

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Analýza osemení hrachu hmotnostní spektrometrií s laserovou  
desorpční-ionizací**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce: Bc. Monika Cechová  
Studijní obor: Analytická chemie  
Vedoucí diplomové práce: doc.RNDr. Petr Bednář, Ph.D.  
Konzultant: Dr. Helena Margarida Saldanha, Ph.D.

**Olomouc 2015**

### **Zhrnutie:**

Cieľom tejto diplomovej práce bolo získať nové poznatky týkajúce sa problematiky dormancie semien na vybraných odrodách hrachu (*Pisum sativum*).

V teoretickej časti sú zhrnuté znalosti súvisiace s fyziologickou a fyzikálnou dormanciou vyskytujúcou sa u mnohých rastlinných druhov. Okrem toho teoretická časť obsahuje prehľad možných chemických zlúčenín, ktoré sa môžu vyskytovať v semenách, respektíve v osemeni a jeho jednotlivých vrstvách. Nechýba v nej ani vysvetlenie princípu použitej metódy analýzy prípadne jej význam v analýze biologických povrchov. Experimentálna časť bola zameraná na štúdium osemenia troch dormantných a troch nedormantných odrôd hrachu pomocou hmotnostnej spektrometrie s laserovou desorpciou/ionizáciou. Merania boli prevádzané s natívnymi vzorkami osemenia, taktiež s použitím matric, prípadne bez použitia matric.

Bolo zistené, že spojenie MALDI-MS analytickej techniky s vhodnými štatistickými analýzami dokáže byť účinným nástrojom na nájdenie širokej škály markerov, ktoré sú charakteristické buď len pre dormantné typy osemenia hrachu, alebo aj pre nedormantné osemenia.

### **Kľúčové slová:**

Dormancia, dormancia semien, fyziologická dormancia, fyzikálna dormancia, rastlinné hormóny, hrach, *Pisum sativum*, stavba osemenia, analýza osemenia, kutín, suberín, lignín, pektínové polysacharidy, MALDI, hmotnostná spektrometria, PCA analýza.

***Summary:***

The aim of this study was to obtain new knowledge about seed dormancy of the chosen pea species (*Pisum sativum*).

The summary of information about physiological and physical dormancy, which is typical for many plant species, is in the introduction part of this study. Furthermore, there are mentioned various chemical compounds occurring in seeds or in the particular seed coat layers. There is also principle explanation of the analytical method used in this study and its importance in direct biological surface analysis. The experimental part is focused on seed coat analysis in three dormant and three nondormant types of pea using the mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption/ionisation. Measurements were realised using the native seed coat as samples with or without matrix solution.

It is shown that MALDI-MS as analytical method in connection with suitable statistic tool provides possibility in various marker searching which are typical either in dormant seed coat or just in nondormant seed coat.

***Keywords:***

Dormancy, seed dormancy, physiological dormancy, physical dormancy, plant hormones, pea, *Pisum sativum*, seed coat structure, seed coat analysis, cutin, suberin, lignin, pectic polysaccharides, MALDI, mass spectrometry, PCA analysis.

Prehlasujem, že som túto prácu vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú v zozname použitej literatúry.

Súhlasím s tým, že je práca prezenčne prístupná v knižnici Katedry analytickej chémie, Prírodovedeckej Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dňa 24.4.2015

.....  
Monika Cechová

**„All the flowers of all the tomorrows are  
in the seeds of today“**

(Indian proverb)

Týmto by som sa chcela vrúcne poďakovať pánovi doc.RNDr.Petru Bednářovi, PhD. za vedenie diplomovej práce, pomoc, cenné rady a pripomienky, rovnako ako aj za obrovskú trpezlivosť a priateľskú atmosféru pri práci. Ďakujem aj pánu Ing.Petru Smýkalovi, PhD. za poskytnutie dostatočného množstva materiálu na analýzy, ochotným pracovníkom z Biofyzikálneho ústavu AV ČR v Brne za možnosť využitia laserovej mikrodisekcie a všetkým členom Katedry analytickej chémie v Olomouci za ich ústretovosť a ochotu. Vďaka za podporu pri písaní práce a počas celého štúdia chcem týmto vyjadriť aj mojej rodine a priateľovi.

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	1
<b>2. Teoretická časť</b> .....	2
2.1. Úvod do problematiky dormancie rastlín .....	2
2.1.1. Dormancia vyskytujúca sa u rastlinných semien.....	2
2.1.2. Typy dormancie semien.....	3
2.1.3. Fyzikálna dormancia semien .....	4
2.1.4. Fyziologická dormancia semien .....	6
2.1.4.1. Kyselina abscisová .....	6
2.1.4.2. Giberelíny.....	8
2.1.4.3. Brasinosteroidy.....	11
2.1.4.4. Etylén .....	13
2.1.4.5. Iné nízkomolekulárne látky: zlúčeniny dusíka.....	13
2.2. Hmotnostná spektrometria .....	14
2.2.1. História hmotnostnej spektrometrie .....	14
2.2.2. Princíp hmotnostného spektrometru.....	14
2.2.3. Inštrumentácia MS: Zabezpečovanie vákua .....	15
2.2.4. Inštrumentácia MS: Iónové zdroje .....	15
2.2.5. Inštrumentácia MS: Hmotnostné analyzátory .....	16
2.2.6. Inštrumentácia MS: Detektory v MS.....	17
2.2.7. MALDI- TOF-MS .....	18
2.2.8. Hmotnostná spektrometria v analýze povrchov rastlinných materiálov .....	19
2.3. Všeobecná štruktúra a chemické zloženie semien strukovín.....	20
2.3.1. Základná biologická funkcia a stavba osemenia .....	22
2.3.2. Kutikula .....	22
2.3.2.1. Štruktúra kutínu a kutánu .....	24
2.3.3. Charakteristika jednotlivých bunkových vrstiev osemenia.....	26
2.3.4. Chemické zloženie osemenia .....	26
2.3.4.1. Fenolické zlúčeniny.....	26
2.3.4.2. Lignín a suberín.....	28
2.3.4.3. Polysacharidy .....	30
<b>3. Praktická časť</b> .....	<b>33</b>

3.1.	Použité prístroje a chemikálie.....	33
3.2.	Príprava matric a kalibračného roztoku pre MALDI-MS analýzu .....	33
3.3.	Príprava vzoriek a postup pri MALDI-MS analýze.....	33
3.4.	Podmienky analýzy pri full MS skanoch osemnia.....	35
3.5.	Prehľad získaných hlavných MALDI-MS analýz .....	36
<b>4.</b>	<b>Diskusia a výsledky .....</b>	<b>37</b>
4.1.	Počiatkové MALDI-MS analýzy osemnia .....	37
4.2.	Analýza hlavných komponent .....	39
4.2.1.	Meranie prevedené s matricou a v negatívnom móde .....	39
4.2.2.	Analýza hlavných komponent a jej zhrnuté výsledky u ďalších typov meraní ..	44
4.3.	Výsledky získané pre dormantnú odrodu JI 64 a nedormantnú JI 92.....	46
4.3.1.	Analýza osemnia JI64 a JI92 v negatívnom móde s použitím matrice.....	48
4.3.2.	Analýza osemnia JI64 a JI92 v negatívnom móde bez použitia matrice.....	61
4.4.	Výsledky z hexán-petroléterový extraktov .....	63
4.5.	Laserová mikrodisekcia osemnia .....	65
<b>5.</b>	<b>Záver.....</b>	<b>67</b>
	<b>Citovaná literatúra .....</b>	<b>68</b>
	<b>Zoznam obrázkov, schém, grafov a tabuliek .....</b>	<b>73</b>
	<b>Použité skratky .....</b>	<b>76</b>

## 1. Úvod

Klíčenie semien je dôležitý a nenahraditeľný krok, ktorý zabezpečuje pokračovanie existencie rastlinných druhov v rozmanitých biotopoch. U semien niektorých rastlinných druhov sa vyskytuje dormancia, teda obdobie, kedy životaschopné semienko aj napriek vhodným okolitým podmienkam nevstupuje do fázy klíčenia. V rastlinnej ríši sa jedná o prirodzene vyskytujúci sa jav a často krát sa práve vďaka dormancii predchádza zániku rastlín aj v nepriaznivých vonkajších podmienkach. U divokých druhov rastlín sa preto táto fáza nedá považovať za nevýhodu. Dormancia býva nežiaduca u semien poľnohospodárskych plodín, od ktorých sa požaduje rýchle a jednotné klíčenie so zámerom získania veľkej úrody. Problematike dormancie semien je k dnešnému dňu venovaných viac ako 700 prác<sup>1</sup>.

Na základe genetických a biochemických štúdií je v literatúre klasifikovaných niekoľko typov dormancie rastlinných semien. Na tento úkaz u semien sa dá pozeráť tiež z morfológického, fyziologického a fyzikálneho pohľadu. Dormancia môže byť teda dôsledkom morfológickej stavby semien, pôsobenia niektorých rastlinných hormónov, či nepriepustnosti niektorých látok cez vonkajší obal semena k zárodku.

Táto práca je zameraná na analýzu osemenia hrachu (*Pisum sativum*) šiestich vybraných odrôd pomocou hmotnostnej spektrometrie s MALDI ionizačnou technikou s účelom nájsť ďalšie látky - markery, ktoré by mohli byť zodpovedné za tento fenomén. Pri analýze osemenia odrody VIR 320 bola využitá aj laserová mikrodisekcia. Vďaka nej boli získané hmotnostné spektrá aj z priečného rezu osemením.



## 2. Teoretická časť

### 2.1. Úvod do problematiky dormancie rastlín

Rastliny patria k nezastupiteľnej súčasť každého ekosystému nachádzajúceho sa od polárnych oblastí až po rovník našej planéty. Fotosyntézou a ako zdroj výživy sa stali esenciálnymi pre heterotrofné živočíchy a človeka, preto je ich štúdium vždy prínosné. Táto práca sa zaoberá štúdiom problematiky spojenej s dormanciou semien vyšších rastlín predovšetkým z chemického hľadiska.

Vyššie rastliny sú eukaryotické organizmy s relatívne zložitým životným cyklom. Zaujímavým a prirodzeným aspektom pri ontogenetickom vývoji rastliny býva stav označovaný ako obdobie vegetačného pokoja, teda obdobie dormancie (z lat. *dormans*, spiaci). Fáza, kedy rastlina prechádza do stavu dormancie sa môže v jej životnom cykle aj viac krát opakovať. Viaceré štúdie poukazujú, že dormancia je riadená geneticky a vyskytuje sa aj pri orgánoch akými sú semená, či kvetné púčiky, prípadne aj niektoré rastlinné hľúzy.

#### 2.1.1. Dormancia vyskytujúca sa u rastlinných semien

Správne načasovanie klíčenia semien a teda ich prekonanie vegetačného pokoja je jedným z kľúčových krokov v živote rastliny, pretože sa jedná o ireverzibilný biologický proces. Fáza dormancie semien je teda nástrojom prírody, vďaka ktorému sa minimalizuje riziko zániku rastliny, a tým aj v extrémnom prípade riziko zániku celého rastlinného druhu pri pôsobení nepriaznivých vonkajších enviromentálnych podmienok, za ktoré sa pokladajú zmeny spojené s vlhkosťou, teplotné zmeny, nedostatok svetla, či prítomnosť niektorých chemických látok v pôde<sup>2</sup>. U semien divokých rastlinných druhov je dormancia prirodzene vyskytujúci sa jav. Okrem vyššie spomenutého zníženia rizika úhynu rastliny dormancia zaisťuje schopnosť druhov prekonať prírodné katastrofy, či bráni klíčaniu semien počas nevhodnej doby. Rastlinám sa tak poskytuje účinný mechanizmus na zastavenie klíčenia do doby, kedy vonkajšie podmienky začnú byť opäť priaznivé. Pravdepodobne sa vďaka tomuto javu znižuje tiež kompetícia medzi rastlinami rovnakého druhu v rámci jedného stanovišťa<sup>3</sup>. Naopak u semien kultúrnych plodín sa dá pozorovať rýchle a jednotné klíčenie všetkých zasadených semien. Fáza dormancie sa u tohto typu semien považuje za nežiaduci stav, pretože dokáže ovplyvniť rozsah úrody a efektívnosť (ekonomiku) poľnohospodárskej produkcie.

Fenoménom dormancie semien sa vo svojej práci zaoberal aj Harper (1957), v ktorej rozdelil semená rastlín na tie, ktoré sa vyvíjajú ako dormantné, na tie, ktoré dormanciu počas vývinu nadobudnú a na tie, ktorým sa vnúti táto vlastnosť napríklad v dôsledku pretrvávajúcich nízkych teplôt<sup>4-5</sup>. V biologických odboroch sa prevádza meranie dormancie ako počet semien, ktorý ostáva v študovanej populácii semien inaktívny (obyčajne sa vyjadruje v percentách). Tieto dáta sú veľmi cenné v mnohých oblastiach vedy aj praxe.

### **2.1.2. Typy dormancie semien**

Začiatočnou fázou životného cyklu rastliny je klíčenie semien. Tento proces vyžaduje, aby rastlinné embryo opustilo pokojové štádium, zmobilizovalo uložené živiny a prekonallo mechanickú bariéru okolitých pletív obalu semena. Zároveň je nutné, aby neustále pokračovalo bunkové delenie a elongácia. Ak je pozastavený niektorý z týchto procesov, semeno sa môže ocitnúť vo fáze vegetačného pokoja.

K dnešnému dňu bolo definovaných niekoľko typov dormancie semien<sup>2-6</sup>:

- *Fyziologická*
- *Morfologická*
- *Morfologicko-fyziologická*
- *Fyzikálna*
- *Kombinovaná*

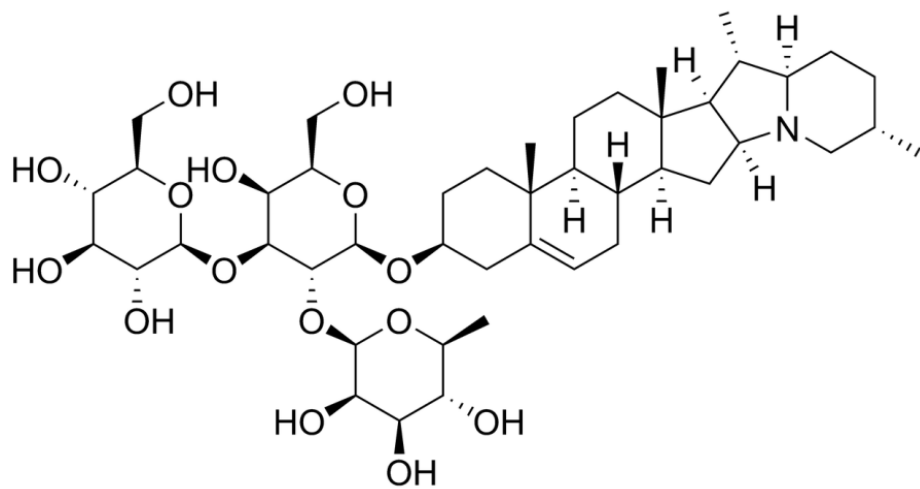
Zvyčajne sa efekt rôznych typov dormancie združuje a počas procesu bobtnania a klíčenia semena prelína. Okrem exogénnych podmienok na ňu vplyvajú aj endogénne signály, ktoré sú podmienené genetickými faktormi a prejavujú sa vzájomnými synergistickými a kompetitívnymi efektmi. Je známe, že u mnohých typov semien sa dá obdobie vegetačného pokoja ovplyvniť skarifikáciou osemenia (tj. jeho narušením), či spôsobom uskladnenia semien po ich dozretí. V niektorých prípadoch sa dá táto pokojová fáza prekonať inkubáciou semien v chladných a vlhkých podmienkach. Tento proces sa nazýva stratifikácia.

Úroveň dormancie v rámci semien získaných z jednej materskej rastliny sa môže podstatne odlišovať. Vzhľadom na zameranie tejto práce na fyzikálnu a chemickú podstatu dorman-

cie v tejto práci bude v nasledujúcich kapitolách bližšie popísaný len princíp fyzikálneho a fyziologického typu dormancie semien.

### **2.1.3. Fyzikálna dormancia semien**

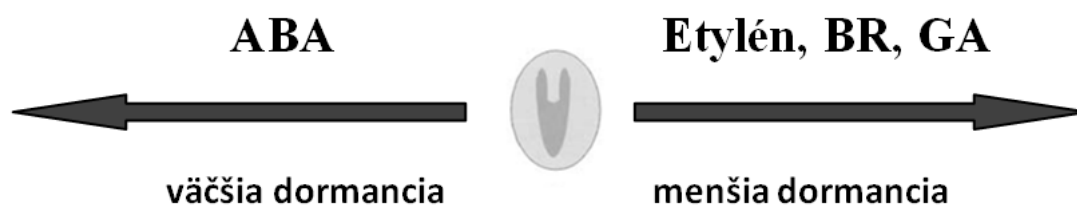
Fyzikálna dormancia patrí k základným typom dormancie semien. Často krát sa označuje aj ako exogénny typ. Jej princíp nesúvisí s látkami produkovanými metabolizmom rastliny, ani s reakciami prebiehajúcimi pri dozrievaní semien. Fyzikálna forma dormancie semien súvisí so stavbou a zložením osemenia, ktoré bráni absorpcii vody a kyslíka a ich prieniku k embryu semena. Často hrá významnú úlohu u semien strukovín. Uvádza sa, že je charakteristická aj pre semená rastlín rastúcich v suchých biotopoch, prípadne v biotopoch, kde sú časté požiare, či extrémne výkyvy teplôt. Je dôležitá v súvislosti s austrálskymi drevnatými rastlinami ako sú eukalypty, či inými semenami austrálskych ihličnatých stromov. Narušiť fyzikálnu dormanciu u niektorých druhov rastlinných semien pomáha pôdna abrázia, prípadne cesta semien cez tráviaci trakt vtákov alebo cicavcov<sup>7-8</sup>. Nepriepustnosť osemenia voči vode a plynom je spôsobená prítomnosťou jednej alebo viacerých palisádových vrstiev lignifikovaných buniek – makroskleroidov, ktoré bývajú naúzko vedľa seba naskladané a impregnované vodeodolnými chemickými zlúčeninami<sup>9</sup>. Suberín a lignín bývajú prítomné v osemení mnohých strukovín. Ich bližšia charakteristika bude uvedená v jednej z ďalších kapitol venovanej chemickému zloženiu semien. Aj u tohto typu dormancie sa dá nájsť niekoľko prací zameralých na objasnenie jej genetickej podstaty a kontroly nepriepustnosti osemenia. Už v roku 1975 sa zistilo, že za hrúbku a tvrdosť osemenia bavlníku sú zodpovedné dva gény, rovnako ako u osemenia fazule a šošovice. Ich bližšia špecifikácia však presahuje rámec práce. Nepriepustnosť osemenia pre plyny môže mať na svedomí mucinózna vrstva u niektorých semien, ktorá tak vytvára bariéru predlžujúcu dobu difúzie kyslíka smerom k embryu. V niektorých osemeniach boli nájdené látky, ktoré môžu spotrebovať kyslík do takej miery, že sa v konečnom dôsledku nedostane k embryu. Medzi tieto látky patrí celý rad fenolických zlúčenín, ktoré môžu podliehať oxidácii na príslušné chinóny. Redukcia kyslíka v osemení môže byť zvýšená aj prítomnosťou enzýmov peroxidáz. V neposlednom rade môžu všeobecne permeabilitu osemenia ovplyvňovať aj látky nazývané saponíny<sup>9</sup>. Príkladom je saponín solanín so štruktúrou uvedenou na *Obrázku 1*.



Obrázok 1: Štruktúra solanínu<sup>9</sup>

#### 2.1.4. Fyziologická dormancia semien

**Fyziologická dormancia** je najviac prevládajúca forma dormancie z typov, ktoré boli spomenuté v predchádzajúcej kapitole. Býva regulovaná rastlinnými hormónmi (fytohormónmi), prípadne inými malými molekulami. Fytohormóny sú syntetizované v niektorých pletivách a dokážu v malých koncentráciách regulovať rast a ovplyvňovať vývoj rastliny. K rastlinným hormónom so stimulačným rastovým účinkom patria **auxíny**, **giberelíny** a **cytokyníny**. K rastovým hormonálnym inhibítorm sa radí **kyselina abscisová** a **etylén**. Vzájomným účinkom vyššie uvedených hormónov sa môžu regulovať procesy súvisiace s kľúčením semien<sup>10</sup>. Účinok jednotlivých fytohormónov na vegetačný pokoj semien výstižne znázorňuje *Obrázok 2*:



*Obrázok 2: Účinok vybraných fytohormónov v rastlinnom semene<sup>11</sup>*

*(ABA - kyselina abscisová, BR - brasinosteroidy, GA - giberelíny)*

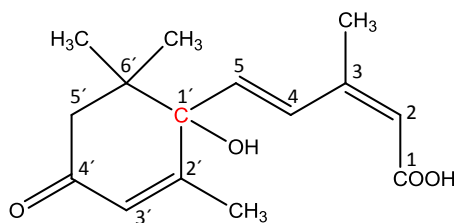
##### 2.1.4.1. Kyselina abscisová

O výskyte kyseliny abscisovej v rastlinách sa vie už takmer 70 rokov. Táto látka bola po prvý krát identifikovaná a izolovaná v 60. rokoch 20. storočia z plodu bavlníku, kde ju označili ako „abscisín II“ a z listov platanového stromu, kde vystupovala pod názvom „dormin“<sup>12</sup>. Kyselina abscisová (ABA) je látka zaradovaná k fytohormónom, ktorých primárnou úlohou je regulácia (inhibícia) procesu kľúčenja semien. Jedná sa teda o látku navodzujúcu u rastlín a ich semien stav vegetačného pokoja. Vyskytuje sa vo všetkých častiach rastlinného tela, avšak najvyššiu hladinu kyseliny abscisovej majú mladé pletivá. Táto látka riadi aj dozrieva-

nie embrya, bunkovú elongáciu a odpovede rastlín a semien na vonkajší stres ako je sucho, zmena salinity pôdy, chlad, patogénne útoky mikroorganizmov, či zmenu svetla<sup>13</sup>.

Kyselina abscisová sa do semien dostáva z materskej rastliny počas ich vzniku a vývinu, avšak v semenách sa syntetizuje aj v priebehu obdobia ich neskoršieho dozrievania v embryu a endospermu. Jej koncentrácia v bunkách je geneticky regulovaná a ovplyvňuje ju aj metabolická rovnováha podmienená aktuálnym stavom semena. Za zaujímavý poznatok, ktorý priniesli niektoré práce, sa dá pokladať to, že kyselina abscisová produkovaná len parentálnym pletivom, prípadne ABA dodaná semienku exogénne, nepostačuje na indukciu dormancie u daného semena<sup>3</sup>. Kyselina abscisová je syntetizovaná nielen vyššími rastlinami, ale aj niektorými fytopatogénnymi hubami alebo baktériami<sup>11</sup>.

Z chemického hľadiska sa jedná o slabú jednosýtnu kyselinu ( $pK_a = 4,8$ ) so seskviterpenoidnou štruktúrou. V molekule vystupuje jeden asymetrický uhlík v pozícii C-1' a vďaka jeho prítomnosti sa jedná o opticky aktívnu látku. Kyselina abscisová býva v apoplastických častiach (tj. v medzibunkových priestoroch, prípadne v častiach medzi bunkovou stenou a cytoplazmatickou membránou buniek) prítomná prevažne v nenabitej forme. Vo forme aniónu sa nachádza v alkalických častiach bunky (napríklad v chloroplastoch)<sup>12</sup>. Jej štruktúra a číslovanie je zobrazené na *Obrázku 3*.



*Obrázok 3: Štruktúra a číslovanie kyseliny abscisovej<sup>12</sup>*

V prírode sa vyskytuje ako S-(+)-ABA s geometrickou izomériou 2-*cis* a 3-*trans* na bočnom reťazci. Kyselina abscisová s konfiguráciou 2-*trans* a 3-*trans* je biologicky neaktívna<sup>12-14</sup>.

ABA býva vo vyšších rastlinách syntetizovaná v plastidoch (chloroplastoch) z prekursorových molekúl karotenoidov. Z  $\beta$ -karoténu vzniká metabolickými reakciami ďalší

karotenoidový intermediát zeaxanthín, ktorý je pomocou zeaxanthín epoxidázy konvertovaný na *trans*-violaxanthín a z neho čiastočne účinkom neoxanthín syntetázy vzniká *trans*-neoxanthín. *Trans*-violaxanthín a *trans*-neoxanthín sú prevedené na ich *cis*-formy. Tie sa účinkom deoxygenázy NCED rozštiepia na xanthoxín s 15 atómami uhlíka a z neho sa priamo syntetizuje tiež 15 uhlíková kyselina abscisová<sup>12-13</sup>. Niektorými metabolickými dráhami môže kyselina abscisová interagovať s glukózou za vzniku komplexu ABA-Glc alebo sa môže od-búravať na kyselinu fazeovú, prípadne na kyselinu dihydrofazeovú<sup>12-15</sup>.

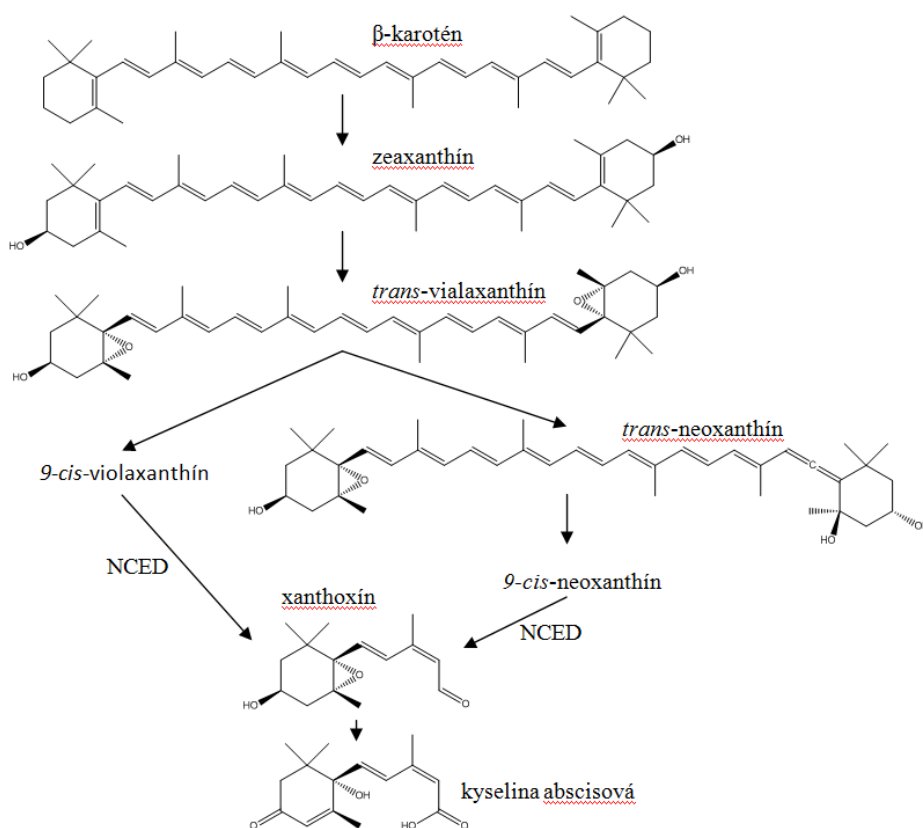


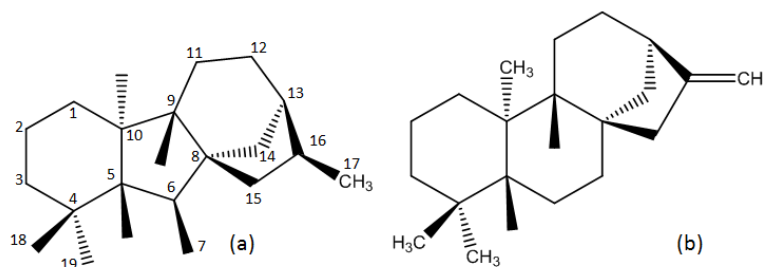
Schéma I: Zjednodušené schéma biosyntézy kyseliny abscisovej

#### 2.1.4.2. Gibberelíny

Giberelíny (GA) všeobecne tvoria rozsiahlu rodinu asi 130 tetracyklických diterpénov. Len malú podmnožinu z nich tvoria giberelíny, ktoré vystupujú ako aktívne rastlinné hormóny<sup>16</sup>. Tieto látky stimulujú klíčenie u mnohých rastlinných druhov tak, že navodzujú účinok hydrolytických enzýmov, ktoré vedia oslabiť bariéru pletiva tvoriaceho endosperm alebo

osemenie. Okrem toho, v semenách podporujú mobilizáciu uskladnených zásob a rast embrya<sup>3</sup>.

Základnou štruktúrnou jednotkou je giberelanový skelet<sup>17</sup> znázornený aj s jeho číslovaním na *Obrázku 4a*. Giberelíny obsahujúce vo svojej štruktúre 20 uhlíkových atómov sa označujú ako C<sub>20</sub>-GAs. Konkrétne zlúčeniny sa rozlišujú číselným indexom v pravom dolnom rohu (napríklad kyselina giberelínová má označenie GA<sub>3</sub>).



*Obrázok 4: Giberelanová štruktúra (a) a štruktúra ent-kaurénu (b)*

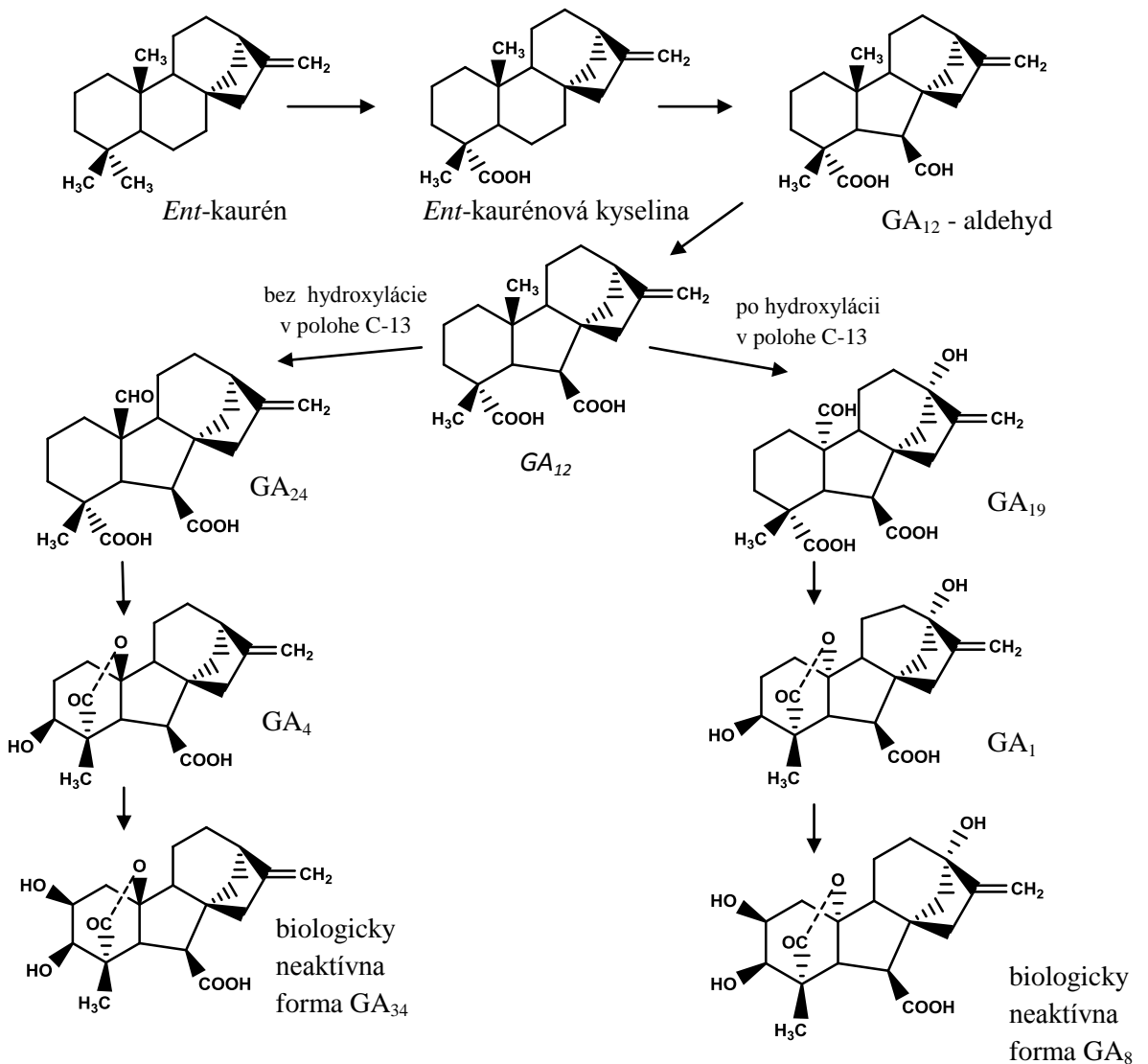
Biosyntéza giberelínov prebieha v plastidoch (chloroplastoch) rovnako ako biosyntéza vyššie uvedenej kyseliny abscisovej. Počiatočná fáza biosyntézy týchto látok, kedy do reakcie vstupuje izopentenylidifosfát, respektíve geranylgeranylidifosfát, je dokonca totožná s počiatočnou fázou biosyntézy kyseliny abscisovej. Z geranylgeranylidifosfátu následne cez medziprodukt vzniká prekursor giberelínov *ent*-kaurén<sup>18</sup> (*Obr.4b*). Ďalšia fáza biosyntézy pokračuje v endoplazmatickom retikulu, kde z *ent*-kaurénu vzniká *ent*-kaurénová kyselina, ktorá je následne konvertovaná na giberelín GA<sub>12</sub>. Z GA<sub>12</sub> (C<sub>20</sub>-GA<sub>12</sub>) následne v cytosole prebieha cez sériu ďalších giberelínových medziproduktov vznik niektorých biologicky aktívnych giberelínov. V tejto fáze vznikajú napríklad GA<sub>4</sub> a GA<sub>1</sub> (19C-GA<sub>1,2</sub>). Tie môžu v ďalších fázach metabolizmu prechádzať na inaktívne formy. Medzi biologicky najaktívnejšie giberelíny patrí menovite GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> a GA<sub>7</sub>. K ich spoločným vlastnostiam patrí to, že sa jedná o 4,10-laktóny, ktoré majú v pozícii C-6 karboxylovú skupinu, v pozícii C-3 v β-orientácii je prítomná hydroxylová skupina, ktorá naopak chýba v pozícii C-2. V kyseline giberelínovej GA<sub>3</sub> a v GA<sub>7</sub> je prítomná ešte aj dvojitá väzba medzi atómami uhlíka C-1 a C-2, ktorá im v porovnaní s giberelínmi GA<sub>1</sub> a GA<sub>4</sub> so štruktúrou bez násobnej väzby v rovnakých polohách



zosilňuje biologickú aktivitu. Prítomnosť násobnej väzby bráni metabolickej deaktivácii hydroxylačnými reakciami.

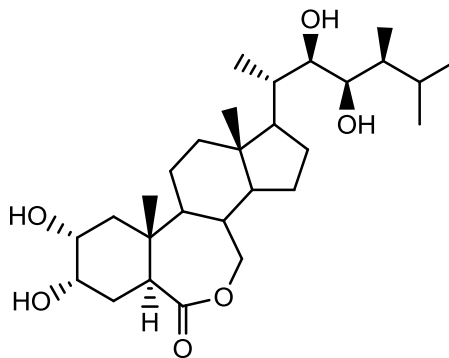
Giberelíny môžu taktiež v ďalších fázach metabolizmu interagovať so sacharidmi, najčastejšie s glukózou za vzniku GA-O-glukozidu (interakcia cez hydroxy skupinu) alebo za vzniku GA-glukozyléteru (ak sa do reakcie zapojí karboxy skupina v polohe C-6). Avšak tieto zlúčeniny nevykazujú žiadnu biologickú aktivitu v rastlinách.

Schéma II: Biosyntéza giberelínov<sup>19</sup> GA<sub>4</sub> a GA<sub>1</sub>



#### 2.1.4.3. *Brasinosteroidy*

K ďalšej skupine fytohormónov, ktoré sa podieľajú na regulácii dormancie semien a ovplyvňujú ich klíčenie sú brasinosteroidy (BRs). Zapájajú sa tiež do predlžovania stoniek a rozbaľovania listov rastlín<sup>20</sup>. Jedná sa o polyhydroxylované deriváty odvodené od sterolu, ktoré sa štruktúrne veľmi podobajú na živočíšne steroidné hormóny – glukokortikoidy, aldosterón, testosterón, progesterón, či estrogén. V súčasnej dobe je identifikovaných viac ako 40 brasinosteroidov<sup>21</sup>, ktoré sa vyskytujú v rozličných častiach rastlín, vrátane peľu, semien, listov, stoniek, koreňov a ďalších mladých vegetatívnych pletív<sup>22</sup>.



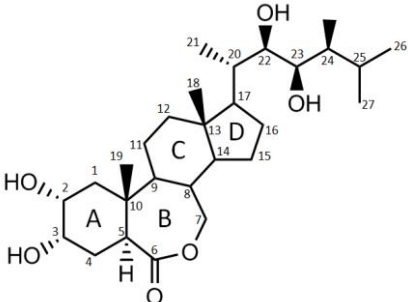
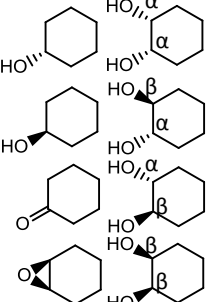
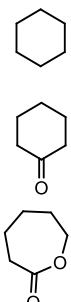
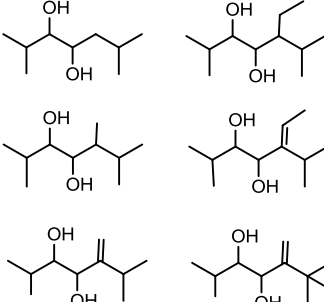
Obrázok 5: Štruktúra fytohormónu brassinolidu

Prvým identifikovaným brasinosteroidom bola 28 uhlíková zlúčenina, ktorá bola nazvaná ako brassinolid (*Obr.5*). Brasinolid bol izolovaný z rastliny *Brassica napus* a jeho štruktúra bola určená pomocou EI-MS, FAB-MS, NMR a metódou RTG difrakcie. Brasinolid je z pomedzi všetkých brasinosteroidov najviac aktívnou zlúčeninou a vzniká sériou redukcií, hydroxylácií a oxidácií z membránového sterolu – kampesterolu<sup>23</sup>.

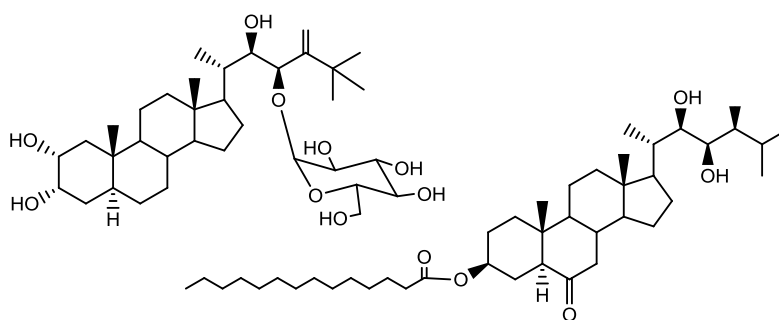
Vlastnosti brasinosteroidov závisí od typu substituentov na A a B kruhu, či na substituentoch naviazaných na bočnom reťazci. Pozície na A kruhu môžu byť substituované ako hydroxylovými skupinami v polohe  $\alpha$  alebo  $\beta$ , tak aj keto skupinou. Literatúra uvádza, že brasinosteroidy s vicinálnymi hydroxylovými skupinami v polohách C-2 $\alpha$  a C-3 $\alpha$  na A kruhu sú najviac biologicky aktívne hormóny. Poradie klesajúcej biologickej aktivity je nasledujúce 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ →2 $\alpha$ ,3 $\beta$ →2 $\beta$ ,3 $\alpha$ →2 $\beta$ ,3 $\beta$ . V súvislosti s B kruhom sa delia brasinosteroidy na 7-oxalaktóny, 6-ketóny a príslušné 6-deoxoderiváty. Z vymenovaných skupín sa najvyššou

biologickou aktivitou vyznačujú práve 7-oxalaktóny, potom nasledujú 6-ketóny a za nimi 6-deoxoderiváty<sup>22</sup>.

Tabuľka 1: Štruktúra a číslovanie brasinolidu a prehľad substituentov prítomných v brasinosteroidoch

Štruktúra a číslovanie brasinolidu <sup>24</sup>	Substituenty na A kruhu	Substituenty na B kruhu	Substituenty na bočnom reťazci
			

Ani brasinosteroidy nie sú výnimkou v interakciách so sacharidmi. Okrem toho sa zistili zlúčeniny týchto látok s vyššími masťnými kyselinami (kyselinou myristylovou a laurovou)<sup>22</sup>. Príklady kondenzačných produktov brasinosteroidov s glukózou a kyselinou myristovou sú uvedené na nasledujúcom *Obrázku 6*:



Obrázok 6: 23-O-glykopyranozyl-25-metyldolichosteron a teasteron-3-myristát<sup>22</sup>

#### **2.1.4.4. Etylén**

Etylén predstavuje najjednoduchší fytohormón s inhibičnými vlastnosťami na rast rastliny. Ovplyvňuje dormanciu skrz interakcie s kyselinou abscisovou.

#### **2.1.4.5. Iné nízkomolekulárne látky: zlúčeniny dusíka**

Experimenty s jednoduchými zlúčeninami dusíku, akými sú dusitany a dusičnany, oxid dusičitý, amoniak, azidy, či kyanidy, preukázali, že tieto látky dokážu ovplyvniť obdobie dormancie u semien. Zvýšená prítomnosť dusičnanov v priebehu vzniku semien u materskej rastliny vedie k zníženiu dormancie. Oxid dusný patrí do signalizačnej siete spojenej s riadením aktivity semena pri klíčení. Zvýšením obsahu týchto dusíkatých zlúčenín vo vonkajších podmienkach sa znížila alebo úplne zredukovala dormancia semien, či zfn, u rastlín *Arabidopsis thaliana*, u jačmeňa (*Hordeum vulgare*), u rastlín *Paulownia tomentosa* a *Lectuca sativa*<sup>25</sup>.

## **2.2. Hmotnostná spektrometria**

### **2.2.1. História hmotnostnej spektrometrie**

Začiatok hmotnostnej spektrometrie je spojený s výskumom britského fyzika Josepha J. Thomsona, ktorý koncom 19. storočia skúmal pohyb nabitých častíc v elektrickom a magnetickom poli. V spolupráci s Francisom W. Astonom (konštruktérom prvého hmotnostného spektrografu) zaznamenal prvé hmotnostné spektrá molekúl (s použitím fotografickej dosky ako detektoru). Počas druhej svetovej vojny bola hmotnostná spektrometria použitá v projekte „Manhatan“ pri výrobe atómovej bomby, pretože dokázala vyriešiť problém so separáciou izotopov uránu<sup>26</sup>. Vďaka naštartovanému ropnému priemyslu sa stala súčasťou mnohých komerčných laboratórií, ktoré ju využívali na analýzu plyných látok. Dôležitými medzníkmi v hmotnostnej spektrometrii boli práce Mc Laffertyho, Beynona a Biemanna, ktoré popísali priebeh a charakter štiepenia organických látok v závislosti od prítomnosti funkčných skupín v ich molekulách. To prinieslo nové možnosti pre použitie hmotnostnej spektrometrie v štruktúrnej analýze látok<sup>27, 28-29</sup>. V druhej polovici 20. storočia sa hmotnostné spektrometre začali spájať s plynovou a kvapalinovou chromatografiou, čo bolo veľkým prínosom pre analýzy zložitých organických zmesí. Rozšírenie aplikačných možností išlo ruka v ruke s novými ionizačnými technikami. V roku 2002 bola udelená Nobelova cena J. Fennovi za dnes jednu z najpoužívanejších ionizačných techník - elektrosprej a tiež aj Koichimu Tanakovi za MALDI techniku. Okrem ionizačných techník vývoj neobišiel ani jednotlivé hmotnostné analyzátory. V prvej polovici 20. storočia bol skonštruovaný sektorový analyzátor s dvojitou fokusáciou a následne TOF analyzátor. V 50. rokoch sa stal súčasťou hmotnostnej spektrometrie aj kvadrupól a iónová pasca, po ktorých nasledovala iónová cyklotrónová rezonancia a v roku 1999 aj analyzátor Orbitrap. Vďaka všetkým týmto udalostiam má dnes svet v rukách v podobe hmotnostnej spektrometrie veľmi presný a účinný analytický nástroj na stanovenie molekulovej hmotnosti a štruktúry širokej palety anorganických a organických látok.

### **2.2.2. Princíp hmotnostného spektrometru**

Meranie hmotnostným spektrometrom zahŕňa ionizáciu analytu v iónovom zdroji, separáciu iónov v hmotnostnom analyzátore podľa ich pomeru hmotnosti k náboju ( $m/z$ ) a ich detekciu. Ionizácia prebieha buď pri atmosférickom tlaku alebo pri tlaku zníženom. Separácia

iónov v analyzátoch a detekcia prebieha za vysokého vákuu. Výstupom analýzy je hmotnostné spektrum. Jeho kvalita a informácie, ktoré sa z neho môžu získať, závisia predovšetkým od typu analytu a podmienok, za ktorých bol ionizovaný, teda od použitého iónového zdroja a od parametrov hmotnostného analyzátoru a typu detektora. Okrem základných hmotnostných spektier (spektier prvého rádu) vie táto metóda poskytnúť aj fragmentačné (produktové) spektrá získané štiepením vybraného materského iónu kolíznymi zrážkami inými časticami (zvyčajne molekulami). Fragmentačné spektrá sú veľmi užitočné pri určovaní štruktúry látok.

### 2.2.3. Inštrumentácia MS: Zabezpečovanie vákuu

Jednou z podmienok analýzy v hmotnostnej spektrometrii je prítomnosť vákuu v hmotnostnom analyzátoch, detektore a tiež pri niektorých ionizačných zdrojoch, ako to bolo spomenuté vyššie. Vákuum umožňuje obmedziť alebo eliminovať neželané vzájomné kolízie medzi iónmi analytu, prípadne medzi iónmi analytu s molekulami plynu. Vákuum v týchto častiach prístroja zabezpečujú výkonné vákuové čerpadlá a turbomolekulárne pumpy pracujúce systémom postupného znižovania tlaku<sup>30</sup>.

### 2.2.4. Inštrumentácia MS: Iónové zdroje

V súčasnej dobe existuje celý rad iónových zdrojov, ktoré sa líšia jednak princípom ionizácie, parametrami a konštrukčným prevedením. Voľba vhodného iónového zdroja sa odvíja od typu analyzovaných vzoriek.

Ďalej je uvedený prehľad základných princípov ionizácie:

- **Ionizácia elektrónom (EI)** – patrí k najstarším spôsobom ionizácie látok a je typická pre spojenie MS s plynovou chromatografiou. Jej princípom sú interakcie vysokoenergetického elektrónu emitovaného z rozžhaveného vlákna s neutrálnou molekulou analytu v plynnej fáze za vzniku iónu.
- **Chemická ionizácia (CI)** – je založená na prenose náboja z ionizovaného plynu na analyt. Obdobou je *chemická ionizácia za atmosférického tlaku (APCI)*, ktorá nevyžaduje vákuum. Používa sa najčastejšie v spojení s kvapalinovou chromatografiou.

- **Fotoionizácia za atmosférického tlaku (APPI)** – analyt v plynnom stave interaguje s fotónom, pričom dochádza k fotoexcitácii molekuly a následne k jej ionizácii<sup>31</sup>.
- **Desorpcia/ionizácia poľom (FD,FI)** – k ionizácii analytu sa používa elektrické pole.
- **Ionizácia urýchlenými atómami (FAB)** – analyt v kondenzovanej fáze je bombardovaný atómami Ar alebo Xe s veľkou kinetickou energiou.
- **Ionizácia urýchlenými iónmi (FIB)** – k ionizácii analytu sa využívajú urýchlené ióny.
- **Ionizačná technika SIMS** – slúži k povrchovej analýze pevných látok. Zväzok iónov pôsobí na analyt za uvoľnenia iónov, ktoré sa následne ďalej analyzujú.
- **Ionizácia indukčne viazanou plazmou (ICP)** – vhodná technika pri stopovej prvkovej analýze. Analyt je ionizovaný v horáku s udržiavanou argónovou plazmou s vysokou teplotou.
- **Ionizácia elektrospejom (ESI)** – roztok analytu prechádza kapilárkou s vysokým napätím. Na výstupe z kapiláry vznikajú nabité kvapky, z ktorých sa postupne odparuje rozpúšťadlo, pričom sa neustále zvyšuje hustota povrchového náboja až do momentu uvoľnenia iónov samotného analytu.
- **Ionizácia termosprejom(TSP)** – roztok analytu sa zavádza do ocelevej vyhrievanej kapiláry. Po výstupe z kapiláry vznikajú nabité kvapky, z ktorých sa ďalej odparuje rozpúšťadlo za postupného zvyšovania hustoty povrchového náboja, čo v ďalšej fáze vedie k tvorbe iónov analytu.
- **Matricou asistovaná desorpcia/ionizácia laserom (MALDI)** – jej princíp je podrobnejšie vysvetlený v jednej z ďalších kapitol.
- **Nano-asistovaná laserová desorpcia/ionizácia (NALDI)** – ionizácii analytu napomáha terčik z nanomateriálu, ktorý interaguje s energiou laseru.

### 2.2.5. Inštrumentácia MS: Hmotnostné analyzátory

Hmotnostný analyzátor zabezpečuje separáciu iónov analytov a fragmentov a ich transport k detektoru. Podobne ako iónové zdroje sa aj hmotnostné analyzátory od seba odlišujú princípom separácie iónov, konštrukčným prevedením a parametrami – rozlíšením, správnosťou a presnosťou získaných m/z. Štúdium štruktúry látok si často vyžaduje tzv. tandémové usporiadanie hmotnostných analyzátorov.

Tu sú uvedené typy používaných analyzátorov:

- **Sektorové analyzátory (magnetický, elektrický)** – separácia iónov s využitím magnetického a elektrického poľa.
- **Kvadrupól** – analyzátor pozostávajúci najčastejšie zo štyroch oproti sebe stojacich tyčí, na ktoré je privádzané jednosmerné a striedavé elektrické pole zodpovedné za osciláciu iónov a ich prechod až k detektoru.
- **Iónová pasca** – analyzátor zložený z prstencovej stredovej a dvoch uzatvárajúcich elektród. Od nastavenia parametrov napätia sú jednotlivé ióny zadržované vo vnútri alebo vypudzované z iónovej pasce.
- **Iónová cyklotrónová rezonancia** – v cyklotrónovej cele vo vysokom magnetickom poli vykonávajú ióny kruhový pohyb s konkrétnou cyklotrónovou frekvenciou. Fourierovou transformáciou sa následne prevádzajú frekvencie prítomných iónov na hmotnostné spektrum.
- **Orbitrap** – analyzátor skonštruovaný zo súdkovitej a vretennej elektródy okolo ktorej oscilujú ióny s charakteristickou frekvenciou. Hmotnostné spektrum je výsledkom Fourierovej transformácie jednotlivých frekvencií.
- **Time of flight analyzátor** – jeho princíp je bližšie vysvetlený v kapitole na nasledujúcej strane.

### 2.2.6. Inštrumentácia MS: Detektory v MS

Poslednou dôležitou súčasťou hmotnostného spektrometra je samotný detektor, ktorý zastupuje funkciu „očí“ v prístroji. V prvom hmotnostnom spektrometre bola detekcia zabezpečená pomocou fotografickej dosky, preto sa tento prístroj nazýval ako hmotnostný spektrograf. V začiatkoch MS bola pomerne značne používaná Faradayova klietka. Tento typ detektoru sa v dnešnej dobe nachádza v prístrojoch určených na presné zisťovanie izotopických pomerov, pretože ponúka vysokú stabilitu signálu<sup>32</sup>. Najčastejším detektorom je elektrónový násobič pracujúci na podobnom princípe ako fotonásobič. K ďalším bežným typom detektorov patrí Dalyho detektor, elektro-optický detektor<sup>32</sup>. V hmotnostnej spektrometrii proteínov sa objavuje aj tzv. kryodetektor<sup>33-34</sup>.

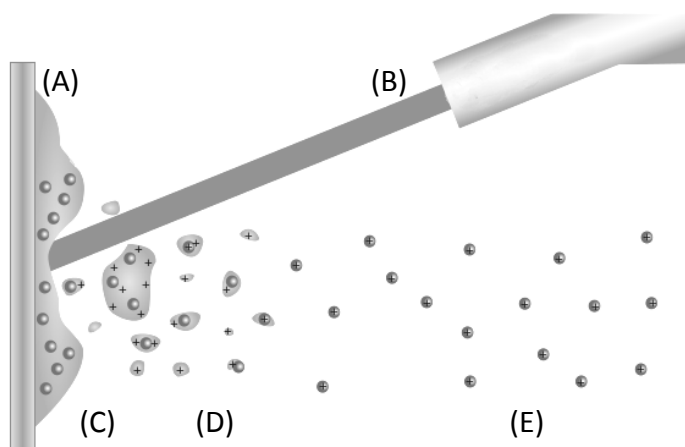


### 2.2.7. MALDI-TOF-MS

V experimentálnej časti tejto práce je používaná technika MALDI-TOF a preto bude popísaná v tejto kapitole podrobnejšie. MALDI (z ang. *Matrix Assisted Laser desorption/ionization*) je mäkká ionizačná technika, ktorá je založená na využití interakcií žiarenia dodávaného laserom s matricou nanosenou spolu s analytom na MALDI terčik a následným predaním energie z matrice na analyt, ktorá vedie k jeho uvoľneniu (desorpcii) z analyzovaného materiálu a ionizácii (tvorba iónov v plynné fáze). Pri tomto type ionizácie vznikajú prevažne jedennásobne nabité pseudomolekulárne ióny  $[M-H]^+$  alebo  $[M-H]^-$  v závislosti od zvolených podmienok analýzy. V hmotnostných spektrometroch sa môže vyskytovať buď UV laser, pracujúci zväčša pri vlnovej dĺžke 355 nm, alebo laser, ktorý je zdrojom infračerveného žiarenia. Výber matrice závisí na mnohých veciach. V prvom rade je to schopnosť matrice interagovať s laserovým lúčom a schopnosť matrice desorbovať a ionizovať analyt. Okrem iného sa matrica volí aj na základe rozpustnosti v rozpúšťadlách používaných pri analyte a schopnosti kryštalizovať po odparení daného rozpúšťadla. Existuje aj celý rad spôsobov vnášania matrice k analytu. Klasickým spôsobom je zmiešanie týchto komponent a ich následné nadávkovanie na spot terčika. Ďalšou možnosťou môže byť sendvičové nanášanie matrice na analyt. Ionizácia sa zväčša odohráva vo vákuu, avšak existuje aj obdoba MALDI techniky pracujúcej pri atmosférickom tlaku<sup>35</sup>. Výhoda MALDI techniky spočíva napríklad v možnosti rýchleho určenia molekulovej hmotnosti biopolymérov. Vzhľadom na to, že sa jedná o mäkkú ionizačnú techniku, je v získaných spektrách väčšinou dobre pozorovateľný aj signál materského iónu analytu (s výnimkou veľmi termo/fotolabilných látok). Pri analýze aromatických látok, prípadne látok, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú systém konjugovaných aromatických väzieb, ktoré sú schopné interagovať s UV žiarením, sa dokonca môže matrica vynechať - potom hovoríme o laserovej desorpcii/ionizácii (LDI). Existuje tiež rad postupov, ktoré uľahčujú desorpciu/ionizáciu napríklad vhodným povrchom (*Surface assisted laser desorption ionization*, SALDI) a podobne. Za nevýhodu tejto techniky sa môže považovať hlavne nemožnosť online prepojenia s kvapalinovou chromatografiou. Zvyčajne teda MALDI technika poskytuje zmesné spektrá obsahujúce signály rôznych iónov.

S touto ionizačnou technikou sa najčastejšie kombinuje hmotnostný analyzátor merajúci dobu letu (TOF, Time of flight analyzátor). Jedná sa o najrýchlejší analyzátor. Všetky ióny sú akcelerované v elektrickom poli napäťovým pulzom, pričom všetky nadobudnú rovnakú kinetickú energiu. Takto vstupujú do evakuovanej trubice, na ktorú už nepôsobí žiadne silové po-

le. K rozdeleniu iónov v konečnom dôsledku dochádza na základe ich odlišnej doby letu, pričom ióny s nižšou hmotnosťou majú väčšiu rýchlosť a na detektor preto dopadajú skôr ako ťažšie ióny s menšou rýchlosťou. TOF v konštrukčnom prevedení s reflektrom (iónovým zrkadlom) poskytuje lepšie rozlíšenie a presnosť merania.



Obrázok 7: Princíp MALDI techniky (A – spot MALDI terčička s matricou a analytom, B - laserový paprsok, C – desorpcia analytu s matricou, D – ionizácia analytu, E – ióny analytu postupujúce ďalej do hmotnostného analyzátoru)

### 2.2.8. Hmotnostná spektrometria v analýze povrchov rastlinných materiálov

Hmotnostná spektrometria sa z hľadiska priamej analýzy biologických povrchov, a teda aj tých rastlinných, radí medzi atraktívne metódy analýzy a to hlavne vďaka svojej vysokej selektivitě a citlivosti<sup>36</sup>. V analýze rastlinných povrchov býva spájaná s ambientnými ionizačnými technikami akými je napríklad desorpcia elektrosprejom (DESI<sup>37</sup>), laserová ablácia v spojení s elektrosprejom (LAESI<sup>38</sup>), hmotnostná spektrometria s ionizáciou elektrosprejom a laserom (LEMS<sup>39</sup>), či bezkontaktná ionizácia za atmosférického tlaku<sup>40</sup>. Priama analýza biologických materiálov je významný typ analýzy a za jej prínos sa dá považovať vynechanie často krát komplikovanej a problematickej prípravy biologickej vzorky, ktorá skresľuje výsledky.

Hmotnostná spektrometria v prevedení MALDI-TOF býva klasickým nástrojom pri mapovaní rozloženia (tzv.imaging) rozličných chemických látok v tenkých rezoch rôznych

biologických materiáloch a rastlinných pletivách. Princíp MALDI-MS imagingu je v zásade rovnaký ako u klasickej analýzy, avšak pohyb laseru, respektíve pohyb MALDI platu s tenkým rezom biologického materiálu je vymedzený množinou x a y súradníc. Na osi z je následne premietnutá intenzita zachytených iónov. Táto technika bola niekoľko krát použitá na analýzu drog, peptidov a proteínov v živočíšnych tkanivách ako aj na analýzu sacharidov, peptidov, či herbicidov v rastlinných pletivách. Za zaujímavú je možné považovať prácu teamu z nemeckého inštitútu Maxa Planka, ktorej cieľom bolo potvrdiť nejednotnú distribúciu glukosinolátov v listoch rastliny *Arabidopsis thaliana*. Keďže sa jedná o látky, ktoré majú za úlohu chrániť rastlinné pletivá tak vďaka tomuto poznatku by sa mohlo objasniť, prečo niektoré typy škodcov obžierajú len určité miesta na listoch<sup>41</sup>.

DESI-MS patrí k ďalšej významnej technike, ktorá ponúka možnosť priamej analýzy biologického povrchu. DESI je ionizačná technika využívajúca elektrosprej v kombinácii s desorpciou analytu z analyzovaného povrchu. Elektrosprej je zdrojom nabitých mikrokvapiek, ktoré sú namierené na vzorku. Vzájomnou interakciou iónov vzniknutých v elektrospreji a povrchom analyzovanej vzorky nastáva desorpcia iónov z povrchu, ktoré putujú do MS analyzátoru<sup>42</sup>. Aj u tohto typu prevedenia analýzy existuje niekoľko typov zameraných na štúdium rastlinných povrchov. Jednou z nich je aj práca Thomasa Müllera, v ktorej sa autori zamerali na identifikáciu degradačných produktov chlorofylu v starnúcich listoch viacerých rastlín (*Cercidiphyllum japonicum*, *Liquidambar styraciflua* a *Ostrya virginiana*). Problém s povrchovými voskami čiastočne vyriešili použitím zmesi chloroformu a dichlórmetánu v pomere 1:1 (v/v)<sup>43</sup>. Vďaka vysokej citlivosti a krátkej dobe analýzy bola táto metóda s úspechom použitá aj v priamej analýze mnohých iných látok prítomných nielen v rastlinných materiáloch vrátane hormónov<sup>44</sup>, či alkaloidov v pletivách<sup>45</sup>. K zaujímavému prístupu patrí tzv. *Leaf spray technika*, pri ktorej je časť rastliny (napr. list) pripojená k vysokému kladnému alebo zápornému napätiu, ktoré z listu vyvolá emisiu nabitých častíc postupujúcich smerom do MS analyzátoru<sup>46</sup>.

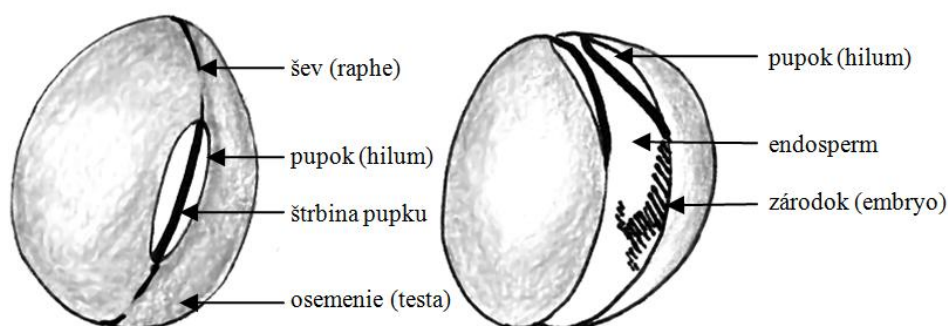
### **2.3. Všeobecná štruktúra a chemické zloženie semien strukovín**

K strukovinám dnes patrí viac ako 13 000 druhov rastlín. Tieto plodiny zohrávajú dôležitú úlohu nielen v ľudskej strave, ale aj v strave mnohých živočíchov po celom svete. Z tohto

množstva je komerčne pestovaných len niekoľko druhov rastlín ako sója, arašidy, fazuľa, hrach, cicer a šošovica<sup>47</sup>.

Semená strukovín patria k druhým najvýznamnejším rastlinným proteínovým zdrojom na svete, hneď po ceráliách<sup>48</sup>. Sú preto dôležité z hľadiska ľudskej výživy. Uvádza sa, že obsah proteínov v týchto semenách sa pohybuje od 20-40%. Spĺňajú v nich funkciu zásobných látok. K hlavným zásobným proteínom patria globulíny. Vo všeobecnosti sú strukoviny chudobné na sírne aminokyseliny ako cysteín, cystín a metionín, ale na rozdiel od cerálií obsahujú relatívne vysoký obsah lyzínu<sup>49</sup>. Okrem bielkovín, môžu byť zdrojom lipidov, prípadne sacharidov<sup>48</sup>. Strukoviny s vyšším obsahom sacharidov majú naopak nižší obsah lipidov. K najviac zastúpeným sacharidom patrí škrob, pričom obsah amyulózy a amylopektínu sa opäť líši od druhu strukoviny. V neposlednom rade obsahujú tieto semená aj niektoré vitamíny – ako niacín, kyselinu pantoténovú a folacín. Z minerálnych látok je v strukovinách najviac zastúpený draslík a k ďalším významným minerálnym látkam patrí aj fosfor, meď, železo, vápnik a horčík<sup>49</sup>.

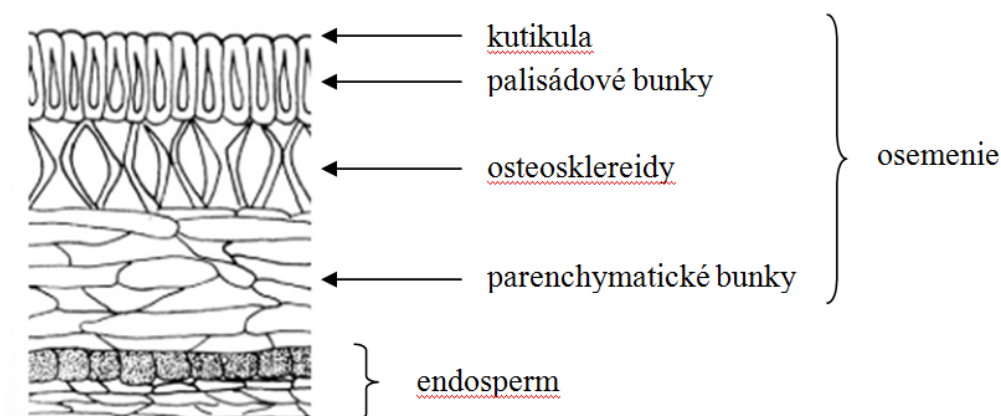
Navzdory určitej variácii v makronutričnom zložení, vo veľkosti, v tvare, farbe a hrúbke je anatomická štruktúra semien strukovín v základe rovnaká. Dozreté semená obsahujú tri hlavné komponenty: osemenie (*testa*), zárodok (*embryo*) a vyživovacie pletivo (*endosperm*). Na ujasnenie predstavy o anatomickej stavbe semien strukovín slúži *Obrázok 8*. Vzhľadom na zameranie experimentálnej časti v tejto práci bude ďalšia pozornosť v teoretickej časti upriamená len na detailnejšiu stavbu osemenia.



*Obrázok 8: Anatomická stavba semena strukovín*

### 2.3.1. Základná biologická funkcia a stavba osemenia

Úloha a prítomnosť niektorých chemických látok v osemeni už boli čiastočne diskutované v kapitole o fyzikálnom type vegetačného pokoja semien. Okrem ovplyvňovania tohto typu dormancie cez schopnosť prepúšťať, respektíve neprepúšťať, vodu a plyny k embryu, má osemenie aj celý rad iných dôležitých funkcií. Svojou anatomickou stavbou a mechanickou pevnosťou vplýva na klíčenie. Je dôležitým prvkom pri transporte živín a fytohormónov z materskej rastliny k vyvíjajúcemu sa embryu, ktoré zároveň chráni pred možným mechanickým poškodením. U mnohých druhov je zdrojom viacerých hodnotných zlúčenín. V porovnaní s embryom a endospermom semien však u osemenia doposiaľ chýbajú štúdie na hlbšej molekulárnej úrovni<sup>50</sup>. Stavba osemenia v priečnom reze je znázornená na *Obrázku 9*.



*Obrázok 9: Priečny rez osemením strukoviny*

### 2.3.2. Kutikula

Kutikula je nebunkový ochranný film, akási membrána, nachádzajúca sa na najvrchnejšej vrstve buniek rozličných častí rastliny – na listoch, plodoch, kvetoch, nedrevnatých stonkách a semenách. Napomáha v ochrane pletív ukrývajúcej sa pod jej vrstvou pred ich vysychaním, UV žiarením, a pred rôznymi fyzikálnymi, chemickými a bakteriálnymi atakmi. Okrem toho chráni labilnejšie biopolyméry prítomné v pletivách akými sú polysacharidy, lignín a proteíny<sup>51</sup>. U niektorých semien pokrýva celú časť osemenia, okrem hila<sup>48</sup> (pupku, miesto na semenici rastlín, kde semeno prisadalo k pútku). Prítomnosť kutikuly u rastlín môže byť dôsledkom adaptácie rastlín na suchozemský život.

Rastlinná kutikula má heterogénnu chemickú povahu. Jej najhlavnejšou komponentou je biopolyester kutín, ktorý vystupuje v úlohe matrice a je zložený z polyhydroxylovaných kyselín navzájom pospájaných cez esterové väzby. V kutíne niektorých rastlinných druhov sa vyskytuje aj významné množstvo glycerolu. Ďalšou látkou polymérnej a lipidickej povahy vyskytujúcej sa v niektorých rastlinných kutikulách je kután<sup>52</sup>. Jedná sa o látku zloženú z derivátov polynenasýtených mastných kyselín prevažne pospájaných éterovými väzbami – tie zvyšujú odolnosť matrice voči chemickej degradácii<sup>53</sup>. Je bohatý aj na kovalentné väzby uhlík-uhlík, avšak jeho štruktúra je inak stále neobjasnená<sup>54</sup>. Na kutikule sa pravdepodobne nachádzajú epikutikulárne vosky pozostávajúce zo zmesi n-alkoholov, n-aldehydov, veľmi dlhých mastných kyselín, či n-alkánov (n = 20-30). Epikutikulárne vosky prítomné vo forme filmu ovplyvňujú makroskopické povrchové vlastnosti akými je lesk listov, či kvetov, kdežto ich kryštáliky zase zvyšujú matnosť<sup>54</sup>. Súčasťou epikutikulárnych voskov môžu byť aj triterpenoidy, tokoferoly alebo rozličné aromatické zlúčeniny<sup>55</sup>. V kutíne môžu byť ako menšina zastúpené aj fenolické zlúčeniny – hlavne kyselina škoricová a flavonoidy. Zo spodnej strany kutikuly sa kutín prelína s polysacharidmi, ktoré sú súčasťou vrstvy epidermálnych buniek nachádzajúcich sa pod kutikulou<sup>53</sup>.

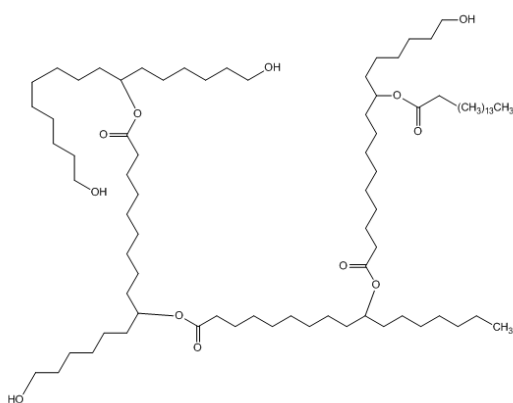
Prehľad komponent kutikulárnych voskov v rozličných rastlinných druhoch<sup>56</sup> zhrňuje Tabuľka 2:

Komponenta	Počet atómov uhlíka	Najviac zastúpená zlúčenina	Rastlinný druh
Uhl'ovodíky	C <sub>21</sub> - C <sub>35</sub>	C <sub>29</sub> , C <sub>31</sub>	všetky <i>Brassica</i> , <i>Rosaceae</i> ,
Ketóny	C <sub>25</sub> - C <sub>33</sub>	C <sub>29</sub> , C <sub>31</sub>	<i>Leptochloa digita</i>
Primárne alkoholy	C <sub>12</sub> - C <sub>36</sub>	C <sub>26</sub> , C <sub>28</sub>	všetky <i>Pisum sativum</i> , <i>Brassica</i> ,
Sekundárne alkoholy	C <sub>29</sub> - C <sub>33</sub>	C <sub>29</sub> , C <sub>31</sub>	<i>Rosaceae</i> , <i>Malus</i>
Monoestery	C <sub>30</sub> - C <sub>60</sub>	C <sub>44</sub> , C <sub>46</sub> , C <sub>48</sub> , C <sub>50</sub>	všetky
Aldehydy	C <sub>14</sub> - C <sub>34</sub>	C <sub>24</sub> , C <sub>26</sub> , C <sub>28</sub>	<i>Vitis</i> , <i>Malus</i>
Karboxylové kyseliny	C <sub>12</sub> - C <sub>36</sub>	C <sub>24</sub> , C <sub>26</sub> , C <sub>28</sub>	všetky

### 2.3.2.1. Štruktúra kutínu a kutánu

Objasňovanie štruktúry látok tvoriacich kutikulu nie je ľahké. Ide o zložité štruktúry a komplexné zmesi látok, ktoré sa ťažko separujú a charakterizujú.

Niektoré druhy rastlín, respektíve ich kutikuly obsahujú len látku kutín (*Lycopersicon esculentum*, plody paradajky), v niektorých kutikulách sa nachádza len kután (*Beta vulgaris*) a v iných sú prítomné obe látky (list *Agave americana*)<sup>57</sup>. To umožňuje do určitej miery študovať zloženie a vlastnosti kutikuly jej porovnávaním medzi rôznymi druhmi rastlín. Pre frakcionáciu zložiek kutikuly je významné, že kutín je látka rozpustná a podliehajúca depolymerizácii počas saponifikácie roztokom hydroxidu sodného v metanole. Naopak kután je nerozpustná a neextrahovateľná látka tvoriaca kutikulu, ktorá sa ostane ako reziduum po odstránení kutínu a polysacharidov z kutikuly<sup>57</sup>.



Obrázok 10: Štruktúra kutínu

Jedným z postupov pri identifikácii jednotlivých zložiek v kutíne bolo použitie alkalickéj hydrolýzy odizolovanej kutikuly prítomnej na povrchu paradajok a analýzy takto upraveného vzorku GC-MS technikou. Týmto postupom sa zistilo, že alkalická hydrolýza rozštiepi kutín na jednotlivé monoméry, prípadne diméry. Najviac zastúpenou látkou v paradajkovom kutíne bola kyselina 10,16-dihydroxyhexadekánová.

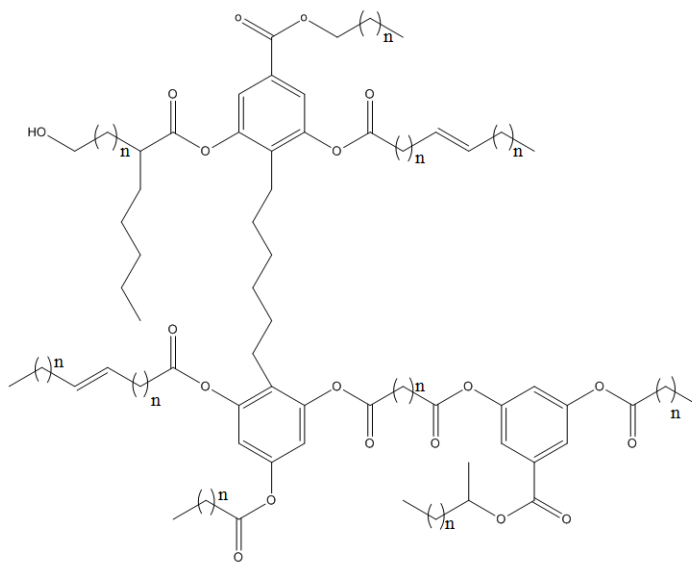
Existuje aj postup, v ktorom sa kutikula prítomná na plode limetky ponechala v prítomnosti enzýmu – porcín pankreatickej lipázy, ktorá primárne štiepi estery primárnych alkoholov<sup>58</sup>. Výsledkom pôsobenia enzýmu bola zmes monomérov a oligomérov kutínu. Pomocou GC-EI-MS a NMR analýzy bolo určené zastúpenie mastných kyselín v limetkovej kutikule. Najpočetnejšie sú kyselina 10,16-dihydroxyhexadekánová, kyselina hexadekánová a kyselina 10-hydroxyhexadekánová<sup>59</sup>. Na základe získaných výsledkov bola navrhnutá štruktúra, ktorá je uvedená na Obr. 10.

Štúdium kutínu a kutánu bolo prevedené aj v kutikule nachádzajúcej sa na listoch rastliny *Agave americana*. Využitím saponifikácie so zakončením pomocou pyrolytickej GC-MS boli identifikované tieto kyseliny - kyselina 9,10,18-trihydroxyoxydekánová, kyselina 9,10-epoxy-18-hydroxyoktadekánová a kyselina 10,16-dihydroxyhexadekánová. Rezistentným

zvyškom po saponifikácii kutikuly ostal kután, ktorý po účinku hydroxidu tetrametylamónia poskytol monomérne produkty metylesterov mastných kyselín s variabilnou dĺžkou reťazca (od C15 do C 31). K najzastúpenejším z nich patrili metylestery s 27 až 31 atómami uhlíka. Okrem toho medzi monomérnymi produktami vystupovali aj 1,3,5-trimetoxylované deriváty benzénu a niekoľko derivátov odvodených od aromatických karboxylových kyselín. Použitím  $^{13}\text{C}$ -NMR analýzy bola zostavená štruktúra kutánu, ktorá vychádzala z 1,3,5-trihydroxylovaných benzénových jadier a mastných kyselín<sup>60</sup>.

V inej práci založenej tiež na kutikule listu vyššie uvedenej rastliny, autori využili na objasnenie štruktúry kutánu oxidáciu pomocou  $\text{RuO}_4$ . Výsledkom oxidácie boli monokarboxylové kyseliny s 16 až 34 atómami uhlíka v reťazci a taktiež  $\alpha,\omega$ -dikarboxylové kyseliny s dĺžkou reťazca o 26 až 34 atómov uhlíku, ktoré by mohli byť esterovou väzbou naviazané na hydroxylované aromatické jadro<sup>61</sup>.

Najnovšia štúdia zameraná na odhalenie štruktúry kutánu pomocou  $^{13}\text{C}$ -NMR a  $^1\text{H}$ -NMR analýzy viedla k štruktúre<sup>57</sup>, ktorá sa nachádza na *Obrázku 11*.



*Obrázok 11: Štruktúra kutánu*



### **2.3.3. Charakteristika jednotlivých bunkových vrstiev osemenia**

Pod kutikulou sa nachádza vrstva palisádových buniek, ktoré sa nazývajú aj ako makroskleroidy. Vrstva je zložená z buniek valcovitého tvaru. Uvádza sa, že má mechanickú podpornú funkciu (napr. v osemení hrachu). Cez palisádové bunky sa často v ich terminálnej časti transversálne tiahne tzv. *linea lucida* (svetlá linka). Jej hrúbka je spojená s impermeabilitou osemenia. Subepidermálna vrstva buniek (tj. vrstva pod palisádovými bunkami) je tvorená osteosklereidmi. Táto vrstva obsahuje aj nápadné množstvo intercelulárnych priestorov vyplnených vzduchom. Usporiadanie tejto vrstvy môže zohrávať úlohu pri vysychaní, či výmene plynov v osemení<sup>48</sup>. Osteoskleroidy obsahujú veľa škrobových zŕn a rovnako ako palisádové bunky zohrávajú význam pri mechanickej podpore v osemení. V sóji vystupujú ako rezervoár proteínov v osemení<sup>50</sup>.

Pod vrstvou osteoskleroidov sa v osemení strukovín nachádza vrstva parenchymatická. Je zložená z niekoľkých menších vrstiev (6-8) pozdĺžne predĺžených tenkých buniek, ktoré sú nerovnomerne rozložené v osemení. V oblasti hila sa rozlišuje len minimálny počet týchto buniek. V osemení hrachu (*Pisum sativum*) sa v tejto vrstve dajú rozlíšiť ešte ďalšie tri podvrstvy. Parenchymatické bunky obsahujú množstvo organel a preto tvoria v osemení veľmi aktívnu vrstvu z hľadiska metabolizmu. Niektorí autori označujú parenchymatické bunky za nutričnú vrstvu<sup>48</sup>.

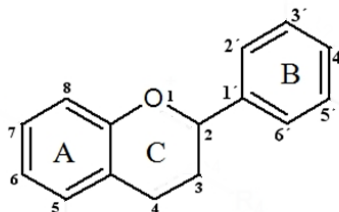
### **2.3.4. Chemické zloženie osemenia**

Chemické zloženie v najvrchnejšej časti osemenia – kutikule, bolo popísané v predchádzajúcej kapitole. Avšak v osemení strukovín sa často krát nachádzajú aj fenolické zlúčeniny, lignifikované bunky, iné typy vosku ako suberín, či celá rozmanitá škála polysacharidov a bielkovín. Ich bližšia štruktúra a vlastnosti budú popísané v nasledujúcich podkapitolách.

#### **2.3.4.1. Fenolické zlúčeniny**

Flavonoidy patria do skupiny prírodných fenolických rastlinných zlúčenín. Od identifikácie prvého flavonoidu rutinu v roku 1930 bolo identifikovaných viac ako 4000 týchto zlúčenín<sup>62</sup>. Z chemického hľadiska sa jedná o zlúčeniny, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú dve

aromatické jadrá s označením A a B a tie sú napojené na heterocyklický pyránový kruh C. Základná štruktúrna jednotka flavonoidov je demonštrovaná na Obr. 12.



Obrázok 12: Základná stavebná jednotka flavonoidov

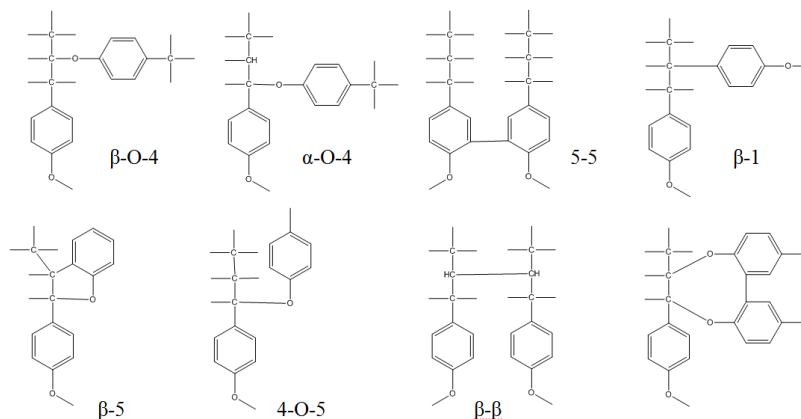
V závislosti od stupňa oxidácie a od prítomnosti substituentov na kruhoch sa flavonoidy delia do niekoľkých skupín na – *chalkony*, *flavony*, *flavonoly*, *flavanony*, *antokyaníny* a *taníny*, *izoflavonoidy*, *stibény* a *auróny*<sup>63</sup>. Tieto látky sa môžu vyskytovať vo forme aglykonov alebo ako glykozidy. Glykozidická väzba sa najčastejšie vyskytuje v polohách C-3 a C-7. Ak sa cukornaté jednotky viažu cez hydroxylovú skupinu, v takomto prípade sa jedná o tzv. O-glykozidy. U niektorých typov flavonoidov sa môžu vyskytovať aj C-glykozidy<sup>64</sup>. Medzi najčastejšie vyskytujúce sa cukry vo flavonoidoch patrí rhamnóza, glukóza, glukorhamnóza, galaktóza a arabinóza. Hydroxylované bývajú hlavne v polohách 3, 5, 7, 2, 3', 4' a 5'. Metyl estery, prípadne acetyl estery v pozíciách hydroxylov sú v prírode tiež bežné<sup>65</sup>.

Flavonoidy sú sekundárne rastlinné metabolity. Typ, množstvo a lokalizácia flavonoidov sa líši podľa druhu rastlín a fázy v akej sa nachádzajú jednotlivé rastlinné pletivá. Medzi hlavné typy flavonoidov vyskytujúcich sa v semenách patria flavonoly, antokyaníny, phlobafény, izoflavony a taníny. Antokyaníny sa vyskytujú v semenách jednoklíčnolistových a dvojklíčnolistových rastlín ako jačmeň (ten obsahuje hlavne deriváty delfinidínu), v semenách fazule a v kukurici. Phlobafény (deoxyflavonoidy) sú červené polyméry flavan-4-olov, ktoré sa tiež vyskytujú v kukurici a niektorých osemeniach. Flavonoly prispievajú k pigmentácii u niektorých semien hlavne ako kopigmenty s antokyanínmi. Flavonoly sú v prírode bežne glykozilované. Izoflavonové zlúčeniny sa vyskytujú v sóji, kde sú hlavné metabolity vznikajúce v embryu a osemeni<sup>66</sup>. Prokyanidíny, respektíve kondenzované taníny, sú prítomné v osemeni rastliny *Arabidopsis*.

Štruktúra flavonoidného skeletu a počet hydroxylovaných skupín výrazne ovplyvňujú ich vlastnosti. Tieto látky patria k prírodným antioxidantom. Celý rad štúdií poukazuje na ich pozitívne pôsobenie na ľudský organizmus. Náš organizmus chráni pred bakteriálnymi a vírusovými ochoreniami, pred degeneratívnymi chorobami súvisiacimi so srdcovocievnu a nervovou sústavou. Slúžia ako „vychytávače“ voľných radikálov, čoho dôsledok môže byť redukcia rizika vzniku onkologických ochorení. Prítomnosť hydroxylových skupín podmieňuje aj ich chelatačný účinok, vďaka ktorému môžu byť tkanivá alebo enzýmy chránené pred pôsobením niektorých kovov. Významnú funkciu majú aj v obranyschopnosti samotných rastlín. Okrem toho, mnohé z nich vystupujú ako prírodné pigmenty zodpovedné za zafarbenie kvetov, plodov a iných častí rastlinných tiel. Flavonoidy sú jedny z mnohých látok, ktoré sa intenzívne spájajú s fenoménom dormancie semien. Príkladom môžu byť semená pšenice, v ktorých bol jav dormancie asociovaný s pigmentovaným osemením. U líní, ktoré mali nepigmentované osemenie sa objavovali semená nedormantné, prípadne len málo dormantné<sup>67</sup>. Vysoká úroveň dormancie sa vyskytuje tiež v pigmentovaných osemeniach divých odrôd ryže<sup>68</sup>. Okrem fyzikálnej dormancie semien môžu ovplyvňovať aj ich fyziologickú dormanciu skrz regulovania fytohormónov – auxínov<sup>65</sup>, prípadne kyseliny gibberelínovej<sup>69</sup>.

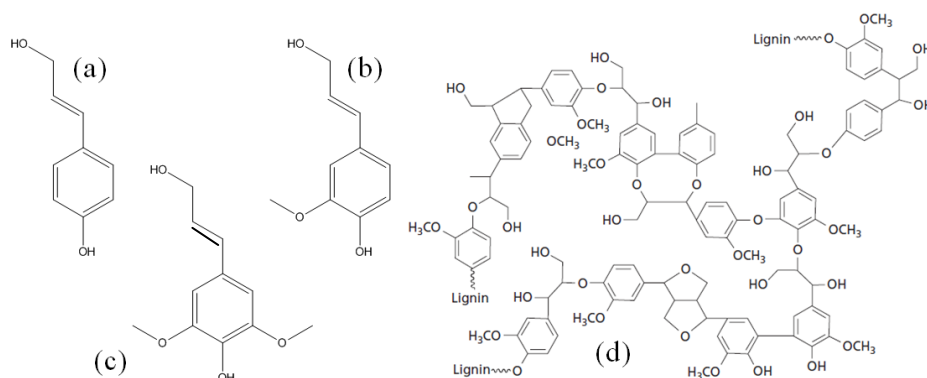
#### 2.3.4.2. *Lignín a suberín*

Názov lignínu pochádza z latinského slova *lignum*, čo znamená drevo. Patrí medzi druhý najzastúpenejší biopolymér na planéte hneď po celulóze<sup>70</sup>. Hoci je rozšírenou látkou rastlinných tiel najmä u drevnatých rastlín, relatívne vo veľkej miere sa môže vyskytovať aj v osemeni niektorých druhov, kde zabezpečuje mechanickú podporu a impermeabilitu<sup>48</sup>. Chráni polysacharidy pred mikrobiálnou degradáciou<sup>71</sup>. Je odolnejší ako celulóza, či iné polysacharidy. Z chemického hľadiska sa jedná o nepravidelný 3D polymér pozostávajúci z fenypropánových skupín. Tvoria ho tri základné monoméry – kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol, ktoré sú pospájané cez rozličné kovalentné typy väzieb v závislosti od rastlinného druhu. Najbežnejší štruktúrny motív je alkyl – aryl éter spojený cez  $\beta$ -O-4 väzbu<sup>72</sup>. Táto väzba je v ligníne dominantná a tvorí približne 40-60% väzieb v tomto polyméru. Medzi ďalšie väzby prítomné v ligníne patria  $\alpha$ -O-4,  $\beta$ -5, 5-5, 4-O-5,  $\beta$ -1 a  $\beta$ - $\beta$ <sup>73</sup>. Ich konkrétne príklady sú znázornené na nasledujúcom *Obr. 13*.



Obrázok 13: Typy väzieb v ligníne

V mnohých prípadoch sa naň kovalentne viažu aj sacharidy pomocou glykozidickej väzby, esterovej väzby, éterového spojenia s benzénovým jadrom, alebo pomocou hemiacetálového, či acetálového spojenia<sup>73</sup>. V ligníne sú prítomné aj funkčné skupiny ako primárne, sekundárne a fenolické hydroxyly, metoxy skupiny, karbonyly, či v menšom množstve aj karboxylové skupiny. Ich množstvo závisí zase od druhu rastliny<sup>73</sup>. Lignín sa vyznačuje vysokou viazanou energiou, preto majú lignifikované materiály potenciál využitia v obnoviteľných zdrojoch palív a svojou štruktúrnou rozmanitosťou by mohol slúžiť pri výrobe mnohých chemikálií<sup>74</sup>.



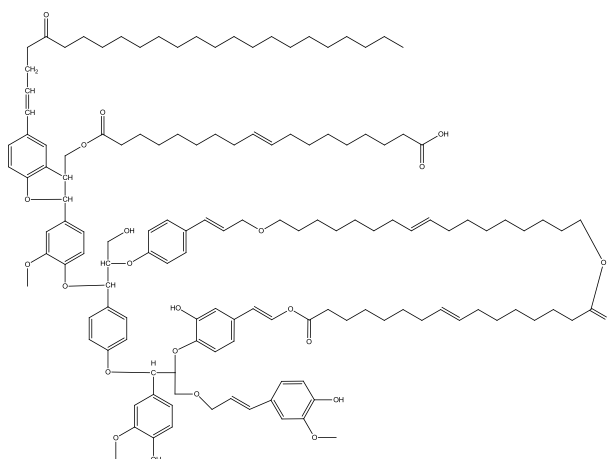
Obrázok 14: Štruktúra lignínu a jeho základných komponent (a – kumarylalkohol, b – koniferylalkohol, c – sinapylalkohol, c – lignín)

Medzi ďalší polymér, ktorý môže byť prítomný v osemeni je suberín<sup>48</sup>. Jeho štruktúra je rovnako ako u vyššie popísaných polymérov nie celkom objasnená. Existujú štúdie, podľa

ktorých je suberín alifatický polyester, podobný kutínu a obsahujúci fenolické látky ako lignín. V *in situ* podmienkach je suberín nerozpustný vo všetkých rozpúšťadlách, čo značne komplikuje jeho štúdium. Najlepšie je suberín preštudovaný v korku, kde je zastúpený vo zvýšenej miere. Na jeho izoláciu sa používa alkalická hydrolyza v metanolickej roztoku<sup>75</sup>.

Suberín je zložený z polyesterových frakcií a frakcií obsahujúcich aromatické jadrá spojené cez väzby uhlík-uhlík, či cez väzby éterové. Tieto dve časti tvoria teda polyalifatickú a polyaromatickú doménu suberínu. Dominantným aromatickým monomérom je ferulát. So suberínom môžu byť asociované aj niektoré vosky<sup>76</sup>.

Okrem glycerolu sú hlavnými monomérnymi jednotkami alifatické kyseliny s dlhým reťazcom, nazývané aj ako suberínové kyseliny. Tie typicky tvoria 80 a viac % produktov depolymerizácie<sup>77</sup>. Medzi suberínové kyseliny patria  $\omega$ -hydroxy kyseliny a  $\alpha,\omega$ -dikyseliny. Fakt, že tieto kyseliny sú zakončené buď hydroxylovou skupinou alebo karboxylom, prispieva k tomu, že sa môže štruktúra suberínu rozrastať. Dĺžka reťazcov sa pohybuje od C16 do C24. U niektorých suberínov prevažujú C18 kyseliny, kým u druhých sa vyskytujú viac C24 kyseliny. Oktadekanové kyseliny majú uprostred reťazca ešte hydroxylové skupiny viazané v polohe C-9 a C-10, a tým sa zvyšuje rozmanitosť stereochemickej konfigurácie suberínu<sup>78</sup>.



Obrázok 15: Ukážka možného usporiadania jednotlivých komponent v suberíne

#### 2.3.4.3. Polysacharidy

Komplex polysacharidov prítomný vo všetkých rastlinných bunkových stenách sa nazýva pektín. Je tvorený tromi pektínovými polysacharidmi – homogalaktouronanom, rhamnogalak-

touromonom I a substituovanými galaktouromonomi<sup>79</sup>. Aj napriek tomu, že bol pektín objavený pred 200 rokmi, určenie jeho štruktúry je veľmi náročné a nie je dokončené, pretože sa jeho zloženie po izolácii z rastliny a počas uskladnenia mení<sup>80</sup>. Býva zvyčajne zo 70% tvorený kyselinou galaktourónovou<sup>81</sup>. Pektín je heteropolymér tvoriaci v rastlinách hydratovaný gél, v ktorom je celulóza a iné molekuly zapustená v bunkových stenách<sup>82</sup>. Epidermálna vrstva v osemeni *Arabidopsis thaliana* je doprevádzaná pektinickým mucínom medzi plazmatickou membránou a vonkajšou stranou palisádových buniek<sup>82</sup>.

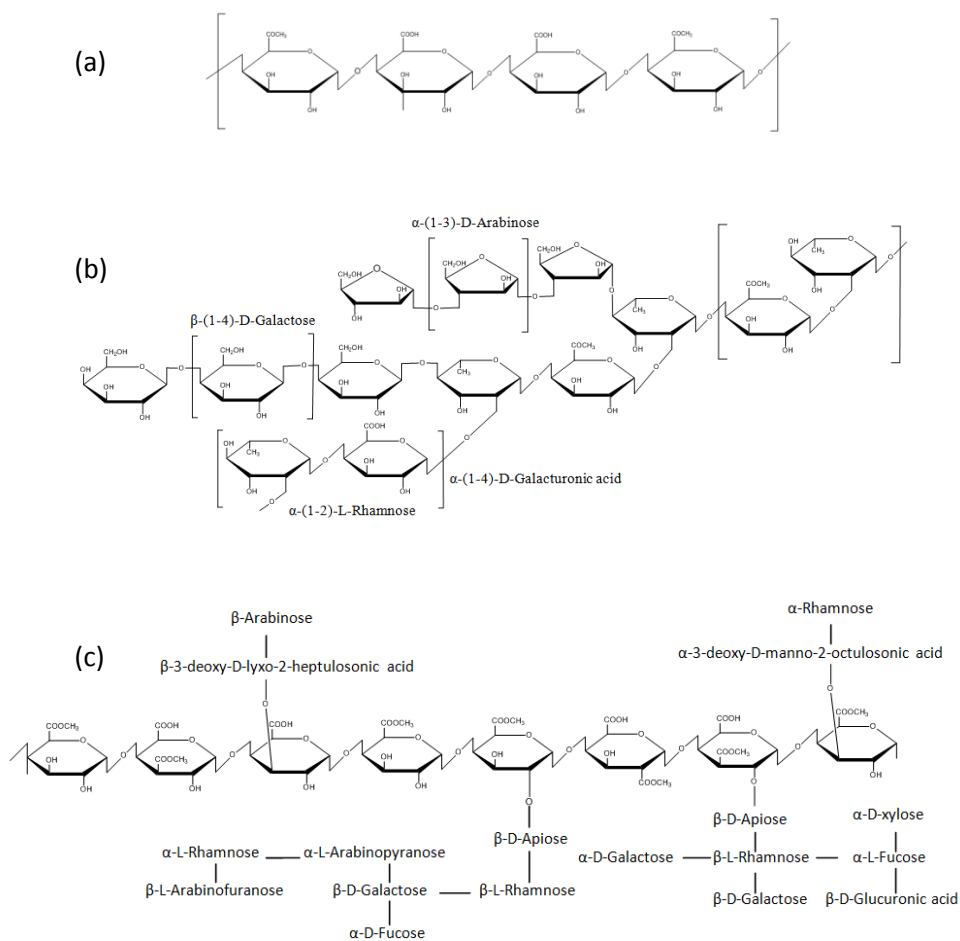
Pektín je významný pri raste rastliny, jej rozvoji, morfogénéze, obranyschopnosti, v adhézii medzi bunkami, ako stavebná jednotka v bunkových stenách, pri prenášaní informácií a delení buniek, pórovitosti stien, viazaní iónov, rastových faktorov a enzýmov, pri hydratacii semien a plodov<sup>81</sup>. Pektíny sú rozpustné v čistej vode. Rozpustné bývajú aj alkalické pektany, soli odvodené od pektínu. U pektanov s kovmi vo vyššom mocenstve rozpustnosť výrazne klesá. Rozpustený pektín podlieha deesterifikácii a depolymerizácii vo vodných roztokoch pri pH 4. Uvádza sa, že pri pH 5-6 sú pektíny vo vodných roztokoch pri izbovej teplote stále. Pri vyššej teplote však prebiehajú  $\beta$ -elimináčnne reakcie. S voľnými hydroxylovými skupinami poskytujú pektíny reakcie vedúce k tvorbe éterov, či acetylačné reakcie a oxidácie<sup>83</sup>.

Homogalaktouromonom je lineárne vystupujúca štruktúra pozostávajúca z  $\alpha$ -D-galaktózyurónovej kyseliny spojenej cez 1. a 4. atóm uhlíku. Je najviac zastúpeným polysacharidom v pektíne, jeho obsah je okolo 65%<sup>81</sup>. Polygalaktózyurónový skelet môže byť čiastočne a náhodne metylovaný alebo acetylovaný. Štruktúra týchto látok sa líši od typu rastliny. V niektorých prípadoch sa vyskytuje O-acylácia v polohe C-3 a C-2<sup>79</sup>.

Rhamnogalaktouromonom I je celý komplex polysacharidov, ktorého kostra je tvorená opakujúcimi sa disacharidovými jednotkami kyseliny galaktózyurónovej (GalA) a rhamnózy (Rha) s väzbami ( $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalA-( $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Rha-( $\rightarrow$ ). Polohy C-2 a C-3 u GalA a Rha môžu byť opäť acetylované. Vetvenie reťazca súvisí s polohou C-4 na rhamnóze, kedy sa tu zväčša viaže glykozidicky  $\alpha$ -L-arabinofuranóza alebo  $\beta$ -D-galaktopyranóza. Vetvenie reťazca opäť závisí od druhu rastliny<sup>79</sup>. RH-I reprezentuje 20-35% pektínu<sup>81</sup>.

Substituované galaktouromomony sú rozmanitou skupinou polysacharidov, ktorých kostra obsahuje lineárne usporiadané jednotky  $\alpha$ -D-galaktózyurónovej kyseliny spojené cez 1. a 4. atóm

uhlíka. Jej reťazec býva substituovaný až 12 odlišnými typmi cukrov. Substituované galaktouronany sú všeobecne označované ako rhamnogalakturonan II <sup>79</sup>. Rhamnogalakturonan II tvorí asi 10% pektínu<sup>81</sup>. Polygalaktourónový reťazec býva esterifikovaný metylovými skupinami a voľné karboxylové skupiny môžu byť plne alebo čiastočne neutralizované sodnými, draselnými či amónnymi iónmi<sup>80</sup>. Medzi ďalšie substituované galaktouronany patrí xylogalakturonan a apiogalakturonan.



Obrázok 16: Polysacharidy (a - homogalaktouronan, b - rhamnogalaktouronan I, c - rhamnogalaktouronan II)

### **3. Praktická časť**

#### **3.1. Použité prístroje a chemikálie**

Na analýzu osemenia bol požívaný hmotnostný spektrometer Synapt G2-S (Waters, Milford, USA) s využitím MALDI ionizácie.

Na prípravu potrebných roztokov a pri meraní boli použité nasledujúce chemikálie: metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, pre HPLC), monohydrát 2',4',6'-trihydroxyacetofenónu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, p.a.), 3-aminochinolín (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, p.a.), acetón (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, pre HPLC), acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, pre HPLC), deionizovaná voda (deionizačná stanica, Milipore), červený fosfor (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, p.a.), hexán (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), petroléter (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

#### **3.2. Príprava matric a kalibračného roztoku pre MALDI-MS analýzu**

Na MALDI-MS analýzu boli pripravené dva roztoky matrice. Prvý roztok obsahoval 2',4',6'-trihydroxyacetofenón monohydrát, ktorý bol rozpustený v zmesi rozpúšťadiel acetonitrilu a deionizovanej vody v pomere 1:1. Druhý roztok matrice obsahoval 3-aminochinolín, ktorý bol rozpustený v acetóne. Obidva roztoky boli pripravené tak, aby výsledná koncentrácia matric v roztokoch bola 1 mg/ml. Ako kalibračný roztok bol použitý červený fosfor v acetóne s výslednou koncentráciou 1 mg/ml (bol vo forme suspenzie).

#### **3.3. Príprava vzoriek a postup pri MALDI-MS analýze**

Na analýzu boli k dispozícii semenka zo šiestich odrôd hrachu, ktoré poskytla Katedra botaniky Univerzity Palackého v Olomouci. Jednotlivé odrody boli rozdelené na dve skupiny. Skupinu semienok, ktorá sa vyznačovala vysokou mierou dormancie tvorili odrody VIR 320, L 100 a JI 64. Druhá skupina semienok bola získaná z odrôd CAMEOR, TERNO a JI 92. Odrody z druhej skupiny sú nedormantné.

Pred samotnou analýzou bolo vždy náhodne vybraných niekoľko semienok z každej odrody a z nich sa následne v trecej miske mechanickou cestou oddelilo osemenie od endospermu. Z jednotlivých osemení sa potom pomocou pinzety a skalpela získala reprezentatívna časť



s veľkosťou do 2 mm neobsahujúc časti hila. Tieto kúsky boli prichytené pomocou obojstrannej lepiacej pásky na jednotlivé spoty na MALDI doštičke.

V závislosti od pozitívneho či negatívneho módu, v ktorom bolo prevádzané meranie, sa na plate s prichytenými časťami osemenia naniesol roztok matrice pomocou sprejovacej techniky. Pre pozitívny mód sa používala matrica s monohydrát 2',4',6'-trihydroxyacetofenómom a pri meraní v negatívnom móde bol nanášať roztok s 3-aminochinolínom. Roztok matrice bol rovnako ako kalibračný roztok na MALDI plate s osemením nanášať opakovane 6x.



Obrázok 17: Príprava MALDI doštičky ( A – prvá fáza prípravy s obojstrannou lepiacou páskou, B – MALDI plate s prichytenými časťami osemenia)

Do dvoch vialok boli pripravené aj hexán-petroléterové extrakty osemenia z odrody JI 64 a JI 92 nasledujúcim spôsobom: Z uvedených dvoch odrôd hrachu sa mechanicky získalo osemenie a z neho bolo do vialky navážené približne 100 mg z každej odrody, pričom navážený materiál neobsahoval opäť hilum. K osemeniu sa pridala zmes nepolárnych rozpúšťadiel hexánu a petroléru v pomere 1:1. Extrakcia 100 mg osemenia prebiehala v 1 ml daných extrakčných činidiel po dobu jedného dňa a extrakty boli podrobené MALDI-MS analýze.

K analýze bolo dostupných aj niekoľko najvrchnejších častí osemenia získaných z priečnych kryorezov osemením odrody VIR 320 pomocou laserovej mikrodisekcie sprostredkovanej vďaka Biofyzikálnemu ústavu AV ČR v Brne. Tieto vzorky boli na MALDI plate prenesené pomocou pipety a kvapky deionizovanej vody. Ich analýza prebiehala s a bez použitia matric.

Samotné MALDI-MS meranie bolo uskutočňované vždy s minimálne troma opakovaniami a tiež s meraním správnej a presnej hmotnosti iónov vďaka možnosti referenčného skenu z LockMass spotu, kde bol nanosený roztok červeného fosforu v acetóne. Analýza bola prevedená vždy až po vysušení osemenia s nanesenými potrebnými roztokmi. Pri použití matrice sa tvorba jej kryštalického filmu sledovala pomocou mikroskopu. Ako štatistický nástroj bol používaný program MarkerLynx s aplikáciou Extended Statistic, ktorý je softwarovou nadstavbou programu MassLynx (Waters) používaného na meranie hmotnostným spektrometrom.

### 3.4. Podmienky analýzy pri full MS skanoch osemenia

*Tabuľka 3: Parametre a podmienky analýzy na prístroji Synapt G2-S*

<b>Typ laseru</b>	1kHz Nd:YAG solid state
<b>Vlnová dĺžka (nm)</b>	350
<b>Maldi Laser Energy</b>	400
<b>Step Rate laseru</b>	30
<b>Rozsah meraných hmot (Da)</b>	50-1200 Da
	Res mód
<b>Trap CE (eV)</b>	4
<b>Transfer CE (eV)</b>	2

### 3.5. Prehľad získaných hlavných MALDI-MS analýz

Tabuľka 4: Prehľad získaných analýz osemenia zo všetkých šiestich odrôd hrachu

	Odroda	Meranie s matricou	Použitá matrica	Mód	Meranie bez matrice	Mód
Dormantné odrody	VIR 320	áno	THAP	pozitívny	áno	pozitívny
		áno	AQ	negatívny	áno	negatívny
	L 100	áno	THAP	pozitívny	áno	pozitívny
		áno	AQ	negatívny	áno	negatívny
	JI 64	áno	THAP	pozitívny	áno	pozitívny
		áno	AQ	negatívny	áno	negatívny
Nedormantné odrody	CAMEOR	áno	THAP	pozitívny	áno	pozitívny
		áno	AQ	negatívny	áno	negatívny
	TERNO	áno	THAP	pozitívny	áno	pozitívny
		áno	AQ	negatívny	áno	negatívny
	JI 92	áno	THAP	pozitívny	áno	pozitívny
		áno	AQ	negatívny	áno	negatívny

Tabuľka 5: Prehľad MALDI-MS analýz získaných z extraktov osemenia odrôd JI 64 a JI 92

Vzorka	Meranie s matricou	Použitá matrica	Mód	Meranie bez matrice	Mód
extrakt JI 64	áno	THAP	pozitívny	áno	pozitívny
	áno	AQ	negatívny	áno	negatívny
extrakt JI 92	áno	THAP	pozitívny	áno	pozitívny
	áno	AQ	negatívny	áno	negatívny

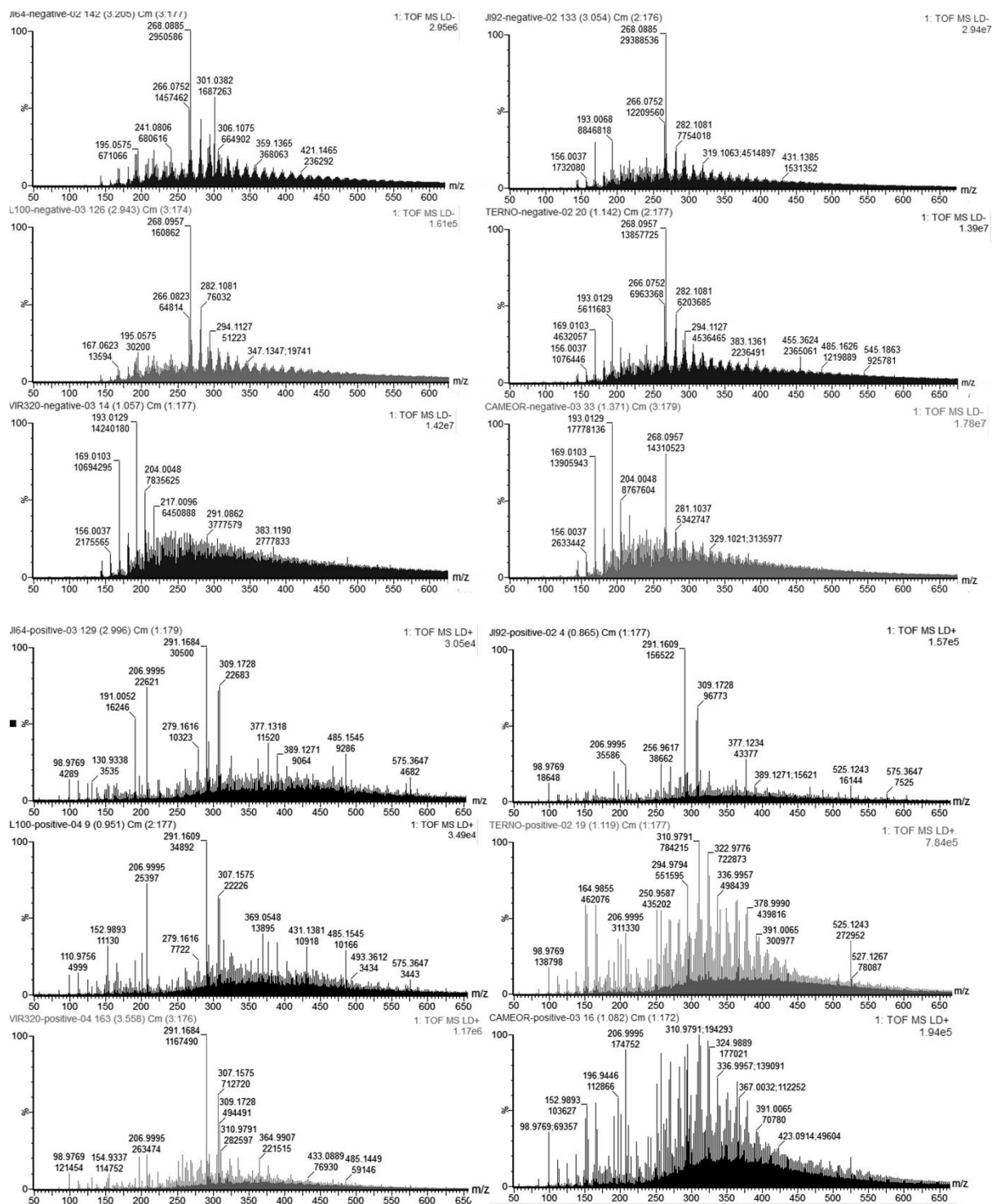
## 4. Diskusia a výsledky

### 4.1. Počiatkové MALDI-MS analýzy osemnia

V počiatkovej MALDI-MS analýze boli získané hmotnostné spektrá látok prítomných na vonkajšej strane osemnia zo všetkých odrôd hrachu, ktoré boli k dispozícii. Jednalo sa o osemenie získané s nedormantných odrôd hrachu (TERNO, CAMEOR a JI 92) a dormantných odrôd (VIR 320, L100 a JI 92). Pre každú odrodu boli prevedené štyri opakovania meraní. Vzhľadom na rôznorodú štruktúru a teda aj chemickú povahu látok, o ktorých sa predpokladalo, že budú prítomné v osemeni bolo meranie prevedené v kladom a zápornom ionizačnom móde s použitím roztoku matrice monohydrát 2',4',6'-trihydroxyacetofenónu pre pozitívny mód a roztoku 3-aminochinolínu pre negatívny mód.

Napriek tomu, že boli na prvý pohľad medzi surovými spektrami kvalitatívne pozorované rozdiely medzi dormantnými a nedormantnými odrodami, nebolo možné ich explicitne popísať. Hodnota celkového iónového prúdu bola porovnateľná. Vo všetkých týchto spektrách získaných pri meraní v negatívu sa so zvýšenou intenzitou vyskytovali ióny s nasledujúcimi hodnotami  $m/z$ : 143,0627; 169,0103; 193,0129; 195,0575; 217,0804; 241,0838; 268,0957 a 282,1081. Hodnota  $m/z$  143,0627 odpovedala najpravdepodobnejšie použitému 3-aminochinolínu. Presná monoizotopická hmotnosť jeden krát deprotonizovanej molekuly 3-aminochinolínu je 143,0609 (chyba činí 2,8 ppm, teda 0,4 mDa).

Z profilu hmotnostných spektier získaných zo všetkých odrôd v pozitívnom móde sa tak tiež nedali dobre priamo popísať rozdiely v  $m/z$  hodnotách v zložení jednotlivých odrôd hrachu a ani rozdiely v zložení, ktorým by sa od seba odlišovali dormantné a nedormantné odrody. V tomto typu hmotnostných spektier sa u všetkých odrôd vyskytovali so zvýšenou intenzitou ióny s hodnotami  $m/z$  98,9769; 206,9995; 291,1684; 307,1575; 309,1728; 377,1234; 389,1271; 485,1449 a 575,3649. Tieto hodnoty  $m/z$  nesúviseli s hodnotami uvedenými v predchádzajúcom odstavci v spojení s protonizovanými molekulami, či sodnými alebo draselnými aduktami. Hodnota celkového iónového prúdu bola v porovnaní s meraním v negatívnom móde v priemer o dva až tri rády nižšia. Na nasledujúcej strane sa nachádza prehľad vybraných full MS spektier v oboch ionizačných módoch.



Obrázok 18: Prehľad vybraných MS spektier v negatívnom a pozitívnom móde a s použitím matric zo všetkých odrôd hrachu (vrchná šesťica – meranie s negatívnou ionizáciou, spodná šesťica – meranie s pozitívnou ionizáciou, spektrá tvoriace ľavú polovicu – dormantné odrody, spektrá tvoriace pravú polovicu – nedormantné odrody hrachu).

## 4.2. Analýza hlavných komponent

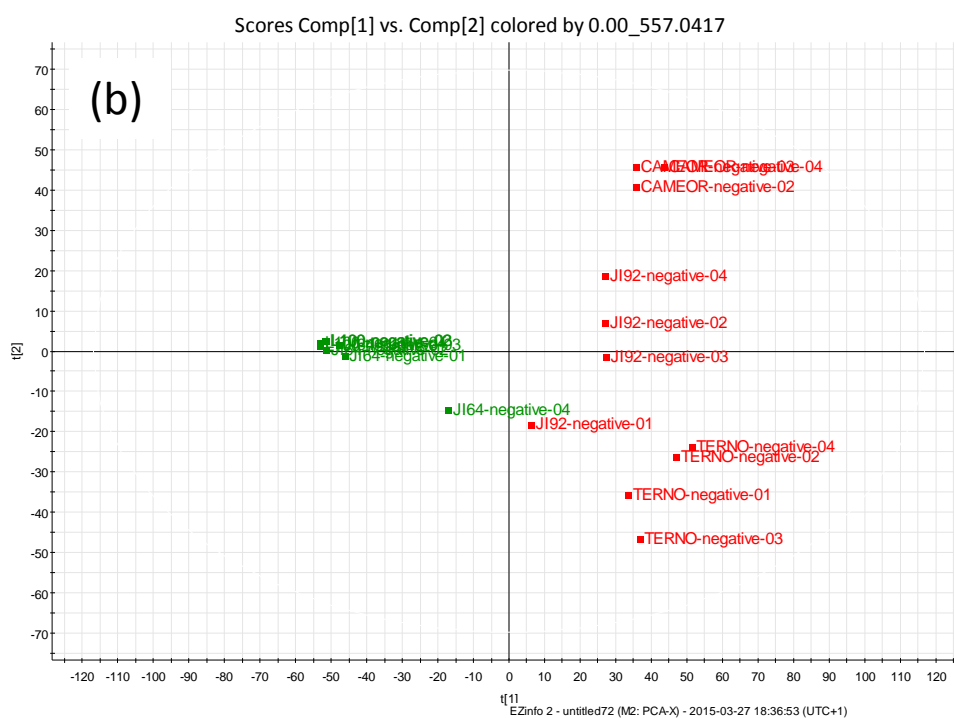
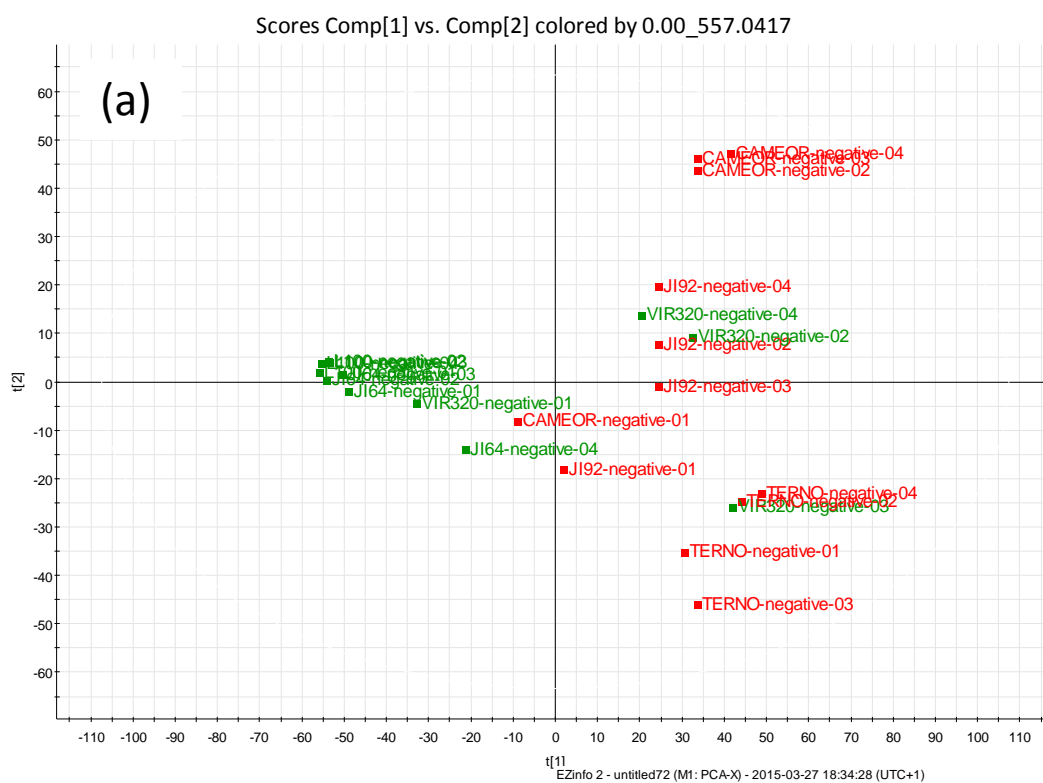
Vzhľadom na obtiažnosť priameho porovnávania signálov v šiestich odrodách (24 analýzach vrátane opakovaní) boli primárne dáta získané MALDI-MS analýzou podrobené štatistickému spracovaniu pomocou softwaru MarkerLynx a následne pomocou analýzy hlavných komponent.

### 4.2.1. Meranie prevedené s maticou a v negatívnom móde

Analýza hlavných komponent, ktorá bola vzťahnutá na MALDI-MS merania v negatívnom móde a s maticou (AQ) preukázala, že v jednotlivých hmotnostných spektrách sú využiteľné rozdiely. V *Grafe 1* na nasledujúcej strane vidno, že sa odrody hrachu delia na dve skupiny podľa ich miery dormancie. Skupinu označenú zelenou farbou tvoria dormantné odrody (JI 64, L100, VIR 320) a skupinu označenú červenou farbou tvoria nedormantné odrody (CAMEOR, TERNO, JI 92).

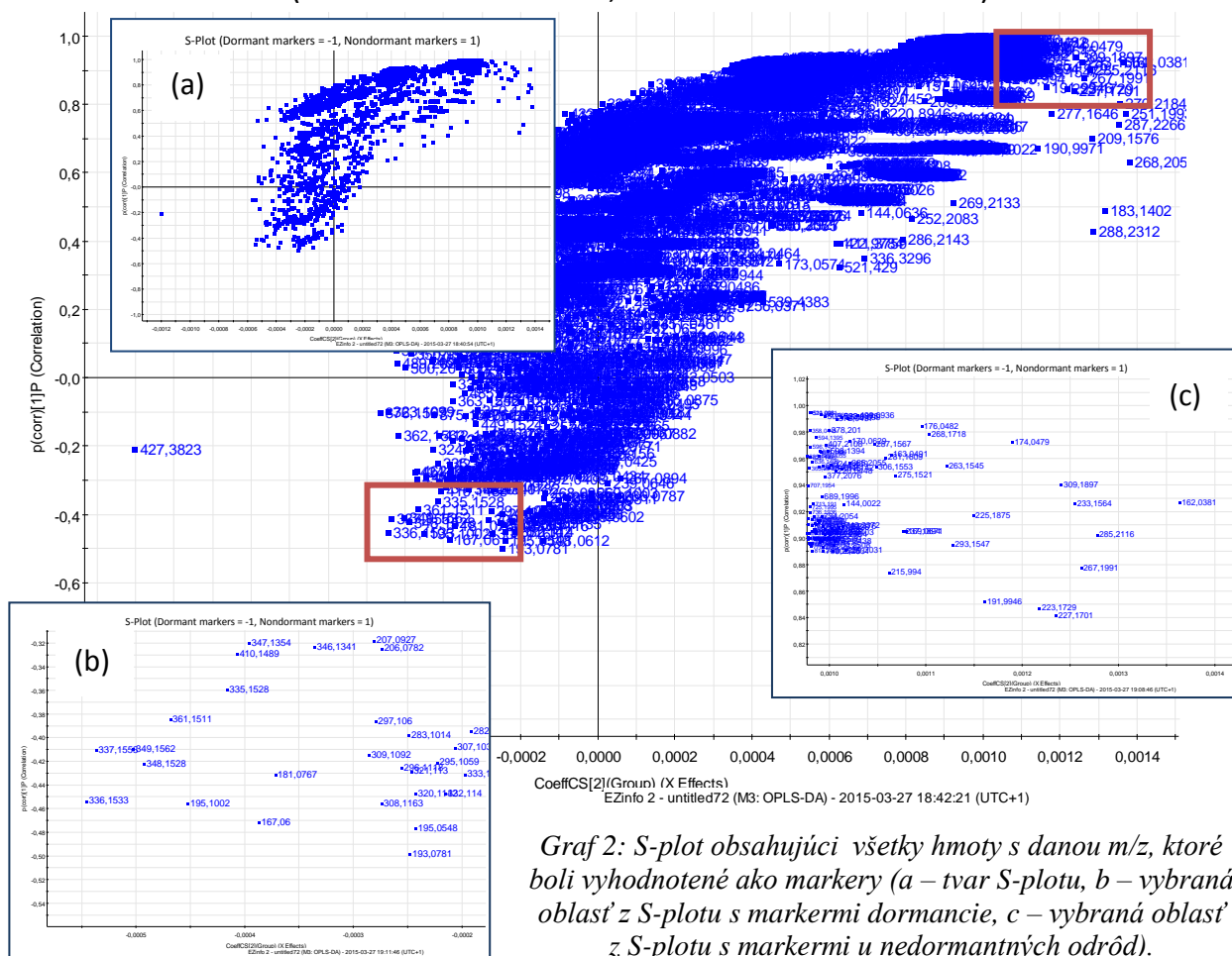
Výnimočne sa však správali merania odrody VIR 320, ktorá v *Grafe 1(a)* nezaujímala logické rozloženie a nedružila sa k dormantným odrodám, ku ktorým patrí. Táto situácia mohla byť zapríčinená vďaka odlišnej morfológii osemenia. Odlišné chovanie bolo pozorované aj u prvého merania osemenia odrody CAMEOR, ktoré sa síce dalo svojimi súradnicami zaradiť do skupiny nedormantných odrôd, avšak toto meranie sa výrazne odchyľovalo od ďalších troch meraní CAMEORU, ktoré spolu tvorili zhuk. Odlišnosť prvého merania CAMEORU od ďalších troch mohlo byť spôsobené zlomom alebo prasklinou v osemení. Vďaka týmto skutočnostiam boli z analýzy hlavných komponent vylúčené všetky merania odrody VIR 320 a prvé meranie odrody CAMEORU.

V novej analýze hlavných komponent, ktorá bola prevedená po vylúčení vyššie uvedeních meraní sa segregácia odrôd s potlačenou a výraznou dormanciou zachovala. Jej výsledok je znázornený na *Grafe 1(b)*. Za týchto podmienok bol z daných meraní zostrojený S-plot (*Graf 2*), ktorý vyhodnotil markery, respektíve ich  $m/z$ , ktorých výskyt je výraznejší u dormantných odrôd (markery dormancie), prípadne u nedormantných odrôd (markery nedormancie). Za významné boli považované tie markery, ktoré boli svojimi  $[x,y]$  súradnicami najviac vzdialené od osi  $x$  a  $y$ . Ich prehľad je zhrnutý v *Tab 6.* Pozornosť bola venovaná aj markeru z  $m/z$  427,3823.



Graf 1: Výsledky PCA analýzy MALDI-MS meraní v negatívnom móde a s použitím matrice (a- segregácia všetkých odrôd, b – segregácia po vylúčení všetkých štyroch meraní odrody VIR 320 a prvého merania odrody CAMEOR)

## S-Plot (Dormant markers = -1, Nondormant markers = 1)

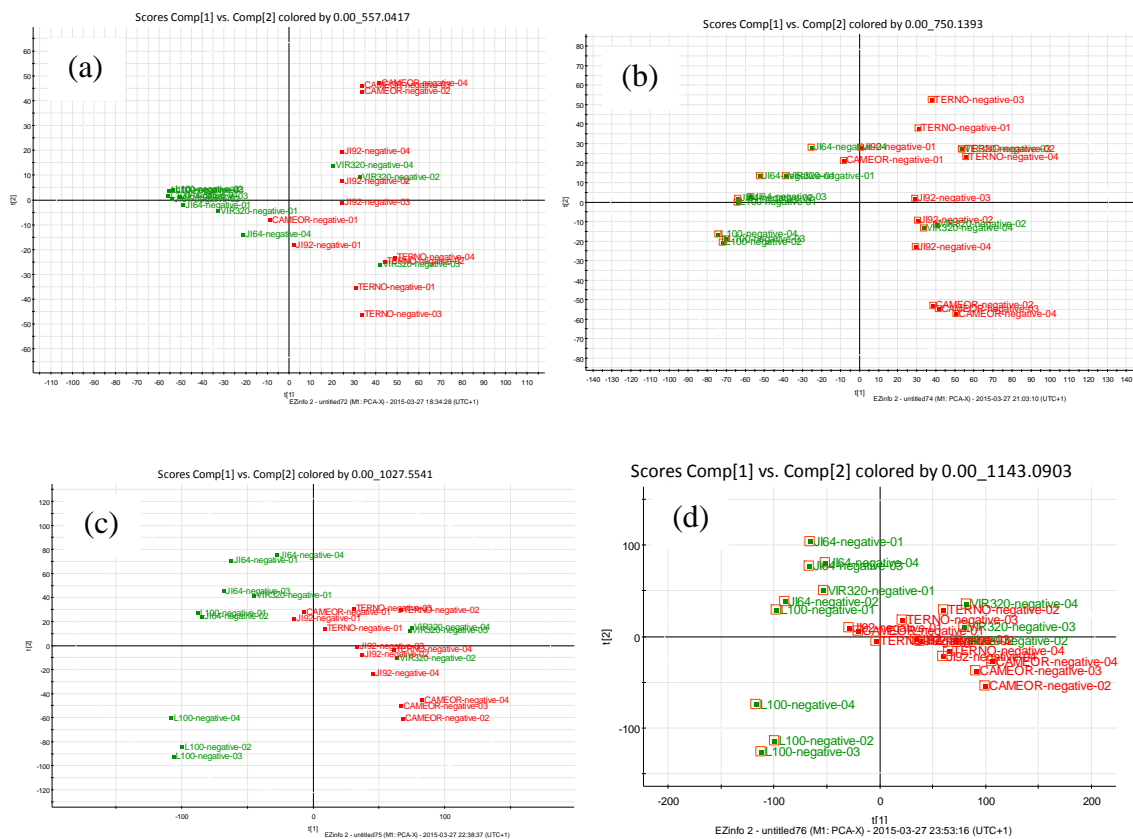


Graf 2: S-plot obsahujúci všetky hmoty s danou m/z, ktoré boli vyhodnotené ako markery (a – tvar S-plotu, b – vybraná oblasť z S-plotu s markermi dormancie, c – vybraná oblasť z S-plotu s markermi u nedormantných odrôd).

Tabuľka 6: Prehľad markerov

Meranie v negatívnom móde, s maticou, všetky odrody						
Markery dormantných odrôd		Markery nedormantných odrôd				
167,06	335,1528	144,0022	223,1729	281,1609	498,0936	748,2372
168,0579	336,1533	162,0381	225,1875	285,2116	508,098	750,244
181,0767	337,1553	163,0491	227,1701	287,1567	510,099	751,2426
195,1002	346,1341	169,0671	233,1564	293,1547	522,0975	752,2438
206,0782	347,1354	170,0629	237,1894	306,1553	598,1394	756,2539
207,0927	348,1528	174,0479	239,2031	309,1897	612,142	760,2422
296,1118	349,1562	176,0482	263,1545	365,2055	614,1432	762,2466
297,106	361,1511	184,045	267,1991	372,0497	624,1439	780,2548
308,1163	410,1489	191,9946	268,1718	377,2076	736,2376	786,2456
309,1092	436,1488	215,994	270,2184	378,201	738,2404	797,2456
334,1112	448,1541	220,0448	275,1521	407,2108	740,2403	800,2508





Graf 3: Grafy PCA analýzy a distribúcia dát pre rôzne hodnoty thresholdu (zelená farba označuje všeobecne dormantné odrody, červená farba označuje nedormantné odrody, a – TH 100 000, b – TH 50 000, c – TH 10 000, d – TH 5000)

Okrem iného bol zisťovaný aj vplyv nastavenia hodnoty *Marker Intensity Threshold* (ďalej už len *TH*) na výsledky PCA analýzy dát získaných pri meraní v negatívnom móde a s použitím matrice. Zmena jeho hodnoty výrazne neovplyvnila spôsob segregácie jednotlivých dát. Porovnanie vybraných hodnôt thresholdu vidíme na grafoch uvedených vyššie. Prvý graf (*Graf 3a*) je zostrojený pre hodnotu TH 100 000. Jedná sa o hodnotu, ktorá bola vzatá do úvahy pri generovaní dormantných a nedormantných markerov v predchádzajúcej kapitole.

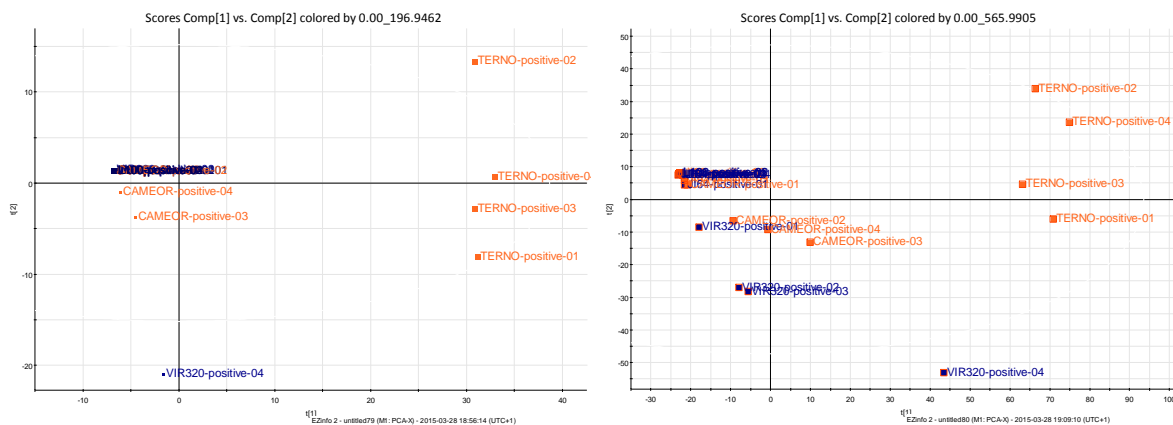
Druhý graf (*Graf 3b*) ukazuje zoskupenie jednotlivých odrôd pri TH 50 000, ktoré je prakticky totožné s predchádzajúcim výsledkom. Aj v tomto prípade sa dá pri odrode VIR 320 nájsť nelogické postavenie v grafe vzhľadom k ďalším odrodám. Výnimkou opäť nie je ani prvé meranie CAMEORU. Pri hodnote TH 10 000 je viditeľné, že došlo k rozdeleniu dormantných odrôd na dva diferencovanejšie klustre. Jeden je tvorený L 100 a druhý je JI 64.



5000. Na základe tohto zistenia bola v ďalších meraniach používaná len hodnota step ratu laseru 30 Hz.

#### 4.2.2. Analýza hlavných komponent a jej zhrnuté výsledky u ďalších typov meraní

K ďalším typom meraní patrila aj MALDI-MS analýza prevedená v kladnom ionizačnom móde s použitím matrice THAP a analýza v pozitívnom a negatívnom móde bez použitia príslušných matric. Všetky typy analýz osemenia boli prevedené opäť v štyroch opakovaniach pre každý druh hrachu. Merania bez použitia matrice mali preukázať, či použitie roztoku matrice neovplyvňuje intenzity príslušných markerov. Okrem toho bol tento typ merania zvolený aj z hľadiska javu, ktorý s osemením u nedormantných odrôd nastal vždy po aplikovaní roztoku matrice. V priebehu niekoľkých minút sa toto osemenie po nanosení matrice začalo stáčať a meniť tvar. Zrejme to súviselo priamo s mechanizmom, ktorý je zodpovedný za transport vody (látok tvorených roztok matrice) cez osemenie. U osemenia dormantných odrôd sa tento jav nevyskytoval. Získané hmotnostné spektrá boli podrobené opäť PCA analýze.



Graf 5: PCA analýza dát získaných pri meraní v pozitíve s použitím matrice THAP (a – pri hodnote TH 100 000, b – pri hodnote TH 10 000).

Ako vidieť v Grafe 5a analýza hlavných komponent s TH 100 000 za daných podmienok (pozitív, matrica) pri meraní neprinesla žiadne jednoznačné delenie dát ako pri dátach získaných v negatívu a aplikáciou matrice. Inak tomu nebolo ani pri zmene hodnoty TH na 50 000, 10 000 a 5000. Rozptýlenie dát pri TH 10 000 je ukázané v Grafe 5b. V oboch prípadoch

je však jasne zo všetkých odrôd vyčlenený nedormantný typ TERNO. Po vygenerovaní S-plotu pri TH 100 000 v PCA analýze, kde sa porovnali dáta pre TERNO vzhľadom k všetkým ďalším odrodám (okrem odľahlého bodu VIR 320, vid' *Graf 5a*), boli za markery vyskytujúce sa s najvyššou pravdepodobnosťou len u tejto odrody vygenerované tie, ktoré sú pre zaujímavosť uvedené v nasledujúcej *Tab. 7*. Ich vzťah k dormancii je však veľmi diskutabilný.

*Tabuľka 7: Markery TERNO odrody*

56,9652	202,0121	238,053	280,1152	427,9988	507,9918	545,993	576,0066	597,0084	622,9842	638,9624
127,0079	207,0686	240,0318	284,1085	429,9862	510,0402	546,0441	577,0802	599,0027	624,9393	639,04
143,0023	209,0804	242,0281	298,1064	474,0468	512,0433	548,0451	578,035	601,0057	625,0072	641,0021
149,9986	214,0164	243,056	320,1543	478,0468	514,0405	552,0286	580,0053	606,0294	626,9487	646,9799
156,9819	222,0117	244,0301	328,157	480,0396	516,0415	553,9982	581,2009	607,0558	627,0032	650,9533
158,999	225,0817	248,0629	330,1628	484,0476	518,0464	555,9932	584,0309	609,0077	629,0046	651,0419
163,9854	226,0126	250,0597	332,1597	488,0431	521,9981	558,0432	586,0313	609,2063	631,012	652,9827
168,9606	227,0557	253,1103	336,1633	496,0407	522,0456	560,0401	588,0133	611,0057	631,0539	654,9946
176,0128	228,033	254,0462	342,1601	498,0454	530,0471	562,0385	590,0371	611,05	634,9777	657,0056
184,0047	230,9478	256,0418	344,1569	500,0444	534,0342	568,0336	592,0206	615,0044	635,0388	662,9716
185,9989	233,0554	257,1034	346,1589	502,0474	538,0062	571,0822	594,0327	615,0671	637,0027	664,9747
193,0558	234,0226	271,1162	352,1573	504,0446	542,0355	574,0367	596,0299	619,0045	637,0574	665,0212

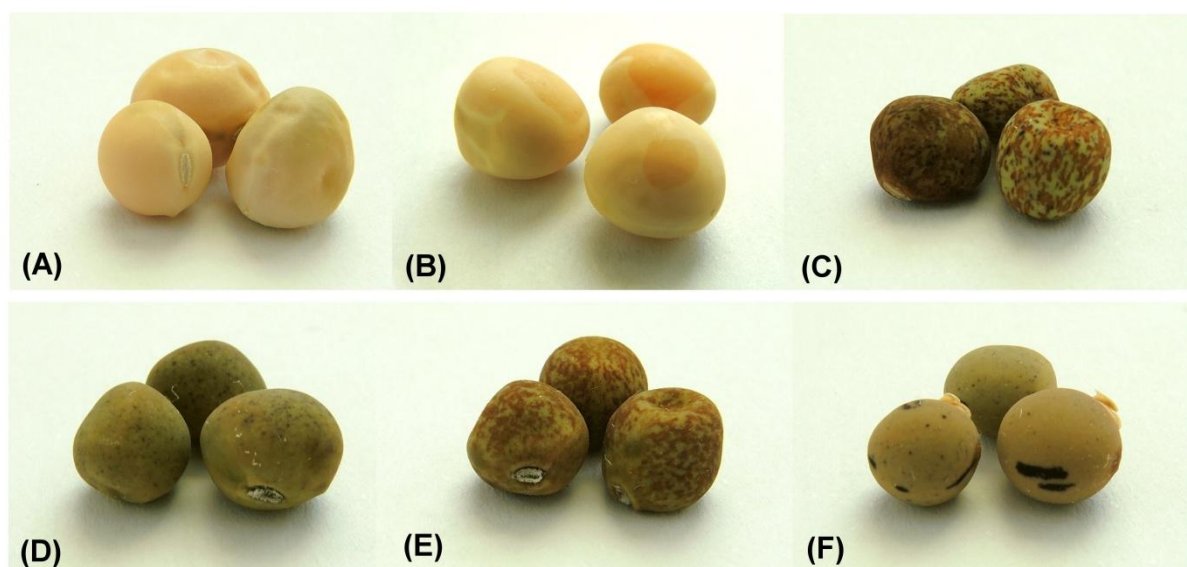
Dáta získané z meraní pri ionizácii pozitívnymi potenciálmi u študovanej šestice odrôd teda neumožňujú segregáciu na dormantné a nedormantné odrody. Oproti tomu pri spracovaní dát získaných pri meraní v negatívnom módu je určitej segregácie dosiahnuté.

U meraní bez matrice a pre obidva ionizačné módy boli výsledky PCA analýzy podobné. Spoločným rysom u oboch analýz bolo odčlenenie JI 92 odrody od ostatných odrôd pri všetkých štyroch zvolených zadaných hodnotách TH. U analýz vychádzajúcich z kladného módu sa najviac odčlenili aj body s CAMEOROM. Za zaujímavé je možno považovať správanie VIRu 320, ktorý sa nachádzal spolu s ostatným typmi v jednom mieste vo výsledných grafoch. Vzhľadom na nedelenie sa odrôd podľa dormancie u oboch týchto experimentov bez matrice sa nepriaznivý výsledok v PCA analýze dá považovať za prínosný. Poukazuje na to, že látky, ktoré môžu istou mierou podporovať dormanciu u vybraných trochu druhov semien hrachu, sú látky, ktoré pravdepodobne nemôžu byť priamo ionizované UV žiarením laseru bez použitia matrice. Priamym pôsobením laseru je v rade prípadov možno desorbo-

vať/ionizovať látky aromatické. Tie teda zrejme nebudú patriť k významným markerom dormancie zachytenými MALDI technikou.

#### 4.3. Výsledky získané pre dormantnú odrodu JI 64 a nedormantnú JI 92

Vybrané odrody hrachu sa od seba odlišovali nielen mierou dormancie, ale aj morfológiou, či mierou pigmentácie ako vidieť na *Obr. 19*. Osemenie bez pigmentácie bolo viditeľné u nedormantnej skupiny odrôd CAMEOR a TERNÓ. JI 92 ako posledný zástupca tejto skupiny mal osemenie výrazne pigmentované. U osemení dormantných odrôd bola pigmentácia prítomná u každého jedného druhu. Vo všeobecnosti bolo tiež osemenie dormantných odrôd hrachu pevnejšie a ťažšie sa mechanicky oddeľovalo od endospermu. Tieto vlastnosti môžu tiež prispievať k výslednej dormancii semien. Vzhľadom na to, že odroda JI 92 bola svojim osemením odlišná od zvyšných dvoch nedormantných odrôd, a vďaka tomu, že jej najvhodnejším protikladom z genetického hľadiska bola dormantná odroda JI 64, sa ďalšie experimenty vzťahovali len k týmto dvom typom osemenia.



*Obrázok 19: Analyzované odrody hrachu*

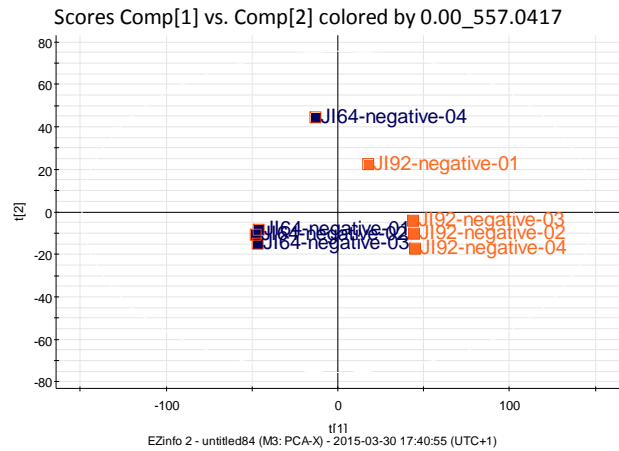
(A - CAMEOR, B - TERNÓ, C - JI 92, D - VIR 320, E - L 100, F - JI 64)

Jednotlivé MALDI-MS analýzy osemenia JI 64 a JI 92 (čiže v oboch módoch s maticou a v oboch módoch bez matrice) boli taktiež podrobené analýze hlavných komponent, u ktorej sa sledoval vplyv hodnoty TH rovnako ako v prvej kapitole, teda pri hodnotách 100 000, 50 000, 10 000 a 5000. PCA analýza získaná z pozitívneho módu (s maticou aj bez matrice) nepreukázala vhodné rozdelenie týchto dvoch odrôd podľa miery dormancie pri žiadnej hodnote TH. U týchto analýz nebolo možné ani zostrojiť príslušné S-ploty, preto im nebola venovaná bližšia pozornosť. Vďaka tomu, že u dát zo spomínanej prvej kapitoly 4.2.1. získaných v negatívnom móde bolo dosiahnuté pomerne ukázkové delenie odrôd podľa dormancie si hlbšiu pozornosť teda zaslúžia aj merania v negatívu u odrôd JI 64 a 92, o ktorých sa bude diskutovať v ďalšej podkapitole.

### 4.3.1. Analýza osemenia JI64 a JI92 v negatívnom móde s použitím matrice

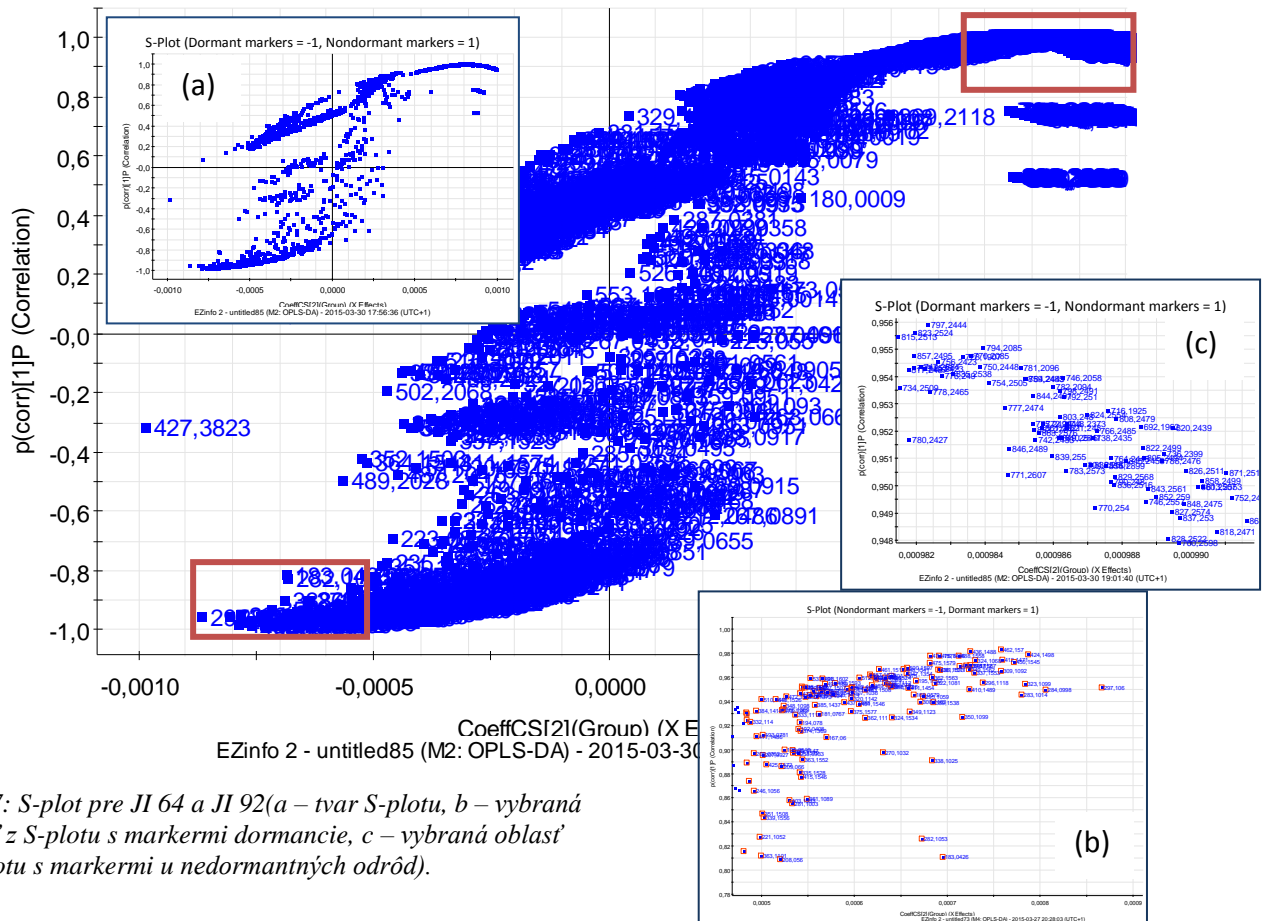
#### Výsledky PCA analýz dát s Marker Intensity Threshold 100 000:

Za týchto podmienok bolo dosiahnuté delenie zvolených dvoch odrôd podľa dormancie ako vidieť v *Grafe 6*. Za odľahlý bod je možno považovať meranie JI64-negative-04, ktoré však vylúčením neovplyvnilo zloženie dormantných, prípadne nedormantných markerov. Tvar a rozloženie merkerov v S-plotu je zobrazené v *Grafe 7*.



*Graf 6: PCA analýza pre JI64 a JI 92 v negatívne, s maticou a pri TH 100 000.*

#### S-Plot (Dormant markers = -1, Nondormant markers = 1)



*Graf 7: S-plot pre JI 64 a JI 92 (a – tvar S-plotu, b – vybraná oblasť z S-plotu s markermi dormancie, c – vybraná oblasť z S-plotu s markermi u nedormantných odrôd).*

*Tabuľka 8: Markery dormancie vygenerované na základe PCA analýzy pre JI64 a JI 92 (za podmienok negatív, matrica, TH 100 000)*

167,0612	284,1031	334,1313	361,1389	403,1535	437,1497	474,1606	525,1917
168,0575	295,1043	335,1338	362,1128	409,152	438,1505	475,1604	536,1896
181,0765	296,1097	336,1078	362,1563	410,1512	439,159	476,1512	537,1929
182,0727	297,1038	336,1533	363,1557	411,1478	447,1543	486,1617	
192,052	307,1034	337,1553	372,1418	412,1504	448,1558	487,1605	
194,0771	308,1137	338,1042	373,1481	415,1548	449,1539	488,1607	
195,0536	309,1079	346,1368	374,1394	422,1467	450,1587	489,159	
195,1002	320,114	347,1379	375,1392	423,153	451,1554	498,1828	
209,0638	321,112	348,1117	376,1563	424,1518	460,1566	499,1624	
258,0964	322,1113	348,1528	385,147	425,1482	461,1538	500,1883	
270,1012	323,112	349,1421	386,1431	427,1576	462,1591	501,1882	
281,0999	324,1087	350,1348	389,1538	434,1506	463,1533	512,1892	
282,1041	324,1531	359,1391	397,1519	435,1518	472,1543	513,1902	
283,1028	333,1098	360,1418	398,1442	436,1507	473,156	524,1901	

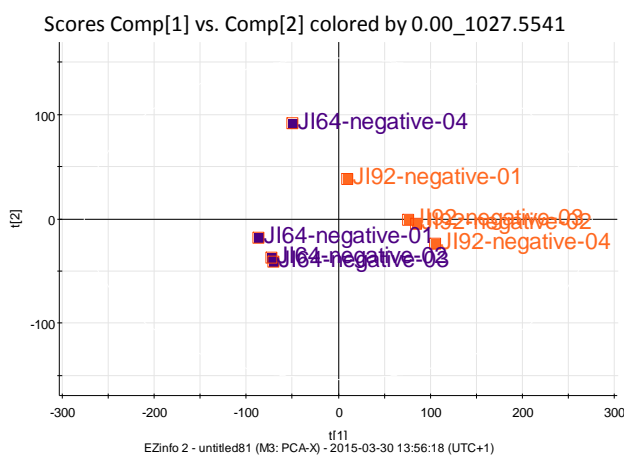
Vo vyššie uvedenej *Tabuľke 8* sú zhrnuté markery dormancie z meraní pri odrodách JI 64 a JI 92. Mnohé z nich sú zhodné s markermi dormancie, ktoré boli získané z S-plotu z PCA analýzy nasadenej na všetky odrody hrachu, ktoré boli už spomenuté v kapitole 4.2.1. Ich štruktúru sa napriek snahe doposiaľ nepodarilo objasniť. Pre všetky markery z vyššie uvedenej tabuľky platí, že sa so zvýšenou intenzitou nachádzajú u JI 64, a v malej alebo žiadnej intenzite u JI 92 pri všetkých opakovaníach MALDI-MS analýz. V S-plotu (pre JI 64 a JI 92) sa opakovane objavuje aj už spomínaný marker s m/z 427,3823. Z jeho súradníc vyplýva, že sa môže jednať o marker, ktorý je typický pre dormantné osemenia, avšak na samotnej dormancii sa môže podieľať len s malou hladinou významnosti. Jeho prípadná štruktúra bude diskutovaná v ďalšej časti práce.

Medzi významné nedormantné markery, ktoré boli súčasťou výrezu z S-plotu, patrilo veľké množstvo iónov s m/z nad 700.

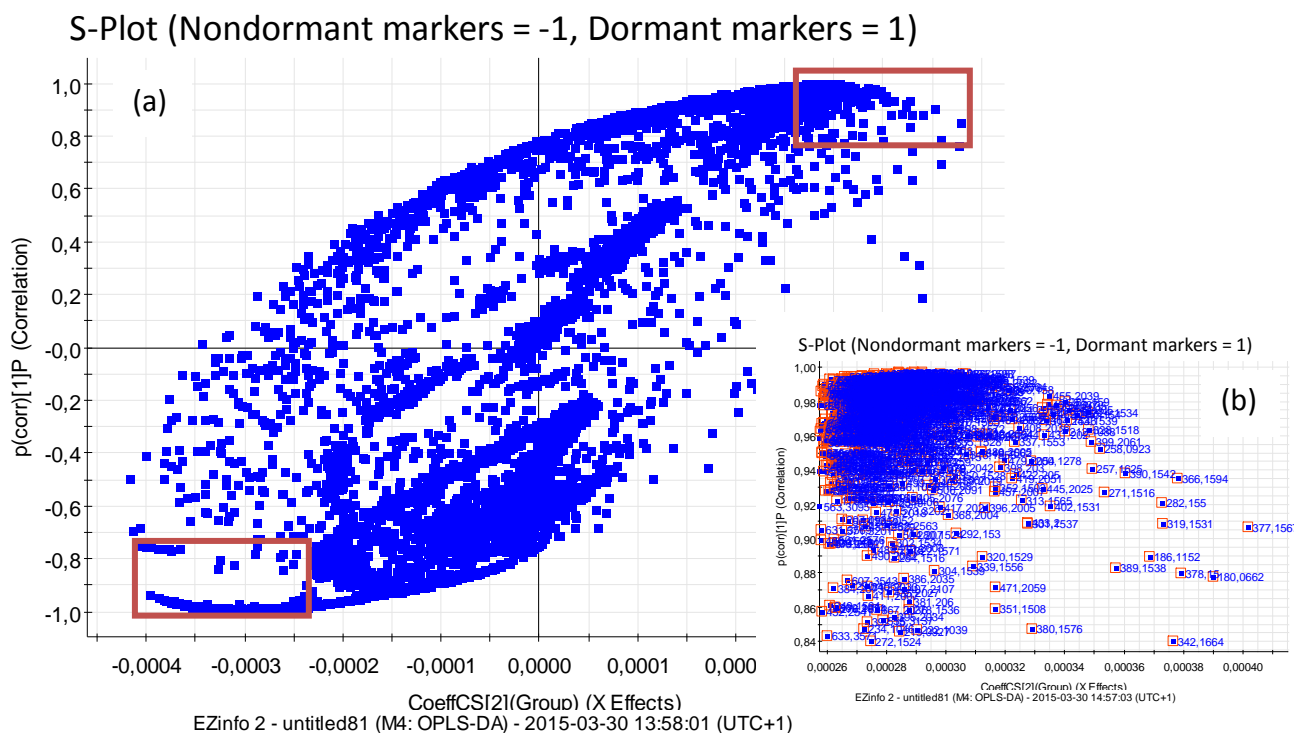


**Výsledky PCA analýz dát s Marker Intensity Threshold 10 000:**

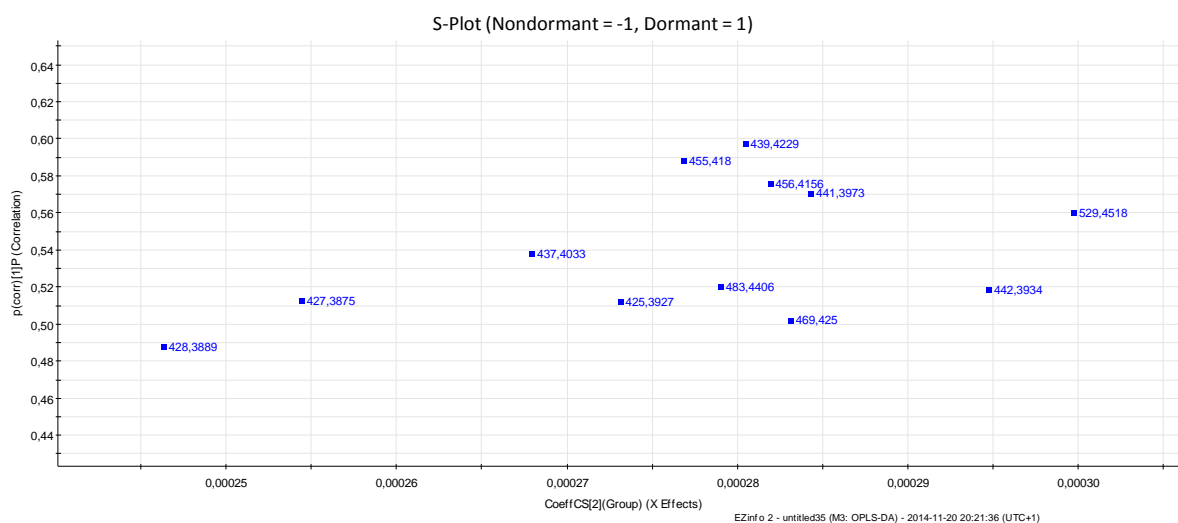
Pri použití hodnoty TH 10 000 bolo opäť dosiahnuté delenie zvolených dvoch odrôd podľa dormancie ako vidieť v *Grafe 8*. Odľahlý bod JI64-negative-04 opäť nebol vylúčený pred vytvorením S-plotu, ktorého tvar a rozloženie merkerov je zobrazené v *Grafe 9*. Prípadné vylúčenie tohto bodu by neovplyvnilo zoznam výsledných markerov dormancie.



*Graf 8: PCA analýza pre JI64 a JI 92 v negative, s maticou a pri TH 10 000.*



*Graf 9: S-plot pre JI 64 a JI 92 pri TH 10 000 (a – tvar S-plotu, b – vybraná oblasť z S-plotu s markermi dormancie, c – vybraná oblasť z S-plotu s markermi u nedormantných odrôd).*



Obrázok 20: Markery dormancie pri TH 10 000 z dát pre všetky odrody v negatívu a s maticou

V prvej kapitole bolo spomenuté, že hodnota TH 10 000 bola zaujímavá z hľadiska delenia odrôd podľa dormancie, a jednotlivé dáta odrôd v nej tvorili klastre. Na *Obr. 20* sú vyobrazené markery dormancie získané za podmienok analýz uvedených vo vyššie spomenutej kapitole z dát pre všetky odrody. Je podstatné, že sú zhodné s markerami dormancie získanými za analogických podmienok avšak len u odrôd JI 64 a JI 92. Tieto markery sa dajú považovať za ideálne (splňujúce pravidlo zvýšeného obsahu u všetkých opakovaných meraní dormantných odrôd oproti všetkým meraniam odrôd nedormantných), pretože sa nachádzajú vo zvýšenej intenzite u dormantnej odrody JI 64 a sú výrazne potlačené u odrody JI 92. *Tabuľka 9* zhrňa všetky nájdené ideálne markery dormancie v odrodách pre JI 64 a JI 92.

Tabuľka 9: Markery dormancie pre JI 64 a JI 92

411,3865	428,3889	442,3934	483,4406
425,3927	437,4033	455,418	493,3677
427,3875	441,3973	456,4156	529,4518

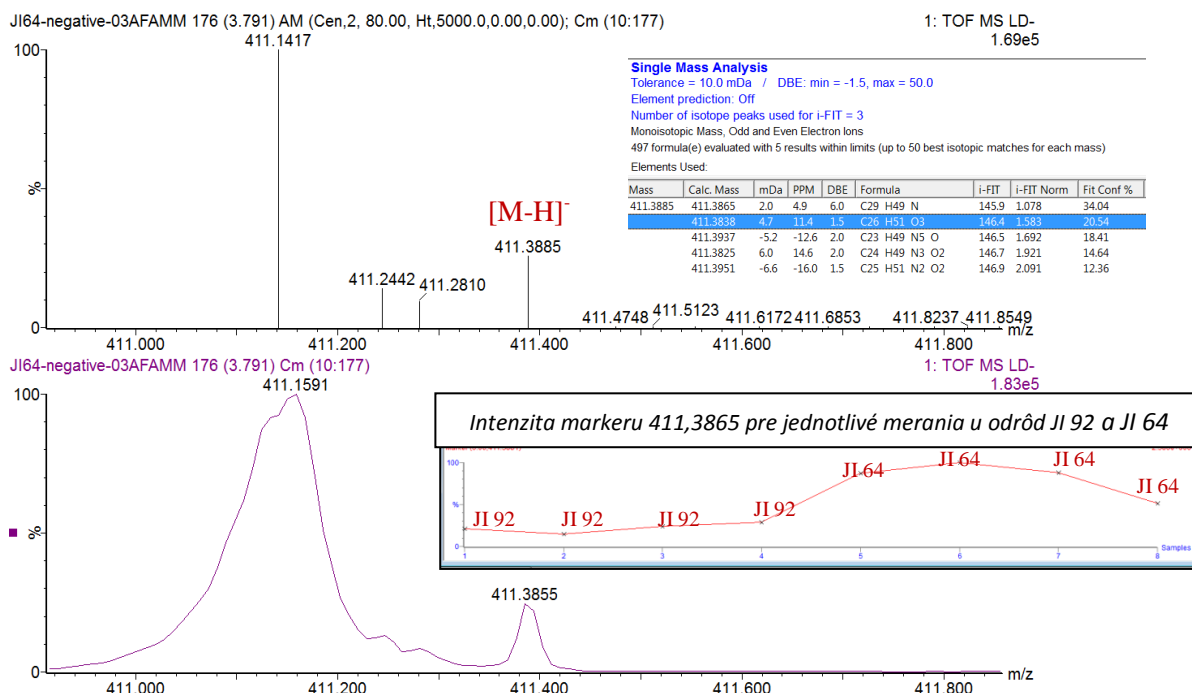
Elementárne zloženie markerov bolo navrhnuté pomocou aplikácie Elemental composition v programe MassLynx 4.1. Pri určovaní odchýlky týchto látok sa vychádzalo z hmotnostných spektier, ktoré boli korigované automatickou LockMass korekciou s referenčnými hodnotami červeného fosforu meraného v LockMass skenu v priebehu analýzy.

Do úvahy boli braté všetky molekulové vzorce látok na výstupe z danej aplikácie s odchýlkou maximálne do 15 ppm. Pomocou webovej aplikácie ChemSpider, či databázy SciFinder boli postupne preverené všetky dormantné markery. K väčšine navrhnutých molekulových vzorcov, prípadne priamo k hodnote m/z, neboli v databázach priradené žiadne štruktúry. Medzi vygenerovanými vzorcami s odchýlkou pod 15 ppm boli aj také, ktoré mali zloženie  $[C_xH_yO_z - H]^-$ . Vzhľadom na to, že sa jednalo o priamu analýzu najvrchnejšej časti osemenia je možné, že dané ióny odpovedajú hydroxylovaným vyšším mastným kyselinám, ktoré bývajú typické pre kutikulárne vosky, či iné látky v rastlinnom tele, ktoré boli diskutované taktiež v teoretickej časti. Jednotlivé štruktúry priradené k markerom dormancie z dát pre JI 64 a JI 92 sú v *Tabuľke 10*. Zvýšená koncentrácia vyšších mastných kyselín v povrchovej vrstve osemenia u dormantných odrôd by zvyšovala hydrofóbne vlastnosti osemenia, vďaka ktorým, by bola sťažená vstupná cesta pre vodu smerom k embryu v porovnaní s nedormantnými typmi osemenia. Hydrofóbnosť osemenia by mohla byť zvýšená vytvorením sieťovanej alebo rozvetvanej štruktúry medzi jednotlivými vyššími mastnými kyselinami vďaka prítomnosti jednej alebo viacerých hydroxylových skupín.

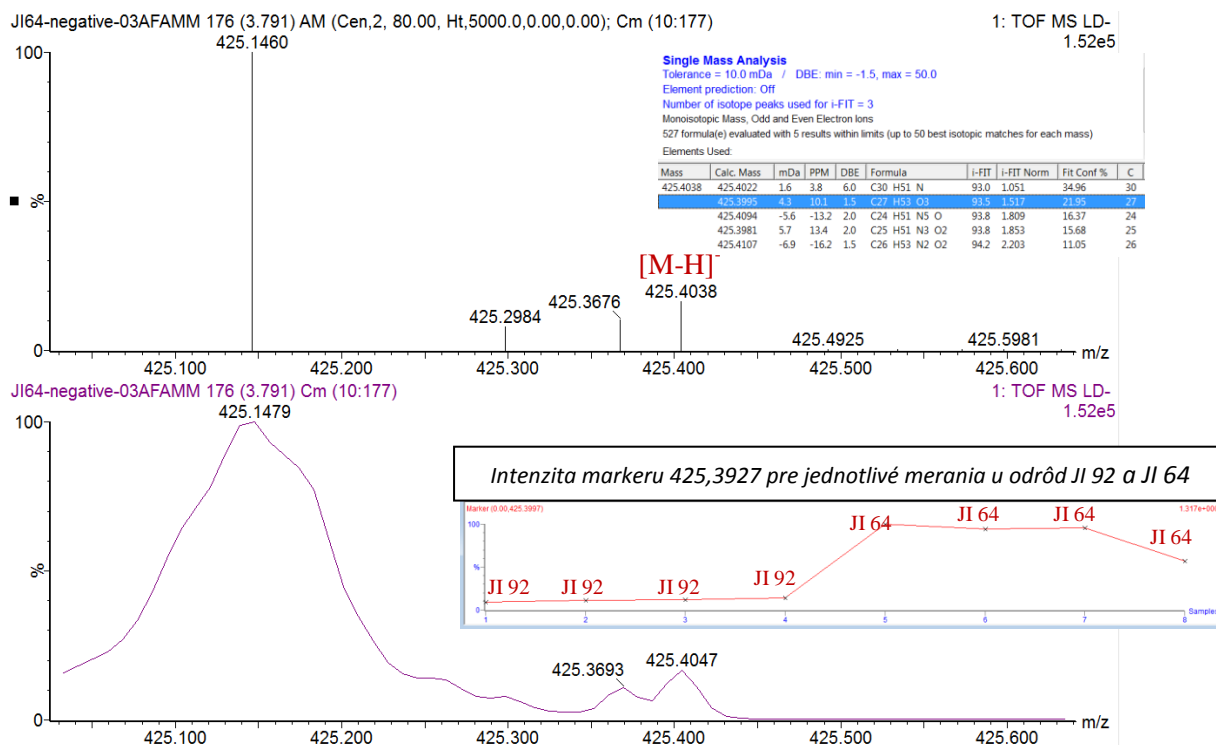
*Tabuľka 10: Navrhnuté štruktúry pre niektoré markery dormancie*

Marker dormancie a jeho m/z	[M - H] <sup>-</sup>	Presná hodnota m/z [M - H] <sup>-</sup>	Odchýlka v ppm	Názov navrhutej štruktúry
411,3865	C <sub>26</sub> H <sub>51</sub> O <sub>3</sub>	411,3839	11,4	kyselina hydroxyhexakosánová
425,3927	C <sub>27</sub> H <sub>53</sub> O <sub>3</sub>	425,3995	10,1	kyselina hydroxyheptakosánová
427,3875	C <sub>26</sub> H <sub>51</sub> O <sub>4</sub>	427,3787	12,2	kyselina dihydroxyhexakosánová
437,4033	C <sub>28</sub> H <sub>53</sub> O <sub>3</sub>	437,3995	10,7	kyselina hydroxyoktakosénová, prípadne kyselina oxooktakosánová
441,3973	C <sub>27</sub> H <sub>53</sub> O <sub>4</sub>	441,3944	13,4	kyselina dihydroxyheptakosánová
455,418	C <sub>28</sub> H <sub>55</sub> O <sub>4</sub>	455,41	13,6	kyselina dihydroxyoktakosánová
483,4406	C <sub>30</sub> H <sub>59</sub> O <sub>4</sub>	483,4413	12,9	kyselina dihydroxytriakontánová
529,4518	C <sub>31</sub> H <sub>61</sub> O <sub>6</sub>	529,4468	11,9	kyselina tetrahydroxyhentiakontánová

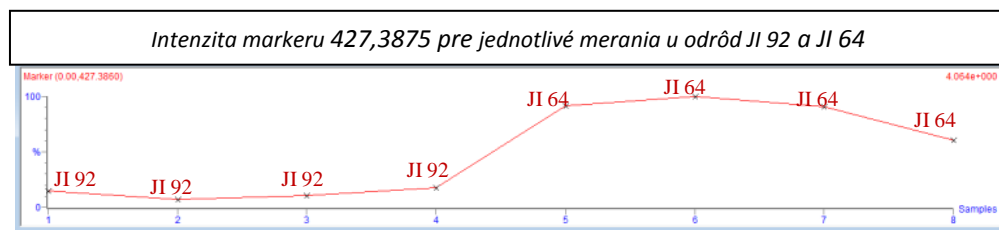
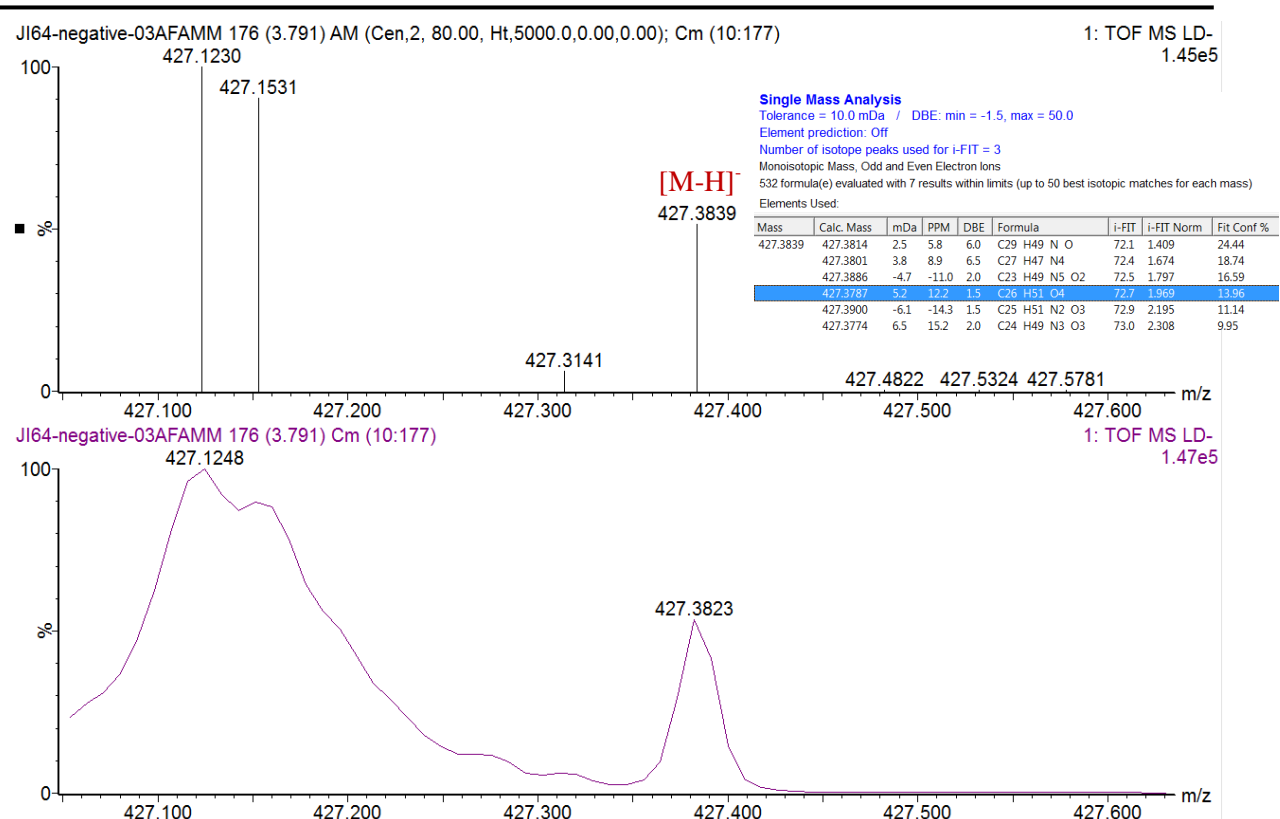
Obrázok 21: Hmotnostné spektrum markeru 411,3865 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64



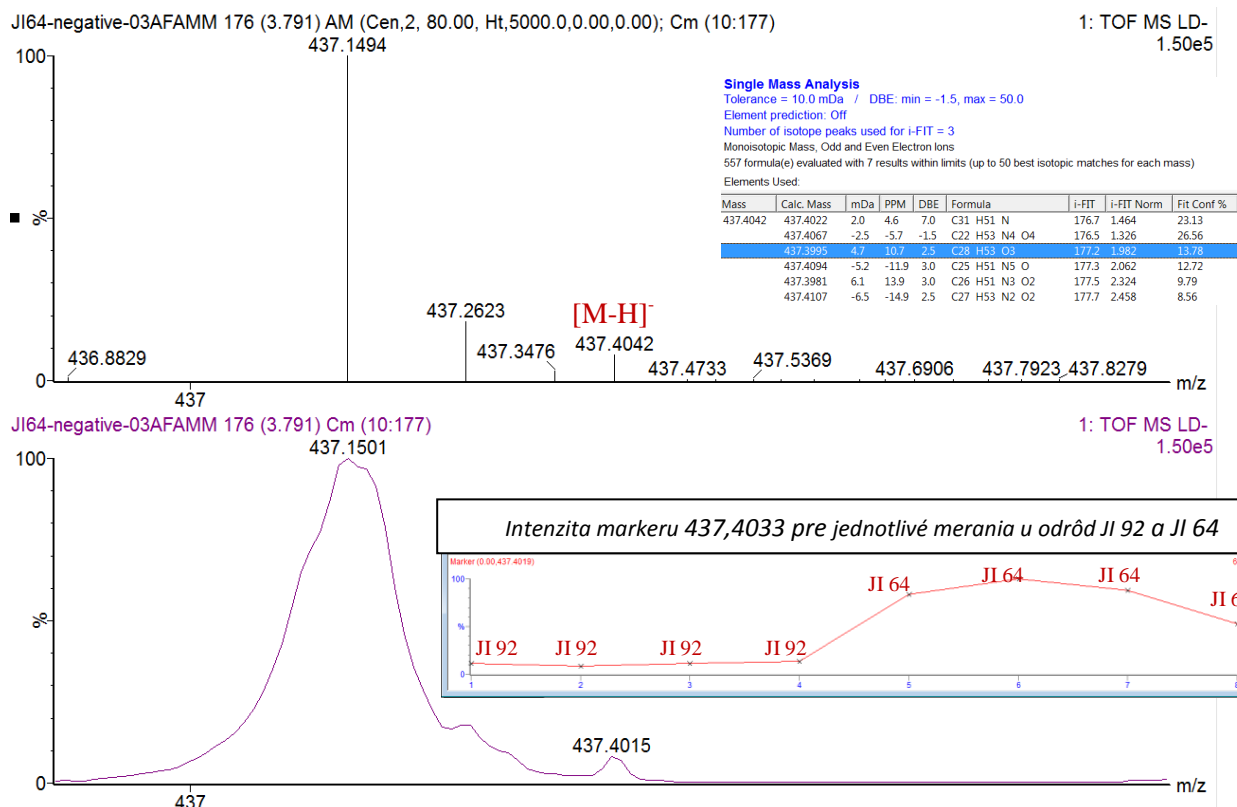
Obrázok 22: Hmotnostné spektrum markeru 425,3927 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64



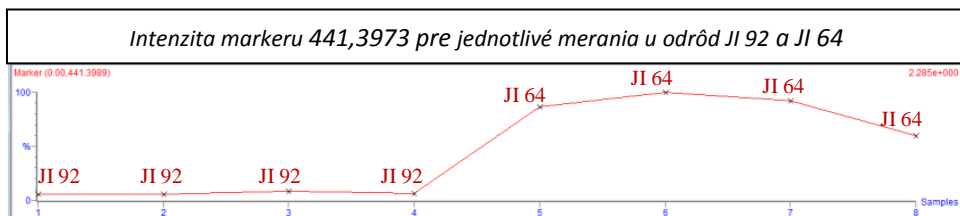
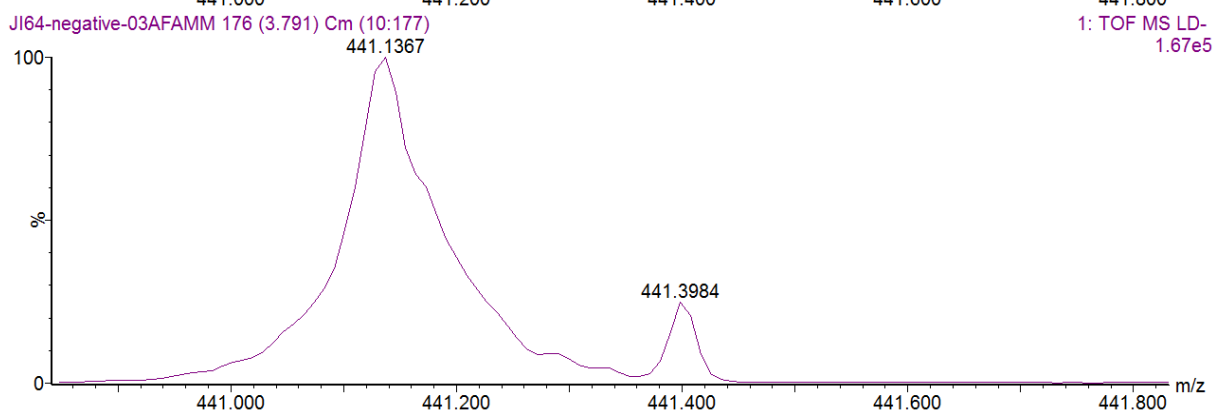
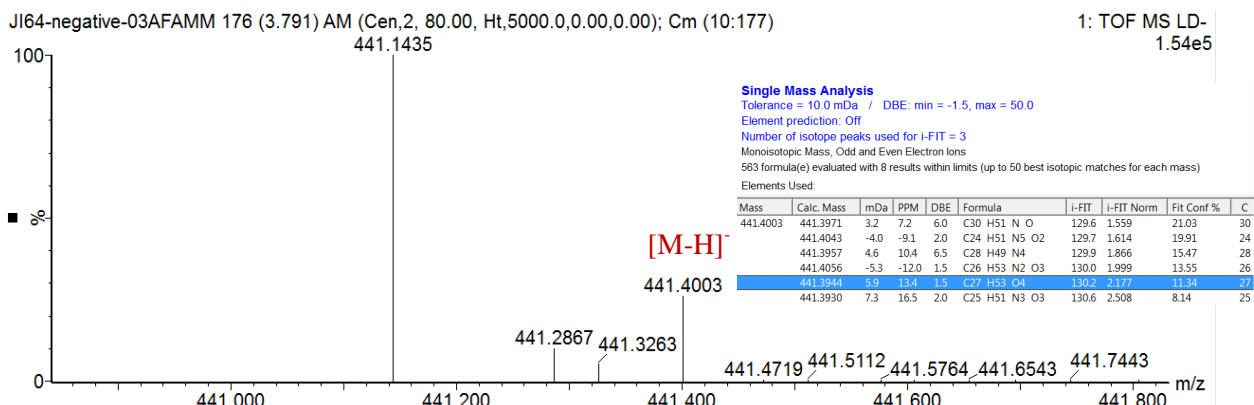
Obrázok 23: Hmotnostné spektrum markeru 427,3875 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64



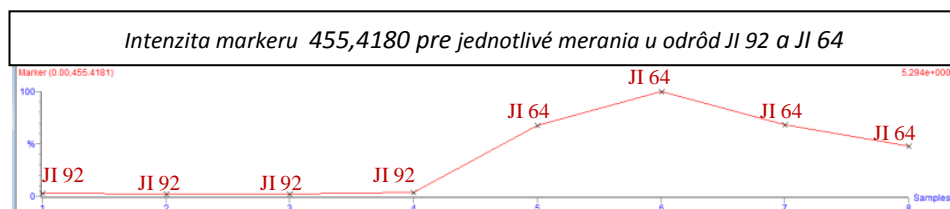
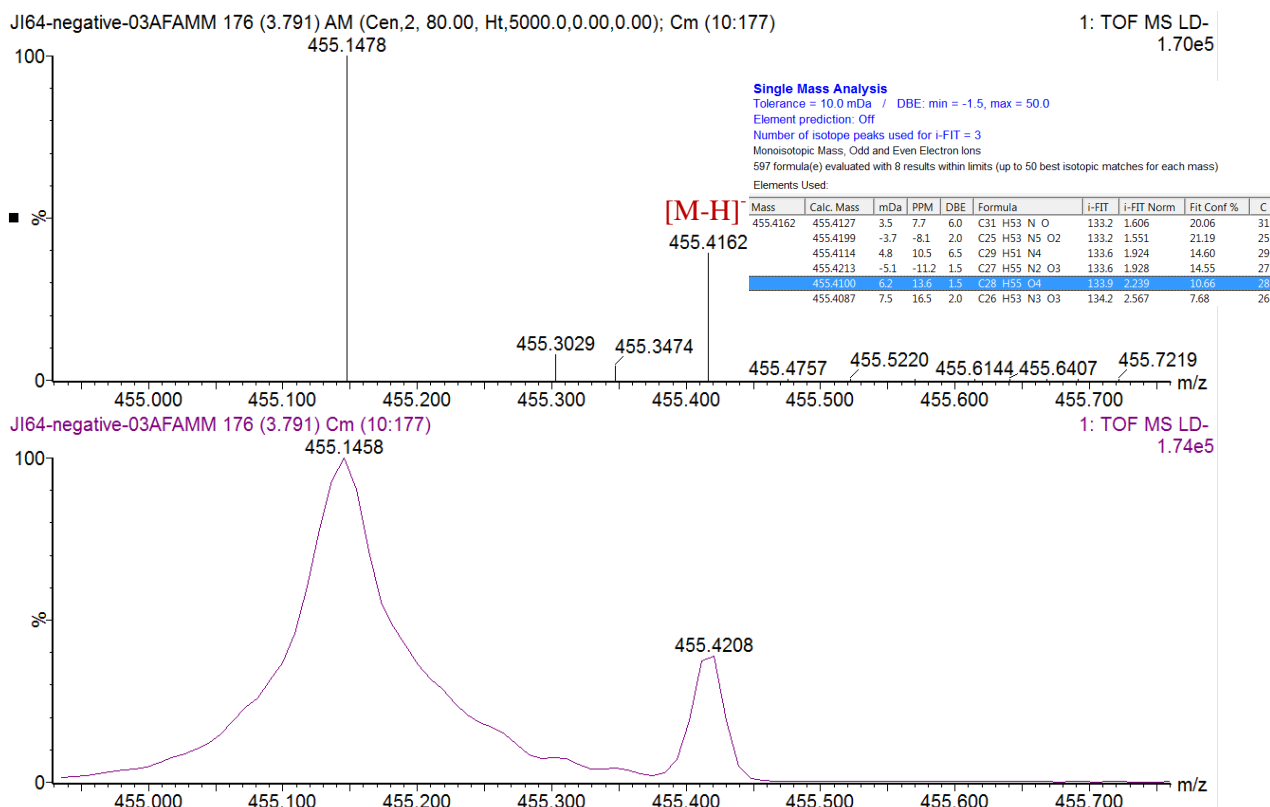
Obrázok 24: Hmotnostné spektrum markeru 437,4033 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64



Obrázok 25: Hmotnostné spektrum markeru 441,3973 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64

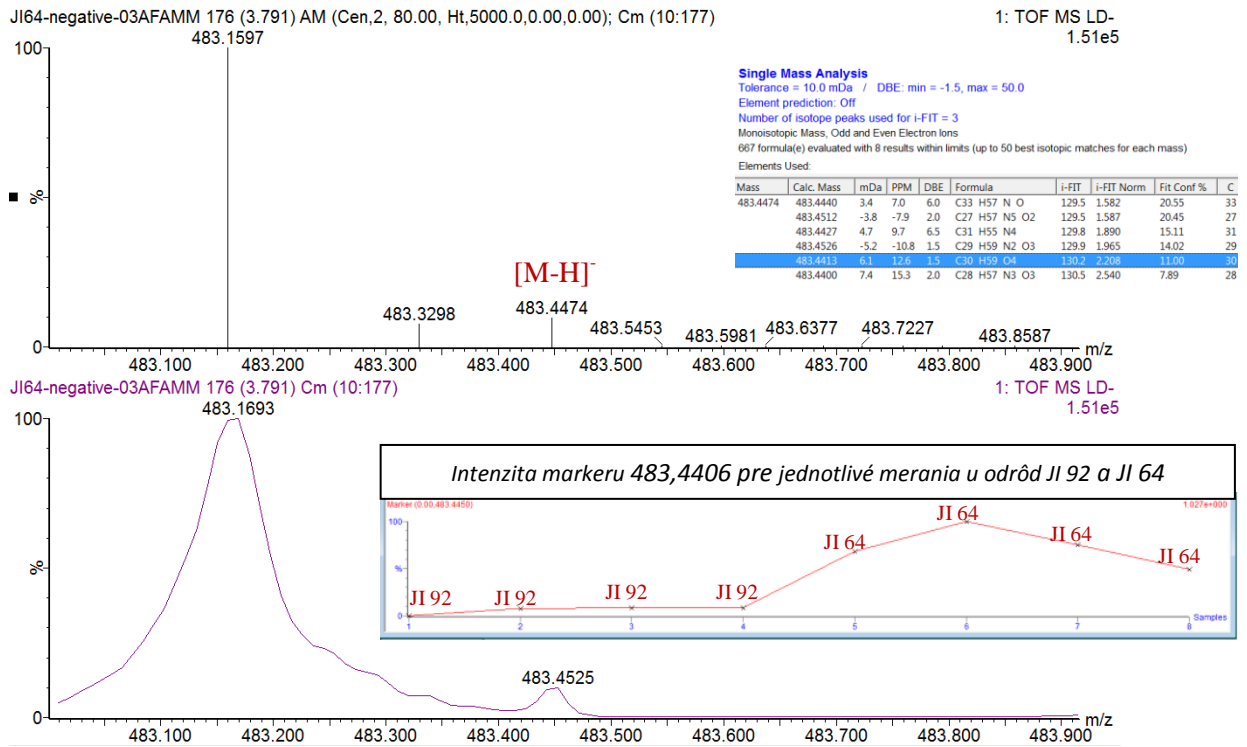


Obrázok 26: Hmotnostné spektrum markeru 455,418 a jeho intenzita v odrôde JI 92 a JI64

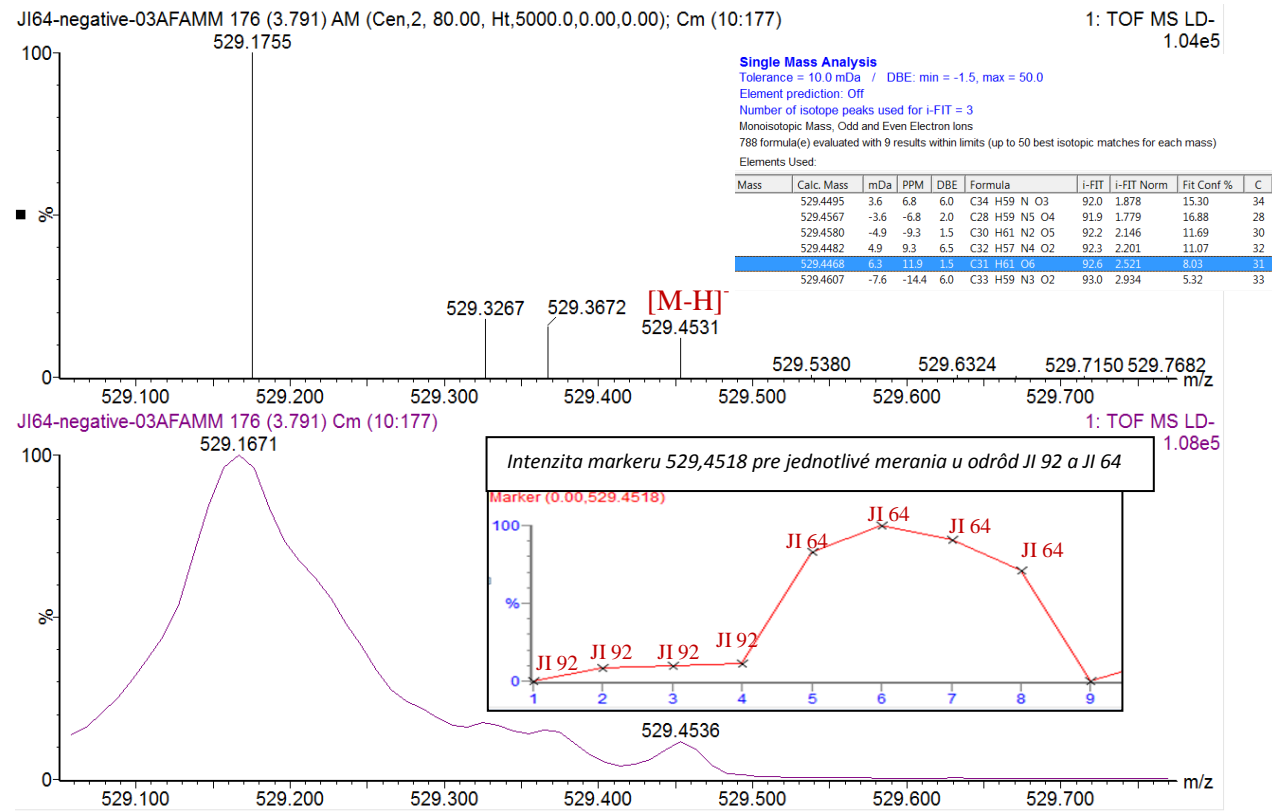




Obrázok 27: Hmotnostné spektrum markeru 483,4406 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64

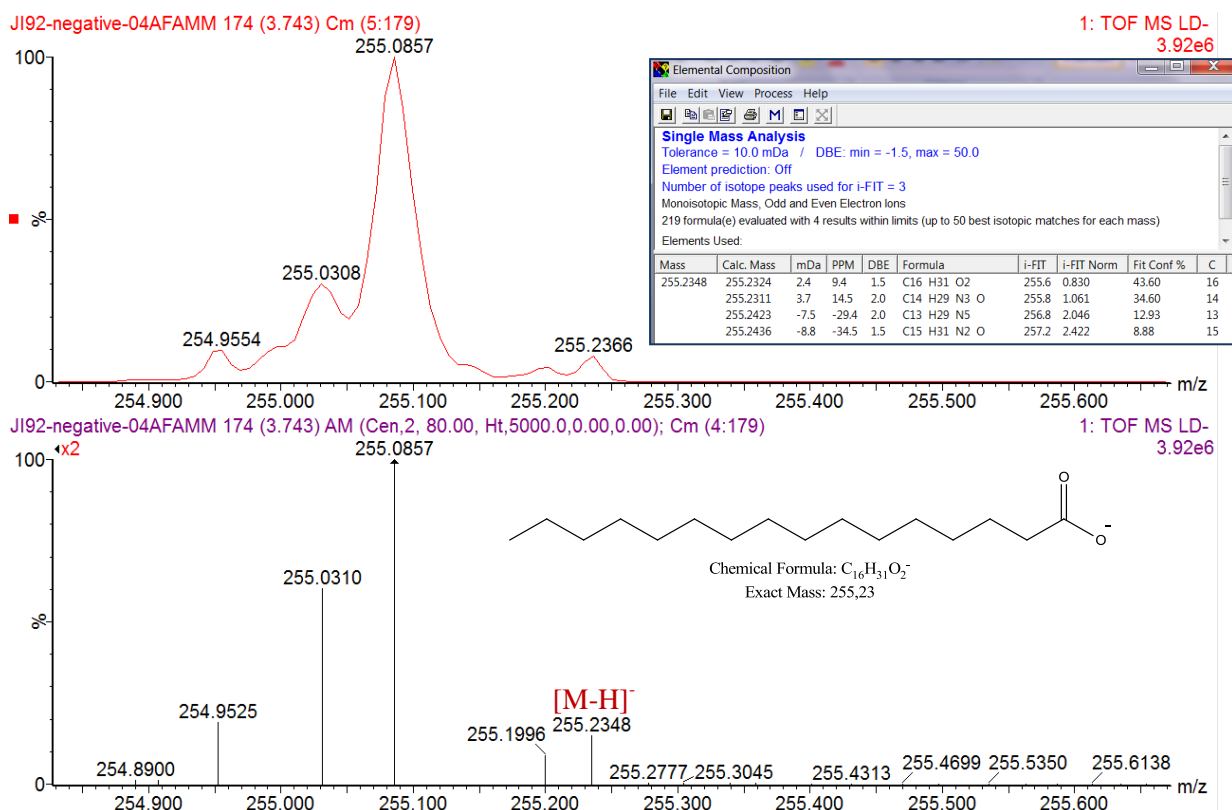


Obrázok 28: Hmotnostné spektrum markeru 529,4518 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64

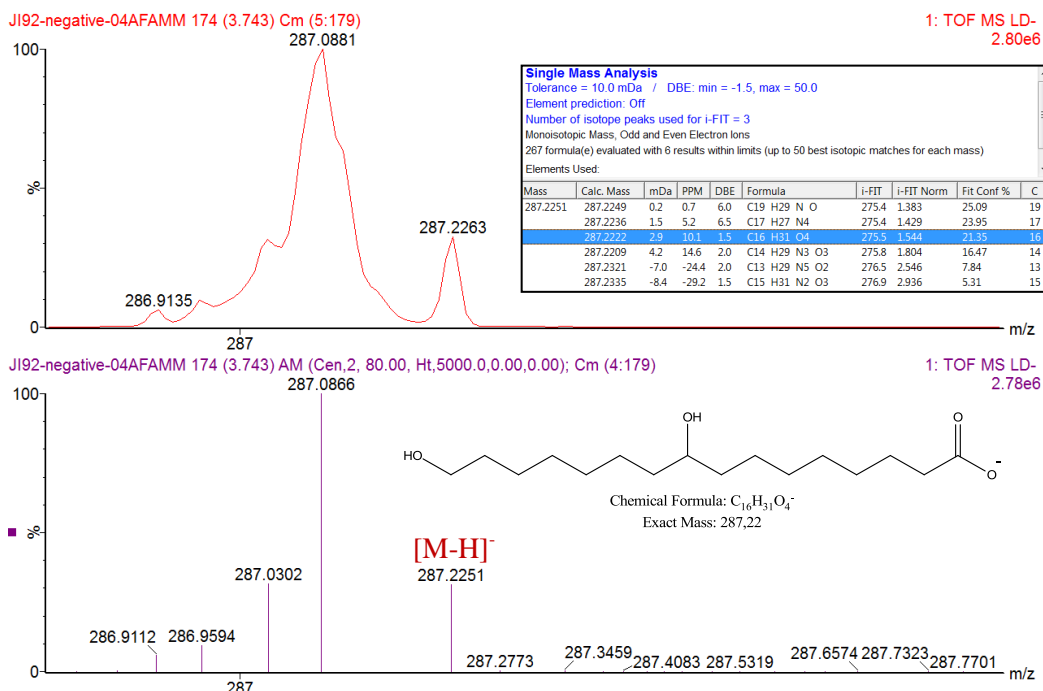


Medzi markermi v dátach, či už pre všetky odrody alebo len pre JI 64 a JI 92, sa našli aj hmoty s hodnotami  $m/z$  255,2352; 271,2307; 287,2266, či 283,2683. Na konci každej analýzy však nikdy nevystupovali ako markery dormancie. Pri bližšom náhl'ade do hmotnostných spektier boli prítomné pri každej odrode. Podľa analogického spôsobu ako u dormantných markerov vyššie bola pre tieto hmoty navrhnutá štruktúra. Je možné, že sa jedná tiež o vyššie mastné kyseliny avšak s menším počtom atómov uhlíka, teda kyselinu palmitovú ( $[M - H]^-$  s  $m/z$  225,2324) a jej mono a dihydroxyderiváty ( $[M - H]^-$  s  $m/z$  271,2273 a 287,2222), či kyselinu stearovú ( $[M - H]^-$  s  $m/z$  283,2637). Aj keď tieto kyseliny nevystupovali medzi markermi dormantnými, môžu byť istou mierou zodpovedné za ovplyvňovanie fyzikálnej dormancie semien, pretože sa jedná tiež o nepolárne štruktúry.

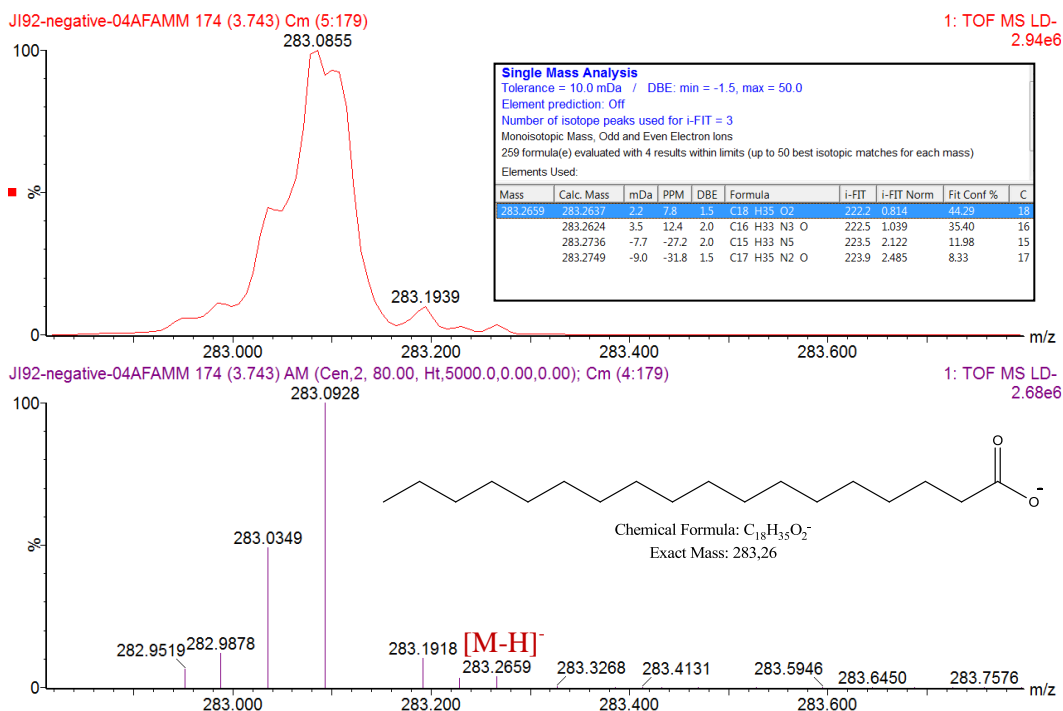
Obrázok 29: Hmotnostné spektrum markeru 255,2352



Obrázok 30: Hmotnostné spektrum markeru 287,2266



Obrázok 31: Hmotnostné spektrum markeru 283,2683

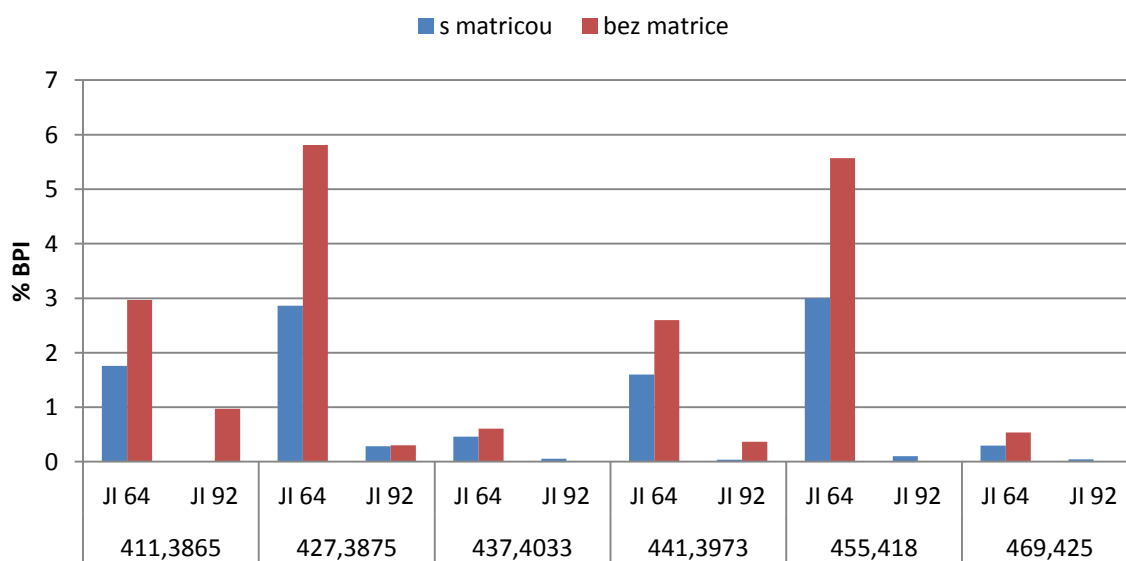


### 4.3.2. Analýza osemenia JI64 a JI92 v negatívnom móde bez použitia matrice

Tento typ analýzy potvrdil, že roztok matrice neovplyvňuje výrazne zoznam markerov. Proces pokrytia osemenia matricou a jej rozpúšťadlom nespôsobuje zásadné zmeny v profiloch získaných markerov. *Graf 10* porovnáva intenzitu dormantných markerov prítomných v MS spektrách získaných ionizáciou negatívnymi potenciálmi s použitím a bez použitia matrice 3-aminochinolínu. Intenzita markerov je pri oboch typoch analýz vždy zvýšená u dormantnej odrody JI 64 oproti nedormantnej odrode JI 92. V grafe sú pre vybrané markery vynesené pomery intenzity signálu k intenzite základného (najintenzívnejšieho) píku v spektre (vyjadrené v percentách  $100 \cdot I_{\text{markeru}}/I_{\text{BPI}}$ ). Podobne v *grafe 11* sú vynesené pomery intenzity nájdeného markeru k celkovému iónovému prúdu, teda sume intenzity všetkých signálov v spektre ( $100 \cdot I_{\text{markeru}}/\sum I$ ).

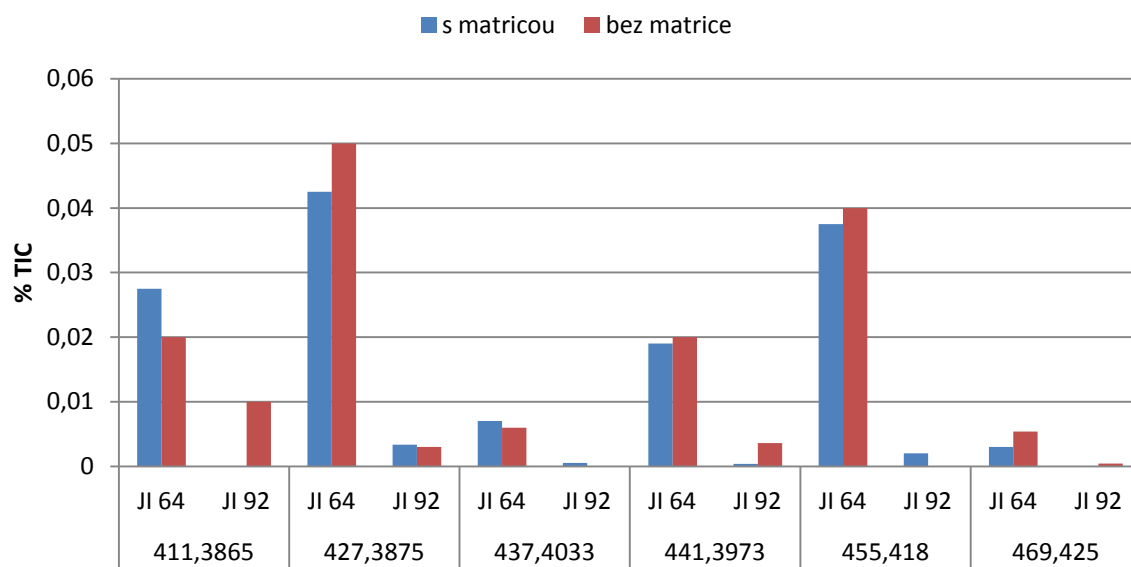
V oboch grafoch je zrejmé, že sledované parametre nadobúdajú výrazne vyšších hodnôt u dormantnej odrody JI64 oproti JI92. To potvrdzuje význam týchto markerov pre dormanciu semien.

*Graf 10: Porovnanie intenzity (%BPI) vybraných markerov dormancie v odrodách JI 64 a JI 92 pri MALDI-MS analýzach prevedených s a bez matrice v negatívnom móde.*



**Vybrané markery dormancie v odrodách JI 64 a JI 92**

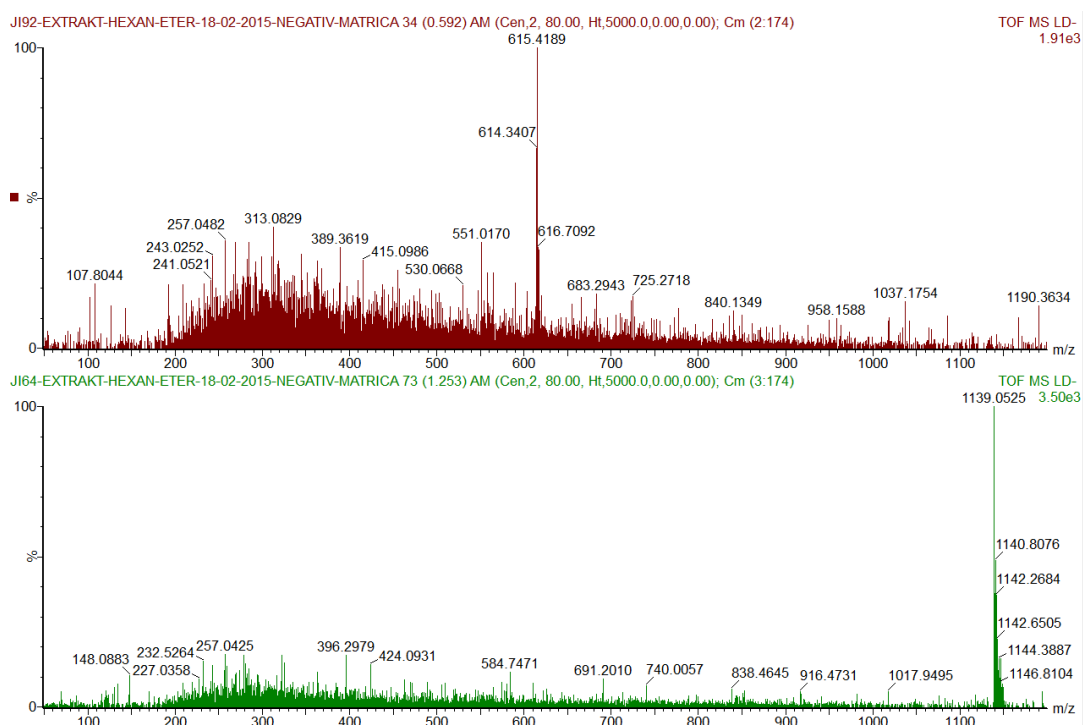
Graf 11: Porovnanie intenzity (%TIC) vybraných markerov dormancie v odrodách JI 64 a JI 92 pri MALDI-MS analýzach prevedených s a bez matrice v negatívnom móde.



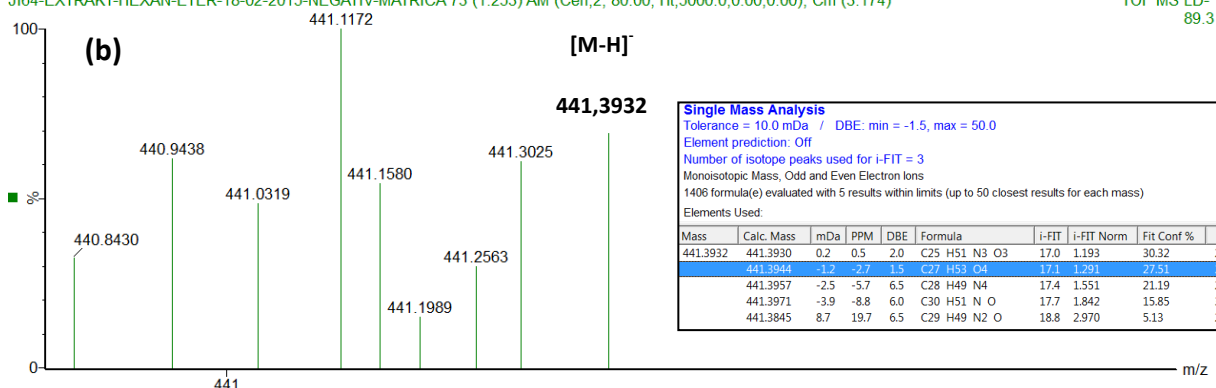
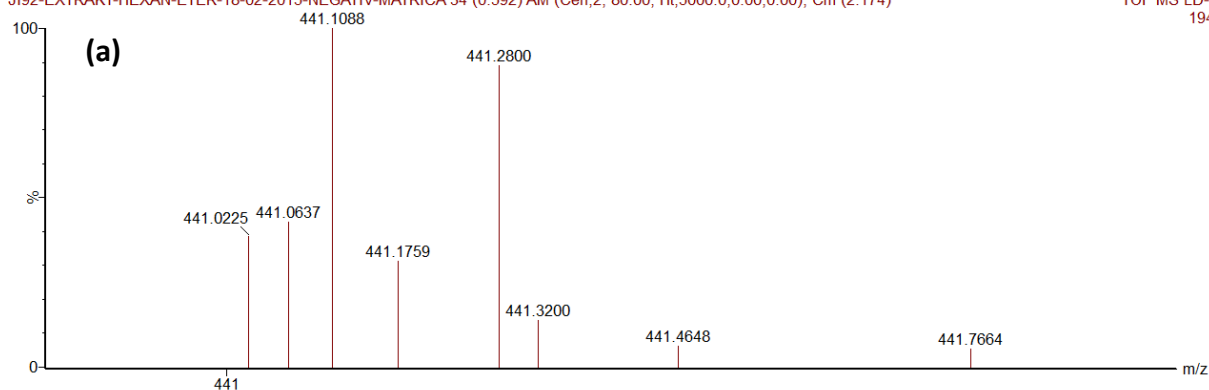
Vybrané markery dormancie v odrodách JI 64 a JI 92

#### 4.4. Výsledky z hexán-petroléterových extraktov

Výsledky MALDI-MS analýzy hexán-petroléterových extraktov dopadli rozporuplne. Boli pripravené extrakty z osemenia JI 92 a tiež JI 64 a analyzované v negatívnom móde s matricou a tiež aj bez nej. Cieľom mala byť extrakcia nepolárnych látok, medzi ktorými by mohli byť aj mastné kyseliny. Extrakčná zmes bola zalkalizovaná pomocou roztoku hydroxidu sodného podporujúc prípadné zmýdelnenie. Pri oboch odrodách boli získané hmotnostné spektrá, v ktorých boli cielene vyhladávané ióny s  $m/z$  s navrhnutou štruktúrou vyšších mastných kyselín. Ich profil je zobrazený na *Obrázku 32*. Hodnoty  $m/z$ , ktoré by odpovedali sa v spektrách nevyskytovali. Výnimkou bola hmota s  $m/z$  441,3932, ktorá zložením odpovedala deprotonovanej kyseline dihydroxyheptakosárovej. Bola prítomná len v extrakte u dormantnej JI 64 (s odchýlkou 2,7 ppm od presnej hmoty) avšak so slabou intenzitou. Výrez z hmotnostného spektra extraktu JI 64 s danou hmotnou je zobrazený na *Obrázku 33*. Nepriítomnosť vyšších mastných kyselín v nepolárnych extraktoch mohla byť spôsobená nedokonalým spôsobom prevedenia extrakcie, či samotného zmýdelňovacieho kroku, bez predchádzajúcej optimalizácie.

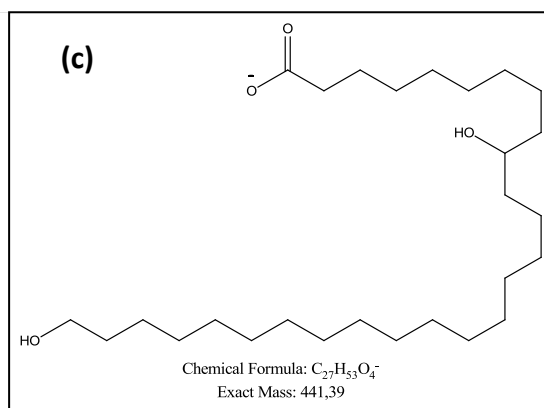


*Obrázok 32: Profil hmotnostných spektier získaných z nepolárnych extraktov osemenia JI 64 a JI 92 (podmienky merania: negatív, s matricou).*



Obrázok 33: Výrez z hmotnostných spektier extraktov získaných z osemnia nedormantnej a dormantnej odrody

( a - hmotnostné spektrum extraktu osemnia JI 92, b – hmotnostné spektrum extraktu osemnia JI 64, c – štruktúra deprotonovanej kyseliny dihydroxyheptakosánovej)

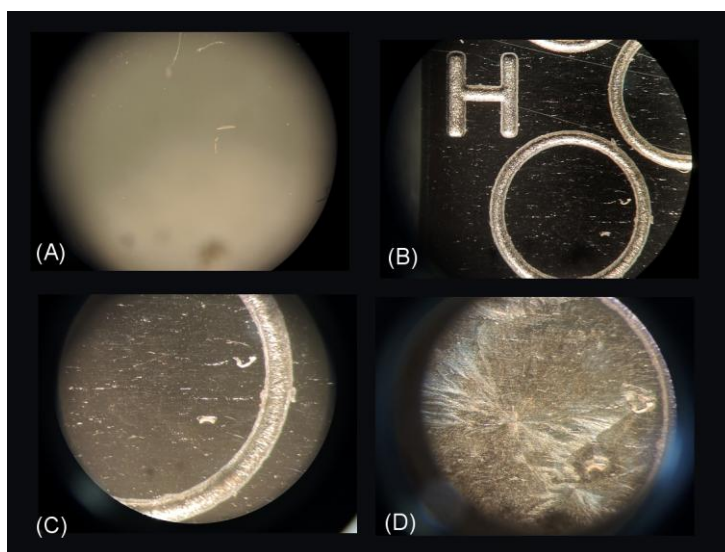


#### 4.5. Laserová mikrodisekcia osemenia

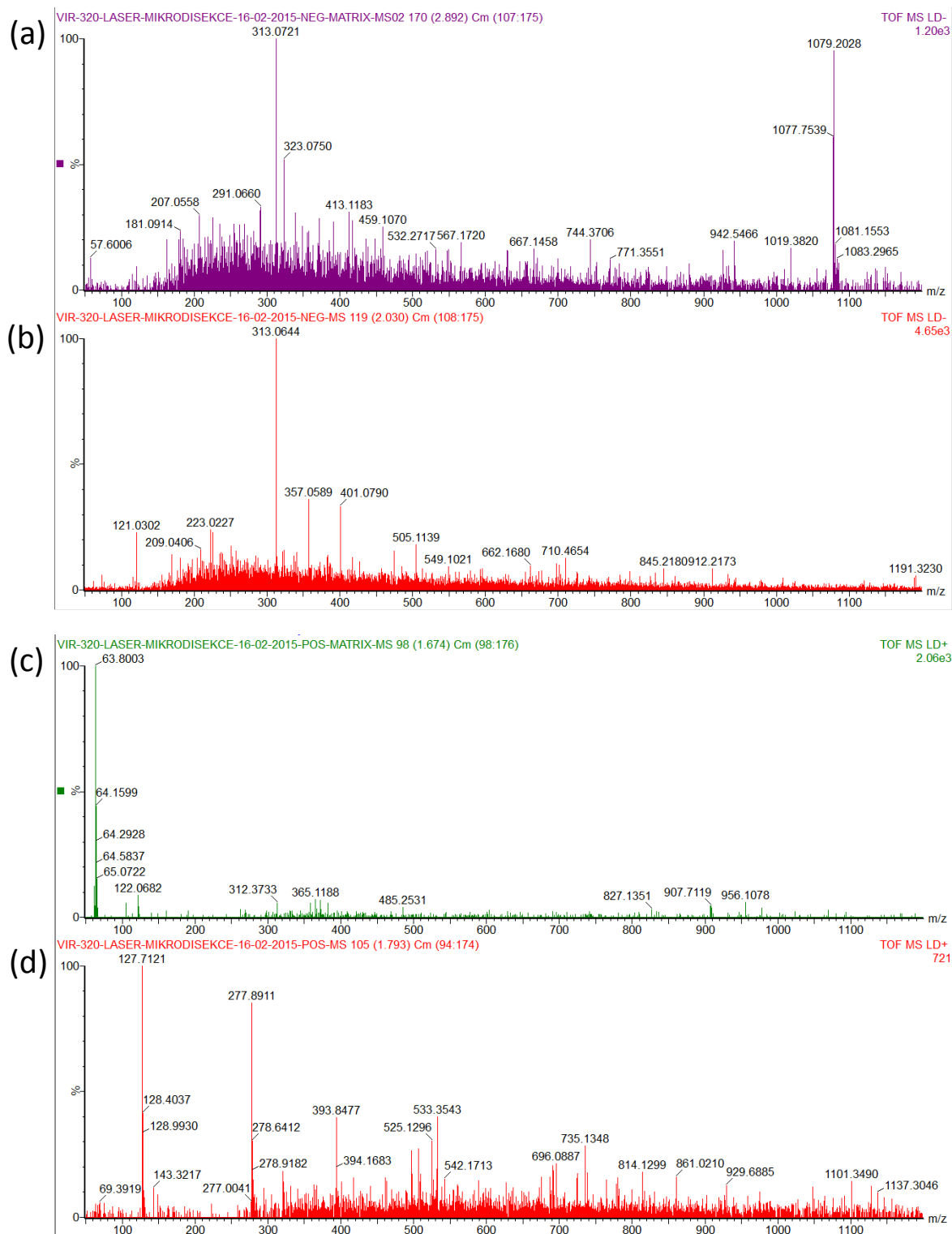
Laserová mikrodisekcia je metóda, ktorá sa používa na získanie častí – jednotlivých buniek, z rastlinných pletív, či živočíšnych tkanív. Táto preparovacia metóda je prepojená s mikroskopom a jednotlivé vyrezávané útvary pomocou laseru z tkanív bývajú zachytené na víčku mikroskúmavky s adhéznym povrchom. Zo získaných častí sa môže vyizolovať DNA, RNA alebo proteíny na genomické štúdie, štúdie génovej expície, či na získanie spektier z proteínov obsiahnutých v daných bunkách<sup>84</sup>. Cieľom tohto experimentu bolo získať hmotnostné spektrá metódou MALDI-MS z priečného profilu osemením s dôrazom na jednotlivé vrstvy osemenia. Vzhľadom na časovú náročnosť experimentu sa podarili získať hmotnostné spektrá len z najvrchnejšej časti osemenia. Laserová preparácia vrstvy osemenia zahŕňujúc kutikulu a len malú časť parenchymatických buniek vychádzala z priečného kryorezu odrody VIR 320. Veľkosti analyzovaných častí osemenia sa pohybovali v rozmeroch 250x30  $\mu\text{m}$ . Na *Obrázku 34* sú zachytené fázy s touto časťou osemenia pred samotnou MALDI-MS analýzou. Hmotnostné spektrá boli získané za podmienok použitia príslušných matric v kladnom a zápornom ionizačnom móde. Ich profily sú zobrazené na *Obrázku 35* na nasledujúcej strane.

Vzhľadom k malému počtu vzoriek nebola zatiaľ jednoznačne objasnená identita iónov prítomných v týchto mikrovzorkách. Na interpretácii získaných spektier sa v súčasnej dobe pracuje. Prítomnosť jednotlivých signálov bude potrebné ešte potvrdiť ďalšími experimentami s mikrodisekciou. Z hľadiska metodológie však získané výsledky jednoznačne potvrdzujú, že je možno pripraviť cielene mikrovzorky (kúsky pletív) obsahujúce len niektoré typy buniek s veľkosťou v desiatkach až stovkách mikrometrov, tieto vzorky naniest' na MALDI plate a získať hmotnostné spektrá využiteľné pre štúdium zloženia jednotlivých častí osemenia.

*Obrázok 34: Náhľad na najvrchnejšiu časť osemenia pomocou mikroskopu (A – časť osemenia s rozmermi 250x30  $\mu\text{m}$  na adhéznom víčku mikroskúmavky, B,C – časť osemenia na MALDI spote s priemerom 2,5 mm, D – časti osemenia po nanosení a vykryštalizovaní matrice).*







Obrázok 35: Hmotnostné spektrá získané MALDI-MS analýzou priečného mikrozrezu osemnia odrody VIR 320 pri podmienkach merania: a – záporný ionizačný mód a matrica AQ, b – záporný ionizačný mód a bez použitia matrice, c - kladný ionizačný mód a matrica THAP, d - kladný ionizačný mód a bez použitia matrice.

## 5. Záver

Hmotnostná spektrometria s matricou asistovanou laserovou ionizačnou/desorpčnou technikou môže byť vhodná metóda na priamu analýzu osemenia z hľadiska štúdia chemickej podstaty dormancie rastlinných semien bez zložitej prípravy ich osemení.

V tejto diplomovej práci bolo zistené, že zvolená analytická technika dokáže v spojení s vhodným štatistickým nástrojom opakovane rozlíšiť dormantné typy osemenia od nedormantných v analýzach prevádzaných v negatívnom ionizačnom móde a s použitím roztoku matrice 3-aminochinolínu. Pomocou tejto techniky boli vo vybraných osemeniach nájdené markery ( $m/z$  hodnoty) podľa ich výskytu u dormantných, prípadne nedormantných, odrôd hrachu.

S využitím meraní presnej a správnej hmoty sa v spektrách získaných meraním s negatívnou ionizáciou podarilo identifikovať niekoľko významných markerov. Medzi významné markery dormancie patria hydroxylované vyššie mastné kyseliny s počtom atómov uhlíka od  $C_{26}$  do  $C_{31}$ . Svojim nepolárnym reťazcom môžu zvyšovať celkové hydrofóbne vlastnosti osemenia a tým brániť prieniku vody cez osemenie smerom k embryu. Medzi ďalšími mastnými kyselinami boli v MS spektrách identifikované tiež kyselina palmitová, monohydroxypalmitová, dihydroxypalmitová a stearová. Do budúca je však nevyhnutné potvrdiť ich štruktúru ďalšími analýzami.

Bolo ukázané, že MALDI-MS technika môže byť použitá aj na analýzu priečných mikrorezov osemenia v spojení s laserovou mikrodisekciou. Pilotný postup bude ďalej testovaný a použitý pre detailnejší popis zloženia jednotlivých bunkových vrstiev v osemeni s ohľadom na dormanciu.

## Citovaná literatúra

- [1] J. D. Bewley: *Plant Cell* 9, 1055 (1997).
- [2] C. Baskin a J. Baskin: *Seeds: Ecology, Biogeography, and, Evolution of Dormancy and Germination*. Elsevier, 2014.
- [3] R. Finkelstein, W. Reeves, T. Ariizumi a C. Steber: *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 387 (2008).
- [4] M. J. Crawley: *Plant Ecology*. Blackwell Science Ltd , 2009.
- [5] O. A. Kildisheva, K. R. Dumroese a A. S. Davis: *Hortscience* 46, 1672 (2011).
- [6] D. V. Duclos, C. O. Altobello a A. G. Taylor: *Ind. Crop. Prod.* 58, 148 (2014).
- [7] A. J. Lack a D. E. Evans: *Plant Biology*. Taylor & Francis Group, New York 2005.
- [8] C. Baskin: *New Phytol.* 158, 227 (2003).
- [9] L. O. Copeland a M. B. McDonald: *Principles of Seed Science and Technology*. Springer Science, New York 1999.
- [10] M. A. C. G. L.-M. Birgit Kucera: *Seed Sci. Res.* 15, 281 (2005).
- [11] S. M. Brady a P. McCourt: *J. Plant Growth Regul.* 22, 25 (2003).
- [12] R. Finkelstein: *The Arabidopsis Book*. The American Society of Plant Biologists, 2013.
- [13] E. Nambara, M. Okamoto, K. Tatematsu, R. Yano, M. Seo a Y. Kamiya: *Seed Sci. Res.* 20, 55 (2010).
- [14] S. R. Cutler, P. L. Rodriguez, R. R. Finkelstein a S. R. Abrams: *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 651 (2010).
- [15] E. Nambara a A. Marion-Poll: *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 165 (2005).
- [16] E. Z. Lincoln Taiz, „Plant Physiology,“ [Online]. Available: <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=384>. [Cit. 11.3.2015].
- [17] A. Lang: *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 21, 537 (1970).
- [18] G. Davis, M. Kobayashi, B. O. Phinney, T. Lange, S. J. Croker, P. Gaskin a J.

- MacMillan: *Plant Physiol.* 121, 1037 (1999).
- [19] M. Varbanova, S. Yamaguchi, Y. Yang, K. McKelvey, A. Hanada, R. Borochoy, F. Yu, Y. Jikumaru, J. Ross, D. Cortez, C. J. Ma, J. P. Noel, L. Mander, V. Shulaev, Y. Kamiya, S. Rodermel, D. Weiss a E. Picherskya: *Plant Cell* 19, 32 (2007).
- [20] V. Khripach, V. Zhabinskii a A. de Groot: *Ann. Bot.* 86, 441 (2000).
- [21] T. Yokota: *Trends Plant Sci* 2, 137 (1997).
- [22] A. Bajguz a A. Tretyn: *Phytochemistry* 62, 1027 (2003).
- [23] S. Clouse: *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, 2011.
- [24] A. Porzel, V. Marquardt, A. Gunter, G. Massiot a D. Zeigan: *Mag.Reson.Chem.* 30, 651 (1992).
- [25] P. C. Bethke, I. G. Libourel, V. Reinohl a R. L. Johnes: *Planta* 223, 805 (2006).
- [26] J. Griffiths: *Anal.Chem.* 80, 5678 (2008).
- [27] F. W. McLafferty: *Anal. Chem.* 31, 82 (1959).
- [28] J. H. Beynon, G. R. Laster a A. E. Williams: *J. Phys. Chem.* 63, 1861 (1959).
- [29] K. Biemann a J. A. McCloskey: *J. Am. Chem. Soc.* 84, 3192 (1962).
- [30] K. L. Usch: *Spectroscopy*, 16 (2001).
- [31] R. Norková, J. Jaklová a V. Kašička: *Chem. Listy* 107, 949 (2013).
- [32] D. W. Koppenaal a C. J. Barinaga: *Anal. Chem.* 77, 418 (2005).
- [33] R. J. Wenzel, U. Matter, L. Schultheis a R. Zenobi: *Anal. Chem.* 77, 4329 (2005).
- [34] C. Koy, J. C. Heitner, R. Woisch, M. Kreutzer, P. Serrano-Fernandez, R. Gohlke, T. Reimer a M. O. Glocker: *Proteomics* 5, 3079 (2005).
- [35] D. Yi, J. Bai a P. D. Perkins: *AP-MALDI-oa-TOF MS for Fast, Sensitive Identification of Mixtures of Protein Digests*. Agilent Technologies , 2004.
- [36] K.-M. Ng, Z. Liang, W. Lu, H.-W. Tang, Z. Zhao, C.-M. Che a Y.-C. Cheng: *Anal. Chem.* 79, 2745 (2007).

- [37] A. U. Jackson, A. Tata, C. Wu, R. H. Perry, G. Haas, L. West a R. G. Cooks: *Analyst* 134, 867 (2009).
- [38] P. Nemes, A. A. Barton a A. Vertes: *Anal. Chem.* 81, 6668 (2009).
- [39] J. J. Brady, E. J. Judge, K. Simon a R. J. Levisa: *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues*. San Francisco, 2010.
- [40] C.-H. Hsieh, C.-H. Chang, P. L. Urban a Y.-C. Chen: *Anal. Chem.* 83, 2866 (2011).
- [41] R. Shroff, F. Vergara, A. Muck, A. Svatoš a J. Gershenzon: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105, 6196 (2008).
- [42] Z. Takats, J. M. Wiseman a R. .. G. Cooks: *J. Mass Spectrom.* 40, 1261 (2005).
- [43] T. Muller, S. Oradu, D. R. Ifa, R. G. Cooks a B. Krautler: *Anal. Chem.* 83, 5754 (2011).
- [44] G. Huang, H. Chen, X. Zhang, R. G. Cooks a Z. Ouyang: *Anal. Chem.* 79 8327 (2007).
- [45] N. Talaty, Z. Takáts a R. G. Cooks: *Analyst* 130, 1624 (2005).
- [46] J. Liu, H. Wang, R. G. Cooks a Z. Ouyang: *Anal. Chem.* 83, 7608 (2011).
- [47] M. M. Eskin a F. Shahidi: *Biochemistry of Foods*. Elsevier Inc., 2013.
- [48] P. Smýkal, V. Vernoud, M. W. Blair, A. Soukup a R. D. Thompson: *Front. Plant Sci.* 5, (2014).
- [49] A. Igbal, I. A. Khalil, N. Ateeq a M. S. Khan: *Food Chem.* 97, 331 (2006).
- [50] J. A. Moise, S. Han, L. Gudynaite-Savitch, D. A. Johnson a B. L. Miki: *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41, 620 (2005).
- [51] N. S. Gupta: *Biopolymers: A molecular paleontology approach*. Springer Science+Business Media, Dordrecht 2014.
- [52] J. F. Villena, E. Dominguez, D. Stewart a A. Heredia: *Planta* 208, 181 (1999).
- [53] E. Dominguez, J. Cuartero a A. Heredia: *Plant Sci.* 181, 77 (2011).
- [54] T. H. Yeats a J. K. C. Rose: *Plant Physiol.* 163, 5 (2013).
- [55] M. Wen, C. Buschhaus a R. Jetter: *Phytochemistry* 67, 1808 (2006).

- [56] A. Heredia a E. Domínguez: Counteraction to Chemical and Biological Terrorism in East European Countries. Springer Netherlands, 2009.
- [57] A. P. Deshmukh, A. J. Simpson, C. M. Hadad a P. G. Hatcher: *Org. Geochem.* 36, 1072 (2005).
- [58] A. K. Ray, R. E. Stark: *Phytochemistry* 48, 1313 (1998).
- [59] X. Fang, F. Qiu, B. Yan, H. Wang, A. J. Mort a R. E. Stark: *Phytochemistry* 57, 1035 (2001).
- [60] D. E. McKinney, J. M. Bortiatynski, D. M. Carson, J. W. de Leeuw a P. G. Hatcher: *Org. Geochem.* 24, 641 (1996).
- [61] S. Schouten, P. Moerkerken, F. Gelin, M. Baas, J. W. de Leeuw a J. S. Sinninghe Damste: *Phytochemistry* 49, 987 (1998).
- [62] E. Middleton, C. Kandaswami a T. C. Theoharides: *Pharmacol. Rev.* 52, 673 (2000).
- [63] B. Winkel-Shirley: *Plant Physiol.* 126, 485 (2001).
- [64] R. Nørbæk, K. Brandt a T. Kondo: *J. Agric. Food Chem.* 48, 1703 (2000).
- [65] S. Kumar a A. K. Pandey: *Scientific World J.* , 2013.
- [66] L. Lepiniec, I. Debeaujon, J.-M. Routaboul, A. Baudry, L. Pourcel, N. Nesi a M. Caboche: *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 405 (2006).
- [67] I. Debeaujon, K. M. Leon-Kloosterziel a M. Koornneef: *Plant Physiol.* 122, 403 (2000).
- [68] X.-Y. Gu, M. E. Foley, D. P. Horvath, J. V. Anderson, J. Feng, L. Zhang, C. R. Mowry, H. Ye, J. C. Suttle, K.-i. Kadowaki a Z. Chen: *Genetics* 189, 1515 (2011).
- [69] A. E. Osbourn a V. Lanzotti: *Plant-derived Natural products: Synthesis, Function and Application.* Springer Science, 2009.
- [70] H. Chung a N. R. Washburn: *Green Materials* 1, 137 (2012).
- [71] R. Vanholme, B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph a W. Boerjan: *Plant Physiol.* 153, 895 (2010).
- [72] P. C. A. Bruijninx a B. M. Weckhuysen: *Nat. Chem.* 6, 1035 (2014).
- [73] S. H. Ghaffar a M. Fan: *Biomass Bioenergy* 57, 1 (2013).

- [74] H. Wang, M. Tucker a Y. Ji: *J. Appl. Chem.*, (2013).
- [75] N. Cordeiro, M. N. Belgacem, A. J. Silvestre, C. Pascoal Neto a A. Gandini: *Int. J. Biol. Macromol.* 22, 71 (1998).
- [76] M. Pollard, F. Beisson, Y. Li a J. B. Ohlrogge: *Trends Plant Sci.* 13, 1360 (2008).
- [77] P. J. Holloway: *Phytochemistry* 22, 495 (1983).
- [78] S. Santos, V. Cabral a J. Graça: *J. Agric. Food. Chem.* 61, 7038 (2013).
- [79] B. L. Ridley, M. A. O'Neill a D. Mohnen: *Phytochemistry* 57, 929 (2001).
- [80] A. Allwyn Sundar Raj, S. Rubila, R. Jayabalan a T. V. Ranganathan: *Sci. Rep.*, (2012).
- [81] D. Mohnen: *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 266 (2008).
- [82] G. Levesque-Tremblay, K. Müller, S. D. Mansfield a G. W. Haughn: *Plant Physiol.* 167, 725 (2015).
- [83] J. N. BeMiller: *Chemistry and Function of Pectins*. American Chemical Society, 1989.
- [84] N. M. Kerk, T. Ceserani, S. L. Tausta, I. M. Sussex a T. M. Nelson: *Plant Physiol.* 132, 27 (2003).

## **Zoznam obrázkov, schém, grafov a tabuliek**

**Obrázok 1:** Štruktúra solanínu.

**Obrázok 2:** Účinok vybraných fytohormónov v rastlinnom semene.

**Obrázok 3:** Štruktúra a číslovanie kyseliny abscisovej.

**Obrázok 4:** Gibberelanová štruktúra a štruktúra ent-kaurénu.

**Obrázok 5:** Štruktúra fytohormónu brasinolidu.

**Obrázok 6:** 23-O-glykopyranozyl-25-metyldolichosteron a teasteron-3-myristát.

**Obrázok 7:** Princíp MALDI techniky.

**Obrázok 8:** Anatomická stavba semena strukovín.

**Obrázok 9:** Priečny rez osemením strukoviny.

**Obrázok 10:** Štruktúra kutínu.

**Obrázok 11:** Štruktúra kutánu.

**Obrázok 12:** Základná stavebná jednotka flavonoidov.

**Obrázok 13:** Typy väzieb v ligníne.

**Obrázok 14:** Štruktúra lignínu a jeho základných komponent .

**Obrázok 15:** Ukážka možného usporiadania jednotlivých komponent v suberíne.

**Obrázok 16:** Polysacharidy.

**Obrázok 17:** Príprava MALDI doštičky.

**Obrázok 18:** Prehľad vybraných MS spektier v negatívnom a pozitívnom móde a s použitím matric zo všetkých odrôd hrachu.

**Obrázok 19:** Analyzované odrody hrachu.

**Obrázok 20:** Markery dormancie pri TH 10 000 z dát pre všetky odrody v negatívnu a s matricou.

**Obrázok 21:** Hmotnostné spektrum markeru 411,3865 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64.

**Obrázok 22:** Hmotnostné spektrum markeru 425,3927 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64.

**Obrázok 23:** Hmotnostné spektrum markeru 427,3875 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64.

**Obrázok 24:** Hmotnostné spektrum markeru 437,4033 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64.

**Obrázok 25:** Hmotnostné spektrum markeru 441,3973 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64.



**Obrázok 26:** Hmotnostné spektrum markeru 455,418 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64.

**Obrázok 27:** Hmotnostné spektrum markeru 483,4406 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64.

**Obrázok 28:** Hmotnostné spektrum markeru 529,4518 a jeho intenzita v odrode JI 92 a JI64.

**Obrázok 29:** Hmotnostné spektrum markeru 255,2352.

**Obrázok 30:** Hmotnostné spektrum markeru 287,2266.

**Obrázok 31:** Hmotnostné spektrum markeru 283,2683.

**Obrázok 32:** Profil hmotnostných spektier získaných z nepolárnych extraktov osemenia JI 64 a JI 92 (podmienky merania: negatív, s matricou).

**Obrázok 33:** Výrez z hmotnostných spektier extraktov získaných z osemenia nedormantnej a dormantnej odrody.

**Obrázok 34:** Náhľad na najvrchnejšiu časť osemenia pomocou mikroskopu.

**Obrázok 35:** Hmotnostné spektrá získané MALDI-MS analýzou priechneho mikrorezu osemenia odrody VIR 320 pri podmienkach merania.

**Schéma I:** Zjednodušené schéma biosyntézy kyseliny abscisovej.

**Schéma II:** Biosyntéza giberelínov  $GA_4$  a  $GA_1$ .

**Graf 1:** Výsledky PCA analýzy MALDI-MS meraní v negatívnom móde a s použitím matrice .

**Graf 2:** S-plot obsahujúci všetky hmoty s danou m/z, ktoré boli vyhodnotené ako markery

**Graf 3:** Grafy PCA analýzy a distribúcia dát pre rôzne hodnoty thresholdu

**Graf 4:** PCA analýza dát získaných pri meraní v negatívnom móde s matricou a pri hodnote step rate laseru 10.

**Graf 5:** PCA analýza dát získaných pri meraní v pozitíve s použitím matrice THAP.

**Graf 6:** PCA analýza pre JI64 a JI 92 v negatívne, s matricou a pri TH 100 000.

**Graf 7:** S-plot pre JI 64 a JI 92

**Graf 8:** PCA analýza pre JI64 a JI 92 v negatívne, s matricou a pri TH 10 000.

**Graf 9:** S-plot pre JI 64 a JI 92 pri TH 10 000.

**Graf 10:** Porovnanie intenzity (%BPI) vybraných markerov dormancie v odrodách JI 64 a JI 92 pri MALDI-MS analýzach prevedených s a bez matrice v negatívnom móde.

**Graf 11:** Porovnanie intenzity (%TIC) vybraných markerov dormancie v odrodách JI 64 a JI 92 pri MALDI-MS analýzach prevedených s a bez matrice v negatívnom móde.

**Tabuľka 1:** Štruktúra a číslovanie brasinolidu a prehľad substituentov prítomných v brasinosteroidoch.

**Tabuľka 2:** Prehľad komponent kutikulárnych voskov v rozličných rastlinných druhoch.

**Tabuľka 3:** Parametre a podmienky analýzy na prístroji Synapt G2-S.

**Tabuľka 4:** Prehľad získaných analýz osemenia zo všetkých šiestich odrôd hrachu.

**Tabuľka 5:** Prehľad MALDI-MS analýz získaných z extraktov osemenia odrôd JI 64 a JI 92.

**Tabuľka 6:** Prehľad markerov.

**Tabuľka 7:** Markery TERNO odrody.

**Tabuľka 8:** Markery dormancie vygenerované na základe PCA analýzy pre JI64 a JI 92 (za podmienok negatív, matrica, TH 100 000).

**Tabuľka 9:** Markery dormancie pre JI 64 a JI 92.

**Tabuľka 10:** Navrhnuté štruktúry pre niektoré markery dormancie.

## **Použité skratky:**

ABA – kyselina abscisová

GA - giberelíny

BRs - brassinosteroidy

ABA-Glc – glykozilovaná kyselina abscisová

GalpA – galaktopyranozyluronová kyselina

Rhap - rhamnopyranóza

RH I – rhamnogalacturonan I

THAP – trihydroxyacetofenón monohydrát

AQ – aminochinolín

Hz – jednotka Hertz