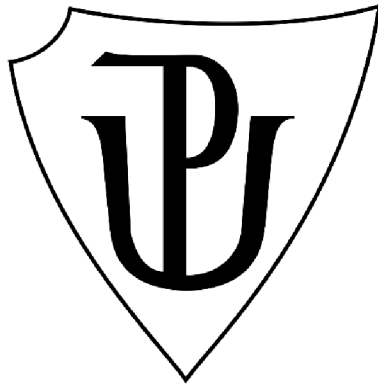


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Analýza metabolitů a aktivit enzymů zapojených do
metabolismu reaktivních forem kyslíku v semenech
planých a kulturních genotypů hrachu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Pavlína Žárská
Studijní program:	N0512A130009 - Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Konzultantka:	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
Rok:	2023

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

V Olomouci dne 25.4.2023

Bc. Pavlína Žárská

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce Mgr. Janě Sekaninové, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení, rady a pomoc při zpracování teoretické i experimentální části této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Balarynové, Ph.D. za poskytnutí rostlinného materiálu a odborné konzultace k vypracování botanických témat v teoretické části práce, dále také za spolupráci v rámci experimentální části. A v neposlední řadě paní doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za cenné rady ke zpracování diplomové práce.

Také bych chtěla poděkovat mé rodině za všestrannou podporu při studiu a vypracování předložené diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Pavlína Žárská
Název práce	Analýza metabolitů a aktivit enzymů zapojených do metabolismu reaktivních forem kyslíku v semenech planých a kulturních genotypů hrachu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Konzultantka	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou molekuly odvozené od kyslíku, přirozeně vznikající v rámci metabolismu. Jsou signálními molekulami, podílejí se na regulaci řady důležitých dějů, ale ve vyšších koncentracích působí toxicky. Aby byla zajištěna redoxní rovnováha a správná funkce biologických systémů v rostlinách, a tedy i semenech, musí být přítomny mechanismy, které se podílejí na regulaci koncentrace ROS. Tyto obranné mechanismy zahrnují antioxidanty, látky enzymové i neenzymové povahy.

Cílem diplomové práce byla analýza antioxidantů a antioxidantních enzymů zapojených v metabolismu ROS v průběhu vývoje semen kulturních (Cameor, JI92) a planých (JI64, JI1794) genotypů hrachu. Studovanými parametry byla celková antioxidantní kapacita, koncentrace fenolů, flavonoidů, aktivita polyfenoloxidas (PPO), peroxidasy (POX), askorbátperoxidasy (APX) a katalasy (CAT). Dále byla měřena exprese genu *PPO* a bylo provedeno histochemické stanovení aktivity PPO, POX a ROS v osemení studovaných genotypů.

V rámci experimentální části DP byly prokázány změny v obsahu antioxidantů a aktivit antioxidantních enzymů zapojených v metabolismu ROS, ke kterým dochází v průběhu vývoje semen planých a kulturních genotypů hrachu. Z výsledků provedených experimentů a porovnání jednotlivých parametrů mezi jednotlivými genotypy, vývojovými stádii a mezi osemením a embryem vyplývá výrazná odlišnost semen genotypu Cameor od semen ostatních genotypů (JI92, JI64, JI1794). V semenech genotypu Cameor byla výrazně nižší koncentrace neenzymových antioxidantů, velmi nízká aktivita PPO, ale naopak aktivity antioxidantních enzymů byly v porovnání s ostatními genotypy výrazně vyšší. Byl tak potvrzen předpoklad rozdílného zapojení studovaných parametrů ve vývoji osemení jednotlivých genotypů, které korelovalo s pigmentací osemení. Bylo potvrzeno, že v průběhu vývoje semen planých a kulturních genotypů hrachu dochází ke změnám v obsahu antioxidantů a aktivit antioxidantních enzymů zapojených v metabolismu ROS.

Klíčová slova	Reaktivní formy kyslíku, hrách, osemení, embryo, antioxidantní kapacita, antioxidantní enzymy, vývoj semene
Počet stran	97
Počet příloh	1
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Pavlína Žárská
Title	Analysis of metabolites and enzyme activities involved in the metabolism of reactive oxygen species in seeds of wild and cultivated pea
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Consultant	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are molecules derived from oxygen, naturally occurring as part of metabolism. They are signal molecules, they participate in the regulation of a number of important events, but in higher concentrations they are toxic. In order to ensure redox balance and proper functioning of biological systems in plants, and thus also in seeds, mechanisms involved in the regulation of ROS concentration must be present. These defense mechanisms include antioxidants, substances of enzymatic and non-enzymatic nature.

The aim of the thesis was the analysis of antioxidants and antioxidant enzymes involved in ROS metabolism during seed development of cultivated (Cameor, JI92) and wild (JI64, JI1794) pea genotypes. The studied parameters were total antioxidant capacity, concentration of phenols, flavonoids, activity of polyphenoloxidase (PPO), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT). Furthermore, the expression of the *PPO* gene was measured and histochemical determination of PPO, POX and ROS activity was performed in the seedcoat of the studied genotypes.

Within the experimental part of the thesis, changes in the content of antioxidants and the activities of antioxidant enzymes involved in ROS metabolism, which occur during the development of seeds of wild and cultured pea genotypes, were demonstrated. From the results of the experiments and the comparison of individual parameters between individual genotypes, developmental stages and between seedcoat and embryo, there is a significant difference between the seeds of the Cameor genotype and the seeds of the other genotypes (JI92, JI64, JI1794). In the seeds of the Cameor genotype, the concentration of non-enzymatic antioxidants was significantly lower, the activity of PPO was very low, but on the contrary, the activities of antioxidant enzymes were significantly higher compared to the other genotypes. Thus, the assumption of different involvement of the studied parameters in the development of the seedcoat of individual genotypes, which was correlated with the pigmentation of the seedcoat, was confirmed. It was confirmed that during the development of seeds of wild and cultured pea genotypes there are changes in the content of antioxidants and activities of antioxidant enzymes involved in ROS metabolism.

Keywords	Reactive oxygen species, pea, seed coat, embryo, antioxidant capacity, antioxidant enzymes, seed development
----------	--

Number of pages	97
Number of appendices	1
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	3
2.1 Semena planých a kulturních hrachů.....	3
2.1.1 Vývoj semen.....	7
2.1.2 Změny metabolismu v průběhu vývoje semen.....	11
2.2 Reaktivní formy kyslíku.....	13
2.2.1 Funkce reaktivních forem kyslíku v rostlinách.....	15
2.2.2 Produkce reaktivních forem kyslíku v semenech.....	16
2.2.3 Význam ROS při dormanci a klíčení.....	17
2.3 Antioxidační ochrana semen.....	20
2.3.1 Neenzymové antioxidanty.....	21
2.3.2 Enzymové antioxidanty.....	24
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1 Použité chemikálie.....	27
3.2 Přístroje a vybavení.....	28
3.3 Rostlinný materiál.....	29
3.4 Metody.....	31
3.4.1 Extrakce antioxidantů, fenolů a flavonoidů z osemení a embryí hrachu.....	31
3.4.2 Celková antioxidační kapacita.....	31
3.4.3 Celková koncentrace fenolů.....	32
3.4.4 Koncentrace celkových flavonoidů.....	32
3.4.5 Vyhodnocení celkové antioxidační kapacity, koncentrace fenolů a flavonoidů.....	33
3.4.6 Extrakce studovaných enzymů.....	33
3.4.7 Stanovení aktivity polyfenoloxidas (PPO).....	33
3.4.8 Stanovení aktivity peroxidasy (POX).....	34
3.4.9 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy (APX).....	34
3.4.10 Vyhodnocení aktivit enzymů.....	35
3.4.11 Histochemická lokalizace aktivity PPO a POX.....	36
3.4.12 Histochemická lokalizace ROS.....	36
3.4.13 Expresí genu PPO.....	37

3.4.14	Statistické vyhodnocení dat	39
4	VÝSLEDKY	40
4.1	Celková antioxidační kapacita	40
4.2	Koncentrace celkových fenolů.....	41
4.3	Koncentrace celkových flavonoidů	42
4.4	Aktivita PPO.....	43
4.5	Aktivita POX	44
4.6	Aktivita APX	45
4.7	Aktivita CAT	46
4.8	Genová exprese PPO.....	47
4.9	Histochemická lokalizace aktivity POX	49
4.10	Histochemická lokalizace aktivity PPO.....	52
4.1	Histochemická lokalizace reaktivních forem kyslíku (ROS).....	57
5	DISKUSE	62
6	ZÁVĚR.....	70
7	LITERATURA	72
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	80
	PŘÍLOHY	81

Cíle práce:

Teoretická část:

- Vypracování literární rešerše na zadané téma s klíčovými slovy: reaktivní formy kyslíku, hrách, osemení, embryo, antioxidační kapacita, antioxidační enzymy, vývoj semene.

Experimentální část:

- Sledované parametry stanovit v osemení i embryu semen kulturních a planých genotypů hrachu v různých vývojových stádiích.
- Stanovit aktivitu antioxidačních enzymů (katalasa, peroxidasa, askorbátperoxidasa, polyfenoloxidasa).
- Změřit antioxidační kapacitu a koncentraci flavonoidů a fenolických látek.
- Histochemicky lokalizovat produkci reaktivních forem kyslíku, aktivitu polyfenoloxidas a peroxidasy.

1 ÚVOD

Hrách setý je hojně pěstovaná kulturní plodina, jejíž semena jsou díky svému vysokému obsahu proteinů využívána hlavně jako potravina a krmivo pro zvířata. V průběhu domestikace původních planých druhů došlo k optimalizaci výnosu, zvětšování semen a snížení míry dormance, tak aby semena klíčila v co nejkratším časovém období. Jedním z hlavních rozdílů mezi planými a kulturními genotypy je právě dormance. Dormance je jev, který umožňuje semeni přežít i za nepříznivých podmínek až do doby, kdy jsou podmínky pro klíčení ideální. Semena po ukončení vývoje vysychají a dochází k výraznému zpomalení metabolismu, který je obnoven až po zpětném příjmu vody semenem. U hrachu a dalších luskovin je typická dormance fyzikální, kdy vzniká tvrdé pro vodu nepropustné osemení, proto záleží na jeho složení a struktuře. Tyto vlastnosti osemení jsou tak považovány za jedny z hlavních faktorů, které mají vliv na to, zda je semeno dormantní, nebo ne.

Vývoj semen je geneticky naprogramovaný proces doprovázený řadou změn. Zahájení vývoje, následné dozrávání semene a ukládání zásobních látek spouští velmi komplexní regulační síť, jejíž součástí jsou změny transkripční, metabolické i fyziologické, řízené změnami hladin sacharidů a regulované hormonálními dráhami. Na regulaci vývoje se mimo jiné podílí také reaktivní formy kyslíku (ROS). ROS jsou molekuly odvozené od kyslíku, které vznikají přirozeně v rámci metabolických pochodů. Plní funkci signálních molekul, které mohou regulovat např. genovou expresi, aktivaci transkripčních faktorů v jádře, účastní se řady enzymových pochodů, mitochondriálního elektronového transportu atd. Ve vyšších koncentracích ale mohou působit toxicky, díky jejich velkému oxidačnímu potenciálu mohou způsobovat oxidaci biomolekul, může docházet ke změnám redoxní signalizace a všechny tyto změny mohou vést k poškození buněk. Aby byla zajištěna redoxní rovnováha a správná funkce biologických systémů v rostlinách, a tedy i semenech, musí být přítomny mechanismy, které se podílejí na regulaci koncentrace ROS. Tyto obranné mechanismy zahrnují antioxidanty. Antioxidanty jsou molekuly enzymové i neenzymové povahy schopné inhibovat nebo zhaset reakce volných radikálů, oddálit nebo zabránit poškození buněk a v nižších koncentracích než potenciální substrát, který by mohl být oxidován, významně zpomalovat nebo bránit jeho oxidaci.

Mezi neenzymové antioxidanty řadíme např. askorbát, glutathion, tokoferoly, karotenoidy a další sekundární metabolity, odvozené např. od fenolických a flavonoidních látek. Mezi antioxidační enzymy řadíme např. katalasu (CAT),

peroxidasu (POX), askorbátperoxidasu (APX) a polyfenoloxidasu (PPO). Porovnáním koncentrací antioxidantů a aktivit antioxidačních enzymů v průběhu vývoje semen v osemení a embryích a porovnáním těchto parametrů mezi semeny kulturních a planých genotypů hrachu, bychom mohli dostat komplexnější pohled na to, do jaké míry jsou ROS zapojeny ve vývoji semen a zda se mohou podílet na vytvoření nepropustnosti osemení, která vede k ustavení dormance v průběhu vývoje semen s fyzikální dormancí.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

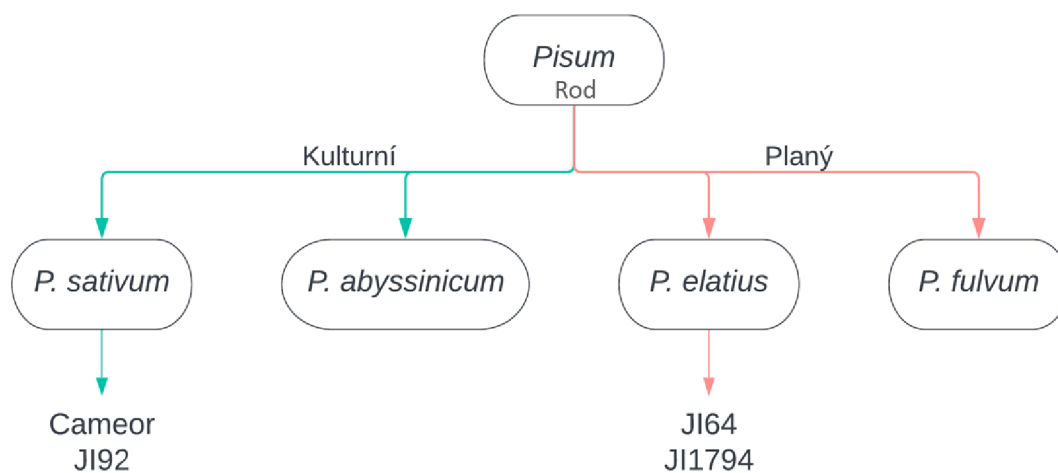
3.1 Semana planých a kulturních hrachů

Hrách setý (*Pisum sativum* L.) je hojně využívaná plodina patřící do čeledi bobovité (*Fabaceae*) pocházející převážně ze Středomoří a oblastí Blízkého východu. Jde o třetí nejpěstovanější luskovinu na světě, jejíž semena s vysokým podílem proteinů se využívají jako potravina a krmivo pro zvířata (Smýkal, 2011). Původní plané druhy byly postupně domestikovány a daly tak vzniknout současným kulturním druhům. V průběhu tohoto procesu docházelo ke změnám jak na genetické úrovni, tak na úrovni fenotypu. Adaptací planých druhů na měnící se podmínky a lidskou selekcí rostlin s požadovanými vlastnostmi došlo k optimalizaci výnosu, snížení míry dormance, ale také například ke zvětšování semen (Trněný et al., 2018). Jedním z nejvýznamnějších rozdílů mezi planými a kulturními druhy je míra dormance. Plané druhy hrachu se vyznačují tvrdým osemením a vysokou mírou dormance, naopak u kulturních druhů je žádoucí snížení dormance a rychlé klíčení semen.

Dormance je fyziologická adaptace na heterogenitu prostředí. Během dormance je pozastavena přeměna embrya na klíčnou rostlinu, až do doby, kdy jsou podmínky pro růst optimální. Tento jev tak pomáhá předcházet úhynu rostlin a riziku vyhynutí druhu za nepříznivých podmínek (Smýkal et al., 2014). Baskin a Baskin (2004) rozlišují několik typů dormance, dormanci fyziologickou, morfologickou, morfofyziologickou, fyzikální a kombinovanou. Pro morfologickou dormanci je typické nedovyvinuté embryo, které vyžaduje delší čas pro růst a klíčení. Nejběžnější formou dormance je dormance fyziologická, která je regulována hlavně rostlinnými hormony: kyselinou abscisovou (ABA) a gibereliny (GA). Pro bobovité rostliny, a tedy i hrách, je typická dormance fyzikální a vyznačuje se tvorbou pro vodu nepropustného osemení.

Taxonomické členění hrachu je zobrazeno na Obr. 1. Mezi plané druhy hrachu řadíme *P. elatius* M. Bieb. a *P. fulvum* Sibth. & Sm.. Tyto druhy se vyznačují pukavostí lusků a dormancí semen. Osemení planých druhů má většinou drsný povrch a bývá pigmentované (Trněný et al., 2018). Planý hrách *P. elatius* se v přírodě vyskytuje v jižní Evropě, západní Asii s přesahem až do severní Afriky, zatímco jeho příbuzný druh *P. fulvum* označovaný za horský typ pouze na Blízkém východě. Kulturní hrachy patří do druhů *P. sativum* L. a *P. abyssinicum* A. Braun, přičemž *P. abyssinicum* je pěstovaný nebo zplaněný v Etiopii a Jemenu. Druh *P. elatius* je pravděpodobným předchůdcem dnes pěstovaného kulturního hrachu (Smýkal 2011). Kulturní druhy hrachu se vyznačují nepukavostí lusků, absencí dormance semen a většinou tenkým osemením s hladkým povrchem (Trněný et al., 2018).

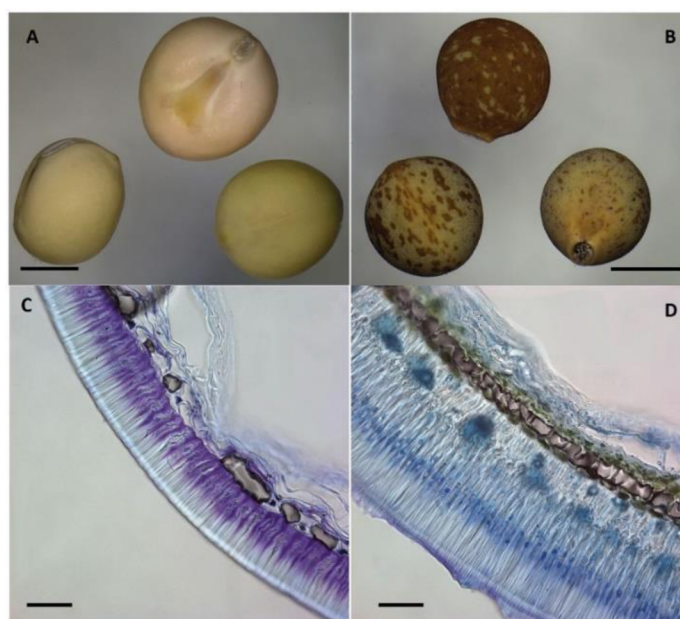
Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu semen 4 genotypů hrachu. Konkrétně se jedná o dva kulturní genotypy Cameor a JI92 (*P. sativum*), a dva plané genotypy JI64 a JI1794 (*P. elatius*) (Obr. 1). Dále v této diplomové práci jsou tyto genotypy označovány pouze jako Cameor, JI92, JI64 a JI1794.



Obr. 1: Schématické zobrazení taxonomie hrachu dle Trněný et al., 2018.

Charakteristiku semen studovaných genotypů jsem vypracovala již v rámci své bakalářské práce, následující text je tedy převzat z Žárská, 2021.





Plané genotypy JI64 a JI1794 vykazují velkou míru dormance (Tab. 1). Semena dormantních genotypů, JI64 a JI1794, a nedormantních genotypů, JI92 a Cameor, se liší ve struktuře osemení (Obr. 2C, D, Hradilová et al., 2017; Záblatzská et al. 2021). Dormantní genotypy JI64 a JI1794 mají znatelně širší osemení s nerovným povrchem (Obr. 2D) (Zablatská et al., 2021), což je spojováno s větší mírou nepropustnosti vody osemením (Miao et al., 2001). Osemení nedormantních genotypů je výrazně tenčí a má hladký povrch (Obr. 2C). Rozdíl v šířce osemení je zapříčiněn hlavně délkou makrosklereid (Zablatská et al., 2021). Světlolomná linie makrosklereid představuje silnou bariéru příjmu vody dormantními semeny hrachu, zatímco u nedormantních semen vstupu vody a zahájení bobtnání nebrání. Procento klíčení u planých neporušených semen dosahuje pouze 2,6-7 %. Semena kulturních genotypů (Cameor, JI92) naopak nasávají vodu, bobtnají, a klíčí během 24 hodin (Hradilová et al., 2017; Jánská et al, 2019).



Obr. 2: Rozdíly v pigmentaci a struktuře osemení kulturního, nedormantního genotypu (Cameor) a planého, dormantního genotypu (JI64) hrachu. A - semeno genotypu Cameor, B - semeno genotypu JI64, C - struktura osemení genotypu Cameor, D - struktura osemení JI64 (převzato ze Smýkal et al., 2014).

Další rozdíly mezi semeny studovaných genotypů jsou v pigmentaci jejich osemení (Obr. 2A, B) a pupku (Tab. 1). Osemení genotypu Cameor není pigmentované (Obr. 2A), zatímco osemení JI92, JI64 (Obr. 2B) a JI1794 je pigmentované. Rovněž pupek může být jak nepigmentovaný (Cameor, JI92), tak pigmentovaný (JI64, JI1794) (Tab. 1) (Zablatská et al., 2021). Předpokládalo se, že pigmentace osemení koreluje s mírou imbibice vody semeny různých druhů luskovin. Tmavé zabarvení osemení během dozrávání je spojováno s nepropustností semene pro vodu, a to i v případě hrachu (Marbach a Mayer, 1974; Werker et al., 1979). Během desikace se v osemení akumulují flavonoidy a jejich oxidací vznikají nerozpustné polymery proanthokyanidiny, které přispívají k nepropustnosti osemení pro vodu a kyslík, tvoří mechanickou bariéru a ochranu proti biotickému a abiotickému stresu (Pourcel et al., 2007). V osemeních dormantních genotypů hrachu byly detekovány vyšší koncentrace proanthokyanidinů (Hradilová et al., 2017) také aktivita, exprese a zastoupení polyfenoloxidas (1,2-benzendiol:kyslíkoxidoreduktasa, PPO, EC 1.10.3.1) (Balarynová et al., 2022). Polyfenoloxidasa katalyzuje o-hydroxylaci monofenolů a difenolů na o-dichinony. O-dichinony jsou velmi reaktivní molekuly, které snadno podléhají neenzymové polymerizaci nebo interagují s proteiny za vzniku vysokomolekulárních melaninových pigmentů (Glagoleva et al., 2020).

Tab. 1: Přehled vlastností semen hrachu genotypů Cameor, JI92, JI64 a JI1794.

Druh	<i>P. sativum</i>		<i>P. elatius</i>	
Genotyp	Cameor	JI92	JI64	JI1794
Kulturní/planý	Kulturní		Planý	
Dormantní/nedormantní	Nedormantní		Dormantní	
Pigmentace osemení	NE	ANO	ANO	
Pigmentace pupku	NE		ANO	
Vzhled				

Semena dormantních a nedormantních genotypů se liší také v chemickém složení osemení. Povrch osemení je pokryt tenkou vrstvou kutikuly, která je tvořena převážně látkami lipidového charakteru. Osemení dormantních genotypů obsahuje větší množství hydroxylovaných mastných kyselin (Hradilová et al, 2017), které pravděpodobně přispívají k vyšší konektivě kutinových hydrofobních komponent, což přispívá k větší stabilitě a nepropustnosti pro vodu (Shao et al., 2007). Osemení nedormantních semen obsahuje více pektinů, méně celulosy a taninů, což vede k jeho větší elasticitě ve srovnání s dormantními genotypy (Jánská et al., 2019). Osemení dormantních genotypů obsahuje vyšší koncentraci hemicelulosy, které přispívá ke snížení hydrofilicity osemení (Mullin & Xu, 2001). Taniny, nebo také proanthokyanidiny, jsou polymerní flavonoidní látky, které se akumulují v buněčných stěnách pigmentovaného osemení zralých semen hrachu (JI92, JI64, JI1794) a přispívají k nepropustnosti osemení pro vodu (Quilichini et al., 2022).

3.1.1 Vývoj semen

Vyvinuté, zralé semeno je esenciální pro reprodukci rostliny. Vývoj semen krytosemenných rostlin začíná dvojitým oplozením, přičemž jedna spermatická haploidní buňka splyne s haploidní vaječnou buňkou a druhá spermatická buňka splývá s centrální buňkou zárodečného vaku. Z vaječné buňky vzniká diploidní zygota, která dále prochází buněčným dělením a vzniká z ní embryo a suspenzor (zavěšovadlo), kterým je embryo spojeno se stěnou zárodečného vaku (Agrawal & Rakwal, 2012).

Proces embryogeneze začíná buněčným dělením, kdy dochází k proliferaci buněk a jejich funkční diferenciaci, specifikaci apikálně-basální osy, vzniku kořenového a stonkového pólu a v případě dvouděložných rostlin vzniku dvou děloh, které obsahují zásobní látky nutné pro výživu vyvíjejícího se embrya (Agrawal & Rakwal, 2012).

Centrální buňka zárodečného vaku je po oplození transformována na triploidní endosperm. V případě hrachu je toto pletivo důležité v raných fázích vývoje semen, kdy vyplňuje prostor mezi osemením a embryem, je dočasným zdrojem výživy, udržuje homeostatické prostředí pro vývoj embrya a v pozdějších stádiích vývoje postupně zaniká. Hraje důležitou roli v komunikaci, přenosu signálů mezi osemením a embryem a také epigenetické kontrole vývoje semene (Berger et al, 2006, Melkus et al., 2009).

Z vaječných obalů (integumentů), které obklopují embryo vzniká osemení (testa). V případě luskovin vzniká osemení ze dvou vaječných obalů, kdy vnitřní integument během vývoje vymizí a z vnějšího vzniká několik vrstev buněk osemení. Významnou

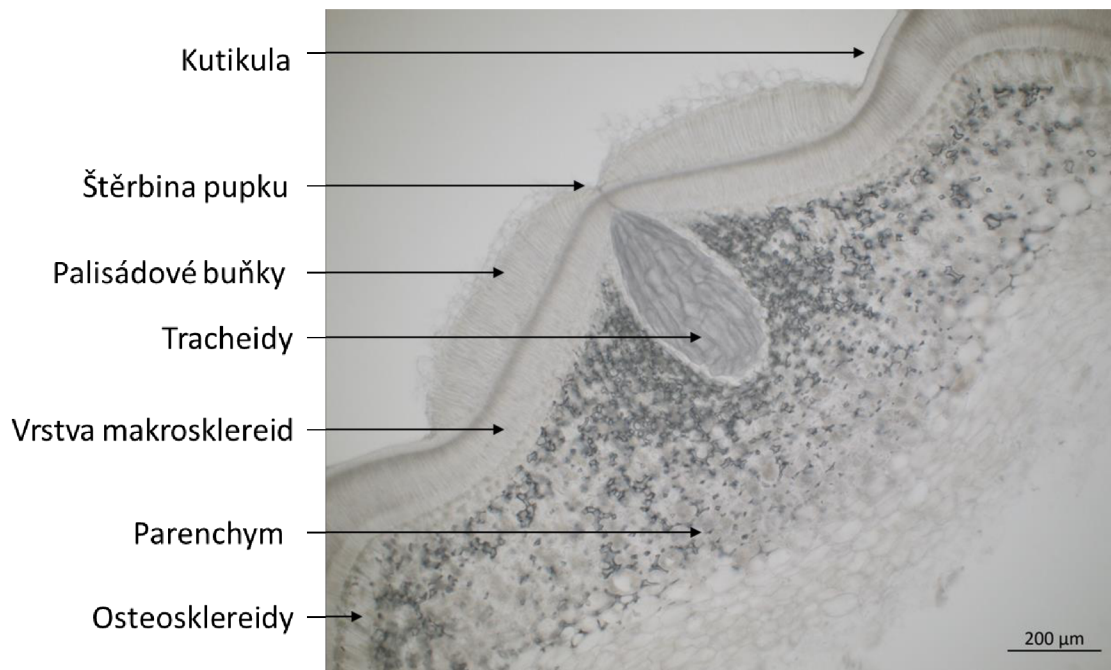
oblastí osemení je chalazální pól. V tomto místě je připojeno k semeni poutko, po jehož odpojení vzniká na semeni typická jizva, pupek (hilum) (Smýkal et al., 2014).

Semeno hrachu prochází třemi růstovými a vývojovými fázemi oddělenými dvěma lag fázemi. V první fázi vývoje dochází k buněčnému dělení buněk dělohy, tato fáze bývá označována jako preukládací fáze (Lemontey et al., 2000). Následuje lag fáze, kdy je výrazně zpomalen růst osemení a postupně zaniká endosperm. Ve druhé vývojové fázi semeno dozrává, buňky děloh expandují a jsou ukládány proteiny a sacharidy jako zásobní látky (Brocard-Gifford et al., 2003). V další lag fázi již kompletně zaniká endosperm a embryo je v přímém kontaktu s osemením. Ve třetí vývojové fázi je dokončen proces dozrávání a dochází k vysychání semene (Weber et al., 2005). Tato fáze bývá označována jako desikace. Dochází k velkému úbytku vody a semeno je připravováno na klidovou fázi a následné klíčení (Kermode & Finch-Savage, 2002). Přechod semene z fáze ukládání do fáze desikace je doprovázen mnoha změnami na úrovni genové exprese. Desikace je typická pro ortodoxní semena, u kterých umožňuje dlouhodobé přežití semen za nepříznivých podmínek a následné klíčení za podmínek optimálních. Během desikace dochází k akumulaci disacharidů a oligosacharidů (Bailly et al., 2001), syntéze zásobních a LEA (late embryogenesis abundant) proteinů (Tunnacliffe & Wise, 2007), heat-shock proteinů (Wehmeyer et al., 1996), aktivaci antioxidantní obrany (Bailly et al., 2001) a změnám struktury buněk (Buitink & Leprince, 2008). Vzhledem k rychlému snížení obsahu vody je semeno vystaveno stresu a následné zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), což může vést k oxidačnímu poškození semene. Rovnováha koncentrace ROS je udržována enzymovými a neenzymovými mechanismy (Bailly, 2004).

3.1.1.1 Struktura osemení

Vnější vrstvu osemení tvoří palisáda těsně na sebe nasedajících radiálně prodloužených sklereid, které jsou označovány také jako Malpighiho buňky, makrosklereidy nebo palisádové buňky (Obr. 3). Tyto buňky jsou typické výrazně zesílenými buněčnými stěnami, které jsou na vnější straně pokryty kutikulou a tato oblast buněk bývá označována jako „terminal caps“. Tvar těchto buněk spolu s přítomností voskových částic udává texturu povrchu osemení (Güneş, 2013). Kutikula (Obr. 3) tvoří kontinuální vrstvu kryjící semeno s výjimkou oblasti pupku, kde tato vrstva chybí. U sóji bývá tato vrstva spojována s nepropustností osemení pro vodu (Shao et al., 2007). V rámci vrstvy makrosklereid je přítomná vrstva oddělující terminal caps od zbytku buňky. Je umístěna příčně přes vrstvu makrosklereid a je označovaná jako světlolomná linie (*linea lucida*, light-line). Je patrná díky odlišnostem v zastoupení polysacharidů a impregnaci této oblasti buněčné stěny. Tyto faktory přispívají k lokální změně refrakčních indexů (Harris, 1983). Pod vrstvou makrosklereid se nachází vrstva osteosklereid (Obr. 3) s velkými vzduchem vyplněnými mezibuněčnými prostory (Smýkal et al., 2014).

Vnitřní vrstva osemení je tvořena buňkami parenchymu (Obr. 3), v rámci této vrstvy jsou také přítomny vzduchem vyplněné mezibuněčné prostory. Parenchymatická vrstva bývá označována jako nutriční vrstva vzhledem k roli, kterou plní v průběhu embryogeneze (Van Dongen et al., 2003), a je v ní rozprostřen cévní systém. V případě hrachu se jedná o jeden chalazální cévní svazek se dvěma bočními větvemi (Hardham, 1976). Během dozrávání osemení je tlakem embrya značná část parenchymu rozdrčena a stlačena (Smýkal et al., 2014).



Obr. 3: Struktura osemení v oblasti pupku planého, dormantního genotypu JI64 ve stádiu 16 DAP (DAP – day after pollination).

Struktura osemení je homogenní s výjimkou chalazální oblasti, kde se nachází pupek (Obr. 4). Pupek, označovaný také jako hilum, je jizva vzniklá v místě připojení semene k mateřské rostlině pomocí poutka. Nachází se zde také navíc další vrstva palisádových buněk (Obr. 3), které jsou pozůstatkem poutka (Lackey, 1981). V palisádové vrstvě pupku je centrální štěrbina (Obr. 4), která překrývá vrstvu tracheid. Štěrbina pupku se otevírá, když je semeno v prostředí s nízkou relativní vlhkostí a umožňuje tak vysychání semen. V prostředí s velkou relativní vlhkostí naopak dochází k uzavření štěrbiny a ochraně před absorpcí vlhkosti (Smýkal et al., 2014).



Obr. 4: Semeno nedormantního genotypu JI92 23 DAP (DAP – day after pollination).

3.1.2 Změny metabolismu v průběhu vývoje semen

Vývoj semen je geneticky naprogramovaný proces doprovázený řadou změn. Zahájení vývoje, následné dozrávání semene a ukládání zásobních látek spouští velmi komplexní regulační síť, jejíž součástí jsou změny transkripční, metabolické i fyziologické, řízené změnami hladin sacharidů a regulované hormonálními drahami (Weber et al., 2005).

Mezi enzymy podílející se na regulaci vývoje semen patří kyselá invertasa (β -D-fruktofuranosidfruktohydrolasa, EC 3.2.1.26), která je aktivní v raných stádiích vývoje a sacharosasyntasa (NDP-glukosa:D-fruktosa 2- α -D-glukosyltransferasa, EC 2.4.1.13), která je spojována s dozráváním a ukládáním zásobních látek. Změny v aktivitách těchto enzymů doprovází změny koncentrace sacharosy a dalších sacharidů (kyselá invertasa a sacharosasyntasa katalyzuje hydrolýzu sacharosy) spojené mimo jiné s regulací vývoje semene (Weber et al., 1995). Invertasa aktivní v raných fázích vývoje způsobuje zvyšování hladin hexos, ty jsou dále transportovány do embrya. Vysoká koncentrace sacharidů indukuje buněčné dělení, embryogenezi a následný růst embrya (Borisjuk et al., 1998). Sacharosa je transportním sacharidem, výživnou látkou a signální molekulou, která spouští expresi genů spojených s ukládáním zásobních látek (Koch, 2004).

Další významnou signální molekulou je kyselina abscisová (ABA). Rostlinný hormon, který reguluje širokou škálu vývojových událostí a odpovídá na stresové podmínky. ABA je nezbytná v pozdních fázích embryogeneze, kdy inhibuje předčasné klíčení semen. Zvýšená hladina ABA v průběhu embryogeneze je důležitá pro udržení normálního vývoje semene, napomáhá toleranci ke ztrátám vody v průběhu desikace a udržování dormance. Dalšími hormony zapojenými v regulaci vývoje semen jsou gibereliny (GA), které jsou antagonisty ABA. GA hrají roli během růstové fáze dozrávání a v poslední době jsou spojovány s regulací embryogeneze (Hu et al., 2018). Gibereliny také indukují klíčení semen a následný růst klíčnicích rostlin (Yamaguchi et al., 2007).

Vývoj semen probíhá za hypoxických podmínek, jelikož mateřská pletiva jsou nepropustná pro plyny, tedy i kyslík. Vytvářející se embrya jsou heterotrofní, ATP je produkováno hlavně respirací a do vakuol je transportováno prostřednictvím ATP/ADP transportérů (Rawsthorne, 2002). Nedostatek kyslíku v semenech může vést k nedostatku energie. Typickým dějem probíhajícím při nedostatku kyslíku je fermentace, jejímž produktem jsou ethanol a laktát. Podle Rolletschek et al. (2002) tyto procesy probíhají pouze v mladých nezralých embryích a nejsou detekovány v pozdějších fázích vývoje. Navzdory nedostatku kyslíku je dozrávání spojeno s velkou metabolickou aktivitou

a vysokou koncentrací ATP. Předpokládá se tedy, že v dozrávajících semenech existují mechanismy, díky kterým se semena na hypoxické podmínky adaptují (Weber et al., 2005).

Metabolická a fyziologická adaptace semen na nízké hladiny kyslíku je zakódována v diferenciacním programu embrya. Respirace je nedostatkem kyslíku ovlivňována více v raných stádiích vývoje a v průběhu vývoje embrya celková rychlost respirace postupně klesá, během zrání je respirace přísně kontrolována a přizpůsobena nízkým hladinám kyslíku (Rolletschek et al., 2003). Koncentrace ATP jsou v raných stádiích vývoje nízké, zatímco později se zvyšují. To naznačuje, že embrya jsou schopna zvyšovat a stabilizovat hladiny ATP. V průběhu přechodu do fáze dozrání dochází v embryích ke změně z metabolismu založeného na přeměně hexos působením invertasy na metabolismus sacharosy, kontrolovaného sacharosasyntasou (Weber et al., 1996). S tím je spojena rozdílná hladina ATP v průběhu embryogeneze. Invertasy aktivní hlavně v raných fázích vývoje spotřebovávají více ATP, než sacharosasyntasa aktivní v pozdějších fázích vývoje. Invertasa štěpí sacharosu na dvě hexosy, k jejichž následné aktivaci jsou potřebné dvě molekuly ATP, zatímco v případě sacharosasyntasy vzniká UDP-glukosa a fruktosa, k aktivaci je tedy spotřebována pouze jedna molekula ATP. Dalším faktorem ovlivňujícím hladinu ATP v embryích je jejich fotosyntetická aktivita (Borisjuk et al., 2003).

Dozrávající embrya jsou zelená a fotosynteticky aktivní. V případě embryí hrachu a dalších luskovin je však nízká míra fixace CO₂ a s tím spojená velmi nízká aktivita ribulosa-bisfosfátkarboxylasy (3-fosfo-D-glycerátkarboxy-lyasy, RuBisCo, EC 4.1.1.39) (Hedley et al., 1975). To vede k předpokladu, že fotosyntéza je v embryích aktivní hlavně z důvodu produkce kyslíku (Rolletschek et al., 2003). Osemení je také fotosynteticky aktivní, produkovaný kyslík je využit k respiraci a zvýšení vnitřní koncentrace kyslíku. Zmírňuje tak hypoxický stres a podporuje syntetickou aktivitu semene. V osemení probíhá ve velké míře respirace, dochází k akumulaci CO₂, díky kterému je aktivován enzym RuBisCo (Radchuk & Borisjuk, 2014).

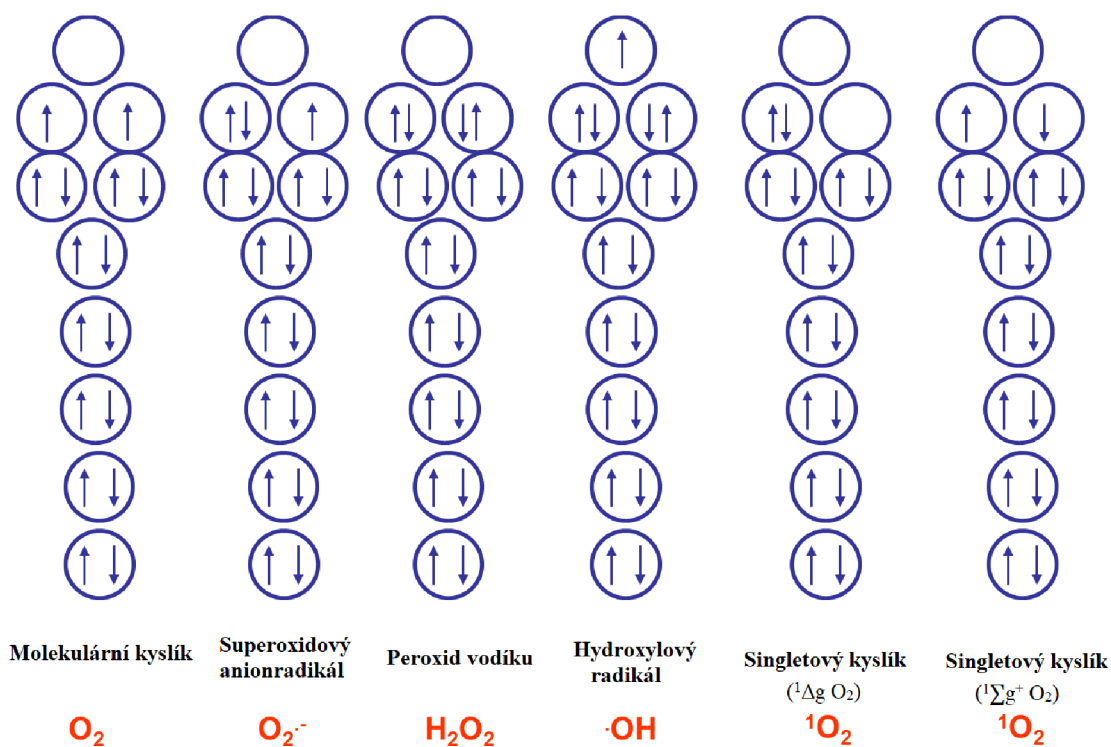
3.2 Reaktivní formy kyslíku

Mezi reaktivní formy kyslíku (ROS) řadíme kyslíkové radikály (látky s jedním či více volnými elektrony), mezi které patří superoxidový ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový (OH^{\cdot}), peroxylový (RO_2^{\cdot}) a perhydroxylový (HO_2^{\cdot}) radikál a některé neradikálové látky s oxidačními účinky, tedy peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná ($HOCl$) a ozon (O_3), které mohou být snadno převedeny na radikály (Halliwell & Gutteridge, 2007). Jedná se o látky přirozeně vznikající v rámci metabolických pochodů, které jsou zapojeny v řadě enzymových reakcí, mitochondriálním elektronovém transportu, přenosu signálu, aktivaci jaderných transkripčních faktorů, genové expresi atd.

Volné radikály jsou látky, které jsou schopny samostatně existovat a obsahují jeden nebo více nepárových elektronů (Obr. 5). Mohou vzniknout z neradikálových látek ztrátou nebo přijetím jednoho elektronu nebo homolytickým štěpením molekul. Molekula kyslíku (O_2), obsahuje dva nepárové elektrony se stejným kvantovým číslem, každý v jiném antivazebném orbitalu (Obr. 5) (Apel a Hirt, 2004). Reakce molekuly kyslíku v základním stavu s atomy a molekulami je tzv. spinově zakázaná a neprobíhá, i když je kyslík považován za velmi silné oxidační činidlo. Toto spinové omezení je eliminováno postupným přijetím elektronů vedoucím ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Singletový kyslík je reaktivnější formou kyslíku, která vzniká přijetím energie. Existují dvě formy singletového kyslíku, lišící se umístěním a orientací valenčních elektronů v orbitalech (Obr. 5). Singletový kyslík ve stavu $^1\Delta_g O_2$ (Obr. 5) je na energetické hladině 93,6 kJ nad základním stavem, zatímco kyslík ve stavu $^1\Sigma^+ O_2$ (Obr. 5) má energii 157 kJ a je tedy ještě reaktivnější než kyslík ve stavu $^1\Delta_g O_2$ (Halliwell & Gutteridge, 2007).

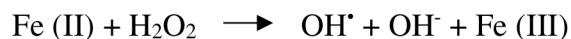
Přijetím jednoho elektronu vzniká superoxidový anionradikál ($O_2^{\cdot-}$), který tak má jeden nepárový elektron (Obr. 5) (Bayr, 2005). Superoxidový radikál není schopný procházet membránami. Přijetím dalšího elektronu vzniká peroxidový ion (O_2^{2-}), který ale není radikálem vzhledem k tomu, že neobsahuje nepárový elektron (Halliwell & Gutteridge, 2007).



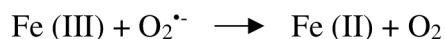
Obr. 5: Schéma molekulárních vazebných orbitalů kyslíku a reaktivních forem kyslíku (převzato a upraveno z ANTIOXIDANTSGROUP, 29. 08. 2022).

Peroxid vodíku (H_2O_2) (Obr. 5) je slabě reaktivní oxidační činidlo, které snadno prochází buněčnými membránami, díky rozpustnosti ve vodě. Hraje roli v signalizaci, protože je za určitých podmínek schopen reagovat s thiolovými skupinami proteinů. Ve vyšších koncentracích může působit cytotoxicky (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Ze superoxidového radikálu a peroxidu dalším přijetím elektronů vznikají vysoce reaktivní hydroxylové radikály (HO^{\cdot}) (Obr. 5). Příkladem je Fentonova reakce, kdy dochází k interakci přechodných kovů (např. Fe(II) a Cu(II)) s H_2O_2 za vzniku OH^{\cdot} .



Superoxid je schopen redukovat Fe(III) a Cu(II):



Další možností vzniku OH^{\cdot} je homolytickým štěpením H_2O_2 indukovaným např. UV zářením. Z vody vzniká OH^{\cdot} působením ionizujícího záření. OH^{\cdot} je považován za nejreaktivnější kyslíkový radikál s vysokým pozitivním redukčním potenciálem (Halliwell & Gutteridge, 2007).

3.2.1 Funkce reaktivních forem kyslíku v rostlinách

Reaktivní formy kyslíku jsou důležitými metabolity, vznikajícími přirozeně v rámci metabolismu rostlinných buněk, které plní úlohu signálních molekul (Van Breusegem et al., 2001), podílejí se na regulaci mnoha důležitých dějů (růst a vývoj rostliny, reakce na podmínky prostředí, reakce na interakce rostliny s patogeny a dalšími stresovými faktory, zavírání stomat) (Waszczak et al., 2018). Ve vyšších koncentracích jsou ale toxické, způsobují oxidační stres, dochází k oxidačnímu poškození DNA a dalších biomolekul a indukují buněčnou smrt (Gill a Tuteja, 2010). Efekt ROS je tedy přímo závislý na jejich koncentraci a rovnováze mezi jejich produkcí a odbouráváním.

Vývojové procesy v rostlinách jsou závislé na přísné kontrole redoxní rovnováhy v čase a prostoru v rámci buněk a pletiv. Tato redoxní rovnováha je definována integrací hladin ROS, NO, reaktivních forem dusíku (RNS), antioxidantů, redoxně aktivních sekundárních metabolitů a proteinů s thiolovými skupinami. Rovnováha mezi těmito látkami je regulována regulačními drahami zahrnujícími komunikaci mezi druhými posly, protein kinasami, fosfatasami, fytohormony, Ca^{2+} signalizací aj. Redoxní rovnováha je tak udržována jak na transkripční, tak posttranskripční úrovni (Tognetti et al., 2017).

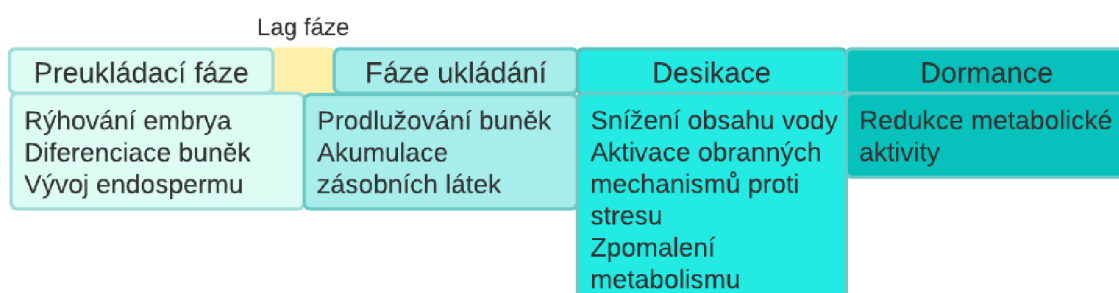
Důležitou funkcí ROS je regulace rostlinného růstu a vývoje, kdy působí jako signální molekuly, umožňující rostlině nastartovat různé vývojové procesy, regulovat a přizpůsobovat je aktuálnímu prostředí a podmínkám. Jedním z příkladů je účast ROS na udržování apikálních meristémů. $\text{O}_2^{\cdot-}$ se akumuluje v meristémech kořenné špičky, kde indukuje buněčné dělení, zatímco H_2O_2 se akumuluje primárně v prodlužovací zóně a indukuje diferenciaci buněk (Tsukagoshi et al., 2010). Pro růst je tedy důležitá jejich kompartmentace a rovnováha. ROS spolu s hormony a dalšími signálními molekulami regulují také růst primárního kořene (Tognetti et al., 2017). V kořenovém apikálním meristému působí ROS antagonisticky proti auxinům. Nerovnováha různých ROS nebo akumulace ROS spojená s vysokou koncentrací glukosy vede k oxidaci kyseliny indolyl-3-octové a její následné degradaci. Výsledkem je pak inhibice růstu kořene (Huang et al., 2019).

ROS jsou distribuovány ve všech rostlinných pletivech, především v těch metabolicky aktivních. Prostřednictvím regulace hladin ROS je řízeno také například klíčení semen. ROS jsou klíčovými posly zapojenými v komplexní signalizační síti kyseliny abscisové (ABA) (Wang a Song, 2008).

3.2.2 Produkce reaktivních forem kyslíku v semenech

Semena mohou být klasifikována jako semena ortodoxní a rekalcitrantní. Ortodoxní (např. luštěniny, obilniny, citrus) semena jsou charakteristická tím, že v průběhu svého vývoje procházejí fází vysychání, kdy jejich obsah vody klesá až na 7 %. Tato semena mohou být skladována až při teplotě -18 °C po dobu více než pěti let (Solberg et al., 2020). Semena rekalcitrantní (např. avokádo, kávovník, mango) jsou naopak k vysychání (vlhkost méně než 27 % vede k poškození) (Ellis et al., 1990) a nízkým teplotám velmi citlivá, proto musí být skladována vlhká při teplotách vyšších než 10 °C po dobu maximálně jednoho roku (Solberg et al., 2020).

Vývoj semen hrachu probíhá v několika fázích, během kterých dochází k výrazným změnám v obsahu vody a dalších metabolitů (Obr. 6). Například během embryogeneze je metabolismus před počátkem buněčného dělení velmi aktivní. V raných fázích vývoje semen je dostatečný přísun vody nezbytný pro transport metabolitů do semene, v pozdějších fázích, v průběhu zrání, dochází k rozsáhlé dehydrataci a při klíčení se obsah vody opět výrazně zvyšuje. Aby se semeno na tyto změny v obsahu vody adaptovalo, je potřeba přesné kontroly produkce, akumulace a metabolismu mimo jiné právě reaktivních forem kyslíku (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008). ROS jsou důležité pro ukončení dormance a následné klíčení. ROS patří mezi signální molekuly, které spouští obranné reakce proti různým biotickým a abiotickým stresům, ve vyšších koncentracích mohou spouštět programovanou buněčnou smrt (Kumar et al., 2015).



Obr. 6: Změny probíhající v semenech v různých vývojových fázích (upraveno podle Malovichko et al., 2021).

Produkce a akumulace ROS závisí na metabolickém a fyziologickém stavu semen. V semeni obsahujícím vodu (fáze: embryogeneze, vývoj semene, klíčení) jsou hlavním zdrojem ROS mitochondrie, glyoxysomy a NADPH oxidasy přítomné v plasmatické membráně (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008). 1-3 % kyslíku v mitochondriích je spotřebováno na produkci ROS, konkrétně $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 2007). Kyslík je na elektronovém transportním řetězci působením cytochrom C oxidasy (ferrocytochrom-C:kyslíkoxidoreduktasa, COX, EC 7.1.1.9) na komplexu IV nebo alternativní oxidasy (ubichinol:kyslíkoxidoreduktasa, AOX, EC 1.10.3.11) redukován na vodu. Může ale docházet k jednoelektronové redukci na komplexu I a III elektronového transportního řetězce vedoucí ke vzniku $O_2^{\cdot-}$, který je dále působením superoxidodismutasy (superoxid:superoxidoxidoreduktasy, SOD, EC 1.15.1.1) převeden na méně reaktivní formu ROS, tj. na H_2O_2 (Sweetlove & Foyer, 2004). H_2O_2 má slabé oxidační účinky a je schopen deaktivovat některé enzymy v matrix, příkladem je akonitasa (citrát(isocitrát) hydrolyasa, EC 4.2.1.3) a pyruvátdehydrogenasový komplex (Rhoads et al., 2006). V raných stádiích vývoje mohou ROS produkovat také chloroplasty, ty ale tuto schopnost postupně ztrácí (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008). V semenech jsou přítomny také glyoxysomy, specifický typ peroxisomů zapojený v mobilizaci lipidových rezerv, produkující velké množství H_2O_2 působením enzymů jako je glykolát oxidasa ((S)-2-hydroxy-acid:oxygen 2-oxidoreduktasa, EC 1.1.3.15) a acyl-CoA oxidasa (acyl-CoA:kyslík 2-oxidoreduktasa, EC 1.3.3.6) (Huang et al., 1983).

Naopak ve stádiu, kdy jsou semena suchá (dozrávání, dormance), není enzymová aktivita téměř detekována. Jednou z možností vzniku ROS jsou hydratované kapsy, přítomné v suchých pletivech, umožňující zachování metabolismu i v suchých semenech (Leubner-Metzger, 2004). Většina ROS ale vzniká mechanismy nezahrnujícími enzymy, příkladem je Amadori-Maillardova reakce a peroxidace lipidů (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008).

3.2.3 Význam ROS při dormanci a klíčení

Dormance semen je jev, který zabraňuje příliš časnému klíčení semene (Bewley a Black, 1994). Je geneticky daná, ovlivněná podmínkami prostředí (Finch-Savage a Leubner-Metzger, 2006). Ortodoxní semena po dozrání prochází fází vysychání (desikace), kdy je výrazně snížen obsah vody v semeni. To je spojováno s tvorbou ROS, jako odpověď na stres vyvolaný nedostatkem vody. Aby nedošlo k poškození semene oxidačním stresem je hladina ROS snižována enzymovými i neenzymovými mechanismy (Bailly, 2004).

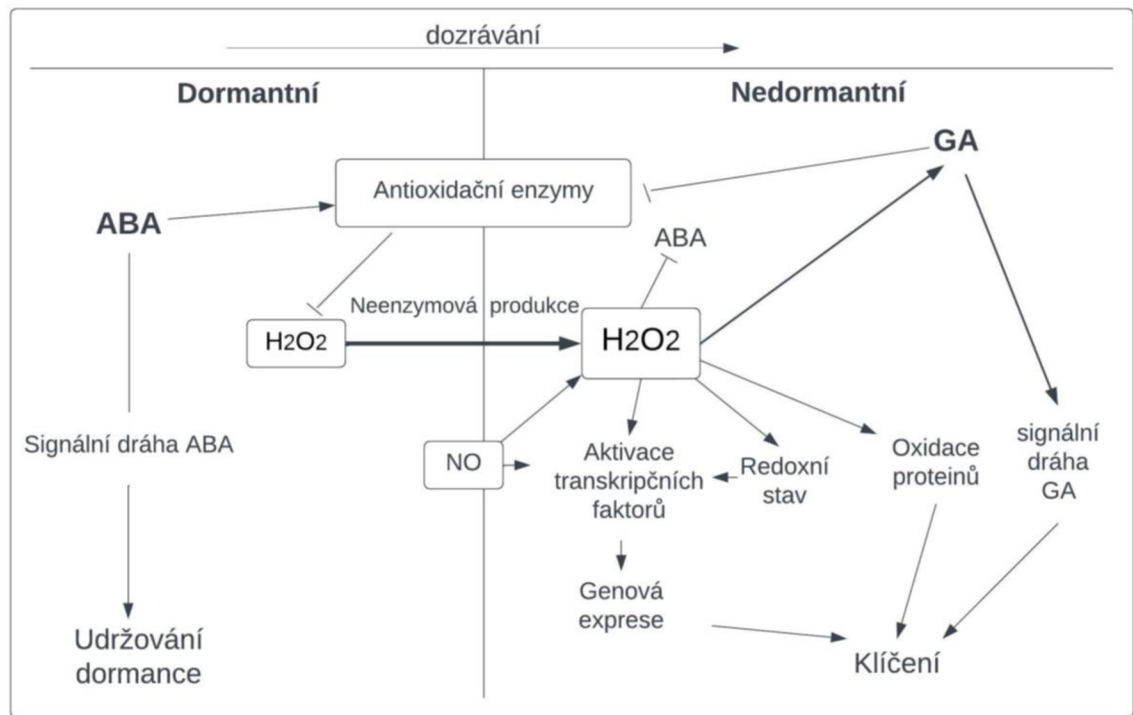
V suchém semeni není detekována téměř žádná metabolická aktivita a produkce ROS je hlavně neenzymová. Obnovení metabolismu v semeni je spojováno s enzymovou produkcí ROS. ROS mohou mít na klíčení dvojitý efekt závislý na jejich koncentraci. Příliš vysoká či nízká hladina ROS má inhibiční efekt na zahájení klíčení, zatímco při optimální hladině ROS je klíčení naopak podpořeno (Bailly et al., 2008).

ROS pravděpodobně hrají roli v ukončení dormance (Bailly, 2004). Při skladování suchých semen dochází k akumulaci ROS, které jsou pak využity ke specifické proteinové oxidaci a mobilizaci zásobních proteinů (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008). Dalším možným účinkem ROS je změna genové exprese, kdy většina genů, které jsou upregulovány v nedormantních semenech, jsou spojovány se syntézou proteinů (Bove et al., 2005).

Klíčení semen je proces, při kterém dochází k prodlužování embryonální osy, proražení osemení radiculou (kořínkem) a následnému růstu klíčící rostliny (Bewley a Black, 1994). Pro zahájení klíčení je nezbytná rehydratace semen (imbibice). Zahájení klíčení vyžaduje aktivaci regulačních systémů, které jsou kontrolovány jak vnitřními (dormance), tak vnějšími (environmentální podmínky: teplota, dostupnost kyslíku a vody) vlivy. Obnovení metabolické aktivity suchého semene je spojeno s tvorbou ROS. Na začátku imbibice dochází ke zvýšení koncentrace H_2O_2 (Wojtyla et al., 2006) a dalších ROS, např. OH^\cdot , O_2^{2-} (Sarath et al., 2007; Schopfer et al., 2001). Dormance a klíčení jsou přísně regulovány hormonálními signálními dráhami zahrnujícími hlavně ABA a GA. Zvýšená koncentrace ROS při zahájení klíčení je asociována se změnou syntézy a signalizace ABA, která brání klíčení a podporuje udržení dormance (Obr. 7). Akumulace H_2O_2 je spojována s degradací ABA způsobenou aktivací (+)-ABA-8'-hydroxylas (EC 1.14.14.137) (Liu et al., 2010) nebo přímou oxidací ABA (El-Maarouf-Bouteau et al., 2015). Na GA, které působí antagonisticky k ABA, má zvýšení hladiny ROS opačný efekt. ROS aktivují transkripční faktory a indukují tak biosyntézu GA (Obr. 7) (Kai et al., 2016). Zvýšená koncentrace ABA potlačuje produkci ROS, naopak GA produkci ROS indukují (El-Maarouf-Bouteau et al., 2015; Liu et al., 2010).

Další diskutovanou rolí ROS je jejich role signálních molekul, uvolňovaných v závislosti na environmentálních podmínkách. Bylo zjištěno, že světlo, konkrétně UVB záření, indukuje produkci ROS, jako je superoxid, peroxid vodíku a singletový kyslík. Tyto látky by mohly plnit roli druhých posílů v UVB signálních dráhách (Mackerness et al., 2002). Uvolňování ROS je spojeno také se stresem způsobeným teplotou (Allan et

al., 2006). Právě teplota a světlo patří mezi faktory prostředí, které ovlivňují dormanci a klíčení. Předpokládá se, že ROS jsou látky, které jsou zapojeny v přenosu signálů stimulujících uvolňování hormonů zapojených v indukci klíčení (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008) a signálních drahách regulujících např. růst a vývoj rostliny, reakce rostliny na vnější prostředí, patogeny a různé stresové faktory (Waszczak et al., 2018).

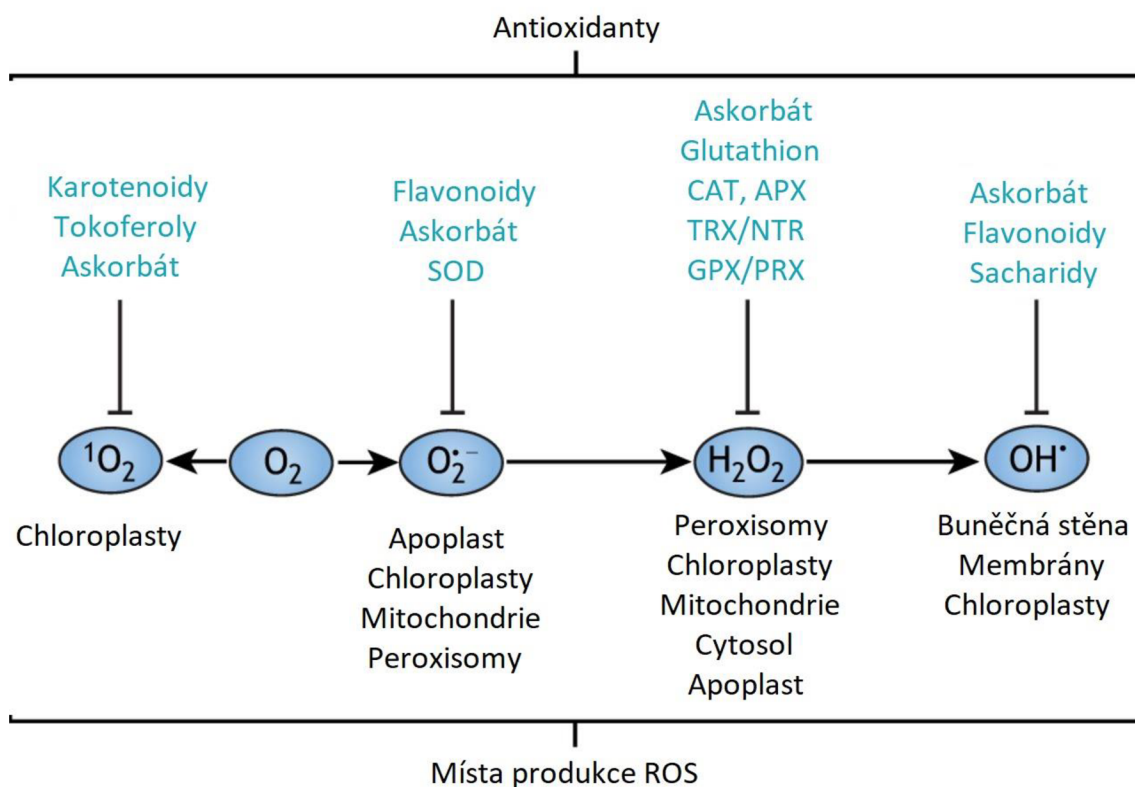


Obr. 7: Schématické zobrazení vzájemné komunikace mezi ROS, ABA a GA v dormanci a klíčení semen. Dormance je spojována se zvýšenou koncentrací ABA, ta má vliv na aktivaci antioxidačních enzymů, a tedy i snížení koncentrace ROS. Pro klíčení je typická zvýšená koncentrace ROS, které indukují produkci GA. ROS dále indukují transkripční faktory, spouštějící genovou expresi, mají vliv na redoxní stav semene a indukují oxidaci proteinů. Souhra těchto faktorů poté vede k indukci klíčení. ABA – kyselina abscisová, GA – gibbereliny, NO – oxid dusnatý (Vytvořeno podle El-Maarouf-Bouteau a Bailly, 2008).

3.3 Antioxidační ochrana semen

Funkce ROS je závislá na jejich hladině, působí jako regulační látky, ale ve vyšších koncentracích díky jejich oxidačnímu potenciálu způsobují oxidační poškození proteinů, DNA a RNA, peroxidaci lipidů a inhibici enzymů vedoucí až k aktivaci apoptosy a nevratnému poškození buněk a pletiv (Gill a Tuteja, 2010). Oxidační stres je podle Sies, 2018 definován jako „nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů, vedoucí k narušení redoxní signalizace, kontroly a poškození molekul“. Aby byla zajištěna redoxní rovnováha a správná funkce biologických systémů v rostlinách, a tedy i semenech, musí být přítomny mechanismy, které se podílejí na regulaci koncentrace ROS. Tyto obranné mechanismy zahrnují antioxidanty. Antioxidanty jsou molekuly schopné inhibovat nebo zhaset reakce volných radikálů, oddálit nebo zabránit poškození buněk a v nižších koncentracích než potenciální substrát, který by mohl být oxidován, významně zpomalovat nebo bránit jeho oxidaci (Obr. 8) (Nimse a Pal, 2015). Antioxidanty dělíme na enzymové a neenzymové.

Celková antioxidační kapacita je termín, kterým je označována suma antioxidačních aktivit, které jsou výsledkem působení nescifické skupiny neenzymových antioxidantů. Jedná se o biologicky významný parametr, který charakterizuje výslednou sílu působící proti nežádoucí oxidaci ve zkoumaném materiálu. Jednou z výhod je, že detekujeme aktivity jak známých, tak i neznámých antioxidantů, které působí synergicky (Bartosz, 2003).

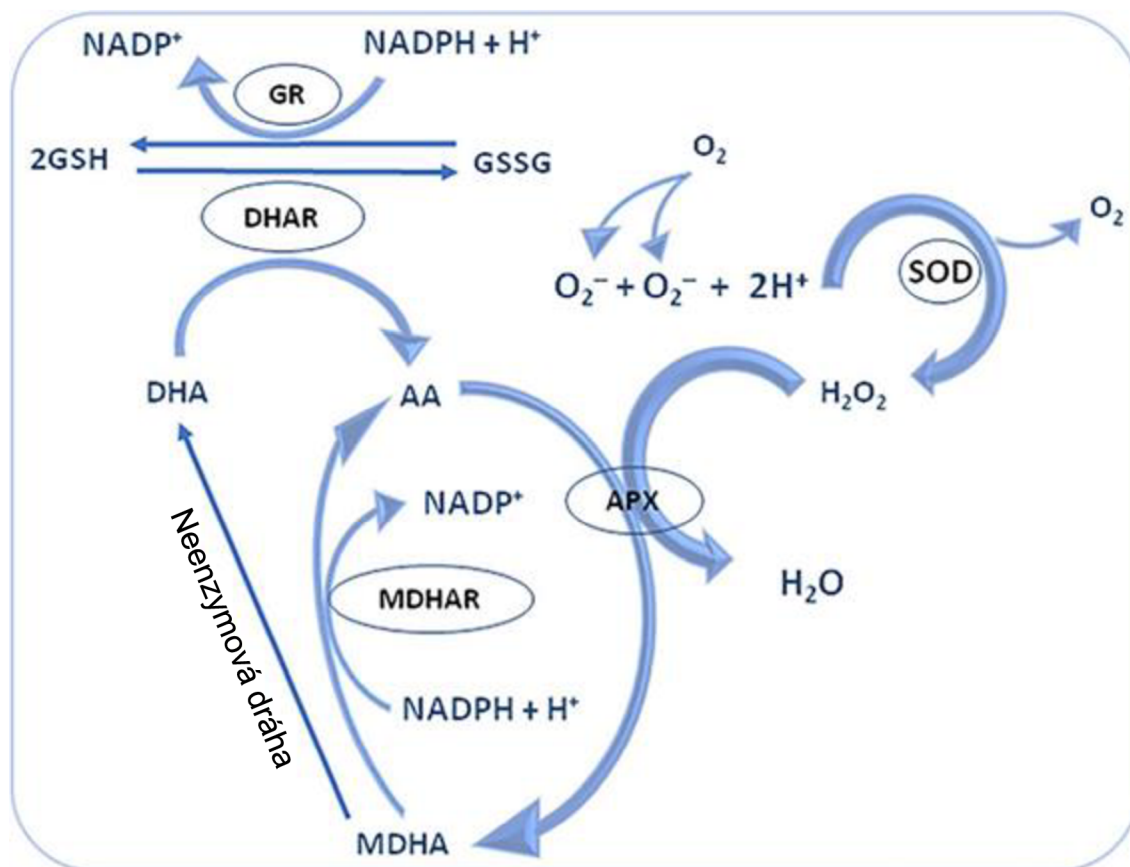


Obr. 8: Přehled lokalizace vzniku jednotlivých ROS a antioxidantů působících jako ochrana proti oxidačnímu stresu způsobenému vyšší hladinou ROS. SOD – superoxididismutasa, CAT – katalasa, APX – askorbátperoxidasa, TRX – thioredoxiny, NTR - NADPH thioredoxinreduktasa, GPX – glutathionperoxidasa, PRX - peroxyredoxiny (převzato a upraveno z Mhamdi & Van Breusegem, 2018).

3.3.1 Neenzymové antioxidanty

Mezi neenzymové antioxidanty řadíme nízkomolekulární látky, jako je askorbát, glutathion, fenoly, tokoferoly, tokotrienoly a karotenoidy (Dumanović et al., 2021). Nízkomolekulární antioxidanty odbourávají volné radikály buď přímo, nebo např. chelatací přechodných kovů, které by se jinak účastnily Haber-Weissovy (Kehrer, 2000) nebo Fentonovy reakce (Dumanović et al., 2021). Nízkomolekulární antioxidanty jsou díky jejich malému rozměru schopné procházet buněčnými membránami a cílit tak na potenciální místa vzniku ROS (Obr. 8) (Kohen a Nyska, 2002). Mezi nízkomolekulární antioxidanty patří také aminokyseliny, sacharidy, pigmenty a sekundární metabolity jako např. flavonoidy a terpeny. Tyto látky jsou označovány jako sekundární antioxidanty a jsou schopné regenerovat oxidované primární antioxidanty (Dumanović et al., 2021).

Mezi nejvýznamnější antioxidanty v rostlinách řadíme askorbát (Asc) a glutathion (GSH). Specifické enzymové systémy umožňují rychlou reakci s H_2O_2 a jejich oxidovaná forma je poté regenerována specifickými reduktasami. Příkladem je H_2O-H_2O (Asada, 1999) a Asc-GSH cyklus (Obr. 9) (Foyer & Halliwell, 1976).



Obr. 9: Schématické zobrazení metabolismu ROS se zapojením nízkomolekulárních antioxidantů. GSH – glutathion, GR – glutathionreduktasa, DHAR – dehydroaskorbátreduktasa, GSSG – glutathion disulfid, DHA – dehydroaskorbát, AA – askorbát, MDHAR – monodehydroaskorbátreduktasa, MDHA – monodehydroaskorbát, APX – askorbátperoxidasa, SOD – superoxid-dismutasa (převzato a upraveno z Dumanović et al., 2021).

H₂O-H₂O cyklus probíhá v chloroplastech za účasti fotosystému I a II (PS I, II) a bývá označován také jako Mehler-askorbátperoxidasaová dráha. V rámci tohoto cyklu dochází k současné fotooxidaci H₂O na O₂ (PS II) a fotoredukci O₂ na O₂^{•-} (PS I, Mehlerova reakce) (Miyake, 2010). O₂^{•-} je za fyziologických podmínek pomocí superoxidodismutasy (superoxid:superoxidoreduktasa, SOD, EC 1.15.1.1) transformován na H₂O₂ (Asada, 1999) (Obr. 8). Vzniklý H₂O₂ je pak odbourán působením askorbátperoxidasy (L-askorbát:peroxidvodíkuoxidoreduktasa, APX, EC 1.11.1.11) na vodu za oxidace dvou molekul Asc. Vzniká monodehydroaskorbát (MDA^{*}), který může být neenzymově transformován na Asc a dehydroaskorbát (DHA) nebo je rychle redukován na Asc působením NAD(P)H-dependentní NAD(P)H:monodehydroaskorbátoxidoreduktasy (MDHAR, EC 1.6.5.4) (Obr. 9) (Foyer a Shigeoka, 2011). DHA je regenerován na Asc přijetím dvou elektronů z GSH působením DHA-reduktasy (glutathion:dehydroaskorbát oxidoreduktasa, DHAR, EC 1.8.5.1) (Obr. 9) (Nimse a Pal, 2015). Glutathiondisulfid (GSSG) je regenerován na GSH působením glutathionreduktasy (glutathion:NADP⁺ oxidoreduktasa, GR, EC 1.8.1.7) (Obr. 9). Asc-GSH cyklus probíhá v cytosolu, mitochondriích, chloroplastech a peroxisomech. Různé izoformy APX a SOD jsou lokalizovány ve stromatu a thylakoidních membránách, zatímco chloroplastová GR a DHAR jsou lokalizovány v rámci stromatu (Sharma et al., 2012).

Karotenoidy, mezi které patří např. lykopen, β-karoten, xantofyly, lutein a zeaxantin, jsou lipofilní antioxidační látky schopné detoxifikace ROS. Nejefektivněji zachytávají peroxylové radikály za vzniku lipidových hydroxyperoxidů a karotenoidových radikálů, které jsou regenerované pomocí tokoferolů. Karotenoidové a tokoferolové radikály jsou dále redukovány askorbátem (Yachandra et al., 1996).

Tokoferoly a tokotrienoly, také označované jako vitamin E, jsou lipofilní antioxidanty syntetizované ve fotosynteticky aktivních, zelených částech rostliny. Jejich antioxidační účinky jsou způsobeny elektron donorovými účinky chromanolového kruhu. Tyto antioxidanty chrání lipidy a další membránové komponenty zachycením a reakcí s ¹O₂ (Sharma et al., 2012) a mají potenciál regenerovat lipidové peroxylové, alkylové a alkoxylové radikály vznikající během oxidace polynenasycených mastných kyselin. Míra afinity je ale dvakrát nižší v porovnání s β-karotenem a nejsou tak efektivní v zachytávání OH^{*} a alkoxyradikálů (Kohen a Nyska, 2002). Oxidované tokoferoly mohou být regenerovány pomocí askorbátu, GSH a ubiquinonu (Dumanović et al., 2021).

Mezi fenolické látky řadíme velkou skupinu sekundárních metabolitů, např. flavonoidy, taniny, estery kyseliny hydroxyskořicové, lignin atd, které jsou přítomné

v rostlinných pletivech (Sakakibara et al., 2003). Fenoly mají antioxidační účinky a díky jejich struktuře, konkrétně aromatickému kruhu s -OH a -OCH₃ substituenty, jsou schopné zachytávat volné radikály. Fenoly, obsahující o-dihydroxy skupiny v jejich struktuře, tvoří komplexy s kovovými ionty a předchází tak vzniku ROS Haber-Weissovou reakcí (Fenton, 1894). Přímou vychytávají ¹O₂ a inhibují peroxidaci lipidů zachycením lipidových alkoxyradikálů (Sharma et al., 2012). Zvýšená akumulace fenolických látek byla detekována při působení biotických a abiotických stresů a některé anthokyaniny a flavanoly vykazovaly čtyřikrát vyšší antioxidační aktivitu než askorbát (Rice-Evans et al., 1996).

3.3.2 Enzymové antioxidanty

3.3.2.1 Superoxiddismutasa

Superoxiddismutasa (SOD) je enzym patřící do třídy oxidoreduktas, katalyzující rychlý rozklad O₂^{•-} na H₂O₂ a O₂, čímž se předchází vzniku OH[•]. Tato reakce je 10 000x rychlejší než spontánní rozpad O₂^{•-}. SOD je přítomná ve všech aerobních buňkách a buněčných kompartmentech náchylných k oxidačnímu stresu (Bowler et al., 1992). Pro rostliny jsou typické tři typy SOD, jedná se o metaloenzymy s kofaktorem v aktivním centru. Nejvíce zastoupená je Cu/Zn-SOD přítomná ve stromatu chloroplastů, cytosolu, peroxisomech a apoplastu. Mn-SOD je přítomná v mitochondriích, peroxisomech, ale také v apoplastu a buněčné stěně. Fe-SOD je nejméně zastoupeným izoenzymem, lokalizovaným v chloroplastech a cytoplasmě (Mittler et al., 2004). Geny kódující SOD jsou citlivé k environmentálním stresovým faktorům a zvýšená aktivita SOD je spojována se zvýšením tolerance rostliny na různé typy stresu (Sharma et al., 2012).

3.3.2.2 Katalasa a peroxidasa

Intracelulární hladina H₂O₂ je kontrolována několika enzymy, zejména katalasami (CAT) a peroxidasami (POX), které se tak podílí na regulaci hladiny ROS (Joseph a Jini, 2010). CAT je zastoupena hlavně v peroxisomech, kde vychytává H₂O₂ vznikající v rámci procesu fotorespirace a β-oxidace mastných kyselin. CAT je tvořena čtyřmi hemovými podjednotkami obsahujícími Fe²⁺ ionty, které jsou oxidovány a katalyzují tak disociaci dvou molekul H₂O₂ na H₂O a O₂ (Anjum et al., 2016). Katalasa je aktivní primárně za stresových podmínek, kdy je koncentrace H₂O₂ vyšší než fyziologická hladina, čemuž napovídá i hodnota Michaelisovy konstanty tohoto enzymu dosahující milimolárních hodnot (Černý et al., 2018). Fyziologické hladiny H₂O₂ dosahují různé škály hodnot v závislosti na lokalizaci v rámci buňky, organele a liší se i v rámci druhu.

Pro běžnou signalizaci se intracelulární koncentrace H_2O_2 pohybují v rozmezí jednotek až stovek nanomolů a koncentrace vyšší jsou pro buňky toxické (Slesak et al., 2007). Katalasa dosahuje nejvyšší aktivity v peroxisomech, tedy místu největší produkce H_2O_2 , ale byla detekována také v cytosolu a mitochondriích (Mhamdi et al., 2010). V rostlinách jsou známy tři funkčně konzervované třídy katalas, lišící se místní a funkční lokalizací. Např. v tabáku katalasa třídy I katalyzuje detoxifikaci H_2O_2 produkovaného v průběhu fotorespirace, katalasa třídy II je lokalizována v cévním systému a katalasa třídy III je lokalizovaná hlavně v květech a plodech (Mhamdi et al., 2012).

Peroxidasa má nižší hodnotu Michaelisovy konstanty pro H_2O_2 , je tedy schopná odbourávat H_2O_2 i v nižších koncentracích (Shaarma et al., 2012). Peroxidasa může využít jako donory elektronů pro odbourání H_2O_2 např. nízkomolekulární antioxidanty glutathion (GSH). Na odstranění jedné molekuly H_2O_2 je potřeba dvou molekul GSH, tato reakce je tedy pro buňku energeticky náročná (Kohen a Nyska, 2002).

Podle aminokyselinových sekvencí dělíme peroxidasy do tří tříd: askorátperoxidasa, glutathionperoxidasa a peroxidasy III. třídy. Askorbátperoxidasa má 5 různých izoenzymů, které jsou přítomné ve stromatu a thylakoidech chloroplastů, glyoxysomech a peroxisomech, cytosolu, mitochondriích a vázané na buněčných membránách. APX izoenzymy jsou málo efektivní v odstraňování lipidových hydroxyperoxidů a zejména chloroplastová APX je velmi náchylná k oxidační inaktivaci při nízkých koncentracích askorbátu. Cytosolická a peroxisomální izoforma je odolnější (Miyake & Asada, 1996). Peroxidasy III. třídy jsou enzymy vycytávající H_2O_2 v apoplastickém a vakuolárním prostředí, katalyzují oxidaci jiných substrátů pomocí H_2O_2 , který slouží jako elektronový akceptor. Tato skupina izoenzymů hraje roli v komunikaci mezi primárními a sekundárními antioxidanty (Veljović Jovanović et al., 2018). Glutathionperoxidasa (glutathion:peroxidvodíkuoxidoreduktasa, GPX, EC 1.11.1.9) je rodina enzymů s velkou afinitou k H_2O_2 využívající jako redukující substráty GSH a thioredoxin. Tento izoenzym je schopný eliminovat kromě H_2O_2 také lipidové peroxidy (Herbette et al., 2002).

3.3.2.3 Polyfenoloxidasa

Polyfenoloxidasa bývá označována také jako tyrosinasa, kresolasa, polyfenolasa a katecholoxidasa. Patří do rodiny oxidoreduktas obsahujících měď, které katalyzují o-hydroxylaci monofenolů nebo konverzi difenolů na o-dichinony (Glagoleva et al., 2020). Polyfenoloxidas jsou velká skupina izoenzymů, které se liší ve struktuře, aminokyselinové sekvenci, funkci, časové a prostorové expresi a substrátové specifitě.

Jako polyfenoloxidasy jsou označovány tyrosinasa (L-tyrosin,L-dopa:kyslík oxidoreduktasa, monofenolmonooxygenasa,, EC 1.14.18.1.), která katalyzuje hydroxylaci ortho pozice od hydroxylové skupiny, dále enzymy katalyzující oxidaci difenolů (podtřída EC 1.10.3.), která zahrnuje katecholoxidasu (1,2-benzendiol:kyslík oxidoreduktasa, EC 1.10.3.1) a lakasu (benzendiol:kyslík oxidoreduktasa, EC 1.10.3.2) (Taranto et al., 2017). Katecholoxidasu katalyzuje oxidaci o-difenolů na o-chinony, lakasa je schopná katalyzovat oxidaci širokého spektra aromatických sloučenin (Fronk et al., 2015).

4 EXPERIMENTNÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- Hydrogenfosforečnan draselný – *Lach-Ner (Česká republika)*
- Dihydrogenfosforečnan draselný - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) – *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Pefabloc – *Honeywell Fluka (Německo)*
- Methanol – *Lach-Ner (Česká republika)*
- Persíran amonný (APS) - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- ABTS - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina (trolox) - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Folin–Ciocalteuovo činidlo - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Uhličitan sodný - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Kyselina gallová - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Hexahydrát chloridu hlinitého – *Fluka (Německo)*
- Octan draselný – *Penta (Česká republika)*
- Kvercetin – *Lachema (Česká republika)*
- Peroxid vodíku - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) – *Sigma Aldrich (Německo)*
- EDTA-Na₂ – *Millipore (USA)*
- Kyselina chlorovodíková - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Benzen-1,2,3-triol (pyrogallol) - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Guajakol - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Kyselina askorbová - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Katalasa - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- 4-methylcatechol - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Agarosa – *Serva (Německo)*
- 4-chlor-1-naftol - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H₂DCF-DA) - *Invitrogen*
- SensiFAST cDNA Synthesis Kit – *Bioline (UK)*
- TransAmp pufr – *Bioline (UK)*
- Reverzní transkriptasa – *Bioline (UK)*
- Dusík

- Chlorid sodný - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Isopropylalkohol - *VWR International (USA)*
- Ethanol - *VWR International (USA)*
- RNase-free voda
- PureLink® Plant RNA reagent - *Thermo Fisher Scientific, (USA)*
- DNaseI pufr - *Top-Bio (Česká republika)*
- DNaseI - *Top-Bio (Česká republika)*
- RiboSafe RNase Inhibitor (RRI) – *Bioline (UK)*
- Fenol - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Chloroform - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Isoamylalkohol – *Lach-Ner (Česká republika)*
- IAA - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Kyselina octová – *Tamda (Česká republika)*
- H₂O^{depc}
- RNA Purification Kit – *Norgen Biotek Corp. (Kanada)*
- F-primer – *Generi Biotech (Hradec Králové, ČR)*
- R-primer - *Generi Biotech (Hradec Králové, ČR)*
- SensiMix™ SYBR® No-ROX - *Bioline (UK)*

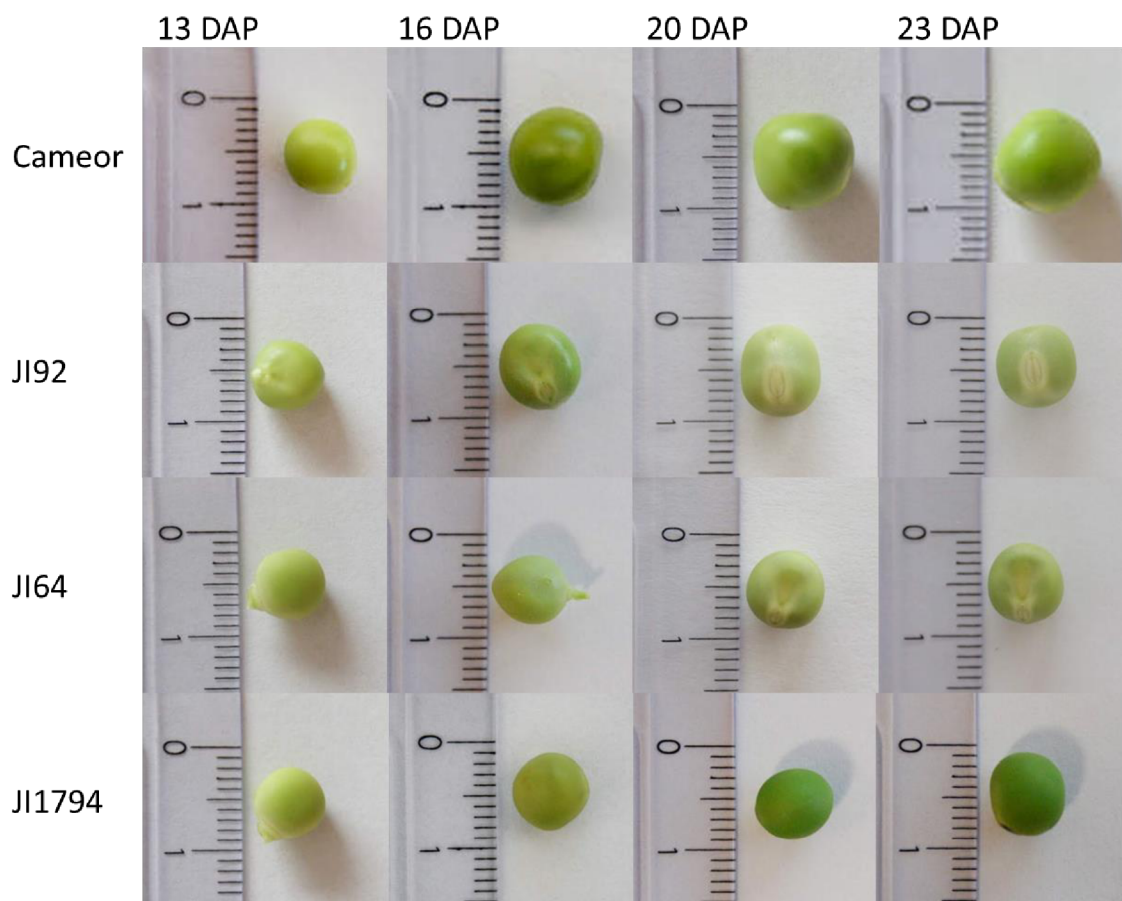
4.2 Přístroje a vybavení

- Digitální předvážky – *KERN, Německo*
- Analytické váhy – *Denver instrument, USA*
- Centrifuga – *Eppendorf, Německo*
- Vortex – *Biosan, Litva*
- Elektromagnetická míchačka – *BioSan, Litva*
- Digitální pH metr – *XS Instruments, Itálie*
- Sada automatických pipet – *Eppendorf, Německo*
- Mikrodestičky Test plate 96F – *TPP, Švýcarsko*
- Mikrodestičkový reader Synergy HT - *BioTek Instruments, USA*
- Mikrodestičkový reader PowerWave XS – *BioTek Instruments, USA*
- Vibratom – *Leica, USA*
- Fluorescenční mikroskop Imager.Z2 – *Zeiss, Německo*
- Mrazicí box – *Elektrolux, Švédsko*
- PCR cykler – *Eppendorf, Německo*

- Termocykluer CFX96 Touch™ systém - Bio-Rad, USA
- PCR destička – Bio-Rad, USA
- NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer – Thermo Scientific

4.3 Rostlinný materiál

Analýza byla provedena na embryích a osemení dvou kulturních, nedormantních genotypů hrachu (Cameor, JI92) a dvou planých, dormantních genotypů hrachu (JI64, JI1794) ve 4 vývojových stádiích: 13 DAP (DAP – day after polination, počet dnů od opylení) (1. stádium), 16 DAP (2. stádium), 21 DAP (3. stádium), 23 DAP (4. stádium) (Obr. 10). Semena různých vývojových stádií byla poskytnuta Katedrou botaniky, PŘF UP. Taxonomické zařazení a charakteristika jednotlivých genotypů byla popsána v kapitole 1.1.



Obr. 10: Fotografie semen genotypu Cameor, JI92, JI64 a JI1794 ve 4 vývojových stádiích. DAP – day after polination, počet dnů od opylení.

Studovaná semena byla použita již v bakalářské práci (Žárská, 2021) a byla pěstována stejným způsobem. Semena JI92, JI64 a JI1794 byla poskytnuta z John Innes Pisum Collection (Norwich, UK), semena kultivaru Cameor z INRA France. Rostliny byly pěstovány v pětilitrových nádobách v substrátovém mixu rašelina-písek v poměru 90:10 (Florcom Profi, BB Com Ltd. CZ) s denními a nočními teplotami pohybujícími se v rozmezí 35–20 °C/18–12 °C. Fotoperioda byla prodloužena na 14 hodin s použitím dodatečného osvětlení pomocí sodíkových výbojek (Hortilux Schreder, Holland, svýbojkou Sylvania Grolux 600 W). Náhodně vybrané květy byly v den, kdy se otevřely, označeny štítkem s datem. Vzniklé lusky se semeny byly sklizeny v rozmezí 13 až 23 dní od otevření květů. Semena byla na ledu vyjmuta z lusků, vypreparovaná osemení a embrya byla okamžitě přenesena do tekutého dusíku a uložena do mrazícího boxu (-80 °C).

4.4 Metody

4.4.1 Extrakce antioxidantů, fenolů a flavonoidů z osemení a embryí hrachu

Byla provedena extrakce rostlinného materiálu v methanolu v poměru 1:5 (w:v) pro následné stanovení celkové antioxidační kapacity, koncentrace celkových fenolů a celkových flavonoidů. Osemení byla nejdříve homogenizována v tekutém dusíku za použití třecí misky s tloučkem, následně byl přidán odpovídající objem vychlazeného methanolu. Pro extrakci z embryí nebyl dusík potřeba a homogenizace materiálu byla provedena přímo v methanolu. Získaný homogenát byl přesunut do mikrozkušavky a centrifugován po dobu 15 min při 15000 g a 4 °C. Byl odebrán supernatant, který byl uskladněn na ledu a dále využit pro analýzu.

4.4.2 Celková antioxidační kapacita

Celková antioxidační kapacita byla stanovena metodou, jejíž principem je schopnost látek zhaset kationradikál ABTS⁺ v prostředí K-fosfátového pufru o pH 7. Kationradikál ABTS⁺ má modrozelenou barvu a zhasení tohoto radikálu je doprovázeno ztrátou intenzity zabarvení, která je měřena spektrofotometricky jako pokles absorbance při vlnové délce 734 nm. Kationradikál ABTS⁺ je vyvíjen přímo v reakční směsi reakcí ABTS s persíranem amonným (APS) (Re et al., 1999). Antioxidační kapacita je srovnávána s antioxidační kapacitou syntetické látky Troloxu a je vyjádřena v jednotkách mmol Troloxu na 1 g vzorku, metoda proto bývá označována také jako TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

Před každým měřením byly připraveny roztoky 1,86 mmol·l⁻¹ APS (10,6 mg APS rozpuštěno v 25 ml 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátového pufru o pH 7), 1,6 mmol·l⁻¹ ABTS (8,78 mg ABTS rozpuštěno v 10 ml 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátového pufru o pH 7). Byl připraven 1 mmol·l⁻¹ Trolox (2,5 mg Troloxu rozpuštěno v 10 ml methanolu) a následně kalibrační řada standardů o koncentraci Troloxu: 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 μmol·l⁻¹.

Do destičky bylo pipetováno 50 μl blanku (methanol)/standardu/vzorku, 50 μl 1,86 mmol·l⁻¹ APS, 100 μl 1,6 mmol·l⁻¹ ABTS. Směs byla poté inkubována při laboratorní teplotě po dobu 25 min a následně byla měřena absorbance při vlnové délce 734 nm. Vzorky byly pipetovány v technickém triplikátu a stanovení bylo 3x opakováno.

4.4.3 Celková koncentrace fenolů

Celková koncentrace fenolů byla stanovena v methanolových extraktech připravených dle postupu v kapitole 2.4.1. Koncentrace fenolů byla stanovena kolorimetrickou spektrofotometrickou metodou, využívající Folin-Ciocalteuovo činidlo, které je v přítomnosti fenolických látek redukováno. V zásaditém prostředí vznikají modré komplexní sloučeniny, jejichž absorbance je měřena při vlnové délce 750 nm. Jako standard pro kalibraci metody je využívána kyselina gallová (Tsaniklidis et al., 2021).

Byl připraven roztok 7% Na_2CO_3 (0,7 g Na_2CO_3 bylo rozpuštěno v 10 ml vody) a standard kyseliny gallové (1000 μg kyseliny gallové bylo rozpuštěno v 1 ml methanolu). Byla připravena kalibrační řada kyseliny gallové o koncentraci 50, 100, 150, 200 a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do jamek na 96 jamkové mikrodestičce bylo pipetováno 75 μl vody, 10 μl vzorku/standardu kyseliny gallové, 10 μl Folin-Coicalteuova činidla a směs byla inkubována po dobu 6 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 125 μl 7% Na_2CO_3 a směs byla inkubována 60 min. Po uplynutí 60 min byla měřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Vzorky byly pipetovány v technickém triplikátu a stanovení bylo 2x opakováno.

4.4.4 Koncentrace celkových flavonoidů

Pro stanovení koncentrace celkových flavonoidů byly využity methanolové extrakty (viz kapitola 2.4.1.). Koncentrace celkových flavonoidů byla stanovena pomocí kolorimetrické spektrofotometrické metody s chloridem hlinitým, který v reakci s flavony a flavanoly tvoří stabilní komplexy. To je doprovázeno změnou absorbance, která je měřena při vlnové délce 415 nm. Jako standard pro kalibraci byl použit kvercetin (Tsaniklidis et al., 2021).

Byl připraven roztok 10% chloridu hlinitého (1,6305 g hexahydrátu chloridu hlinitého bylo rozpuštěno v 10 ml methanolu), 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanu draselného (0,9814 g octanu draselného bylo rozpuštěno v 10 ml methanolu) a standard kvercetinu (1000 μg kvercetinu bylo rozpuštěno v 1 ml methanolu). Byla připravena kalibrační řada kvercetinu 25, 50, 75, 100, 125, 150 175 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Do jamky na 96 jamkové mikrodestičce bylo pipetováno 140 μl vody, 25 μl vzorku/standardu, 10 μl 10% chloridu hlinitého, 10 μl 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanu draselného. Směs byla inkubována po dobu 30 min při laboratorní teplotě a poté byla měřena absorbance při vlnové délce 415 nm. Vzorky byly pipetovány v triplikátu a stanovení bylo 2x opakováno.

4.4.5 Vyhodnocení celkové antioxidační kapacity, koncentrace fenolů a flavonoidů

Pro výpočet celkové antioxidační kapacity a koncentrace fenolů a flavonoidů byly vytvořeny kalibrační řady, byla změřena absorbance a byly vytvořeny grafy závislosti absorbance na koncentraci. Vznikla tak lineární kalibrační přímka, jejíž rovnice lineární funkce $y = ax + b$ (y – absorbance, x – koncentrace, a – směrnice přímky, b – průsečík funkce s osou y) byla poté využita pro výpočet koncentrace látky v daném vzorku (Tab. 2). Koncentrace byla přepočtena dle případného ředění extraktu a poměru extrakce.

Tab. 2: Rovnice kalibrační přímky pro výpočet koncentrace celkové antioxidační kapacity, celkových fenolů a celkových flavonoidů.

	Rovnice kalibrační funkce	Koeficient determinace
Celková antioxidační kapacita - ekvivalent Troloxu [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	$y = -0,0026x + 0,4469$	$R^2 = 0,9949$
Fenoly [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	$y = 0,0031x + 0,0606$	$R^2 = 0,9954$
Flavonoidy [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	$y = 0,0035x + 0,0089$	$R^2 = 0,9982$

4.4.6 Extrakce studovaných enzymů

Pro měření aktivity polyfenoloxidasy (PPO), peroxidasy (POX), askorbátperoxidasy (APX) a katalasy (CAT) byla provedena extrakce z osemení a embryí. K extrakci enzymů byl použit $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátový pufr (pH 7) obsahující 1% PVPP, $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pefabloc (200 mg PVPP a 2,2 mg pefablocu bylo rozpuštěno ve 20 ml $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru o pH 7). Extrakce probíhala za chlazení, osemení bylo homogenizováno pomocí třecí misky s tloučkem v tekutém dusíku a následně byl přidán extrakční pufr. Embrya byla homogenizována pomocí třecí misky přímo v extrakčním pufru. Homogenáty byly přesunuty do mikrozkušavek a centrifugovány po dobu 15 min při 15000 g a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Byl odebrán supernatant, který byl uskladněn na ledu a dále využit pro analýzu.

4.4.7 Stanovení aktivity polyfenoloxidasy (PPO)

Aktivita PPO byla měřena spektrofotometricky, na základě oxidace substrátu 4-methylkatecholu na hnědý produkt, který byl detekován při vlnové délce 420 nm (Balarynová et al., 2022).

Byly připraveny roztoky katalasy (5 mg katalasy bylo rozpuštěno ve 4 ml destilované vody) a $88 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-methylkatecholu (21,8 mg 4-methylkatecholu bylo rozpuštěno ve 2 ml destilované vody).

Do jamky bylo pipetováno $180 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru o pH 7, $20 \mu\text{l}$ katalasy, $10 \mu\text{l}$ extraktu, $10 \mu\text{l}$ $88 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 4-methylkatecholu/pufru do blanku. Byl měřen nárůst absorbance při 420 nm při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 60 min v časovém intervalu 5 min. Byla změřena absorbance při 900 a 977 nm pro výpočet délky optické dráhy. Vzorky byly pipetovány v technickém triplikátu, stanovení bylo opakováno 3x.

4.4.8 Stanovení aktivity peroxidasy (POX)

Aktivita POX byla měřena spektrofotometrickou metodou s guajakolem. Principem reakce je redukce H_2O_2 , který je substrátem peroxidasy, za současné oxidace guajakolu na 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenylchinon. To je doprovázeno vznikem barevného produktu, který detekujeme při vlnové délce 436 nm (Angelini et al., 1990).

Byl připraven reakční pufr K-fosfátový pufr obsahující $0,113 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ guajakol ($1,4125 \text{ ml}$ zásobního roztoku $8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ guajakolu bylo naředěno $98,5875 \text{ ml}$ $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátovým pufrem o pH 6) a $175 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok H_2O_2 ($0,2029 \text{ ml}$ zásobního roztoku H_2O_2 o koncentraci $8625,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo doplněno v odměrném válci do 10 ml destilovanou vodou).

Do jamky na destičce bylo pipetováno $155 \mu\text{l}$ reakčního pufru (obsahující guajakol), $10 \mu\text{l}$ extraktu a $10 \mu\text{l}$ $175 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 . Po dobu dvou minut v časovém intervalu 20 s byl měřen nárůst absorbance při vlnové délce 436 nm při $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Byla změřena absorbance při vlnových délkách 900 a 977 nm pro výpočet délky optické dráhy. Vzorky byly pipetovány v technickém triplikátu a stanovení bylo 4x zopakováno.

4.4.9 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy (APX)

Aktivita APX byla stanovena spektrofotometricky. H_2O_2 je v reakci katalyzované APX redukován na vodu za současné oxidace askorbátu na monodehydroaskorbát. Úbytek askorbátu je sledován jako pokles absorbance při 290 nm (Asada & Nakano, 1981).

Byly připraveny roztoky $1,75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ askorbátu (3 mg askorbátu bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody) a $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 ($11,6 \mu\text{l}$ $8625,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 bylo doplněno do 10 ml destilovanou vodou).

Do jamky bylo pipetováno $125 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru o pH 7, $72 \mu\text{l}$ $1,75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ askorbátu, $15 \mu\text{l}$ extraktu a $38 \mu\text{l}$ $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ H_2O_2 /vody do blanku. Byl měřen pokles absorbance při 290 nm při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 min v časovém intervalu 1 min.

Byla změřena absorbance při 900 a 977 nm pro výpočet délky optické dráhy. Vzorky byly pipetovány v technickém triplikátu a stanovení bylo zopakováno 4x.

4.4.9.1 Stanovení aktivity katalasy (CAT)

Aktivita CAT byla stanovena spektrofotometricky v UV oblasti, kdy dochází k poklesu koncentrace H₂O₂ katalytickým působením enzymu, což je sledováno jako pokles absorbance při 240 nm (Aebi, 1984).

Byl připraven roztok 150 mmol·l⁻¹ H₂O₂ (173,9 μl 8625,5 mmol·l⁻¹ H₂O₂ bylo doplněno do 10 ml destilovanou vodou).

Do jamky 96 jamkové mikrodestičky pro měření v UV oblasti bylo pipetováno 220 μl 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátového pufru o pH 7, 10 μl extraktu a 20 μl 150 mmol·l⁻¹ H₂O₂. Byla měřena absorbance při vlnové délce 240 nm po dobu 5 min v časovém intervalu 1 min při teplotě 30 °C. Byla změřena absorbance při vlnové délce 900 a 977 nm pro výpočet délky optické dráhy. Vzorky byly pipetovány v technickém triplikátu a stanovení bylo 4x zopakováno.

4.4.10 Vyhodnocení aktivit enzymů

Pro výpočet délky optické dráhy byl použit vztah: $l = \frac{A_{977} - A_{900}}{0,18}$ [cm] (A_{977, 900} – absorbance při λ = 977, 900 nm).

Aktivita enzymů byla vypočtena podle vztahu: $a = \frac{\Delta A \cdot V}{\epsilon \cdot t \cdot l}$ (ΔA změna absorbance v čase, V – objem reakčního roztoku v jamce destičky [l], ε – extinkční koeficient specifický pro daný enzym [M⁻¹·cm⁻¹] (Tab. 3), t – čas měření [s], l – délka optické dráhy [cm]). Aktivita byla přepočtena na 1 ml extraktu, bylo započteno ředění jednotlivých vzorků. Vynásobením poměrem extrakce byla aktivita vztažena na g čerstvé váhy (FW).

Tab. 3: Přehled extinkčních koeficientů pro výpočet aktivity jednotlivých enzymů.

Enzym	Extinkční koeficient [M ⁻¹ ·cm ⁻¹]
PPO	1090
POX	4500
APX	2800
CAT	39,4

4.4.11 Histochemická lokalizace aktivity PPO a POX

Rostlinný materiál, konkrétně osemení v oblasti pupku, byl kolmo vložen do 4% agarosy o teplotě 40 °C. Z agarosy byla po ztuhnutí vyřezána pyramida, základna byla přilepena na základní desku vibratomu a byly připraveny 50 µm řezy, které byly poté přeneseny do 10 mmol·l⁻¹ K-fosfátového pufru o pH 7 a využity pro histochemickou lokalizaci PPO a POX. Pro detekci aktivity PPO byly řezy rostlinného materiálu inkubovány 60 min v roztoku 10 mmol·l⁻¹ 4-methylkatecholu (1,2414 mg 4-methylkatecholu bylo rozpuštěno v 1 ml destilované vody). Za katalýzy PPO dochází k oxidaci 4-methylkatecholu za vzniku hnědého produktu. Pro detekci aktivity POX byl připraven roztok 0,05% 4-chlor-1-naftolu (1,5 mg 4-chlor-1-naftolu bylo rozpuštěno v 1 ml studeného methanolu, bylo přidáno 2,7 ml 10 mmol·l⁻¹ K-fosfátového pufru o pH 7). Barvicí roztok byl připraven smícháním 1 ml 0,05% 4-chlor-1-naftolu s 20 µl 30% H₂O₂. 4-chlor-1-naftol je v přítomnosti POX oxidován na fialový produkt, který pozorujeme. Řezy byly inkubovány v barvicím roztoku po dobu 1 minuty. Po uplynutí doby inkubace byly řezy 3x propláchnuty 10 mmol·l⁻¹ K-fosfátovým pufrům o pH 7 a následně pozorovány pod mikroskopem.

4.4.12 Histochemická lokalizace ROS

Pro histochemickou lokalizaci ROS byla použita fluorescenční sonda 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetát (H₂DCF DA, excitační/emisní maximum: 492–495/517–527 nm). H₂DCF DA je po odštěpení acetátových skupin působením volných radikálů oxidován na vysoce fluorescenční 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) (ThermoFisher Scientific, 2023).

Připravené řezy byly inkubovány ve tmě po dobu 5 minut v 10 µmol·l⁻¹ roztoku H₂DCF-DA (5 µl 10 mmol·l⁻¹ H₂DCF DA bylo doplněno 10 mmol·l⁻¹ K-fosfátovým pufrům do 5 ml). Následně byl barvicí roztok odsát a řezy byly 3x propláchnuty 10 mmol·l⁻¹ K-fosfátovým pufrům a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem.

4.4.13 Exprese genu PPO

4.4.13.1 Izolace RNA

Osemení genotypu Cameor a JI64 (ve 2. vývojovém stádiu - 17 DAP) byla homogenizována v tekutém dusíku pomocí třecí misky s tloučkem na jemný prášek. K 0,1 g takto připraveného prášku bylo přidáno 0,5 ml vychlazeného roztoku PureLink[®] Plant RNA Reagent, vzniklý roztok byl vortexován a následně inkubován po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl roztok centrifugován při 12000 g po dobu 2 min při laboratorní teplotě. Byl odebrán supernatant, ke kterému bylo přidáno 0,1 ml 5 mol·l⁻¹ NaCl a směs byla promíchána otočením zkumavky. Bylo přidáno 0,3 ml chloroformu, směs byla promíchána a následně centrifugována při 12000 g po dobu 10 min při teplotě 4 °C. Došlo k rozdělení fází, horní vodná fáze byla odebrána a byl k ní přidán stejný objem isopropylalkoholu. Směs byla promíchána, inkubována po dobu 10 min při pokojové teplotě a následně centrifugována při 12000 g po dobu 10 min při 4 °C. Vzniklý supernatant byl odstraněn a k peletu byl přidán 1 ml 75% ethanolu. Směs byla centrifugována při 12000 g po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě. Po odebrání supernatantu byl pelet ještě krátce centrifugován a poté byl pomocí pipety odstraněn veškerý zbytek supernatantu. Pelet byl rozpuštěn ve 40 µl RNase-free water.

Následně byly z vyizolované RNA odstraněny potenciální zbytky DNA aplikací DNasy I. Byl připraven premix obsahující 6 µl 5x reakčního pufru, 3 µl DNasyI a 1 µl RiboSafe RNase Inhibitor (RRI) na jeden vzorek. Ke 40 µl vyizolované RNA bylo přidáno 10 µl premixu a směs byla inkubována po dobu 20 min při 37 °C. Poté byl objem vzorků doplněn vodou na 200 µl. Ke vzorkům bylo přidáno 200 µl směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1, v:v:v) a směs byla vortexována. Mikrozkušavky byly ponechány stát do vytvoření dvou fází. Směs byla znovu vortexována a centrifugována při 12000 g po dobu 10 min při 4 °C. Horní fáze byla přenesena do nové mikrozkušavky a vortexována spolu s 300 µl chloroform:IAA (24:1, v:v) a poté centrifugována po dobu 5 min při 12000 g při 4 °C. Horní fáze byla odebrána do nové mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 20 µl 1 mol·l⁻¹ kyseliny octové a 550 µl 96% ethanolu. Vzorky byly inkubovány přes noc při teplotě -80 °C. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány při 13000 rpm po dobu 30 min při 4 °C. Byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 500 µl 70% ethanolu. Byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 500 µl 90% ethanolu. Směs byla centrifugována při 12000 g po dobu 5 min při 4 °C a poté byl odstraněn supernatant. Zkušavky byly krátce centrifugovány a zbyly

ethanol byl odstraněn pomocí pipety. Pelet byl na vzduchu vysušen a rozpuštěn ve 40 µl sterilní H₂O^{depc}. Pomocí NanoDrop spektrofotometru byla změřena koncentrace RNA. Vyizolovaná RNA byla pro zvýšení čistoty dále purifikována použitím Plant/Fungi Total RNA Purification Kit dle instrukcí výrobce. Po purifikaci byla opět pomocí nanodropu změřena koncentrace RNA.

4.4.13.2 cDNA syntéza a RT-qPCR

Získaná RNA byla následně přepsána do komplementární DNA (cDNA) pomocí kitu SensiFAST cDNA Synthesis Kit. Byla připravena reakční směs obsahující 4 µl 5x TransAmp pufru, 1 µl reverzní transkriptasy a 1 µg RNA daného vzorku. Objem reakční směsi byl vždy doplněn do 20 µl H₂O^{depc}. Reakční směs byla inkubována v PCR cykleru s následujícím programem: 10 min při 25 °C, 15 min při 42 °C, 15 min při 48 °C a 5 min při 85 °C.

Získaná cDNA byla použita pro RT-qPCR analýzu genu kódujícího PPO použitím kitu SensiMix™ SYBR® No-ROX. Reakční směs obsahovala 1,5 µl forward primeru, 1,5 µl reverse primeru, 4,5 µl H₂O^{depc} a 12,5 µl 2x SensiMix™ SYBR® No-ROX. Do PCR destičky bylo pipetováno 20 µl připravené reakční směsi a 4 µl 10x naředěné cDNA. Každý vzorek byly analyzován v triplicátu. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tab 4. Primery byly navrženy pomocí programu PRIMERQUEST (IDT, USA). PCR amplifikace probíhala v termocykléru CFX96 Touch™ systém za podmínek uvedených v Tab. 5.

Tab. 4: Sekvence primerů použitých v RT-qPCR analýze.

Gen	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')
<i>Psat1g206360</i>	GGTGATTGGACCAGGGAATACTGAGTT	TGACAAGTCCTTTCCACATCTTGGA
<i>Psat5g212520</i>	AGGTGTTTGGTGCTGAGTA	TCCCCCTTGAGTTGCTTCC
<i>Psat6g025120</i>	TGGGATTCTCTTCACTTGCG	GAAATCAACGGCCCATCTTC

Tab. 5: Podmínky PCR amplifikace.

Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas [s]
1	95	600
40	95	15
	60	15
	72	20

Relativní exprese genu *Psat1g206360* (PPO) byla kvantifikována pomocí $\Delta\Delta C_T$ metody (Pffaf, 2001) proti kontrole (Cameor) a referenčním genům *Psat5g212520* (Acetyltransferase (GNAT) rodina) a *Psat6g025120* (transmembránový protein DUF1077) (Balarynová et al., 2022). Data byla vyhodnocena pomocí softwaru BioradMaestro (Bio-Rad, USA).

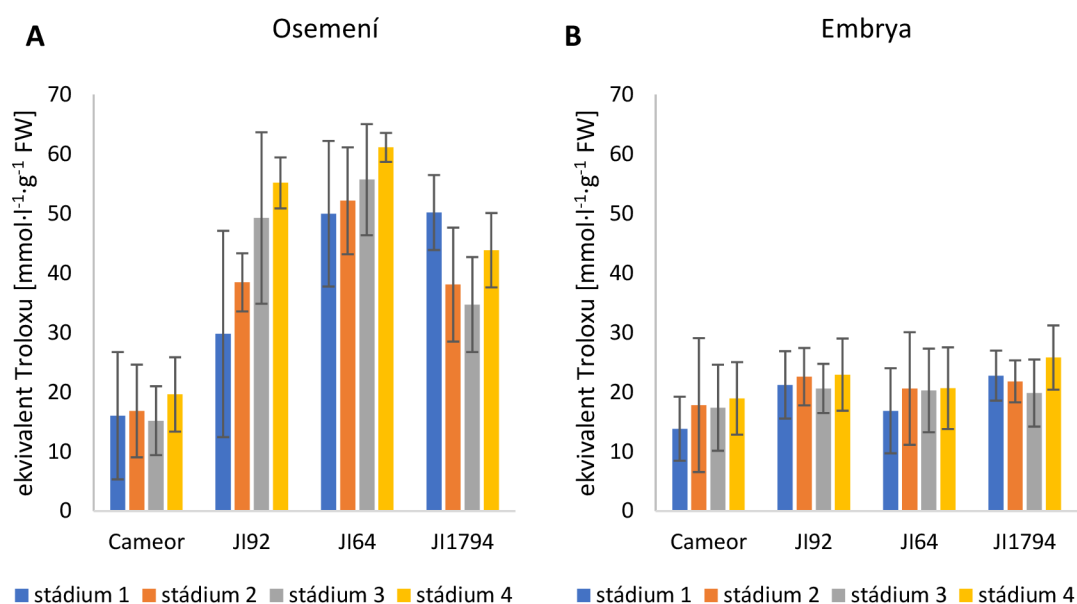
4.4.14 Statistické vyhodnocení dat

Bylo provedeno statistické vyhodnocení dat metodou Faktoriální ANOVA, kdy byly sledovány změny parametrů stanovenými spektrofotometrickými metodami, tedy celkové antioxidační kapacity, koncentraci fenolů a flavonoidů, aktivity enzymů PPO, POX, APX a CAT v rámci jednotlivých genotypů a vývojových stádií a *post hoc* Bonferroniho test, kde byly porovnávány celkové antioxidační kapacity v rámci všech genotypů a vývojových stádií navzájem (viz příloha).

5 VÝSLEDKY

5.1 Celková antioxidační kapacita

Metodou zhášení radikálu ABTS⁺ (Re et al., 1999) byla stanovena celková antioxidační kapacita v osemení a embryích kulturních (Cameor, JI92) a planých (JI64, JI1794) genotypů hrachu ve čtyřech vývojových stádiích. Antioxidační kapacita byla porovnána s antioxidační kapacitou syntetické látky Trolox, byla vytvořena kalibrační přímka, ze které byla poté vypočtena celková antioxidační kapacita jednotlivých vzorků. Stanovení bylo provedeno ve třech opakováních, byl vypočten průměr a směrodatná odchylka a data byla shrnuta v grafu (Obr. 11).



Obr. 11: Celková antioxidační kapacita vyjádřená jako ekvivalent Troloxu v osemení (A) a embryích (B) semen hrachu genotypu Cameor, JI92, JI64 a JI1794 ve čtyřech vývojových stádiích.

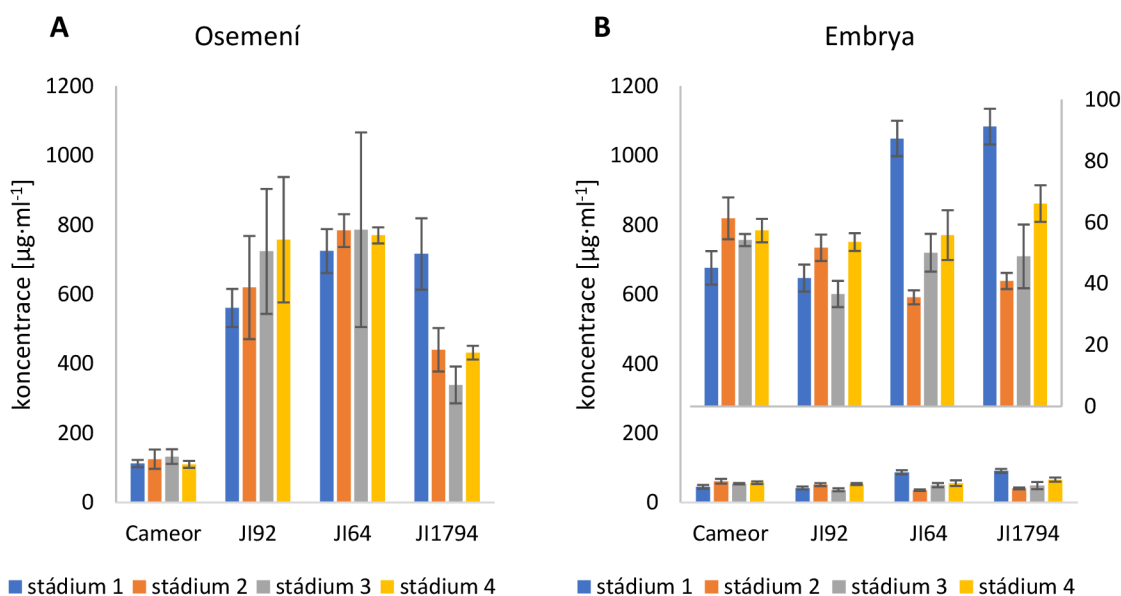
Vyhodnocením dat metodou Faktoriální ANOVA (příloha Tab. 1) bylo potvrzeno, že se celková antioxidační kapacita v osemeni liší v rámci genotypů. V embryích nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi jednotlivými genotypy, ani vývojovými stádii.

Rozdíly mezi vývojovými stádii a jednotlivými genotypy byly vyhodnoceny pomocí *post hoc* Bonferroniho testu (příloha Tab. 2). Bylo potvrzeno, že celková antioxidační kapacita v osemeni genotypu Cameor je významně nižší, než v osemeni genotypů JI92, JI64 a JI1794. V embryích nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v celkové antioxidační kapacitě mezi genotypy, ani vývojovými stádii.

Porovnáním celkové antioxidační kapacity v osemeni a embryích bylo zjištěno, že v osemeni a embryích genotypu Cameor se celková antioxidační kapacita významně neliší. V osemeni genotypů JI92, JI64 a JI1794 je celková antioxidační kapacita vyšší než v embryích (Obr. 11).

5.2 Koncentrace celkových fenolů

Koncentrace celkových fenolů byla stanovena spektrofotometrickou metodou s Folin-Ciocalteuvým činidlem (Tsaniklidis et al., 2021). Jako standard byla použita kyselina gallová a byla vytvořena kalibrační přímka, ze které byly vypočteny koncentrace celkových fenolů v jednotlivých vzorcích. Z důvodu nedostatku vzorků mohlo být stanovení zopakováno 2x, orientačně byl vypočten průměr a směrodatná odchylka a data byla shrnuta v grafu (Obr. 12).



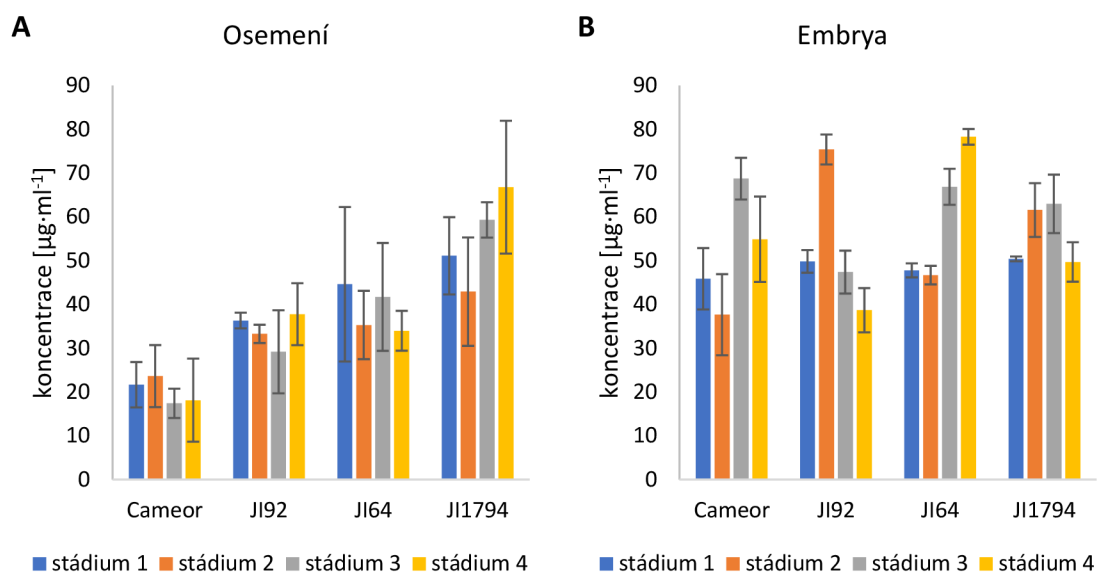
Obr. 12: Koncentrace celkových fenolů v osemeni (A) a embryích (B) semen hrachu genotypu Cameor, JI92, JI64 a JI1794 ve čtyřech vývojových stádiích.

Vyhodnocením dat metodou Faktoriální ANOVA (příloha Tab. 1) bylo potvrzeno, že v osemení se koncentrace celkových fenolů liší v závislosti na genotypu, rozdíly koncentrace fenolů mezi genotypy jsou tedy statisticky významné. V embryích byly pozorovány statisticky významné rozdíly jak mezi genotypy, vývojovými stádii i kombinaci genotypů s vývojovými stádii.

Rozdíly mezi vývojovými stádii a jednotlivými genotypy byly vyhodnoceny pomocí *post hoc* Bonferroniho testu (příloha Tab. 3). Bylo potvrzeno, že koncentrace celkových fenolů v osemení genotypu Cameor je statisticky významně nižší, než v osemení genotypů JI92, JI64 a JI1794. Koncentrace celkových fenolů v osemení genotypu Cameor se v průběhu vývoje nemění. V osemení genotypu JI92, JI64 taktéž nebyly pozorovány výrazné změny v koncentraci fenolů. Pouze v osemení genotypu JI1794 koncentrace celkových fenolů v průběhu vývoje klesala. V embryích byly výrazné rozdíly v koncentraci fenolů pozorovány v prvním vývojovém stádiu genotypu JI64 a JI1794, kde byla koncentrace výrazně vyšší než v ostatních vývojových stádiích a také vyšší než v prvním vývojovém stádiu genotypu Cameor a JI92.

5.3 Koncentrace celkových flavonoidů

Koncentrace celkových flavonoidů byla stanovena spektrofotometrickou metodou s chloridem hlinitým (Tsaniklidis et al., 2021). Jako standard byl použit kvercetin, byla vytvořena kalibrační přímka, ze které byly vypočteny koncentrace celkových flavonoidů v jednotlivých vzorcích. Z důvodu nedostatku vzorků mohlo být stanovení zopakováno 2x, orientačně byl vypočten průměr a směrodatná odchylka a data byla shrnuta v grafu (Obr. 13).

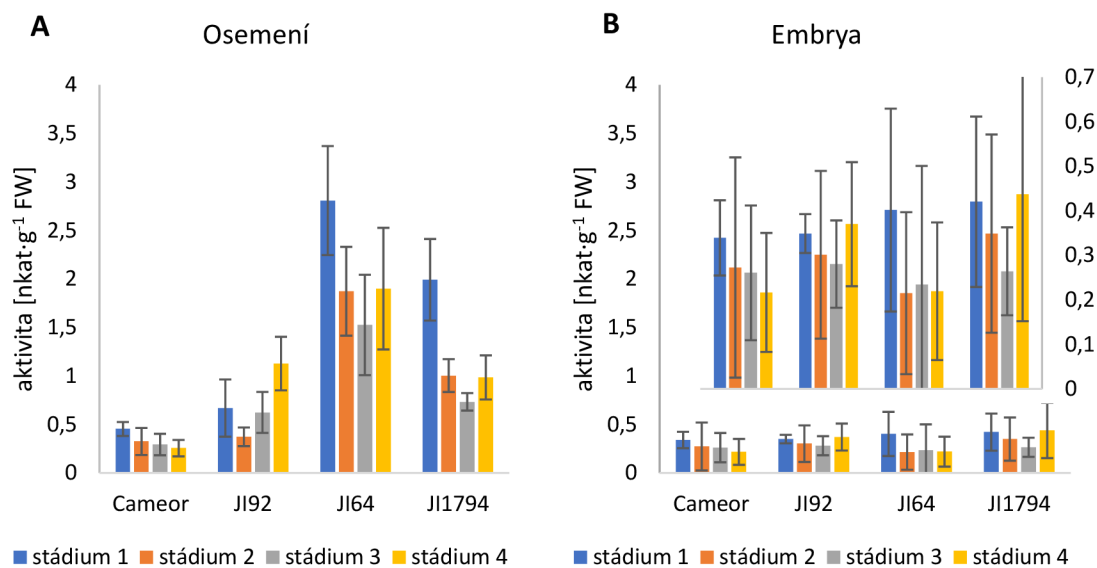


Obr. 13: Koncentrace celkových flavonoidů v osemení (A) a embryích (B) semen hrachu genotypu Cameor, JI92, JI64 a JI1794 ve čtyřech vývojových stádiích.

Vyhodnocením dat metodou Faktoriální ANOVA (příloha Tab. 1) bylo potvrzeno, že se koncentrace celkových flavonoidů v osemení liší v závislosti na genotypu, a v embryích jsou rozdíly mezi genotypy, vývojovými stádii. Rozdíly mezi vývojovými stádii a jednotlivými genotypy byly vyhodnoceny pomocí *post hoc* Bonferroniho testu (příloha Tab. 4). Rozdíly koncentrace celkových flavonoidů v osemení mezi genotypy a vývojovými stádii nebyly signifikantní. Nejnižší koncentrace flavonoidů byla naměřena v osemení genotypu Cameor, nejvyšší v osemení JI1794. V embryích byla koncentrace celkových flavonoidů mezi jednotlivými genotypy podobná a lišila se ve vývojových stádiích, u každého genotypu dosahovala nejvyšších hodnot v jiném vývojovém stádiu. V embryích genotypu Cameor byla koncentrace nejvyšší ve 3. vývojovém stádiu, v embryích JI92 ve 2. vývojovém stádiu a JI64 ve 4. vývojovém stádiu.

5.4 Aktivita PPO

Aktivita PPO byla stanovena kinetickou spektrofotometrickou metodou, kdy byla detekována oxidace substrátu 4-methylcatecholu na hnědý produkt jako změna absorbance za čas. Stanovení bylo 3x zopakováno, byl vypočten průměr a směrodatné odchylky a data byla shrnuta v grafu (Obr. 14).



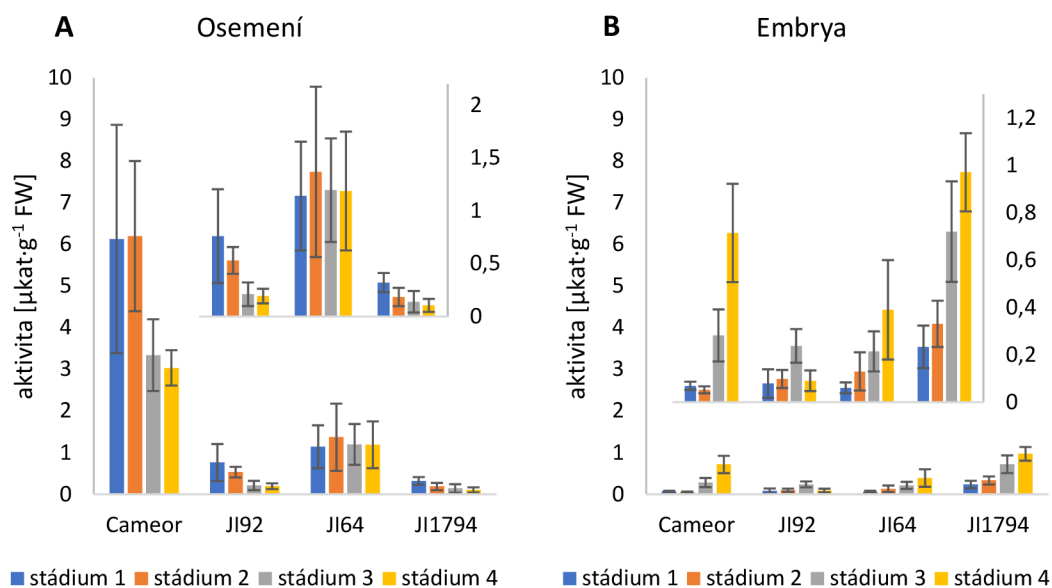
Obr. 14: Aktivita PPO v osemení (A) a embryích (B) semen hrachu genotypu Cameor, JI92, JI64 a JI1794 ve čtyřech vývojových stádiích.

Vyhodnocením dat metodou Faktoriální ANOVA (příloha Tab. 1) bylo potvrzeno, že aktivita PPO v osemení se statisticky významně liší v rámci genotypu, vývojového stádia a kombinace genotypu a vývojového stádia. V embryích se aktivita PPO neliší mezi genotypy, ani v průběhu vývoje.

Pro srovnání jednotlivých genotypů a vývojových stádií mezi sebou byla data vyhodnocena *post hoc* Bonferroniho testem (příloha Tab. 5). Bylo potvrzeno, že aktivita PPO v osemení genotypu Cameor je signifikantně nižší, než v osemení genotypu JI64 a JI1794. V průběhu vývoje osemení genotypu Cameor se aktivita PPO významně nelišila, u genotypů JI92, JI64 a JI1794 byly rozdíly v aktivitě PPO v průběhu vývoje pozorovány. Aktivita PPO ve vývojovém stádiu 13 DAP v osemení genotypu JI64 a JI1794 je statisticky významně vyšší než aktivita PPO v 1. vývojovém stádiu genotypu Cameor a JI92, a v průběhu vývoje výrazně klesá. V embryích nebyly pozorovány žádné výrazné rozdíly v aktivitě PPO mezi jednotlivými genotypy, ani vývojovými stádií.

5.5 Aktivita POX

Aktivita POX byla stanovena kinetickou spektrofotometrickou metodou založenou na oxidaci guajakolu. Stanovení bylo 4x zopakováno, byl vypočten průměr a směrodatné odchylky a data byla shrnuta v grafu (Obr. 15).

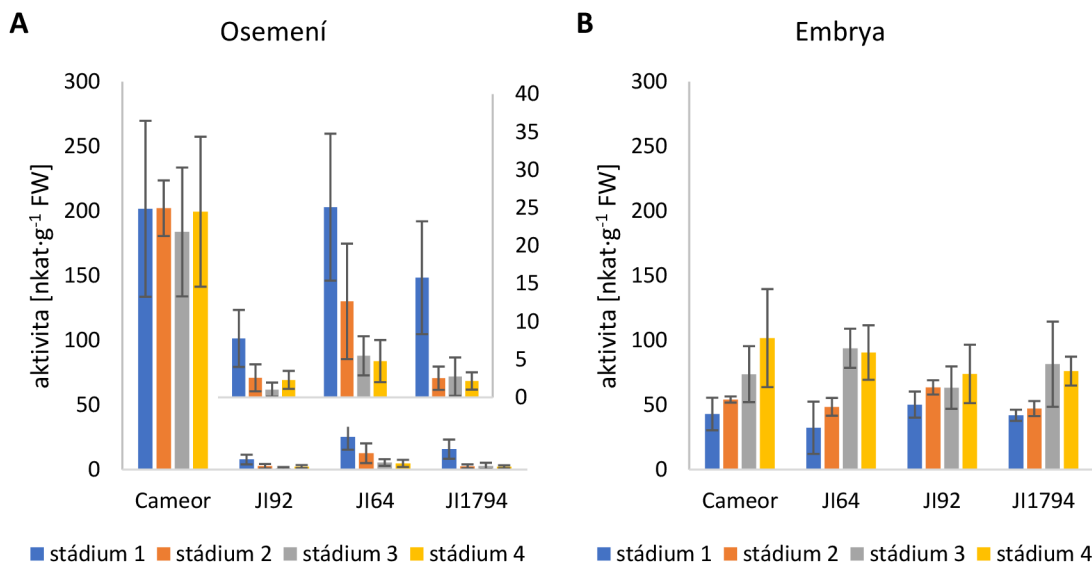


Obr. 15: Aktivita POX v osemení (A) a embryích (B) semen hrachu genotypu Cameor, JI92, JI64 a JI1794 ve čtyřech vývojových stádiích.

Vyhodnocením dat metodou Faktoriální ANOVA (příloha Tab. 1) bylo potvrzeno, že rozdíly v aktivitách POX jsou statisticky významné v osemení i embryích v rámci genotypů, vývojových stádií i kombinaci genotypu a vývojových stádií. Pro porovnání jednotlivých stádií byl použit *post hoc* Bonferroniho test (příloha Tab. 6). Bylo potvrzeno, že aktivita POX v osemení genotypu Cameor je signifikantně vyšší než v genotypu JI92, JI64 a JI1794. Aktivita POX v osemení genotypu JI92 a JI1794 je výrazně nižší. Byly pozorovány statisticky významné rozdíly v aktivitě POX v osemení v prvním a posledním vývojovém stádiu genotypu Cameor, JI92 a JI1794, kde aktivita POX v průběhu vývoje klesala. Aktivita POX v embryích je násobně nižší, než v osemení a v průběhu vývoje roste. V průběhu vývoje nejsou pozorovány statisticky významné změny v aktivitě POX pouze u genotypu JI92. Rozdíly mezi jednotlivými genotypy nejsou statisticky významné.

5.6 Aktivita APX

Aktivita APX byla stanovena kinetickou spektrofotometrickou metodou, kdy byla sledována oxidace askorbátu doprovázející redukcí H_2O_2 , typická změnou absorbance v čase. Stanovení bylo 4x zopakováno, byl vypočten průměr a směrodatné odchylky a data byla shrnuta v grafu (Obr. 16).

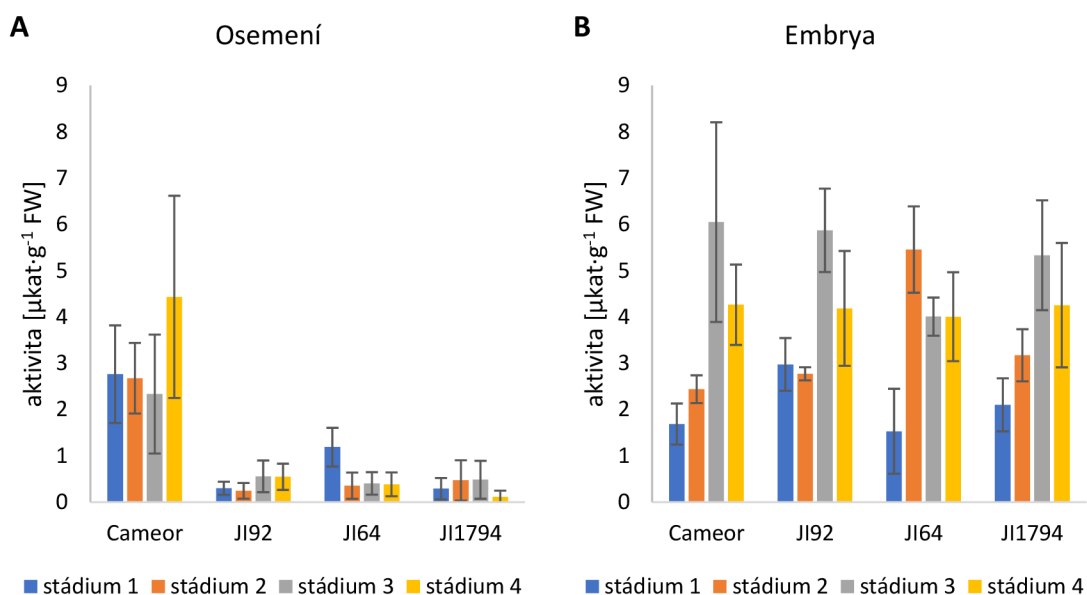


Obr. 16: Aktivita APX v osemení (A) a embryích (B) semen hrachu genotypu Cameor, JI92, JI64 a JI1794 ve čtyřech vývojových stádiích.

Vyhodnocením dat metodou Faktoriální ANOVA (příloha Tab. 1) bylo potvrzeno, že rozdíly v aktivitě APX v osemení se signifikantně liší mezi jednotlivými genotypy, zatímco v embryích jsou statisticky významné rozdíly mezi vývojovými stádii. Pro porovnání jednotlivých genotypů a vývojových stádií mezi sebou byla data vyhodnocena *post hoc* Bonferroniho testem (příloha Tab. 7) a bylo potvrzeno že aktivita APX v osemení genotypu Cameor je statisticky významně vyšší, než v osemení ostatních genotypů a v průběhu vývoje se aktivita APX významně nemění. V embryích nebyly pozorovány statisticky významné změny v rámci genotypů, v průběhu vývoje aktivita APX ve všech genotypech rostla.

5.7 Aktivita CAT

Aktivita CAT byla stanovena kinetickou spektrofotometrickou metodou, kdy byl sledován pokles koncentrace H_2O_2 katalytickým působením enzymu, doprovázený poklesem absorbance v čase. Stanovení bylo 4x zopakováno, byl vypočten průměr a směrodatné odchylky a data byla shrnuta v grafu (Obr. 17).

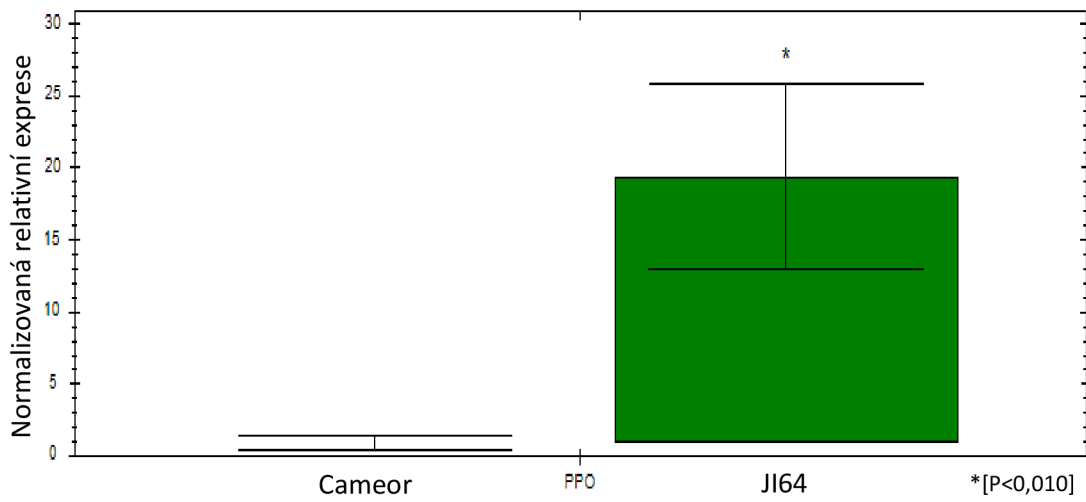


Obr. 17: Aktivita CAT v osemení (A) a embryích (B) semen hrachu genotypu Cameor, JI92, JI64 a JI1794 ve čtyřech vývojových stádiích.

Vyhodnocením dat metodou Faktoriální ANOVA (příloha Tab. 1) bylo potvrzeno, že rozdíly v aktivitě CAT v osemení jsou statisticky významné v závislosti na genotypu, v embryích na vývojovém stádiu. Pro porovnání jednotlivých genotypů a vývojových stádií byla data vyhodnocena *post hoc* Bonferroniho testem (příloha Tab. 8). V osemení byly pozorovány signifikantní rozdíly v aktivitě CAT mezi genotypem Cameor a ostatními genotypy, v průběhu vývoje se aktivity signifikantně nelišily. V embryích nebyly pozorovány významné rozdíly v aktivitě CAT v porovnání mezi jednotlivými genotypy a v průběhu vývoje všech genotypů se zvyšovaly.

5.8 Genová exprese PPO

Pomocí RT-qPCR analýzy byla stanovena exprese genu PPO (*Psat1g206360*) v osemení genotypů Cameor a JI64 ve 2. vývojovém stádiu (Obr. 18). Exprese genu *PPO* v osemení planého genotypu JI64 byla asi 20x vyšší, než v osemení kulturního genotypu Cameor.



Obr. 18: Normalizovaná relativní exprese genu *Psat1g206360* (PPO) v osemeni semen genotypu Cameor a JI64 ve 2. vývojovém stádiu.

5.9 Histochemická lokalizace aktivity POX

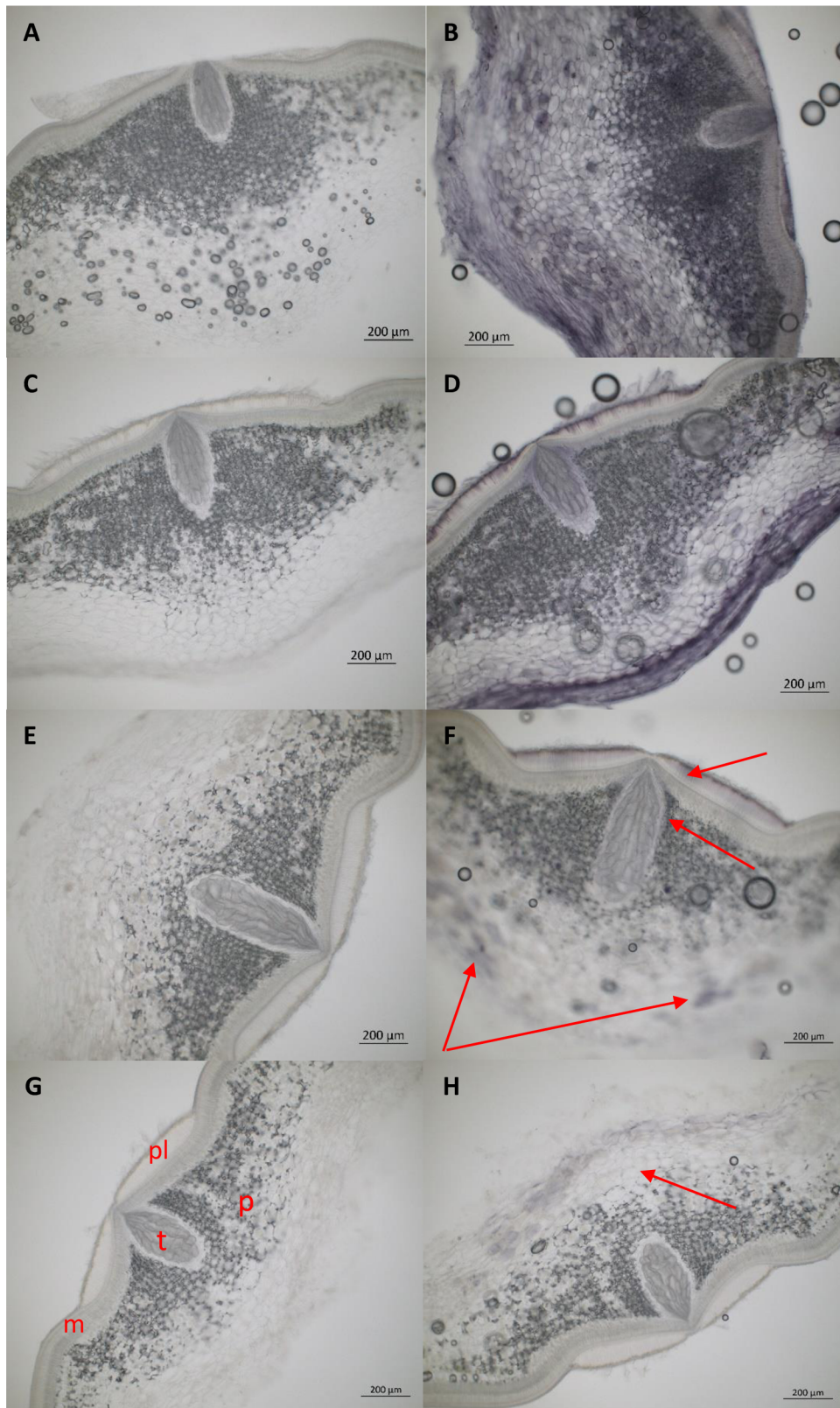
Byla provedena histochemická lokalizace aktivity POX v osemení genotypu Cameor (Obr. 19), JI92 (Obr. 19), JI64 (Obr. 20) a JI1794 (Obr. 20) ve 4 vývojových stádiích.

Byly pozorovány výrazné rozdíly v lokalizaci a aktivitě POX v rámci jednotlivých genotypů i vývojových stádií. Nejintenzivnější signál, tzn. nejvyšší aktivita POX byla detekována v osemení genotypu Cameor (Obr. 19A - D). Peroxidasová aktivita byla histochemicky detekována ve všech strukturách osemení všech vývojových stádií.

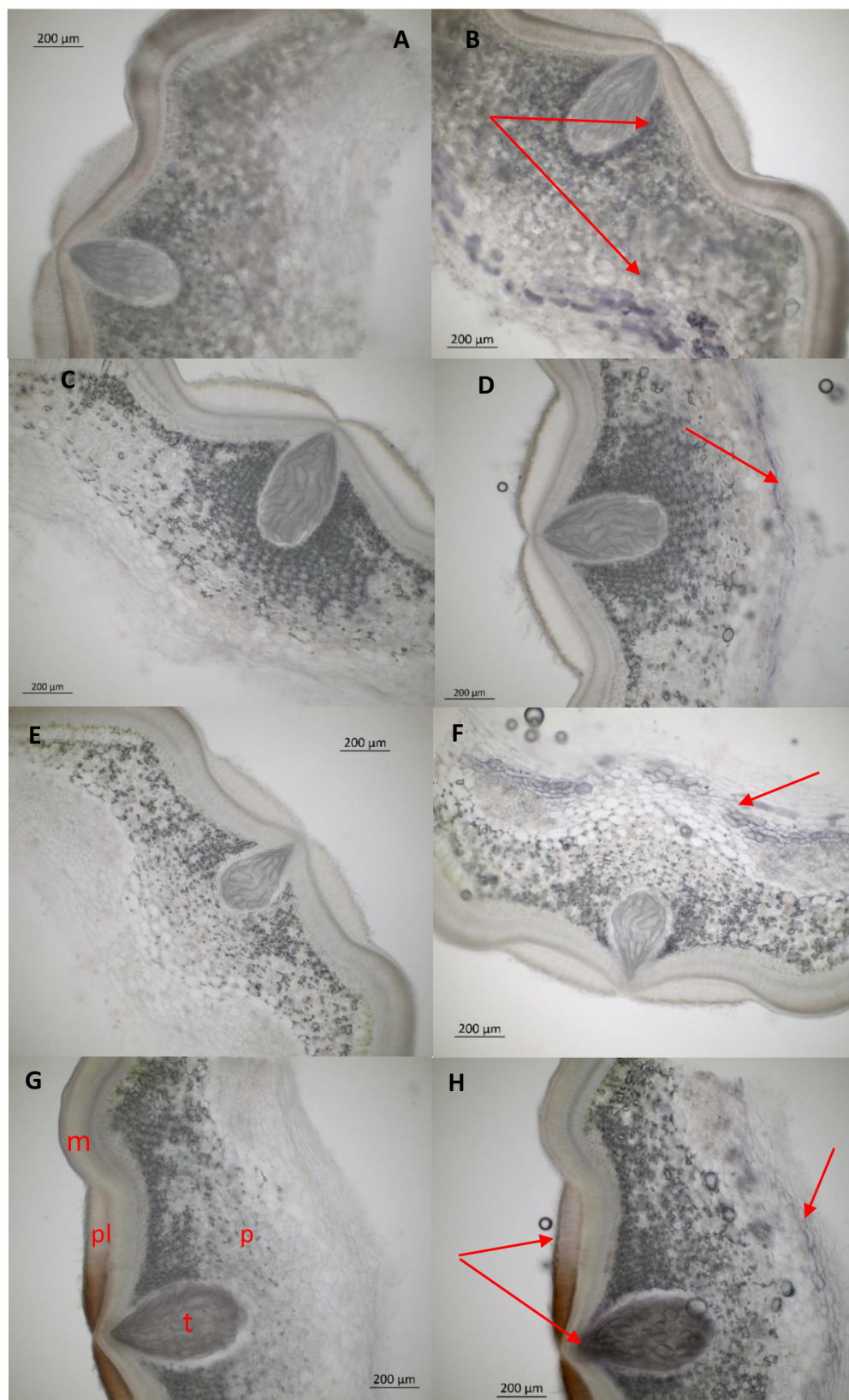
V osemení genotypu JI92 (Obr. 19E-H) byla peroxidasa výrazně méně aktivní, než v osemení genotypu Cameor, nejintenzivnější signály byly pozorovány v 1. vývojovém stádiu (Obr. 19F), kde byly signály pro aktivitu POX pozorovány v oblasti palisádových buněk, v okolí tracheid a v parenchymu. V průběhu vývoje se intenzita snižovala a měnila lokalizace signálu. Ve 4. vývojovém stádiu (Obr. 19G, H) byla POX aktivní už jen ve spodní vrstvě parenchymu.

V osemení genotypu JI64 v 1. vývojovém stádiu (Obr. 20A, B) byl signál pro aktivitu pozorován v okolí tracheid a ve spodní vrstvě parenchymu a byl výrazně slabší, než v osemení genotypu Cameor a výraznější, než v osemení genotypu JI92. Ve 2., 3. a 4. vývojovém stádiu byl signál pozorován pouze ve spodní části parenchymu (Obr. 20C, D).

V osemení genotypu JI1794 v 1. vývojovém stádiu (Obr. 20E, F) byla aktivita POX detekována převážně v oblasti parenchymu. V průběhu vývoje se měnila intenzita a lokalizace signálu. Ve 3. vývojovém stádiu (Obr. 20G, H) byla aktivita POX detekována v oblasti palisádových buněk, kolem štěrbin pupku a v parenchymatické vrstvě.



Obr. 19: Mikroskopické snímky řezu osemením v oblasti pupku genotypu Cameor a JI92 po histochemické lokalizaci aktivity POX. A – Cameor st. 1 kontrola, B – Cameor st. 1 barvení POX, C – Cameor st. 4 kontrola, D – Cameor st. 4 barvení POX, E – JI92 st. 1 kontrola, F – JI92 st. 1 barvení POX, G – JI92 st. 4 kontrola, H – JI92 st. 4 barvení POX. St. – vývojové stádium, p – parenchym, t – tracheidy, m – makrosklereidy, pl – palisádové buňky.



Obr. 20: Mikroskopické snímky řezu osemením v oblasti pupku genotypu JI64 a JI1794 po histochemické lokalizaci aktivity POX. A – JI64 st. 1 kontrola, B – JI64 st. 1 barvení POX, C – JI64 st. 4 kontrola, D – JI64 st. 4 barvení POX, E – JI1794 st. 1 kontrola, F – JI1794 st. 1 barvení POX, G – JI1794 st. 3 kontrola, H – JI1794 st. 3 barvení POX. St. – vývojové stádium, p – parenchym, t – tracheidy, m – makrosklereidy, pl – palisádové buňky.

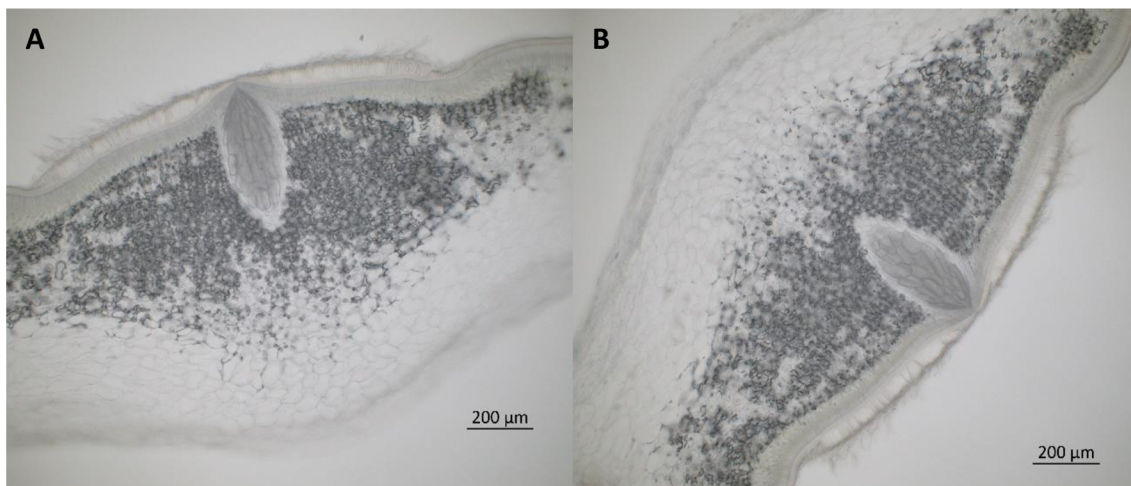
5.10 Histochemická lokalizace aktivity PPO

Byla provedena histochemická lokalizace aktivity PPO v osemeni genotypu Cameor (Obr. 21), JI92 (Obr. 22), JI64 (Obr. 23) a JI1794 (Obr. 24) ve 4 vývojových stádiích.

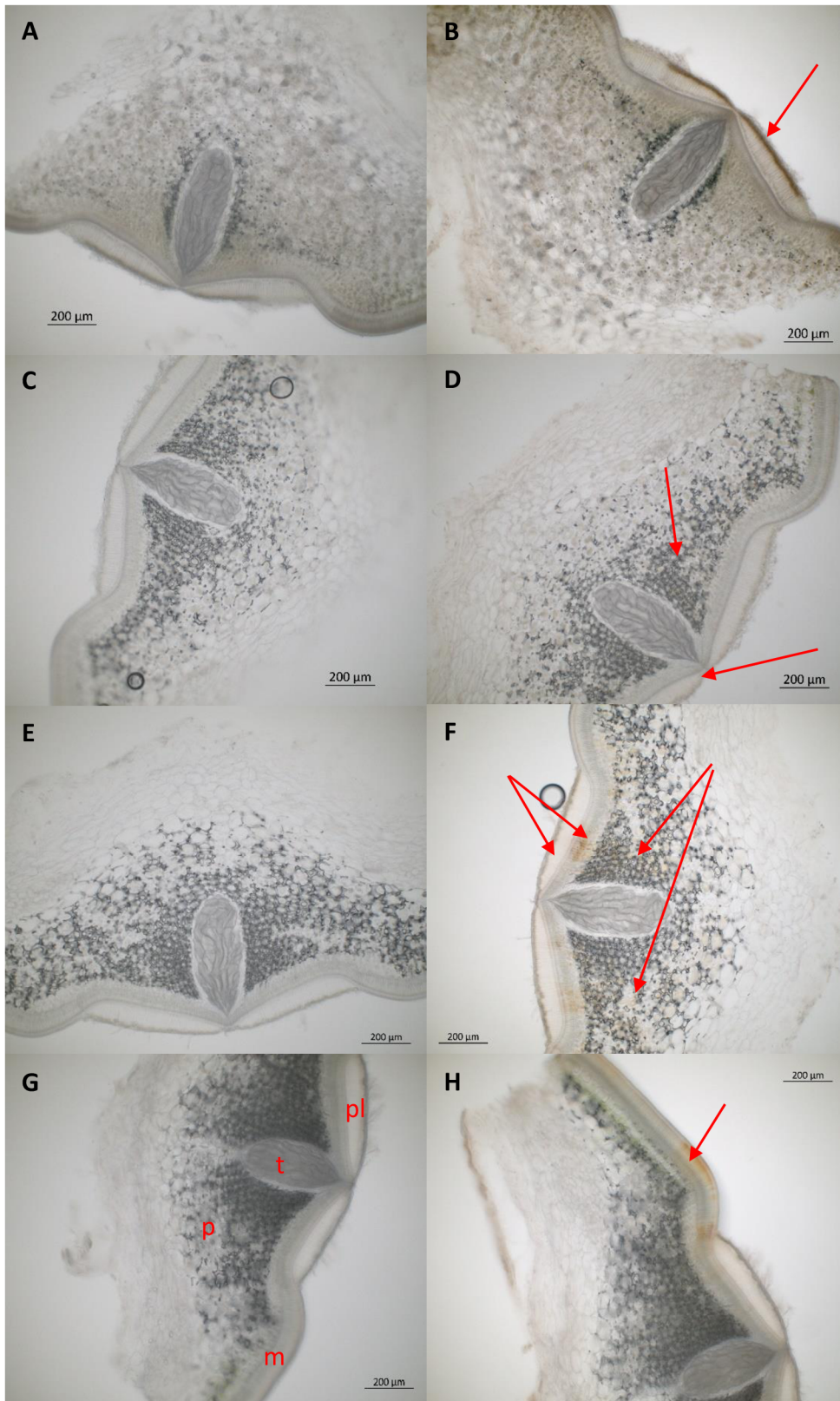
V osemeni genotypu Cameor nebyla detekována PPO aktivita v žádném z vývojových stádií. Pro demonstraci jsou ukázány fotografie osemení ve 4. vývojovém stádiu před a po barvení na POX aktivitu (Obr. 21).

V osemeni genotypu JI92 (Obr. 22) byla intenzita signálu pro aktivitu PPO vysoká v 1. vývojovém stádiu, zejména v horní vrstvě palisádových buněk ve 2. vývojovém stádiu byly signály slabší a opět se zvýšily ve 3. a 4. vývojovém stádiu, kde byla PPO nejaktivnější ve vrstvě makroklereid a palisádových buněk.

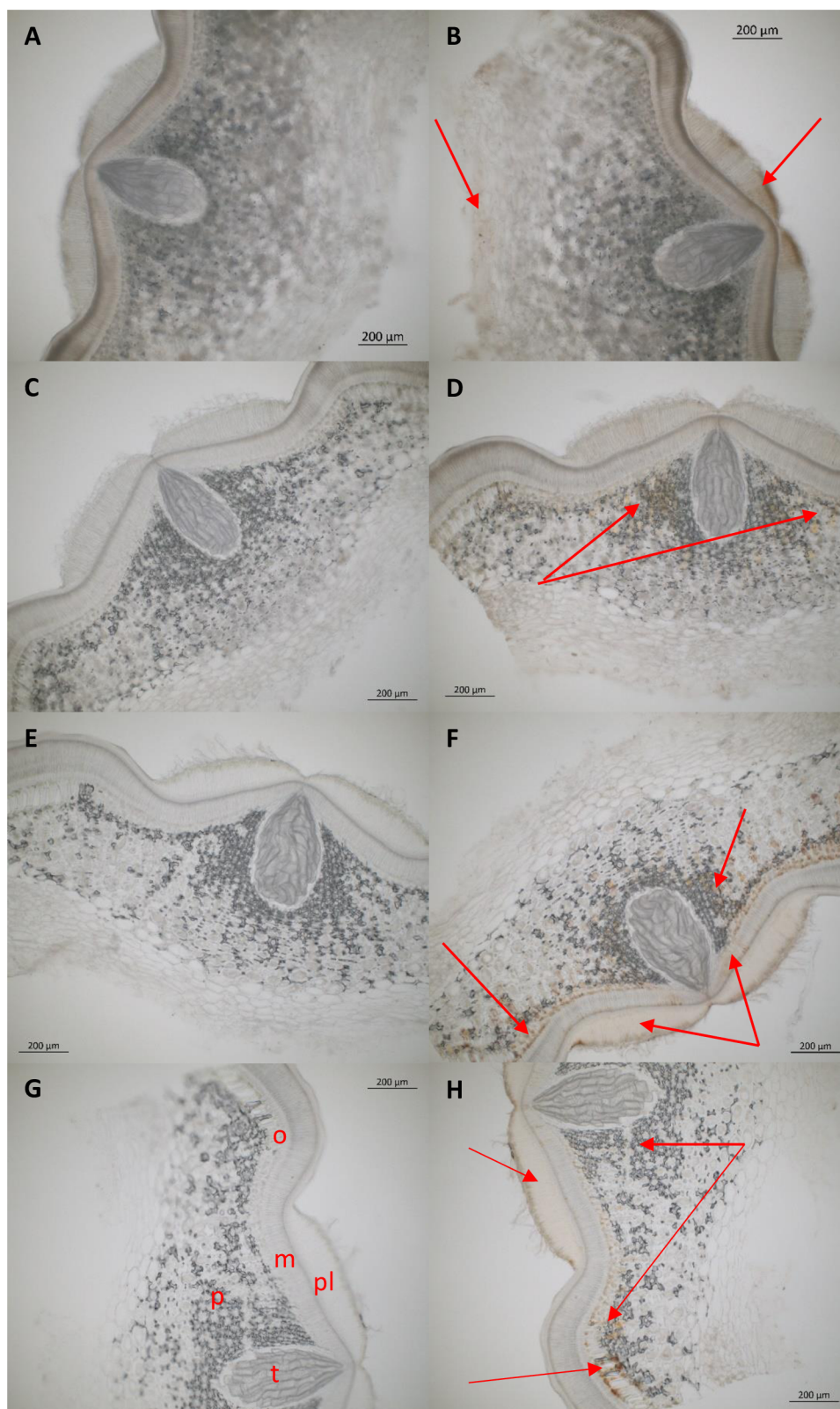
V osemeni genotypu JI64 (Obr. 23) byla PPO aktivní ve všech vývojových stádiích, měnila se intenzita a lokalizace signálu. V 1. vývojovém stádiu (Obr. 23A, B) byla aktivita PPO pozorována hlavně v oblasti palisádových buněk a parenchymu. Ve 2. vývojovém stádiu byla aktivita PPO lokalizována ve všech strukturách osemení v oblasti pupku, nejvyšší intenzita signálu byla zaznamenána v oblasti horní palisády, makroklereid a osteoklereid. Ve 3. vývojovém stádiu (Obr. 23E, F) bylo intenzivní zbarvení pozorováno v oblasti parenchymu a osteoklereid, kde byla PPO nejaktivnější, a dále v oblasti palisádových buněk a vrstvy makroklereid. Ve 4. vývojovém stádiu (Obr. 23G, H) byla intenzita zbarvení menší a signály byly pozorovány hlavně v oblasti osteoklereid, palisádových buněk a buněk parenchymu. U genotypu JI1794 (Obr. 24) byly pozorovány velmi podobné výsledky jako u JI64. Signály byly pozorovány ve všech vrstvách osemení, tedy v oblasti palisádových buněk, makroklereid a parenchymu, v průběhu vývoje se intenzita signálu zvyšovala a PPO byla aktivní také v oblasti osteoklereid.



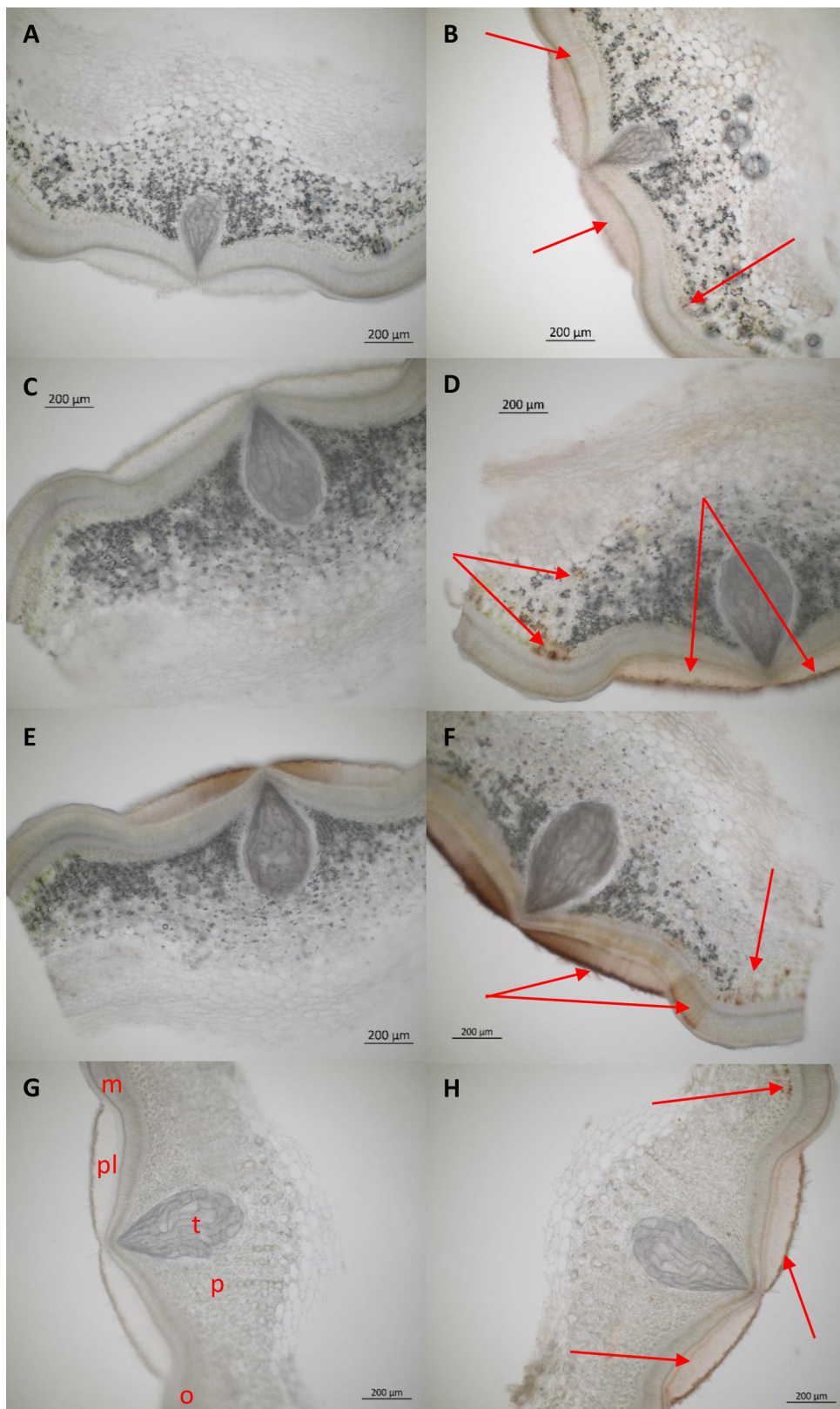
Obr. 21: Mikroskopické snímky řezu osemením v oblasti pupku genotypu Cameor po histochemické lokalizaci aktivity PPO. A – Cameor stádium 4 kontrola, B – Cameor stádium 4 barvení PPO.



Obr. 22: Mikroskopické snímky řezu osetním v oblasti pupku genotypu JI92 po histochemické lokalizaci aktivity PPO. A – JI92 st. 1 kontrola, B – JI92 st. 1 barvení PPO, C – JI92 st. 2 kontrola, D – JI92 st. 2 barvení PPO, E – JI92 st. 3 kontrola, F – JI92 st. 3 barvení PPO, G – JI92 st. 4 kontrola, H – JI92 st. 4 barvení PPO. St. – vývojové stádium, pl – palisádové buňky, t – tracheidy, p – parenchym, m – makroklereidy.



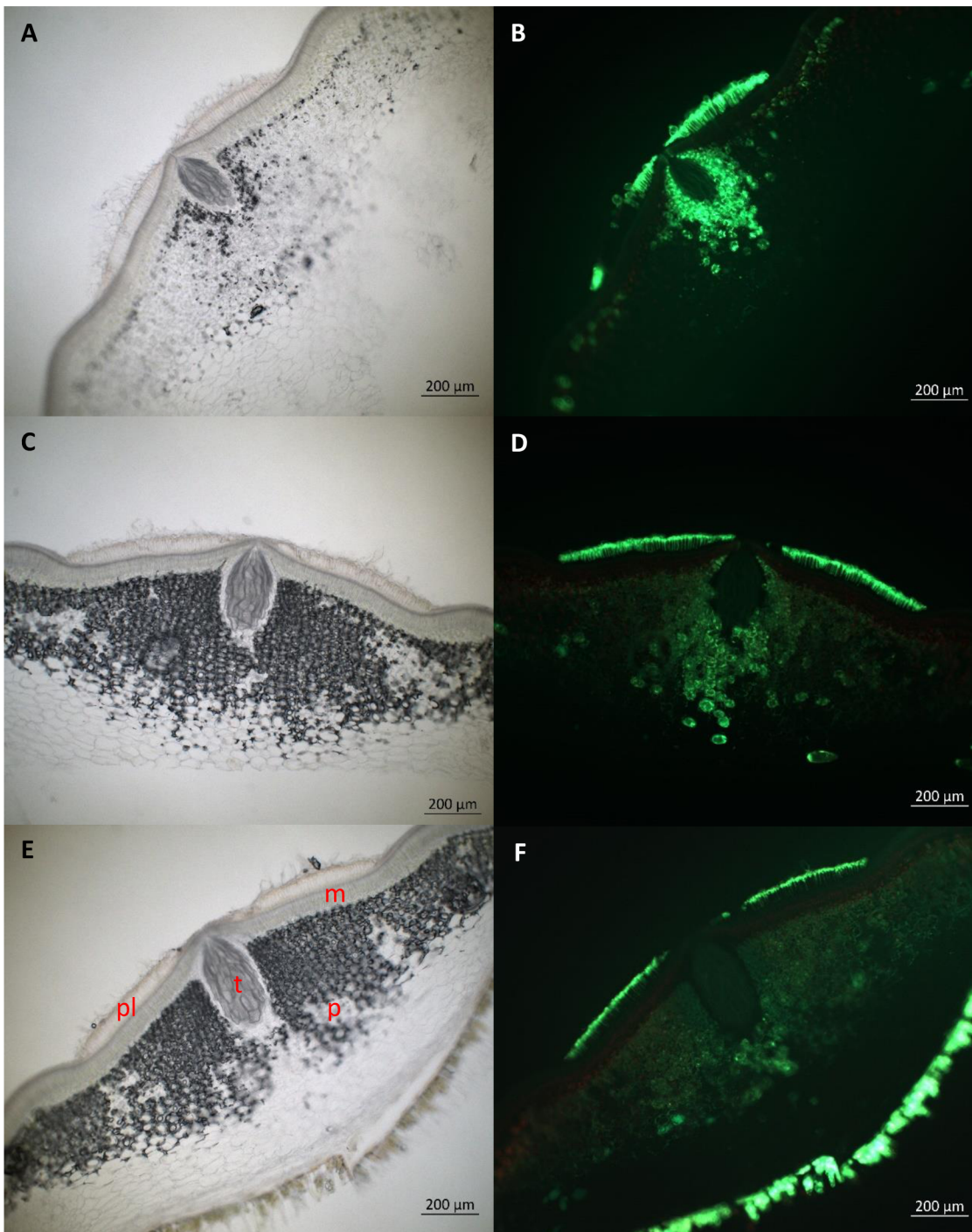
Obr. 23: Mikroskopické snímky řezu osemením v oblasti pupku genotypu JI64 po histochemické lokalizaci aktivity PPO. A – JI64 st. 1 kontrola, B – JI64 st. 1 barvení PPO, C – JI64 st. 2 kontrola, D – JI64 st. 2 barvení PPO, E – JI64 st. 3 kontrola, F – JI64 st. 3 barvení PPO, G – JI64 st. 4 kontrola, H – JI64 st. 4 barvení PPO. St. – vývojové stádium, pl – palisádové buňky, t – tracheidy, m – makrosklereidy, p – parenchym, o – osteosklereidy.



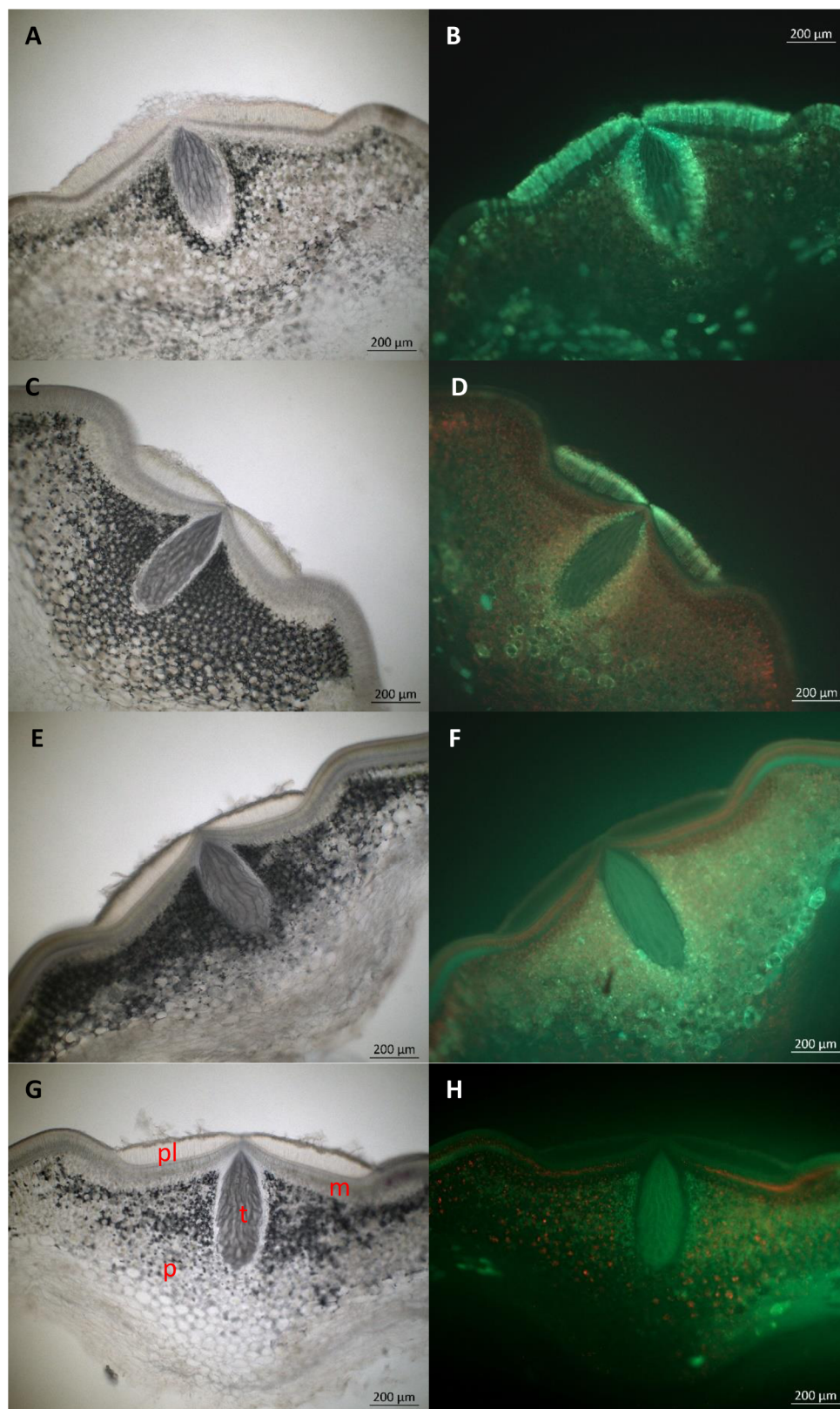
Obr. 24: Mikroskopické snímky řezu osemněním v oblasti pupku genotypu JI1794 po histochemické lokalizaci aktivity PPO. A – JI1794 st. 1 kontrola, B – JI1794 st. 1 barvení PPO, C – JI1794 st. 2 kontrola, D – JI1794 st. 2 barvení PPO, E – JI1794 st. 3 kontrola, F – JI1794 st. 3 barvení PPO, G – JI1794 st. 4 kontrola, H – JI1794 st. 4 barvení PPO. St. – vývojové stádium, m – makrosklereidy, p – parenchym, o – osteosklereidy, pl – palisádové buňky, t – tracheidy.

5.1 Histochemická lokalizace reaktivních forem kyslíku (ROS)

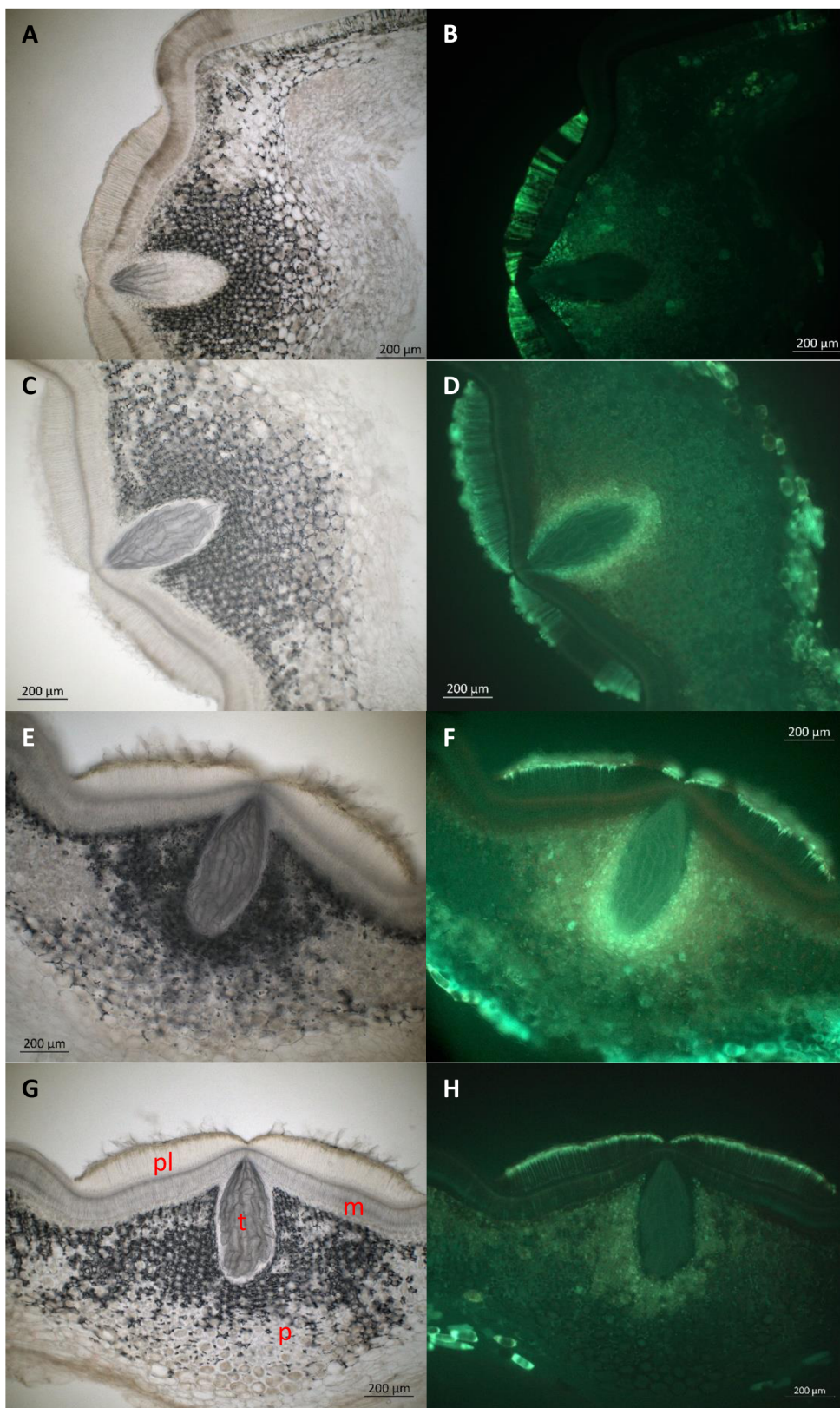
Byla provedena histochemická lokalizace ROS za použití fluorescenční sondy H₂DCF DA v osemeni genotypu Cameor (Obr. 25), JI1794 (Obr. 28) ve 3 vývojových stádiích a osemeni JI92 (Obr. 26) a JI64 (Obr. 27) ve 4 vývojových stádiích. Lokalizace produkce ROS u všech studovaných genotypů se v rámci vývoje měnila. Souhrnně lze říci, že v raných fázích vývoje docházelo k významné produkci ROS v palisádových buňkách a parenchymu v oblasti kolem tracheid (Obr. 25B; 26B; 27B, D). S postupným dozráváním semen byl signál pro ROS detekován pouze v horní vrstvě palisádových buněk (Obr. 25F, 26D, 27F, H, 28B). Významná produkce ROS byla také lokalizována ve spodní vrstvě parenchymu, kde dochází ke kontaktu osemení s embryem (Obr. 25F; 27D, F, H; 28B). V posledních fázích vývoje semen genotypů JI92 a JI1794 nebyla tvorba ROS detekována vůbec (Obr. 26H, 28F).



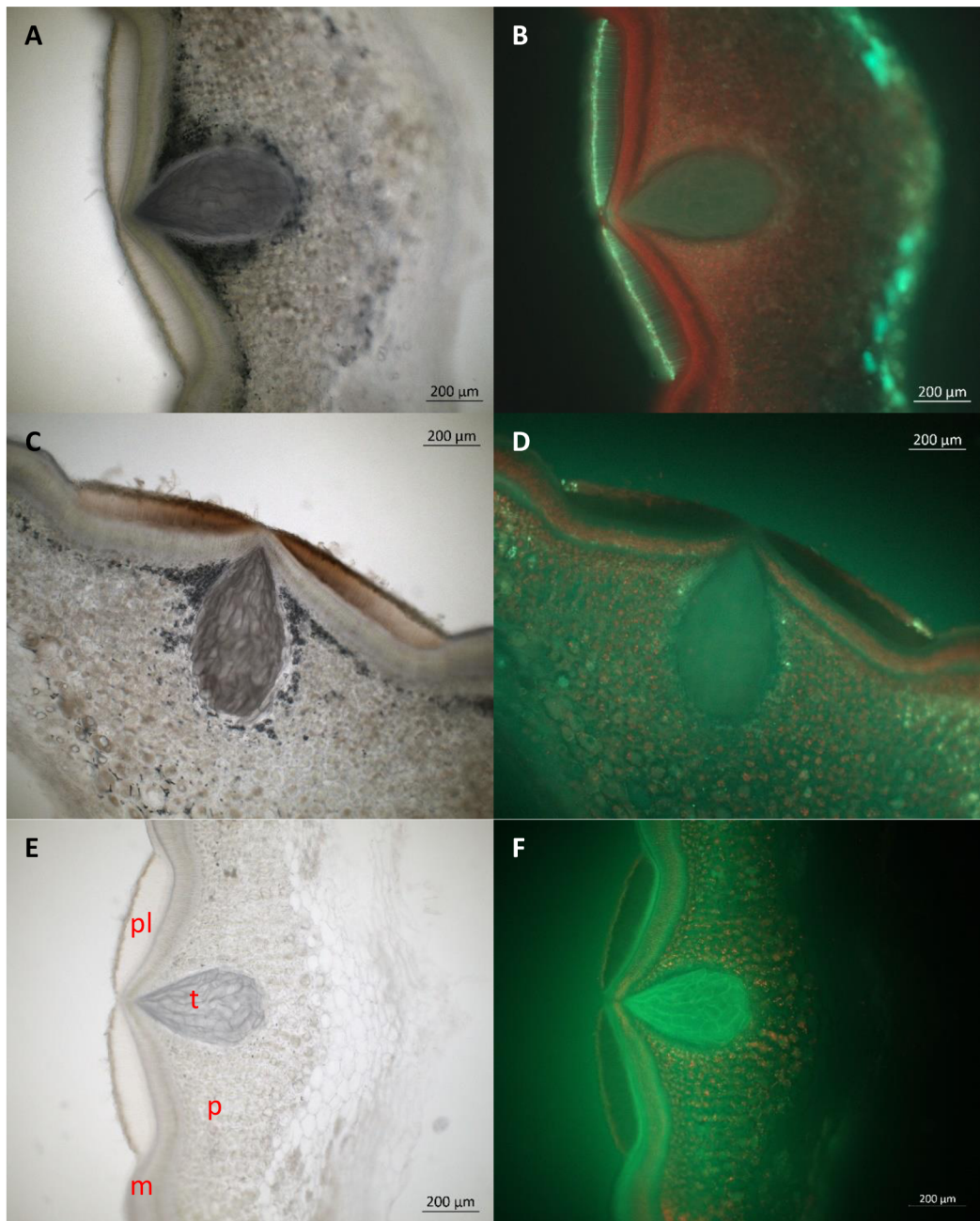
Obr. 25: Mikroskopické snímky řezu osemením v oblasti pupku genotypu Cameor po histochemické lokalizaci ROS s využitím fluorescenční sondy H₂DCF DA. A – Cameor st. 1 kontrola, B – Cameor st. 1 barvení ROS, C – Cameor st. 2 kontrola, D – Cameor st. 2 barvení ROS, E – Cameor st. 3 kontrola, F – Cameor st. 3 barvení ROS. St. – vývojové stádium, pl – palisádové buňky, p – parenchym, m – makrosklereidy, t – tracheidy.



Obr. 26: Mikroskopické snímky řezu osemením v oblasti pupku genotypu JI92 po histochemické lokalizaci ROS s využitím fluorescenční sondy $H_2DCF\ DA$. A – JI92 st. 1 kontrola, B – JI92 st. 1 barvení ROS, C – JI92 st. 2 kontrola, D – JI92 st. 2 barvení ROS, E – JI92 st. 3 kontrola, F – JI92 st. 3 barvení ROS, G – JI92 st. 4 kontrola, H – JI92 st. 4 barvení ROS. St. – vývojové stádium, pl – palisádové buňky, t – tracheidy, p – parenchym, m – makrosklereidy.



Obr. 27: Mikroskopické snímky řezu osemením v oblasti pupku genotypu JI64 po histochemické lokalizaci ROS s využitím fluorescenční sondy H_2DCF DA. A – JI64 st. 1 kontrola, B – JI64 st. 1 barvení ROS, C – JI64 st. 2 kontrola, D – JI64 st. 2 barvení ROS, E – JI64 st. 3 kontrola, F – JI64 st. 3 barvení ROS, G – JI64 st. 4 kontrola, H – JI64 st. 4 barvení ROS. St. – vývojové stádium, pl – palisádové buňky, m – makrosklereidy, t – tracheidy, p – parenchym.



Obr. 28: Mikroskopické snímky řezu osemením v oblasti pupku genotypu JI1794 po histochemické lokalizaci ROS s využitím fluorescenční sondy H₂DCF DA. A – JI1794 st. 2 kontrola, B – JI1794 st. 2 barvení ROS, C – JI1794 st. 3 kontrola, D – JI1794 st. 3 barvení ROS, E – JI1794 st. 4 kontrola, F – JI1794 st. 4 barvení ROS. St – vývojové stádium, pl – palisádové buňky, t – tracheidy, p – parenchym, m - makrosklereidy.

6 DISKUSE

Předložená diplomová práce se věnuje studiu zapojení možných mechanismů, které se podílejí na regulaci koncentrace ROS v průběhu vývoje semen u kulturních a planých genotypů hrachu, lišících se pigmentací semen a mírou dormance. Jak bylo uvedeno v teoretické části, vývoj semen je geneticky naprogramovaný proces. Zahájení vývoje, následné dozrávání semene a ukládání zásobních látek spouští velmi komplexní regulační síť, jejíž součástí jsou změny transkripční, metabolické i fyziologické, řízené změnami hladin sacharidů a regulované hormonálními drahami (Weber et al., 2005). Semeno hrachu v průběhu svého vývoje prochází několika vývojovými a růstovými fázemi, v rámci kterých dochází ke změnám v obsahu vody a dalších metabolitů (Malovichko et al., 2021). V raných fázích vývoje semen je pro transport metabolitů do semene nezbytný dostatečný přísun vody, v pozdějších fázích, v průběhu zrání, dochází k rozsáhlé dehydrataci. Aby se semeno na tyto změny v obsahu vody adaptovalo, je potřeba přesné kontroly produkce, akumulace a metabolismu mimo jiné právě reaktivních forem kyslíku (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008).





Předložená diplomová práce se věnuje studiu zapojení možných mechanismů, které se podílejí na regulaci koncentrace ROS v průběhu vývoje semen u kulturních (Cameor, JI92) a planých (JI64, JI1794) genotypů hrachu, lišících se pigmentací semen a mírou dormance. Pro dormantní (fyzikální dormance) genotypy je typický vznik tvrdého, pro vodu nepropustného osemení, s čímž souvisí jeho struktura a chemické složení (Hradilová et al., 2017, Jánská et al., 2019). Na syntézu látek přispívajících k nepropustnosti osemení by tak mohly mít vliv také ROS. Rovnováha koncentrace ROS je udržována enzymovými a neenzymovými mechanismy (Bailly, 2004). Role ROS ve fyziologické dormanci a klíčení semen byla již studována a popsána (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008; Kumar et al., 2015; Bailly, 2019), na rozdíl od procesů spojených s vývojem a dozráváním semen.

Porovnáním vybraných parametrů, jako je produkce ROS a zapojení celé škály antioxidantních systémů do metabolismu ROS, v rámci vývoje semen kulturních (Cameor, JI92) a planých (JI64, JI1794) genotypů hrachu ve 4 vývojových stádiích (13 DAP – 1. vývojové stádium, 16 DAP – 2. vývojové stádium, 21 DAP – 3. vývojové stádium a 23 DAP – 4. vývojové stádium) bychom mohli získat komplexnější pohled na zapojení ROS ve vývoji dormantních a nedormantních semen, a jejich roli v ustavení tohoto dosud stále

málo popsaného typu dormance. Měřené parametry jsou v případě zvolených 4 genotypů (uvedených výše) stanoveny jak v osemení, tak embryu.

Pro větší přehlednost bylo porovnání všech studovaných parametrů shrnuto v Tab. 6.

Tab. 6: Přehled vlastností a semikvantitativní porovnání sledovaných parametrů v osemení genotypů Cameor, JI92, JI64 a JI1794. TAC – celková antioxidační kapacita, PPO – polyfenoloxidas, POX – peroxidasa, APX – askorbátperoxidasa, CAT – katalasa.

Druh	<i>P. sativum</i>				<i>P. elatius</i>			
Genotyp	Cameor		JI92		JI64		JI1794	
Kulturní/planý	Kulturní				Planý			
Dormantní/nedormantní	Nedormantní				Dormantní			
Pigmentace osemení	NE		ANO		ANO		ANO	
Pigmentace pupku	NE				ANO			
Vzhled								
	Osemení	Embryo	Osemení	Embryo	Osemení	Embryo	Osemení	Embryo
TAC	+	+	+++	+	++++	+	+++	+
Fenoly	+	+	+++	+	++++	+	+++	+
Flavonoidy	+	+	++	+	++++	+	+++	+
PPO	+	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
POX	++++	+	+	+	+	+	+	+
APX	++++	++	+	++	+	++	+	++
CAT	+++	++++	+	++++	+	++++	+	++++

Detekované parametry, jako je intenzita antioxidační kapacity, zastoupení fenolů a s tím spojená PPO aktivita, stanovené v osemeni a embryích při porovnání 4 genotypů hrachu spolu úzce korelují. Nízké hodnoty daných parametrů byly detekované v embryích všech čtyř genotypů hrachu. V embryích se celková antioxidační kapacita ani hladina fenolů neliší v rámci genotypů, ani v rámci vývojových stádií a je významně nižší, než celková antioxidační kapacita v osemeni JI92, JI64 a JI1794. Můžeme tedy říci, že pro vývoj embrya nejsou fenolické látky tak významné, jako v případě osemeni. Nižší antioxidační kapacita v embryích může být také spojena s nižší potřebou ochrany tohoto orgánu před vnějšími vlivy. Tuto ochrannou funkci zajišťuje právě osemeni (Smýkal et al., 2014), proto lze předpokládat, že v osemeni bude více antioxidantů přispívajících k ochraně semen proti nepříznivým vnějším vlivům a různým typům stresů.

V případě osemeni byly poměrně nízké hodnoty antioxidační kapacity a koncentrace fenolů pouze u genotypu Cameor. Naopak u ostatních genotypů, pro které je charakteristická intenzivní pigmentace osemeni, byla stanovena vysoká antioxidační kapacita, vysoká hladina fenolů a v osemeni planých genotypů navíc vysoká aktivita PPO. Nejvyšší hodnoty byly detekovány v osemeni planého dormantního genotypu JI64. Výsledky tedy poukazují na to, že na antioxidační kapacitě osemeni se podílejí zejména fenoly, které rovněž hrají významnou roli při pigmentaci osemeni. Rozdíly v intenzitě antioxidační kapacity a zastoupení fenolických sloučenin mezi genotypem Cameor, který má nepigmentované osemeni a ostatními studovanými genotypy s pigmentovaným osemením, poukazuje na signifikantní roli fenolických sloučenin v rámci antioxidační ochrany pigmentovaných semen. Předpokládá se, že pigmentace osemeni koreluje s mírou imbibice vody semeny různých druhů luskovin. Hnědé zbarvení osemeni v průběhu dozrávání je spojováno s nepropustností semene pro vodu (Marbach a Mayer, 1974; Werker et al., 1979). Vyšší aktivita a exprese PPO, související s vyšší koncentrací fenolů v osemeni byla v naší studii detekována především v osemeni pigmentovaných dormantních genotypů, toto pozorování je v souladu s výsledky publikovanými ve studii Balarynová et al., 2022. Fenolické látky jsou substrátem PPO, enzymu, který katalyzuje *o*-hydroxylaci monofenolů nebo konverzi difenolů na *o*-dichinony (Glagoleva et al., 2020). Tyto látky podléhají neenzymové polymeraci nebo interagují s proteiny za vzniku vysokomolekulárních melaninových pigmentů (Glagoleva et al., 2020), které jsou přítomny právě v pigmentovaném osemeni.

U pigmentovaných genotypů JI92, JI64 a JI1794 korelují změny hladin fenolů a intenzita antioxidační kapacity i v průběhu vývoje, zatímco u genotypu Cameor nejsou

v průběhu vývoje pozorovány výraznější rozdíly. U genotypů JI92, JI64 byl v rámci vývoje zaznamenán postupný nárůst koncentrace fenolů a současně i intenzity antioxidační kapacity v osemení, v případě genotypu JI1794 byl naopak v průběhu vývoje detekován pokles hodnot obou parametrů. Násobně vyšší koncentrace fenolických látek v osemení pigmentovaných genotypů hrachu byla pozorovaná také ve studii Troszyńska & Ciska, 2002 a Hradilová et al., 2019, Balarynová et al., 2022.

Jak bylo dříve zmíněno, PPO katalyzuje oxidaci fenolických látek, vedoucí ke vzniku vysokomolekulárních melaninových pigmentů. Vznikají tak komplexy, přispívající k nepropustnosti osemení pro vodu (Glagoleva et al., 2020). Tyto melaninové komplexy jsou přítomné v pigmentovaném osemení hlavně planých genotypů hrachu (JI64, JI1794), ale také v osemení kulturního pigmentovaného genotypu (JI92), který ale na rozdíl od JI64 a JI1794 nemá pigmentovaný pupek. Pigmentace osemení a nepropustnost osemení pro vodu je spojována mimo jiné také s aktivitou PPO (Werker et al., 1979), v poslední době se tak diskutuje podíl PPO na ustavení fyzikální dormance. Dle výsledků práce Balarynová et al., 2022 je gen pro PPO nefunkční ve většině kulturních genotypů hrachu a jeho nefunkčnost se projevuje krémově zbarveným pupkem. Naopak všechny plané genotypy hrachu mají gen *PPO* funkční a pupek semen tmavý. Na pigmentaci osemení by se tak mohly podílet také další enzymy, např. lakasa (benzenediol:kyslík oxidoreduktasa, EC 1.10.3.2) (Ma et al., 2009) či POX (Banci et al., 1999). Dle předpokladu byla aktivita PPO vyšší v osemení než v embryích. V embryích se aktivita PPO mezi jednotlivými genotypy a vývojovými stádii výrazně nelišila. V osemení byla dle předpokladů aktivita PPO výrazně vyšší v planých genotypech (JI64, JI1794) než v kulturních (Cameor, JI92). V osemení genotypu JI92 aktivita PPO ve 2. vývojovém stádiu klesla a dále v průběhu vývoje rostla. V genotypu JI64 aktivita klesala až do 3. vývojového stádia a následně vzrostla, stejný trend byl pozorován u genotypu JI1794. Byla provedena také analýza exprese genu *PPO*, která potvrdila výsledky spektrofotometrického stanovení aktivity PPO v osemení, kdy v genotypu Cameor (genotyp s nepigmentovaným osemením) byla detekována výrazně nižší aktivita PPO, než v genotypech s pigmentovaným osemením (JI92, JI64 a JI1794).

Výsledky spektrofotometrického stanovení aktivity PPO a exprese genu *PPO* podpořily také výsledky histochemické detekce aktivity tohoto enzymu. Dle předpokladu v osemení genotypu Cameor nebyly pozorovány žádné signály pro aktivitu PPO. U genotypů s pigmentovaným osemením byly aktivity PPO pozorovány v různé intenzitě. Nejintenzivnější signály byly pozorovány v osemení genotypů JI64 a JI1794,

tedy planých genotypech s pigmentovaným oseměním. Signály byly pozorovány v palisádových buňkách v oblasti pupku, ale také v makrosklereidách a parenchymu. V pozdějších stádiích vývoje byl intenzivní signál lokalizován v oblasti osteosklereid. Lokalizace PPO také v palisádových buňkách, makrosklereidách a osteosklereidách vede k ukládání vznikajících melaninových nerozpustných komplexů, které přispívají k nepropustnosti oseměni (Marbach a Mayer, 1974) a mohou se také podílet na obraně semen proti patogenům a nepříznivým vlivům prostředí (Fuerst et al., 2014; Zhang & Sun, 2021). Signály pro aktivitu PPO byly pozorovány také v oseměni genotypu JI92, kde byly spektrofotometricky naměřené aktivity nízké a gen pro PPO není dle studie Balarynová et al., 2022 aktivní, detekované signály by mohly znamenat nespecifické barvení, katalyzované jiným enzymem než PPO.

V oseměni a embryích studovaných genotypů byla dále stanovena celková koncentrace flavonoidů v různých vývojových stádiích. Flavonoidy jsou sekundární metabolity hojně se vyskytující v rostlinách, mimo jiné také v plodech a semenech (Dias et al., 2021). Jsou často spojovány s barvou a vůní a v rostlinách plní řadu funkcí. Podílejí se na regulaci buněčného růstu, plní funkci signálních molekul, díky jejich struktuře fungují jako UV filtr, vylučují ROS a hrají roli v ustavení tolerance vůči extrémním podmínkám jako je sucho, vysoké nebo naopak nízké teploty atd. (Dias et al., 2021) a jsou substrátem PPO a prekurzorem melaninových pigmentů (Fei et al., 2021). Naměřená koncentrace flavonoidů ve studovaných genotypech hrachu je výrazně nižší, než koncentrace fenolických látek. V oseměni byla detekována nejnižší koncentrace flavonoidů u genotypu Cameor, pigmentované genotypy vykazovaly vyšší obsah flavonoidů. V embryích jsou tyto látky obsaženy v podobných nebo vyšších koncentracích, než v oseměni. Díky jejich schopnostem vylučovat ROS (Brunetti et al., 2013), by mohly v embryích působit jako antioxidanty a podílet se na regulaci vývoje, tomu napovídají i změny v jejich koncentraci v jednotlivých vývojových stádiích.

Dalším sledovaným parametrem byla aktivita POX. POX je enzym, který se podílí na regulaci hladiny H_2O_2 , k odbourání H_2O_2 využívá jako donory elektronů nízkomolekulární antioxidanty (Kohen a Nyska, 2002). H_2O_2 je zapojen v indukci exprese genů, kódujících ochranné proteiny, transkripční faktory, fosfatasy, kinasy a enzymy zapojené v syntéze a degradaci ROS. H_2O_2 hraje roli v ukládání ligninu v buněčných stěnách v reakci katalyzované POX (Asthir et al., 2002). Předpokládá se, že POX tedy bude aktivní hlavně ve fázích vývoje, kdy je metabolismus hodně aktivní, a aktivita se bude v rámci vývojových stádií lišit. Např. během embryogeneze dochází ke

zvýšení míry metabolické aktivity, mimo jiné mitochondriální respirace, a dochází tak ke vzniku velkého množství ROS (Kairong et al., 1999). Z porovnání aktivity POX mezi osemením a embryi v průběhu vývoje vyplývá, že vývoj těchto orgánů probíhá odlišně. V případě osemení je aktivita POX obecně nejvyšší v prvních fázích vývoje a postupně klesá, osemení je tedy nejvíce metabolicky aktivní v raných fázích vývoje a poté už k výrazným změnám nedochází. Zatímco v případě embryí aktivita POX v průběhu vývoje roste. Hlavní rolí embrya je akumulace zásobních látek a aktivita metabolismu se tak v průběhu dozrávání zvyšuje. Porovnáním aktivity POX v osemení bylo zjištěno, že POX je násobně aktivnější v osemení genotypu Cameor v porovnání s ostatními genotypy a je také násobně vyšší než v embryích genotypu Cameor, což by mohlo souviset s větší velikostí semen, oproti ostatním genotypům. Semena genotypu Cameor jsou výrazně větší než semena JI92, JI64 a JI1794, což naznačuje také vyšší míru růstu, a tedy i aktivitu metabolismu, při kterém vznikají ROS. Další možností by mohlo být, že POX v osemení Cameor svou aktivitou nahrazuje nefunkční PPO, s níž využívají podobné substráty.

Aktivita POX byla v osemení sledována také histochemicky barvením s 4-chlor-1-naftolem. Intenzita fialového zabarvení odpovídající vznikajícímu oxidovanému chlornaftolu korelovala s trendem pozorovaným pro spektrofotometrické stanovení aktivity POX v osemení. POX byla neaktivnější v osemení genotypu Cameor, v ostatních genotypech byla intenzita signálů pro aktivitu POX výrazně slabší. V průběhu vývoje jednotlivých genotypů se měnila lokalizace a intenzita signálů. V osemení genotypu Cameor byla POX detekována ve všech vrstvách osemení, v ostatních genotypech hlavně v parenchymu a palisádových buňkách, které jsou pozůstatkem poutka, a kolem štěrbiny pupku.

Dále byla v práci stanovena také aktivita APX. APX katalyzuje redukci H_2O_2 , jako donor elektronů tento enzym využívá askorbát (Asada, 1992), a účastní se tak regulace koncentrace ROS. V osemení genotypu Cameor byla naměřená aktivita APX násobně vyšší, než v osemení ostatních genotypů. Byl pozorován podobný trend jako v aktivitě POX, kde byla POX výrazně aktivnější také v osemení genotypu Cameor. Nejnižší aktivita APX byla naměřena v osemení genotypu JI92, mezi genotypy JI64 a JI1794 nebyly rozdíly v aktivitě APX významné. U všech genotypů, s výjimkou genotypu Cameor, aktivita APX v osemení v průběhu vývoje stejně jako u POX aktivita APX klesala. V embryích se aktivita APX nelišila mezi jednotlivými genotypy, ale byly pozorovány rozdíly v průběhu vývoje, aktivita APX narůstala u všech genotypů.

Třetím studovaným antioxidačním enzymem byla CAT, enzym katalyzující rozklad H_2O_2 v peroxisomech v rámci procesu fotorespirace a β -oxidace mastných kyselin (Anjum et al., 2016). Aktivity CAT v osemení jednotlivých genotypů se lišily, nejvyšší aktivitu CAT dosahovala v genotypu Cameor, kde je aktivita CAT násobně vyšší než v ostatních genotypech, což opět naznačuje vyšší metabolickou aktivitu osemení genotypu Cameor, oproti pigmentovaným genotypům JI92, JI64 a JI1794. Aktivita CAT byla porovnávána i v rámci osemení a embryí, kdy v embryích byla vyšší, než v osemení. Aktivita CAT se v embryích v průběhu vývoje zvyšovala.

Byla provedena histochemická lokalizace ROS v osemení genotypů Cameor, JI92, JI64 a JI1794. V průběhu vývoje se měnila intenzita a lokalizace signálů ROS. U všech genotypů byly nejvýraznější signály pro ROS pozorovány hlavně v oblasti palisádových buněk, které jsou pozůstatkem poutka, a v buňkách parenchymu obklopujících tracheidy, což naznačuje aktivní metabolismus právě v těchto oblastech. Jedním z diskutovaných efektů ROS, je jejich role v senescenci a opadu listů a dalších rostlinných orgánů včetně semen (Zentgraf et al., 2022). Vysoká koncentrace ROS v horní části palisádových buněk by mohla být spojena s dozráváním semen a následným opadem semene od poutka, kde by podobně jako u senescence listů mohly ROS hrát roli signálních molekul. V pozdějších fázích vývoje jsou ROS akumulovány v buňkách parenchymu v místě kontaktu osemení a embrya. Během dozrávání dochází ke zvětšování embrya, které tak vyvíjí tlak na buňky parenchymu a část je jich stlačena a rozdrčena (Smýkal et al., 2014) a s tím může být spojena vyšší koncentrace ROS v této oblasti v pozdějších fázích vývoje. Dalším důvodem vyšší koncentrace ROS v této oblasti může být komunikace osemení a embrya, právě prostřednictvím ROS jakožto signálních molekul. U genotypů JI92 a JI1794 v pozdějších vývojových stádiích vymizely signály pro ROS z oblasti palisádových buněk, zatímco u genotypu Cameor a JI64 byly ROS v palisádových buňkách lokalizovány i v pozdějších stádiích, ale pouze v jejich horní části. Pouze v osemení genotypů JI92 a JI1794 byly ROS v pozdějších vývojových stádiích lokalizovány v oblasti makroklereid a tracheid.

Z výsledků provedených experimentů a porovnání jednotlivých parametrů mezi jednotlivými genotypy, vývojovými stádii a mezi osemením a embryem vyplývá výrazná odlišnost semen genotypu Cameor od semen ostatních genotypů (JI92, JI64, JI1794). Na rozdíl od ostatních genotypů byla v genotypu Cameor detekována výrazně nižší koncentrace neenzymových antioxidantů, velmi nízká aktivita PPO, ale naopak aktivity antioxidačních enzymů byly v porovnání s ostatními genotypy významně vyšší. Semena

genotypu Cameor jsou výrazně větší než semena genotypů JI92, JI64 a JI1794 a jako jediná nemají pigmentované osemení. V embryích se porovnávané parametry mezi jednotlivými genotypy výrazně neliší, zatímco v osemení jsou pozorovány rozdíly studovaných parametrů v závislosti na genotypu, byla tak podpořena hypotéza, že tyto parametry v osemení ovlivňují jeho strukturu a vlastnosti. Byly pozorovány významné rozdíly v osemení pigmentovaných a nepigmentovaných genotypů, což naznačuje spojitost sledovaných faktorů právě s pigmentací osemení, která souvisí mimo jiné s akumulací fenolických látek jako prekurzorů vznikajících pigmentů obsažených v osemení.

7 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše na zadané téma s klíčovými slovy reaktivní formy kyslíku, hrách, osemení, embryo, antioxidační kapacita, antioxidační enzymy, vývoj semene. Práce byla zaměřena na analýzu 4 genotypů hrachu, dvou kulturních, nedormantních (*P. sativum*, Cameor a JI92) a dvou planých, dormantních (*P. elatius*, JI64 a JI1794). Byl popsán vývoj semen, metabolické změny v průběhu vývoje, dále charakterizovány reaktivní formy kyslíku, jejich funkce v rostlinách a antioxidační systém. Byly popsány neenzymové antioxidanty a enzymy zapojené v metabolismu ROS.

V rámci experimentální části bylo provedeno stanovení celkové antioxidační kapacity, celkových fenolů a flavonoidů, aktivity PPO, POX, APX a CAT, byla změřena exprese genu PPO a provedena histochemická lokalizace aktivity POX, PPO a ROS. Stanovené parametry byly měřeny ve 4 vývojových stádiích, v osemení a embryích a následně byly pomocí statistického vyhodnocení metodou faktoriální ANOVA a Bonferroniho testem porovnávány mezi jednotlivými genotypy a vývojovými stádii. PPO a POX byly histochemicky lokalizovány v osemení, rozdíly v intenzitě signálů mezi jednotlivými genotypy odpovídaly rozdílům pozorovaným v spektrofotometricky stanovených aktivitách těchto enzymů. Byla provedena histochemická lokalizace ROS v osemení.

Z výsledků provedených experimentů a porovnání jednotlivých parametrů mezi jednotlivými genotypy, vývojovými stádii a mezi osemením a embryem vyplývá výrazná odlišnost semen genotypu Cameor od semen ostatních studovaných genotypů (JI92, JI64, JI1794). Na rozdíl od ostatních genotypů byla v osemení genotypu Cameor výrazně nižší koncentrace neenzymových antioxidantů, velmi nízká aktivita PPO, ale naopak aktivity antioxidačních enzymů byly v porovnání s ostatními genotypy výrazně vyšší. Ze stanovení aktivit antioxidačních enzymů vyplývá jejich rozdílné zapojení ve vývoji osemení a embryí. Aktivity PPO a POX jsou v embryích výrazně nižší, než v osemení, zatímco v případě APX a CAT jsou aktivity těchto enzymů v embryích vyšší. V osemení byly u stanovovaných parametrů pozorovány rozdíly, zatímco v embryích byly stanovené parametry ve všech genotypech podobné. Byl tak potvrzen předpoklad rozdílného zapojení studovaných parametrů ve vývoji osemení jednotlivých genotypů, které korelovalo s pigmentací osemení.

V průběhu vývoje osemení a embryí dochází ke změnám metabolismu a vzniku ROS, které jsou signálními molekulami, podílejícími se na regulaci vývoje, ale mohou také

působit toxicky, jejich koncentrace tak musí být přísně kontrolována. Bylo potvrzeno, že v průběhu vývoje semen planých a kulturních genotypů hrachu dochází ke změnám v obsahu antioxidantů a aktivit antioxidačních enzymů zapojených v metabolismu ROS.

8 LITERATURA

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Oxygen Radicals in Biological Systems*, 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Agrawal, G. K., & Rakwal, R. (Eds.). (2012). *Seed development: OMICS technologies toward improvement of seed quality and crop yield*. Springer.
- Allan, A. C., Maddumage, R., Simons, J. L., Neill, S. O., & Ferguson, I. B. (2006). Heat-induced oxidative activity protects suspension-cultured plant cells from low temperature damage. *Functional Plant Biology*, 33(1). <https://doi.org/10.1071/FP05077>
- 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). <https://doi.org/10.1007/BF00239989>
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., Mohamed, A. A., Thangavel, P., Devi, G. D., Vasudhevan, P., Sofo, A., Khan, N. A., Misra, A. N., Lukatkin, A. S., Singh, H. P., Pereira, E., & Tuteja, N. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19002-19029. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>
- ANTIOXIDANTSGROUP: Plant ROS Research. <https://antioxidantsgroup.wordpress.com/2013/06/27/reactive-oxygen-species-friends-or-foes/> (29. 08. 2022).
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373-399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 235-241. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04728.x>
- Asada, K. (1999). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 601-639. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.601>
- Asada, K., & Nakano, Y. (1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5). <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Asthir, B., Duffus, C. M., Smith, R. C., & Spoor, W. (2002). Diamine oxidase is involved in H₂O₂ production in the chalazal cells during barley grain filling. *Journal of Experimental Botany*, 53(369), 677-682. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.369.677>
- Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14(2), 93-107. <https://doi.org/10.1079/SSR2004159>
- Bailly, C. (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., Audigier, C., Ladonne, F., Wagner, M. H., Coste, F., Corbineau, F., & Côme, D. (2001). Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany*, 52(357), 701-708. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.701>
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., & Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*, 331(10), 806-814. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.022>
- Balarynová, J., Klčová, B., Sekaninová, J., Koblíková, L., Cechová, M. Z., Krejčí, P., Leonova, T., Gorbach, D., Ihling, C., Smržová, L., Trněný, O., Frolov, A., Bednář, P., & Smýkal, P. (2022). The loss of polyphenol oxidase function is associated with hilum pigmentation and has been selected during pea domestication. *New Phytologist*, 235(5), 1807-1821. <https://doi.org/10.1111/nph.18256>
- Banci, L., Ciofi-Baffoni, S., & Tien, M. (1999). Lignin and Mn Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Phenolic Lignin Oligomers. *Biochemistry*, 38(10), 3205-3210. <https://doi.org/10.1021/bi982139g>
- Bartosz, G. (2003). Total antioxidant capacity. *Advances in Clinical Chemistry*, 37, 219-292. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(03\)37010-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(03)37010-6)

- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1), 1-16. <https://doi.org/10.1079/SSR2003150>
- Bayr, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33(12), S498-S501. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12>
- Berger, F., Grini, P. E., & Schnittger, A. (2006). Endosperm: an integrator of seed growth and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6), 664-670. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.015>
- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Walenta, S., Panitz, R., Wobus, U., & Weber, H. (2003). Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within *Vicia faba* embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity. *The Plant Journal*, 36(3), 318-329. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01879.x>
- Borisjuk, L., Walenta, S., Weber, H., Mueller-Klieser, W., & Wobus, U. (1998). High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. *The Plant Journal*, 15(4), 583-591. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00214.x>
- Bove, J., Lucas, P., Godin, B., Ogé, L., Jullien, M., & Grappin, P. (2005). Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Molecular Biology*, 57(4), 593-612. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-0953-8>
- Bowler, C., Montagu, M. V., & Inze, D. (1992). Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43(1), 83-116. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.000503>
- Brocard-Gifford, I. M., Lynch, T. J., & Finkelstein, R. R. (2003). Regulatory Networks in Seeds Integrating Developmental, Abscisic Acid, Sugar, and Light Signaling. *Plant Physiology*, 131(1), 78-92. <https://doi.org/10.1104/pp.011916>
- Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Fini, A., Pollastri, S., & Tattini, M. (2013). Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 3540-3555. <https://doi.org/10.3390/ijms14023540>
- Buitink, J., & Leprince, O. (2008). Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus Biologies*, 331(10), 788-795. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.08.002>
- Černý, M., Habánová, H., Berka, M., Luklová, M., & Brzobohatý, B. (2018). Hydrogen Peroxide: Its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092812>
- De Gara, L., de Pinto, M. C., Moliterni, V. M. C., & D'Egidio, M. G. (2003). Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*. *Journal of Experimental Botany*, 54(381), 249-258. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg021>
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17). <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., & Jačević, V. (2021). The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>
- Ellis, R. H., Hong, T. D., & Roberts, E. H. (1990). An Intermediate Category of Seed Storage Behaviour?. *Journal of Experimental Botany*, 41(230), 1167-1174.
- El-Maarouf-Bouteau, H., & Bailly, C. (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 175-182. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5539>
- El-Maarouf-Bouteau, H., Sajjad, Y., Bazin, J., Langlade, N., Cristescu, S. M., Balzergue, S., Baudouin, E., & Bailly, C. (2015). Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant, Cell & Environment*, 38(2), 364-374. <https://doi.org/10.1111/pce.12371>
- Fei, X., Qi, Y., Lei, Y., Wang, S., Hu, H., & Wei, A. (2021). Transcriptome and metabolite analysis reveals key genes for melanin synthesis during the development of *Zanthoxylum bungeanum* seeds. *Industrial Crops and Products*, 165, 113419. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113419>

- Fenton, H. J. H. (1894). LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans*, 65, 899-910. <https://doi.org/10.1039/CT8946500899>
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501-523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>
- Foyer, C. H., & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21-25. <https://doi.org/10.1007/BF00386001>
- Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. *Plant Physiology*, 155(1), 93-100. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166181>
- Fronk, P., Hartmann, H., Bauer, M., Solem, E., Jaenicke, E., Tenzer, S., & Decker, H. (2015). Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase. *Food Chemistry*, 183, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.016>
- Fuller, D. Q., & Allaby, R. (2009). Seed Dispersal and Crop Domestication: Shattering, Germination and Seasonality in Evolution under Cultivation. *Fruit Development and Seed Dispersal*, 238-295. <https://doi.org/10.1002/9781444314557.ch7>
- Fuerst, E. P., Okubara, P. A., Anderson, J. V., & Morris, C. F. (2014). Polyphenol oxidase as a biochemical seed defense mechanism. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00689>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Glagoleva, A. Y., Shoeva, O. Y., & Khlestkina, E. K. (2020). Melanin Pigment in Plants: Current Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 11(770), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00770>
- Güneş, F. (2013). Seed characteristics and testa textures of *Pratensis*, *Orobon*, *Lathyrus*, *Orobastrum* and *Cicerula* sections from *Lathyrus* (Fabaceae) in Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 299(10), 1935-1953. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0849-z>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free radicals in biology and medicine* (4th ed). Oxford University Press.
- Hardham, A. R. (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). <https://doi.org/10.1071/BT9760711>
- Harris, W. M. (1983). On the Development of Macrosclereids in Seed Coats of *Pisum sativum* L. *American Journal of Botany*, 70(10). <https://doi.org/10.2307/2443351>
- Hedley, C. L., Harvey, D. M., & Keely, R. J. (1975). Role of PEP carboxylase during seed development in *Pisum sativum*. *Nature*, 258(5533), 352-354. <https://doi.org/10.1038/258352a0>
- Herbette, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J. -L., Drevet, J. R., & Roeckel-Drevet, P. (2002). Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *European Journal of Biochemistry*, 269(9), 2414-2420. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02905.x>
- Hradilová, I., Tměný, O., Válková, M., Cechová, M., Janská, A., Prokešová, L., Aamir, K., Krezdorn, N., Rotter, B., Winter, P., Varshney, R. K., Soukup, A., Bednář, P., Hanáček, P., & Smýkal, P. (2017). A Combined Comparative Transcriptomic, Metabolomic, and Anatomical Analyses of Two Key Domestication Traits: Pod Dehiscence and Seed Dormancy in Pea (*Pisum* sp.). *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00542>
- Hradilová, I., Duchoslav, M., Brus, J., Pechanec, V., Hýbl, M., Kopecký, P., Smržová, L., Štefělová, N., Vaclávek, T., Bariotakis, M., Machalová, J., Hron, K., Pirintsos, S., & Smýkal, P. (2019). Variation in wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) seed dormancy and its relationship to the environment and seed coat traits. *PeerJ*, 7. <https://doi.org/10.7717/peerj.6263>
- Hu, Y., Zhou, L., Huang, M., He, X., Yang, Y., Liu, X., Li, Y., & Hou, X. (2018). Gibberellins play an essential role in late embryogenesis of *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 4(5), 289-298. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0143-8>

- Huang, A. H. C., Trelease, R. N., & Moore, T. S. (1983). *Plant Peroxisomes*. Academic Press.
- Huang, L., Yu, L. -J., Zhang, X., Fan, B., Wang, F. -Z., Dai, Y. -S., Qi, H., Zhou, Y., Xie, L. -J., & Xiao, S. (2019). Autophagy regulates glucose-mediated root meristem activity by modulating ROS production in Arabidopsis. *Autophagy*, 15(3), 407-422. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1520547>
- Janská, A., Pecková, E., Szczepaniak, B., Smýkal, P., & Soukup, A. (2019). The role of the testa during the establishment of physical dormancy in the pea seed. *Annals of Botany*, 123(5), 815-829. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy213>
- Joseph, B., & Jini, D. (2010). Insight into the Role of Antioxidant Enzymes for Salt Tolerance in Plants. *International Journal of Botany*, 6(4), 456-464. <https://doi.org/10.3923/ijb.2010.456.464>
- Kai, K., Kasa, S., Sakamoto, M., Aoki, N., Watabe, G., Yuasa, T., Iwaya-Inoue, M., & Ishibashi, Y. (2016). Role of reactive oxygen species produced by NADPH oxidase in gibberellin biosynthesis during barley seed germination. *Plant Signaling & Behavior*, 11(5). <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1180492>
- Kairong, C., Gengsheng, X., Xinmin, L., Gengmei, X., & Yafu, W. (1999). Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Science*, 146(1), 9-16. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00087-4)
- Kehrer, J. P. (2000). The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6)
- Kermode, A. R., & Finch-Savage, B. E. (2002). Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *Desiccation and survival in plants: drying without dying*, 149-184. <https://doi.org/10.1079/9780851995342.0149>
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650. <https://doi.org/10.1080/01926230290166724>
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 235-246. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.014>
- Kumar, S. P. J., Prasad, S. R., Banerjee, R., & Thammineni, C. (2015). Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany*, 116(4), 663-668. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv098>
- Lackey, J. A. (1981). Systematic Significance of the Epihilum in Phaseoleae (Fabaceae, Faboideae). *Botanical Gazette*, 142(1), 160-164. <https://doi.org/10.1086/337207>
- Lemontey, C., Mousset-Déclas, C., Munier-Jolain, N., & Boutin, J. -P. (2000). Maternal genotype influences pea seed size by controlling both mitotic activity during early embryogenesis and final endoreduplication level/cotyledon cell size in mature seed. *Journal of Experimental Botany*, 51(343), 167-175. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.343.167>
- Leubner-Metzger, G. (2005). B-1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *The Plant Journal*, 41(1), 133-145. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02284.x>
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., & Zhang, J. (2010). H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 2979-2990. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq125>
- Ma, H. -L., Kermasha, S., Gao, J. -M., Borges, R. M., & Yu, X. -zhu. (2009). Laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1-4), 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.07.006>
- Mackerness, S. A. H., Surplus, S. L., Blake, P., John, C. F., Buchanan-Wollaston, V., Jordan, B. R., & Thomas, B. (2002). Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant, Cell & Environment*, 22(11), 1413-1423. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00499.x>
- Malovichko, Y. V., Shikov, A. E., Nizhnikov, A. A., & Antonets, K. S. (2021). Temporal Control of Seed Development in Dicots: Molecular Bases, Ecological Impact and Possible Evolutionary Ramifications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179252>

- Marbach, I., & Mayer, A. M. (1974). Permeability of Seed Coats to Water as Related to Drying Conditions and Metabolism of Phenolics. *Plant Physiology*, 54(6), 817-820. <https://doi.org/10.1104/pp.54.6.817>
- Melkus, G., Rolletschek, H., Radchuk, R., Fuchs, J., Rutten, T., Wobus, U., Altmann, T., Jakob, P., & Borisjuk, L. (2009). The metabolic role of the legume endosperm: a noninvasive imaging study. *Plant Physiology*, 151(3), 1139-1154. <https://doi.org/10.1104/pp.109.143974>
- Mhamdi, A., & Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 145(15). <https://doi.org/10.1242/dev.164376>
- Mhamdi, A., Noctor, G., & Baker, A. (2012). Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 525(2), 181-194. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.015>
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4197-4220. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>
- Miao, Z. H., Fortune, J. A., & Gallagher, J. (2001). Anatomical structure and nutritive value of lupin seed coats. *Aust. J. Agric. Res.*, 2001(52), 985-993. <https://doi.org/10.1071/AR00117>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Miyake, C. (2010). Alternative Electron Flows (Water–Water Cycle and Cyclic Electron Flow Around PSI) in Photosynthesis: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Plant and Cell Physiology*, 51(12), 1951-1963. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq173>
- Miyake, C., & Asada, K. (1996). Inactivation Mechanism of Ascorbate Peroxidase at Low Concentrations of Ascorbate, Hydrogen Peroxide Decomposes Compound I of Ascorbate Peroxidase. *Plant and Cell Physiology*, 37(4), 423-430. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a028963>
- Mullin, W. J., & Xu, W. (2001). Study of Soybean Seed Coat Components and Their Relationship to Water Absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5331-5335. <https://doi.org/10.1021/jf010303s>
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pourcel, L., Routaboul, J., Cheynier, V., Lepiniec, L., & DEBEAUJON, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12(1), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.006>
- Quilichini, T. D., Gao, P., Yu, B., Bing, D., Datla, R., Fobert, P., & Xiang, D. (2022). The Seed Coat's Impact on Crop Performance in Pea (*Pisum sativum* L.). *Plants*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/plants11152056>
- Radchuk, V., & Borisjuk, L. (2014). Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00510>
- Rawsthorne, S. (2002). Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research*, 41(2), 182-196. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00023-](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00023-)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C., & Siedow, J. N. (2006). Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 357-366. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079129>
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)

- Rolletschek, H., Borisjuk, L., Koschorreck, M., Wobus, U., & Weber, H. (2002). Legume embryos develop in a hypoxic environment. *Journal of Experimental Botany*, 53(371), 1099-1107. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.371.1099>
- Rolletschek, H., Weber, H., & Borisjuk, L. (2003). Energy Status and Its Control on Embryogenesis of Legumes. Embryo Photosynthesis Contributes to Oxygen Supply and Is Coupled to Biosynthetic Fluxes. *Plant Physiology*, 132(3), 1196-1206. <https://doi.org/10.1104/pp.102.017376>
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., & Kanazawa, K. (2003). Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 571-581. <https://doi.org/10.1021/jf020926l>
- Sarath, G., Hou, G., Baird, L. M., & Mitchell, R. B. (2007). Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C4-grasses. *Planta*, 226(3), 697-708. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0517-z>
- Shao, S., Meyer, C. J., Ma, F., Peterson, C. A., & Bernards, M. A. (2007). The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition and function during imbibition. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1071-1082. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl268>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1-26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahry, G., & Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, 214(6), 821-828. <https://doi.org/10.1007/s00425-001-0699-8>
- Schopfer, P., Plachy, C., & Frahry, G. (2001). Release of Reactive Oxygen Intermediates (Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, and Hydroxyl Radicals) and Peroxidase in Germinating Radish Seeds Controlled by Light, Gibberellin, and Abscisic Acid. *Plant Physiology*, 125(4), 1591-1602. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1591>
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 122-126. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.01.002>
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinsky, S., & Miszalski, Z. (2007). The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica*, 54(1), 39-50.
- Smýkal, P. (2011). Fylogeneze, biogeografie a genetická diverzita rodu hrách. *Živa*, 2011(4), 151-154.
- Smýkal, P., Vernoud, V., Blair, M. W., Soukup, A., & Thompson, R. D. (2014). The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00351>
- Solberg, S. Ø., Yndgaard, F., Andreassen, C., von Bothmer, R., Loskutov, I. G., & Asdal, Å. (2020). Long-Term Storage and Longevity of Orthodox Seeds: A Systematic Review. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01007>
- Sweetlove, L. J., & Foyer, C. H. (2004). Roles for Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Plant Mitochondria. *Plant Mitochondria: From Genome to Function*, 307-320. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2400-9_14
- Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M., Pavan, S., & Montemurro, C. (2017). Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2). <https://doi.org/10.3390/ijms18020377>
- ThermoFisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C682> (23. 2. 2023)
- Tognetti, V. B., Bielach, A., & Hrtyan, M. (2017). Redox regulation at the site of primary growth: auxin, cytokinin and ROS crosstalk, 40(11), 2586-2605. <https://doi.org/10.1111/pce.13021>
- Trněný, O., Brus, J., Hradilová, I., Rathone, A., Das, R. R., Kopecký, P., Coyne, C. J., Reeves, P., Richards, C., & Smýkal, P. (2018). Molecular Evidence for Two Domestication Events in the Pea Crop. *Genes*, 2018(9), 535. <https://doi.org/10.33390>

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. A. (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>

Tsukagoshi, H., Busch, W., & Benfey, P. N. (2010). Transcriptional Regulation of ROS Controls Transition from Proliferation to Differentiation in the Root. *Cell*, 143(4), 606-616. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.020>

Tunnacliffe, A., & Wise, M. J. (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94(10), 791-812. <https://doi.org/10.1007/s00114-007-0254-y>

Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J. F., & Inzé, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161(3), 405-414. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00452-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00452-6)

Van Dongen, J. T., Ammerlaan, A. M., Wouterlood, M., Van Aelst, A. C., & Borstlap, A. C. (2003). Structure of the Developing Pea Seed Coat and the Post-phloem Transport Pathway of Nutrients. *Annals of Botany*, 91(6), 729-737. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg066>

Veljović Jovanović, S., Kukavica, B., Vidović, M., Morina, F., & Menckhoff, L. (2018). Class III Peroxidases: Functions, Localization and Redox Regulation of Isoenzymes. *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, 269-300. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0_13

Wang, P., & Song, C. -P. (2008). Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytologist*, 178(4), 703-718. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02431.x>
Bewley, J. D., & Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of Development and germination* (2nd ed.). Springer New York.

Waszczak, C., Carmody, M., & Kangasjärvi, J. (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 209-236. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322>

Weber, H., Borisjuk, L., & Wobus, U. (2005). Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annu. Rev. Plant Biol.*, (56), 253-79. <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>

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

Werker, E., Marbach, I., & Mayer, A. M. (1979). Relation Between the Anatomy of the Testa, Water Permeability and the Presence of Phenolics in the Genus *Pisum*. *Annals of Botany*, 43(6), 765-771. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a085691>

Wojtyła, Ł., Garmczarska, M., Zalewski, T., Bednarski, W., Ratajczak, L., & Jurga, S. (2006). A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds. *Journal of Plant Physiology*, 163(12), 1207-1220. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.06.014>

Yachandra, V. K., Sauer, K., & Klein, M. P. (1996). Manganese Cluster in Photosynthesis: Where Plants Oxidize Water to Dioxygen. *Chemical Reviews*, 96(7), 2927-2950. <https://doi.org/10.1021/cr950052k>

Yamaguchi, S., Kamiya, Y., & Nambara, E. (2007). Regulation of ABA and GA levels during seed development and germination in *Arabidopsis*. In K. Bradford & H. Nonogaki, *Seed development, dormancy and germination* (pp. 224-242). Blackwell Publishing.

Zablatzká, 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>

Zentgraf, U., Andrade-Galan, A. G., & Bieker, S. (2022). Specificity of H₂O₂ signaling in leaf senescence: is the ratio of H₂O₂ contents in different cellular compartments sensed in *Arabidopsis* plants?. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1). <https://doi.org/10.1186/s11658-021-00300-w>

Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L., & Davies, K. J. (1990). The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.*, 265(27), 16330-6.

Zhang, J., & Sun, X. (2021). Recent advances in polyphenol oxidase-mediated plant stress responses. *Phytochemistry*, 181. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112588>

9 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA, Asc	askorbát
ABA	kyselina abscisová
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)
AOX	alternativní oxidasa
APS	persíran amonný
APX	askorbátperoxidasa
CAT	katalasa
COX	cytochrom C oxidasa
DAP	day after polination – počet dnů od opylení
DHA	dehydroaskorbát
DHAR	dehydroaskorbátreduktasa
EDTA-Na ₂	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
F-primer	forward primer
FW	čerstvá váha
GA	gibereliny
GPX	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
H2DCF-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
IAA	isoamylalkohol
l	optická dráha
LEA	„late embryogenesis abundant protein“
MDHA	monodehydroaskorbát
MDHAR	monodehydroaskorbátreduktasa
NO	oxid dusnatý
NTR	NADPH thioredoxinreduktasa
POX	peroxidasa
PPO	polyfenoloxidasa
PRX	peroxyredoxiny
PS I	fotosystém I
PS II	fotosystém II
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
R-primer	reverse primer
RRI	RiboSafe RNase Inhibitor
SOD	superoxiddismutasa
t	čas
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
TRX	thioredoxin
ΔA	změna absorbance
ε	extinkční koeficient
λ	vlnová délka

PŘÍLOHA

Tab. 1: F a p hodnoty po provedení metody Faktoriální ANOVA, kdy byly pozorovány změny sledovaných parametrů v osemeni a embryích v závislosti na genotypu a vývojovém stádiu, $\alpha = 0,05$.

		F hodnota	p hodnota		F hodnota	p hodnota	
Osemení	Genotyp	20,2067	0,0000	TAC	POX	87,9219	0,0000
	Vývojové stádium	1,7697	0,1767			4,4796	0,0067
	Genotyp*vývojové stádium	1,4327	0,2236			3,4717	0,0017
Embrya	Genotyp	2,1026	0,1194	TAC	POX	34,9868	0,0000
	Vývojové stádium	0,3470	0,791495			39,0803	0,0000
	Genotyp*vývojové stádium	0,1293	0,9985			6,4741	0,0000
Osemení	Genotyp	20,9205	0,0000	Fenoly	APX	172,1165	0,0000
	Vývojové stádium	0,3002	0,8248			0,7014	0,5559
	Genotyp*vývojové stádium	1,5151	0,2244			0,1095	0,9993
Embrya	Genotyp	17,5180	0,0000	Fenoly	APX	0,5757	0,6352
	Vývojové stádium	33,5060	0,0000			11,5176	0,0000
	Genotyp*vývojové stádium	24,4680	0,0000			0,9576	0,4916
Osemení	Genotyp	15,8367	0,0000	Flavonoidy	CAT	27,1869	0,0000
	Vývojové stádium	0,4175	0,7428			0,7303	0,5411
	Genotyp*vývojové stádium	0,7592	0,6540			1,0245	0,4409
Embrya	Genotyp	5,7340	0,0029	Flavonoidy	CAT	0,1881	0,9028
	Vývojové stádium	12,0680	0,0000			19,5336	0,0000
	Genotyp*vývojové stádium	21,2840	0,0000			2,5707	0,0512
Osemení	Genotyp	37,8524	0,0000	PPO			
	Vývojové stádium	7,5127	0,0007				
	Genotyp*vývojové stádium	2,4774	0,0310				
Embrya	Genotyp	1,4818	0,2274	PPO			
	Vývojové stádium	1,9241	0,1341				
	Genotyp*vývojové stádium	0,4384	0,9094				

Tab. 2: *Post hoc* Bonferroniho test – porovnání změn TAC v osemeni a embryích mezi jednotlivými genotypy a vývojovými stádii, $\alpha = 0,05$.

Genotyp	Vývojové stádium	Cameor				JI92				JI64				JI1794			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Cameor	1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,181193	0,017724	0,163605	0,050661	0,019255	0,002255	0,089587	1,000000	1,000000	0,309060
	2	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,062404	0,005951	0,056225	0,017110	0,006467	0,000763	0,030465	1,000000	1,000000	0,107862
	3	1,000000	1,000000		1,000000	0,919184	0,775292	0,031080	0,002946	0,027979	0,008468	0,003201	0,000382	0,015104	0,876760	1,000000	0,054015
	4	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,146580	0,014241	0,132282	0,040781	0,015473	0,001813	0,072245	1,000000	1,000000	0,250813
JI92	1	1,000000	1,000000	0,919184	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	2	1,000000	1,000000	0,775292	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,349040	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	3	0,181193	0,062404	0,031080	0,146580	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	4	0,017724	0,005951	0,002946	0,014241	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
JI64	1	0,163605	0,056225	0,027979	0,132282	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	2	0,050661	0,017110	0,008468	0,040781	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	3	0,019255	0,006467	0,003201	0,015473	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	4	0,002255	0,000763	0,000382	0,001813	1,000000	0,349040	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,302559	0,242253
JI1794	1	0,089587	0,030465	0,015104	0,072245	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
	2	1,000000	1,000000	0,876760	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,302559	1,000000		1,000000	1,000000
	3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,242253	1,000000	1,000000		1,000000
	4	0,309060	0,107862	0,054015	0,250813	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
Cameor	1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	2	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	3	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	4	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
JI92	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
JI64	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
JI1794	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
	2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
	3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
	4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Tab. 3: *Post hoc* Bonferroniho test – porovnání změn koncentrace fenolů v osemeni a embryích mezi jednotlivými genotypy a vývojovými stádii, $\alpha = 0,05$.

Genotyp	Vývojové stádium	Cameor				JI92				JI64				JI1794				
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Osemení	Cameor	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,646626	0,168648	0,046617	0,123310	0,047689	0,094226	0,056711	0,226660	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		2	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,717398	0,186870	0,051483	0,136544	0,052671	0,104272	0,062669	0,251278	1,000000	1,000000	1,000000
		3	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,811075	0,211017	0,057919	0,154076	0,059260	0,117575	0,070551	0,283904	1,000000	1,000000	1,000000
		4	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,614476	0,160374	0,044403	0,117299	0,045423	0,089663	0,054002	0,215484	1,000000	1,000000	1,000000
	JI92	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		2	0,646626	0,717398	0,811075	0,614476	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		3	0,168648	0,186870	0,211017	0,160374	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		4	0,046617	0,051483	0,057919	0,044403	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	1	0,123310	0,136544	0,154076	0,117299	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		2	0,047689	0,052671	0,059260	0,045423	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		3	0,094226	0,104272	0,117575	0,089663	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		4	0,056711	0,062669	0,070551	0,054002	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
JI1794	1	0,226660	0,251278	0,283904	0,215484	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	
	2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	
	3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	
	4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		
Embryo	Cameor	1		0,132438	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,006529
		2	0,132438		1,000000	1,000000	0,016657	1,000000	0,000586	1,000000	0,000248	0,000294	1,000000	1,000000	0,000021	0,009188	1,000000	1,000000
		3	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,053835	1,000000	0,000003	0,027624	1,000000	1,000000	0,000000	0,684306	1,000000	1,000000
		4	1,000000	1,000000	1,000000		0,197799	1,000000	0,007746	1,000000	0,000019	0,003903	1,000000	1,000000	0,000002	0,112635	1,000000	1,000000
	JI92	1	1,000000	0,016657	1,000000	0,197799		1,000000	1,000000	1,000000	0,000000	1,000000	1,000000	0,467894	0,000000	1,000000	1,000000	0,000759
		2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,250926	1,000000	0,000001	0,132438	1,000000	1,000000	0,000000	1,000000	1,000000	0,371155
		3	1,000000	0,000586	0,053835	0,007746	1,000000	1,000000	0,250926		0,000000	1,000000	0,634594	0,019725	0,000000	1,000000	1,000000	0,000027
		4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,081277		0,000002	0,041963	1,000000	1,000000	0,000000	0,992928	1,000000	1,000000
	JI64	1	0,000000	0,000248	0,000003	0,000019	0,000000	0,000001	0,000000	0,000002		0,000000	0,000000	0,000008	1,000000	0,000000	0,000000	0,005501
		2	1,000000	0,000294	0,027624	0,003903	1,000000	0,132438	1,000000	0,041963	0,000000		0,343386	0,010006	0,000000	1,000000	0,684306	0,000014
		3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,634594	1,000000	0,000000	0,343386		1,000000	0,000000	1,000000	1,000000	0,143564
		4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,467894	1,000000	0,019725	1,000000	0,000008	0,010006	1,000000		0,000001	0,271502	1,000000	1,000000
JI1794	1	0,000000	0,000021	0,000000	0,000002	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000	0,000001		0,000000	0,000000	0,000452	
	2	1,000000	0,009188	0,684306	0,112635	1,000000	1,000000	1,000000	0,992928	0,000000	1,000000	1,000000	0,271502	0,000000		1,000000	0,000415	
	3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000000	0,684306	1,000000	1,000000	0,000000	1,000000		0,068965	
	4	0,006529	1,000000	1,000000	1,000000	0,000759	0,371155	0,000027	1,000000	0,005501	0,000014	0,143564	1,000000	0,000452	0,000415	0,068965		

Tab.4: *Post hoc* Bonferroniho test – porovnání změn koncentrace flavonoidů v osemeni a embryích mezi jednotlivými genotypy a vývojovými stádii, $\alpha = 0,05$.

	Genotyp	Vývojové stádium	Cameor				JI92				JI64				JI1794				
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Osemení	Cameor	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,080081
	Cameor	2	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,107156
	Cameor	3	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,765531	1,000000	0,931252	0,038850	
	Cameor	4	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,709654	1,000000	0,875500	0,036107	
	JI92	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI92	2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,762780
	JI92	3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,479003
	JI92	4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,986778
	JI1794	1	1,000000	1,000000	0,765531	0,709654	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI1794	2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
	JI1794	3	1,000000	1,000000	0,931252	0,875500	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
	JI1794	4	0,080081	0,107156	0,038850	0,036107	1,000000	0,762780	0,479003	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,986778	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
	Embrya	Cameor	1		1,000000	0,001057	1,000000	1,000000	0,000012	1,000000	1,000000	1,000000	0,003677	0,000002	1,000000	0,119502	0,048536	1,000000	1,000000
		Cameor	2	1,000000		0,000005	0,044674	1,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000015	0,000000	0,720540	0,000531	0,000206	1,000000	1,000000
		Cameor	3	0,001057	0,000005		0,377032	0,015017	1,000000	0,002967	0,000009	0,003838	0,001849	1,000000	1,000000	0,021952	1,000000	1,000000	0,013798
		Cameor	4	1,000000	0,044674	0,377032		1,000000	0,005181	1,000000	0,086334	1,000000	1,000000	0,000749	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
JI92		1	1,000000	1,000000	0,015017	1,000000		0,000174	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,050588	0,000026	1,000000	1,000000	0,574716	1,000000	
JI92		2	0,000012	0,000000	1,000000	0,005181	0,000174		0,000034	0,000000	0,000044	0,000022	1,000000	1,000000	0,000255	0,377032	0,868052	0,000159	
JI92		3	1,000000	1,000000	0,002967	1,000000	1,000000	0,000034		1,000000	1,000000	1,000000	0,010252	0,000005	1,000000	0,310418	0,129556	1,000000	
JI92		4	1,000000	1,000000	0,000009	0,086334	1,000000	0,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,000030	0,000000	1,000000	0,001057	0,000410	1,000000	
JI64		1	1,000000	1,000000	0,003838	1,000000	1,000000	0,000044	1,000000	1,000000		1,000000	0,013225	0,000007	1,000000	0,391901	0,164876	1,000000	
JI64		2	1,000000	1,000000	0,001849	1,000000	1,000000	0,000022	1,000000	1,000000	1,000000		0,006415	0,000003	1,000000	0,201254	0,082878	1,000000	
JI64		3	0,003677	0,000015	1,000000	1,000000	0,050588	1,000000	0,010252	0,000030	0,013225	0,006415		1,000000	0,073298	1,000000	1,000000	0,046566	
JI64		4	0,000002	0,000000	1,000000	0,000749	0,000026	1,000000	0,000005	0,000000	0,000007	0,000003	1,000000		0,000037	0,062187	0,152178	0,000023	
JI1794		1	1,000000	0,720540	0,021952	1,000000	1,000000	0,000255	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,073298	0,000037		1,000000	0,805929	1,000000	
JI1794		2	0,119502	0,000531	1,000000	1,000000	1,000000	0,377032	0,310418	0,001057	0,391901	0,201254	1,000000	0,062187	1,000000		1,000000	1,000000	
JI1794		3	0,048536	0,000206	1,000000	1,000000	0,574716	0,868052	0,129556	0,000410	0,164876	0,082878	1,000000	0,152178	0,805929	1,000000		0,532662	
JI1794		4	1,000000	1,000000	0,013798	1,000000	1,000000	0,000159	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,046566	0,000023	1,000000	1,000000	0,532662		

Tab. 5: *Post hoc* Bonferroniho test – porovnání změn aktivit PPO v osemeni a embryích mezi jednotlivými genotypy a vývojovými stádii, $\alpha = 0,05$.

	Genotyp	Vývojové stádium	Cameor				JI92				JI64				JI1794				
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Osemeni	Cameor	1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		2	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		3	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		4	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI92	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,000386	1,000000	1,000000	1,000000	0,249697	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,000000	0,007926	0,038205	0,018239	0,000585	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,000007	0,096948	0,564266	0,284193	0,010151	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,004903	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	1	0,000000	0,000001	0,000001	0,000000	0,000386	0,000000	0,000007	0,004903		1,000000	0,035219	0,073156	1,000000	0,000325	0,000014	0,000274	
		2	0,014430	0,011230	0,008593	0,005247	1,000000	0,007926	0,096948	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,175971	1,000000
		3	0,074869	0,055944	0,041743	0,024274	1,000000	0,038205	0,564266	1,000000	0,035219	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		4	0,034269	0,026832	0,019949	0,011537	1,000000	0,018239	0,284193	1,000000	0,073156	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,539295	1,000000	1,000000
	JI1794	1	0,000875	0,000865	0,000641	0,000369	0,249697	0,000585	0,010151	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,435739	0,020345	0,372463	
		2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000325	1,000000	1,000000	1,000000	0,435739		1,000000	1,000000	
		3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000014	0,175971	1,000000	0,539295	0,020345	1,000000		1,000000	
		4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000274	1,000000	1,000000	1,000000	0,372463	1,000000	1,000000		
Embryo	Cameor	1		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		2	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		3	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		4	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI92	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI1794	1	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
		2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
		3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
		4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000

Tab. 6: *Post hoc* Bonferroniho test – porovnání změn aktivit POX v osemeni a embryích mezi jednotlivými genotypy a vývojovými stádii, $\alpha = 0,05$.

	Genotyp	Vývojové stádium	Cameor				JI92				JI64				JI1794				
			{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	
Osemeni	Cameor	1		1,000000	0,006658	0,000639	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	
	Cameor	2	1,000000		0,004553	0,000428	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	
	Cameor	3	0,006658	0,004553		1,000000	0,006862	0,001866	0,001109	0,000258	0,068023	0,177106	0,475025	0,338199	0,000549	0,000235	0,000687	0,000528	
	Cameor	4	0,000639	0,000428	1,000000		0,061415	0,018268	0,009851	0,002807	0,495359	1,000000	1,000000	1,000000	0,005761	0,002572	0,006260	0,004875	
	JI92	1	0,000000	0,000000	0,006862	0,061415		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
	JI92	2	0,000000	0,000000	0,001866	0,018268	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
	JI92	3	0,000000	0,000000	0,001109	0,009851	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
	JI92	4	0,000000	0,000000	0,000258	0,002807	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
	JI64	1	0,000000	0,000000	0,068023	0,495359	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
	JI64	2	0,000000	0,000000	0,177106	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
	JI64	3	0,000000	0,000000	0,475025	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
	JI64	4	0,000000	0,000000	0,338199	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
	JI1794	1	0,000000	0,000000	0,000549	0,005761	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	
	JI1794	2	0,000000	0,000000	0,000235	0,002572	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	
	JI1794	3	0,000000	0,000000	0,000687	0,006260	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	
	JI1794	4	0,000000	0,000000	0,000528	0,004875	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		
	Embryo	Cameor	1		1,000000	1,000000	0,000009	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,123474	1,000000	0,756666	0,000005	0,000000	
		Cameor	2	1,000000		1,000000	0,000001	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,029278	1,000000	0,233585	0,000001	0,000000
		Cameor	3	1,000000	1,000000		0,004588	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,002278	0,000000	
		Cameor	4	0,000009	0,000001	0,004588		0,000004	0,000006	0,000979	0,000005	0,000002	0,000018	0,000459	0,171407	0,001634	0,024623	1,000000	0,968855
JI92		1	1,000000	1,000000	1,000000	0,000004	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,090663	1,000000	0,656913	0,000002	0,000000		
JI92		2	1,000000	1,000000	1,000000	0,000006	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,147084	1,000000	1,000000	0,000003	0,000000		
JI92		3	1,000000	1,000000	1,000000	0,000979	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000502	0,000000		
JI92		4	1,000000	1,000000	1,000000	0,000005	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,134355	1,000000	0,936384	0,000003	0,000000		
JI64		1	1,000000	1,000000	1,000000	0,000002	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,040428	1,000000	0,314478	0,000001	0,000000		
JI64		2	1,000000	1,000000	1,000000	0,000018	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,404162	1,000000	1,000000	0,000009	0,000000		
JI64		3	1,000000	1,000000	1,000000	0,000459	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000224	0,000000		
JI64		4	0,123474	0,029278	1,000000	0,171407	0,090663	0,147084	1,000000	0,134355	0,040428	0,404162	1,000000		1,000000	0,090875	0,000013		
JI1794		1	1,000000	1,000000	1,000000	0,001634	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,000841	0,000000	
JI1794		2	0,756666	0,233585	1,000000	0,024623	0,656913	1,000000	0,936384	0,314478	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,012515	0,000002	
JI1794		3	0,000005	0,000001	0,002278	1,000000	0,000002	0,000003	0,000502	0,000003	0,000001	0,000009	0,000224	0,090875	0,000841	0,012515		1,000000	
JI1794		4	0,000000	0,000000	0,000000	0,968855	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000013	0,000000	0,000002	1,000000		

Tab. 7: *Post hoc* Bonferroniho test – porovnání změn aktivit APX v osemeni a embryích mezi jednotlivými genotypy a vývojovými stádii, $\alpha = 0,05$.

Genotyp	Vývojové stádium	Cameor				JI92				JI64				JI1794				
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Osemení	Cameor	1	1,000000	1,000000	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
	Cameor	2	1,000000		1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
	Cameor	3	1,000000	1,000000		1,000000		1,000000	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
	Cameor	4	1,000000	1,000000	1,000000			0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
	JI92	1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI92	2	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI92	3	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI92	4	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	2	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	3	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	4	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI1794	1	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI1794	2	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
	JI1794	3	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
	JI1794	4	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
Embryo	Cameor	1		1,000000	1,000000	0,042442	1,000000	1,000000	0,391269	0,578998	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	Cameor	2	1,000000		1,000000	0,289019	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	Cameor	3	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	Cameor	4	0,042442	0,289019	1,000000		0,006324	0,111271	1,000000	1,000000	0,149965	1,000000	1,000000	1,000000	0,035587	0,087738	1,000000	1,000000
	JI92	1	1,000000	1,000000	1,000000	0,006324		1,000000	0,064418	0,097936	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,510943	1,000000
	JI92	2	1,000000	1,000000	1,000000	0,111271	1,000000		0,949571	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI92	3	0,391269	1,000000	1,000000	1,000000	0,064418	0,949571		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,332025	0,764600	1,000000	1,000000
	JI92	4	0,578998	1,000000	1,000000	1,000000	0,097936	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,492848	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	1	1,000000	1,000000	1,000000	0,149965	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI64	4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	JI1794	1	1,000000	1,000000	1,000000	0,035587	1,000000	1,000000	0,332025	0,492848	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
	JI1794	2	1,000000	1,000000	1,000000	0,087738	1,000000	1,000000	0,764600	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
	JI1794	3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,510943	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
	JI1794	4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Tab. 8: *Post hoc* Bonferroniho test – porovnání změn aktivit CAT v osemeni a embryích mezi jednotlivými genotypy a vývojovými stádii, $\alpha = 0,05$.

Genotyp	Vývojové stádium	Cameor				JI92				JI64				JI1794				
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Osemení	Cameor	1	1,000000	1,000000	1,000000	0,058836	0,136057	0,551861	0,257227	1,000000	0,118889	0,187643	0,191874	0,092083	0,219770	0,095959	0,223266	
	Cameor	2	1,000000		1,000000	1,000000		1,000000	0,947012	1,000000	0,458695	0,704963	0,719863	0,360133	0,714661	0,410242	0,725380	
	Cameor	3	1,000000	1,000000		0,810277	0,332632	0,715792	1,000000	1,000000	1,000000	0,626151	0,982914	1,000000	0,485433	1,000000	0,545164	1,000000
	Cameor	4	1,000000	1,000000	0,810277		0,000074	0,000338	0,003866	0,000713	0,008124	0,000289	0,000491	0,000504	0,000216	0,001302	0,000130	0,001326
	J192	1	0,058836	0,258105	0,332632	0,000074		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J192	2	0,136057	0,520990	0,715792	0,000338	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J192	3	0,551861	1,000000	1,000000	0,003866	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J192	4	0,257227	0,947012	1,000000	0,000713	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J164	1	1,000000	1,000000	1,000000	0,008124	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J164	2	0,118889	0,458695	0,626151	0,000289	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J164	3	0,187643	0,704963	0,982914	0,000491	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J164	4	0,191874	0,719863	1,000000	0,000504	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J11794	1	0,092083	0,360133	0,485433	0,000216	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
	J11794	2	0,219770	0,714661	1,000000	0,001302	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
	J11794	3	0,095959	0,410242	0,545164	0,000130	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
	J11794	4	0,223266	0,725380	1,000000	0,001326	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	
Embryo	Cameor	1		1,000000	0,017914	1,000000	1,000000	1,000000	0,026687	1,000000	1,000000	0,069031	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,091743	1,000000
	Cameor	2	1,000000		0,099935	1,000000	1,000000	1,000000	0,151451	1,000000	1,000000	0,403683	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,539412	1,000000
	Cameor	3	0,017914	0,099935		1,000000	0,352819	0,904058	1,000000	1,000000	0,012696	1,000000	1,000000	1,000000	0,045849	0,563165	1,000000	1,000000
	Cameor	4	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,790335	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J192	1	1,000000	1,000000	0,352819	1,000000		1,000000	0,537110	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J192	2	1,000000	1,000000	0,904058	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J192	3	0,026687	0,151451	1,000000	1,000000	0,537110	1,000000		1,000000	0,018830	1,000000	1,000000	1,000000	0,069031	0,856583	1,000000	1,000000
	J192	4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,952648	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J164	1	1,000000	1,000000	0,012696	0,790335	1,000000	1,000000	0,018830	0,952648		0,048260	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,063992	0,806878
	J164	2	0,069031	0,403683	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,048260		1,000000	1,000000	0,182204	1,000000	1,000000	1,000000
	J164	3	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J164	4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
	J11794	1	1,000000	1,000000	0,045849	1,000000	1,000000	1,000000	0,069031	1,000000	1,000000	0,182204	1,000000	1,000000		1,000000	0,243213	1,000000
	J11794	2	1,000000	1,000000	0,563165	1,000000	1,000000	1,000000	0,856583	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
	J11794	3	0,091743	0,539412	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,063992	1,000000	1,000000	1,000000	0,243213	1,000000		1,000000
	J11794	4	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,806878	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	