

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství a vodní hospodářství

Studium chemické podstaty fyzikální dormance semen hrachu setého (*Pisum sativum L.*)

Veronika Babyrádová
Jihomoravský kraj

Vyškov, 2019

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství a vodní hospodářství

**Studium chemické podstaty fyzikální dormance
semen hrachu setého (*Pisum sativum L.*)**

**Study of the chemical essence of physical dormancy
of pea seed (*Pisum sativum L.*)**

Autor: Veronika Babyrádová

Škola: Gymnázium a Střední odborná škola zdravotnická a
ekonomická Vyškov, příspěvková organizace, Komenského 16/5
Vyškov

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultanti: Mgr. Cechová Monika*, doc. RNDr.
Bednář Petr, Ph.D.*, Mgr. Jitka Hrežová

* Katedra analytické chemie, Přírodovědná fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci Vyškov, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Ve Vyškově dne 28. 1. 2019

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svým konzultantům, kterými byli Mgr. Cechová Monika, doc. RNDr. Bednář Petr, Ph.D., Mgr. Jitka Hrežová za ochotu a trpělivost při vypracovávání mé práce. Chtěla bych poděkovat také doc. Ing. Petru Smýkalovi PhD. z Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za dodání biologického materiálu nutného pro můj výzkum. Děkuji i Regionálnímu centru pokročilých technologií a materiálů, Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a blízkým.

Anotace

Ve svojí práci jsem se věnovala studiu chemických změn vyvolaných teplotním cyklováním semen u hrachu setého (*Pisum sativum*). Teplotní cyklování a možné chemické změny v osemeni mohou ovlivňovat jejich dormanci. Teplotní cyklování je možné pozorovat i v přírodě a je popsáno, že střídání teploty je u některých druhů významný faktor pro ukončení dormance a začátek klíčení. Snažila jsem se objasnit tento jev, jelikož dormance může úzce souviset se zemědělskou činností a mít i ekonomický dopad pro zemědělství. Při svém výzkumu jsem použila celkem tři metody analytické chemie: infračervenou spektrometrii, hmotnostní spektrometrii s laserovou desorpcí a ionizací a kapalinový chromatograf s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Podařilo se mi objasnit, jaké látky by mohly hrát roli ve fyzikální dormanci u semen, která prošla teplotním cyklováním. Příkladem takové látky je například derivát inositolu.

Klíčová slova

hrách setý, semeno, osemení, chemická analýza, infračervená spektrometrie, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie, fyzikální dormance, teplotní cyklování

Annotation

This work deals with the influence of cycling by temperature to seeds of *Pisum sativum* L. and their physical dormancy. I had an afford to elucidate this phenomenon in connection with domestication (cultivation) and influence of temperature (its cycling) on the seed coat and consequently on physical dormancy of *Pisum sativum* L. seeds. In my research I used three methods of analytical chemistry: infrared spectrometry, mass spectrometry with laser desorption/ ionization and liquid chromatography-mass spectrometry. The obtained results contribute to the knowledge what substances could play a role in the changes of physical dormancy of seeds exposed to thermal cycling. The content of inositol, a common sugar alcohol, appeared to change significantly in seed coats after the cycling of temperature.

Keywords

Pisum sativum L, seed, seed coat, infrared spectroscopy, mass spectrometry, high-performance liquid chromatography, physical dormancy, thermal cycling

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Hrách setý (<i>Pisum sativum L.</i>)	3
3.1	Role hrachu v zemědělství.....	4
3.1.1	Choroby a škůdci.....	4
3.1.2	Zahrádkáři oblíbené druhy hrachu	5
4	Dormance semen	6
4.1	Fyzikální dormance	7
4.2	Látky ovlivňující fyzikální dormanci semen	7
4.3	Souvislost cyklování teploty s fyzikální dormancí semen.....	9
5	Použité analytické metody	10
5.1	Infračervená spektroskopie.....	10
5.1.1	Technika ATR (Attenuated Total Reflectance)	11
5.2	Kapalinová chromatografie	12
5.3	Hmotnostní spektrometrie	13
6	Vícerozměrná statistika (analýza hlavních komponent a diskriminační analýza)	15
7	Experimentální část	16
7.1	Použité chemikálie.....	16
7.2	Použité přístroje a vybavení	16
7.3	Použitý rostlinný materiál.....	16
7.4	Podmínky analýz a příprava vzorků	17
7.4.1	IČ spektrometr (typ NICOLET 6700).....	17
7.4.2	Hmotnostní spektrometr (Waters, Synapt G2-S)	17
7.4.3	Kapalinový chromatograf (Waters).....	17
8	Výsledky a diskuze.....	19
9	Závěr.....	26
10	Seznam zkratk	27
11	Bibliografie.....	28

1 ÚVOD

Hrách setý (*Pisum sativum L.*) je hospodářsky významnou plodinou a tvoří nezanedbatelnou součást jídelníčků mnohých z nás. Je pěstovaný zejména pro poměrně vysoký obsah proteinů, jež jsou pro organismus člověka velmi důležité.

S hrachem, stejně jako s ostatními rostlinami, se pojí i proces klíčení. Aby se celý proces mohl odehrát, je nezbytný průnik vody k embryu, které je uloženo v semeni. Voda se k embryu dostává skrze nejsvrchnější vrstvu semene nazývanou osemení. Jeho chemické složení se významně podílí na ovlivnění počátku klíčení. Na základě rychlosti a snadnosti klíčení rozlišujeme semena na dormantní a nedormantní. Dormantní semena jsou taková, která klíčí později, mohou vyklíčit i po několika letech strávených v půdě. Nedormantní semena klíčí při dostatku vody velmi rychle, v řádech několika dní. Dormance je pak tedy klidové stádium samotných semen a je typická právě pro semena divokých rostlin.

Kvalita i kvantita úrody některých plodin však může být ovlivněna i přírodními jevy (např. počasí). Některá semena mohou na základě výrazných teplotních změn prodělat změny v chemickém složení osemení a tím i změnit svoji dormanci. Nedormantní semena se tak za určitých okolností mohou stát semeny dormantními a naopak.

Ve svojí práci jsem se proto zabývala právě touto problematikou. Analyzovala jsem osemení hrachu setého (*Pisum sativum L.*), jež změnila svoji dormanci. Pracovala jsem se vzorky získanými od botaniků z Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Na nich jsem tedy zkoumala změny v chemické stavbě osemení jednotlivých semen před změnou dormance a po ní. Změna byla dosažena teplotním cyklováním. Změny v chemickém složení jsem studovala pomocí tří analytických metod: infračervené spektroskopie, kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.

Výzkum by měl přispět novými poznatky k problematice, která vzhledem k hrachu setému zatím není probádaná. Na základě těchto poznatků by pak mohlo být snadnější předejít některým nežádoucím jevům u hospodářsky významných plodin, jako je například předčasné klíčení. To může velmi významně ovlivnit podstatnou část úrody a znehodnotit ji, což pro zemědělce není žádoucí.

2 CÍLE PRÁCE

Cíle mojí práce jsou shrnuty v pěti následných bodech:

1. Vysvětlit fyzikální dormanci, její změny po teplotním cyklování semen a její význam pro zemědělství
2. Přispět novými poznatky k problematice teplotního cyklování semen a jeho mechanismu působení na vznik a zánik dormance u semen
3. Pokusit se popsat látky, jejichž obsah se mění v průběhu teplotního cyklování v osemení hrachu
4. Pokusit se zjistit, na které části osemení se teplotní cyklování projevuje v podobě změny chemické stavby osemení (na svrchní nebo vnitřní straně)
5. Porovnat výsledky získané pomocí tří analytických metod u semen, která prošla teplotním cyklováním a jejich protějšků, které jím neprošly a jsou označovány jako kontroly jednotlivých genotypů

3 HRÁCH SETÝ (*PISUM SATIVUM L.*)

Hrách setý (*Pisum sativum L.*) je dobře známou rostlinou nejen zemědělcům nebo zahrádkářům, ale i široké veřejnosti, jelikož je hojně vysazován. Jeho plody v podobě lusku jsou s oblibou konzumovány a je nezbytnou surovinou při vaření mnoha tzv. luštěninových jídel.

Pravděpodobně pochází z oblasti jižní Evropy a jihovýchodní Asie. Plodinou hojně pěstovanou z důvodu konzumace se stal již v pravěku. (Pazdera, 2015) Oblíbenou plodinou byl i v antice. Na přelomu 9. a 10. století se začal vyskytovat i ve střední Evropě. (Malý, 2003) Hrách byl domestikován asi před 10 000 lety. (Abbo, Lev-Yadun, & Gopher, 2010)

Jedná se o jednoletou často popínavou bylinu s obvykle vejčitými sudozpeřenými listy zakončenými úponky podepřené výraznými palisty, květenství nejčastěji bílé barvy. Řadí se do čeledi bobovité (*Fabaceae*).

Přírodní genotypy hrachu jsou často rostliny vysoké, jejich stonek je úzký a větvený. Na rozdíl od druhů domestikovaných mají divoké odrůdy květy různých barev, často odstínů modré a fialové barvy. Semena uložená v luscích také nemusí mít typickou zelenou barvu, bývá jich menší množství a jsou poměrně malá. Barva osemení se liší v závislosti na jednotlivých druzích. Například *Pisum elatius* má tmavě zelené osemení, které má v mnoha místech jiný, hnědý pigment. (Cousin, 1997)

Pro výsev hrachu je nejvhodnější půda, která je úrodná a není nijak znehodnocena plevelem. Vzhledem k tomu, že se jedná o poměrně odolnou rostlinu, je vhodný pro pěstování v mírném podnebném pásu. (Pekárková, 1997)

V léčitelství se využívají některé části rostliny, zejména nať. Hrách setý obsahuje flavony, kumariny a aminokyseliny. Odvar z nati slouží jako prevence nádorových onemocnění a má i antiseptický účinek. Může být využit i jako hojivo, které se ve formě povařeného a následně rozemletého prýtu přikládá na drobná zranění. (Pazdera, 2015)

Výsledky některých studií ukazují, že výtažky ze semen hrachu mají destruktivní účinky na maligní buňky, které způsobují rakovinu tlustého střeva, plic, prsou nebo krve. Nejedná se však jen o hrách. Slabou protinádorovou aktivitu vykazují i jiné rostliny z čeledi bobovité (*Fabaceae*) jako například tolíce vojtěška (*Medicago sativa*). (Rungruangmaitree & Jiraungkoorskul, 2017)

3.1 Role hrachu v zemědělství

Jak jsem zmínila výše, jedná se o velmi významnou plodinu využívanou v kulinářství. Nejen že je velmi chutný, ve svých plodech obsahuje i velké množství proteinů, které jsou pro tělo člověka nezbytné.

Semena jsou bohatá na škrob a jednoduché rostlinné bílkoviny například globuliny. (Pazdera, 2015) Obsah proteinů se však liší v závislosti na struktuře osemení. Jestliže je povrch semene hrachu hladký, pak obsahuje méně proteinů, řádově do 31 %, protože se zde nachází více amylopektinů než v osemení, které je hrubší. Rozmezí obsahu bílkovin v celém semenu se bez ohledu na strukturu osemení pohybuje mezi 23 % – 33 %. (Cousin, 1997)

Nejvýznamnější odrůdou hrachu setého využívanou v zemědělství je *Pisum arvense* (L.). (Cousin, 1997) Od hrachu, který se vysazuje na zahradách pro domácí užití, se liší. Jeho lusky mají stejně jako jeho květy fialovou barvu. Rozdílný je pouze odstín. Lusky jsou zbarvené tmavě fialově, zatímco květy jsou světle fialové. Tyto odrůdy se však od sebe často ani nerozlišují. Jeho další výhodou je i odolnost vůči chladu, nejen semen, ale i samotné dospělé rostliny. Tomuto hospodářskému druhu hrachu nevádí ani sucho (Cousin, 1997), jestliže netrvá většinu vegetačního období rostliny. Každá rostlina pak vyprodukuje v jednom lusku asi 4-9 semen. Rychlost růstu rostliny závisí přímo i na přírodních podmínkách a počasí. Jestliže je vlhko a zima, pak rostlina roste velmi pomalu, nebo ani nezačne klíčit, protože samotná semena jsou na teplotní podmínky obvykle citlivá. Klíčí zhruba po dobu 14 dní, a to za teploty od 4°C. Kvést začíná z pravidla po 40 dnech od výsevu. (Endres, a další, 2016)

Hrách setý (*Pisum sativum*) je hospodářskou rostlinou, která není náročná na pěstování. Nepotřebuje zvláštní hnojení dusíkatými hnojivy a je schopen růst a plodit i na podzim. Hrách hraje významnou roli v zemědělství. Kanada, Francie a Austrálie jsou co do pěstování hrachu světové velmoci. V Austrálii stále roste plocha, na níž se pěstuje. Jedná se zejména o „Dun peas“ odrůdu, které se zde výjimečně daří. (Pritchard, 2018)

3.1.1 Choroby a škůdci

Stejně jako při pěstování jiných plodin může být rostlina hrachu setého napadena škůdci, nebo rostlinnými chorobami. Aby se předešlo napadení rostliny, provádí se kontroly nadzemních částí rostliny. Sněti jsou jednou nemocí, kterou může být rostlina napadena. Jedná se o stopkovýtusné houby, které napadají zelené části rostlin, zejména listy. Prorůstají mezi buňkami palisádového parenchymu, odkud rostlině berou živiny. Vytváří na ní nádory, které obsahují množství odolných spor. Poté, co nádor praskne, dochází k rozšíření spor a tím i samotné houby.

Padlí se řadí mezi vřeckovýtrusné parazitické houby a způsob, jakým rostlinu napadá, je velmi podobný jako u sněti. Rozvíjí se zejména při střídání teplých a vlhkých dní s chladnými nocemi. (Cousin, 1997)

Fusariové vadnutí je další choroba způsobená houbou, která má velkou genetickou variabilitu. Zapříčiňuje poškození cévních svazků. Rostlina se však může bránit, kóduje totiž ve svém genomu i rezistenci vůči této chorobě a to konkrétně v podobě dominantního znaku. (Cousin, 1997)

Kromě hub jsou pro rostliny nebezpečné i fytoviry, což jsou RNA viry, které způsobují rostlině infekci. Zajímavostí je, že tyto viry mající tyčinkový či kulovitý tvar jsou poměrně velké. Patří sem i virus mozaiky, který na rostlině tvoří hnědé skvrny a deformuje listy, čímž rostlině znemožňuje ideálně provádět fotosyntézu a vytvářet dostatek živin pro další růst.

Hmyz je pro rostlinu hrachu setého také hrozbou. Některé druhy kladou vajíčka na rostlinu a tím je pak znehodnocena úroda. Obaleč hrachový (*Cydia nigricana*) klade svá vajíčka do lusků hrachu. Larvy, které se zde vylíhnou, mají tedy potravu pro svůj růst. (Gianfrancesco, 2013) Napadení hrachu tímto škůdcem zničí velkou část úrody.

Mšice kyjatky hrachové žijí na hrachu. Jelikož sají z rostliny živiny, mohou sloužit jako vektor pro některá virová onemocnění. Podstatné je, že velké množství mšic ničí pupeny, kvůli čemuž rostlina nemůže kvést. (Pokorný, 2015)

3.1.2 Zahrádkáři oblíbené druhy hrachu

Hrách setý má mnoho odrůd, které jsou na trhu dostupné. Rozlišujeme odrůdy rané a pozdní, které se výrazně liší dobou výsevu. Dále odrůdy dělíme podle vzrůstu na nízké a vyšší. Vyšší odrůdy často potřebují ke svému růstu oporu. Mezi ty, které se vysazují nejčastěji, patří hrášek dřevňový a hrášek cukrový. Obě tyto odrůdy se řadí do raných.

Cukrový hrách má světle zelené dužnaté lusky. (Dunford, 2015) Lusky této odrůdy se konzumují celé i se semeny ať už vařené nebo syrové. V tomto případě se jedná o vyšší odrůdu, pro kterou je tedy vhodná opora ve formě dřevěné nebo kovové konstrukce. Zralá semena se nevyklupují, jelikož je nelze příliš dobře vařit samostatně bez lusku. Výhodou této odrůdy je odolnost vůči nízkým teplotám. (Pekárková, 1997)

Hrách dřevňový má v lusku uložená semena, která obsahují poměrně vysoké množství cukrů. Jedná se o odrůdu velmi rozšířenou, protože semena jsou velmi chutná. Na rozdíl od hrachu cukrového je však náchylný na nižší teploty. Semena jsou také v porovnání s jinými odrůdami tvarově netypická. Bývají svaštělá, nikoliv hladká a kulatá. (Pekárková, 1997)

4 DORMANCE SEMEN

Dormance je jedna ze zásadních vlastností divokých semen. Díky ní je zachována biodiverzita. Je to vlastnost semene, která rozhoduje o tom, kdy semeno začne klíčit. Jedná se o klidové stádium, kterým semeno prochází. Můžeme říci, že dormance popisuje, jaký počet semen z dané populace nezačne v příhodných podmínkách klíčit a zůstane zachovaný pro budoucnost. Pokud vyklíčí všechna semena a v průběhu růstu rostliny dojde ke změnám okolního prostředí, které jsou pro rostliny nevhodné, může dojít k jejich odumření a následně k vymizení celého rostlinného druhu v dané lokalitě. Dormance jako regulační nástroj je tedy ochranou genomu daného rostlinného druhu. V této souvislosti rovněž platí, že dormantní semena klíčí po delší době, kterou stráví v půdě, přestože mají podmínky vhodné pro klíčení. Naopak semena nedormantní začínají klíčit velmi brzy. (Baskin & Baskin, 1998)

Rozlišujeme celkem pět základních typů dormance. Fyziologickou, fyzikální, morfologickou, morfo-fyziologickou, fyzikální a jejich kombinace. (Baskin & Baskin, 1998) Ve svojí práci jsem se zabývala studiem fyzikální dormance semen. Hlubší poznání tohoto jevu může vylepšit nepříznivé ekonomické ztráty v zemědělství po celém světě. Farmáři se často střetávají s předčasným vyklíčením semen, která jsou na nesklizené mateřské rostlině. Tento nepříznivý jev se označuje jako „pre-harvest sprouting, tj. PHS“ a je demonstrován na Obrázku 1. Na konci dvacátého století tento jev negativně ovlivnil asi 15% úrody pšenice v oblasti Queensland a Northern New South Wales v Austrálii, kde jsou časté letní srážky. (Rathjen, 2006) U předčasně klíčících semen pšenice dochází k degradaci proteinu i škrobu a redukcii jejich kvality. Díky tomuto procesu se pak vyrábí mouka s nízkou kvalitou. Takto znehodnocené klasy se (v lepším případě) používají jako krmivo pro zvířata, což má za následek snížení ceny a zmenší výtěžek pro farmáře.



Obrázek 1: Pro farmáře nežádoucí předčasné klíčení pšenice, kukuřice, sóji. Převzato z MAS Wheat (AUTOR NEUVEDEN. *MAS Wheat* [online]. [cit. 13.1.2019]. Dostupný na WWW: <https://maswheat.ucdavis.edu/Education/PDF/facts/PHS.pdf>) a z webové stránky JenREESources Extension Blog (REES, Jenny. *JenREESources Extension Blog* [online]. [cit. 13.1.2019]. Dostupný na WWW: <https://jenreesources.files.wordpress.com/2013/09/sprouted-good-side-of-damaged-ear.jpg>)

4.1 Fyzikální dormance

Fyzikální dormance je do značné míry způsobena obsahem voděodolných látek v osemeni, tedy nejvrchnější vrstvě semen, která vzniká z vaječných obalů samičí zárodečné buňky. Tyto látky se zde vytvářejí v průběhu dozrání semene, a to tedy v půdě nezačne klíčit, dokud voda nepronikne pod osemení. V přírodě existují jednoduché mechanismy, kterými bývá fyzikální dormance a následně klíčivost ovlivněna.

K těmto mechanismům patří například působení světla, průměrná teplota nebo střídání teplot během dne a noci nebo v rámci delšího ročního cyklu, dále působení ohně, pH půdy a půdní kyseliny či báze, vlhkost nebo i samotný kyslík. Dormanci mohou ovlivnit i různé chemikálie (včetně těch, které do životního prostředí vnáší svou činností člověk) nebo plyny jako je ethylen nebo kyslík. (Crocker, 1916) V mnoha případech bývají dormantní semena potravou pro živočichy. Osemení jednotlivých semen jsou v žaludku nebo v jiných částech trávicí soustavy naleptána. Průchod živočišným trávicím traktem je může tedy také zbavit dormance. Poté, co vyjdou z trávicího traktu, je pravděpodobnost počátku klíčení vyšší. V některých případech pomáhá narušit fyzikální dormanci i půdní abrazivita či mikrobiální půdní kultura. V neposlední řadě je fyzikální dormance semen závislá i na anatomii osemení a látek přítomných v samotném osemeni.

Studiem vlivu simulované teplotní oscilace na dormanci několika odrůd hrachu setého (*Pisum sativum*) pomocí skenovací elektronové a světelné mikroskopie se ve svém výzkumu zabývala Anna Janská. Bylo prokázáno, že nejen povrch osemení ale i bílá linie (tzv. light line) nacházející se mezi voskovou kutikulou a makrosklereidami má na dormanci vliv. Studie ukazuje, že narušení dormance souvisí se změnami ve složení subkutikulárních vosků. Mechanické praskání osemení, důležité pro započítí klíčení, podporují i vlastnosti buněčných stěn makrosklereid. (Janská, Pecková, Sczepaniak, Smýkal, & Soukup, 2018)

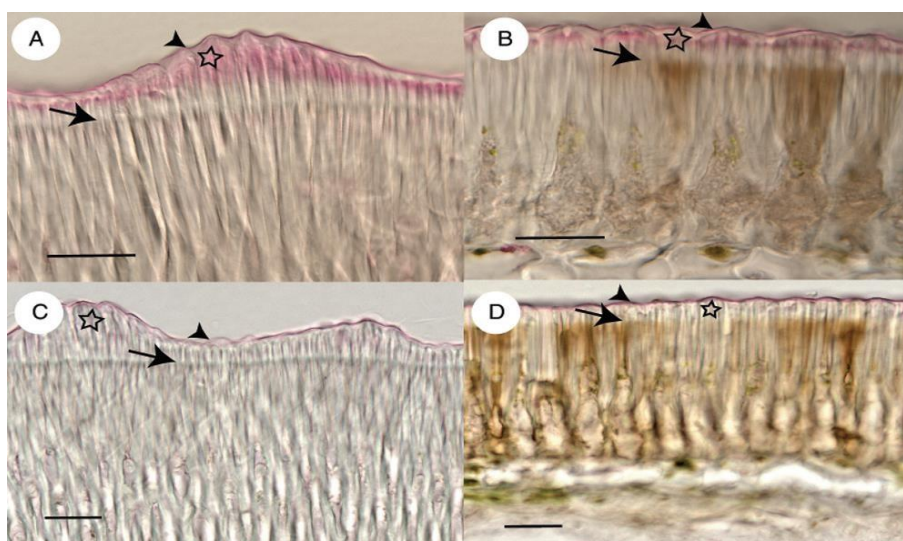
V rámci fyzikální dormance je na osemeni důležité místo, které se nazývá jizva popoutku. Zde bylo semeno přichyceno v lusku pomocí poutka. Bylo zjištěno, že voda často proniká tímto místem, jelikož obsahuje nejméně látek odpuzujících vodu. (Cechová, a další, 2017)

4.2 Látky ovlivňující fyzikální dormanci semen

Jak už bylo naznačeno v předchozí kapitole, fyzikální dormanci semene ovlivňuje nejvíce stavba a chemické složení osemení. Tyto dva parametry jsou podstatné při průniku a regulaci vody a kyslíku k zárodku a tím i jeho dalšímu vývoji. (Smýkal, Vernoud, Blair, Soukup, & Thompson, 2014)

Na povrchu slupky dormantního hrachu setého (genotyp JI64) můžeme najít několik látek, které by mohly mít na fyzikální dormanci semene vliv. Jedná se zejména o hydroxylované mastné kyseliny, kyselinu dihydroxyoktacosanovou, dihydroxyheptacosanovou, hydroxyoktacosanovou nebo hydroxyheptacosanovou a hydroxyhexacosanovou (Cechová, a další, 2017).

Jedná se o nepolární, velice hydrofobní látky, které jsou přítomny pravděpodobně v nejsvrchnější části semenného obalu. Podílejí se zřejmě na vytvoření primární bariéry zabráňující průniku vody skrz osemení k embryu, který je impulzem ke klíčení. Přítomnost hydroxy skupin navázaných na nepolárním uhlíkatém řetězci u zmíněných molekul mastných kyselin může podmiňovat následně tvorbu esterických vazeb mezi dvěma molekulami mastných kyselin. Efekt možného zesíťování několika hydroxylovaných mastných kyselin do společného celku může umocnit hydrofobní vlastnost osemení. Novější studie poukazuje na přítomnost vyšších mastných kyselin také v jiném dormantním osemení hrášku (genotyp L100). Jedná se o konkrétně o kyselinu hexakosanovou a oktakosanovou (Cechová, Hradilová, Smýkal, Barták, & Bednář, 2019) U této dormantní odrůdy jsou však přítomny mastné kyseliny bez hydroxylace na uhlíkatých řetězcích. Uvedené práce byly zaměřené na chemickou charakterizaci povrchové vrstvy osemení, kutikuly. Výsledky prací podporují i výsledky dříve zmíněné studie Anny Janské. (Janská, Pecková, Sczepaniak, Smýkal, & Soukup, 2018) Zabývala se histochemickým barvením lipidické vrstvy v řezech osemení dormantního hrachu genotypu JI64 a nedormantního hrachu genotypu JI92. Obrázek 2. ukazuje výraznou lipidickou vrstvu v povrchu osemení dormantní odrůdy hrachu (A) a její potlačení v nedormantní odrůdě (B). Po aplikaci nepolárního rozpouštědla, hexanu, došlo k extrakci lipidických látek z obou osemení (C, D).



Obrázek 2: Lipidické látky v příčném řezu osemení dormantního genotypu hrachu JI64 a nedormantního genotypu JI92 před (A, B) a po aplikaci hexanu (C, D). Převzato z práce Anny Janské. (Janská, Pecková, Sczepaniak, Smýkal, & Soukup, 2018)

Kutikula, nebuněčná ochranná vrstva tvořená nepolárním kutinem, může obsahovat také směs mastných alkoholů, aldehydů nebo alkanů. Její složení se liší v rámci rostlinných druhů a orgánů. Nenachází se však na kořeni, jelikož je nutné, aby kořen absorboval vysoké množství vody, nikoliv aby ji odpuzoval. Pod kutikulou se nachází buněčná vrstva buněk palisádového tvaru – makroklereid. Pod ní následují osteosklereidy válcovitého tvaru. Oba typy buněk obsahují škrobová zrna a jsou tvořeny především celulórou. Obecně lze říci, že sacharidy, oligosacharidy a polysacharidy jsou látky polární, přestože jsou některé z nich za běžných podmínek ve vodě nerozpustné. Podílí se významně na regulaci prostupu vody

osemením a na ovlivňování celkového bobtnání semene. U některých druhů semen mohou být tyto buňky lignifikované neboli zdřevnatělé. Celulóza i lignin tvoří mechanickou oporu osemení. Jeho mechanická pevnost souvisí s mírou praskání této slupky, čímž souvisí i s fyzikální dormancí. Významnou skupinou látek jsou fenolické sloučeniny (flavonoly, anthokyaniny, isoflavony a taniny). (Cechová, Hradilová, Smýkal, Barták, & Bednář, 2019) Tyto látky řadíme k přírodním antioxidantům, a mají proto zdraví prospěšné účinky. Navzdory tomu mohou být taniny spolu s tříslovinami i zdraví nebezpečné. Jedná se o polyfenolickou skupinu jedovatých látek mající až svíravou chuť. Z tohoto poznatku můžeme usuzovat, že chrání samotné rostlinné pletivo proti predátorům. Anthokyaniny jsou fenolické sloučeniny s charakteristickými barvami – patří mezi rostlinné pigmenty. Pigmentované osemení u některých druhů pšenice a divokých odrůd rýže bylo charakteristické pro dormantní semena (Debeaujon, Léon-Kloosterziel, & Koornneef, 2000); (Gu, a další, 2011). Jejich přítomnost byla v několika studiích spojena s nepropustností vody skrz osemení v některých luštěninách (Smýkal, Vernoud, Blair, Soukup, & Thompson, 2014). Mechanismus regulace prostupu vody není zatím v tomto případě vysvětlen.

4.3 Souvislost cyklování teploty s fyzikální dormancí semen

V kapitole 3.1. jsem zmínila, že jednou z příčin změn v dormanci je teplota. Pomocí ní je možné u některých rostlinných druhů dormance dosáhnout a u jiných ji naopak redukovat.

V literatuře jsou dostupné informace o vlivu teploty na dormanci semen například u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), který patří do čeledi brukvovité (*Brassicaceae*). Slouží často jako modelový organismus ve vědeckých studiích. Bylo zjištěno, že například jeho ekotyp *Cvi* produkuje na podzim dormantní semena, která potřebují k narušení jejich dormance teplo. Musí tedy projít létem, aby mohla na podzim klíčit. Naopak rostliny ekotypu *Bur* produkují semena na konci léta, protože k narušení osemení a snížení dormance potřebují nízké, zimní teploty. Následně semena na jaře klíčí. (Footitt, Huang, Clay, Mead, & Finch-Savage, 2013), (Footitt, Huang, Clay, Mead, & Finch-Savage, 2013)

Pro dosažení změny dormance semene je nezbytné v laboratorních podmínkách správně stanovit amplitudu kolísání, tedy časový úsek, po němž se bude teplota vzduchu v okolí semene měnit. (Smýkal, Vernoud, Blair, Soukup, & Thompson, 2014) Tato změna je poměrně prudká, například z 50 °C na 20 °C. Dále je nutné, aby i doba, po kterou je experiment prováděn byla dostačující pro snížení dormance. Parametry teplotních oscilací vedoucí ke změnám v klíčivosti se budou významně lišit pro jednotlivé rostlinné druhy i mezi jednotlivými genotypy stejného druhu.

Významné snížení dormance semen za určitý časový úseku se odehrává i ve volné přírodě. Neobvykle vysoké teploty v zimním období jsou pro tento proces příhodné. Semeno začíná být postupem času citlivější na výkyvy teplot a na jaře to může mít za následek změnu z dormantního na nedormantní charakter. Může tomu být i naopak. Pro semeno, které takovým procesem prošlo, nemusí být jarní teploty dostačující, aby začalo klíčit, je tedy nutné, aby si celým procesem prošlo znovu. Přechází tak nedotčené

v půdě, aby absolvovalo další zimní období, které by ho mohlo opět udělat citlivým a umožnit mu klíčení. (Smýkal, Vernoud, Blair, Soukup, & Thompson, 2014). Tyto změny logicky mohou ovlivnit množství úrody.

Cílem této práce bylo pokusit se zjistit, zda se teplotní cyklování podílí i na změnách v chemickém složení osemení, které mohou následně ovlivnit fyzikální dormanci, která je typická pro luštěniny, tedy hrášek.

5 POUŽITÉ ANALYTICKÉ METODY

Během výzkumu jsem použila celkem tři různé metody analytické chemie. Infračervenou spektroskopii, kapalinovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii.

5.1 Infračervená spektroskopie

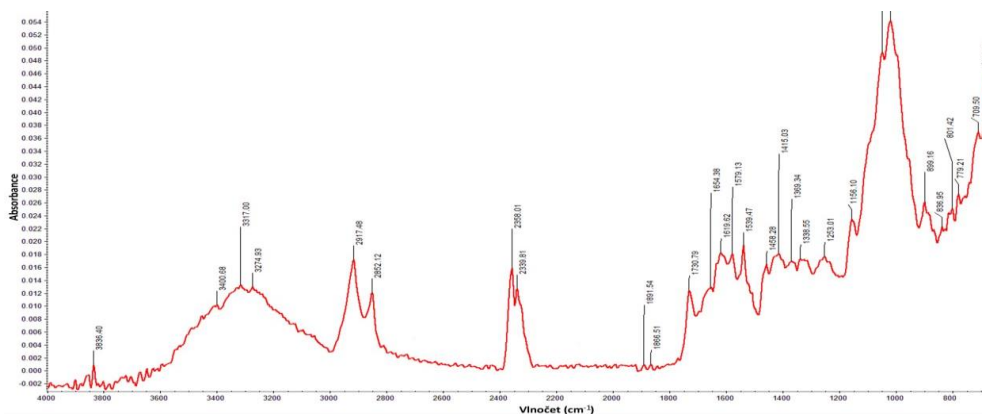
Infračervená spektroskopie je jednou z celé řady analytických technik, které se využívají při strukturní charakterizaci a identifikaci látek. Pomocí ní lze charakterizovat látky organické a anorganické povahy v plynném, kapalném i pevném skupenství. V mojí práci jsem využila infračervenou spektroskopii v kombinaci s odraznou (reflexní) technikou ATR, která bude krátce představena na následující straně. Toto uspořádání má řadu výhod. Jedná se například o krátký čas analýzy (v porovnání například s běžným uspořádáním kapalinové chromatografie probíhá analýza vzorků velmi rychle, tj. 1-3 minuty). Při této analýze nebylo třeba vzorek předem nijak složitě upravovat. Pro moji práci bylo zásadní, že vzorky, které byly analyzovány pomocí této metody, nebyly nijak poškozeny. Z toho důvodu mohly být později znovu využity i při jiných analytických metodách, což bylo vzhledem k nedostatku rostlinného materiálu velmi důležité.

Podstatou infračervené spektroskopie je interakce infračerveného záření se studovanou hmotou, kdy v případě pohlcení fotonu studovanou hmotou mluvíme o absorpční infračervené spektroskopii. (Kania, 2007) Infračervené záření je součástí elektromagnetického spektra. Jeho vlnové délky se pohybují v rozmezí od 780 nm do 1000 μm , čímž je pro pozorování pouhým okem neviditelné. Tato oblast se však v rámci analytické metody rozlišuje ještě na další 3, v rámci kterých se analýza uskutečňuje. Dělíme ji na blízkou, střední a vzdálenou oblast, které se označují jako Near-IR, Mid-IR a Far-IR. Pro naše měření byla nevhodnější oblast střední (Mid-IR) v rozsahu vlnových délek 4000 – 400 cm^{-1} (2,5 – 25 μm).

Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu daným vzorkem, u něhož dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů v závislosti na změnách dipólového momentu interagujících molekul. Změnu vibračního stavu lze chápat jako zvětšení amplitudy vibrace dané molekuly a změnu rotačního stavu lze z klasického pohledu vnímat jako zrychlení rotace molekuly. (Hajzler, 2014) IR spektrum, tedy záznam analýzy, je závislost absorbance (nebo transmittance) analyzovaných látek na vlnočtu záření, případně na jeho vlnové délce. Příklad IR spektra ukazuje Obrázek 3. Funkční skupiny přítomné ve sloučeninách, které jsou součástí vzorku, mají své vibrace, které můžeme rozeznat

a přítomné funkční skupiny určit. Takové skupiny pak podle jejich vlastností, můžeme najít právě v určité části IČ spektra, kde se nachází jako jednotlivé píky.

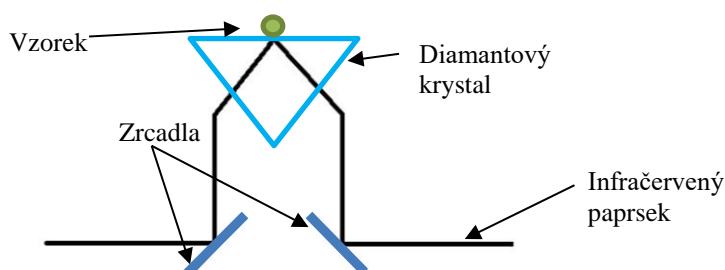
Vibrace funkčních skupin jsou pozorované v oblasti charakteristických vibrací (rozsah vlnočtu v IR spektru od 4000-1300 cm^{-1}). V oblasti takzvaného „otisku palce“ (vlnočet od 1300 do 40 cm^{-1}) jsou pozorovány vibrace ovlivněné skeletem celé molekuly a jsou charakteristické pro každou molekulu. Při interpretaci IR spekter jsou následně přítomné píky a jejich intervaly vlnočtů porovnávány s hodnotami uvedenými v tabulkách a elektronických databázích určených k charakterizaci látek.



Obrázek 3: ATR-IR spektrum osetení hrachu setého (odřůda L100), na kterém lze rozlišit charakteristické skupiny.

5.1.1 Technika ATR (Attenuated Total Reflectance)

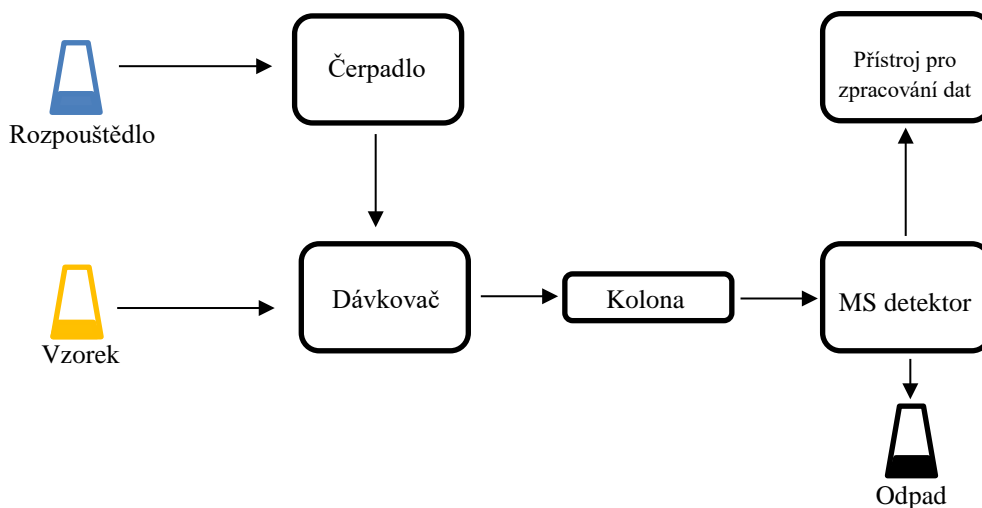
Technika ATR se řadí mezi reflexní techniky měření u IR, která je vhodná pro měření povrchů pevných vzorků, práškových materiálů či kapalin. ATR funguje na principu odrazu záření na fázovém rozhraní měřeného vzorku a měřícího krystalu, který je vyroben z materiálu vyznačujícím se vysokým indexem lomu. Infračervený paprsek je soustřeďován do krystalu soustavou zrcadel. Úhel dopadu na fázové rozhraní splňuje podmínku jeho totálního odrazu. Tato technika je schematicky znázorněna na Obrázku 4. Je nezbytné, aby měřený vzorek měl nejlepší možný kontakt s ATR krystalem. Pokud měřený vzorek absorbuje záření o určité frekvenci, pak tato složka záření bude v totálně odraženém světle zeslabena, jak bylo zmíněno u absorpční infračervené spektroskopie. Hloubka průniku záření do povrchu vzorku je řádově v jednotkách μm , a to znamená, že charakterizujeme pouze velmi tenké povrchové vrstvy vzorku.



Obrázek 4: Schématický náčrt techniky ATR.

5.2 Kapalinová chromatografie

Jednou z technik použitých v této práci byla i kapalinová chromatografie, která patří mezi separační analytické techniky. Tato technika umožňuje jednotlivé látky přítomné ve vzorku rozdělit a detekovat samostatně. Používá se pro kvalitativní i kvantitativní analýzu látek. Základy kapalinové chromatografie byly položeny už během 19. století ruským botanikem M. S. Cvěttem, který rozdělil na rostlinná barviva na plochem sorbentu, po kterém vzlínalo čisté rozpouštědlo. Dnes je kapalinová chromatografie automatizovaná instrumentální technika s řadou vylepšení. Kapalinový chromatograf se skládá z několika důležitých částí, které jsou pro jeho správné fungování nezbytné. Jeho schéma je demonstrováno na Obrázku 5. Jedná se o čerpadlo, které je vysokotlaké, dávkovač vzorku, kolonu, detektor a systém, jímž jsou výsledky přečteny a zhodnoceny. Nezbytnou součástí jsou i rozpouštědla, tzv. mobilní fáze, které slouží k transportu analytů z dávkovače na kolonu a pak k detektoru. Její správný průtok zajišťuje právě vysokotlaké čerpadlo. Tlak je pro transport rozpouštědla nezbytný. Na separaci analytů přítomných ve vzorku se používá kolona. Je vyměnitelná, což je výhodné, protože její volbou můžeme podpořit účinnost a selektivitu separovaných látek, které jsou ve vzorku přítomné. Její náplň (sorbent) může být vyrobena z různých materiálů. Zvolený sorbent se vybírá s ohledem na to, jaký charakter látek ve vzorku očekáváme. Kapalinová chromatografie tedy využívá k separaci analytů interakci se stacionární fází. (Friedecký & Lemr, 2012) Analyty uvolněné v rozdílných časech z kolony pokračují dále přístrojem a jsou sledovány pomocí detektoru. Záznamem z analýzy je chromatogram, kde vidíme píky separovaných látek s různými retenčními časy. V této experimentální části jsem měla k dispozici hmotnostně spektrometrický detektor.



Obrázek 5: Schéma kapalinového chromatografu.

5.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie bývá často označována zkratkou MS, která pochází z anglického názvu Mass Spectrometry. Jedná se o pokročilou metodu analytické chemie. Přístroj, kterým je měření vzorků prováděno se nazývá hmotnostní spektrometr. Může být využíván samostatně, nebo je jej lze propojit i s jinými přístroji, jako například s kapalinovou chromatografií nebo s plynovou chromatografií. Hmotnostní spektrometr se obecně skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru iontů. Metoda funguje na principu tvorby iontů (kladných nebo záporných) v iontovém zdroji.

Vznik iontů z analyzovaných látek může být například způsoben laserem (MALDI zdroj), elektrickým výbojem (APCI nebo ASAP zdroje) nebo sprejováním analyzovaného roztoku s využitím vysokého napětí (ESI zdroj). Iontový zdroj lze u moderních hmotnostních spektrometrů podle typu studovaných látek a vzorků vzájemně vyměnit. Vygenerované ionty jsou pak směřovány do hmotnostního analyzátoru, kde probíhá jejich separace na základě poměru jejich hmotnosti (m) a náboje (z). Hmotnostním analyzátozem může být jednotka složená ze čtyř rovnoběžných tyčí (tj. kvadrupólový analyzátor), elektrod, na které se střídavě vkládá kladné a záporné napětí. U analyzátoru doby letu (TOF, Time of flight analyzátor) se ionty dělí na základě jejich odlišné doby letu v letové trubici. Existují i další typy analyzátorů, například magnetický sektorový analyzátor, iontová past, Orbitrap nebo iontová cyklotronová rezonance. Ionty prošlé analyzátozem jsou detekované hmotnostním detektorem. Dopadající ionty se zde převádějí na elektrický signál. (De Hoffmann & Stroobant, 2007). Získaný záznam označujeme jako hmotnostní spektrum (výstup z hmotnostně spektrometrické analýzy) a ukazuje závislost intenzity signálu na hodnotě m/z . (Poustka, 2007)

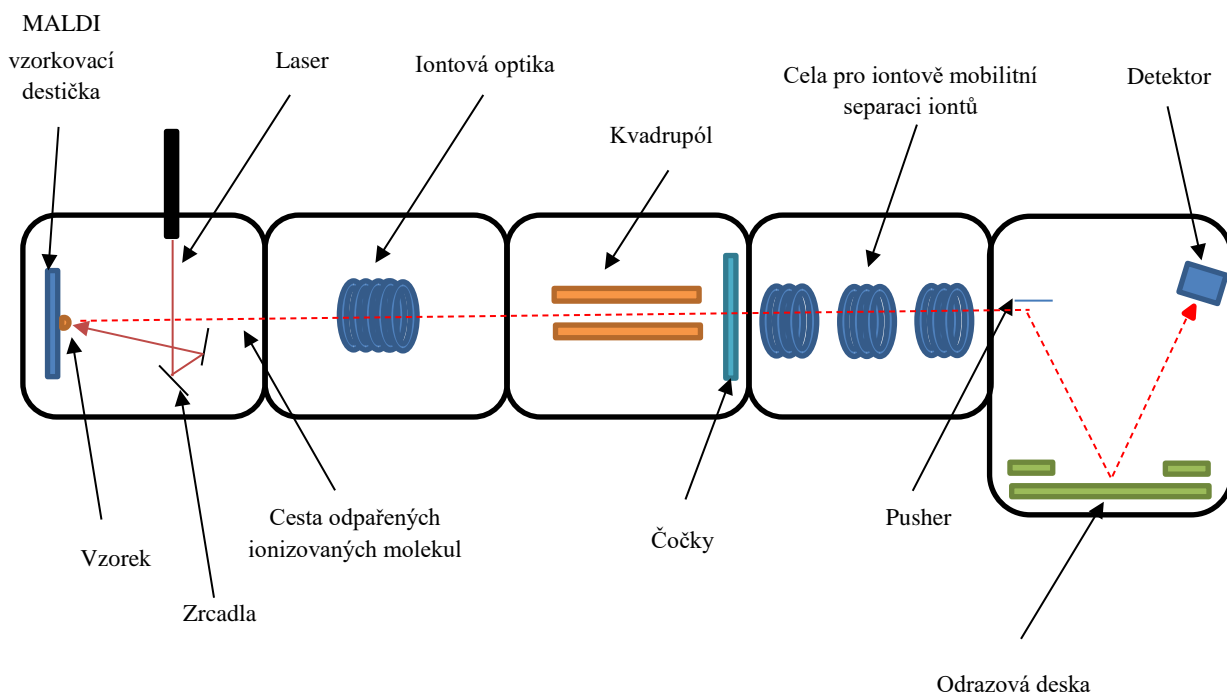
Spektrum, které po měření vznikne poskytuje řadu významných informací. Jeho kvalita však závisí na podmínkách při analýze i na samotném vzorku a jeho přípravě. Je možné z něj vyčíst hmotnost iontu a přítomnost dalších prvků (např. chlor nebo brom a jiné) na základě zastoupených izotopů. Hmotnostní spektrometrie umožňuje i sledování rozbití neboli fragmentace studovaných molekul. Zpětné skládání informací o vzniklých fragmentech je velmi efektivní pro učení struktury molekuly. Pokud je měření dostatečně přesné, lze rozpoznat i elementární složení iontů analyzovaných látek. (Chudoba)

Ve svojí práci jsem pracovala s ionizační technikou MALDI a v případě LC/MS spojení s elektrosprejem.

4.2.1 MALDI-MS

(Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice)

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí-ionizací za účasti matrice neboli MALDI je překladem z anglického názvu Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. Je vhodný pro analýzu organických látek, které nejsou teplotně náchylné k rozkladu a zároveň interagují s fotony použitého laseru. Ionizace pomocí MALDI je založena na působení paprsku laseru na analyt umístěný na MALDI vzorkovací destičce. Oblast analýzy se volí v počítači, kde laser opisuje předem definovanou dráhu automaticky nebo je pohyb působení laseru ručně ovládaný člověkem. V mnohých aplikacích se neobejde bez využití matrice – látky, která se cíleně zvolí a nanese na analyzovaný vzorek. Laser tak zahřeje a desorbuje matrici a ta předá svoji energii analytu. Při tomto procesu probíhající ve vakuu se matrice ionizuje a předává náboj analytu (Friedecký & Lemr, 2012). Při vynechání aplikace matrice se tato technika označuje jako LDI-MS. MALDI-MS umožňuje rychle analyzovat vzorky bez složité přípravy. Matrice minimalizuje degradaci analytu ve vzorku laserem, protože absorbuje většinu dopadajícího laserového záření a následně zprostředkovává i ionizaci samotného analytu. Zvyšuje také účinnost přenosu energie laseru na analyt a tím umožňuje ionizaci látek, které interagují s laserem minimálně nebo vůbec. Tento zdroj ionizace je relativně univerzální a umožňuje tak analyzovat široké spektrum látek z pevných nebo kapalných vzorků. (De Hoffmann & Stroobant, 2007)



Obrázek 6: Schéma techniky MALDI-MS (je uvedeno zjednodušené uspořádání použité v MS systému Synapt G2-S).

6 VÍCEROZMĚRNÁ STATISTIKA (ANALÝZA HLAVNÍCH KOMPONENT A DISKRIMINAČNÍ ANALÝZA)

Vícerozměrná statistika slouží k přehlednějšímu porovnání výsledků s velkým množstvím proměnných. Díky efektivní vizualizaci celé analýzy pomocí vícerozměrných statistických metod je interpretace získaných dat jednodušší a je možné hledat mezi proměnnými souvislosti a ty následně využít. (Haruštiaková, Jarkovský, Littnerová, & Dušek, 2012)

K metodám vícerozměrné statistiky patří i analýza hlavních komponent (PCA). U této metody dochází k snížení počtu proměnných, čímž umožňuje zjednodušení interpretace dat z původního souboru. V principu jde tedy o přepis původního vícerozměrného souřadnicového systému do nového troj nebo dvoudimenzionálního systému bez velké ztráty informace. (Geschwinder, 2009) Prakticky umožňuje PCA rozlišit například dvě skupiny vzorků, které se od sebe v něčem odlišují, ale v surových datech není rozdíl mezi vzorky přímo pozorovatelný. Grafickým výstupem je diagram komponentních skóre (tzv. Score plot). V ideálním případě je možné do PCA Score plotu, tedy do 2D nebo 3D průmětu jednotlivých vzorků, vložit přímku nebo rovinu, jež oddělí vzorky s rozdílnými vlastnostmi. Vícerozměrná analýza tedy pomáhá potvrdit nebo zavrhnout navrženou hypotézu nebo odhalit další (skryté) souvislosti mezi měřenými vzorky. 3D rozměrný PCA graf může poskytnout lepší náhled na přítomné jevy a segregaci vzorků z různých úhlů pohledu a lze jím otáčet. Analytik je tak schopen porovnat možné souvislosti mezi skupinami, které jsou například ve stejné oblasti a tvoří hlouček.

Dalším nástrojem vícerozměrné statistiky je diskriminační analýza OPLS-DA, která nám může pomoci v hledání konkrétních rozdílů. Např. v případě chemické analýzy vzorků může ukázat konkrétní látky nacházející se jen v určité skupině vzorků (chybějící v jiné skupině vzorků).

Vícerozměrná statistika má dnes svůj důležitý význam v mnoha vědních disciplínách. Využívá se zejména při metabolomických studiích v medicínských oborech a v přírodních vědách, ale také v ekonomii, marketingu, technice i sociologii. V ekologii se využívá například při hodnocení vlivu změn životního prostředí na organismy. (Haruštiaková, Jarkovský, Littnerová, & Dušek, 2012)

Stejně jako PCA patří OPLS-DA mezi metody vícerozměrné analýzy. Oproti PCA, která poskytuje kompletní pohled na celý analyt, OPLS-DA se věnuje menším, konkrétnějším oblastem. Diskriminační analýza hledá vhodnou funkci, podle které se bude rozhodovat s ohledem na zadané hodnoty, do které skupiny bude objekt hodnot vektoru x zařazen.

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Použité chemikálie

Acetonitril, deionizovaná voda, methanol, aceton. Všechny použité chemikálie byly v čistotě p.a.

7.2 Použité přístroje a vybavení

Pro experimenty byly použity následující přístroje:

Infračervený spektrometr Nicolet 6700 (Thermo Scientific) vybavený nádstavcem pro ATR měření.

Kapalinový chromatograf UPLC I-Class (Waters) skládající se z vysokotlakého čerpadla, autosampleru a spektrofotometrického detektoru s diodovým polem. Pro analýzu byla použita kolona Cogent TYPE-C™ Silica (Microsolv Technology Corp.) a kapalinový chromatograf byl připojen ke hmotnostnímu spektrometru Synapt. G2-S.

Hmotnostní spektrometr Synapt G2-S (Waters) vybavený vakuovým MALDI zdrojem nebo elektrosprejem (pro LC/MS analýzu), hybridním analyzátozem typu kvadrupól-detektor doby letu a iontově mobilní celou.

Dalšími pomůckami byly ultrazvuková lázeň Elmasonic, čtyřmístné analytické váhy Kern, laboratorní sušárna, kuličkový mlýnek Pulverisette 23 (Fritsch) a běžné laboratorní vybavení (kádinky, pipety, vialky atd.)

7.3 Použitý rostlinný materiál

Studovaná semena byla podrobena teplotnímu cyklování po dobu 30 dní střídáním teplot 20 °C a 60 °C ve 12 hodinových periodách. V průběhu teplotního cyklování byla kontrolní semena ponechána při laboratorní teplotě, ta se teplotně necyklovala. Všechna semena byla uchovávána ve tmě po dobu 30 dní, což eliminovalo vliv cyklování světlo/tma, které může mít na dormanci vliv. Vlhkost při tomto experimentu kontrolována nebyla.

Testování bylo provedeno doc. Ing. Petrem Smýkalem z Katedry botaniky, PřF UP Olomouc. Před našimi experimenty byly vzorky skladovány v temnu a laboratorní teplotě na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Ke studii byly vybrány následující číselně kódované genotypy hrachu setého, u kterých byla testováním klíčivosti hodnocena rezpozivita (změny v dormanci). U semen genotypů s kódem 9, 40, 75, 86 a 24 došlo ke změně z nedormantního na dormantní chování. Genotypy s kódem 3, 17, 25 a 69 byly původně dormantní a po teplotním cyklování začaly vykazovat nedormantní chování. U genotypu s kódem 27 nenastala cyklováním žádná výrazná změna z hlediska dormance. Všechna analytická měření byla prováděna oproti odpovídajícím kontrolám (semena, která nebyla podrobena teplotnímu cyklování).

Všechny uvedené genotypy (resp. vnější strana jejich osemení) byly změřeny přímo pomocí IČ spektrofotometrie a hmotnostní spektrometrie. Kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní detekcí byly změřeny jejich extrakty.

7.4 Podmínky analýz a příprava vzorků

7.4.1 IČ spektrometr (typ NICOLET 6700)

1. Detektor DTGS KBr, použitý Mid-IR KBr filtr, Source IČ, rozsah měření 600-4000 cm^{-1} , počet skenů: 32, v průběhu měření vzorků bylo měřeno pozadí.
2. Zpracování IČ dat proběhlo v softwaru OMNIC a TQ ANALYST.

Vzorky osemení vybraných genotypů hrachu byly měřené přímo pomocí techniky ATR v šesti opakováních. Osemení nebo celé semínko hrášku bylo položeno pinzetou na krystal ATR a následně bylo vrchním šroubem natěsno přitlačeno ke krystalu kvůli dosažení co nejlepšího kontaktu analyzované části osemení s krystalem. Při dotahování byl kladen důraz na to, aby osemení neprasklo a nedocházelo tak k měření vnitřní části semena, embrya.

7.4.2 Hmotnostní spektrometr (Waters, Synapt G2-S)

1. MALDI analýza: bez použití matrice, rozsah od 50-1000 Da.

Vzorky bylo nutné pro měření upravit. Kousky osemení (zhruba o velikosti 2x2 mm) byly připevněny oboustrannou lepicí páskou na MALDI vzorkovací destičku. Svrchní strana osemení byla desorbována a ionizována laserem. Pro toto měření nebyla na osemení aplikována matrice. Měření bylo provedeno ve čtyřech opakováních.

7.4.3 Kapalinový chromatograf (Waters)

1. Použitý hmotnostně spektrometrický detektor (Synapt G2-S) s elektrosprejem, Source temperature 120 °C, rozsah sledovaných hmot 50-1200 Da.
2. Separace na koloně Cogent TYPE-C™ Silica, teplota kolony 25 °C, nadávkovaný objem 2 μl , průtok MF byl 0,2 ml/min, použité mobilní fáze: MF-A: ($\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ kyseliny mravenčí) a MF-B (acetonitril+0,1% kyseliny mravenčí), pro analýzu byl nastaven gradient.

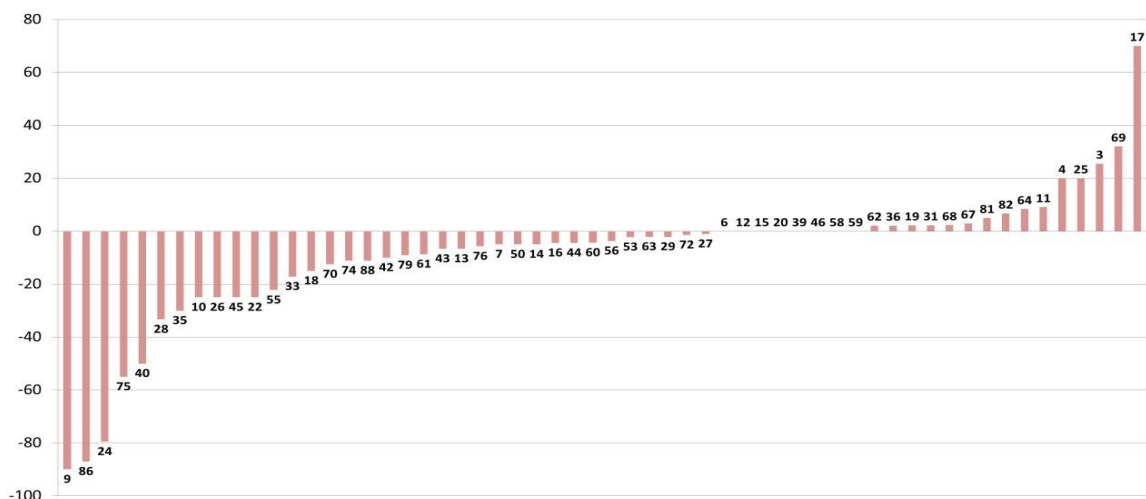
Gradient mobilních fází		
Čas (min)	MF-A	MF-B
0	100 %	0 %
20	0 %	100 %
30	0 %	100 %
33	100 %	0 %
35	100 %	0 %

Tabulka 1: Nastavený gradient při kapalinové chromatografii.

3. Pro měření kapalinovou chromatografií bylo osemení vybraných genotypů mechanicky odděleno od embrya. Poté bylo homogenizováno v mlýnku na jemný prášek. Takto připravený prášek byl navážen a extrahován ve skleněných vialkách v poměru 80 μ l extrakčního činidla na 1,5 mg namletého osemení. Jako extrakční činidlo bylo zvoleno rozpouštědlo aceton:voda (70:30, v:v). Extrakce probíhala po dobu 3 hodin v ultrazvuku za neustálého chlazení ledem, aby se předcházelo případnému rozkladu některých vyextrahovaných látek, jelikož se ultrazvuková lázeň po několika minutách svou činností samovolně zahřívá. Takto připravené extrakty byly stočené v centrifuze. Odebrané definované množství (0,25 ml) bylo odfoukáno proudem dusíku, následně zředěno na 0,5 ml rozpouštědlem methanol:mobilní fáze A (1:1, v:v). Připravené vzorky byly přefiltrovány přes membránový mikrofiltr (mikrofiltr brání ucpaní LC systému nečistotami, měl velikost pórů 0,2 μ m) a nadávkovány do kapalinového chromatografu.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro účely mojí práce byly vybrány vždy nejkontrastnější genotypy, tj. ty, které se po teplotním cyklování staly dormantními nebo ty, u kterých se dormance významně potlačila. Graf 1. demonstruje tento jev. Růžové sloupce představují odezvu v klíčení pro jednotlivé genotypy hrachu setého (*Pisum sativum*) po teplotním cyklování. Osa y popisuje rezpozivitu na klíčení, to znamená, že čím je větší tato hodnota na ose y, tím semena snadněji bobtnají (přijímají vodu) a lépe klíčí po teplotním cyklování. Genotypy s kódem 9, 86 nebo 24 po teplotním cyklování „zdormantní“, u genotypů ze středu grafu (s kódem např. 53,63, 6, 12) nedochází k výrazným změnám a genotypy s kladnou rezpozivitou (nejvíce tedy ty s kódy 3, 69, 17) začnou oproti kontrolám významně lépe klíčit (po teplotním cyklování se tedy stanou nedormantními).

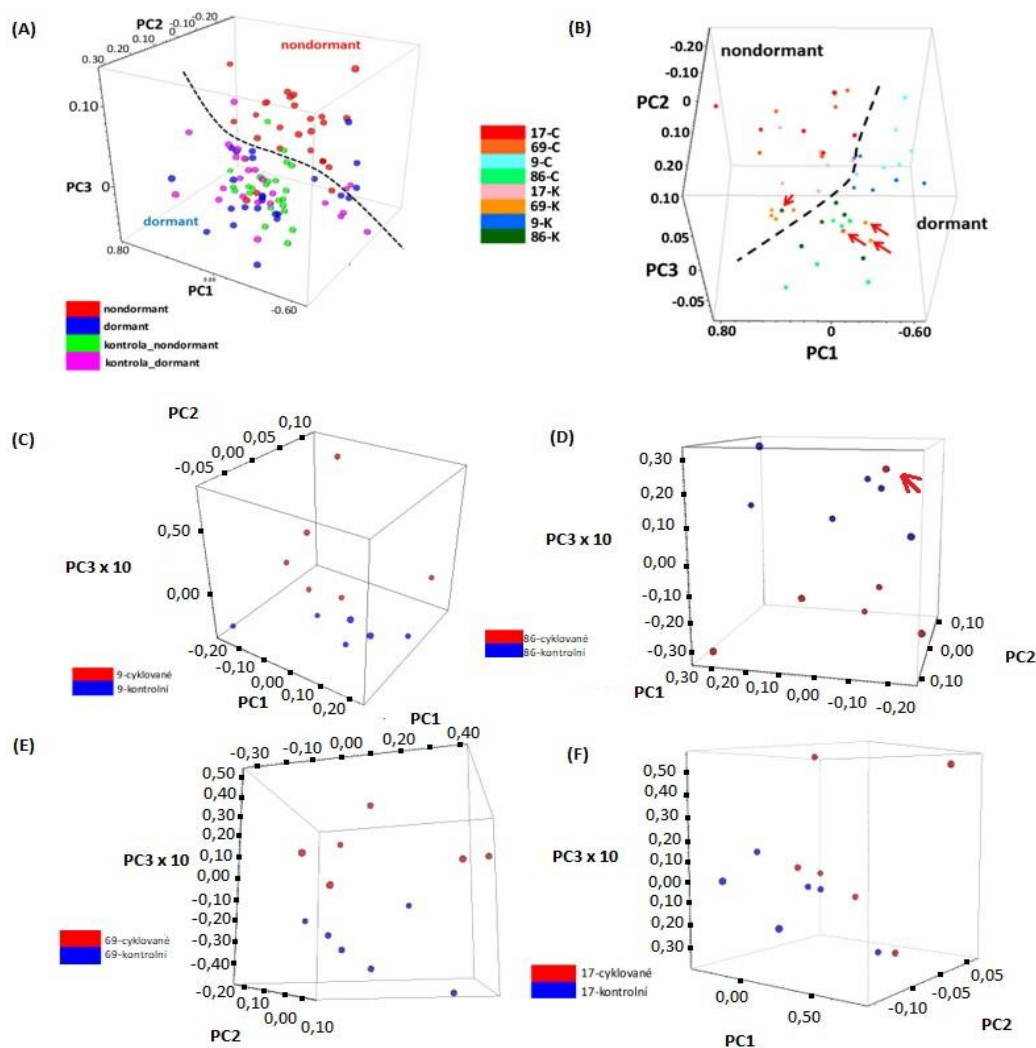


Graf 1: Rozdělení dormantních a nedormantních genotypů hrachu.

První metodou byla infračervená spektrometrie. Jako první byla zvolena pro její nedestruktivní charakter (s použitým nastavením přístroje lze předpokládat, že nedochází k ovlivnění studovaného materiálu). Analyzovaný materiál se potom mohl použít i na další chemickou analýzu, jelikož jej byl nedostatek. Pomocí této techniky byl studován povrch osemení vybraných genotypů (po teplotním cyklování a bez teplotního cyklování). Jejich přehled ukazuje tabulka 1.

Nedormantní genotypy s kódem:	Dormantní genotypy s kódem:
17	9
69	86
3	75
25	40

Tabulka 2: Přehled jednotlivých genotypů semen.

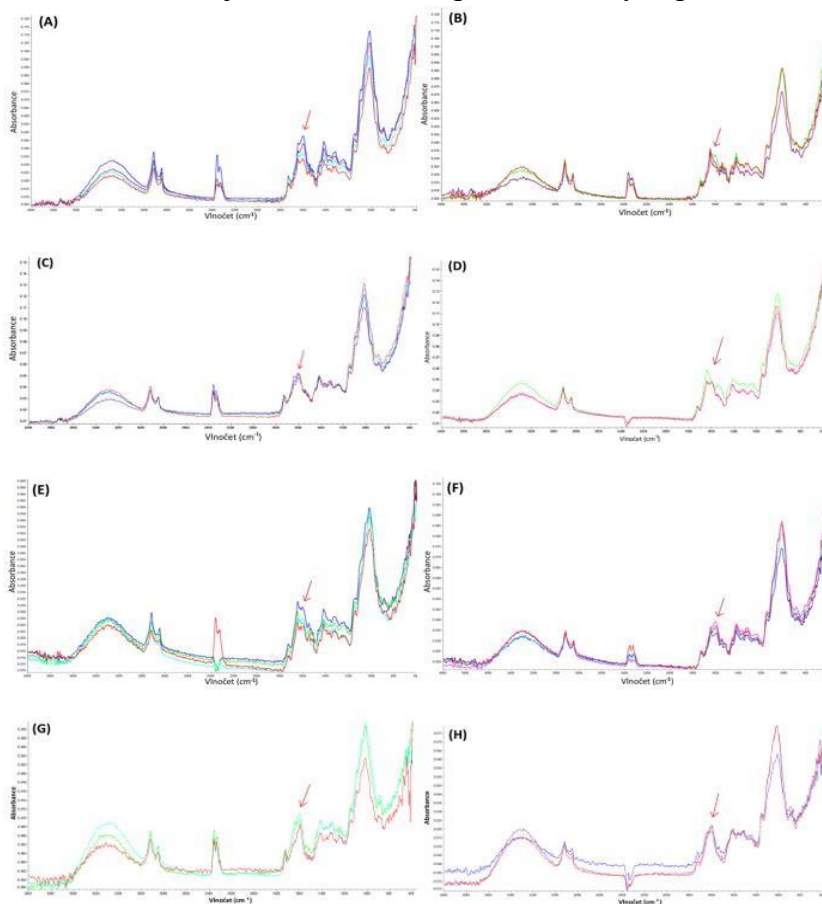


Obrázek 7: PCA Score ploty ukazující rozdíly mezi dormantními a nedormantními semeny, která prošla procesem teplotního cyklování.

Vzhledem k tomu, že komplexní porovnání IČ spekter v mnoha opakováních bylo náročné, zkusila jsem tato naměřená IČ spektra porovnat a zhodnotit za pomoci vícerozměrné statistiky. Pomocí 3D PCA Score plotu bylo zjištěno, že infračervená spektrometrie dokáže zachytit rozdíly mezi dormantními (modré body) a nedormantními semeny (červené body). Tuto skutečnost potvrzuje Obrázek 7 (A) – většina modrých bodů je koncentrována směrově „vlevo a dole“, zatímco většina červených je „vpravo a nahore“. Toto pravidlo však neplatí pro rozmístění bodů odpovídajících kontrolám. Systém s takovým množstvím vzorků a jejich opakování (Obrázek 7 – A) je značně rozsáhlý a je zřejmě komplikován celou řadou efektů. Proto jsem se v dalším bádání zaměřila na dílčí sledování vybraných genotypů, konkrétně na dva dormantní vzorky (s kódy 86 a 9), dále na dva nedormantní vzorky (s kódy 69 a 17) a jejich příslušná kontrolní semena. Separace vzorků v 3D PCA byla také zjevná a je ukázaná na Obrázku 7 – B. V tomto obrázku je vidět, že pouze 4 měření z celkového počtu 40 měření vystupují jako odlehle body (tj. jedna 86 – kontrola, jeden 69 – cyklovaný a dvě 69 – kontroly). Tyto rozdíly mohou být dány biologickou variabilitou studovaného materiálu a rovněž změnami ve spektrech danými nedokonalým přitlačením osemení na ATR krystal. Pro studium možných chemických změn

týkajících se osemení bylo nutné se blíže zaměřit také na semena ve vztahu genotyp-kontrola. PCA analýza prokázala, že infračervená spektrometrie dokáže odlišit i tento vztah. Obrázek 7: C, D, E, F demonstrují separaci vybraných nejkontrastnějších semen po teplotním cyklování od jejich odpovídajících kontrol. Obrázek 7 také ukazuje změnu dormance, kterou semena nabyli. V částech obrázku C, D, E, F můžeme pozorovat rozlišení dormantních a nedormantních cyklovaných a kontrolních semen. Jedinou výjimkou (odlehlym bodem) je zde jedno měření u genotypu 86, označené šipkou (Obrázek 7-D). Dormantními semeny se tedy stala ta s kódem 9 a 69. Naopak o svoji schopnost dormance přišla po teplotním cyklování semena genotypů s kódy 17 a 86. U všech čtyř vybraných genotypů však vidíme jasné oddělení dormantních hrachů od nedormantních, což vede k myšlence, že některé signály v infračerveném spektru mají spojitost s látkami (funkčními skupinami) ovlivňujícími (nebo doprovázejícími) dormanci.

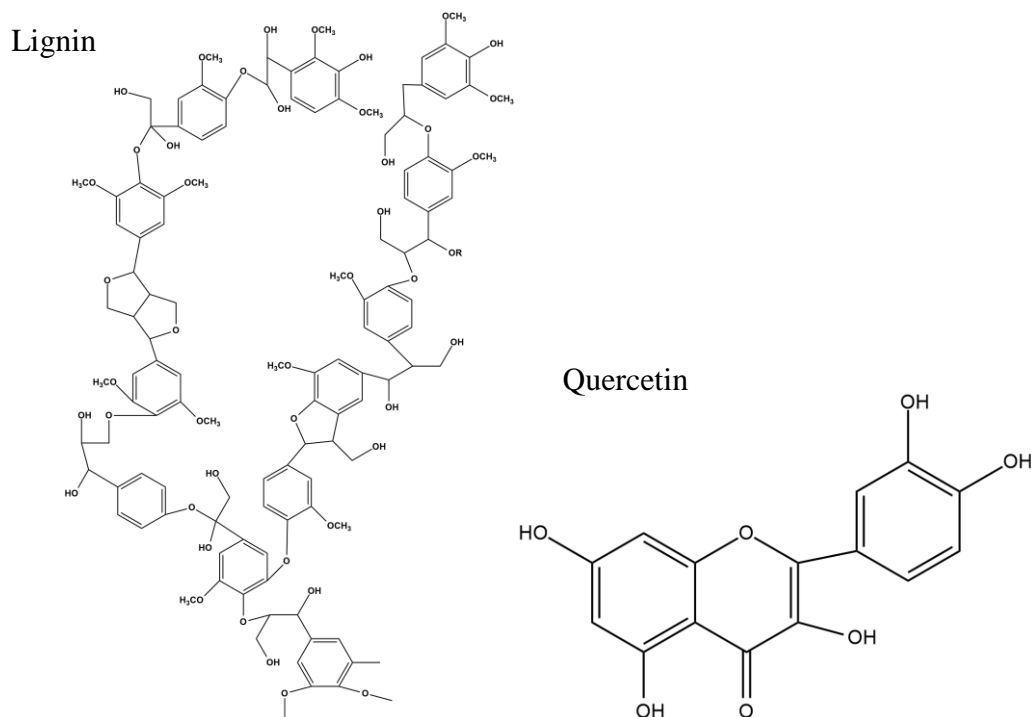
Na dalším obrázku, jsou uvedena IČ spektra měřených povrchů semen.



Obrázek 8: IČ spektra zkoumaných genotypů hrachu po cyklování a jejich kontroly; (A):17-cyklování, (B):17kontrola, (C):69-cyklování, (D):69-kontrola, (E):86-cyklování, (F):86-kontrola, (G):9-cyklování, (H): 9-kontrola.

Po detailnějším prozkoumání těchto IČ spekter (Obrázek 8. A, B, C, D) bylo zjištěno, že po teplotním cyklování genotypů s kódem 17 a 69 (nedormantní) dochází k vzniku píku s vlnočtem mezi $1650-1600\text{ cm}^{-1}$, který je u kontrolních semen potlačen. Naopak je tento pík přítomen u kontrolních vzorků genotypu s kódem 86 a po teplotním cyklování genotypu s kódem 86 (dormantní) tento pík mizí (Obrázek 8. E, F). U genotypu s kódem 9 (dormantní)

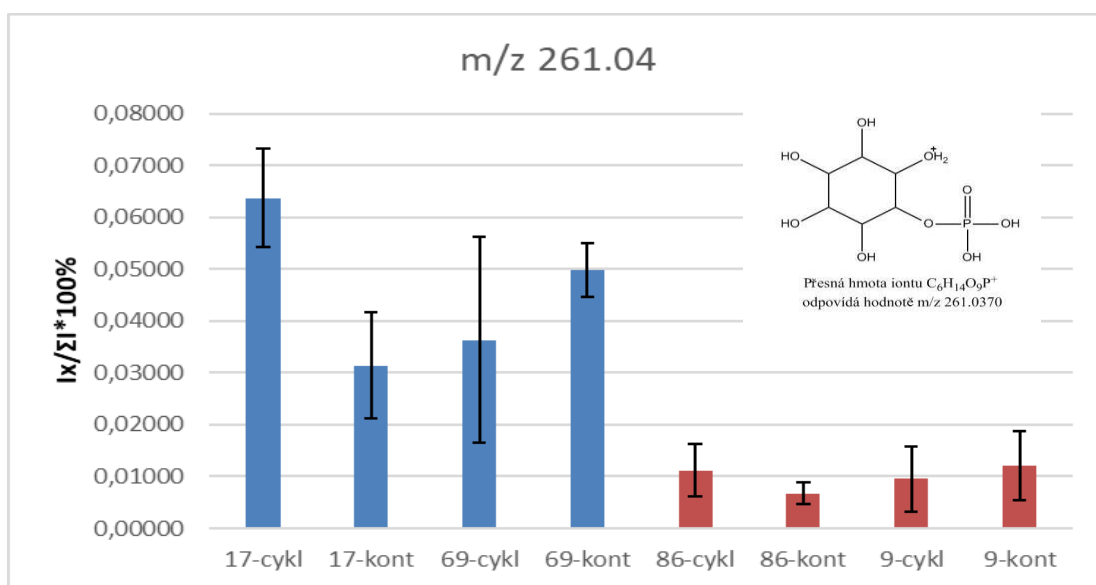
tento pík chybí u kontroly i u cyklovaných semen (Obrázek 8. G, H). Je možné tedy usuzovat, že u genotypu s kódem 9 může teplotní cyklování způsobovat jiné chemické změny než u zmíněných tří sledovaných genotypů. Na základě literatury jsem určila, že by se tyto teplotní změny mohly týkat látek, které mají funkční skupiny navázané na aromatickém nebo na jiném nenasyceném systému. Podle práce od Josého A. Heredia-Guerrero z roku 2014 by se mohlo jednat o změny ve fenolických sloučeninách nebo ve složkách kutinu (vibrace C=O skupiny, které mohou být přisouzené esterifikovaným steroidům, složkám hemicelulózy, pektinu, ligninu a rovněž estericky vázaným složkám kutinu). (Heredia-Guerrero, a další, 2014) Příklady těchto struktur jsou uvedeny na Obrázku 9.



Obrázek 9: Příklady látek, kterých by se mohly týkat změny v průběhu teplotního cyklování.

Pomocí přímého měření osemení pomocí MALDI-MS techniky v pozitivním módu, který generuje kladně nabitě ionty, byl pro nedormantní cyklovaný genotyp s kódem 17 nalezen marker s hodnotou m/z 261,0354, která dobře koresponduje s vypočtenou hodnotou m/z pro elementární složení $C_6H_{14}O_9P^+$ (hodnota 261,0370). Toto elementární složení odpovídá fosforylovanému alkoholickému cukru, inositolu. Tento marker byl přítomen i v příslušném kontrolním semenu genotypu s kódem 17, ale s významně nižším signálem. Jeho zvýšené množství v nedormantním genotypu s kódem 17 by mohlo hypoteticky souviset se snazším prostupem vody (jako polárního rozpouštědla) skrze osemení, jelikož se jedná o polární látku. Mechanismus změn v obsahu této látky v průběhu cyklování však není jasný, musí být dále potvrzen větší sadou analytických měření a jeho vysvětlení bude vyžadovat řadu dalších biologických testování, která jsou nad rámec této práce. Na druhé straně, signál této látky byl výrazně potlačen u genotypů s kódy 9 a 86, jak u cyklovaných semen, tak u jejich kontrolních semen. Jeho absence, nebo výskyt ve stopovém množství, a tedy nižší obsah polárních látek v osemení by mohl komplikovat průnik vody skrz osemení a následně snižovat rezpozivitu (zvýšovat dormanci). Nedormantní genotyp s kódem 69

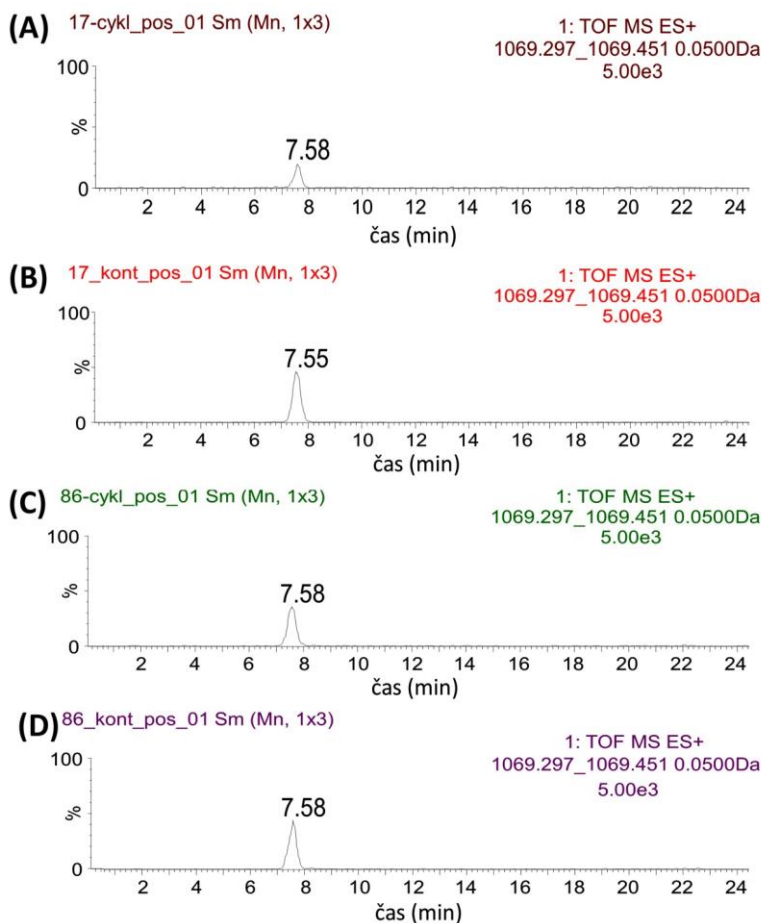
nelze spolehlivě zhodnotit z hlediska tohoto signálu ke kontrolním semenům, protože velká hodnota směrodatné odchylky u jeho cyklovaných semen poukazuje na velké rozptyly jeho signálu v opakovaných měřeních (rozdíly mezi signály měřeními v cyklovaných a kontrolních osemení nejsou statisticky významné). V grafu č.2 pod textem je demonstrována intenzita tohoto markeru ve zkoumaných genotypech i struktura zmíněné látky. Na první pohled je z Grafu 2. viditelné, že u genotypu s kódem 17 je opravdu zásadní rozdíl v nárůstu obsahu inositolu po teplotním cyklování. Látka má tedy vliv na dormanci semene, jelikož z původně dormantních semen genotypu s kódem 17 se stala semena nedormantní. V negativním módu, který generuje záporně nabitě ionty, nebyly zjištěny žádné rozdíl mezi zkoumanými teplotně cyklovanými genotypy a jejich příslušnými kontrolními semeny.



Graf 2: Výskyt inositolu v jednotlivých genotypech. Červené sloupce představují dormantní semena a modré sloupce semena nedormantní.

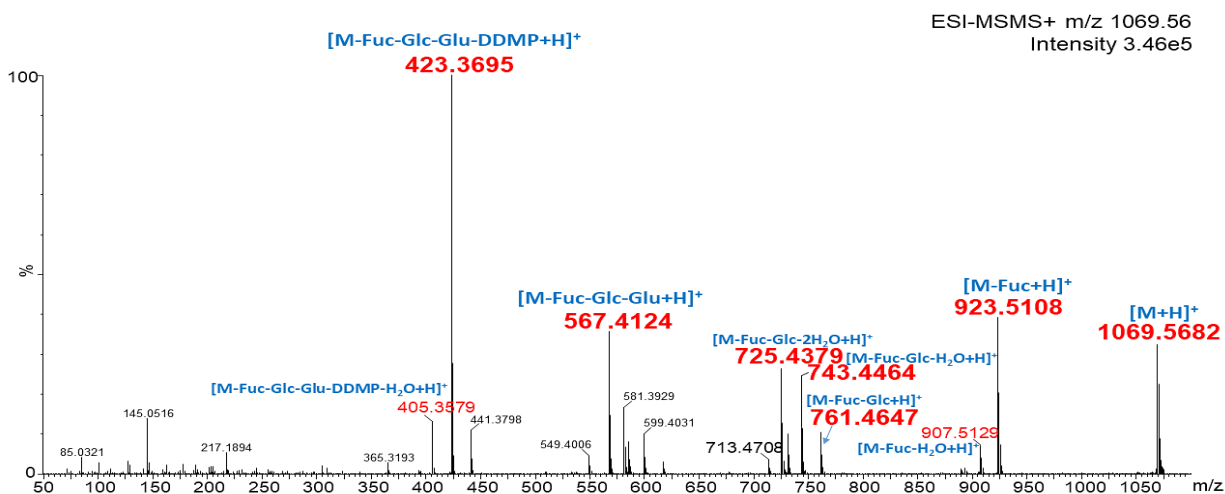
Poslední sadou experimentů byla v mé práci analýza extraktů vybraných genotypů hrachu spojením kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS). Vzhledem k nedostatku materiálu a časové náročnosti celého experimentu byly připraveny extrakty z cyklovaných a kontrolních semen genotypu s kódem 17 (jak již bylo uvedeno, genotyp, jehož cyklováním se zvyšuje rezpozivita a mění se na nedormantní). Analogicky byly také připraveny extrakty genotypu s kódem 86 (jak uvedeno výše, cyklováním ztrácí rezpozivitu a „zdormantní“). Jako extrakční činidlo byl použit roztok acetonu a vody (objemový poměr byl 70:30) za účelem extrakce polárnějších i méně polárních látek. Za těchto podmínek lze očekávat s dobrým výtěžkem i extrakci látek fenolických. V naměřených chromatogramech jsem si všimla, že v čase 7,6 minut je z kolony vymývána s neznámá látka s hodnotou m/z 1069.5682. V kontrolní analýze je signál této látky významně nižší. Porovnání signálů této látky v extraktech osemení z cyklovaných a necyklovaných semen je uvedeno v Grafu 3. Změny v signálu této látky v genotypu 17 jsou statisticky vysoce významné. Naproti tomu u genotypu 86 jsou zanedbatelné. Rozdíly v těchto signálech naznačují,

že složení osemení jednotlivých genotypů je i přes to, že jde o stejný rostlinný druh, poměrně rozdílné a velmi rozdílný bude patrně i mechanismus průniku vody do semene.



Obrázek 10: LC-MS chromatogram pro látku s m/z 1069,5682 ukazující, že semeno hrachu s kódem 17 cyklované obsahuje téměř o polovinu méně látky s hodnotou m/z 1069,5682.

Následně jsem provedla fragmentaci doposud neurčené látky s hodnotou m/z 1069,5682. Fragmentační spektrum této látky pak ukazuje obrázek č. 11.



Obrázek 11: MS-MS spektrum látky získané pomocí kapalinové chromatografie s hodnotou m/z 1069,5682 (Vysvětlení zkratk: Fuc = fukopyranosa, Glc = glukopyranosa, Glu = kyselina glukuronová, M = saponin, H = vodík, DDMP = 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on).

Látka s hodnotou m/z 1069,5682 se nazývá parent a je v rámci spektra umístěna vpravo. Jedná se o protonizovanou formu zkoumané látky. Nalevo od ní jsou pak vyobrazeny jednotlivé dílčí fragmenty této hmoty. Na základě přesné hmoty a literatury (Faizal, a další, 2013) jsem určila, že by se mělo jednat o derivát saponinu, který zřejmě ve své struktuře obsahuje glukopyranosu (Glc), metylovanou hexopyranosu (fukopyranosu, Fuc), kyselinu glukuronovou (Glu) a 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on (DDMP). (Kurosawa, a další, 2002) Jejich ztráty a také ztráty molekul vody můžeme pozorovat ve fragmentačním spektru (Obrázek 11). Ve stejném retenčním čase eluoval také její sodný adukt (m/z 1091,5540), ten však nebyl pro fragmentaci vybrán. Podobné fragmentační spektrum je popsáno i v práci týkající se saponinů ve fazolích od D. Guajardo-Florese z roku 2012. V tomto saponinu je však místo fukopyranosy navázaná galaktopyranosa (Gal). Detailnější náhled na fragmenty tohoto saponinu z fazolí ukazuje Tabulka 3. Je známo, že u saponinů existuje velká rozmanitost glykosidických jednotek. (Faizal, a další, 2013)

m/z hodnoty fragmentů	Navrhnuté struktury
923	[M-Glc-Gal+H] ⁺
743	[M-Glc-Gal-H ₂ O+H] ⁺
725	[M-Glc-Gal-2H ₂ O+H] ⁺
567	[M-Glc-Gal-Glu+H] ⁺
423	[M-Glc-Gal-Glu-DDMP-2H ₂ O+H] ⁺

Tabulka 3: Fragmenty saponinu (konkrétně soyasaponin α) z fazole. (Guajardo-Flores, a další, 2012)

Jak už bylo zmíněno, v osemeni hrachu s kódem 17 byl pozorován po teplotním cyklování pokles této látky téměř o 50 % ve srovnání s její kontrolou. Teplotní cyklování může mít tedy významný vliv na množství této látky v osemeni (lze usuzovat například její postupnou degradaci během teplotního cyklování). Jelikož v literatuře není zmiňována žádná souvislost těchto látek s fyzikální dormancí, není ani doposud známo, zda se podílejí na ovlivňování transportu vody skrz osemení. Na druhé straně mají tyto látky významné funkce v rostlinách (také semenech a v jejich osemeni). Vystupují zejména jako povrchově aktivní látky, ale podílejí se i na imunitě u rostlin a tím brání pletivo před nežádoucími účinky vnějších patogenů, jako jsou plísňe. (Faizal, a další, 2013) Hypoteticky, jejich menší množství, a tedy i menší rezistence osemeni vůči patogenům, by mohlo právě souviset se snadnějším narušením osemeni těmito vnějšími patogeny. Tyto látky by tedy mohly nepřímo souviset s ulehčením průniku vody skrz narušené (oslabené) osemení a tím napomáhat klíčení (snižovat dormanci semen).

9 ZÁVĚR

Ve svojí práci jsem se věnovala hledání chemické podstaty fyzikální dormance semen hrachu setého (*Pisum sativum*). Dormance, a naopak klíčivost má přímý vliv na velikost a kvalitu úrody, proto je její výzkum v rámci zemědělství velmi důležitý. Předčasné klíčení není neobvyklou záležitostí a pokud se podaří objasnit látky, které dormanci ovlivňují, pak by mohlo být i snadnější tomuto nepříznivému jevu předejít. Další důležitou znalostí pro pochopení dormance a předčasného klíčení je i teplotní cyklování, ke kterému v přírodě dochází a které hraje ve vztahu ke klíčení významnou roli. Dnes se stále neví, k jakým chemickým změnám při něm v osemení dochází.

Hlavním cílem mojí práce bylo pokusit se objasnit, jakým způsobem se projevuje teplotní cyklování semen v chemickém složení osemení hrachu setého (*Pisum sativum L.*) a jak se tyto změny mohou projevat ve změnách dormance. Pomocí celkem tří analytických technik jsem charakterizovala povrch osemení semen zatěžovaných teplotním cyklováním a osemení semen kontrolních. Infračervená spektrometrie poukázala na rozdíly v povrchové vrstvě osemení, zejména s ohledem na esterifikované látky (potenciálně steroidní, sacharidické, ligninové aj.) v kutině, případně ve fenolických sloučeninách. Mezi další látky, které potenciálně souvisí se změnami ve složení osemení vlivem cyklování patří inositol nebo jeho izomery (přesněji jejich fosforylovaná forma) nalezené LDI-MS technikou a určitý druh saponinu s hodnotou m/z 1069,5682, který byl objeven pomocí spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. V práci byly uvedeny i hypotézy, které vysvětlují jak by jejich množství a struktura mohly souviset dormanci semen a budou testovány v dalších experimentech. Zjistila jsem, že všechny použité metody jsou nápomocné při posuzování chemických změn v osemení vznikajících teplotním cyklováním. Na základě svého výzkumu mohu říci, že k významným změnám v chemickém složení dochází pravděpodobně ve všech částech osemení, nejen ve svrchní vrstvě osemení. Poznatky získané použitými analytickými technikami naplňují cíle práce spojené s pilotní charakterizací chemických změn v osemení hrachu setého souvisejících s cyklováním teploty.

Do budoucna plánuji pokračovat v těchto i dalších experimentech. V plánu je rovněž rozšíření datového souboru z analýzy infračervenou spektroskopií – technikou ATR, prostudovat spektra dalších genotypů a zopakovat měření s větším počtem opakování pro zlepšení možností statistického vyhodnocení rozdílů v IČ spektrech.

10 SEZNAM ZKRATEK

ATR – Attenuated Total Reflectance

IR – Infrared spectrometry (Infračervená spektrometrie)

LC – Liquid chromatography (Kapalinová chromatografie)

LDI – Laser Desorption/Ionization

MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (Laserová desorpce-ionizace za účasti matrice)

MF – Mobilní fáze

MS – Mass spectrometry (Hmotnostní spektrometrie)

OPLS-DA – Orthogonal partial least squares

p.a. – pro analýzu

PCA – Principal component analysis (Analýza hlavních komponent)

PřF UP – Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

tR – Retenční čas

11 BIBLIOGRAFIE

ABBO, Shahal, Simcha LEV-YADUN a Avi GOPHER. Agricultural Origins: Centers and Noncenters; A Near Eastern Reappraisal. *Critical Reviews in Plant Sciences* [online]. 2010, **29**(5), 317-328 [cit. 2018-12-12]. DOI: 10.1080/07352689.2010.502823. ISSN 0735-2689. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2010.502823>

BASKIN, Carol C. a Jerry M. BASKIN. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Second edition. San Diego, CA: Elsevier/AP, [2014]. ISBN 9780124166776.

BASKIN, Jerry M., Carol C. BASKIN a Xiaojie LI. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology* [online]. 2000, **15**(2), 139-152 [cit. 2018-12-12]. DOI: 10.1046/j.1442-1984.2000.00034.x. ISSN 0913557X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1442-1984.2000.00034.x>

BETANCOURT, Jennifer a Sean GOTTLIEB. Liquid Chromatography. *Chemistry LibreTexts* [online]. California: UC Davis Office of the Provost, 2018 [cit. 2018-12-12]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography)

CECHOVÁ Monika, *Analýza osemení hrachu hmotnostní spektrometrií s laserovou desorpční-ionizací*. Diplomová práce (Mgr.). Univerzita palackého v Olomouci, Katedra analytické chemie, 24. 4. 2015

CECHOVÁ, Monika, Markéta VÁLKOVÁ, Iveta HRADILOVÁ, Anna JANSKÁ, Aleš SOUKUP, Petr SMÝKAL a Petr BEDNÁŘ. Towards Better Understanding of Pea Seed Dormancy Using Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(10) [cit. 2018-12-10]. DOI: 10.3390/ijms18102196. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/10/2196>

COUSIN, R. Peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research* [online]. 1997, **53**(1-3), 111-130 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1016/S0378-4290(97)00026-9. ISSN 03784290. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378429097000269>

CROCKER, Wm. MECHANICS OF DORMANCY IN SEEDS. *American Journal of Botany* [online]. 1916, **3**(3), 99-120 [cit. 2018-12-21]. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1916.tb05406.x. ISSN 00029122. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.1537-2197.1916.tb05406.x>

CVAČKA, Josef. Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. *Natur.cuni* [online]. Praha, 2010 [cit. 2018-12-21]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>

HOFFMANN, Edmond de a Vincent STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-03310-4.

DEBEAUJON, Isabelle, Karen M. LÉON-KLOOSTERZIEL a Maarten KOORNNEEF. Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in Arabidopsis. *Plant Physiology* [online]. 2000, **122**(2), 403-414 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1104/pp.122.2.403. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.122.2.403>

CHAUNEY, Dunford. *Vypěstujte si, co sníte*. Přeložil Zdenka PODHAJSKÁ. Praha: Knižní klub, 2016. ISBN 978-80-242-5062-5.

ENDRES, Gregory, Shana FORSTER, Julie PASCHE a Kenneth HELLEVANG. Field Pea Production. In: *North Dakota State University* [online]. USA, North Dakota, 2016 [cit. 2018-12-23]. Dostupné z: <https://www.ag.ndsu.edu/publications/crops/field-pea-production>

FAIZAL, Ahmad a Danny GEELLEN. Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochemistry Reviews* [online]. 2013, **12**(4), 877-893 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1007/s11101-013-9322-4. ISSN 1568-7767. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11101-013-9322-4>

FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Hmotnostní spektrometrie – zdroj analytických informací. *Klinická biochemie a metabolismus*. Vydává Česká lékařská společnost J. E. Purkyně ve společnosti STAPRO, 2012, **20**(41), 210-215.

CECHOVÁ Monika, *Analýza osemení hrachu hmotnostní spektrometrií s laserovou desorpční-ionizací*. Diplomová práce (Mgr.). Univerzita palackého v Olomouci, Katedra analytické chemie, 24. 4. 2015

GESCHWINDER Lukáš, *Možnosti využití metod vícerozměrné statistické analýzy dat při hodnocení spolehlivosti distribučních sítí*. Diplomová práce (Mgr.). Vysoké učení technické v Brně. 25. 5. 2009

GIANFRANCESCO, Richard. *Potraviny z vlastní zahrady: jednoduchý návod, jak pěstovat ovoce, zeleninu, bylinky a další rostliny*. Praha: Mladá fronta, 2013. ISBN 978-80-204-2809-7.

GU, Xing-You, Michael E. FOLEY, David P. HORVATH, et al. Association Between Seed Dormancy and Pericarp Color Is Controlled by a Pleiotropic Gene That Regulates Abscisic Acid and Flavonoid Synthesis in Weedy Red Rice. *Genetics* [online]. 2011, **189**(4), 1515-1524 [cit. 2018-12-23]. DOI: 10.1534/genetics.111.131169. ISSN 0016-6731. Dostupné z: <http://www.genetics.org/lookup/doi/10.1534/genetics.111.131169>

GUAJARDO-FLORES, D., M. GARCÍA-PATIÑO, D. SERNA-GUERRERO, J.A. GUTIÉRREZ-URIBE a S.O. SERNA-SALDÍVAR. Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food Chemistry* [online]. 2012, **134**(3), 1312-1319 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.020. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612004803>

HAJZLER Jan, *Tvorba a databáze FT-IR spekter heterogenních systémů*. Bakalářská práce (Bc.). Vysoké učení technické v Brně. 23. 5. 2014

HARUŠTIAKOVÁ, Danka, Jiří JARKOVSKÝ, Simona LITTNEROVÁ a Ladislav DUŠEK. Vícerozměrné statistické metody v biologii. In: *Institut biostatistiky a analýz, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity* [online]. Brno, Česká republika: AKADEMICKÉ NAKLADATELSTVÍ CERM, s.r.o. Brno, 2012 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://www.iba.muni.cz/res/file/ucebnice/jarkovsky-vicerozmerne-statisticke-metody.pdf>

HAVLIŠ, Jan. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír*. 1999, **78**(8), 448.

CHUDOBA, Josef. Hmotnostní spektrometrie (1). In: *Katedra chemie, Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem* [online]. Ústí nad Labem, Česká republika [cit. 2018-12-23]. Dostupné z: <http://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/prednaska%20MS%20v%202014-1.pdf>

JANSKÁ, Anna, Eva PECKOVÁ, Bogna SCZEPANIAK, Petr SMÝKAL a Aleš SOUKUP. The role of the testa during the establishment of physical dormancy in the pea seed. *Annals of Botany* [online]. 2018 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1093/aob/mcy213. ISSN 0305-7364. Dostupné z: <https://academic.oup.com/aob/advance-article/doi/10.1093/aob/mcy213/5236604>

KANIA, Patrik. Infračervená spektroskopie. In: *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. Praha [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf?redirected>

KUROSAWA, Yasunori, Hidenari TAKAHARA a Masakazu SHIRAIWA. UDP-glucuronic acid: soyasapogenol glucuronosyltransferase involved in saponin biosynthesis in germinating soybean seeds. *Planta* [online]. 2002, **215**(4), 620-629 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1007/s00425-002-0781-x. ISSN 0032-0935. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-002-0781-x>

LI Xixuan, *Infrared: Application Chemistry LibreTexts* [online]. California: UC Davis Office of the Provost, 2013 [cit. 2018-12-12]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/Infrared%3A_Application](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/Infrared%3A_Application)

MALÝ, Ivan. *Pěstujeme cibuli, česnek, hrách a další cibulové a luskové zeleniny*. Praha: Grada, 2003. Česká zahrada. ISBN 80-247-0635-0.

NEUBAUER, Jiří. Analýza hlavních komponent: Ekonometrie. In: *Fakulta vojenského leadershipu, Univerzita obrany* [online]. Brno, Česká republika [cit. 2018-12-23]. Dostupné z: https://k101.unob.cz/~neubauer/pdf/ekon_PCA.pdf

OSIBANJO Richard, RachaelCURTIS, Zijuan LAI, *Chemistry LibreTexts* [online]. California: UC Davis Office of the Provost, 2017 [cit. 2018-12-12]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/Infrared%3A_Theory#title](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/Infrared%3A_Theory#title)

PAZDERA, Zdeněk. Pisum sativum – hrách setý. *Herbář Wendys* [online]. 2015 [cit. 2018-12-23]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/488-pisum-sativum-hrach-sety>

PEKÁRKOVÁ, Eva. *Pěstujeme zeleninu: [výběr vhodného druhu : termíny výsevu a výsadby : osevňovací postupy a sledy : zůsoby pěstování]*. Praha: Grada, 1997. Česká zahrada. ISBN 80-7169-493-2.

POKORNÝ, Zbyněk. Kyjatka hrachová. In: *Chovzvirat.cz* [online]. 2015 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <http://www.chovzvirat.cz/zvire/1374-kyjatka-hrachova/>

POUSTKA, Jan. Hmotnostní spektrometrie. In: *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. Praha, Česká republika, 2018 [cit. 2018-12-23]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-8%20MS-1-PRINCIP+IONIZACE_JP2018.pdf

PATCHARD, Ian. Growing field pea. In: *Department of Primary Industries and Regional Development* [online]. Austrálie, 2018 [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://www.agric.wa.gov.au/field-peas/growing-field-pea>

RATHJEN, Judith Rebecca. Role of the seed coat in the dormancy of wheat (*Triticum aestivum*) grains. In: *The University of Adelaide* [online]. Austrálie, 2006 [cit. 2018-12-23]. Dostupné z: <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/57104/2/02whole.pdf>

RUNGRUANGMAITREE, Runchana a Wannee JIRAUNGKOORSKUL. Pea, *Pisum sativum*, and its anticancer activity. *Pharmacognosy Reviews* [online]. 2017, **11**(21) [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.4103/phrev.phrev_57_16. ISSN 0973-7847. Dostupné z: <http://www.phcogrev.com/text.asp?2017/11/21/39/204370>

SHAO, S., C. J. MEYER, F. MA, C. A. PETERSON a M. A. BERNARDS. The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition and function during imbibition. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2007, **58**(5), 1071-1082 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1093/jxb/erl268. ISSN 0022-0957. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erl268>

SMÝKAL, Petr, Vanessa VERNOUD, Matthew W. BLAIR, Aleš SOUKUP a Richard D. THOMPSON. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2014, **5** [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.3389/fpls.2014.00351. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00351/abstract>

SÝKORA, D. a J. FÄHNRIK. Kapalinová chromatografie a absorpční UV spektrometrie. In: *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. Praha, Česká republika [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: https://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/6_LC.pdf?redirected