjajúcich sa zásobných orgánoch a šíri sa v pomyselnej vlně od adaxiálneho regónu po abaxiálny povrch klíčného listu. Jedným z týchto proteínov hrachu je vicilín. Jeho gén je exprimovaný len v oblastiach bez mitotickej aktivity, z čoho môžeme usúdiť, že začiatkom syntézy zásobných látok (maturácie) je ukončenie bunkového delenia (embryogenézy) (Hauxwell et al., 1990).

Sacharóza-fosfát syntáza (UDP- α -D-glukóza:D-fruktóza-6-fosfát 2- α -D-glukozyltransferáza ((konfiguráciu-zachovávajúca)), SPS, EC 2.4.1.14) je enzým deaktivovaný fosforyláciou počas prechodu semena z fázy morfogénézy do uskladňovacej fázy (Weber et al., 1996). Naopak fosfoenolpyruvátkarboxyláza (fosfát:oxalacetát karboxy-lyáza ((fosfát adujúca, fosfoenolpyruvát-formujúca)), PEPC, EC 4.1.1.31) je aktivovaná fosforyláciou a práve v aktivovanej forme dokáže smerovať tok uhlíka smerom ku biosyntéze proteínov (Golombek et al., 1999; Rolletschek et al., 2004). Ku samotnej syntéze proteínov je nutný import glutamínu a asparagínu z floému a ich následná metabolizácia v osemeni na alanín, threonín a asparagín (Rochat & Boutin, 1991; Lanfermeijer et al., 1992; Miranda et al., 2001). Mobilizácia syntetizovaných proteínov pomocou proteáz je dôležitým krokom pre rast a vývoj mladého semenáčka. Syntéza iniciačných proteáz začína až po klíčení, resp. po nabobtnaní, aby zásobné proteíny zostali nedotknuté počas maturácie (Tan-Wilson & Wilson, 2012).

2.2.4 Tolerancia voči desikácií

V neskorej fáze maturácie dochádza ku vysychaniu semena, čo je dokázané expresiou LEA (Late embryogenesis abundant) proteínov zapojených v dosahovaní tolerancie voči desikácií počas dozrievania (Roberts et al., 1993; Wobus & Weber, 1999). LEA proteíny patria do podskupiny proteínov reagujúcich na kyselinu abscisovú, ktorých expresia bola preukázaná počas maturácie v takmer všetkých embryách krytosemenných rastlín. Ide o malé hydrofilné proteíny, rozpustné pri vyšších teplotách (Galau et al., 1986; Baker et al., 1988).

Desikačná tolerancia zahŕňa schopnosť vyrovnáť sa so stresom spojeným s takmer úplnou stratou vody, ako aj následnou drastickou rehydratáciou. Semená sú schopné v anhydrobiotickom stave pretrvať dekády, v niektorých prípadoch až storočia (Lerman & Cigliano, 1971). K nadobudnutiu tolerancie prispievajú mnohé faktory, ako

akumulácia sacharidov, LEA a heat-shock proteínov, aktivita antioxidantných enzýmov, a molekúl či limitovanie celkového metabolizmu a prístupu kyslíka.

Disacharidy a oligosacharidy sa akumulujú vo vysokých koncentráciách v anhydrobiotických organizmoch. Existuje tzv. Hypotéza náhrady vodou, podľa ktorej sacharidy chránia proteíny počas vysychania väzbou vodíka na polárne a nabité skupiny počas straty vody, čím predchádzajú suchom indukovanú denaturáciu proteínu (Prestrelski et al., 1993; Carpenter & Crowe, 1989) Konkrétne ide o väzbu vodíka sacharidových hydroxylových skupín s P=O polárnymi skupinami fosfolipidov a s C=O proteínov (Crowe et al., 1998). V prípade, že sa obsah vody dostane na úroveň 0,3 g H₂O/g suchej váhy, dochádza ku náhrade H-väzbových interakcii s vodou za interakcie vodíka so sacharidmi (Hoekstra & Nijssse, 2002).

Aktívny metabolizmus sa považuje za nekompatibilný s desikačnou toleranciou (Leprince et al., 2000). Vysoká respiračná aktivita má za následok zvýšenú hladinu ROS, snahou semena je teda metabolizmus obmedziť. Gény kódujúce enzymatické antioxidanty ako glutatiónreduktáza (glutatión:NADP⁺ oxidoreduktáza, EC 1.8.1.7) sú zvýšene regulované počas dehydratácie (Mittler & Zilinskas, 1994). Zároveň je ale ich aktivita možná len s prístupom určitého množstva vody. Ich úlohu preto preberajú molekulárne antioxidanty ako glutathion, askorbát, polyoly a amfifilné molekuly (chinóny, flavonoidy, fenoly), ktoré môžu byť aktívne aj v suchom stave (Hoekstra & Nijssse, 2002).

2.2.5 Dormancia

V prípade, že životaschopné semeno neklíči pri podmienkach, ktoré sú na klíčenie vhodné, hovoríme o dormancii (Jiang & Kermodé, 1994). Prejavuje sa dočasným zastavením rastu a vývoja rastliny alebo jej časti. Pomáha semenu prečkať nepriaznivé podmienky a jej evolučný pôvod pravdepodobne súvisí so zmenou klímy počas histórie Zeme (Baskin & Baskin, 1998).

Podľa načasovania sa dormancia môže deliť na primárnu a sekundárnu. Primárna sa vyskytuje pred samotným opadom semien a je súčasťou vývojového programu semena. Naopak sekundárna dormancia je nadobudnutá zrelým semenom po nabobtnaní v prípade, že podmienky na klíčenie nie sú vhodné (Amen, 1968)). Práve primárna dormancia sa začína vyvíjať v rámci maturácie semien (Raz et al., 2001). Za zmienku opäť stojí ABA, ktorá funguje ako pozitívny regulátor indukcie dormancie, ako aj jej udržania počas maturácie (Kucera et al., 2005).

2.3 Fenylpropanoidná dráha a flavonoidy

V rámci tejto práce boli študované koncentrácie celkových flavonoidov a fenolov, vďaka ktorým bolo možné prepojiť poznatky o aktivitách enzýmov oxidujúcich dané látky s rozdielnou tvorbou pigmentu kultúrnych genotypov hrachu siateho.

Rastliny si počas evolúcie vyvinuli vlastné spôsoby interakcie s prostredím pomocou syntézy rôznorodých sekundárnych metabolitov. Pod pojmom sekundárne metabolity rozumieme organické látky, ktoré nie sú priamo zapojené do procesov rastu, vývoja, alebo rozmnožovania daného organizmu a ich absencia sa neprejaví okamžitou smrťou rastliny (Paech, 1950). Medzi sekundárne metabolity patria, okrem iného, produkty fenylpropanoidnej dráhy.

Z hľadiska štruktúry sú fenylpropanoidy látky s fenylovou skupinou napojenou na 3-C propánového reťazca kyseliny kumarovej. Variáciami substituentov fenolu a polohy dvojitej väzby vzniká enormné množstvo látok s rozmanitými biologickými funkciami (Koeduka et al., 2014). Medzi metabolity tejto dráhy patria napríklad flavonoidy, amidy a estery kyseliny hydroxyškoricovej, a taktiež prekurzory lignínov, lignanov, či tanínov (Dong & Lin, 2021).

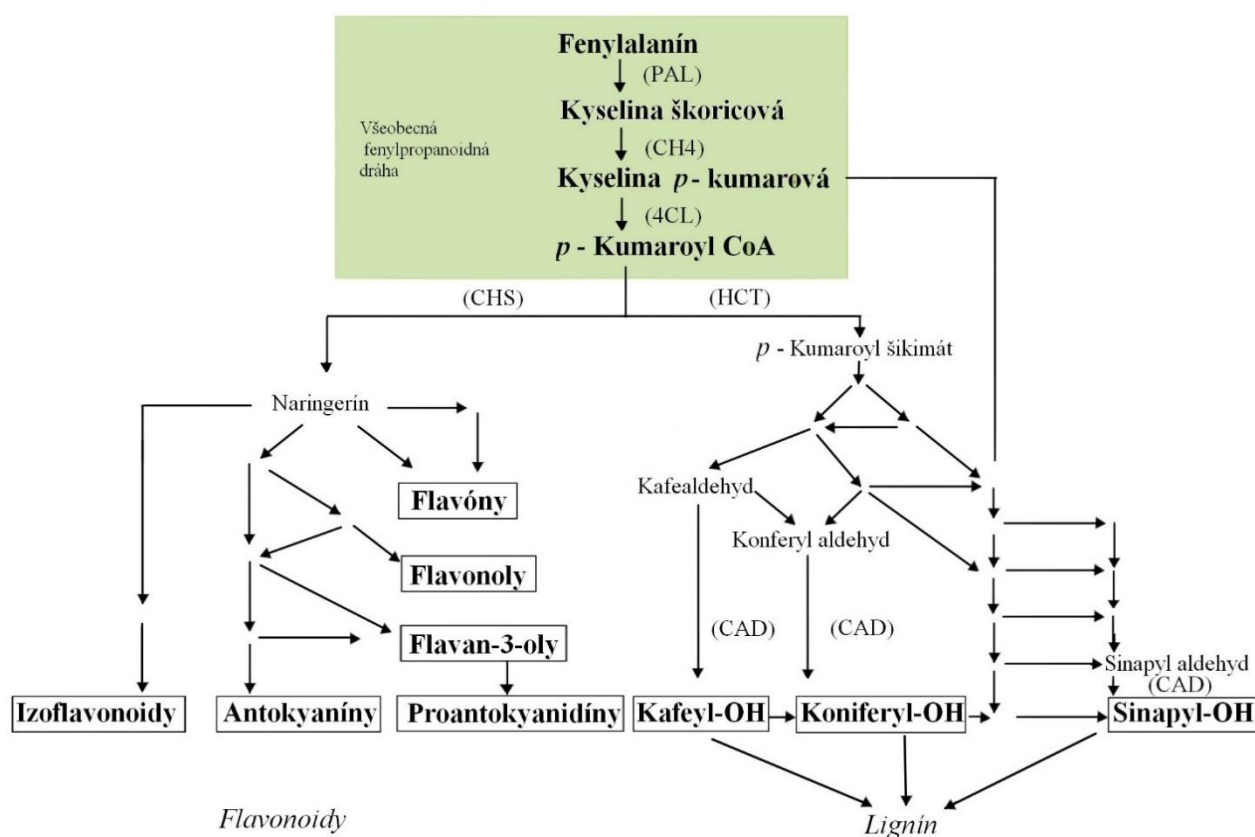
2.3.1 Všeobecná fenylpropanoidná dráha

Východnou látkou fenylpropanoidnej dráhy je produkt šikimátovej dráhy – fenylalanín (Knowles et al., 1993). Prvé tri kroky premeny tejto aminokyseliny na *p*-kumaroyl-CoA sú rovnaké pre všetky fenylpropanoidy. Z *p*-kumaroyl-CoA následne vedú rôzne odvetvia metabolických dráh až ku viac ako 8000 aromatickým látkam (Zhang & Liu, 2015). Prvým krokom je katalýza neoxidatívnej deaminácie fenylalanínu na kyselinu *trans*-škoricovú enzýmom fenylalanínamoniaklyázou (L-fenylalanínamoniaklyáza ((tvoriaca kyselinu *trans*-škoricovú)), PAL, EC 4.3.1.24). V tomto bode dochádza ku zmene procesov primárneho metabolizmu na sekundárny, ide preto o kľúčový bod regulácie (Bate et al., 1994). V druhom kroku sa pomocou cinamát-4-hydroxylázy (*trans*-cinamát, (redukovaný NADPH-hemoproteín reduktáza):O₂ oxidoreduktáza (4-hydroxylujúca) EC 1.14.14.91; C4H) hydroxyluje na kyselinu *p*-kumarovú (Hahlbrock & Scheel, 1989). Posledným krokom je formácia *p*-kumaroyl-CoA za katalýzy 4-kumarát-CoA ligázy (4-kumarát:CoA ligáza ((AMP tvoriaca)), EC 6.2.1.12, 4CL). Tento enzým má navyše schopnosť pripojenia CoA aj na iné fenylpropanoidy (Lee et al., 1995).

Získaným *p*-kumaroyl-CoA sa končí všeobecná dráha biosyntézy fenylpropanoidov. Ďalší osud tejto molekuly sa líši v rozdielnych odvetviach metabolických dráh, z ktorých

v rámci práce spomenieme syntézu flavonoidov a lignínov. Ligníny budú popísané v kapitole o cinnamylalkoholdehydrogenáze.

Východnou látkou pre syntézu flavonoidov je z *p*-kumaroyl-CoA zo všeobecnej fenylypropanoidnej dráhy. Chalkónsyntáza (malonyl-CoA:4-kumaroyl-CoA malonyltransferáza ((cyklizujúca)) CHS, EC 2.3.1.74) katalyzuje premenu *p*-kumaroyl-CoA na chalkón, čím usmerňuje metabolický tok do flavonoidného metabolizmu. Chalkón je následne premenený na naringerin, z ktorého viacerými metabolickými cestami vzniká široká škála flavonoidov (Dong & Lin, 2021). Prehľad týchto udalostí je uvedený v Obr.4.



Obr. 4: Schéma fenylypropanoidného metabolizmu rastlín. Východnou látkou je fenylyalanín, ktorý je v troch krokoch premenený na *p*-kumaroylCoA pomocou enzýmov fenylyalanínamoniaklyzáza (PAL), cinnamát-4-hydroxylázy (CH4) a 4-kumarát-CoA ligázy (4CL). Od *p*-kumaroylCoA sa dráha delí na biosyntézu flavonoidov (pôsobením enzýmu chalkónsyntáza, CHS) alebo syntézu

prekurzorov lignínu (pôsobením hydroxycinnamoyl-CoA transferázy). Upravené od Dong a Lin, (2021).

2.3.2 Flavonoidy

Najpočetnejším odvetvím fenyylpropanoidov sú flavonoidy, ktoré zahŕňajú okolo 6 000 známych zlúčenín (Hichri et al., 2011). Patria medzi sekundárne rastlinné metabolity, všadeprítomné v rámci buniek zelených rastlín (Havsteen, 2002).

Flavonoidy nachádzajú v rastlinách rôzne využitie. Antokyaníny, flavonoly a flavanoly zodpovedajú za farbu kvetov, ktorá prispieva ku prilákaniu hmyzu rozptyľujúcemu ich peľ, čím napomáha rozmnožovaniu rastliny (Kong et al., 2003; Grotewold, 2006). Farba antokyanínov závisí napríklad od hydroxylácie B-kruhu (čím viac hydroxylovaná, tým viac modrá), alebo od pH (červené v silno kyslom prostredí pod pH 2,5 a bez farby v slabo kyslom prostredí v pH 3-6) (Goto & Kondo, 1991).

Ich význam je však ďaleko rozsiahlejší – chránia rastlinu pred UV-B žiarením, majú antimikrobiálne účinky, fungujú ako signálne molekuly, odpudzujú hmyz a herbivóry, dokážu vychytávať voľné radikály a zabráňujú ich vzniku chelataciou (Scalbert, 1991; Li et al., 1993; Hungria & Stacey, 1997; Ferrali et al., 1997; Mallikarjuna et al., 2004). V neposlednom rade, izoflavóny indukujú expresiu génov, ktoré sú zodpovedné za biosyntézu Nod faktorov rhizobiálnych baktérií, čím sprostredkovávajú fixáciu dusíka z atmosféry (Subramanian et al., 2006).

Základom štruktúry flavonoidov je hydroxylovaná 15-uhlíkatá molekula pozostávajúca z dvoch benzénových kruhov A a B, spojených 3-uhlíkatým reťazcom. Vo väčšine prípadov sa tento reťazec uzatvára a formuje heterocyklus C spájajúci kruhy A a B. Kruh B pochádza z šikimátovej dráhy aj býva hydroxylovaný na 3',4' a 5' uhlíku (Saito et al., 2013). Prírodné flavonoidy klasifikujeme do podtried podľa oxidačného stupňa C kruhu. Menovite ide napríklad o flavonoly, antokyaníny a flavan-3-oly a mnoho ďalších (Pourcel et al., 2007). Kondenzačným produktom flavan-3-olov sú proantokyanidíny (Aron & Kennedy, 2008). Aromatické kruhy môžu podstupovať početné modifikácie (metylácie, hydroxylácie, glykosylácie, acylácie, prenylácie) vďaka ktorým je dosiahnutá diverzita a početnosť v rámci tejto skupiny látok. (Stafford, 1990).

Výsledkom oxidácie flavonoidov (najmä *o*-difenolov) enzýmami ako PPO a POX sú veľmi reaktívne semichinóny a chinóny, ktoré ochotne podstupujú ďalšie enzymatické a neenzymatické reakcie. Spontánne môžu reagovať s množstvom látok, napríklad

s inými fenolmi a proteínmi za tvorby hnedého, ťažko charakterizovateľného produktu. Ide o fenolický polymér - melanín (Mason et al., 1955; Walker & Ferrar, 1998).

2.3.2.1 Flavonoidy a fenoly v semenách

Strukoviny obsahujú v osemeni vysoké koncentrácie fenolických látok, menovite flavonoidov ako flavan 3-oly, flavonoly a flavóny (Dueñas et al., 2003). Tmavé semená vykazujú vysokú antioxidačnú kapacitu práve vďaka fenolickým látkam. Osemenie strukovín teda poskytuje ochranu semenám vystaveným oxidatívne poškodeniu spôsobenému enviromentálnymi faktormi ako voľné radikály, kyslík či svetlo. Z fenolických látok sú v semenách strukovín najhojnejšie zastúpené proantokyanidíny, ktorých oxidácia vedie k hnednutiu semena počas desikácie (Troszyńska & Ciska, 2002). Rastliny mutantné v lokuse *tt* (transparent testa) majú narušené enzýmy zapojené v procesoch biosyntézy flavonoidov, následkom čoho majú menej pigmentované semená (Shirley et al., 1995).

2.4 Peroxidázy

Enzýmy patriace do triedy oxidoreduktáz, ktoré oxidujú substráty pomocou peroxidu (je akceptorom elektrónu) nazývame triviálnym názvom peroxidázy. Označujú sa v závislosti od používaného jazyka skratkami POX alebo POD.

Podľa výskytu sa hemové peroxidázy tradične delia do dvoch rozsiahlych nadrodín – prvou sú peroxidázy živočíchov, baktérií a húb (Daiyasu & Toh, 2000). Druhú nadrodinu nachádzame v hojnej miere v rastlinách, hubách a čiastočne v baktériách a členíme ich na tri triedy podľa umiestnenia v bunke a funkcie (Zámocký, 2004; Passardi et al., 2007). Toto delenie však nie je striktné. V niektorých prípadoch sa peroxidázy dodatočne preukážu aj v rámci inej nadrodiny, čím sa delenie komplikuje. Zámocký (2015) zdôrazňuje, že názvy nadrodín by mali reflektovať ich enzýmovú aktivitu (nie ich výskyt).

2.4.1 Peroxidázy – trieda III

Do tretej triedy hemových peroxidáz patrí sekrečný rastlinný glykoproteín – peroxidáza (POX, EC 1.11.1.7). Vzhľadom na jej relatívnu termostabilitu a ľahko merateľnú aktivitu nachádza široké využitie v laboratóriách a je známa aj pod menom chrenová peroxidáza (Hiraga et al., 2001).

POX je kódovaná veľkou multigénovou rodinou a je prítomná vo všetkých vyšších rastlinách (Tognolli et al., 2002; Passardi et al., 2004). V nich je sekretovaná do bunkovej steny, vakuoly, alebo apoplastu (Welinder et al., 2002). POX majú všeobecne nízku špecifitu voči reduktantom, u niektorých izoenzýmov bola dokázaná aj katalýza oxidoredukcie nezávislej od H₂O₂ (Hinman & Lang, 1965).

2.4.1.1 Štruktúra POX III triedy

Všetky rastlinné peroxidázy môžeme štruktúrne zovšeobecniť na prostetickú skupinu protoporfyrín IX a 10 α -helixov. POX tretej triedy majú svoje ďalšie špecifiká ako 4 disulfidové mostíky, niekoľko vysoko konzervovaných aminokyselín a 3 α -helixy navyše (Welinder, 1992).

Peroxidázy III sa medzi sebou odlišujú vo vplyve glykozylácie na aktivitu enzýmu a potenciálne sú zodpovedné za determináciu substrátovej špecifity, stabilizáciu a zabaľovanie proteínu. Glykozylácia nie je zapojená do aktivity enzýmu v prípade chrenovej POX (Tams & Welinder, 1995). Naopak, glykány sú nevyhnutné napríklad pre katalytickú aktivitu POX arašidov a zvyšujú ich termostabilitu (Gabaldón et al., 2007).

Vlastnosťami hojne glykozylovaných peroxidáz sú vysoká termostabilita, stabilita v nízkom pH a vysoká reaktivita. Príkladom môže byť POX palmy (*Roystonea regia*) (Zamorano et al., 2008; Watanabe et al., 2010).

Jeden zo spôsobov charakterizácie peroxidáz je určenie ich izoelektrického bodu (pI), nakoľko sa medzi izoenzýmami výrazne líšia. Môžu mať aniónové aj kationové formy. V prípade izoenzýmov *Arabidopsis* sa nachádzajú pI v rozmedzí 4.5–9. (Valério et al., 2004) .

2.4.2 Peroxidatívny cyklus peroxidáz

Peroxidázy významne regulujú množstvo reaktívnych foriem kyslíka (ROS) pomocou dvoch protichodných cyklov, kedy v jednom z cyklov využívajú H_2O_2 , a v druhom ROS naopak produkujú- sú teda bifunkčným enzýmom (Halliwell, 1977). Schéma tohto mechanizmu je uvedená v Obr. 5.

V rámci „klasického“ peroxidatívneho cyklu katalyzujú enzýmy oxidáciu substrátu pomocou H_2O_2 , pričom donormi elektrónov sú napríklad rôzne fenolické zlúčeniny alebo sekundárne metabolity (Hiraga et al., 2001). Samotný peroxid patrí medzi neradikálové formy ROS, nakoľko môže byť jednoducho premenený na reaktívne radikály (Halliwell & Gutridge, 2015). Oxidovaný substrát má následne v metabolických dráhach rôzne osudy. Môže byť zapojený do katabolizmu auxínov, polymerizácie komponentov bunkovej steny alebo oxidácie NAD(P)H (Passardi et al., 2004).

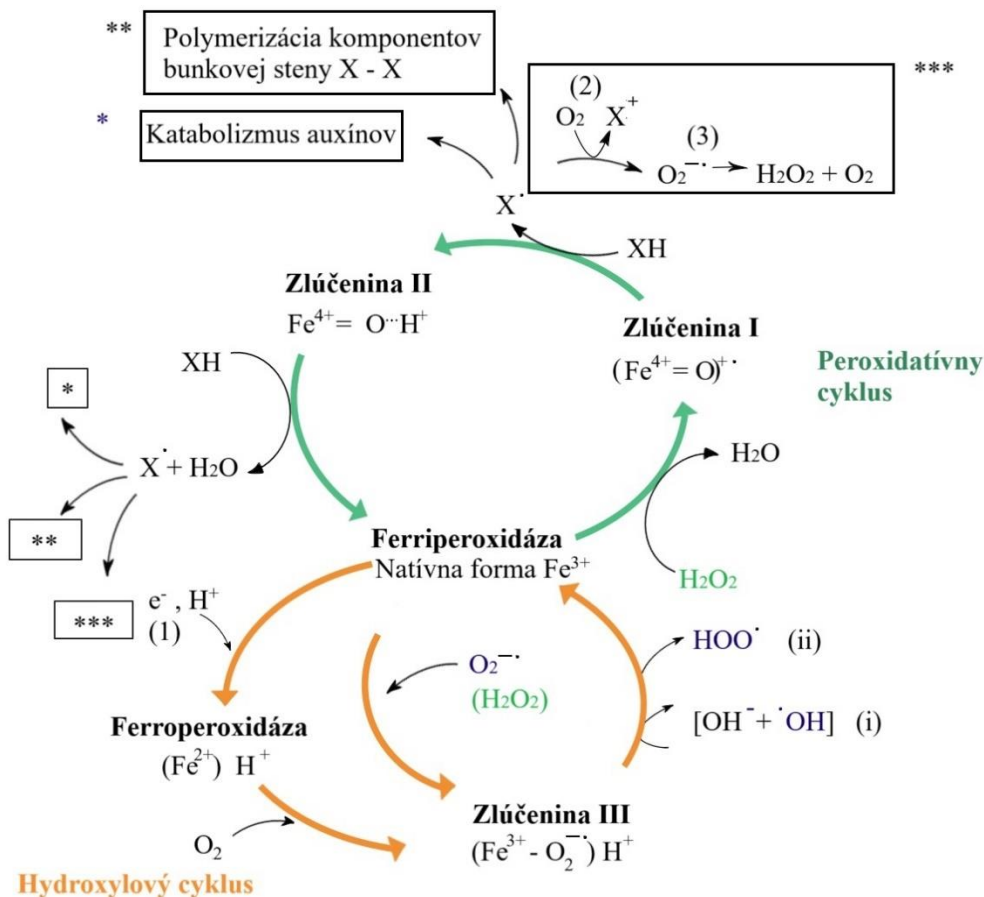
POX sa spolu s lakázami účastní v procese lignifikácie- oxiduje monoligníny v prítomnosti H_2O_2 na vo vode nerozpustné polyméry (Stergiades et al., 1993). V rámci metabolizmu bunkovej steny majú POX význam taktiež pri suberizácii, tj. pletivovo špecifický proces, kedy je bunková stena impregnovaná súčasne polyfenolickou a polyalifatickou matricou (Lewis & Davin, 1994). Práve polyfenolická matrica je pravdepodobne polymerizovaná pomocou POX, pričom tento proces môžeme považovať za analóg lignifikácie. Ku suberizácii dochádza napríklad pri hojení poškodeného pletiva v zemiakových hl'uzách, pričom peroxidáza s týmto javom asociovaná má aniónový charakter (Espelie & Kolattukudy, 1985) (Bernards et al., 1999).

2.4.3 Hydroxylový cyklus peroxidáz

POX zo svojej natívnej formy (Fe^3) môže prechádzať dvoma rôznymi spôsobmi na tzv. Zlúčeninu III, oksyločenú formu ferropoxidázy. Môže tak urobiť priamou reakciou s $\text{O}_2^{\cdot -}$ (pochádza z peroxidu), alebo cez Zlúčeninu II (Fe^{2+}) v prítomnosti kyslíka a zdroja e^- a H^+ (napr. auxín). (Sawada & Yamazaki, 1973; Passardi et al., 2004).

Zlúčenina III sa rozpadá späť na natívnu formu peroxidázy za priamej disociácie $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Rotilio et al., 1975). Superoxidový radikál následne reaguje za vzniku ďalších typov ROS:

- a) $\text{O}_2^{\cdot -} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HO}_2^{\cdot}$
 $2 \text{HO}_2^{\cdot} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
- b) $\text{O}_2^{\cdot -} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}_2^- + \text{HO}^{\cdot}$ (Haber- Weissova reakcia)
 $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \text{HO}^{\cdot}$ (Fentonova reakcia)
 (Evans & Goldfine, 2000).



Obr. 5: Reakčné cykly peroxidáz III triedy. Peroxidatívny cyklus.(i)-vznik OH^- , (ii)- vznik HOO^- v rámci hydroxylového cyklu. (1) Zdrojom e^- a H^+ je auxín, alebo iný reduktant. XH/X – redukovaná a oxidovaná forma substrátu.

2.5 Polyfenoloxidázy

Definícia a kategorizácia polyfenoloxidáz je problematickejšou, ako sa na prvý pohľad môže javiť. Pod pojmom polyfenoloxidáza (PPO) uvádzajú autori rôznych článkov odlišné enzýmy, poprípade ide o rovnakú látku so zmeneným zaradením alebo názvom. V nasledujúcom odstavci sa pokúsime objasniť túto problematiku a spomenieme tri enzýmy: tyrozinázu (L-tyrozín, L-dopa: O₂ oxidoreduktáza, TYR, EC: 1.14.18.1), katecholoxidázu (1,2-dibenzendiol: O₂ oxidoreduktáza, CO, EC: 1.10.3.1) a lakázu (beznzéndiol: O₂ oxidoreduktáza, LAC, EC: 1.10.3.2). Spoločnou vlastnosťou týchto enzýmov je katalýza prenosu atómov vodíku z fenolických substrátov na molekulu kyslíka za súčasnej redukcie druhého kyslíka na molekulu vody. Pod pojmom PPO uvádzajú autori článkov napríklad konkrétne CO, iný zase TYR, niektorí PPO rozdeľujú na CO a TYR alebo TYR a LAC (Pérez-Gilabert & García Carmona, 2000; Mayer, 2006; Pourcel et al., 2007; Balarynová et al., 2022). Podľa Whitakera et al., (2013) sú síce PPO klasifikované pod EC 1.10.3.1, nazýva ich však aj tyrozinázami. V tejto práci bude pojem polyfenoloxidázy označovať spoločne všetky spomínané enzýmy: TYR, CO a LAC (Obr.6).

2.5.1 Tyrozináza

Tyrozinázy zahŕňajú triedu metaloenzýmov, ktoré s využitím kyslíka 1) katalyzujú oxidáciu monofenolov na *o*-difenyly – majú tzv. kreolázovú/monofenolázovú aktivitu a zároveň 2) oxidujú *o*- difenyly na príslušné *o*- chinóny – vykazujú katecholázovú/difenolázovú aktivitu (Solomon et al., 1996; Whitaker et al., 2002; Walker & Ferrar, 1998). Monofenolázová aktivita udáva rýchlosť reakcie (Rodríguez-López et al., 1992). Kyslík zabudovaný do fenolického substrátu pochádza z molekulárneho O₂, elektróny redukujúce druhý atóm kyslíka poskytuje substrát (Mason et al., 1955; Solomon et al., 1996). Tyrozinázy sú takmer všadeprítomné a v organizmoch hrajú rozličné fyziologické úlohy. V prípade húb a stavovcov katalyzujú začiatkový krok syntézy pigmentu- melanínu z tyrozínu (Riley, 1997). V rastlinách sú pre TYR substrátmi rôzne fenolické látky, ktorých oxidáciu (sprevádzanú hnednutím) pozorujeme pri poškodení pletiva (Solomon et al., 1996).

2.5.2 Katecholoxidáza

Katecholoxidáza katalyzuje oxidáciu *o*-difenolov na ortochinóny, má teda rovnako ako tyrozinázy difenolázovú (resp. katecholázovú) aktivitu. Narozdiel od TYR však absentuje kreolázová aktivita (Solomon et al., 1996). Nachádza sa v rôznych častiach tela vyšších rastlín (Sokolenko et al., 1995).

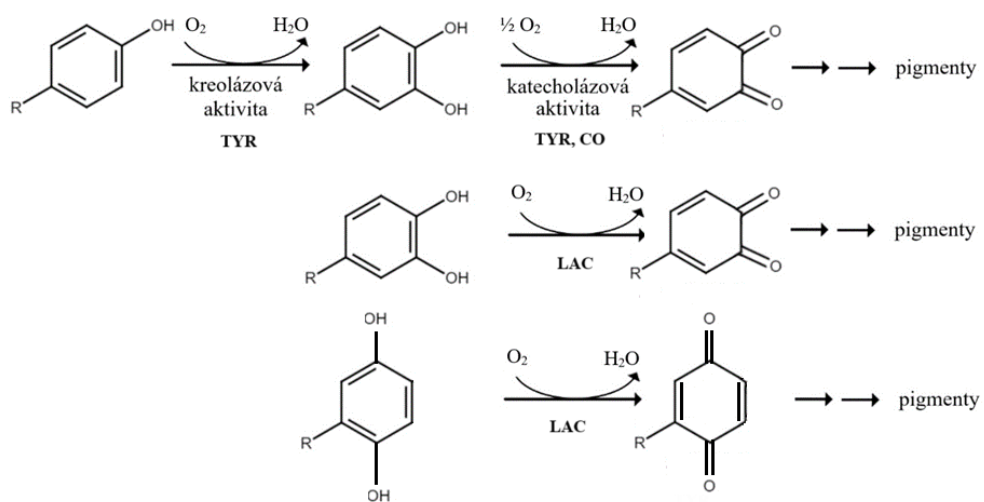
2.5.3 Lakáza

Lakázy sa vyskytujú ako v eukaryotných organizmoch (huby, vyššie rastliny, hmyz), tak v prokaryotách (Claus, 2003). Väčšinou sú prítomné vo forme niekoľkých izoenzýmov s unikátnou substrátovou špecifitou. Okrem mono a difenolov sú schopné oxidovať širokú škálu aromatických zlúčenín ako diamíny a aromatické amíny, thioly či dokonca niektoré anorganické zlúčeniny. Najvhodnejšími substrátmi pre LAC sú *o*-substituované zlúčeniny (napríklad guajakol), poloha funkčnej skupiny však nie je podmienkou – substrátom môže byť napríklad rezorcinol (meta poloha) alebo *p*-kresol (Dwivedi et al., 2011).

Lakázam je v poslednom čase venovaná pozornosť kvôli využiteľnosti v rôznych odvetviach priemyslu. Vďaka schopnosti katalyzovať rôzne reakcie bez tvorby škodlivých vedľajších produktov nachádza uplatnenie najmä v oblasti bioremeditácie (Khatami et al., 2022).

2.5.4 Štruktúra polyfenoloxidáz

Tyrozinázy spolu s lakázami štruktúrne patria do obsiahlej rodiny proteínov s obsahom medi (typu 3). Aktívne miesto pozostáva z dvoch atómov Cu, ozačovaných ako CuA a CuB, pričom každý z nich je koordinovaný tromi histidínovými reziduami, kde sa viaže O₂ (Claus & Decker, 2006). Lakázy sú štruktúrne dimérne alebo tetramérne glykoproteíny so štyrmi atómami medi na jeden monomér a spolu formujú katalytické jadro enzýmu (Desai & Nityanand, 2011).



Obr. 6: Oxidácia fenolických zlúčenín enzýmami tyrozináza (TYR), catechol oxidáza (CO) a lakáza (LAC).

2.6 Cinnamylalkoholdehydrogenáza

Významným enzýmom v procese biosyntézy lignínu je cinnamylalkohol dehydrogenáza (cinnamylalkohol:NADP⁺ oxidoreduktáza; EC 1.1.1.195; CAD), ktorá katalyzuje redukciu aldehydov na odpovedajúce alkoholy, tzv. monolignoly, ako je zobrazené na Obr.7 (Whetten & Sederoff, 1991). Ide o posledný krok syntézy prekursorov lignínu, pričom produktami takto sprostredkovanej reakcie sú menovite napríklad koniferylalkohol, sinapylalkohol, *p*-kumaroylalkohol a kafeylalkohol. Dané monolignoly polymerizujú v apoplaste buniek na tri základné jednotky naturálnych lignínových polymérov -guajacyl (G), syringyl (S) a *p*-hydroxyfenyl (H) (Lewis & Yamamoto, 1990; Campbell & Sederoff, 1996). Lignín je dôležitým štruktúrnym komponentom sekundárnej bunkovej steny v bunkách cievnatých rastlín, napomáha transportu v nich a poskytuje mechanickú odolnosť. Zvýšená expresia CAD génu ovplyvňuje obsah lignínu, čím zvyšuje odolnosť rastliny voči stresu spojeným s tvorbou ROS (Kim & Huh, 2019). Samotné monolignoly sú produktami fenylpropanoidnej dráhy, konkrétne premeny *p*-kumaroyl-CoA na *p*-kumaroyl-šikimát enzýmom hydroxycinnamoyl-CoA transferázou (Hydroxycinnamoyl-CoA šikimát/quinát hydroxycinnamoyl transferáza, HCT, EC 2.3.1.133) (Dong & Lin, 2021).

2.6.1 Kategorizácia cinnamylalkoholdehydrogenáz

Alkohol dehydrogenázy boli enzýmy detekované už od roku 1937 a majú najnižšie EC číslo (EC 1.1.1.1). Spadajú pod dva enzýmové systémy: dehydrogenázy/reduktázy stredného reťazca (MDR) a dehydrogenázy/reduktázy krátkeho reťazca (SDR) (Nordling et al., 2002). CAD tvorí jednu z minimálne ôsmich rodín MDR. Výskyt cinnamyl alkohol dehydrogenázy bol dlhodobo pripisovaný ríši plantae, neskôr však bola nájdená aj v genóme *S. cerevisiae*, čo indikuje jej rozsiahlejšiu funkciu, akou je biosyntéza lignínu.

2.6.2 Štruktúra cinnamylalkoholdehydrogenáz

Rodina CAD obsahuje 43 striktne konzervovaných reziduí, z toho 19 glycínových a 7 cysteínových. Z modelovania molekúl CAD vyplýva, že niektoré enzýmy majú aktívne miesto hlboké (>12 Å) a úzke (~8 Å), iné zas plytkejšie (~9 Å) a širšie (~10 Å) (Nordling et al., 2002). Predpokladá sa, že proteín CAD pozostáva zo štyroch kľúčových domén: zinok viažuca doména-2 (Zn2), katalytická zinok viažuca doména-1 (Zn1), koenzým špecifická doména a NADPH viažuca doména. Sekundárna štruktúra domény Zn2 je

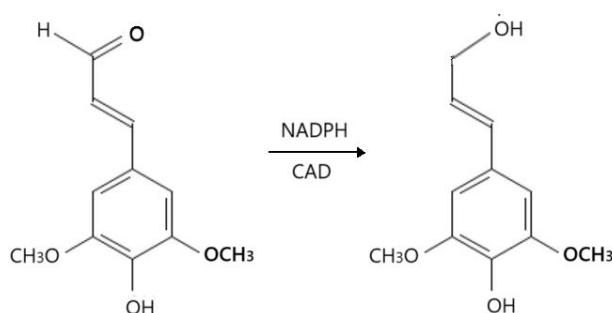
variabilná. Zhruba polovica rastlinných CAD je zložená z jedného β -skladaného listu, zatiaľ čo druhá polovica obsahovala navyše α -helix. Táto doména je veľmi dôležitá pre aktivitu enzýmu (KURT & FİLİZ, 2019).

CAD nahosemenných a krytosemenných rastlín majú niektoré rozdielne vlastnosti. Nahosemenné rastliny majú jeden gén kódujúci CAD, vysoko špecifickú pre konyferil aldehyd. Naopak CAD krytosemenných rastlín je kódovaný viacerými génmi s afinitou k viacerým substrátom (O'Malley et al., 1992; Brill et al., n.d.).

2.6.3 Hospodársky vplyv cinnamylalkoholdehydrogenázy

Lignín v rastlinách vo všeobecnosti spôsobuje rigiditu pletív a odolnosť voči patogénom. V rámci rastliny teda ide o žiadanú výhodu, avšak nepoddajnosť tohto materiálu môže byť prekážkou vo využívaní biomasy. Vysoký obsah lignínu výrazne znižuje stráviteľnosť krmovín u hospodárskych zvierat- tento problém by mohol byť riešený obmedzením aktivity CAD (Akin, 1980; McKie et al., 1993). Príkladom organických inhibítorov sú sulfinamoyl t-butyl-acetáty navrhnuté tak, aby špecificky viazali atóm zinku v aktívnom mieste (Grand et al., 1985). Nešpecificky chelatujúcim inhibítorom je napríklad 1,10-fenantrolín (Grand et al., 1985).

Medzi ďalšie odvetvia, ktorých záujmom je znižovanie obsahu lignínu patrí papierenský a celulóзовý a priemysel. Lignín znižuje efektivitu procesu a zvyšuje výdavky, nakoľko obmedzuje prístup ku polysacharidom bunkovej steny pre rozkladné mikrobiálne enzýmy (Gutierrez et al., 2007). Je preto snahou geneticky modifikovať rastliny ku znižovaniu obsahu tohto polyméru, prípadne ku zmene jeho zloženia. Lignín bol jednoduchšie odstránený v prípade tabaku a topoľa so zníženou expresiou CAD (Ralph et al., 2001; Lapierre et al., 2004) .



Obr. 7: Ukážka redukcie sinapyl aldehydu na odpovedajúci monolignol sinapylalkohol v prítomnosti enzýmu cinnamyl alkohol dehydrogenázy (CAD). Prevzaté od McKie et al., (1993)

2.7 Úloha reaktívnych foriem kyslíka pri dozrievaní semien

2.7.1 Reaktívne formy kyslíka

Medzi reaktívne formy kyslíka zahrňujeme radikály superoxidu ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyly (OH^{\cdot}), perhydroxyly (HO_2^{\cdot}), alkoxy a peroxy radikály (RO^{\cdot} , ROO^{\cdot}), spolu s neradikálovými formami ako peroxid vodíka, hydroperoxydy (H_2O_2 , $ROOH$) či singletový kyslík (1O_2) (Bhattacharjee, 2012). Koncentrácia reaktívnych foriem kyslíka určuje, či sú tieto látky pre semeno prospešné, alebo naopak škodlivé. Istá hladina ROS je zodpovedná za uvoľnenie dormancie v suchom semene a ich monitorovaná tvorba má vplyv na vnímanie environmentálnych podmienok, ktoré kontrolujú klíčenie. V prípade vhodných podmienok je udržiavaný taký level ROS, ktorý spúšťa procesy asociované s klíčením, napríklad ovplyvňuje signaling hormónov (Oracz et al., 2007). Na druhú stranu ide o veľmi reaktívne látky schopné poškodenia okolitých biomolekúl (Demidchik, 2015).

Semená hrachu sa radia medzi tzv. ortodoxné, čo znamená, že desikujú na materskej rastline a sú schopné tolerovať veľmi nízky obsah vody (Bailly et al., 2001). Takáto fáza znamená pre semeno extrémny stres zo sucha asociovaný s produkciou ROS, proti ktorým sa chráni enzýmovými a neenzýmovými mechanizmami. Výsledkom je vysoko oxidované suché zrelé semeno. Následne býva uskladnené po dobu niekoľko mesiacov v izbovej teplote. Počas tejto doby začína dormancia povolovať (Bewley, 1997). V desikovanom semene neprebiehajú metabolické deje, avšak ROS vznikajú práve neenzýmovou cestou (Bazin et al., 2011). Po následnom prijatí vody dochádza ku obnoveniu metabolizmu a kontrolovanej produkcii ROS pomocou enzýmov. V tomto období je semeno veľmi citlivé na odchýlky podmienok okolia potrebných na klíčenie. Ide o adaptívnu vlastnosť zvyšujúcu pravdepodobnosť prežitia mladej sadenice (Mittler & Blumwald, 2015).

2.7.2 Zdroje reaktívnych foriem kyslíka

Hlavnými zdrojmi ROS v suchom semene sú kyslík a lipidy. Kyslík sa nachádza vo svojom základnom molekulárnom stave v prázdnych intracelulárnych priestoroch, a jeho redukcia dáva vznik ROS (Cloetens et al., 2006; Bailly, 2023). Lipidy sú v podmienkach s nízkou vlhkosťou veľmi náchylné na oxidáciu (Karel, 1980). Príjem aj malého množstva vody obnovuje metabolickú produkciu ROS, nakoľko ide o vedľajší produkt normálneho aeróbného metabolizmu. Hlavným zdrojom je pravdepodobne mitochondria tvoriaca superoxidové anióny v I a II komplexe elektrón transportného reťazca

(Puntarulo et al., 1988) . Inými zdrojmi môžu byť proteíny teplotného šoku v matrix mitochondrie, NADPH oxidázy, (poly)amín oxidázy, oxalát oxidázy a peroxidázy (Lane et al., 1993; Sagi & Fluhr, 2001; Liskay et al., 2003; Cona et al., 2006).

2.7.3 Vplyv reaktívnych foriem kyslíka na klíčenie a dormanciu

Priamou oxidáciou bunkových komponentov dokázu ROS meniť fungovanie buniek a následne celkovej rastlinnej fyziológie. V rámci proteínov sú thiolové skupiny aminokyselín Cysteínu a Metionínu citlivé na oxidáciu a tvoria disulfidy (Bailly, 2019). Najbežnejšou oxidáciou je nevratná karbonylácia proteínov. Jej následkom môže byť strata funkcie až degradácia daného proteínu. Hlavné zásobné proteíny sú výrazne karbonylované a predpokladá sa, že karbonylácia je dôležitá pre mobilizáciu týchto proteínov v čase klíčenia (Zhang et al., 2017). Modifikované proteíny sú náchylnejšie na proteolytické štiepenie pomocou 20S proteazómu (Oracz et al., 2007). Ku karbonylácií dochádza napríklad v prípade LEA proteínov, známych pozitívnych regulátorov dormancie (Zhang et al., 2017). Okrem proteínov je možné oxidovať aj RNA, ktorá je tak isto na tento proces veľmi citlivá. Oxidácia špecifického súboru transkriptov sa ukazuje byť prerekvizitou uvoľnenia dormancie. Môžeme teda povedať, že úlohou ROS je oxidácia negatívnych regulátorov klíčenia (El-Maarouf-Bouteau et al., 2013). Ďalším spôsobom, ako ROS pôsobí na semeno, je interakcia OH^{\bullet} s polysacharidmi bunkových stien, čo má za následok ich rozvoľnenie. Tento radikál dokáže polysacharidy štiepiť. Ide dôležitý proces umožňujúci radikule prerásť cez oslabené ochranné štruktúry semena (Müller et al., 2009). Je taktiež domnienkou, že POX nachádzajúce sa v apoplaste sú zapojené v produkcii ROS iniciujúcich predlžovanie buniek rastúcej radikuly (Stamm et al., 2017). Čo sa týka vzťahu ROS a hormónov, je treba brať na vedomie odlišnosť medzi fungovaním signálnych dráh semena a iných rastlinných častí. V prípade stresom spôsobeným suchom napríklad rastlina uzatvára svoje prieduchy, ktoré reguluje ABA interagujúca s ROS synergicky (Mittler & Blumwald, 2015). Opakom je antagonistické fungovanie týchto dvoch látok v rámci semena. Klíčenie a dormancia je úzko spätá práve s reguláciou hormónov, na ktoré majú ROS vplyv. Zvýšenie hladiny ROS je do istej miery výhodné pre klíčenie – upravujú signálne dráhy a syntézu ABA, hormónu potlačujúceho klíčenie. Konkrétne ide o akumuláciu H_2O_2 degradujúceho ABA tým, že aktivuje rozkladný enzým ABA-8-hydroxylázu. Priame oxidovanie ABA však nebolo pozorované. ROS naopak stimulujú biosyntézu giberelínov. Samotné hormóny majú spätné vplyv na tvorbu ROS – GA indukujú ROS, ABA ich vznik potlačuje (Bailly, 2019).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Prístroje a vybavenie

- Analytické váhy –*Denver instrument, USA*
- Automatické pipety – *Eppendorf, Nemecko*
- Centrifúga – *Eppendorf, Nemecko*
- Digitálne predvážky – *KERN, Nemecko*
- Digitálny pH meter – *XS Instruments, Taliansko*
- Elektromagnetická miešačka – *BioSan, Litva*
- Fluorescenčný mikroskop Imager.Z2– *Zeiss, Nemecko*
- Mikroplatničky Test plate 96f – *TPP, Švajčiarsko*
- Mikrovlnná rúra
- Spektrofotometer - reader *Synergy HT (Biotek Instruments, USA*
- Termostat – *BioSan, Litva*
- Vibratóm – *Leica, USA*
- Vortex – *BioSan, Litva*

3.2 Chemikálie a činidlá

Honeywell Fluka, Rumunsko:	agaróza, pefabloc, hexahydrát chloridu hlinitého
Lachema, Česká republika:	kvercetín
Lach-Ner, Česká republika	dihydrogénfosforečnan draselný, hydrogénfosforečnan draselný, peroxid vodíka
Invitrogen, USA	2',7' dihydrodichlorofluoresceín diacetát
Penta, Česká republika	Octan draselný

ROTH, Nemecko	hovädzí sérový albumín,
Sigma-Aldrich, USA	polyvinylprrolidon, kataláza,-metylkatechol, BCA činidlo, pentahydrát síranu meďnatého, metanol, kyselinagallová, Folin-Ciocalteuovo činidlo, uhličitan sodný

3.3 Príprava pufrov

Na extrakciu a ako reakčné pufry boli využité rôzne K-fosfátové a Tris pufry, ktorých príprava je popísaná v nasledujúcich riadkoch.

10 mmol.l⁻¹ K-fosfátový pufo, pH 7 bol pripravený z 0,1 mol.l⁻¹ K-fosfátového pufru, pH 7 riedením na 100 ml : 10 ml zásobného pufru s 90 ml vody.

0,1 mol.l⁻¹ K-fosfátový pufr pH 7 bol pripravený zmiešaním 30,75 ml zásobného 1 mol.l⁻¹ K₂HPO₄ + 19,25 ml zásobného 1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ a 400 ml vody. Následne bolo pH upravené na požadovanú hodnotu a objem doplnený vodou na 500 ml.

0,1 mol.l⁻¹ K-fosfátový pH 6 bol pripravený zmiešaním 6,6 ml 1 mol.l⁻¹ K₂HPO₄, 43,4 ml 1 mol.l⁻¹ KH₂PO₄ a 400 ml vody. Po kontrole pH bol objem doplnený na 500 ml.

0,05 mol.l⁻¹ K-fosfátový pH 7 pufo bol pripravený riedením 0,1 mol.l⁻¹ pufru pH 7 v pomere 1:1 s vodou.

0,1 mol.l⁻¹ Tris-HCl pufo pH 8,8 bol pripravený rozpustením 3,784 g Tris v 200 ml vody. Následne bolo pH upravené na požadovanú hodnotu pomocou HCl a doplnené na objem 250 ml.

3.4 Rastlinný materiál

V tejto práci boli využité tri kultúrne genotypy hrachu siateho menovite *P. sativum* PI 181958 (PI), *P. sativum* Cameor (CAM), PI, a *P. sativum* ATC 7025 (ATC). Vo všetkých troch prípadoch ide o kultúrne genotypy hrachu siateho. Vybrané semená sa líšia v pigmentácii – hilum a osemenie Cameor a PI je bez zafarbenia. Naopak ATC má hilum a osemenie pigmentované, pričom ide o znak typický skôr pre plané genotypy (Balarynová et al., 2022).

3.4.1 Rastlinný materiál použitý pri mikroskopii

Semená použité pre prípravu rezov pre mikroskopické pozorovanie boli získané zo skleníkov Katedry Botaniky UP. Nakoľko nebolo možné získať semená genotypu PI, ktorý je používaný pre štúdium parametrov spektrofotometrickými metódami, bol nahradený jemu veľmi podobným genotypom Cameor. Z rastlín genotypov ATC a Cameor teda boli odobraté semená približne z obdobia 17, 20 a 25 dní po opelení (DAP -Days After Pollination).

3.4.2 Rastlinný materiál použitý pri spektrofotomertrickom stanovení

Pre spektrofotometrické stanovenie boli využité zamrazené osemenia a embryá genotypov PI a ATC, pripravené Katedrou Botaniky UP. Poskytnuté vzorky boli odobraté v štyroch vývojových štádiách, konkrétne 13,17,23 a 28 DAP.

3.5 Použité metódy

3.5.1 Extrakty pre stanovenia fenolov a flavonoidov

Rastlinný materiál bol homogenizovaný v trecej miske s použitím tekutého dusíka v prípade osemení z dôvodu uľahčenia drvenia materiálu. Dusík v prípade embryí nebol použitý, nakoľko ich hlbšie zamrazenie naopak viedlo k ich ťažšiemu rozdrveniu. Rastlinný materiál bol následne extrahovaný do vychladeného metanolu v pomere 1:5 (w:v). Následne boli vzorky premiestnené do centrifúgy vychladenej na 4 °C, kde boli centrifugované po dobu 10 minút pri 16 000 RPM. Supernatant bol odobraný automatickou pipetou a následne bol buď rozalíkvótovaný a zamrazený, alebo chladený v ľadovej lázni pre okamžité meranie.

3.5.2 Extrakty pre stanovenia aktivity enzýmov a koncentrácie proteínov

Rastlinný materiál bol homogenizovaný v trecej miske s použitím tekutého dusíku pri osemeniach. Extrakčný pufor bol pripravený zmiešaním 0,1 mol.l⁻¹ K-fosfátového pufru s polyvinylpyrrolidónom (PVPP) a pefablocom. Na 10 ml extrakčného pufru bolo použitých 100 mg PVPP a 1,1 mg pefabloku. Extrakcia bola pre prevedená v pomere 1:4 (w:v). Rovnako ako pri metanolovej extrakcii boli vzorky centrifugované (4 °C, 10 minút, 16 000 RPM), supernatanty boli rozalíkvótované a zamrazené, alebo vložené do ľadovej lázne a využité pre okamžitú analýzu.

3.5.3 Stanovenie koncentrácie fenolov

V tejto práci boli fenoly stanovené kolorimetricky pomocou Folin-Ciocalteovho činidla. Princípom metódy je prenos elektrónov v zásaditom médiu z fenolických zlúčenín za tvorby modrého chromofóru na kyslé komplexy činidla. Zafarbenie sledujeme spektrofotometricky pri 760 nm (Singleton et al., 1999).

Na meranie bolo potrebné pripraviť štandard kyseliny gallovej a 7% Na₂CO₃.

Príprava štandardu spočívala v rozpustení 1000 μg kyseliny v 1 ml metanolu, čím bola dosiahnutá koncentrácia 0,001g/ml. Štandard bol riedený metanolom na kalibračnú sériu o koncentráciách 50, 100, 150, 200 a 250 μg.ml⁻¹. 7% Na₂CO₃ bol pripravený rozpustením 0,7g uhličitanu v 10 ml vody.

Do jednej jamky mikroplošnice bolo pipetovaných 75 μl vody, 10 μl vzorky/štandardu/ do blanku metanol, 10 μl Folin- Ciocalteovho činidla a pri laboratórnej teplote sa zmes nechala inkubovať po dobu 6 minút. Následne bolo pridaných 125 μl 7% Na₂CO₃ a zmes bola ponechaná pri rovnakej teplote inkubovať 60 minút. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 750 nm (Tsaniklidis et al., 2021). Merania boli vyhotovené v technickom triplikáte.

3.5.4 Stanovenie koncentrácie flavonoidov

Koncentrácia flavonoidov v metanolových extraktoch bola určená kolorimetrickou spektrofotometrickou metódou využívajúcou chlorid hlinitý a octan draselný za vzniku komplexu a následnej zmeny absorbancie. Zmena absorbancie bola meraná pri 415 nm a výsledky boli získané z kalibračnej krivky kvercetínu (Tsaniklidis et al., 2021).

Štandard bol dosiahnutý rozpustením 1000 μg kvercetínu v 1 ml metanole s výslednou koncentráciou c= 1mg/ml. Kalibračná séria koncentrácií 25, 50, 75, 100, 125, 150 a 175 μg.ml⁻¹ bola dosiahnutá riedením štandardu metanolom.

Rozpustením 1,8106 g hexahydrátu AlCl₃ v 10 ml metanole bol pripravený 5,5 % roztok chloridu hlinitého. Na prípravu 10 ml 1 mol.l⁻¹ octanu draselného bolo rozpustených 0,9812 g octanu v 10 ml metanolu.

Postup zahŕňal prídavok 25 μl vzorky/štandardu/pre blank metanolu, do 140 μl vody. Následne bolo pridaných 10 μl 5,5 % AlCl₃ a 10 μl 1 mol.l⁻¹ octanu draselného a zmes bola inkubovaná 30 minút pri laboratórnej teplote. Následne bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 415 nm. Vzorky boli pipetované a merané v triplikáte.

3.5.5 Stanovenie koncentrácie proteínov pomocou Bradfordovho činidla

Pri adsorbčnom naviazaní farbiva Coomassie Brilliant Blue G-250 v kyslom prostredí na bázické a aromatické aminokyseliny proteínu dochádza ku zmene farbiva z hnedej na modrú (Bradford, 1976).

Zásobný roztok Bradfordovho činidla bol dostupný na Katedre Biochémie UP (50 mg Coomassie Blue G-250 rozpustených v 25 ml metanolu a 50 ml 85% kyseliny fosforečnej, doplnené vodou na 100 ml). Pracovný roztok Bradfordovho činidla bol podľa pokynov riedený vodou v pomere 1:4. Ako štandard bol použitý hovädzí sérový albumín (BSA), rozpustený v $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ K-fosfátovom pufru o pH 7 (postup prípravy pufru kapitola 3.3.). Kalibračná krivka boli zhotovená z nariadeného BSA štandardu pufrom na koncentrácie 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2 a $1,4 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Do jamky na mikroplatničke bolo pipetovaných $45 \mu\text{l}$ pufru, $5 \mu\text{l}$ štandardu/vzorku/ pufru do blanku a $200 \mu\text{l}$ pracovného činidla. Po ľahkom premiešaní a 5 minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote bola meraná absorbanca pri 595 nm.

3.5.6 Stanovenie koncentrácie proteínov pomocou bicinchonínovej metódy

Bicinchonínová metóda (BCA) spočíva v reakcii peptidovej väzby s meďnatými (Cu^{II}) iónmi, pričom dochádza k ich redukcii na Cu^{I} . K redukcii prispievajú aj cysteín, tryptofán a tyrozín. Redukovaný ión je následne komplexovaný sodnou soľou kyseliny bicinchonínovej. Najvhodnejšia teplota pre danú reakciu je $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Zmena absorbanca po vytvorení modrofialového komplexu je meraná pri vlnovej dĺžke 562 nm (Smith et al., 1985).

Komerčný roztok kyseliny bicinchonínovej bol zmiešaný s roztokom pentahydrátu síranu meďnatého (4g CuSO_4 v 100 ml vody, konečná koncentrácia 16 mmol.l^{-1}) v pomere 50:1. Na kalibráciu boli použité roztoky BSA o koncentráciách 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 a $0,6 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Do jamky mikroplatničky bolo napipetovaných $10 \mu\text{l}$ štandardu/vzorky/ do blanku vody a $200 \mu\text{l}$ pracovného BCA činidla. Absorbancia pri 562 nm bola zmeraná po 30-minútovej inkubácii pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.7 Stanovenie celkovej aktivity peroxidázy

Spektrofotometrické stanovenie aktivity peroxidázy podľa Angeliniho využíva ako substrát pre POX peroxid vodíka za súčasnej oxidácie guajakolu na 3,3'-dimetoxy-4,4'-bifenylchinón za sprievodného nárastu absorbancie pri $\lambda = 436$ nm. Molárny absorpčný koeficient pre bifenylnchinón je $4500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Angelini et al., 1990).

Zmiešaním 98,59 ml $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ K-fosfátového pufru pH 6 (postup prípravy pufru- kapitola 3.3.) a 1,41 ml 8 mol.l^{-1} zásobného roztoku guajakolu bolo pripravených 100 ml reakčného pufru (výsledný guajakol = $0,113 \text{ mol.l}^{-1}$). Na prípravu 10 ml 175 mmol.l^{-1} peroxidu vodíka bolo nutné riediť $8,59 \text{ mol.l}^{-1}$ zásobný H_2O_2 vodou (204 μl peroxidu + 9796 μl vody).

Do jednej jamky mikroplatničky bolo pipetovaných 155 μl reakčného pufru, 10 μl extraktu a 10 μl 175 mmol.l^{-1} H_2O_2 /vody do blanku. Nárast absorbancie bol meraný pri teplote 30°C a $\lambda = 436$ nm po dobu 1 minúty. Pre výpočet optickej dráhy boli vzorky následne zmerané aj pri vlnových dĺžkach 900 a 977 nm.

3.5.8 Stanovenie celkovej aktivity polyfenoloxidázy

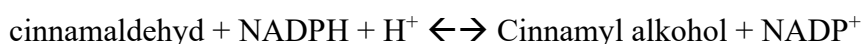
Pri tejto metóde bola využitá oxidácia 4-metylkatecholu ako substrátu pre polyfenoloxidázy (PPO). Výsledný produkt oranžovej až hnedej farby má najvyššiu absorbanciu pri dĺžke 420 nm (Balarynová et al., 2022).

Bol pripravený roztok katalázy (CAT) rozpustením 5mg CAT v 4 ml vody. Roztok 88 mM 4-metylkatecholu vznikol pridaním 10,9 mg do 1 ml vody.

Do jednej jamky mikroplatničky bolo napipetovaných 180 μl $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ K-fosfátového pufru pH 7 (postup prípravy pufru- kapitola 3.3.), 20 μl CAT, 10 μl vzorky a 10 μl metylnkatecholu/vody/ do blanku pufru. Nárast absorbancie bol meraný pri 420 nm po dobu 60 minút pri 25°C . Pre výpočet optickej dráhy boli následne zmerané absorbancie v jamkách pri $\lambda = 900$ a 977 nm. Jednotlivé vzorky boli pipetované v triplikáte.

3.5.9 Stanovenie celkovej aktivity cinnamylalkoholdehydrogenázy

Reverzibilná premena cinnamaldehydov na príslušné cinnamylalkoholy, resp. monolignoly, je katalyzovaná enzýmom CAD podľa rovnice:



Polymerizáciou monolignolov (*p*- kumaryl-/ sinapyl-/ koniferyl alkohol) vzniká lignín (McKie et al., 1993).

Príprava metódy merania CAD aktivity zahŕňala riedenie 100 mmol.l⁻¹ zásobného roztoku sinapyl alkoholu na požadovanú molaritu 2 mmol.l⁻¹ (20 µl sinapyl alkoholu + 980 µl vody) a rozpustenie 3,1 mg NADP⁺ v 1 ml vody (4m mol.l⁻¹).

Do mikropatničky bolo pipetovaných 165 µl 0,1 mol.l⁻¹ Tris-HCl pufru, 10 µl 2 mmol.l⁻¹ sinapyl alkoholu, 10 µl 4 mmol.l⁻¹ NADP⁺ a 15 µl vzorky. V blanku boli nahradené objemy NADP⁺ a sinapylalkoholu odpovedajúcim množstvom pufru. Absorbancia pri λ=400 nm bola meraná po dobu 10 minút pri teplote 30 °C. Jamky so vzorkami boli následne premerané pri 900 a 977 nm kvôli výpočtu dĺžky optickej dráhy.

3.5.10 Príprava priečných rezov pomocou vibratómu

Pomocou skalpela bola vyrezaná obdĺžniková časť osemenia v oblasti hila. Tieto segmenty boli vložené kolmo do Petriho misiek s 4% agarózou o teplote 40 °C. Po ochladení boli vyrezané kvádre so vzorkou uprostred o veľkosti približne 1,5 x 1,5 cm, následne boli orezané do tvaru pyramídy. Základňa bola prilepená na základnú kocku vibratómu, ktorý vykonal rezy hrúbky 60 µm. Tie boli pomocou štetca prenesené na podložné sklíčka do kvapky 10 mmol.l⁻¹ K-fosfátového pufru, pH 7.

4% roztok agarózy bol pripravený rozpustením 4g agarózy v 100 ml vody za ohrevu pomocou mikrovlnnej rúry.

3.5.11 Lokalizácia, pozorovanie a fotodokumentácia reaktívnych foriem kyslíka

Na identifikáciu a lokalizáciu chemických látok v pletivách, tkanivách alebo bunkách je možné použiť histochemické metódy, kedy v prvom kroku premení enzým dodaný substrát na produkt. V druhom kroku je produkt vizualizovaný reakciou s chromogénom a vzniká farebná, nerozpustiteľná zlúčenina. V tejto práci bol ako indikátor ROS použitý 2',7'-dihydrodichlorofluoresceín diacetát (H₂DCF DA), ktorý sa po oxidácii voľnými radikálmi premieňa na vysoko fluorescenčný fluorescenční 2',7'-dichlorofluoresceín (DCF) (KYSELÁKOVÁ et al., 2013).

K rezom na podložnom sklíčku bolo Pasteurovou pipetou ku každému rezu pridaná kvapka 10 µmol.l⁻¹ roztoku 2',7'-dihydrodichlorofluoresceín diacetátu (H₂DCF DA) a následne bola vzorka ponechaná inkubácii po tme. Po 10-tich minútach bol pomocou automatickej pipety odsatý farbiaci roztok a rezy boli následne minimálne 3x premyté 10

mmol.l⁻¹ K-fosfátovým pufrom. Týmto pufrom boli rezy nakoniec zakvapnuté a prikryté krycím sklíčkom. Všetky pripravované rezy boli pozorované pod fluorescenčným mikroskopom.

10 µmol.l⁻¹ H₂DCF DA bol pripravený riedením zásobného 1 mmol.l⁻¹ H₂DCF DA nasledovne. 5 µl zásobného H₂DCF DA zmiešaný s 495 µl 10 mmol.l⁻¹ K-fosfátového pufu pH 7).

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tejto bakalárskej práci boli sledované zmeny testovaných biochemických parametrov počas vývoja semien hrachu siateho u genotypov PI, Cameor a ATC. Všetky parametre boli sledované v osemeniach a embryách. Stanovenie aktivity enzýmov v embryách vak komplikovala tvorba zrazenín, kvôli ktorej nebolo možné merať absorbanciu, a teda ani stanoviť aktivitu. Z toho dôvodu sú vo výsledkovej časti komentované len výsledky enzýmových aktivít v osemeniach. Zákal bol prítomný aj po riedení extraktov na hranicu detekovateľnosti enzýmovej aktivity. Optimalizácia metódy nebola vykonaná z dôvodu časového obmedzenia. Príkladom optimalizácie by mohlo byť odstránenie sacharidov ako škrob zo vzoriek, napríklad centrifugáciou. Všetky merania boli prevedené len raz, výsledky sú teda priemerom technického triplikátu. Pre overenie správnosti získaných výsledkov by bolo vhodné merania zopakovať. Následne bola vykonaná histochemická vizualizácia reaktívnych foriem kyslíka v rezoch osemenia v oblasti hila. Vzájomné prepojenie daných parametrov dodáva obraz o biochemických a fyziologických procesoch počas vývoja semena.

4.1 Stanovenie množstva celkových fenolov a flavonoidov

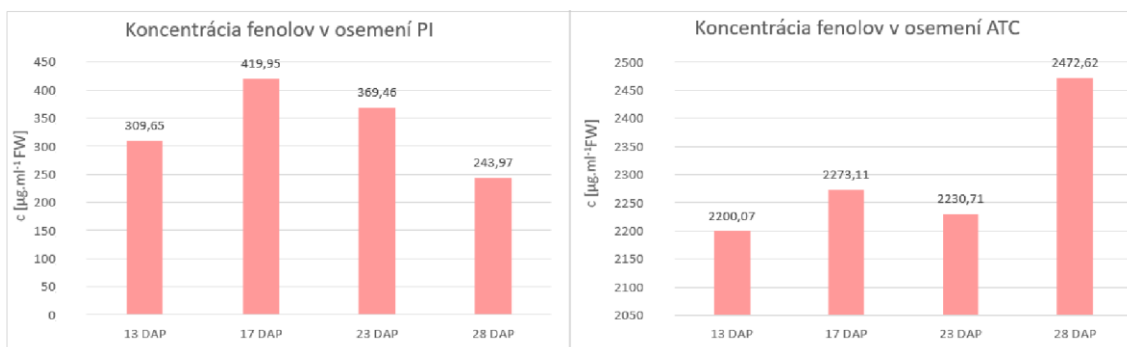
Celkový obsah fenolických a flavonoidných látok bol určený v osemeniach a embryách oboch genotypov hrachu siateho vo vývojových štádiách 13, 17, 23 a 28 DAP. Markantný rozdiel v obsahu fenolických látok bol očakávané pozorovaný medzi osemeniami ATC a PI – genotyp ATC obsahoval 7-násobné množstvo fenolov v 13 dňoch po opelení oproti PI ($309,65 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ PI, $2200,07 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ATC).

Všetky merané vzorky (embryá a osemenia) vykazovali zhodný trend v prvých troch štádiách 13-17 DAP, kedy najvyššiu koncentráciu fenolických látok bola nameraná 17 dní po opelení (Obr.8). Posledné vývojové štádium (28 DAP) bolo z hľadiska obsahu fenolických látok variabilné. Vzorky osemenia genotypu PI vykazovali najnižší obsah fenolov v štádiu 28 DAP oproti svojim zvyšným vývojovým štádiám. V osemení ATC tomu bolo presne naopak – spomedzi všetkých štádií ATC bol obsah fenolických látok najvyšší v 28 dňoch po opelení. V prípade embryí malo posledné štádium genotypu PI najvyšší obsah fenolov, u ATC boli celkové fenoly obsahovo na podobnej úrovni, ako v 23 dňoch po opelení (Obr.9).

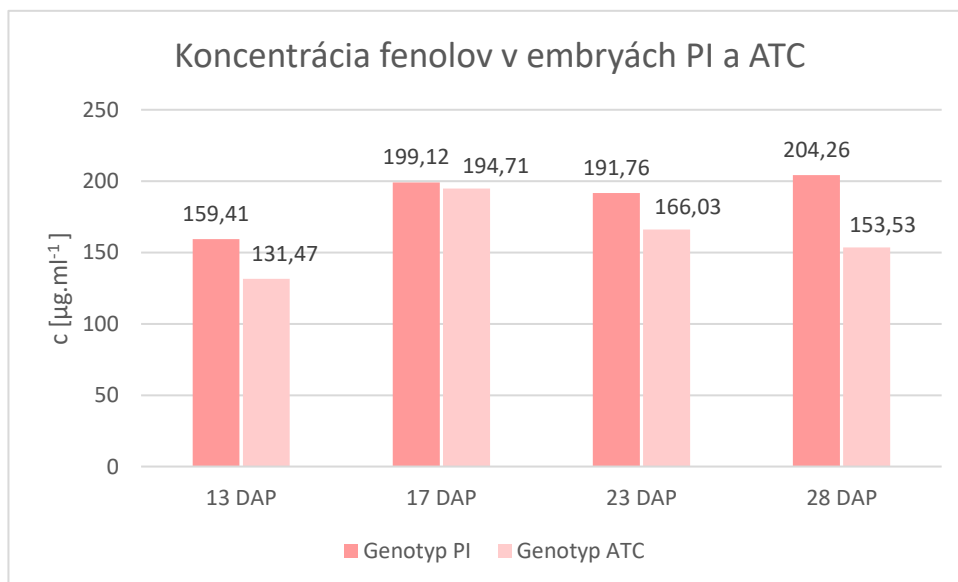
Medzi osemeniami neboli pozorované výrazné rozdiely v množstvách flavonoidných látok medzi osemeniami študovaných genotypov. V prípade osemenia genotypu PI bola nameraná najvyššia koncentrácia flavonoidov v prvom vývojovom štádiu ($169,39 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

¹⁾, v nasledujúcich troch štádiách bola koncentrácia podobná. Najvyššie množstvo flavonoidov u genotypu ATC bolo v osemeni stanovené až v druhom vývojovom štádiu a ich hladina v rámci vývoja postupne klesala (Obr.10).

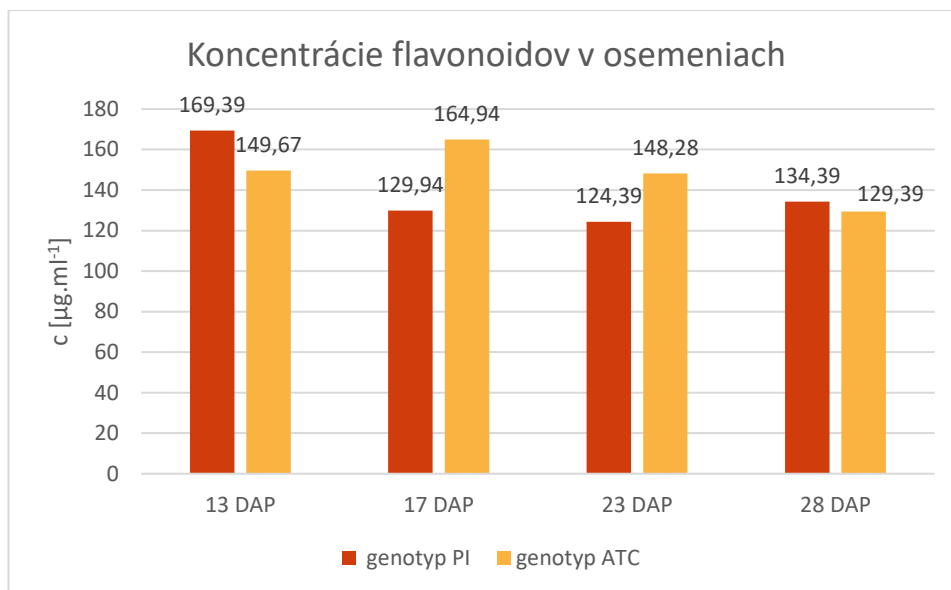
Množstvo flavonoidov v embryách (Obr.11), (61,75 -106,47 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bolo mierne nižšie v porovnaní s osemeniami (124,39-169,39 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). V prípade embrya genotypu PI dochádzalo počas vývoja ku nárastu koncentrácie až na najvyššiu hodnotu 80,92 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 28 dňoch po opelení. Koncentrácie flavonoidov u ATC bola v porovnaní s PI genotypom celkovo vyššia s najvyšším obsahom látok s štádiu 23 DAP (106,47 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).



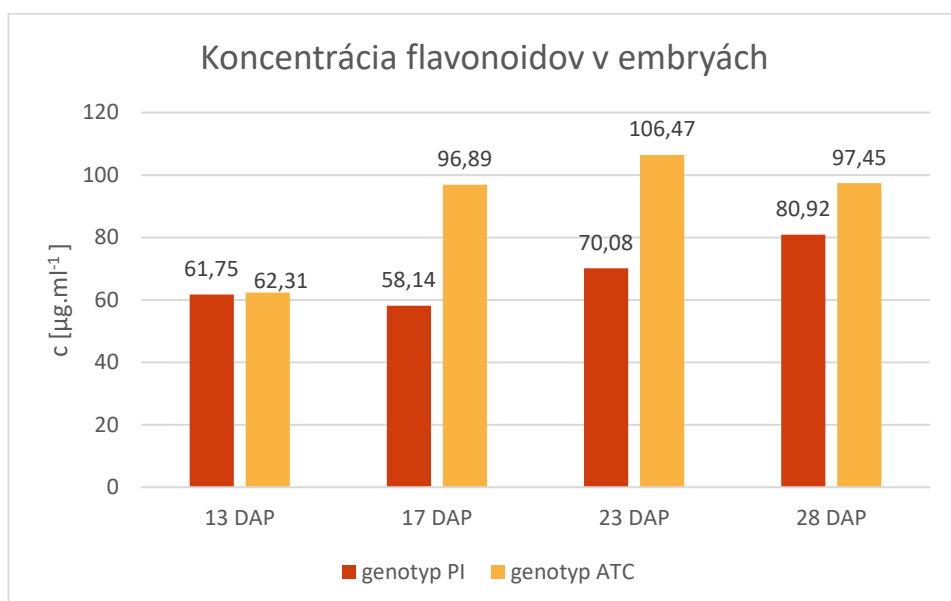
Obr. 8: Koncentrácia fenolických látok v osemeniach genotypov ATC a PI počas 4 vývojových štádií DAP (dní po opelení).



Obr. 9: Koncentrácia fenolických látok v embryách genotypov ATC a PI počas 4 vývojových štádií DAP (dní po opelení).



Obr. 10: Koncentrácia flavonoidov v osemeniach genotypov ATC a PI počas 4 vývojových štádií DAP (dní po opelení).



Obr. 11: Koncentrácia fenolických látok v osemeniach genotypov ATC a PI počas 4 vývojových štádií DAP (dní po opelení).

Kultúrne genotypy hrachu PI a ATC sa líšia pigmentáciou osemenia. Genotyp ATC je špecifický pigmentovaným osemením, pričom ide o charakteristiku typickú skôr (ale nie výlučne) pre druhy plané. Ako príklad ďalšieho kultúrneho genotypu s pigmentovaným osemením môže slúžiť PIS475 alebo PIS476 (Balarynová et al., 2022). Semená kultúrneho genotypu PI väčšinou nie sú pigmentované a práve tento fakt prispieva ku výraznému rozdielu koncentrácií celkových fenolov a flavonoidov medzi dvoma genotypmi. Pigmentácia osemenia závisí od množstva flavonoidov, ktoré boli oxidované

na hnedý polymérny melanín- fenolycký polymér (Britton, 1983). Genotyp ATC teda očakávane vykazoval oproti PI v osemeni nižšie koncentrácie flavonoidov (spotrebovali sa na tvorbu pigmentu) a výrazne vyššie koncentrácie fenolov (tvoril sa pigment).

4.2 Stanovenie množstva celkových proteínov

Celkový obsah proteínov v štyroch vývojových štádiách (13-28 DAP) osemení a embryí genotypov PI a ATC bol určený Bradfordovou a bicinchinínovou metódou. Nakoľko majú uvedené metódy rôznu citlivosť a so vzorkami odlišne interferujú, výsledky neboli vždy zhodné.

Obsah proteínov v osemeni PI určený dvoma metódami bol trendovo zhodný. V prvých troch štádiách (13, 17, 23 DAP) sa proteíny nachádzali v približne rovnakých množstvách. Posledné štádium bolo oproti prvým trom na proteíny chudobnejšie, čo môže byť vysvetlené dočasnou zásobnou a výživnou funkciou osemenia pred tým, ako túto funkciu preberá embryo (Rochat & Boutin, 1991). V prípade genotypu ATC obe metódy stanovili nižší obsah proteínov oproti PI, pričom vo všetkých štádiách boli koncentrácie podobné a nebol sledovaný trend. Obsah proteínov v osemeniach PI bol stanovený metódou BCA na približne dvojnásobok obsahu meraného pomocou Bradfordovej metódy (13 dní po opelení, PI: 12,25 mg.ml⁻¹ Bradford/ 21,98 mg.ml⁻¹ BCA), trend však zostal zachovaný. V prípade meraní obsahu proteínov v osemeni ATC bol však rozdiel medzi dvoma metódami výraznejší, a to až 10-násobný (Bradford 13 DAP – 0,75 mg.ml⁻¹, BCA- 7,69 mg.ml⁻¹). Trend kopíruje prvé dve vývojové štádiá, ale v 23 a 28 DAP sa medzi sebou metódy v osemeniach ATC odlišujú.

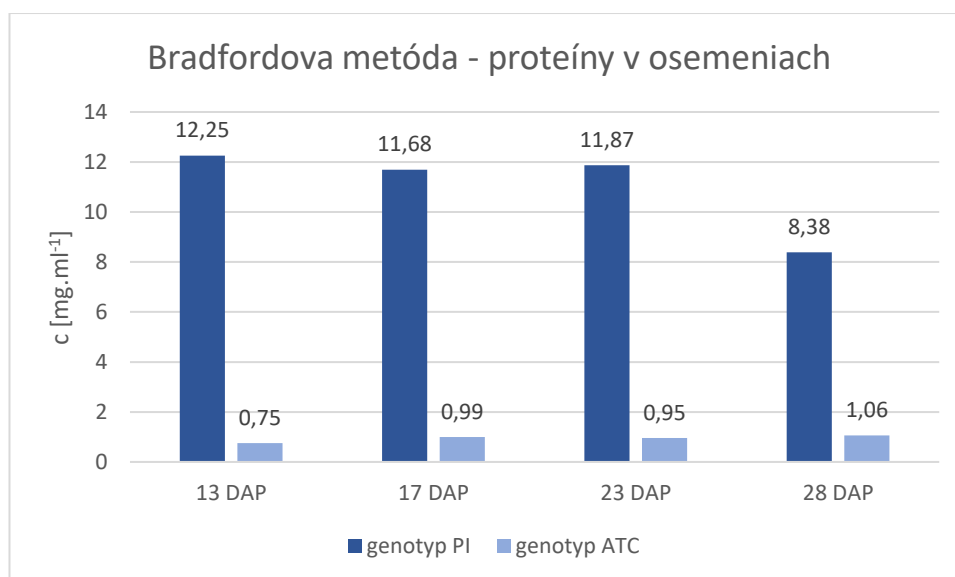
U všetkých vzoriek embryí bol pri použití oboch metód sledovaný nárast obsahu proteínov v priebehu vývoja, nakoľko ide o zásobné orgány semena. Výnimku tvoril iba posledné štádium genotypu ATC určené metódou BCA, kedy oproti 23 DAP obsah proteínov mierne klesol zo 106,36 mg.ml⁻¹ na 92,29 mg.ml⁻¹. V prípade embryí bol stanovený vyšší obsah proteínov vo všetkých štádiách metódou Bradforda oproti BCA. V prípade použitia Bradfordovej metódy je u embryí sledovaný takmer lineárny nárast obsahu proteínov počas vývoja, naproti tomu výsledky meraní pomocou BCA naznačujú prudší skok medzi prvými dvoma štádiami.

Metóda BCA je oproti Bradfordovej metóde menej variabilná pre rozdielne proteíny. Na druhú má BCA nižší prah detekcie (0,5– 1,5 µg.ml⁻¹ BCA, 1-1,5 µg.ml⁻¹ Bradford) a k pozitívnemu výsledku prispieva prítomnosť niektorých AMK. Metóda

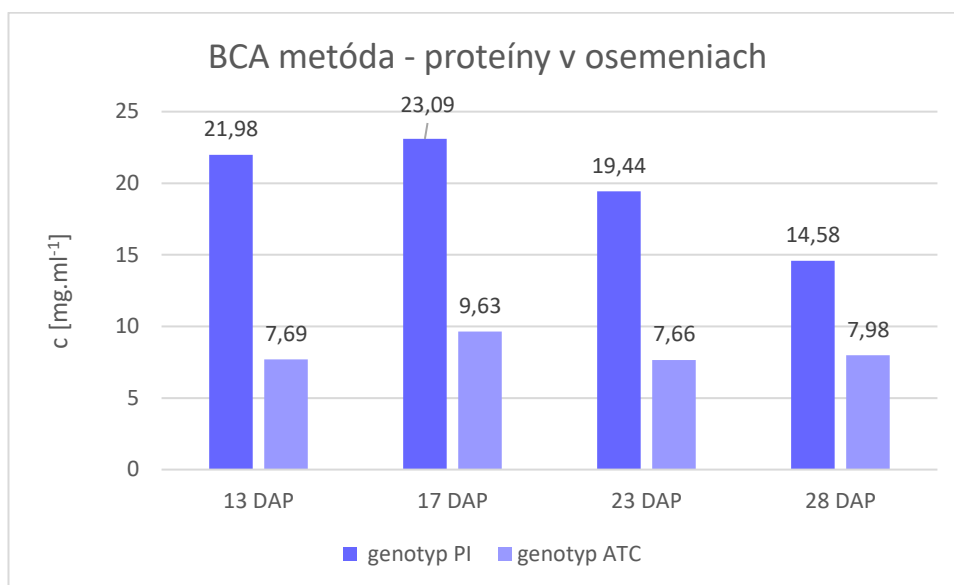
BCA určila celkovo vyššie koncentrácie proteínov v osemeni oproti Bradfordovej metóde, čo môžeme odôvodniť aminokyselínovým zložením bohatým na cysteín, tyrozín a tryptofán u oboch genotypov. Ďalším vysvetlením by mohol byť rozdiel v glykozylácii proteínov - Bradfordova metóda stanovuje nižšie koncentrácie proteínu ako BCA (Fountoulakis et al., 1992) .

Obe metódy určili nižšiu koncentráciu proteínov u genotypu ATC oproti PI, čo indikuje rozdiel v proteínovom zložení osemenia daných genotypov. V prípade Bradfordovej metódy bol rozdiel medzi obsahom proteínov PI a ATC v osemeni väčší ako u BCA metódy pravdepodobne preto, že dochádzalo ku väčšej interferencii proteínov ATC ako v prípade BCA metódy.

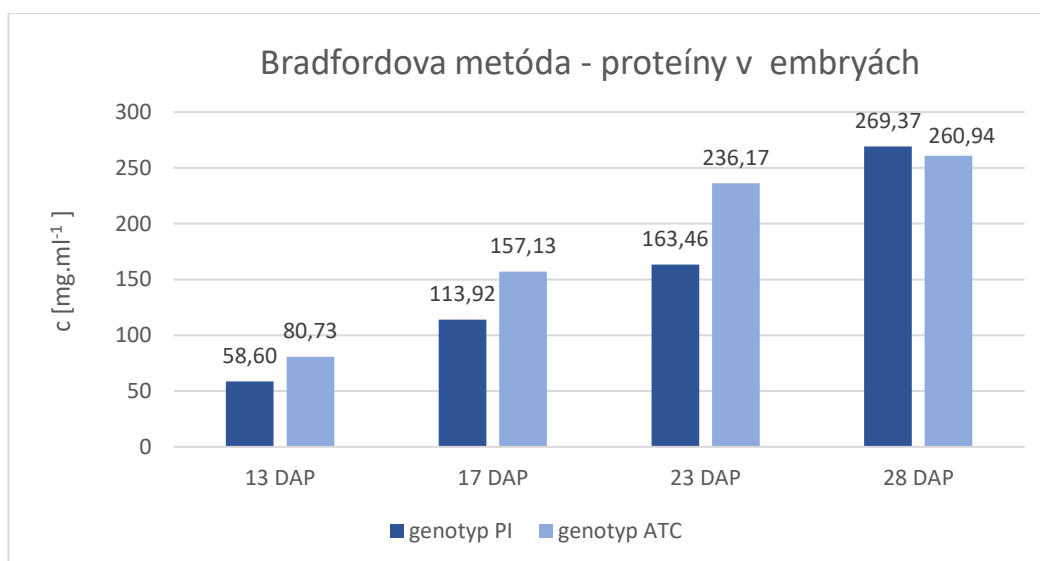
Bradfordova metóda naopak stanovila oproti BCA väčšie koncentrácie proteínov v embryách. Proteínové zloženie embryí je pravdepodobne odlišné od osemenia a preto nedochádza ku takej veľkej interferencii v prípade Bradfordovej metódy. Metódy použité v rámci tejto práce sú v porovnaní s inými relatívne rýchle a jednoduché. Pre presnejšie stanovenie by však bolo vhodné použiť napríklad fluorescenčné metódy, kedy dochádza ku reakcii činidla (napríklad fluoreskamínu) so špecifickými AMK za vzniku fluorescenčného produktu (De Bernardo et al., 1974).



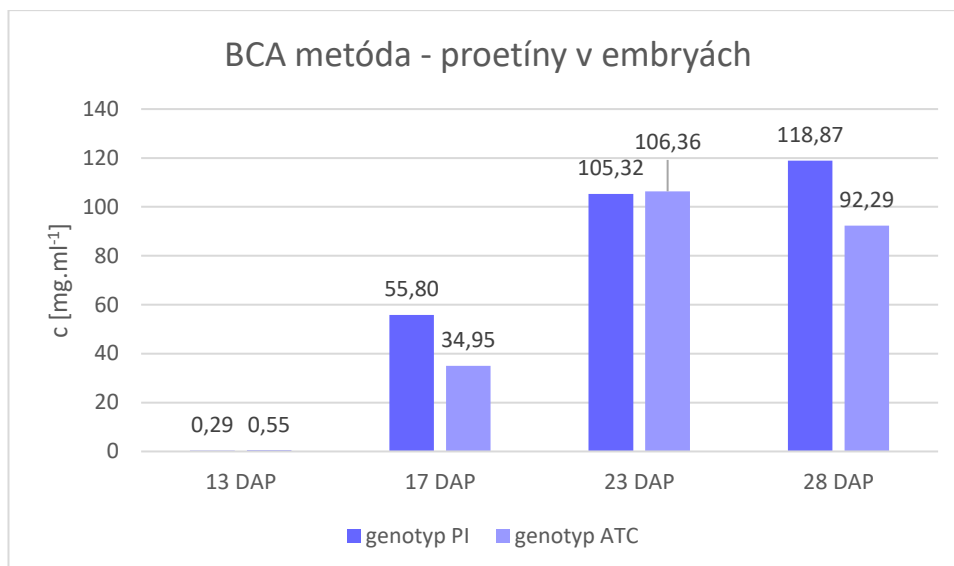
Obr. 12: Koncentrácia celkových proteínov v osemeniach dvoch genotypov hrachu stanovená Bradfordovou metódou počas 4 vývojových štádií DAP (dní po opelení).



Obr. 13: Koncentrácia celkových proteínov v osemeniach dvoch genotypov hrachu stanovená BCA metódou počas 4 vývojových štádií DAP (dní po opelení).



Obr. 14: Koncentrácia celkových proteínov v embryách dvoch genotypov hrachu stanovená Bradfordovou metódou počas 4 vývojových štádií DAP (dní po opelení).

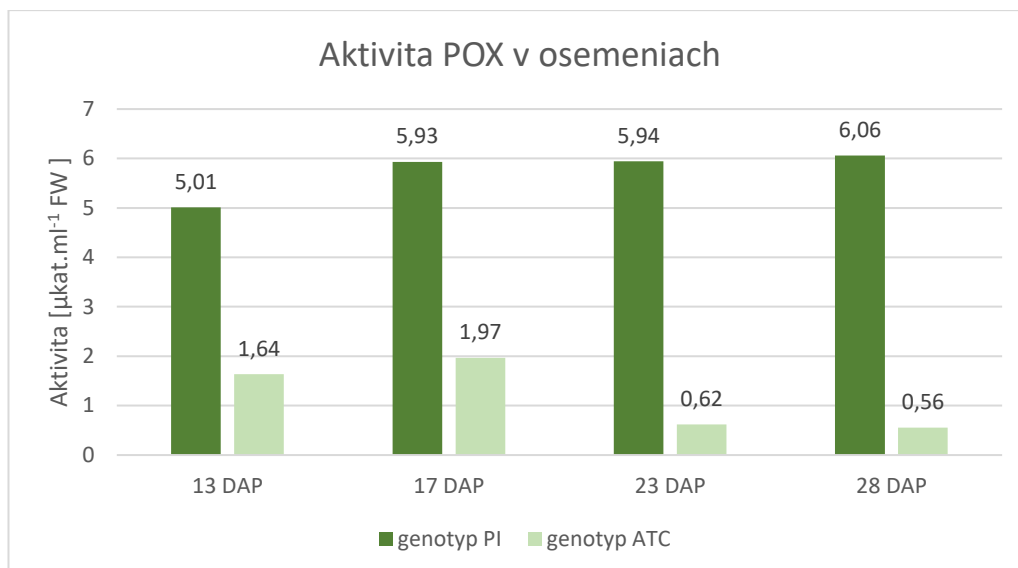


Obr. 15: Koncentrácia celkových proteínov v embryách dvoch genotypov hrachu stanovená BCA metódou počas 4 vývojových štádií DAP (dni po opelení).

4.3 Stanovenie aktivity peroxidázy

Aktivita peroxidázy bola meraná počas štyroch vývojových štádií v osemeniach kultúrnych genotypov PI a ATC líšiacou sa pigmentáciou. Celkovo bola aktivita enzýmu vyššia u genotypu PI v porovnaní s ATC (13 DAP: 5,01 $\mu\text{kat.ml}^{-1}$ FW u PI, 1,64 $\mu\text{kat.ml}^{-1}$ FWATC). V prípade genotypu PI dochádzalo v priebehu dozrievania semien k miernemu nárastu aktivity POX, zatiaľ čo u genotypu ATC tomu bolo naopak. Aktivita POX rástla len do druhého vývojového štádia, potom klesala až na najnižšiu hodnotu v 28 dní po opelení (0,56 $\mu\text{kat.ml}^{-1}$ FW).

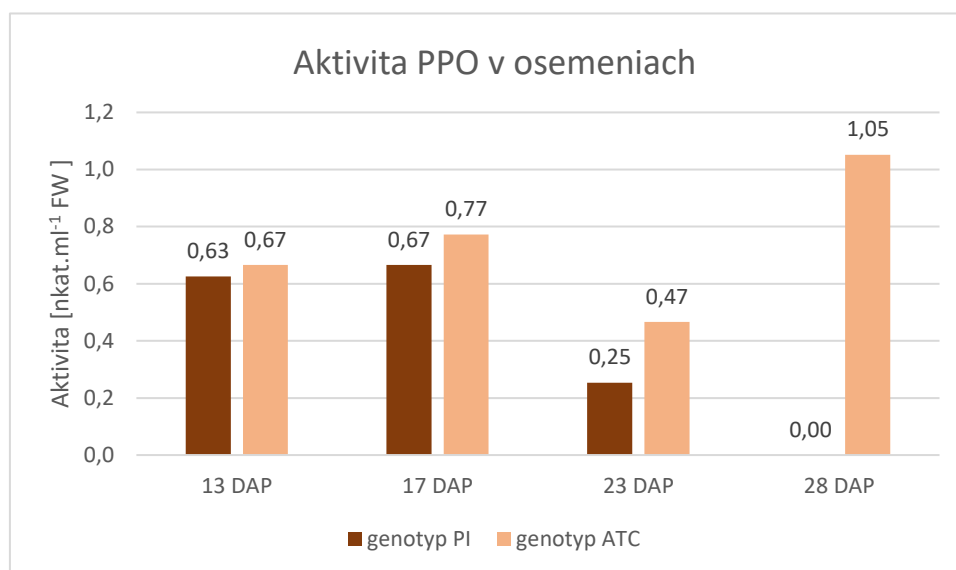
Peroxidázy spolu s PPO oxidačne polymerizujú lignín. V prípade semien sóje je POX aktívna už 13 dní po opelení a jej aktivita v rámci vývoja rastie (Zablatzká et al., 2021). Rovnaký trend bol sledovaný v rámci tejto práce u genotypu PI. Dôvodom, prečo je medzi genotypmi líšiacimi sa pigmentáciou rozdiel môže byť tvorba lignínu ako primárnej formy ochrany semena v prípade nepigmentovaného genotypu PI. Pigmentovaný genotyp ATC môže pred tvorbou lignínu uprednostňovať oxidáciu substrátov najmä pomocou PPO za tvorby pigmentu, ktorý má tiež ochranné vlastnosti.



Obr. 16: Aktivita enzýmu peroxidázy, stanovená v osemeni dvoch genotypov hrachu počas 4 vývojových štádií DAP (dní po opelení).

4.4 Stanovenie aktivity polyfenoloxidázy

Aktivita enzýmu PPO bola meraná v osemeniach genotypov PI a ATC, pričom počas prvých troch vývojových štádií bol sledovaný trend zhodný pre oba genotypy (Obr.17). Od prvého štádia aktivita v druhom štádiu vzrástla z 0,63 na 0,67 nkat.ml⁻¹ FW pre PI, a z 0,67 na 0,77 nkat.ml⁻¹ FW pre ATC, a následne v 23 DAP v oboch prípadoch klesla pod úroveň aktivity namerané v 13 dňoch po opelení. Vo štvrtom vývojom štádiu sa aktivita PPO u študovaných genotypov výrazne líšila. U genotypu PI nebola POX v štádiu 28 DAP aktívna. Naopak, u genotypu ATC bola aktivita PPO 28 dní po opelení najvyššia spomedzi všetkých vývojových štádií ATC. Z výsledkov aktivity PPO môžeme dedukovať, že v prípade kultúrneho a pigmentovaného genotypu ATC dochádzalo v štvrtom štádiu 28 DAP ku tvorbe melanínu v oblasti hila, nakoľko sa aktivita PPO oproti zvyšným štádiám výraznejšie zvýšila. Naopak, u genotypu PI enzým PPO nevykazoval v 28 dňoch po opelení žiadnu aktivitu, pretože sa pigment netvoril. Pigmentácia hila v štádiu 28 DAP bola v rámci tejto bakalárskej práce taktiež priamo pozorovaná na zamrazených vzorkách osemenia. Tieto hypotézy potvrdzuje práca kolektívu Balarynová et al. (2022), z ktorej vyplýva, že pigmentácia hila korešponduje s aktivitou PPO spolu s prítomnosťou fenolických prekurzorov. Štúdia uvádza ako príklad kultúrneho, pigmentovaného semena hrachu genotyp JI92, ktorého trend v aktivite PPO je zhodný s aktivitou PPO v ATC, použitom v tejto bakalárskej práci. Analógiou genotypu PI je kultúrny nepigmentovaný Cameor, ktorého aktivita však bola veľmi nízka a stabilná počas všetkých štyroch vývojových štádií (Balarynová et al.,

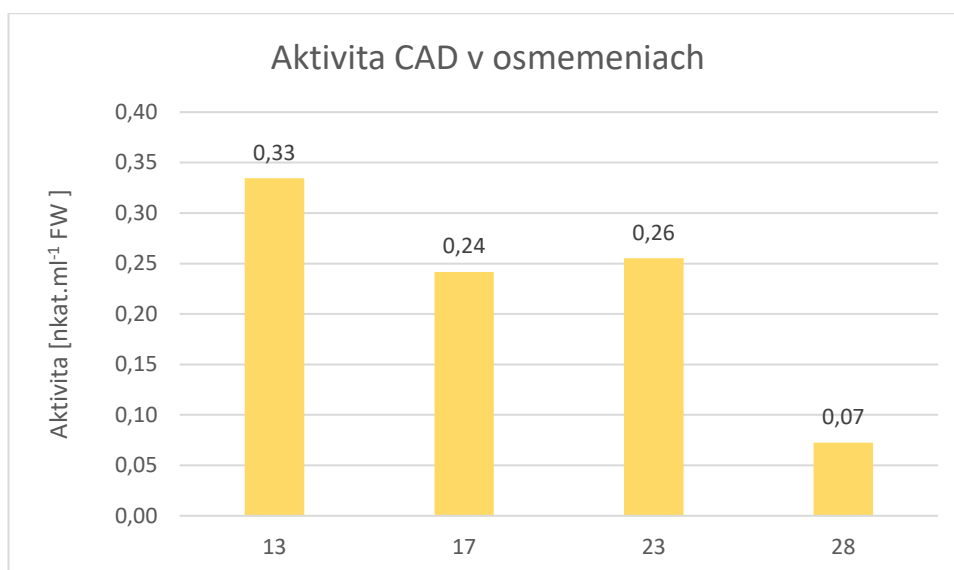


Obr. 17: Aktivita enzýmu polyfenoloxidázy, stanovená v osemeni dvoch genotypov hrachu počas 4 vývojových štádií DAP (dní po opelení).

2022) na rozdiel od PI, ktorého aktivita PPO bola síce nižšia, ale porovnateľná s pigmentovaným genotypom ATC a líšila sa len v poslednom štádiu. Aktivita PPO v prípade nepigmentovaného, kultúrneho genotypu PI má pravdepodobne iný, doposiaľ neznámy význam. Ide o skupinu enzýmov s veľkou diverzitou, ktorých fyziologické úlohy sú stále predmetom štúdia (Zhang, 2023).

4.5 Stanovenie aktivity cinnamyl alkohol dehydrogenázy

Aktivita CAD bola meraná v osemeniach oboch typov študovaných genotypov v 4 vývojových štádiách. Enzým však vykazoval aktivitu len v prípade genotypu PI (Obr.7). V osemeni genotypu ATC nebola aktivita danou metódou stanovená. Najvyššia aktivita CAD bola zaznamenaná v prvom vývojovom štádiu (0,33 nkat.ml⁻¹ FW) a najnižšia v poslednom, teda štvrtom vývojovom štádiu (0,07 nkat.ml⁻¹ FW). Na tému aktivity CAD v osemeniach aktuálne neboli nájdené štúdie, s ktorými by boli výsledky tejto práce porovnané. Literatúra ohľadom CAD najčastejšie sleduje enzým v listoch, internódiách alebo koreňoch a zameriava sa napríklad na jeho zvýšenú aktivitu v reakcii na stres (Zhang et al., 2006; Kim & Huh, 2019; Ng et al., 2024). Interpretácia výsledkov je analogická s odôvodnením aktivity POX v osemeniach. Pigmentovaný genotyp ATC môže v osemeni využívať prednostne enzým PPO na oxidáciu ochranných pigmentov, pričom tvorba lignínu v študovaných štádiách nehrá veľkú úlohu. Naopak nepigmentovaný genotyp PI deficit ochranných látok kompenzuje tvorbou lignínu, v rámci ktorej figuruje enzým CAD.



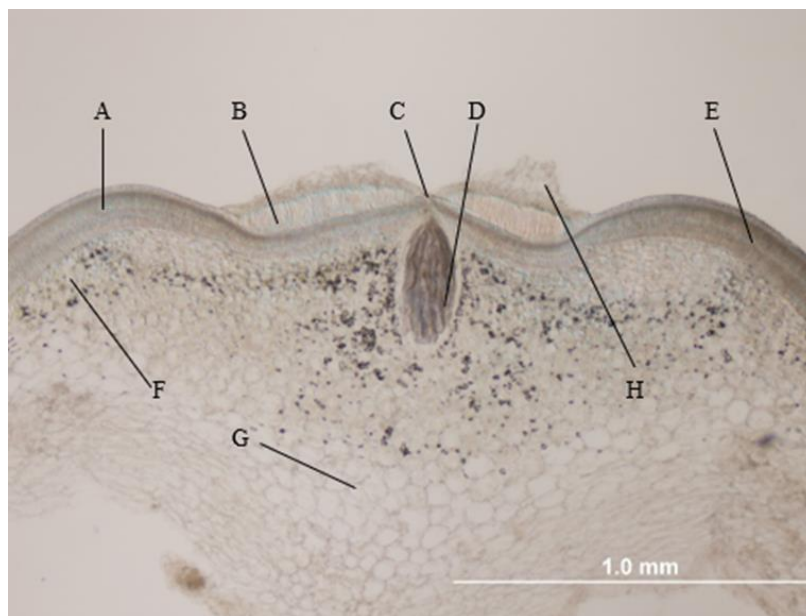
Obr. 18: Aktivita cinnamyl alkohol dehydrogenázy v osemeni genotypu PI v štyroch vývojových štádiách DAP (dni po opelení).

4.6 Histochemická lokalizácia reaktívnych foriem kyslíka

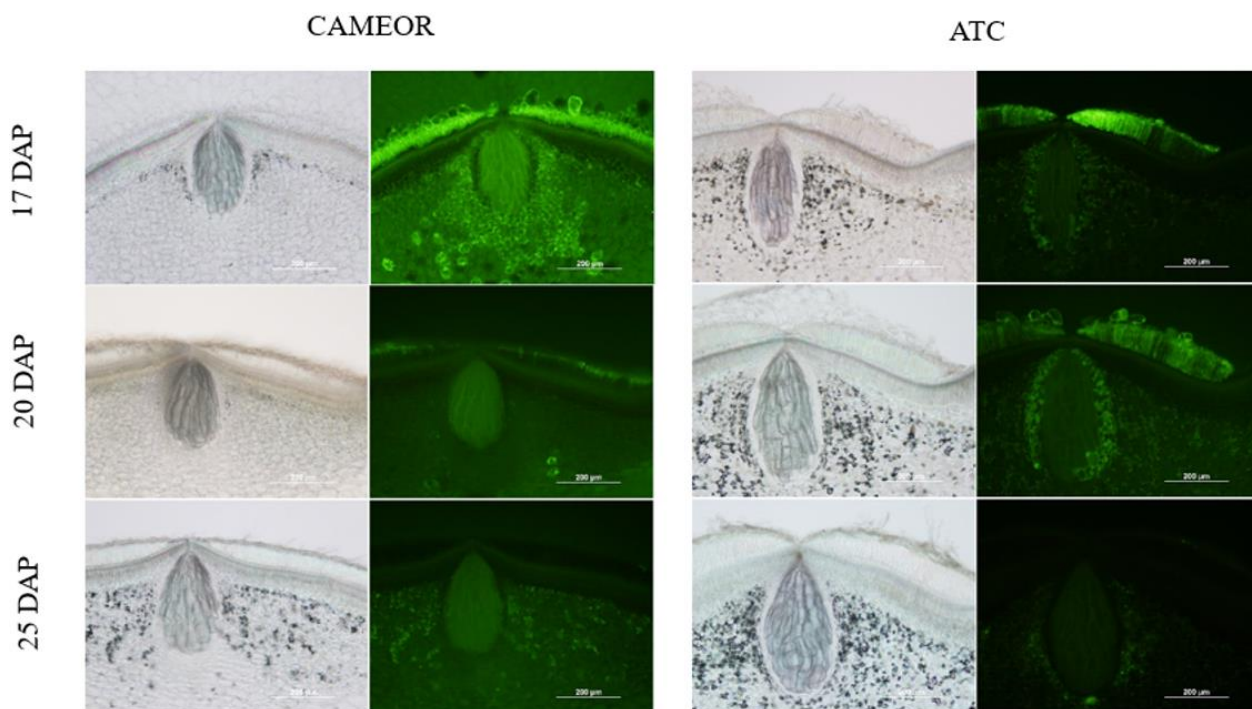
Štruktúra osemenia je prevažne homogénna s výnimkou chazálnej oblasti, kde sa nachádza hilum. Osemenie sa pri hile jemne zvlí, po bokoch hilárnej štrbiny sa nachádza ďalšia vrstva palisádových buniek – tzv. horné palisády, ktoré sú funikulárneho pôvodu (Lackey, 1981). Horné palisády prekrývajú tracheidy. V oblasti hila taktiež dochádza ku zlučovaniu osteosklereidov s parenchymatickými bunkami. V neskorších štádiách vývoja embrya má hilum funkciu regulácie procesov vysychania – otvára sa, ak je vlhkosť nízka, naopak uzatvára sa v prípade vysokej vlhkosti. Tento jav je možný vďaka zmenám spôsobeným napučaním a scvrknutím palisádových buniek (HYDE, 1954) (Lush & Evans, 1980). Rez v oblasti hila bol mikroskopicky sledovaný a zobrazený v Obr.19.

Distribúcia ROS bola v prípade oboch genotypov výrazne pozorovateľná najmä v oblasti horných palisádových buniek a okolo tracheí (Obr.20.). Trend taktiež sledujeme v poklese produkcie ROS počas dozrievania semena, čo môže byť spôsobené aktívnym metabolizmom, s ktorým je spojená práve tvorba ROS v oblasti funikulu, kedy dochádza ku transportu živín z materskej rastliny hlavne v raných štádiách vývoja semena. Kumulácia ROS v oblasti protipalisád pravdepodobne nie je reakciou na stres z mechanického poškodenia, nakoľko dochádza ku detekcii ROS aj v prípade, že funikulus zostáva stále pripojený (Obr. 21). Tvorbu ROS ako reakciu na poškodenie naopak môžeme sledovať na spodnom okraji vzorky (Obr.22), kde došlo

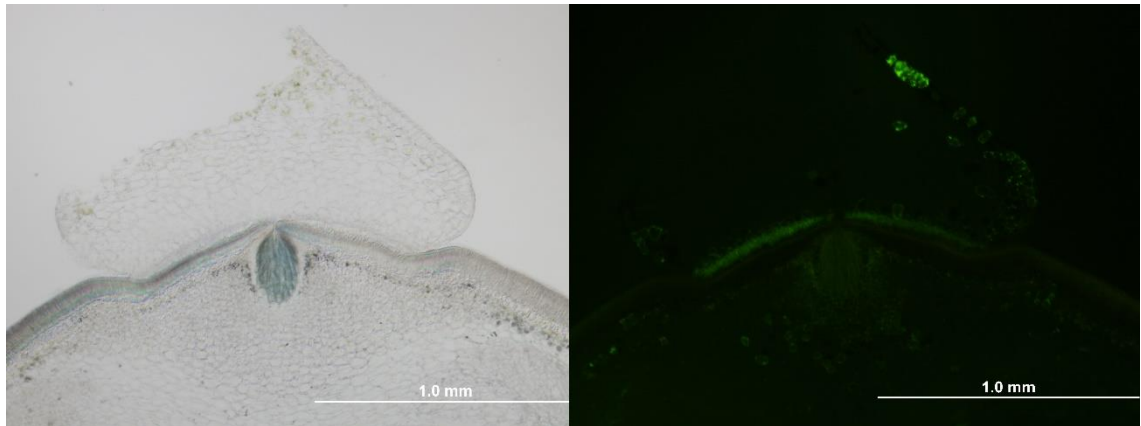
ku narušeniu parenchýmatického pletiva následkom oddelenia oddelením osemenia od embrya. Výrazné rozdiely v produkcii ROS medzi študovanými genotypmi hrachu neboli pozorované.



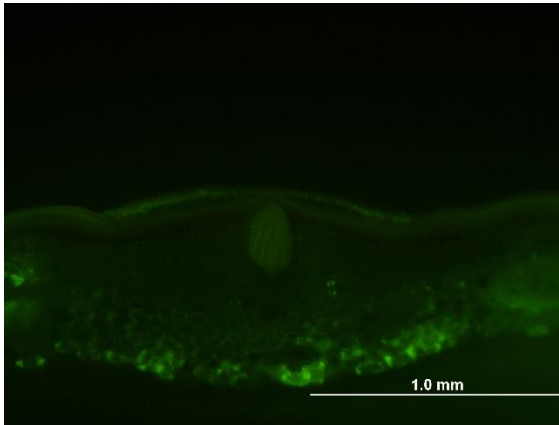
Obr. 20: Tranzverzálny rez osemenia Hrachu siateho v oblasti hila genotypu ATC 17 dní po opelení. A- makrosklereidy, B-horná palisáda, C- hilárna štrbina, D- tracheidy, E –svetlolomná línia, F- osteosklereidy, G – parenchýmatické bunky, H- zbytok funikulu. Zväčšené 100x.



Obr. 19: Distribúcia reaktívnych foriem kyslíka detekovaná fluorescenčnou sondou $H_2DCF\ DA$ ($10\ \mu mol \cdot l^{-1}$) v oblasti hila genotypu Cameor a ATC v troch štádiách vývoja – 17, 20 a 25 DAP (dní po opelení). Zväčšenie 100x.



Obr. 21: Histochemická detekcia ROS s využitím fluorescenčnej sondy 10 mikroM H_2DCF DA v reze osemením v oblasti hila so zachovaným pútkom (funikulus) u genotypu ATC. Zväčšené 100x.



Obr. 22: Histochemická lokalizácia ROS s využitím $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ fluorescenčnej sondy H_2DCF DA v reze osemením v oblasti hila genotypu Cameor. Zväčšené 100x.

5 ZÁVER

V rámci bakalárskej práce bolo cieľom objasniť problematiku dozrievania semien hrachu siateho a enzýmov s ním súvisiacich prostredníctvom spracovania teoretických poznatkov a vykonania vlastného merania. Dosiahnuté boli nasledujúce výsledky:

1. Literárna rešerš bola spracovaná na zadané témy, pričom v rámci kapitoly: Štruktúra semena – bol popísaný aj vývoj semien, nakoľko spojitosť medzi vývojom a štruktúrou je logicky podmienený. V nasledujúcich kapitolách bol čitateľ oboznámený s kľúčovými poznatkami, ako napríklad význam dozrievania semien, ktorý spočíva v akumulácii zásobných látok, nadobudnutí dormancie a tolerancie voči desikácií. V kapitolách o enzýmoch PPO, CAD a POX bol kladený dôraz na klasifikáciu, popis fyziologického účinku a štruktúry. V poslednej kapitole teoretickej časti bol popísaný ako negatívny, tak aj pozitívny vplyv ROS v rámci semena.
2. V praktickej časti boli na stanovenia použité 3 kultúrne genotypy hrachu siateho, líšiace sa pigmentáciou. Genotypy PI a Cameor sú charakteristické bezfarebným osemením, naopak genotyp ATC sa vyznačuje pigmentáciou hila, pričom ide o charakteristiku typickú najmä pre divé genotypy.
3. Stanovenie aktivít enzýmov bolo vykonané len v osemeniach daných genotypov, nakoľko embryá s reakčnou zmesou reagovali tvorbou zákalu. Odporúčame preto optimalizáciu metódy, ktorá z časových dôvodov nebola uskutočnená.
4. Rozdiely v stanovených koncentráciách celkových fenolov a flavonoidov medzi genotypmi ukázali, že genotyp ATC môže spotrebovať flavonoidy na tvorbu fenolických pigmentov. U embryí nebol rozdiel medzi genotypmi výrazný, nakoľko v ňom ku pigmentácii nedochádza.
5. Reaktívne formy kyslíka boli histochemicky lokalizované v oblasti hila v raných vývojových štádiách.
6. Boli použité dve metódy stanovenia koncentrácie proteínov, ktoré určili: a) rozdielne proteínové zloženie medzi osemeniami genotypov ATC a PI, b) nárast obsahu proteínov v priebehu vývoja semien oboch genotypov, nakoľko dochádza k ich akumulácii počas dozrievania. Optimalizáciou by v tomto prípade bolo použitie presnejšej, napríklad fluorescenčnej metódy.
7. Enzýmy PPO, CAD a POX majú v o osemeniach kultúrnych genotypov PI a ATC rôznu aktivitu, pričom ich význam bol diskutovaný v rámci daných kapitol.

8. Odporúčaním do budúcnosti je vykonať stanovenia v opakovaníach, aby boli dosiahnuté hodnotnejšie výsledky.

LITERATÚRA

- Akin, D. (1980). Evaluation by electron microscopy and anaerobic culture of types of rumen bacteria associated with digestion of forage cell walls. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(1), 242-252. <https://doi.org/10.1128/aem.39.1.242-252.1980>
- Amen, R. (1968). A model of seed dormancy. *The Botanical Review*, 34(1), 1-31. <https://doi.org/10.1007/BF02858619>
- Angelini, R., Manes, F., & Federico, R. (1990). Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta*, 182(1), 89-96. <https://doi.org/10.1007/BF00239989>
- Aron, P., & Kennedy, J. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition a Food Research*, 52(1), 79-104. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700137>
- Bailly, C. (2019). The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochemical Journal*, 476(20), 3019-3032. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190159>
- Bailly, C. (2023). ROS in seed germination. *Oxidative Stress Response In Plants*, 105(1), 177-204. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2022.10.003>
- Bailly, C., Audigier, C., Ladonne, F., Wagner, M., Coste, F., Corbineau, F., & Côme, D. (2001). Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany*, 52(357), 701-708. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.701>
- Baker, J., Van dennSteele, C., & Dure, L. (1988). Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*, 11(3), 277-291. <https://doi.org/10.1007/BF00027385>
- Balarynová, J., Klčová, B., Sekaninová, J., Kobrlová, L., Cechová, M., Krejčí, P., Leonova, T., Gorbach, D., Ihling, C., Smržová, L., Trněný, O., Frolov, A., Bednář, P., & Smýkal, P. (2022). The loss of polyphenol oxidase function is associated with hilum pigmentation and has been selected during pea domestication. *New Phytologist*, 235(5), 1807-1821. <https://doi.org/10.1111/nph.18256>
- Baskin, C., & Baskin, J. (eds.). (1998). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination* ([]). Academic Press.
- Bate, N., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P., Dixon, R., Lamb, C., & Elkind, Y. (1994). Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), 7608-7612. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7608>
- Bazin, J., Langlade, N., Vincourt, P., Arribat, S., Balzergue, S., El-Maarouf-Bouteau, H., & Bailly, C. (2011). Targeted mRNA Oxidation Regulates Sunflower Seed Dormancy Alleviation during Dry After-Ripening. *The Plant Cell*, 23(6), 2196-2208. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.086694>
- Bernards, M., Fleming, W., Llewellyn, D., Priefer, R., Yang, X., Sabatino, A., & Plourde, G. (1999). Biochemical Characterization of the Suberization-Associated Anionic Peroxidase of Potato. *Plant Physiology*, 121(1), 135-146. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.135>
- Bewley, J. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9(7), 1055-1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>
- Bhalla, P., & Slattery, H. (1984). Callose Deposits make Clover Seeds Impermeable to Water. *Annals of Botany*, 53(1), 125-128. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086661>
- Bhattacharjee, S. (2012). The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Journal of Botany*, 2012(1), 1-22. <https://doi.org/10.1155/2012/985298>
- Boesewinkel, F., & Bouman, F. (1984). The Seed: Structure. In B. Johri (ed.), *Embryology of Angiosperms* (1 ed., pp. 567-610). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [file:///C:/Users/User/Downloads/B.%20M.%20Johri,%20K.%20B.%20Ambegaokar%20\(aut h.\),%20Professor%20Brij%20Mohan%20Johri%20\(eds.\)%20-%20Embryology%20of%20Angiosperms-Springer-Verlag%20Berlin%20Heidelberg%20\(1984\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/B.%20M.%20Johri,%20K.%20B.%20Ambegaokar%20(aut h.),%20Professor%20Brij%20Mohan%20Johri%20(eds.)%20-%20Embryology%20of%20Angiosperms-Springer-Verlag%20Berlin%20Heidelberg%20(1984).pdf)

- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brill, E., Abrahams, S., Hayes, C., Jenkins, C., & Watson, J. Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 41(2), 279-291. <https://doi.org/10.1023/A:1006381630494>
- Britton, G. (1983). *The biochemistry of natural pigments* (1 ed.). Great Britain.
- Campbell, M., & Sederoff, R. (1996). Variation in Lignin Content and Composition - Mechanisms of Control and Implications for the Genetic Improvement of Plants. *PLANT PHYSIOLOGY*, 110(1), 3-13. <https://doi.org/10.1104/pp.110.1.3>
- Capeleti, I., Ferrarese, M., Krzyzanowski, F., & Ferrarese-Filho, O. (2005). A new procedure for quantification of lignin in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed coat and their relationship with the resistance to mechanical damage. *Seed Science and Technology*, 33(2), 511-515. <https://doi.org/10.15258/sst.2005.33.2.25>
- Carpenter, J., & Crowe, J. (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*, 28(9), 3916-3922. <https://doi.org/10.1021/bi00435a044>
- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 179(3), 145-150. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0510-7>
- Claus, H., & Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(1), 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.012>
- Cloetens, P., Mache, R., Schlenker, M., & Lerbs-Mache, S. (2006). Quantitative phase tomography of Arabidopsis seeds reveals intercellular void network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14626-14630. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603490103>
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., & Tavliadoraki, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11(2), 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.12.009>
- Crowe, J., Carpenter, J., & Crowe, L. (1998). THE ROLE OF VITRIFICATION IN ANHYDROBIOSIS. *Annual Review of Physiology*, 60(1), 73-103. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.73>
- Daiyasu, H., & Toh, H. (2000). Molecular Evolution of the Myeloperoxidase Family. *Journal of Molecular Evolution*, 51(5), 433-445. <https://doi.org/10.1007/s002390010106>
- De Bernardo, S., Weigele, M., Toome, V., Manhart, K., Leimgruber, W., Böhlen, P., Stein, S., & Udenfriend, S. (1974). Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 163(1), 390-399. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(74\)90490-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90490-1)
- Debeaujon, I., Lepiniec, L., Pourcel, L., & Routaboul, J. (2007). Seed coat development and dormancy. In K. Bradford & H. Nonogaki, *Seed Development, Dormancy and Germination* (27 ed., pp. 1-25). by Blackwell Publishing Ltd. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470988848#page=43>
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109(), 212-228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- Desai, S., & Nityanand, C. (2011). Microbial Laccases and their Applications: A Review. *Asian Journal of Biotechnology*, 3(2), 98-124. <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2011.98.124>
- Diboll, A. (1968). FINE STRUCTURAL DEVELOPMENT OF THE MEGAGAMETOPHYTE OF ZEA MAYS FOLLOWING FERTILIZATION. *American Journal of Botany*, 55(7), 787-806. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1968.tb07437.x>
- Dong, N., & Lin, H. (2021). Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 180-209. <https://doi.org/10.1111/jipb.13054>

- Doyle, J. (2006). Seed ferns and the origin of angiosperms. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 133(1), 169-209. [https://doi.org/10.3159/1095-5674\(2006\)133\[169:SFATOO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3159/1095-5674(2006)133[169:SFATOO]2.0.CO;2)
- Dueñas, M., Sun, B., Hernández, T., Estrella, I., & Spranger, M. (2003). Proanthocyanidin Composition in the Seed Coat of Lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7999-8004. <https://doi.org/10.1021/jf0303215>
- Dwivedi, U., Singh, P., Pandey, V., & Kumar, A. (2011). Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 117-128. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>
- El-Maarouf-Bouteau, H., Meimoun, P., Job, C., Job, D., & Bailly, C. (2013). Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4(1), neuvedené. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00077>
- Espelie, K., & Kolattukudy, P. (1985). Purification and characterization of an abscisic acid-inducible anionic peroxidase associated with suberization in potato (*Solanum tuberosum*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 240(2), 539-545. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90060-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90060-8)
- Evans, J., & Goldfine, I. (2000). α -Lipoic Acid: A Multifunctional Antioxidant That Improves Insulin Sensitivity in Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2(3), 401-413. <https://doi.org/10.1089/15209150050194279>
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., & Comporti, M. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters*, 416(2), 123-129. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01182-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01182-4)
- Finch-Savage, W., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501-523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- Forbis, T., Floyd, S., & Queiroz, A. (2002). THE EVOLUTION OF EMBRYO SIZE IN ANGIOSPERMS AND OTHER SEED PLANTS: IMPLICATIONS FOR THE EVOLUTION OF SEED DORMANCY. *Evolution*, 56(11), 2112-2125. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00137.x>
- Fountoulakis, M., Juranville, J., & Manneberg, M. (1992). Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24(3-4), 265-274. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(94\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0165-022X(94)90078-7)
- Frey, A., Godin, B., Bonnet, M., Sotta, B., & Marion-Poll, A. (2004). Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana glauca*. *Planta*, 218(6), 958-964. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1180-7>
- Friedman, W., & Floyd, S. (2001). PERSPECTIVE: THE ORIGIN OF FLOWERING PLANTS AND THEIR REPRODUCTIVE BIOLOGY? A TALE OF TWO PHYLOGENIES. *Evolution*, 55(2), 217-231. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb01288.x>
- Gabaldón, C., Gómez-Ros, L., Núñez-Flores, M., Esteban-Carrasco, A., & Barceló, A. (2007). Post-translational modifications of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*. *Plant Molecular Biology*, 65(1-2), 43-61. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9197-0>
- Galau, G., Hughes, D., & Dure, L. (1986). Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 7(3), 155-170. <https://doi.org/10.1007/BF00021327>
- Gifford, E., & Foster, A. (1989). *Morphology and evolution of vascular plants* (3 ed.). W.H. Freeman.
- Golombek, S., Heim, U., Horstmann, C., Wobus, U., & Weber, H. (1999). Phosphoenolpyruvate carboxylase in developing seeds of *Vicia faba* L: gene expression and metabolic regulation. *Planta*, 208(1), 66-72. <https://doi.org/10.1007/s004250050535>
- Goto, T., & Kondo, T. (1991). Structure and Molecular Stacking of Anthocyanins—Flower Color Variation. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 30(1), 17-33. <https://doi.org/10.1002/anie.199100171>

- Grand, C., Sarni, F., & Boudet, A. (1985). Inhibition of cinnamyl-alcohol-dehydrogenase activity and lignin synthesis in poplar (*Populus x euramericana* Dode) tissues by two organic compounds. *Planta*, 163(2), 232-237. <https://doi.org/10.1007/BF00393512>
- Griffen, L., Wilczek, A., & Bazzaz, F. (2004). UV-B affects within-seed biomass allocation and chemical provisioning. *New Phytologist*, 162(1), 167-171. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01013.x>
- Groot, S. (2022). Seed maturation and its practical implications. *Seed Science and Technology*, 50(2), 141-151. <https://doi.org/10.15258/sst.2022.50.1.s.08>
- Grotewold, E. (2006). THE GENETICS AND BIOCHEMISTRY OF FLORAL PIGMENTS. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 761-780. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105248>
- Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M., & Bellini, C. (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science*, 12(7), 294-300. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.003>
- Hahlbrock, K., & Scheel, D. (1989). Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40(1), 347-369. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002023>
- Halliwell, B. (1977). Generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals during the oxidation of dihydroxyfumaric acid by peroxidase. *Biochemical Journal*, 163(3), 441-448. <https://doi.org/10.1042/bj1630441>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5 ed.). Oxford University Press.
- Hamly, D. (1932). Softening of the Seeds of *Melilotus alba*. *Botanical Gazette*, 93(4), 345-375. <https://doi.org/10.1086/334269>
- Hardham, A. (1976). Structural Aspects of the Pathways of Nutrient Flow to the Developing Embryo and Cotyledons of *Pisum sativum* L. *Australian Journal of Botany*, 24(6), 711-721. <https://doi.org/10.1071/BT9760711>
- Harris, W. (1983). On the Development of Macrosclereids in Seed Coats of *Pisum sativum* L. *American Journal of Botany*, 70(10), 1528-1535. <https://doi.org/10.2307/2443351>
- Hauxwell, A., Corke, F., Hedley, C., & Wang, T. (1990). Storage protein gene expression is localised to regions lacking mitotic activity in developing pea embryos. An analysis of seed development in *Pisum sativum* XIV. *Development*, 110(1), 283-289. <https://doi.org/10.1242/dev.110.1.283>
- Havsteen, B. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids, 96(2-3), 67-202. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X)
- Hichri, I., Barrieu, F., Bogs, J., Kappel, C., Delrot, S., & Lauvergeat, V. (2011). Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2465-2483. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq442>
- Hinman, R., & Lang, J. (1965). Peroxidase-catalyzed Oxidation of Indole-3-acetic Acid *. *Biochemistry*, 4(1), 144-158. <https://doi.org/10.1021/bi00877a023>
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce061>
- Hoekstra, F., & Nijssen, J. (2002). What do we really know about desiccation tolerance mechanisms?. In G. Nicolás, K. Bradford, D. Come & H. Pritchard (eds.), *The Biology of Seeds* (2 ed., pp. 259-270). CABI Publishing.
- Hungria, M., & Stacey, G. (1997). Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: Basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5-6), 819-830. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00239-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00239-8)
- HYDE, E. (1954). The Function of the Hilum in Some Papilionaceae in Relation to the Ripening of the Seed and the Permeability of the Testa. *Annals of Botany*, 18(2), 241-256. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083393>
- Jiang, L., & Kermode, A. (1994). Role of desiccation in the termination of expression of genes for storage proteins. *Seed Science Research*, 4(2), 149-173. <https://doi.org/10.1017/S0960258500002154>

- Jurgens, G. (2001). NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: Apical-basal pattern formation in Arabidopsis embryogenesis. *The EMBO Journal*, 20(14), 3609-3616. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3609>
- Kaplan, D., & Cooke, T. (1996). THE GENIUS OF WILHELM HOFMEISTER: THEORIGIN OF CAUSAL-ANALYTICAL RESEARCH IN LANT DEVELOPMENT: the origin of causal-analytical research in plant development. *American Journal of Botany*, 83(12), 1650. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb12823.x>
- Karel, M. (1980). Lipid Oxidation, Secondary Reactions, and Water Activity of Foods. In M. Simic & M. Karel (eds.), *Autoxidation in Food and Biological Systems* (1 ed., pp. 191-206). Springer New York, NY.
- Karssen, C., Brinkhorst-van der Swan, D., Breekland, A., & Koornneef, M. (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Planta*, 157(2), 158-165. <https://doi.org/10.1007/BF00393650>
- Khatami, S., Vakili, O., Movahedpour, A., Ghesmati, Z., Ghasemi, H., & Taheri-Anganeh, M. (2022). Laccase: Various types and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(6), 2658-2672. <https://doi.org/10.1002/bab.2313>
- Kim, Y., & Huh, G. (2019). Overexpression of cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from sweetpotato enhances oxidative stress tolerance in transgenic Arabidopsis. *In Vitro Cell.Dev.Biol*, 55(2), 172-179. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-09951-5>
- Knowles, W., Anderson, K., Andrew, S., Phillion, D., Ream, J., Johnson, K., & Sikorski, J. (1993). Synthesis & characterization of N-amino-glyphosate as a potent analog inhibitor of E. coli EPSP synthase. *Bioorganic a Medicinal Chemistry Letters*, 3(12), 2863-2868. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80780-0](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80780-0)
- Koeduka, T., Sugimoto, K., Watanabe, B., Someya, N., Kawanishi, D., Gotoh, T., Ozawa, R., Takabayashi, J., Matsui, K., Hiratake, J., & Pichersky, E. (2014). Bioactivity of natural O -prenylated phenylpropenes from Ilicium anisatum leaves and their derivatives against spider mites and fungal pathogens. *Plant Biology*, 16(2), 451-456. <https://doi.org/10.1111/plb.12054>
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2)
- Kucera, B., Cohn, M., & Leubner-Metzger, G. (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15(4), 281-307. <https://doi.org/10.1079/SSR2005218>
- KURT, F., & FILİZ, E. (2019). Bioinformatical Analyses of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) proteins from higher plant species. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 26-38. <https://doi.org/10.17798/bitlisfen.462778>
- KYSELÁKOVÁ, H., SEDLÁŘOVÁ, M., KUBALA, M., NOŽKOVÁ, V., PITERKOVÁ, J., LUHOVÁ, L., NOVÁK, O., & ILÍK, P. (2013). Reactive oxygen and nitrogen species and hormone signalling in systemic infection of pea by Pea enation mosaic virus. *Plant Protection Science*, 49(3), 105-119. <https://doi.org/10.17221/51/2012-PPS>
- Lackey, J. (1981). Systematic Significance of the Epihilum in Phaseoleae (Fabaceae, Faboideae). *Botanical Gazette*, 142(1), 160-164. <https://doi.org/10.1086/337207>
- Lane, B., Dunwell, J., Ray, J., Schmitt, M., & Cuming, A. (1993). Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12239-12242. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31377-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31377-2)
- Lanfermeijer, F., van Oene, M., & Borstlap, A. (1992). Compartmental analysis of amino-acid release from attached and detached pea seed coats. *Planta*, 187(1), 75-82. <https://doi.org/10.1007/BF00201626>
- Lapierre, C., Pilate, G., Pollet, B., Mila, I., Leplé, J., Jouanin, L., Kim, H., & Ralph, J. (2004). Signatures of cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in poplar lignins. *Phytochemistry*, 65(3), 313-321. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.11.007>
- Lattanzio, V., Terzano, R., Cicco, N., Cardinali, A., Venere, D., & Linsalata, V. (2005). Seed coat tannins and bruchid resistance in stored cowpea seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(5), 839-846. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2024>

- Lee, D., Ellard, M., Wanner, L., Davis, K., & Douglas, C. (1995). The *Arabidopsis thaliana* 4-coumarate: CoA ligase (4CL) gene. *Plant Molecular Biology*, 28(5), 871-884. <https://doi.org/10.1007/BF00042072>
- Leprince, O., Harren, F., Buitink, J., Alberda, M., & Hoekstra, F. (2000). Metabolic Dysfunction and Unabated Respiration Precede the Loss of Membrane Integrity during Dehydration of Germinating Radicles. *Plant Physiology*, 122(2), 597-608. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.597>
- Lerman, J., & Cigliano, E. (1971). New Carbon-14 Evidence for Six Hundred Years Old *Canna compacta* Seed. *Nature*, 232(5312), 568-570. <https://doi.org/10.1038/232568a0>
- Lersten, N., & Gunn, C. (1981). Seed Morphology and Testa Topography in *Cicer* (Fabaceae: Faboideae). *Systematic Botany*, 6(3), 223-230. <https://doi.org/10.2307/2418283>
- Lewis, N., & Davin, L. (1994). Evolution of Lignan and Neolignan Biochemical Pathways. *Isopentenoids and Other Natural Products*, 562(), 202-246. <https://doi.org/10.1021/bk-1994-0562.ch010>
- Lewis, N., & Yamamoto, E. (1990). Lignin: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41(1), 455-496. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.41.060190.002323>
- Li, J., Ou-Lee, T., Raba, R., Amundson, R., & Last, R. (1993). *Arabidopsis* Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *The Plant Cell*, 5(2). <https://doi.org/10.2307/3869583>
- Liszczay, 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(4), 658-667. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1028-1>
- Lush, W., & Evans, L. (1980). The seed coats of cowpeas and other grain legumes: Structure in relation to function. *Field Crops Research*, 3(1), 267-286. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(80\)90034-9](https://doi.org/10.1016/0378-4290(80)90034-9)
- Mallikarjuna, N., Kranthi, K., Jadhav, D., Kranthi, S., & Chandra, S. (2004). Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *Journal of Applied Entomology*, 128(5), 321-328. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00834.x>
- Mason, H., Fowls, W., & Peterson, E. (1955). OXYGEN TRANSFER AND ELECTRON TRANSPORT BY THE PHENOLASE COMPLEX 1. *Journal of the American Chemical Society*, 77(10), 2914-2915. <https://doi.org/10.1021/ja01615a088>
- Mauseth, J. (2014). *Botany: an introduction to plant biology*. Jones & Bartlett Learning.
- Mayer, A. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318-2331. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.006>
- McCormick, S. (2004). Control of Male Gametophyte Development. *THE PLANT CELL ONLINE*, 16(1), S142-S153. <https://doi.org/10.1105/tpc.016659>
- McKie, J., Jaouhari, R., Douglas, K., Goffner, D., Feuillet, C., Grima-Pettenati, J., Boudet, A., Baltas, M., & Gorrichon, L. (1993). A molecular model for cinnamyl alcohol dehydrogenase, a plant aromatic alcohol dehydrogenase involved in lignification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1202(1), 61-69. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90063-W](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90063-W)
- Miller, S., Jin, Z., Schnell, J., Romero, M., Brown, D., & Johnson, D. (2010). Hourglass cell development in the soybean seed coat. *Annals of Botany*, 106(2), 235-242. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq101>
- Miranda, M., Borisjuk, L., Tewes, A., Heim, U., Sauer, N., Wobus, U., & Weber, H. (2001). Amino acid permeases in developing seeds of *Vicia faba* L: expression precedes storage protein synthesis and is regulated by amino acid supply. *The Plant Journal*, 28(1), 61-71. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01129.x>
- Mittler, R., & Blumwald, E. (2015). The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation. *The Plant Cell*, 27(1), 64-70. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133090>
- Mittler, R., & Zilinskas, B. (1994). Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *The Plant Journal*, 5(3), 397-405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1994.00397.x>

- Müller, K., Linkies, A., Vreeburg, R., Fry, S., Krieger-Liszkay, A., & Leubner-Metzger, G. (2009). In Vivo Cell Wall Loosening by Hydroxyl Radicals during Cress Seed Germination and Elongation Growth. *Plant Physiology*, 150(4), 1855-1865. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139204>
- Muralidhara, B., Reddy, Y., Srilatha, V., & Akshitha, H. (2015). Effect of Seed Coat Removal Treatments on Seed Germination and Seedling Attributes in Mango Varieties. *International Journal of Fruit Science*, 16(1), 1-9. <https://doi.org/10.1080/15538362.2015.1021885>
- Ng, H., Gondo, T., Yamada, T., Tanaka, H., & Akashi, R. (2024). The expression of lignin biosynthesis genes during plant development and effects of downregulated cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) gene in bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé). *Grassland Science*, 70(2), 67-76. <https://doi.org/10.1111/grs.12419>
- Nordling, E., Persson, B., & Jörnvall, H. (2002). Differential multiplicity of MDR alcohol dehydrogenases: enzyme genes in the human genome versus those in organisms initially studied. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 59(6), 1070-1075. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8487-6>
- Nordling, E., Jörnvall, H., & Persson, B. (2002). Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). *European Journal of Biochemistry*, 269(17), 4267-4276. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03114.x>
- Ohto, M., Stone, S., & Harada, J. (2007). Geneti control of seed development and seed mass. In K. Bradford & H. Nonogaki (eds.), *Seed development, Dormancy and Germination* (27 ed., pp. 1-24). Blackwell publishing Ltd.
- O'Malley, D., Porter, S., & Sederoff, R. (1992). Purification, Characterization, and Cloning of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase in Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Physiology*, 98(4), 1364-1371. <https://doi.org/10.1104/pp.98.4.1364>
- Oracz, K., Bouteau, H., Farrant, J., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., Job, D., Corbineau, F., & Bailly, C. (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *The Plant Journal*, 50(3), 452-465. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03063.x>
- Ozga, J., van Huizen, R., & Reinecke, D. (2002). Hormone and Seed-Specific Regulation of Pea Fruit Growth. *Plant Physiology*, 128(4), 1379-1389. <https://doi.org/10.1104/pp.010800>
- Paech, K. (1950). *Biochemie und Physiologie der Sekundären Pflanzenstoffe* (1 ed.). Springer-Verlag. https://books.google.cz/books?hl=sk&lr=&id=HYWABwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Biochemie+und+Physiologie+der+Sekund%C3%A4ren+Pflanzenstoffe&ots=HfRjNnWtLR&sig=ZBUiTPDIn5KUxiVIMuCr7d0urvU&redir_esc=y#v=onepage&q=Biochemie%20und%20Physiologie%20der%20Sekund%C3%A4ren%20Pflanzenstoffe&f=false
- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., & Dunand, C. (2004). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants☆☆☆. *Phytochemistry*, 65(13), 1879-1893. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.06.023>
- Passardi, F., Zamocky, M., Favet, J., Jakopitsch, C., Penel, C., Obinger, C., & Dunand, C. (2007). Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: Are there patches of order in chaos?: Are there patches of order in chaos?. *Gene*, 397(1-2), 101-113. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.016>
- Passardi, F., Penel, C., & Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9(11), 534-540. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.09.002>
- Patrick, J. (1997). PHLOEM UNLOADING: Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), 191-222. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.191>
- Patrick, J., & Offler, C. (1995). Post-Sieve Element Transport of Sucrose in Developing Seeds. *Functional Plant Biology*, 22(4), 681 - 702. <https://doi.org/10.1071/PP9950681>
- Pérez-Gilabert, M., & García Carmona, F. (2000). Characterization of Catecholase and Cresolase Activities of Eggplant Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 695-700. <https://doi.org/10.1021/jf990292r>

- Pourcel, L., Routaboul, J., Cheynier, V., Lepinec, L., & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, *12*(1), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.006>
- Prestrelski, S., Tedeschi, N., Arakawa, T., & Carpenter, J. (1993). Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal*, *65*(2), 661-671. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81120-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81120-2)
- Puntarulo, S., Sánchez, R., & Boveris, A. (1988). Hydrogen Peroxide Metabolism in Soybean Embryonic Axes at the Onset of Germination. *Plant Physiology*, *86*(2), 626-630. <https://doi.org/10.1104/pp.86.2.626>
- Ralph, J., Lapierre, C., Marita, J., Kim, H., Lu, F., Hatfield, R., Ralph, S., Chapple, C., Franke, R., Hemm, M., Van Doorselaere, J., Sederoff, R., O'Malley, D., Scott, J., MacKay, J., Yahiaoui, N., Boudet, A., Pean, M., Pilate, G. et al. (2001). Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry*, *57*(6), 993-1003. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00109-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00109-1)
- Raven, P., Evert, R., & Eichhorn, S. (2013). *Raven biology of plants* (8th ed). W.H. Freeman and Company.
- Raz, V., Bergervoet, J., & Koornneef, M. (2001). Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. *Development*, *128*(2), 243-252. <https://doi.org/10.1242/dev.128.2.243>
- Riley, P. (1997). Melanin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *29*(11), 1235-1239. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00013-7)
- Roberts, J., DeSimone, N., Lingle, W., & Dure, L. (1993). Cellular Concentrations and Uniformity of Cell-Type Accumulation of Two Lea Proteins in Cotton Embryos. *The Plant Cell*, *5*(7), 769-780. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.7.769>
- Rodríguez-López, J., Tudela, J., Varón, R., García-Carmona, F., & García-Cánovas, F. (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(6), 3801-3810. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50597-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50597-X)
- Rochat, C., & Boutin, J. (1991). Metabolism of Phloem-borne Amino Acids in Maternal Tissues2 *Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany*, *42*(2), 207-214. <https://doi.org/10.1093/jxb/42.2.207>
- Rolletschek, H., Borisjuk, L., Radchuk, R., Miranda, M., Heim, U., Wobus, U., & Weber, H. (2004). Seed-specific expression of a bacterial phosphoenolpyruvate carboxylase in *Vicia narbonensis* increases protein content and improves carbon economy. *Plant Biotechnology Journal*, *2*(3), 211-219. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00064.x>
- Rotilio, G., Falcioni, G., Fioretti, E., & Brunoir, M. (1975). Decay of oxyperoxidase and oxygen radicals; a possible role for myeloperoxidase. *Biochemical Journal*, *2*(145), 405-407. <https://doi.org/10.1042/bj1450405>
- Sagi, M., & Fluhr, R. (2001). Superoxide Production by Plant Homologues of the gp91phox NADPH Oxidase. Modulation of Activity by Calcium and by Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiology*, *126*(3), 1281-1290. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1281>
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T., & Fernie, A. (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity. *Plant Physiology and Biochemistry*, *72*(1), 21-34. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.001>
- Sawada, Y., & Yamazaki, I. (1973). One-electron transfer reactions in biochemical systems. VIII. Kinetic study of superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, *327*(2), 257-265. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(73\)90408-7](https://doi.org/10.1016/0005-2744(73)90408-7)
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, *30*(12), 3875-3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
- Serrato-Valenti, G., Ferro, M., & Modenesi, P. (1990). Structural and Histochemical Changes in Palisade Cells of *Prosopis juliflora* Seed Coat in Relation to its Water Permeability. *Annals of Botany*, *65*(5), 529-532. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087965>
- Shaw, R., & Loomis, W. (1950). BASES FOR THE PREDICTION OF CORN YIELDS. *Plant Physiology*, *25*(2), 225-244. <https://doi.org/10.1104/pp.25.2.225>

- Shirley, B., Kubasek, W., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausubel, F., & Goodman, H. (1995). Analysis of Arabidopsis mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*, 8(5), 659-671. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.08050659.x>
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants Part A*, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., & Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Smýkal, P., Vernoud, V., Blair, M., Soukup, A., & Thompson, R. (2014). The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science*, 5(1), /. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00351>
- Sokolenko, A., Fulgosi, H., Gal, A., Altschmied, L., Ohad, I., & Herrmann, R. (1995). The 64 kDa polypeptide of spinach may not be the LHCII kinase, but a lumen-located polyphenol oxidase. *FEBS Letters*, 371(2), 176-180. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00892-D](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00892-D)
- Solomon, E., Sundaram, U., & Machonkin, T. (1996). Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*, 96(7), 2563-2606. <https://doi.org/10.1021/cr950046o>
- Stafford, H. (1990). *Flavonoid metabolism* (1. vydanie). CRC Press, Inc.
- Stamm, P., Topham, A., Mukhtar, N., Jackson, M., Tomé, D., Beynon, J., & Bassel, G. (2017). The Transcription Factor ATHB5 Affects GA-Mediated Plasticity in Hypocotyl Cell Growth during Seed Germination. *Plant Physiology*, 173(1), 907-917. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01099>
- Steeves, T. (1983). The evolution and biological significance of seeds. *Canadian Journal of Botany*, 61(12), 3550-3560. <https://doi.org/10.1139/b83-404>
- Sterjiades, R., Dean, J., Gamble, G., Himmelsbach, D., & Eriksson, K. (1993). Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell-suspension cultures. *Planta*, 190(1), 75-87. <https://doi.org/10.1007/BF00195678>
- Subramanian, S., Stacey, G., & Yu, O. (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal*, 48(2), 261-273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02874.x>
- Swain, S., Ross, J., Reid, J., & Kamiya, Y. (1995). Gibberellins and pea seed development. *Planta*, 195(3), 426-433. <https://doi.org/10.1007/BF00202601>
- Swamy, B. (1943). EMBRYOLOGY OF ORCHIDACEÆ. *Current Science*, 12(1), 13-17.
- Tams, J., & Welinder, K. (1995). Mild Chemical Deglycosylation of Horseradish Peroxidase Yields a Fully Active, Homogeneous Enzyme. *Analytical Biochemistry*, 228(1), 48-55. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1313>
- Tan-Wilson, A., & Wilson, K. (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 140-153. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01535.x>
- Tegeder, M., Wang, X., Frommer, W., Offler, C., & Patrick, J. (1999). Sucrose transport into developing seeds of *Pisum sativum* L. *The Plant Journal*, 18(2), 151-161. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00439.x>
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., & Simon, P. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 288(1-2), 129-138. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00465-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00465-1)
- Troszyńska, A., & Ciska, E. (2002). Phenolic compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and their total antioxidant activity. *Czech Journal of Food Sciences*, 20(1), 15-22. <https://doi.org/10.17221/3504-CJFS>
- Tsaniklidis, G., Chatzistathis, T., Fanourakis, D., Nikoloudakis, N., Kotsiras, A., Delis, C., & Tzortzakakis, E. (2021). Leaf antioxidant machinery stimulation by *Meloidogyne javanica* infestation: A case study on *Cucumis melo* seedlings. *Plant Stress*, 1. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100002>
- Valério, L., De Meyer, M., Penel, C., & Dunand, C. (2004). Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry*, 65(10), 1331-1342. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.017>

- VAN DONGEN, J. (2003). Structure of the Developing Pea Seed Coat and the Post-phloem Transport Pathway of Nutrients. *Annals of Botany*, 91(6), 729-737. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg066>
- Vinter, V., & Macháčková, P. (2013). *Přehled morfologie cévnatých rostlin: studijní opora e-learningových vzdělávacích modulů projektu BOTASKA* (1. vyd). Univerzita Palackého v Olomouci.
- Vitale, A., & Bollini, R. (1955). Legume Storage Proteins. In J. Kigel, *Seed Development and Germination* (1 ed., p. 30). M. Dekker.
- Walker, J., & Ferrar, P. (1998). Diphenol Oxidases, Enzyme-catalysed Browning and Plant Disease Resistance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 15(1), 457-498. <https://doi.org/10.1080/02648725.1998.10647966>
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A., Crosby, W., & Fowke, L. (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(4), 501-510. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00231.x>
- Wang, T., & Hedley, C., Casey, R., Davies, D. (1993). Peas: genetics, molecular biology and biotechnology. In *Genetic and developmental analysis of the seed*. (1 ed., pp. 83-120). CAB International.
- Wariishi, H., Valli, K., & Gold, M. (1991). In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176(1), 269-275. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)90919-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)90919-X)
- Watanabe, L., de Moura, P., Bleicher, L., Nascimento, A., Zamorano, L., Calvete, J., Sanz, L., Pérez, A., Bursakov, S., Roig, M., Shnyrov, V., & Polikarpov, I. (2010). Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). *Journal of Structural Biology*, 169(2), 226-242. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.10.009>
- Weber, H., Borisjuk, L., & Wobus, U. (2005). MOLECULAR PHYSIOLOGY OF LEGUME SEED DEVELOPMENT. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 253-279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144201>
- 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(11), 1835-1846. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.11.1835>
- Weber, H., Buchner, P., Borisjuk, L., & Wobus, U. (1996). Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development. *The Plant Journal*, 9(6), 841-850. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9060841.x>
- Welinder, K. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2(3), 388-393. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(92\)90230-5](https://doi.org/10.1016/0959-440X(92)90230-5)
- Welinder, K., Justesen, A., Kjærsgård, I., Jensen, R., Rasmussen, S., Jespersen, H., & Duroux, L. (2002). Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*, 269(24), 6063-6081. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03311.x>
- Whetten, R., & Sederoff, R. (1991). Genetic engineering of wood. *Forest Ecology and Management*, 43(3-4), 301-316. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(91\)90133-G](https://doi.org/10.1016/0378-1127(91)90133-G)
- Whitaker, J. (2013). Polyphenol Oxidase. In D. Wong, *Food Enzymes - Structure and Mechanism* (1 ed., pp. 271-307). Springer New York, NY. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-2349-6_9#citeas
- Whitaker, J., Voragen, A., & Wong, D. (eds.). (2002). *Handbook of Food Enzymology* (1 ed.). CRC Press. [https://books.google.cz/books?hl=sk&lr=&id=v0qyDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=E.C.+Ram%C4%B1%C2%B4rez,+J.R.+Whitaker,+V.M.+Virador,+in:+J.R.+Whitaker,+A.G.J.+Voragen,+D.W.S.+Wong+\(Eds.\),+Handbook+of+Food+Enzymology,+Marcel+Dekker,+Inc.,](https://books.google.cz/books?hl=sk&lr=&id=v0qyDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=E.C.+Ram%C4%B1%C2%B4rez,+J.R.+Whitaker,+V.M.+Virador,+in:+J.R.+Whitaker,+A.G.J.+Voragen,+D.W.S.+Wong+(Eds.),+Handbook+of+Food+Enzymology,+Marcel+Dekker,+Inc.,)

- +New+York,+2003,+pp.+509%E2%80%93523.&ots=NFtB5ZyQSI&sig=PJXfsmDbjvp6FKtGzclIXXKJnEA&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Wobus, U., & Weber, H. (1999). Sugars as Signal Molecules in Plant Seed Development. *Biological Chemistry*, 380(7-8), 937-944. <https://doi.org/10.1515/BC.1999.116>
- Zablazková, L., Balarynová, J., Klčová, B., Kopecký, P., & Smýkal, P. (2021). Anatomy and Histochemistry of Seed Coat Development of Wild (*Pisum sativum* subsp. *elatius* (M. Bieb.) Asch. et Graebn. and Domesticated Pea (*Pisum sativum* subsp. *sativum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094602>
- Zámocký, M. (2004). Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. *European Journal of Biochemistry*, 271(16), 3297-3309. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04262.x>
- Zámocký, M., Hofbauer, S., Schaffner, I., Gasselhuber, B., Nicolussi, A., Soudi, M., Pirker, K., Furtmüller, P., & Obinger, C. (2015). Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 574, 108-119. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.025>
- Zamorano, L., Pina, D., Arellano, J., Bursakov, S., Zhadan, A., Calvete, J., Sanz, L., Nielsen, P., Villar, E., Gavel, O., Roig, M., Watanabe, L., Polikarpov, I., & Shnyrov, V. (2008). Thermodynamic characterization of the palm tree *Roystonea regia* peroxidase stability. *Biochimie*, 90(11-12), 1737-1749. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.07.010>
- Zhang, H., He, D., Li, M., & Yang, P. (2017). Carbonylated protein changes between active germinated embryos and quiescent embryos give insights into rice seed germination regulation. *Plant Growth Regulation*, 83(2), 335-350. <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0299-7>
- Zhang, K., Qian, Q., Huang, Z., Wang, Y., Li, M., Hong, L., Zeng, D., Gu, M., Chu, C., & Cheng, Z. (2006). GOLD HULL AND INTERNODE2 Encodes a Primarily Multifunctional Cinnamyl-Alcohol Dehydrogenase in Rice. *Plant Physiology*, 140(3), 972-983. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073007>
- Zhang, S. (2023). Recent Advances of Polyphenol Oxidases in Plants. *Molecules*, 28(5), /. <https://doi.org/10.3390/molecules28052158>
- Zhang, X., & Liu, C. (2015). Multifaceted Regulations of Gateway Enzyme Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Biosynthesis of Phenylpropanoids. *Molecular Plant*, 8(1), 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.001>
- Zhu, D., Zhang, P., Xie, C., Zhang, W., Sun, J., Qian, W., & Yang, B. (2017). Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0735-y>

6 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

4CL	4-kumarát-CoA ligáza
ABA	kyselina abscisová
APS	persíran amónny
BCA	bicinchonínová metóda
C4H	cinamát-4-hydroxyláza
CAD	cinnamylalkoholdehydrogenáza
CO	katecholoxidáza
CoA	koenzým A
FW	čerstvá hmotnosť
LAC	lakáza
LEA	Late Embryogenesis Abundant
PAL	fenylalanínamoniaklyáza
PAs	proantokyanidíny
POX	peroxidáza
PPO	polyfenoloxidáza
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
ROS	reaktívne formy kyslíku
TYR	tyrozináza