

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin



Bakalářská práce

**Méně známé látky s regulační funkcí ovlivňující růst  
a vývoj dřevin**

Autor: Veronika Řehořová

Vedoucí práce: doc. Ing. Ivana Tomášková, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Veronika Řehořová

Lesnictví

Název práce

**Méně známé látky s regulační funkcí ovlivňující růst a vývoj dřevin**

Název anglicky

**Less known substances with regulatory function influencing plant growth and development**

---

### Cíle práce

Cílem práce je 1. popsat méně známé funkce látek běžně se vyskytující v rostlinných pletivech, 2. vyhledat látky a jejich funkce, které byly objeveny nedávno a které významně ovlivňují růst a vývoj dřevin.

### Metodika

Rostliny představují téměř neomezený zdroj chemických sloučenin. Jejich tělo je tvořené látkami primárního metabolismu, ale i látkami užitečnými při interakci s prostředím a s různými stresovými faktory. Ty jsou součástí sekundárního metabolismu a patří mezi ně fenolické látky nebo terpeny. S dokonalejšími analytickými přístroji jsou objevovány stále nové chemické sloučeniny, které vykazují široké spektrum účinků na rostlinu, resp. jsou objevovány nové účinky již delší dobu známých látek. V případě trehalózy tak bylo relativně nedávno zjištěno, že tento disacharid dokáže syntetizovat vedle živočichů a hub i některé rostliny (Smeekens a kol., 2010). V jejich těle pak slouží jako osmotikum, jež chrání před tvorbou ledových krystalů a navíc je i látkou se signální funkcí. Podobně u strigolaktonů bylo objeveno, že nejsou zdaleka jen látkami se signální funkcí, ale mají spíše charakter fytohormonů, se kterými také interagují v pletivech rostlin (Gomez-Roldan a kol., 2008). Bakalářská práce shrne dosavadní poznatky o nově objevených sloučeninách nebo nových funkcí již známých sloučenin a popíše jejich vliv na růst a vývoj dřevin. Součástí práce bude zhodnocení využitelnosti nových poznatků o biochemických sloučeninách v provozu lesního hospodářství a ochraně přírody.

**Doporučený rozsah práce**

30-40

**Klíčová slova**

butenolid, ekofyziologie, fytohormon, strigolakton, trehalóza

---

**Doporučené zdroje informací**

- Burger, B. V et al. More butenolides from plant-derived smoke with germination inhibitory activity against karrikinolide. *South African J. Bot.* (2018).
- Gomez-Roldan, V. et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455, 189 (2008).
- Jardin, P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* (Amsterdam). 196, 3–14 (2015).
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J. & Rolland, F. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 273–278 (2010).
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M. & Vitti, A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 13561–13578 (2015).
- 

**Předběžný termín obhajoby**

2018/19 LS – FLD

**Vedoucí práce**

doc. Ing. Ivana Tomášková, Ph.D.

**Garantující pracoviště**

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 19. 11. 2018

**prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc, Ph.D.**

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 9. 2. 2019

**prof. Ing. Marek Turčáni, Ph.D.**

Děkan

V Praze dne 18. 02. 2019

---

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Méně známé látky s regulační funkcí ovlivňující růst a vývoj dřevin“ jsem vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Ivany Tomáškové, Ph.D. a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu použitých zdrojů na konci práce.

Jsem si vědoma, že zveřejněním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 20.4.2019

Podpis: Veronika Řehořová

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou vyjádřila velké poděkování vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Ivaně Tomáškové, Ph.D. za obrovskou trpělivost a odbornou pomoc v průběhu psaní a především, že mě ve výběru tématu plně podpořila.

Také bych chtěla poděkovat Ing. Adamu Brezáni a Ing. Michalu Samkovi z katedry KOLE za pomoc v realizaci praktické části bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Anně Krejzkové také za asistenci při realizaci praktické části bakalářské práce v laboratoři.

A v neposlední řadě děkuji mé rodině za plnou podporu během studií.

## **Méně známé látky s regulační funkcí ovlivňující růst a vývoj dřevin**

### **Abstrakt**

V rostlinných organismech se vyskytuje řada chemických látek, které mají signální a regulační funkci; jsou to tedy látky schopné ovlivňovat růst a vývoj rostlin. Mezi takové látky se řadí tzv. fytohormony. Do skupiny fytohormonů patří již dobře známé auxiny, gibbereliny, kyselina abscisová, ethylen a cytokininy. Kromě těchto pěti skupin hormonů se nově řadí mezi fytohormony také strigolaktony, které jsou rovněž důležitými látkami pro růst a vývoj rostlin, klíčení semen a ovlivňují větvení kořenů. Kromě fytohormonů ale existují další látky, které svou povahou mezi fytohormony nepatří, avšak vyznačují se rovněž signální a regulační funkcí v rostlinách. Jsou to brassinosteroidy, které stimulují dlouhivý růst a ovlivňují klíčení semen. Dále například disacharid trehalóza, kterou rostliny využívají jako obrannou látku při abiotických stresech nebo pro vyrovnání se s dehydratací organismu. Mezi méně známou skupinu signálních látek patří butenolidy-látky ovlivňující klíčení semen některých druhů rostlin po rozsáhlých lesních požárech, které rovněž interagují spolu se strigolaktony.

**Klíčová slova:** butenolid, ekofyziologie, fytohormon, strigolakton, trehalóza

## **Less known substances with regulatory function influencing plant growth and development**

### **Abstract**

There are number of chemicals in plant organisms that have a signal and regulatory function; they are therefore substances capable of influencing plant growth and development. Such substances are called phytohormones. The group of phytohormones includes well-known auxins, gibberellins, abscisic acid, ethylene and cytokinins. In addition to these five hormone groups, strigolactone is also a newly classified phytohormone, which is also an important ingredient in plant growth and development, germination of seeds and influences the branches of roots. However, in addition to phytohormones, there are other substances which by their nature are not phytohormones but are also characterised by a signal and regulatory function in plants. They are brassinosteroids that stimulate long growth and affect germination of seeds. For example, disaccharide trehalose, which is used by plants as a defensive agent during abiotic stress or to cope with dehydration of an organism. A less known group of signal substances includes butenolide-substances affecting the germination of seeds of certain plant species after extensive forest fires, which also interact with strigolactones.

**Keywords:** butenolide, ecophysiology, phytohormone, strigolactone, trehalose

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>13</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>14</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>15</b>
3.1 Primární metabolismus .....	16
3.1.1 Sacharidy .....	16
3.1.1.1 Monosacharidy.....	17
3.1.1.2 Oligosacharidy .....	19
3.1.1.3 Polysacharidy.....	21
3.1.1.4 Deriváty sacharidů .....	24
3.1.2 Lipidy .....	25
3.1.2.1 Jednoduché lipidy-vosky, tuky, oleje.....	25
3.1.2.2 Složené lipidy-fosfolipidy, glykolipidy.....	27
3.1.3 Bílkoviny .....	28
3.1.3.1 Aminokyseliny.....	29
3.1.3.2 Peptidy.....	30
3.1.3.3 Jednoduché bílkoviny.....	30
3.1.3.4 Složené bílkoviny.....	30
3.2 Sekundární metabolismus.....	32
3.2.1 Izoprenoidy .....	33
3.2.1.1 Monoterpeny.....	34
3.2.1.2 Diterpeny-gibereliny, ABA .....	34
3.2.1.3 Triterpeny-brassinosteroidy.....	35
3.2.1.4 Tetraterpeny.....	36
3.2.1.5 Polyterpen kaučuk.....	36
3.2.2 Alkaloidy .....	36
3.2.2.1 Alkaloidy a jejich využití .....	37
3.2.3 Fenolické látky.....	38
3.2.3.1 Flavonoidy .....	39
3.2.3.2 Kyselina salyciová .....	39
3.2.3.3 Lignin .....	40
3.2.3.4 Třísloviny .....	41
3.3 Látky se signální a regulační funkcí.....	42



3.3.1	Fytohormony.....	42
3.3.1.1	Auxiny.....	43
3.3.1.2	Cytokininy.....	44
3.3.1.3	Strigolaktony.....	46
3.3.2	Butenolidy.....	47
3.3.2.1	Karrikiny a princip klíčení semen.....	48
3.3.2.2	Další využití karrikinů.....	48
3.3.2.3	Butenolid a jeho vliv na klíčení a vývoj semen.....	49
3.3.3	Kyanhydridy.....	50
3.3.4	Trehalóza.....	51
<b>4</b>	<b>Metodika.....</b>	<b>54</b>
4.1	Popis vybraných lokalit, způsob odběru vzorků.....	54
4.2	Třídění a čištění odebraných vzorků.....	60
4.3	Popis spektrofotometru DR 6000.....	63
4.4	Postup extrahování trehalózy z kořenů <i>Picea abies</i> .....	64
4.5	Postup stanovení trehalózy ve vzorcích.....	65
4.6	Výpočet obsahu trehalózy.....	69
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zdrojů.....</b>	<b>75</b>

## Seznam obrázků

Obrázek 1 - Příklad podrobnějšího schématu primárního a sekundárního metabolismu s meziprodukty a výslednými metabolity, zdroj: (Krměčik & Kysilka, 2019).....	15
Obrázek 2 - D-glukóza, zdroj: (Mareček & Honza, 2000).....	18
Obrázek 3 - D-fruktóza, zdroj: (Mareček & Honza, 2000).....	19
Obrázek 4 – Sacharóza, zdroj: (Voet & Voetová, 1995).....	20
Obrázek 5 - Primární struktura celulózy, zdroj: (Voet & Voetová, 1995).....	22
Obrázek 6 - Struktura glycerolu, zdroj: (Mareček & Honza, 2000).....	27
Obrázek 7 - Primární struktura bílkovin, zdroj: (Mareček & Honza, 2000).....	29
Obrázek 8 - Dráhy primárního metabolismu až po výsledné produkty metabolismu sekundárního, zdroj: (Taiz & Zeiger, 2002).....	33
Obrázek 9 - Izopren (2-methyl-1,3-butadien), zdroj: (Luštinec & Žárský, 2005).....	34
Obrázek 10 - Jeden z giberelinů: Giberelin A1, zdroj: (Taiz & Zeiger, 2002).....	35
Obrázek 11 - Dráha vzniku některých fenolických látek šikimátovou a malonovou cestou, např. tříslovin, zdroj: (Taiz & Zeiger, 2002).....	39
Obrázek 12 - Napadení rostliny patogenem a dráha šíření signálu o aktivizaci rezistence, zdroj: (Taiz & Zeiger, 2002).....	40
Obrázek 13 - Kyselina indol-3-octová, zdroj: (Luštinec & Žárský, 2005).....	44
Obrázek 14 - Kinetin, první objevený cytokinin, zdroj: (Taiz & Zeiger, 2002).....	45
Obrázek 15 - Místo po odběru půdní sondy, cca 25 cm hluboko a 1 m vzdálené od stromu, zdroj: (Michal Samek).....	54
Obrázek 16 - Odběr půdní sondy, zdroj: (Michal Samek).....	55
Obrázek 17 - Odebraný válec hlíny s kořeny, zdroj: (Michal Samek).....	55
Obrázek 18 - Plocha s označením 17B6, převzato (10.4.2019): <a href="http://www.mapy.cz">www.mapy.cz</a> .....	57
Obrázek 19 - První lokalita 17B6, zdroj: (Michal Samek).....	57
Obrázek 20 - Strom č.2 se 3. stupněm napadení kloubnatkou smrkovou z první lokality 17B6, zdroj: (Michal Samek).....	58
Obrázek 21 – Pohled na lokalitu 17B6, zdroj: (Michal Samek).....	58
Obrázek 22 - Plocha s označením 88B5, převzato (10.4.2019): <a href="http://www.mapy.cz">www.mapy.cz</a> .....	59

Obrázek 23 - Třetí lokalita s označením 80B8, převzato (10.4.2019): www.mapy.cz .....	59
Obrázek 24 - Čištění kořenů smrku ztepilého vodou, zdroj: (Veronika Řehořová) .....	60
Obrázek 25 - Ukládání a popisování vyříděných vzorků, zdroj: (Veronika Řehořová) ....	61
Obrázek 26 - Přístroj spektrofotometr DR 6000 umístěný v laboratoři, zdroj: (Anna Krejzková) .....	63
Obrázek 27 - Displej přístroje DR 6000 s možností navolení programů, zdroj: (Anna Krejzková) .....	64
Obrázek 28 - Balení kitů značky Megazyme, zdroj: (Anna Krejzková) .....	66
Obrázek 29 - Lahvičky s obsahem jednotlivých kitů: lahvička 1 - buffer, lahvička 2 - NAPD + ATP, lahvička 3 - HK/G6PDH, lahvička 4 – trehaláza, zdroj: (Anna Krejzková) .....	66
Obrázek 30 - Magnetická míchačka IKA C-MAG HS 7, zdroj: (Anna Krejzková).....	68

## **Seznam tabulek**

Tabulka 1 - Souhrn některých vlastností trehalózy, zdroj: (Higashiyama, 2002) .....	51
Tabulka 2 - Popis jednotlivých ploch (1) .....	56
Tabulka 3- Popis jednotlivých ploch (2) .....	56
Tabulka 4- Popis jednotlivých ploch (3) .....	56
Tabulka 5 - Seznam jedinců plochy 17B6 s velikostí kořene a stupněm poškození kloubnatkou smrkovou .....	61
Tabulka 6 - Seznam jedinců plochy 80B8 s velikostí kořene a stupněm poškození kloubnatkou smrkovou .....	62
Tabulka 7- Seznam jedinců plochy 88B5 s velikostí kořene a stupněm poškození kloubnatkou smrkovou .....	62
Tabulka 8 – Seznam a použití kitů, zdroj: (Megazyme, 2018).....	67
Tabulka 9 - Kit trehaláza, která se přidá ke vzorku a poté se nechá spolu s ním promíchat, zdroj: (Megazyme, 2018).....	67
Tabulka 10 - Výsledky analýzy: hodnoty A1, A2, vypočtená hodnota $\Delta A$ , koncentrace a obsah trehalózy .....	71
Tabulka 11 – Výsledky analýzy po změně metodiky .....	72

## **Seznam použitých zkratek**

**ABA** kyselina abscisová

**ATP** adenosin-5'-trifosfát

**BR** brassinosteroidy

**DNA** deoxyribonukleová kyselina

**GA** gibereliny

**G-6-P** glukóza-6-fosfát

**G6P-DH** glukóza-6-fosfát dehydrogenáza

**HK** hexokináza

**IAA** kyselina indolyl-3-octová

**mRNA** messengrová RNA (ribonukleová kyselina)

**NADP<sup>+</sup>** nikotinamid-adenin dinukleotid fosfát

**NADPH** redukovaný nikotinamid-adenin dinukleotid fosfát

**PAA** kyselina fenylactová

**SA** kyselina salyciová

**TPS** trehalóza-6-fosfát syntáza

**T6P** trehalóza-6-fosfát

**VOC** těkavé organické látky

# 1 Úvod

V každém živém organismu, ať už se jedná o rostlinu či živočicha, probíhá řada biologických procesů, díky nimž daný organismus je schopen existovat. Jedná se o širokou škálu chemických reakcí, které již dobře známe a jsou popsány v nejedné učebnici. Každá reakce, která se odehraje v živém organismu, má své výsledné látky, kterým se říká přírodní látky. Mezi ty hlavní patří látky, které, jak živočichům, tak i rostlinám slouží jako nutrienty. Mezi živiny se řadí bílkoviny, lipidy a sacharidy, dále pak biokatalyzátory (především hormony a enzymy), v neposlední řadě nukleové kyseliny, terpeny, steroidy a alkaloidy. Reakce, jež v organismech probíhají, se nazývají metabolické procesy a tělo si díky nim dokáže vyrobit například dostatek energie (Blažek & Fabini, 2005; Voet & Voetová, 1995).

Avšak s pokrokem vědy a techniky se objevuje stále více nových látek, které se aktuálně zkoumají a mnoho dalších látek, které na své objevení teprve čekají. Veškeré metabolické procesy jsou velmi složité a mnoho z nich ještě není zcela objasněno (Blažek & Fabini, 2005). Již teď je ale známo obrovské množství hormonů a signálních látek u živočichů, stejně tak je tomu i u rostlin. Kromě živin a nukleových kyselin jsou právě tzv. fytohormony a další signální látky pro rostliny velice důležité. Zrovna tak jako u živočichů i fytohormony a signální látky řídí těla rostlin, jedná se o látky, které stimulují například růst stonku a listů, u dřevin pak růst pupenů a mají mnoho dalších funkcí (Procházka, et al. 1998).

Nejprve je třeba si uvést a rozebrat jednotlivé skupiny přírodních látek, tedy látky primárního a sekundárního metabolismu, na které navážou již známé látky se signální a regulační funkcí, mezi nimi právě fytohormony a také méně známé látky, které nejsou příliš v povědomí. Mezi méně známými látkami jsou zařazeny například strigolaktony, nejnovější skupina fytohormonů s dalšími objevenými funkcemi, mezi nimiž je například stimulace klíčení semen nebo ovlivňování větvení kořenů, dále butenolidy schopné vyvolat klíčení semen po požárech a v neposlední řadě disacharid trehalóza, u které se zjistily další funkce pro organismus. Trehalóza je také hlavním předmětem praktické části bakalářské práce. Smyslem praktické části je prokázání koncentrace a obsahu trehalózy v kořenech smrku ztepilého.

## 2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je přiblížit, popsat a objasnit, jak vznikají a fungují některé látky řadící se mezi látky se signálními a regulačními funkcemi u rostlin, tedy látky, které jsou zodpovědné za růst a vývoj rostlinných orgánů; látky, které fungují jako obranné mechanismy proti škodlivým patogenům, proti biotickým a abiotickým stresům; látky, které jsou hormonálně zodpovědné za chování rostlin.

Tato bakalářská práce je postavena na popisu skupin látek primárních metabolitů a na ně navazujících sekundárních metabolitů, vzhledem k tomu, že z jejich metabolických drah a produktů vznikají některé látky ze skupiny signálních látek. Práce pokračuje popisem látek se signální a regulační funkcí-fytohormonů, dále nově zařazenou skupinu fytohormonů strigolaktony, kterou následují méně známé látky, jako jsou butenolidy a kynahydridy. Poslední část literární rešerše spolu s praktickou částí je věnována disacharidu trehalóza.

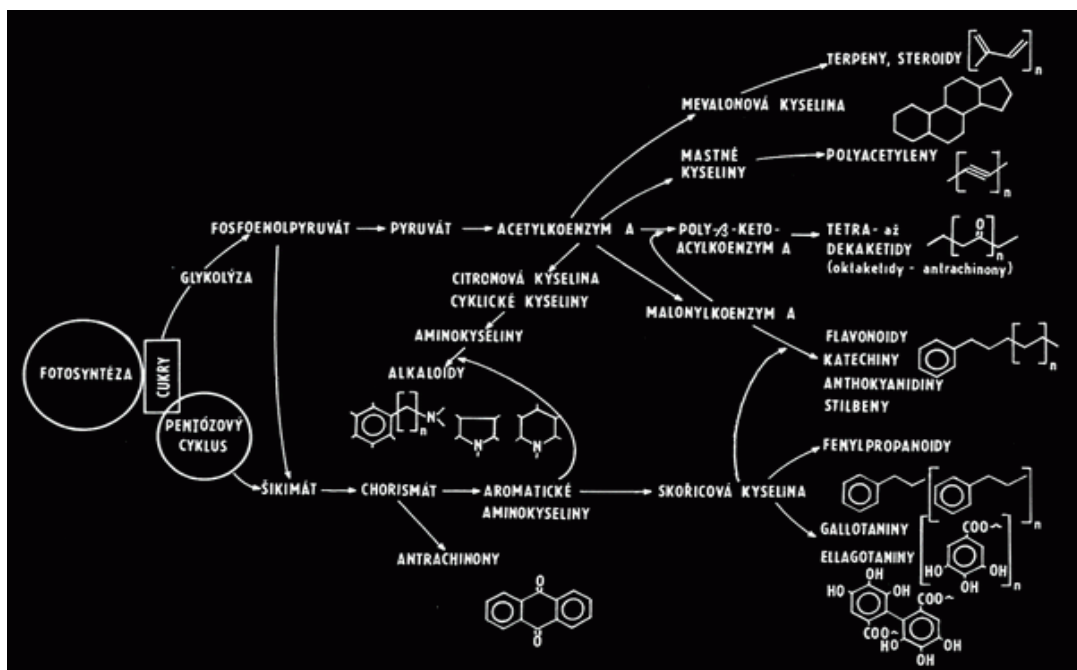
Cílem praktické části bakalářské práce je prokázat koncentraci a obsah trehalózy v kořenech smrku ztepilého nacházející se na zkusných plochách v Krušných horách, konkrétně laboratorní analýzou pomocí spektrofotometru a pomocí kitů pro detekci trehalózy.

### 3 Literární rešerše

V každém rostlinném těle, stejně tak jako u živočichů, probíhá řada chemických reakcí, díky kterým rostliny mohou správně růst a vyvíjet se, bránit se nepříznivým jevům, a které jsou nezbytné k přežití jedince. Zásadou těchto chemických reakcí získává organismus potřebnou volnou energii, kterou pak následně využije dle svých potřeb. Jak je již známo, rostliny se řadí mezi fototrofní organismy, které tuto volnou energii získávají ze Slunce pomocí fotosyntézy a dále ji enzymy skrze metabolické dráhy přetváří na výsledné složky-metabolity. Souhrnně se tyto procesy označují pojmem metabolismus (Voet & Voetová, 1995).

Metabolismus se pak dále dělí na primární a sekundární, dle reakcí a výsledných produktů. Oba tyto metabolismy jsou úzce spjaty, navazují na sebe a nedá se přímo určit, kde začíná nebo končí hranice mezi nimi. Například některé výsledné produkty metabolismu sekundárního vedle produktů metabolismu primárního, jako jsou fytohormony, také velmi ovlivňují růst a vývoj rostliny. Dráhy obou metabolismů jsou cyklické (Voet, et al. 2013; Voet & Voetová, 1995).

V metabolických drahách je mimo výsledných produktů, známá i řada meziproductů, například Acetyl-CoA nebo kyselina skořicová (Obrázek 1), které se dále podílí na biosyntézách právě oněch výsledných metabolitů (Voet & Voetová, 1995).



Obrázek 1 - Příklad podrobnějšího schématu primárního a sekundárního metabolismu s meziproducty a výslednými metabolity, zdroj: (Krmencič & Kysilka, 2019)

### 3.1 Primární metabolismus

Primárním metabolismem rostlin se označují procesy, kterými jsou toky energií a přeměny látek v těle rostliny. Jsou to velice důležité děje v oblasti růstu a vývoje rostlin. Tyto reakce se odehrávají za přítomnosti enzymů v živých buňkách rostlin a jsou základními pro tvorbu primárních metabolitů, které jsou důležité pro syntézu látek sekundárního metabolismu a jejich derivátů (Voet & Voetová, 1995).

Vzniklé produkty primárního metabolismu, mezi které řadíme základní nutrienty-sacharidy, lipidy, bílkoviny spolu s aminokyselinami (20 základních) a nukleové kyseliny, se běžně vyskytují ve všech rostlinných organismech a jsou základem pro stavbu rostlinného těla, jako obrana proti škodlivým vlivům a především jsou rostlinám pohonnou energií (Tomášková & Kubásek, 2017; Voet et al., 2013; Voet & Voetová, 1995). Jsou to tedy látky důležité pro přežití daného organismu. Primární metabolismus je součástí nezbytných dějů jako je fotosyntéza nebo dýchání (Voet & Voetová, 1995).

Veškeré látky produkované fotosyntézou a dále přeměněné na primární metabolity se šíří po rostlině pomocí rostlinného pletiva floému od zdroje vzniku k cílovým částem rostliny, tedy k sinku (Luštinec & Žárský, 2005).

#### 3.1.1 Sacharidy

Sacharidy jsou základní organické látky živých organismů s variabilními funkcemi (Voet & Voetová, 1995). Mezi nejvýznamnější patří funkce zásobní (škrob), stavební (celulóza) nebo slouží jako zdroj energie (glukóza), některé mohou být například součástí hormonů či glykosidů, jiné nesou genetickou informaci. Najdeme je hlavně v rostlinách, konkrétně v buněčných stěnách, kde zastávají funkci zásobní, u živočichů figurují potom především jako zdroj energie (Blažek & Fabini, 2005; McMurry, 2004). Mimo to plní velice významnou funkci signální molekuly, řídí například růst organismu (trehalóza) (Tomášková & Kubásek, 2017). Molekuly sacharidů se skládají ze 3 prvků-kyslík, vodík a uhlík. Obecný vzorec sacharidů je  $C_n(H_2O)_n$ . Každá molekula sacharidu se pak skládá z jednotlivých monosacharidových (cukerných) jednotek. Dle toho, kolik jednotek molekula obsahuje, se sacharidy dělí na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Obecně znám je pojem cukry, ale takto jsou správně označovány jen nízkomolekulární sacharidy-monosacharidy a oligosacharidy, jejichž významnou vlastností je rozpustnost ve vodě (Mareček & Honza, 2000).



Pro přehlednost sacharidů jsou jednotlivé skupiny a podskupiny sacharidů, které jsou zmíněny v této kapitole, uvedeny níže:

- Monosacharidy
  - Glukóza, fruktóza
  - Deriváty monosacharidů-cukerné alkoholy
- Oligosacharidy
  - Neredukující disacharid sacharóza
  - Neredukující disacharid trehalóza
  - Redukující disacharidy
  - Trisacharid rafinóza
- Polysacharidy
  - Stavební polysacharidy celulóza a chitin
  - Zásobní polysacharidy škrob a inulin
  - B-glukany
- Deriváty sacharidů
  - Pektin
  - Slizy, gummy, klejotoky

### **3.1.1.1 Monosacharidy**

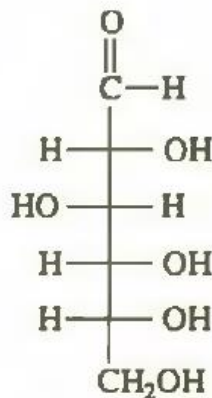
U monosacharidů se molekula daného cukru skládá pouze z jedné monosacharidové jednotky, která je cyklická. Jsou to ty nejjednodušší cukry, které známe a už se dále nedají rozložit. Jsou rozpustné ve vodě a často bývají sladké. Při vyšších teplotách tají a mění barvu na hnědou, tedy karamelizují (Mareček & Honza, 2000). Většina monosacharidů jsou výsledným produktem fotosyntézy, například základní sacharid glukóza (Voet & Voetová, 1995) a dělí se dle počtu uhlíků (obsahují nejméně tři, nejvíce sedm) na triózy, tetózy, pentózy, hexózy a heptózy, nejvýznamnější monosacharidy rostlin mívají tři, pět a šest uhlíků (Mareček & Honza, 2000). Monosacharidy jsou pak stavebními látkami složitějších sacharidů a najdeme je také v nukleových kyselinách nebo v tucích (Voet & Voetová, 1995).

Monosacharidy mají kromě hydroxylové skupiny i skupinu ketonovou či aldehydovou. Aldózy a ketózy se řadí mezi sacharidy s třemi až šesti uhlíky, důležitým zástupcem skupiny aldóz je tříuhlíkatý glycerinaldehyd-meziprodukt fotosyntézy a skupiny

ketóz tří uhlíkatý dihydroxyaceton (Voet & Voetová, 1995). Patří mezi nejjednodušší cukry vůbec (Mareček & Honza, 2000).

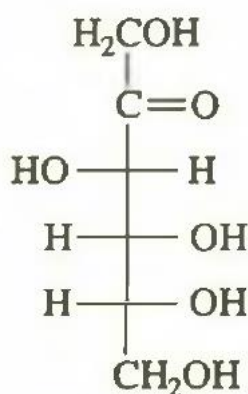
Významnými monosacharidy jsou také pentózy ribóza a deoxyribóza, které jsou součástí nukleových kyselin, některých metabolických meziproduktů, makroergických sloučenin jako je ATP, koenzymu NADP<sup>+</sup> nebo vitamínů (Tomášková & Kubásek, 2017).

Mezi nejvýznamnější monosacharid s redukčními vlastnostmi se řadí glukóza neboli hroznový cukr s celkem šesti uhlíky, jejíž vzorec je C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (Obrázek 2) a je produktem fotosyntézy. Najdeme ji v ovocných šťávách či v ovoci (Blažek & Fabini, 2005). Je velice důležitá z hlediska okamžitého dodání energie organismu. Díky odbourání v glykolýze pak vstupuje do citrátového cyklu a uskutečňuje buněčné dýchání (Voet et al., 2013). Je to dobře známá bílá, krystalická, rozpustná látka (Mareček & Honza, 2000). Glukóza se dále přeměňuje na některé významné sacharidy v rostlinách, na oligosacharidy, jako je třeba sacharóza nebo polysacharidy, kde tvoří základní stavební jednotku pro celulózu a škrob (Blažek & Fabini, 2005).



Obrázek 2 - D-glukóza, zdroj: (Mareček & Honza, 2000)

Další významnou hexózou je potom fruktóza (Obrázek 3), která se podílí na stavbě oligosacharidů. Spolu s glukózou je složkou ovoce a včelího medu, najdeme ji v sacharóze a ze všech cukrů má největší sladivost (Mareček & Honza, 2000).



Obrázek 3 - D-fruktóza, zdroj: (Mareček & Honza, 2000)

Cukerné alkoholy, jinak se jim říká polyoly, jsou metabolické redukční produkty aldóz a ketóz. Jelikož jsou to alkoholy, mají připojenou skupinu -OH na téměř všech uhlících. Řetězce uhlíků mají buď lineární nebo cyklické, ty se potom značí jako inosity. Jeden z významných a nejčastěji se vyskytujících cukerných alkoholů pro rostliny je sorbitol. Jedná se o šesti uhlíkatý cukr, který je přímým produktem fotosyntézy v listech, odkud je dál dopravován spolu s dalšími produkty do sinkových pletiv. Spolu se sacharózou plní funkci zásobní, slouží k translokaci uhlíku po celé rostlině a je zdrojem energie. Používá se jako umělé sladidlo.

Druhým takovým velmi významným cukrem je manitol, který se rovněž nachází v mnoha druzích rostlin, stejně tak je obsažen v listech rostlin, odkud putuje floémem dále. Dalším příkladem je robitol, který je součástí koenzymů nebo glycerol, který je pak nedílnou složkou některých jednoduchých lipidů. Xylitol se potom využívá jako umělé sladidlo na doslazování žvýkaček bez cukru nebo v diabetických produktech. Polyoly se po rostlině pohybují floémem či xylémem a ke zvýšenému přenosu dochází, pokud je rostlina vystavena stresu ze soli či sucha (Noiraud, et al. 2001; Voet et al., 2013).

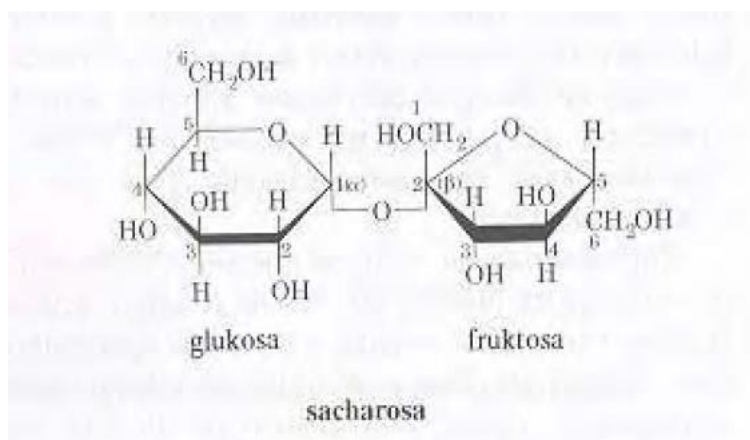
### 3.1.1.2 Oligosacharidy

Oligosacharidy se skládají minimálně ze dvou a nejvíce z deseti monosacharidových jednotek, na sebe vázaných glykosidickou vazbou. Dle počtu těchto cukerných jednotek se rozlišují oligosacharidy na disacharidy (nejvýznamnější), trisacharidy atd. Rovněž mají stavební funkci, ale také regulační (Voet & Voetová, 1995). Dle způsobu, kterým se na sebe monosacharidové jednotky vážou, rozlišujeme redukující

a neredukující oligosacharidy. U redukujících sacharidů vzniká glykosidová vazba mezi dvěma atomy uhlíku dvou molekul monosacharidů, zatímco u neredukujícího sacharidu vzniká tato vazba mezi atomem uhlíku jednoho monosacharidu a atomem aldózy nebo ketózy druhého monosacharidu (Mareček & Honza, 2000).

Neredukující sacharidy jsou pro rostliny velkou výhodou. Díky nim jsou rostliny například dobře rezistentní vůči nízkým i vysokým teplotám a vůči nepříznivému pH.

Mezi nejvýznamnější oligosacharidy patří disacharidy. Jedním z nich je i sacharóza se vzorcem  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (Obrázek 4). Sacharóza je neredukující oligosacharid, který najdeme skoro ve všech rostlinných plodech a šťávách, nejvíce pak v cukrové třtině nebo cukrové řepě a našli bychom ji uloženou ve vakuolách. Do povědomí se zapsala jako nejpoužívanější potravinářské sladidlo, nejznámější je pak jako třtinový cukr. Je to bezbarvá, dobře rozpustná látka, vlivem zahřívání z ní vzniká hnědý karamel (Blažek & Fabini, 2005). Pokud se nachází v kyselém prostředí, pak hydrolyzuje na glukózu a fruktózu (Mareček & Honza, 2000). Sacharóza je nejhojněji přenášený disacharid pomocí lýka skrz celou rostlinu. Je hlavním produktem fotosyntézy, její přenos se odehrává za účelem dodání energie a uhlíku po celé rostlině. Je tedy hlavní rezervní látkou. Sacharóza také zastupuje kromě funkce zásobní i spolu s trehalózou funkci signální látky, je součástí některých vývojových dějů, například diferenciací vodivých pletiv, indukce kvetení nebo vývoj semen (Lunn & MacRae, 2003). Pokud dřevina sacharózu v daném období zas až tolik nevyužívá, pak ji rostlina skladuje ve formě škrobu v pletivech dřeva a kořenech stromů (Tomášková & Kubásek, 2017).



Obrázek 4 – Sacharóza, zdroj: (Voet & Voetová, 1995)

Dalším významným disacharidem je trehalóza. Trehalóza je složená ze dvou molekul glukózy. Je to jeden z nejstálejších sacharidů, má poměrně vysokou tepelnou stabilitu a široké rozmezí pH. Má výbornou sladivost, a tak je využívána i v potravinářském průmyslu. Najdeme ji v kořenových systémech některých hub (kolem 10-25 %), u bakterií, hmyzu a samozřejmě v rostlinách. Je jedním z hlavních zdrojů energie. Mimo to, že má funkci zásobní, se také označuje jako signální látka. Je také známa tím, že dokáže chránit organismus proti stresu vyvolaném mrazem, suchem nebo osmotickým tlakem. Hraje důležitou roli při stabilizaci membrán v nepříznivých podmínkách, jako je nedostatek vody (Higashiyama, 2002).

Příkladem redukujících cukrů můžou být dobře známé disacharidy maltóza a laktóza. Oba jsou to cukry hojně užívané v potravinářství, oba mají sladkou chuť. Maltóza se získává hydrolyzou glykogenu či škrobu, zatímco laktóza vzniká propojením molekul glukózy a galaktózy a najdeme ji v mléce savců (Mareček & Honza, 2000).

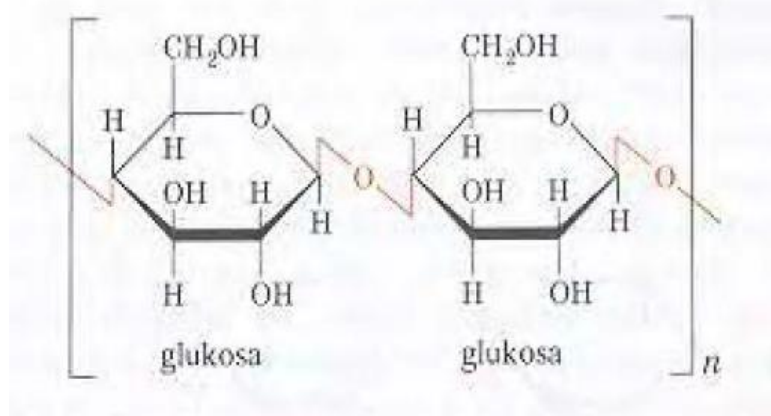
Za zmínku ještě stojí trisacharid rafinóza, kterou najdeme v sójových bobech či melase. Avšak v přírodě najdeme jen málo volně se vyskytujících vyšších oligosacharidů jako je právě rafinóza (Mareček & Honza, 2000).

### **3.1.1.3 Polysacharidy**

Polysacharidy jsou přírodní makromolekulární látky, skládají se z více jak deseti monosacharidových jednotek, běžně i z několika tisíc cukerných jednotek, navzájem spojené glykosidovými vazbami. Pokud jsou těmito základními cukernými jednotkami jednotky stejného typu, jedná se o homopolysacharidy (glukany), příkladem mohou být tzv. glukany, které obsahují stavební jednotky glukózy, pokud jsou základními jednotkami jednotky různých typů, potom se jedná o heteropolysacharidy (většina polysacharidů). Sumární vzorec polysacharidů je  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Polysacharidy plní funkci zásobní a stavební u rostlin, ale také u živočichů, hub a mikroorganismů. Další funkce, kterou bychom u nich našli, je zdroj energie pro biochemické reakce. V rámci rostlin je známa i funkce hospodaření s vodou (Čopíková & Synytsya, 2005; Mareček & Honza, 2000). Nejčastější základní stavební jednotkou polysacharidů je glukóza (Blažek & Fabini, 2005). Mezi nejvýznamnější polysacharidy v rámci rostlinné říše řadíme škrob a celulózu, u živočichů potom glykogen. U polysacharidů nenajdeme redukční vlastnosti z důvodu vzniku

glykosidových vazeb mezi polyacetalovými hydroxyly. Dělíme je na lineární (celulóza) a větvené (glykogen), kdy záleží, na kterém atomu uhlíku vznikly glykosidové vazby (Mareček & Honza, 2000).

Celulóza nás zajímá především proto, že se jedná o jeden z nejvýznamnějších sacharidů, produkovaným v rostlinách vůbec. Je primární stavební jednotkou buněčných stěn rostlin, mimo to je také součástí některých bakterií a pláštěnců, a je schopna vázat více jak 50 % uhlíku obsaženého v atmosféře. Jedná se o látku, která je nejvíce zastoupena na planetě Zemi (Mareček & Honza, 2000; Voet & Voetová, 1995). Je nerozpustná ve vodě a málo reaktivní. Skládá se z několika tisíc D-glukózových cukerných jednotek (Obrázek 5). Je zastoupena ve velké míře v listech, ve dřevě, trávě i bavlně (McMurry, 2004). Zajímavostí je, že jehličnaté stromy obsahují procentuálně více celulózy než listnaté stromy, stejně tak tomu je i v případě ligninu (Tomášková & Kubásek, 2017). Celulóza je v rostlinných buňkách uložena a spojena hmotou, která je složena z polysacharidů na bázi glukózy. V dřevinách se tato hmota skládá z většího množství ligninu, což je fenolový polymer, který zaručuje dřevině pevnost vláken. Pevnost a tuhost celulózy je však dána především díky vodíkovým můstkům, jež spojují jednotlivá vlákna a odolnosti vůči vodě (Voet & Voetová, 1995).



Obrázek 5 - Primární struktura celulózy, zdroj: (Voet & Voetová, 1995)

Velice podobným polysacharidem k celulóze je chitin, rozdílem je pouze nahrazení každé hydroxylové skupiny na uhlíku skupinou acetamidovou, a že neobsahuje glukózu, ale její derivát N-acetylglukosamin. Po celulóze je to nejvíce zastoupený polysacharid v přírodě a vyskytuje se v exoskeletech členovců (korýšů či hmyzu) a v dalších

bezobratlých, ale i v buněčných stěnách hub (Čopíková & Synytsya, 2005; Voet & Voetová, 1995).

Oproti stavebním polysacharidům jsou zásobní polysacharidy méně odolné vůči vodě vzhledem k menšímu obsahu vodíkových můstků mezi vlákny. Ve vodě bobtnají a částečně se mění v roztok (Mareček & Honza, 2000).

Škrob je hlavní zásobní látkou rostlin a je rostlinou využíván k růstu. Je to makromolekulární látka výhradně syntetizována právě rostlinami. Je uložen v cytoplasmě rostlin ve formě granulí a skládá se pouze ze dvou složek: z  $\alpha$ -amylózy a z větveného amylopektinu.  $\alpha$ -Amylóza je složena z několika tisíc glukózových zbytků s vazbou  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$ 4), jedná se o lineární polymer a je izomerem celulózy, avšak s odlišnými vlastnostmi vzhledem k otočení glukózových zbytků o sto osmdesát stupňů oproti předešlému zbytku. Amylóza je nerozpustná ve studené vodě. Amylopektin je potom větvenou molekulou s vazbami  $\alpha$ - (1  $\rightarrow$ 6), po 24-30 glukózových zbytcích. Je tvořen právě glukózovými zbytky a to až celkem 106 zbytky, čímž se řadí mezi největší molekuly v přírodě vůbec. Je rozpustný ve studené vodě. Makromolekuly škrobu mají šroubovicovou konformaci, kde na jeden závit šroubovice připadá celkem šest glukózových cukerných jednotek (Mareček & Honza, 2000; Voet & Voetová, 1995). Obsah amylopektinu a amylózy se liší druh od druhu rostliny, nejčastěji bývá 75 % amylopektinu a 25 % amylózy. Přítomnost škrobu v listech je u rostlin proměnlivá, záleží na denní době. Jeho ukládání dřevinami do kořenů začíná počátkem léta. Během klíčení dochází ke štěpení škrobu na maltózu a ta je hydrolyzována na glukózu, která slouží potom k tvorbě buněk a také částečně k dýchání (Tomášková & Kubásek, 2017; Voet & Voetová, 1995).

Některé druhy rostlin (například artyčoky, chřest nebo kořen čekanky) využívají jako zásobní sacharid inulin, který mají uložený ve vakuolách. Inulin není tvořen glukózou, ani jejími zbytky, nýbrž jednotkami fruktózy. Celkem má kolem dvaceti až třiceti těchto cukerných jednotek. Je označován jako vláknina a je využíván jako náhradní sladidlo (Mareček & Honza, 2000; Tomášková & Kubásek, 2017).

Poslední dobou jsou často studovanými a zajímavými polysacharidy  $\beta$ -glukany. Jsou složkou buněčných stěn rostlin, některých vyšších hub nebo mikroorganismů. Hlavní řetězec se skládá z glukózy pojenou  $\beta$ -glykosidovou vazbou (1 $\leftrightarrow$ 3) a větvený vazbou

(1↔6). Jsou předmětem zájmů především proto, že se u nich objevil kladný vliv na imunitní systém člověka a snižují hladinu cholesterolu (Čopíková & Synytsya, 2005).

#### 3.1.1.4 Deriváty sacharidů

Mezi významné deriváty sacharidů rozhodně patří pektin, který se nachází v buněčných stěnách rostlin. Nejčastěji se s ním setkáváme ve slupkách nezralých plodů (ovoce), dohromady s ligninem a celulózu se nachází v buněčných stěnách, konkrétně ve střední lamele. Pektin se podílí na stavbě buněčných pletiv a na hospodaření buněk s vodou, je ve vodě nerozpustný (protopektin) a má schopnost ji na sebe vázat, díky tomu je nezralé ovoce pevné a tuhé. Jedná se o polymer kyseliny galakturonové. Stejně jako celulózu nebo inulin ho řadíme mezi vlákninu. Používá se například k výrobě gelů (Čopíková & Synytsya, 2005). Pektiny jsou pro vědce zajímavé především proto, že u lidí snižují hladinu cholesterolu v krvi a vážou ionty těžkých kovů. Díky esterifikovaným karboxylům v molekulách jsou pektiny naprosto vyhovující pro různé chemické modifikace (např. transesterifikace), které mohou změnit fyzikální i chemické vlastnosti jejich derivátů. Díky esterifikaci či alkylationi vznikají tyto deriváty vazbou nepolárních skupin na pektinové makromolekuly. Právě tyto deriváty jsou potom schopné zachycovat a odstraňovat nepolární molekuly, jako jsou cholesteroly či tuky. Další zajímavostí je využití pektinů k ochraně tkání tlustého střeva. Pektiny jako takové po konzumaci jsou štěpeny na začátku tlustého střeva díky mikroorganismům. Avšak pokud se pektiny modifikují, ubrání se těmto mikroorganismům a projdou dále do tlustého střeva, čímž ho mohou chránit. Modifikovaný citrusový pektin kromě toho dokáže zamezit galaktózu-adhezi nádorových buněk na povrchu zdravých tkání tlustého střeva a zabránit tak vzniku metastáz (Čopíková & Synytsya, 2005).

Další zajímavou skupinou jsou rostlinné slizy a gummy. Obvykle se jejich řetězce skládají z polysacharidů, u gum také z glykoproteinů. Slizy potom mají ve svém řetězci především galaktózu, glukózu nebo kyselinu galakturonovou. Mezi slizy patří například agary a karagenany, které jsou získávány z červených mořských řas. Agary jsou složeny z lineárního polymeru galaktózy a využívají se jako kultivační média, zatímco karageny mají na řetězci galaktózy připojenou skupinu sulfátů. Z hlediska rostlin mají zásobní



i ochrannou funkci a jsou schopny vázat vodu v semenech. Jsou rozpustné v horské vodě, ochlazením roztoku vznikají gely (McMurry, 2004; Tomášková & Kubásek, 2017).

Klejotoky jsou také tvořeny polysacharidy a vznikají následkem nákazy či poranění dané dřeviny jako hojivé pletivo. Jedná se o tzv. výron látek připomínající vytékající lepkavý gel. Vzhledem se podobají pryskyřici, avšak to je nesprávné pojmenování, jelikož pryskyřici bychom našli pouze u jehličnatých dřevin, zatímco klejotoky jsou výhradně na dřevinách listnatých (ovocných) (Tomášková & Kubásek, 2017).

### **3.1.2 Lipidy**

Lipidy jsou další skupinou přírodních látek vyskytujících se ve všech živých buňkách. Jsou zčásti rozpustné nebo vůbec nerozpustné ve vodě, rozpustí se pouze v nepolárních rozpouštědlech. Mezi lipidy řadíme oleje, tuky, některé hormony či vitamíny, vosky, a především ty části buněčných membrán, které nejsou tvořeny bílkoviny. Z chemického hlediska se jedná o směsi esterů vyšších mastných kyselin a alkoholů s dlouhými řetězci. Z mastných kyselin jsou potom nejčastěji v lipidech obsaženy nasycené kyseliny palmitová či stearová a z nenasycených olejová nebo linolová, z alkoholů potom glycerol. Mastné kyseliny mívají obvykle dvojnou vazbu, ale mají i vícenásobné vazby. Molekuly lipidů obsahují uhlík, kyslík a vodík. Ty lipidy, které mají uhlovodíkové řetězce, slouží jako zásoby energie. Lipidy mohou být ve formě kapalné či pevné a mají nízkou teplotu tání. Lipidy můžeme dělit na jednoduché a složené. Mezi jednoduché patří tuky a vosky, mezi složené fosfolipidy (Mareček & Honza, 2000; McMurry, 2004; Voet et al., 2013; Voet & Voetová, 1995). Dále je můžeme dělit na hydrolizovatelné, ty mají esterovou vazbu, kterou lze štěpit, a nehydrolizovatelné, které esterovou skupinu nemají, sem řadíme například steroidy (McMurry, 2004). Lipidy jsou také významné z hlediska vstřebávání vitamínů (A, D, E...) a dalších látek rozpustných v tucích. Mimo jiné slouží jako tepelná izolace a ochraňují těla organismů (Mareček & Honza, 2000). Zajímavé také je, že se účastní syntézy barviv, jako jsou například chlorofyly nebo karotenoidy (McMurry, 2004).

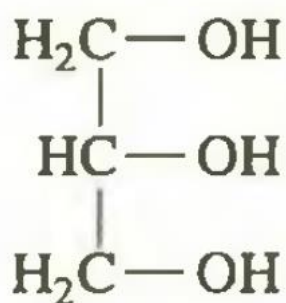
#### **3.1.2.1 Jednoduché lipidy-vosky, tuky, oleje**

Mezi jednoduché lipidy patří vosky, tuky a rostlinné oleje. Vosky najdeme jak u rostlin, tak u živočichů. Jsou to na rozdíl od olejů tuhé látky. Mají podobné vlastnosti jako

tuky, avšak jsou oproti nim stálé. Jsou také odolnější vůči hydrolyze a nepodléhají enzymatickým reakcím, to je důvod, proč je živočišné nejsou schopni strávit. Fungují jako skvělá ochrana rostlin proti mikroorganismům (Mareček & Honza, 2000). Tvoří tuhé ochranné povlaky na povrchu označované pojmem kutikula, našli bychom je u nadzemních částí rostlin, mimo to kutikula odpuzuje vodu a zároveň zamezuje nadměrnému odparu vody. Kutikulu tvoří polyester kutin (Tomášková & Kubásek, 2017). Dále mohou mít funkci stavební, jsou tak například součástí včelích pláství. Vosky jsou složeny z uhlíkových řetězců a z navázaných vyšších jednosytných alkoholů, případně aldehydů či ketonů (Blažek & Fabini, 2005; Mareček & Honza, 2000).

Mezi další látky podobné voskům a významné pro rostliny řadíme suberin. Je součástí buněčných stěn vyšších rostlin. Najdeme ho v Casparyho prouzcích, mezi jejichž funkci patří znemožnění odtoku vody z centrálního válce, pokud v prostředí rostliny je nedostatek vody. Avšak suberin oproti kutinu najdeme na vnitřní straně buněčné stěny a vytváří ho více druhů buněk či orgánů. U dřevin se vyskytuje potom v borce (Tomášková & Kubásek, 2017).

Některé jednoduché lipidy, jejichž alkoholickou část esterů tvoří glycerol (Obrázek 6), označujeme jako glyceridy. Glyceridy se dále dělí dle obsahu zbytků kyselin. Jednoduché glyceridy jsou tvořeny zbytkem jedné mastné kyseliny, zatímco smíšené ze zbytků různých kyselin. Mezi glyceridy řadíme právě tuky a rostlinné oleje. Tuky i oleje se dělí dle původu na rostlinné a živočišné. Tuky mívají obvykle původ živočišný, například sádlo nebo lůj. Oproti tomu oleje jsou výhradně původu rostlinného, například lněný, slunečnicový či olivový olej. Výjimkou je potom rybí olej nebo kakaový tuk. Přírodní tuky jsou vždy směs triacylglycerolů. Přeměnou sacharidů vznikají oleje v tělech rostlin, zatímco tuky si živočišné utváří sami z přijatých tuků nebo olejů v potravinách. Co se týká jejich důležitosti pro organismus, jsou tuky a oleje především energetickým zdrojem. Dále fungují jako rozpouštědlo pro některé vitamíny, rovněž jsou jejich zdrojem a také slouží jako rezervní látky (Blažek & Fabini, 2005). Oleje jsou v rostlinných tělech skladovány v oleozómech (organely obklopené fosfolipidovou membránou), u semen potom v tukových těliscích (Tomášková & Kubásek, 2017). Glyceridy se soustřeďují především v semenech a plodech rostlin, u živočichů potom pod kůží (Šorm & Hellberg, 1967).



Obrázek 6 - Struktura glycerolu, zdroj: (Mareček & Honza, 2000)

### 3.1.2.2 Složené lipidy-fosfolipidy, glykolipidy

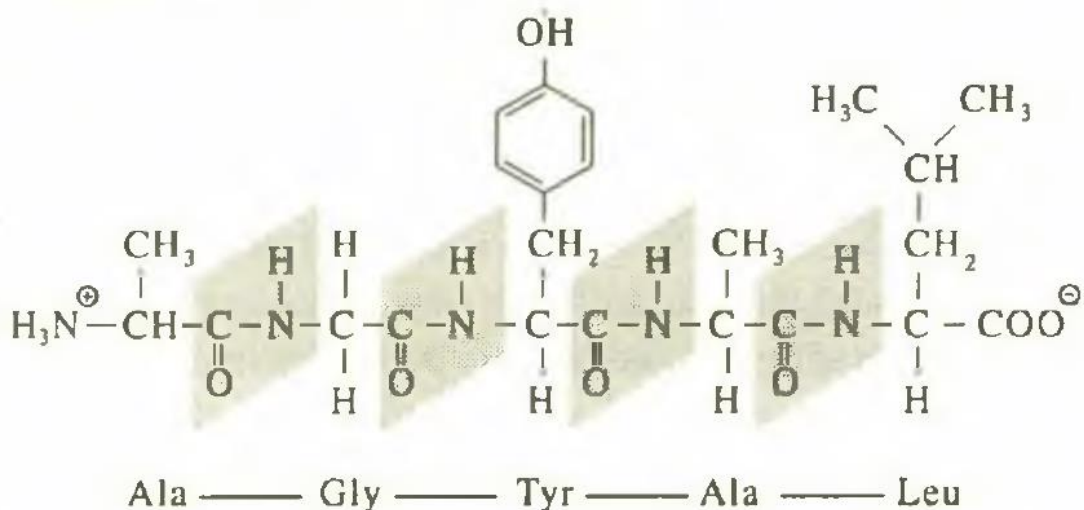
Mezi složené lipidy patří fosfolipidy a glykolipidy. Skládají se stejně jako jednoduché lipidy z vyšších mastných kyselin a alkoholů, navíc však z dalších látek, jakými mohou být kyselina fosforečná v případě fosfolipidů, sacharidy a jejich deriváty v případě glykolipidů (Mareček & Honza, 2000). Jsou významnými a hlavními komponenty biologických membrán. Molekuly fosfolipidů i glykolipidů jsou složeny z hydrofilních i hydrofobních prvků, které tvoří ve vodném prostředí uspořádané struktury. Kdybychom tyto prvky molekuly rozebrali, dostali bychom hydrofobní nepolární ‚ocas‘, tedy dlouhý uhlíkatý řetězec a hydrofilní polární ‚hlavičku‘ (Voet & Voetová, 1995). Hydrofobní části molekuly odpuzují vodu a jsou ve fosfolipidové dvojvrstvě membrán orientované směrem k sobě, zatímco hydrofilní části jsou zvenčí vrstvy a přitahují k sobě vodu. Takto výhodné postavení umožňuje potom biomembránám propouštět jen některé látky dovnitř a jiné ne (McMurry, 2004; Voet & Voetová, 1995). Fosfolipidy jsou diestery kyseliny fosforečné ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Glykolipidy se od fosfolipidů liší zejména tím, že nejsou složeny z kyseliny fosforečné, ale obsahují sacharid, například galaktózu. Z biologického hlediska mají však význam podobný fosfolipidům. Fosfolipidy se dají dělit do několika skupin dle substituentů, které se na ně vážou: dvě velice významné skupiny jsou fosfolacylglyceroly a sfingofosfolipidy, dalšími jsou například glycerofosfolipidy nebo galaktolipidy. Fosfoacylglyceroly obsahují stejně jako oleje a tuky molekulu glycerolu, na niž jsou dále vázány dvě molekuly mastných kyselin a molekula kyseliny fosforečné. Pomocí fosfátové skupiny se na hydroxyl váže ještě aminoalkohol, třeba cholin. Mezi nejvýznamnější fosfoacylglyceroly patří lecitin a kefalín. Biologické membrány obsahují přibližně 40 % fosfoacylglycerolů, zatímco sfingofosfolipidy jsou obsaženy jen z 5 %

(McMurry, 2004). Galaktolipidy bychom potom našli v membránách tylakoidních váček u chloroplastů (Tomášková & Kubásek, 2017).

Z chemického hlediska patří mezi lipidy i terpenoidy, avšak v této bakalářské práci jsou zařazeny mezi látky sekundárního metabolismu.

### 3.1.3 Bílkoviny

Bílkoviny neboli proteiny rovněž patří ke složkám primárního metabolismu. Jsou to velké biomolekuly a opět bychom je našli v každém živém organismu. Skládají se z asi 50 % uhlíku, ale také z kyslíku, vodíku, fosforu, dusíku či síry (Blažek & Fabini, 2005). Jejich hlavními funkcemi jsou funkce stavební (například nehty, rohy...především tedy u živočichů), transportní či zásobní, také koordinují chemické reakce organismů (hormony). Proteiny také katalyzují metabolické reakce (enzymy). Bílkoviny se skládají z několika aminokyselinových jednotek, které se pojí v dlouhé řetězce (Obrázek 7). Aminokyseliny jsou k sobě spojeny peptidickou vazbou mezi amidovou skupinou  $-NH_2$  na jedné aminokyselině a karboxylovou skupinou  $-COOH$  na druhé aminokyselině a jsou základní stavební jednotkou jak peptidů, tak bílkovin. Jestliže vazba pojí dvě molekuly aminokyseliny, označuje se látka jako dipeptid, pokud tři, tak tripeptid... Pokud vazba spojuje jedenáct až padesát aminokyselin, hovoříme o polypeptidech. O bílkovinách mluvíme až v případě, že počet vázaných aminokyselin je více než padesát (Mareček & Honza, 2000; McMurry, 2004; Murray, et al. 2003). Proteiny vznikají translací na ribozomech. Nejdříve se informace v rámci DNA přepisuje dějem nazývaném transkripce do mRNA, poté přichází na řadu právě ona translace a v rámci ní se tvoří proteiny v mRNA. K jejich syntéze však dochází až na endoplazmatickém retikulu nebo v cytoplasmě. V endoplazmatickém retikulu se bílkoviny dále upravují, a nakonec putují ve tvaru váček do Golgiho aparátu. Pokud dojde k procesu zvanému exocytóza (vyvržení určitého komponentu z buňky ven), odchází proteiny vně buňky ve formě vezikulů (Tomášková & Kubásek, 2017).



Obrázek 7 - Primární struktura bílkovin, zdroj: (Mareček & Honza, 2000)

### 3.1.3.1 Aminokyseliny

Vzhledem k důležitosti aminokyselin jakožto základních stavebních jednotek bílkovin je vhodné zmínit o nich některé informace. Máme dvacet základních aminokyselin, které se nejčastěji vyskytují v bílkovinách. Značí se tří písmennou zkratkou a dle postranního řetězce se dělí na neutrální, bazické a kyselé. Mezi základní neutrální aminokyseliny patří například alanin, glycin nebo leucin, celkem jich známe ale patnáct. Kyselé aminokyseliny jsou pouze dvě, a to kyselina asparagová a glutamová, a mají v postranním řetězci další karboxylovou skupinu. Bazické jsou tři s názvy arginin, histidin a lysin a mají v postranním řetězci amidovou skupinu. Aminokyseliny jsou rozpustné ve vodě, avšak v nepolárních rozpouštědlech nejsou. Jsou to krystalické látky s vysokou teplotou tání. O aminokyselinách můžeme říci, že jsou amfoterní, tedy mohou se chovat jako zásada, ale také jako kyselina dle prostředí, ve kterém se nachází (McMurry, 2004). Aminokyseliny mají kromě primárního metabolismu významnou funkci také v metabolismu sekundárním, kdy se účastní vzniku některých fytohormonů (Procházka et al., 1998). Vyjma zmíněných dvaceti základních aminokyselin existují i další, které se vyskytují například v rostlinných pletivech či v tkáních živočichů, některé se podílí na stavbě nízkomolekulárních peptidů. Rostliny si zvládnou aminokyseliny vyrobit samy, zatímco pro živočichy jsou některé tzv. esenciální látky, tedy nedokáží si je sami vyrobit, ale musí je přijmout v potravě (Mareček & Honza, 2000).

### 3.1.3.2 Peptidy

Hlavní velkou skupinou peptidů jsou protaminy a peptidové hormony. Peptidy vznikají kondenzací dvou či více aminokyselin, mohou mít jak lineární řetězce, tak cyklické. Jsou to látky produkované metabolismem, ale zároveň mohou být syntetizovány, sem patří například umělá sladidla. Protaminy jsou zásadité, jelikož jsou složeny z velkého množství zásaditých aminokyselin. Mezi peptidové hormony patří oxytocin nebo insulin. Peptidy zahrnují také některé jedy, například ten v mochomůrce hlízovité (Mareček & Honza, 2000).

### 3.1.3.3 Jednoduché bílkoviny

Jednoduché bílkoviny jsou složeny pouze z řetězců peptidů. Rozlišujeme dvě velké skupiny jednoduchých bílkovin, a to skleroproteiny a sferoproteiny. Skleroproteiny najdeme pouze u živočichů, jsou stavební složkou nehtů, vlasů, kůže, dokonce i peří. Mají vláknitou formu, ve vodě jsou nerozpustné. Nejznámějšími jsou kolagen a keratin. Kolagen bychom našli v chrupavkách či kostech, keratin potom ve vlasech (Mareček & Honza, 2000). Sferoproteiny jsou součástí jak těl živočichů, tak i rostlin. Mezi významné sferoproteiny rostlin řadíme globuliny a albuminy a z nich potom třeba legumin, který plní postavení zásobní složky v semenech olejnin, zatímco gluteiny nebo prolaminy jsou zásobními látkami v obilovinách (Mareček & Honza, 2000; Tomášková & Kubásek, 2017).

### 3.1.3.4 Složené bílkoviny

Na rozdíl od jednoduchých bílkovin neobsahují pouze peptidové řetězce, ale také nějakou další nebílkovinnou složku nazývanou prostetická skupina. Dle toho, jaký druh složky je na řetězec navázán, se také jmenují jednotlivé skupiny proteinů. Jako příklad uvedu glykoproteiny, které jsou obsaženy v sekretech sliznic a lipoproteiny, které jsou součástí buněčných membrán (Mareček & Honza, 2000).

Zajímavostí může být i to, že se některé proteiny chovají jako signální látky. Pokud je daná rostlina (či živočich) napadena patogenem, proteiny s větším podílem leucinu, které se vážou na nukleotidy a jsou označovány zkratkou NB-LRR (nucleotid bin-ding – leucin rich repea), rozpoznají škůdce ve svých buňkách a jsou schopny potlačit jeho

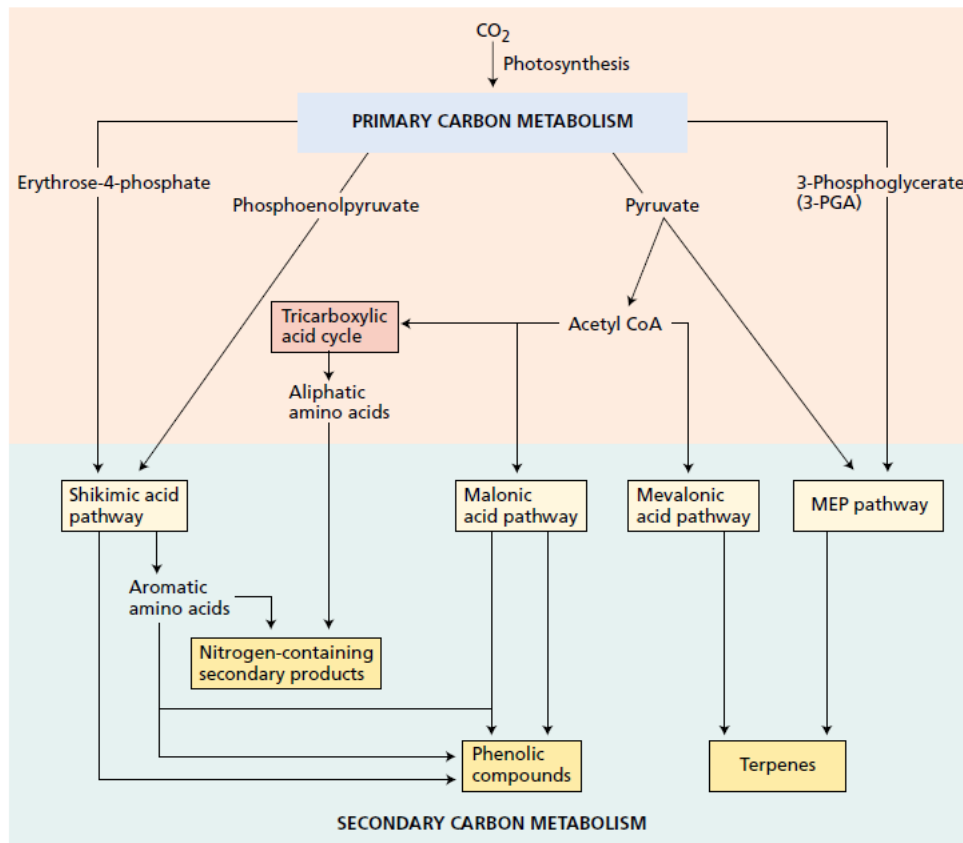
virulentní působení, tato akce potom může mít za následek hypersenzitivní reakci, což znamená, že usmrtí buňky hostitele (DeYoung et al., 2012; Salačová et al., 2015).

### 3.2 Sekundární metabolismus

Produkty sekundárního metabolismu rostlin jsou již látky, které nemusí být přítomny ve všech rostlinných organismech, nejsou tedy všem rostlinám vlastní, ale vyskytují se nebo jsou rostlinami využívány v určitých fázích jejich vývoje nebo jsou typické jen pro některé druhy rostlin. Jsou to tedy látky druhotné, nemusí na nich přímo záviset život rostliny, ale mohou ovlivňovat životně důležité procesy, jako je vývoj a růst rostliny nebo jsou to látky spojené s obranou proti biotickým a abiotickým stresům. Rostliny byly okolnostmi donuceny si je vytvořit, jelikož na rozdíl od živočichů nemohou opustit své prostředí. Fungují pro ně tak jako ochrana proti vnějším činitelům. Oproti živočichům se v rostlinné říši setkáváme s širokým spektrem těchto látek a jejich míra výskytu může být závislá na prostředí, ve kterém se rostlina nachází (Luštinec & Žárský, 2005; Taiz & Zeiger, 2002).

Konečné látky sekundárního metabolismu vychází pak ze syntéz primárních metabolitů. Mezi skupiny produktů sekundárního metabolismu řadíme izoprenoidy, fenolické látky a alkaloidy, mezi nimi potom různé éterické oleje, hormony, pryskyřice a silice (Obrázek 8) (Mareček & Honza, 2000). Produkování těchto látek je časově náročnější a často záleží, v jakém prostředí se zrovna rostliny nacházejí (Luštinec & Žárský, 2005).

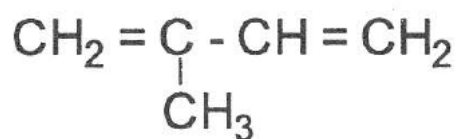




Obrázek 8 - Dráhy primárního metabolismu až po výsledné produkty metabolismu sekundárního, zdroj: (Taiz & Zeiger, 2002)

### 3.2.1 Izoprenoidy

Izoprenoidy jsou látky typické pro rostlinou říši, ale našli bychom je i u živočichů (vyšší terpeny). Z chemického hlediska jsou to látky řazené mezi lipidy, nazývané též terpeny (jedná-li se o uhlovodíky) či terpenoidy. Terpeny jsou látky s rozmanitými vlastnostmi a strukturou. Dnes je již známo několik tisíc těchto látek v rostlinách. Do skupiny terpenů patří vonné silice, pryskyřice, barviva či některé hormony. Většinu těchto látek si rostliny vyrobily jako obranný mechanismus proti škůdcům jako je hmyz či jiní predátoři. Základní stavební jednotkou izoprenoidů je izopren (2-methyl-1,3-butadien) (Obrázek 9), respektive jeho zbytek izopentenyl. Izopentenylové jednotky se pojí v řetězce, které mohou být lineární i cyklické. Dle množství těchto jednotek se izoprenoidy dělí na monoterpeny až polyterpeny, z nichž nejvýznamnější jsou tetraterpeny (Mareček & Honza, 2000; McMurry, 2004; Walsh, 2003). Obecně není přesně známa funkce terpenů, avšak mají široké využití v lékařství či kosmetickém průmyslu (Blažek & Fabini, 2005).



Obrázek 9 - Izopren (2-methyl-1,3-butadien), zdroj: (Luštinec & Žárský, 2005)

### 3.2.1.1 Monoterpeny

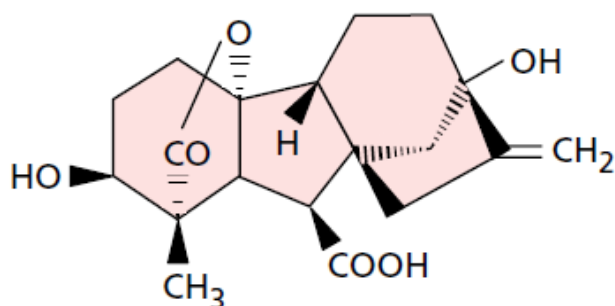
Monoterpeny jsou deseti uhlíkaté sloučeniny složené ze dvou izoprenových jednotek. Jsou uvolňované rostlinami destilací vodní páry a jsou hojně využívány ve farmaceutickém průmyslu. Vyskytují se v rostlinách, houbách i bakteriích. V rostlinách se nejčastěji vyskytují ve žláznatých trichomech (byliny), v buněčných stěnách, ve vakuolách či v pryskyřičných kanálcích u jehličnatých dřevin, dokonce se vyskytují i v mezibuněčných prostorech (například v citrusu monoterpen limonen). Monoterpeny jsou látky značně nestálé a vyznačují se vůní (Dvořáková et al., 2011; McMurry, 2004). Mezi monoterpeny patří například vonné silice, řadíme sem například (R)- karvon (keton), který bychom našli v mátě peprné, dále pačulový alkohol (složka pačulového oleje) z pačuli obecné nebo  $\alpha$ -pinen jakožto součást terpentýnového oleje získávaného z borovic (McMurry, 2004).

Zvláštní skupinou jsou potom esenciální oleje, které jsou tvořené jak monoterpeny, tak i diterpeny či seskviterpeny. Jsou uvolňovány do ovzduší skrze průduchy a kutikulu a spolu s nimi i izopren, který produkuje spousta dřevin (duby, eukalypty). Avšak izopren svou těkavostí je řazen mezi tzv. těkavé organické látky (VOC). Jeho sloučeniny s oxidem dusíku a slunečním zářením vytváří škodlivé látky (Tomášková & Kubásek, 2017).

### 3.2.1.2 Diterpeny-gibereliny, ABA

Diterpeny jsou složeny z celkem čtyř základních izoprenových jednotek. Vyznačují se tím, že jsou základem pro většinu signálních molekul v rostlinách, tedy pro fytohormony. Mezi významné diterpeny a zároveň fytohormony v rostlinách se zahrnují kyselina abscisová a gybereliny. Gybereliny (Obrázek 10) stimuluji prodlužovací růst nadzemní části rostlin, kromě toho indukují kvetení u dlouhodobých rostlin s růžicovitým typem růstu a jsou regulátory klíčení semen. Praktického využití giberelinů se využívá v aplikaci postřiku spolu s obsahem giberelinů na ovocné stromy či vinnou révu, kdy tento postřik vyvolá větší nasazení plodů a větší bobule vína. U jehličnanů, zejména borovice, se

využívá giberelinů ke zkrácení jejich juvenilního období (Luštinec & Žárský, 2005). Kyselina abscisová (ABA) je zároveň seskviterpenem. Nejhojněji je zastoupena v pupenech, hlízách či semenech, někdy i v kořenových špičkách. ABA na rozdíl od giberelinů snižuje růstovou rychlost, působí tedy jako její antagonist. Naopak stimuluje rychlost opadu, urychluje stárnutí rostliny a reguluje dormanci (Mareček & Honza, 2000; Procházka et al., 1998; Seidlová et al., 2008). Mimo to je velice podstatným fytohormonem ve snižování citlivosti vůči nedostatku vody, ovlivňuje uzavírání průduchů-díky tomu rostliny přežívají i za nepříznivých podmínek. V období dozrávání semen snižují množství vody v nich, jelikož semena musí přežít nepříznivé období pro růst poměrně suchá. Také větší množství kyseliny zamezuje jejich předčasnému klíčení (Seidlová et al., 2008). ABA je produkována kořeny a přepravována xylémem do nadzemních částí rostliny. Mezi další její signální funkce spadá regulace exprese některých genů (Xiong et al., 2003).



Obrázek 10 - Jeden z giberelinů: Giberelin A1, zdroj: (Taiz & Zeiger, 2002)

### 3.2.1.3 Triterpeny-brassinosteroidy

Triterpeny se skládají z celkem šesti izoprenových jednotek. Významnou skupinou triterpenů jsou steroidy. Vyznačují se mnoha funkcemi-podílí se na tvorbě hormonů, některé mohou být toxickými látkami a další (Mareček & Honza, 2000). Nejznámější skupinou steroidů rostlin jsou brassinosteroidy (BR). Nejsou řazeny mezi fytohormony z různých důvodů, jako je například jejich vyšší koncentrace v organismu, než jakou mají obvykle fytohormony. BR jsou steroidy s regulačními účinky, především výrazně stimulují dlouhivý růst, ale také oddalují opad listů, působí na klíčení semen nebo se podílí na diferenciaci xylémových částí. Dále účinkují na dělení a růst buněk. Díky nim jsou rostliny odolnější vůči stresovým faktorům, jakými jsou sucho či mrazy. Vyskytují se ve všech

orgánech rostliny vyjma kořenů, nejhojněji jsou potom zastoupeny v reprodukčních orgánech. Nejčastějšími brassinosteroidy v rostlinách jsou brassinolid, typhasterol nebo castasteron (Procházka et al., 1998; Seidlová et al., 2008).

#### **3.2.1.4 Tetraterpeny**

Tetraterpeny se vyznačují tím, že obsahují celkem osm izoprenových jednotek. Do této skupiny spadají rostlinná přírodní barviva-karotenoidy. Nejčastěji jsou u rostlin viditelné na podzim, jelikož rostliny v tuto dobu odstraňují zeleně zbarvený chlorofyl z listů a dávají tím tak prostor pro barevné karotenoidy. Typickým příkladem karotenoidů je  $\alpha$  a  $\beta$ -karoten, které jsou složkou potravin (především mrkve) a zdrojem vitamínu A. Dalším je například žlutý lutein a červený rhodoxanthin (Mareček & Honza, 2000; McMurry, 2004).

#### **3.2.1.5 Polyterpen kaučuk**

Z polyterpenů tu potom zmíním dobře známý kaučuk, který se získává ze dřeviny kaučukovníku, respektive z vytékajícího roztoku-latexu. Po úpravě získáme přírodní kaučuk. Rostliny jej produkují jako ochranu proti herbivorům (Tomášková & Kubásek, 2017).

### **3.2.2 Alkaloidy**

Alkaloidy se označují za nejhojnější skupinu mezi sekundárními metabolity. Lze je najít výhradně v rostlinách, u živočichů nejsou tak časté (našli bychom je u hmyzu, mikroorganismů či u mořských živočichů). Do dneška již bylo extrahováno přes šest tisíc těchto látek. Jsou obsaženy především ve kvetoucích rostlinách, třeba v máku, ale i tabáku nebo bramborách. Jejich molekuly čítají jeden a více atomů dusíku a jsou to heterocykly zásadité povahy. Přesný význam pro rostliny či živočichy není specifikován, avšak předpokládá se, že jej organismus využívá na obranu. Většina alkaloidů ovlivňuje centrální nervovou soustavu živočichů. Některé jsou toxické, mají narkotické účinky a způsobují závislosti. Lidmi jsou využívány pro výrobu léčiv, v negativním smyslu je lidé konzumují jako drogy (Mareček & Honza, 2000; Walsh, 2003).

Co se týká jejich výskytu u dřevin, z nahosemenných je produkuje jen *Taxus baccata* (tis červený), který obsahuje taxin nebo *Ephedra sinica* (chvojník čínský) obsahující alkaloid efedrin. U krytosemenných je potom typickým zástupcem skupina *Berberidaceae* (Tomášková & Kubásek, 2017). Paclitaxel, neboli taxol, je velmi významný alkaloid produkovaný tisem z hlediska využití lidmi. Poprvé byl izolován z kůry tichomořské dřeviny *Taxus brevifolia* a napomáhá lidem například v boji proti karcinomu prsu (Walsh, 2003).

### 3.2.2.1 Alkaloidy a jejich využití

Jedním z toxických alkaloidů je atropin. Je získáván z bobulí rostliny *Atropa belladonna* (rulík zlomocný) nebo z listů a kořenů rostliny *Hyoscyamus muticus* a z dalších lilkovitých rostlin. Byly u něj zjištěny protikřečové účinky, ve farmacii je proto využíván pro výrobu léčiv na zánět tlustého střeva nebo se využívá v očním lékařství (rozšiřuje zornice) (Mareček & Honza, 2000; McMurry, 2004; Walsh, 2003). Pro své halucinogenní účinky se řadí mezi drogy.

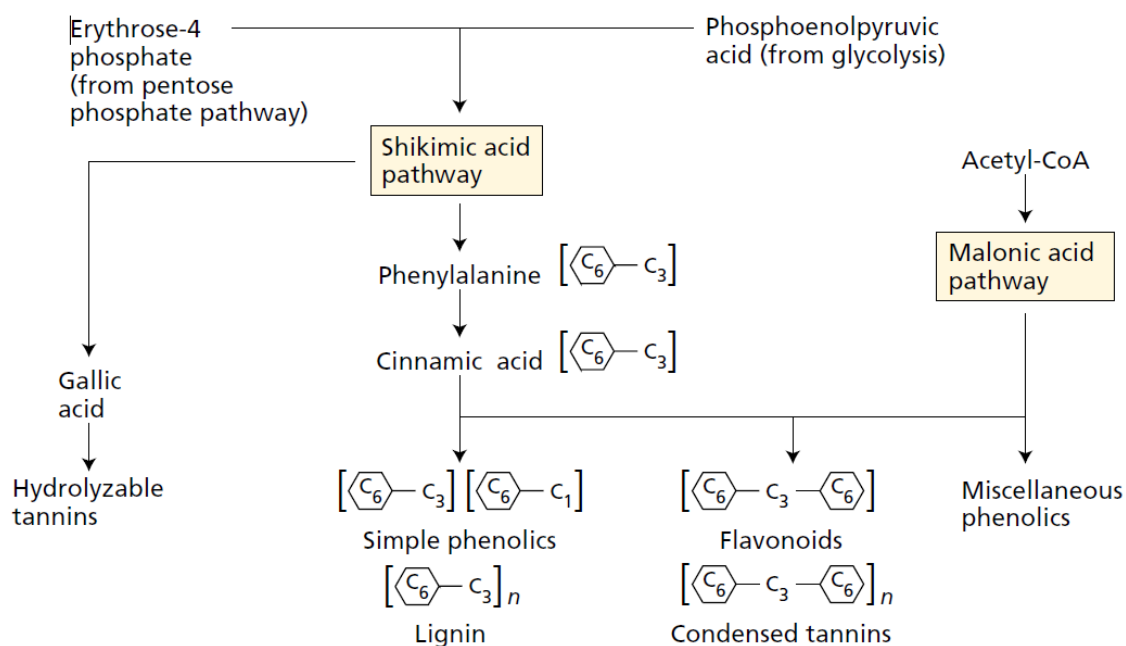
Další známou a hojně užívanou návykovou látkou po celém světě je kofein jakožto složka kávových zrn nebo čajových lístků. Kofein při správných dávkách tlumí únavu, podporuje činnost srdce a ledvin, avšak ve vysokých dávkách naopak zapřičiňuje únavu, nervozitu, nepříjemné bušení srdce a pocení. Druhou světově velmi užívanou látkou je nikotin, jehož zdrojem jsou listy tabáku. Ze synteticky vyráběných alkaloidů je nejznámější morfin nebo kodein, které mají základ v opiu získávaného z *Papaver somniferum* (mák setý). V lékařství jsou využívány jako analgetika či anestetika, avšak bývají zneužívány jako droga. Kokain, další z návykových drog, je přírodního původu a získává se z lisů rostliny *Erythoxylum coca* (rudořev koka). Je přísadou některých nealkoholických nápojů a dříve se využíval jako odvykací látka při léčbě závislosti (Mareček & Honza, 2000; McMurry, 2004; Walsh, 2003).

Zajímavou skupinou jsou alkaloidy produkované námelovými parazitickými houbami. Nejznámější skupinou jsou houby rodu *Claviceps*, která vytváří námely na klasech obilnin, zejména žita. Z nich je syntetizován např. alkaloid ergometrin, který se využívá v gynekologii pro stimulaci kontrakcí dělohy nebo lysergová kyselina, ze které se vyrábí droga LSD. Ještě tu zmíním alkaloid chinin získávaný z kůry dřeviny *Cinchona officinalis* (chinovník lékařský), používaný jako lék na malárii (Walsh, 2003).

### 3.2.3 Fenolické látky

Poslední velkou skupinou látek sekundárního metabolismu jsou fenolické látky. Jedná se o velmi bohatou a heterogenní skupinu metabolitů syntetizovanou ze šikimátové nebo malonové metabolické dráhy (Obrázek 11). Jsou to aromatické sloučeniny s minimálně jednou skupinou -OH. Mají široké spektrum fyziologických funkcí. Fungují jako impregnace buněčných stěn rostlin, jako stavební materiál zajišťující rostlinám pevnost, chrání organismy před UV-zářením, jejich aroma láká hmyz a v neposlední řadě vykonávají funkci signální látky. Mezi fenolické látky patří spousta skupin látek, některé jsou odvozeny od derivátů benzenu, skořicové kyseliny, jiné se nazývají flavonoidy či antokyany nebo kumariny. To byly ty jednodušší látky, mezi ty složitější potom patří třísloviny nebo lignin (Luštinec & Žárský, 2005; Procházka et al., 1998; Taiz & Zeiger, 2002). V rostlinách jsou skladovány ve vakuolách a nachází se v nich ve značných koncentracích. Fenolické látky jsou syntetizovány z fenylalaninu, který je díky enzymu fenylalaninamoniaklyáza (PAL) transformován až na skořicovou kyselinu, do níž vstupují např. hydroxylové skupiny. Vzniklé látky jsou dále polymerizovány a vzniká lignin, dále třeba kumariny či flavonoidy (Hahlbrock & Scheel, 1989). Bylo zjištěno, že se fenolické látky podílí na reakci infekce rostlin půdními bakteriemi, které napadají pouze některé dvouděložné rostliny. Rostliny reagují produkcí např. syringonu, který zmobilizuje genom bakterie a v místě poškození tyto bakterie potom vpraví infekci do rostlinné T-DNA. Jednoděložné rostliny nereagují na poškození syntézou fenolickými látkami, a tak jsou vůči těmto půdním bakteriím rezistentní. Dále fenolické látky, především deriváty kyseliny skořicové, zpomalují dlouhivý růst. Důvodem je, že tyto deriváty jsou výchozími látkami pro stavbu ligninu, který také znemožňuje dlouhivý růst (Procházka et al., 1998).

Dráha kyseliny šikimátové přetváří výchozí jednoduché sacharidy vzniklé glykolýzou na aromatické aminokyseliny. Na principu blokování této dráhy funguje přípravek Roundup, který hubí plevel, avšak některé rostliny se již umí bránit zvýšenou koncentrací flavonoidy díky glutathion-S-transferáze. Vznik fenolických látek právě touto dráhou je vlastní bakteriím, houbám a rostlinám, avšak ne živočichům (Cummins et al., 2013; Taiz & Zeiger, 2002).



Obrázek 11 - Dráha vzniku některých fenolických látek šikimátovou a malonovou cestou, např. tříslovin, zdroj: (Taiz & Zeiger, 2002)

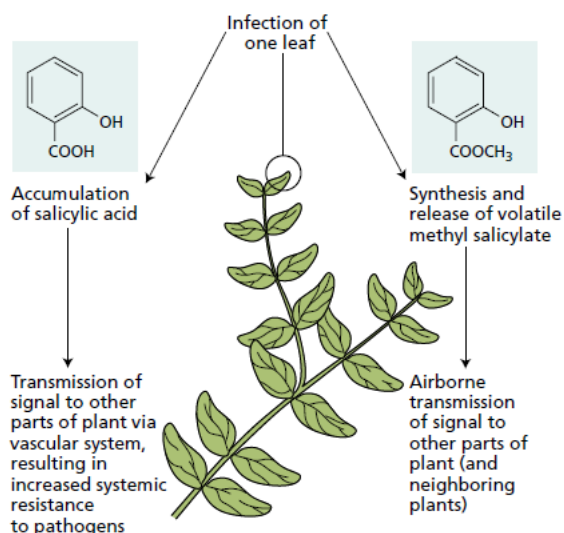
### 3.2.3.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou polyfenoly tvořené patnácti uhlíky a jsou produkovány všemi cévnatými rostlinami. Dnes již známe přes čtyři tisíce těchto látek, z nichž některé mají zdravotně pozitivní účinky, například protivirové, a tak jsou využívány ve farmaceutickém průmyslu (Walsh, 2003). Mezi flavonoidy bychom našli širokou škálu nejrůznějších pigmentů, z nich pak nejrozšířenější skupinu antokyanů, dále pak flavonoly nebo flavony. Antokyaniny zahrnují barvy od červené až po různé odstíny modré, fungují tak dobře jako atraktanty pro opylovače, zbarvují například květy rostlin a chrání rostliny před UV zářením. Také slouží rostlinám na obranu před různými patogeny (Taiz & Zeiger, 2002).

### 3.2.3.2 Kyselina salyciová

Velice významným sekundárním metabolitem, respektive fenolickou látkou, je kyselina salyciová získávaná z kůry vrby a využívána pro lékařské účely, především v dermatologii. Největší množství kyseliny salyciové (SA) bylo naměřeno u rostlin napadených smrtelnými patogeny a u termogenních rostlin (při kvetení vytváří teplo). Právě u těchto rostlin funguje SA jako kalorigen, tedy látka zpomalující aerobní fosforylaci a způsobující procentuální růst dýchání odolného proti kyanidu, zapříčínující právě nárůst

teploty. Pokud je rostlina napadena nebezpečným patogenem, SA funguje jako endogenní signální látka, která nese v rostlině informaci o napadení a podnítl tak změnu nutnou k ochraně rostliny proti patogenu (Obrázek 12) (Procházka et al., 1998).



Obrázek 12 - Napadení rostliny patogenem a dráha šíření signálu o aktivizaci rezistence, zdroj: (Taiz & Zeiger, 2002)

### 3.2.3.3 Lignin

Ze složitějších látek bych tu uvedla lignin, jakožto spolu s celulózou nejhojněji zastoupenou látku v rostlinách, konkrétně v buněčných stěnách. Přesný význam ligninu zatím nelze s určitostí identifikovat-je kovalentně vázán na celulózu a další polysacharidy, a tak je obtížné ho extrahovat. Lignin patří do skupiny fenylypropanoidů. Skládá se z celkem tří fenylypropanoidních alkoholů, a to z koniferylu, kumarylu a sinapyly, syntetizovaných z fenylyalaninu a pojící se ve větvený polymer. Lignin je obsažen ve vodivých a podpůrných tkání-v cévních prvcích xylému a v tracheidách. Nejčastěji se vyskytuje v sekundární buněčné stěně, ale najdeme ho spolu s celulózou a hemicelulózou i ve střední lamelle nebo primární buněčné stěně. V rostlinách zastává funkci mechanické podpora (zpevňuje buněčné stěny cév), izolační a také částečně ochrannou (pro býložravce je hůře stravitelný). Lignifikace se spustí obvykle jako reakce na poškození patogeny či na infekci (Taiz & Zeiger, 2002).



### 3.2.3.4 Třísloviny

Poslední skupinu, kterou tu zmíním z fenolických látek, jsou třísloviny (jinak také taniny). Opět jsou to polymery, které se dají rozdělit do dvou skupin-hydrolizovatelné a kondenzované. Hydrolizovatelné třísloviny jsou heterogenní polymery kyseliny gallové a jednoduchých cukrů. Mají menší molekuly než kondenzované třísloviny a snáze se hydrolyzují. Jsou součástí dřeva či kůry. Kondenzované třísloviny jsou formovány polymerizací flavonoidními jednotkami a jsou například obsaženy ve vinné révě. Většina tříslovin je toxických, mají trpkou chuť. Rostliny je produkují na svou obranu proti různým patogenům a býložravcům, jelikož pro ně jsou taniny hůře stravitelné a ztěžují jejich trávení. Zajímavé však je, že i v našem jídelníčku se objevují potraviny s jistým obsahem tříslovin, např. jablka, ostružiny a v neposlední řadě červené víno (Taiz & Zeiger, 2002). Avšak právě červené víno je lidskému tělu prospěšné. Studie ukázaly, že mírná konzumace červeného vína díky obsahu tříslovin zamezuje zúžování cév a onemocnění srdce (Corder et al., 2001).

### 3.3 Látky se signální a regulační funkcí

Každá rostlina reaguje na určité stimuly-signály, které přichází jak z vnějšího, tak z jejího vnitřního prostředí. Tyto signály přijímá pomocí různých receptorů, které je přenáší po celé rostlině v dráhách. Mezi stimulanty se signální funkcí patří světlo, patogeny, cukry, samozřejmě fytohormony, jiná forma rozložení mechanických tlaků, gradienty iontů, ale i řada dalších vnějších faktorů. To, jakým způsobem bude rostlina na signály reagovat, záleží na prostředí, ve kterém se nachází, na biorytmu nebo v jakém stádiu vývoje se nachází. Signály obvykle vedou až k expresi genu v dané buňce, kam látky míří.

Reakce, které jsou transportovány od místa vzniku až k místu účinku (do buňky), se šíří po rostlině v signálních drahách. Tyto dráhy existují buď samostatně, nebo jsou propojeny s jinými drahami ve větší signální síť. Ke kontaktu drah dochází v místech zvané uzlové body, kde spolu dráhy mohou komunikovat.

Hlavními rostlinnými receptory, které se obvykle nachází přímo v cytoplasmě nebo na membráně buňky, sloužící k přenosu signálu=ligandu, jsou bílkovinné komplexy či přímo samotné bílkoviny, kterým se říká sensory. Příkladem mohou být proteinkinasové receptory (RLK). Na koncentraci jednotlivých receptorů v buňkách závisí vnímavost buněk vůči stimulům. K rozdílům koncentrace receptorů v pletivech a orgánech dochází během diferenciaci buněk a pletiv, díky tomu reagují na signály velmi rozdílně (Luštinec & Žárský, 2005).

#### 3.3.1 Fytohormony

Poslední roky jsou velmi studovanou skupinou látek rostlinné hormony, tzv. fytohormony neboli růstové regulátory. Jedná se o nízkomolekulární organické sloučeniny. Jeden fytohormon je obvykle zodpovědný nebo alespoň ovlivňuje i několik procesů v rostlině, které spolu nemusí rovnou souviset. Fytohormony zahrnují celkově pět velkých skupin látek: jsou to gibereliny a kyselina abscisová, cytokininy, auxiny a etylen. Mimo ně máme ještě skupiny látek s regulační a signální funkcí, které mezi hormony nepatří, jelikož se v rostlinách nachází ve větším množství, než je u hormonů obvyklé, jsou to brassinosteroidy, polyaminy, kyselina jasmonová, fenolické látky nebo oligosachariny (Luštinec & Žárský, 2005; Procházka et al., 1998). Fytohormony ovlivňují a regulují procesy růstu a vývoje rostlin, fungují jako signální látky-tedy přenáší signály z vnějšího

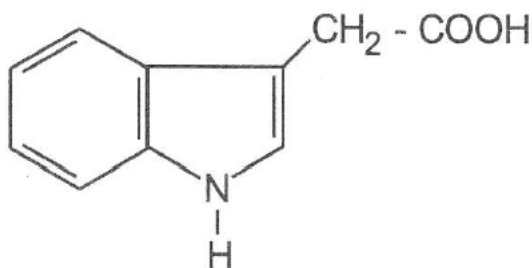
prostředí, jako obrana proti patogenům a poslední výzkumy ukazují, kolik dalších procesů v rostlinném těle usměrňují (Luštinec & Žárský, 2005). Funkci signálních a regulačních látek zastávají také strigolaktony jakožto nejmladší skupina fytohormonů, disacharid trehalóza nebo butenolid, kterým se v dalších kapitolách také budu věnovat.

Rostlinám na rozdíl od živočichů nejsou žlázy s vnitřní sekrecí, které by hormony tvořily, vlastní, a tak si hormony musí syntetizovat v různých částech těla. Než hormony dosáhnou svého působení, vždy se nejdříve musí navázat na bílkovinné receptory, které je dopraví na místo účinku. První variantou může být navázání na receptor na buněčné membráně a signál se do buňky přenáší pomocí tzv. druhých posílů, mezi které patří například vápenaté nebo vodíkové ionty. Druhou variantou může být přímý vnik hormonu do buňky, kde se naváže na rozpustný receptor v cytoplazmě a dále se dostane až do jádra buňky, kde způsobí reakci v expresi genu. Fytohormony se šíří na větší vzdálenosti jak xylémem, tak floémem. K syntéze fytohormonů dochází v pletivech různých orgánů a často je produkce vyvolána faktory z vnějšího prostředí (Luštinec & Žárský, 2005; Procházka et al., 1998).

### **3.3.1.1 Auxiny**

Auxiny tu zmíním jako naprosto základní a první objevené rostlinné hormony. K jejich objevu došlo při zkoumání tropismů. Prvním objeveným auxinem byla přirozeně se vyskytující kyselina indolyl-3-octová (IAA) (Obrázek 13). Nejprve byla objevena v lidské moči, poté i v některých kvasinkách a až postupem času ve vyšších rostlinách, bakteriích i houbách a řasách. Jako další přirozený auxin tu uvedu kyselinu fenyloctovou (PAA). Je obsažena ve všech rostlinách, nejhojněji je potom zastoupena v plodech ovocných dřevin. Kromě přirozeně se vyskytujících auxinů známe i syntetické auxiny, avšak jsou to jen slabé organické kyseliny. Z chemického hlediska jsou řazeny mezi aromatické sloučeniny (Procházka et al., 1998). K syntéze auxinů dochází ve vrcholkových pletivech stonku a v juvenilních listech, odkud jsou dále přenášeny do dalších částí rostliny. Auxiny se účastní velkého počtu procesů v rostlině, mezi ty hlavní patří například ovlivňování růstu a dělení buněk, diferenciací vodivých pletiv a tím usnadnění průchodu fytohormonů pletivy. Na koncentraci auxinu v kořenech závisí jejich větvení a tvorba postranních kořenů. Naopak nižší koncentraci auxinu využívají stonky a v daném místě dochází k jejich větvení. Auxiny se zaslouhují především o udržování

polarity rostlin (tropismy) (Seidlová et al., 2008). Auxiny působí spolu s cytokininy při dělení a diferenciaci buněk a při dlouhivém růstu (Luštinec & Žárský, 2005).

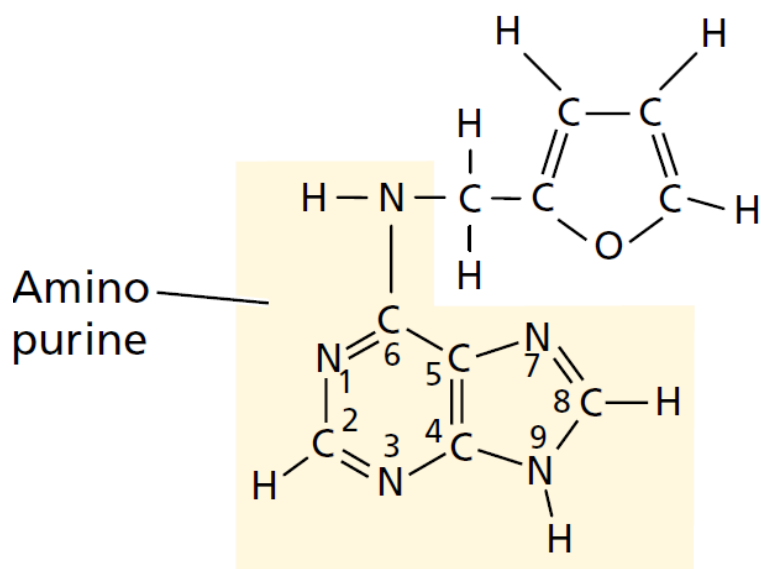


Obrázek 13 - Kyselina indol-3-octová, zdroj: (Luštinec & Žárský, 2005)

### 3.3.1.2 Cytokininy

Cytokininy jsou přírodní látky, konkrétně deriváty adeninu. Zdrojem a místem jejich syntézy jsou kořeny, z nichž jsou transportovány dále do rostliny. Jejich hlavní funkcí je inhibování tvorby a růstu pupenů, dále stimulují dělení buněk (za přítomnosti auxinu) a proteosyntézu, odkládají odbourávání proteinů, což vede ke zpomalení stárnutí rostliny (Seidlová et al., 2008). Mimo to jsou zodpovědné za regeneraci orgánů rostliny. Pracují jako antagonisté auxinu, tedy zamezují apikální dominanci, naopak podporují větvení stonků a tvorbu pupenů. Také stimulují vyšší metabolickou činnost pletiv, dále podněcují diferenciaci plastidů, vznik chlorofylu a zvyšují odolnost vůči nepříznivým vlivům prostředí. Dnes známe již více jak třicet přirozeně se vyskytujících cytokininů, z nichž prvním objeveným přirozeně se vyskytujícím cytokininem byl zeatin (Letham, 1973; Procházka et al., 1998).

Cytokininy se v rostlinách vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Můžeme je rozdělit dle substituentů postranního řetězce na izoprenoidní a aromatické. Chemickým základem pro stavbu cytokininů jsou N6-substituované adeniny. Izoprenoidní cytokininy byly doposud více zkoumané, avšak nedávno byly zjištěny zajímavé účinky také těch aromatických. Izoprenoidní cytokininy jsou odvozeny od bázi N6-( $\Delta^2$ -izopentenyl) adenin (iP), dihydrozeatin (DHZ) a zeatin (Z). Naproti tomu mezi aromatické cytokininy řadíme 6-benzylaminopurin (BAP), orto-, meta- a para-topolin nebo jejich metabolity. Mezi aromatické cytokininy patří také známý, prvně objevený cytokinin vůbec-kinetin (Obrázek 14) (Doležal & Strnad, 2017).



## Kinetin

Obrázek 14 - Kinetin, první objevený cytokinin, zdroj: (Taiz & Zeiger, 2002)

Dlouhou dobu se nedařilo izolovat aromatické cytokininy vzhledem k jejich nízké koncentraci v rostlinách, ale také kvůli kolísavému vlivu okolního prostředí. Prvním vůbec izolovaným aromatickým cytokininem byl 6-(2-hydroxybenzylamino)-9-β-D-ribofuranosylpurin, který se podařilo izolovat z listů topolu *Populus x robusta* a to před více jak čtyřiceti lety. V 90. letech se však podařilo v Ústavu experimentální botaniky Československé akademie věd vědeckým pracovníkům objevit v rostlinných extraktech vyjma BAP také jeho hydroxyderiváty, kterým se přiřadil název topoliny dle dřeviny (topol), ze které byly izolovány. Mezi hlavní zástupce aromatických cytokininů této skupiny patří meta-topolin (meta-hydroxybenzyladenin). Předpokládá se, že význam a funkce aromatických cytokininů je odlišná oproti činnostem izoprenooidním cytokininům, avšak přesný význam zatím ještě není zcela objasněn. Mezi funkce topolinů, které jsou již potvrzené, patří větší stabilita, rezistence proti degradačním enzymům a jsou aktivnější i při velmi nízkých koncentracích. Dalším jejich velkým přínosem je také to, že nezpomalují růst kořene, což například BAP při větší hustotě způsobuje.

Cytokininy mají velký potenciál ve využití v kosmetickém průmyslu, v zemědělství i v oblasti medicíny a rozvoje léčiv proti závažným onemocněním, jako jsou nádorová onemocnění (Doležal & Strnad, 2017).

### 3.3.1.3 Strigolaktony

Strigolaktony jsou nejmladší skupinou rostlinných hormonů. Spolu s butenolidy jsou posledních asi deset let zkoumány jako nově objevené regulátory růstu rostlin (Morffy et al., 2016). Stejně jako již dobře známé rostlinné hormony zajišťují komunikaci mezi rostlinami a vnějším prostředím. Doposud byly objeveny ve všech zkoumaných suchozemských rostlinách. Mezi jejich hlavní funkce patří regulace růstu rostlin, klíčení semen a nově objevený vliv na větvení kořenů a výhonků. Dříve se jim přisuzovala pouze role signálních molekul v symbióze rostlin s parazitickými plevely nebo mykorhizními houbami. Kromě kořenové skladby ovlivňují i tvar a senescenci listů nebo růst kambia (Morffy et al., 2016). Strigolaktony jsou biologicky podobné karotenoidům, jedná se o seskviterpeny patřící do skupiny laktonů. Jsou syntetizovány v poměrně nízkých koncentracích v kořenech rostlin, odkud jsou dále zčásti transportovány do rhizosféry (Dvořáková & Vaněk, 2015; Seidlová, 2008). Strigolaktony kooperují také s dalšími rostlinnými fytohormony, jako jsou auxiny, gibbereliny nebo ABA (Foo & Reid, 2013). Strigolaktony mají schopnost dělit buňky, rozdělovat živiny v rámci rostliny a měnit umístění auxinu, proto jim je přisuzována škatulka fytohormonů. Nedávno se také zjistily další funkce strigolaktonů, mezi nimi například podpora růstu stonku či kořenových vlásečnic, růst nových výhonků či kambia. Dle toho, v jakém prostředí se rostlina nachází, v takové míře produkuje strigolaktony a zajišťuje si optimální růst a vývoj (Foo & Reid, 2013). Rostlina také reaguje zvýšenou produkcí strigolaktonů za nedostatku fosforu v půdě. Za následek to může mít schopnost přizpůsobení růstu kořenů rostlin i ve zhoršených nutričních podmínkách. S tím také souvisí zvýšení produkce strigolaktonů se záměrem získat více fosforu z okolního prostředí díky lepší kooperaci s mykorhizními houbami (Yoneyama et al., 2012). Rostliny jsou schopny produkovat stovky různých stereoizomerů strigolaktonů, avšak vědcům se podařilo prozatím izolovat jen ty, které rostliny vytváří ve velkém množství (Zwanenburg et al., 2009). V kořenových exudátech bychom našli kombinaci různých strigolaktonů a v různém poměru. Avšak k izolaci strigolaktonů z kořenů rostlin je třeba až stovky jedinců vzhledem k menším koncentracím (Xie et al., 2013).

### 3.3.2 Butenolidy

Butenolidy patří mezi látky s regulační funkcí růstu. Jsou považovány za hlavní aktivní látky izolované z kouře a popela při požárech rostlin, vznikající při spalování rostlinného materiálu. Výzkumy potvrdily, že mají velký význam z hlediska stimulace klíčení semen a růst sazenic některých rostlin a komerčních plodin po rozsáhlých požárech (Calder et al., 2010; Nelson et al., 2012). Jedná se o látky ze skupiny laktonů (cyklické karboxylové estery) (Carey & Giuliano, 2011) s heterocyklickou strukturou, někdy se setkáváme s označením oxidované deriváty furanu (Joule & Mills, 2000). Skládají se z molekul kyslíku, vodíku a uhlíku. Nejjednodušší butenolid je 2-furanon, pojmenován jednoduše butenolid, jakožto první ze skupiny butenolidů, u kterého se prokázala nejvýraznější stimulace klíčení semen po požárech (Flematti et al., 2004). Je obsažen v některých přírodních produktech, například v kyselině askorbové (Joule & Mills, 2000). Butenolid má podobnou strukturu jako strigolaktony, které také fungují jako stimulanty klíčení u kořenových parazitických rostlin (Daws et al., 2008). Butenolid je dnes znám spíše pod názvem karrikin 1 (KAR1). Postupem času byly z kouře izolovány další deriváty butenolidu s označením karrikiny (tento název má původ ve slově „karrik“=kouř z australského domorodého jazyka Noongar) (Flematti et al., 2009). Řada butenolidů dodnes čítá šest objevených karrikinů, izolovaných právě z kouře s označením KAR 1-KAR 6, z nichž KAR 1-4 jsou těmi aktivnějšími (Nelson et al., 2012). Rozdíly mezi jednotlivými karrikiny jsou v počtu a umístění methylové skupiny (Flematti et al., 2009). Karrikiny jsou produkovány rostlinami při vysokých teplotách, tedy právě při požárech (Flematti et al., 2004). Vznikají spalováním sacharidů rostlin včetně celulózy (Flematti et al., 2011). Samotné karrikiny se přirozeně v rostlinách nevyskytují, pouze některé látky jim podobné (Gutjahr et al., 2015). Výzkumy také ukazují, že karrikiny jsou při vysokých teplotách nestálé (Scaffidi et al., 2012), tudíž vznikají v méně intenzivních a vysokými teplotami ovlivňovaných místech, poté se vypařují a kondenzují a nakonec jsou vázány do půdy. Avšak přesný mechanismus působení butenolidů na stimulaci klíčení semen dosud není znám (Daws et al., 2008; Flematti et al., 2015). Karrikiny jsou přenášeny kouřem na krátké vzdálenosti, v blízkosti vzniku požáru (Nelson et al., 2012).

### 3.3.2.1 Karrikiny a princip klíčení semen

Po uhašeném požáru lesa, louky nebo pole zůstane na tomto místě popel. Právě v popelu jsou uloženy karrikiny. Postupem času vlivem vnějších podmínek, jako je například déšť, se popel spolu s karrikiny vmísí do půdy, kde se nachází uskladněná semena rostlin v dormantním stádiu. Díky rozpuštěným karrikinům a vodě začnou některá semena reagovat a klíčit. Takto vzniklé rostliny poměrně rychle vyrostou a samy plodí, odumírají však také brzy (i po 2 letech). Spadaná semena se opět uloží v půdě, kde mohou přežít i několik desítek let. Po dalším vzniklém požáru se opět uvolní karrikiny a proces se opakuje. Některé druhy rostlin tohoto procesu využívají, jelikož požár zlikviduje jejich konkurenty a tím se jim dostává více světla a živin. Tyto rostliny už mají semena poté adaptována tak, že přečkají v půdě až do dalšího vzniklého požáru, dokud u nich karrikiny opět nevyvolají klíčení. Rostliny využívající této životní strategie se označují jako „fire ephemers“ (Flematti et al., 2015; Nelson et al., 2012).

Je zajímavé, že podobných účinků u semen dosahuje také voda, která přišla do styku s kouřem a kontaminovala se právě částicemi v kouři-karrikiny, nazývána „smoke-water“ (kouřová voda) (De Lange & Boucher, 1990). U některých druhů rostlin semena akceptují kouř jako signál příznivých podmínek pro klíčení. Dodnes není přesně známo, jakým způsobem semena butenolid vnímají, ale jsou již důkazy o tom, že v rostlinách spouští mechanismus, který usnadňuje příjem vody (Calder et al., 2010; Jain et al., 2008).

### 3.3.2.2 Další využití karrikinů

Karrikiny mimo stimulaci klíčení semen pravděpodobně přispívají i vývoji listů a zlepšují přežití rostliny, mohly by tedy být využity jako stimulatory růstu rostlin (van Staden et al., 2006). Interagují spolu s rostlinnými fytohormony, jako jsou ABA, GA nebo IAA. Zajímavé je, že u různých druhů rostlin mohou regulovat klíčení semen rozdílně. Karrikiny mají také velký vliv na zmírňování vyhýbání se rostlin stínu, právě při těchto procesech působí společně s auxiny (Meng et al., 2016). Funkce karrikinů by se mohly využít například v zemědělství, jelikož na karrikiny reagují i některé zemědělské plodiny jako jsou rajčata, saláty nebo kukuřice (Stevens et al., 2007). Karrikiny jsou také schopny oddalovat klíčení sójových semen díky regulaci GA a ABA, a to za stinných podmínek (Daws et al., 2007).



### 3.3.2.3 Butenolid a jeho vliv na klíčení a vývoj semen

Lesní požáry hrají klíčovou roli v aktivaci klíčení semen některých druhů dřevin, jakým je například rod *Acacia*. Dle několika studií zvýšily semeniště rodu *Acacia* svou četnost po rozsáhlých požárech, avšak nebyla jasná příčina. Spekulovalo se o tom, že by příčinou mohla být vysoká teplota či jiné fyzikální účinky. Avšak tato domněnka se později vyvrátila díky izolování butenolidu z kouře v místech požárů a zjištění, že butenolid stimuluje klíčení semen. Studie se účastnily druhy *A. hebeclada* (keř), *A. mearnsii* (invazivní strom původem z Austrálie) a *A. robusta* (strom). Semena těchto druhů byla za laboratorních podmínek ošetřena roztokem butenolidu. Pokus proběhl po dobu 10 dnů a při teplotě  $\pm 25^{\circ}\text{C}$ . U všech tří druhů se prokázaly příznivé účinky aplikace butenolidu na semena, tedy došlo ke zlepšení klíčivosti a to jak za světelně příznivých podmínek, tak i méně příznivých. Studie tak ukazuje, že butenolid má velice významný příznivý vliv na ekologii sazenic rodu *Acacia* v oblastech zasažených požáry (Kulkarni et al., 2007).

Je dokázáno, že karrikiny ovlivňují klíčivost semen různých plevelů, zemědělských plodin, ale také především stromů a keřů.

Jedna velice zajímavá studie z USA se zabývala vlivem působení kouře po požárech na vývoj listů a jehličí u některých druhů dřevin a na intenzitu fotosyntézy a s tím spojenou produkci metabolitů. Ve Spojených státech mají posledních několik let vlivem klimatických změn časté lesní požáry, kouř může v ovzduší přetrvávat i několik týdnů (Sandberg et al., 2009) a tím ovlivňovat okolí a působit změny životního prostředí, některé rostliny ho vnímají jako katalyzátor adaptace na prostředí a přizpůsobí metabolické a růstové reakce. V kouři vědci objevili již přes sto různých sloučenin, mezi nimi i butenolid, který spolu s dalšími sloučeninami se nepodílí jen na klíčení, ale i na onen vývoj asimilačních orgánů. Avšak předpokládá se, že kouř způsobuje zpomalení fotosyntetické reakce a změnu alokace růstových sloučenin rostliny. Zkoumanými druhy dřevin byly *Populus tremuloides*, *Acer glabrum* a *Quercus gambelii* jakožto zástupci listnatých dřevin a dále jehličnaté dřeviny *Pinus ponderosa*, *Pseudotsuga menziesii* a *Picea pungens*. Vybrané druhy dřevin byly zvoleny s ohledem na jejich vysokou odolnost vůči požárům a pro schopnost regenerace. Listnaté dřeviny, tedy topol, javor a dub reagují na požár tím, že během nepříznivých podmínek využívají k respiraci kořenové přísavky (Lentile et al., 2007). Na rozdíl od nich jehličnaté dřeviny, například douglaska, mají na obranu poměrně silnou kůru (Kimmins, 2004). Všechny experimentální dřeviny jsou původními druhy ve

Skalistých horách na západě USA. Až na topol získaný z volně rostoucí mateřské dřeviny pocházely všechny dřeviny z lesní školky, přes léto byly semenáčky pravidelně zalévány a hnojeny.

Na jaře 2008 bylo pět semenáčků každého druhu dřeviny vystaveno po dobu dvaceti minut kouři. Semenáčky byly uloženy v baňkách-tím se vytvořila kouřová komora. Kouř byl vytvořen spálením listů experimentálního materiálu ve zvláštní nálevce. Po celou dobu experimentu byly baňky chlazeny, aby teplota nepřekročila 35°C. Experiment se samozřejmě nemůže rovnat stejným přírodním podmínkám, koncentrace byly nižší než při velkém lesním požáru. Výsledky přinesly zajímavé poznatky: kromě douglasky tisolisté (tento druh srovnal rychlost fotosyntézy již po třiceti minutách po experimentu) všechny dřeviny vykazovaly rozdílně rychlou fotosyntetickou reakci, k výraznému zpomalení došlo především u *Pinus ponderosa*, ale již dva týdny po experimentu došlo ke srovnání. Jehličnaté dřeviny se zregenerovaly rychleji než listnaté, avšak příčina není známa.

Experiment tedy prokázal změny v rychlosti fotosyntetické reakce, avšak neprokázal výrazné změny a ovlivnění růstu listů či jehličí ani změny v sekundárních metabolických reakcích (Calder et al., 2010).

### 3.3.3 Kyanhydridy

Dalšími zajímavými organickými sloučeninami jsou kyanhydridy. Byly izolovány už z více jak 3000 druhů rostlin ve formě kyanhydridových glykosidů jakožto poměrně stabilní sloučeniny (Mithöfer & Boland, 2012). Spolu s karrikiny jsou jedny z mnoha sloučenin nacházejících se také v kouři při požárech rostlin. Zatím se předpokládá, že v rostlinách plní funkci obrannou proti býložravcům a dalším patogenům díky obsahu toxického kyanidu. Našli bychom je uskladněny v rostlinných vakuolách. Stejně jako butenolidy, tak i kyanhydridy plní signální funkci-aktivují klíčení semen (Flematti et al., 2013). Jejich aktivita je vyvolána, pokud dojde v rostlině k syntéze ethylenu, tedy jednoho z fytohormonů, který je také odpovědný za klíčení semen, senescenci a především zrání plodů (Wang et al., 2002) nebo jako reakce na abiotické či biotické stresy. Mimo to mohou být kyanhydridy zodpovědné za některé fyziologické procesy v rostlinách, např. zvýšení rezistence listů některých druhů rostlin (Chivasa & Carr, 1998). Avšak ethylen, který bychom také našli v kouři, nemá schopnost přetrvávat v půdě stejně jako např. karrikiny vzhledem ke své těkavé povaze, a tak není brán jako signální látka, která by po požárech způsobovala stimulaci klíčení semen rostlin (Preston et al., 2004).

### 3.3.4 Trehalóza

Trehalóza je disacharid patřící mezi látky primárního metabolismu s prokázanou signální funkcí. Jejími základními stavebními prvky jsou UDP-glukóza a glukóza-6-fosfát, které jsou propojené enzymem trehalóza-6-fosfát syntáza (TPS) (Goddijn & van Dun, 1999). Je přítomna nejen v houbách, rostlinách či bakteriích, v kvasinkách, ale také v různých potravinách, např. med, mořské plody, ovocné produkty a další. Avšak obratlovci si ji nejsou schopni sami vytvořit, umí ji pouze odbourávat pomocí enzymu trehalázy. Má výborné fyzikální vlastnosti. Jak již bylo zmíněno, má výbornou stabilitu v širokém rozmezí pH a má vysokou termostabilitu. Tím, že je trehalóza vysoce stabilní látka, působí proti retrogradaci škrobu, proti denaturaci bílkovin, proti odbourání lipidů i proti Maillardově reakci (reakce sacharidů s aminokyselinami). Kromě toho je také schopna potlačit i odbourávání mastných kyselin. Při jednom experimentu, kdy se čtyřprocentní roztok zahříval na 100°C v rozmezí pH 3,5–10 pH, nedošlo povětšinou k poklesu trehalózy ve vzorcích (Tabulka 1). To činí z trehalózy velice atraktivní látku například pro průmysl (Higashiyama, 2002).

Tabulka 1 - Souhrn některých vlastností trehalózy, zdroj: (Higashiyama, 2002)

Teplota tání	dihydrát	97,0°C
	anhydrid	210,5°C
Rozpustnost	68 g/ 100 g vody při 20°C	
Relativní sladkost	45 % sacharózy	
Stravitelnost	trávená a absorbovaná tenkým střevem	
Stabilita roztoku (pH)	více jak 99 %	3,5–10 pH při 20°C po dobu 24 h

Jednoduché cukry, konkrétně disacharidy, jsou schopné stabilizovat různé biomateriály i během mrazení či vysoušení materiálů. Tuto schopnost má rovněž i trehalóza. Spousta rostlin, ale také živočichů, tak využívá této schopnosti při nedostatku vody-dehydrataci (Crowe et al., 1996; Madin & Crowe, 1975). U hmyzu potom zastává funkci krevního cukru, v případě hub funkci zásobního sacharidu (Goddijn & van Dun, 1999).

Nejdůležitější funkcí trehalózy je však ochrana rostlin před různými abiotickými stresovými faktory-před vysokými teplotami, mrazem, vodním stresem. Například u obilnin je prokázána vyšší koncentrace trehalózy při nepříznivých podmínkách (Mackenzie et al., 1988). Klíčovou roli hraje zejména při dehydrataci rostlin. U rostliny známé pod názvem růže z Jericha (*Selaginella lepidophylla*), pocházející ze suchých oblastí Mexika, se v takovém případě trehalóza akumuluje ve výši přibližně 12 % suché hmotnosti rostliny a působí jako ochrana proteinových membrán (fosfolipidové membrány). Po rehydrataci opět dojde k poklesu obsahu trehalózy (Goddijn & van Dun, 1999).

U vyšších cévnatých rostlin je ale takováto akumulace trehalózy vzácná-sacharóza totiž převzala tuto funkci od trehalózy, a tak ji v tomto případě nahrazuje (Müller et al., 1990). Avšak zvýšená přítomnost jak sacharózy, tak trehalózy může lépe zamezovat poškození rostliny suchem (Goddijn & van Dun, 1999).

U vyšších rostlin se tedy neprokázal značný výskyt trehalózy, ale prokázala se přítomnost prekurzoru trehalózy T6P (trehalóza-6-fosfát) s funkcí signální molekuly, která hraje důležitou roli jako regulátor růstu a vývoji rostlin (Yadav et al., 2014).

Zajímavé také je, že enzym trehaláza má velký význam na odbourávání trehalózy pocházející z půdních bakterií rodu *Rhizobium* nebo z hub zapojené do mykorhizy (Müller et al., 1995).

Olivovníky nacházející se ve Středomoří mohou trpět nedostatkem živin, což je pro tento středomořský ekosystém typické. Avšak výskyt mykorhizních hub (*R. irregularis*) zvyšuje šanci na příjem živin v nepříznivých podmínkách (Tekaya et al., 2017). Mimo to jsou stromy pozitivně ovlivněny houbami také z hlediska vyšší tolerance vůči suchu (Ruiz-Sánchez et al., 2010), vůči přesolené půdě (Porrás-Soriano et al., 2009) i vůči patogenům (Wehner et al., 2010). To vše může zapříčiňovat výskyt právě trehalózy v mykorhizních houbách, která se vyznačuje ochranou rostlin vůči abiotickým stresům. Mykorhizní houby

také interagují s některými druhy půdních bakterií. Tyto bakterie umí syntetizovat některé regulátory růstu, např. cytokininy. To může mít za následek zvýšení absorpce vody a živin kořenového systému stromů. Skupina Tekaya et al. (2017) provedla experiment, kdy se po dobu šesti měsíců sledovaly vysázené olivovníky ve skleníku ovlivněné mykorrhizní houbou (*R. irregularis*), měřila se u nich mimo jiné rychlost fotosyntézy, obsah živin i obsah některých sacharidů, mezi nimiž byla i trehalóza. Zajímavé na tomto experimentu je, že byl u olivovníků s mykorrhizními houbami pozorován vyšší obsah sacharidů v kořenech než u olivovníků, které ovlivněny mykorrhizními houbami nebyly.

## 4 Metodika

Cílem praktické části bakalářské práce je stanovení přítomnosti disacharidu trehalózy laboratorní analýzou ve vzorcích kořenů smrku ztepilého (*Picea abies*) pomocí spektrofotometru.

### 4.1 Popis vybraných lokalit, způsob odběru vzorků

Pro praktickou část bakalářské práce byly vybrány 3 zkusné plochy v Krušných horách, na nichž se odebralo celkem 24 půdních sond s kořeny stromu smrku ztepilého (*Picea abies*). Jedná se o plochy, které byly založeny v rámci zkoumání napadení smrkových porostů parazitickou houbou kloubnatka smrková (*Gemmamyces piceae*).

Na daných lokalitách se nachází smrkové porosty, konkrétně s druhem smrk ztepilý. Na každé ploše bylo vybráno 8 stromů, z nichž 4 byly ovlivněny a napadeny právě kloubnatkou smrkovou a další 4 byly zdraví jedinci. Odebírané půdní sondy se nacházely vždy ve vzdálenosti do 1 metru od vybraného jedince (Obrázek 15). Pomocí nástroje na odběr půdních sond (Obrázek 16) se vždy odebrala hlína i s kořeny a ostatním půdním materiálem, následně se váleček hlíny s kořeny (Obrázek 17) zabalil do alobalu. Každý vzorek se označil příslušným číslem pořadí dané sondy, mírou napadení kloubnatkou smrkovou a označením konkrétní zkusné plochy. Stejným způsobem se pokračovalo s odebíráním vzorků na každé ploše.



Obrázek 15 - Místo po odběru půdní sondy, cca 25 cm hluboko a 1 m vzdálené od stromu, zdroj: (Michal Samek)



**Obrázek 16 - Odběr půdní sondy, zdroj: (Michal Samek)**



**Obrázek 17 - Odebraný válec hlíny s kořeny, zdroj: (Michal Samek)**

Vybrané lokality se nachází na území LS Litvínov-LHC Červený Hrádek. První plocha nese označení 17B6 (Obrázek 18, 19, 20, 21), druhá 88B5 (Obrázek 22) a třetí 80B8 (Obrázek 23). Všechny plochy spadají do ochranného pásma A. Stupeň ovlivnění vodou stanovišť je 1. Lesní vegetační stupeň oblasti je 7, tedy bukovo-smrkový, odpovídající nadmořské výšce mezi 901 až 1050 m. n. m. Soubor lesních typů je 8G, tedy podmáčená smrčina s největším zastoupením rašeliníků, třtiny a přesliček (ÚHÚL, 2003). Plocha 17B6 je dvouetážová s výměrou nad 10 ha, plocha 88B5 má výměru 4–10 ha. N plochách je stoprocentní zastoupení smrku ztepilého. Specifikace ploch 17B6 a 88B5 z hospodářské knihy je uvedena níže v tabulkách 2, 3, 4:

Tabulka 2 - Popis jednotlivých ploch (1)

Název	Revír	LHP od:	LHP do:	LHC	Název LHC	Oddělení	Dílec	Porostní skupina	PLO	Etáž	SLT
LS Litvínov	11	1.1.10	31.12.19	1296	Červený Hrádek	17	B	06/01p	1	01p	8G
LS Litvínov	11	1.1.10	31.12.19	1296	Červený Hrádek	17	B	06/01p	1	6	8G
LS Litvínov	11	1.1.10	31.12.19	1296	Červený Hrádek	88	B	5	1	5	8G

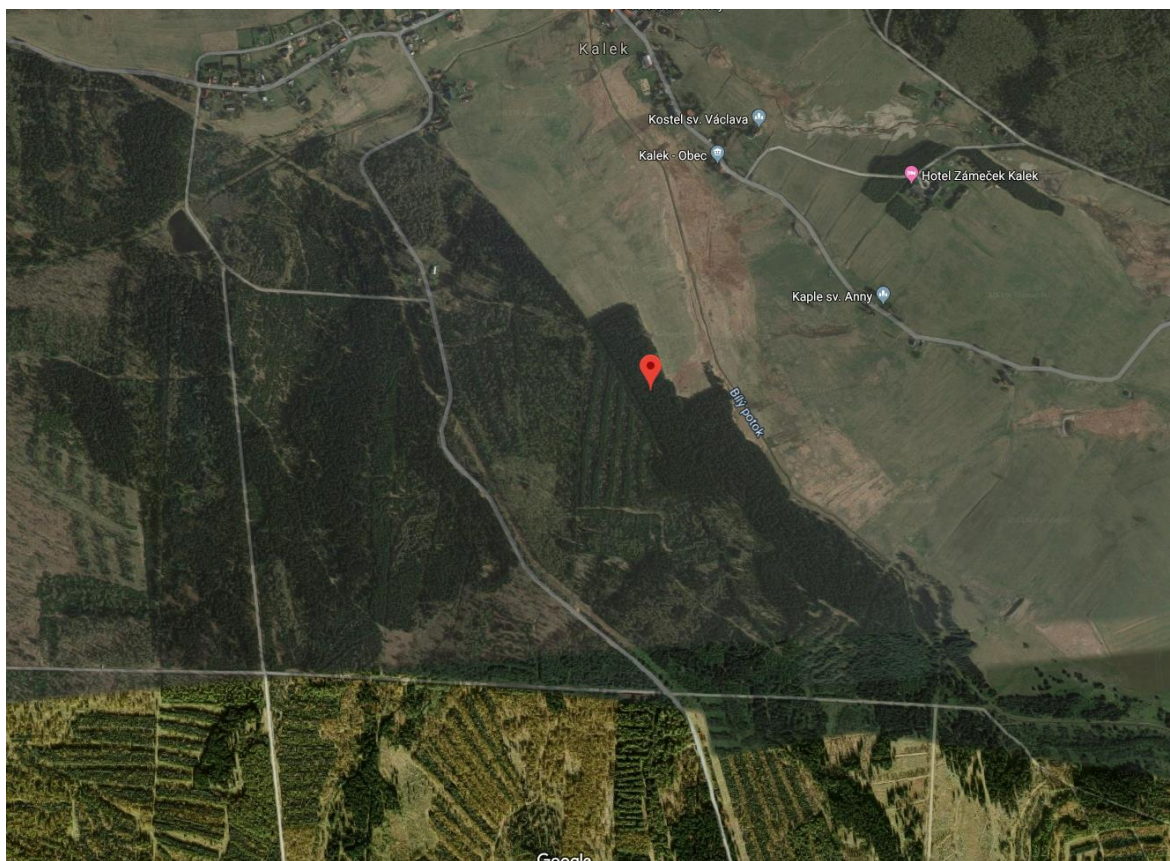
Tabulka 3- Popis jednotlivých ploch (2)

JPRL	Rozloha	Pásma ochrany	Souřadnice N	Souřadnice E	LVS	Hospodářský soubor
17B06/01p	nad 10 ha	A	50.57129	13.32325	7	7781
17B06/01p	nad 10 ha	A	50.57129	13.32325	7	7781
88B05	4-10 ha	A	50.55575	13.33523	7	7781

Tabulka 4- Popis jednotlivých ploch (3)

Název	Název LHC	Věk	Zakmenění	Dřevina	Zastoupení	Stř. tloušťka	Stř. výška	AVB
LS Litvínov	Červený Hrádek	10	1	SM	100	0	1	24
LS Litvínov	Červený Hrádek	52	8	SM	100	21	17	22
LS Litvínov	Červený Hrádek	47	9	SM	100	15	13	24





Obrázek 18 - Plocha s označením 17B6, převzato (10.4.2019): [www.mapy.cz](http://www.mapy.cz)



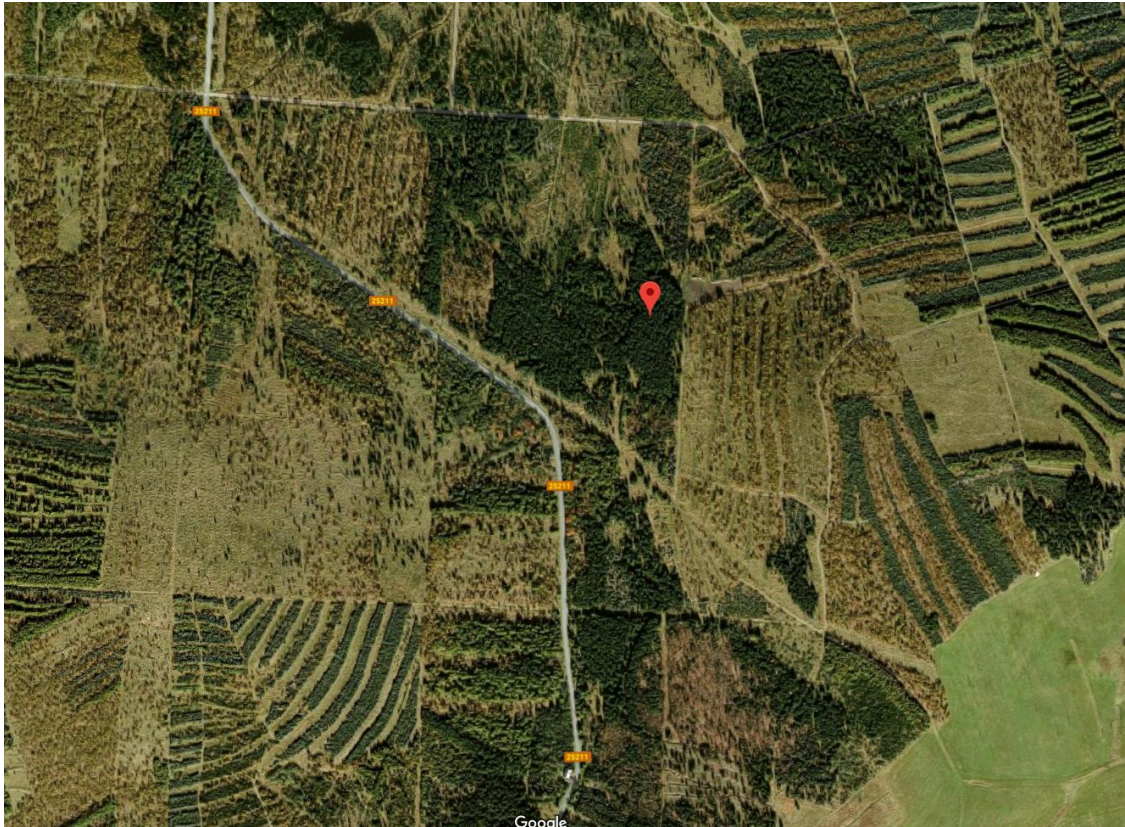
Obrázek 19 - První lokalita 17B6, zdroj: (Michal Samek)



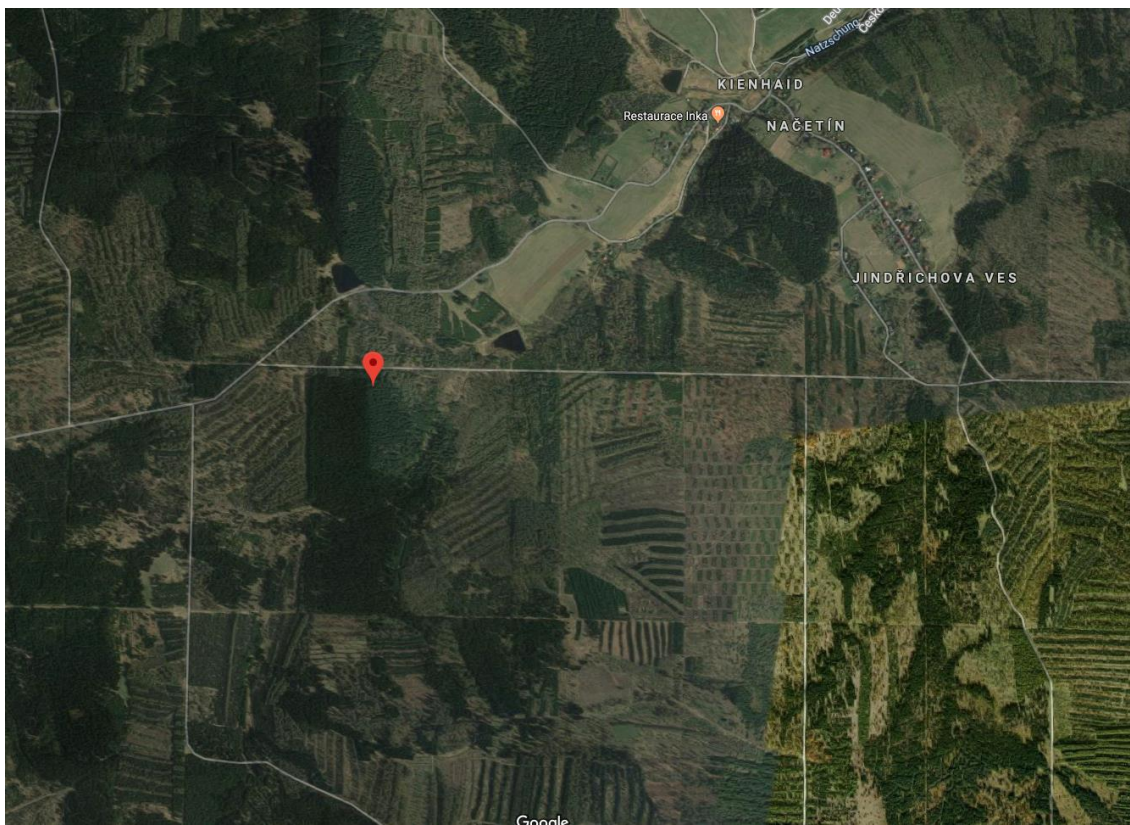
Obrázek 20 - Strom č.2 se 3. stupněm napadení kloubnatkou smrkovou z první lokality 17B6, zdroj: (Michal Samek)



Obrázek 21 – Pohled na lokalitu 17B6, zdroj: (Michal Samek)



Obrázek 22 - Plocha s označením 88B5, převzato (10.4.2019): [www.mapy.cz](http://www.mapy.cz)



Obrázek 23 - Třetí lokalita s označením 80B8, převzato (10.4.2019): [www.mapy.cz](http://www.mapy.cz)

## 4.2 Třídění a čištění odebraných vzorků

Pro laboratorní analýzu bylo nejprve třeba roztrždit odebrané vzorky z půdních sond s cílem získat kořeny s tloušťkou pod 3 mm a s tloušťkou nad 3 mm. Třídění a čištění se provádělo v laboratoři pomocí sít s různými velikosti ok. Nejprve se musely odebrané kořeny prosít a zbavit hlíny a dalších půdních materiálů jako jsou například kamínky, zbytky organických materiálů a další. Poté se kořeny očistily v nádobě s vodou (Obrázek 24), a to několikrát, dokud nebyly zcela čisté. Očištěné kořeny se osušily buničinou a vložily do uzavíratelných sáčků (Obrázek 25), kam byly opět vloženy popisky lokalit, stupně napadení houbou, číslem sondy, popřípadě číslo stromu a velikostí kořene. Poté byl materiál zmrazen a uchován pro následující analýzu.



Obrázek 24 - Čištění kořenů smrku ztepilého vodou, zdroj: (Veronika Řehořová)



Obrázek 25 - Ukládání a popisování vytříděných vzorků, zdroj: (Veronika Řehořová)

Seznam 24 vybraných jedinců dle ploch, se stupněm poškození kloubnatkou smrkovou a s velikostí kořene pod 3 mm i nad 3 mm:

Tabulka 5 - Seznam jedinců plochy 17B6 s velikostí kořene a stupněm poškození kloubnatkou smrkovou

strom č.	velikost kořene	poškození	porost
6	<3mm	3 - Z (0)	17B6
13	≥3mm	4 - N (4)	17B6
1	≥3mm	2 - Z (0)	17B6
13	<3mm	4 - N (4)	17B6
20	<3mm	5 - Z (0)	17B6
6	≥3mm	3 - Z (0)	17B6
1	<3mm	2 - Z (0)	17B6
20	≥3mm	5 - Z (0)	17B6
N	<3mm	7 - N (3)	17B6
48	<3mm	6 - N (3)	17B6
N	≥3mm	7 - N (3)	17B6
48	≥3mm	6 - N (3)	17B6
31	≥3mm	8 - Z (0)	17B6
2	<3mm	1 - N (3)	17B6
31	<3mm	8 - Z (0)	17B6
2	≥3mm	1 - N (3)	17B6

Tabulka 6 - Seznam jedinců plochy 80B8 s velikostí kořene a stupněm poškození kloubnatkou smrkovou

strom č.	velikost kořene	poškození	porost
51	≥3mm	1 - N (3)	80B8
51	<3mm	2 - N (3)	80B9
48	≥3mm	5 - Z (0)	80B8
15	≥3mm	2 - Z (0)	80B8
15	<3mm	3 - Z (0)	80B8
16	<3mm	3 - Z (0)	80B8
48	<3mm	5 - Z (0)	80B8
N	≥3mm	4 - Z (0)	80B8
N	<3mm	4 - Z (0)	80B8
16	≥3mm	3 - Z (0)	80B8
N	≥3mm	6 - N (3)	80B8
N	<3mm	6 - N (3)	80B8
N	≥3mm	8 - N (3)	80B8
N	<3mm	8 - N (3)	80B8
N	≥3mm	7 - N (3)	80B8
N	<3mm	7 - N (3)	80B8
N	≥3mm	5 - Z (0)	80B8
N	<3mm	5 - Z (0)	80B8

Tabulka 7- Seznam jedinců plochy 88B5 s velikostí kořene a stupněm poškození kloubnatkou smrkovou

strom č.	velikost koř.	poškození	porost
N	<3mm	2 - N (3)	88B5
N	≥3mm	6 - Z (0)	88B5
N	<3mm	4 - Z (0)	88B5
N	≥3mm	4 - Z (0)	88B5
N	<3mm	3 - Z (0)	88B5
N	<3mm	6 - Z (0)	88B5
N	≥3mm	3 - Z (0)	88B5
N	<3mm	7 - N (3)	88B5
N	≥3mm	8 - N (3)	88B5
N	<3mm	1 - N (3)	88B5
N	≥3mm	1 - N (3)	88B5
N	≥3mm	7 - N (3)	88B5
N	≥3mm	8 - N (3)	88B5
N	≥3mm	2 - N (3)	88B5

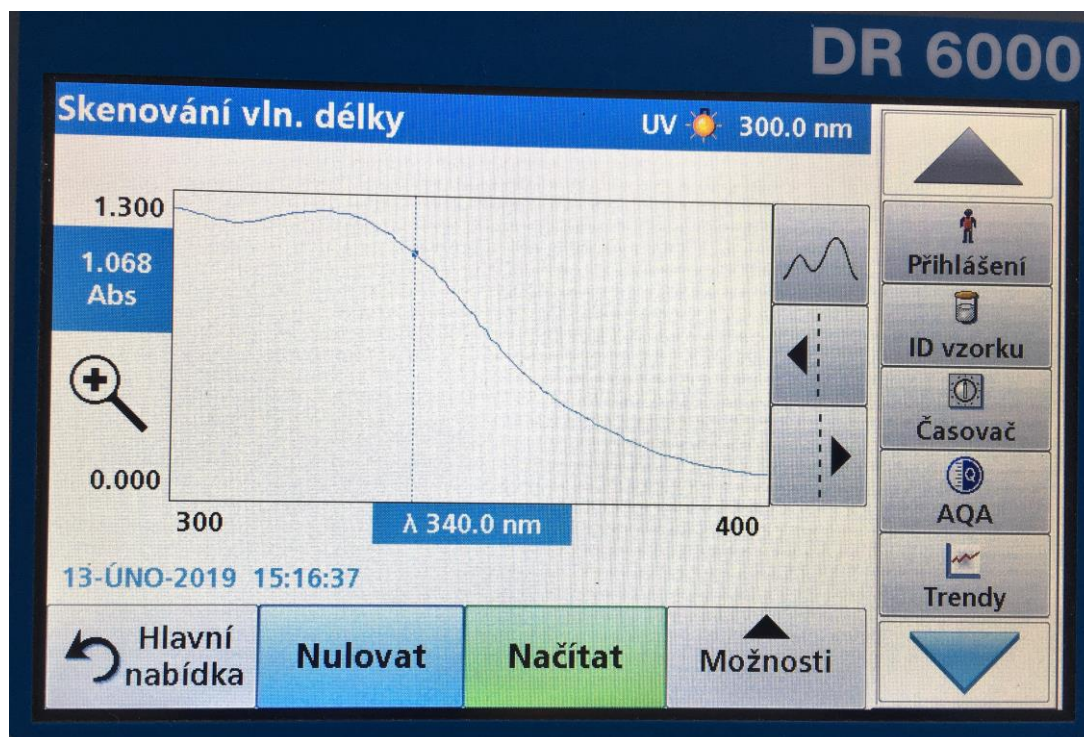
### 4.3 Popis spektrofotometru DR 6000

Přístroj DR 6000 je spektrofotometr UV-VIS (Obrázek 26) sloužící k digitálnímu odečtu procentuální transmittance, absorpance a koncentrace látek a roztoků. Přístroj pracuje na principu vlnových délek, jejichž rozmezí se pohybuje mezi 190 – 1100 nm, s přesností  $\pm 1$  nm v rozsahu délek 200 – 900. Jako zdrojová lampy pokrývající viditelné spektrum (320-1100 nm) je zde halogenová lampy a deuteriová lampy s UV spektrem (190-360 nm). Fotometrický měřicí rozsah je potom při vlnových délkách 200 – 900 nm  $\pm 3$  Abs.

Po odkrytí vrchního krytu kyvetového prostoru se uvnitř nachází kyvetový adaptér na kyvetu se vzorkem, dále se ve vrchní části nachází kryt prostoru lampy a dotykový displej nabízející různé typy programů, a kterým se přístroj ovládá. Pro uložení kyvety do kyvetového prostoru je třeba zvednout univerzální kyvetový adaptér a otočit jím doleva směrem ke kyvetovému prostoru a poté opět zatlačit dolů. Po zapnutí přístroje je tu možnost navolení jazyka a poté se již může přistoupit ke zvolení z mnoha nahraných programů. Pro tento experiment byl zvolen program „Jedna vlnová délka“ a „Skenování vlnové délky“ (Obrázek 27), v němž se odečítá hodnota absorpance vzorku, kdy se měří světlo pohlčené vzorkem v jednotkách absorpance. Získaná data se poté dají jednoduše uložit a nahrát na flash disk přes USB port (Hach, 2018).



Obrázek 26 - Přístroj spektrofotometr DR 6000 umístěný v laboratoři, zdroj: (Anna Krejzková)



Obrázek 27 - Displej přístroje DR 6000 s možností navolení programů, zdroj: (Anna Krejzková)

#### 4.4 Postup extrahování trehalózy z kořenů *Picea abies*

Jako první krok bylo třeba extrahovat trehalózu z kořenů. Suché vzorky (tedy kořeny v sáčcích) vyjmuté z mrazícího boxu se navážily na vzorky o hmotnosti 1g a poté nechaly rozdrtit v oscilačním mlýnku. Po navážení bylo třeba vzorky kořenů nakrájet na hoblinky přibližné tloušťky 0,5 mm, které se poté vložily do kyvet. Kyvety se vzorky o hmotnosti 1g by měly před drcením dosahovat pokojové teploty. Do kyvet ke vzorkům se přilévá 200 ml destilované vody o teplotě kolem 80°C, v tomto případě se však použil tekutý dusík, také o objemu 200 ml. Doba drcení v oscilačním mlýnku se pohybovala mezi 10-15 minutami (čím déle, tím vyšší pravděpodobnost lepšího nadrcení). Drcením v mlýnku vznikla ze vzorků kořenů tuhá hmota. Poté se vzorky vyjmuly z kyvet, část vzorku se uložila do kádinky, přidala se k nim destilovaná voda (opět cca 200 ml), promíchaly se a nechaly vychladnout na pokojovou teplotu. Pracovalo se se vzorky s obsahem trehalózy do 12%.

Vzniklý roztok se přecedí přes filtrační papír (roztok může být i po procedění mírně zakalený) a je připraven k okamžité analýze, případně se dá uchovat při teplotě kolem 4°C na pozdější použití. Pokud se v roztoku vytvoří zákal, je třeba roztok znovu přefiltrovat (Megazyme, 2018).

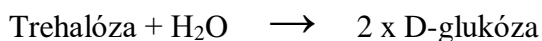


## 4.5 Postup stanovení trehalózy ve vzorcích

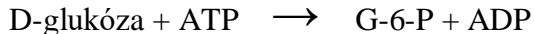
Postupovalo se dle návodu použitého kitu značky Megazyme (Obrázek 28, 29) (firma Megazyme, se sídlem v Irsku, je jedna z největších globálních výrobců a dodavatelů analytických činidel, enzymů a testovacích souprav), která je výhodná z hlediska rychlosti reakce (stačí pouze 2 minuty), z hlediska užitého kitu, kdy stačily k reakci pouze enzymy trehaláza, hexokináza a glukóza-6-fosfát dehydrogenáza, také je to ekonomicky výhodná varianta.

Postupy reakcí: trehalóza s přidáním vody je hydrolyzována enzymem trehaláza na D-glukózu. Uvolněná D-glukóza je potom spolu s adenosin-5'-trifosfátem (ATP) fosforylována enzymem hexokináza (HK) na glukózu-6-fosfát (G-6-P) a zároveň se tvoří adenosin-5'-difosfát (ADP), jak je vidět v rovnicích:

(trehaláza)



(HK)



V přítomnosti enzymu glukóza-6-fosfát dehydrogenáza (G6P-DH) je G-6-P spolu s nikotinamidem-adenin dinukleotid fosfátem ( $\text{NADP}^+$ ) oxidována na glukonát-6-fosfát s tvorbou redukovaného nikotinamid-adenin dinukleotid fosfátem (NADPH) v následující rovnici:

(G6P-DH)



Množství NADPH vytvořené touto reakcí je stechiometrické s množstvím D-glukózy, tedy dvojnásobné množství trehalózy. Jedná se o NADPH, který je měřen vrůstem absorbance při 340 nm (Megazyme, 2018).



Obrázek 28 - Balení kitů značky Megazyme, zdroj: (Anna Krejzková)



Obrázek 29 - Lahvičky s obsahem jednotlivých kitů: lahvička 1 - buffer, lahvička 2 - NADP + ATP, lahvička 3 - HK/G6PDH, lahvička 4 – trehaláza, zdroj: (Anna Krejzková)

Samotné stanovení trehalózy vyžaduje tyto podmínky:

- metoda= spektrofotometrická (UV lampa)
- vlnová délka= 340 nm
- kyveta= s tloušťkou 1 cm z plastu či skla
- teplota=  $\pm 25^{\circ}\text{C}$
- konečný objem= 2,54 ml
- roztok vzorku= 4-80  $\mu\text{g}$  trehalózy nebo D-glukózy v kyvetě v objemu vzorku 0,20 ml
- limit detekce= 37,5 mg/l

Poté se již může přistoupit k přípravě vzorků s roztoky viz tabulka 8:

**Tabulka 8 – Seznam a použití kitů, zdroj: (Megazyme, 2018)**

Pipetou do kyvety	Kyveta s rozpouštědlem	Kyveta se vzorkem
Destilovaná voda (+- 25°C)	2,20 ml	2,0 ml
Roztok vzorku	-	0,20 ml
Roztok I. (buffer)	0,20 ml	0,20 ml
Roztok II. (NADP <sup>+</sup> /ATP)	0,10 ml	0,10 ml
Suspenze III. (HK/G-6-P-DH)	0,02 ml	0,02 ml

Připravený roztok se nechá dobře promíchat magnetickou míchačkou (Obrázek 30). Roztok v kyvetě se vloží do spektrofotometru a po 5 minutách se odečte hodnota absorbance roztoků, a tím se získá hodnota A1. Po odečtení hodnoty se přidá suspenze IV. viz tabulka 9:

**Tabulka 9 - Kit trehaláza, která se přidá ke vzorku a poté se nechá spolu s ním promíchat, zdroj: (Megazyme, 2018)**

Pipetou do kyvety	Kyveta s rozpouštědlem	Kyveta se vzorkem
Suspenze IV. (trehaláza)	0,02 ml	0,02 ml

Roztok se opět nechá dobře promíchat a po dalších 5 minutách následuje další odečítání hodnot absorbance vzorku spektrofotometrem. Výsledná hodnota je hodnota A2. Reakce může v kyvetě dále pokračovat a hodnoty se ještě mohou měnit. Po dvouminutových intervalech se pokračuje odečítáním hodnot absorbance, dokud se hodnoty A2 neustálí, tedy nadále již nezvyšují. Může se stát, že se hodnoty stále budou měnit a zvyšovat, to může být dáno působením některých enzymů či sloučenin v roztoku, kterým se dá předejít jejich odstraněním během přípravy roztoku (Megazyme, 2018).



Obrázek 30 - Magnetická míchačka IKA C-MAG HS 7, zdroj: (Anna Krejzková)

## 4.6 Výpočet obsahu trehalózy

Rozdílem absorbancí A1 a A2 (A2-A1) se získá hodnota  $\Delta A$ , kterou je třeba dosadit do vzorce. Hodnoty A1 i A2 se stanoví jak pro rozpouštědlo, tak pro vzorek. Hodnota  $\Delta A$  by potom měla dosahovat nejméně 0,1 pro přesnost výsledků. Koncentraci trehalózy zjistíme dle této rovnice (Megazyme, 2018):

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 2} \times \frac{1,1}{0,2} \times \Delta A \text{ trehalóza } [\text{g}/\text{L}]$$

V = konečný objem (ml)

MW = molekulová hmotnost trehalózy (g/l)

$\varepsilon$  = koeficient extinkce NADPH při 340 nm

d = dráha pohybu světla (cm)

v = objem vzorku (ml)

2 = 2 molekuly D-glukózy uvolněné z každé molekul trehalózy

1.1/0.2 = 0,2 ml extraktu vzorku se zpracuje s borohydridem, konečný objem po ošetření a neutralizaci je 1,1 ml

Pokud je vzorek během přípravy naředěn jinak, než borohydridem, musí být výsledek vynásoben faktorem ředění (F). Při analýze polotuhých nebo tuhých vzorků, které jsou zváženy pro přípravu vzorků, se vypočte obsah trehalózy z množství váženého dle následující rovnice (Megazyme, 2018):

$$c = \frac{\text{obsah trehalózy v roztoku vzorku } [\text{g}/\text{l}]}{\text{váha vzorku v roztoku vzorku } [\text{g}/\text{l}]} \times 100 [\text{g}/100 \text{ g}]$$

## 5 Výsledky

Stanovení obsahu a koncentrace trehalózy laboratorní analýzou se účastnilo celkem 20 vybraných vzorků kořenů smrku ztepilého. Hodnoty, které naměřil spektrofotometr ve vzorcích, tedy A1 a A2, se použily pro stanovení hodnoty  $\Delta A$ , která se následně použila pro výpočet koncentrace a nakonec pro stanovení obsahu trehalózy v daném vzorku dle výše zmíněných vzorců. Ve všech případech, až na vzorek č.13, výsledky nabývaly záporných hodnot, počínajíc zápornou hodnotou  $\Delta A$ . Použité vzorky byly z plochy 17B6 (celkem 14 vzorků) a 80B8 (celkem 6 vzorků). Pro stanovení obsahu trehalózy v kořenech bylo použito deset vzorků s tloušťkou kořene nad 3 mm a deset vzorků s tloušťkou kořene pod 3 mm. Všechny vzorky měly hmotnost 1 g, výjimku tvořily pouze vzorky č. 6, 1 a 48, jejichž hmotnost činila 0,5 g.

Pro stanovení obsahu a koncentrace trehalózy v kořenech smrku ztepilého se nakonec použilo pouhých 20 vzorků (resp. 21, vzorek č. 6 musel být naměřen 2x) proto, že hodnoty vycházely stále záporně. Původně se zamýšlelo použít minimálně 30 vzorků.

V odebraných kořenech smrku ztepilého byla s největší pravděpodobností příliš malá koncentrace trehalózy, proto výsledky získaly zápornou hodnotu viz tabulka 10:

Tabulka 10 - Výsledky analýzy: hodnoty A1, A2, vypočtená hodnota  $\Delta A$ , koncentrace a obsah trehalózy

strom č.	velikost kořene	porost	A1	A2	$\Delta A$	koncentrace T [g/L]	obsah T [g/100 g]	pozn.
6	≥3mm	17B6	0,208	0,207	-0,001	-0,000345	-0,0345	N <sup>o</sup> 1 vzorek; ZNOVU
6	≥3mm	17B6	0,223	0,201	-0,022	-0,007590367	-1,518073333	0,5 g (l. vzorek)
13	≥3mm	17B6	0,187	0,199	0,012	0,00414	0,414	
20	≥3mm	17B6	0,223	0,201	-0,022	-0,00759	-0,759	
48	≥3mm	17B6	0,279	0,233	-0,046	-0,01587	-1,587	
N	≥3mm	17B6	0,165	0,132	-0,033	-0,011385	-1,1385	
1	≥3mm	17B6	0,274	0,234	-0,04	-0,0138	-1,38	
31	≥3mm	17B6	0,218	0,181	-0,037	-0,012765	-1,2765	
51	≥3mm	80B8	0,223	0,187	-0,036	-0,01242	-1,242	
48	≥3mm	80B8	0,148	0,135	-0,013	-0,004485	-0,4485	
15	≥3mm	80B8	0,22	0,192	-0,028	-0,00966	-0,966	
6	<3mm	17B6	0,225	0,186	-0,039	-0,013455	-1,3455	
20	<3mm	17B6	0,203	0,182	-0,021	-0,007245	-0,7245	
13	<3mm	17B6	0,91	0,087	-0,823	-0,283935	-28,3935	
N	<3mm	17B6	0,203	0,191	-0,012	-0,00414	-0,414	
2	<3mm	17B6	0,16	0,143	-0,017	-0,005865	-0,5865	
1	<3mm	17B6	0,18	0,159	-0,021	-0,00724535	-1,44907	0,5 g
48	<3mm	17B6	0,12	0,114	-0,006	-0,0020701	-0,41402	0,5 g
15	<3mm	80B8	0,14	0,127	-0,013	-0,004485	-0,4485	
51	<3mm	80B8	0,15	0,139	-0,011	-0,003795	-0,3795	
16	<3mm	80B8	0,099	0,091	-0,008	-0,00276	-0,276	

Vzhledem k tomu, že výsledky v předchozím měření nabývaly záporných hodnot, přistoupilo se ke změně metody stanovení koncentrace a obsahu trehalózy namícháním více vzorků ze stejného porostu s různými velikostmi kořenů, s různým stupněm napadení kloubnatkou smrkovou a různou gramáží namísto pouze jednoho vzorku. Přistoupilo se k tomu z důvodu domněnky se, že kořeny z vícero stromů, ať už napadených kloubnatkou smrkovou či zdravých, by mohly vykazovat větší množství trehalózy. Avšak ani tato změna v metodice nebyla příliš úspěšná. Ze 4 pokusů vyšel opět pouze jeden s kladnými hodnotami, a to vzorek s označením Mix 3. Zbylé vzorky nabývaly záporných hodnot, viz tabulka 11:

Tabulka 11 – Výsledky analýzy po změně metodiky

	Strom č.	Velikost kořene	A1	A2	$\Delta A$	koncentrace T [g/L]	obsah T [g/100 g]	Stupeň napadení
Mix 3	N	$\geq 3\text{mm}$	1,75	1,82	0,07	0,132832	13,2832	3
	48	$\geq 3\text{mm}$						
	48	$< 3\text{mm}$						
Mix 5	20	$\geq 3\text{mm}$	1,79	1,745	-0,05	-0,085392	-1,58133333	
Mix 0	20	$< 3\text{mm}$	1,296	1,248	-0,05	-0,0910848	-1,68675556	0
	1	$\geq 3\text{mm}$						
	6	$< 3\text{mm}$						
Mix 4	13	$< 3\text{mm}$	1,174	1,151	-0,02	-0,0436448	-0,80823704	4



## 6 Diskuze

Z výsledků vyplývá, že stanovení obsahu trehalózy v kořenech smrku ztepilého nebylo úspěšné. Ani po menší úpravě metodiky se nepodařilo naměřit více, jak jednu kladnou hodnotu. Důvodů neúspěchu tohoto experimentu může být více. Jedním z nich může být příliš malý obsah trehalózy k detekování spektrofotometrem ve vzorcích, tedy nevhodně zvolený materiál, druhým důvodem může být nevhodně vybraný kit. K detekování obsahu trehalózy ve vzorcích byly použity enzymy trehaláza, hexokináza a glukóza-6-fosfát dehydrogenáza. Všechny tyto enzymy jsou od značky Megazyme a jsou primárně určeny pro detekci trehalózy v potravinách, např. med, houby, mořské plody, ovocné produkty, nápoje nebo jiné materiály, jako jsou biologické kultury (Megazyme, 2018). S velkou pravděpodobností tyto enzymy nebyly vhodné k detekování trehalózy z kořenů smrku ztepilého. Dále může být na vině přítomnost dalších látek ve vzorcích, které působí a interagují spolu s trehalózou. Mezi nimi například produkty sekundárního metabolismu, jako jsou fenolické látky a další. Některé enzymy jsou schopné štěpit trehalózu i po zmrazení vzorků, v nichž je obsažena, tedy pro tento experiment by bylo vhodnější zvolit právě je.

Při experimentu stanovení obsahu rozpustných sacharidů, včetně trehalózy, z kořenů a listů stromu *Olea europaea L.*, který prováděl Tekaya et al. (2017), se prokázal vysoký obsah trehalózy. Analyzování trehalózy v kořenech však při tomto experimentu probíhalo pomocí plynového chromatografu, který je schopen složky vzorků od sebe oddělit převedením do plynné fáze, aniž by jednotlivé složky poškodil. Také se lišilo extrahování sacharidů z kořenů-extrakce probíhala pomocí etanolu při 80°C.

Další zajímavý experiment, prováděný tentokrát u kvasnicového extraktu, je zde uveden vzhledem k užití různých metod pro stanovení obsahu trehalózy, všechny založené na detekci pomocí chromatografu. Experiment prováděl Ferreira et al. (1996). Extrakce suchých vzorků byla provedena vroucím etanolem, který se následně nechal odpařit. Poté byl přidán acetonitril s vodou. Takto hotový vzorek byl připraven na chromatografii. Jednou z metod byla detekce trehalózy za přítomnosti aromatického ketonu (anthron), která byla naměřena chromatografem. Další metoda využila enzym trehalázu, což je stejný enzym, který byl užit pro stanovení trehalózy v kořenech smrku ztepilého. Výsledky ukázaly na přítomnost trehalózy nejméně 9 mg/g buněk suchého vzorku (Ferreira et al., 1996).

Nabízí se tedy možné vysvětlení neúspěchu tohoto experimentu. Kromě toho, že byl pravděpodobně použit nevhodný kit, na vině dále může být nevhodně zvolená metodika a přístroj. Plynový chromatograf by pravděpodobně detekoval trehalózu od jiných složek a nedošlo by k jejímu případnému poškození. Jeden z uvedených příkladů experimentu také ukazuje, že enzym trehaláza se hodí spíše pro detekci trehalózy v potravinách.

## **7 Závěr**

Cílem praktické části bakalářské práce bylo stanovit obsah trehalózy v kořenech smrku ztepilého laboratorní analýzou pomocí spektrofotometru. Tento experiment se nezdařil. Více jak 90 % užitých vzorků vykazovalo záporné hodnoty. Pravděpodobně nevhodně zvolená metodika a přípravy k detekci trehalózy značky Megazyme k tomuto negativnímu výsledku přispěly. Odebrané vzorky kořenů smrku ztepilého rovněž mohly dosahovat přirozeně nízký obsah trehalózy bez ohledu na stupeň napadení kloubnatkou smrkovou. Spektrofotometr tudíž nebyl schopen trehalózu analyzovat. Pozitivních výsledků by se pravděpodobně mohlo dosáhnout, pokud by trehalózu detekoval plynový chromatograf.

## 8 Seznam použitých zdrojů

- Blažek, J., & Fabini, J. (2005). *Chemie pro studijní obory SOŠ a SOU nechemického zaměření*. SPN- Pedagogické nakladatelství, akciová společnost, Praha.
- Calder, W. J., Lifferth, G., Moritz, M. A., & Clair, S. B. St. (2010). Physiological Effects of Smoke Exposure on Deciduous and Conifer Tree Species. *International Journal of Forestry Research*, 2010, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2010/438930>
- Carey, F. A., & Giuliano, R. M. (2011). *Organic chemistry* (8.). McGraw-Hill.
- Chivasa, S., & Carr, J. P. (1998). Cyanide restores N gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase. *Plant Cell*, 10, 1489–1498.
- Čopíková, J., & Synytsya, A. (2005). Polysacharidy, jejich význam a uplatnění. *Chemické Listy* 99, 621.
- Corder, R., Douthwaite, J. A., Lees, D. M., Khan, N. Q., Dos, Viseu Santos, A. C., Wood, E. G., & Carrier, M. J. (2001). *Endothelin-1 synthesis reduced by red wine*. *Nature* 414: 863–864.
- Crowe, L. M., Reid, D. S., & Crowe, J. H. (1996). Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical Journal*, 71(4), 2087–2093. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79407-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79407-9)
- Cummins, I., Wortley, D., & Sabbadin, F. et kol. (2013). *Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds*. 110: 5812-5817. Proceeding of the National Academy of Sciences.
- Daws, M. I., Davies, J., Pritchard, H. W., Brown, N. A. C., & Van Staden, J. (2007). Butenolide from plant-derived smoke enhances germination and seedling growth of arable weed species. *Plant Growth Regulation*, 51(1), 73–82. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-9149-8>
- Daws, M. I., Pritchard, H. W., & Van Staden, J. (2008). Butenolide from plant-derived smoke functions as a strigolactone analogue: Evidence from parasitic weed seed germination. *South African Journal of Botany* 74. 116-120. Retrieved from [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- De Lange, J. H., & Boucher, C. (1990). Plant-derived smoke as a seed germination cue. *South African Journal of Botany* 56: 700-3.
- DeYoung, B. J., Qi, D., Kim, S.-H., Burke, T. P., & Innes, R. W. (2012). *Cell. Microbiology* 14, 1071.
- Doležal, K., & Strnad, M. (2017). Cytokininy-regulátory růstu rostlin, které dokážou mnohem více než jen regulovat dělení buněk. *Živa*. Retrieved from <http://ziva.avcr.cz/2017-4/cytokininy-regulatory-rustu-rostlin-ktere-dokazou-mnohem-vice-nez-jen-regulovat-deleni-bunek.html>

- Dvořáková, M., & Vaněk, T. (2015). Strigolaktony-struktura a funkce v rostlinách. *Chemické Listy* 109, 762-769.
- Dvořáková, M., Vaněk, T., & Valtrová, I. (2011). Monoterpeny v rostlinách. *Chemické Listy* 105, 839-845.
- Ferreira, J. C., Paschodin, M. F. V., Panek, A. D., & Trugo, L. (1996). Comparison of three different methods for trehalose determination in yeast extracts. *Food Chemistry*. Vol. 60, No. 2, Pp. 251-254.
- Flematti, G. R., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2015). What are karrikins and how were they 'discovered' by plants? *BMC Biology*, 13(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0219-0>
- Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Trengove, R. D. (2004). A compound from smoke that promotes seed germination. *Science*. 305 (5686): 977.
- Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Trengove, R. D. (2009). Identification of Alkyl Substituted 2 H -Furo[2,3- c ]pyran-2-ones as Germination Stimulants Present in Smoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20), 9475–9480. <https://doi.org/10.1021/jf9028128>
- Flematti, G. R., Scaffidi, A., Dixon, K. W., Smith, S. M., & Ghisalberti, E. L. (2011). Production of the Seed Germination Stimulant Karrikinolide from Combustion of Simple Carbohydrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1195–1198. <https://doi.org/10.1021/jf1041728>
- Flematti, G. R., Waters, M. T., Scaffidi, A., Merritt, D. J., Ghisalberti, E. L., & Kingsley, W. Dixon Smith, S. M. (2013). Karrikin and Cyanohydrin Smoke Signals Provide Clues to New Endogenous Plant Signaling Compounds. *Molecular Plant*, Pages 29–37, Number 1, 6. <https://doi.org/10.1093/mp/sss132>, Advance Access publication 23 November 2012
- Foo, E., & Reid, J. B. (2013). *J. Plant Growth Regul.* 32, 429.
- Goddijn, O. J. ., & van Dun, K. (1999). Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Science*, 4(8), 315–319. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01446-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01446-6)
- Gutjahr, C., Gobbato, E., Choi, J., Riemann, M., Johnston, M. G., Summers, W., ... Paszkowski, U. (2015). Rice perception of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi requires the karrikin receptor complex. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6267), 1521–1524. <https://doi.org/10.1126/science.aac9715>
- Hach. (2018). DR 6000. Hach, Germany, 620 s.
- Hahlbrock, K., & Scheel, D. (1989). *Annu. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biology.* 40: 347.
- Higashiyama, T. (2002). Novel functions and applications of trehalose. *Pure and Applied Chemistry*, 74(7), 1263–1269. <https://doi.org/10.1351/pac200274071263>
- Jain, N., Ascough, G. D., & Van Staden, J. (2008). A smoke derived butenolide alleviates HgCl<sub>2</sub> and ZnCl<sub>2</sub> inhibition of water uptake during germination and subsequent growth

- of tomato—possible involvement of aquaporins. *Journal of Plant Physiology*, Vol. 165, No. 13, Pp. 1422–1427.
- Joule, J. A., & Mills, K. (2000). *Heterocyclic Chemistry* (4.). Blackwell Science Publishing: Oxford, UK.
- Kimmins, J. P. (2004). *Forest Ecology: A Foundation for Sustainable Forest Management and Environmental Ethics in Forestry*.
- Krmenčík, P., & Kysilka, J. (2019). Sekundární metabolismus rostlin, online [cit.2019.2.11]. Retrieved from <http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/sekmetab.php>
- Kulkarni, M. G., Sparg, S. G., & Van Staden, J. (2007). Germination and post-germination response of Acacia seeds to smoke-water and butenolide, a smoke-derived compound. *Journal of Arid Environments*, 69(1), 177–187. <https://doi.org/10.1016/J.JARIDENV.2006.09.001>
- Lentile, L. B., Morgan, P., & Hudak, A. T. (2007). Post-fire burn severity and vegetation response following eight large wildfires across the Western United States. *Fire Ecology*, Vol. 3, No. 1, Pp. 91–108.
- Letham, D. S. (1973). *Phytochemistry* 12: 2445.
- Lunn, J. E., & MacRae, E. (2003). *New complexities in the synthesis of sucrose. Current Opinion in Plant Biology* 6: 208-214.
- Luštinec, J., & Žárský, V. (2005). *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum Praha.
- Mackenzie, K. F., Singh, K. K., & Brown, A. D. (1988). Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1661–1666.
- Madin, K. A. C., & Crowe, J. H. (1975). Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration. *J. Exp. Zool.* 193:335-342.
- Mareček, A., & Honza, J. (2000). *Chemie pro čtyřletá gymnázia* 3 (1.). Nakladatelství Olomouc.
- McMurry, J. (2004). *Organická chemie* (6.). Brooks/Cole, a Thomson Learning Company.
- Megazyme. (2018). Trehalose- assay procedure. Megazyme, Ireland, 14 s.
- Meng, Y., Shuai, H., Luo, X., Chen, F., Zhou, W., Yang, W., & Shu, K. (2016). Karrikins: Regulators Involved in Phytohormone Signaling Networks during Seed Germination and Seedling Development. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02021>
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 431–450.
- Morffy, N., Faure, L., & Nelson, D. C. (2016). Action and Evolution of Karrikin and

- Strigolactone Signaling. *Trends in Genetics*, Vol. 32, No. 3. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2016.01.002>
- Müller, J., Boller, T., & Wiemken, A. (1995). Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci.* 112, 1–9.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., & Rodwell, V. W. (2003). *Harper's Illustrated Biochemistry* (26.). The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Nelson, D. C., Flematti, G. R., Dixon, K. W., Smith, S. M., & Ghisalberti, E. L. (2012). Regulation of Seed Germination and Seedling Growth by Chemical Signals from Burning Vegetation. *Biology*. 63 (1): 107-130.
- Noiraud, N., Maurousset, L., & Lemoine, R. (2001). *Transport of polyols in higher plants. Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 717-728.
- Porrás-Soriano, A., Sorano-Martín, M. L. Porrás-Piedra, A., & Azcon, P. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. *J. Plant Physiol.* 166: 1350-1359,.
- Preston, C. A., Becker, R., & Baldwin, I. T. (2004). Is 'NO' news good news? Nitrogen oxides are not components of smoke that elicits germination in two smoke-stimulated species, *Nicotiana attenuata* and *Emmenanthe penduliflora*. *Seed Sci. Res.* 14, 73–79.
- Procházková, S., Macháčková, I., Krekule, J., & Šebánek, J. a kol. (1998). *Fyziologie rostlin*. Academia.
- Ruiz-Sánchez, M., Aroca, R., & Muñoz, Y. a kol. (2010). The fungus-specific sugar trehalose increased by 52.7% in M roots compared with the NM plants. In M roots, the glucose is incorporated by the AM fungus into trehalose and glycogen (Shachar-Hill et al.1995, Bago et al.2000), consequently the amount of obse. *J. Plant Physiol.* 167: 862-869,.
- Salačová, L., Faltusová, Z., & Ovesná, J. (2015). Jaké mechanismy využívají rostliny pro obranu proti houbovým patogenům. *Chemické Listy* 109, 613-618. Retrieved from [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015\\_08\\_613-618.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_08_613-618.pdf)
- Sandberg, D. V., Ottmar, R. D., & Peterson, J. L. (2009). Wildland fire in ecosystems: effects of fire on air. *General Technical Report, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Ogden, Utah, USA*.
- Scaffidi, A., Waters, M. T., Skelton, B. W., Bond, C. S., Sobolev, A. N., Bythell-Douglas, R., & Al, E. (2012). Solar irradiation of the seed germination stimulant karrikinolide produces two novel head-to-head cage dimers. *Organic Biomolecular Chemistry*, 10:4069–73.
- Seidlová, F. (2008). Strigolakton-další hormon rostlin? *Vesmír* 88. Retrieved from <http://www.vesmir.cz>
- Seidlová, F., Pavlová, L., & Zažímalová, E. (2008). Fytohormony- Jak s rostlinami cvičí hormony. *Vesmír* 0042-4544 87, 8, 532-533. Retrieved from <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2008/cislo-8/fytohormony.html>

- Šorm, F., & Hellberg, J. (1967). *Organická chemie pro SVVŠ*. SPN- Pedagogické nakladatelství, akciová společnost, Praha.
- Stevens, J. P., Merritt, D., Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., & Dixon, K. W. (2007). Seed germination of agricultural weeds is promoted by the butenolide 3-methyl-2H-furo [2, 3-c] pyran-2-one under laboratory and field conditions. *Plant Soil* 298 113–124. [10.1007/S11104-007-9344-Z](https://doi.org/10.1007/S11104-007-9344-Z).
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3.). Sinauer Associates.
- Tekaya, M., Mechri, B., Mbarki, N., Cheheb, H., Hammami, M., & Attia, F. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* influences key physiological parameters of olive trees (*Olea europaea* L.) and mineral nutrient profile. *PHOTOSYNTHETICA* 55 (2): 308-316. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0243-5>
- Tomášková, I., & Kubásek, J. (2017). *Fyziologie lesních dřevin II. - Růst, vývoj a rozmnožování*. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- ÚHÚL. (2003). Přehled lesních typů a souborů lesních typů v ČR. Retrieved from [http://www.uhul.cz/images/typologie/tab\\_LT\\_web\\_F.pdf](http://www.uhul.cz/images/typologie/tab_LT_web_F.pdf)
- van Staden, J., Sparg, S. G., Kulkarni, M. G., & Light, M. E. (2006). Post-germination effects of the smoke-derived compound 3-methyl-2H-furo[2,3-c]pyran-2-one, and its potential as a preconditioning agent. *Field Crops Research*, 98(2–3), 98–105. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2005.12.007>
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2013). *Fundamentals of Biochemistry-Life at the molecular level* (4.). John Wiley & Sons, Inc.
- Voet, D., & Voetová, J. G. (1995). *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing.
- Walsh, G. (2003). *Biopharmaceuticals. Biochemistry and biotechnology*. (2.). John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.
- Wang, K. L., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signalling networks. *Plant Cell*. 14 Suppl., S131–S151.
- Wehner, J., Antunes, P. M., & Powell, J. R. a kol. (2010). Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: a role for fungal diversity? *Pedobiologia* 53: 197-201.
- Wiemken, A. (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek J. Gen. Microbiol.* 58, 209–217.
- Xie, X., Yoneyama, K., Kisugi, T., Uchida, K., Ito, S., Akiyama, K., ... Yoneyama, K. (2013). *Mol. Plant*. 6, 153.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., & Zhu, J.-K. (2003). *Cell signaling during cold, drought and salt stress*. *Plant Cell* 165-183.
- Yadav, U. P., Ivakov, A., & Feil, R. et al. (2014). The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *J Exp Bot* 65:1051–1068.

Yoneyama, K., Xie, X., Kim, H. I., Kisugi, T., Nomura, T., Sekimoto, H., & Yokota, T. (2012). *Planta*.

Zwanenburg, B., Mwakaboko, A. S., Reizelman, A., & Anilkumar, G. Sethumadhavan, D. (2009). Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Manag. Sci.* 65, 478.