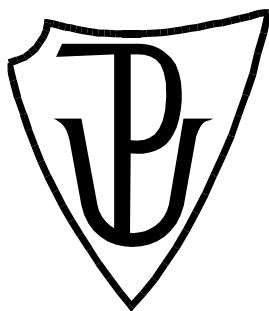


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Analýza metabolitů a aktivit enzymů zapojených do metabolismu reaktivních forem dusíku v průběhu vývojových fází hrachu setého

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Pavčina Žárská
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Konzultantka:	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
Rok:	2021

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

V Olomouci dne *podpis bakaláře*

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí své bakalářské práce Mgr. Janě Sekaninové, PhD. za trpělivost, odborné vedení, rady a pomoc při zpracování jak teoretické, tak experimentální části této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Balarynové, Ph.D. za poskytnutí rostlinného materiálu a odborné konzultace k botanickým tématům v teoretické části. A v neposlední řadě doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za rady ke zpracování bakalářské práce.

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

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Pavčina Žárská
Název práce	Analýza metabolitů a aktivit enzymů zapojených do metabolismu reaktivních forem dusíku v průběhu vývojových fází semen hrachu setého
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Konzultantka	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Reaktivní formy dusíku (RNS) a polyaminy (PA) hrají důležitou roli ve vývoji semen, kde plní funkci signálních molekul a díky jejich reaktivitě jsou schopny regulovat strukturu a funkci proteinů. Pro jejich správnou funkci je důležité udržování určitých koncentrací, protože ve větším množství mohou způsobovat nitrooxidační stres. Jejich hladiny jsou kontrolovány mimo jiné pomocí enzymů aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH), diaminooxidasy (DAO) a S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR).

Cílem bakalářské práce bylo sledovat zapojení RNS a PA v procesu vývoje semene a dormance prostřednictvím měření aktivit enzymů AMADH, DAO a GSNOR a koncentrace celkových proteinů a S-nitrosothiolů (SNO) v osemeni dvou genotypů kulturních, nedormantních (Cameor a JI92) a dvou genotypů planých, dormantních (JI64 a JI1794) semen hrachu setého ve 4 různých vývojových stádiích.

V experimentální části byly popsány provedené a plánované metodiky měření aktivity AMADH, DAO, GSNOR a koncentrace celkových proteinů a SNO. Z důvodu opatření spojených s pandemií Covid-19 byla v laboratoři provedena pouze příprava a cvičné měření. Zkouška dalších metodik, tedy stanovení aktivity enzymů AMADH, DAO a GSNOR, měření koncentrace SNO a proměření všech studovaných parametrů v celých sadách (všech vývojových stádiích) rostlinného materiálu již bohužel nebyla zrealizována. Byla vypracována diskuse a na základě výsledků publikací na podobné téma a předpokladů vycházejících z nastudované tematiky, byly popsány předpokládané výsledky.

Klíčová slova	klíčení, dormance semen, reaktivní formy dusíku, oxid dusnatý, hrách
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Pavĺína Źárská
Title	Analysis of metabolites and activity of enzymes involved in reactive nitrogen species metabolism during developmental stages of pea seed
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Consultant	Mgr. Jana Balarynová, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Reactive nitrogen species (RNS) and polyamines (PA) play an important role in seed development, where they act as signaling molecules and due to their reactivity are able to regulate the structure and functions of proteins. Maintaining certain concentration is important for their proper function, as they can cause nitrooxidative stress in larger amounts. Their levels are controlled by the enzymes aminoaldehyde dehydrogenase (AMADH), diamine oxidase (DAO) and S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR).

The aim of this bachelor thesis was to observe the involvement of RNS and PA in the process of seed development and dormancy by measuring the activities of enzymes AMADH, DAO and GSNOR and the concentration of total proteins and S-nitrosothiols (SNO) in seedcoats of two cultured, nondormant (Cameor, JI92) and two wild, dormant (JI64, JI1794) genotypes of pea in different developmental stages.

In the experimental part of this bachelor thesis were described the performed and planned methodologies for measuring the activity of AMADH, DAO and GSNOR and the concentration of total proteins and SNO. Due to the restrictions associated with the Covid-19 pandemic, only preparation and practice measurements were performed in the laboratory. Testing of other methods, measurement of activity of AMADH, DAO and GSNOR enzymes, measurement of SNO concentration and measurement of all studied parameters in whole sets (all developmental stages) of plant material has not been realized. A discussion was developed and based on the results of publications on a similar topic and assumptions based on the studied topic, the expected results were described.

Keywords	germination, seed dormancy, reactive nitrogen species, nitric oxide, pea
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	10
2.1	Vznik a vývoj semene hrachu	10
2.2	Struktura semene hrachu	10
2.2.1	Vývoj endospermu	12
2.2.2	Embryogeneze.....	13
2.2.3	Kontrola embryonálního vývoje	14
2.2.4	Struktura a funkce osemení.....	16
2.3	Desikace a dormance	19
2.4	Klíčení	21
2.5	Reaktivní formy dusíku	21
2.5.1	Oxid dusnatý	22
2.5.1.1	Vznik oxidu dusnatého v rostlinné buňce	22
2.5.1.2	Vznik oxidu dusnatého redukčním způsobem	24
2.5.1.3	Vznik oxidu dusnatého oxidačním způsobem.....	24
2.5.2	S-nitrosothioly a S-nitrosoglutathion	26
2.5.3	Peroxyinitry.....	28
2.5.4	Fyziologické účinky NO a reaktivních forem dusíku	28
2.5.4.1	Vliv NO na fotosyntetický aparát	29
2.5.4.2	Role NO a ROS v obranném mechanismu rostlin proti stresu	30
2.5.5	Role NO a RNS ve vývoji semen.....	31
2.6	Polyaminy.....	32
2.6.1	Komunikace mezi polyaminy a oxidem dusnatým	34
2.7	Charakteristika studovaných enzymů.....	35
2.7.1	Aminoaldehyddehydrogenasa	35
2.7.2	Diaminooxidas.....	37
2.7.3	S-nitrosoglutathionreduktasa.....	37
2.8	Charakteristika studovaného rostlinného materiálu	38
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	41
3.1	Provedené experimenty – materiál a metody	41
3.1.1	Použité chemikálie	41
3.1.2	Použité přístroje	41
3.1.3	Rostlinný materiál	42
3.1.4	Metody	42
3.1.4.1	Extrakce aminoaldehyddehydrogenasy z osemení hrachu setého.....	42

3.1.4.2	Měření aktivity aminoaldehyddehydrogenasy	42
3.1.4.3	Stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou.....	44
3.2	Plánované experimenty – metody	45
3.2.1	Měření aktivity diaminooxidasy	45
3.2.2	Měření aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy.....	45
3.2.3	Stanovení koncentrace S-nitrosothiolů	45
3.2.3.1	Savillova metoda.....	45
3.2.3.2	NO analyzátor	45
4	Výsledky a diskuse.....	46
5	ZÁVĚR	51
	LITERATURA	52
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	61

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

Zpracování literární rešerše na téma:

- Stavba, vývojová stádia a metabolické přeměny v průběhu vývoje semene hrachu setého (*Pisum sativum L.*).
- Metabolismus oxidu dusnatého, reaktivních forem dusíku a polyaminů a jejich role ve vývoji semene.
- Enzymy zapojené do metabolismu reaktivních forem dusíku a polyaminů.
- Charakteristika studovaných genotypů hrachu setého.

Praktická část:

Stanovit a porovnat:

- aktivity vybraných enzymů zapojených do metabolismu NO, RNS a polyaminů (aminoaldehyddehydrogenasa, diaminooxidasa, S-nitrosoglutathionreduktasa).
- koncentrace S-nitrosothiolů a proteinů.

v osemení čtyř genotypů hrachu setého (Cameor, JI92, JI64, JI1794).

1 ÚVOD

Hrách setý (*Pisum sativum L.*) je jedna z nejstarších domestikovaných plodin, která hraje významnou roli v mnoha odvětvích. Pro jeho velký výnos semen, obsahujících mnoho významných živin, zejména proteinů, je nedílnou součástí potravy člověka i hospodářských zvířat.

Vývoj semen hrachu, jejich následné dozrávání a růst je závislý na mnoha faktorech. Vývoje se účastní nespočet látek a metabolických pochodů, které mohou být závislé na vnějších podmínkách, jako je například světlo, teplota, roční období, dostupnost a složení živin atd. Vývoj semen je podmíněn i genetickými predispozicemi a je regulován a zprostředkováván mnoha metabolickými drahami, jejichž nedílnou součástí je přítomnost enzymů. Ty zajišťují regulaci již zmíněných metabolických drah a adaptaci semen na aktuální podmínky.

Mezi enzymy, účastníci se vývoje semen patří i studované enzymy aminoaldehyddehydrogenasa (AMADH), diaminooxidasa (DAO) a S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR). Tyto enzymy se účastní metabolismu polyaminů a reaktivních forem dusíku, jako je např. oxid dusnatý (NO), peroxyinitrit (ONOO⁻), S-nitrosoglutathion (GSNO), nitrosothioly (SNO) a další. Reaktivní formy dusíku (RNS) plní funkci signálních molekul, které mohou přímo regulovat odpovědi rostlin nebo díky jejich reaktivitě interagovat s proteiny a ovlivňovat tak jejich strukturu a funkci. Další rolí RNS je udržování redoxní rovnováhy skrze regulaci antioxidantních enzymů. Ve větším množství mohou způsobovat nitrooxidační stres. NO a RNS mají vliv také na dormanci, její prolomení a klíčení.

Během dormance je pozastaven proces přeměny embrya na klíčnou rostlinu. Tento proces umožňuje uchování embrya do té doby, kdy jsou podmínky pro růst ideální. V případě zemědělských plodin je nežádoucí, aby tento proces byl příliš dlouhý. Je ideální, aby semeno bylo schopno klíčit v co nejkratší a nejvhodnější době. Proto přírodní i lidskou selekcí a šlechtěním vznikaly nedormantní odrůdy. Fyzikální dormance u hrachu se vyznačuje tvrdým oseměním nepropustným pro vodu. Ke klíčení u dormantních druhů dochází až po mechanickém narušení oseměni půdními částicemi, působením mikroorganismů, působením teplot nebo požitím a průchodem semene zažívacím traktem živočichů.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Vznik a vývoj semene hrachu

Hrách setý patří mezi krytosemenné rostliny, které se vyznačují dvojitým oplozením (Bewley a Black, 1994). Jedna spermatická buňka splývá s oosférou za vzniku zygoty, zatímco druhá se slučuje s centrální buňkou zárodečného vaku, ze které posléze vzniká endosperm. Z jednobuněčné zygoty vzniká suspensor a embryo. Oplozené vajíčko díky dvojitému oplození obsahuje pletiva s různým jaderným genomem, kdy embryo obsahuje polovinu mateřského a polovinu otcovského genomu a endosperm celý mateřský a polovinu otcovského genomu. Tvorbu endospermu a vývoj embrya doprovází přeměna vajíčka v semeno (Pavlová a Fischer, 2011).

Vývoj semene hrachu byl sledován v mnoha různých studiích, za různých podmínek a na několika genotypech hrachu. Až v roce 1975 bylo vytvořeno obecné schéma vývoje a bylo potvrzeno výzkumem Hedleyho a Ambrose (1980), kteří analyzovali vývoj několika genotypů hrachu za shodných podmínek. Podle výsledků této studie, semeno prochází třemi rychlými růstovými fázemi oddělenými dvěma lag fázemi. V první fázi jde o rychlý růst endospermu a osemení. Následuje první lag fáze, kdy je pozorováno pozastavení růstu osemení a endospermu. Po lag fázi následuje druhá fáze růstu týkající se růstu embrya a končící ukončením embryogeneze. Ve druhé lag fázi je endosperm téměř absorbován a osemení přichází do kontaktu s embryem. V rámci třetí fáze růstu dochází hlavně k expanzi buněk a dozrávání semene (Górecki *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2005).

Vývoj semene, stejně jako růst, je rozdělen do tří fází. V první (rané) fázi dochází k buněčnému dělení. Ve druhé fázi (maturace) buňky děloh expandují a do zásobních pletiv jsou ukládány zásobní látky (škrob a proteiny). Poslední fázi vývoje je fáze, kdy dochází k desikaci, tedy ke snižování obsahu vody (Weber *et al.*, 2005).

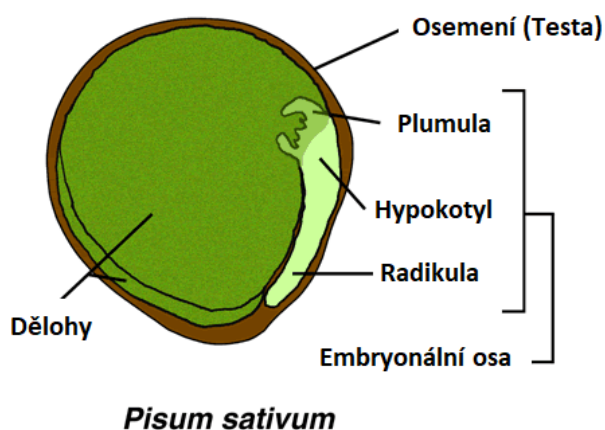
2.2 Struktura semene hrachu

Semeno hrachu (Obr. 1) je tvořeno 3 hlavními pletivy – osemením (testa), endospermem a embryem (Obr. 2). Testa (osemení) je mateřské pletivo vznikající z obalů vajíčka (integumentů), které obklopují embryo, během raného stádia vývoje semene plní funkci výživné tkáně a distribuuje živiny z mateřské rostliny skrze endosperm do vyvíjejícího se embrya (Murray, 1987). Po zaniknutí endospermu je osemení v přímém kontaktu s embryem a živiny jsou transportovány specializovanými transferovými buňkami. Ve fázi, kdy je semeno zralé a začíná ztrácet vodu, jsou vrstvy osemení stlačeny embryem

a akumulují se v nich látky jako je lignin, suberin, kutin, kalosa a taniny. V suchých semenech plní osemení funkci mechanické bariéry, kdy chrání embryo před biotickými i abiotickými vlivy, které by ho mohly nějakým způsobem poškodit (Górecki *et al.*, 2001).

Endosperm je triploidní pletivo, které v raném stádiu vývoje semene plní funkci dočasného zdroje výživy, vytváří prostor pro růst embrya a propojuje mateřské pletivo s vznikajícím embryem. Zajišťuje homeostatické prostředí pro vývoj embrya. V semenech hrachu velikost endospermu s rostoucím embryem rychle klesá a endosperm postupně zaniká (Melkus *et al.*, 2009).

Největší část semene tvoří embryo. Jeho součástí jsou dvě dělohy a embryonální osa tvořená stonkovým a kořenovým pólem (Obr. 1). V rané fázi je embryo vyživováno pomocí endospermu, po jeho zániku jsou živiny dodávány osemením. V pozdějších fázích vývoje je embryo orgánem, kde jsou ukládány zásobní látky (Górecki *et al.*, 2001).

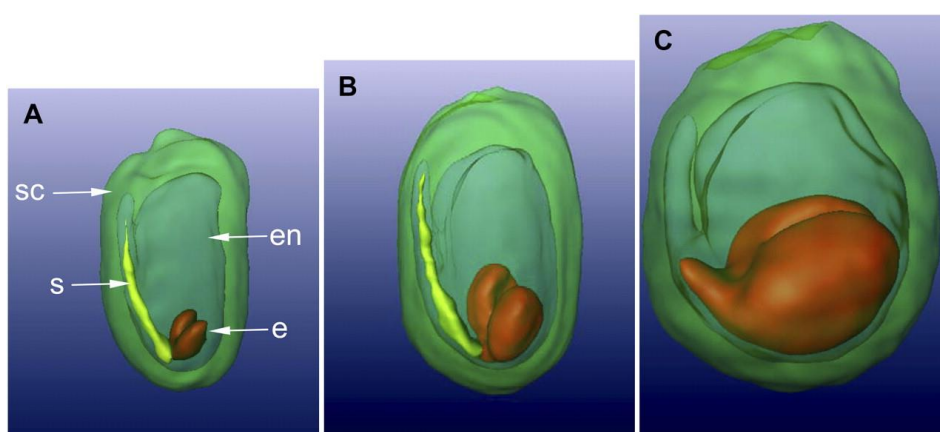


Obr. 1 Struktura semene hrachu (převzato a upraveno z Finch-Savage a Leubner-Metzger, 2006).

2.2.1 Vývoj endospermu

Jak již bylo výše zmíněno, endosperm je triploidní pletivo v raných stádiích vývoje semen zprostředkovávající transport živin z mateřské rostliny do embrya. Bylo také zjištěno, že obsahuje mnoho genů, které mají efekt na výslednou velikost semene a také to, že tyto geny pocházejí primárně z mateřské rostliny (Melkus *et al.*, 2009).

V rané fázi vývoje tvoří endosperm hrachu pohyblivé, proliferující pletivo obklopující embryo a suspenzor (Obr. 2A). Endosperm se postupně zvětšuje až vyplňuje většinu embryonálního vaku a tvoří embryonální vakuolu, která je v pozdější fázi vývoje obklopena buněčnou stěnou. Embryo v rané fázi vývoje plave v endospermální vakuole tvořící mechanickou obranu proti tlaku vyvolanému osemením. Embryo je s embryonálním vakem propojeno skrze suspenzor, který v rané fázi zajišťuje výživu embrya z mateřského pletiva (Obr. 2B). V průběhu růstu embrya je suspenzor od embryonálního vaku oddělen, postupně mizí a funkci distribučního orgánu plní endosperm (Obr. 2C). Jednotlivá stádia vývoje byla zaznamenána pomocí NMR a byl vytvořen digitální model (Obr. 2) (Melkus *et al.*, 2009). Prostřednictvím endospermu je embryu z mateřského pletiva dodávána sacharosa a aminokyseliny. V další fázi vývoje, kdy je v embryu vyvinut sink (místo kde jsou transportovány a ukládány metabolity), se metabolismus v endospermu zpomaluje a rostoucí embryo vyplňuje místo, které bylo původně zaplněno endospermem. Kapalná část endospermu vymizí a zůstává pouze přechodný endosperm, který zabraňuje kompetici o živiny a prostor s mateřským pletivem (Melkus *et al.*, 2009).



Obr. 2 Digitální model semene hrachu ve 3 vývojových stádiích. s – suspenzor, sc – osemení, en – endosperm, e – embryo (převzato z Melkus *et al.*, 2009).

2.2.2 Embryogeneze

Splynutím spermatické buňky s oosférou vzniká zygota obsahující veškerou genetickou informaci pro vznik embrya. Zygota se v první fázi vývoje dělí asymetricky přepážkou kolmou k ose mikropyle (otvor klovy) na buňku apikální a bazální a v této fázi je nazývána proembryo. Z buňky apikální se vyvíjí embryo a z buňky bazální suspensor. Následuje embryogeneze (vývoj embrya), která je obvykle rozdělena na 3 fáze: časnou, střední a pozdní (Pavlová a Fischer, 2011).

Embryogeneze začíná buněčným dělením. Ve stádiu, kdy je embryo tvořeno 8-16 buňkami dochází k funkční diferenciaci buněk tvořících povrch embrya na protoderm. Ten je základem epidermis nadzemní části rostliny. V raném stádiu vývoje dochází ke vzniku transferových buněk, které jsou důležitou součástí transportu živin. U bobovitých rostlin transferové buňky vznikají regionální diferenciací protodermu (Borisjuk *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2005). Vnitřní buňky embrya tvoří centrální meristém. Následuje globulární stádium, které je charakteristické polarizací embrya, kdy směrem k endospermu vzniká stonkový pól (epifýza) a směrem k suspensoru kořenový pól (hypofýza), tyto buňky se přestávají dělit a jejich buněčný cyklus se výrazně prodlužuje. V dalších stádiích vývoje se počty buněk mohou zvětšit jejich dělením a mohou se přidat přiléhající deriváty centrálního meristému, což vede ke vzniku promeristémů (Pavlová a Fischer, 2011).

Na konci globulárního stádia se na okrajích apikální části embrya diferenciují dvě skupiny intenzivně se dělících buněk, ze kterých posléze vznikají dvě dělohy a embryo přechází z globulárního stádia do srdčitého. Toto stádium je označováno jako přechodné. Dochází k dělení buněk, jejich diferenciaci, prodlužování buněčného cyklu, tvorbě cytoplazmatických domén atd. (Pavlová a Fischer, 2011). Tento proces je ovlivňován hormony (Nambara a Marion-Poll, 2003; Swain *et al.*, 1995) a sacharidy (Ambrose *et al.*, 1987) iniciovanými signálními dráhami, které spouští zrání semene (Weber *et al.*, 2005). Prodlužováním transverzálně dělených buněk střední oblasti embrya ve směru epifýza-hypofýza vzniká hypokotyl. Uspořádáním buněk do řad vzniká prokambium, ze kterého v postembryonálním vývoji se vytváří centrální válec kořene, hypokotyl a stonek. Z buněk mezi prokambiem a protodermem vzniká základní meristém (základ primární kůry). Část buněk základního meristému zůstává uprostřed prokambia a podílí se na vzniku dřene. Zvětšování embrya v této fázi je způsobeno nejen dělením

ale i zvětšováním buněk. Stádium, kde jsou vyvinuty dělohy a embryo je prodlouženo ve směru epifyza-hypofýza se nazývá embryo torpédovité (Pavlová a Fischer, 2011).

Následuje fáze dozrávání, kdy je embryo připravováno k dormanci. V tomto stádiu se v embryu, především v dělohách, začínají syntetizovat a ukládat zásobní látky, dochází ke ztrátě vody (desikaci) a v embryu je zvýšena tvorba ochranných proteinů LEA (late embryogenesis abundant protein). LEA proteiny jsou látky hydrofilní povahy ve velké míře akumulovány v pletivech semen tolerantních k desikaci hlavně v pozdějších fázích vývoje semene, které postupně vymizí během klíčení. Plní obrannou funkci v průběhu dehydratace semen. Expres LEA proteinů, která je v mnoha případech závislá na kyselině abscisové (ABA), probíhá také při vystavení vegetativních pletiv nedostatku vody vyvolanému stresovými faktory jako je sucho, zvýšená koncentrace solí, nízké teploty (Grelet *et al.*, 2004). Při dozrávání klesá metabolická aktivita semene a snižuje se transkripce, translace a respirace. Dozrávání embrya je doprovázeno změnami hladin fytohormonů, stoupá hladina kyseliny abscisové, klesá aktivita cytokininů, giberelinů a auxinů. Hladina PA se v průběhu vývoje semene postupně zvyšuje a jejich zapojení v procesu klíčení bylo potvrzeno zjištěním, že exogenní PA urychlují proces klíčení (Khan *et al.*, 2012). Za zralé embryo je považováno to, ze kterého po dormanci za vhodných podmínek vzniká sporofyt (Pavlová a Fischer, 2011).

2.2.3 Kontrola embryonálního vývoje

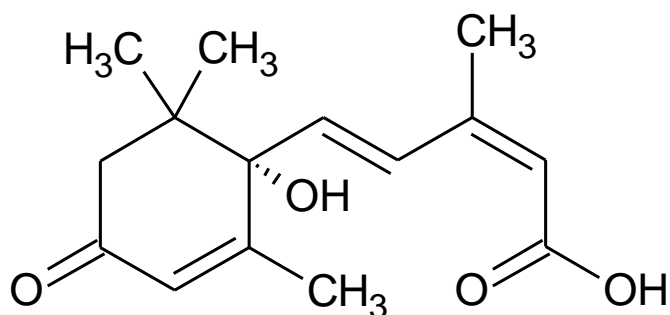
Během embryonálního vývoje jsou pozorovány změny strukturální a morfologické, ale také změny akumulace a distribuce metabolitů, podle kterých může být rozpoznáváno stádium vývoje. Dozrávání semen je obecně ovlivněno signálními dráhami zahrnujícími sacharidy, ABA a proteinovou kinasu SnRK1 (Brocard-Gifford *et al.*, 2003). Příkladem je nižší obsah glukosy v nediferenciovaných, nezralých oblastech, který je spojován s mírou mitotické aktivity. Zralé oblasti, ve kterých je akumulován škrob, se vyznačují nízkou hladinou glukosy. Hladina ATP v dělohách se během zrání embrya zvyšuje (Borisjuk *et al.*, 2003).

Dalším sledovaným parametrem je hladina sacharosy. Mladá embrya obsahují velmi malé koncentrace tohoto sacharidu, zatímco dozrávající pletiva s elongační a akumulační aktivitou obsahují sacharosu v nejvyšších koncentracích. Sacharosa funguje jako transportní a zásobní cukr, ale také jako signální molekula spouštějící expresi genů a procesy spojené s ukládáním živin. Reguluje hladiny enzymů jako je sacharosasyntasa (EC 2.4.1.13), ADPG-pyrofosforylasa (EC 2.7.7.27), sacharosafosfátsynthasa

(EC 2.4.1.14) a fosfoenolpyruvátkarboxylasa (EC 4.1.1.31) (Golombek *et al.*, 1999), je součástí regulační sítě kontrolující diferenciaci semene. Přeměna hexos na sacharosu iniciuje zrání embrya (Weber *et al.*, 2005).

V procesu dozrávání hraje také velmi důležitou roli kyselina abscisová (ABA) (Obr. 3) (Nambara a Marion-Poll, 2003). Reguluje širokou škálu odpovědí na vnější stresové podmínky (Weber *et al.*, 2005). Zastoupení ABA se v různých fázích vývoje a různých částech embrya liší. Příkladem je několikrát vyšší hladina ABA v ose embrya ve srovnání s dělohami. Hladiny ABA jsou během raného embryonálního vývoje nízké, ale v průběhu dozrávání se zvyšují a korelují s vývojovým stádiem semene. Zvyšování hladiny ABA v průběhu dozrávání indukuje expresi cyklin-dependentního kinasového inhibitoru způsobujícího pozastavení buněčného cyklu. V signalizaci ABA během vývoje semen je zapojeno mnoho různých genů a druhých posílů jako jsou fosfolipasy, proteinkinasy/fosfatasy, mitogenem aktivované kinasy, SnRK1, fosfolipidy, reaktivní formy kyslíku a oxid dusnatý (Hirayama a Shimozaki, 2007). Radchuk *et al.* (2010) zjistili, že aktivita ABA v semenech hrachu je částečně ovlivňována prostřednictvím SnRK1 kinas. Jejich nedostatek vede k neefektivnímu využívání sacharosy a snížení hladiny ABA. To vede k nižšímu obsahu metabolitů, narušení metabolických toků a výsledkem je snížení síly sinku embrya.

Regulace embryogeneze probíhá také prostřednictvím fosforylace proteinů (Weber *et al.*, 1996), pomocí které jsou regulovány např. aktivity enzymů v souvislosti s energetickým stavem. Nízký energetický stav vede ke snižování toku metabolitů. Tento způsob regulace je propojen se signálními dráhami cukrů, kdy například během přechodu ze stavu s vysokou hladinou hexosy do stavu s vysokou hladinou sacharosy dochází k inaktivaci sacharosafosfátsynthasy pomocí fosforylace, v důsledku toho je zvýšen energetický stav a snížena hladina adenosinmonofosfátu (AMP) (Weber *et al.*, 2005).



Obr. 3 Strukturální vzorec kyseliny abscisové (vytvořeno v ChemSketch).

2.2.4 Struktura a funkce osemení.

Mezi hlavní funkce osemení patří:

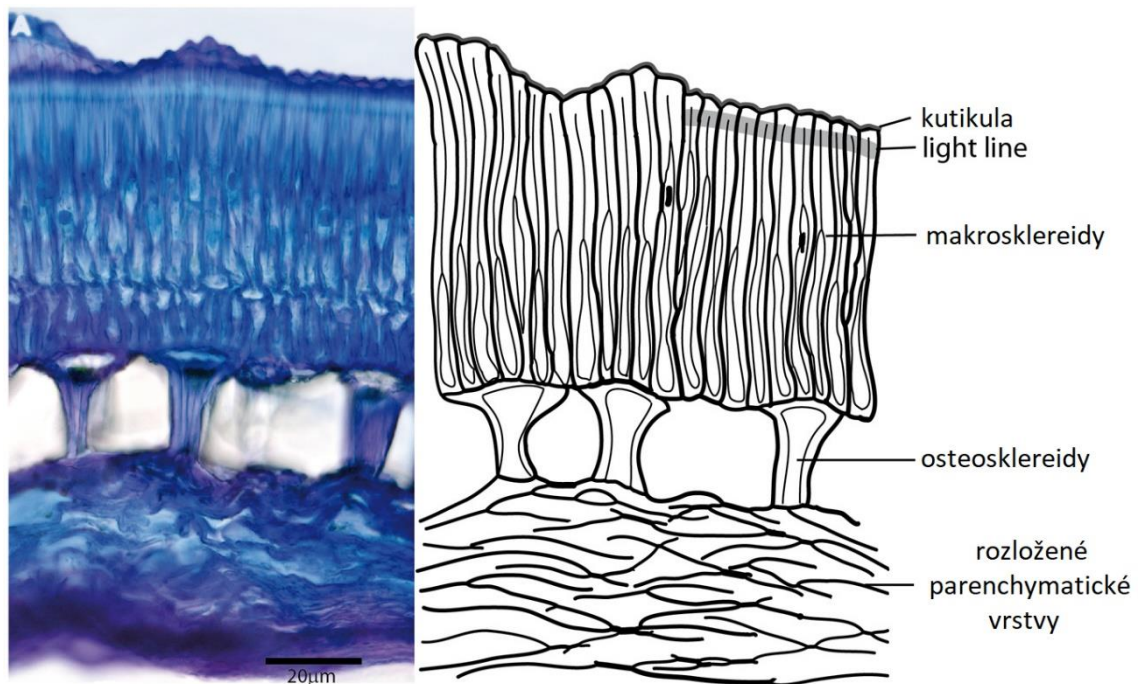
- 1) Produkce, transport a příjem metabolitů potřebných pro vývoj zygoty, včetně vnitřní konverze metabolitů, transportu asimilátů a fotosyntézy.
- 2) Přenos informací o okolním prostředí.
- 3) Ustavení dormance.
- 4) Mechanická ochrana embrya.
- 5) Napomáhá při rozšiřování semen (Smýkal *et al.*, 2014).

Vývoj osemení je před oplozením pozastaven pomocí aktivních polycomb proteinů, k jejichž expresi dochází v mateřském pletivu obklopujícím vajíčko. Po oplození dochází k uvolnění této represe a začíná vývoj osemení (Rozsak a Köhler, 2011). Osemení vzniká z L1 sporofytické vrstvy obklopující vajíčko (Schneitz *et al.*, 1997). Diferenciace osemení z vaječných obalů je doprovázena nejvýraznějšími změnami na buněčné úrovni. V tomto stádiu vzniká systém regulačních sítí koordinujících růst vnějších a vnitřních vrstev (integumentů) obklopujících vajíčko (Skinner *et al.*, 2004). Vnitřní vrstva v průběhu vývoje téměř mizí, vnější vrstva produkuje několik různých vrstev buněk, ze kterých se poté tvoří osemení (Smýkal *et al.*, 2014).

Svrchní vrstva osemení je tvořena jednou vrstvou makroklereid (Obr. 4). V raných vývojových stádiích obsahují hustou cytoplazmu a několik malých vakuol. V dalším stádiu jsou až 4-násobně prodlužovány vzhledem k jejich původní délce a dochází k jejich diferenciaci v palisádu makroklereid (Malthighiho buňky) s nerovnoměrně zesílenými buněčnými stěnami (Van Dongen *et al.*, 2003). Makroklereidy jsou prodlouženy kolmo k povrchu semene (Obr. 4). Vnější části buněčné stěny makroklereid (tzv. „terminal caps“) jsou zesíleny a pokryty kutikulou. Tvar této části spolu s kutikulou a voskovými depozicemi určují texturu povrchu osemení (Van Dongem *et al.*, 2003). Část makroklereid oddělující jejich vrcholovou část od části bazální nazýváme *linea lucida* (light-line, světlá linie) (Obr. 4). Její vzhled je odvozen od lokálních variací refrakčních indexů a barvivosti připisované modifikacím v ukládání polysacharidů a impregnaci této oblasti buněčné stěny. Velikost světlé linie ovlivňuje nepropustnost osemení (Smýkal *et al.*, 2014). Vnější vrstva osemení vytváří fyzikální bariéru mezi semenem a okolním prostředím. Tvoří tak ochranu i proti virům a bakteriím. Integrita povrchové vrstvy osemení je velmi důležitá pro kvalitu semen a schopnost ukládání živin a dozrávání semene (Radchuk a Borisjuk, 2014).

Pod vrstvou makrosklereid je vrstva tvořená tlustostěnnými osteosklereidami (Obr. 4) (Moise *et al.*, 2005). V raných stádiích jsou buňky této vrstvy podobné přilehlým parenchymatickým buňkám, ale později se diferenciují na osteosklereidy („hourglass cells“) (Corner, 1951). Po dosažení jejich finální velikosti a tvaru začínají tyto buňky zvětšovat buněčnou stěnu. Součástí této vrstvy jsou mezibuněčné prostory naplněné vzduchem vzniklé během diferenciacce osemení. V místě a okolí hila (pupek) vrstva osteosklereidů splývá s tlustostěnnými parenchymatickými buňkami.

Nejspodnější část osemení je tvořena parenchymatickými buňkami (Obr. 4), které jsou rozděleny do vrstev: chlorchym, parenchym a rozvětvený parenchym. Parenchym je charakterizován velkými mezibuněčnými prostory, které jsou ještě větší v rozvětveném parenchymu. Tyto mezibuněčné prostory jsou důležité pro translokaci kyslíku (Van Dongen *et al.*, 2003; Radchuk a Borisjuk, 2014). Chlorchym je tvořen velkými buňkami obsahujícími chloroplasty.



Obr. 4 Struktura osemení bobovité rostliny *Fabaceae* (převzato a upraveno ze Smýkal *et al.*, 2014).

Ve vyvíjejících se semenech probíhá fotosyntéza v omezené míře a hypoxie uvnitř semen indukuje, že probíhá v menší míře než respirace. Fotosyntéza v osemení fixuje CO₂ a vytváří kyslík, čímž se zmírňuje hypoxie uvnitř semene (Greenway a Gibbs, 2003). Transport živin a jejich skladování v endospermu závisí do značné míry na energii získané respirací, a tedy i na stálém přísunu fotosynteticky odvozeného kyslíku (Melkus *et al.*, 2011). Bylo dokázáno, že proces skladování sacharosy ve formě škrobu je stimulován světlem a přísunem kyslíku (Gifford a Bremner, 1981). Vysoká míra respirace osemení spolu s nízkou propustností pro CO₂ přispívá ke zvýšení koncentrace oxidu uhličitého v semenech. Vysoká koncentrace CO₂ zvyšuje aktivitu enzymu fosfoenolpyruvátkarboxylasy (EC 4.1.1.31; PEPC), který je zodpovědný za refixaci CO₂ (Wager, 1974) a tak za snižování jeho ztrát. Refixace CO₂ je také kontrolována pomocí aktivity enzymu ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy (EC 4.1.1.39, RuBisCo) během fotosyntézy (Goffman *et al.*, 2004). Nicméně míra fotosyntézy v osemení je velmi malá. Fotosyntetická aktivita osemení je pravděpodobně zachována kvůli adaptaci na vnější prostředí (zachycení a zpracování světla) (Radchuk a Borisjuk, 2014).

Druhá vrstva parenchymu se podobá chlorchymu, ale obsahuje méně chloroplastů. Rozvětvený parenchym, tvořený malými buňkami nepravidelného tvaru, je charakteristický rozsáhlými mezibuněčnými prostory, které se v průběhu zvětšování děloh zmenšují až do stádia, kdy se embryo dotýká osemení. Parenchymatické buňky jsou stlačeny a spolu se zbytky buněčných stěn embryonálního vaku tvoří základ hraniční vrstvy mezi osemením a dělohami (Van Dongen *et al.*, 2003).

Díky roli v průběhu embryonálního vývoje je parenchymatická vrstva označována také jako nutriční vrstva. V parenchymatické tkáni je rozvětven cévní systém. V případě hrachu jde o poměrně jednoduchý systém s jedním chalazálním cévním svazkem (Smýkal *et al.*, 2014), který transportuje do vyvíjejícího se osemení živiny a asimiláty produkované mateřskou rostlinou. Tento cévní svazek se dělí do dvou krátkých větví, které obsahují pouze floém a vedou paralelně k radikule. Chalazální cévní svazek je tvořen centrálním xylémem obklopeným floémovými elementy (Van Dongen *et al.*, 2003). Tímto způsobem jsou z mateřské rostliny předávány hormonální signály a informace přenášené pomocí RNA a proteinů. Parenchymatické buňky jsou vzájemně propojeny plazmodesmaty a tvoří tak symplastické domény usnadňující pohyb malých molekul cukrů a peptidů (Radchuk a Borisjuk, 2014).

V chalazální oblasti se nachází hilum (pupek) tvořené oválnou jizvou, která je pozůstatkem původního napojení vajíčka k mateřské rostlině prostřednictvím poutka

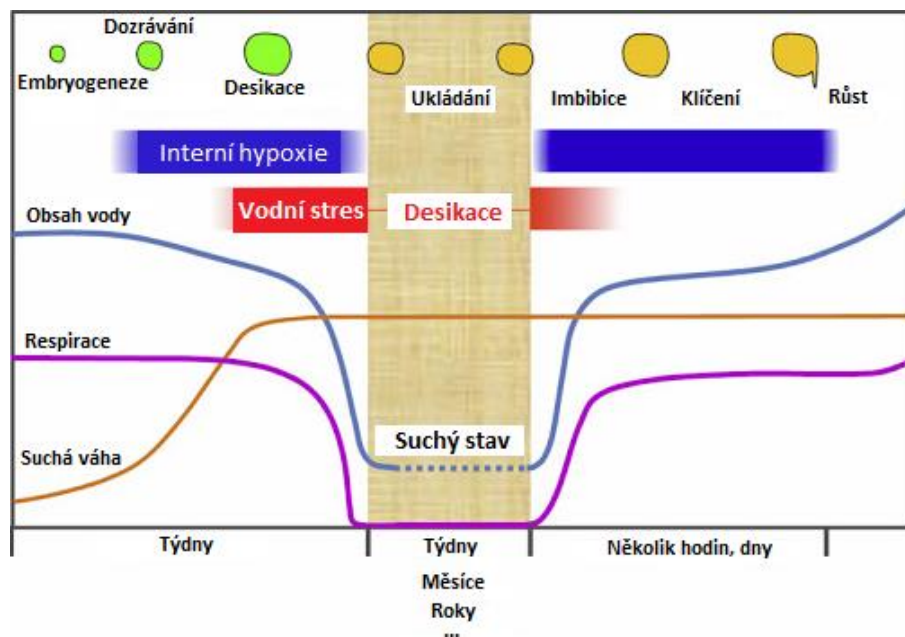
(funikulus). Uprostřed pupku se nachází štěrbina (hilar groove), která slouží k regulaci vlhkosti. Štěrbina se otevírá v případě, že je relativní vlhkost vzduchu nízká a dochází díky tomu k vysychání semene. V případě vysoké relativní vlhkosti vzduchu je štěrbina zavřená, aby nedocházelo k absorpci vlhkosti semenem (Smýkal *et al.*, 2014).

Na opačném pólu vajíčka, označovaném jako mikropylární pól, je umístěn otvor klovy (mikropyle), kterým po opylení prorůstá pylová láčka do zárodečného vaku. (Smýkal *et al.*, 2014).

Koordinovaný vývoj vnitřního a vnějšího integumentu (obal vajíčka) je regulován pomocí lokální exprese několika transkripčních faktorů. Raná stádia vývoje embrya jsou kontrolována mateřskou rostlinou, která s dceřinou tkání komunikuje prostřednictvím osemení a endospermu (Smýkal *et al.*, 2014).

2.3 Desikace a dormance

V průběhu desikace dochází k velkému úbytku vody a vysychání semen (Obr. 5) (Kermode a Finch-Savage, 2002). Nízká hladina kyslíku (hypoxie) při desikaci může zmírnit oxidační poškození membrán a enzymů a vést tak k dlouhověkosti semen (Borisjuk a Rolletschek, 2009). U vysychajících semen je aktivní metabolismus a transkripční aparát vyžadující energii. Přejít semene z fáze ukládání do fáze desikace je doprovázen mnoha změnami na úrovni genové exprese. Během desikace dochází k řadě biologických procesů, které předcházejí klíčení semen. V průběhu desikace jsou akumulovány disacharidy a oligosacharidy, sekundární metabolity (tokoferoly a flavonoidy), kyselina γ -aminomáselná (GABA), sukcinát, fumarát, aminokyseliny a volné mastné kyseliny. Rafinosové oligosacharidy stabilizují membrány a chrání tak buňky, dále jsou zdrojem substrátů pro vytvoření energie během klíčení (Blochl *et al.*, 2007) a jsou součástí procesu odstraňování hydroxylových radikálů (Nishizawa *et al.*, 2008). Během desikace dochází také k degradaci zhruba 15% olejů syntetizovaných během fáze ukládání (Angelovici *et al.*, 2010).



Obr. 5 Procesy probíhající v průběhu vývoje semene a změny v obsahu vody, suché váze a míře respirace tyto procesy doprovázející (převzato a upraveno z Plant Physiology and Development sixth edition, 17.2.2021).

Fyziologický stav suchých semen se mění během posklizňového dozrávání (after-ripening) a je závislý na teplotě a vlhkosti (Probert, 2000). Předpokládá se, že při posklizňovém dozrávání dochází k oxidaci proteinů reaktivními formami kyslíku (ROS). Semeno je závislé na přítomnosti malých antioxidačních molekul, které jej chrání před oxidačním poškozením. Hlavní roli pravděpodobně hraje glutathion (GSH), který po oxidaci ROS tvoří dimer GSSG (Kranner a Grill., 1993). Dalším antioxidantem je tokoferol, který chrání membrány proti lipidové peroxidaci (Sattler *et al.*, 2004). V suchých semenech je skladováno velké množství mRNA označovaných jako dlouhodobé transkripty, které zajišťují přežití během dormance (Rajjou *et al.*, 2004). Většina uložených mRNA nese informace skupiny zásobních LEA proteinů (Weitbrech *et al.*, 2011).

Jako dormance je označována fyziologická adaptace semen na environmentální heterogenitu (Smýkal *et al.*, 2014). Během dormance je pozastaven proces přeměny embrya na klíčnou rostlinu. Tento proces umožňuje uchování embrya do té doby, kdy jsou podmínky pro růst ideální (Moïse *et al.*, 2005). Suché dormantní semeno je dobře vybaveno pro přežití po delší dobu za nepříznivých podmínek. Dormance je kontrolována několika faktory, jako je světlo, teplota, doba skladování osiva. Dormance a klíčení jsou ustavovány pomocí spolupůsobení růstového potenciálu embrya a omezení daných pletivy obklopujícími embrya (Koornneef *et al.*, 2002). V rámci čeledi bobovité je

typická tzv. fyzikální dormance (tvrdosemennost), která je kontrolována prostřednictvím tloušťky, impregnace a struktury povrchu osemení a geneticky je řízena až třemi lokusy genu (Weeden, 2007). Dormantní semena se stávají propustná pro vodu až po mechanickém narušení osemení půdními částicemi, působením mikroorganismů, působením teplot nebo požitím a průchodem semene zaživacím traktem živočichů (Baskin a Baskin, 2000). Fyzikální dormance plní ochrannou funkci proti predátorům a patogenům (Smýkal *et al.*, 2014).

2.4 Klíčení

Proces klíčení může být rozdělen do několika stádií. Začíná za příznivých podmínek, kdy suchá semena přichází do styku s vodou. V raném stádiu klíčení dochází k rychlému nasávání vody (imbibice), během kterého semeno bobtná a mění svou velikost a tvar (Robert *et al.*, 2008), následovanému plateau fázi (nedochází ke změnám). Hlavní roli při příjmu vody hraje permeabilita osemení. Nasávání vody doprovází masivní ztráta buněčných roztoků, což může urychlovat klíčení snižováním koncentrace inhibitorů např. ABA (Matilla *et al.*, 2005) a je také důkazem poškození membrán a buněčných součástí způsobeným rychlou nehomogenní rehydratací (Powell a Matthews, 1978). Po zastavení příjmu vody a změn velikosti semene nastávají další dvě fáze příjmu vody ukončené až vznikem klíčící rostliny. Tyto procesy doprovází důležité metabolické změny. U planého hrachu nastává třetí fáze příjmu vody až po narušení osemení. V průběhu klíčení dochází k elongaci buněk. Po ukončení bobtnání jsou všechny změny tvaru a velikosti semene způsobeny prodlužováním buněk. Klíčení je dokončeno po proniknutí radikuly krycími vrstvami embrya, což je následováno vznikem klíčící rostliny. Tento poslední krok klíčení je řízen podílem ABA/GA (k. abscisová/gibereliny). Hladiny ABA se snižují a dochází k porušení osemení. Následuje zvýšení hladiny GA, je zvyšován růstový potenciál embrya a dochází k aktivaci hydrolytických enzymů zeslabujících ochranná pletiva (Weitbrecht *et al.*, 2011; Arc *et al.*, 2013).

2.5 Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku (Tab. 1), jako je např. i oxid dusnatý (NO) jsou zapojeny v téměř všech fyziologických rostlinných procesech, počínaje prolomením dormance a klíčením semen přes vývoj, stárnutí, pohyb stomat, zrání plodů, reprodukci až k mechanismům odpovědi na biotické a abiotické stresové podmínky (Domingos *et al.*, 2015; Corpas *et al.*, 2011). Jako reaktivní formy dusíku jsou označovány látky odvozené od NO (Corpas, 2016).

Tab. 1 Přehled reaktivních forem dusíku (RNS) (převzato a upraveno z Corpas, 2016).

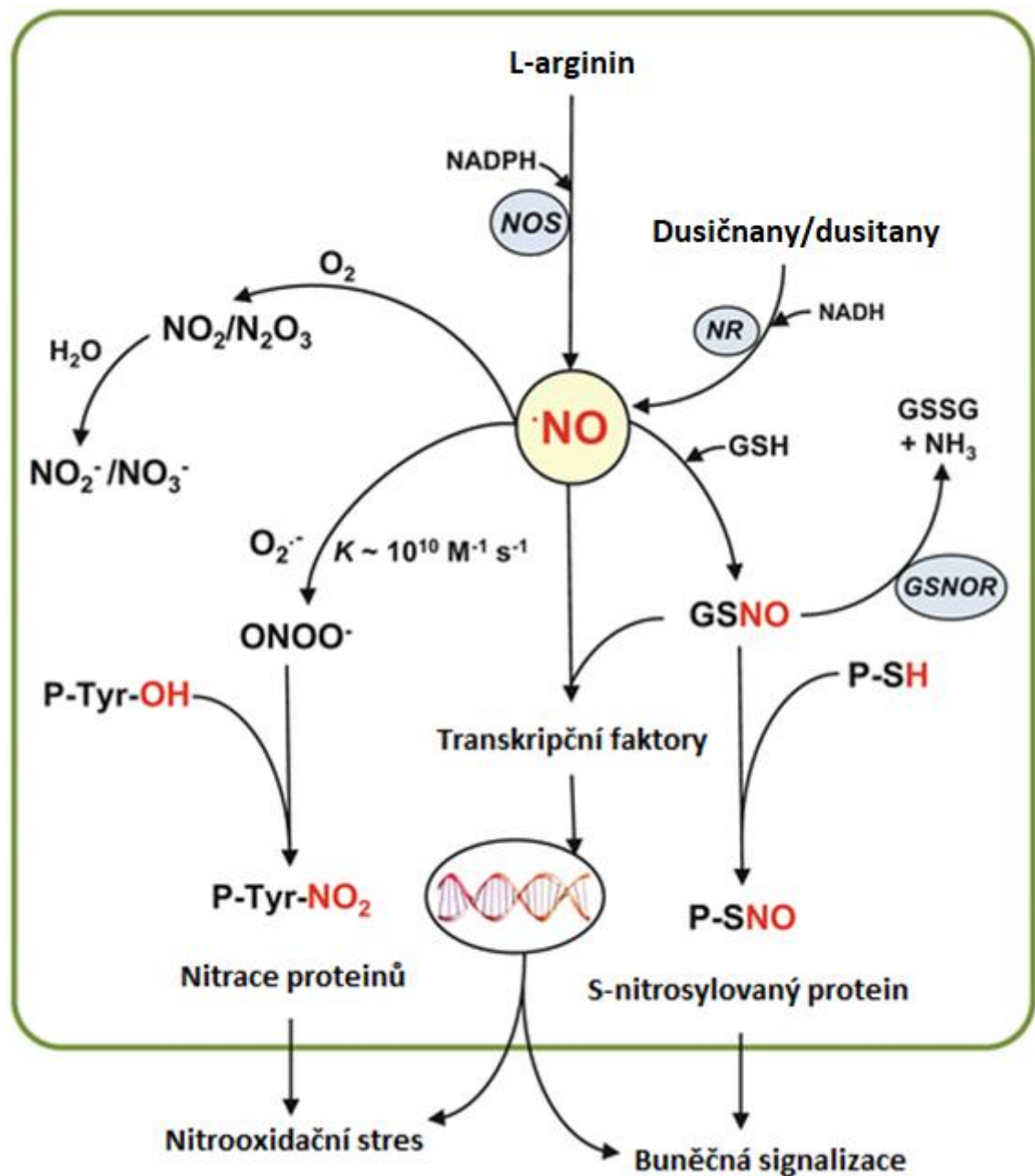
Anorganické molekuly	
Neradikálové RNS	Radikály
Nitroxylový anion (NO^-)	Oxid dusnatý ($\cdot\text{NO}$)
Nitrosioniový kation (NO^+)	Oxid dusičitý ($\cdot\text{NO}_2$)
K. dusitá (HNO_2)	
Oxid dusitý (N_2O_3)	
Oxid dusičitý (N_2O_4)	
Peroxyinitrity (ONOO^-)	
K. peroxodusitá	
Organické molekuly	
Nitrotyrosin (Tyr-NO_2)	Lipidové peroxylové radikály (LOO^\bullet)
Nitrosoglutathion (GSNO)	
Nitrosothioly (SNO)	
Nitro- γ - tokoferol	
Nitrované mastné kyseliny (MK-NO_2)	

2.5.1 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je volný radikál, tedy vysoce reaktivní částice, obsahující v π orbitalu volný nepárový elektron. Díky tomu působí jako silné oxidační činidlo a může reagovat s mnoha anorganickými i organickými molekulami, jako jsou peptidy, proteiny, lipidy a nukleotidy. NO jak v plynné, tak kapalné formě reaguje s kyslíkem za vzniku N_2O_3 a NO_2 , které ve vodném prostředí tvoří stechiometrické množství dusitanů (NO_2^-) a dusičnanů (NO_3^-). NO reaguje také se superoxidovými radikály (O_2^-) za vzniku peroxyinitritů (ONOO^-) (Obr. 6) (Vandelle a Delledonne, 2011). Tato reakce díky vysoké rychlostní konstantě probíhá v jakékoliv rostlinné buňce nebo pletivu, kde jsou přítomny oba radikály současně, tedy hlavně chloroplastech, mitochondriích a peroxisomech (Corpas, 2016).

2.5.1.1 Vznik oxidu dusnatého v rostlinné buňce

Vznik NO v rostlinách nebyl zatím plně prozkoumán. Jeho syntéza může probíhat dvěma hlavními způsoby: redukční nebo oxidační dráhou (Obr. 6). Redukční dráha je založena na redukci dusitanů na NO, zatímco oxidační na oxidaci molekul obsahujících dusík, jako je např L-arginin (Obr. 6) (Gupta *et al.*, 2011b).



Obr. 6 Schématický model metabolických drah NO v rostlinných buňkách. NO může vznikat z dusičnanů/dusitanů působením NR (nitrátreduktasa) ale i z L-argininu působením NOS-like enzymů (NO synthasa). Vzniklý NO poté přímo působí na transkripční faktory nebo interaguje s O₂, kdy je převeden zpět na dusitany/dusičnaný, a se O₂·⁻ za vzniku peroxynitritů, které dále nitrují proteiny. Reakcí NO s glutathionem (GSH) vznikají S-nitrosoglutathiony (GSNO), které mohou být působením S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) převedeny na glutathion disulfid (GSSG) nebo dále interagují s proteiny. (převzato a upraveno z Corpas *et al.*, 2016).

2.5.1.2 Vznik oxidu dusnatého redukčním způsobem

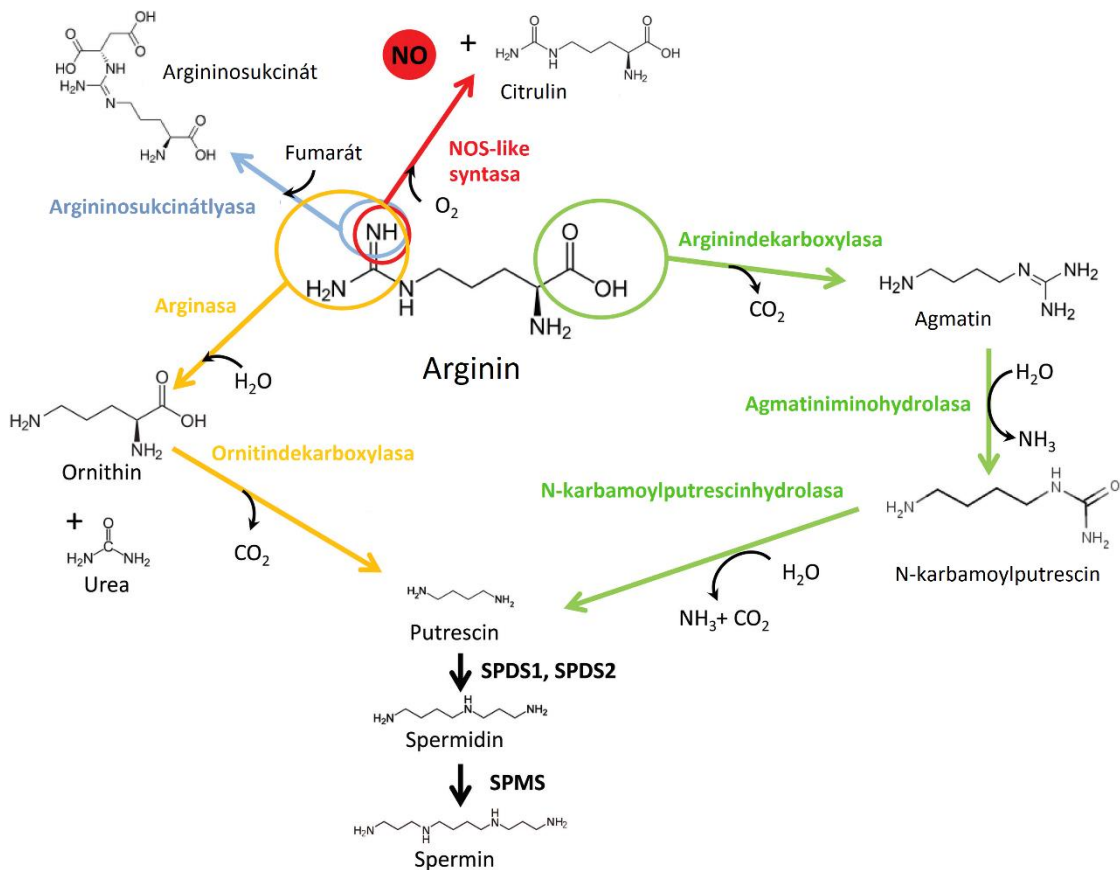
Redukce dusitanů může probíhat jak za nepřítomnosti enzymů, tak za jejich katalýzy. Redukce dusitanů probíhá bez přítomnosti enzymů pouze za určitých podmínek (nízké pH, vysoce redukční prostředí za vysokých koncentrací dusitanů) (Bethke *et al.*, 2004a; Rockel *et al.*, 2002).

Dalším způsobem vzniku NO je redukce dusitanů za enzymové katalýzy. Nitrátreduktasa (EC 1.6.6.1., NR) je multifunkční cytoplasmatický enzym účastnící se asimilace a metabolismu dusíku. Katalyzuje přeměnu dusičnanů na dusitany za účasti NADH. V několika studiích bylo popsáno, že vykazuje schopnost za určitých podmínek (anaerobní nebo kyselé prostředí) redukovat dusičnany až na NO (Obr. 6) (Yamasaki *et al.*, 1999), k tomu dochází za normálních podmínek jen velmi vzácně. Nitrátreduktasa může interagovat s partnerským proteinem NOFNiR („NO-forming nitrite reductase“) a produkovat NO redukcí dusitanu (Astier *et al.*, 2018). Pro funkci NR i NOFNiR je důležitá přítomnost molybdenového kofaktoru. Tento kofaktor obsahují i další rostlinné enzymy: xanthinoxidasy, aldehydoxidasy a sulfitoxidasy. Tyto enzymy mohou také hrát roli v syntéze NO (Astier *et al.*, 2018). Dalším proteinem zapojeným do syntézy NO je vazebný membránový protein nitritreduktasa (Ni-NOR) (Stöhr *et al.*, 2001) produkující NO z dusitanů v apoplastech buněk s využitím elektronového donoru NAD(P)H. Aktivita Ni-NOR je závislá na nízké hladině kyslíku (Astier *et al.*, 2018).

Podle výzkumu Gupta a Kaisera (2010) je NO produkováno také pomocí mitochondriálního elektronového transportního řetězce (mETC). Tato reakce je lokalizována na membráně mitochondrií, je limitována dostupností dusitanů a vyžaduje anaerobní podmínky.

2.5.1.3 Vznik oxidu dusnatého oxidačním způsobem

V živočišných buňkách vzniká NO enzymově za účasti NO synthasy (EC 1.14.13.39; NOS). První rostlinný NOS-like enzym byl objeven u zelených řas *Osteococcus tauri* ve výzkumu Foresiho *et al.* (2010). Tento enzym vykazoval 43% sekvenční homologii s lidskou NOS. NOS-like enzym katalyzoval produkci NO z L-argininu, stejně jako živočišná NOS (Jeandroz *et al.*, 2016). Předpoklady pro přítomnost NOS v rostlinách byly potvrzeny pomocí měření NOS-like aktivity v pletivech několika druhů rostlin (Corpas *et al.*, 2006, 2004; Pagnussat *et al.*, 2002; Dordas *et al.*, 2004).



Obr. 7 Schématický model předpokládaných metabolických přeměn argininu v rostlinách. SPDS – spermidinsyntasa, SPMS - sperminsyntaxa (převzato a upraveno z Astier *et al.*, 2018).

NOS-like aktivita byla měřena pomocí testu na bázi citrulinu („the citrulline based assay“), kdy je pozorována konverze radioaktivně značeného argininu, který byl substrátem pro vznik radioaktivně značeného citrulinu (Obr. 7) (Bredt a Snyder, 1989). Problémem tohoto testu byla nespecificita na vznik citrulinu. Mohly vznikat jiné produkty, jako například argininosukcinát, který mohl být produkován v jiných metabolických drahách (Obr. 7) (Astier *et al.*, 2018; Tischner *et al.*, 2007).

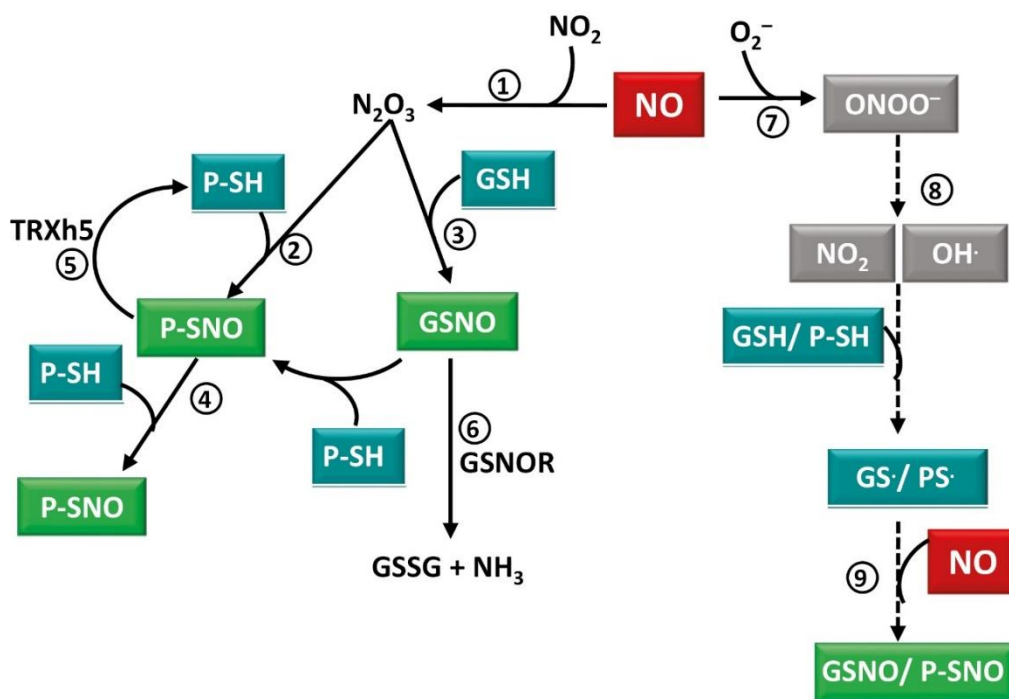
Aktivita enzymů na bázi NOS byla potvrzena použitím dalších metod měřících produkci NO jako je chemiluminiscence (Corpas *et al.*, 2006, 2004) a EPR („electrochemical potentiodynamic reactivation“) (Pagnussat *et al.*, 2002; Dordas *et al.*, 2004). Naměřené aktivity byly striktně závislé na přítomnosti argininu, NADH a dalších NOS kofaktorech. Dalším důkazem přítomnosti NOS-like enzymu v rostlinách bylo jejich vystavení NOS inhibitorům. Tyto inhibitory, převážně analoga argininu, jsou v kompetici ve vazbě na aktivní místo enzymu (Víteček *et al.*, 2012). Na základě těchto měření byly navrženy arginin-dependenční dráhy produkce NO v rostlinách (Obr. 6) (Astier *et al.*, 2018).

Výzkumem Frungilla *et al.* (2014) bylo potvrzeno, že produkce NO koreluje s hladinou argininu. L-Arginin je převáděn na ornitin a močovinu za katalýzy arginasou, přičemž jejich nadměrná exprese vede ke snížení hladiny NO (Obr. 7). Tento jev je doprovázen změnami fenotypu pro aminoxidasu 8 obsahující měď (EC 1.4.3.21, CuAO), enzymu účastnícího se katabolismu polyaminů (PA). Prekursorem pro syntézu polyaminů je právě L-arginin. Několika výzkumy bylo potvrzeno že zvýšení hladiny PA vede ke zvýšené produkci NO (Astier *et al.*, 2018).

2.5.2 S-nitrosothioly a S-nitrosoglutathion

S-nitrosothioly (SNO) mají vliv na změnu aktivit, lokalizace a konformace cílových proteinů (Spadaro *et al.*, 2010; Hess a Stamler, 2012). Molekuly SNO jsou stabilnější než samotný NO, proto plní funkci zásobárny NO (Letierrier *et al.*, 2011). S-nitrosylace proteinů je součástí široké škály fyziologických procesů a procesů spojených se stresem (Fancy *et al.*, 2017; Begara-Morales, 2019), hraje roli ve vývoji, metabolismu hormonů, příjmu nutrientů, fotosyntéze a dalších procesech.

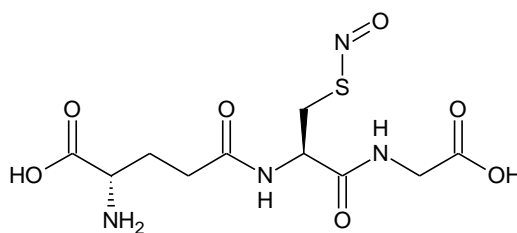
SNO vznikají procesem S-nitrosace. S-nitrosace je proces, kterým je popsána tvorba a přenos nitroso skupiny na thiol za vzniku SNO (Obr. 8) (Hess *et al.*, 2005). Tento proces z důvodu nízké reaktivity NO s neradikálovými molekulami neprobíhá přímo a zahrnuje tvorbu meziproductů ve formě radikálů. Jedním z případů je interakce NO s NO₂ za vzniku N₂O₃, který je již schopen reagovat s thiolovou skupinou a produkovat tak SNO (Obr. 8). S-nitrosothioly jsou schopné přenášet NO transnitrosylačními reakcemi, kdy je NO přenesen na jiný protein a vzniká tak nový S-nitrosothiol (Begara-Morales *et al.*, 2019, Broniowska a Hogg, 2012).



Obr. 8 Dráhy vzniku SNO v rostlinách. (1) tvorba N₂O₃ schopného dále interagovat s proteiny za vzniku protein-SNO (2) nebo GSH (reakce s glutathionem) za vzniku S-nitrosoglutathionů (3). Transnitrosylace (4). Kontrola hladiny SNO denitrosylačními enzymy (TRXh5) (5). Odbourání GSNO (S-nitrosoglutathion) na GSSG a NH₃ (glutathion disulfid) kontrolované GSNOR (S-nitrosoglutathionreduktasa) (6). Tvorba ONOO⁻ (peroxynitrity) (7). Rozklad ONOO⁻ na radikálové částice oxidující thiole proteinů na GS⁻ (glutathionylový radikál) a PS⁻ (thiolátový radikál) (8). S-nitrosace GS⁻ a PS⁻ (9) (převzato z Begara-Morales *et al.*, 2019).

S-nitrosoglutathion (GSNO) (Obr. 9) vzniká reakcí NO s redukováným glutathionem (GSH) S-nitrosylací za přístupu kyslíku (Obr. 6) (Broniowska *et al.*, 2013). Ve formě GSNO je v rostlinných a živočišných buňkách NO uchováván a slouží také k jeho transportu. GSNO je považován za hlavní zásobárnu NO schopnou generovat protein-SNO molekuly (Obr. 8). GSNO se účastní mechanismů odpovědi na biotické a abiotické stresové podmínky. Plní funkci mobilní signální molekuly v odpovědi na různé typy stresů (Corpas *et al.*, 2013) S molekulami obsaženými v buňkách, hlavně proteiny interaguje mechanismy S-nitrosylace, S-transaminace a S-glutathionylace (Hogg, 2002; Martínez-Ruiz a Lamas, 2007).

GSNO je nejčastějším nízkomolekulárním S-nitrosothiolem (LMM SNO). Do skupiny nízkomolekulárních S-nitrosothiolů patří další molekuly jako S-nitrosocystein (CySNO) a S-nitrosocysteinyglycin (GlyCySNO). Reakcí s thiolovou skupinou (-SH) proteinů vznikají vysokomolekulární S-nitrosothioly (HMM SNO) (Corpas *et al.*, 2013; Frungillo *et al.*, 2014).



Obr. 9 Strukturní vzorec S-nitrosoglutathionu (vytvořeno v ChemSketch).

2.5.3 Peroxynitrity

Peroxynitrity (ONOO^-) vznikají reakcí stechiometrického množství NO a superoxidového radikálu (O_2^-) (Hrabárová *et al.*, 2007). Protože superoxidový radikál je nestabilní částice neprocházející přes membrány, vznikají peroxynitrity primárně v místech vzniku O_2^- (Denicola *et al.*, 1998) a jejich množství je limitováno dostupností těchto prekurzorů (Quijano *et al.*, 2005). V rostlinách vzniká malý podíl peroxynitritů i ve fotosyntetizujících chloroplastech. Vysoké hladiny peroxynitritů vznikají v souvislosti s odpovědí na stres vyvolaný různými faktory, kdy je odpovědí zvýšení produkce obou prekurzorů, NO i O_2^- (Delledonne *et al.*, 1998; Vandelle a Delledonne, 2011).

Jsou to látky se silnými oxidačními účinky, které interagují hlavně s thiolovou skupinou cysteinu, ale také s dalšími aminokyselinami (např. tyrosinem) v proteinech, dochází k nitraci těchto proteinů a následně k regulaci funkce daných proteinů např. změna aktivity antioxidantních enzymů, cysteinových proteas... (Pacher *et al.*, 2007). Nitrace proteinů hraje významnou roli v regulačních mechanismech u rostlin. Nitrace tyrosinových residuí je spojována s produkcí antigenních epitopů, změnami v katalytické aktivitě enzymů, organizací cytoskeletu a přenosu signálu (Schopfer *et al.*, 2003). Působením peroxynitritů mohou být nitrovány také lipidy za vzniku biologicky aktivních derivátů nitroalkenů, které mohou plnit funkci signálních molekul (Baker *et al.*, 2004). Působení peroxynitritů může mít ale také nepříznivé účinky, kdy mohou způsobovat poškození proteinů, DNA, abnormality lipidů a tyto změny mohou vést k poškození buněk a až k jejich smrti (Vandelle a Delledonne, 2011).

2.5.4 Fyziologické účinky NO a reaktivních forem dusíku

NO v rostlinách plní hned řadu funkcí. Je považován za klíčovou signální molekulu hrající roli v téměř všech vývojových stádiích rostlin. Účastní se různých buněčných procesů jako je růst a vývoj, respirační metabolismus, senescence, dozrávání,

kvetení, oplození a stárnutí (Corpas *et al.*, 2016). Tyto procesy jsou regulovány buď přímo NO nebo jeho interakcemi s dalšími biologicky aktivními látkami, jako jsou fytohormony (auxiny, ethylen, k. abscisová) a ROS (O_2^- , H_2O_2) (Zao, 2007; Freschi, 2013).

NO a RNS jsou schopny regulovat a modifikovat širokou škálou cílových proteinů a přímo tak ovlivnit jejich strukturu. Se změnou struktury proteinů jsou spojeny změny v jejich aktivitě a funkci. Tímto způsobem je přijímaný signál přenesen přes NO na proteiny, které poté indukují odpověď (Hancock *et al.*, 2011). Proteiny jsou modifikovány prostřednictvím S-nitrosylace (Hess a Stamler, 2012), tyrosinové nitrace (Astier a Lindermayr, 2012) a kovové nitrosylace (Ignarro *et al.*, 1999).

Role NO ve vývoji semen začíná už při oplození, kdy se podílí na regulaci procesu prorůstání pylové láčky (Bright *et al.*, 2009; McInnis *et al.*, 2006). NO je uvolňován po kontaktu pylu s bliznou (Wilson *et al.*, 2009). Podle navrhovaného mechanismu je hydratace pylového zrna signálem, který iniciuje počátek uvolňování NO (Wang *et al.*, 2012). Molekula NO stimuluje klíčení a foto-morfogenezi a interaguje s látkami jako je vápník, H_2O_2 , auxiny a gibereliny a pomocí těchto interakcí ovlivňuje např. strukturu kořene a dalších vyvíjejících se orgánů (Pagnussat *et al.*, 2002; Correa-Aragunde *et al.*, 2004).

NO ve velké míře ovlivňuje metabolismus rostlin a má tak vliv na jejich růst a vývoj. Odpovědi na zvýšení koncentrace NO jsou různé v závislosti na vnějších podmínkách a druhu rostliny (Jin *et al.*, 2009). NO může mít dvojitý efekt v závislosti na jeho koncentraci. V určitém množství může zvyšovat míru metabolismu, růst atd., ale po zvýšení jeho koncentrace nad určitou hranici nemá žádný nebo naopak negativní efekt (Leshem, 1996; Tian a Lei, 2006).

2.5.4.1 Vliv NO na fotosyntetický aparát

Vysoká koncentrace NO a od této molekuly odvozené RNS, konkrétně ONOO⁻, mohou vést k narušení fotosyntetického aparátu. Bylo dokázáno, že NO je schopen reversibilně inhibovat elektronový transport v chloroplastech, ovlivňovat fotosyntézu i fotorespiraci (Takahashi a Yamasaki, 2002). Může také redukovat asimilaci CO_2 (Hill a Bennett, 1970). V určitém množství je schopen zvyšovat míru fotosyntézy, zvyšovat hladinu chlorofylu, míru transpirace a vodivost stomat a má vliv na jejich zavírání (Fan *et al.*, 2007). Byla prokázána inhibice elektronového transportu přes tylakoidní membránu a snížení množství syntézy ATP (Takahashi a Yamasaki, 2002). Produkce NO z dusitanů

v mitochondriích přispívá k přežití za hypoxických stavů tak, že udržuje minimální tvorbu ATP (Gupta *et al.*, 2011a).

2.5.4.2 Role NO a ROS v obranném mechanismu rostlin proti stresu

NO může zprostředkovávat obranu proti stresu (Beligni a Lamattina, 1999; Delledonne, 2005), ale také jej vyvolávat. NO v určitém množství může způsobit poškození membrán a fragmentaci DNA (Pedroso *et al.*, 2000; Yamasaki, 2000), což vede k poškození rostlinných buněk. Efekt NO je závislý na mnoha faktorech, mezi které patří např. koncentrace NO, druh rostlinného pletiva, vývojové stádium rostliny a typ stresu. NO může oxidační a nitrosační stres regulovat, ale také jej způsobovat (Siddiqui *et al.*, 2011).

Působení abiotického stresu (salinita, vysoké či nízké teploty, UV, sucho, vystavení ozonu) je charakteristické nadprodukcí ROS (Mittler, 2002). NO je lipofilní molekula schopná reagovat přímo s membránami nebo přímo s ROS, jako je O_2 či O_2^- (Wink a Mitchell, 1998). Vazba vysoce reaktivního NO na proteiny přes thiolové skupiny indukuje zvrtné konformační změny a mění tak jejich strukturu a funkci. Aktivita antioxidantních enzymů může být regulována vazbou NO a modifikacemi kovových (Ford *et al.*, 2005; Ford, 2010) či thiolových (Hess a Stamler, 2012) skupin a tyrosinových residuí (Schopfer *et al.*, 2003).

NO působí jako ligand železa v enzymech obsahujících hem a tyto enzymy jsou následně inhibovány nebo aktivovány (Brown, 1995). Díky podobným vlastnostem NO a O_2 každý enzym reagující s kyslíkem může být potenciálním terčem NO (Cooper, 1999). Díky tomu jsou enzymy schopné přecházet mezi různými oxidačními stavy a tím dochází k regulaci jejich aktivity (Drapier, 1997).

Díky metodě biotin-switch (Jaffrey a Snyder, 2001), která je založena na výměně NO skupiny na SNO za biotin, byly identifikovány stovky protein-SNO molekul produkovaných za fyziologických a stresových podmínek. Většina z těchto proteinů je zapojena do redoxních dějů, jako je produkce a odbourávání ROS. Z tohoto důvodu se předpokládá role SNO v udržování redoxní homeostázy (Begara-Morales *et al.*, 2016). SNO mohou mít rozdílné efekty na fyziologické procesy v různých rostlinných druzích v závislosti na specifických podmínkách, kterým jsou tyto rostliny vystaveny (Begara-Morales *et al.*, 2019).

Během stresu způsobeném nedostatkem vody a stresu způsobeném teplotou bylo pozorováno zvýšení produkce NO. NO je zodpovědný také za odpovědi na stres vyvolaný

kadmiem, arsenem a dalšími těžkými kovy, které způsobují oxidační poškození. Tyto stresy vyvolávají zvýšení hladiny NO, aktivity GSNOR, míry proteinové nitrace a pokles hladiny glutathionu a GSNO (Letierrier *et al.*, 2012). Vznikající NO plní funkci signální molekuly a je schopen zmírnit oxidační stres vyvolaný arsenem a dalšími těžkými kovy zvýšením antioxidační ochrany (Corpas *et al.*, 2016).

Dalším stresovým faktorem je salinita, která je také spojována s oxidačním stresem. Stejně jako u výše zmiňovaných stresů těžkými kovy, je stres vyvolaný salinitou spojován se spuštěním NO metabolismu, zvýšením hladiny NO a S-nitrosylovaných a nitrovaných proteinů (Valderrama *et al.*, 2007). NO a RNS jsou zapojeny v ustavení redoxní rovnováhy a mohou v rostlině indukovat určitou antioxidační rezistenci spojenou se zvyšováním aktivity antioxidačních systémů zahrnujících katalasu (EC 1.11.1.6), superoxiddismutasu (EC 1.15.1.1, SOD), askorbátperoxidasu (EC 1.11.1.11, APX) a glutathionreduktasu (EC 1.8.1.7, GR). Je předpokladem že NO plní regulační funkci antioxidačních enzymů na proteinové a genové úrovni (Tanou *et al.*, 2009).

2.5.5 Role NO a RNS ve vývoji semen

NO a RNS, jako jsou dusičnany, dusitany, hydroxylaminy, azidy a nitroprussid sodný (SNP) jsou spojovány s prolomením dormance semen a procesem klíčení (Bethke *et al.*, 2006). Molekuly fungující jako donory NO (např. KNO₃, SNP) vykazují pozitivní vliv na prolomení dormance a na průběh procesu klíčení. Nejčastěji využívaným donorem NO byl ve výzkumech použit nitroprussid sodný (SNP). Jeho vliv na prolomení dormance a klíčení byl pozorován např. u semen salátu (Beligni a Lamattina, 2000), teplo-sezonních trav (Sarath *et al.*, 2006), *Arabidopsis* a ječmene (Bethke *et al.*, 2004b). To je doprovázeno zvyšováním koncentrace proteinů, aktivity NR, SOD a katalasy (Lara *et al.*, 2014), snižováním koncentrace ABA (Matakiadis *et al.*, 2009) a zvyšováním koncentrace giberelinů (GA) (Vidal *et al.*, 2018). Snižování koncentrace ABA je spojeno s aktivačním účinkem NO na katabolické enzymy ABA (Bethke *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2009). NO má aktivační vliv také na endo a exo-β-D-glukanasy (EC 3.2.1.74) podporující uvolňování buněčné stěny a její roztažitelnost (Terasaki *et al.*, 2001).

Rychlá akumulace NO ve vrstvách endospermu v prvním stádiu imbibice je nutná pro katabolismus ABA (Liu *et al.*, 2009) a prolomení dormance semen. Endosperm je považován za hlavní pletivo determinující dormanci semen. Je pletivem s nejvyšší mírou syntézy NO (Liu *et al.*, 2009). RNS mohou regulovat hladiny ABA deaktivací ABA receptoru PYR/PYL/RCAR pomocí nitrace tyrosinových residuí (Castillo *et al.*, 2015)

a nitrosylace thiolových skupin proteinů (Wang *et al.*, 2015). To má za následek aktivaci proteinové fosfatasy PPC2, která inaktivuje kinasu SnRK2. SnRK2 je kinasa umožňující činnost leucinového zipového transkripčního faktoru (ABI5). ABI5 hraje důležitou roli v transkripční kontrole dormance a pozastavení jeho aktivity má vliv na proces prolomení dormance (Skubacz *et al.*, 2016; Signorelli a Considine, 2018).

Dormance semen může být prolomena působením řady látek obsahujících dusík (dusičnany, dusitany, kyanidy, hydroxylaminy, azidy, SNP). Z tohoto poznatku je vyvozována účast NO na tomto procesu (Bethke *et al.*, 2006). Tento předpoklad je podpořen také zjištěním, že vystavení přímo plynnému NO působí prolomení dormance u semen *Arabidopsis*. Prolomení dormance se zdá být závislé na světle, kdy SNP (NO donor) způsobilo prolomení dormance za přístupu světla, ale ve tmě tento efekt neměl. SNP na světle podléhá fotolýze a uvolňuje NO. Jedním z navrhovaných mechanismů působení SNP je uvolnění CN, které je podpořeno také působením donorů CN (Fe_2CN , Fe_3CN) na dormanci. Experimenty založené na aplikaci NO scavengeru c-PTIO potvrdily, že proces prolomení dormance je závislý na přítomnosti NO (Bethke *et al.*, 2006).

2.6 Polyaminy

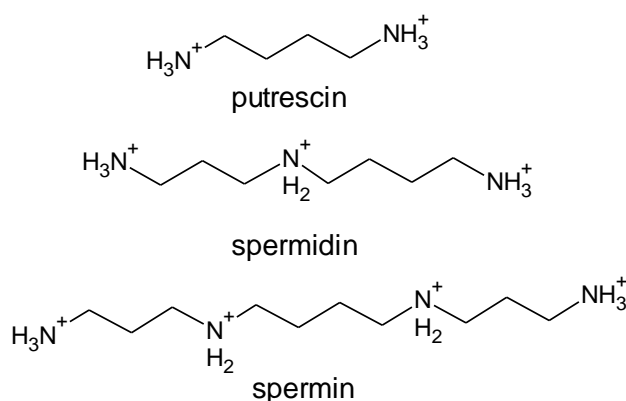
Polyaminy (PA) jsou makromolekulární alifatické látky pozitivního náboje obsahující dusík (Kusano *et al.*, 2008) účastníci se regulace řady fyziologických procesů jako je vývoj rostliny, embryogeneze, organogeneze, senescence, vývoj a dozrávání plodů (Xu *et al.*, 2014; Mustafavi *et al.*, 2018). PA hrají roli v mechanismech odpovědi na biotické a abiotické stresové podmínky (Gill a Tuteja, 2010). Hladina PA je v rostlinných buňkách regulována anabolickými a katabolickými procesy (Matilla *et al.*, 2002). Mezi hlavní rostlinné polyaminy patří spermin, spermidin a putrescin (Obr. 10) (Yang *et al.*, 2016).

Volné polyaminy díky jejich pozitivnímu náboji podléhají elektrostatickým interakcím se záporně nabitými molekulami a mohou interagovat s biomakromolekulami, jako jsou proteiny, membránové fosfolipidy, nukleové kyseliny, lignin atd. (Igarashi a Kashiwagi, 2015). Tyto interakce jsou spojovány s vlivem PA na regulaci enzymové aktivity, DNA replikaci, genovou transkripci, buněčné dělení a membránovou stabilitu (Chen *et al.*, 2019).

Prekurzorem pro syntézu putrescinu je arginin a ornitin (Winter *et al.*, 2015), které jsou dekarboxylovány dekarboxylasami. Spermidin vzniká z putrescinu adicí aminopropylových skupin v reakci katalyzované spermidinsyntasou (Obr. 11)

(EC 2.5.1.16). Adicí aminopropylových skupin za katalýzy sperminsintasou (EC 2.5.1.22) na spermidin vzniká spermin (Obr. 11). Aminopropylové skupiny jsou tvořeny dekarboxylací S-adenosylmethioninu (SAM) (Slocum *et al.*, 1984). SAM je substrátem pro kyselinu 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou (ACC), která je přímým prekursorem pro tvorbu ethylenu (Gniazdowska *et al.*, 2010). V několika studiích byla dokázána NO-dependentní stimulace tvorby ethylenu v procesu prolomení dormance (Gniazdowska *et al.*, 2010).

V procesu katabolismu polyaminů jsou zahrnuty aminooxidasy obsahující měď (EC 1.4.3.6, CAO) a polyaminoxidasy obsahující FAD (EC 1.5.3.11, PAO) (Bouchereau *et al.*, 1999) (Obr. 11). Diaminy a polyaminy v rostlinách jsou oxidovány na odpovídající aminoaldehydy, H₂O₂ a NH₃. Konkrétním příkladem je oxidativní odbourání sperminu a spermidinu za účasti PAO za vzniku 4-aminobutyraldehydu (ABAL) a 4-(3-aminopropylamino)butyraldehydu za současného vzniku 1,3-diaminopropanu (DAP) a H₂O₂ (Šebela *et al.*, 2000) (Obr. 11). DAP je poté metabolizován na 3-aminopropylaldehyd (APAL) (Duhazé *et al.*, 2002). Takto vzniklé aminoaldehydy jsou poté metabolizovány za účasti NAD-dependentních aminoaldehyddehydrogenas (EC 1.2.1.19, AMADH) (Šebela *et al.*, 2000).



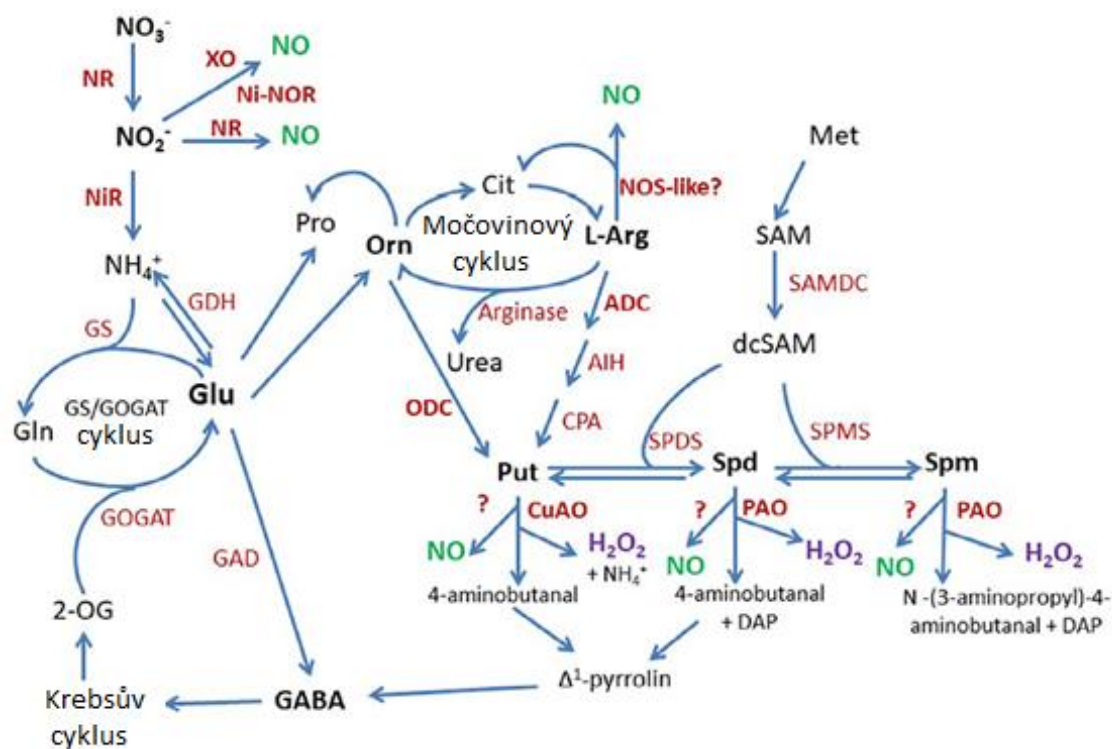
Obr. 10 Strukturní vzorec putrescinu, spermidinu a sperminu (vytvoreno v ChemSketch).

PA hrají roli v procesu vývoje a klíčení semen. Hladina PA se v průběhu vývoje semene postupně zvyšuje. Jejich zapojení v procesu klíčení bylo potvrzeno zjištěním, že exogenní PA urychlují proces klíčení (Khan *et al.*, 2012), naopak při inhibici biosyntézy PA bylo pozorováno zpomalení klíčení (Villanueva a Huang, 1993).

2.6.1 Komunikace mezi polyaminy a oxidem dusnatým

Díky podobným funkcím NO a PA v průběhu vývoje rostlin a odpovědi na stresy je předpokládáno, že NO by mohl být potenciálním mediátorem působícím na PA (Tun *et al.*, 2006). Katabolismus PA může vézt ke vzniku NO (Obr. 11). Polyaminy mají prokazatelný regulační vliv na hladiny karbonylovaných, nitrovaných a S-nitrosylovaných proteinů v případě působení stresových faktorů (Tanou *et al.*, 2014) a v poslední době je hodně diskutována komunikace mezi PA a NO v případě procesů jako je prolomení dormance a klíčení. Bylo dokázáno, že putrescin stimuluje klíčení semen jabloně doprovázeného zvýšeným uvolňováním NO z embryonální osy a kořínků (Krasuska *et al.*, 2014).

Možným propojením mezi PA a NO je metabolismus argininu, který je spojený se syntézou obou látek. Arginin je syntetizován z ornitinu v močovinovém cyklu a ornitin tedy ovlivňuje syntézu PA a pravděpodobně i produkci NO z argininu (Obr. 11) (Gao *et al.*, 2009). Arginin je působením arginasy (EC 3.5.3.1) metabolizován na močovinu a ornitin (Obr. 11). Močovina je významným zdrojem organického dusíku. Vysoká aktivita arginasy byla pozorována během klíčení (Yu a Cho, 1997). Ve výzkumu Krasuska *et al.* (2017) byl pozorován vliv putrescinu a spermidinu na aktivitu NOS-like enzymu, která se zvyšovala. To ukazuje na vliv PA na syntézu NO. Zvýšená hladina PA vedla k prolomení dormance a klíčení embrya.



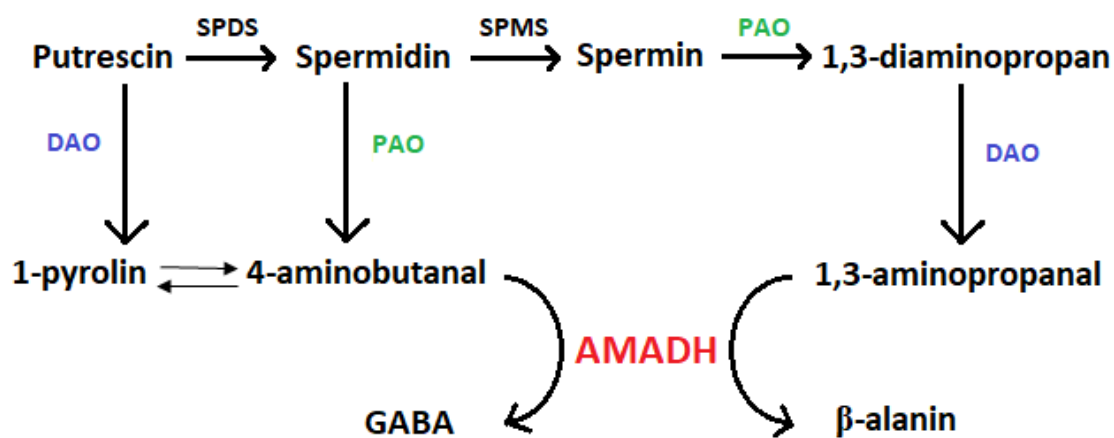
Obr. 11 Schéma metabolických drah oxidu dusnatého (NO) a polyaminů (PA) a jejich propojení. ADC – arginindekarboxylasa, AIH – agmatiniminohydrolasa, CPA – N-karbamoyl-putrescinamidohydrolasa, CuAO – měď obsahující aminooxidasa, DAP – 1,3-diaminopropan, dcSAM – dekarboxylovaný S-adenosylmethionin, GABA – kyselina γ -aminomáselná, GAD – glutamátdekarboxylasa, GDH – glutamátdehydrogenasa, GOGAT – glutamin-2-oxoglutarátaminotransferasa, GS – glutaminsyntetasa, NiR – nitritreduktasa, NOS-like – NOSyntasa-like enzym, NR – nitrátreduktasa, ODC – ornitindekarboxylasa, PAO – polyaminoxidasa, SAM – S-adenosylmethionin, SAMDC – S-adenosylmethionindekarboxylasa, SPDS – spermidinsyntasa, SPMS – sperminsyntasa (převzato z Recalde *et al.*, 2020).

2.7 Charakteristika studovaných enzymů

2.7.1 Aminoaldehyddehydrogenasa

Aminoaldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.19, AMADH) je rostlinný enzym patřící do rodiny aldehyddehydrogenas 9 (EC 1.2.1.3., ALDH) (Perozich *et al.*, 1999). Aldehyddehydrogenasy jsou enzymy katalyzující NAD^+ -dependentní oxidaci reaktivních aldehydů na odpovídající karboxylové kyseliny (Vasiliou *et al.*, 1999; Šebela *et al.*, 2000). AMADH spolu s aminooxidasami katalyzují NAD -dependentní oxidaci ω -aminoaldehydů odvozených od polyaminů (PA) na odpovídající ω -aminokyseliny (Obr. 12) (Tylichová *et al.*, 2010). V rostlinách katalyzují poslední krok katabolismu PA a předpokládá se, že hrají roli v syntéze GABA z 4-aminobutyraldehydu (ABAL) (Obr. 12). GABA je v rostlinách akumulována za působení řady okolních stresorů a je

brána jako hlavní spouštěč řetězců fyziologických odpovědí na stres. (Tylichová *et al.*, 2010; Petřivalský *et al.*, 2007).



Obr. 12 Schéma metabolismu PA. SPDS – spermidinnsyntasa, SPMS – sperminsyntasa, PAO – polyaminoxidasa, DAO – diaminoxidasa. (vytvořeno podle Stiti *et al.*, 2011).

2.7.2 Diaminooxidasa

Diaminooxidasa (EC 1.4.3.22, DAO) se účastní metabolismu PA (Obr. 13) a reguluje tak jejich koncentraci. Jedná se o aminoxidasu obsahující měď (Choudhary a Singh, 1997). Jednou z důležitých rolí, kterou plní, je katalýza přeměny putrescinu na GABA (Obr. 11, 12) (Bhatnagar *et al.*, 2001). GABA je důležitý metabolit hrající roli v řadě fyziologických procesů. Hladiny PA a GABA se zvyšují po vystavení rostliny okolním stresovým podmínkám a předpokládá se jejich role při adaptaci rostlin na tyto podmínky (Yang *et al.*, 2011).

V průběhu klíčení se hladina DAO znatelně zvyšuje a je vyšší u semen klíčících za nepřístupu světla. Zvyšování aktivity DAO v průběhu klíčení doprovází zvyšování hladiny GABA. (Yang *et al.*, 2011). Bylo pozorováno, že po transportu O₂ do děloh skrz embryonální axis dochází ke zvýšení aktivity DAO. Nejvyšší aktivita DAO je v pozdějších fázích klíčení v průběhu elongace, diferenciaci a v zónách hypokotylu (Matilla *et al.*, 2002).

2.7.3 S-nitrosoglutathionreduktasa

S-nitrosoglutathionreduktasa (EC 1.1.1.1., GSNOR) je klíčový enzym, který se podílí na regulaci hladiny S-nitrosoglutathionů (GSNO) a nepřímo také proteinových S-nitrosothiolů. Katabolizuje nezvratnou NADH-dependentní přeměnu GSNO na oxidovaný glutathion disulfid (GSSG) a NH₃ za současného buněčného katabolismu NO (Liu *et al.*, 2001). Molekula GSNO je nejdříve redukována na nestabilní intermediát N-hydroxysulfínamid (GSNHOH) za účasti kosubstrátu NADH. Až v dalším reakčním kroku dochází ke vzniku finálního produktu GSSG a uvolnění hydroxylaminu. Tento proces je závislý na lokální koncentraci GSH a také na dostupnosti NADH (Staab *et al.*, 2008).

GSNOR je zapojen v regulaci hladiny reaktivních forem dusíku a s tím spojeného redoxního stavu buněk, udržování homeostázy nitrobuněčné hladiny NO a v kontrole trans-nitrosace mezi S-nitrosylovanými proteiny a GSNO (Fruntillo *et al.*, 2014). V procesu trans-nitrosace dochází k přenosu nitroso skupiny mezi thiolovými skupinami na proteinech a nízkomolekulárními peptidy. Po redukci GSNO pomocí GSNOR již produkt tohoto procesu není schopen přenášet nitroso skupiny na další proteiny (Jahnová *et al.*, 2019).

GSNOR hraje roli také ve vývoji rostlin, kde se účastní signalizačních drah závislých i nezávislých na NO. S-nitrosothioly jsou schopné transportovat signál na velké

vzdálenosti a procesy S-nitrosace a denitrosace jsou regulovány pomocí GSNOR (Jahnová *et al.*, 2019). Aktivita GSNOR ovlivňuje např. větvení kořenů, růst hypokotylu, výnos semen, čas kvetení, snížení rostliny a ztrátu apikální dominance (Feechan *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2012). Svůj význam má také v obranných mechanismech rostlin proti biotickým a abiotickým stresovým podmínkám (Jahnová *et al.*, 2019).

2.8 Charakteristika studovaného rostlinného materiálu

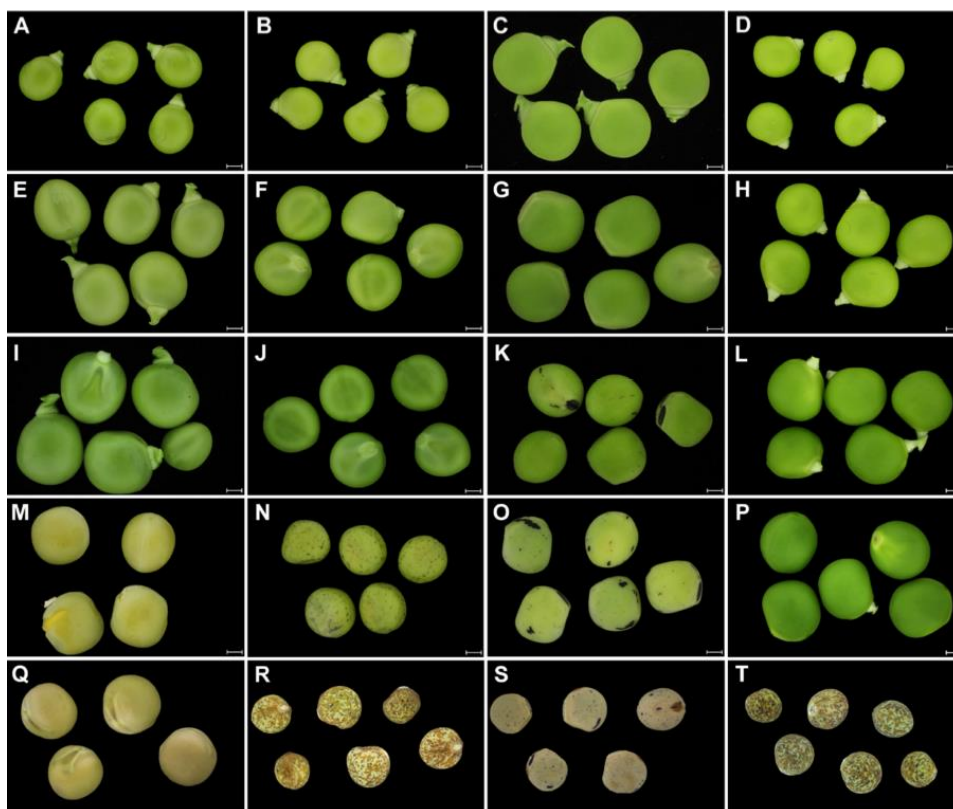
Studovaným rostlinným materiálem je osemení semen hrachu (*Pisum sativum* subsp. *sativum* L. a *Pisum sativum* subsp. *elatius* (M. Bieb.) Asch. et Graebn.). Studovány byly dva genotypy kulturních, nedormantních (Cameor a JI92) a dvou planých, dormantních (JI64, JI1794) hrachů ve 4 vývojových stádiích (Tab. 2; Obr. 13).

Vývoj zemědělství vedl k domestikaci planých druhů rostlin na kulturní plodiny. Součástí tohoto procesu jsou rychlé změny na morfologické a genetické úrovni způsobené jak přírodní, tak lidskou selekcí (Abbo *et al.*, 2012, 2014). Došlo k adaptaci planých druhů na kultivaci a sklizeň těchto plodin člověkem. Požadovanými vlastnostmi plodin je úspěšné rychlé klíčení semen, inhibice dormance a důležitá je také dostatečná velikost semen. Načasování klíčení je jak v přírodních, tak v agrikulturních ekosystémech jeden z klíčových kroků pro produkci plodin. U planých druhů je klíčení blokováno procesem dormance, která je prolomena pouze za určitých podmínek nebo po narušení osemení. U kulturních plodin je žádoucí, aby klíčily v co nejkratším časovém období, ale naopak příliš krátká dormance může způsobovat zhoršení kvality semen (Smýkal *et al.*, 2014).

Rozdíly mezi genotypy Cameor, JI92 a JI64 byly stanovovány ve výzkumu Hradilové *et al.* (2017) pomocí transkriptomických, metabolomických a anatomických analýz.

Tab. 2 Studované genotypy hrachu setého.

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



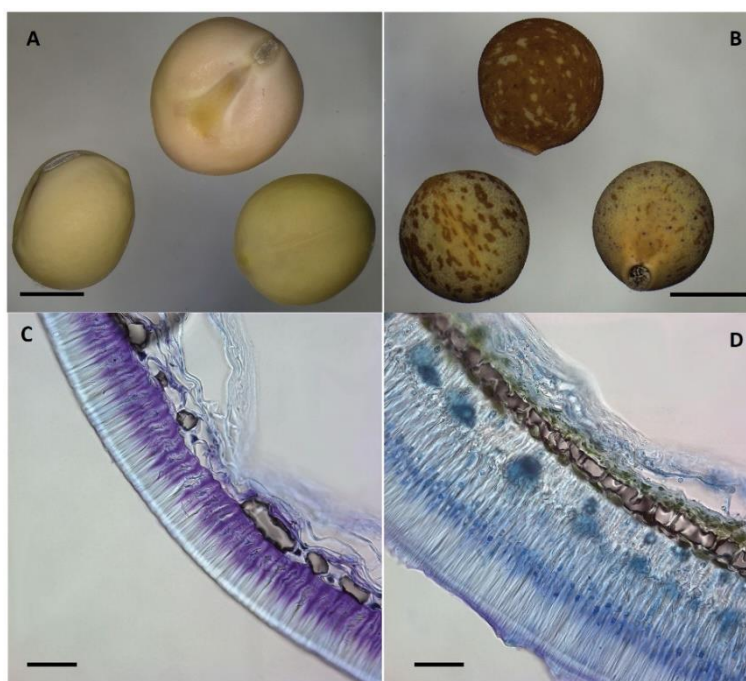
Obr. 13 Fotografie semen kulturních, nedormantních genotypů hrachu: Cameor (A, E, I, M, Q) a JI92 (B, F, J, N, R) a planých, dormantních genotypů hrachu: JI64 (C, G, K, O, S) a JI1794 (D, H, L, P, T) v 5 vývojových stádiích: 13 DAA (A – D), 21 DAA (E – H), 30 DAA (M – P), suché semena (Q – T), DAA – „day after anthesis“ (převzato ze Zablatzká *et al.*, 2021).

Plané, dormantní genotypy (JI64, JI1794) vykazují velkou míru dormance závislé na tloušťce osemení. Semena dormantního genotypu JI64 a nedormantních genotypů JI92 a Cameor se liší v délce palisádových buněk, tloušťce a struktuře osemení (Obr. 14C, D). Dormantní genotyp JI64 má znatelně širší vrstvu osemení (Obr. 14D), což je spojováno s větší mírou nepropustnosti vody osemením dormantních genotypů hrachu (Miao *et al.*, 2001). Subkutikulární makrosklereidy a vosková vrstva mohou vytvořit silnou bariéru proti příjmu vody. Zatímco light-line nebrání vstupu vody u nedormantních semen, u dormantních tvoří light-line efektivní bariéru proti imbibici vody. Klíčivost planých neporušených semen dosahuje v daném roce pouze 2,6-7 %. U semen kulturních genotypů (Cameor, JI92) dochází k imbibici vody snadno a k jejich klíčení dochází do 24 hodin (Hradilová *et al.*, 2017; Jánská *et al.*, 2019).

Další rozdíly mezi studovanými genotypy jsou v pigmentaci (Obr. 14A, B) a textuře jednotlivých vrstev osemení (Obr. 13). V několika výzkumech bylo pozorováno, že pigmentace osemení koreluje s mírou imbibice vody semeny různých druhů luštěnin. Hnědé zbarvení osemení během dozrávání je spojováno s nepropustností semeno pro

vodu a to i v případě hrachu (Marbach a Mayer, 1974; Werker *et al.*, 1979). Osemení Cameoru není pigmentované (Obr. 14A). Osemení genotypu JI64 má jako jediný ze studovaných nerovný povrch (Obr. 14D). Integrita osemení je v jednotlivých genotypech porušena různě velkými štěrbinami. U nedormantních genotypů Cameor a JI92 jsou pozorovány velké štěrbiny v osemení v oblasti pupku (Hradilová *et al.*, 2017).

Semena dormantních a nedormantních genotypů se liší také v jejich chemickém složení osemení. Osemení dormantních genotypů například obsahuje velké množství hydroxylovaných mastných kyselin (Hradilová *et al.*, 2017). Hydroxylované mastné kyseliny jsou důležitým prvkem majícím vliv na míru dormance. Voskové částice patří mezi nejdůležitější faktory rozlišující dormantní semena od nedormantních. Osemení nedormantních semen obsahuje více pektinů méně celulosy a taninů, což vede k jeho větší elasticitě než u dormantních genotypů (Jánská *et al.*, 2019).



Obr. 14 Rozdíly v pigmentaci, povrchu a tloušťce osemení kulturního, nedormantního genotypu a planého, dormantního genotypu hrachu. A – semeno genotypu Cameor, B – semeno genotypu JI64, C – struktura osemení genotypu Cameor, D – struktura osemení JI64 (převzato ze Smýkal *et al.*, 2014).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Z důvodu uzavření laboratoří v rámci pandemické situace nebylo možné provést plánované experimenty. V krátkém časovém období, kdy nám byla dovolena přítomnost v laboratoři, jsem stihla pouze cvičně splnit některé z úkonů, které předchází stanovení plánovaných parametrů. Tedy vytvořit kalibrační křivku pro stanovení koncentrace proteinů, vyzkoušet si extrakci osemení genotypu CAMEOR a JI64 pro měření aktivity AMADH a koncentrace proteinů a cvičně stanovit aktivitu AMADH na multifunkčním spektrofotometru Reader.

3.1 Provedené experimenty – materiál a metody

3.1.1 Použité chemikálie

- Hydrogenfosforečnan draselný - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Dihydrogen fosforečnan amonný - *Lach-Ner (Česká republika)*
- EDTA-Na⁺ - *Honeywell Fluka (Rumunsko)*
- Polyvinylpyrrolidon (PVPP) - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Pefabloc - *Honeywell Fluka (Rumunsko)*
- Tris - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- NAD⁺ - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Kyselina chlorovodíková - *Lach-Ner (Česká republika)*
- 1-amino-3,3-diethoxypropan (APAL) - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Coomassie Blue 250 - *Sigma-Aldrich (Německo)*
- Methanol - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Kyselina fosforečná - *Lach-Ner (Česká republika)*
- Hovězí sérový albumin - *Sigma-Aldrich (Německo)*

3.1.2 Použité přístroje

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

3.1.3 Rostlinný materiál

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

3.1.4 Metody

3.1.4.1 Extrakce aminoaldehyddehydrogenasy z osemení hrachu

setého

AMADH byla extrahována z osemení genotypu Cameor a JI64. Práce s rostlinným materiálem probíhala za chlazení. Osemení byla rozetřena v třecí misce a extrakce byla provedena v poměru 1:2 (w:v) v extrakčním 0,1 mmol.l⁻¹ K-fosfátovém pufru o pH 7, který obsahoval 2 mmol.l⁻¹ EDTA-Na⁺, 1% (w/v) polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) a 0,5 mmol.l⁻¹ pefabloc. Rozetřený rostlinný materiál s extrakčním pufrem byl přesunut do mikrozkuřavky a centrifugován po dobu 15 min při 16000 g a 4 °C. Byl odebrán supernatant, který byl dále použit k měření aktivity AMADH a ke stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové.

3.1.4.2 Měření aktivity aminoaldehyddehydrogenasy

Aktivita AMADH byla stanovována na principu přeměny substrátu 3-aminopropionylaldehydu (APAL). AMADH katalyzuje přeměnu APAL na β-alanin za současné redukce NAD⁺ na NADH. Vzniklé NADH je měřeno pomocí Warburgova

optického testu měřením nárůstu absorpance při vlnové délce 340 nm ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Šebela *et al.*, 2000).

Substrát 3-aminopropionalaldehyd (APAL) byl připraven čerstvým smícháním 3 μl 97% APAL v 997 μl 0,2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl a byl 5 minut povařen. Do jamek na 96 jamkové mikrodestičce byly napipetovány roztoky podle Tab. 3. Byl připraven protokol pro měření. Bylo nastaveno předehřátí readeru na 30 °C a protřepávání jamek před každým měřením. Byla měřena absorpance v časových intervalech po 30 s při vlnové délce 340 nm a 30 °C po dobu 11 minut. Dále byla změřena absorpance při vlnových délkách 900 a 977 nm pro výpočet délky optické dráhy.

Z naměřených absorpancí byla stanovena aktivita podle vzorce:

$$a = \frac{\Delta A \cdot V}{\epsilon \cdot t \cdot l}$$

kdy ΔA představuje změnu absorpance v daném časovém úseku (v úseku s lineárním nárůstem absorpance odečteme $A_x - A_0$), V [l] je objem reakčního roztoku v jamce, $\epsilon = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ je extinkční koeficient, t [s] udává čas měření a l [cm] je optická dráha vypočítaná podle vzorce:

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

Tab. 3 Pipetovací objemy jednotlivých složek reakční směsi pro měření aktivity AMADH.

Vzorky	Blank
165 μl 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris pH 9	165 μl 150 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris pH 9
10 μl 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD ⁺	10 μl 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NAD ⁺
15 μl vzorku	15 μl vzorku
10 μl 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ APAL	10 μl 0,2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl

3.1.4.3 Stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou

Stanovení celkových proteinů Bradfordovou metodou je založeno na tvorbě komplexu mezi proteiny a triarylmetanovým barvivem Coomassie Brilliant Blue G250 v kyselém prostředí. Po interakci proteinů s barvivem dochází k posunu absorpčního maxima z 465 na 595 nm (Bradford, 1976).

Pracovní roztok byl připraven naředěním zásobního Bradfordova činidla destilovanou vodou v poměru 1:4. Pro kalibraci byla ze zásobního roztoku hovězího sérového albuminu (10 mg.ml^{-1}) připravena koncentrační řada roztoků dle Tab. 4.

Do jamky na destičce bylo napipetováno 45 μl destilované vody, 5 μl standardu nebo vzorku, 200 μl pracovního Bradfordova činidla a směs byla promíchána a inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Poté byla měřena absorbance při 595 nm.

Vyhodnocení je založeno na vynesení závislosti absorbance (osa y) na koncentraci (osa x) a takto získané kalibrační funkce, pomocí které je poté možno zpětně dopočítat koncentraci vzorku z naměřených hodnot absorbancí.

Tab. 4 Pipetovací objemy roztoků pro přípravu koncentrační řady, zásobní roztok BSA ($c = 10 \text{ mg.ml}^{-1}$).

Koncentrace BSA [mg.ml^{-1}]	Objem zásobního roztoku BSA [μl]	Objem vody [μl]
0,2	20	980
0,4	40	960
0,6	60	940
0,8	80	920
1	100	900
1,2	120	880
1,4	140	860

3.2 Plánované experimenty – metody

3.2.1 Měření aktivity diaminooxidasy

Pro extrakci DAO z rostlinného materiálu je používán extrakční 0,1 mmol.l⁻¹ K-fosfátový pufr o pH 7 obsahující 2 mmol.l⁻¹ EDTA-Na⁺, 1% (w/v) polyvinylpolypyrrolidon (PVPP), 0,5 mmol.l⁻¹ pefabloc a 2mmol.l⁻¹ dithiotreitol (DTT).

Principem plánované metody pro stanovení DAO je účast DAO na přeměně putrescinu na APAL a H₂O₂. Vzniklý H₂O₂ oxiduje guajakol za katalýzy peroxidasou (EC 1.11.1.7.) na žlutohnědý produkt 3,3'-dimethoxyfenyl-4,4'-bifenoquinon, který je spektrofotometricky detekován jako nárůst absorbance při vlnové délce 436 nm ($\epsilon = 4500 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (Angelini *et al.*, 1990).

3.2.2 Měření aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy

Pro extrakci GSNOR je používán extrakční 50 mmol.l⁻¹ Tris pufr o pH 7,5 obsahující 0,2% (v/v) Triton X-100, 2 mmol.l⁻¹ DTT a 1 mmol.l⁻¹ PMSF.

Principem měření aktivity GSNOR je oxidace NADH a měření změny absorbance při 340 nm na mikrodestičkovém spektrofotometrickém readeru (Tichá *et al.*, 2018).

3.2.3 Stanovení koncentrace S-nitrosothiolů

3.2.3.1 Savillova metoda

Principem Savillovy metody stanovení RSNO je detekce a kvantifikace reaktivních NO⁺ uvolněných rozkladem RSNO v přítomnosti rtuťnatých solí. Vzniká dusitan, který dále reaguje s Griessovým činidlem za tvorby diazoniové soli, která kopuluje s N-(naftylethylen)diamidem (NED). Vzniká azobarvivo, které je detekováno spektrofotometricky při 540 nm (Saville, 1958).

3.2.3.2 NO analyzátor

Detekce NO je založena na rychlé reakci NO s ozonem za vzniku excitované molekuly NO₂^{*}. Při návratu elektronu z excitovaného stavu zpět do základního stavu dochází k emisi fotonu, který je detekován jako chemiluminiscence. Detekované světlo je amplifikováno fotonásobičem (PTM) a generováno jako elektrický signál (Gupta *et al.*, 2005; Planchet *et al.*, 2005).

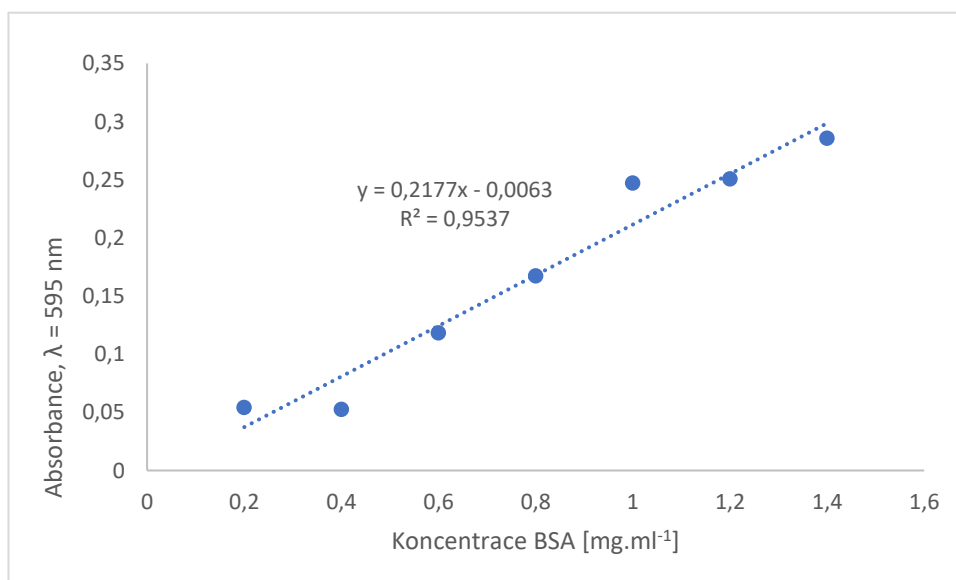
4 Výsledky a diskuse

Reaktivní formy dusíku a polyaminy jsou velmi důležitými látkami, které se účastní mnoha procesů spojených s vývojem rostlin, reakcí na stres, udržováním redoxní rovnováhy a dalšími procesy v průběhu života rostlin. Proto je velmi důležité se těmito látkami zabývat a zkoumat jejich zapojení v konkrétních rostlinných procesech. V této bakalářské práci se zabývám rolí těchto látek v procesu vývoje semen dormantních a nedormantních genotypů hrachu setého (*Pisum sativum L.*). Porovnáním koncentrací studovaných metabolitů, jako jsou celkové proteiny a polyaminy, hladina RSNO, a aktivit vybraných enzymů, které se účastní metabolismu polyaminů a dalších dusíkatých látek, bychom mohli dostat komplexnější obraz o tom, do jaké míry a v kterém vývojovém stádiu se zmiňované PA a NO účastní daných procesů a také v jaké míře se účastní procesu dormance u studovaných semen hrachu setého.

V mnoha studiích byl popsán vliv RNS a PA v procesech dormance, prolomení dormance a klíčení. Např. ve výzkumu Bethke *et al.* (2006) byl potvrzen stimulační vliv NO, aplikovaného ve formě NO donorů, na proces prolomení dormance a klíčení. Po aplikaci NO-vychytávače 2-4-carboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxidu (c-PTIO) byla dormance semen naopak podpořena. Z toho vyplývá, že NO opravdu hraje roli v procesech prolomení dormance a klíčení. Podobné výsledky byly pozorovány i ve výzkumu Vidal *et al.* (2018) a v této studii byl zaznamenán také vliv NO donorů na zvyšování koncentrace ABA a snižování koncentrace GA. Dalším pozorovaným efektem NO donorů bylo snížení senzitivity semen k ABA. To bylo podpořeno zjištěním ve výzkumu Castillo *et al.* (2015), že RNS procesem tyrosinové nitrace deaktivují ABA receptory. Hladiny ABA jsou pomocí RNS regulovány také na transkripční a post-transkripční úrovni (Xiong a Zhu, 2003).

Polyaminy jsou díky jejich zapojení v procesech růstu, vývoje a regulací odpovědí na stres rostlinami v poslední době také častým předmětem výzkumů. Je diskutován jejich vztah s NO a RNS, kdy se tyto látky účastní podobných procesů a je tedy předpokládána jejich vzájemná komunikace. Možným propojením mezi PA a NO je jejich společný prekurzor L-arginin. Závěry studie Yamasaki a Cohen (2006), týkající se indukce produkce NO polyaminy byly potvrzeny i ve výzkumu Krasuska *et al.* (2014). Ve studii Krasuska *et al.* (2017) bylo pozorováno zvýšení aktivity NOS-like syntasy, což poukazuje vzhledem ke společnému prekursoru biosyntézy na možný vzájemný vztah PA a NO. PA se podobně jako NO a RNS se také účastní procesu dormance a klíčení.

Experimentální část této bakalářské práce měla spočívat v měření aktivit enzymů zapojených v katabolismu PA a RNS, konkrétně DAO, AMADH a GSNOR a dále měly být stanoveny koncentrace celkových proteinů a S-nitrosothiolů v osemeni 4 genotypů hrachu setého (Cameor, JI92, JI64, JI1794) ve 4 vývojových stádiích. Cameor a JI92 představují kulturní nedormantní genotypy hrachu a JI64 a JI1794 plané dormantní genotypy. Rostlinný materiál pro provedení experimentů byl vypěstován a dodán Mgr. Janou Balarynovou, Ph.D (Katedra botaniky). V experimentální části měly být porovnány aktivity zmiňovaných enzymů ve vztahu k vývoji semen a dormanci hrachu setého. Vzhledem k omezeným možnostem práce v laboratoři bylo provedeno pouze stanovení kalibrační funkce (Obr. 15) pro měření celkových proteinů Bradfordovou metodou. Dále byla provedena extrakce osemeni semen hrachu setého genotypu Cameor a JI64 a extrakty byly využity pro cvičné měření aktivity enzymu AMADH s využitím multifunkčního spektrofotometru Reader. Testování dalších metodik, jako je stanovení aktivity enzymů DAO a GSNOR, měření koncentrace SNO a proměření všech studovaných parametrů v celých sadách (všech vývojových stádiích) rostlinného materiálu již bohužel kvůli vládním opatřením spojeným s pandemií Covid-19 nebyla zrealizována.



Obr. 15 Grafické zobrazení kalibrační funkce pro stanovení koncentrace celkových proteinů, rovnice kalibrační funkce $y = 0,2177x - 0,0063$, y – absorbance, x – koncentrace, λ - vlnová délka.

Aktivita AMADH byla měřena na principu přeměny substrátu APAL na β -alanin za současné redukce NAD^+ na NADH. Vzniklé NADH bylo měřeno pomocí Warburgova optického testu měřením nárůstu absorbance při vlnové délce 340 nm ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Šebela *et al.*, 2000). I když naměřená data nebyla ideální, bylo alespoň cvičně provedeno vyhodnocení aktivity AMADH v osemeni genotypu JI64 a Cameor podle vzorce:

$$a = \frac{\Delta A \cdot V}{\epsilon \cdot t \cdot l}$$

kdy ΔA představuje změnu absorbance v daném časovém úseku (v úseku s lineárním nárůstem absorbance odečteme $A_x - A_0$), V [l] je objem reakčního roztoku v jamce, $\epsilon = 6220 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ je extinkční koeficient, t [s] udává čas měření a l [cm] je optická dráha zjištěná podle vzorce:

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

Aktivita enzymu AMADH pro kulturní genotyp Cameor (17 DAP) byla $0,845 \text{ nkat}\cdot\text{g}^{-1}$ FW a pro planý genotyp JI64 (17 DAP) $0,612 \text{ nkat}\cdot\text{g}^{-1}$ FW.

V práci Šebela *et al.* (2000) byla poprvé izolována a charakterizována AMADH z hrachu setého, konkrétně z 6 dní starých etiolovaných sazenic. Substrátem pro měření aktivity byl APAL a aktivita AMADH ze surového extraktu činila 2240 nkat, specifická aktivita vztažená na množství proteinu $0,5 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$. Ve studii Yin *et al.* (2013) byla aktivita AMADH stanovena v semenech 2 dny klíčící sóji (*Glycine max L.*) stejným principem jako v této bakalářské práci s rozdílem substrátu, ale za použití substrátu ABAL. Hodnota aktivity byla v této studii stanovena jako 159,4 U, tedy 2657,198 nkat a specifická aktivita vztažená k množství proteinů činila $8,335 \text{ nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$. Autoři této studie se zabývali pH a teplotním optimem AMADH, teplotní optimum pro aktivitu AMADH bylo stanoveno při 45 °C a pH 8,0, zatímco u hrachu setého bylo optimální pH stanoveno na 8,5 (Šebela *et al.*, 2000).

Dalším plánovaným experimentem bylo měření aktivity diaminooxidasy. Ve studii Srivastava *et al.* (1977) byla měřena aktivita DAO v klíčících semenech hrachu setého. Aktivita byla měřena v dělohách a embryu semen. V dělohách byla detekována po 62 h klíčení a v případě embrya byla aktivita naměřena už po 38 h. Nejvyšší aktivita byla stanovena mezi 6. a 12. dnem od počátku klíčení a činila $14,2 \text{ nkat}\cdot\text{g}^{-1}$ FW. Ve studii Yang *et al.* (2011) byla měřena aktivita DAO během klíčení bobu obecného. Aktivita DAO se v průběhu klíčení postupně zvyšovala a dosahovala podobných hodnot jako tomu

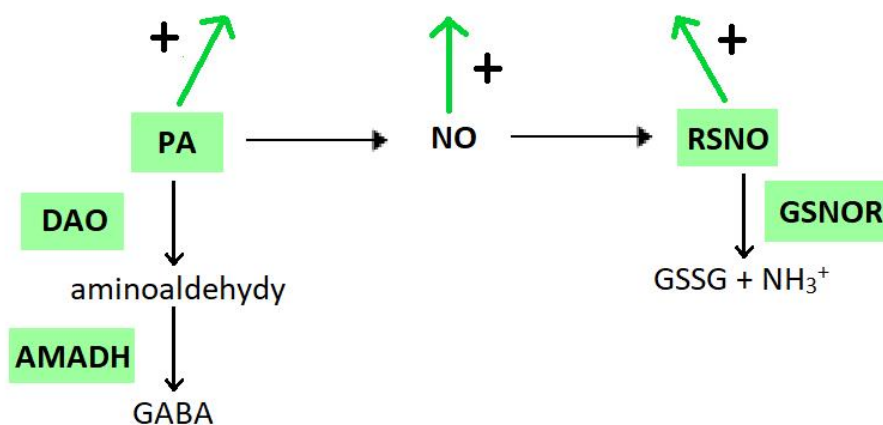
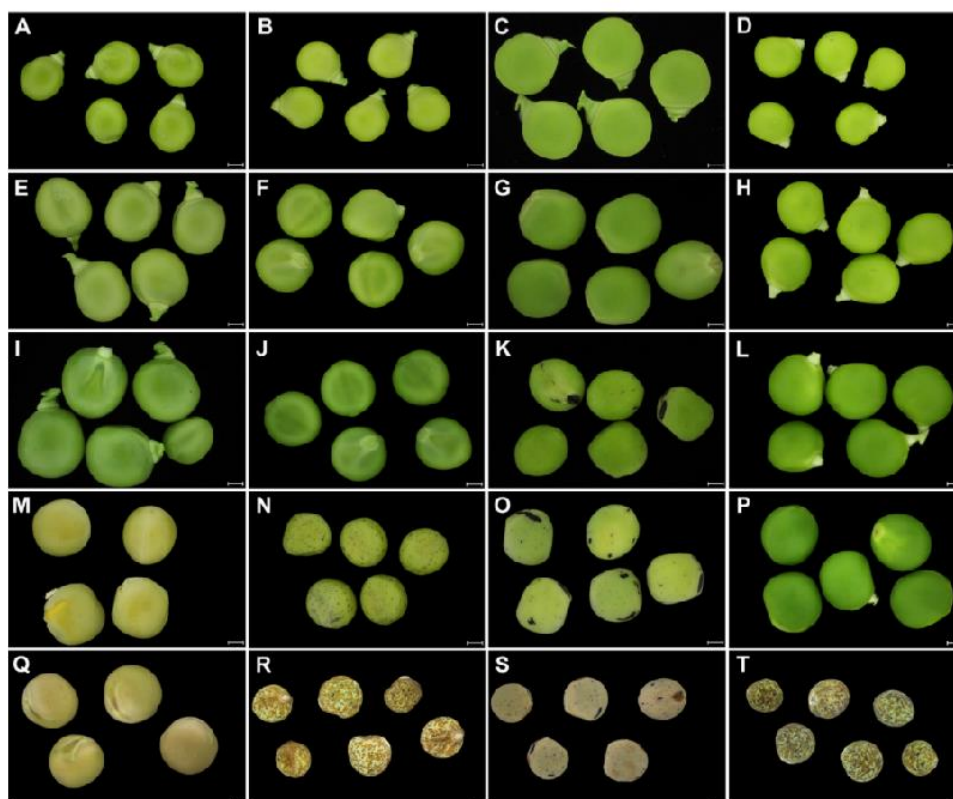
bylo ve studii Srivastava *et al.* (1977). V průběhu vývoje semen hrachu setého jsou očekávány podobné výsledky. Otázkou, kterou jsme měly odpovědět je, zda budou detekovány změny v aktivitách DAO v souvislosti s vlastností semen týkajících se dormance.

GSNOR je zapojena v regulaci hladiny reaktivních forem dusíku a s tím spojeného redoxního stavu buněk, udržování homeostázy nitrobuněčné hladiny NO a v kontrole trans-nitrosace mezi S-nitrosylovanými proteiny a GSNO (Frunghillo *et al.*, 2014). V bakalářské práci Kadlecové (2012) byla měřena aktivita GSNOR v semenáčcích hrachu setého ve stáří 7 a 14 dnů. Z výsledků je patrné, že aktivita GSNOR klesala se stářím rostlin a dosahovala specifických aktivit vztažených k množství proteinu v řádu jednotek nkat.mg^{-1} . Měřením aktivit GSNOR v průběhu vývoje semen se ještě nikdo nezabýval. Vzhledem k účasti NO na procesu prolomení dormance a indukce klíčení lze předpokládat, že se bude aktivita GSNOR v průběhu vývoje semen snižovat. Tato hypotéza musí být v následující studii potvrzena nebo případně vyvrácena.

Dále měla být stanovena koncentrace proteinů a SNO v osemení dormantních a nedormantních semen hrachu setého. Ve výzkumu Barac *et al.* (2010) byl porovnáván obsah proteinů v několika různých genotypech semen hrachu setého. Byla pozorována výrazná variabilita v obsahu proteinů v rámci zkoumaných genotypů a podobný trend je předpokládán i u genotypů studovaných v této bakalářské práci. V publikaci Tzitzikas *et al.* (2005) bylo autory pozorováno, že obsah proteinů je v planých genotypech hrachu vyšší než v kulturních. Koncentrace SNO měla být stanovena chemiluminiscenční metodou pomocí NO analyzátoru, případně Savillovou metodou. Jednou z důležitých funkcí SNO je jejich schopnost uchovávat NO a v případě potřeby NO skupinu předávat na jiné molekuly, především proteiny, mechanismy S-nitrosylace, S-transaminace a S-glutathionylace. (Hogg, 2002; Martínez-Ruiz A a Lamas S., 2007). Vzhledem k účasti NO v mechanismech prolomení dormance, je předpokladem, že se hladiny SNO budou v průběhu vývoje semen zvyšovat. Předpokládaná hypotéza musí být experimentálně ověřena.

Na Obr 16. je uveden vztah mezi sledovanými parametry PA, RSNO a enzymy jejich metabolismu, je zdůrazněný předpokládaný pozitivní efekt PA a NO na vývoj semen.

DORMANTNÍ X NEDORMANTNÍ semena hrachu setého vývoj semen



Obr. 16 Vztah mezi sledovanými parametry PA, RSNO a enzymy jejich metabolismu. Zdůrazněn předpokládaný pozitivní efekt PA a NO na vývoj semen. PA – polyaminy, DAO – diaminoxidasa, AMADH – aminoaldehyddehydrogenasa, GABA – kyselina γ -aminomáselná, NO – oxid dusnatý, RSNO – S-nitrosothioly, GSNOR – S-nitrosoglutathionreduktasa, GSSG – glutathion disulfid. Fotografie semen kulturních, nedormantních genotypů hrachu: Cameor (A, E, I, M, Q) a JI92 (B, F, J, N, R) a planých, dormantních genotypů hrachu: JI64 (C, G, K, O, S) a JI1794 (D, H, L, P, T) v 5 vývojových stádiích: 13 DAA (A – D), 21 DAA (E – H), 30 DAA (M – P), suché semena (Q – T), DAA – „day after anthesis“ (obrázek vývojových stádií hrachu převzat ze Zablatzká *et al.*, 2021).

5 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na téma stavba, vývojová stádia a metabolické přeměny v průběhu vývoje semen hrachu setého (*Pisum sativum* L.). Práce byla zaměřena na charakterizaci RNS a PA. Byl popsán metabolismus RNS a PA, jejich vzájemná komunikace a funkce v procesu vývoje semen. Dále byly charakterizovány enzymy, které hrají nezastupitelnou roli v regulaci hladin RNS a PA: AMADH, DAO a GSNOR.

Cílem experimentální části bylo porovnání aktivit enzymů spojených s metabolismem RNS a PA a stanovení změn v obsahu RSNO ve 4 vývojových stádiích osetí 4 genotypů hrachu setého (Cameor, JI92, JI64, JI1794). V experimentální části bakalářské práce byly popsány provedené a plánované metody, které spočívaly v měření aktivit AMADH, DAO a GSNOR a koncentrace celkových proteinů a SNO.

Kvůli vládním opatřením spojených s pandemií Covid-19 nebylo možné provést plánované experimenty a proměření všech studovaných parametrů v celých sadách (všech vývojových stádiích) rostlinného materiálu a porovnat jednotlivé parametry v rámci dormantních a nedormantních genotypů hrachu setého v různých vývojových stádiích. V rámci diskuse byly na základě výsledků publikovaných studií týkajících se úlohy PA a NO v procesu klíčení semen nastíněny předpokládané výsledky, které musí být ověřeny experimentálně.

LITERATURA

- Abbo S., Lev-Yadun S., Gopher A. (2012): Plant domestication and crop evolution in the Near East: on events and processes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **31**, 241–257.
- Abbo S., Pinhasivan-Oss R., Gopher A., Saranga Y., Ofner I., Peleg Z. (2014): Plant domestication versus crop evolution: a conceptual framework for cereals and grain legumes. *Trends Plant Sci.* **19**, 351–360.
- Ambrose M.J., Wang T.L., Cook S.K., Hedley C.L. (1987): An analysis of seed development in *Pisum sativum* L. IV. Cotyledon cell population in vitro and in vivo. *J. Exp. Bot.* **38**, 1909–1920.
- 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 Chin-pea stems. *Planta* **182**, 89-96.
- Angelovici R., Galili G., Fernie A.R., Fait A. (2010): Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science* **15**, 211-218.
- Arc E., Galland M., Godin B., Cuffe B., Rajjou L. (2013): Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. *Front Plant Sci.* **4**:346 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3777103/>.
- Astier J., Lindermayr C. (2012): Nitric oxide-dependent postranslational modification in plants: an update. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 15193-15208.
- Astier J., Gross I., Durner J. (2018): Nitric oxide production in plants: an update. *Journal of Experimental Botany* **69**, 3401-3411.
- Baker P.R., Schopfer F.J., Sweeney S., Freeman B.A. (2004): Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, cilinal identification, and quantitation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 11577-11582.
- Baskin J.M., Baskin C.C. (2000): Evolutionary considerations of claims for physical dormancy-break by microbial action and abrasion by soil particles. *Seed Sci. Res.* **10**, 409–413.
- Barac M., Cabrilo S., Pesic M., Stanojevic S., Zilic S., Macej O., Ristic N. (2010): Profile and Functional Properties of Seed Proteins from Six Pea (*Pisum sativum*) Genotypes. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 4973-4990.
- Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Perez C., Corpas F.J., Barroso J.B. (2016): Protein S-nitrosylation and S-glutathionylation as regulators of redox homeostasis during abiotic stress response. In: *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses* (Gupta D.K., Palma J.M., Corpas F.J., eds.), Springer, Switzerland, 365-386.
- Begara-Morales J.C., Chaki M., Valderrama R., Mata-Pérez C., Padilla M.N., Barroso J.B. (2019): The function of S-nitrosothiols during abiotic stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **70**, 4429-4439.
- Beligni M.V., Lamattina L. (1999): Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* **208**, 337-344.
- Beligni M.V., Lamattina L. (2000): Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**, 215-221.
- Bethke P.C., Badger M.R., Jones R.L. (2004a): Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues. *The Plant Cell* **16**, 332-341.
- Bethke P.C., Gubler F., Jacobsen J.V., Jones R.L. (2004b): Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barely grains can be broken by nitric oxide. *Planta* **219**, 847-855.
- Bethke P.C., Libourel I.G.L., Jones R.L. (2006): Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 517-526.
- Bewley J.D., Black M. (1994): *Seeds: Physiology of Development and Germination*, 2nd ed., Plenum Press, New York.
- Bhatnagar P., Glasheen B.M., Bains S.K., Long S.L., Minocha R., Walter C., Minocha S.C. (2001): Transgenic manipulation of the metabolism of polyamines in poplar cells. **125**, 2139-2153.
- Blochl A., Peterbauer T., Richter A. (2007): Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. *J. Plant Physiol.* **164**, 1093–1096.
- Borisjuk L., Wang T., Rolletschek H., Wobus U., Weber H. (2002): A pea seed mutant affected

in the differentiation of the embryonic epidermis leads to deregulated seed maturation and impaired embryo growth. *Development* **129**,1595–607.

Borisjuk L., Rolletschek H., Weber H., Wobus U., Weber H. (2003): Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *J. Exp. Biol.* **54**, 503–512.

Borisjuk L., Rolletschek H. (2009): The oxygen status of the developing seed. *New Phytol.* **182**, 17–30.

Bouchereau A., Aziz A., Larher F., Martin-Tanguy J. (1999): Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant science* **140**, 103-125.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.

Bredt D.S., Snyder S.H. (1989): Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 9030-9033.

Bright J., Hiscock S.J., James P.E., Hancock J.T. (2009): Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 49-55.

Brocard-Gifford I.M., Lynch T.J., Finkelstein R.R. (2003): Regulatory Networks in Seeds Integrating Developmental, Abscis Acid, Sugar, and Light Signaling. *Plant Physiology*® **131**, 78-92.

Broniowska K.A., Hogg N. (2012): The Chemical Biology of S-Nitrosothiols. *Antioxidants & Redox Signaling* **17**, 969-980.

Broniowska K.A., Diers A.R., Hogg N. (2013): S-NITROSOGLUTATHION. *Biochim Biophys Acta.* **1830**, 3173-3181.

Brown C.G. (1995): Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett* **369**, 136-139.

Castillo M.-C., Lozano-Juste J., Gonzalez-Guzman M., Rodriguez L., Rodrigues P.L., Leon J. (2015): Inactivation of PYR/PYL/RCAR ABA receptors by tyrosine nitration may enable rapid inhibition of ABA signaling by nitric oxide in plants. *Sci. Signal.* **8**:ra89.

Chen D., Shao Q., Yin L., Younis A., Zheng B. (2019): Polyamines Function in Plants: Metabolism, Regulation on Development, and Roles in Abiotic Stress Responses. *Plant Sci.* **9**:1945 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01945/full#B42>.

Cooper C.E. (1999): Nitric oxide and iron proteins. *Biochem Biophys Acta* **1411**, 290-309.

Corner E.J.H. (1951): The leguminous seed. *Phytomorphology* **1**, 117-150.

Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Quirós M., León A.M., Romero-Puertas M.C., Esteban F.J., Valderrama R., Palma J.M., Sandalio L.M., Gómez M., del Río L.A. (2004): Cellular and Subcellular Localization of Endogenous Nitric Oxide in Young and Senescent Pea Plants. *Plant Physiology* **136**, 2722-2733.

Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., León A.M., Sandalio L.M., del Río L.A. (2006): Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**, 246-254.

Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J.M., Barroso J.B. (2011): Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant science* **181**, 604-611.

Corpas F.J., Alché J.D., Barroso J.B. (2013): Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in Plant Science* **4**:126, <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00126>.

Corpas F.J. (2016): Reactive Nitrogen Species (RNS) in Plants Under Physiological and Adverse Environmental Conditions: Current view. In: *Progress in Botany*. Vol. 78, (Cánovas F., Lüttge U., Matyssek R. eds.), Springer, Cham, https://doi.org/10.1007/124_2016_3.

Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L. (2004): Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**, 900-905.

Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.

Delledonne M. (2005): NO news is good news for plants. *Curr Opin. Plant Biol* **8**, 390-396.

- Denicola A., Souza J.M., Radi R. (1998): Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Sci.* **95**, 3566-3571.
- Domingos P., Prado A.M., Wong A., Gehring C., Feijo J.A. (2015): Nitric oxide: A Multitasked Signaling Gas in Plants. *Molecular Plant* **8**, 506-520.
- Dordas C., Hasinoff B.B., Rivoal J., Hill R.D. (2004): Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell-suspension cultures. *Planta* **219**, 66-72.
- Drapier J.C. (1997): Interplay between NO and [Fe-S] clusters: relevance to biological systems. *Methods* **11**, 319-329.
- Duhazé C., Gouzerh G., Gagneul D., Larher F., Bouchereau A. (2002): The conversion of spermidine to putrescine and 1,3-diaminopropane in the roots of *Limonum tataricum*. *Plant Sci* **163**, 639-646.
- Fan H., Guo S., Jiao Y., Zhang R., Li J. (2007): Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism, and photosynthesis characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Frontiers of Agriculture in China* **1**, 308-314.
- Fancy N.N., Bahlmann A.K., Loake G.J. (2017): Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell and environment* **40**, 462-472.
- Feechan A., Kwon E., Yun B.W., Wang Y., Pallas J.A., Loake G.J. (2005): A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 8054-8059.
- Finch-Savage W.E., Leubner-Metzger G. (2006): Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* **170**, 501-523.
- Ford P.C., Fernandez B.O., Lim M.D. (2005): Mechanisms of reductive nitrosylation in iron and copper models relevant to biological systems. *Chem Rev* **105**, 2439-2455.
- Ford P.C. (2010): Reactions of NO and nitrite with heme models and proteins. *Inorg Chem* **49**, 6226-6239.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L. (2010): Characterization of nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Osteococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *The plant cell* **22**, 3816-3830.
- Freschi L. (2013): Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Plant Physiol.* **4**:398 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00398/full>.
- Frungillo L., Skelly M.J., Loake G.J., Spoel S.H., Salgado I. (2014): S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nat. Commun.* **5**:5401, <https://doi.org/10.1038/ncomms6401>.
- Gao H.-J., Yang H.-Q., Wang J.-X. (2009): Arginine metabolism in roots and leaves of apple (*Malus domestica* Borkh.): the tissue-specific formation of both nitric oxide and polyamines. *Sci. Hortic.* **119**, 147-152.
- Gifford R.M., Bremner P.M. (1981): Accumulation and conversion of sugars by developing wheat grains. 2. Light requirement for kernels cultured in vitro. *Aust. J. Plant Physiol.* **8**, 631-640.
- Gill S.S., Tuteja N (2010): Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling & Behavior* **5**, 26-33.
- Gniazdowska A., Krasuska U., Bogatek R. (2010): Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. *Planta* **232**, 1397-1407.
- Goffman F., Ruckle M., Ohlrogge J., Shachar-Hill Y. (2004): Carbon dioxide concentrations are very high in developing oil seeds. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 703-708.
- Golombek S., Heim U., Horstmann C., Wobus U., Weber H. (1999): PEP-carboxylase in developing seeds of *Vicia faba*. Gene expression and metabolic regulation. *Planta* **208**, 66-72.
- Górecki R.J., Fordoński G., Hålmäjan H.V., Horbowicz M., Jones R.G., Lahuta L.B. (2001): Carbohydrates in grain legume seeds: improving nutritional quality and agronomic characteristic. In: *Seed Physiology and Biochemistry.*, (Hedley C.L.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 117-143.
- Greenway H., Gibbs J. (2003): Mechanisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintenance and energy distribution to essential processes. *Funct. Plant Biol.* **30**, 999-1036.

- Grelet J., Benamar A., Teyssier E., Avelange-Macherel M.H., Grunwald D., Macherel D. (2004): Identification in Pea Seed Mitochondria of a Late-Embryogenesis Abundant Protein Able to Protect Enzymes from Drying. *Plant Physiology* **137**, 157-167.
- Gupta K.J., Stoimenova M., Kaiser W.M. (2005): In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *J. of Exp. Botany* **56**, 2601–2609.
- Gupta K.J., Kaiser W.M. (2010): Production and Scavenging of Nitric Oxide by Barley Root Mitochondria. *Plant & cell physiology* **51**, 576-584.
- Gupta K.J., Igamberdiev A.U., Manjunatha G., Segu S., Moran J.F., Neelewarne B., Bauwe H., Kaiser W.M. (2011a): The emerging roles of nitric oxide (NO) in plant mitochondria. *Plant Sci.* **181**, 520-526.
- Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W. M., van Dongen J.T. (2011b): On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* **16**, 160-168.
- Hancock J.T., Neill S.J., Wilson I.D. (2011): Nitric oxide and ABA in the control of plant function. *Plant Sci.* **181**, 555-559.
- Hedley C.L., Ambrose M.J. (1980): An Analysis of Seed Development in *Pisum sativum* L. *Annals of Botany Company* **46**, 89-105.
- Hess D.T., Matsumoto A., Kim S.O., Marshall H.E., Stamler J.S. (2005): Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 150-166.
- Hess D.T., Stamler J.S. (2012): Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J Biol Chem.* **287**, 4411-4418.
- Hill C.A., Bennett J.H. (1970): Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. *Atmospheric Environment* **4**, 341-348.
- Hirayama T., Shinozaki K. (2007): Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Plant science* **12**, 343-351.
- Hogg N. (2002): The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 585-600.
- Hrabárová E., Gemeiner P., Šoltés L. (2007): Peroxynitrite: *In vivo* and *In Vitro* Synthesis and Oxidant Degradative Action on Biological Systems Regarding Biomolecular Injury and Inflammatory Processes. *Chem. Pap.* **61**, 417-437.
- Choudhary A., Singh R.P. (1997): Distribution of Cu²⁺-diamineoxidase during ontogeny of seedlings of *Vigna radiata* cultivars. *Biol.Plant.* **40**, 449–452.
- Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2015). Modulation of protein synthesis by polyamines. *Iubmb Life.* **67**, 160–169.
- Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C. (1999): Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J. Cardio-vasc. Pharmacol.* **34**, 879-886.
- Jaffrey S.R., Snyder S.H. (2001): The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Science's STKE* **2001**:pl1 <https://stke.sciencemag.org/content/2001/86/pl1>.
- Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2019): S-nitrosoglutathione Reductase – The Master Regulator of Protein S-Nitrosation in Plant NO Signaling. *Plants* **8**:48 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6409631/>.
- Jánská 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**, 815-829.
- Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D.J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter E.J., Wong G.K., Wendehenne D. (2016): Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci Signal.* **9**:re2 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26933064/>.
- Jin C.W., Du S.T., Zhang Y.S., Tang C., Lin X.Y. (2009): Atmospheric nitric oxide stimulates plant growth and improves the quality of spinach (*Spinacia oleracea*). *Annals of Applied Biology* **155**, 113-120.
- Kadlecová K. (2012): *Detekce S-nitrosoglutathionreduktasy v rostlinách nativní elektroforézou*. Diplomová práce, UPOL Olomouc, Česká republika.
- Kermode A.R., Finch-Savage B.E. (2002): Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. In: *Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying* (Black, M. and Pritchard, H.W., eds), CABI Publishing, pp. 149–184.

- Khan H.A., Ziaf K., Amjad M., Iqbal Q. (2012): Exogenous Application of Polyamines Improves Germination and Early Seedling Growth of Hot Pepper. *Chilean Journal of Agricultural Research* **72**, 429-433.
- Koornneef M., Bentsink L., Hilhorst H. (2002): Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 33-36.
- Kranner I., Grill D. (1993): Content of low-molecular-weight thiols during the imbibition of pea-seeds. *Physiologia Plantarum* **88**, 557-562.
- Krasuska U., Ciacka K., Bogatek R., Gniazdowska A. (2014): Polyamines and nitric oxide link in regulation of dormancy removal and germination of apple (*Malus domestica* Borkh.) embryos. *J. Plant Growth Regul.* **33**, 590-601.
- Krasuska U., Ciacka K., Gniazdowska A. (2017): Nitric oxide-polyamines cross-talk during dormancy release and germination of apple embryos. *Nitric oxide* **68**, 38-50.
- Kusano T., Berberich t., Tateda C., Takahashi Y. (2008): Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**, 367-381.
- Kwon E., Feechan A., Yun B.W., Hwang B.H., Pallas J., Kang J.G., Loake G. (2012): AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in Arabidopsis. *Planta* **236**, 887-900.
- Lara T.S., Lira J.M.S., Rodriguez A.C., Rakocevic M., Alvarenga A.A. (2014): Potassium Nitrate priming Affects the Activity of Nitrate reductase and Antioxidant Enzymes in Tomato Germination. *J. Agric. Sci.* **6**, 72-80.
- Leshem Y.Y. (1996): Nitric oxide in biological systems. *Plant Growth Regulation* **18**, 155-159.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J.M., Barroso J.B., Corpas F.J. (2011): Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signal Behav* **6**, 789-793.
- Leterrier M., Airaki M., Palma J.M., Chaki M., Barroso J.B., Corpas F.J. (2012): Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in Arabidopsis. *Environ Pollut* **166**, 136-143.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J.S. (2001): A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490-494.
- Liu, Y., Shi, L., Ye, N., Liu, R., Jia, W., and Zhang, J. (2009): Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in Arabidopsis. **183**, 1030-1042.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S (2007): Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovasc. Res.* **75**, 220-228.
- Matakiadis T., Aboresi A., Jikumaru Y., Tatematsu K., Pichon O., Renou J.P., Kamiya Y., Nambara E., Truong H.N. (2009): The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiol.* **149**, 949-960.
- Matilla A.J., Garcia S., Bueno M. (2002): Diamine oxidase activity during the germinative and post-germinative growth of the embryonic axis in chickpea seeds. *Biologia plantarum* **45**, 551-556.
- Matilla A., Gallardo M., Puga-Hermida M.I. (2005): Structural, physiological and molecular aspects of heterogeneity in seeds: a review. *Seed Science Research* **15**, 63-76.
- Marbach I., Mayer A.M. (1974): Permeability of seed coats to water as related to drying conditions and metabolism of phenolics. *Plant Physiol.* **54**, 817-820.
- McInnis S.M., Desikan R., Hancock J.T., Hiscock S.J. (2006): Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signaling crosstalk? *New Phytol.* **172**, 221-228.
- 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**, 1139-1154.
- Melkus G., Rolletschek H., Fuchs J., Radchuk V., Grafahrend-Belau E., Sreenivasulu N., Rutten T., Weier D., Heinzl N., Schreiber F., Altmann T., Jakob P.M., Borisjuk L. (2011): Dynamic ¹³C/1H NMR imaging uncovers sugar allocation in the living seed. *Plant Biotechnol. J.* **9**, 1022-1037.

- Miao Z.H., Fortune J.A., Gallagher J. (2001): Anatomical structure and nutritive value of lupin seed coats. *Aust. J. Agric. Res.* **52**, 985–993.
- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**, 1360–1385.
- Moïse J.A., Han S., Gudynaitė-Savitch L., Johnson D.A., Miki B.L.A. (2005): Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* **41**, 620–644.
- Murray D.R. (1987): Nutritive role of seed coats in developing legume seeds. *Am J Bot* **74**, 1122–1137.
- Mustafavi S.H., Badi H.N., Sekara A., Al E. (2018): Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. *Acta Physiol. Plant.* **40**:102 <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-018-2671-2>.
- Nambara E., Marion-Poll A. (2003): ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci.* **8**, 213–217.
- Nishizawa A., Yabuta Y., Shigeoka S. (2008): Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* **147**, 1251–1263.
- Pagnussat G.C., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L. (2002): Nitric Oxide Is Required for Root Organogenesis. *Plant Physiol.* **129**, 954–956.
- Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. (2007): Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **87**, 315–424.
- Pavlová L., Fischer L. (2011): Embryogeneze. In: *Růst a vývoj rostlin.*, 1st ed., (Jakubec I.), Nakladatelství Karolinum, Praha, 123–162.
- Pedroso M.C., Magalhaes J.R., Durzan D. (2000): Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Sci* **157**, 173–180.
- Perozich J., Nicholas H., Wang B.C., Lindahl R., Hempel, J. (1999): Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci.* **8**, 137–146.
- Petrůvský M., Brauner F., Luhová L., Gagneul D., Šebela M. (2007): Aminoaldehyde dehydrogenase activity during wound healing of mechanically injured pea seedlings. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1410–1418.
- Planchet E., Jagadis Gupta K., Sonoda M., Kaiser W.M. (2005): Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal* **41**, 732–743.
- Plant Physiology and Development sixth edition: <http://6e.plantphys.net/essay12.04.html> (17. 2. 2021).
- Powell A.A., Matthews S. (1978): The influence of testa conditions on the imbibition and vigour of pea seeds. *J. Experimental Botany* **30**, 193–197.
- Probert R.J. (2000): The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. In: *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities.* (Fenner M., ed.), CAB International, Wallingford, UK, 261–292.
- Quijano C., Romero N., Radi R. (2005): Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: modeling the impact of superoxide dismutase and nitric oxide diffusion. *Free Radic. Biol. Med.* **39**, 728–741.
- Radchuk R., Conrad U., Saalbach I., Giersberg M., Neil Emery R.J., Küster H., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Weschke W., Weber H. (2010): Abscisic acid deficiency of developing pea embryos achieved by immunomodulation attenuates developmental phase transition and storage metabolism. *The Plant Journal* **64**, 715–730.
- Radchuk V., Borisjuk L. (2014): Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Frontiers in plant science* **5**:510 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00510/full>.
- Rajjou L., Gallardo K., Debeaujon I., Vandekerckhove J., Job C., Job D. (2004): The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology* **134**, 1598–1613.
- Recalde L., Gómez Mansur N.M., Cabrera A.V., Matayoshi C.L., Gallego S.M., Groppa M.D., Benavides M.P. (2020): Unravelling ties in the nitrogen network: Polyamides and nitric oxide emerging as essential players in signalling roadway. *Ann Appl Biol.* **178**, 192–208.

- Robert C., Noriega A., Tocino A., Cervantes E. (2008): Morphological analysis of seed shape in *Arabidopsis thaliana* reveals altered polarity in mutants of the ethylene signaling pathway. *J. Plant Physiol.* **165**, 911–919.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M. (2002): Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* **53**, 103-110.
- Rozsak P., Köhler C. (2011): Polycomb group proteins are required to couple seed coat initiation to fertilization. *PNAS* **108**, 20826-20831.
- Sarath G., Bethke P.C., Jones R., Baird L.M., Hou G., Mitchell R.B. (2006): Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta* **223**, 1154-1164.
- Sattler S.E., Gilliland L.U., MagallanesLundback M., Pollard M., DellaPenna D. (2004): Vitamin E is essential for seed longevity, and for preventing lipid peroxidation during germination. *The Plant Cell* **16**, 1419–1432.
- Saville B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* **83**, 670-672.
- Schopfer F.J., Baker P.R., Freeman B.A. (2003): NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.* **28**, 646-654.
- Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Basalah M.O. (2011): Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* **248**, 447-455.
- Signorelli S., Considine M.J. (2018): Nitric Oxide Enables Germination by a Four-Pronged Attack on ABA-Induced Seed Dormancy. *Front Plant Sci.* **9**:296 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5854660/>.
- Skubacz A., Daszkowska-Golec A., Szarejko I. (2016): The role and regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. *Front Plant Sci.* **7**:1884 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28018412/>.
- Slocum R.D., Kaur-Sawhney R., Galston A.W. (1984): The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch.Biochem.Biophys.* **235**, 283–303.
- Smykal P., Vernoud V., Blair M W., Soukup A., Thompson R.D. (2014): The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant science* **5**:351 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00351/full>.
- Spadaro D., Yun B.W., Spoel S.H., Chu C., Wang Y.Q., Loake G.J. (2010): The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. *Physiol Plant.* **138**, 360-371.
- Srivastava S.K., Prakash V., Naik B.I. (1977): Regulation of diamine oxidase activity in germinating pea seeds. *Phytochem.* **16**, 185-187.
- Staab C.A., Ålander J., Brandt M., Lengqvist J., Morgenstern R., Grafström R.C., Höög J.O. (2008): Reduction of S-nitrosoglutathione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH-controlled formation of glutathione transferase inhibitors. *Biochem. J.* **413**,493–504.
- Schneitz K., Hülskamp M., Kopczak S.D., Pruitt R.E. (1997): Dissection of sexual organ ontogenesis: a genetic analysis of ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 1367–1376.
- Skinner D.J., Hill T.A., Gasser C.S. (2004): Regulation of ovule development. *Plant Cell* **16**, S32–S45.
- Stiti N., Missihoun T.D., Kotchoni S.O., Kirch H.H., Bartels D. (2011): Aldehyde Dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana*: Biochemical Requirements, Metabolic Pathways, and Functional Analysis. *Front Plant Sci.* **2**:65 <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00065>.
- Stöhr C., Strube F., Marx G., Ullrich W.R., Rockel P. (2001): A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**, 835-841.
- Swain S.M., Ross J.J., Reid J.B., Kamiya Y. (1995): Gibberellins and pea seed development. Expression of the *lhi*, *ls* and *le5839* mutations. *Planta* **195**, 426–433.
- Šebela M., Brauner F., Radová A., Jacobsen S., Havliš J., Galuszka P., Peč P. (2000): Characterisation of a homogenous plant aminoaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1480**, 329-341.
- Takahashi S., Yamasaki H. (2002): Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplast by nitric oxide. *FEBS Letters* **512**, 145-148.

- Tanou G., Molassiotis A., Diamantdis G. (2009): Hydrogen peroxide- and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. *J. Plant Physiol* **166**, 1904-1913.
- Tanou G., Ziogas V., Belghazi M., Christou A., Filippou P., Job D., Fotopoulos V., Molassiotis A. (2014): Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant Cell Environ.* **37**, 864-885.
- Terasaki S., Sakurai N., Yamamoto R., Wada N., Nevins D.J. (2001): Changes in Cell Wall Polysaccharides of Kiwifruit and the Visco-elastic Properties Detected by a Laser Doppler Method. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* **70**, 572-580.
- Tichá T., Sedlářová M., Činčalová L., Drábková Trojanová Z., Meislerová B., Lebeda A., Luhová L., Petřivalský M. (2018): Involvement of S-nitrosothiols modulation by S-nitrosoglutathione reductase in defence responses of lettuce and wild *Lactuca* spp. to biotrophic mildews. *Planta* **2018**, 1203-1215.
- Tischner R., Galli M., Heimer Y.M., Bielefeld S., Okamoto M., Mack A., Crawford N.M. (2007): Interference with the citrulline-based nitric oxide synthase assay by argininosuccinate lyase activity in *Arabidopsis* extracts. *The FEBS journal* **274**, 4238-4245.
- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh I.S., Scherer G.F.E. (2006): Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.* **47**, 346–354.
- Tylichová M., Kopečný D., Moréra S., Briozzo P., Lenobel R., Snégaroff J., Šebela M. (2010): Structural and Functional Characterization of Plant Aminoaldehyde Dehydrogenase from *Pisum sativum* with a Broad Specificity for Natural and Synthetic Aminoaldehydes. *J. Mol. Biol.* **396**, 870-882.
- Tzitzikas E.N (2005): *Exploring variation in pea protein composition by natural selection and genetic transformation*. Ph.D. thesis Wageningen University, The Netherlands.
- Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Colmenero-Varea P., del Río L.A., Barroso J.B. (2007): Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* **581**, 453-461.
- 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**, 729-737.
- Vandelle E., Delledonne M. (2011): Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science* **181**, 534-539.
- Vasiliou V., Bairoch A., Tipton K.F., Nebert D.W. (1999): Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: Human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* **9**, 421–434.
- Vidal A., Cantabella D., Bernal-Vicente A., Diaz-Vivancos P., Hernández J. A. (2018): Nitrate and nitric oxide-induced plant growth in pea seedlings is linked to antioxidative metabolism and the ABA/GA balance. *Journal of Plant Physiology* **230**, 13-20.
- Villanueva V.R., Huang H. (1993): Effect of Polyamine Inhibition on Pea Seed Germination. *Journal of Plant Physiology* **141**, 336-340.
- Víteček J., Lojek A., Valacchi G., Kubala L. (2012): Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges. *Mediators Inflamm.* **2012**:318087 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22988346/>.
- Wager H.G. (1974): Effect of subjecting peas to air enriched with carbon-dioxide. 1. Path of gaseous diffusion, content of CO₂ and buffering of tissue. *J. Exp. Bot.* **85**, 330–337.
- Wang Y.H., Li X.C., Zhu-Ge Q., Jiang X., Wang W.D., Fang W.P., Chen X., Li X.H. (2012): Nitric oxide participates in cold-inhibited *Camellia sinensis* pollen germination and tube growth partly via cGMP in vitro. *PLoS One* **7**:e52436 <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0052436>.
- Wang P., Du Y., Hou Y.-J., Zhao Y., Hsu C.-C., Yuan F., Zhu X., Tao W.A., Song C.-P., Zhu J.-K. (2015): Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 613-618.
- Weber H., Buchner P., Borisjuk L., Wobus U. (1996): Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate

synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications on seed development. *Plant J.* **9**, 841–850.

Weber H., Borisjuk L., Wobus U. (2005): Molecular Physiology of Legume Seed Development. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 253-279.

Weeden N.F. (2007): Genetic changes accompanying the domestication of *Pisum sativum*: is there a common genetic basis to the ‘domestication syndrome’ for legumes? *Ann. Bot.* **100**, 1017–1025.

Weitbrecht K., Müller K., Leubner-Metzger G. (2011): First of the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3289-3309.

Werker E., Marbach I., Mayer A.M. (1979): Relation between the anatomy of the testa, water permeability and the presence of phenolics in the genus *Pisum*. *Ann. Bot.* **43**, 765–771.

Wilson I.D., Hiscock S.J., James P.E., Hancock J.T. (2009): Nitric oxide and nitrite are likely mediators of pollen interactions. *Plant Signal. Behav.* **4**, 416-418.

Wink D.A., Mitchell J.B. (1998): Chemical biology of NO: insights into regulation, protective and toxic mechanism of nitric oxide. *Free Rad Bio Med* **25**, 434-456.

Winter G., Todd C.D., Trovato M., Forlani G., Funck D. (2015): Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* **6**:534 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00534/full>.

Xiong L., Zhu J.-K. (2003): Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant. Physiol.* **133**, 29-36.

Xu L., Xing S.T., Sun X. (2014): Effects of polyamines on hormones contents and the relationship with the flower bud differentiation in chrysanthemum. *Plant Physiol. J.* **50**, 1195-1202.

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**, 128-129.

Yamasaki H. (2000): Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **355**, 1477-1488.

Yamasaki H., Cohen M.F. (2006): NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants. *TRENDS in Plant Science* **11**, 522-524.

Yang R., Chen H., Gu Z. (2011): Factors Influencing Diamine Oxidase Activity and γ -Aminobutyric Acid Content of Fava Bean (*Vicia Faba* L.) during Germination. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 11616-11620.

Yang L., Hong X., Xiao-xia W., Yun-cheng L. (2016): Effect of polyamines on seed of wheat under drought stress is related to changes in hormones and carbohydrates. *Journal of Integrative Agriculture* **15**, 2759-2774.

Yin Y., Yang R., Wu J., Gu Z. (2013): Partial purification, characterization and cDNA cloning of aminoaldehyde dehydrogenase in germinated soybean (*Glycine max* L.). *Eur Food Res Technol* **237**, 731-738.

Yu G.-H., Cho Y.D. (1997): Relationship between induced arginase activity and the level of free amino acids and polyamines in the excised embryonic axes of germinating soybean seeds. *J. Plant Physiol.* **153**, 226-229.

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.). *Int. J. Mol. Sci.* **22**:4602 <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/9/4602>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	absorbance
ABA	kyselina abscisová
ABAL	4-aminobutyraldehyd
ABI5	leucinový zipový transkripční faktor ABA Insensitive 5
ACC	kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová
ADC	arginindekarboxylasa
ADPG	ADP- α -D-glukosa
AIH	agmatiniminohydrolasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
AMADH	aminoaldehyddehydrogenasa
AMP	adenosinmonofosfát
APAL	aminopropylaldehyd
APX	askorbátperoxidasa
BSA	hovězí sérový albumin
CAO	amidooxidasa obsahující měď
CPA	N-karbamoylputrescinamidohydrolasa
c-PTIO	2-4-carboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
CuAO 8	copperaminoxidasa 8
CySNO	S-nitrosocystein
DAO	diaminooxidasa
DAP	„day after polination“
DAA	„day after anthesis“
DAP	1,3-diaminopropan
dcSAM	dekarboxylovaný S-adenosylmethionin
DTT	dithiotreitol
EPR	„elektrochemical potentiodynamic reactivation“
FW	„fresh weight“ – čerstvá váha
GA	gibereliny
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GAD	glutamátdekarboxylasa
GDH	glutamátdehydrogenasa
GlyCySNO	S-nitrosocysteinylglycin
GOGAT	glutamin-2-oxoglutarátaminotransferasa
GR	glutathionreduktasa
GS ⁻	glutathionylový radikál
GS	glutaminsyntetasa
GSH	glutathion
GSNHOH	N-hydroxysulfinamid
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSSG	glutathiondisulfid
HMM SNO	vysokomolekulární S-nitrosothiol
I	optická dráha
LEA	„late embryogenesis abundant protein“
LMM SNO	nízkomolekulární S-nitrosothiol
mETC	mitochondriální elektronový transportní řetězec
mg.ml ⁻¹	miligram na mililitr
mmol.l ⁻¹	milimol na litr
mRNA	mediátorová RNA
NED	N-(naftylethylen)diamid
Ni:NOR	vazebný membránový protein nitritreduktasa
NiR	nitritreduktasa
nkat.g ⁻¹	nanokatal na gram

nkat.mg ⁻¹	nanokatal na miligram
NO	oxid dusnatý
NOFNiR	NO-forming nitritreduktasa
NOS	NO-synthasa
NR	nitrátreduktasa
ODC	ornitindekarboxylasa
ONOO ⁻	peroxynitrit
PA	polyaminy
PAO	polyaminooxidasa obsahující FAD
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PPC2	proteinová fosfatasa 2
PS ⁻	thiolátový radikál
PTM	fotonásobič
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
PYR/PYL/RCAR	„pyrabactin resistance/PYR-like/regulatory components of ABA receptors“
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RuBisCo	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa
SAM	S-adenosylmethionin
SAMDC	S-adenosylmethionindekarboxylasa
-SH	thiolová skupina
SNO	S-nitrosothioly
SNP	nitroprussid sodný
SnRK1/2	proteinová kinasa 1/2
SOD	superoxiddismutasa
SPDS	spermidinsyntasa
SPMS	sperminsyntasa
t	čas
U	standartní jednotka enzymové aktivity
V	objem
w:v	hmotnost na objem
ε	extinkční koeficient
λ	vlnová délka