

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Přírodní produkty pro inhibici
klíčení a růstu rostlin**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. David Kacr**
Studijní program: N1501 Experimentální biologie rostlin
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. David Kacr
Název práce	Přírodní produkty pro inhibici klíčení a růstu rostlin
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	Cílem předkládané diplomové práce bylo zjistit, zda se v rostlinném materiálu nacházejí sloučeniny nebo jejich skupiny, které by mohly mít inhibiční účinky na klíčení a růst rostlin. Použili jsme rostlinné extrakty získané z trávy a listů ořešáku, a testovali je na semenech <i>Arabidopsis thaliana</i> , prosa setého a laskavce. V laboratorních podmínkách jsme sledovali především klíčivost semen a růst rostlin, vlivem aplikace rostlinných extraktů. Výsledky našich experimentů ukázaly, že rostlinné extrakty obsahují sloučeniny, které způsobují inhibici klíčení. Bylo také zjištěno, že nejvíce citlivá jsou semena <i>Arabidopsis thaliana</i> . Z výsledků frakcionace můžeme usoudit, že látky způsobující inhibici jsou polární. Závěrem lze konstatovat, že tráva obsahuje látky, které mohou vést k inhibici klíčení semen a mají podobné vlastnosti jako herbicidní látky.
Klíčová slova	Herbicidy, inhibice klíčení, SPE, alelopatie
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. David Kacr
Title of thesis	Natural products for the inhibition of germination and plant growth
Type of thesis	Master (Diploma)
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>The aim of this diploma thesis was to find out if the plant material contained compounds or groups of them that could have inhibitory effects to seed germination and plant growth. We used plant extracts obtained from grass and walnut leaves and tested them on seeds of <i>Arabidopsis thaliana</i>, millet and amaranth. In laboratory conditions, we mainly observed seed germination and plant growth affected by plant extracts. The results of our experiments showed that plant extracts contain certain compounds that lead primarily to the inhibition of germination. It has also been found that seeds of <i>Arabidopsis thaliana</i> are the most sensitive. From the results of fractionation, we can also conclude that the inhibiting substances are probably polar. In conclusion, we can conclude that grass contains substances that can lead to inhibition of seed germination and have similar properties to herbicides.</p>
Keywords	Herbicides, inhibition of germination, SPE, allelopathy
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením
Mgr. Jiřího Grúze, Ph.D., za použití citované literatury.

V Olomouci dne.....

.....

Bc. David Kacr

Rád bych poděkoval Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D. za odborné a cenné rady, čas a trpělivost, které mi poskytl v průběhu vypracování diplomové práce. Dále bych také poděkoval Skupině redoxaktivních látek za vytvoření příjemného pracovního prostředí a Mgr. Jiřímu Skořepovi za případné konzultace k diplomové práci.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Herbicidy.....	10
2.2 Mechanismus působení herbicidů	12
2.3 Skupiny herbicidů	16
2.3.1 Fenoxo herbicidy	16
2.3.2 Triaziny a triazoly.....	16
2.3.3 Fenylmočovinové herbicidy.....	17
2.4 Využití herbicidů	19
2.5 Přírodní herbicidy	20
2.6 Syntetické herbicidy	21
2.7 Inhibice klíčení a růstu	21
2.7.1 Inhibitory klíčení semen.....	24
2.8 Růst rostlin.....	25
2.8.1 Inhibice růstu	25
2.9 Alelopatie.....	27
2.9.1 Využití a aplikace.....	28
2.10 Fermentace (biotransformace).....	28
2.11 Frakcionace (Bioassay-guided fractionation)	29
2.12 SPE (Solid Phase Extraction)	30
2.12.1 Reverzní fáze SPE	31
3 MATERIÁL A METODIKA.....	32
3.1 Rostlinný materiál.....	32
3.2 Chemikálie.....	32
3.3 Spotřební materiál a další vybavení	32
3.4 Přístrojové vybavení.....	32
3.5 Metodika	33
3.5.1 Fermentace rostlinného materiálu	33
3.5.2 Test klíčivosti	33
3.5.3 Metody pro úpravu extraktu	33
3.5.4 Sterilní výsev semínek <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
3.5.5 Test růstu.....	34
3.5.6 Frakcionace pomocí SPE metody.....	34
4 VÝSLEDKY	35

4.1 Vliv extraktů na klíčivost semen.....	35
4.2 Vliv extraktů na růst kořínků.....	41
5 DISKUZE.....	43
6 ZÁVĚR.....	46
7 POUŽITÁ LITERATURA.....	47

SEZNAM ZKRATEK

2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
2,4,5-T	2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina
ABA	abscisová kyselina
ALS	acetolaktátsyntáza
DCMU	<i>N'</i> -(3,4-dichlorophenyl)- <i>N,N</i> -dimethylurea
DPE	p-nitrodifenylethery
ENVI-Carb	reverzní fáze na bázi uhlíku
ENVI-Chrom P	reverzní fáze na bázi polymeru
EPSP	5-enolpyruvyl-shikimát-3-fosfát
GS	glutamin syntetáza
Hisep	reverzní fáze tvořená polymerem křemíku
IAA	indoloctová kyselina
LC	liquid chromatography (kapalinová chromatografie)
MCPA	2-methyl-4-chlorfenoxyoctová kyselina
MCPP	methylchlorfenoxypropionová kyselina
O.A.	ořech aerobně
O.AN.	ořech anaerobně
PPO	protoporfyrinogen oxidáza
PS I	fotosystém I
SPE	Solid Phase Extraction (extrakce na pevné fázi)
TIBA	2,3,5-trijodobenzoová kyselina
T.S.	tráva sekaná
T.T.	tráva trhaná

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

V diplomové práci jsem se zabýval tím, zda se v rostlinném materiálu nachází látky, které způsobují inhibici klíčení semen a růstu rostlin a mohou fungovat jako přírodní herbicidy.

Herbicidy jsou látky chemické povahy, které slouží k inhibici růstu nebo usmrcení nežádoucích rostlin tzn. plevelů. Dělíme je do dvou velkých skupin na selektivní a neselektivní, kdy selektivní herbicidy ovlivňují růst jen některých druhů rostlin, zatímco neselektivní ovlivňují růst všech rostlin. V současné době se používají především syntetické herbicidy, ale dříve se k likvidaci plevelů používaly jiné látky, jako např. mořská sůl, vedlejší produkty z chemického průmyslu nebo oleje.

V experimentální části byli aplikovány rostlinné extrakty získané z trávy a listů ořešáku na zástupce jednoděložných (proso seté) a dvouděložných (*Arabidopsis thaliana* a laskavec) rostlin. Cílem experimentální části diplomové práce bylo zjistit, zda jsou v rostlinném extraktu obsaženy látky, které mohou inhibovat klíčení nebo růst rostlin.

Diplomová práce byla vypracována ve Skupině redoxaktivních látek, Laboratoř růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky.

Teoretická část

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Herbicidy

Herbicidy jsou chemické látky o molekulové hmotnosti do 700 kDa a za normálních okolností nejsou pro člověka toxické (Michel et al., 2004). Slouží k usmrcení nebo inhibici růstu nežádoucích rostlin tzn. plevelů. Dříve se k odstraňování plevelů používaly jiné látky, jako například mořská sůl, vedlejší produkty vznikající z chemického průmyslu nebo různé oleje. Až v polovině 20. století došlo k objevu nových látek na likvidaci plevelů, a to byly organické herbicidy, které měly vysokou toxicitu při použití nízké dávky.

Historie

První objev byl roku 1933 ve Francii a jednalo se o 2,4-dinitro-o-krezol, který je velmi toxický pro živočichy a může být nebezpečný i pro člověka. V průběhu druhé světové války došlo k vývoji další skupiny herbicidů, a to byla fenoxi skupina. Do této skupiny se řadí 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), 2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina (2,4,5-T) a také jejich deriváty, jako jsou kyseliny, soli aminů a estery. Tato skupina byla v té době nejrozšířenější dostupnou skupinou herbicidů roku 1946 (Gupta 1989) a použila se o rok později. Později se zjistilo, že u 2,4,5-T hrozila kontaminace a tvorba vedlejšího produktu 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxinu a došlo k jeho odstranění z komerčního prodeje. Dalšími herbicidy byla bipyridylová skupina, jejichž herbicidní účinky byly objeveny v roce 1955 a komerčně se stala dostupnou v roce 1962 (Smith, 1997). Poté existovaly také triazinové a triazolové herbicidy, ty se využívaly především v zemědělství v USA a jiných místech ve světě více jak 40 let (Steven and Summer, 1991). Další skupinou byly imidazolinonové herbicidy používané od sedmdesátých let, které dostaly americký patent v roce 1980 pro herbicid imazamethabenz-methyl (Hess et al., 2001).

Tyto sloučeniny inhibují specifická cílová místa, která jsou součástí biochemických nebo fyziologických drah u rostlin a mají ve většině případů smrtelné účinky. Většina cílových míst pro herbicidy jsou enzymy, podílející se na primárních metabolických drahách (procesy důležité pro růst a vývoj rostlin). Nebo to mohou být proteiny a ty jsou důležité pro chod fyziologických funkcí. Kromě zmíněných enzymů a proteinů existují další cílová místa, která jsou důležitá pro fungování sekundárního metabolismu. Kdyby však došlo k jejich inhibici, tak je málo pravděpodobné, že by byly pro rostlinu smrtelné. Pokud však herbicidy naruší primární metabolismus, dochází k ovlivnění také sekundárního metabolismu. Herbicidy jsou klasifikovány především na základě působení, které zahrnuje minimálně 16 mechanismů, ovlivňující důležité funkce rostlin. Patří mezi

ně např. fotosyntéza, syntézy mastných kyselin, aminokyselin, proteinů a pigmentů. Dále sem patří hormonální systém, buněčný cyklus nebo tvorba buněčné stěny.

V současnosti se herbicidy dělí do dvou velkých skupin na selektivní a neselektivní. Selektivní skupina herbicidů ovlivňuje určité druhy rostlin, a naopak neselektivní skupina má vliv na rostliny bez jakékoliv specifikace. Selektivita herbicidů funguje tak, že narušuje rovnováhu biochemických procesů, které probíhají u plevelů. Patří mezi ně např. fenoxxy herbicidy, které se svou strukturou napodobují indolctovou kyselinu (IAA), vyskytující se v rostlině. Následně tím způsobuje zvýšenou a neregulovanou produkci IAA v rostlině, dochází k nekontrolovatelnému růstu, zesílení, prodloužení a smrti rostliny. Další selektivní herbicidy jsou zaměřeny na fotosyntézu, při které je produkována energie ze slunečního záření. Za normálních okolností by blokování fotosyntézy způsobilo pomalou smrt plevelů, ale je jasné, že tyto herbicidy fungují daleko rychleji. Kromě blokování fotosyntézy může dojít k tvorbě vysoce toxického kyslíku a hydroxylových sloučenin, které se tvoří uvnitř rostliny a zničí buněčné membrány. Po jejich zničení dochází k uvolnění obsahu buňky a následně ke smrti rostliny. Velké množství selektivních herbicidů se váže na enzymy, které katalyzují procesy probíhající v rostlinných buňkách.

Selektivita je ovlivněna několika faktory, jako jsou například aplikační metody, diferenciální absorpce, translokace, sekvestrace v rostlinách a pak ještě rozdíly v citlivosti na aktivním místě a rychlost metabolismu. Existují ještě vnitřní faktory ovlivňující koncentraci herbicidu v rostlinách, a to především rychlost metabolismu, který je ovlivněn aktivitou enzymů a koncentrací vnitřních substrátů. Rostliny dokážou herbicidy metabolizovat na různé meziprodukty a tento proces se skládá ze čtyř fází. První fáze je označována jako konverze, druhá fáze je konjugace, třetí fáze je spojena se sekundární konverzí a transportem do vakuoly a ve čtvrté fázi dochází k ukládání vzniklého metabolitu (Devine et al., 1993; Cole, 1994; Eerd et al., 2003; Yuan et al., 2007).

V průběhu první fáze dochází k chemickým modifikacím molekul herbicidů, mezi které patří oxidace, redukce, hydrolýza, oxygenace nebo hydroxylace. Při tom dochází k navázání funkčních skupin (např. OH, NH₂, COOH) a molekula herbicidu se stává více hydrofilní a méně toxickou (Devine et al., 1993; Eerd et al., 2003; Edwards et al., 2005; Yuan et al., 2007). Aby reakce probíhaly správně, je pro ně důležitá přítomnost enzymů, v tomto případě to jsou monooxygenázy cytochromu P450 (Eerd et al., 2003; Yuan et al., 2007). Tyto enzymy jsou membránově navázané na proteiny, které katalyzují oxidačně-redukční reakce substrátů (Bolwell et al., 1994; Persans et al., 2001; Hatzios & Burgos, 2004; Edwards et al., 2005).

U druhé fáze je sloučenina nebo metabolit, vytvořený v první fázi, konjugován sacharidem, aminokyselinou nebo tripeptidem a dochází ke zvýšení rozpustnosti ve

vodě a ke snížení fytotoxicity (Devine et al., 1993). Mezi mechanismy, které probíhají ve druhé fázi patří především konjugace s glutathionem, homoglutathionem nebo s glukózou (Price, 1957; Carnegie, 1963; McGonigle et al., 1998). Enzymy, které jsou důležité pro spojení glutathionu s metabolitem, např. sulfonylmočoviny, triaziny nebo imidazolinony (Yuan et al., 2007), se nazývají Glutathion-S-transferázy (Devine et al., 1993; Cole, 1994; McGonigle et al., 1998; Eerd et al., 2003).

Ve třetí fázi jsou vytvořené metabolity transportovány do vakuoly pomocí ABC transportérů (Yuan et al., 2007). V této fázi probíhá sekundární konjugace, pomocí které vznikají nefototoxické sloučeniny (Hatzios, 1991) a v poslední fázi dochází k detoxikaci metabolitů a jejich rozdělení do vakuol spojené se složkami buněčné stěny (např. pektin, lignin) (Pillmoor et al., 1984; Langebartels & Harms, 1985; Cole, 1994; Edwards et al., 2005).

2.2 Mechanismus působení herbicidů

Komerční herbicidy působí celou řadou mechanismů účinku, z nichž nejčastější je inhibice fotosyntézy zablokováním vazby proteinu na chinon (D-1) a to způsobí zastavení transportu elektronů. Jiné skupiny herbicidů inhibují protoporphyrinogen oxidasy a bipyridylium s heteropentaleny, které vytváří superoxidové radikály odkloněním energie. Některé skupiny herbicidů způsobují inhibici mitózy vazbou na tubulin. I když je v současné době o herbicidech hodně informací, tak zatím nejsou známy. Některé herbicidy mají i více míst působení. Mechanismy účinku, které působí na mnoha místech metabolických reakcí u rostlin, mají daleko větší rozmanitost působení než insekticidy.

Biosyntéza aminokyselin

Inhibice biosyntézy aminokyselin je způsobena přítomností tří enzymů 5-enolpyruvylshikimát-3-fosfátsyntázy (EPSP syntáza), acetolaktátsyntázy (ALS, známá jako aceto-hydroxykyselinová syntáza) a glutamin syntetázy (GS). Tato místa jsou pevně dána pro působení některých tříd herbicidů. Existuje však více míst, kterými ovlivňují herbicidy biosyntézu aminokyselin anebo jsou i skupiny herbicidů, které mají vliv na enzymy biosyntézy. EPSP syntáza slouží k syntéze aromatických aminokyselin. Tento enzym funguje primárně v plastidech, ale je funkční i v cytoplasmě (Duke, S. O., 1988). Při zablokování zmíněného enzymu dochází k velkému nahromadění shikimátu v poškozené části rostliny (Pinto et al., 1988). Pokud vezmeme v úvahu jen enzym EPSP syntázu, tak existuje jen jedna sloučenina glyfosátu, která je schopná inhibovat jeho funkci a fungovat jako herbicid.

Dalším enzymem je ALS, který slouží k tvorbě aminokyselin s rozvětveným řetězcem jako je např. leucin, isoleucin a valin. Tento enzym katalyzuje dvě reakce: kon-

denzuje dvě molekuly pyruvátu na CO_2 a α -acetolaktát a v druhé reakci molekulu pyruvátu s α -ketobutyratem a vzniká opět CO_2 a 2-acetohydroxybutyrát. Enzym ALS je schopen inhibovat sulfonylmočoviny (Beyer et al., 1988), imidazolinony a 1,2,4-triazolpyrimidiny (Kishore and Shah, 1988). První dvě skupiny sloučenin jsou komercializované, ale u poslední skupiny se teprve zvažuje o komercializaci. U tohoto enzymu se herbicidní složka váže reverzibilně na ALS-FAD-thiamin pyrofosfát-Mg²⁺-dekarboxylovaný komplex pyruvátu a soutěží také o další vazebné místo na pyruvátu. Sulfonylmočoviny jsou složeny z arylové skupiny a heterocyklu, ve kterém se nachází dusík. Arylová část se označuje jako fenyl, který je v ortho poloze substituovaný halogenem, karboxymetylovou nebo karboxyethylovou skupinou. Její aktivita je dána skupinami, které se na ni můžou navázat a jsou to thiofenové, furanové, pyridinové nebo naftalenové skupiny. Musí však být navázané pouze v ortho pozici, aby byla aktivita co nejvyšší. Pokud by došlo k jakékoliv modifikaci sulfonylmočovinného můstku, způsobilo by to snížení aktivity. Imidazolinony nejsou tak účinné jako sulfonylmočovinné sloučeniny, protože se nejdříve musí navázat pyruvát na ALS a potom se naváže herbicid. Aby byly imidazolinony co nejúčinnější, musí mít ve struktuře uhlík, který sousedí s karbonylovým uhlíkem imidazolinového kruhu substituovaný methylovou nebo isopropylovou skupinou (Los, 1987).

Fotosyntéza

Proces fotosyntézy je cílem více tříd herbicidů než u jakéhokoliv metabolismu a působí jako fotosyntetické inhibitory. Tyto inhibitory se vážou na strukturu D-1, což je protein, který se váže na chinon (dříve Q_B protein) a způsobuje zablokování fotosyntetického transportu elektronů (Fedtke and Trebst, 1987). Mezi skupiny herbicidů, které se na protein váží patří anilidy, benzimidazoly, biskarbamáty, pyridazinony, triazindiony, triaziny, triazinony, uracily, substituované močoviny, chinony, hydroxybenzonnitrily a několik neklasifikovaných heterocyklů (Fedtke, 1982). Přirozeně se vyskytující plastochinon se váže na D1 protein v místech, kde se nachází histidin-215 a serin-264. Herbicidy, které působí na tomto proteinu lze rozdělit podle toho, jestli se vážou blíže místu, kde se nachází serin nebo histidin. I přesto, že mají herbicidy odlišnou charakterizaci, tak nejsou jejich rozdíly objasněné (Trebst, 1987).

Biosyntéza lipidů

Do procesu biosyntézy lipidů je zapojeno několik skupin herbicidů (Duke and Kenyon, 1988; Wilkinson, 1988), kdy bylo dokázáno, že působí v metabolismu lipidů. Bylo zjištěno, že aryloxyfenoxyalkanové kyseliny (Burton et al., 1987; Secor and Cseke, 1988; Kobek et al., 1988) a cyklohexandiony (Burton et al., 1987; Secor and Cseke,

1988; Kobek et al., 1988; Focke and Lichtenthaler, 1987; Rendina and Felts, 1988) způsobují inhibici acetyl-CoA-karboxylázy. Tento enzym, který se vyskytuje ve většině trávníků, je citlivý ke zmíněným skupinám herbicidů, ale mechanismus inhibice enzymu acetyl-CoA-karboxylázy není doposud známý. Aktivita herbicidu je dána strukturou, obsahující kyselinu propionovou spolu se skupinou, která má více než jeden kruh připojený k asymetrickému nekarbonylovému uhlíku propionové kyseliny, kdy R enantiomer je více aktivní než S enantiomer. Kruhová struktura spojená s kyselinou je připojena k dalšímu kruhu pomocí esterové vazby.

Dělení buněk

Existuje velké množství herbicidů, které mohou inhibovat dělení buněk, ale u většiny z nich není známý mechanismus jejich účinku. Výjimku tvoří pouze amidy fosforu a dinitroanilin. Jsou to jediné skupiny herbicidů, které jsou schopné inhibovat dělení buněk na jejich molekulárních místech důležité pro dělení (Hess, 1987). Tyto herbicidy se vážou na protein tubulin, který vytváří mikrotubuly cytoskeletu buňky a jsou také důležité při buněčném dělení. Obě zmíněné skupiny herbicidů způsobují inhibici polymerizace tubulinu in vitro (Vaughn et al., 1987). O konkrétním vazebném místě na tubulinu, kam se tyto herbicidy vážou není vůbec známo. Možnými vazebnými místy herbicidů na tubulinu jsou proteiny asociované s mikrotubuly.

Biosyntéza karotenoidů

Karotenoidy jsou fotosyntetická barviva, řadí se do tetraterpenoidů, která chrání rostlinu před fotooxidací. Pokud by však došlo k zablokování syntézy terpenoidu v jakémkoliv bodě, tak dojde k inhibici syntézy karotenoidů, které se tvoří v pozdější fázi a existuje jen několik herbicidů nebo skupin inhibujících syntézu karotenoidů. Patří mezi ně substituované pyridazinony, fenyloxybenzamidy, fluridon, difunon a 4-hydroxypyridiny. Tyto sloučeniny inhibují syntézu fytoenu a fytofluenu pomocí desaturázy, to je označení pro necharakterizovaný enzym nebo určitou enzymovou skupinu (Ridley, 1982; Sandman, 1987). Ze všech těchto skupin herbicidů je pouze skupina izoxazolidinonů komercializována a inhibuje syntézu karotenoidů (Duke et al., 1985). Do této skupiny patří clomazon, který blokuje isopentenylpyrofosfát izomerázu nebo prenyl transferázu (Sandmann and Boger, 1987), ale v rámci enzymů syntézy terpenoidů v rostlinách není známo moc informací o jejich mechanismu (Chang et al., 1987).

Fotoherbicidy

Existuje několik skupin herbicidů, které způsobují bělení zelené tkáně u rostlin pomocí světla. Jedna z těchto skupin je redukována pomocí fotosystému I (PS I) na radikál a

následně dochází ke snížení molekulárního kyslíku na superoxidový radikál. Pokud se rostlina nemůže ochránit před superoxidovým radikálem, tak dochází k peroxidaci lipidů a vybělení listů pomocí světla. Jen jediná skupina herbicidů s tímto účinkem byla komercializována, a to bipyridylium včetně paraquatu a diquatu (Halliwell, 1982). Existují i další skupiny, které působí stejným způsobem jako předchozí herbicidy a jsou to například heteropentaleny (Camilleri et al., 1987). Jsou také ale skupiny herbicidů, které navodí vybělení světlem různými mechanismy nezávislými na fotosyntéze (Duke, 1987; Duke et al., 1989; Matringe and Scalla, 1988). Nejdůležitější skupinou jsou p-nitrodifenylethery (DPE), oxadiazoly a N-fenylimidy. Žádná ze zmíněných sloučenin nefunguje jako fotosyntetický pigment, ale nedávno bylo zjištěno, že DPE a skupiny herbicidů s podobnými vlastnostmi způsobují akumulaci protoporphyrinu IX (Duke et al., 1989; Matringe and Scalla, 1988; Lydon and Duke, 1988; Witkowski and Halling, 1988). Zmíněná akumulace inhibuje protoporphyrinogenové oxidázy, které vedou k autooxidaci protoporphyrinogenu na protoporphyrin IX (Matringe et al., 1989; Matringe et al., 1989).

Jiná místa působení

Existují herbicidy, které mohou způsobit inhibici biosyntézy mikrotubulů a celulózy. Mikrotubuly tvoří cytoskelet buněk, který má důležitou úlohu při dělení buněk (Fedtke 1982; Sterrett and Fretz 1975). Tuto inhibici způsobuje karbamátový herbicid asulam, který blokuje syntézu folátu a tím dochází k inhibici enzymu 7,8-dihydropteroát syntázy (Kidd et al., 1982, Veerasekaran et al., 1981). Biosyntéza celulózy, která je součástí buněčné stěny, je inhibována herbicidem dichlobenilem (Delmer, 1987).

Bioaktivace

Existují herbicidy, které svoji aktivitu získají až jejich metabolizací v rostlině. Tímto způsobem mohou být proherbicidy stabilnější, lépe absorbovány nebo translokovány, selektivnější pro rostliny nebo se mohou snadněji syntetizovat než jeho účinná složka. Jakmile je herbicid v rostlinné buňce metabolizován, změní se na aktivní formu, která může blokovat metabolické dráhy (Casida, 1983). Jako příklad můžeme uvést aryloxy-fenoxyalkanovové kyseliny, aplikované jako methylestery, které však neúčinkují na acetyl-CoA-karboxylázu. Jakmile se dostane sloučenina do rostliny, tak je ester hydrolyzován na aktivní složku herbicidu. Jako estery se často využívají fenoxyalkanové kyseliny, které snadněji prochází přes vnější vrstvy pokožky rostlin než ve formě kyseliny. Další příklad herbicidů, který funguje na stejném principu je benzadox, inhibující aminotransferázy, dále kyselina aminoxyoctová (Nakamoto et al., 1982), bialofos přeměňující se na glufosinát a methazol převádějící se na močovinový herbicid.

2.3 Skupiny herbicidů

2.3.1 Fenoxxy herbicidy

Tyto herbicidy patří mezi nejrozšířenější skupinu herbicidů na světě a jejich komerční dostupnost je více jak 60 let. Jsou to syntetické analogy růstového hormonu auxinu, který se vyskytuje u rostlin. Nejznámější herbicid v této skupině je 2,4-dichlorfenoxxyoctová kyselina (2,4-D) a dále sem ještě patří kyselina 2,4,5-trichlorfenoxxyoctová (2,4,5-T), kyselina 2-methyl-4-chlorfenoxxyoctová (MCPA) a kyselina methylchlorfenoxxypropionová (MCPA). Všechny zmíněné kyseliny mají stejnou základní strukturu, která se skládá z aromatického kruhu a karboxylového řetězce.

2,4-dichlorfenoxxyoctová kyselina (2,4-D)

Tato kyselina se řadí mezi organokovové sloučeniny a používá se jako selektivní systémový herbicid. Jeho soli jsou velmi dobře absorbovány kořeny a následně transportovány do meristematičtých tkání kořene (Tomlin, 1994). V něm se 2,4-D hromadí a funguje zde jako rostlinný hormon auxin, což vede k nekontrolovatelnému růstu meristematičtých buněk. Poté dochází k zabránění syntézy DNA a bílkovin, které vede k narušení růstu a vývoje rostlin. Patří mezi nejběžněji užívané herbicidy (Copping, 2002; Watkins, 2002).

2,4-D způsobuje poškození rostlin jako např. zkroucení stonku a řapíku, nebo různé malformace listů ((23) Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority, APVMA, "The reconsideration of approvals of the active constituent 2,4-D, registrations of products containing 2,4-D and their associated labels," Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority, Canberra, Australia, 2006). Tato sloučenina je dostupná ve formě solí a esterů, mezi které patří 2,4-D dimethylaminová sůl nebo 2,4-D-butylester, kdy každá z těchto sloučenin má jiné fyzikální a chemické vlastnosti ((22) Environmental Protection Agency, (EPA), "Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D. List A: Case 0073," 2005).

2.3.2 Triaziny a triazoly

Triaziny se řadí mezi největší skupinu herbicidů a triazoly, které jsou blízce příbuzné se využívají v zemědělství a farmacii jako fungicidy nebo insekticidy. Jedna triazinová sloučenina může být použita ve farmacii při chemoterapii a slouží jako alkylační činidlo. Triaziny jsou syntetizovány pomocí reakce kyanorchloridu s příslušným alkylationem, pokud jsou přítomné kyselé akceptory. Triazinový kruh je stabilní vůči degračdním procesům jako je např. biologická degradace nebo fotolýza. Herbicidní účinky jsou aktivní, pokud se ve struktuře vyskytují substituenty na poloze 2 u uhlíku, kdy mezi nejčastější substituenty patří Cl, OCH₃ nebo SCH₃. Pokud je ve struktuře přítomný Cl,

tak má herbicid nižší rozpustnost ve vodě než za přítomnosti zbylých dvou substituentů. Nejčastěji se vyskytují N-alkylové substituenty, ale mohou být i jiné a vyskytovat se na vazbách C-4 a C-6. Všechny triaziny mají společný mechanismus pro herbicidní aktivitu, a to je inhibice Hillovy reakce fotosyntézy. U různých druhů rostlin se liší jejich citlivost na triaziny nebo jejich samotná toxicita.

Amitrol (3-amino-1,2,4-triazol)

Amitrol nepatří do skupiny triazinů, i když sdílí jejich určité vlastnosti jako je např. herbicidní aktivita, která inhibuje Hillovy reakce ve fotosyntéze. Kromě Hillových reakcí inhibuje také cytochromy P450. Patří spíše mezi triazoly, protože je tvořen pětiatomovým heterocyklickým kruhem. Na rozdíl od pesticidů je amitrol velmi dobře rozpustný ve vodě, ale nerozpustný v organických rozpouštědlech a patří mezi neselektivní herbicidy, to znamená, že zabíjí veškeré rostliny, se kterými přijde do kontaktu. Na rozdíl od rostlin není pro savce tolik toxický.

Atrazin

Patří mezi preemergentní a postemergentní herbicidy a začal se využívat v roce 1957. Je to bílá krystalická látka, která má vysokou teplotu tání (173–175 °C), je rozpustná ve vodě při 27 °C, v methanolu a chloroformu. Jeho hydrolýza probíhá za přítomnosti alkalických nebo minerálních kyselin při vyšší teplotě, ale udržuje stabilitu při působení slabé kyseliny nebo báze. Používá se pro obecnou a selektivní kontrolu plevelu u některých plodin jako je např. čirok, cukrová třtina, kukuřice nebo ananas.

2.3.3 Fenyльмоčovinové herbicidy

Patří mezi skupinu nejpoužívanějších herbicidů na světě, využívají se v zemědělství, ale také v jiné oblasti, například k likvidaci plevelu v okolí železnic. Fenyльмоčovinové herbicidy mají vysokou rozpustnost ve vodě a nízkou sorpční schopnost do půdy. Tyto herbicidy jsou odolné proti chemické degradaci za mírné teploty, což znamená, že degradace neprobíhá v půdě. Může ale probíhat za přítomnosti slunečního záření (Gerecke et al., 2001; Kulshrestha and Mukerjee, 1986), kdy dochází k částečné degradaci za vzniku produktů akumulovaných v prostředí (Remde and Traunspurger, 1994; Tixier et al., 2000; Tixier et al., 2002). Kromě chemické degradace fenyльмоčovinových herbicidů dochází také k jejich rozkladu pomocí mikrobiologických procesů, k mineralizaci fenylového kruhu a ke vzniku metabolitů. Ty mohou vstoupit do metabolismu mikroorganismů, kde vzniká CO₂ spolu s biomasou (Bending et al., 2003; Sørensen and Aamand, 2001; Sørensen et al., 2001). U některých herbicidů a jejich

metabolitů se zjistilo, že mohou znečišťovat slanou i sladkou vodu (Field et al., 1997; Spliid and Køppen, 1998; Gerecke et al., 2001).

Tyto herbicidy se dostávají do životního prostředí několika způsoby jako je např. kontaminace zdroje (Johnson et al., 2001; Gooddy et al., 2002). Po jejich zavedení do zemědělství, dochází k rozkladu herbicidů, které zahrnuje transport vodou, sorpci do půdních složek a některé degradační procesy. Degradace zahrnuje biotické i abiotické procesy, které jsou usnadněny pomocí biodegradace a poté následuje rozklad aromatických sloučenin na anorganické produkty (Alexander, 1981). Tato skupina herbicidů se vyrábí a prodává pod různými názvy jako je buturon, linuron, diuron, fenuron, siduron atd (Kiely et al., 2004). Herbicidní účinek těchto chemických sloučenin je především inhibice fotosyntézy, a to konkrétně fotosystému II. Fotosystém II je složen z multipodjednotkových enzymů a obsahuje také reakční centrum složené z několika proteinů D1, D2, CP43, CP47 a komplexu, které získává světlo (Rhee et al., 1998). Fenylmočovinné herbicidy se vážou na D1 protein a tím dochází k inhibici transportu elektronů (Arnaud et al., 1994).

Monuron (N, N-dimethyl-N-(4-chlorfenyl)-močovina)

Je známý jako N, N-dimethyl-N-(4-chlorfenyl)-močovina a označuje se jako první fenylmočovinný herbicid, který se začal používat. Používá se jako inhibitor fotosyntézy a slouží ke kontrole plevelu v oblastech, kde se nevykonávají zemědělské práce. Má velmi dlouhou životnost v prostředí, která může být až 10 měsíců (Khan, 1980), ale s tím souvisí problém, protože existuje riziko kontaminace vod. O jeho fotoreaktivitě a absorpci k půdním částicím neexistuje příliš mnoho informací.

Diuron (DCMU, *N'*-(3,4-dichlorophenyl)-*N,N*-dimethylurea)

Diuron je bílá krystalická látka bez zápachu s bodem tání (158-159 °C), bodem varu (180-190 °C) a je stabilní při působení kyslíku a vlhkosti (Worthing, 1983). Bylo zjištěno, že je to dihalogenovaný substituovaný močovinný herbicid. Používá se jako herbicid na místech, kde se nepěstují zemědělské plodiny (Kiely et al., 2004), ale využívá se v místech, kde se vyskytují ovocné stromy, bavlna nebo cukrová třtina (U.S. Agentura pro ochranu životního prostředí (EPA), 2003).

Protoporfyrinogen oxidáza (PPO)

Je to enzym, který se vyskytuje v biosyntetické dráze vedoucí ke vzniku hemu a chlorofylu (Poulson and Polglase, 1975; Arnould et al., 1999; Hao et al., 2011). Tento enzym byl nalezen kromě rostlin také u živočichů, hub a bakterií a patří do skupiny enzymů, které jsou spojené s membránou. U rostlin existují dvě formy plastidový

PPO1, který se nachází v thylakoidu a mitochondriální PPO2 (Lermontova et al., 1997), se nachází na vnější straně vnitřní membrány mitochondrií. U rostlin je PPO detekován jako cíl pro tvorbu různých skupin herbicidů jako jsou např. difenylethery (Hao et al., 2011), fenylpyrazoly (Koch et al., 2004), oxadiazoly (Gitsopoulos and Froud-Williams, 2004), triazolinony (Theodoridis, 1997), thiadiazoly (Hiraki et al., 2001), pyrimidindiony (Theodoridis et al., 2000), oxazolidindiony (Hirai et al., 1989), N-fenylftalimidy (Lyga et al., 1991) a další (Simmons et al., 1992). Kromě toho má tato skupina herbicidů několik výhod jako je např. nízká toxicita, nízká účinná koncentrace, široké spektrum plevelů, rychlý a dlouhodobý účinek na rostliny. Pokud zmíněnou skupinu porovnáme s jinou skupinou herbicidů, tak inhibitory PPO vytváří pomalejší rezistenci k plevelům.

2.4 Využití herbicidů

Herbicidy se používají k likvidaci škodlivých rostlin – plevelů. Důležitá vlastnost herbicidů je ta, aby byly toxické pro plevel ale ne pro plodinu. Příkladem je použití velmi běžného herbicidu 2,4-D, který je toxický pro více druhů plevelů, ale pro plodiny jako např. pšenice, kukuřice nebo ječmen není toxický. Tímto způsobem se rozlišují herbicidy na dvě velké skupiny, a to na selektivní a neselektivní, kdy 2,4-D patří do první skupiny. Škodlivé rostliny soutěží s plodinami především o světlo, vodu, živiny a také prostor. V rámci této interakce mezi plevellem a plodinou může vést ke snížení produkce a jejich následných výnosů.

Vedlejší účinky herbicidů

Herbicidy slouží primárně k likvidaci plevele, ale mohou mít vedlejší účinky na jiné organismy jako jsou např. savci včetně člověka. Při nesprávném použití jsou pro zmíněné organismy nebezpečné. Mohou způsobit respirační problémy, kdy dojde k poškození dýchacích cest včetně nosu, hrdla nebo plic. Například paraquat (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid) je toxický herbicid, který v 70. a 80. letech způsobil popáleniny v krku, krvácení z nosu a respirační obtíže. V horších případech dochází k tvorbě otvorů v jícnu nebo k plicní fibróze a při pozření malého množství může dojít i ke smrti. Kromě poškození dýchacích cest způsobuje také zvýšenou tvorbu vzniku vrozených vad u nenarozených dětí jako je např. rozštěp, mentální retardace nebo prst navíc. Dalším problémem je rakovina, která může být některými herbicidy vyvolaná jako je např. agent orange (je to označení pro 2,4-D a 2,4,5-T). Ten se dříve používal jako defoliant a řadí se mezi jedny z nejnebezpečnějších herbicidů, protože může vést k tvorbě rakoviny nebo abnormalit.

2.5 Přírodní herbicidy (produkty)

Jsou to látky tvořené především z olejů (např. eugenol a d-limonen), mýdla (např. kyselina pelargonová) nebo kyseliny octové, které ničí kutikulu listů plevelu nebo způsobují únik buněk, a to následně vede ke smrti rostliny. Tento typ herbicidů zabíjí pouze zelené části rostlin, a proto nemají kontrolu nad nezelenými částmi rostlin, jako jsou kořeny, hlízy nebo oddenky a po následném ošetření většina rostlin přežije. Na rozdíl od přírodních produktů, herbicidy typu glyfosát nebo 2,4-D napadají kořeny a podzemní části rostlin a to vede k jejich usmrcení. Tyto herbicidy se aplikují po prvním výskytu plevelu a nezůstává po nich v půdě žádná aktivita. Rostliny zabíjí tak, že rozkládají rostlinné membrány, proto mohou být označovány jako kontaktní herbicidy. Aby byly co nejúčinnější, tak musí zahubit celou nadzemní část nebo větší část rostliny. Používají se především na menší druhy plevelu, které rostou celoročně nebo v puklinách. Uvedené herbicidy jsou tvořeny na bázi olejů WeedZap, Bioganic Broadleaf Killer nebo na bázi kyseliny octové WeedPharm, Grass Killer.

Výhody a nevýhody přírodních herbicidů (produktů)

Velké množství produktů vzniklo reakcemi z biotické interakce, a proto je pravděpodobné, že budou mít tyto produkty vyšší biologickou aktivitu než produkty vytvořené chemickou syntézou. Biologická aktivita může být použita v úplně jiné molekulární oblasti, než ve které by měla být aktivní. Velké množství sekundárních metabolitů ještě musí být objeveno, protože je známo málo přírodních sloučenin, kde byla prozkoumána jejich biologická aktivita, především fytoxicita a je velmi zajímavá vyhlídka nových sloučenin, u kterých nebyla studována jejich biologická aktivita.

Auxinové herbicidy, mezi které patří 2,4-D a MCPA, se využívají hlavně v zemědělství k likvidaci plevelů u obilovin nebo v neagrikulturních oblastech. Svě jméno získaly podle rostlinného hormonu auxinu neboli indol-3-octová kyselina (Sterling and Hall 1997). Jsou podle něj pojmenovány proto, že při nižších koncentracích napodobují jeho fyziologické a biochemické účinky. Auxinové herbicidy mají podobnou strukturu jako auxin, liší se v poloze karboxylové kyseliny. Podle typu aromatické skupiny se dělí do tří skupin (Ashton and Crafts 1981) a to na fenoxycarboxylové kyseliny, kam patří např. 2,4-D. Do druhé skupiny patří benzoové kyseliny, která zahrnuje např. dicamba a chloramben a ve třetí skupině jsou pyridinokarboxylové kyseliny, mezi které patří picloram, nebo triclopyr. Tyto herbicidy se řadí mezi první selektivní organické herbicidy, protože byly vytvořeny již během druhé světové války, a proto došlo ke zvýšení tvorby 2,4-D nejen v Severní Americe, ale i ve světě (Kirby 1980). Sloučenina 2,4-D měla takový úspěch, který vedl k syntéze dalších sloučenin, např. dicamba, clopyralid nebo picloram (Sterling and Hall 1997). Auxinové herbicidy nejsou příliš nákladné a

patří mezi nejrozšířenější herbicidy. Je to dáno jejich selektivitou, účinností, širokému spektru kontroly plevelu a nízkým nákladům na aplikaci (Industry Task Force II, 2005). V nedávné době byla vytvořena další skupina herbicidů chinolinkarboxylové kyseliny, které se řadí do auxinových herbicidů, protože mají podobnou aktivitu jako auxin (Grossman 2000, 2010).

2.6 Syntetické herbicidy

Syntetické auxinové herbicidy se používají jako prostředek pro likvidaci širokého spektra plevelu, který se vyskytuje v travních porostech nebo pastvinách. Tyto herbicidy jsou známy jako růstové regulátory, snadno se absorbují kořeny a listy. Následně jsou přemístěny do meristemických buněk a lokalizovány pomocí xylému nebo floému. Tento proces herbicidů vede k abnormálnímu růstu kořenů a stonků. Účinek herbicidů není daný pouze jedním faktorem, ale je způsobený narušením několika procesů u rostlin. Primárně herbicidy působí na elasticitu buněčné stěny a metabolické děje nukleových kyselin, ovlivňují také syntézu proteinů, dělení buněk, růst a podporují tvorbu ethylenu. Syntetické auxinové herbicidy obsahují několik skupin, jako jsou benzoové, fenoxycarboxylové, pyridinkarboxylové a chinolinkarboxylové kyseliny, které mají podobný účinek jako endogenní auxiny.

2.7 Inhibice klíčení a růstu

Klíčení

Klíčení semen je označováno za důležitý životní stupeň vývoje rostliny a je považováno jako determinant tvorby rostlin. Klíčení začíná absorpcí vody, dále se hromadí zásobní látky, syntetizují se bílkoviny a dochází k výstupu radikuly (Hasanuzzaman et al., 2013). Aby došlo ke správnému vývoji semen, tak dochází k uchování látek, mezi které patří proteiny, lipidy a sacharidy (Borgheretti and Ferreira, 2000). Například u olejnatých semen jsou hlavním zdrojem energie, uhlíku a dusíku bílkovinné a olejové látky (Zienkiewicz et al., 2014), zatímco škrob a proteiny jsou lokalizovány v endospermu. Bohužel fyziologie hromadění zásob a procesy klíčení nejsou zcela známy, a proto musí být provedeny studie těchto mechanismů (Gonçalves et al., 2003). Hydrolyza proteinů, lipidů a sacharidů probíhá pomocí enzymů a následný transport metabolitů je závislý na množství vody (Bewley and Black, 1994). Během klíčení nastávají fyziologické, biochemické a poté i morfologické změny, které úzce souvisí s přežitím semínek a vegetativním růstem rostlin.

Klíčení lze rozdělit do tří fází: první fáze je vstřebávání vody semenem, v druhé fázi dochází k reaktivaci metabolismu (je nejkritičtější) a třetí fáze je tvorba radikuly (Bewley, 1997). Mezitím co dochází k reaktivaci metabolických procesů jako je hydro-

lýza, biosyntéza makromolekul nebo respirace, tak dochází k prodlužování buněk a následnému nastartování klíčení (Bewley et al., 2013). Klíčení semen je bráno jako vzájemná interakce mezi embryem a endospermem, protože endosperm uvolňuje signály, které mají vliv na růst embrya (Lee et al., 2010). Klíčení semen je také citlivé na stresové podmínky prostředí, mezi které patří např. soli nebo voda (Carter and Chesson, 1996). Pokud by semena byla slaná a tolerantní k suchu, tak vykazují vysokou rychlost klíčení, což zvyšuje jejich výnosnost (Munns, 2002). Naopak pokud je přítomna voda a sůl dochází k redukci a zpoždění klíčení semene (Singh et al., 2012).

Existuje několik definic na pojem klíčení a je důležité, abychom odlišily rozdíly popisu. Klíčení (klíčivost) je definováno jako vznik radikuly, která se dostává přes vrstvu semene ven. V této definici se nemluví o jiných částech rostliny jako jsou epikotyl nebo hypokotyl. U analytiků je klíčení popisováno jako vznik a vývoj embrya základních struktur, které jsou typické pro určitý typ semene, ze kterého dojde k tvorbě rostliny za příznivých podmínek. Jiná definice zase popisuje klíčení jako obnovení aktivního růstu embrya, které způsobuje protržení vrstvy semene a vzniká nová rostlina. U této definice je to míněno tak, že po vzniku a vývoji semene dochází k procesu klidu nebo odpočinku, kdy je semeno málo aktivní a probíhají v něm minimální metabolické procesy. Ve stavu klidu může zůstat do té doby, než budou okolní podmínky optimální pro jeho růst.

Morfologie klíčení semen

Existují dva typy klíčení semen, které jsou popsány na semenech fazole a hrachu, a přestože je jejich struktura semen podobná, tak je jejich klíčení úplně odlišné. Epigeální klíčení (klíčivost) je typické pro semena fazole a borovice a je primitivnější než druhý typ klíčení hypogeální. V průběhu klíčení jsou kotyledony nad zemí a poskytují živiny pro rostoucí semeno. Při tvorbě kořenů dochází k prodlužování hypokotylu do oblouku, posouvá se kotyledon spolu s plumulou nad půdu, kotyledony se otevrou, plumula dále roste, a nakonec kotyledony spadnou do půdy. Druhý typ klíčení je hypogeální, který je typický pro hrách a všechny traviny jako je např. kukuřice. Na rozdíl od epigeálního klíčení zůstávají kotyledony pod půdou, naopak plumula roste nahoru nad zem a epikotyl vytváří protáhlou strukturu semene. Kotyledony i nadále poskytují nadzemním i podzemním částem látky, které potřebují ke klíčení a následnému růstu.

Podmínky pro klíčení semene

Jako první je uvedena voda, která tvoří základ pro klíčení semene, protože je důležitá pro aktivaci enzymů a také slouží jako rezervní skladovací materiál. V klidovém stavu mají semena nízký obsah vody a také málo aktivní metabolismus. Tato semena dokážou udržet stále nízkou aktivitu metabolismu, a to je velmi důležité

pro jejich dlouhodobé přežití nebo skladování. S tím souvisí také vlhkost okolního prostředí, která se mezi jednotlivými druhy liší. Většina semen má během klíčení kritický obsah vlhkosti, u kukuřice je to 30 %, u pšenice 40 % a u sóji 50 %. Při dosažení kritického obsahu vlhkosti, tak může začít klíčení semene, protože obsahuje dostatečné množství vody, ale je to nevratný proces. Pokud by nastala situace, že by hodnota vlhkosti klesla pod kritickou hodnotu, způsobilo by to rozpad semen. Klíčení je také ovlivňováno teplotou okolí, protože obsahuje několik reakcí a každá z nich probíhá za rozdílné teploty.

O tom, jak úspěšné klíčení bude, závisí na teplotních oblastech, které se dělí na teplotní minimum, optimum a maximum, kdy dochází ke klíčení. Minimální teplota není přesně definovaná, protože klíčení může probíhat, ale velmi pomalu. Optimální teplota je dána tím, že poskytuje nejvyšší procento klíčivosti za nejkratší čas a maximální teplota je taková teplota, při které dochází k denuraci proteinů důležitých pro klíčení semene. Pro většinu semen je optimální teplota kolem 15–30 °C a maximální teplota bývá mezi 30–40 °C. Teplotní odezva závisí na několika faktorech jako je např. odrůda, pěstitelská oblast nebo kvalita semen. Obecně platí, že semena, která se vyskytují v mírných oblastech potřebují nižší teplotu než semena, která se nachází v tropických oblastech.

Tento proces je složený z pěti kroků, ke kterým dochází v průběhu klíčení semene: vstřebávání, respirace, účinek světla na klíčení, shromažďování zásob při klíčení, regulátory růstu semene a vytvoření embryonální osy při vzniku sazenice. Jako první proces je vstřebávání vody semenem, což způsobuje jeho nabobtnání, protože buňky uvnitř se tímto způsobem hydratují. Dochází k hydrataci makromolekul, které se ukládají ve formě polysacharidů a proteinů do buněčné stěny. Tyto sloučeniny se nevyskytují v jiných částech rostliny. Bobtnání semene má velkou sílu, které rozruší vrstvy buněk, a to způsobí proniknutí ven ve formě primárního kořene. Druhý proces je dýchání (respirace), které je ze začátku anaerobní kvůli energii dodávané glykolýzou, ale potom je dýchání už aerobní, protože kyslík se dostane do semene. U semen vodních rostlin jako je např. rýže dochází k přijmutí kyslíku z vody a semena rostlin vyskytující se v půdě, získávají kyslík přímo z půdy. Jako třetí je účinek světla na semena, kdy se dělí na tři skupiny podle toho, jak reagují na světlo: pozitivní fotoblastická, negativní fotoblastická a nefotoblastická.

Pozitivní fotoblastická semena klíčí pouze za přítomnosti světla a ve tmě neklíčí, negativní fotoblastická semena naopak klíčí za tmy a neklíčí působením světla a nefotoblastická semena klíčí nezávisle na přítomnosti světla. U klíčení semen, která jsou závislá na světlo, má největší vliv jeho červená složka, ale daleké červené světlo může zrušit účinek červeného světla a semeno se stává dormantní. Dále sem patří

regulátory růstu a hromadění zásob v semeni, kdy dochází k jejich rozkladu za spotřeby energie, která se získá z aerobního dýchání. Podle toho, o jaký druh semena se jedná, tak se liší i látky uložené především v endospermu nebo kotyledonech. Na povrchu buněk endospermu se nachází aleuronová vrstva, která tvoří a produkuje enzymy (jako např. amylasy nebo proteasy) sloužící k rozkladu zásobních látek v endospermu. Jako poslední je tvorba embryonální osy, která vzniká růstem a dělením buněk pomocí translokace sloučenin a jejich následné asimilace v buňkách.

2.7.1 Inhibitory klíčení semen

Inhibitory jsou chemické látky přírodního nebo syntetického původu, které slouží k zablokování, zastavení nebo přerušení určité chemické reakce. Ovlivňují chemické reakce nejen u rostlin, ale také u živočichů, včetně člověka, my se však budeme zabývat inhibicí klíčení semen u rostlin. Jedním z mála přírodních inhibitorů klíčení je kyselina abscisová (ABA), která mimo jiné slouží k otvírání průduchů, způsobuje dormanci semen nebo reguluje rostlinu při působení stresu (abiotický a biotický) (Moore, 1989; Davies and Jones, 1991; Weyers and Paterson 2001; Popko et al., 2010). Zmíněné funkce ABA mají však pozitivní vliv na funkci rostlin, kromě zmíněného klíčení, kdy už při koncentraci 1–10 mol/l může dojít k inhibici klíčení např. u rostliny *Arabidopsis thaliana* (Kucera et al., 2005; Muller et al., 2006). Na rozdíl od ABA působí ostatní rostlinné hormony pozitivně na klíčení a mají negativní vliv právě na ABA (Kucera et al., 2005; Hermann et al., 2007). ABA může být při stresu rostliny produkována ve formě glukosidázy (Lee et al., 2006) a stejně jako receptory ABA můžou působit i regulátory fosfatázy (Ma et al., 2009). ABA se může pohybovat buněčnou membránou v závislosti na pH a buněčných částicích. Podle těchto podmínek lze předpovědět, jaká bude koncentrace ABA v buňkách. Pomocí experimentů bylo prokázáno, že receptory pro ABA a IAA jsou lokalizovány mimo plasmatickou membránu (Weyers and Paterson, 2001). Pro ABA hraje důležitou roli skupina proteinů PYR/PYL/PAR, která funguje jako receptor (Park et al., 2009) a nedávno byly objeveny další dva G proteiny fungující jako receptory ABA (Pandey et al., 2009). Hlavní úloha ABA a jejich genů je zpoždění šíření radikálů, oslabení endospermu a také zvýšení exprese transkripčních faktorů, které mají negativní vliv na klíčivost semen (Graeber et al., 2010). Pomocí giberelinového represoru RGL2 dochází k inhibici klíčení, a navíc stimuluje produkci ABA (Piskurewicz et al., 2008). Stejnou funkci má i ABA receptor H podjednotka proteinu Mg-chelatáza (Shen et al., 2006) a nedávno bylo navrženo, že G PROTEIN COUPLED RECEPTOR 2 může fungovat jako ABA receptor a mít stejnou funkci jako ABA (Liu et al., 2007b).

2.8 Růst rostlin

Růst rostlin je dán rozdělováním buněk, zvětšováním nově vytvořených buněk a následnou diferenciací na různé typy pletiv. Zmíněné procesy růstu rostlin doprovázejí tyto změny: trvalá změna velikosti (zvětšení délky nebo objemu) a zvýšení množství sušiny v rostoucích částech rostliny. U rostlin probíhá permanentní růst pouze v oblastech meristémů, což jsou dělivá pletiva a nachází se na vrcholcích orgánů (kořen, stonek). Vzrostlé vrcholy kořenů a stonků obsahují primární meristémy a ve starších částech rostliny jsou sekundární meristémy (např. kambium), kde dochází k tvorbě vaskulárních tkání a korkových buněk.

Kinetika růstu (průběh)

Za příznivých podmínek dochází k růstu jednotlivých částí rostlin. Růst je na začátku pomalý (lag fáze), potom dochází ke zrychlení (log fáze) a nakonec se opět zpomaluje, až dojde k jeho zastavení. Celková doba, během které probíhal růst, se označuje jako velké období růstu. Toto období trvá omezenou dobu, kdy dochází ke spotřebě zásobných látek, hromadění toxických produktů a působení vnějších a vnitřních faktorů, a to způsobí snížení množství buněk. Tento proces probíhá tak dlouho, dokud se budou buňky dělit v meristematických pletivech.

2.8.1 Inhibice růstu

Jak už bylo zmíněno u klíčení, tak inhibice je proces, který způsobuje zpomalení nebo zastavení růstu rostlin. Inhibice je řízena chemickými látkami inhibitory ovlivňující procesy nejen u rostlin, ale i u živočichů. Mezi dva hlavní přírodní inhibitory patří kyselina abscisová (ABA) a ethylen. Jako první inhibitor růstu je zmíněna ABA, která se přirozeně vyskytuje v rostlinách a funguje jako přírodní inhibitor nejen růstu, ale také klíčení semen. Tato látka, která je podobná cytokininům způsobuje u rostlin pokles listů (abscise) nebo dormanci pupenů, ale její účinek nebyl doposud objasněn. Předpokládá se však, že způsobuje inhibici syntézy RNA a proteinu. Další studie prokázaly, že dochází k inhibici prodloužení buněk v kořenové tkáni a tím pádem se zastavuje aktivita buněk, ve kterých probíhá mitóza (G1 fáze) (Nagl 1972; de laTorre et al. 1972). Bylo dále dokázáno, že ABA brání růstu nadzemní a podzemní části rostliny a funguje jako antagonist a auxinu (Pilet & Chanson 1981; vanVolkenburgh & Davies 1983; Kutschera & Schopfer 1986; Pilet & Saugy 1987). Tato funkce je ale závislá na koncentraci ABA. Pokud by byla koncentrace vyšší, tak je rychlost růstu pozorovatelná (Saugy et al. 1989), u nízké koncentrace ABA může docházet ke stimulaci růstu kořenů (Pilet & Barlow 1987).

Také se předpokládalo, že účinek ABA je dán vodním stresem, protože v průběhu stresu docházelo k nárůstu endogenní ABA, která vedla k inhibici růstu rostliny (Creelman et al., 1990, Zhang a Davies, 1990). V experimentu s kořeny semenáčků kukuřice bylo sledováno, jak postupně dochází k inhibici prodloužení kořenů. Množství ABA u kořene, v místě prodloužení, bylo zvýšeno použitím určité koncentrace ABA. Při poklesu této koncentrace ABA ve vodě došlo opět k prodloužení kořínků rostlin. Při tomto experimentu byla transpirace nulová, takže nemohlo dojít k nepřímému ovlivnění pomocí stomat (Spollen et al., 2000). ABA působí stejným způsobem také na růst stonku, protože o tom existuje mnoho informací, ale nastává pouze v případě vysušení půdy, ve které rostlina roste, což bylo potvrzeno na experimentu rostliny ječmene (Bacon et al., 1998).

Druhou zmíněnou látkou je ethylen, který se také přirozeně vyskytuje v rostlinách. Je to produkt vytvořený z kyseliny linolenové nebo z methioninu a slouží jako inhibitor růstu rostlin. Hlavní příčinou inhibice růstu je zastavení nebo zpomalení mitotického procesu, který probíhá v meristematických pletivech kořene, výhonků a pupenů (Apelbaum and Burg, 1972; Apelbaum and Burg, 1972). Během několika hodin začíná klesat množství mitotických buněk a za přibližně 10 hodin se mitóza zastaví úplně. Dochází k inhibici mitózy na kořenovém vrcholu a podobný účinek má i 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D), která patří mezi auxiny. Tím, že ethylen (Apelbaum and Burg, 1972) blokuje dělení meristematických buněk před profází, tak dochází ke zpomalení syntézy DNA z thyminu nejen v meristematických buňkách, ale také v růstové zóně stonku (Sfakiotakis, 1972). Existuje určitá souvislost mezi inhibicí syntézy DNA, dělením buněk a růstem, která je způsobena ethylenem v kořeni, stonku a pupenech na etiolovaném hrachu (Apelbaum and Burg, 1972). Ethylen ještě brání procesu lignifikace a zastavuje proces tvorby vláknitých buněk (Apelbaum et al., 1972).

Mezi syntetické inhibitory růstu patří např. kyselina 2,3,5-trijodobenzoová (TIBA), která ovlivňuje globulární embrya tím, že dochází k potlačení axiální a oboustranné polarity. U abnormálních embryí je potlačena tvorba apikálních meristémů u kořenů a stonků, tímto vývojem dochází ke vzniku rostlin bez stonků a kořenů. TIBA je inhibitor auxinů, proto dochází k inhibici růstu a rostliny mají trpasličí vzrůst.

Jinou skupinou inhibitorů jsou morfaktiny, které ovlivňují morfogenezi a expresi rostlin. Morfaktiny patří do skupiny derivátů fluorovaných sloučenin a většinou jsou to syntetické látky, které mají různý vliv na růst a vývoj rostlin. Jejich účinky jsou ovlivněny koncentracemi přirozených hormonů a mohou mít synergické nebo antagonistické účinky na rostliny. Způsobují inhibici klíčení nejen semen, ale i semenáčků, inhibují také prodloužení internodií a ve velkém množství případů vedou k depolarizaci buněk, která vede k deformaci morfogeneze. Mají podobné vlastnosti jako ABA např. indukují

dormanci semen, brání prodlužování kmene apod. Mohou také mít rušivý účinek na fototropismus a geotropismus.

2.9 Alelopatie

Alelopatie je pojem složený ze slov allelo, který znamená „navzájem“ a pathy, to znamená „trpět“ („vzájemné poškození“ nebo „utrpení“) a poprvé byl použit rakouským vědcem Hansem Molischem v jeho knize Allelopathie rostlin na sobě (Willis 2010). Jedná se o typ chemické inhibice, která probíhá na základě uvolňování chemických látek z rostliny do prostředí např. sekundární metabolity a ovlivňují růst a vývoj okolních rostlin. Na alelopatii mohou mít vliv různé faktory, jako jsou např. ekologie rostlin, výskyt, růst, posloupnosti rostlin, dominantnost, rozmanitost a produktivita rostlin.

Povaha alelopatie

Neexistuje žádná chemikálie, která by působila na všechny rostliny stejně, ale jsou určitá specifická místa, kde nejčastěji tyto chemikálie působí. Patří mezi ně snížení klíčivosti semen nebo růstu rostlin, dále dělení buněk, klíčení pylu, fotosyntéza, vychytávání živin apod. Alelopatická inhibice je složitý proces, do kterého je zahrnuto velké množství skupin chemikálií jako např. fenolové sloučeniny, flavonoidy, terpenoidy, steroidy, alkaloidy, aminokyseliny a sacharidy a je známo, že kombinace různých sloučenin má vyšší alelopatický účinek než jednotlivé sloučeniny. Inhibici mohou ovlivnit také podněty z vnějšího prostředí, jako jsou škůdci, teplota, vlhkost, nemoci, herbicidy, sluneční záření atd. Chemikálie, které vznikají při alelopatii, jsou především sekundární metabolity, které jsou uvolňovány rostlinným organismem. Tyto chemické látky jsou důležité také jako ochrana proti býložravcům (Fraenkel 1959; Stamp 2003) a vyskytují se v různých částech rostliny např. v květech, listech, kořenech, kůře, řapíku ale také v půdě a jejich aktivita se mění během vegetačního cyklu rostliny. Pokud se tyto látky nachází v půdě, tak zde mohou přetrvávat delší dobu a mohou ovlivňovat okolní rostliny.

Nejvíce chemických látek se však nachází uvnitř listů. Po spadnutí na zem a následném rozkladu listů se uvolní toxiny do půdy a ovlivní růst rostlin. Jiné rostliny mohou uvolňovat toxiny pomocí kořenů. Alelopatie se vyskytuje nejen u rostlin, ale i stromů, kde se alelopatické látky nejvíce vyskytují v listech nebo v kořenech. Listy jsou toxické, pokud se dostanou do kontaktu s rostlinou a kořeny absorbují více vody než rostliny. Tento jev je typický např. pro ořešák královský nebo rhododendron. Proces alelopatie představuje pasivní prvek ve vzájemné interakci rostlin, pokud to porovnáme z pohledu konkurence mezi určitými druhy rostlin (Reigosa et al. 1999).

2.9.1 Využití a aplikace

Základem pro využití alelopatie je pěstování plodin, které mají schopnost potlačení růstu plevelů. Aby mohla být alelopatie prokázána, musí být stanoven původ rostliny, její produkce a identifikace alelopatických látek, které musí mít dostatečnou koncentraci na ovlivnění rostlin ve svém okolí. Potom jsou získané rostlinné extrakty testovány v laboratoři na klíčivost semen a následně proběhne izolace a identifikace alelochemických látek z půdy. Důležitá je také vzájemná interakce mezi alelopatickými rostlinami, pěstovanými plodinami a jinými necílovými organismy. Alelochemické látky mohou poskytnout základní struktury, ze kterých je možné v budoucnu vytvořit nové syntetické herbicidy. Studie prokázaly přítomnost alelochemických látek potlačujících růst plevelů např. u žita (benzoxanoidy), rýže (diterpenoidní momilaktony), kostřavy (alkaloidy a flavonoidy), nebo u lísky (cyklopropenová mastná kyselina). Aby byla biosyntéza a následné uvolnění alelopatických látek co nejúčinnější, musí dojít k začlenění alelopatických znaků (z pěstovaných plodin) pomocí šlechtění nebo genetického inženýrství do kulturních plodin. Alelopatie má daný genetický základ v pšenici a rýži, protože existují kultivary s alelopatickým potenciálem.

2.10 Fermentace (biotransformace)

Biotransformace zahrnuje chemické reakce katalyzované enzymy vyskytující se v cytoplasmě a fungují jako biologické katalyzátory (Lilly, 1994). Tento typ katalyzátoru může být popsán jen jako enzym nebo inaktivovaný mikroorganismus, který obsahuje jeden nebo skupinu enzymů. Kromě enzymů mohou reakce katalyzovat také rostlinné buňky nebo orgány, které je možné použít k tvorbě chemických látek (Murthy et al., 2014; Talano et al., 2012). U biotransformace probíhá také chemická konverze látek, katalyzovaná biologickými systémy, enzymy nebo rostlinnými orgány (Banerjee et al., 2012; Giri et al., 2001). Jako první tento pojem použil francouzský chemik a mikrobiolog Louis Pasteur pro proces, vyvolaný kvasinkami nebo mikroorganismy za nepřítomnosti kyslíku. Dochází přitom k modifikaci funkčních skupin sloučenin pomocí živých buněk a ke vzniku odlišného produktu. Biotransformace také zkoumá vlastnosti biokatalyzátorů především jejich specifickou a schopnost provádět reakce za optimálních hodnot pH a teploty. Může se také využít k provedení specifických konverzí komplexních substrátů pomocí rostlinných, živočišných nebo mikrobiálních buněk nebo se použijí i purifikované enzymy, které slouží jako katalyzátory.

Biotransformace má vhodnější podmínky k tvorbě nových nebo vytvoření známých produktů. Mezi produkty můžeme zahrnout metabolity, léčiva a chemikálie, které vznikají biotransformací působením biologických katalyzátorů. Pro proces biotransformace jsou vybrány rostlinné buňky, a to ze dvou hlavních důvodů. Za prvé jsou schop-

né katalyzovat reakce stereospecificky a výsledkem jsou čisté produkty. A za druhé provádí modifikace, které se nedají vytvořit chemickou syntézou nebo působením mikroorganismů. Metoda biotransformace využívá enzymatické reakce, mezi které patří hydroxylace, hydrolýza, methylace, acetylace, hydrogenace, esterifikace, izomerizace a oxidoredukce (Giri et al., 2001; Ishihara et al., 2003).

Rychlost biotransformace rostlinnými buňkami závisí na několika faktorech jako je např. rozpustnost prekurzorů, lokalizace enzymů, množství enzymatické aktivity, přítomnost reakcí, které vedou k nežádoucímu vedlejšímu produktu a přítomnost enzymů degradující daný produkt. Biotransformační kapacita buněk může být ovlivněna určitými podmínkami, a to jsou permeabilizace, změna pH, elicitace a osmotické účinky.

Další pojem spojený s biotransformací je biokonverze. Biokonverze využívá katalytickou aktivitu živých organismů, které vytváří velké množství enzymů. Biokonverze a biotransformace jsou velmi často zaměnitelné, protože je mezi nimi velmi malý rozdíl (Walker and Cox, 1995). Biotransformační procesy patří mezi rozmanité procesy, protože v nich funguje větší množství mikroorganismů nebo enzymů, které slouží k tvorbě různých látek (Leresche and Meyer, 2006; Tang et al., 2005).

Mikrobiální fermentace se může rozdělovat podle množství produktů na jeden (homofermentativní) nebo na více produktů (heterofermentativní). Hlavními produkty fermentace jsou organické kyseliny, ethanol a oxid uhličitý. Jako komerční produkt je nejdůležitější kyselina mléčná a alkohol. Mezi mikroorganismy, které způsobují fermentaci, patří fermentační bakterie *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Bacillus* tvořící kyselinu mléčnou, dále jsou zde *Escherichia* a *Salmonella*, které produkují více produktů jako je ethanol, kyseliny mléčnou, jantarovou a octovou, oxid uhličitý a vodík.

2.11 Frakcionace (Bioassay-guided fractionation)

Frakcionace (izolace) řízená biologickou aktivitou je proces, který slouží k identifikaci biologicky aktivní látky z extraktu. Po této frakcionaci nastává testování získaných frakcí a dále jsou frakcionovány pouze frakce, které byly aktivní. U každé separace (frakcionace) se každá frakce podrobuje biologickému testu, abychom zjistili, která frakce je nejaktivnější. Protože pouze aktivní frakce se dále zpracovávají pomocí frakcionace.

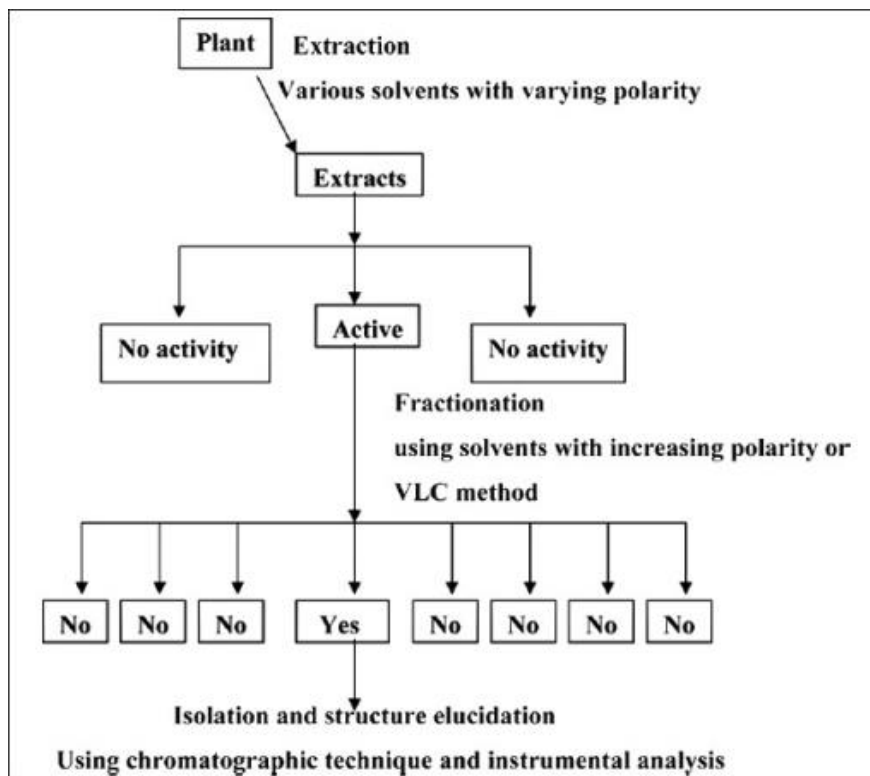


Schéma procesu frakcionace řízené biologickou aktivitou

2.12 SPE (Solid Phase Extraction)

Extrakce na pevné fázi (SPE) slouží k extrakci, čištění a koncentraci analytů. Je to separační metoda, ve které se používají stejné principy jako např. u kapalinové chromatografie. SPE lze využít pro rozmanitou škálu vzorků, kterými mohou být biologické tekutiny (plazma, sliny), vzorky z životního prostředí (voda, půda), potraviny (maso), farmaceutika, nápoje nebo průmyslové produkty (Waters Applications Database, 1983). Tato technika je rychlá, jednoduchá k provedení a může být automatizovaná.

Princip SPE

Tato separační technika je založena na principu zadržování sloučenin na stacionární fázi, které jsou potom uvolňovány pomocí elučnicích činidel s vyšší afinitou k daným analytům. Tyto mechanismy zadržování sloučenin na pevné fázi jsou dány intermolekulárními silami mezi analytem, aktivními místy na sorbentu a kapalnou nebo pevnou fází. Mechanismus separace látek je podobný kapalinové chromatografii (Scheepers et al., 1993; Rosenfeld et al., 1991). O tom, jak dlouho bude analyt navázaný na reverzní fázi, závisí na síle jejich vazby.

2.12.1 Reverzní fáze SPE

Reverzní fáze u SPE metody tvoří mobilní fázi (polární nebo středně polární) a stacionární fázi (nepolární), analyzovaná látka bývá středně polární nebo nepolární. Několik materiálů (LC-18, ENVI-18, LC-8, ENVI-8, LC-4 a LC-Ph) patří do skupiny reverzní fáze, patří sem i hydrofilní silanolové skupiny obsahující oxid křemičitý, který je modifikovaný alkylovými nebo arylovými funkčními skupinami s danými silany. Organické analytické sloučeniny z polárních roztoků se vážou pomocí vazby uhlík-vodík a funkčních skupin na oxid křemičitý a tím vznikají nepolární vazby (van der Waalsovy nebo disperzní síly). Abychom rozbili vazbu mezi absorbovanými sloučeninami a reverzní fází, tak použijeme nepolární rozpouštědlo, pokud je však vazba polymerní, tak musí dojít k okyselení vzorků sloučenin pro jejich zachování. Všechny vazebné fáze křemíku obsahují zbytky nezreagovaného silanolu, které fungují jako sekundární interakční místa a mohou nám pomoci při extrakci nebo retenci velmi polárních analytů nebo kontaminantů. Následující materiály se používají také jako reverzní fáze ENVI-Carb (na bázi uhlíku), ENVI-Chrom P (na bázi polymeru) a Hisep (křemík pokrytý polymerem a pojenými křemičitany).

Jako první jsou ENVI-Carb, které jsou složeny z neporézního uhlíku a mají vysokou přitažlivost především pro polární a nepolární organické sloučeniny. Jeho povrch je složen z šestihranných struktur, které jsou mezi sebou propojené a navrstvené a má velkou selektivitu pro aromatické, hexagonální molekuly ve tvaru kruhu a uhlovodíkové řetězce s více kontaktními místy. Zadržení analytů je závislé hlavně na struktuře molekuly než na interakcích a eluce se provádí pomocí středně polárního nebo polárního rozpouštědla.

Jako druhý je ENVI-Chrom P tvořený styrenem/divinylbenzenem, který slouží k zadržení hydrofobních sloučenin a některé z nich obsahují hydrofilní funkční skupiny (aromáty). Například fenoly se obtížně zachytávají na C18 modifikovaném oxidu křemičitém v reverzní fázi, hlavně kvůli jeho rozpustnosti ve vodě. Oproti tomu ENVI-Chrom P zadržuje fenoly v reverzní fázi snadněji a následná eluce může probíhat pomocí středně až nepolárních rozpouštědel.

Jako poslední je Hisep, který je podobný C18 (hydrofobní oxid křemičitý), má na povrchu hydrofilní polymerní vrstvu a je typický pro reverzní fázi. Pórovitý povrch je výhodný v tom, že na sebe neváže nežádoucí molekuly a dále umožňuje malým hydrofobním organickým sloučeninám, aby se dostaly na povrch křemíku. Naopak velké sloučeniny jsou chráněny oxidem křemičitým a jsou uvolněny kolonou SPE. Další postup na tomto povrchu je podobný jako u LC-18.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Rostlinný materiál:

huseníček rolní *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – Columbia-0 (Col 0) - semena

proso seté *Panicum miliaceum* (L.) - semena

laskavec *Amaranthus* sp. - semena

lebeda *Atriplex* (L.) - semena

ořešák královský *Juglans regia* (L.) - listy

směs trávy ze zahrady

3.2 Chemikálie:

diethylether (C₂H₅)₂O

kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Německo)

methanol – MeOH, hypergrade for LC-MS (Merck, Německo)

3.3 Spotřební materiál a další vybavení:

sterilní 96-ti jamkové desky pro buněčné kultury (TPP, Švýcarsko)

sterilní Petriho misky Ø 100 mm (TPP, Švýcarsko)

mikrozkumavky 0,5 ml; 1,5 ml (Eppendorf, Německo)

kartridž *Spe-ed* SPE pro extrakci na pevnou fázi, 500 mg/6 ml C18 oktadecyl/18 (Applied Separations, USA)

běžné laboratorní vybavení kam patří kádinky, odměrné válce, pinzeta

3.4 Přístrojové vybavení:

automatické pipety (Eppendorf, Německo)

CO₂ inkubátor MCO-17AIC (Sanyo, Japonsko)

dusíková odparka TurboVap Classic LV (Biotage, Švédsko)

inverzní mikroskop CK2 (Olympus, Japonsko)

laminární box VBH Compact, VBH36 C2 (Steril, Itálie)

stolní centrifuga Centrifuge 5424 R a Centrifuge 5702 R (Eppendorf, Německo)

ultrazvuková vana VWR Ultrasonic Cleaner (VWR, USA)

zkumavkový vortex Reax top (Heidolph Instruments, Německo)

3.5 Metodika

3.5.1 Fermentace rostlinného materiálu

Fermentace probíhala ve skleněných zavařovacích nádobách o objemu 4 litry, kde byl umístěn rostlinný materiál ořešáku a trávy. Spolu s rostlinným materiálem jsme do všech nádob přidali 100 ml destilované vody. Listy ořešáku a trávu jsme nechali fermentovat 4 měsíce ve skleníku s průměrnou teplotou pohybující se mezi 23-25 °C.

3.5.2 Test klíčivosti

Byl proveden na semenech lebedy umístěných na buničině v Petriho misce. V každé misce bylo 50 semínek, které se nechaly 7 dní klíčit. Následně bylo spočítáno množství naklíčených semínek. Test klíčivosti byl poté proveden na semínkách *Arabidopsis* a prosa v 96-ti jamkových destičkách. Extrakty byly naředěny 10x, 100x a 1000x, jako kontrola se použila destilovaná voda. U každé varianty extraktu byly tři opakování, kdy v jedné jamce byla semínka *Arabidopsis* v rozmezí 5 až 8 a u prosa byly dány 2 semínka na jamku. Pak se nechala čtyři dny naklíčit a množství naklíčených semínek bylo spočítáno pod mikroskopem. Jejich klíčivost je uvedena v grafech níže. Stejný postup byl proveden i na semenech laskavce a *Arabidopsis*, kdy byly použity jen vybrané extrakty. V tomto případě bylo šest opakování pro každou variantu, kdy na jednu jamku byly dány semínka *Arabidopsis* v počtu 6 až 9 a u laskavce byly 4 semínka na jamku.

3.5.3 Metody pro úpravu extraktu

Byly použity tři různé metody k úpravě extraktu z trávy – inkubace při teplotě 95 °C, precipitace methanolem a extrakce kapalina-kapalina pomocí diethyletheru. U první metody jsme vložili plastovou zkumavku s extraktem do inkubátoru při teplotě 95 °C na 30 minut. Při druhé metodě jsme vložili zkumavku do centrifugy a následně jsme odpipetovali supernatant. Potom jsme umístili zkumavku do dusíkové odparky a k odpařenému vzorku extraktu jsme přidali methanol (750 µl). Jako poslední jsme použili diethylether (750 µl), který jsme přidali k extraktu do zkumavky a promíchali. Po oddělení vrstev jsme diethylether odpipetovali, postup zopakovali a umístili zkumavku do dusíkové odparky. Takto upravený extrakt jsme napipetovali do 96-ti jamkové destičky a do každé jamky jsme dali 6 semen *Arabidopsis thaliana*.

3.5.4 Sterilní výsev semínek *Arabidopsis thaliana*

Nejdříve byl rozehrán připravený agar (MS médium) v mikrovlnné troubě, poté jsme ho opatrně nalili na desku a nechali ztuhnout. Před samotným výsevem na MS médium jsme museli semínka *Arabidopsis thaliana* sterilizovat v plastové zkumavce, do které jsme přidali 1 ml 70% ethanolu s 0,01% tritonem a promíchali pomocí vortexu 3-4 minuty. Po promíchání se odpipetoval roztok a byl přidán 1 ml 99,9% ethanolu (určený pro UV), ve kterém byla přenesena semínka pomocí sterilní špičky na skleněnou Petriho misku se sterilním filtračním papírem. Takto připravená semínka jsme nanесли na ztuhlé MS médium. Po ukončení sterilního výsevu jsme desky obtáhli parafilmem, poté přemístili do Adaptisu a nastavili program (16 hodin světlo, 8 hodin tma, intenzita světla 1).

3.5.5 Test růstu

Byl proveden na kořenech *Arabidopsis thaliana*. Kořínky byly ošetřeny dvěma extrakty z rostlinného materiálu (tráva a ořech) ve dvou koncentracích (naředěný 10x a 100x) a kontrolou (destilovaná voda). Délka kořínků byla změřena po 10 dnech pomocí programu ImageJ.

3.5.6 Frakcionace pomocí SPE metody

V našem experimentu jsme použili kolonky s reverzní fází (C18;0,5g). Kolonky byly promyty 10 ml methanolu, aby došlo k odstranění nečistot z kolonky. Jako první krok byla kondicionace pomocí 2 ml methanolu, po ní následovala ekvilibrace 2 ml vody a potom byl nanesen vzorek 2x600 µl v 0,1% kyselině mravenčí s vodou. Po nanesení vzorku se kolona promyla 2 ml 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě, kdy jsme získali první frakci C0. Následně proběhla eluce pomocí 3 ml methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí, kdy jsme použili různě koncentrovaný methanol pro získání jednotlivých frakcí (např. pro získání C1 frakce jsme přidali ke kyselině mravenčí 10% methanol, pro C2 zase 20% methanol atd). Celkem jsme získali 8 frakcí (C0, C1, C2, C3, C5, C6, C7 a C10), abychom zjistili, kde se nacházejí látky, které mají inhibiční účinky a poté je otestovaly na semínkách *Arabidopsis* v testu klíčivosti.

4 VÝSLEDKY

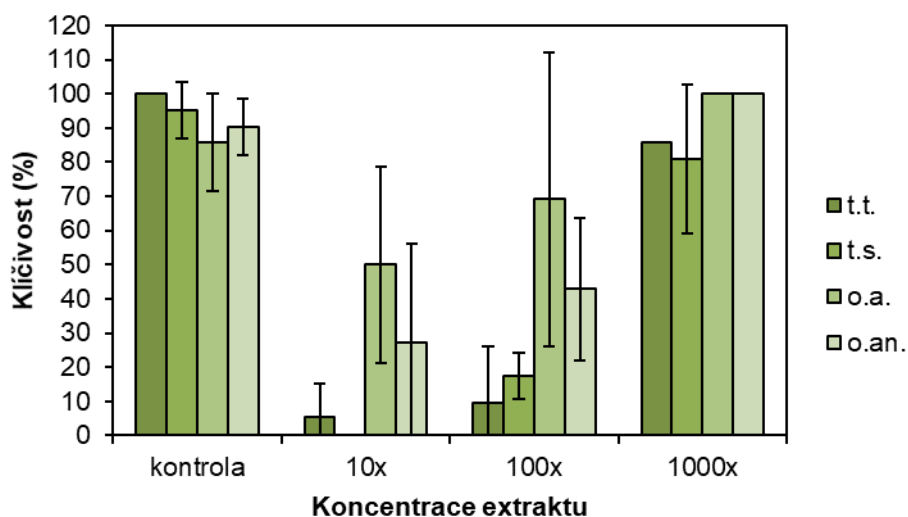
Pro vyhodnocení úlohy míry inhibice rostlinných extraktů na růst kořene a klíčení semen u *Arabidopsis thaliana*, prosa setého a laskavce, bylo sledováno, jak účinná je inhibice u jednotlivých testovaných extraktů. Všechny zmíněné experimenty byly provedeny podle postupů uvedených v metodice. Inhibice byla testována na všechny extrakty nejdříve ve třech koncentracích a kontrole. U dalších experimentů byla použita jen jedna koncentrace a vybraný extrakt, který měl nejvyšší míru inhibice a jen jeden druh semínek rostliny.

4.1 Vliv extraktů na klíčivost semen

Inhibice klíčení u semen *Arabidopsis thaliana* a prosa setého

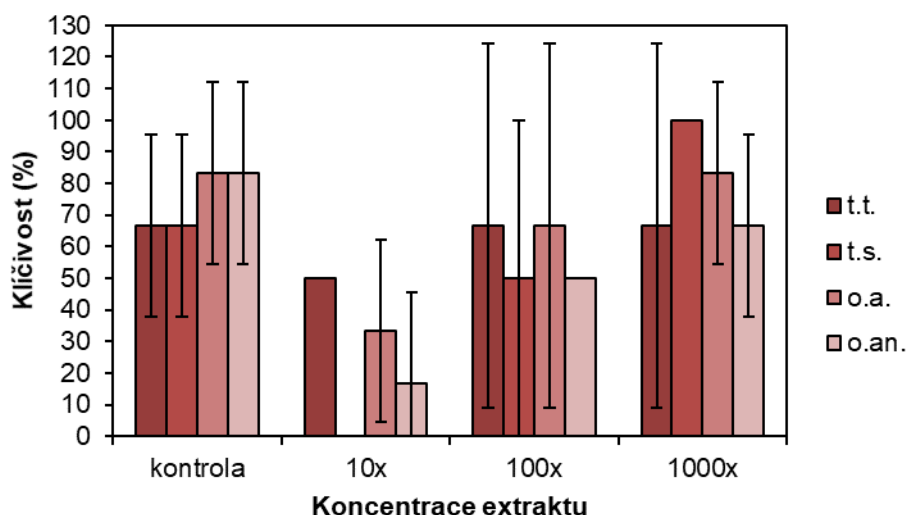
Klíčení semen *Arabidopsis thaliana* a prosa setého byly ovlivňovány čtyřmi získanými extrakty ze dvou různých skupin rostlin (tráva a ořešák). Dva extrakty byly získány z trávy a dva z ořešáku. Rozdíl byl v tom, že část trávy byla posekaná sekačkou a druhá část byla natrhaná v kuse a u ořešáku byly jiné podmínky pouze v průběhu fermentace, kdy jedna část byla rozkládána za aerobních podmínek a druhá část za anaerobních podmínek. Testovaly se všechny extrakty, abychom zjistili, které mají nejvyšší inhibiční účinek.

U grafu 1 můžeme pozorovat klíčivost semen u *Arabidopsis thaliana*, ovlivněnou čtyřmi extrakty, kdy nejnižší hodnota klíčivosti byla u obou extraktů v nejvyšší koncentraci 10x. Konkrétně extrakty z trávy měly vyšší inhibiční účinek na semena *Arabidopsis thaliana*, oproti extraktům z listů ořešáku. Ty měly nižší účinek inhibice, ale při porovnání hodnoty s kontrolou vidíme, že došlo k určité inhibici klíčení semen. Vyplývá z toho, že extrakt z trávy byl účinnější než extrakt z listů ořešáku.



Graf 1: Klíčivost semínek (%) *Arabidopsis thaliana* po čtyřech dnech po působení rostlinných extraktů (t.t. – tráva trhaná, t.s. – tráva sekaná, o.a. – ořech aerobně, o.an. – ořech anaerobně) a kontrolou (destilovaná voda). Extrakty byly aplikovány ve třech koncentracích – 10x, 100x a 1000x naředěné v porovnání s původním extraktem. Sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n=3).

Graf 2 zobrazuje klíčivost semen prosa ošetřených stejnými extrakty jako u semen *Arabidopsis thaliana*. Zde jsou výsledky odlišné především u extraktů z trávy, kde je inhibiční účinek na semena prosa nižší než u *Arabidopsis thaliana* a je podobný účinku extraktu z listů ořešáku. V nejvyšší koncentraci jsou oba extrakty z ořešáku účinnější než u jednoho extraktu z trávy, ale v dalších koncentracích jsou účinky inhibice vyrovnanější. Ve srovnání s výsledky *Arabidopsis thaliana* je míra inhibice nižší pravděpodobně v důsledku odolnější povrchové vrstvy semene.

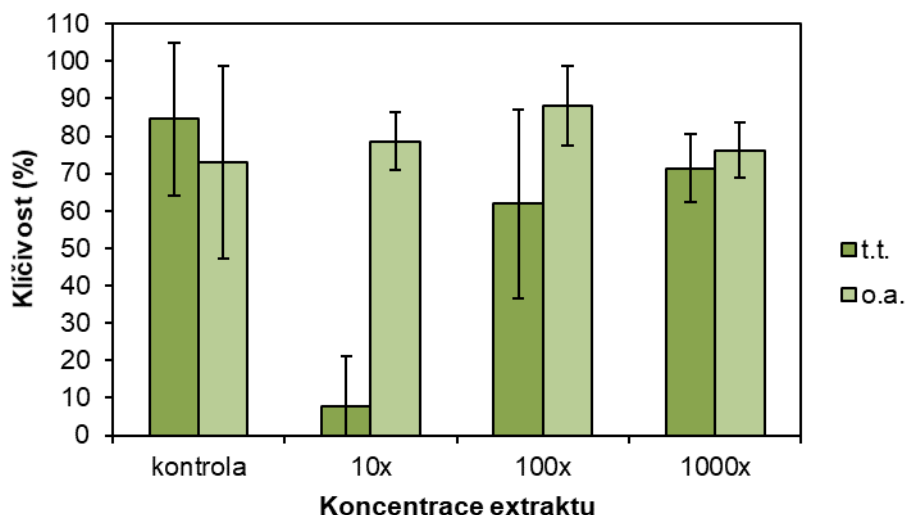


Graf 2: Klíčivost semínek (%) prosa setého po čtyřech dnech po působení rostlinných extraktů (t.t. – tráva trhaná, t.s. – tráva sekaná, o.a. – ořech aerobně, o.an. – ořech anaerobně) a kontrolou (destilovaná voda). Extrakty byly aplikovány ve třech koncentracích – 10x, 100x a 1000x naředěné v porovnání s původním extraktem. Sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n=3).

Inhibice klíčení u semen *Arabidopsis thaliana* a laskavce

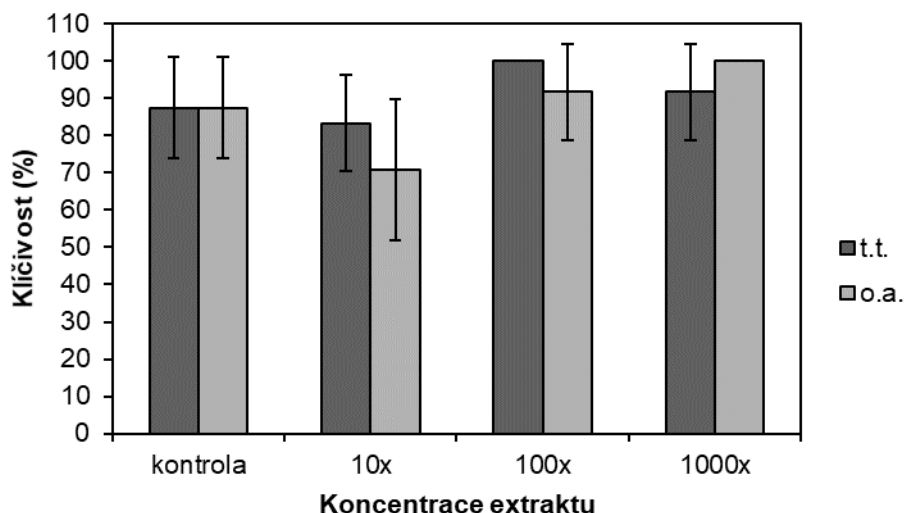
V tomto experimentu jsou semena *Arabidopsis thaliana* a laskavce ovlivňovány pouze dvěma extrakty, které byly vybrány díky předchozímu testování. Jeden extrakt je z trávy a jeden z ořešáku, protože tyto extrakty byly nejvíce účinné na inhibici semen.

Graf 3 nám zobrazuje klíčivost semen *Arabidopsis thaliana* ovlivněnou extrakty, které jsme vybrali jako nejúčinnější z předchozího testování. Při porovnávání výsledků vidíme markantní rozdíl mezi extraktem z trávy a z listů ořešáku při nejvyšší koncentraci. U extraktu z trávy je klíčivost semen minimální, oproti tomu extrakt z ořešáku měl daleko nižší inhibiční účinek, ale u zbylých dvou koncentrací je rozdíl extraktů daleko menší než v při nejvyšší koncentraci.



Graf 3: Klíčivost semínek (%) *Arabidopsis thaliana* po deseti dnech po působení rostlinných extraktů (t.t. – tráva trhaná, o.a. – ořech aerobně) a kontrolou (destilovaná voda). Extrakty byly aplikovány ve třech koncentracích – 10x, 100x a 1000x naředěné v porovnání s původním extraktem. Sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n=6).

U grafu 4 můžeme pozorovat klíčivost semen laskavce při působení extraktů z trávy a z ořešáku. Rozdíly oproti klíčivosti semen *Arabidopsis thaliana* jsou zcela viditelné, protože ve všech koncentracích extraktů byla klíčivost semen vyšší především u nejvyšší koncentrace extraktu z trávy. Při vzájemném porovnání obou extraktů byla jejich účinnost na semena laskavce podobná. Z toho lze usoudit, že podobně jako u semen prosa je příčinou odolnější vnější vrstva semene.

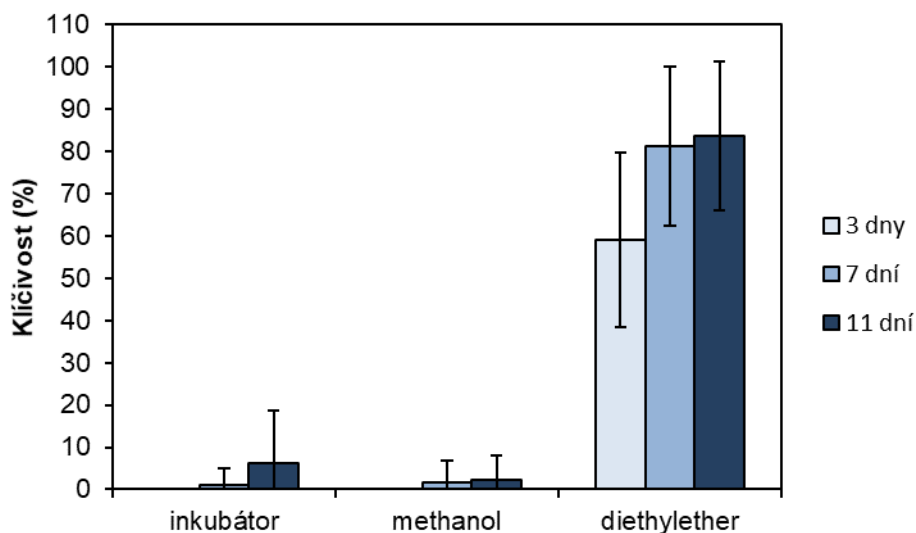


Graf 4: Klíčivost semínek (%) laskavce po deseti dnech po působení rostlinných extraktů (t.t. – tráva trhaná, o.a. – ořech aerobně) a kontrolou (destilovaná voda). Extrakty byly aplikovány ve třech koncentracích – 10x, 100x a 1000x naředěné v porovnání s původním extraktem. Sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n=6).

Použití metod pro upravení extraktu a inhibice klíčení semen *Arabidopsis thaliana*

Abychom u extraktu vyloučili, že inhibiční účinek není způsobený proteiny, bakteriemi nebo nepolárními látkami, byl extrakt upraven pomocí tří metod. Jako první proběhla inkubace při 95 °C po dobu 30 minut v inkubátoru, pomocí kterého dojde k odstranění většiny bakterií a patogenů. Jako druhá metoda byl použit methanol, který se přidal k odpařenému vzorku extraktu. Methanol způsobí vysrážení proteinů z extraktu, které by mohly vést k inhibici klíčení semen. U poslední metody byl přidán diethylether k extraktu. Následná extrakce kapalina-kapalina sloužila k odstranění polárních látek a solí. Tyto zmíněné metody slouží k otestování extraktu a jeho inhibičního účinku na klíčení semen *Arabidopsis thaliana*, jestli inhibiční účinek způsoben jinou látkou vyskytující se v extraktu. Na testování se použil jen jeden extrakt z trávy, který byl určen jako nejučinnější inhibitor klíčení.

Graf 5 nám zobrazuje účinek extraktu z trávy upraveného pomocí inkubace při teplotě 95 °C (inkubátor), precipitace methanolem a extrakcí kapalina-kapalina pomocí diethyletheru na semenech *Arabidopsis thaliana*. Nejnižší klíčivost semen byla u extraktu při použití inkubátoru a methanolu, oproti tomu u diethyletheru byla klíčivost mnohem vyšší. Inhibiční efekt na klíčivost semen nebyl způsoben bakteriemi (patogeny), proteiny ani látkami, které jsou extrahovatelné do diethyletheru, tj. nepolárními látkami.

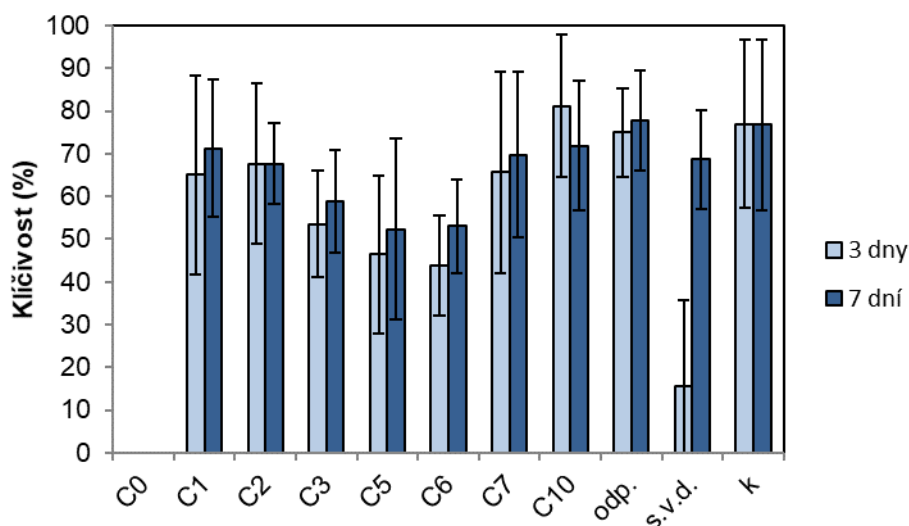


Graf 5: Klíčivost semínek (%) *Arabidopsis thaliana* po třech, sedmi a jedenácti dnech po působení rostlinného extraktu (t.t. – tráva trhaná), který byl upraven pomocí tří metod – inkubátorem, methanolem a etherem. Extrakt byl aplikován pouze v jedné koncentraci – 10x naředěné v porovnání s původním extraktem. Sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n=32).

Použití SPE metody pro získání frakcí a inhibice klíčení semen *Arabidopsis thaliana*

Metodou SPE byl separován extrakt na 6 až 10 frakcí. Následně byly tyto frakce otestovány v testu klíčivosti na semínkách *Arabidopsis thaliana*.

Graf 6 zobrazuje klíčivost semen *Arabidopsis thaliana* ošetřených frakcemi získanými z extraktu trávy, frakci s extraktem z odparku, ze spodní vrstvy diethyletheru a s kontrolou. Nulová klíčivost je u frakce C0 (extrakt z trávy bez použití methanolu), která obsahuje látky s výrazně polární povahou. Dále je nižší klíčivost u frakcí C5 a C6, kde se vyskytují semipolární látky. U ostatních frakcí je klíčivost vysoká a nedošlo k výrazné inhibici klíčení.



Graf 6: Klíčivost semínek (%) *Arabidopsis thaliana* po třech a po sedmi dnech při působení frakcí z extraktu trávy trhané (t.t.) v jedné koncentraci, kontroly (destilovaná voda), odparku (odp.) a spodní vrstvy po diethyletheru (s.v.d.) metodou SPE. Sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku (n=16).

4.2 Vliv extraktů na růst kořínků

Inhibice růstu kořínků u *Arabidopsis thaliana*

Kořínky u *Arabidopsis thaliana* byly ošetřeny dvěma extrakty. První extrakt byl získán z trávy a druhý z ořešáku.

Tabulka 1 ukazuje délky kořínků *Arabidopsis thaliana*, na které působily dva extrakty ve dvou koncentracích a pro porovnání hodnot jsme aplikovali kontrolu ve formě destilované vody. Následně jsme pozorovali, zda dojde k inhibici růstu kořene. Délka kořene byla signifikantně ovlivněna (zkrácena) pouze u 10x zředěného extraktu z trhané trávy (t.t. 10x) a to přibližně o 22 % při porovnání s kontrolou. U ostatních extraktů (o.a. 10x, t.t. 100x a o.a. 100x) nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl.

Tabulka 1: Délka kořínků (cm) *Arabidopsis thaliana* po aplikaci rostlinných extraktů (t.t. – tráva trhaná a o.a. – ořech aerobně), které byly dány ve dvou koncentracích a také kontrola (průměr ze dvou hodnot) ve formě destilované vody. T test je vypočítán z hodnoty kontroly a daného extraktu (výpočet v Excelu).

	t.t. (10x)	o.a. (10x)	t.t. (100x)	o.a. (100x)	kontrola
	3,380	4,253	5,884	4,749	2,664
	3,072	3,874	5,954	4,852	3,212
	3,595	5,866	5,493	6,722	3,768
	3,997	1,502	5,939	6,803	3,713
	3,901	6,294	5,896	4,509	5,353
	3,008	4,525	6,448	4,846	6,024
	4,020	5,599	6,398	6,316	3,311
	3,799	6,065	5,390	6,233	5,429
	4,620	4,916	5,480	6,597	6,256
	3,418	4,839	2,488	6,593	6,443
	5,651	5,551	6,288	6,896	4,115
	3,365	7,232	6,335	4,418	6,431
	4,940	6,721	5,176	4,112	6,367
	2,739	6,337	6,902	3,579	6,057
	6,590	4,734	5,620	3,091	6,623
	3,730	5,383	6,775	3,998	4,459
	3,886	4,813	7,019	5,867	6,010
Průměr	3,983	5,206	5,852	5,305	5,073
Směrod	0,986	1,318	1,022	1,262	1,355
Počet	17	17	17	17	17
SE	0,239	0,320	0,248	0,306	0,329
P(t test)	0,023	0,710	0,105	0,658	-

5 DISKUZE

V experimentální části diplomové práce jsem se zabýval, zda se v rostlinách nebo rostlinném materiálu mohou vyskytovat skupiny látek nebo sloučenin, které by mohly způsobit inhibici klíčení semen nebo růstu rostlin. V experimentech jsem použil metodu testu klíčivosti a růstu na několika typech rostlin (*Arabidopsis thaliana*, proso seté, laskavec), kdy jsem na semena aplikoval rostlinné extrakty, v několika koncentracích, které jsem získal fermentací rostlinného materiálu (tráva, ořešák). Dalším úkolem bylo zjistit, jaká skupina látek je zodpovědná za inhibici těchto fyziologických procesů.

Inhibice klíčení semen

Inhibice klíčení semen a růstu kořene byl pozorován na semenech *Arabidopsis thaliana*, prosa setého a laskavce působením extraktů z fermentovaných rostlinných materiálů (tráva a ořešák). Nejdříve byly testovány všechny získané extrakty ve třech koncentracích na semenech *Arabidopsis thaliana* a prosa setého, abychom zjistili, které mají nejvyšší inhibiční účinek na klíčení semen. Z výsledků plyne, že silnější inhibice byla na semenech *Arabidopsis thaliana*, ve srovnání s prosem setým. Nejvyšší koncentrace extraktu z trhané trávy způsobila nulovou klíčivost u obou druhů semen. Je to dáno pravděpodobně tím, že semena prosa setého mají tlustější povrchovou vrstvu, která je vůči těmto extraktům odolná.

Další experiment byl proveden opět na semenech *Arabidopsis thaliana* a jako druhá byla semena laskavce a tentokrát se testovaly jen dva extrakty (jeden z trávy a jeden z ořešáku) opět ve třech koncentracích, které byly v předchozím experimentu nejúčinnější v inhibici. Bylo to důležité také pro potvrzení, že tyto extrakty mají skutečně inhibiční účinky, a to se potvrdilo opět u semen *Arabidopsis thaliana*. Bylo to především u extraktu z trávy při nejvyšší koncentraci, u nižších koncentrací byla inhibice mnohem nižší a u semen laskavce neměl výrazný vliv na klíčivost semen žádný ze dvou extraktů. Můžeme tedy přepokládat, že semena laskavce jsou více odolná, stejně jako semena prosa, ve srovnání s *Arabidopsis thaliana* a vliv na to může mít stavba semene.

Pro další specifikaci zjištění účinné složky byla aplikována inkubace při teplotě 95 °C, extrakce pomocí methanolu a etheru. Proto se v dalším experimentu použili tyto metody (úpravy), abychom mohli stanovit aktivní složky z extraktu. Inkubace při teplotě 95 °C se použila k odstranění bakterií nebo patogenů, kteří by mohli způsobovat inhibici klíčení semen. Extrakcí methanolu došlo k vysrážení proteinů a extrakcí diethyletheru jsme mohli zjistit polaritu látek. Do diethyletheru se mohou extrahovat pouze nízkomolekulární nepolární látky. V tomto experimentu se použil jenom nejúčinnější extrakt z předchozích experimentů a testoval se jen na semenech

Arabidopsis thaliana. Po úpravách extraktu pomocí zmíněných metod jsme provedli další test klíčivosti, abychom zjistili, zda se v extraktu i nadále vyskytuje látka způsobující inhibici klíčení semen. Jak můžeme vidět ve výsledcích, tak při inkubaci a extrakci methanolem došlo ve vysoké míře k inhibici klíčení, ve srovnání s tím diethylether neměl moc výrazný vliv na inhibici klíčení. Hledaná aktivní složka není nepolární a nedošlo k jejímu vysrážení z extraktu. Z těchto výsledků je jasné, že inhibiční účinky v extraktu nemají bakterie ani proteiny, ale je to jiná skupina látek, kterou můžeme zjistit při dalších testováních na semenech.

V následujícím experimentu nejprve proběhla frakcionace extraktu na frakce, které se od sebe liší látkami podle jejich polarity, látky v prvních frakcích jsou polární jako např. voda, hydroxid amonný, v posledních frakcích se nachází nepolární látky jako např. mastné kyseliny a mezi nimi jsou látky semipolární. Na testování bylo použito celkem deset frakcí a dvě kontroly, které byly rozděleny do dvou destiček a testovány na semenech *Arabidopsis thaliana*. Ve výsledcích vidíme, že nejvyšší inhibice byla v C0 frakci, která obsahovala polární látky, kde se nachází hledaná skupina látek způsobující inhibice klíčení. Potvrzují to i výsledky, kdy polární látky nebyly extrahovány do diethyletheru při extrakci kapalina-kapalina a zůstaly ve vodě. Určitá míra inhibice klíčení byla i v oblasti semipolární frakce C5 a C6. V ostatních frakcích nebyla výrazná inhibice klíčení, takže s určitou pravděpodobností je hledaná skupina látek v semipolární oblasti, jak vypovídají tyto výsledky.

Inhibice růstu kořene

Kromě testu klíčivosti, kdy jsme pozorovali inhibici klíčení semen *Arabidopsis thaliana*, jsme také testovali, zda získané rostlinné extrakty mohou inhibovat také růst kořene na rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Rostliny byly dány v deskách s médiem, které byly umístěny v Adaptisu s nastavenými podmínkami pro růst rostlin. Nejdříve však musel být proveden sterilní výsev semínek v laminárním boxu (viz. metodika sterilní výsev). Po několika dnech, kdy rostliny dostatečně vyrostly se na jejich kořeny nanesly dva extrakty (jeden z trávy a jeden z ořesáku) ve dvou koncentracích a kontrolu, kdy každý byl aplikován na dvě desky a opět byly umístěny do růstové místnosti, kde předtím rostly. Po několika dnech působení extrakty bylo na řadě měření kořenů, abychom zjistili, zda byl nebo nebyl inhibován jejich růst. Měření probíhalo pomocí programu ImageJ, kde bylo možné zjistit přesnou délku kořene na tři desetinná místa. U kontroly byly dvě hodnoty z důvodu použití dvou extraktů, a proto se udělal z těchto hodnot průměr, se kterým se dále pracovalo. Hodnoty délek byly vloženy do tabulky a rozděleny podle extraktu a jejich koncentrace do sloupců, jako poslední sloupec byla dána kontrola. Abychom zjistili míru inhibice, tak jsme provedli t test,

podle kterého jsme mohli zjistit, zda je rozdíl mezi hodnotami extraktu a kontroly, tyto dvě hodnoty se totiž vkládaly do t testu a k tomu ještě jiné parametry. Podle hodnot, které vyšly v t testu, měl pouze extrakt z trávy vliv na růst kořene a došlo u něho k částečné inhibici. U ostatních extraktů byla míra inhibice nízká, proto jsme se zaměřili hlavně na inhibici klíčení, kde byla inhibice viditelná podle výsledků.

Abychom mohli určit konkrétní skupinu látek nebo sloučeninu, která způsobuje inhibici, tak musí proběhnout měření pomocí chromatografické metody. Potom by došlo k rozdělení jednotlivých látek a následné identifikaci jednotlivých sloučenin přítomných v extraktu. V této práci bylo cílem zjistit, jaký typ látek je zodpovědný za inhibici klíčení. Pro zjištění konkrétní sloučeniny je to bohužel časově náročné, ale mohla by na ni navázat další práce, která by se zaměřila na konkrétní látky a jejich následnou identifikaci.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda jsou v rostlinném extraktu obsažené látky, které mohou inhibovat klíčení nebo růst rostlin. Pro toto posouzení jsem testoval extrakty získané z různých rostlinných materiálů (z trávy a listů ořešáku) na semenech několika druhů rostlin. Byly to zástupci jednoděložných (laskavec, proso seté) a dvouděložných rostlin (*Arabidopsis thaliana*) proto, abych měl mezi nimi srovnání, na jakou skupinu působí získané extrakty více.

Při experimentech bylo zjištěno, že semena laskavce a prosa setého byla odolnější vůči inhibici klíčení způsobenou testovanými extrakty než semena *Arabidopsis thaliana*. V provedených experimentech u inhibice růstu nebyl pozorován vliv aplikovaných extraktů na růst kořene u *Arabidopsis thaliana*.

Z rostlinných extraktů testovaných na semenech *Arabidopsis thaliana*, prosa setého a laskavce, byly účinnější extrakty z trávy než z ořešáku, protože způsobily vyšší míru inhibice klíčení. Pokud však porovnáme oba extrakty z trávy, tak účinnější byl ten z trhané trávy, který byl testován v dalších experimentech – u metod, kde byl extrakt upraven. Tyto metody měly potvrdit, že inhibiční účinky jsou dány skupinou hledaných látek a ne např. bakteriemi nebo proteiny. Pro identifikaci látek jsme provedli frakcionaci extraktu pomocí metody SPE, díky které jsme mohli odhadnout povahu látek způsobující inhibici klíčení. Ze získaných výsledků vyplývá, že to jsou látky polární povahy, které se vyskytovaly v rostlinném extraktu (frakce C0). Konkrétní látku jsme nestanovili z toho důvodu, že je to velmi časově náročné.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Alexander M.** 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211, 132-138.
- Apelbaum A. and Burg SP.** 1972. *Plant Physiol.* 50, 117.
- Apelbaum A. and Burg SP.** 1972. *Plant Physiol.* 50, 125.
- Arnaud L, Taillandier G, Kaouadji M, Ravanel P and Tissut M.** 1994. Photosynthesis inhibition by phenylureas: A QSAR approach. *Ecotoxicol Environ Safety* 28:121-133.
- Arnould S, Takahashi M and Camadro JM.** 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 14825.
- Ashton FM and Crafts AS.** 1981. Phenoxy. Pages 272–302 in F. M. Ashton and A. S. Crafts, eds. *Mode of Action of Herbicides*. Toronto: John Wiley and Sons.
- Bacon MA, Wilkinson S, Davies WJ.** 1998. pH-regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent. *Plant Physiology* 118, 1507–1515.
- Bending GD, Lincoln SD, Sørensen SR, Morgan JAW, Aamand J, and Walker A.** 2003. In-field spatial variability in the degradation of the phenyl urea herbicide isoproturon is the result of interactions between degradative *Sphingomonas* spp. and soil pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 827-834.
- Berrueta LA, Gallo B and Vicente F.** 1994. A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments.
- Bewley JD and Black M.** 1994. *Physiology of Development and Germination*. 2nd ed. New York: Plenum Press; 445 p.
- Bewley JD, Bradford K, Hilhorst H and Nonogaki H.** 2013. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3rd ed. New York: Springer.
- Bewley JD.** 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell.*;9:1055-1066.
- Beyer EM, Duffy MJ Jr, Hay JV and Schlueter DD.** 1988. Sulfonylureas. In: *Herbicides-Chemistry, Degradation, and Mode of Action*, Vol. 3 (P. C. Kearney and D. D. Kaufman, Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York.
- Bolwell GP, Bozak K, Zimmrelin A.** 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*, v.37, p.1491-1506.
- Borgheretti F and Ferreira AG.** 2000. *Germinação do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed; 222 p.
- Burton JD, Gronwald JW, Somers DA, Connelly JA, Gengenbach BG and Wyse DL.** 1987. Inhibition of plant acetylcoenzyme A carboxylase by the herbicides sethoxydim and haloxyfop. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148: 1039-1044.

Camilleri P, Bowyer JR and McNeil PH. 1987 The effects of photosystem I electron acceptors on leaf discs. *Z. Naturforsch.* 42c: 829-833.

Cargenie PR. 1963. Structure and properties of homologue of glutathione. *Biochemical Journal*, v.89, p.471.

Carter LM and Chesson JH. 1996. Two USDA researchers develop a moisture seeking attachment for crop seeders that is designed to help grower's plant seed in soil sufficiently moist for germination. *Seed World*;134:14-15

Casida JE. 1983. Propesticides: bioactivation in pesticide design and toxicological evaluation. In: *Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment, Vol. 4, Mode of Action, Metabolism and Toxicology* (J. Miyamoto, and P. C. Kearney, Eds.), Pergamon Press, Oxford, 1983, pp. 239-246.

Cole DJ. 1994. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pesticide Science*, v.42, p.209-222.

Copeland LO and McDonald MB. 1999. *Principles of Seed Science and technology* Springer US pp 59-110.

Creelman RA, Mason HS, Bensen RJ, Boyer JS and Mullet JE. 1990. Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. Analysis of growth, sugar accumulation and gene expression. *Plant Physiology* 92, 205–214.

Davies WJ and Jones HG. 1991. *Abscisic acid: physiology, biochemistry.* BIOS. Scientific Publishers Ltd., Cambridge, UK.

de la Torre C, Diez JL, Lopez-Saez JF and Gimenez-Martin G. 1972. Effect of abscisic acid on the cytological components of the root growth. *Cytologia* 37, 197-205.

Delmer DP. 1987. Cellulose biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 259-290.

Devine M, Duke SO and Fedtke C. 1993. *Physiology of herbicide action.* Englewood Cliffs: Prentice Hall, 441p.

Duke SO. 1988. Glyphosate. In: *Herbicides-Chemistry, Degradation and Mode of Action, Vol. 3* (P. C. Kearney and D. D. Kaufman, Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York.

Duke SO. 1987. A non-metabolic model of acifluorfen activity. *Z. Naturforsch.* 42c: 813-818.

Duke SO and Kenyon WH. 1988. Polycyclic alkanolic acids. In: *Herbicides-Chemistry, Degradation, and Mode of Action, Vol. 3* (P. C. Kearney and D. D. Kaufman, Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 71-116.

Duke SO, Kenyon WH and Paul RN. 1985. FMC 57020 effects on chloroplast development in pitted morningglory (*Ipomoea lacunosa*) cotyledons. *Weed Sci.* 33: 786-794.

- Duke SO, Lydon J and Paul RN.** 1989. Oxadiazon activity is similar to that of p-nitrodiphenyl ether herbicides. *Weed Sci.* 37: 152-160.
- Edwards R, Brazier-Hicks M, Dixon DP and Cummins I.** 2005. Chemical manipulation of antioxidant defenses in plants. *Advances in Botanical Research*, v.42, p.1-32.
- Eerd LL, van Hoagland RE, Zablutowicz RM and Hall JC.** 2003. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science*, v.51, p.472-495.
- Fedtke C.** 1982. *Biochemistry and Physiology of Herbicide Action.* Springer-Verlag, Berlin.
- Field JA, Reed RL, Sawyer TE and Martinez M.** 1997. Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction and in-vial elution. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3897-3902.
- Focke M and Lichtenthaler HK.** 1987. Inhibition of the acetyl-CoA carboxylase of barley chloroplasts by cycloxydim and sethoxydim. *Z. Naturforsch.* 42c: 1361-1363.
- Fraenkel GS.** 1959. "The Raison d'Être of Secondary Plant Substances." *Science* 129: 1466–1470.
- Gerecke A, Müller S, Sägesser M, Ochsenbein U and Popow G.** 2001. Pestizideinträge via Kläranlage. Gas-Wasser-Abwasser (in press)
- Gerecke AC, Canonica S, Muller SR, Schaerer M and Schwarzenbach RP.** 2001. Quantification of dissolved natural organic matter (DOM) mediated phototransformation of phenylurea herbicides in lakes. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3915-3923.
- Giri A, Dhingra V, Giri CC, Singh A, Ward OP and Narasu ML.** 2001. Biotransformations using plant cells, organ, culture and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances* 19: 175-199.
- Gitsopoulos TK and Froud-Williams RJ.** 2004. *Weed Res.*, 44, 329.
- Gonçalves JFC, et al.** 2003. Aspectos fisiológicos bioquímicos de plantas da Amazônia. Projeto Jacaranda Fase II: Pesquisas Florestais na Amazônia Central. Manaus: INPA; p. 89-101
- Gooddy DC, Chilton PJ and Harrison I.** 2002. A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil. *Sci. Total Environ.* 297, 67-83.
- Graeber K, Linkies A, Muller K, Wunchova A, Rott A and Leubner-Metzger G.** 2010. Cross-species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae DOG1 genes. *Plant Mol Biol.* 73, 67–87.
- Grossman K.** 2000. The mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends Plant Sci.* 5:506–508.

- Grossman K.** 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Manag. Sci.* 66:113–120.
- Gupta PK.** 1989. Pesticide production – an overview. In *Soil Pollution and Soil*
- Halliwell B.** 1982. The toxic effects of oxygen on plant tissues. In: *Superoxide Dismutase*, Vol. 1. (L. W. Oberley, Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1982, pp. 89-123.
- Hao GF, Tan Y, Yu NX and Yang GF.** 2011. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 25, 213.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Roychowdhury R and Fujita M.** 2013. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*; 14:9643-9684
- Hatzios KK and Burgos N.** 2004. Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. *Weed Science*, v.52, p.454-467.
- Hatzios KK.** 1991. Biotransformations of herbicides in higher plants. In: GROVER, R.; CESSNA, A.J. (Ed.) *Environmental chemistry of herbicides*. Boca Raton: CRC Press. p.141-185.
- Hermann K, Meinhard J, Dobrev P, Linkies A, Pesek B, Heß B, Machackova I, Fischer U and Leubner-Metzger G.** 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) - A comparative study of fruits and seeds. *J. Exp. Bot.* 58, 3047–3060.
- Hess FG, Harris JE, Pendino K and Ponnock K.** 2001. Imidazolinones. In *Handbook of Pesticide Toxicology*, 2nd edition, Vol. 2 (Krieger R, ed.). Academic Press, San Diego, pp. 1641–52.
- Hess FD.** 1987. Herbicide effects on the cell cycle of meristematic plant cells, *Rev. Weed Sci.* 3: 183-203.
- Himmelbach A, Iten M and Grill E.** 1998. Signalling of abscisic acid to regulate plant growth; *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*
- Hirai K, Futikami T, Murata A and Hirose H.** 1989. US Patent 4818272.
- Hiraki M, Ohki S, Sato Y, Jablonkai I, Boger P and Wakabayashi K.** 2001. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 70, 159.
- Chang JH, Konz MJ, Aly EA, Sticker RE, Wilson KR, Krog NE and Dickinson PR.** 1987. 3-Isoxazolidinones and related compounds. A new class of herbicides. *ACS (Am. Chem. Soc.) Symp. Ser.* 355: 10-23.
- Ishihara K, Hamada H, Hirata T and Nakajima N.** 2003. Biotransformation using plant cultured cells. *J Mol Catalysis B: Enz* 23: 145–170.
- Johnson, A.C., Besien, T.J., Bhardwaj, C.L., Dixon, A., Goody, D.C., Haria, A.H. and White, C.** 2001 Penetration of herbicides to groundwater in an unconfined chalk aquifer following normal soil applications. *J. Contam. Hydrol.* 53, 101-117.

- Khan SU.** 1980. *Pesticides in the Soil Environment*. Elsevier, Amsterdam.
- Kidd B. R, Stephenand N. H, Duncan H. J.** 1982. The effect of asulam on purine biosynthesis. *Plant Sci. Lett.* 26:211–217.
- Kiely T, Donaldson D, Grube A.** 2004. Pesticide industry sales and usage: 2000 and 2001 market estimates. Washington, DC:U.S. Environmental Protection Agency.
- Kiely T, Donaldson D and Grube A.** 2004. Pesticides industry sales and usage 2000 and 2001 market estimates. Biological and Economic Analysis Division, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, DC., USA.
- Kieran J. Germaine, Xuemei Liu, Guiomar Garcia Cabellos, Jill P. Hogan, David Ryan, David N.,** 2006; Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Dowling; *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 57, Issue 2, 1 August 2006, Pages 302–310.
- Kirby C.** 1980. *The Hormone Weedkillers: A Short History of Their Discovery and Development*. London Road, Croydon, UK: British Crop Protection Council. 55 p.
- Kishore, G. M., and Shah D. P.** 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 627-663.
- Kobek K, Focke M and Lichtenthaler HK.** 1988. Fatty-acid biosynthesis and acetyl-CoA carboxylase as a target of diclofop, fenoxaprop and other aryloxy-phenoxy-propionic acid herbicides. *Z. Naturforsch.* 43c: 47-53.
- Koch M, Breithaupt C, Kiefersauer R, Freigang J, Huber R and Messerschmidt A.** 2004, *EMBO J.*, 23, 1720.
- Kucera B, Cohn MA and Leubner-Metzger G.** 2005. Plant hormone interactions duringseed dormancy release and germination. *Seed Sci Res.* 15, 281–307.
- Kulshrestha G and Mukerjee SK.** 1986. The photochemical decomposition of the herbicide isoproturon. *Pestic. Sci.* 17, 489-494.
- Kutschera U and Schopfer P.** 1986. In vivo measurement of cell-wall extensibility in maize coleoptiles: effects of auxin and abscisic acid. *Planta* 169, 437-442.
- Langebartels C and Harms H.** 1985. Analysis for nonextractable (bound) residues of pentachlorophenol in plant cells using a cell wall fractionation procedure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.10, p.268-279.
- Lee SJ, Kang JY, Park HJ, Kim MD, Bae MS, Choi HI, et al.** DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. *Plant Physiology.* 2010; 153(2):716-727
- Lee KH, Kim H-Y, Piao HL, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee I-J and Hwang I.** 2006. Activation of glucosidase via stress-induced poly-merization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell.* 126, 1109–1120.

- Leresche JE and Meyer HP.** 2006. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and a biotechnologist *Org Proc Res Dev*, 10, pp. 572-580
- Lermontova I, Kruse E, Mock HP and Grimm B.** 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 8895.
- Lilly MD.** 1994. Advances in biotransformation processes *Chem Eng Sci*, 49 (2), pp. 151-159.
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, Wu WH and Ma L.** 2007b. A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315, 1712–1716.
- Los M.** 1987. Synthesis and biology of the imidazolinone herbicides. In: *Pesticide Science and Biotechnology* (R. Greenhalgh and T. Roberts, Eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 35-42.
- Lydon J and Duke SO.** 1988. Porphyrin synthesis is required for photobleaching activity of the p-nitrosubstituted diphenyl ether herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 31: 74-83 (1988).
- Lyga JW, Patera RM, Theodoridis G, Halling BP, Hotzman FW and Plummer MJ.** 1991. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1667.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A and Grill E.** 2009. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 1064–1068.
- Matringe M and Scalla R.** 1988. Studies on the mode of action of acifluorfen-methyl in non-chlorophyllous soybean cells: accumulation of tetrapyrroles. *Plant Physiol.* 86: 619-622.
- Matringe M, Camadro J-M, Labbe P and Scalla R.** 1989. Photoporphyrinogen oxidase as a molecular site for diphenyl ether herbicides. *Biochem. J.* 260: 232-235.
- McGonigle B, Lau SMC, Jennings LD and O'Keefe DP.** 1998. Homoglutathione selectivity by soybean glutathione s-transferases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.62, p.15-25.
- Michel A, Arias RS, Scheffler BE, Duke SO, Netherland M and Dayan FE.** 2004. Somatic mutation-mediated evolution of herbicide resistance in the nonindigenous invasive plant hydrilla (*Hydrilla verticillata*). *Molecular Ecology*. vol. 13, pp. 3229-3237
- Moore TC.** 1989. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*, 2nd edn. Springer-Verlag, New York U.S.A.
- Muller K, Tintelnot S and Leubner-Metzger G.** 2006. Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47, 864–877.

- Munns R.** 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment.*; 25:239-250
- Nagl W.** 1972. Selective inhibition of cell cycle stages in the *Allium* root meristem by colchicine and growth regulators. *Am. J. Bot.* 59, 346-351.
- Nakamoto H, Ku MS and Edwards GE.** 1982. Inhibition of C4 photosynthesis by (benzamidoxy)acetic acid. *Photosynth. Res.* 3: 293-305.
- Pandey S, Nelson DC and Assmann SM.** 2009. Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. Ashish Publishing House, New Delhi, India, pp. 1–16. *Cell* 136, 136–148.
- Park S, Fung P, Nishimura N, Jensen D, Fujii H, Zhao Y, Lumb S, Santiago J, Rodrigues A, Chow T, Alfred S, Bonetta D, Finkelstein R, Provart N, Desveaux D, Rodriguez P, McCourt P, Zhu J, Schroeder J, Volkman B, Cutler S.** 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068–1071.
- Persans MW, Wang J and Schuler MA.** 2001. Characterization of maize cytochrome P450 monooxygenases induced in response to safeners and bacterial pathogens. *Plant Physiology*, v.125, p.1126-1138.
- Pilet PE and Barlow PW.** 1987. The role of abscisic acid in root growth. A critical examination. *Pl. Sci. Lett.* 21, 99-106.
- Pilet PE and Chanson A.** 1981. Effect of abscisic acid on maize root growth. A critical examination. *Pl. Sci. Lett.* 31, 117-122.
- Pilet PE and Saugy M.** 1987. Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA. A critical reexamination. *Pl. Physiol.* 83, 33-38.
- Pillmoor JB, Gaunt JK and Roberts TR.** 1984. Examination of bound (non-extractable) residues of MCPA and flumetop in wheat straw. *Pesticide Science*, v.15, p.375-381.
- Pinto JEBP, Dyer WE, Weller SC and Hermnan KM.** 1988. Glyphosate induces 3-deoxy-D-arabino-heptulosinate 7-phosphate synthase in potato (*Solanum tuberosum* L.) cells grown in suspension culture. *Plant Physiol.* 87: 891-893.
- Piskurewicz U, Jikumaru Y, Kinoshita N, Nambara E, Kamiya Y and Lopez-Molina L.** 2008. The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* 20, 2729–2745.
- Popko J, Hänsch R, Mendel R, Polle A and Teichmann T.** 2010. The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant Biol.* 12, 242–258.
- Poulson R and Polglase WJ.** 1975. *J. Biol. Chem.*, 250, 1269.
- Price CA.** 1957. A new thiol in legumes. *Nature*, v.180, p.148,

- Reigosa MJ, Sanchez-Moreiras A and Gonzalez L.** 1999. Ecophysiological approach in allelopathy, *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 577-608.
- Remde A and Traunspurger W.** 1994. A method to assess the toxicity of pollutants on anaerobic microbial degradation activity in sediments. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 9, 293-298.
- Rendina AR and Felts JM.** 1988. Cyclohexanedione herbicides are selective and potent inhibitors of acetyl-CoA carboxylase from grasses. *Plant Physiol.* 86: 983-986.
- Rhee K-H, Morris EP, Barber J and Kühlbrandt W.** 1998. Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* 396: 283–286.
- Ridley SM.** 1982. Carotenoids and herbicide action. In: IUPAC Carotenoid Chemistry and Biochemistry (G. Britton and T. W. Goodwin, Eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 353-369.
- Rosenfeld JP, Angell A, Johnson M and Qian JH.** 1991. An ERP based, control-question lie detector analog: algorithms for discriminating effects within individuals' average wave forms. *Psychophysiology*, 32, 319–335.
- Sandmann G.** 1987. Structure and activity of herbicidal inhibitors of phytoene desaturase. In: Pesticide Science and Biotechnology (R. Greenhalgh and T. R. Roberts, Eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 43-48.
- Sandmann G and Boger P.** 1987. Interconversion of prenyl pyrophosphates and subsequent reactions in the presence of FMC 57020. *Z. Naturforsch.* 42c: 803-807.
- Saugy M, Mayor G and Pilet PE.** 1989. Endogenous ABA in growing maize roots: light effects. *Pl. Physiol.* 89, 622-627.
- Secor J and Cseke C.** 1988. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase activity by haloxyfop and tralkoxydim. *Plant Physiol.* 86: 10-12.
- Sfakiotakis E.** 1972. Doctoral thesis, Michigan State University.
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH and Zhang DP.** 2006. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443, 823–826.
- Scheepers PJJ, Langereis CG and Hilgen FJ.** 1993. Counter-clockwise rotations in the southern Apennines during the Pleistocene: paleomagnetic evidence from the Matera area. *Tectonophysics* 225: 379-410.
- Simmons KA, Dixson JA, Halling BP, Plummer EL, Plummer MJ, Tymonko JM, Schmidt RJ, Wyle MJ, Webster CA. et al.** 1992. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 297.
- Singh J, Sastry EVD, Singh V.** 2012. Effect of salinity on tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.) during seed germination stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants*;18:45-50.

- Smith LL.** 1997. Paraquat. In *Comprehensive Toxicology – Toxicology of the Respiratory System*, Vol. 8 (Sipes IG, McQueen CA, Gandolfi JA, eds.). Pergamon, Elsevier Science, Inc., USA, pp. 581–9.
- Sørensen SR and Aamand J.** 2001. Biodegradation of the phenylurea herbicide isoproturon and its metabolites in agricultural soils. *Biodegradation* 12, 69-77.
- Sørensen SR, Ronen Z and Aamand J.** 2001. Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5403-5409.
- Spliid HS and Køppen B.** 1998. Occurrence of pesticides in Danish shallow groundwater. *Chemosphere* 37, 1307-1316.
- Spollen WG, LeNoble ME, Samuels TD, Bernstein N and Sharp RE.** 2000. Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology* 122, 967–976.
- Stamp N.** 2003. "Out of the Quagmire of Plant Defense Hypotheses." *The Quarterly Review of Biology* 78: 23–55.
- Sterrett R. B and Fretz T. A** 1975. Asulam-induced mitotic irregularities in onion root-tips. *Hortscience* 10:161–162.
- Sterling TM and Hall JC.** 1997. Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. In: Roe RM, Burton JD, Kuhr RJ, eds. *Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology*. Amsterdam: IOS Press, 111–141.
- Sterling TM and Hall JC.** 1997. Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. Pages 111–141 in R. M. Roe, J. D. Burton, and R. J. Kuhr, eds. *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*. Amsterdam, the Netherlands: IOS Press.
- Steven JT and Summer DD.** 1991. Herbicides. In *Handbook of Pesticides Toxicology* (Hayes WJ, Laws ER, eds.). Academic Press, USA, pp. 1317–408.
- Tang FH, Zhao YJ, Tang AK.** 2005. Presence of ectoparasitic trichodinids (Ciliophora, Oligohymenophorea, Peritrichida) on the gills of cultured freshwater fish, *Carassius auratus* in Chongqing, China, with the description of a new species of the genus *Trichodina* *Acta Zootaxon Sin*, 30, pp. 35-40
- Theodoridis G, Bahr JT, Hotzman FW, Saroj S and Suarez DP.** 2000. *Crop Prot.*, 19, 533.
- Theodoridis G.** 1997. *Pestic. Sci.*, 50, 283.
- Tixier C, Bogaerts P, Sancelme M, Bonnemoy F, Twagilimana T, Cuer A, Bohatier J and Veschambre H.** 2000. Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron: structure and toxicity of metabolites. *Pest Manag. Sci.* 56, 455-462.

- Tixier C, Sancelme M, Aït-Aïssa S, Widehem P, Bonnemoy F, Cuer A, Truffaut N and Veschambre H.** 2002. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2 structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere* 46, 519-526.
- Trebst A.** 1987. The three-dimensional structure of the herbicide binding niches on the reaction center polypeptides of photosystem II. *Z. Naturforsch.* 42C: 742-750.
- van Volkenburgh E and Davies WJ.** 1983. Inhibition of light-stimulated leaf expansion by abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 35, 110-120.
- Vaughn KC, Marks MD and Weeks DP.** 1987. A dinitroaniline resistant mutant of *Eleusine indica* exhibits cross-resistance and supersensitivity to antimicrotubule herbicides and drugs. *Plant Physiol.* 83: 956-964.
- Veerasekaran P, Kirkwood RC and Parnell EW.** 1981. Studies on the mechanism of action of asulam in plants. II. Effect of asulam on the biosynthesis of folic acid. *Pestic. Sci.* 12: 330-338.
- Walker JM and Cox M.** 1995. The language of biotechnology – a dictionary of terms (2nd ed.), ACS Professional Reference Book, ACS, USA.
- Weyers JDB and Paterson NW.** 2001. Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytol.* 152, 375–407.
- Wilkinson RE.** 1988. Carbamothioates. In: *Herbicides-Chemistry, Degradation, and Mode of Action*, Vol. 3 (P. C. Kearney and D. D. Kaufman, Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 245-300.
- Wilen Ch.** 2011. UC IPM South Coast Area Advisor: UC IPM News December.
- Willis RJ.** 2010. *The History of Allelopathy*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Witkowski DA and Hailing BP.** 1988. Accumulation of photodynamic tetrapyrroles induced by acifluorfen-methyl. *Plant Physiol.* 86: 632-637.
- Worthing CR. (Ed.)** 1983. *The Pesticide Manual: A World Compendium*, Croydon, England, The British Crop Protection Council.
- Yuan JS, Tranel PJ, Stewart JR CN.** 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science*, v.12, p.6-13.
- Zhang J and Davies WJ.** 1990. Does ABA in the xylem control the rate of leaf growth in soil-dried maize and sunflower plants? *Journal of Experimental Botany* 41, 1125–1132.
- Zienkiewicz Z, Zienkiewicz AK, Rejon JD, Alche JD, Castro AJ and Rodriguez-Garcia MI.** 2014. Olive seed protein bodies store degrading enzymes involved in mobilization of oil bodies. *Journal of Experimental Botany*; 65:103-115.

Internetové zdroje

<https://www.britannica.com/science/herbicide>

<http://agriculture.vic.gov.au/agriculture/farm-management/chemical-use/agricultural-chemical-use/chemical-residues/managing-chemical-residues-in-crops-and-produce/how-do-selective-herbicides-work>

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162009000100020

<https://www.intechopen.com/books/herbicides-physiology-of-action-and-safety/herbicide-metabolism-in-weeds-selectivity-and-herbicide-resistance>

<http://science.jrank.org/pages/3306/Herbicides.html>

<https://firstaidcalgary.ca/what-are-the-side-effects-of-herbicides/>

<http://www.biologydiscussion.com/seed/germination/process-of-seed-germination-5-steps-with-diagram/15769>

<http://nptel.ac.in/courses/102103016/38>

<https://www.britannica.com/science/fermentation>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123214001428#f0020>

<http://www.weedscience.org/summary/SOADescription.aspx>

http://www.waters.com/waters/en_CZ/Solid-Phase-Extraction-SPE-Guide/nav.htm?cid=134721476&locale=en_CZ

<http://www.affinisep.com/technology/solid-phase-extraction/>

<http://science.jrank.org/pages/710/Bacteria-role-bacteria-in-fermentation.html>

[http://slideplayer.com/slide/5938182/20/images/66/BIOASSAY-GUIDED+FRACTIONATION+\(BGF\).jpg](http://slideplayer.com/slide/5938182/20/images/66/BIOASSAY-GUIDED+FRACTIONATION+(BGF).jpg)

https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/199/3159277/PMC3159277_JYPharm-3-226-g003.png

<http://edis.ifas.ufl.edu/hs186>

<http://www.plantgrowthhormones.com/plant-growth-regulator/control-overgrowth-plant-hormones/plant-growth-hormones-auxin-transport.html>

http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant_Growth_And_Development8-Plant_Hormones-Morphactins_And_Others.htm

<http://vle.du.ac.in/mod/book/view.php?id=12932&chapterid=27821>

<https://www.britannica.com/science/hormone/Growth-inhibitors>

<http://www.porwal.net/triiodobenzoic.htm>

http://herbicidesymptoms.ipm.ucanr.edu/MOA/Synthetic_Auxins/

[http://www.weedscience.org/Summary/Uspecies
MOAasp?lstMOAID=8&FmHRACGroup=Go](http://www.weedscience.org/Summary/UspeciesMOAasp?lstMOAID=8&FmHRACGroup=Go)) - 27

www.life.illinois.edu/bfrancis/ib486/H4-Triazines.doc