

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Vplyv oxidu dusnatého na aktivitu polyfenoloxidasy a peroxidasy počas klíčenia a raného vývoja sadeníc hrachu siateho

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Martina Sopkuliaková
Študijný program:	B1406 Biochemie
Študijný odbor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
Rok:	2022

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

V Olomouci dňa

.....

Martina Sopkuliaková

Pod'akovanie

Rada by som sa poďakovala vedúcej svojej bakalárskej práce Mgr. Jane Sekaninovej, Ph.D. za ochotu, cenné rady, odborné vedenie, ľudský prístup, trpezlivosť a čas, ktorý mi venovala. Moja vďaka patrí aj Mgr. Jane Balarynovej, Ph.D. za pomoc a odborné rady z oblasti botaniky pri riešení teoretickej a experimentálnej časti bakalárskej práce.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Martina Sopkuliaková
Názov práce	Vplyv oxidu dusnatého na aktivitu polyfenoloxidas a peroxidasy počas klíčenia a raného vývoja sadeníc hrachu siateho
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Hrach siaty (*Pisum sativum* L.) patrí do čeľade *Fabaceae* a rodu *Pisum*. Radí sa medzi tretiu najpestovanejšiu strukovinu na svete. Semená hrachu sú dobrým zdrojom bielkovín, polysacharidov, mikroživín a sekundárnych metabolitov ako sú polyfenoly a alkaloidy, ktoré sú prospešné pre ľudské zdravie. Oxid dusnatý (NO) je dôležitá signálna molekula, ktorá je v rastlinách produkovaná enzýmovými aj neenzýmovými cestami. Podieľa sa na mnohých fyziologických procesoch zahŕňajúcich rast a vývoj, dozrievanie, starnutie a reakcie na biotický a abiotický stres. Výskumy naznačujú, že oxid dusnatý sa zúčastňuje na procesoch podporujúcich klíčenie semien za použitia zlúčenín, ktoré sú donormi oxidu dusnatého. Cieľom bakalárskej práce bolo stanoviť vplyv donora a lapača oxidu dusnatého na aktivitu enzýmov polyfenoloxidas (PPO) a peroxidasy (POD) v 3 vývojových štádiách hrachu siateho, a to planého, vysoko dormantného genotypu *P. sativum* subsp. *elatius*, IG140897 a kultúrneho, nedormantného genotypu *P. sativum* subsp. *sativum* Trendy. Následne lokalizovať aktivitu študovaných enzýmov v rastlinnom materiáli mikroskopicky.

Kľúčové slová	Polyfenoloxidas, peroxidasa, oxid dusnatý, klíčenie, hrach
Počet strán	64
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Martina Sopkuliaková
Title	Influence of nitric oxide on polyphenol oxidase and peroxidase activity during germination and early development of pea seedlings
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Consultant	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
The year of presentation	2022

Abstract

Pea (*Pisum sativum* L.) belongs to the family *Fabaceae* and the genus *Pisum*. It is the third most cultivated legume in the world. Pea seeds are a good source of proteins, polysaccharides, micronutrients and secondary metabolites such as polyphenols and alkaloids, which are beneficial to human health. Nitric oxide (NO) is an important signaling molecule produced in plants by both enzymatic and non-enzymatic pathways. It is involved in many physiological processes involving growth and development, maturation, senescence and responses to biotic and abiotic stresses. Assays using compounds that are nitric oxide donors suggests that nitric oxide is involved in promoting seed germination. The aim of this bachelor thesis was to grow seeds of two pea genotypes, *P. sativum* subsp. *elatius* IG140897 (a wild, dormant) and *P. sativum* subsp. *sativum* Trendy (a cultivated, non-dormant) in a presence of nitric oxide donor. The enzyme activities of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) were measured in different seed and young seedling tissues. Subsequently, the activities of the studied enzymes were localized using histochemical staining method.

Keywords	Polyphenol oxidase, peroxidase, nitric oxide, germination, peas
Number of pages	64
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	TEORETICKÁ ČASŤ	2
2.1	Hrach.....	2
2.1.1	Taxonomické zaradenie	2
2.1.2	Vlastnosti a využitie hrachu.....	2
2.1.3	Domestikácia.....	3
2.2	Semeno hrachu.....	3
2.3	Štruktúra osemenia hrachu.....	5
2.4	Dormancia.....	8
2.5	Klíčenie a vývoj klíčnej rastliny	9
2.6	Oxid dusnatý	11
2.6.1	Vlastnosti oxidu dusnatého	11
2.6.2	Produkcia oxidu dusnatého	13
2.6.3	Lapače a donory oxidu dusnatého.....	15
2.6.4	Role oxidu dusnatého pri klíčení a dormancii semien	16
2.6.5	Lokalizácia produkcie oxidu dusnatého v bunke	17
2.7	Charakteristika študovaných parametrov	19
2.7.1	Polyfenoloxidasa	19
2.7.2	Peroxidasa	21
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	24
3.1	Rastlinný materiál	24
3.2	Použité chemikálie	24
3.3	Použité prístroje a experimentálne vybavenie	24
3.4	Metódy	25
3.4.1	Pestovanie a spracovanie rastlinného materiálu.....	25
3.4.2	Príprava rastlinných extraktov pre stanovenie enzýmovej aktivity	26
3.4.3	Stanovenie aktivít enzýmov	26
3.4.3.1	Stanovenie aktivity peroxidasy	26
3.4.3.2	Stanovenie aktivity polyfenoloxidasy	27
3.4.4	Výpočty a štatistika enzýmových aktivít	27
3.4.5	Histochemická lokalizácia aktivity peroxidasy a polyfenoloxidasy	27
4	VÝSLEDKY	29
4.1	Porovnanie študovaných genotypov hrachu	29
4.1.1	Porovnanie semien	29
4.1.2	Anatomické porovnanie osemenia	30
4.1.3	Anatomické porovnanie osemenia v oblasti hila	31
4.1.4	Anatomické porovnanie koreňa	32
4.1.5	Anatomické porovnanie klíčneho listu	33
4.2	Histochemická lokalizácia aktivity peroxidasy.....	34
4.2.1	Lokalizácia aktivity peroxidasy v osemení	34
4.2.2	Lokalizácia aktivity peroxidasy v koreni	34
4.2.3	Lokalizácia aktivity peroxidasy v klíčovom liste	35
4.3	Histochemická lokalizácia aktivity polyfenoloxidasy	36
4.3.1	Lokalizácia aktivity polyfenoloxidasy v osemení.....	36
4.3.2	Lokalizácia aktivity polyfenoloxidasy v koreni.....	37
4.3.3	Lokalizácia aktivity polyfenoloxidasy v klíčovom liste	38

4.4	Spektrofotometrické stanovenie aktivity peroxidasy	39
4.4.1	Aktivita peroxidasy v kontrolnom rastlinnom materiáli	39
4.4.2	Vplyv donora a lapača oxidu dusnatého na aktivitu peroxidasy.....	40
4.5	Spektrofotometrické stanovenie aktivity polyfenoloxidasy.....	43
4.5.1	Aktivita polyfenoloxidasy v kontrolnom rastlinnom materiáli.....	43
4.5.2	Vplyv donora a lapača oxidu dusnatého na aktivitu polyfenoloxidasy...44	
5	DISKUSIA	47
6	ZÁVER.....	50
7	LITERATÚRA	51
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	56

CIELE PRÁCE

Teoretická časť:

- Vypracovať literárnu rešerš na zadanú tému s kľúčovými slovami: polyfenoloxidasa, peroxidasa, oxid dusnatý, klíčenie, hrach.

Experimentálna časť:

- Napestovať rastlinný materiál v troch vývojových štádiách (nabobtnané semená, klíčiace semená a klíčiace rastliny hrachu) v prostredí donora a lapača oxidu dusnatého.
- Stanoviť aktivity vybraných enzýmov – polyfenoloxidasa, peroxidasa.
- Mikroskopicky lokalizovať aktivitu študovaných enzýmov v rastlinnom materiáli.

1 ÚVOD

Hrach siaty (*Pisum sativum* L.) patrí do čeľade *Fabaceae* a rodu *Pisum*, v ktorom sa rozlišujú tri druhy: *P. sativum*, *P. fulvum* Sibth & Sm a *P. abyssinicum* A.Br. (Smýkal, 2011; Smýkal et al., 2012). V súčasnosti ide o celosvetovo tretiu najpestovanejšiu strukovinu, ktorej semená sú bohaté na proteíny a slúžia ako potrava, zelenina a krmivo pre zvieratá. V dôsledku výberu a šľachtenia dnes existuje veľké množstvo odrôd hrachu. V génových bankách po celom svete je uchovávaných okolo 98 tisíc genotypov hrachu, z nich kultúrne formy sú zastúpené viacnásobne a naopak plané formy nedostatočne (Smýkal, 2016).

Oxid dusnatý (NO) je malá, ale dôležitá redoxná signálna molekula, ktorá sa v rastlinách zúčastňuje rôznych fyziologických procesov vrátane klíčenia, vývoja, kvitnutia, pohybov prieduchov, zrenia, starnutia a abiotického stresu (Nabi et al., 2019). Oxid dusnatý taktiež patrí medzi plynný dvojatómový voľný radikál detegovaný v nízkych hladinách v atmosfére a môže byť prítomný aj v pôdach. Ukázalo sa, že NO účinne narušuje dormanciu alebo podporuje klíčenie niekoľkých typov semien (Arc et al., 2013b).

Polyfenoloxidas (1,2-benzendiol oxidoreduktasa, PPO, EC 1.10.3.1) patrí do skupiny oxidoreduktas obsahujúcich meď, ktoré môžu hydroxylovať monofenoly alebo oxidovať difenoly na o-dichinony. Radí sa medzi antioxidantné enzýmy (Glagoleva et al., 2020). Peroxidas (peroxid vodíka oxidoreduktasa, POD, EC 1.11.1.7) je glykozylovaný rastlinný enzým obsahujúci hem. Patrí ku kľúčovým antioxidantným enzýmom, ktoré sú v prírode široko rozšírené a katalyzujú oxidáciu rôznych elektrón donorových substrátov súčasne s rozkladom peroxidu vodíka (Gundinger & Spadiut, 2017; Pandey et al., 2017). Rastlinné peroxidasy sa podieľajú na rôznych životne dôležitých procesoch rastu a vývoja rastlín. Patrí sem metabolizmus bunkovej steny, rast a dozrievanie plodov, lignifikácia, metabolizmus reaktívnych foriem kyslíka (ROS), metabolizmus reaktívnych foriem dusíka (RNS) a metabolizmus auxínov (Pandey et al., 2017).

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Hrach

2.1.1 Taxonomické zaradenie

Hrach patrí do čeľade *Fabaceae* (*Leguminosae*) a podčeľade *Faboideae*. Rod *Pisum* sa delí na tri druhy: *P. sativum*, *P. fulvum* (planý) a *P. abyssinicum* (kultúrny). Druh *P. sativum* sa ďalej rozdeľuje na dva poddruhy a to na *P. sativum* subsp. *sativum* (kultúrny) a *P. sativum* subsp. *elatius* (planý) (Smýkal, 2011). Geograficky je *P. sativum* subsp. *elatius* rozšírený v oblasti Stredozemného mora od Španielska po Blízky východ a na sever Európy. *P. fulvum* sa vyskytuje v oblasti krajín ako sú Sýria, Libanon, Izrael a Palestína. *P. abyssinicum* bol zaznamenaný v Etiópii a Jemene (Trněný et al., 2018).

2.1.2 Vlastnosti a využitie hrachu

Hrach je jednou z hlavných strukovín pestovaných v rôznych častiach sveta. Pestovanie hrachu sa rozšírilo z oblasti úrodného polmesiaca (Stredomorie a Blízky východ) do Ruska, na západ pozdĺž údolia Dunaja do Európy a do starovekého Grécka či Ríma, čím sa uľahčilo jeho rozšírenie do severnej a západnej Európy. Paralelne s tým sa pestovanie hrachu presunulo na východ do Perzie, Indie a Číny.

Semená hrachu sú dobrým zdrojom bielkovín, polysacharidov (vláknina, škrob) a mikroživín (vitamíny, stopové prvky), preto ľudia konzumujú hlavne zelené semená. Okrem toho obsahujú bioaktívne zlúčeniny ako sú fenolové zlúčeniny, pričom sú všetky nerovnomerne rozložené v semene (Dueñas et al., 2004; Smýkal et al., 2014a). V súčasnosti patrí hrach k jarnej plodine v oblastiach mierneho pásma, zatiaľ čo v oblastiach s miernymi zimami a suchými jarami ako je stredomorské prostredie, sa podobné genotypy hrachu vysádzajú na jeseň (Neugschwandtner et al., 2019).

Jednou z najdôležitejších vlastností bôbových rastlín je ich schopnosť symbiotickej fixácie dusíka, čo podčiarkuje ich význam ako zdroj dusíka v prírodných aj poľnohospodárskych ekosystémoch (Smýkal et al., 2012). Bôbovité rastliny taktiež produkujú jedinečné sekundárne metabolity, čo sú organické zlúčeniny odvodené z primárneho metabolizmu, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu pri obrane rastlín. Prispievajú k adaptačným vlastnostiam a ekologickej kondícii, vrátane obranných mechanizmov, tolerancii voči abiotickým aj biotickým stresom a interakciám s opel'ovačmi, mikróbmi spojenými s koreňmi a bylinožravcami. Obsah sekundárnych metabolitov sa medzi

rôznymi rastlinnými druhmi líši. Semená bôbových rastlín sú bohaté na sekundárne metabolity ako sú polyfenoly, alkaloidy, saponíny a izoflavóny, ktoré sú prospešné pre ľudské zdravie. Zároveň sú strukoviny známe tým, že chránia ľudí pred chronickými chorobami zahŕňajúc kardiovaskulárne choroby, cukrovku, obezitu, osteoporózu alebo dokonca rakovinu (Ku et al., 2020).

2.1.3 Domestikácia

Hrach siaty patrí medzi najstaršie kultúrne plodiny domestikované pred približne 10 tisíc rokmi v oblasti Stredomoria a Blízkeho východu (Smýkal, 2016). Domestikované rastliny sa líšia od svojich planých predkov v niekoľkých morfofyziologických znakoch, z ktorých väčšina je spojená s klíčením semien, rastom, veľkosťou, sfarbením a použiteľnosťou hospodársky dôležitých orgánov. Domestikačný syndróm označuje súbor vlastností a znakov, v ktorých sa plané druhy líšia od z nich domestikovaných druhov (Abbo et al., 2014). Premenu planých rastlín na kultúrne plodiny možno považovať za zrýchlený vývoj, ktorý predstavuje adaptáciu na pestovanie a ľudský zber, sprevádzanú genetickými zmenami (Hradilová et al., 2017). Proces domestikácie je možné rozdeliť do troch fáz. Prvá fáza zahŕňa zber voľne rastúcich jedlých plodov, druhá fáza je pestovanie divo rastúcich rastlín (pre-domestikácia) a treťou fázou je fixácia domestikačného syndrómu (Allaby, 2010).

2.2 Semeno hrachu

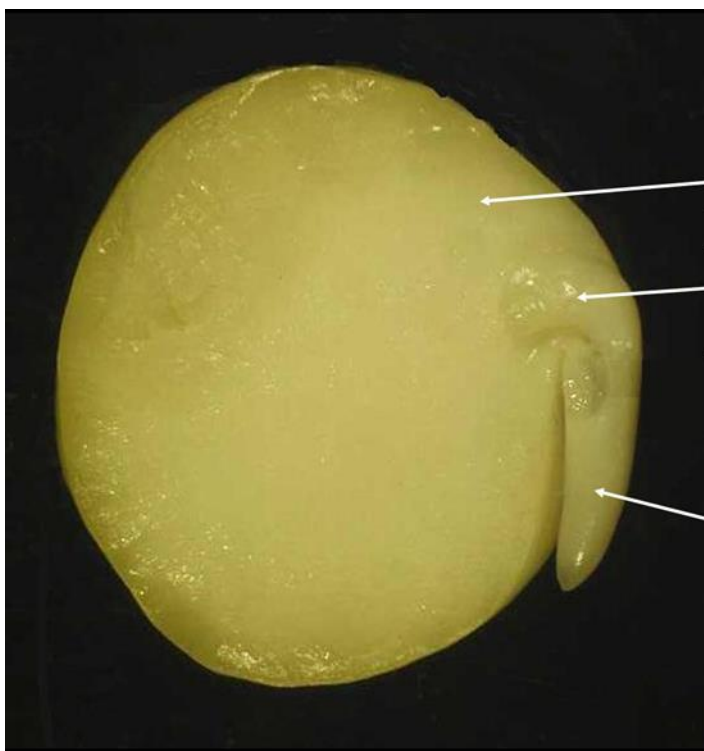
Semená majú dve hlavné funkcie, ktorými sú reprodukcia a rozptýlenie do okolia. V dôsledku rozšírenia do okolia existuje obrovská rozmanitosť veľkostí a tvarov semien. Okrem rozhodujúcej biologickej úlohy semien pri šírení, majú tiež nenahraditeľné postavenie pre ľudí a zvieratá, pretože tvoria podstatnú časť potravy a krmiva (Dueñas et al., 2004; Zablazská et al., 2021).

Prežitie rastlinných druhov závisí hlavne od pohlavného rozmnožovania, ktoré vedie k vzniku nových populácií. Počas tohto procesu dospelé krytosemenné rastliny produkujú kvety, z ktorých po oplodnení vznikajú plody obsahujúce semená. Semeno sa vyvíja z vajíčka. V dôsledku procesu dvojitého oplodnenia obsahuje zrelé semeno krytosemnej rastliny diploidné embryo a ochranné vrstvy obsahujúce triploidný endosperm, výživné pletivo pre embryo, obal semena materského pôvodu (osemenie) (Arc et al., 2013a).

V životnom cykle rastlín sú fázy semien a klíčnych rastlín kľúčovými vývojovými štádiami (Arc et al., 2013b).

V semenách bôbovitých rastlín sa rozlišujú tri rôzne časti: obal semena (nazývaný aj osemenie, testa), endosperm a embryo. Embryo pozostáva z koreňka (radikula), vyrasteného vrcholu stonky (plumula) a dvoch klíčnych listov (kotyledón) (Obr. 1). Korienok vo všeobecnosti preniká do pôdy, vytvára koreňové vlásky a často aj bočné korene (Fahn, 1990). Hoci sa morfológia semien medzi rôznymi rodinami rastlín líši, zložky embrya sú zachované. Zrenie embrya sa začína vo vnútornej adaxiálnej oblasti. Skorý rast podlieha kontrole materskou rastlinou, čo sa môže prejaviť v miere, akou bude embryo neskôr realizovať svoj rastový potenciál (Weber et al., 2005).

Triploidný endosperm je pletivo dodávajúce živiny embryu počas raného vývoja. Najskôr tvorí endosperm hrachu pohyblivé, proliferujúce pletivo, ktoré vystieľa dutinu zárodočného vaku. Neskôr obalí embryo a suspenzor. V priebehu vývinu embrya sa endosperm znižuje a postupne zaniká, čiže v zrelom semene sa nenachádza (Melkus et al., 2009).



Embryo hrachu

Klíčný list
(kotyledón)

Vyrastený vrchol
stonky (plumula)

Korienok
(radikula)

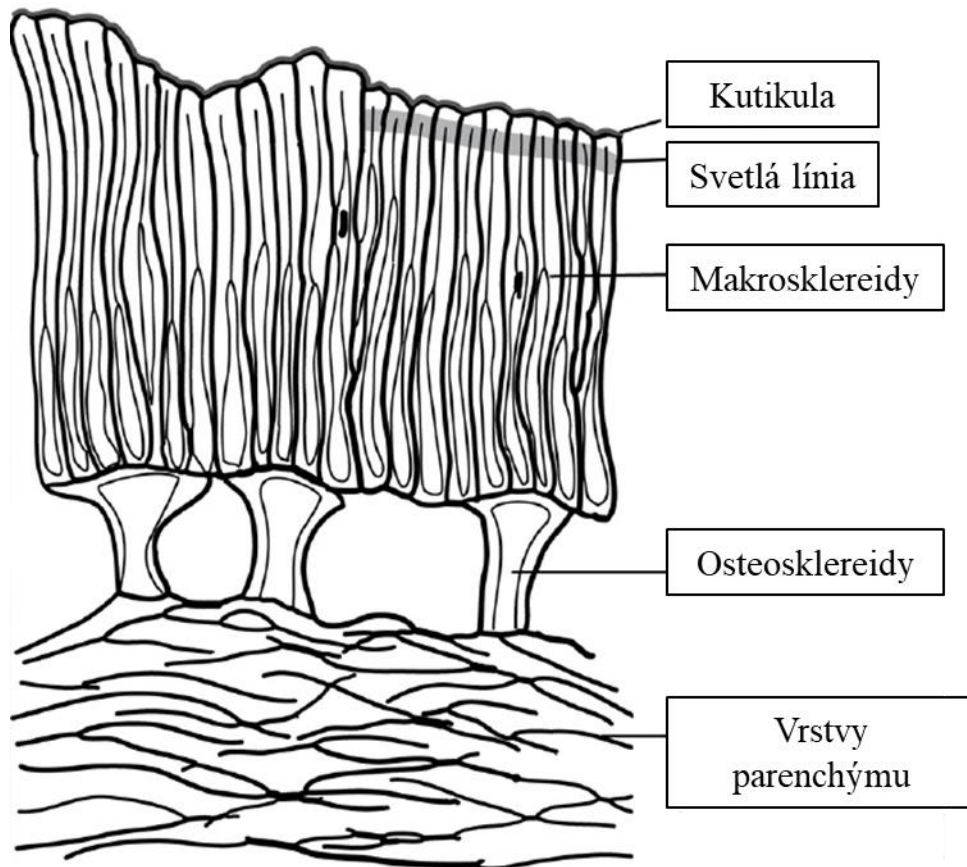
Obr. 1: Embryo hrachu. Po odstránení osemenia z embrya je možné pozorovať jednotlivé časti, ktorými sú klíčny list (kotyledón), vyrastený vrchol stonky (plumula) a koreňok (radikula). Prevzaté a upravené z https://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-organologie-morfologie_semen.html. (15.2.2022).

Kotyledón (klíčny list) obsahuje hlavné zásobné látky, bielkoviny a sacharidy. U hrachu siateho zostávajú kotyledóny hrubé, pretože sú miestom rezervného skladovania a tvoria takmer celú hmotu semien (Fahn, 1990; Bewley & Black, 2013). Vo všeobecnosti je diferenciácia kotyledónov postupný proces zahŕňajúci príjem sacharózy, rozšírenie buniek, získanie fotosyntetickej aktivity, akumuláciu zásobných produktov a získanie tolerancie voči vysychaniu. Kotyledóny dosiahnu fyziologickú zrelosť, keď bunky zväčšia svoj objem. Mladé kotyledóny hrachu sú vysoko mitoticky aktívne. Počas prechodného štádia sa veľkosť vnútorných adaxiálnych buniek zväčšuje, zatiaľ čo vo vonkajšej abaxiálnej oblasti sa mitotická aktivita udržiava dlhšie (Weber et al., 2005).

2.3 Štruktúra osemenia hrachu

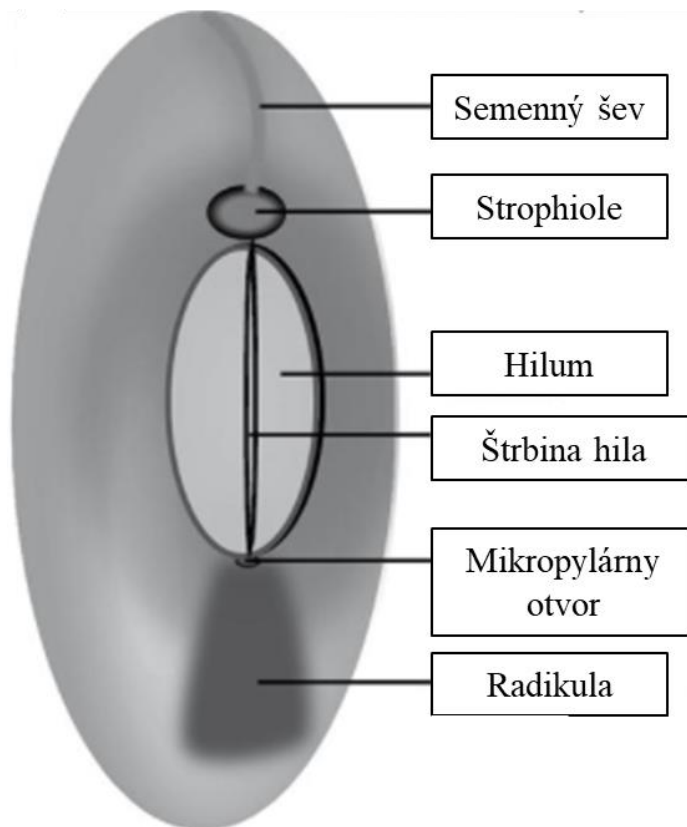
Osemenie je multifunkčný orgán, ktorý hrá dôležitú úlohu vo výžive embryí počas vývoja semena a následne v ochrane pred škodlivými činiteľmi z prostredia. Osemenie funguje ako fyzická bariéra, cesta príjmu vody a zároveň chráni pred mikrobiálnymi útokmi (Smýkal, 2016). Uvádza sa, že v osemení sa nachádza najvyššia koncentrácia fenolových zlúčenín (Dueñas et al., 2004).

Vonkajšia bunková stena makroklereíd je pokrytá kutikulou (Obr. 2). Kutikula tvorí súvislú vrstvu pokrývajúcu semeno. Jedinou nepokrytou časťou je hilum. Priehľadná oblasť nazývajúc sa svetlá línia oddeľuje koncové časti makroklereidov od ich bazálnych častí. Svetlá línia sa tiahne priečne cez vrstvu makroklereidov. Makroklereidy majú nepravidelný tvar, pričom sa zužujú smerom k povrchu osemenia v dôsledku výrazného zhrubnutia bunkovej steny. Vrstvu buniek pod makroklereidami tvoria osteoklereidy, medzi ktorými sa nachádzajú nápadné medzibunkové priestory vyplnené vzduchom. Osteoklereidy sú prvým hlavným typom buniek počas diferenciácie osemenia, v ktorých bola zistená bunková smrť. V hile a jeho okolí sa vrstva osteoklereidov spája s hrubostenným parenchýmom v tvare hviezdy. Najvnútornejšia časť osemenia je zložená z parenchýmových buniek predĺžených v kolmom smere, ktoré vytvárajú bohaté medzibunkové priestory so vzduchom. Parenchýmové bunky sa často vyskytujú v 5-12 vrstvách, pričom vnútorná vrstva je v priamom kontakte s endospermom (Smýkal et al., 2014b).



Obr. 2: Epidermálne bunky sa diferencujú na makrosklereidy, ktoré sa vyznačujú povrchom pokrytým kutikulou. Vonkajšie časti makrosklereidov sú oddelené svetlou líniou so špecifickými znakmi, čo vedie k rôznym optickým alebo farbiacim vlastnostiam. Centrálna časť sa rozlišuje na osteosklereidy so zvláštnymi tvarmi, ktoré sú spôsobené zhrubnutou sekundárnou bunkovou stenou. Najvnútornejšie vrstvy parenchýmových buniek počas diferenciacie často odumierajú a zostanú len rozpadnuté fragmenty. Prevzaté a upravené od Smýkal et al., 2014b.

V parenchýmových vrstvách sú zakotvené cievne systémy osemenia a ich štruktúra sa u jednotlivých druhov bôbových rastlín líši. Semená hrachu majú relatívne jednoduchý cievny systém obsahujúci jeden chalázový cievny zväzok s dvomi bočnými vetvami zasahujúcimi do osemenia. Chalázová oblasť je dôležitou súčasťou osemenia, kde končí spojenie cievnych zväzkov semena s materskou rastlinou pomocou pútka (funikulus). Hilum je výrazne oválna alebo okrúhla jazva, ktorá zostala po spojení s materskou rastlinou na semene (Obr. 3). Keď je relatívna vlhkosť nízka, štrbina v hile sa otvára, čo umožňuje semenu vyschnúť. Pri vysokej relatívnej vlhkosti sa štrbina uzatvára, čím bráni absorpcii vlhky. Kľový otvor (mikropyle) je umiestnený na opačnej strane semena, označovanej ako mikropylárny pól. Cez mikropyle po opelení prerastá peľové vrecúško až do zárodočného vaku. U niektorých druhov je zvyšok mikropylárneho



Obr. 3: Všeobecná schéma morfológie semena, ktorá sa bežne vyskytuje v semenách *Fabaceae*. Schéma zobrazuje najdôležitejšie morfológické znaky ako sú hilum, strophiole, semenný šev a mikropylárny otvor. Prevzaté a upravené od Smýkal et al., 2014b.

otvoru pokrytý voskovým viečkom. Na druhej strane hila sa nachádza strophiole, štruktúra, cez ktorú môže byť nasávaná voda. Vplyvom vonkajších alebo vnútorných faktorov sa strophiole otvára. V oblasti strophiole sú palisádové bunky užšie, dlhšie a variabilnejšie ako vo zvyšku osemenia (Debeaujon et al., 2000; Van Dongen et al., 2003; Smýkal et al., 2014b).

Dvomi hlavnými funkciami osemenia sú ochrana embrya v zrelom semene a zásobovanie embrya živinami počas vývoja. Živiny sa takmer výlučne dovážajú cez floém a zahŕňajú hlavné organické živiny, sacharózu a aminokyseliny, ako aj draslík a mikroživiny. Osemenie taktiež obmedzuje klíčenie, pretože je nepriepustné pre vodu a kyslík, prípadne svojou mechanickou odolnosťou bráni vyčnievaniu koreňkov (Debeaujon et al., 2000; Van Dongen et al., 2003). Hoci sa osemenia rôznych druhov značne líšia v štruktúre a zložení, prechádzajú podobnými fázami vývoja vo vzťahu k embryu a endospermu. Pri vývoji semien bôbovitých rastlín sa najskôr vyvíja osemenie a endosperm, následne sa vyvinie embryo, pokračuje dozrievanie osemenia a dozrievanie embrya (Moise et al., 2005).

2.4 Dormancia

Dormancia je vlastnosť jednotlivého semena, ktorá bráni klíčeniu aj za priaznivých podmienok prostredia. Mnohé druhy rastlín, najmä tie, ktoré pochádzajú z miernych oblastí, vykazujú dormanciu semien. Dormancia je veľmi prospešná, pretože oddiaľuje klíčenie až dovtedy, pokiaľ nebudú podmienky a prostredie priaznivé pre rast klíčnych rastlín (Bethke et al., 2006). V prirodzených podmienkach je vhodné načasovanie klíčenia semien dôležité z toho dôvodu, aby sa zabezpečili optimálne rastové podmienky pre mladé rastliny a zaručilo sa prežitie druhu (Bewley, 1997). Dormancia semien zohrala významnú úlohu v evolúcii a adaptácii rastlín, pretože klíčenie je jedným z kľúčových momentov v živote rastlín. Určuje nástup novej generácie a aj to, kde a kedy rastlina rastie. Vo voľnej prírode existuje veľa spiacich semien, ktorým môže trvať niekoľko mesiacov, či dokonca rokov, kým vyklíčia (Smýkal, 2016).

Dormancia môže byť spôsobená určitými vlastnosťami osemenia, mobilizáciou rezervných zložiek, hladinami hormónov alebo spoločným pôsobením viacerých týchto faktorov. Dormancia je teda určená genetickými faktormi, ale môže byť podstatne modulovaná aj parametrami prostredia. Zmiernenie blokady môže byť podmienené niekoľkými odlišnými činiteľmi prostredia (teplota, vlhkosť, svetlo, koncentrácia živín) alebo fyzikálnymi faktormi (narušenie osemenia). Presné podmienky potrebné na uvoľnenie dormancie a následné klíčenie závisia od druhu a prispievajú tak k primeranosti rastliny k prostrediu oddialením klíčenia, kým semeno nesplní vhodné podmienky pre svoj vývoj (Arc et al., 2013b). Dormanciu možno klasifikovať ako primárnu a sekundárnu na základe toho, kedy nastáva jej vyvolanie. Primárna dormancia vzniká počas vývoja semien v dôsledku endogénnych (vnútorných) faktorov alebo podmienok prostredia, ktorým čelí materská rastlina. Semená vykazujúce primárnu dormanciu môžu byť uvoľnené zo stavu dormancie množstvom ošetrov, ktoré zahŕňajú následné dozrievanie, definované ako obdobie suchého skladovania čerstvo zozbieraných semien. Keď semená čelia nepriaznivým podmienkam pre klíčenie, môžu nedormantné semená prejsť do stavu pokoja, ktorý sa označuje ako sekundárna dormancia (Tuan et al., 2019).

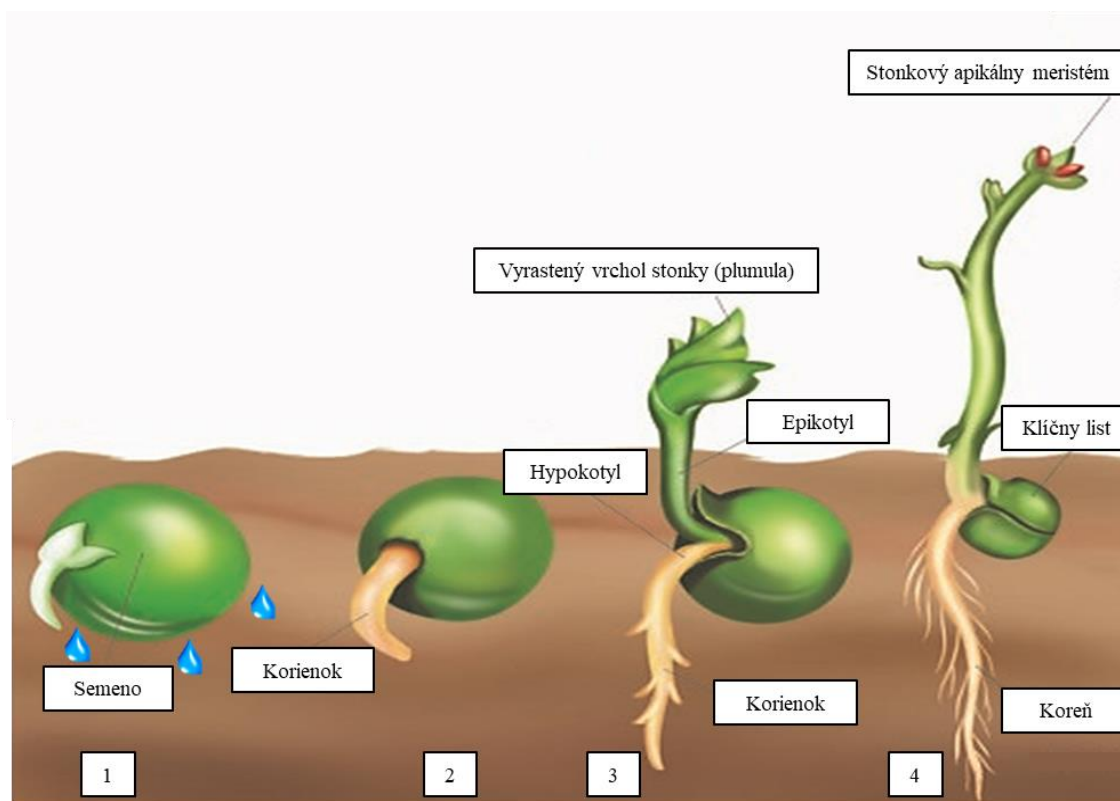
Primárna dormancia sa kategorizuje do piatich typov: fyziologická, morfológická, morfofyziologická, fyzikálna a kombinovaná (napr. fyziologická a fyzikálna dormancia). Fyziologická dormancia je najbežnejším typom dormancie, ktorá sa vyskytuje u mnohých

rastlinných druhov. Je daná hladinou kyseliny abscisovej a giberelínov. Zníženie koncentrácie kyseliny abscisovej vedie k postupnému uvoľňovaniu jej inhibičného účinku. Pri zvýšení hladín bioaktívnych giberelínov sa zväčšuje rastový potenciál embrya a indukujú sa hydrolytické enzýmy, ktoré oslabujú bariérové pletivá (Arc et al., 2013b). Fyziologická dormancia sa ďalej delí na nehlbokú, strednú a hlbokú dormanciu na základe hĺbky kl'udu (Tuan et al., 2019). Hĺbka primárnej dormancie v zrelých semenách môže závisieť od podmienok, ktorým bola materská rastlina vystavená. Takýmito podmienkami môže byť teplota alebo dostupnosť minerálnych prvkov (dusičnanov) v pôde. Semená teda vyvinuli komplexnú kontrolu hĺbky pokoja, ktorá integruje rôzne časopriestorové parametre umožňujúce dynamickú definíciu minimálnych požiadaviek na klíčenie (Arc et al., 2013b). Embryo hlbokého fyziologicky spiaceho semena buď nemôže rásť vôbec alebo bude produkovať abnormálne klíčne rastliny. Na rozdiel od hlbkej dormancie môžu embryá nehlboko fyziologicky spiacich semien ľahko klíčiť a produkovať normálne klíčne rastliny. Embryá semien vykazujúce strednú fyziologickú dormanciu môžu nakoniec vyklíčiť a rásť. Morfológická dormancia je spôsobená nediferencovaným alebo nedostatočne vyvinutým embryom, avšak klíčenie môže nastať po ďalšom vývoji embrya, zatiaľ čo morfofyziologická dormancia je charakterizovaná nedostatočne vyvinutým embryom, ktoré tiež vykazuje fyziologickú dormanciu. Fyzikálna dormancia, typická pre planých zástupcov hrachu, je spôsobená osemením alebo kryciami vrstvami semien nepriepustnými pre vodu alebo plyn, čím blokujú klíčenie. Kombinovaná dormancia je typ dormancie vyvolanej napríklad fyzikálnymi a fyziologickými zložkami semien (Tuan et al., 2019).

2.5 Klíčenie a vývoj klíčnej rastliny

Klíčenie semien je komplexný fyziologický proces, ktorý sa začína príjmom vody suchým semenom a končí rastom koreňkov cez krycie vrstvy embrya (Obr. 4) (Tuan et al., 2019). Počas procesu príjmu vody pôvodne pokojné suché semeno postupne prechádza tromi hlavnými krokmi. Prvý krok spočíva v rýchlom nasatí vody prvotne pokojných semien, čo vedie k postupnému obnoveniu metabolickej aktivity, génovej expresie, syntéze, spracovaniu proteínov a oprave DNA pletiva (Arc et al., 2013b). Suché semená majú veľmi nízky potenciál vody, čo spôsobuje jej rýchle nasatie. Priepustnosť osemenia, ktoré je súčasťou semena prichádzajúceho do kontaktu s okolitou vodou, zohráva ústrednú úlohu pri prijímaní vody (Smýkal et al., 2014b). V priebehu druhého

kroku absorpcie vody sa jej obsah len mierne zvyšuje, zatiaľ čo vo vnútri semien prebiehajú dôležité metabolické zmeny. Ak sa na konci druhého kroku prijme „rozhodnutie“ pokračovať smerom ku klíčeniu, rastový potenciál embrya postupne prekonáva mechanické obmedzenia spôsobené okolitými vrstvami, čo vedie k postupnému prasknutiu ošivenia. Prečnievanie koreňa cez obal semena je teda dosiahnuté ako výsledok dôležitého predlžovania buniek bez ich akéhokoľvek delenia a vyskytuje sa súčasne s významným obnovením príjmu vody (Arc et al., 2013b). Po nasatí vody semenom nasleduje rastová fáza embrya, kedy ošivenie embrya praská a vytvára sa korieňok. Pokračuje rast korieňka, z ktorého sa neskôr vyvinie koreň a postupne sa predlžuje epikotyl (ScienceFacts. <https://www.sciencefacts.net/seed-germination.html> (16.2.2022)).



Obr. 4: Vývoj semien hrachu siateho v klíču rastlinu. 1.: Nasávanie vody semenom hrachu a následné preniknutie korieňka ošivením. 2.: Rast korieňka. 3.: Pokračuje rast korieňka, z ktorého sa vyvinie koreň a predlžuje sa epikotyl. 4.: Klíčna rastlina ďalej rastie. Prevzaté a upravené z <https://www.indiamart.com/proddetail/germination-of-seed-bean-pea-for-botany-chart-2898719797.html> (15.2.2022).

Schopnosť klíčenia je regulovaná kombináciou environmentálnych a endogénnych signálov so synergickými aj antagonistickými účinkami. V priebehu klíčenia semená produkujú reaktívne formy kyslíka (ROS) ako napríklad superoxid alebo peroxid vodíka. Zvýšenú produkciu reaktívnych foriem kyslíka môže spôsobovať aj nedostatok kyslíka. Pokiaľ nedôjde k detoxikovaniu, ROS sú schopné poškodiť bunkové membrány či podporiť degradáciu proteínov, čím sa oneskorí klíčenie. Keďže proces klíčenia semien závisí hlavne od uloženej mRNA a proteínov, poškodenie na úrovni DNA môže viesť k prerušeniu rastu a vývoja klíčnej rastliny. Mechanizmy bunkovej opravy najmä na úrovni DNA a proteínové post-translačné modifikácie majú dôležitú rolu v životnosti semien. Kvôli vysokej zraniteľnosti semien poranením, biotickým a abiotickým stresom počas nasávania vody sa klíčenie považuje za najdôležitejšiu fázu životného cyklu rastlín. Dokázalo sa, že oxid dusnatý (NO) je silným činidlom uvoľňujúcim dormanciu u mnohých druhov a predpokladá sa, že hrá kľúčovú úlohu pri klíčení semien a mitochondriálnej funkcii (Arc et al., 2013b; Pandey et al., 2019). Po vyklíčení semien vznikajúca klíčna rastlina spočiatku rastie poháňaná zásobami semien. V priebehu ďalšieho vývoja klíčna rastlina získava fotosyntetickú schopnosť a prejde do autotrofie. Dostupnosť dusíka je dôležitým signálom pre skorý rast po vyklíčení a pozitívne ovplyvňuje rozširovanie a zelenanie kotyledónov a rast hypokotylu (Vidal et al., 2020).

2.6 Oxid dusnatý

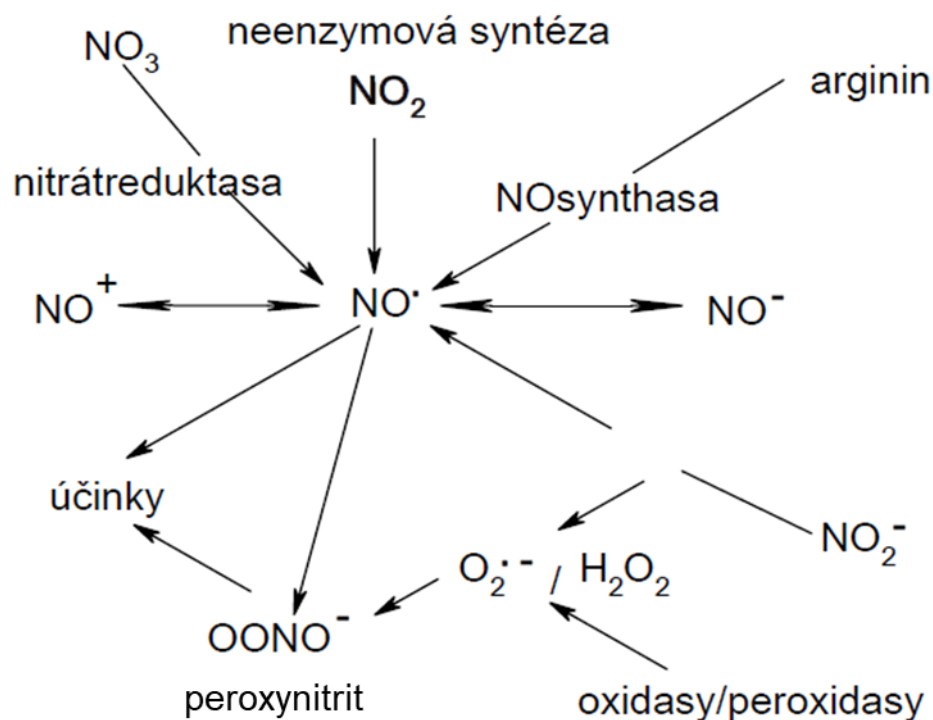
2.6.1 Vlastnosti oxidu dusnatého

Oxid dusnatý (NO) je relatívne stabilný, voľný a vysoko difúzny plyn, ktorý spočiatku priťahoval pozornosť ako látka znečisťujúca životné prostredie. Chemické vlastnosti však z neho robia všestrannú signálnu molekulu. Oxid dusnatý sprostredkúva rôzne patofyziologické a vývojové procesy, vrátane expresie génov súvisiacich s obranou, programovanou bunkovou smrťou, uzavretím prieduchov, tvorbou semien a vývojom koreňov. Aplikácia NO na neporušené a čerstvo narezané plody po zbere dokáže oddialiť dozrievanie, inhibovať biosyntézu etylénu či zhnednutie povrchu rezu (Duan et al., 2007; Wu et al., 2012). Rovnako môže oxid dusnatý neutralizovať oxidačné poškodenie, čím sa preukáže jeho ochranný účinok proti chorobám. Dokonca hrá významnú úlohu ako regulátor fyziológie rastlín či tolerancie stresu (Nabi et al., 2019; Gheysarbigi et al., 2020). Predpokladá sa, že oxid dusnatý je dôležitá molekula počas vývoja koreňového

systému a rozvoja symbiotických interakcií s pôdnymi baktériami na povrchu koreňov (Adámková & Petřivalský, 2012).

Molekula oxidu dusnatého obsahuje vo svojom vonkajšom orbitáli nepárový elektrón, a preto má vlastnosti radikálu. Radikál môže získať alebo stratiť jeden elektrón a premeniť sa na jednu z troch foriem: radikál ($\text{NO}\cdot$), nitrozóniový kation (NO^+) alebo nitroxylový anión (NO^-), čo vysvetľuje jeho vysokú reaktivitu. Tieto tri formy NO sú v bunke zameniteľné a sú silne závislé od jej redoxného stavu. Radikál oxidu dusnatého voľne difunduje vo vodných roztokoch, je schopný prechádzať cez lipidové membrány, pohybovať sa v bunkových kompartmentoch a aj z bunky do bunky (Rico-Lemus & Rodríguez-Garay, 2014). Reaktivita NO v bunkách je značne ovplyvnená množstvom a vzájomnou lokalizáciou vznikajúceho oxidu dusnatého a potenciálnych reaktantov. Typickou reakciou NO v aerobnom prostredí je relatívne pomalá oxidácia molekulárnym kyslíkom na NO_2 . Ďalšou významnou reakciou NO je tvorba nitrosylových komplexov s atómami kovov. Biologicky významnou interakciou je väzba oxidu dusnatého na atóm Fe^{2+} hemových kofaktorov enzýmov, kde najdôležitejším príkladom je regulácia aktivity guanylátcyklyazy (GTP difosfát lyasa, EC 4.6.1.2) (Brown & Borutaite, 2002; Szabó et al., 2007).

Vytvorený NO je reaktívny voľný radikál, ktorý veľmi rýchlo reaguje s inými radikálmi, hlavne s reaktívnymi formami kyslíka (ROS) za vzniku peroxynitritov (Obr. 5). Peroxynitrit ako silné nitračné činidlo ďalej reaguje s proteínmi, lipidmi a DNA za vzniku príslušných nitroso a nitro derivátov (Adámková & Petřivalský, 2012). Po produkcii sa uvoľnený NO môže prispôbiť bunkovému redoxnému prostrediu, čo vedie k tvorbe rôznych biologicky aktívnych zlúčenín označovaných ako reaktívne formy dusíka (RNS) (Arc et al., 2013a). Oxid dusnatý môže pôsobiť buď ako priamy lapač reaktívnych foriem kyslíka alebo dokáže indukovať antioxidačný systém rastlín (Singh & Bhatla, 2017).



Obr. 5: Schéma produkcie oxidu dusnatého v rastlinách znázorňujúca vznik oxidu dusnatého neenzýmovou syntézou, pomocou NOsynthasy z argininu alebo pomocou nitrátreduktasy z NO₃. Prevzaté a upravené od Adámková & Petřivalský, 2012.

2.6.2 Produkcia oxidu dusnatého

Produkcia oxidu dusnatého je spojená s obrovským počtom fyziologických situácií v rastlinách, ktoré pokrývajú celý život rastliny a zahŕňajú klíčenie, vývoj koreňov, kontrolu stomatálnych pohybov, kvitnutie, rast peľových trubíc a starnutie listov. Takisto k produkcii NO dochádza aj pri reakciách na pôsobenie biotických alebo abiotických stresových faktorov (Baudouin, 2010).

Oxid dusnatý je v rastlinách produkovaný enzýmovými aj neenzýmovými cestami (Li et al., 2017a). Neenzýmové procesy môžu za určitých podmienok prispievať k syntéze NO v rastlinách. Nízke pH v apoplaste podporuje neenzýmovú redukciu dusitanu, kedy dusitan dismutuje na NO a dusičnan. Dusitan môže byť tiež chemicky redukovaný kyselinou askorbovou pri fyziologických hodnotách pH na NO a kyselinu dehydroaskorbovú. Ďalší neenzýmový mechanizmus pre tvorbu NO v membránach chloroplastov je svetlom sprostredkovaná premena NO₂ na NO katalyzovaná karotenoidmi (Cooney et al., 1994; Yamasaki, 2000; Stöhr & Ullrich, 2002).

V súčasnosti bolo popísaných celkom osem oxidačných a redukčných dráh, o ktorých sa predpokladá, že majú podiel na biosyntéze NO. Oxidačné dráhy zahŕňajú oxidáciu

L-arginínu NOS-like enzýmom (NOS-oxid dusnatý syntasa), polyamínov a hydroxylamínu. V redukčných dráhach sa využívajú enzýmy ako je nitrátreduktasa, xanthinoxidasa, cytochrom-c oxidasa/reduktasa, nitrit:NO reduktasa a chrenová peroxidasa (Prakash et al., 2019).

Prvým jednoznačne identifikovaným enzýmovým zdrojom NO v rastlinách je nitrátreduktasa (nitrat:NAD⁺ oxidoreduktasa, NR, EC 1.7.1.1). Nitrátreduktasa je homodimérny proteín, pričom každý monomér obsahuje tri prostetické skupiny: FAD, hem a molybdénový kofaktor. Aktivita NR je posttranslačne regulovaná reverzibilnou fosforyláciou. Hlavnou úlohou nitrátreduktasy v rastlinách je katalýza NAD(P)H-dependentnej dvojelektrónovej redukcie dusičnanu na dusitan (Yamasaki et al., 1999; Yamasaki & Sakihama, 2000). Nitrátreduktasa sa nachádza v cytosole a podieľa sa na regulácii otvorenia prieduchov, aktivácii antioxidantných enzýmov, vývoji kvetu alebo na regulácii vegetatívneho – generatívneho prechodu (Gupta et al., 2011). Oxid dusnatý závislý od NR je nevyhnutný pre aktivity antioxidantných enzýmov indukovaných kyselinou abscisovou a peroxidom vodíka (Huang et al., 2019).

Aktivita NOS-like enzýmu bola zistená v chloroplastoch a peroxizómoch. Substrátom je L-arginín, zatiaľ čo NAD(P)H pôsobí ako donor elektrónov (Gupta et al., 2011). Produkcia NO z L-arginínu sa vyskytuje aj v listoch, stonkách a koreňoch semenáčikov hrachu počas vývoja (Huang et al., 2019). Reakcie spojené s NOS-like aktivitou môžu byť súčasťou indukcie nahromadenia kadmia, programovanej bunkovej smrti vyvolanej kadmim, sprostredkovaní ochranných reakcií proti UV-B žiareniu a na vývoji koreňov (Gupta et al., 2011).

Nitrit:NO reduktasa (nitrit:NO ferricytochrom-c oxidoreduktasa, NiNOR, EC 1.7.2.1) je ďalším špecifickým rastlinným enzýmom podieľajúcim sa na syntéze NO a nachádza sa na plazmatickej membráne. Nitrit:NO reduktasa katalyzuje redukcii dusitanu na oxid dusnatý (Stöhr & Stremlau, 2006). Aktivita NiNOR je vyvolaná pri zníženom obsahu kyslíka v pletivách. Okrem toho je produkcia oxidu dusnatého pomocou NiNOR určená tvorbou dusitanov prostredníctvom apoplastickej nitrátreduktasy, ktorá je zase ovplyvnená dostupnosťou dusičnanov a sukcinátov (Gupta et al., 2011).

Chrenová peroxidasa katalyzuje tvorbu NO *in vitro* za účasti peroxidu vodíka z N-hydroxyarginínu alebo hydroxymočoviny. Ďalšie hemoproteíny vyskytujúce sa v rastlinných bunkách ako cytochromy P450, hemoglobíny a katalasa sú schopné *in vitro* produkovať NO a ďalšie oxidy dusíka katalýzou oxidácie N-hydroxyarginínu kumarylhydroperoxidom. Aktivita xanthinoxidasy (xanthin:kyslík oxidoreduktasa, XOD,

EC 1.17.3.2) bola nájdená v peroxizómoch listov hrachu, ktoré sú pravdepodobne jedným z miest aktívnej tvorby NO v rastlinných bunkách (Boucher et al., 1992; Barroso et al., 1999; Huang et al., 2004). Xanthinoxidasa je schopná redukovať organické nitráty, a taktiež aj anorganické dusičnany a dusitany uvoľňujúce oxid dusnatý (Procházková et al., 2014).

2.6.3 Lapače a donory oxidu dusnatého

Mnohé environmentálne a chemické úpravy znižujú alebo odstraňujú dormanciu semien, avšak biochemické zmeny, ktoré sa vyskytujú počas premeny stavu nie sú dostatočne pochopené. Niekoľko výskumov zaradilo oxid dusnatý ako účastníka daného procesu, pretože je súčasťou signálnej siete, ktorá riadi dormanciu semien. Aplikácia donorov NO znižuje alebo odstraňuje dormanciu zo semien a naopak, použitie vychytávačov NO posilňuje dormanciu semien. Hendricks a Taylorson (1974) dospeli k záveru, že stimulácia klíčenia semien dvojkľúčolistových rastlín dusičnanmi je pravdepodobne sprostredkovaná hydroxylamínom, dusitanom alebo oxidom dusnatým (Bethke et al., 2006). Pokiaľ ide o rastlinné hormóny, akýkoľvek mechanizmus priamo ovplyvňujúci hladiny NO, okrem dráh biosyntézy, môže mať kľúčovú úlohu v regulácii signalizácie NO. Oxid dusnatý je schopný reagovať s redukovaným glutatiónom za vzniku S-nitrozoglutatiónu, ktorý bol navrhnutý ako skladovacia a transportná forma pre oxid dusnatý v rastlinách a semenách (Arc et al., 2013a).

Ako donor oxidu dusnatého funguje nitroprusid sodný (SNP) (Gheysarbigi et al., 2020). SNP, systematickým názvom pentakyanonitrosylželezitan sodný, je anorganický komplex, v ktorom je železo viazané ako Fe^{2+} a oxid dusnatý ako NO^+ (Rico-Lemus & Rodríguez-Garay, 2014). SNP má niekoľko výhod v porovnaní s inými donormi NO. Azda najväčšou výhodou je, že nitroprusid sodný dodáva oxid dusnatý mnoho hodín (Bethke et al., 2006). Nitroprusid sodný v roztoku je vysoko fotosenzitívny a jeho rýchlosť rozkladu sa zvyšuje kyslíkom aj teplotou. Dokázalo sa, že fotolýza SNP uvoľňuje viac kyanidu ako oxidu dusnatého, a preto môže byť kyanid aktívnou zlúčeninou pri aplikácii SNP na semená. Uvoľňovanie kyanidu ako vedľajšieho produktu v roztoku obmedzuje užitočnosť SNP ako donora NO v rôznych biologických výskumoch (Arc et al., 2013b; Singh & Bhatla, 2017).

Medzi ďalšie donory oxidu dusnatého patria SNAP (S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicilamín), DETA (dietyléntriámín NONOát) a CAY (4-(*p*-metoxyfenyl)-1,3,2-

oxatiazolylium-5-olát), ktoré vykazujú rozdielnu schopnosť uvoľňovania oxidu dusnatého vo vodnom roztoku. DETA patrí do skupiny diazéniumdiolátov, známych aj ako NONOáty. Tieto zlúčeniny obsahujú diolátovú skupinu viažúcu sa cez atóm dusíka na nukleofilný adukt, ktorým môže byť primárny alebo sekundárny amín, prípadne polyamín. Ich rozklad závisí od hodnoty pH, pretože pri hodnotách vyšších ako 9 sa rozkladajú veľmi pomaly, pri fyziologickom pH sa rozkladajú strednou rýchlosťou a pri kyslom pH sa rozkladajú okamžite (Singh & Bhatla, 2017).

K zablokovaniu signálnych dráh oxidu dusnatého dochádza pôsobením lapačov, ktoré sa líšia svojou špecifickosťou a schopnosťou získať prístup k miestu pôsobenia NO. Do kategórie zlúčenín nitronyl nitroxidu, ktoré sú stabilné organické radikály patria PTIO (2-fenyl-4,4,5,5-tetrametylimidazolín-1-oxyl-3-oxid) a cPTIO (2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetrametylimidazolín-1-oxyl-3-oxid), využívajúce sa ako lapače oxidu dusnatého. PTIO reaguje s NO za vzniku zodpovedajúcich iminonitroxidov (PTI) a NO₂. Bežne je preferovaný cPTIO pred PTIO, pretože je vo vode viac rozpustný. Vo všeobecnosti platí, že pri použití donorov alebo lapačov NO by sa mal vždy brať do úvahy potenciálny účinok všetkých vytvorených zlúčenín. Preukázanie opačných účinkov donorov NO a lapačov NO v danom fyziologickom procese sa zvyčajne považuje za spoľahlivý dôkaz obsiahnutia oxidu dusnatého (Goldstein et al., 2003; Adámková & Petřivalský, 2012; Arc et al., 2013b; Singh & Bhatla, 2017).

Ditiokarbamáty sú zlúčeniny, ktoré vychytávajú oxid dusnatý tvorbou komplexu s Fe²⁺. Medzi takéto zlúčeniny patrí DETC (dietylditiokarbamát), známy ako molekulárny lapač NO. DMPO (5,5-dimetyl-1-pyrolín-N-oxid) je redoxná, hydrofilná a inertná molekula s nízkou toxicitou. Vďaka tomu, že DMPO dokáže vytvárať stabilné adukty s radikálmi obsahujúcimi dusík vo svojom centre, niektoré pozorovania zo živočíšnych systémov naznačujú schopnosť danej molekuly zachytávať oxid dusnatý (Singh & Bhatla, 2017).

2.6.4 Role oxidu dusnatého pri klíčení a dormancii semien

Mnohé zlúčeniny obsahujúce dusík vrátane oxidu dusnatého, oxidu dusičitého, dusitanov, dusičnanov a amoniaku podporujú klíčenje semien a zbavujú ich dormancie u viacerých druhov. Klíčeniu semien môžu napomáhať prostredníctvom účinkov na metabolizmus, oxidačný stav alebo signalizáciu. Oxid dusnatý, dusitany a dusičnany dokážu stimulovať pentózafosfátovú dráhu, pričom dusičnany sú schopné indukovať expresiu niektorých

génov kódujúcich enzýmy v pentózafosfátovej dráhe pre poskytnutie základných živín, a tým vyvolajú klíčenie (Finkelstein et al., 2008).

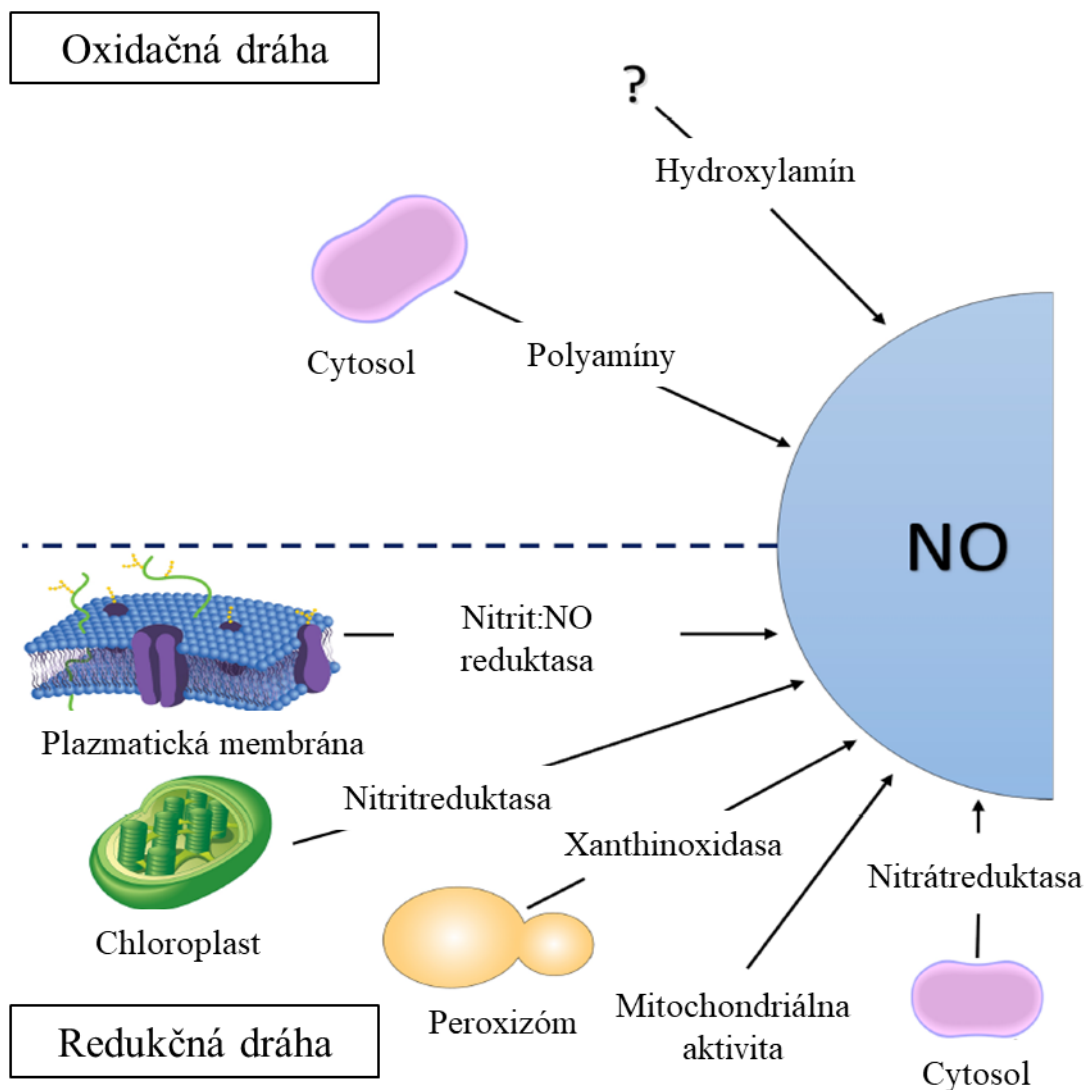
Výskumy naznačujú, že oxid dusnatý sa podieľa na procesoch podporujúcich klíčenie semien za použitia zlúčenín, ktoré sú donormi oxidu dusnatého. Dokonca aktivuje klíčenie a má účinok aj na odstránenie dormancie tým, že je spojený s katabolizmom kyseliny abscisovej. Rápidne zvýšenie katabolizmu kyseliny abscisovej je spôsobené oxidom dusnatým, ktorý je produkovaný vo vrstve endospemu v krátkom čase počas nasávania semien (Bethke et al., 2007; Gibbs et al., 2014; Yan & Chen, 2020). Kyselina abscisová (ABA) inhibuje klíčenie semien a podporuje ich dormanciu počas dozrievania embryí. To slúži ako obranný mechanizmus za nepriaznivých podmienok. Kyselina abscisová podporuje akumuláciu proteínov a lipidov v semenách, čo zvyšuje ich vysychanie a dormanciu, a tým zabraňuje klíčeniu (Prakash et al., 2019). Rýchly pokles obsahu ABA vyvolaný oxidom dusnatým je sprostredkovaný zvýšením transkripcie génu *CYP707A2* a nahromadením proteínu *CYP707A2*. Zvýšenú transkripciu daného génu vykazujú semená ošetrované SNP, zatiaľ čo pri semenách ošetrovaných c-PTIO je transkripcia potlačená. Oxid dusnatý tým pádom podporuje zmiernenie dormancie semien zvýšením expresie génu *CYP707A2* a následným znížením obsahu kyseliny abscisovej v semenách (Yan & Chen, 2020).

Oxid dusnatý dokáže inhibovať mitochondriálne dýchanie vratnou väzbou na cytochrom c oxidasu, pričom táto inhibícia pomáha pri zlepšovaní oxidačnej fosforylácie. Počas klíčenia je potrebná rovnováha medzi oxidom dusnatým, reaktívnymi formami kyslíka a respiračným metabolizmom na udržanie energetického stavu v semene. Pre zahájenie klíčenia môže byť potrebná minimalizácia ROS, pričom v procese detoxikácie ROS indukciou syntézy antioxidantov sa dá predpokladať, že má oxid dusnatý dôležitú úlohu. V súčasnosti však neexistujú dostatočné informácie o mechanizme detoxikácie ROS počas klíčenia semien (Pandey et al., 2019).

2.6.5 Lokalizácia produkcie oxidu dusnatého v bunke

Biosyntéza oxidu dusnatého sa väčšinou vyskytuje v chloroplastoch, peroxizómoch a mitochondriách. Oxid dusnatý sa môže vytvárať redukčným alebo oxidačným mechanizmom (Obr. 6). Oxidačný mechanizmus zahŕňa L-arginin-dependentnú dráhu v chloroplastoch, oxidáciu hydroxylamínov a polyamínov (PA), čo vedie k syntéze NO. Podrobný mechanizmus, akým sa polyamíny menia na NO a rovnako tak aj enzým

podieľajúci sa na biosyntéze NO riadenej hydroxylamínom zostávajú stále neznáme. Redukčná syntéza (závislá od dusitanov) zahŕňa nitrátreduktasu (NR), nitrit: NO reduktasu (NiNOR) nachádzajúcu sa na plazmatickej membráne, peroxizomálnu xanthinoxidasu (XOD) a neenzymatickú redukciu dusitanov v apoplaste (Huang et al., 2019; Singh et al., 2020). Mitochondriálny oxid dusnatý je vytváraný hlavne z NO_2^- a deteguje sa iba za anaeróbnych podmienok. Funkcia mitochondriálneho NO môže byť obzvlášť dôležitá vo fyziologických situáciách, keď je dýchanie narušené (Baudouin, 2010).



Obr. 6: Schematické znázornenie kľúčových dráh zapojených do biosyntézy oxidu dusnatého. Prerušovaná čiara označuje biosyntézu oxidu dusnatého, ktorá môže prebiehať oxidačnou alebo redukčnou dráhou. Redukčná dráha zahŕňa premenu NO_2^- na NO v cytosole (prostredníctvom aktivity NR, nitrátreduktasa), na plazmatickej membráne (prostredníctvom aktivity Ni-NOR, nitrit:NO reduktasa) v peroxizómech, chloroplastoch a v mitochondriách. Otáznik naznačuje neistý mechanizmus pôsobenia hydroxylamínov pri produkcii oxidu dusnatého. Prevzaté a upravené od Singh et al., 2020.

2.7 Charakteristika študovaných parametrov

2.7.1 Polyfenoloxidasa

Polyfenoloxidasa (1,2-benzendiol oxidoreduktasa, PPO, EC 1.10.3.1), často nazývaná aj tyrosinasa, kresolasa, polyfenolasa alebo katecholoxidasa (Blaschek & Pesquet, 2021) patrí do skupiny oxidoreduktas obsahujúcich meď, ktoré môžu hydroxylovať monofenoly alebo oxidovať difenoly na o-dichinony. Tieto vysoko reaktívne zlúčeniny môžu ďalej polymerovať alebo sa kovalentne viazať na proteíny a zosieťovať za vzniku melanínu, pigmentu s vysokou molekulovou hmotnosťou (Glagoleva et al., 2020). Izoenzýmy PPO možno rozlíšiť na základe elektroforetickej mobility, optimálnej teploty a substrátovej špecifickosti. Aktivita PPO závisí od pH, ktoré ovplyvňuje väzbu substrátov a katalýzu. Vo všeobecnosti sa optimálne pH PPO pohybuje medzi 4,0 a 8,0 (Taranto et al., 2017).

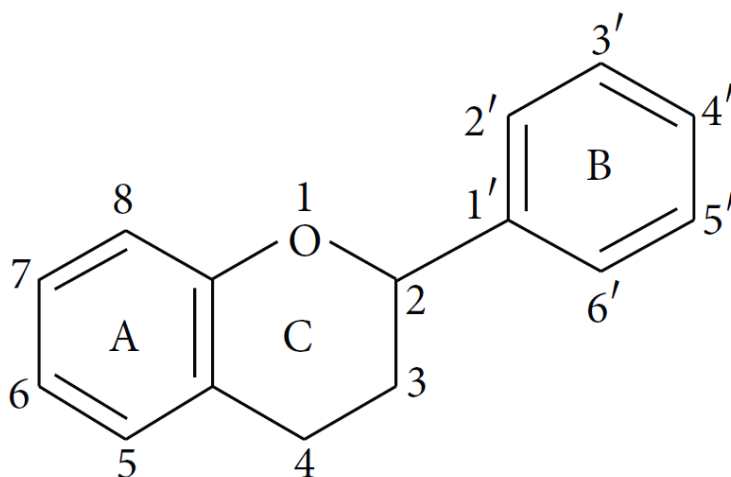
Enzýmy polyfenoloxidasý sú často lokalizované v chloroplastoch, kde sú spojené s vnútornými membránami tylakoidov. Nachádzajú sa aj v cytoplazme a vo vezikulách medzi plazmalemou a bunkovou stenou (Nguyen et al., 2003).

Počas starnutia, poranenia a manipulácie pri spracovaní a skladovaní sa po zbere môže na plodoch objaviť hnednutie. Hnednutie negatívne ovplyvňuje farbu, chuť, nutričné vlastnosti a trvanlivosť potravinárskych výrobkov (Sahbaz et al., 2009; Taranto et al., 2017). Počas procesu hnednutia dochádza k syntéze rastlinného melanínu, pigmentu hnedej až čiernej farby. Táto reakcia nastane, keď sa polyfenoloxidasý umiestnené v chloroplastoch uvoľňujú z chloroplastov v dôsledku narušenia bunkových organel. Následne polyfenoloxidasý interagujú s vakuolárnymi substrátmi za vzniku o-chinónov polymerizujúcich na melanín. Následkom variácií v lokalizácii enzýmov zapojených do procesu hnednutia, hnednutie pokračuje, až kým sa vnútrobunková membrána nerozpadne. Počas nefunkčnosti membrány je najdôležitejším javom pozorovaným v danej lokalite oxidácia fenolických zlúčenín, pri ktorej sa po tomto procese zníži ich celkový obsah v rastlinných bunkách (Gheysarbigi et al., 2020; Glagoleva et al., 2020).

Bôbovité rastliny patria medzi rastliny bohaté na fenoly, pričom prevažnú časť tvoria flavonoidy, izoflavonoidy, antokyány a fenolové kyseliny (Fahim et al., 2019). Fenolové zlúčeniny sú jednou z najviac študovaných funkčných zložiek v semenách hrachu, pretože fenoly, no hlavne flavonoidy, nachádzajúce sa najmä v osemeni a v rastlinných systémoch pomáhajú v boji proti oxidačnému stresu a pôsobia ako regulátory rastu (Kumar & Pandey, 2013; Ma et al., 2021). Fenoly a flavonoidy sú najbežnejšími fytozložkami rôznych druhov ovocia, zeleniny, liečivých a aromatických rastlín, ktoré sa vyznačujú

antioxidačnými a protizápalovými účinkami. Antioxidant je látka inhibujúca a oddiaľujúca oxidačné poškodenie buniek tým, že vychytáva voľné radikály ako je peroxid alebo hyperoxid. Vďaka tomu sa znižuje riziko degeneratívnych ochorení. Neprimeraná produkcia voľných radikálov môže spôsobiť niekoľko závažných chorôb (rakovina, Alzheimerova choroba, ochorenia srdca, obličiek, pečene alebo ateroskleróza) (Phuyal et al., 2020; Borges-Martínez et al., 2022).

Flavonoidy sú hydroxylované fenolické látky s premenlivou fenolovou štruktúrou. Po chemickej stránke pozostávajú zo skeletu zloženého z pätnástich uhlíkov tvoriacich dva benzénové kruhy, spojené cez heterocyklický pyránový kruh (Obr. 7). Flavonoidy možno rozdeliť do rôznych tried akými sú flavóny, flavonoly a flavanóny. Triedy sa od seba líšia úrovňou oxidácie a substitúciou heterocyklického pyránového kruhu. Jednotlivé zlúčeniny v rámci triedy sa líšia substitúciou benzénových kruhov (Kumar & Pandey, 2013).

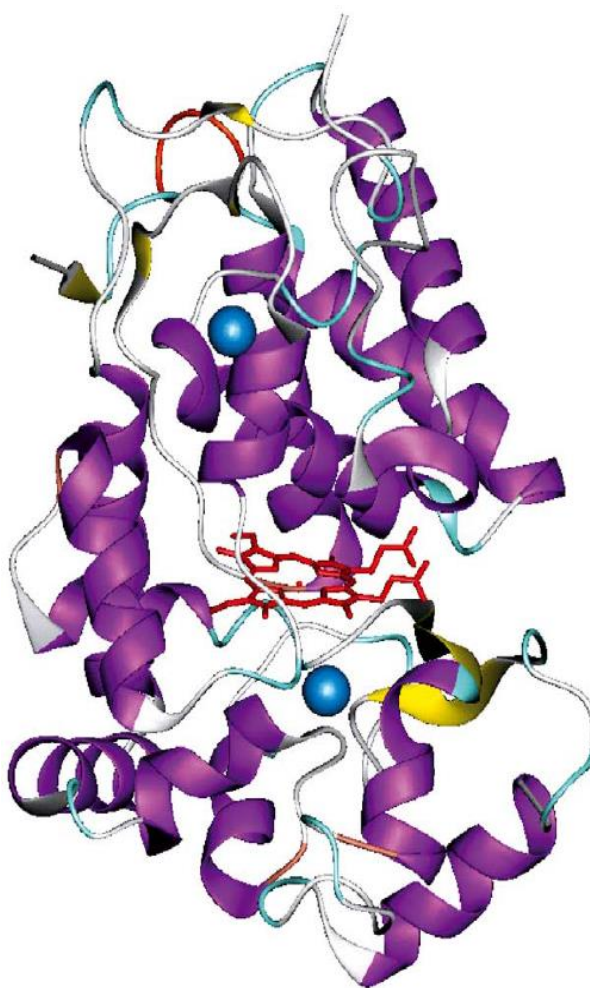


Obr. 7: Základná štruktúra flavonoidov skladajúcich sa z pätnásť uhlíkového skeletu, ktorý tvoria dva benzénové kruhy (A a B), spojené cez heterocyklický pyránový kruh (C). Prevzaté a upravené od Kumar & Pandey, 2013.

2.7.2 Peroxidasa

Peroxidasa (peroxid vodíka oxidoreduktasa, POD, EC 1.11.1.7) je glykozylovaný rastlinný enzým obsahujúci hem. Patrí ku kľúčovým antioxidačným enzýmom, ktoré sú v prírode široko rozšírené a katalyzujú oxidáciu rôznych elektrón donorových substrátov (aromatických fenolov, amínov, indolov) súčasne s rozkladom peroxidu vodíka (Gundinger & Spadiut, 2017; Pandey et al., 2017).

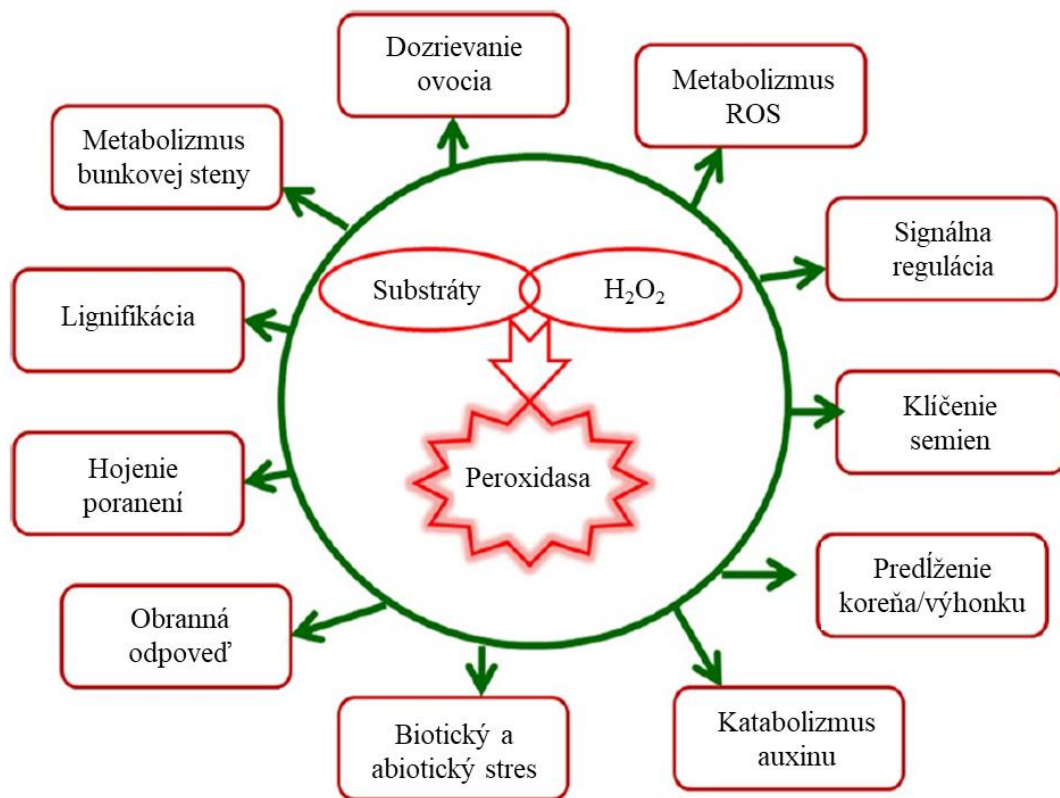
Peroxidasy rovnakej triedy sú tvorené dvomi doménami, nazývanými proximálna a distálna, z ktorých každá viaže jeden ión vápnika (Obr. 8) (Blaschek & Pesquet, 2021). Vo väčšine skúmaných rastlinných druhov sa vyskytujú ako charakteristické izoenzýmy, ktoré môžu byť konštitutívne alebo indukované v reakcii na vonkajšie faktory ako je poranenie, stres a napadnutie patogénmi (Veitch, 2004a).



Obr. 8: Trojrozmerné znázornenie kryštálovej štruktúry izoenzýmu C chrenovej peroxidasy. Skupina hemu (vyfarbená červenou farbou) sa nachádza medzi distálnou a proximálnou doménou, z ktorých každá obsahuje jeden atóm vápnika (zobrazené ako modré guľôčky). α -helikálne a β -listové oblasti enzýmu sú znázornené fialovou a žltou farbou. Prevzaté od Veitch, 2004b.

V prírode sú všadeprítomné a nachádzajú sa v baktériách, hubách, riasach, rastlinách a zvieratách. Rastlinné peroxidasy, ktoré patria do triedy III sa podieľajú na rôznych životne dôležitých procesoch rastu a vývoja rastlín počas ich životného cyklu (Obr. 9). Patrí sem metabolizmus bunkovej steny, rast a dozrievanie plodov, lignifikácia, metabolizmus reaktívnych foriem kyslíka (ROS), metabolizmus reaktívnych foriem dusíka (RNS) a metabolizmus auxínov. Lignifikácia sa vyskytuje počas normálneho rastu a obranných reakcií rastlín. Lignín nachádzajúci sa v bunkovej stene rastlín poskytuje rastline tuhosť, pevnosť a odolnosť voči chemickým, fyzikálnym a biologickým útokom. V prípade metabolizmu reaktívnych foriem kyslíka sa tvoria redukované druhy kyslíka, ktoré sú veľmi reaktívne a schopné oxidovať rôzne bunkové zložky. Reakcia vedie k oxidačnému poškodeniu rastlinnej bunky spojenému s peroxidáciou membránových lipidov, oxidáciou proteínov, inhibíciou enzýmov a poškodením DNA. V konečnom dôsledku to môže viesť k programovanej bunkovej smrti. V rastlinách je bunková hladina peroxidu vodíka väčšinou regulovaná enzýmovými účinkami katalas a peroxidas. Počas klíčenia rastlín je aktivita peroxidasy zvýšená, pretože odstraňuje rôzne toxické produkty zo semien ako prirodzený lapač. Peroxidasa má podiel na syntéze rastlinného hormónu etylénu, ktorý dáva podnet k dozrievaniu plodov (Pandey et al., 2017).

Peroxidasy triedy III majú dva odlišné reakčné mechanizmy: peroxidačný cyklus využívajúci H_2O_2 (peroxid vodíka) alebo iné peroxidy na oxidáciu ich substrátu a hydroxylový cyklus premieňajúci H_2O_2 na iné typy reaktívnych foriem kyslíka. Peroxidasy z rastlín obsahujúce hem zahŕňajú klasické alebo sekrečné rastlinné peroxidasy a askorbátperoxidasy: L-askorbát peroxid vodíka oxidoreduktasa (peroxidasa, E.C. 1.11.1.11). Tieto dve odlišné skupiny enzýmov sú klasifikované oddelene v nadrodine rastlinných peroxidas. Primárnou funkciou askorbátperoxidas nachádzajúcich sa hlavne v cytosole alebo chloroplaste je zachytávanie a detoxikácia peroxidu vodíka (Veitch, 2004a).



Obr. 9: Schéma znázorňujúca úlohy rastlinných peroxidas, ktoré sa podieľajú na obranných reakciách voči stresu, ROS metabolizme, hojení rán alebo procesov podnecujúcich klíčenie a rast rastlín. Prevzaté a upravené od Pandey et al., 2017.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Rastlinný materiál

Rastlinný materiál, konkrétne semená hrachu dvoch genotypov boli poskytnuté Katedrou botaniky, Prírodovedecká fakulta Univerzita Palackého a firmou Selgen. Semená zahŕňali planý, vysoko dormantný genotyp *Pisum sativum* subsp. *elatius* IG140897 a kultúrny, nedormantný genotyp *Pisum sativum* subsp. *sativum* Trendy. Ďalej v práci sú použité skrátené názvy pre označenie genotypov, a to Trendy a IG140897.

3.2 Použité chemikálie

- 2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetrametylimidazolín-1-oxyl-3-oxid (cPTIO) – Sigma-Aldrich, USA
- 4-chlór-1-naftol - Sigma-Aldrich, USA
- 4-metylkatechol - Sigma-Aldrich, USA
- Agarosa - Sigma-Aldrich, USA
- Cryo-gel - Leica Biosystems, USA
- Dimetylsulfoxid (DMSO) - Lach-Ner, Česká republika
- Guajakol - Sigma-Aldrich, USA
- Katalasa - Honeywell Fluka, Rumunsko
- Metanol - Sigma-Aldrich, USA
- Nitroprusid sodný (SNP) - Honeywell Fluka, Rumunsko
- Pefabloc - Honeywell Fluka, Rumunsko
- Peroxid vodíka - Lachema, Česká republika
- Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) - Sigma-Aldrich, USA

3.3 Použité prístroje a experimentálne vybavenie

- Analytické váhy - Denver Instrument, USA
- Centrifúga 5418R - Eppendorf, Nemecko
- Digitálny pH meter - XS Instruments, Taliansko
- Kryostat LEICA CM1950 - Leica Biosystems, USA
- Magnetická miešačka - BioSan, Litva
- Mikrodoštičkový reader Synergy HT - Bio Tek Instruments, USA
- Mikrodoštičky Test plate 96F - TPP, Švajčiarsko

- Mikroskop AXIO Imager KM - Zeiss, Nemecko
- Sada automatických pipiet - Eppendorf, Nemecko
- Vibratom s dvojramenným zdrojom VT1000S - Leica Biosystems, USA
- Vortex - BioSan, Litva

3.4 Metódy

3.4.1 Pestovanie a spracovanie rastlinného materiálu

Semená planého a kultúrneho hrachu bobtnali a vyvíjali sa v kľíčne rastliny na štvorcových Petriho miskách. Do Petriho misiek boli vložené servítky, na ktoré boli naliate jednotlivé roztoky a voda podľa podmienok v akých mali semená kľíčiť. Na jeden genotyp bolo použitých 9 misiek, pričom 3 misky obsahovali len vodu a slúžili na kontrolu, 3 misky obsahovali roztok donora oxidu dusnatého a ďalšie 3 misky roztok lapača oxidu dusnatého. Ako kontrola slúžila voda z vodovodu. Ako donor oxidu dusnatého bol použitý roztok nitroprusidu sodného (SNP) o koncentrácii $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a ako lapač oxidu dusnatého bol použitý roztok 2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetrametyl-imidazolín-1-oxyl-3-oxidu (cPTIO) o koncentrácii $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Na každú Petriho misku bolo naliatých 20 ml daného roztoku alebo vody. Na takto navlhčené servítky bolo poukladaných 20 vopred obrúsených semien hrachu. Dôvodom obrúsenia semien hrachu bolo použitie planého, vysoko dormantného genotypu IG140897, ktorý by bez narušenia osemenia nezačal kľíčiť. Aby boli zachované rovnaké podmienky pre rast, boli obrúsené aj semená kultúrneho, nedormantného genotypu Trendy. Semená sa nechali kľíčiť vo fytotrone pri teplote $23 \text{ }^\circ\text{C}$ s fotoperiódou 16 hodín svetlo a 8 hodín tma. Rastlinný materiál pre stanovenie aktivity polyfenoloxidas a peroxidasy bol napestovaný v troch opakovaniach.

Semená kultúrneho genotypu kľíčili rýchlejšie ako semená planého genotypu. Rastlinný materiál bol zozbieraný v troch štádiách. U genotypu Trendy bolo v prvom štádiu pri nabobtnaní (1 deň po nasadení) zozbierané embryo a osemenie. V druhom štádiu (2 dni po nasadení) bolo zozbierané osemenie, koreň a zvyšok embrya. V poslednom štádiu (4 dni po nasadení) bolo zozbierané osemenie, kľíčny list, koreň a epikotyl. V prípade planého genotypu IG140897 bolo v prvom štádiu pri nabobtnaní (1 deň po nasadení) zozbierané embryo a osemenie. Druhé štádium (4 dni po nasadení) zahŕňalo zber osemenia, koreňka a zvyšku embrya. V treťom štádiu (7 dní po nasadení) bolo zozbierané osmenie, kľíčny list, koreň a epikotyl. Rastlinný materiál bol po

zozbieraní vložený do mikroskúmaviek a okamžite prenesený do tekutého dusíka. Následne boli mikroskúmavky s rastlinným materiálom umiestnené do mraziaceho boxu s teplotou $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.2 Príprava rastlinných extraktov pre stanovenie enzýmovej aktivity

Rastlinný materiál (embryá, korene a nadzemné časti) bol postupne homogenizovaný v trecej miske na ľade. Osemenia hrachu boli homogenizované taktiež v trecej miske, ale s prídavkom tekutého dusíka. K zhomogenizovanému rastlinnému materiálu bol pridaný extrakčný pufo, ktorý obsahoval $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátový pufo o pH 7, 1% (w:v) polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) a $0,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pefabloc. Extrakčný pufo bol pridaný v pomere 1:3 (w:v), prípadne 1:4 (w:v). Vzorky boli následne centrifugované po dobu 20 minút, pri otáčkach $16\,900\text{ x g}$ a teplote $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugácii boli supernatanty prepipetované do čistých mikroskúmaviek, vložené do nádoby s ľadom a extrakty použité k stanoveniu aktivity jednotlivých enzýmov.

3.4.3 Stanovenie aktivít enzýmov

3.4.3.1 Stanovenie aktivity peroxidasy

Pre stanovenie aktivity peroxidasy bola použitá spektrofotometrická metóda s guajakolom (Angelini et al., 1990). Pri vlastnej enzýmovej reakcii bol peroxid vodíka substrátom pre peroxidasu za súčasnej oxidácie guajakolu na 3,3'-dimetoxy-4,4'-bifenylochín, čo sa prejavilo nárastom absorbancie pri vlnovej dĺžke 436 nm. Molárny absorpčný koeficient pre 3,3'-dimetoxy-4,4'-bifenylochín bol $4500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Aktivita peroxidasy bola stanovená na mikrodoštičkovom readeri Synergy HT v 96 jamkovej mikrodoštičke. K stanoveniu bol použitý reakčný pufo, roztok peroxidu vodíka a extrakt. Reakčný pufo obsahoval $0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátový pufo o pH 6 a $0,113\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ guajakol. Do jamiek na mikrodoštičke bolo postupne napipetovaných $155\text{ }\mu\text{l}$ reakčného pufu, $10\text{ }\mu\text{l}$ extraktu a $10\text{ }\mu\text{l}$ $175\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku peroxidu vodíka. Stanovenia prebiehali v triplikátoch. Nárast absorbancie bol meraný pri vlnovej dĺžke 436 nm pri teplote $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 minúty v 20 sekundových intervaloch. Následne bola zmeraná absorbancia pri vlnových dĺžkach 900 nm a 977 nm pre výpočet dĺžky optickej dráhy. Aktivita peroxidasy bola stanovená v osemeni, embryu, koreni a nadzemnej časti u oboch genotypov počas troch štádií zberu.

3.4.3.2 Stanovenie aktivity polyfenoloxidasy

Aktivita polyfenoloxidasy bola stanovená spektrofotometricky na mikrodoštičkovom readeri Synergy HT v 96 jamkovej mikrodoštičke. Molárny absorpčný koeficient produktu reakcie bol $1090 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. K stanoveniu aktivity PPO bol použitý K-fosfátový pufr o koncentrácii $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pH 7, roztok katalasy (pripravený rozpustením 5 mg katalasy v 4 ml vody), vzorka a roztok 4-metylkatecholu s koncentráciou $88 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do jamiek na mikrodoštičke bolo postupne napipetovaných 180 μl K-fosfátového pufru, 20 μl roztoku katalasy, 10 μl vzorky a buď 10 μl roztoku 4-metylkatecholu alebo 10 μl vody do blanku. Nárast absorbancie bol meraný pri vlnovej dĺžke 420 nm pri teplote $25 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 60 minút v 5 minútových intervaloch. Potom bola zmeraná absorbancia pri vlnových dĺžkach 900 nm a 977 nm pre výpočet dĺžky optickej dráhy. Aktivita polyfenoloxidasy bola stanovená v osemeni, embryu, koreni a nadzemnej časti u oboch genotypov počas troch štádií zberu.

3.4.4 Výpočty a štatistika enzýmových aktivít

V priebehu pestovania boli prevedené tri biologické replikáty vzoriek, čiže tri pestovania. Aktivity enzýmov boli merané v technických triplikátoch. V grafoch sú uvedené priemery a smerodajné odchýlky z minimálne deviatich hodnôt. Hodnoty aktivity boli prepočítané na relatívne jednotky, kedy hodnota jedna bola priradená vždy kontrolnej vzorke daného genotypu u oboch vývojových štádií. Bolo tak možné lepšie pozorovať vplyv modulátorov hladiny oxidu dusnatého na študovaný parameter.

3.4.5 Histochemická lokalizácia aktivity peroxidasy a polyfenoloxidasy

Štruktúry osemenia, hila, koreňa a kľúčneho listu kultúrneho a planého genotypu hrachu v druhom štádiu vývoja boli pozorované v prechádzajúcom svetle s využitím mikroskopu. K zhotoveniu rezov boli použité prístroje vibratom a kryostat. Na vibratome boli pripravené rezy koreňov a kľúčnych listov, na kryostate rezy osemení. K príprave preparátov osemenia bol použitý terčik s naneseným cryo-gelom, ktorý sa nechal zamraziť. Na zamrazený cryo-gel bola nanosená ďalšia vrstva cryo-gelu, do ktorého bola vložená vyzeraná časť osemenia obsahujúca hilum. Takto pripravený terčik sa dal opäť zamraziť. Po zamrazení boli zhotovené rezy s hrúbkou 40 μm pre IG140897 a 50 μm pre Trendy. Rezy boli pomocou štetca prenesené do K-fosfátového pufru o koncentrácii

10 mmol·l⁻¹ a pH 7 na podložnom sklíčku na ďalšie pozorovanie. K príprave preparátov klíčneho listu a koreňa bola použitá 4% agarosa. Rastlinný materiál bol vložený do tekutej agarosy s teplotou 40 °C, ktorá sa následne nechala stuhnúť na ľade. Zo stuhnutej agarosy boli vyrezané časti s koreňom alebo klíčnym listom potrebnej veľkosti k zhotoveniu rezov. Hrúbka rezov koreňa u oboch genotypov bola 70 µm a klíčneho listu 50 µm. Rezy boli pomocou štetca prenesené do K-fosfátového pufru o koncentrácii 10 mmol·l⁻¹ a pH 7 na podložnom sklíčku na ďalšie pozorovanie.

Po príprave rezov nasledovalo farbenie k stanoveniu aktivity enzýmov peroxidasa a polyfenoloxidasa. K stanoveniu aktivity POD bol použitý roztok 4-chlór-1-naftolu. Roztok bol pripravený rozpustením 1,5 mg 4-chlór-1-naftolu v 1 ml metanolu, následne bolo pridaných 2,7 ml K-fosfátového pufru o koncentrácii 10 mmol·l⁻¹ a pH 7. Z pripraveného roztoku bol odobratý 1 ml a k nemu bolo pridaných 20 µl 30% peroxidu vodíka. K stanoveniu aktivity PPO bol použitý 40 mmol·l⁻¹ roztok metylkatecholu.

Pred farbením rezov bol z podložného sklíčka odpipetovaný K-fosfátový pufor a následne pridaný farbiaci roztok k stanoveniu aktivity PPO alebo POD. Rezy s farbiacimi činidlami sa nechali inkubovať, buď 1 minútu pre stanovenie aktivity POD alebo 1 hodinu pre stanovenie aktivity PPO. Po inkubácii boli farbiace roztoky odpipetované, 2x bol pridaný a odpipetovaný K-fosfátový pufor o koncentrácii 10 mmol·l⁻¹ a pH 7, na premytie rezu. Následne bol na rez znovu pridaný K-fosfátový pufor o koncentrácii 10 mmol·l⁻¹ a pH 7, pripravený preparát bol prekrytý krycím sklíčkom a nasledovalo samotné mikroskopické pozorovanie.

4 VÝSLEDKY

Experimentálna časť bakalárskej práce bola zameraná na spektrofotometrické stanovenie aktivity peroxidasy (POD), polyfenoloxidas (PPO) a histochemickú lokalizáciu aktivity týchto enzýmov v rastlinnom materiáli. Rastlinný materiál pre spektrofotometrické stanovenie aktivity POD a PPO bol pestovaný v prostredí donora a lapača oxidu dusnatého. Následne bol zozbieraný v troch štádiách. Vo výsledkoch sú uvedené aktivity enzýmov len v dvoch štádiách, pretože tretie štádium bolo zaťažené stresom zo sucha. Semená slúžiace k lokalizácii aktivity POD a PPO mikroskopickým pozorovaním, boli pestované vo vode, pričom bol použitý rastlinný materiál z druhého štádia. Na zhotovenie preparátov slúžili rezy osemením, koreňom a kľúčnym listom planého genotypu *P. sativum* subsp. *elatius* IG140897 a kultúrneho *P. sativum* subsp. *sativum* Trendy.

4.1 Porovnanie študovaných genotypov hrachu

4.1.1 Porovnanie semien

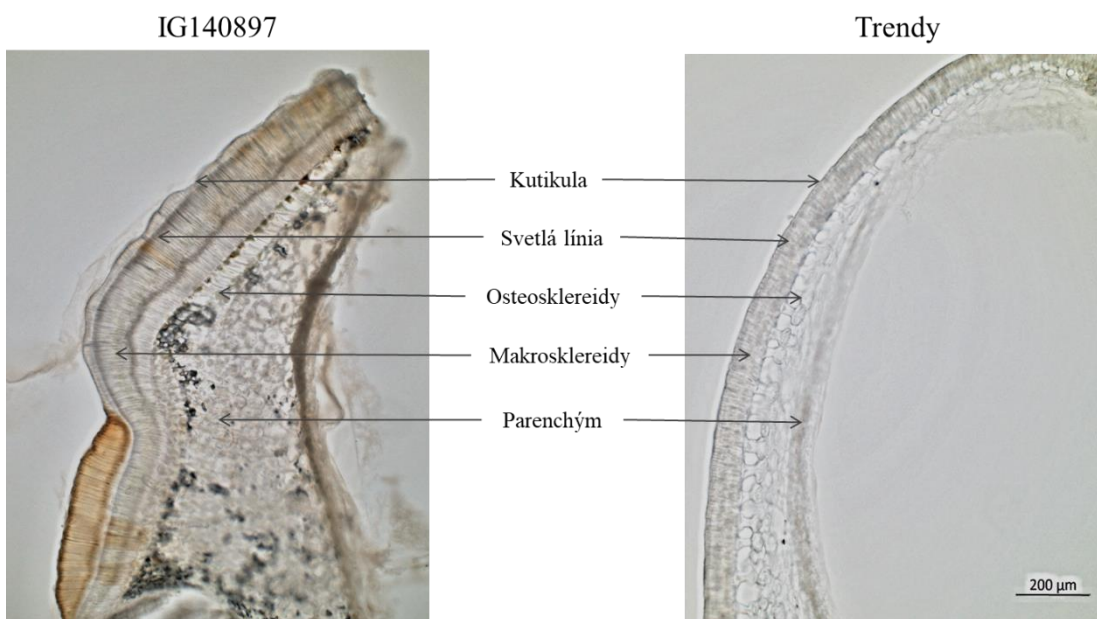
Rastlinný materiál zahŕňal semená planého, vysoko dormantného genotypu IG140897 a kultúrneho, nedormantného genotypu Trendy (Obr. 10). Semená genotypu Trendy boli v porovnaní so semenami IG140897 väčšie. Osemenie genotypu Trendy bolo nepigmentované a hladké, rovnako aj hilum. V prípade IG140897 bolo osemenie i hilum tmavej pigmentácie a na osemení sa vyskytovali drobné tmavšie škvrny.



Obr. 10: Semená hrachu kultúrneho genotypu Trendy a planého genotypu IG140897, po 24 h bobtnaní.

4.1.2 Anatomické porovnanie osemenia

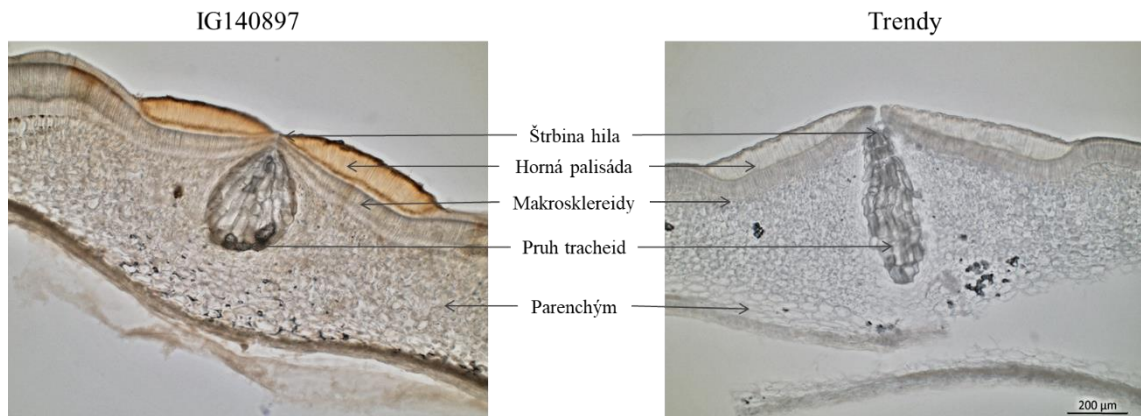
Na obr. 11 je vidieť osemenie planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy. Osemenie planého genotypu je v porovnaní s hladkým osemením kultúrneho genotypu štruktúrované a pigmentované. Povrch oboch osemení je pokrytý kutikulou, ktorá tvorí súvislú vrstvu. Pod povrchom sa nachádza svetlá línia, pričom u planého genotypu vytvára hrubšiu vrstvu než u kultúrneho genotypu. Rovnako tak aj vrstva makrosklereidov je hrubšia u IG140897 ako u genotypu Trendy. Pod makrosklereidmi sa nachádza vrstva osteosklereidov s medzibunkovými priestormi vyplnenými vzduchom. Nasleduje najvnútornejšia vrstva osemenia tvorená parenchýmom. V prípade IG140897 je parenchymatická vrstva hrubšia než v osemeni Trendy.



Obr. 11: Anatomické porovnanie osemenia planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy. Snímky boli zhotovené pri rovnakom zväčšení. Dĺžka úsečky je rovnaká pre obe snímky a demonštratívne je uvedená len na jednej snímke.

4.1.3 Anatomické porovnanie osemenia v oblasti hila

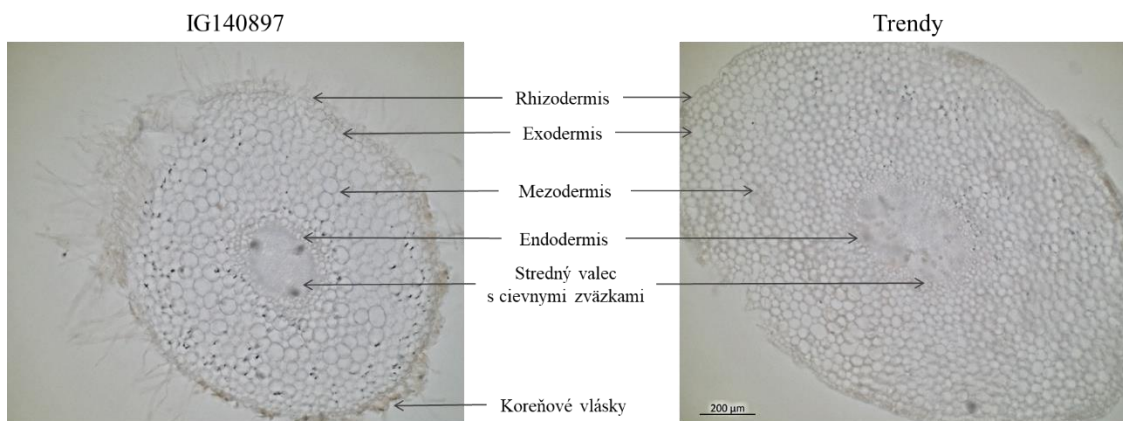
Rez osemením v oblasti hila planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy je zobrazený na obr. 12. Hilum planého genotypu je na rozdiel od hila kultúrneho genotypu, pigmentované. Obe osemenia obsahujú hornú palisádu (z angl. counter-palisade), pričom v osemeni planého genotypu je hnedo sfarbená a v prípade kultúrneho genotypu je nepigmentovaná. Oblasť hila je jedinou časťou semena, ktorá nie je pokrytá kutikulou. Hilum oboch genotypov obsahuje štrbinu, ktorá sa otvára pri nízkej relatívnej vlhkosti, zatiaľ čo pri vysokej relatívnej vlhkosti sa uzatvára. V hile a jeho okolí sa nevyskytuje vrstva osteosklereidov. Pruh tracheid (z angl. tracheid bar), ktorý zásobuje parenchým živinami, prechádza cez obe hila. Jeho tvar sa medzi genotypmi líši. U planého genotypu predstavuje tvar kvapky a u kultúrneho genotypu má úzky a predĺžený tvar. Pod vrstvou makrosklereidov, ktorá je hrubšia v prípade planého genotypu, sa nachádza parenchým.



Obr. 12: Anatomické porovnanie osemení v oblasti hila planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy. Snímky boli zhotovené pri rovnakom zväčšení. Dĺžka úsečky je rovnaká pre obe snímky a demonštratívne je uvedená len na jednej snímke.

4.1.4 Anatomické porovnanie koreňa

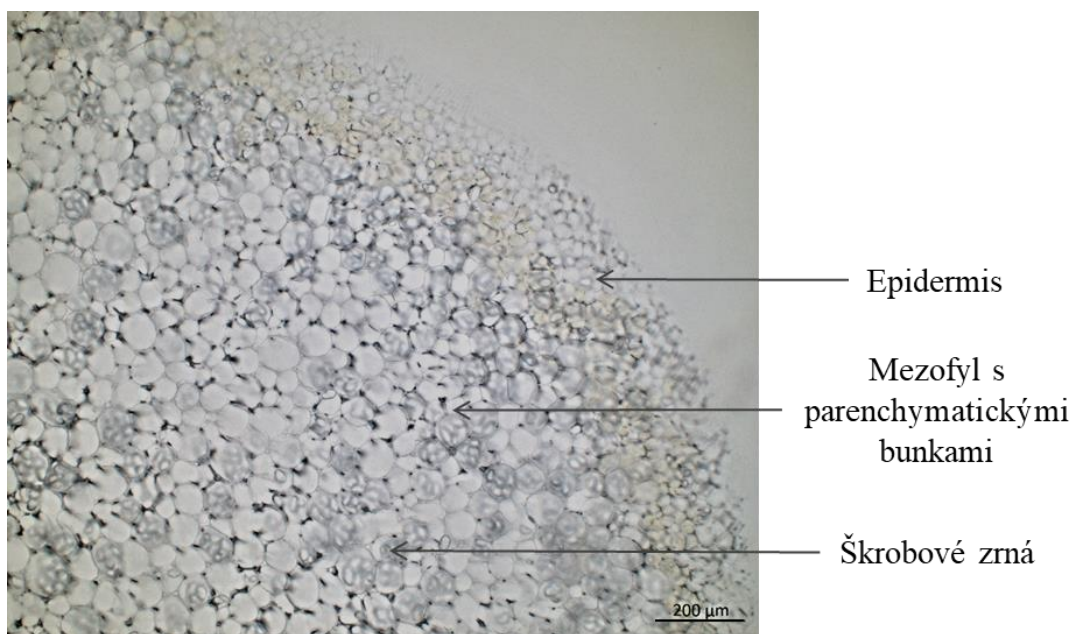
Na obr. 13 je zobrazený priečný rez koreňom planého genotypu IG140897, 3 dni po nasadení a kultúrneho genotypu Trendy, 2 dni po nasadení. Rezy koreňov oboch genotypov pozostávajú z rovnakých častí a neboli pozorované rozdiely. Na povrchu sa nachádza pokožka (rhizodermis) bez kutikuly. Pod pokožkou je primárna kôra tvorená tromi vrstvami: exodermis, mezodermis a endodermis. Nasleduje stredný valec s cievnymi zväzkami.



Obr. 13: Anatomické porovnanie priečného rezu koreňom planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy. Snímky boli zhotovené pri rovnakom zväčšení. Dĺžka úsečky je rovnaká pre obe snímky a demonštratívne je uvedená len na jednej snímke.

4.1.5 Anatomické porovnanie klíčného listu

Rez klíčným listom, vypreparovaný z bobtnajúceho semena 2 dni po nasadení, kultúrneho genotypu Trendy zobrazuje obr. 14. V prípade oboch genotypov vyzerá rez klíčným listom rovnako, preto je na obr. 14 uvedená len jedna snímka. Povrch tvorí pokožka (epidermis), pod epidermis sa nachádza široká vrstva mezofylu s parenchymatickými bunkami a vo vnútri buniek sú škrobové zrná.



Obr. 14: Anatomické pozorovanie rezu klíčným listom kultúrneho genotypu Trendy.

4.2 Histochemická lokalizácia aktivity peroxidasy

4.2.1 Lokalizácia aktivity peroxidasy v osemeni

V osemeni nebola detekovaná žiadna aktivita peroxidasy ani u jedného zo študovaných genotypov hrachu. Osemenie pred aj po farbení farbiacim roztokom vyzeralo rovnako ako na obr. 11.

4.2.2 Lokalizácia aktivity peroxidasy v koreni

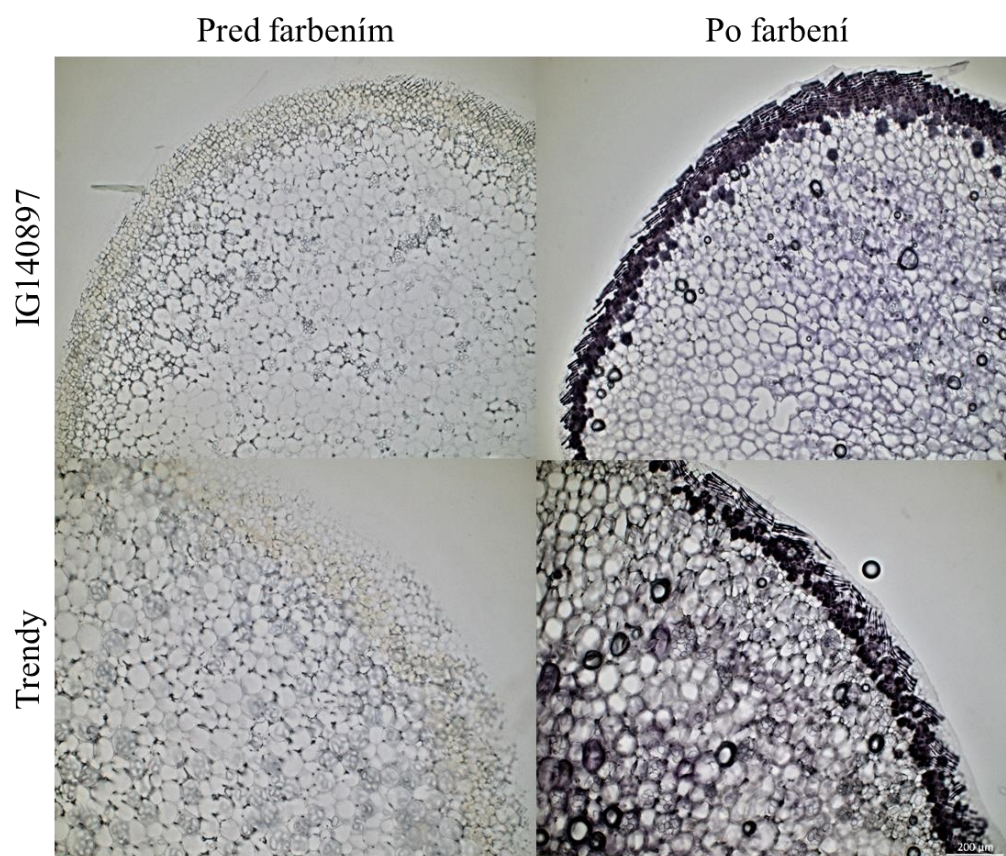
Obrázok 15 zobrazuje priečný rez koreňom planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy, pred a po farbení na lokalizáciu aktivity peroxidasy. Na farbenie bol použitý roztok 4-chlór-1-naftolu s peroxidom vodíka. Po minútovej inkubácii preparátu bolo možné vidieť zafarbenie rezu, čo znamenalo, že v koreni oboch genotypov bola peroxidasa aktívna. Aktivita peroxidasy bola lokalizovaná v bunkovej stene všetkých štruktúr koreňa. Intenzívnejšie tmavofialové zafarbenie bolo pozorované v oblasti rhizodermis, exodermis a stredného valca. K zafarbeniu však došlo aj v oblasti mezodermis a endodermis.



Obr. 15: Priečne rezy koreňom planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy pred a po farbení pre lokalizáciu peroxidasovej aktivity. Snímky boli zhotovené pri rovnakom zväčšení. Dĺžka úsečky je rovnaká pre všetky snímky a demonštratívne je uvedená len na jednej snímke.

4.2.3 Lokalizácia aktivity peroxidasy v klíčovom liste

Na obrázku 16 sú zobrazené rezy klíčovými listami planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy. Na základe viditeľného zafarbenia preparátov po farbení u oboch genotypov je možné zhodnotiť, že peroxidasa bola aktívna. Preparáty boli farbené rozokom 4-chlór-1-naftolu s peroxidom vodíka počas jednej minúty. Aktivita peroxidasy sa prejavila ako v oblasti epidermis, tak aj vo vrstve mezofylu s parenchymatickými bunkami.

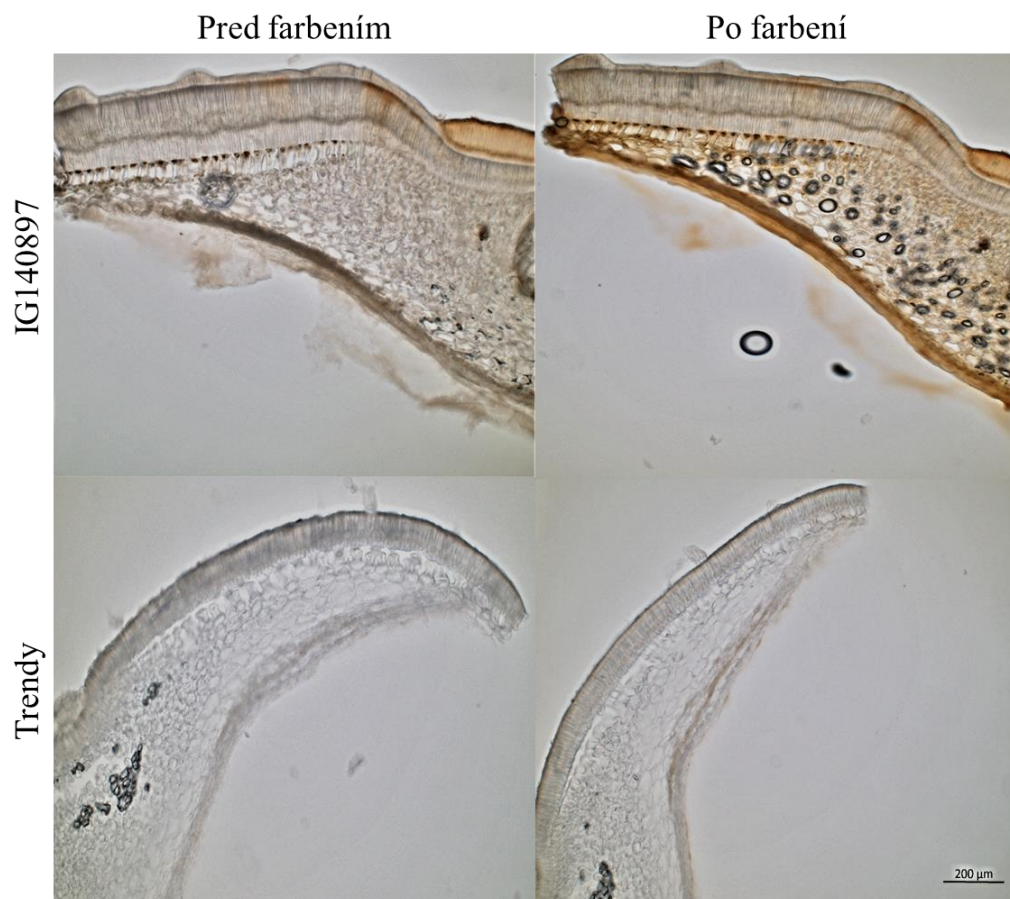


Obr. 16: Rezy klíčovými listami planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy pred a po farbení pre lokalizáciu peroxidasevej aktivity. Snímky boli zhotovené pri rovnakom zväčšení. Dĺžka úsečky je rovnaká pre všetky snímky a demonštratívne je uvedená len na jednej snímke.

4.3 Histochemická lokalizácia aktivity polyfenoloxidasy

4.3.1 Lokalizácia aktivity polyfenoloxidasy v osemeni

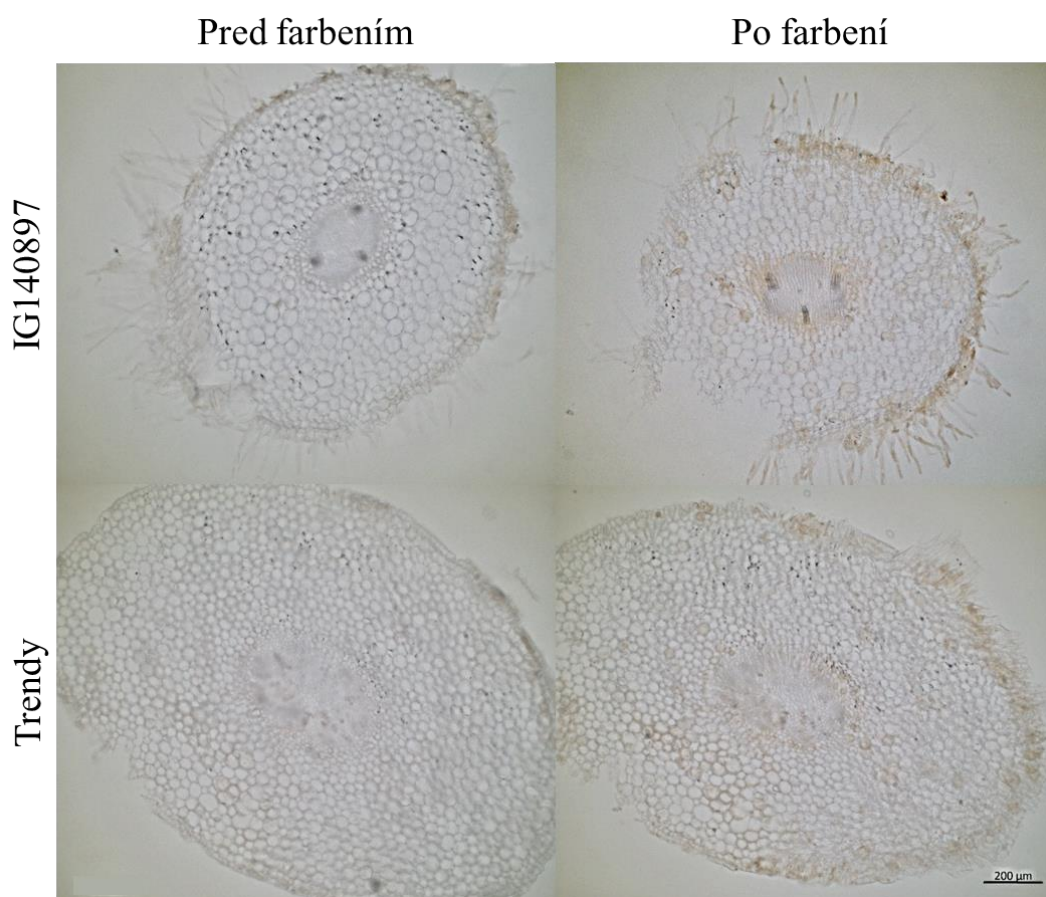
Zábery z mikroskopického pozorovania osemenia planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy sú znázornené na obr. 17. Zábery zobrazujú osemenie pred farbením a po farbení roztokom $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ metylkatecholu po dobu jednej hodiny. Je možné pozorovať, že v prípade planého genotypu došlo k hnedému zafarbeniu parenchymatickej vrstvy a vrstvy osteosklereidov. Hnedé sfarbenie značí, že polyfenoloxidasa je v osemeni planého genotypu aktívna. Na rozdiel od planého genotypu, v osemeni kultúrneho genotypu nenastala významná farebná zmena. Polyfenoloxidasa teda v prípade kultúrneho genotypu v osemeni bola výrazne menej aktívna.



Obr. 17: Rezy osemenia planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy pred a po farbení pre lokalizáciu polyfenoloxidasovej aktivity. Snímky boli zhotovené pri rovnakom zväčšení. Dĺžka úsečky je rovnaká pre všetky snímky a demonštratívne je uvedená len na jednej snímke.

4.3.2 Lokalizácia aktivity polyfenoloxidas v koreni

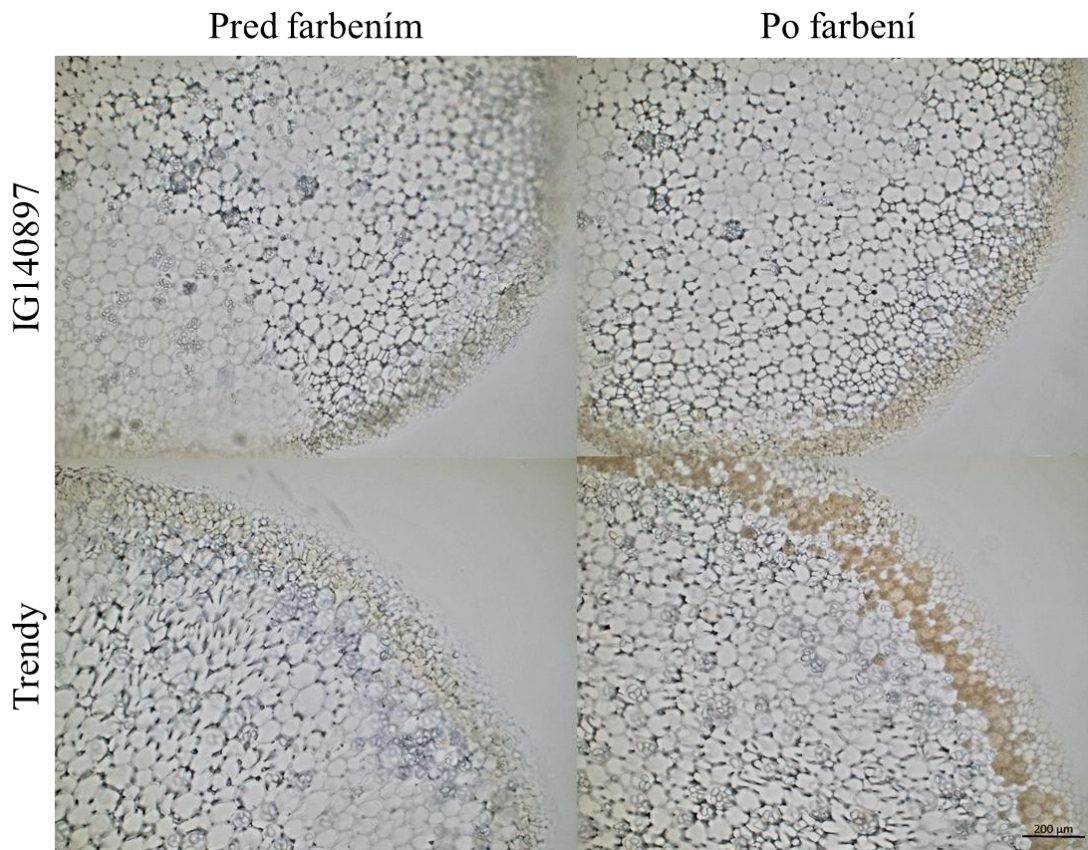
Priečný rez koreňom znázornený na obr. 18 predstavuje preparáty planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy. Možno pozorovať rezy pred a po farbení 40 mmol·l⁻¹ roztokom metylkatecholu počas jednej hodiny. U oboch genotypov sa hnedá pigmentácia, znázorňujúca aktívnu polyfenoloxidasu, prejavila v oblasti rhizodermis a exodermis. V porovnaní s nefarbeným preparátom sa hnedá farba objavila aj v oblasti stredného valca s cievnymi zväzkami.



Obr. 18: Priečne rezy koreňom planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy pred a po farbení pre lokalizáciu polyfenoloxidasovej aktivity. Snímky boli zhotovené pri rovnakom zväčšení. Dĺžka úsečky je rovnaká pre všetky snímky a demonštratívne je uvedená len na jednej snímke.

4.3.3 Lokalizácia aktivity polyfenoloxidas v klíčovom liste

Obrázok 19 zobrazuje rezy klíčovými listami planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy. Je možné vidieť rezy pred a po farbení 40 mmol·l⁻¹ roztokom metylkatecholu po dobu jednej hodiny pre lokalizáciu aktivity polyfenoloxidas. PPO bola aktívna v kultúrnom aj planom genotypu hlavne v oblasti epidermis. Vo vrstve mezofyly s parenchymatickými bunkami nebola pozorovaná farebná zmena.



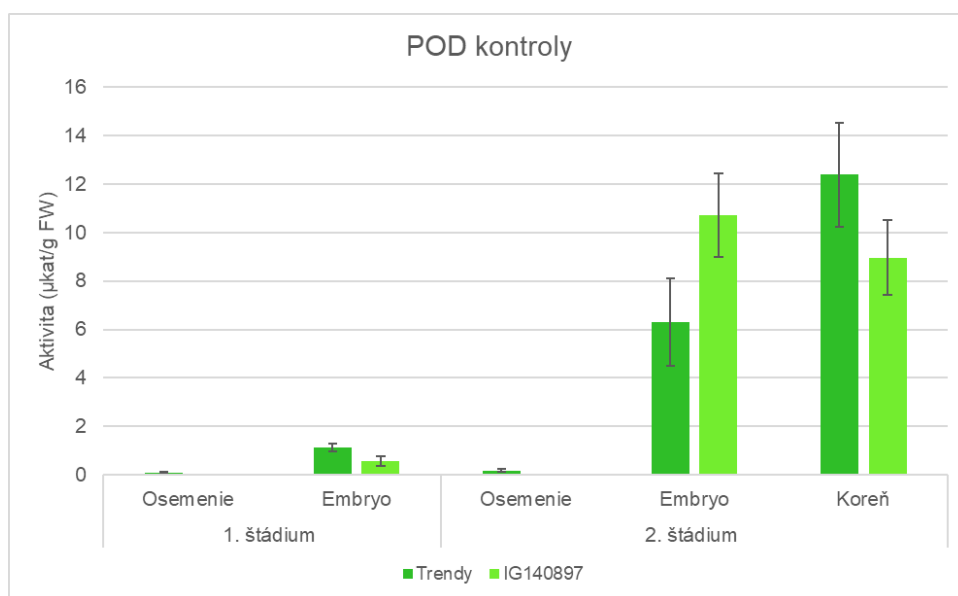
Obr. 19: Rezy klíčovými listami planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy pred a po farbení pre lokalizáciu polyfenoloxidasovej aktivity. Snímky boli zhotovené pri rovnakom zväčšení. Dĺžka úsečky je rovnaká pre všetky snímky a demonštratívne je uvedená len na jednej snímke.

4.4 Spektrofotometrické stanovenie aktivity peroxidasy

4.4.1 Aktivita peroxidasy v kontrolnom rastlinnom materiáli

Aktivita peroxidasy bola stanovená v rastlinnom materiáli v dvoch štádiách pestovania. Použité boli dva genotypy, a to kultúrny genotyp Trendy a planý genotyp IG140897. U oboch študovaných genotypov bolo v prvom štádiu pri nabobtnaní zozbierané embryo a osemenie. V druhom štádiu bolo zozbierané osemenie, koreň a zvyšok embrya. Pre stanovenie aktivity peroxidasy bola použitá spektrofotometrická metóda s guajakolom, kedy bol peroxid vodíka substrátom pre peroxidasu za súčasnej oxidácie guajakolu na 3,3'-dimetoxy-4,4'-bifenylchinon. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 436 nm.

Na obrázku 20 je zobrazený graf aktivity peroxidasy v študovanom rastlinnom materiáli kultúrneho a planého genotypu pestovaného vo vode, ktorý slúžil ako kontrola. Aktivita peroxidasy v prvom aj druhom štádiu v osemení u kultúrneho genotypu bola minimálna v porovnaní s ostatným rastlinným materiálom. V osemení planého genotypu nebola aktivita POD vôbec nameraná. Aktivita POD bola veľmi nízka aj v embryu oboch genotypov v prvom štádiu. K výraznému zvýšeniu aktivity peroxidasy embrya došlo v druhom štádiu v porovnaní s prvým štádiom. Väčšie zmeny boli detekované u planého genotypu. V koreňoch študovaných genotypov bola detekovaná vysoká aktivita peroxidasy podobne ako v embryu v druhom štádiu. V prípade koreňa bola vyššia aktivita zaznamenaná v koreni kultúrneho genotypu Trendy (12 $\mu\text{kat/g FW}$), u planého genotypu bola POD aktivita v koreni okolo 9 $\mu\text{kat/g FW}$.



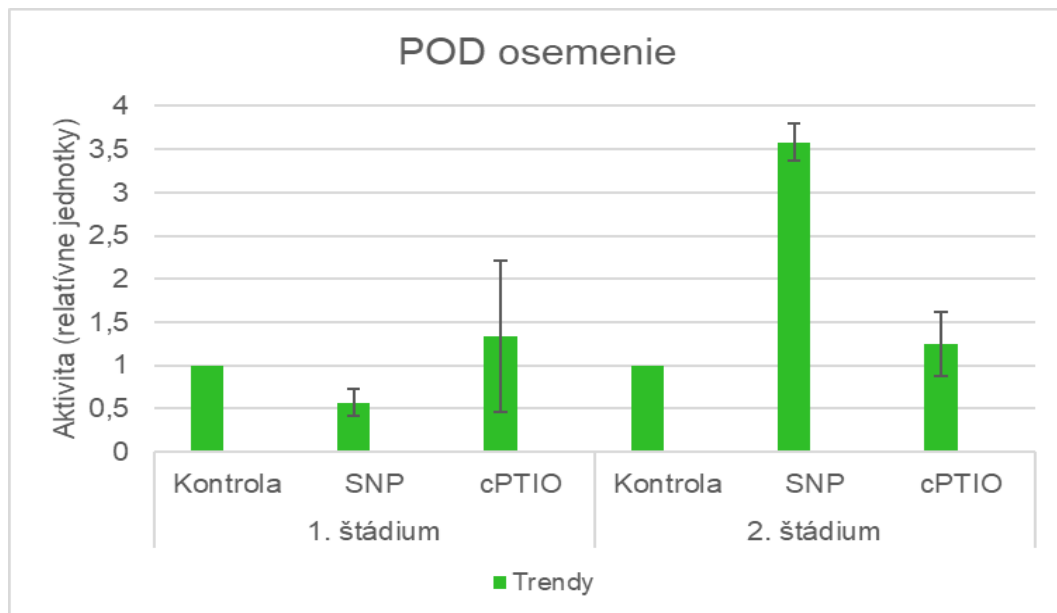
Obr. 20: Aktivita peroxidasy v dvoch vývojových štádiách kultúrneho genotypu Trendy a planého genotypu IG140897 v kontrolných vzorkách. V prvom štádiu bola aktivita stanovená v osemení a v embryu, v druhom štádiu v osemení, embryu a koreni.

4.4.2 Vplyv donora a lapača oxidu dusnatého na aktivitu peroxidasy

Aktivita peroxidasy bola stanovená spektrofotometricky v osemeni (Obr. 21), embryu (Obr. 22) a koreni (Obr. 23) kultúrneho genotypu Trendy a planého genotypu IG140897, ktoré boli pestované v prostredí donora oxidu dusnatého (SNP) a lapača oxidu dusnatého (cPTIO).

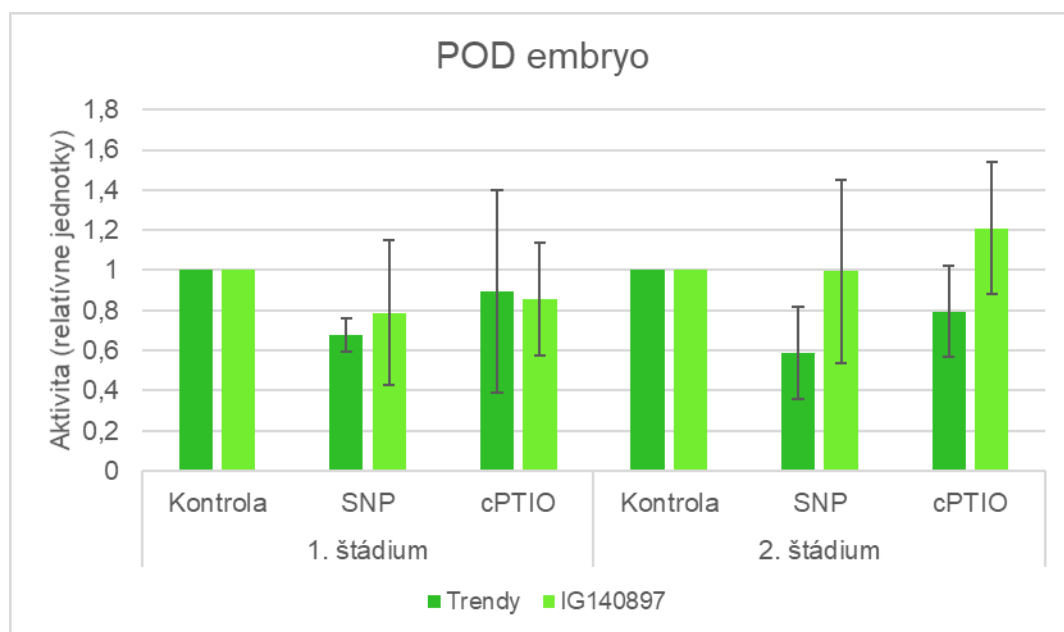
Ako bolo už v predošlej kapitole zmienené, aktivita peroxidasy v osemeni planého genotypu nebola spektrofotometricky vôbec nameraná. Aktivita nebola detekovaná ani v osemeni semien vystavených pôsobeniu modulátorov hladiny NO. Na obr. 21 sú teda znázornené len aktivity POD namerané pre kultúrny genotyp Trendy.

Aktivita peroxidasy v osemeni kultúrneho genotypu bola významne ovplyvnená pôsobením donoru NO, kedy v prvom štádiu vývoja bol pozorovaný pokles aktivity, zatiaľ čo v druhom štádiu významný nárast. Zmena aktivity peroxidasy v prostredí cPTIO nebola voči kontrole významná ani v jednom štádiu.



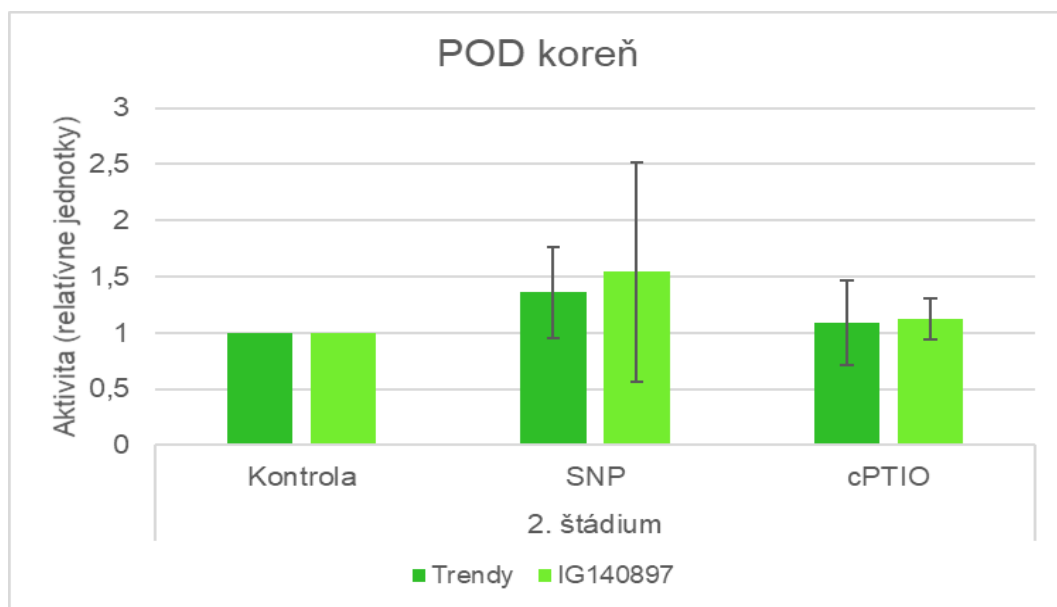
Obr. 21: Aktivita peroxidasy v osemeni kultúrneho genotypu Trendy pestovaného v prostredí donora oxidu dusnatého (SNP) a lapača oxidu dusnatého (cPTIO) v dvoch vývojových štádiách.

V prvom štádiu, u planého aj kultúrneho genotypu vystaveného pôsobeniu oboch modulátorov hladiny NO, bol pozorovaný pokles aktivity peroxidasy v embryu (Obr. 22). V druhom štádiu bol viditeľný pokles aktivity u kultúrneho genotypu v prostredí SNP aj cPTIO. V prípade planého genotypu IG140897 pestovaného v prostredí SNP, sa aktivita peroxidasy voči kontrole nelíšila, zatiaľ čo v prostredí cPTIO sa aktivita mierne zvýšila. Na prítomnosť modulátorov NO v médiu významnejšie reagoval kultúrny genotyp.



Obr. 22: Aktivita peroxidasy v embryu kultúrneho genotypu Trendy a planého genotypu IG140897, pestovaného v prostredí donora oxidu dusnatého (SNP) a lapača oxidu dusnatého (cPTIO) v dvoch vývojových štádiách.

Obrázok 23 zobrazuje graf aktivity peroxidasy v koreni kultúrneho genotypu Trendy a planého genotypu IG140897. Aktivita peroxidasy v prostredí SNP bola u kultúrneho aj planého genotypu vyššia, než hodnota aktivity kontroly. V prípade vzoriek pestovaných v prostredí cPTIO nebol nárast aktivity voči kontrole významný.



Obr. 23: Aktivita peroxidasy v koreni kultúrneho genotypu Trendy a planého genotypu IG140897, pestovaného v prostredí donora oxidu dusnatého (SNP) a lapača oxidu dusnatého (cPTIO).

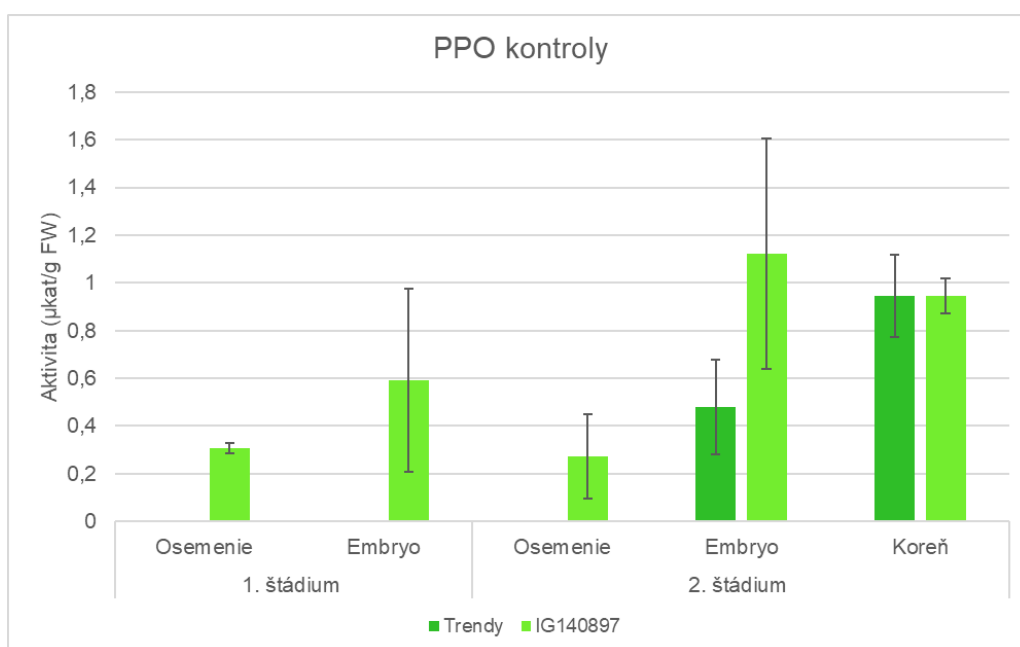
4.5 Spektrofotometrické stanovenie aktivity polyfenoloxidasy

4.5.1 Aktivita polyfenoloxidasy v kontrolnom rastlinnom materiáli

Pre stanovenie aktivity polyfenoloxidasy boli použité dva genotypy, kultúrny genotyp Trendy a planý genotyp IG140897 (Obr. 24). Rastlinný materiál bol pestovaný v dvoch štádiách. V prvom štádiu pri nabobtnaní bolo zozbierané embryo a osemenie. V druhom štádiu bolo zozberané osemenie, koreň a zvyšok embrya. Aktivita polyfenoloxidasy bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 420 nm s využitím 4 mmol·l⁻¹ substrátu - metylkatecholu.

Obrázok 24 zobrazuje graf aktivity polyfenoloxidasy v študovanom rastlinnom materiáli kultúrneho a planého genotypu pestovaného vo vode, ktorý slúžil ako kontrola.

Aktivita polyfenoloxidasy v osemení kultúrneho genotypu nebola ani v jednom vývojovom štádiu nameraná, rovnako tak v embryu prvého štádia. Aktivita PPO v embryu planého genotypu bola vyššia v porovnaní s osemením v oboch študovaných štádiách, pričom dochádzalo k jej nárastu v rámci vývoja. Korene planého a kultúrneho genotypu vykazovali približne rovnakú aktivitu PPO, a to okolo 0,95 µkat/g FW.



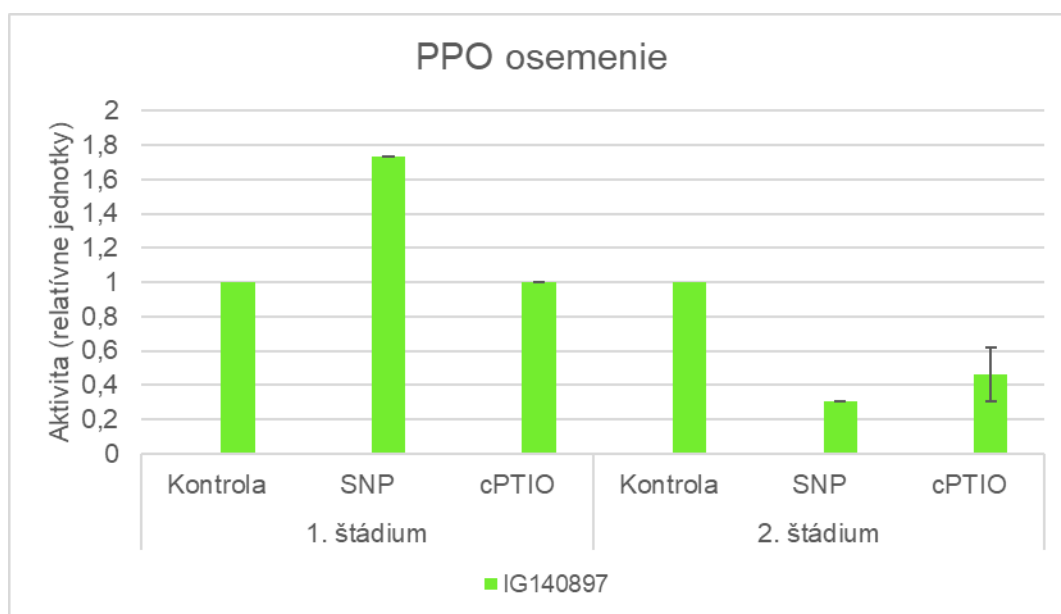
Obr. 24: Aktivita polyfenoloxidasy v dvoch vývojových štádiách kultúrneho genotypu Trendy a planého genotypu IG140897 v kontrolných vzorkách. V prvom štádiu bola aktivita stanovená v osemení a v embryu, v druhom štádiu v osemení, embryu a koreni.

4.5.2 Vplyv donora a lapača oxidu dusnatého na aktivitu polyfenoloxidasy

Aktivita polyfenoloxidasy bola stanovená spektrofotometricky v osemeni (Obr. 25), embryu (Obr. 26) a koreni (Obr. 27) kultúrneho genotypu Trendy a planého genotypu IG140897, ktoré boli pestované v prostredí donora oxidu dusnatého (SNP) a lapača oxidu dusnatého (cPTIO).

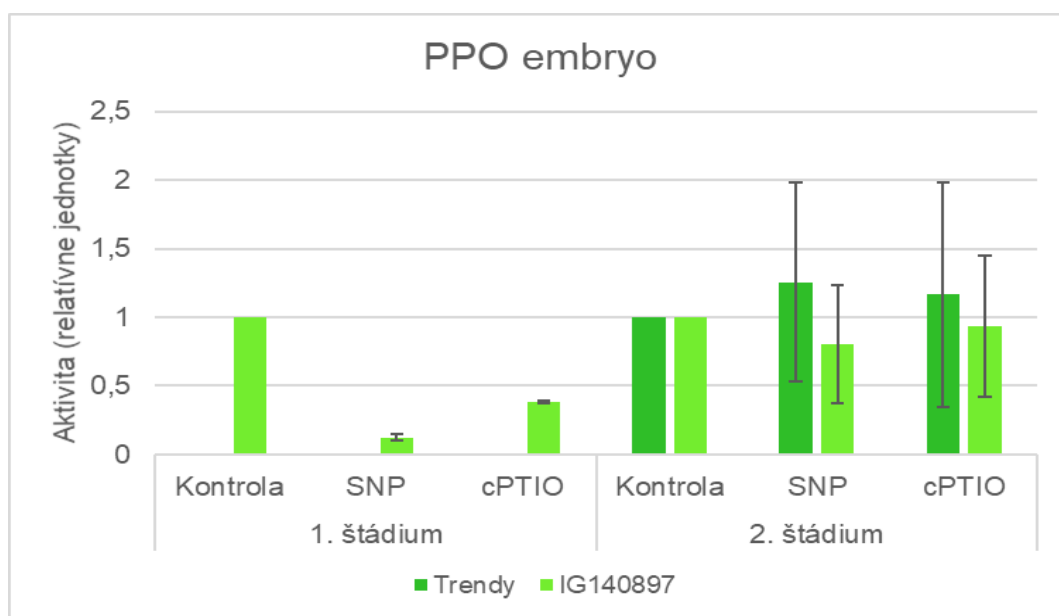
Rovnako ako bolo zmienené už v predošlej kapitole, aktivita polyfenoloxidasy v osemeni kultúrneho genotypu nebola spektrofotometricky vôbec nameraná. Aktivita nebola detekovaná ani v osemeni semien vystavených pôsobeniu modulátorov hladiny NO. Na obr. 25 sú teda znázornené len aktivity PPO namerané pre planý genotyp IG140897.

Aktivita polyfenoloxidasy bola v osemeni významne ovplyvnená pôsobením donorov oxidu dusnatého, kedy v prvom štádiu vývoja bol pozorovaný nárast aktivity, zatiaľ čo v druhom štádiu pokles. Zmena aktivity polyfenoloxidasy v prostredí cPTIO nebola v prvom štádiu vývoja voči kontrole významná. V druhom štádiu bol pozorovaný pokles aktivity PPO.



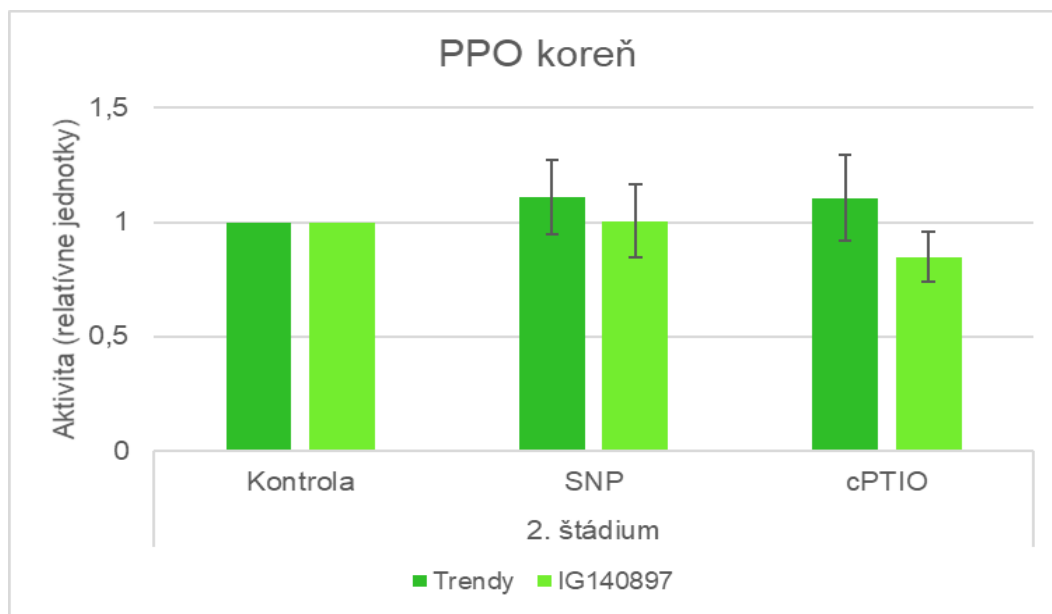
Obr. 25: Aktivita polyfenoloxidasy v osemeni planého genotypu IG140897, pestovaného v prostredí donora oxidu dusnatého (SNP) a lapača oxidu dusnatého (cPTIO) v dvoch vývojových štádiách.

V prvom štádiu možno pozorovať, že polyfenoloxidas v kultúrnom genotypе nebola vôbec aktívna, ani v prostredí modulátorov hladiny NO (Obr. 26). Aktivita PPO v planom genotypе poklesla voči kontrole v prostredí oboch modulátorov hladiny NO. V druhom štádiu neboli detekované signifikantné zmeny aktivity polyfenoloxidasy voči kontrole v kultúrnom genotypе v oboch prostrediach, v ktorých bol rastlinný materiál pestovaný. Na rozdiel od kultúrneho genotypu, aktivita PPO v planom genotypе mierne poklesla, voči kontrole v prostredí oboch modulátorov hladiny NO.



Obr. 26: Aktivita polyfenoloxidasy v embryu kultúrneho genotypu Trendy a planého genotypu IG140897, pestovaného v prostredí donora oxidu dusnatého (SNP) a lapača oxidu dusnatého (cPTIO) v dvoch vývojových štádiách.

Aktivita polyfenoloxidasy kultúrneho genotypu bola v koreňoch vystavených pôsobeniu oboch modulátorov hladiny oxidu dusnatého mierne vyššia v porovnaní s kontrolou (Obr. 27). Zatiaľ čo u planého genotypu bolo pozorované ovplyvnenie aktivity PPO len v prípade pôsobenie lapača NO, kedy došlo k miernemu poklesu aktivity v porovnaní s kontrolou.



Obr. 27: Aktivita polyfenoloxidasy v koreni kultúrneho genotypu Trendy a planého genotypu IG140897, pestovaného v prostredí donora oxidu dusnatého (SNP) a lapača oxidu dusnatého (cPTIO).

5 DISKUSIA

V bakalárskej práci bola aktivita peroxidasy a polyfenoloxidasy stanovená spektrofotometricky a súčasne mikroskopicky lokalizovaná v rastlinnom materiáli.

Morfológiou semien planého a kultúrneho genotypu hrachu sa vo svojej štúdiu zaoberali aj Hradilová et al. (2017). Skúmali plané genotypy JI64 a VIR320 a kultúrne genotypy Cameor a JI92. Študované genotypy sa medzi sebou líšili, pričom osemenie kultúrneho genotypu Cameor nebolo pigmentované, u ostatných genotypov bola pigmentácia osemenia viditeľná s rôznou intenzitou. Výsledky sa zhodovali, čiže semená iného planého genotypu boli pigmentované, zatiaľ čo semená kultúrneho genotypu nie. Janská et al. (2019) študovali úlohu osemenia počas vzniku fyzikálnej dormancie v semenách hrachu. Jedným z cieľov v práci bolo aj mikroskopické porovnanie osemenia planého a kultúrneho genotypu. Pozorovaním zistili, že osemenie semien planého genotypu JI64 a L100 bolo nerovné a štruktúrované, čo bolo dôsledkom výčnelkov vrcholov makroklereidov nad svetlú líniu. Oproti tomu, semená všetkých kultúrnych genotypov, ktoré v práci použili, mali hladké osemenie. Rovnaký záver možno usúdiť aj v prípade planého genotypu IG140897, ktorý mal štruktúrované osemenie a kultúrneho genotypu Trendy s hladkým osemením. Svetlá línia a pod ňou nachádzajúca sa vrstva makroklereidov mala rôznu hrúbku u oboch genotypov. Tak ako už pri porovnaní osemení planých a kultúrnych zástupcov rodu *Pisum* uviedli Hradilová et al. (2017) a Janská et al. (2019), svetlá línia aj vrstva makroklereidov bola hrubšia u planých genotypov, než u kultúrnych.

Peroxidasa patrí medzi glykoproteíny obsahujúce hem. Podieľa sa na mnohých procesoch v rastlinách, ako je metabolizmus auxínov, modifikácia bunkovej steny (napr. lignifikácia), obrana proti patogénom, senescencia, tolerancia voči soli a ťažkým kovom (Begović et al., 2017). Vďaka možnosti farbenia neporušených buniek je histochemická metóda vhodná k lokalizácii enzýmov v rastlinnom materiáli (Onsa et al., 2007). Aktivitu POD v pričnom reze koreňom hrachu lokalizovali aj Švubová et al. (2021). Dospeli k rovnakým výsledkom, čiže v oblasti rhizodermis, primárnej kôry a stredného valca pozorovali farebnú zmenu, a teda peroxidasa tu bola aktívna. Li et al. (2017b) študovali výskyt peroxidasy v semenách ryže farbením 3,3',5,5'-tetrametylbenzidinom (TMB). Pozorovali, že intenzita farby bola zvýšená hlavne v koreni, menej v kľúčnom liste. Rovnakou metódou bola lokalizovaná peroxidasa aj v semenách šalátu v práci Zhang et al. (2014). Pomocou TMB farbenia dokázali aktivitu peroxidasy. Jia et al. (2013)

skúmali semená planého genotypu *Arabidopsis thaliana*. Histochemickou lokalizáciou aktivity peroxidasy v osemeni nepozorovali žiadne sfarbenie. Z toho vyplýva, že peroxidasa v osemeni planého genotypu *Arabidopsis thaliana* bola rovnako neaktívna, ako v prípade planého genotypu IG140897 a kultúrneho genotypu Trendy.

Aktivita peroxidasy v osemeni planého a kultúrneho genotypu bola spektrofotometricky stanovená len v prípade kultúrneho genotypu, ale detekovaná aktivita bola veľmi nízka. Histochemicky nebola peroxidasa lokalizovaná ani u jedného genotypu. Rozdiel v pozorovaní sa dá vysvetliť rozdielnou citlivosťou spektrofotometrickej a mikroskopickej metódy. V prípade mikroskopickej detekcie je možné v nadväzujúcich štúdiách predĺžiť dobu inkubácie rastlinného rezu v reakčnej zmesi. V prípade embryí oboch genotypov bola aktivita peroxidasy nameraná spektrofotometricky, a taktiež lokalizovaná aj histochemicky. Spektrofotometricky stanovená a histochemicky lokalizovaná bola aktivita peroxidasy v koreňoch planého a kultúrneho genotypu.

V osemeni planého a kultúrneho genotypu pestovaného vo vode, ktoré slúžilo ako kontrola bol pozorovaný rozdiel v aktivite jednotlivých enzýmov. Pri stanovení aktivity polyfenoloxidasy, bola PPO aktívna v osemeni planého genotypu a v osemeni kultúrneho genotypu aktívna nebola. Avšak aktivita peroxidasy bola stanovené len v osemeni kultúrneho genotypu, zatiaľ čo v osemeni planého genotypu nebola aktívna. Rovnaké výsledky boli zaznamenané aj v rámci spoločného výskumu s katedrou botaniky, pričom článok obsahujúci získaný výsledok ešte len bude publikovaný.

Gheysarbigi et al. (2020) sa vo svojej práci zaoberali inhibičným účinkom oxidu dusnatého na enzymatické reakcie hnednutia v osemeni čerstvých pistácií. K stanoveniu aktivity peroxidasy a polyfenoloxidasy využili roztok SNP s rôznou koncentráciou a destilovanú vodu ako kontrolu. V kontrolných vzorkách pozorovali nárast aktivity enzýmov POD a PPO. Naopak, vzorky ošetrené SNP vykazovali zníženú aktivitu enzýmov. Tento jav mohol byť spôsobený tým, že oxid dusnatý uvoľnený zo SNP interagoval s prechodnými kovmi (železo, meď, zinok). Polyfenoloxidasa vo svojom aktívnom mieste obsahovala dva ióny medi a oxid dusnatý s nimi mohol ľahko reagovať za vzniku komplexu meď-nitrozyl, čo nakoniec viedlo k inhibícii aktivity PPO. Rovnaký pokles aktivity PPO voči kontrole bol pozorovaný aj v prípade planého genotypu IG140897 v embryu v prvom štádiu, či v druhom štádiu v osemeni a embryu. K totožným záverom, v ktorých potvrdili vplyv oxidu dusnatého na zníženie aktivity PPO, dospeli aj Duan et al. (2007) v štúdiu o longane, či Wang et al. (2015) v štúdiu o banáne.

Na potvrdenie hypotézy, že nižšie dávky oxidu dusnatého zlepšujú lignifikáciu a obsah súvisiacich enzýmov, uskutočnili Sharma et al. (2019) experimenty s NO vychytávačom cPTIO na fazuli mungo. Ošetrovanie cPTIO znížilo hladiny peroxidasy a polyfenoloxidasy, ktoré sa zúčastňovali na lignifikácii. Podobné výsledky boli dosiahnuté aj v prípade genotypu Trendy. Aktivita peroxidasy u kultúrneho genotypu poklesla voči kontrole v oboch štádiách v embryu. Pokles aktivity polyfenoloxidasy bol pozorovaný aj u planého genotypu IG140897 rovnako v oboch štádiách v embryu, v osemeni a v koreni. Dané výsledky mohli byť zapríčinené priamym účinkom oxidu dusnatého na hemeproteíny, ktoré sa zúčastňujú na syntéze lignínu a inhibícii aktivity POD.

6 ZÁVER

V teoretickej časti bakalárskej práce bola vypracovaná literárna rešerš zameraná na charakterizáciu jednotlivých častí embrya a osemenia hrachu, dormanciu a vývojové štádia. Ďalej boli charakterizované enzýmy peroxidasa a polyfenoloxidasa, a taktiež oxid dusnatý, jeho produkcia a modulátory hladiny oxidu dusnatého.

V rámci experimentálnej časti bol napestovaný a spracovaný rastlinný materiál planého genotypu *P. sativum* subsp. *elatius* IG140897 a kultúrneho genotypu *P. sativum* subsp. *sativum* Trendy. Bol študovaný vplyv modulátorov hladiny oxidu dusnatého na aktivitu vybraných enzýmov v dvoch vývojových štádiách. Aktivita enzýmov v rastlinnom materiáli oboch genotypov bola lokalizovaná aj histochemicky.

Z uskutočnených experimentov je možné vyvodit' niekoľko záverov. U kultúrneho genotypu *P. sativum* subsp. *sativum* Trendy bol pozorovaný rýchlejší rast a vývoj oproti planému genotypu *P. sativum* subsp. *elatius* IG140897. Histochemickou lokalizáciou boli lokalizované enzýmy peroxidasa a polyfenoloxidasa v rastlinnom materiáli oboch genotypov.

Výsledky histochemickej metódy boli porovnateľné s výsledkami zo spektrofotometrického stanovenia. Bol pozorovaný rozdiel v aktivite daných enzýmov v osemení kultúrneho a planého genotypu pestovaného vo vode. Peroxidasa bola aktívna len v osemení kultúrneho genotypu, zatiaľ čo polyfenoloxidasa bola aktívna len v osemení planého genotypu. Vplyv donora oxidu dusnatého (SNP) na aktivitu peroxidasy sa prejavil hlavne v osemení a koreni kultúrneho genotypu. Pôsobením donoru bola významne ovplyvnená aj aktivita polyfenoloxidasy v osemení planého genotypu.

Zlúčenina cPTIO slúžila ako vychytávač oxidu dusnatého. Pôsobením cPTIO poklesla aktivita peroxidasy v osemení kultúrneho genotypu. Pokles aktivity peroxidasy nastal aj v embryu oboch genotypov v prvom štádiu, či v druhom vývojovom štádiu kultúrneho genotypu. Ovplyvnená lapačom oxidu dusnatého bola aj aktivita polyfenoloxidasy, ktorá poklesla v osemení planého genotypu v druhom štádiu vývoja. Rovnako bol pozorovaný pokles aktivity polyfenoloxidasy aj v embryu a koreni planého genotypu. Výsledky meraní u niektorých vzoriek však boli zaťažené veľkou chybou, preto by bolo vhodné merania v ďalšej štúdií zopakovať.

7 LITERATÚRA

- Abbo, S., Van-Oss, P. R., Gopher, A., Saranga, Y., Ofner, I., Peleg, Z. (2014). Plant domestication versus crop evolution: a conceptual framework for cereals and grain legumes. *Trends in Plant Science*, 19(6), 351-360. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.12.002>
- Adámková, S., & Petřivalský, M. (2012). Interactions between Metabolism and Signal Functions of Polyamines and Nitric Oxide in Plants. *Chemicke listy*, 106(3), 166-173. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/959>
- Allaby, R. (2010). Integrating the processes in the evolutionary system of domestication. *Journal of Experimental Botany*, 61(4), 935-944. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp382>
- Angelini, R., Manes, F., Federico, R. (1990). Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta*, 182(1), 89-96. <https://doi.org/10.1007/BF00239989>
- Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L., Marion-Poll, A. (2013a). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide on seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00063>
- Arc, E., Galland, M., Godin, B., Cueff, G., Rajjou, L. (2013b). Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00346>
- Baudouin, E. (2010). The language of nitric oxide signalling. *Plant Biology*, 13(2), 233-242. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00403.x>
- Barroso, J. B., Corpas, F. J., Carreras, A., Sandalio, L. M., Valderrama, R., Palma, J. M., Lupiáñez, J. A., Del Río, L. A. (1999). Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *The Journal of biological chemistry*, 274(51), 36729-36733. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36729>
- Begović, L., Lepeduš, H., Lalić, A., Štolfa, I., Jurković, Z., Kovačević, J., Cesar, V. (2017). Involvement of peroxidases in structural changes of barley stem. *Bragantia*, 76(3). <https://doi.org/10.1590/1678-4499.155>
- Bethke, P. C., Libourel, I. G. L., Reinöhl, V., Jones, R. L. (2006). Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break Arabidopsis seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta*, 223, 805-812. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0116-9>
- Bethke, P. C., Libourel, I. G. L., Jones, R. L. (2007). Nitric oxide in seed dormancy and germination. *Annual Plant Reviews. Seed Development, Dormancy and Germination*, 27, 153-175. <https://doi.org/10.1002/9780470988848.ch7>
- Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*, 9, 1055-1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>
- Bewley, J. D., & Black, M. (2013). *Seeds: physiology of development and germination* (Third edition). Springer Science & Business Media.
- Blaschek, L., & Pesquet, E. (2021). Phenoloxidases in Plants – How Structural Diversity Enables Functional Specificity. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.754601>
- Borges-Martínez, E., Gallardo-Velázquez, T., Cardador-Martínez, A., Moguel-Concha, D., Osorio-Revilla, G., Ruiz-Ruiz, J. C., Martínez, C. J. (2022). Phenolic compounds profile and antioxidant activity of pea (*Pisum sativum* L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sprouts. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.45920>
- Boucher, J. L., Genet, A., Vadon, S., Delaforge, M., Mansuy, D. (1992). Formation of nitrogen oxides and citrulline upon oxidation of N^ω-hydroxy-L-arginine by heme proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184(3), 1158-1164. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(05\)80004-x](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)80004-x)
- Brown, G. C., & Borutaite, V. (2002). Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(11), 1440-1450. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01112-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01112-7)
- Cooney, R. V., Harwood, P. J., Custer, L. J., Franke, A. A. (1994). Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental health perspectives*, 102(5), 460-462. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102460>

- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, M. K., Koornneef, M. (2000). Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination and Longevity in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 122(2), 403-413. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.403>
- Duan, X., Su, X., You, Y., Qu, H., Li, Y., Jiang, Y. (2007). Effect of nitric oxide on pericarp browning of harvested longan fruit in relation to phenolic metabolism. *Food Chemistry*, 104(2), 571-576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.007>
- Dueñas, M., Estrella, I., Hernández, T. (2004). Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). *European Food Research and Technology*, 219(2), 116-123. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0938-x>
- Fahim, J. R., Attia, E. Z., Kamel, M. S. (2019). The phenolic profile of pea (*Pisum sativum*): a phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 18, 173-198. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9586-9>
- Fahn, A. (1990). *Plant anatomy* (Fourth edition). Pergamon Press.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., Steber, C. (2008). Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 387-415. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092740>
- Gheysarbigi, S., Mirdehghan, H. S., Ghasemnezhad, M., Nazoori, F. (2020). The inhibitory effect of nitric oxide on enzymatic browning reactions of in-package fresh pistachios (*Pistacia vera* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110998>
- Gibbs, J. D., Isa, M. N., Movahedi, M., Lozano-Juste, J., Mendiondo, M. G., Berckhan, S., Marin-de la Rosa, N., Conde, V. J., Correia, S. C., Pearce, P. S., et al. (2014). Nitric Oxide Sensing in Plants Is Mediated by Proteolytic Control of Group VII ERF Transcription Factors. *Molecular Cell*, 53(6), 369-379. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.020>
- Glagoleva, A. Y., Shoeva, O. Y., Khlestkina E. K. (2020). Melanin Pigment in Plants: Current Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00770>
- Goldstein, S., Russo, A., Samuni, A. (2003). Reactions of PTIO and Carboxy-PTIO with NO, NO₂ and O₂⁻. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 50949-50955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308317200>
- Gundinger, T., & Spadiut, O. (2017). A comparative approach to recombinantly produce the plant enzyme horseradish peroxidase in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 248(20), 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.003>
- Gupta, K. J., Fernie, A. R., Kaiser, W. M., Van Dongen, J. T. (2011). On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science*, 16(3), 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.11.007>
- Hendricks, S. B., & Taylorson, R. B. (1974). Promotion of Seed Germination by Nitrate, Nitrite, Hydroxylamine, and Ammonium Salts. *Plant Physiology*, 54(3), 304-309. <https://doi.org/10.1104/pp.54.3.304>
- Hradilová, I., Trněný, O., Válková, M., Cechová, M., Janská, A., Prokešová, L., Aamir, K., Krezdorn, N., Rotter, B., Winter, P., et al. (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*, 542(8). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00542>
- Huang, J., Kim-Shapiro, D. B., King, S. B. (2004). Catalase-Mediated Nitric Oxide Formation from Hydroxyurea. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(14), 3495-3501. <https://doi.org/10.1021/jm030547z>
- Huang, D., Xiaokang, Z., Zhou, J., & Zhu, S. (2019). Nitric Oxide Signaling in Plants. In G. Paliyath, J. Subramanian, A. K. Handa, A. K. Mattoo, & L.-T. Lim. *Postharvest Biology and Nanotechnology* (First edition). John Wiley & Sons.
- Indiamart. <https://www.indiamart.com/proddetail/germination-of-seed-bean-pea-for-botany-chart-2898719797.html> (15.2.2022).
- Janská, A., Pecková, E., Sczepaniak, 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>

- Jia, L., Xu, W., Li, W., Ye, N., Liu, R., Shi, L., Raman, A. N. M. R. B., Fan, M., Zhang, J. (2013). Class III peroxidases are activated in proanthocyanidin-deficient *Arabidopsis thaliana* seeds. *Annals of Botany*, 111(5), 839-847. <https://doi.org/10.1093/aob/mct045>
- Ku, Y. S., Contador, C. A., Ng, M. S., Yu, J., Chung, G., Lam, H. M. (2020). The Effects of Domestication on Secondary Metabolite Composition in Legumes. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.581357>
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>
- Li, X., Zhang, L., Ahammed, G. J., Li, Z. X., Wei, J. P., Shen, C., Yan, P., Zhang, L. P., Han, W. Y. (2017a). Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced flavonoid biosynthesis in *Camellia sinensis* L. *Journal of Plant Physiology*, 214, 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.04.005>
- Li, W.-Y., Chen, B.-J., Chen, Z.-J., Gao, Y.-T., Chen, Z., Liu, J. (2017b). Reactive Oxygen Species Generated by NADPH Oxidases Promote Radicle Protrusion and Root Elongation during Rice Seed Germination. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010110>
- Ma, Y., Gao, J., Wei, Z., Shahidi, F. (2021). Effect of *in vitro* digestion on phenolics and antioxidant activity of red and yellow colored pea hulls. *Food Chemistry*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127606>
- 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>
- Moise, J. A., Han, S., Gudynaite-Savitch, L., Johnson, D. A., Miki, B. L. A. (2005). Seed Coats: Structure, Development, Composition, and Biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 41(5), 620–644. <http://www.jstor.org/stable/4293908>
- Nabi, R. B. S., Tayade, R., Hussain, A., Kulkarni, K. P., Imran, Q. M., Mun, B.-G., Yun, B.-W. (2019). Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*, 161, 120-133. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003>
- Neugschwandtner, R. W., Bernhuber, A., Kammlander, S., Wagentristsl, H., Klimek-Kopyra, A., Kaul, H. P. (2019). Yield structure components of autumn- and spring-sown pea (*Pisum sativum* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science*, 70(2), 109-116. <https://doi.org/10.1080/09064710.2019.1676463>
- Nguyen, T. B. T., Ketsa, S., Van Doorn, G. W. (2003). Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 30(2), 187-193. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00103-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00103-0)
- Onsa, G. H., Saari, N. B., Selamat, J., Bakar, J., Mohammed, A. S., Bahri, S. (2007). Histochemical Localization of Polyphenol Oxidase and Peroxidase from *Metroxylon sagu*. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 15(2), 91-98. <https://www.semanticscholar.org/paper/Histochemical-Localization-of-Polyphenol-Oxidase-Onsa-Saari/a0debd9a629d55fdd0b90d90b4c395081dc67790#citing-papers>
- Pandey, P. V., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., Dwivedi, U. N. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 6(1). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
- Pandey, S., Kumari, A., Shree, M., Kumar, V., Singh, P., Bharadwaj, Ch., Loake, G. J., Parida, S. K., Masakapalli, S. K., Gupta, K. J. (2019). Nitric oxide accelerates germination via the regulation of respiration in chickpea. *Journal of Experimental Botany*, 70(17), 4539-4555. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz185>
- Phuyal, N., Jha, P. K., Raturi, P. P., Rajbhandary, S. (2020). Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities of Fruit, Seed, and Bark Extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. *The Scientific World Journal*. 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8780704>
- Prakash, V., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Sharma, S., Corpas, F. J. (2019). Crosstalk between nitric oxide (NO) and abscisic acid (ABA) signalling molecules in higher plants.

- Environmental and Experimental Botany*, 161, 41-49.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.033>
- Procházková, D., Haisel, D., Pavlíková, D. (2014). Nitric oxide biosynthesis in plants – the short overview. *Plant Soil Environment*, 60(3), 129-134. <https://doi.org/10.17221/901/2013-PSE>
- Rico-Lemus, M., & Rodríguez-Garay, B. (2014). SNP as an Effective Donor of Nitric Oxide for *in vitro* Plant Cell and Tissue Culture. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*, 2(3). <https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000e127>
- Sahbaz, R., Lieberel, R., Aniszewski, T. (2009). Polyphenol oxidase (PPO, catecholase) activity during germination and early seedling growth of Cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 82(2), 163-169. Web of science. <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000266332600011> (28.10.2021).
- ScienceFacts. <https://www.sciencefacts.net/seed-germination.html> (16.2.2022).
- Sharma, S., Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, R. K. (2019). Nitric oxide induced modulations in adventitious root growth, lignin content and lignin synthesizing enzymes in the hypocotyls of *Vigna radiata*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 225-230. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.028>
- Singh, N., & Bhatla, S. C. (2017). Signaling through reactive oxygen and nitrogen species is differentially modulated in sunflower seedling root and cotyledon in response to various nitric oxide donors and scavengers. *Plant Signaling and Behavior*, 12(9). <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1365214>
- Singh, S., Kumar, V., Kapoor, D., Kumar, S., Singh, S., Dhanjal, D. S., Datta, S., Samuel, J., Dey, P., Wang, S., et al. (2020). Revealing on hydrogen sulfide and nitric oxide signals coordination for plant growth under stress conditions. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 301-317. <https://doi.org/10.1111/ppl.13002>
- Smýkal, P. (2011). Phylogeny, Biogeography and Genetic Diversity of the Pea Family. *Živa*, 4, 151-154. <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/fylogeneze-biogeografie-a-geneticka-diverzita-rodu.pdf>
- Smýkal, P., Aubert, G., Burstin, J., Coyne, C. J., Ellis, N. T. H., Flavell, A. J., Ford, R., Hýbl, M., Macas, J., Neumann, P., et al. (2012). Pea (*Pisum sativum* L.) in Genomic Era. *Agronomy*, 2(2), 74-115. <https://doi.org/10.3390/agronomy2020074>
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., Berger, J., Vymyslický, T., Greene, S. L., Nelson, N. M., et al. (2014a). Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 43-104. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897904>
- Smýkal, P., Vernoud, V., Blair, M. W., Soukup, A., Thompson, R. D. (2014b). The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science*, 351(5). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00351>
- Smýkal, P. (2016): *Genetic diversity of genus Pisum, its exploitation and pea domestication*. [Habilitation work]. UPOL Olomouc, Česká republika.
- Stöhr, C., & Ullrich, W. R. (2002). Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2293-2303. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf110>
- Stöhr, C., & Stremmlau, S. (2006). Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 463-470. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj058>
- Szabó, C., Ischiropoulos, H., Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(8), 662-680. <https://doi.org/10.1038/nrd2222>
- Švubová, R., Válková, N., Bathoova, M., Kyzek, S., Gálová, E., Medvecká, V., Slovákova L. (2021). Enhanced *In situ* Activity of Peroxidases and Lignification of Root Tissues after Exposure to Non-Thermal Plasma Increases the Resistance of Pea Seedlings. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 41, 903-922. <https://doi.org/10.1007/s11090-021-10160-z>
- Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M. M., Pavan, S., Montemurro, C. (2017). Polyphenol Oxidases in Crops: Biochemical, Physiological and Genetic Aspects.

- International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 377-393. <https://doi.org/10.3390/ijms18020377>
- Trněný, O., Brus, J., Hradilová, I., Rathore, 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*, 9(11), 535-555. <https://doi.org/10.3390/genes9110535>
- Tuan, P. A., Sun, M., Nguyen, T. N., Ayele, B. T., & Park, S. (2019). Molecular mechanisms of seed germination. In J. W. DeVries, H. Feng & B. Nemzer. *Sprouted Grains Nutritional Value, Production, and Applications*. Woodhead Publishing and AACC International Press.
- Van Dongen, J. T., Ammerlaan, A. M. H., 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>
- Veitch, C. N. (2004a). Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Reviews*, 3(1), 3-18. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047799.17604.94>
- Veitch, C. N. (2004b). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>
- Vidal, E. A., Alvarez, J. M., Araus, V., Riveras, E., Brooks, M. D., Krouk, G., Ruffel, S., Lejay, L., Crawford, N. M., Coruzzi, G. M., et al. (2020). Nitrate in 2020: Thirty Years from Transport to Signaling Networks. *The Plant Cell*, 32(7), 2094-2119. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00748>
- Wang, Y., Luo, Z., Du, R. (2015). Nitric oxide delays chlorophyll degradation and enhances antioxidant activity in banana fruits after cold storage. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1821-z>
- Web2.mendelu. https://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-organologie-morfologie_semen.html (15.2.2022).
- Weber, H., Borisjuk, L., Wobus, U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annual review of plant biology*, 56, 253-279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144201>
- Wu, F., Yang, H., Chang, Y., Cheng, J., Bai, S., Yin, J. (2012). Effects of nitric oxide on reactive oxygen species and antioxidant capacity in Chinese Bayberry during storage. *Scientia Horticulturae*, 135, 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.12.011>
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., Takahashi, S. (1999). An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in plant science*, 4(4), 128-129. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(99\)01393-x](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01393-x)
- Yamasaki, H. (2000). Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 355(1402), 1477-1488. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0708>
- Yamasaki, H., & Sakihama, Y. (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS letters*, 468(1), 89-92. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01203-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01203-5)
- Yan, A., & Chen, Z. (2020). The Control of Seed Dormancy and Germination by Temperature, Light and Nitrate. *The Botanical Review*, 86, 39-75. <https://doi.org/10.1007/s12229-020-09220-4>
- 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 Science*, 22(9), 4602. <https://doi.org/10.3390/ijms22094602>
- Zhang, Y., Chen, B., Xu, Z., Shi, Z., Chen, S., Huang, X., Chen, J., Wang, X. (2014). Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 65(12), 3189-3200. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru167>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABA	kyselina abscisová
CAY	4-(<i>p</i> -metoxyfenyl)-1,3,2-oxatiazolylium-5-olát
cPTIO	2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetrametylimidazolín-1-oxyl-3-oxid
CYP707A2	gén cytochromu P450 z rodiny 707 podrodiny A polypeptidu 2
DETA	dietyléntriámín NONOát
DETC	dietylditiokarbamát
DMPO	5,5-dimetyl-1-pyrolín-N-oxid
DMSO	dimetylsulfoxid
FAD	flavinadenín dinukleoid
Fe ²⁺	železnatý kation
FW	čerstvá váha (z angl. fresh weight)
GTP	guanozíntrifosfát
H ₂ O ₂	peroxid vodíka
mRNA	mediátorová RNA
NiNOR	nitrit:NO reduktasa
NO	oxid dusnatý
NO·	radikál oxidu dusnatého
NO ⁻	nitroxylový anión
NO ⁺	nitrozóniový kation
NO ₂	oxid dusičitý
NO ₂ ·	radikál oxidu dusičitého
NO ₂ ⁻	dusitan
NOS	oxid dusnatý syntasa
NR	nitrát reduktasa
OONO ⁻	peroxynitrit
PA	polyamíny
POD	peroxidasa
PPO	polyfenoloxidasa
PTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetrametylimidazolín-1-oxyl-3-oxid
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
RNS	reaktívne formy dusíka
ROS	reaktívne formy kyslíka
SNAP	S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicilamín
SNP	nitroprusid sodný
TMB	3,3',5,5'-tetrametylbenzidín
w:v	hmotnosť na objem
XOD	xanthinoxidasa