

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav biologie rostlin



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



**Růstová a metabolická odezva okřehku menšího
(*Lemna minor* L.) na polycyklický aromatický
uhlovodík**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

RNDr. Ing. Marek Klemš, Ph.D.

Výpracovala:

Bc. Zuzana Hrušková

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: „Růstová a metabolická odezva okřehku menšího (*Lemna minor* L.) na polycyklický aromatický uhlovodík“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

Poděkování

Mé poděkování patří především mému vedoucímu diplomové práce RNDr. Ing. Markovi Klemšovi za cenné rady a odborné vedení.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Kamile Lónové za pomoc při práci v laboratoři, Dr. Ing. Heleně Fišerové za pomoc při stanovení produkce etylénu rostlinami a Ing. Heleně Vlašínové, Ph.D. za zapůjčení mikroskopické lupy.

Ústřednímu kontrolnímu a zkušebnímu ústavu zemědělskému se sídlem v Brně děkuji za věnování rostlin okřehku.

Své rodině a přátelům děkuji za podporu při psaní předkládané diplomové práce.

ABSTRAKT

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou řazeny mezi organické sloučeniny, které svým dlouhodobým setrváváním zatěžují životní prostředí. Na přítomnost PAU reagují zejména vodní rostliny. Okřehek menší (*Lemna minor* L.), vodní rostlina charakteristická tím, že je vystavena působení cizorodých látek převážnou částí svého těla, představuje vhodnou modelovou rostlinu pro studium vývojových a metabolických reakcí na přítomnost polycyklických aromatických uhlovodíků. Cílem diplomové práce bylo sledovat vývojové a metabolické odpovědi okřehku menšího na působení polycyklického aromatického uhlovodíku fluoranthenu. Po dobu 21 dnů byly pozorovány u čtyř koncentrací fluoranthenu, které představovaly běžně se vyskytující (0,1 a 0,5 mg FLT/l) a mírně zvýšenou (1 a 5 mg FLT/l) koncentraci fluoranthenu, metabolické a bioenergetické odpovědi. Dále byly pozorovány růstové a vývojové změny a změny v obsahu fytohormonů. Studium bylo zaměřeno i na morfologii rostlin. Z výsledků práce bylo patrné, že přítomnost fluoranthenu má významný vliv na vzhled a produkci rostlin. Dále byl prokázán značný negativní vliv na parametry růstu. Fluoranthen prokázal významný vliv na produkci rostlinných hormonů.

Klíčová slova: metabolismus, vývoj, *Lemna minor* L., polycyklické aromatické uhlovodíky, fluoranthen

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ranked among the organic compounds with long-term permanence pollute the environment. The presence of PAHs react particularly aquatic plants. Duckweed (*Lemna minor* L.), water plant characterized in that it is exposed to foreign substances significant portion of his body, is a suitable model for the study of plant developmental and metabolic responses to the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons. The aim of the thesis was to observe developmental and metabolic responses duckweed on the effect of polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene. For 21 days were observed in four concentrations of fluoranthene, which accounted for commonly occurring (0.1 and 0.5 mg FLT / l) and slightly increased (1 and 5 mg FLT / L) concentrations of fluoranthene, metabolic and bioenergetic response. We were also observed growth and developmental changes and changes in the content of phytohormones. The study was focused on plant morphology. The results of this work, was evident that the presence of FLT has a significant impact on the appearance and production plants. It was also demonstrated a significant negative impact on the growth parameters. Fluoranthene demonstrated significant effects on the production of plant hormones.

Keywords: metabolism, development, *Lemna minor* L., polycyclic aromatic hydrocarbons, fluoranthene

OBSAH

Zadání diplomové práce

Čestné prohlášení

Poděkování

Abstrakt

Abstract

1	ÚVOD.....	11
2	CÍL PRÁCE	13
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	14
3.1	Růst a vývoj rostlin ve vodním ekosystému	14
3.2	Metabolické a bioenergetické děje u rostlin.....	15
3.3	Stres u rostlin.....	16
3.4	Obranné reakce rostlin na působení stresových faktorů	17
3.4.1	Produkce glutationu u rostlin	19
3.4.2	Lipidová peroxidace u rostlin	21
3.5	Polycyklické aromatické uhlovodíky	21
3.5.1	Příjem a akumulace PAU v rostlinách	23
3.5.2	Fluoranthen a jeho vliv na růst a vývoj rostlin	23
3.6	Rostlinné hormony	25
3.6.1	Stimulátory růstu a vývoje rostlin.....	26
3.6.1.1	Cytokininy	26
3.6.2	Inhibitory růstu a vývoje rostlin.....	30
3.6.2.1	Etylén.....	30

3.6.2.2	Kyselina abscisová	33
3.7	Okřehek menší (<i>Lemna minor</i> L.)	36
4	MATERIÁL A METODY	41
4.1	Rostlinný materiál	41
4.1.2	Kultivace okřehku menšího	42
4.2	Založení experimentu a odběry vzorků	43
4.3	Stanovení počtu rostlin, délky kořenů a viability rostlin	43
4.4	Stanovení specifické listové plochy a obsahu sušiny	44
4.5	Stanovení obsahu chlorofylu „a“ a „b“	44
4.6	Stanovení kvantového výtěžku elektronového transportu ve fotosystému PSII	45
4.7	Stanovení intaktnosti membrán	45
4.8	Stanovení lipidové peroxidace	46
4.9	Stanovení hladiny endogenních cytokininů prostřednictvím ELISA analýzy .	47
4.10	Stanovení produkce etylénu u rostlin	52
4.11	Stanovení obsahu kyseliny abscisové prostřednictvím radioimunoanalýzy	53
4.12	Fotodokumentace	57
4.13	Statistické hodnocení	57
5	VÝSLEDKY	58
5.1	Vzhled rostlin <i>Lemna minor</i> L.	58
5.1.1	Mikroskopické pozorování rostlin <i>Lemna minor</i> L.	60
5.2	Vliv FLT na počet rostlin <i>Lemna minor</i> L.	63
5.3	Vliv FLT na délku kořenů u rostlin <i>Lemna minor</i> L.	65

5.4	Vliv FLT na viabilitu rostlin <i>Lemna minor</i> L.....	66
5.5	Vliv FLT na obsah sušiny a specifickou listovou plochu.....	67
5.6	Vliv FLT na kvantový výtěžek elektronového transportu ve fotosystému PSII	69
5.7	Vliv FLT na obsah chlorofylu „a“ a „b“ u <i>Lemna minor</i> L.	70
5.8	Vliv FLT na tvorbu MDA jako markeru poškození membrán.....	71
5.9	Vliv FLT na intaktnost membrán u rostlin okřehku.....	72
5.10	Vliv FLT na hladinu endogenních cytokininů u rostlin	73
5.11	Vliv FLT na obsah kyseliny abscisové u rostlin.....	76
5.12	Vliv FLT na produkci etylénu rostlinami.....	77
6	DISKUZE	79
7	ZÁVĚR.....	83
8	SEZNAM POUŽITÉ LITARATURY	84
	SEZNAM OBRÁZKŮ	96
	SEZNAM GRAFŮ	98
	SEZNAM TABULEK.....	99
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	100

1 ÚVOD

Růst a diferenciacie původních meristemických buněk v buňky specializované představují jeden z nejcharakterističtějších projevů rostlin. Projevu růstu a diferenciacie jsou z hlediska časového sledu nazývány vývojem rostlin. Základní vlastností u rostlin, která probíhá po celou dobu jejich života, je neustálý příjem, přeměna a výdej látek. Tento sled pochodů je znám pod pojmem metabolismus rostlin. O problematiku vývojových a metabolických procesů rostlin se lidé začali zajímat od té doby, kdy rostliny začaly představovat způsob jejich obživy. Lidé tak získávali dlouholeté zkušenosti, které v současné době vedou k získávání nových vědeckých poznatků, uplatňujících v oboru zemědělství a lesnictví. Působením nepříznivých podmínek vnějšího prostředí může docházet k nestandardním vývojovým a metabolickým procesům.

Životní prostředí je průběžně znečišťováno značným množstvím nebezpečných chemických látek o různé struktuře a úrovni toxicity (GIANFREDA a RAO 2004). Do prostředí se dostávají cizorodé látky vlivem zemědělských a průmyslových exhalací. Tyto látky mají negativní vliv na vodní a terestrický ekosystém. Vodní prostředí je kontaminováno zejména látkami organického původu, mezi které patří i polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU). PAU představují karcinogenní mutagenní látky, které působí na živé organismy včetně člověka. Proto jsou polycyklické aromatické uhlovodíky řazeny mezi významně rizikové látky. V životním prostředí je nutné PAU očekávat všude tam, kde je vysoce rozvinuto zpracování ropy a uhlí. Svou vysokou perzistencí mohou způsobovat stresové reakce u rostlin, ovlivňující řadu fyziologických a biochemických procesů, které determinují vývoj a metabolismus rostlin.

Do popředí společenského zájmu ochrany životního prostředí se v současnosti dostávají rostliny, plnící úlohu bioindikátorů. Bioindikátory představují organismy, jejichž životní funkce jsou v korelaci se škodlivými faktory životního prostředí a mohou tak sloužit jako ukazatelé těchto nežádoucích faktorů.

Rostliny jsou schopny svou reakcí vyvolávat odezvu na vnější podněty. Mezi nejčastěji se vyskytující negativní vnější podnět, který vyvolává stres u rostlin, patří látky, zatěžující životní prostředí. Řada rostlin je schopna hyperakumulace, představující zvýšenou akumulaci cizorodých látek. Není však vyloučeno, že hyperakumulátor nemůže současně plnit úlohu bioindikátoru. Ekologický monitoring, využívající testovací rostlinné organismy, uplatňuje rostlinné bioindikátory jako ukazatele toxických vlivů (VÁVROVÁ et al. 2003).

Na organické látky typu polycyklických aromatických uhlovodíků významně reaguje malá vodní rostlina z čeledi *Araceae* (dříve *Lemnaceae*), pod názvem okřehek menší (*Lemna minor* L.). Tato drobná, na hladině plovoucí, rostlina má vysokou toleranci vůči pH. Vzhledem ke značné snášenlivosti okřehek vůči silné eutrofizaci, vyššímu obsahu solí i jiným antropogenním znečištěním je považován za vhodný bioindikátor organického zatížení vodního ekosystému. Díky své anatomické stavbě, která se skládá z lístkovitého článku a jednoduchého kořínku, je okřehek snadno používaným rostlinným materiálem v laboratořích. Okřehek menší tak představuje vhodnou modelovou rostlinu pro řadu toxikologických testů, biochemických testů včetně biotestů (MKANDAWIRE a DUDEL 2007).

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit růstové a metabolické odezvy okřehku menšího na působení polycyklického aromatického uhlovodíku fluoranthenu (FLT), který se běžně vyskytuje v životním prostředí. Tento polycyklický aromatický uhlovodík je představitelem možné toxické zátěže pro růst a vývoj rostlin. Studium bylo zaměřeno na ovlivnění metabolismu a bioenergetiky antioxidační odpovědi (lipidová peroxidace a intaktnost membrán) a dále pak na růstové a vývojové procesy rostlin *Lemna minor* L. Jedním z prvních kroků bylo sledovat v několika koncentracích morfolologii rostlin, viabilitu a reprodukci, dále pak stanovit parametry růstu, mezi které patří specifická listová plocha, délka kořenů a obsah fotosyntetických pigmentů. V těchto parametrech byly předpokládány fyziologické změny. Mezi dalšími experimentálními kroky v diplomové práci bylo sledovat procesy fotosyntézy a akumulaci sušiny. Dále pak bylo cílem popsat snížení produkčních schopností prostřednictvím parametrů fluorescence chlorofylu a kvantového výtěžku elektronového transportu fotosystému II. V neposlední řadě bylo cílem stanovit hormonální změny obsahu kyseliny abscisové (ABA) jako hlavního markeru stresu, cytokininů a etylénu, představujících markery stresu.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Růst a vývoj rostlin ve vodním ekosystému

Ontogeneze rostlin, nebo také růst a vývoj rostlin, představuje strukturní a funkční změny, při kterých rostlina vzniká, vyvíjí se i zaniká. Tyto změny představují procesy, které jsou na sobě navzájem závislé. Během rostlinné ontogeneze dochází k časovým úsekům růstu a diferenciaci, které jsou nazývány vývojem. Růstové procesy nejsou u většiny rostlinných organizmů pevně určeny. U rostlinných druhů lze však pozorovat zřetelnou orientaci nově se vytvářejících struktur a opakování určitých strukturních jednotek. Polarita buněk a celých orgánů, projevující se nestejnými vlastnostmi protilehlých, ale zdánlivě stejných struktur má u rostlin zvláštní význam. Polarita je krátce po vzniku nové buňky ovlivněna faktory vnějšího prostředí. Rostliny jsou charakteristické svojí jedinečnou vývojovou flexibilitou, která je způsobena stále se měnícím prostředím. V průběhu celého svého vývoje si rostliny udržují stálou aktivitu meristémových buněk a tvoří nové orgány. Na těchto vývojových procesech se kromě jiného také podílejí rostlinné hormony (VANSTRAELEN a BENKOVÁ 2012). CUBAS et al. (1999) prokázali, že řada významných proteinů se podílí na růstu a vývoji rostlin.

Vodní rostliny a rostliny terestrické se svým vývojem a růstem do značné míry liší. Životem rostlin ve vodním prostředí znemožňuje jejich vysychání, eliminuje gravitaci a pomocí vysokého měrného tepla vody dochází k udržení teplotní stability u rostlin. Vodní rostliny se během vývojových a růstových procesů přizpůsobují svými těly prostředí, ve kterém žijí. Cévní svazky vodních rostlin se většinou redukují na jeden svazek. Tento svazek probíhá středem stonku rostlin a v uzlinách stonkových článků se napojuje na cévní svazky listů. Charakteristická je i stavba kořenů. Uvnitř kořenů se nachází mezibuněčné prostory, které jsou vyplněny vzduchem a cévní svazky jsou zde silně redukovány. Některé hydrofyty se vyznačují značnou redukcí orgánů, při čemž jsou tyto rostliny (*Wolffia*, *Lemna*) tvořeny malými články plovoucími na vodní hladině.

Světlo, výška vodního sloupce i proudění vody včetně množství vodních živin a teploty se podílí na vnější stavbě těla vodních rostlin. Nejvyšší růst u rostlin byl prokázán vlivem působení červeného světla (HEUSEMANN a REINERT 1976). Během svého růstu a vývoje vytváří tělo rostlin více přechodných forem. Rostliny se dělí na typy přizpůsobené značné hloubce, pobřežní typy, bahenní typy a rostliny, pro které není voda přirozeným životním prostředím (vlhkomilné rostliny). Hlavním kritériem pro dělení rostlin mezi již zmíněné typy je výška vodního sloupce. Vodní druhy rostlin se musí během svého života vyrovnávat s řadou mechanických problémů, jako je například upevnění v substrátu na základě kořenového systému, který je vytvářen podle typu vodního prostředí. U volně plovoucích vodních rostlin je známo velmi malé množství informací o fotosyntéze a fotorespiraci. Podle studií, které provedl LONGSTRETH (1989), vyplývá, že u vodních rostlin nedochází k žádným specifickým změnám při fixaci uhlíku oproti C₃ rostlinám. U sladkovodních druhů rostlin bývají charakteristické velké mezibuněčné prostory, které obsahují vysokou koncentraci oxidu uhličitého. Vzhledem k tomuto faktu může u vodních rostlin docházet k intenzivnější fotosyntéze než u terestrických druhů rostlin. Na fixaci uhlíku se podílí i řada jiných faktorů prostředí, mezi které patří teplota, nebo také hustota toku fotonů.

3.2 Metabolické a bioenergetické děje u rostlin

Metabolické děje u rostlin rozlišujeme na primární a sekundární metabolismus. Primární metabolismus zahrnuje základní chemické přeměny, na kterých přímo závisí vývoj a růst rostlin prostřednictvím energetického zajištění životních pochodů. Rostlinné tělo je složeno převážně z uhlíku, kyslíku, vodíku a dusíku. Tyto prvky rostliny přijímají ve formě oxidu uhličitého, vody a dusičnanů. Kromě těchto látek přijímají rostliny mnoho dalších minerálních a stopových prvků, i když ve výrazně menším množství. Podle typu výživy jsou rostliny členěny na autotrofy a heterotrofy. Většina rostlin je řazena mezi autotrofní rostliny vzhledem k jejich schopnosti přeměňovat anorganické látky na organické. V opačném případě se pak jedná o

heterotrofní rostliny. Rostlinné organizmy vykazují obrovskou genetickou variabilitu v metabolismu na množství vzájemně souvisejících biochemických reakcí, udržujících životaschopnost rostlin. Metabolické dráhy odpovědné za asimilaci a využití uhlíku, dusíku a dalších prvků jsou vysoce regulované. Tyto dráhy jsou ovlivněny řadou faktorů – teplotou, intenzitou světla a dostupností vody. Metabolické a bioenergetické děje u rostlin jsou děleny na procesy anabolické a katabolické. Při anabolickém procesu dochází ke vzniku složitějších látek z látek jednoduchých. Mezi tyto procesy patří např. fotosyntéza. Proces, při kterém vznikají jednoduché látky z látek složitějších, je nazýván katabolismem. Při katabolických dějích dochází k rozkladným procesům, sloužícím k získávání energie. Mezi tyto procesy je řazeno např. dýchání. Aktivita fotosyntézy i dýchání rozhoduje o celkové bioenergetice a produktivitě rostliny, jak bylo prokázáno i u okřešku (KHELLAF a ZERDAOUI 2010). V průběhu metabolismu vodních rostlin dochází k uvolňování řady nejrůznějších látek do svého okolí. Tyto látky pak ovlivňují ostatní složky biocenózy. U vodních rostlin se zejména jedná o fytoncidní, baktericidní a protistocidní látky. Kromě těchto látek však bylo také prokázáno vylučování dalších biologicky aktivních látek, které mají povahu rostlinných hormonů (kyselina abscisová, kyselina indolyloctová). Vylučování biologicky aktivních látek představuje sekundární metabolismus rostlin, zahrnující chemické procesy, pomocí kterých dochází k produkci a odbourávání specifických nebiřkovinných chemických látek.

3.3 Stres u rostlin

Vzhledem k trvale přisedlému způsobu života bývají rostliny neustále vystavovány měnícím se podmínkám prostředí, které pak u nich vyvolávají stres. U rostlin tak dochází ke zpomalení jejich jednotlivých procesů (PITERKOVÁ et al. 2005). Stres rostlin představuje dynamický komplex mnoha reakcí na působení stresových podmínek. Jedná se zejména o změny počasí, o herbivory, které se jimi živí, ultrafialové záření, ale i cizorodé látky, nacházející se v jejich prostředí, které mohou na rostliny

působit negativním účinkem. Tyto nepříznivé vlivy nazýváme stresory. Podle charakteru působení stresoru se dělí stres na biotický a abiotický stres. Přísedlý způsob života neumožňuje rostlinám před působením stresoru uniknout, proto se u nich vyvinuly účinné obranné mechanismy, které jim umožňují přežít v jejich přirozeném prostředí (BUCHANAN et al. 2000). Na stresové podmínky reagují rostliny prostřednictvím řady fyziologických, buněčných a molekulárních procesů. Dochází tak ke spuštění mechanismů, které jsou geneticky podmíněny a zapojují se bezprostředně po působení stresoru (SHINOZAKI a YAMAGUCHI-SHINOZAKI 2007).

3.4 Obranné reakce rostlin na působení stresových faktorů

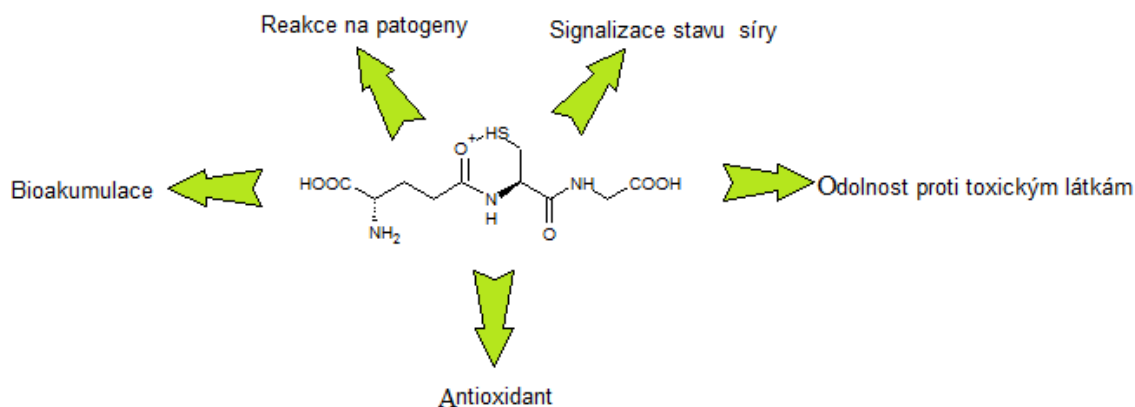
Během svého růstu a vývoje jsou rostliny vystavovány proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí, které mohou na ně mít negativní vliv. Působením těchto nepříznivých podmínek může docházet ke zpomalení životních funkcí, poškození jednotlivých orgánů nebo přímo k úhynu rostlin. V dnešní době se jedná zejména o působení toxických látek, které se volně vyskytují v životním prostředí. Mezi nejčastěji vyskytované toxické látky v prostředí patří řada chemických sloučenin, které mají na rostliny značný vliv. Takovéto látky se do životního prostředí dostávají zejména zemědělskou a průmyslovou antropogenní činností. Včasná identifikace faktorů, které jsou zapojeny do reakcí rostlin na působení stresových podmínek, umožňuje detailnější studium dané problematiky a zároveň technologického přístupu zdokonalení zemědělské výroby a kvality životního prostředí (LABRA et al. 2006). Abiotické stresové podmínky, představující sucho, zasolení, extrémní teploty, zatížení prostředí toxickými látkami představují pro zemědělství současné doby ne příliš pozitivní predispozici. Proto má objasnění mechanismů odpovědí rostlin na působení stresových faktorů praktický význam. Z metabolického hlediska dochází při obranných reakcích u rostlin k biosyntéze alespoň tří typů sloučenin, mezi které patří sloučeniny, podílející se na aklimaci rostlin a látky, podílející se na přenosu signálů, které reagují na působení stresorů. Mezi naposledy zmíněné patří kyselina abscisová, reaktivní formy kyslíku

(ROS), fenolické sloučeniny, nebo také antioxidanty (SHULAEV et al. 2008). Při dlouhodobém i krátkodobém působení cizorodých látek může docházet ke vzniku oxidativního stresu. U tohoto jevu dochází ke tvorbě aktivních forem kyslíku, které představují vedlejší produkty aerobního metabolismu (XU a PORTER 2014). Reaktivní formy kyslíku slouží jako signální molekuly pro řízení procesů programované buněčné smrti a chování průduchů (APEL a HIRT 2004). Působení chemických cizorodých látek na rostlinné organizmy způsobuje produkci ROS ve vyšších koncentracích, přičemž k vyšší produkci ROS dochází v chloroplastech. Vznik těchto forem kyslíku má pro rostliny fatální následky, kdy může docházet ke snížení fotosyntetických dějů, což může souviset s poškozením fotorespirace. Proto je pro rostliny důležité mít obranný mechanismus, který bude zabraňovat reakci reaktivních forem kyslíku s důležitými molekulami. Excitační energie, která je pro rostliny přebytečná, bývá z chloroplastů vyzářena ve formě tepla, nebo rostliny regulují transport elektronů na alternativní akceptory na přijatelnou úroveň. Přesto však mohou ROS u rostlin dále vznikat. V tomto případě jsou odstraňovány pomocí antioxidačních obranných systémů (TAUSZ et al. 2004). U těchto systémů zastávají hlavní obrannou funkci nízkomolekulární enzymy a antioxidanty, sloužící jako náhradní nebo kompetitivní cíl pro ROS (BARTOSZ 1997). Obranné systémy jsou dvojího druhu (BRUGGEMANN et al. 1999). Mezi první druh obranných systémů patří mechanismy, které mohou s ROS reagovat přímo, kam patří např. superoxidodismutáza, katalázy, peroxidázy nebo askorbát. K systémům, regenerujícím oxidované antioxidanty, které patří k druhému druhu obranných systémů, řadíme glutation, glutationreduktázy, askorbát a askorbátreduktázy. V dalším případě může po působení cizorodých látek docházet k peroxidaci lipidů a inaktivaci enzymů (SMIRNOFF 1993). U rostlin proto dochází při včasné rozpoznání působení toxické látky k obranné reakci, která vede k rozpadu buněk. Tento rozpad buněk je ovlivněn působením malonyldialdehydu (MDA), jako degradačního produktu lipidové peroxidace (CHEESEMAN 1993). Působením stresoru může také docházet k aktivaci proteinů a udržení jejich funkční konformace. Mezi tyto proteiny patří proteiny tepelného šoku (HSP), které jsou důležité pro přežití buněk rostlin, které jsou vystaveny působení stresových látek (WANG et al. 2004). Stříbrné ionty, představující významný faktor stresu, mají pozitivní vliv na rostliny. Působením těchto iontů dochází ke spuštění obranné reakce u rostlin v podobě produkce proteinů a

sloučenin za účelem jejich detoxikace (KŘÍŽKOVÁ et al. 2009). Při vzniku HSP a ROS může také docházet ke změně termotolerance u rostlin (KOTAK et al. 2007). Dalšími biochemickými obrannými mechanizmy u rostlin je produkce sekundárních metabolitů, nazývajících se fytoalexiny. Fytoalexiny mají obrannou úlohu v interakci s patogeny. Působením své antioxidační funkce ovlivňují průběh stresových mechanismů (MITHÓFER et al. 2004). Jedním z takových mechanismů je například zvýšení produkce glutationu (GSH), jenž představuje cenný marker ekofyziologických studií, které jsou vztahovány k sekvestraci xenobiotik a těžkých kovů (TAUSZ et al. 2004). Působením stresových látek dochází u rostlin ke zvýšené biosyntéze kyseliny abscisové, která vede k expresi transkripčního aktivátoru včasné stresové reakce (ZHU 2002).

3.4.1 Produkce glutationu u rostlin

Glutation (GSH) je nízkomolekulární thiol, působící jako antioxidant a regulační molekula u rostlin za působení stresových podmínek. Z chemického hlediska se jedná o tripeptid, skládající se ze tří aminokyselin – kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Glutation se hojně vyskytuje v cytosolu, mitochondriích a dalších buněčných kompartmentech. Glutation představuje zásobní formu redukované síry, která je pro rostliny nepostradatelná z důvodu řady funkcí v metabolismu rostlin (obr. 1).



Obr. 1: *Hlavní role glutathionu v metabolismu rostlin*

Jeho hlavní funkcí u rostlin je obranná reakce před oxidativním stresem, kdy dochází k zabránění oxidace thiolové skupiny stromatálních enzymů, jež by způsobila jejich okamžitou inaktivaci (PITERKOVÁ et al. 2005). Kromě jiného se glutathion podílí na zabránění peroxidace lipidů a lipidových alkylů (ALSCHER 1989) a také nese podíl na regulaci kaskád některých fytohormonů (NOCTOR et al. 2012). Základní funkcí glutathionu u rostlin představují thiol-sulfidické interakce, kde redukovaný GSH je neustále oxidován na disulfidickou formu (GSSG). K opětovné regeneraci na redukovaný GSH dochází pomocí NADPH a glutathionreduktázy (TAVERNE et al. 2013). Rostliny v normálním stavu obsahují jak oxidovanou, tak i redukovanou formu glutathionu v konstantním poměru (WEN et al. 2005). Při stresových podmínkách přibývá oxidované formy, díky reakci se vzniklými volnými radikály. Vznik GSSG u rostlin je spojen s regenerací oxidované formy kyseliny askorbové. Rostlinné organizmy jsou schopny po určitou dobu udržovat GSH v redukované formě. Při dlouhodobém stresu však dochází u rostlin k akumulaci GSSG, vedoucí k možné buněčné smrti (NOCTOR et al. 2011 a BARTOSZ 1997).

3.4.2 Lipidová peroxidace u rostlin

Proces, při kterém jsou poškozovány polynenasycené mastné kyseliny lipidů, je obecně nazýván peroxidací lipidů. Tento proces dává vznik hydroperoxidům, které vznikají působením enzymů, ROS a jiných volných radikálů. Hydroperoxydy se dále samovolně nebo prostřednictvím enzymatických reakcí mění na produkty sekundárního metabolismu rostlin. Takto vzniklé sekundární sloučeniny mohou v rostlinném těle působit škodlivě až letálně. Vlivem těchto sloučenin dochází k poškození membránových fosfolipidů, kdy dochází ke změně fluidity membrány a rostlinné buňky se tak stávají propustnějšími pro ionty. U rostlin dochází nejčastěji k přeměně hydroxyperoxidu na malondialdehyd (MDA), který hraje v rostlinných buňkách obrannou roli. MDA naopak může i samotné buňky poškozovat. Malondialdehyd představuje degradační produkt peroxidace lipidů a je tak významným markerem lipidové peroxidace (YAMAUCHI et al. 2008). Tvorba MDA u rostlin vypovídá o poškození membrán v rostlinných buňkách (CHEESEMAN 1993). Pomocí antioxidační aktivity může u rostlin docházet k zabránění lipidové peroxidace.

3.5 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Životní prostředí bývá průběžně znečišťováno značným množstvím nebezpečných chemických látek o různé chemické struktuře a úrovni toxicity (GIANFREDA a RAO 2004). Mezi nejčastější zástupce organických polutantů, které znečišťují životní prostředí, patří polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU). PAU představují významnou skupinu látek, které se nacházejí ve všech složkách životního prostředí a jsou především produkty nedokonalého spalování (SVERDRUP et al. 2003). Vzhledem ke svým genotoxickým vlastnostem patří mezi velmi sledované látky znečišťující životní prostředí (HILMI et al. 2011). Polycyklické aromatické uhlovodíky, které jsou známé také jako polyareny (MALAWSKA et al. 2006), působí negativním vlivem na

ekosystém. Zejména pak na rostliny z hlediska jejich potenciálu toxicity. Jejich deriváty, zejména epoxidy jsou toxické pro mikroorganismy i pro živé systémy včetně člověka. Mnohé z nich jsou karcinogenní a mutagenní, a některé z nich jsou endokrinními disruptory (WANG et al. 2005). PAU patří mezi skupinu chemických látek, které se vyznačují chemickou stabilitou, nízkou volatilitou a nízkou rozpustností ve vodě (CASTAÑO-VINYALS et al. 2004). Obsahují dvě a více benzenových jader. Stabilita polycyklických aromatických uhlovodíků klesá s narůstajícím počtem aromatických jader. Zároveň je ovlivněna chemickou strukturou. Na zvýšené degradaci PAU má podle studie, provedené týmem BRÄNDLI et al. (2007) vliv mikrobiální aktivita. Jejich stabilita pak roste směrem ke klastrovému uspořádání aromatických jader. Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou tuhé látky, které jsou za normálních podmínek bezbarvé nebo žluté. Vlastnosti polycyklických aromatických uhlovodíků se mění podle jejich molekulové hmotnosti. Pokud molekulová hmotnost roste, zvyšuje se bod tání, varu a lipofilita. Účinky PAU na živé organismy jsou spojeny s narušením genetické funkce. Polycyklické aromatické uhlovodíky se do životního prostředí dostávají neúplným spalováním a pyrolýzou organických materiálů – dřevo, ropná paliva, odpadky a jiné organické látky. Hlavní znečišťující látky pocházejí hlavně ze spalování uhlí (KUANG et al. 2011, ZHANG a WANG 2011). Ochlazením kouřových plynů dochází k jejich kondenzaci na pevných nosičích a jejich následnému úniku do atmosféry, kde následně znečišťují vodu, půdu a rostliny (CHETIYANUKORNKUL et al. 2006). Působení PAU jsou tedy vystaveni jak lidé, tak i rostliny a živočichové. Těkáním u nízkomolekulárních PAU, vymýváním, fotooxidací a akumulací v rostlinách může docházet k odstraňování těchto látek z prostředí (TEHRANY 2013). Rostliny jsou schopny transformovat PAU pomocí enzymů, které nejsou doposud přesně známy. Důležitou roli v metabolických dějích rostlin hrají peroxidázy, kdy dochází ke tvorbě konjugátů polycyklických aromatických uhlovodíků s kyselinou glukuronovou. Peroxidázy se také částečně zapojují, společně s cytochromem P450, do transformačního mechanismu u rostlin (CHROMA et al. 2002).

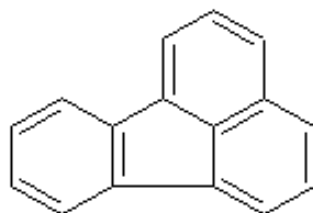
3.5.1 Příjem a akumulace PAU v rostlinách

Rostliny jsou schopny příjmu různých cizorodých látek z vody a půdy. Právě proto jsou velmi často nazývány „zelenými játry“ planety. Rostliny hrají významnou roli při transformaci toxických látek v životním prostředí. Rostlinné organizmy přijímají cizorodé látky stejně tak, jako přijímají živiny. Tyto látky bývají přijímány rostlinou převážně z okolního prostředí pomocí svých kořenů, hrajících důležitou roli ve strategii přežití vodních i terestrických rostlin. Cizorodé látky bývají, kromě kořenů, přijímány i jinými orgány rostlin. Takovými orgány jsou například listy, u kterých závisí na rozdělovacím koeficientu vodní a plynné fáze, typu toxické látky, druhu rostlin, ale i typu povrchu a velikosti samotného listu (KUČEROVÁ et al. 1999). Rostliny polycyklické aromatické uhlovodíky metabolizují / transformují jen v minimální míře. Proto dochází u rostlin k akumulaci PAU v pletivech a dochází tak ke snížení koncentračního gradientu a příjmu PAU (FLETCHER et al. 1990). Polycyklické aromatické uhlovodíky bývají rostlinami přijímány na základě vnitřních a vnějších faktorů. Zejména závisí na druhu rostlin a jejich stádiu růstu a vývoje, stupni chlorace a molekulové hmotnosti organických polutantů, při čemž platí, že čím nižší molekulová hmotnost a stupeň chlorace, tím jsou molekuly PAU rozpustnější ve vodním prostředí a snáze dochází k akumulaci těchto polutantů rostlinou (SCHROLL a SCHEUNERT 1992). Pro příjem polycyklických aromatických uhlovodíků je také důležitý vyšší obsah lipidů ve struktuře rostlinných membrán, kdy při obsahu lipofilních molekul lipidů dochází ke snadnějšímu příjmu perzistentních sloučenin rostlinami (WILD a JONES 1992).

3.5.2 Fluoranthen a jeho vliv na růst a vývoj rostlin

S ohledem na chemické a fyzikální vlastnosti fluoranthenu, patří tento polycyklický aromatický uhlovodík mezi uhlovodíky benzenoidní povahy (GUTMAN et al. 2009). Jeho molekula $C_{16}H_{10}$ je charakteristická obsahem tří kondenzovaných aromatických

jader, které jsou spojeny terciálními uhlíky (obr. 2). Fluoranthen je kromě jiného řazen mezi perzistentní organické polutanty (POP). Za normálních podmínek představuje FLT krystalickou látku, která je práškové nebo jehličkové konzistence s teplotou tání při 110 °C a teplotou varu při 375 °C. Fluoranthen je látkou jen minimálně rozpustnou ve vodě a naopak dobře rozpustnou v olejích a tucích. Se svou molekulovou hmotností 202 se fluoranthen řadí mezi středněmolekulární aromáty. Jedná se o typický, všudypřítomný polycyklický aromatický uhlovodík, který je rozšířený v životním prostředí nejčastěji společně s kadmíem (BRYSELBOUT et al. 2000). Nejčastěji bývá obsažen v černouhelném dehtu a asfaltech, přičemž vzniká v rámci nedokonalého spalovacího procesu, zejména u materiálů, obsahujících uhlík. Vodní prostředí a organismy v něm žijící patří mezi nejvíce náchylné rizikové složky prostředí na znečištění fluoranthenem.



Obr. 2: Chemická struktura molekuly fluoranthenu

Fluoranthen, jako látka, znečišťující životní prostředí, může ovlivňovat biochemické a fyziologické procesy v rostlinách. V současné době je fluoranthen intenzivně studován z fyziologického hlediska vlivu na rychlost klíčení, obsah chlorofylu, listovou plochu, výměnu plynů a fluorescenci chlorofylu (QIUSHUANG et al. 2013). Z výsledků experimentu provedeného kolektivem KUMMEROVÁ et al. (2010) je pravděpodobné, že FLT má negativní vliv na růst a vývoj rostlin. V tomto experimentu byly kultivovány rostliny *Pisum sativum* po dobu 21 dnů v roztocích s různým obsahem fluoranthenu společně v kombinaci s kyselinou indolyl-3-octovou (IAA) a IAA s N6-benzyladeninem (BA). Během již zmíněných 21 dnů byl pozorován inhibiční vliv na růst rostlin u

nejvyšší koncentrace (5 mg/l) FLT. Kromě toho byla zvýšena u rostlin produkce etylénu (o 14 %) a etanu. Naopak produkce CO₂ byla snížena. Fluoranthen má také negativní vliv na kořenový systém, kdy bylo pozorováno jeho poškození, které mělo za následek ovlivnění příjmu, distribuce a utilizace živin. Dále je u FLT patrná indukce poškození fotosyntetického aparátu, která se projevuje prudkým snížením základního fluorescenčního poměru a kvantového výtěžku elektronového transportu ve fotosystému PSII (KUMMEROVÁ et al. 2010). FLT by mohl také plnit možnou funkci fotosenzibilní látky s antivirovou aktivitou v rostlinném těle a mohl by tak nacházet uplatnění jako zdroj biologicky aktivních látek (LINN et al. 1995). KUMMEROVÁ et al. (2006) uvádějí, že fluoranthen, přijímaný rostlinami nemusí mít přímo negativní vliv na vývoj rostlin. FLT přijímaný v nižších koncentracích může působit spíše jako stimulant růstu a vývoje. V jejich experimentech byly založeny testy akutní toxicity na dvou druzích lišejníků (*Lasallia pustulata*, *Umbilicaria hirsuta*). Se zvyšující koncentrací FLT docházelo ke ztenčení stélek u obou druhů. Nejnižší koncentrace (0,01 mg/l) způsobila zvýšení fluorescence chlorofylu až o 170 %.

3.6 Rostlinné hormony

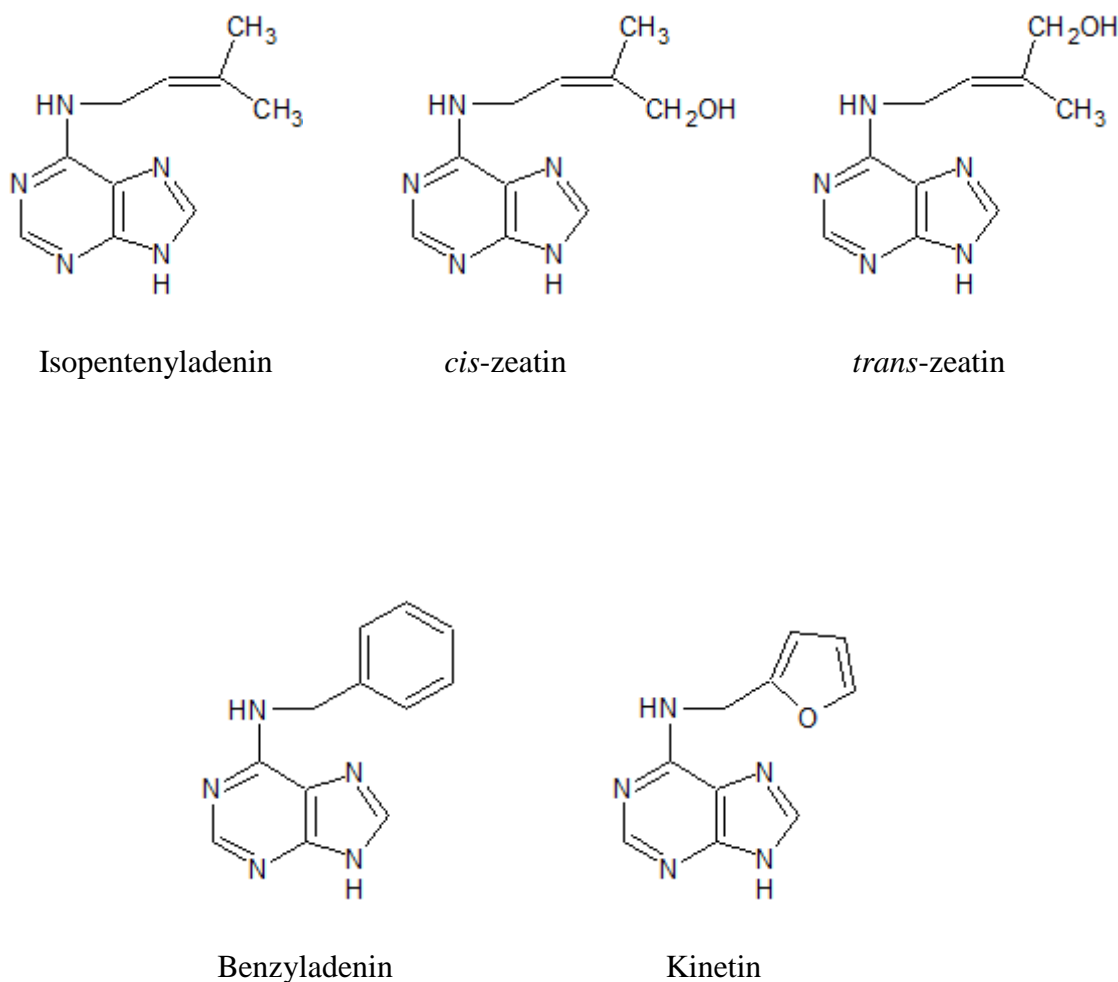
Rostlinné hormony, nebo také fytohormony (FH), představují látky, objevené na počátku 20. století. Fytohormony působí jako regulátory růstu rostlin, které zprostředkovávají informace z vnějšího prostředí. Rostlinné hormony bývají přirozenými metabolity, které regulují v nízkých koncentracích ontogenezi rostlin. Syntéza fytohormonů probíhá v určitých částech rostlin ve velmi nízkých koncentracích. Poté jsou rostlinné hormony z místa syntézy transportovány do jiných rostlinných částí. Zde pak vyvolávají fyziologické reakce rostlin. U této reakce je důležitá vazba FH na specifickou vazebnou bílkovinu nebo receptor na membránách či v cytoplasmě, nebo v jádře. Mezi nejznámější rostlinné hormony jsou řazeny auxiny, cytokininy (CK) a gibbereliny, působící jako stimulanty růstu a vývoje u rostlin. Mezi nejznámější látky, inhibující růst a vývoj rostlin, patří etylén a kyselina abscisová.

3.6.1 Stimulátory růstu a vývoje rostlin

3.6.1.1 Cytokininy

Cytokininy jsou charakterizovány jako látky, podporující buněčné dělení, zvané také jako cytokineze. Odtud pochází název cytokininů. CK tvoří jednu z hlavních skupin rostlinných hormonů. V 50. letech izoloval C. O. Miller se svým kolektivem z autoklávované DNA sledího spermatu látku, která je v současnosti považována za první objev cytokininů. Látka z autoklávované DNA sledího spermatu představovala velmi aktivní látku, identifikovanou jako adeninový derivát N⁶ – furfurylamino-purin, který je v současné době znám také jako kinetin (MILLER et al. 1955). Skoog a Miller, krátce po tomto objevu, navrhli cytokininovou hypotézu o morfogenezi rostlin *in vitro* (SKOOG a MILLER 1957, WERNER et al. 2001). Tato hypotéza popisuje účinky CK, působících protichůdně s auxiny. Protichůdné účinky cytokininů s auxiny ovlivňují negativní regulaci tvorby postranních kořenů, kořenové prodlužování a tvorbu cévních svazků (WERNER a SCHMÜLLING 2009). Kromě podpory buněčného dělení mají cytokininy spoustu fyziologicky působících účinků, jako je např. zeslabení apikální dominance, zpomalení stárnutí, udržování vysoké metabolické aktivity pletiv u rostlin a indukce regenerace orgánů (TARKOWSKI et al. 2004). Cytokininy svou strukturou představují různorodé chemické látky. CK dělíme podle jejich chemické struktury na deriváty adeninu, deriváty močoviny a thiomčoviny. Mezi cytokininy adeninového typu patří dvě podskupiny CK, které jsou děleny podle typu postranního řetězce. Tyto podskupiny jsou nazývány isoprenoidními a aromatickými cytokininy (obr. 3). Isoprenoidní cytokininy se v rostlinném těle nacházejí v mnohem větším množství, než aromatické cytokininy. Isoprenoidní cytokininy byly nalezeny u rostlin kukuřice, *Arabidopsis* a rýže. Mezi tyto CK patří N⁶ – (Δ^2 – isopentenyl) adenin (*iP*), *trans* – zeatin (*tZ*), dihydrozeatin (*DZ*) a *cis* – zeatin (*cZ*). Mezi aromatické cytokininy jsou ze strukturálního hlediska řazeny cytokininy *ortho* – topolin (*oT*), *meta* – topolin (*mT*), benzyladenin (*BA*), *ortho* – methoxytopolin (*MeoT*) a *meta* – methoxytopolin (*MemT*).

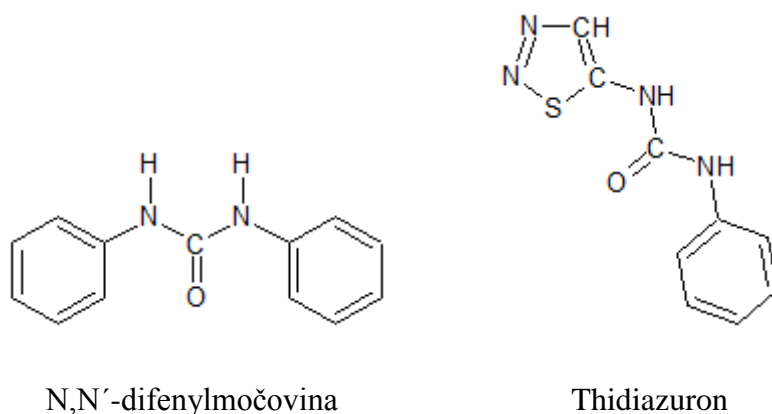
V rostlinách však bývají nalézány pouze *mT* a methoxy – deriváty (*MeoT*, *MemT*) společně s BA (SAKAKIBARA 2006).



Obr. 3: *Strukturní vzorce isoprenoidních a aromatických cytokininů*

Dále rozlišujeme cytokininy syntetického původu, kam řadíme deriváty močoviny a thiomčoviny (obr. 4). Syntetické cytokininy jsou svou molekulární geometrií podobné isoprenoidním CK, přičemž mají shodná rozeznávací vazebná místa. Mezi močovinné deriváty jsou řazeny N, N' – difenylmočovina, N – fenyl - N' – pyridilmočovina. N, N' – difenylmočovina nachází své uplatnění v kulturách *in vitro*, kde je nahrazována za přírodní CK adeninového typu (GROSSMANN 1991). Dalším derivátem močovinného typu je thidiazuron (TDZ). TDZ je známý jako velmi účinný regulátor

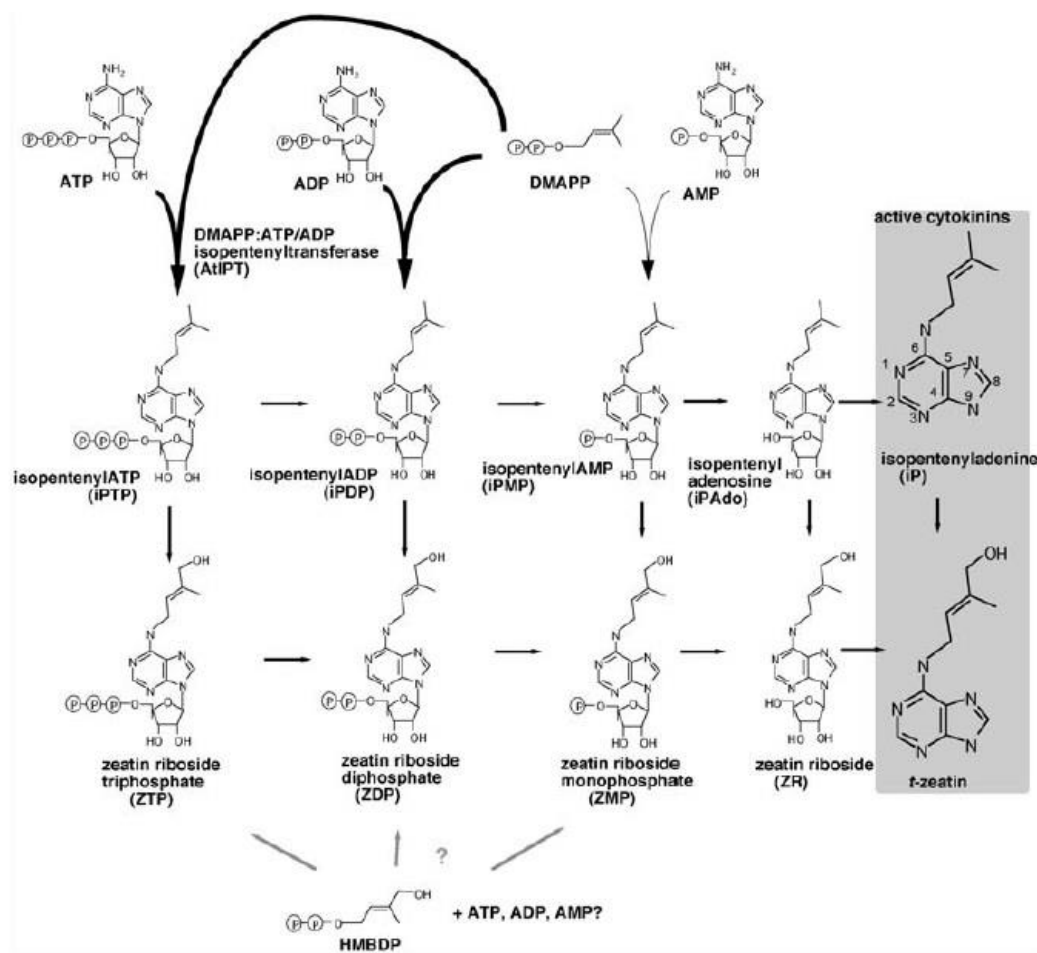
morfogeneze rostlin. Má široké uplatnění zejména při regeneraci z listových explantátů. V rostlinné praxi je využíván samostatně nebo v kombinaci s adeninem (AGGARWAL et al. 2012). Bylo prokázáno, že thidiazuron podporuje produkci etylénu u rostlin (YIP a YANG 1985). Řada cytokininů syntetického původu, které jsou odvozeny od močoviny, má herbicidní účinky, kdy např. thidiazuron je využíván pro defoliaci bavlníku (SRINIVASAN et al. 2006).



Obr. 4: *Strukturní vzorce cytokininů syntetického původu*

V rostlinném těle se CK vyskytují ve dvou formách. První formu představují volné látky. V druhém případě jsou cytokininy u rostlin součástí některých molekul *t*RNA. Podle získaných studií probíhá biosyntéza cytokininů u rostlin v různých částech rostlin (KURAKAWA et al. 2007). Zejména se jedná o mladé části rostlin, bohatých na dělicí se buňky. Nejzákladnějším místem biosyntézy cytokininů bývají kořeny. Odtud jsou pak CK transportovány do míst fyziologické spotřeby. Na transportu cytokininů v rostlinných částech se podílí xylém. Syntéza cytokininů je řízena vnitřními i vnějšími faktory. K samotné biosyntéze dochází prostřednictvím biochemické změny adeninu. Tato změna je započata připojením isoprenoidního řetězce na nukleotid adeninu pomocí enzymu isopentenyltransferázy (IPT). Vhodným substrátem pro IPT jsou u rostlin adenosin – trifosfát (ATP) (obr. 5). (MOK a MOK 2001). Nedávná výzkumná studie kolektivu SAKAKIBARA et al. (2006) prokázala vliv dusičnanů na syntézu CK. Zde se

tyto dusíkaté látky podílejí do značné míry na biosyntéze bílkovin, které jsou důležité pro biosyntézu CK.



Obr. 5: Biosyntéza cytokininů (KAKIMOTO 2003)

Rostlinné hormony, jako jsou cytokininy, ovlivňují ontogenezi rostlin, reakci rostlin na různé vlivy ŽP a spouští dalších fyziologických procesů, které probíhají v tělech rostlin (KAMÍNEK 1992). Jedná se o fytohormony, které jsou definovány jako látky, podporující buněčné dělení za přítomnosti auxinu (NOVÁK et al. 2003). Nadbytek CK v buňkách rostlin způsobuje zvýšení schopnosti organogeneze (SMIGOCKI a OWENS

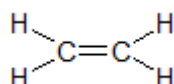
1988). Cytokininy představují důležité regulátory meristematické činnosti a morfogeneze u rostlin (WERNER et al. 2001). Společně s auxiny mohou v kulturách *in vitro* podporovat tvorbu pupenů a kořenů u rostlin. Nízký poměr CK k auxinům způsobuje tvorbu kořenů (KAMÍNEK et al. 1997). V opačném případě, kdy cytokininy převažují nad auxinami, dochází k diferenciaci pupenů. Cytokininy mají schopnost zeslabovat apikální dominanci u rostlin nebo podporovat proliferaci, sloužící k intenzivnímu množení rostlin. Tyto důležité úlohy CK u rostlin mají do budoucna význam pro biotechnologický výzkum (STRNAD 1997). Kromě jiného mohou být CK zodpovědné za opožděnou senescenci u rostlin. Opožděná senescence, způsobená cytokininy, lze prokázat pomocí transgenních rostlin, kdy prostřednictvím *Ti* – plazmidu je do rostlin vložen IPT gen (GAN a AMASINO 1996). Rostliny přijímají minerální látky ze substrátu pomocí svých kořenů. Tento způsob příjmu může mít vliv na hladinu CK v buňkách rostlin. Příjem nízkých koncentrací dusíku kořeny rostlin a nedostatečný příjem fosforu kořenovým systémem rostlin může vést ke snížení celkové hladiny cytokininů v pupenech, listech a kořenech rostlin (EI-D et al. 1979). Jednu z nejvýznamnějších skupin isoprenoidních CK představuje zeatin. Jeho dvě izomerové formy se u rostlin značně liší, a to především svou funkcí, kdy *tZ* podporuje rostlinný růst jako vysoce bioaktivní látka, naopak *cZ* růst rostlin spíše inhibuje (GAJDOŠOVÁ et al. 2011).

3.6.2 Inhibitory růstu a vývoje rostlin

3.6.2.1 Etylén

V 19. století se objevily první zmínky o svítiplynu, který je schopen produkovat látky, způsobující předčasné stárnutí a defoliaci skleníkových rostlin. Účinnou složku tohoto plynu představuje etylén, který má vliv na vývoj rostlin (BLEECKER a KENDE 2000). Dostatečné důkazy o produkci etylénu rostlinami poskytl GANE (1934). Etylén

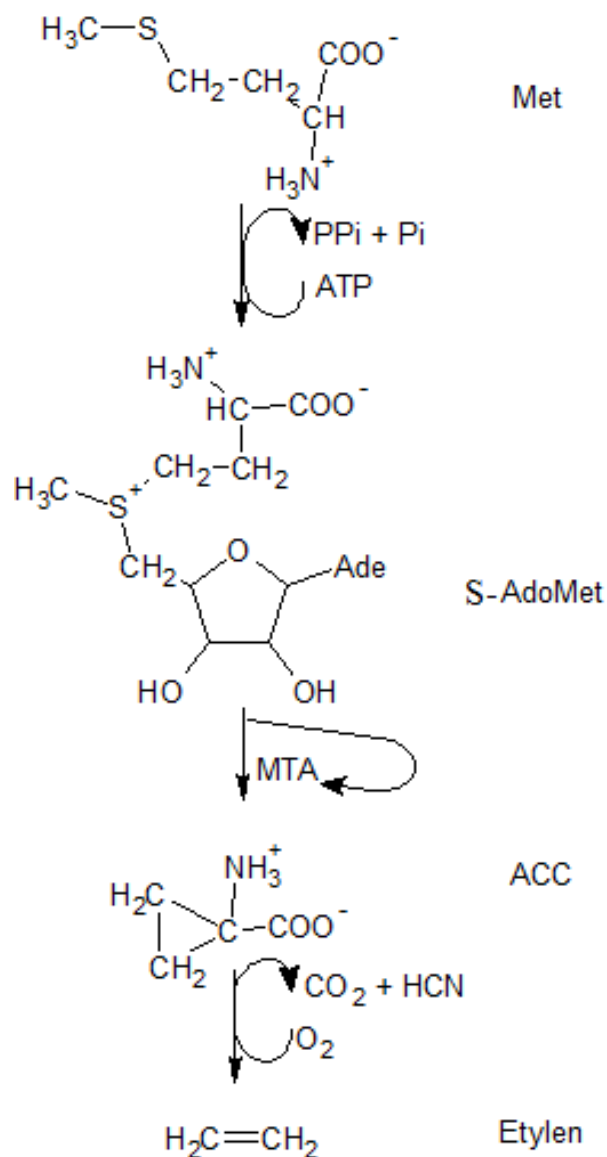
představuje endogenní signální molekulu u rostlin. Z tohoto důvodu je etylén intenzivně studován. Zejména je studována jeho regulace v procesech metabolismu a vývoje rostlin. Z pohledu chemické struktury je etylén nejjednodušším nenasyčeným uhlovodíkem, který obsahuje dva atomy uhlíku a čtyři atomy vodíku (obr. 6). Etylén představuje chemicky aktivní plyn již při velmi nízké koncentraci (BRADFORD 2008). Nepochopitelná dvojná vazba udává reaktivitu tomuto rostlinnému hormonu.



Obr. 6: *Strukturní vzorec etylénu*

Tento plynný hormon může snadno oxidovat na etylénoxid, etylénglykol a formaldehyd. Etylén se může snadno vázat s těžkými kovy. Nejbližším analogem etylénu je propylen.

Biosyntéza etylénu představuje vysoce regulovaný proces, probíhající prostřednictvím poměrně jednoduché metabolické cesty (obr. 7). Etylén je odvozen od aminokyseliny methioninu. Tato aminokyselina je dále převedena na S – adenosylmethionin pomocí enzymu S – adenosylmethionin syntetázy. Prostřednictvím 1 – aminocyklopropan – 1 – karboxylázy syntázy (ACS) je S – adenosylmethionin převeden na kyselinu 1 – aminocyklopropan – 1 – karboxylovou (ACC). Tato kyselina představuje prekurzor určující rychlost syntézy plynného hormonu. S produkcí ACC zároveň vzniká methylthioadenin, který je přeměněn na methionin. Kyselina 1 – aminocyklopropan – 1 – karboxylová je převáděna na etylén, oxid uhličitý a kyanovodík, který je detoxikován do b-kyanoalaninu a slouží tak jako prevence proti stresu u rostlin, který je způsoben vysokou koncentrací syntetizovaného etylénu (ARGUESO et al. 2007).



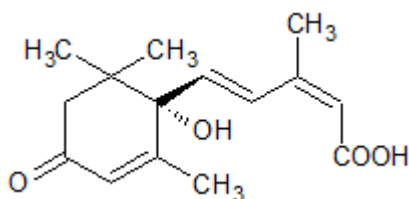
Obr. 7: Biosyntéza etylénu

Etylén je hormon, který se podílí na mnoha vývojových procesech rostlin jako je zrání plodů, dlouhivý růst, klíčení semen a senescenci listů a květů (ELMO a BAYER 1976). Etylén není nezbytný při růstu rostlin za příznivých podmínek, na rozdíl od jiných rostlinných hormonů. Ke zvyšování jeho hladiny v buňkách rostlin dochází zejména při reakci na působení stresorů. Jeho rozhodující role při vývoji kořenů u rostlin je reakcí na podněty okolního prostředí (CLARK et al. 1999). Etylén má inhibiční vliv na prodlužovací růst kořenů (GLICK et al. 1998). Etylén je považován za hormon, který má spíše inhibiční vliv na fyziologické procesy rostlin. V současnosti

však probíhá řada výzkumů, při kterých je studován vliv etylénu, podporující vývojové a růstové procesy u rostlin (PIERIK et al. 2006). ABELES a LONSKI (1968) popsali pozitivní vliv tohoto plynného hormonu na klíčení semen u rostlin salátu.

3.6.2.2 *Kyselina abscisová*

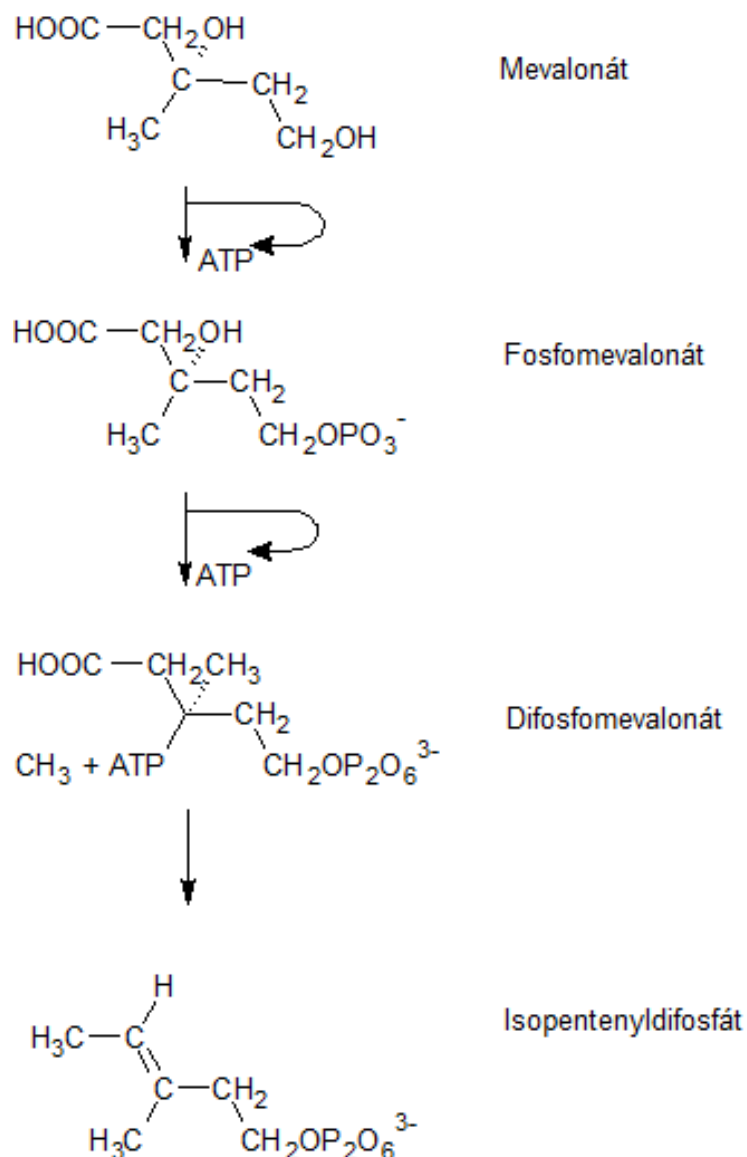
V 60. letech byla z opadlých plodů mladých rostlin bavlníku izolována, která měla inhibiční vliv na ontogenezi rostlin. Tato izolovaná látka byla nazvána dormin a dále byla přejmenována na kyselinu abscisovou. ABA patří mezi rostlinné hormony, mající inhibiční vliv na růst a vývoj rostlin, na rozdíl od FH stimulační povahy. Kyselina abscisová má zásadní vliv na dormanci a významně se podílí na vývojových procesech u semen rostlin. ABA se nachází v nízkých koncentracích u mnoha rostlinných druhů (SONDHEIMER et al. 1968). Mezi stresové vlivy životního prostředí patří chlad, zasolení půdy a vodní stres – vysoušení (BUSK a PAGES 1998), přičemž se kyselina abscisová uplatňuje jako centrální regulátor při adaptaci rostlin.



Obr. 8: *Strukturní vzorec opticky aktivní kyseliny abscisové*

Kyselina abscisová je podle chemické struktury je zařazována mezi seskviterpeny. Obsahuje 15 atomů uhlíku a patří tak mezi terpenoidní hormony, mezi něž patří také gibbereliny. Vyskytuje se ve formě několika izomerů. U rostlinných zástupců je fyziologicky aktivní (+) – S – izomer. Ve své molekule obsahuje kyselina abscisová asymetrický atom uhlíku, díky němuž patří mezi opticky aktivní sloučeniny (obr. 8).

V nativní formě je sloučeninou termolabilní, přičemž její bod tání se v krystalické formě pohybuje při 161 °C. ABA je relativně stabilním rostlinným hormonem vůči teplotním podmínkám. Metanol, etanol, éter, ale i chloroform a etylacetát představují organická rozpouštědla, ve kterých je ABA lehce rozpustná. Xantofyly představují základní prekurzory kyseliny abscisové, které jsou odvozeny od isopentenyl – adenosinfosfátu (IPP). Syntéza IPP probíhá u rostlin v plastidech přes mevalonát (obr. 9). Hladina kyseliny abscisové u rostlin je regulována prostřednictvím zeaxantinu. Zeaxantin se podílí na katalýze přeměny zeaxantinu na violaxantin, pomocí enzymu zeaxantin – epoxidázy (ZEP). LIOTENBERG et al. (1999) prokázali, že změny, probíhající v expresi genu ZEP, se podílejí na úpravě biosyntézy ABA pouze v kořenech a semenech rostlin. Kyselina abscisová se syntetizuje prostřednictvím oxidačního štěpení epoxy – karotenoidů, které jsou přítomny v rostlinách ve vysoké koncentraci, na xantoxin. Xantoxin je dále přeměněn na kyselinu abscisovou, a to přes meziproduct nazývaný ABA – aldehyd (TAN et al. 1997). ABA je rostlinami odbourávána pomocí oxidace, dávající vznik kyselině fazeové a kyselině dihydrofazeové. Kyselina abscisová, podobně jako ostatní rostlinné hormony, je schopna tvořit konjugáty s molekulami glukózy. Konjugáty, které jsou nazývány glykosidy a glukosylestery, se hromadí ve vakuolách, naopak od volné kyseliny abscisové, která se nejvíce nachází v chloroplastech.



Obr. 9: Biosyntéza isopentenylidifosfátu jako prekurzoru ABA (MILBORROW 2001)

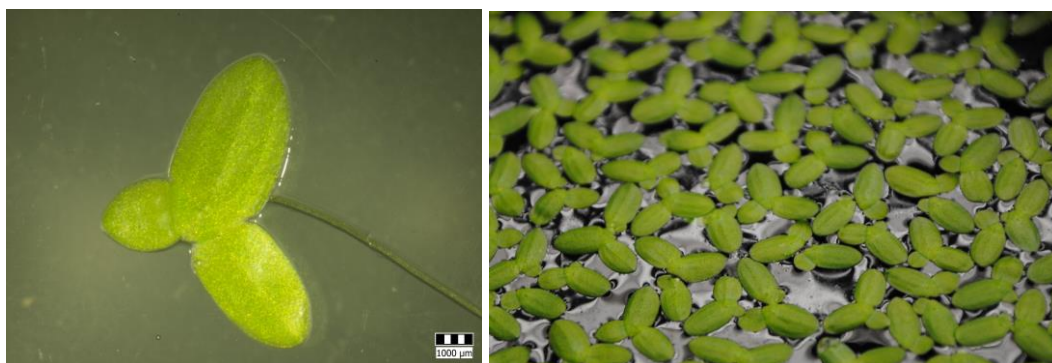
V nízkých koncentracích se kyselina abscisová nachází u většiny rostlinných druhů. K mnohonásobnému nárůstu koncentrace endogenní hladiny ABA v těle rostlin dochází při působení stresových podmínek (PODLEŠÁKOVÁ et al. 2012). Při nadbytečném množství kyseliny abscisové dochází k uzavírání průduchů, které zprostředkovávají signální dráhy, které jsou závislé na vápníku, aktivovaného peroxidem vodíku, IP_3 a oxidem dusnatým. Tyto meziprodukty jsou syntetizovány pro indukované uzavření průduchů, které redukuje rostlinnou transpiraci (NEILL et al. 2002). Mezi kyselinou abscisovou a etylénem dochází k významné interakci, kdy endogenní ABA brzdí ve

značné míře tvorbu etylénu, což nevede k inhibici tvorby a růstu kořenů. Tato interakce vede spíše ke stimulačním účinkům na tyto procesy (SHARP 2002).

3.7 Okřehek menší (*Lemna minor* L.)

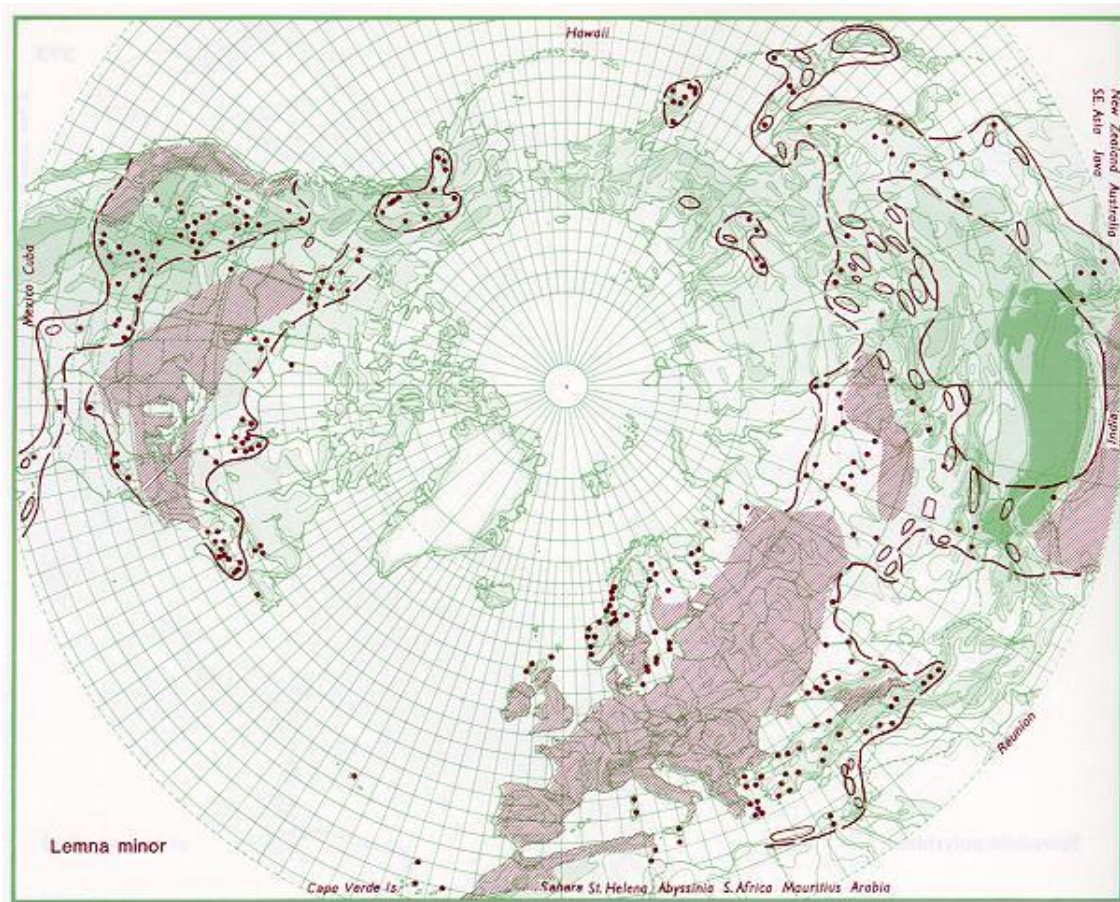
Vytrvalé jednoděložné rostliny z čeledi *Lemnaceae* jsou vhodnými modelovými organismy pro studium růstu a vývoje rostlin. Rostliny z této čeledi jsou pro studium morfologických a fyziologických vlastností vhodné zejména z důvodu své velikosti, stavby rostlinného těla, přizpůsobeného životu ve vodním prostředí s usnadněným příjmem látek. Vzhledem ke své vysoké rychlosti růstu slouží rostliny *Lemnaceae* jako významný ukazatel přírůstku sušiny. Kromě jiného tyto rostliny představují geneticky jednotný materiál z důvodu svého vegetativního rozmnožování (STRNADOVÁ 1990). Ve fyziologickém, morfologickém, ale i genetickém a biochemickém výzkumu nachází uplatnění *Lemna minor* (okřehek menší) (obr. 10). Jedná se o drobnou vodní rostlinu, s listy na hladině plovoucími a bez morfologicky specializovaných a ke dnu klesajících turionů. Roste ve stojatých a pomalu proudících vodách, které jsou plně osluněny i zastíněny. Obvykle se jedná o vody mezotrofní až eutrofní. Právě pro svou malou velikost je okřehek snadno využitelný v elektronové mikroskopii, při které lze jednoduše pozorovat ultrastrukturu jeho buněk, která je v určitých ohledech strukturálně podobná jiným jednoděložným rostlinám svou agregací endoplazmatického retikula, jadernou degenerací a četnými krystalickými inkluzemi. Jeho rostlinná stavba je jednoduchá. Jeho proměnlivost je zejména výrazná ve tvaru a velikosti lístků, kdy výrazná variabilita je dána prostředím. Obvykle vějířovité lístky jsou složeny z buněk, oddělených velkými intercelulárními prostory. Tyto prostory jsou vyplněny vzduchem, který poskytuje vztlak. Horní epidermis okřehku bývá vysoce kutinizovaná a obsahuje četné průduchy. Rostliny *Lemna* se vyznačují malým počtem cévních svazků. Xylém tvoří ztlustlé tracheje. Délka kořene je závislá na podmínkách prostředí. V optimálních podmínkách jsou kořeny krátké, jejichž délka se pohybuje v rozmezí několika milimetrů až 14 cm. Kořeny, mající absorpční funkci, se podílejí na udržení vějířovitých lístků na

vodní hladině v horizontální poloze (STRNADOVÁ 1990). Kořenová čepička obsahuje krystaly šťavelanu vápenatého (FRANCESCHI 1989), které představují nejčastější krystalické inkluze, které se vyskytují v rostlinných buňkách, obsahujících až stovky opticky viditelných krystalů (ARNOTT 1966).



Obr. 10: *Lemna minor* L.

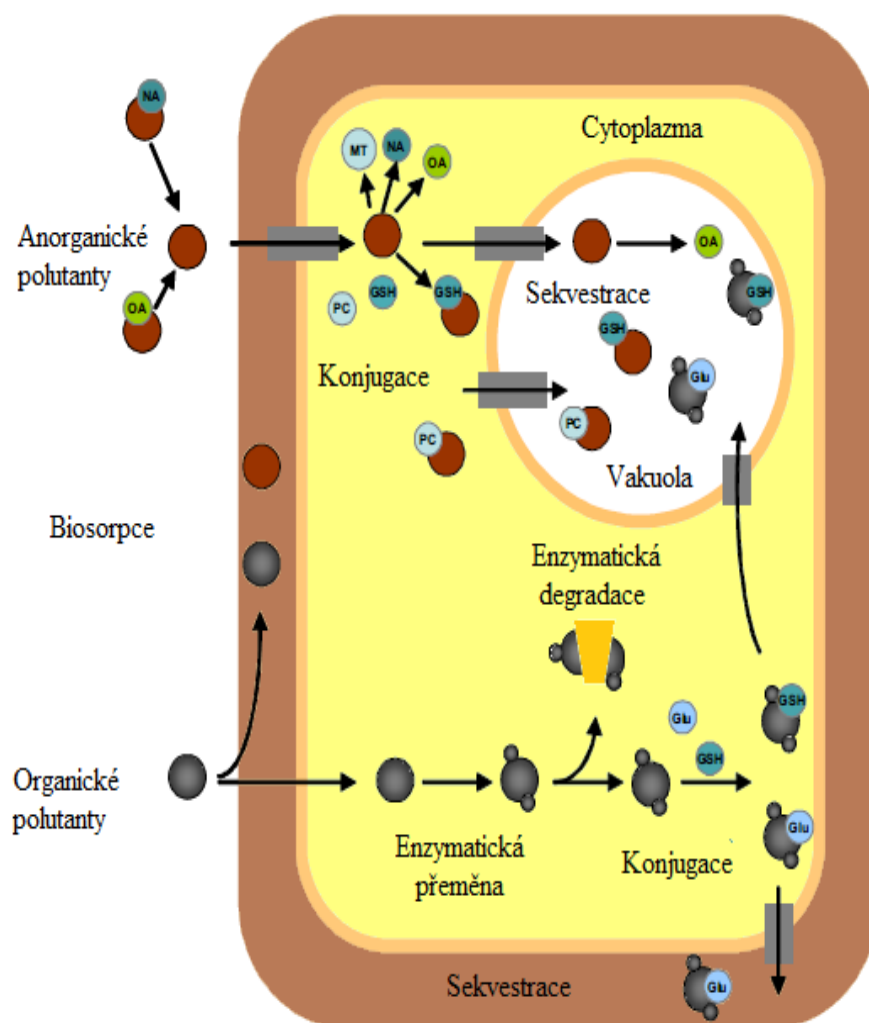
Je známo 13 druhů rodu *Lemna*, které jsou rozšířeny téměř po celém světě (obr. 11). V České republice se nejčastěji vyskytuje kromě okřehku menšího také okřehok hrbatý (*Lemna gibba* L.), okřehok červený (*Lemna turionifera* L.) a okřehok trojbrázdý (*Lemna trisulca* L.). Tyto druhy lze roztroušeně a hojně nalézt na většině našeho území od nížin až do podhůří. Proniká i do nižších partií hor. Deset z 13 druhů lze na základě genetické podobnosti prostřednictvím analýzy polymorfismu délek amplifikovaných fragmentů DNA (AFLP) jednoznačně rozlišit (BOG et al. 2010). Mezi těchto deset geneticky rozpoznatelných druhů se řadí i okřehok menší.



Obr. 11: Rozšíření okřehku ve světě (HULTÉN 1971)

Rostliny okřehku menšího rostou v místech s nízkým obsahem živin velice pomalu. Vhodné prostředí však umožňuje okřehku menšímu rychlý růst, kdy nárůst biomasy vzroste až na dvojnásobek původní hmotnosti během dvou dnů (SKILLICORN et al. 1993). Rostliny okřehku menšího rostou i při nižších teplotách vody jako je 5 – 7 °C a atmosferické teplotě 1 – 3 °C. V laboratorních podmínkách je schopen růstu při pH 4,5 – 7,5. Naopak při pH vyšším než 7,5 je růst okřehku menšího zcela zastaven (OBEK a HASAR 2002). Kromě jiného obsahují rostliny okřehku vysoké množství aminokyselin, bílkovin, živin a minerálů. Je známo, že okřehek menší obsahuje vyšší obsah nenasycených mastných kyselin oproti nasyceným mastným kyselinám (MUKHERJEE et al. 2010).

Okřehek menší má schopnost odstraňovat kontaminanty z vodního prostředí, ale i fixovat – akumulovat v těle rostlin a ukládat je do buněčných organel a buněčné stěny. Zde jsou pak chemicky vázány na molekuly celulózy (MKANDAWIRE et al. 2003). Prostřednictvím detoxikačních mechanismů jsou z buněčných kompartmentů tyto látky odstraňovány. Jedná se zejména o zvýšenou tvorbu glutationu, glukózy (Glu), metalothioneinu (MT), nikotinaminu (NA), nebo také organických kyselin (OA) (obr. 12). Okřehek se vyznačuje výbornými schopnostmi akumulovat sloučeniny fosforu, dusíku a těžkých kovů. Akumulované látky jsou rostlinami enzymaticky rozkládány. Rostliny okřešku menšího jsou schopny cizorodé látky, které byly akumulovány do buněčných struktur, úplně mineralizovat na CO₂ či méně toxické sloučeniny. Na mineralizaci je předpokládán vliv mikrobiální činnosti, který však nebyl doposud objasněn (MKANDAWIRE a DUDEL 2007). Většina rostlin druhů *Lemna* je schopna transformovat a akumulovat perzistentní organické polutanty. Kromě jiného jsou tyto druhy také schopny odolávat extrémním koncentracím cizorodých látek, které se ukládají do organel buněk rostlin (GAO et al. 2000).



Obr. 12: *Obranný mechanismus na buněčné úrovni u rostlin okřehku (MKANDAWIRE a DUDEL 2007)*

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Rostlinný materiál

Pro experimenty, které byly provedeny v předkládané závěrečné práci, byly využity rostliny okřehku menšího (*Lemna minor* L.) z čeledi *Araceae* (dříve *Lemnaceae*) (obr. 13). K tomuto účelu byly rostliny okřehku poskytnuty Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ), který sídlí v Brně.



Obr. 13: Kultivace okřehku v laboratorních podmínkách

4.1.2 Kultivace okřehku menšího

Kultury rostlin okřehku menšího byly kultivovány v tmavých růstových komorách ve Steinbergově mediu (tab. 1) při teplotě 19 – 21 °C a při fotoperiodě 10 hodin tmy a 14 hodin světla. Každých deset byly rostliny přenášeny do nově připraveného Steinbergova media. Toto vše probíhalo za sterilních podmínek ve flow – boxu, za účelem udržet kultivaci rostlin bez zanesení kontaminace a udržet tak životaschopné rostliny, sloužící pro případ nutnosti založení nového experimentu.

Zásobní roztok č. I	KNO_3 (17,50 g/l)
	K_2HPO_4 (4,50 g/l)
	KH_2PO_4 (0,63 g/l)
Zásobní roztok č. II	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (5 g/l)
Zásobní roztok č. III	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (14,75 g/l)
Zásobní roztok č. IV	H_3BO_3 (120 g/l)
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (180 g/l)
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (44 g/l)
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (180 g/l)
Zásobní roztok č. V	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (760 g/l)
	Na_2EDTA (1500 g/l)

Tab. 1: Složení koncentrátů Steinbergova media

4.2 Založení experimentu a odběry vzorků

Rostliny *Lemna minor* L. byly ošetřeny fluoranthenem ve čtyřech variantách (0,1mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l a 5 mg/l). Součástí experimentu dále představovala kontrola, kultivovaná za stejných podmínek i se stejnými rostlinami okřehku menšího, ovšem bez přítomnosti fluoranthenu. Kořeny a listy rostlin, zakrývající hladinu media, představovaly hlavní součást pozorování.

Vzorky byly odebírány sterilně ve flow – boxu po 5, 12 a 21 dnech od založení experimentu. Přičemž délka trvání experimentu byla 21 dní. Výjimku tvořilo stanovení produkce etylénu, kdy měření probíhalo po 3, 6 a 9 dnech a tento experiment tak trval 9 dní. Vzniklé fyziologické změny u rostlin byly hlavním kritériem pro posouzení míry stresu u rostlin.

4.3 Stanovení počtu rostlin, délky kořenů a viability rostlin

Fotodokumentace, sloužící pro stanovení počtu rostlin, byla provedena v průběhu 5, 12 a 21 dnů od samotného založení experimentu. Počet rostlin okřehku menšího v jednotlivých variantách koncentrací fluoranthenu byl stanoven pomocí počítačového programu ImageJ.

Měření délky kořenů u rostlin probíhalo odebráním deseti rostlin od každé koncentrace. Tyto kořeny byly na filtračním papíru zbaveny přebytečné vody. Jejich délka byla měřena prostřednictvím milimetrového pravítka. Vzniklé výsledné hodnoty byly zprůměrovány a vyhodnoceny grafickým způsobem.

Po 21 dnech kultivace od založení experimentu byla také hodnocena viabilita rostlin *Lemna minor* L. kdy v rámci fotodokumentace byl stanoven procentický podíl odumřelých a rostoucích rostlin.

4.4 Stanovení specifické listové plochy a obsahu sušiny

Pro stanovení specifické listové plochy (SLA), která představuje podíl plochy listu a hmotnosti sušiny tohoto listu, bylo odebráno z prvního paralelního měření deset rostlin okřehku menšího. Tyto odebrané rostliny byly umístěny do malé kultivační nádoby, kde byly nasnímány pomocí fotoaparátu Nikon a uloženy ve formátu JPEG. SLA byla stanovena v mm² ze snímků černobílého jednobitového formátu, který byl vytvořen pomocí programu ImageJ. Rostliny byly dále usušeny při teplotě 85 °C po dobu 48 hodin a zváženy na analytických vahách s přesností na 0,0001 g.

Stejně jako pro stanovení SLA byly využity stejné rostliny okřehku pro stanovení obsahu sušiny (LDMC). Těsně před zvážením byly rostliny odebrány a zbaveny přebytečné vody na filtračním papíru. Rostlinný materiál byl zvážen na analytických vahách s přesností na 0,0001 g. Ze zjištěných hodnot pro stanovení SLA byly využity hodnoty sušiny rostlin. Z hodnot čerstvé hmotnosti a hmotnosti suchých rostlin byl stanoven procentický podíl sušiny v rostlinách.

4.5 Stanovení obsahu chlorofylu „a“ a „b“

U okřehku menšího byla pro stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů analyzována biomasa, která vzrostla během celé expozice experimentu. Všechny rostliny okřehku byly vyjmuty a zbaveny přebytečné vody pomocí filtračního papíru. Vody zbavené rostliny byly poté homogenizovány. Vzniklý homogenát rostlinné biomasy byl přelit 5 ml acetonu a poté přefiltrován přes sintr. Uzavřené zkumavky se vzorky byly umístěny do chladničky.

Pomocí spektrofotometru Spectronic 20 Genesis byl ve zchlazeném extraktu stanoven obsah chlorofylu „a“ a chlorofylu „b“. Samotná analýza testovaných vzorků probíhala ve skleněných hranolových kyvetách při vlnových délkách 663 nm a 645 nm.

Hodnoty získané během měření absorbance rostlinných vzorků byly dosazeny do vzorců pro výpočet chlorofylu „a“ ($C_{\text{Chl } a} = 12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}$) a chlorofylu „b“ ($C_{\text{Chl } b} = 22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}$). Následně byly vzniklé hodnoty zprůměrovány a graficky znázorněny.

4.6 Stanovení kvantového výtěžku elektronového transportu ve fotosystému PSII

Pro analýzu stanovení kvantového výtěžku elektronového transportu ve fotosystému PSII byly odebrány tři rostliny okřehku od každé experimentální koncentrace. Rostliny byly osušeny pomocí filtračního papíru a pomocí fluorimetru FluorPen byl měřen kvantový výtěžek elektronového transportu ve fotosystému PSII, signalizující vliv stresoru na primární procesy fotosyntézy u rostlin. Vzniklé hodnoty byly zprůměrovány a graficky zhodnoceny.

4.7 Stanovení intaktnosti membrán

Intaktnost membrán u rostlinných vzorků byla stanovena konduktometricky podle LIU et al. (2000). Analyzované vzorky byly 3x opláchnuty deionizovanou vodou. Cca 0,2 g rostlinného materiálu bylo vloženo do tub s deionizovanou vodou a umístěno po dobu 15 minut na roller. Po uplynutí této doby byly vzorky z rolleru vyjmuty a byla měřena počáteční konduktivita (E_1) při 25 °C. Po změření E_1 konduktivity byly analyzované vzorky přivedeny k varu a ochlazeny na 25 °C, při kterých byla měřena konduktivita, vzniklá po povaření (E_2). Z podílu rozdílů konduktivit před a po povaření vzorků od konstantní hodnoty konduktivity použité deionizované vody (E_0) byla

vypočtena procentuální hodnota uvolňovaných elektrolytů pro membránovou permeabilitu (REL). Výsledné hodnoty byly zprůměrovány a graficky znázorněny.

Vzorec pro stanovení REL:

$$\text{REL} = \frac{E_1 - E_0}{E_2 - E_0} * 100 [\%]$$

4.8 Stanovení lipidové peroxidace

Lipidová peroxidace byla stanovena podle GAO et al. (2009). Cca 0,2 g rostlinného materiálu bylo přelito 0,1% TCA a následně homogenizováno. Po homogenizaci následovala centrifugace při 3600 otáčkách po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl odebrán a následně smíchán s 1-2 ml 0,67% TBA. Vzorky byly přivedeny k varu a vařeny při 100 °C po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byly vzorky zchlazeny na pokojovou teplotu. Následovala centrifugace po dobu 5 minut při 1800 otáčkách, po které byly vzorky měřeny pomocí spektrofotometru Spectronic 20 Genesis při vlnových délkách 450, 532 a 600 nm. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány a graficky zhodnoceny.

Vzorec pro stanovení vyprodukovaného MDA:

$$c = 6,45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0,56 \times A_{450}$$

4.9 Stanovení hladiny endogenních cytokininů prostřednictvím ELISA analýzy

Pro stanovení hladiny endogenních cytokininů v rostlinném materiálu byla využita imunoanalytická metoda ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay), při které dochází ke kompetici navázání traceru (hapten značený enzymem) nebo haptenu na protilátku vyvázanou na stěnu mikrotitrační destičky. Této imunoanalytické metodě předcházela extrakce, purifikace a separace jednotlivých cytokininů pomocí vysokoúčinné kapalně chromatografie (HPLC).

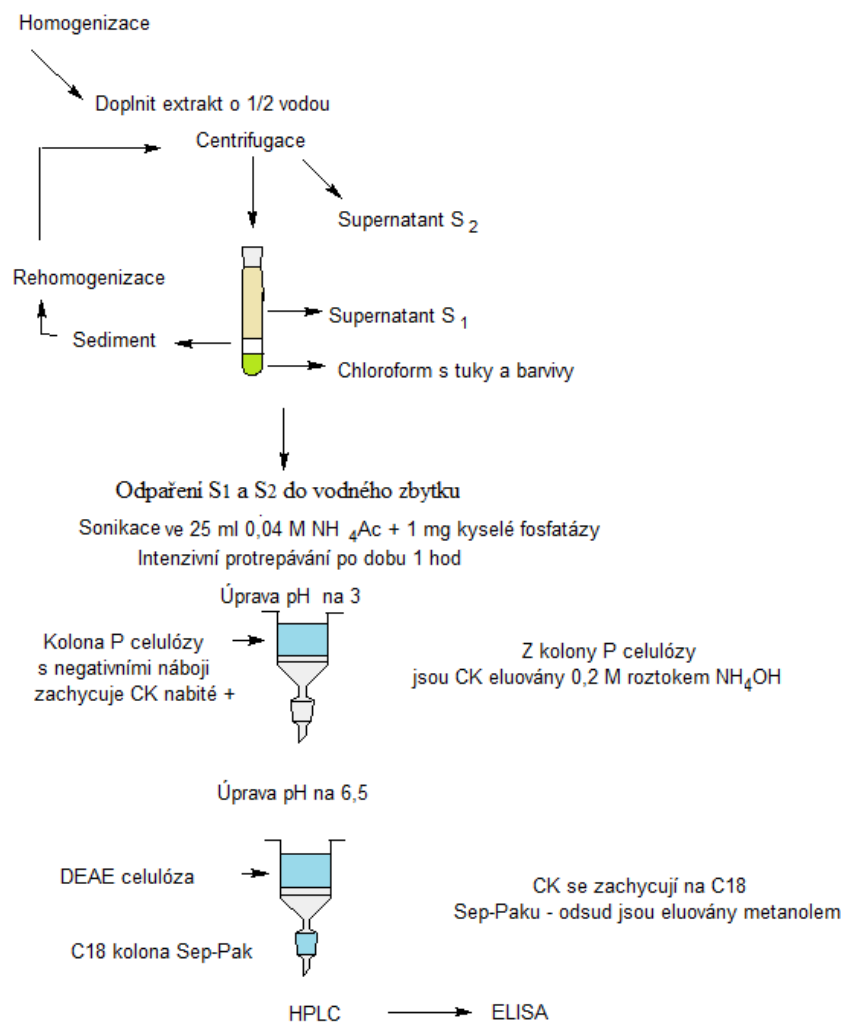
Rostliny okřehku menšího byly lyofilizovány na lyofilizátoru Christ Alpha 1-2 (obr. 14) a poté homogenizovány v třecí misce, která byla dostatečně vychlazená na konzistenci pudru. Ke vzniklému homogenátu byla přidána modifikovaná Bieleškiho fixáž složená z MeOH, CHCl₃ a H₂O v poměru 13:5:2. Poté byl homogenát kvantitativně přenesen do erlenmayerových baněk. Tyto baňky byly přelepeny parafilmem a uchovány v mrazáku po dobu 24 hodin a při teplotě -20 °C.



Obr. 14: A) lyofilizátor Christ Alpha 1-2 B) lyofilizované vzorky *Lemna minor*

Po 24 hodinách byly vzorky protřepávány po dobu jedné hodiny při teplotě 4 °C. Vzorky byly poté doplněny deionizovanou vodou o nízké vodivosti o poloviční objem. Frakcionace supernatantu od chloroformu (odstraněn po centrifugaci) s obsahem lipidů a pigmentů, který obsahoval cytokininy, bylo docíleno centrifugací při 3500 otáčkách po dobu 15 minut.

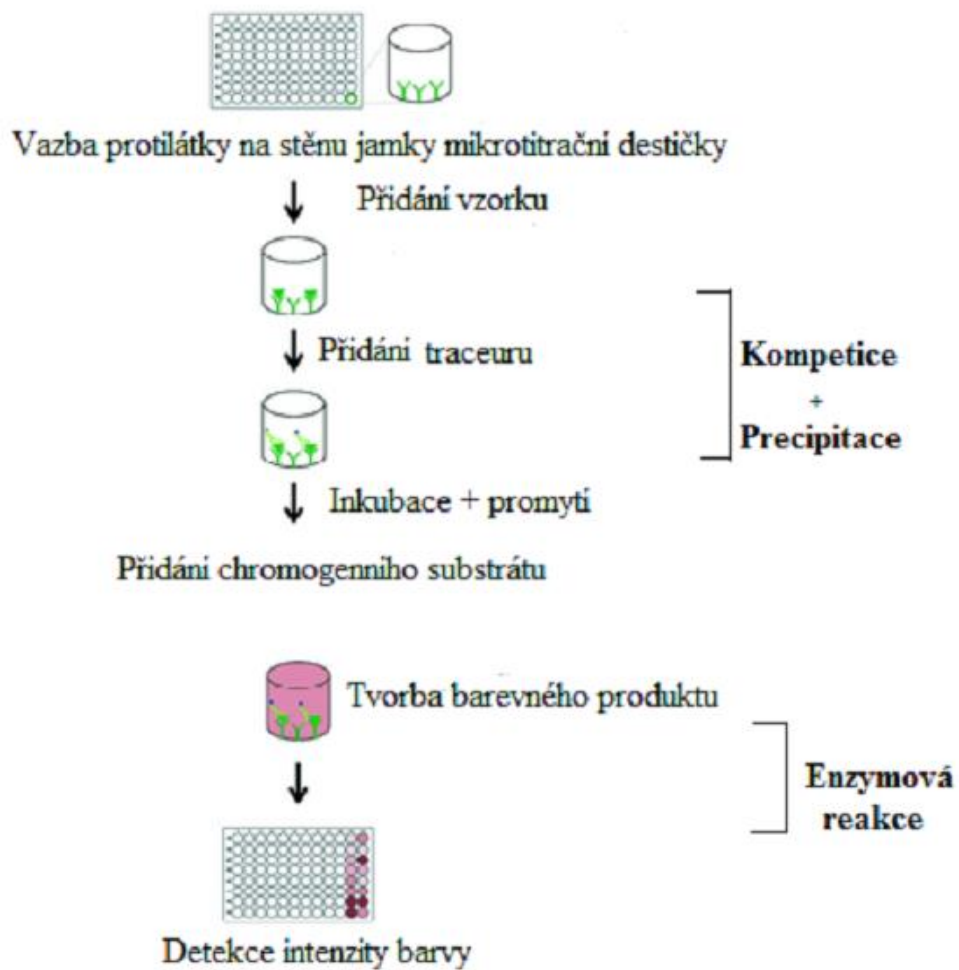
Po dobu této doby byl vzniklý supernatant přenesen do odpařovacích baněk. Zbylý sediment byl rehomogenizován 100% metanolem. Na rotační vakuové odparce byly spojené supernatanty odpařeny do vodného zbytku. Za použití 0,04M acetátamonného pufru došlo k rozpuštění cytokininů. Ribosidy těchto cytokininů byly dále štěpeny pomocí kyselé fosfatázy po dobu jedné hodiny. U vzorků bylo upraveno pH na 3,00. Cytokininy s kladným nábojem byly odděleny od látek s negativním nábojem za použití iontoměničové chromatografie, při které byly využity kolony P-celulózy. Na těchto kolonách byly cytokininy zachyceny a pomocí 0,2M amoniaku eluovány. Po eluaci cytokininů z kolon P-celulózy bylo pH vzorků upraveno na pH 6,5. Následně byla provedena chromatografie na reverzní fázi na DEAE celulóze, která je spojená s C18 kolonou Sep-Pak. Pomocí metanolu byly zachycené cytokininy eluovány ze Sep-Pak kolony. U vzorků došlo k odpaření metanolu na rotační vakuové odparce. Takto upravené vzorky představovaly finální vzorky pro HPLC separaci (obr. 15).



Obr. 15: Schématické znázornění postupu čištění cytokininů

Pomocí kolon Phenomenex na přístroji HPLC od firmy ECOM byla provedena separace cytokininů a jejich ribosidů. Roztoky metanolu a 0,05% trifluoroctové kyseliny (TFA) představovaly mobilní fázi, jejíž průtok byl 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$. Jednotlivé frakce cytokininů u vzorků byly při HPLC separaci sbírány podle příslušných časů a byly odpařeny do sucha. Takto odpařené frakce cytokininů ve vzorcích byly rozpuštěny ve fyziologickém tris-pufrovaném roztoku (TBS). Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky byla nanášena směs uhličitanového pufru s protilátkou, kde byla inkubována přes noc. Během této inkubace došlo k navázání protilátky na stěny jamek. Po tomto kroku byla mikrotitrační destička promyta destilovanou vodou a její stěny byly potaženy roztokem hovězího sérového albuminu (BSA) v TBS pufru. Inkubace destičky

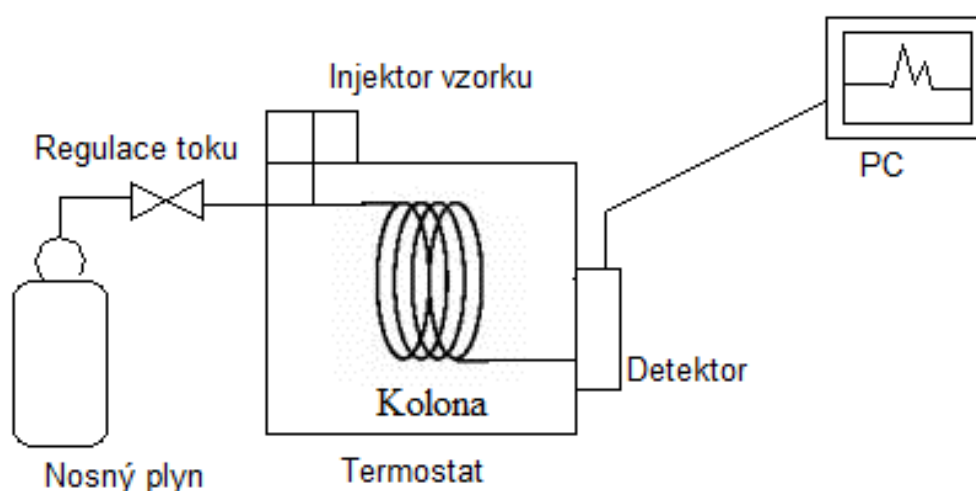
proběhla při pokojové teplotě po dobu jedné hodiny. Následovalo promytí destičky v destilované vodě, po kterém byly do jamek destičky nanášeny cytokininové standardy a analyzované vzorky, konjugát alkalické fosfatázy s ribosidem příslušného cytokininu a substrát *para*-nitrofenylfosfát rozpuštěný v uhličitanovém pufru, které představují komponenty nezbytné pro ELISA analýzu. Po nanesení všech komponentů následovala inkubace po dobu jedné hodiny, během které probíhala tvorba barevného produktu (*p*-nitrofenolát sodný), která je dána enzymem, navázaným na ribosidu určitého cytokininu. K zastavení barevné reakce došlo prostřednictvím 5M KOH. Pomocí fotometrie byly stanoveny při vlnové délce 405 nm výsledné hodnoty obsahu cytokininů ve vzorcích okřehku menšího a porovnány s řadou standardů (obr. 16).



Obr. 16: *Princip ELISA analýzy*

4.10 Stanovení produkce etylénu u rostlin

Na stanovení produkce etylénu u okřehku byla využita plynová chromatografie. Tato metoda představuje nejčastěji využívanou separační metodu k metabolickému studiu pro analýzu celé řady látek, jako jsou aminokyseliny, cukry a organické kyseliny (WOJTOWICZ et al. 2012). Pro naše stanovení produkce etylénu rostlinami okřehku byl využit plynový chromatograf (obr. 17) s cca 50 mm kapilární kolonou Al_2O_3 "S" 15 μm , ID 0,53 mm, vyrobený italskou firmou FISSONS.

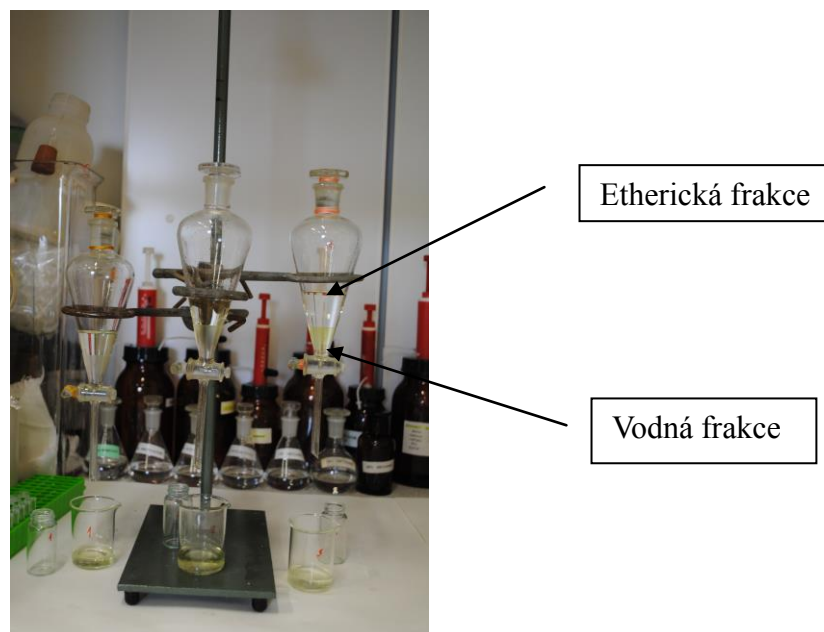


Obr. 17: Schématické znázornění plynového chromatografu

Pomocí injekční stříkačky s jehlou byl nasán jeden ml vzduchu ze skleněné lahvičky, uzavřené gumovým septem, které obsahovaly kontrolní rostliny okřehku menšího a rostliny, ošetřené fluoranthenem. Odebraný vzorek plynů z kultivace byl vnesen do nástřikové komory. Zde došlo k jeho odpaření a poté byl ve formě par unášen až k samotnému konci kolony prostřednictvím nosného plynu. Tímto způsobem docházelo k neustálému dělicímu procesu. Pomocí detektoru, udávajícího výsledné hodnoty produkce etylénu, došlo k indikaci separovaných látek. Ke statistickému hodnocení došlo po konverzi na 1 nl vyprodukovaného etylénu rostlinami okřehku v 1 l uzavřeného prostoru.

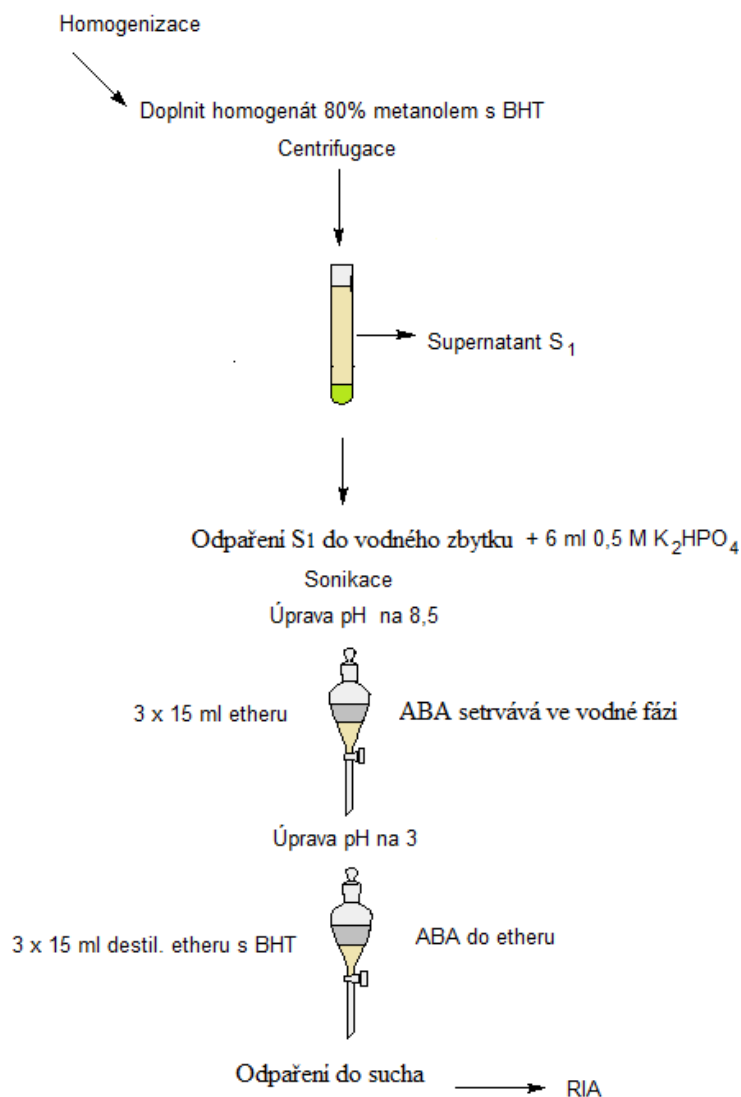
4.11 Stanovení obsahu kyseliny abscisové prostřednictvím radioimunoanalýzy

Kyselina abscisová byla z rostlinného materiálu extrahována pomocí metody frakcionace kyseliny abscisové v systému roztoku 0,5 M K_2HPO_4 /ether. Pomocí citlivé kvantitativní imunoanalytické metody, která je známá pod názvem radioimunoanalýza (RIA), bylo stanoveno celkové množství kyseliny abscisové ve vzorcích rostlin. V první řadě byl rostlinný materiál zhomogenizován v třecí misce, která byla vychlazená tekutým dusíkem. Tento homogenát byl přelit 80% redestilovaným metanolem společně s 2,6 – di – t – butyl – 4 – hydroxytoluen (BHT). Následně došlo ke slítí vzorků do kádinek. Po uplynutí 24 hodin byly vzorky intenzivně protřepávány po dobu jedné hodiny. Následně byla provedena centrifugace při 5000 otáčkách po dobu pěti minut. Vzniklý supernatant byl slit do odpařovacích baněk. Zde pak došlo k odpaření metanolu až do vodného zbytku prostřednictvím vakuové odparky na vodní lázni s teplotou vody 40 °C. K vodnému zbytku byly po odpaření metanolu přidány 3 ml 0,5 M K_2HPO_4 pufru. Poté byla provedena sonikace vzorků, po které následovalo přidání totožného množství pufru (6 ml). Takto upravené vzorky byly slity do skleněných kádinek, kde bylo upraveno pH roztoků na 8,5. Poté bylo ke vzorkům přidáno 15 ml etheru. Vzorky s přidáním etherem byly vlivem protřepávání v dělicí nálevce extrahovány na frakci vodnou a etherickou (obr. 18).



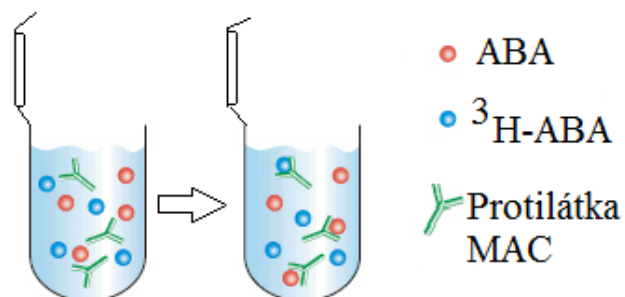
Obr. 18: Rozdělení vodné a etherické frakce v dělicích nálevkách

Do kádinek pak byla sbírána vodná frakce, u které bylo pH upraveno na 3,00 a opět došlo po přidání destilovaného etheru s BHT k extrakci frakcí v dělicích nálevkách. Po tomto kroku byla etherická frakce obsahující ether sbírána do odpařovacích baněk a odpařována na vakuové rotační odparce. Odparek byl rozpuštěn v etheru s BHT a poté došlo za přítupu vzduchu k samovolnému odpaření do sucha. Takto odpařené vzorky představovaly finální vzorky pro RIA-metodu (obr 19).



Obr. 19: Schématické znázornění postupu stanovení obsahu kyseliny abscisové

Reakce haptenu a radioligandu se specifickými rozpoznávacími místy protilátky představuje základní proces při radioimunoanalýze. Při této metodě byla využita monoklonální a vysoce specifická protilátka MAC 252. Tato protilátka detekovala molekuly ABA v rostlinných vzorcích (QUARRIE et al. 1988). Do mikrozkušavek byly přidány v přesně daném množství a pořadí ABA, která představovala haptenu, 100 μ l ^3H – ABA, představující radioligand a 100 μ l protilátky MAC. Tyto přidané komponenty jsou nezbytné pro radioimunoanalýzu (obr. 20).



Obr. 20: *Princip imunoprecipitační reakce při radioimunoanalýze*

Po přidání komponentů, nezbytných pro RIA analýzu, byla reakční směs po dobu 45 minut při teplotě 4 °C inkubována. Poté byl k reakční směsi přidán saturovaný síran amonný, jehož pomocí došlo k zastavení reakce. Následně byla provedena centrifugace, kdy došlo ke vzniku sedimentu. Pomocí odsávačky byl zbylý supernatant odsán a k sedimentu byl přidán 50% síran amonný. Následovalo rozřepání vzorků a centrifugace. Vzniklý supernatant byl opět odstraněn pomocí odsávačky. Výsledný sediment byl destilovanou vodou zředěn a doplněn dioxanovým scintilátorem. H₃-aktivita byla pomocí programu Securia Packard přepočtena na finální obsah ABA v rostlinném materiálu.

4.12 Fotodokumentace

V předkládané diplomové práci byly fotografické snímky pořízeny prostřednictvím zrcadlového fotoaparátu Nikon D3000. Poté byly uloženy ve formátu JPEG. Anatomické a morfologické snímky okřehku byly nasnímány na mikroskopické lupě OLYMPUS a pomocí programu QUICKPHOTO MICRO 2.3 dále zpracovány.

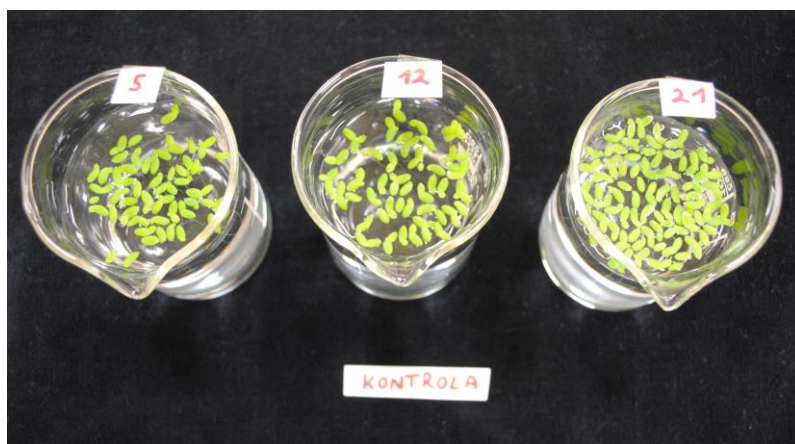
4.13 Statistické hodnocení

Hodnoty u všech proběhlých experimentálních analýz byly statisticky zpracovány. Počet opakování se u jednotlivých experimentů lišil. Stanovení délky kořenů bylo analyzováno v deseti opakováních, stanovení kvantového výtěžku elektronového transportu PSII mělo tři opakování, stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů společně s produkcí ABA a CK měl dvě opakování a u stanovení produkce etylénu probíhal experiment v pěti opakováních. Pro statistické hodnocení byl využit PC program Excel, pomocí kterého byl vypočten aritmetický průměr a směrodatná odchylka ze souboru hodnot sledovaných charakteristik. Pomocí směrodatné odchylky pak byla stanovena střední chyba průměru. Jednofaktoriální analýzou variace (ANOVA) byla stanovena průkaznost rozdílů. Výsledky statistického hodnocení byly graficky znázorněny kromě stanovení produkce endogenních cytokininů.

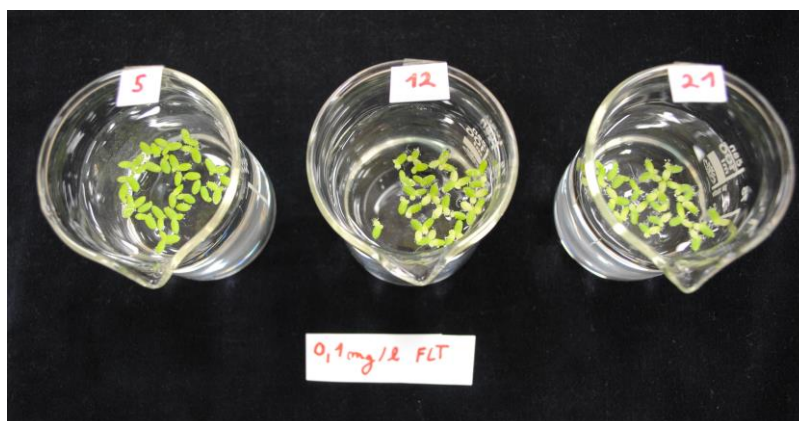
5 VÝSLEDKY

5.1 Vzhled rostlin *Lemna minor* L.

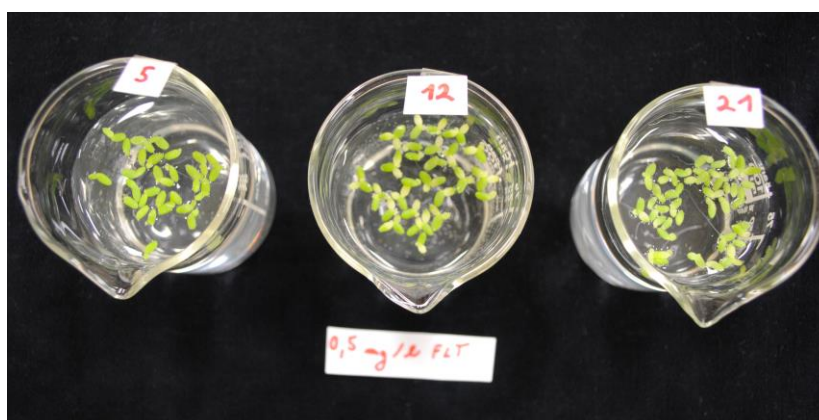
Rostliny kultivované bez přídavku fluoranthenu (kontrolní rostliny) měly elipsovité tvar. Byly zelené, rovnoměrně zbarvené a bez viditelných chloróz a nekrot. Nebyly zde patrné žádné viditelné změny na listové ploše (obr. 21). Již u nejnižší koncentrace FLT (0,1 mg/l) byly pozorovány morfologické změny. Byly zde pozorovány příznaky ztráty barviva u rostlin, přičemž docházelo ke žloutnutí stélek (obr. 22). Toto žloutnutí dále vedlo až k úplné nekrotizaci rostlin. Velmi podobně působila na rostliny koncentrace 0,5 mg FLT/l (obr. 23). K viditelnému zlepšení stavu došlo u rostlin, kultivovaných při 1 mg FLT/l. Tyto rostliny vykazovaly jen nepatrné známky ztráty barviva (obr. 24) a byly dále schopny reprodukce (dělení). U kultivace rostlin při 5 mg FLT/l (obr. 25) byly pozorovány nekrotizující stélky až z 65 % z celkové plochy a ztrácely tak úplnou schopnost dělení. U rostlin, které byly kultivovány při vyšších koncentracích fluoranthenu, docházelo k vysoké překryvnosti listů oproti kontrolním rostlinám (obr. 26).



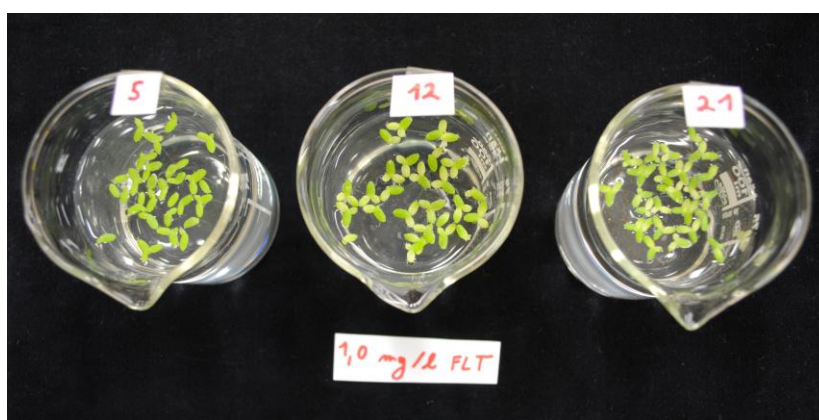
Obr. 21: Kontrolní rostliny okřehku menšího



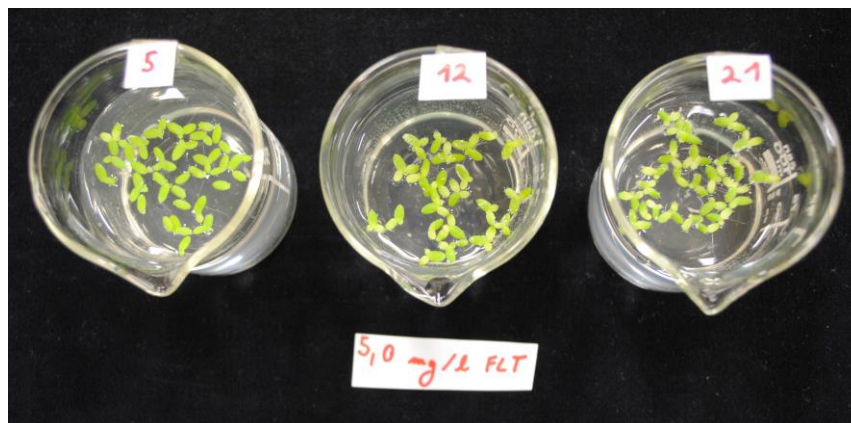
Obr. 22: Rostliny ošetřené 0,1 mg FLT/l



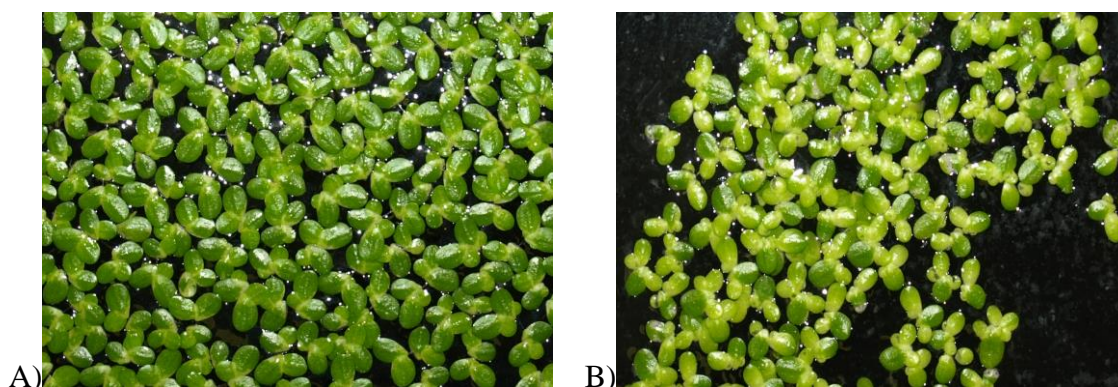
Obr. 23: Rostliny ošetřené 0,5 mg FLT/l



Obr. 24: Rostliny ošetřené 1 mg FLT/l



Obr. 25: Rostliny ošetřené 5 mg FLT/l



A)

B)

Obr. 26: Kontrolní rostliny s listy bez překryvu (A) a rostliny ošetřené 5 mg FLT/l s překrývajícími se listy (B)

5.1.1 Mikroskopické pozorování rostlin *Lemna minor* L.

Kontrolní rostliny okřehku měly dobře pozorovatelnou stavbu těla, která byla zjednodušená na jednoduchý kořen bez cévních svazků a kořenových vlásků (obr. 27 a 28) a listkový článek. Rostliny měly svrchní stranu epidermis listkových článků viditelně kutinizovanou oproti spodní straně, která kutinizovaná nebyla (obr. 29). Mezi svrchní a spodní epidermis se nacházelo pletivo parenchymu, obsahující velké

mezibuněčné prostory (obr. 30). U kontrolních rostlin byla také dobře pozorovatelná produkce dceřiných článků prostřednictvím dělivého meristému. Nové dceřiné články se vyvíjeli na shodné straně mateřského článku (obr. 31). Vyšší koncentrace FLT (1 mg/l a 5 mg/l) měly značný vliv na vzhled a tvar rostlin. Lístkovité články okřehku byly podle snímků, pořízených na mikroskopické lupě, povadlé a ztrácely elipsovité vzhled, který byl patrný u kontrolních rostlin (obr. 32). Výrazně kratší a rovnější (ve smyslu přímé) byly u těchto rostlin i jejich kořeny. U rostlin kultivovaných při vyšších koncentracích FLT docházelo k odumírání mateřských článků od okrajů listových čepelí (obr. 33). Nižší koncentrace fluoranthenu (0,1 mg/l a 0,5 mg/l) neprokázaly viditelný vliv negativního působení (obr. 34).



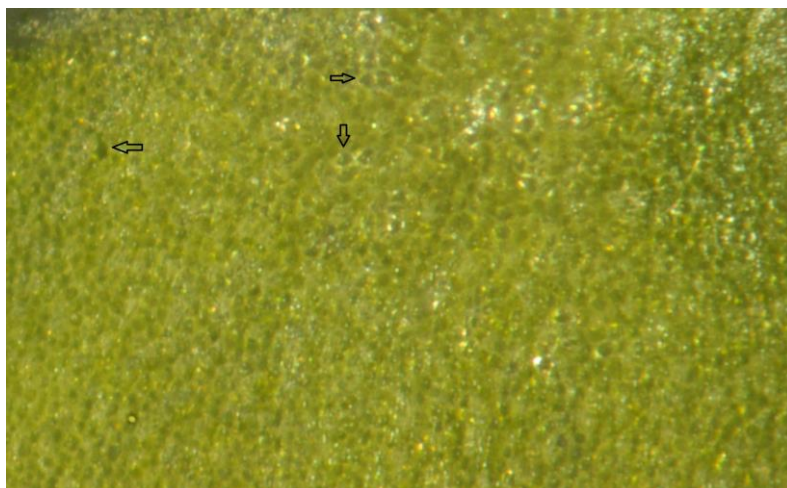
Obr. 27: *Detail kořene okřehku*



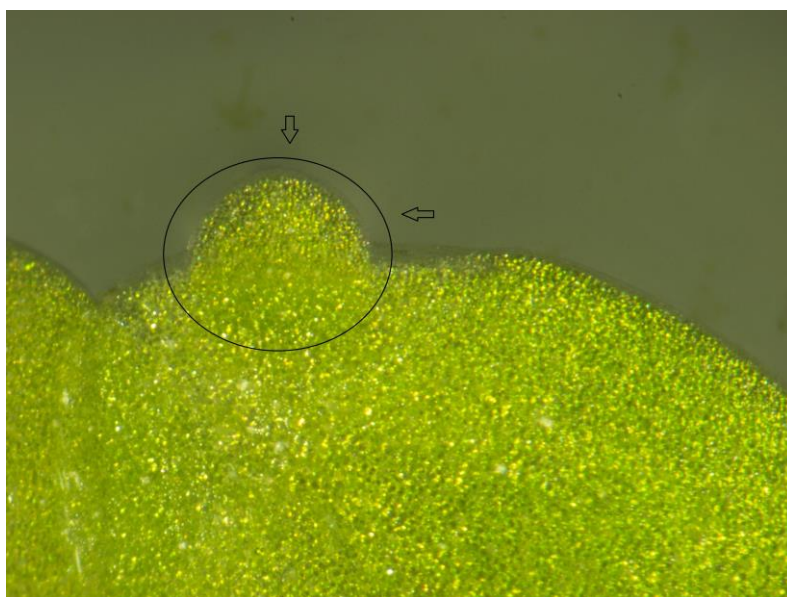
Obr. 28: *Rostlina okřehku menšího*



Obr. 29: *Nekutinizovaná spodní strana epidermis*



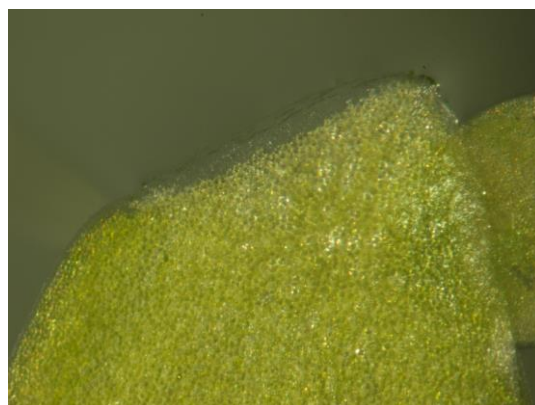
Obr. 30: *Parenchymatické pletivo s mezibuněčnými prostory*



Obr. 31: *Produkce nového dceřiného článku*



Obr. 32: Okřehok ošetřený 5 mg FLT/l



Obr. 33: Odumírání mateřského článku



Obr. 34: Okřehok ošetřený 0,1 mg FLT/l

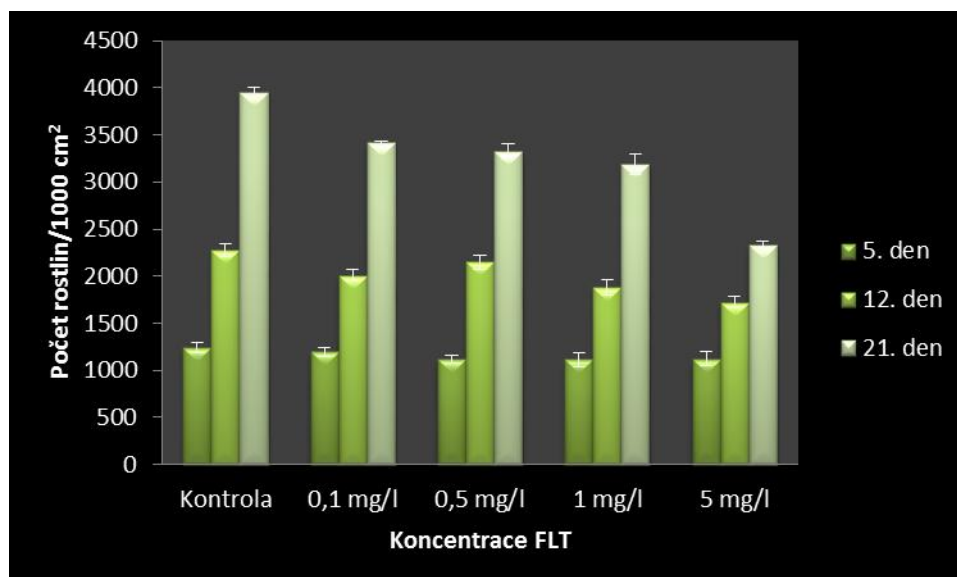
5.2 Vliv FLT na počet rostlin *Lemna minor* L.

V průběhu kultivace kontrolních rostlin došlo k výraznému nárůstu v počtu rostlin okřehku mezi pátým a 12 dnem kultivace a mezi 12 a 21 dnem kultivace rostlin. Ke znatelnému snížení počtu rostlin došlo po 12 dnech u rostlin, ošetřených 5 mg FLT/l, a 21 dnech od založení experimentu. Rozdíly velikosti listové plochy rostlin okřehku v jednotlivých variantách jsou zachyceny na obr. 35.



Obr. 35: Zobrazení velikosti listové plochy po 21 dnech kultivace; A) 5 mg FLT/l, B) 1 mg FLT/l, C) 0,5 mg FLT/l, D) 0,1 mg FLT/l a E) kontrolní rostliny

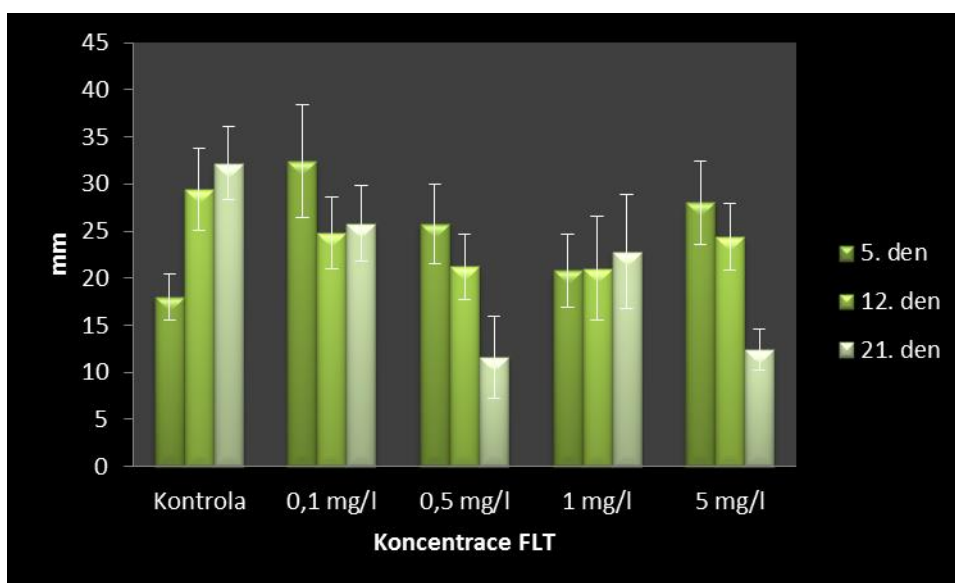
Statisticky průkazné snížení počtu rostlin po 12 a 21 dnech, mezi rostlinami, které byly ošetřeny 0,1; 0,5; 1 a 5 mg FLT/l, a kontrolními rostlinami, je znázorněno na grafu 1.



Graf 1: Počet rostlin v jednotlivých variantách experimentu

5.3 Vliv FLT na délku kořenů u rostlin *Lemna minor* L.

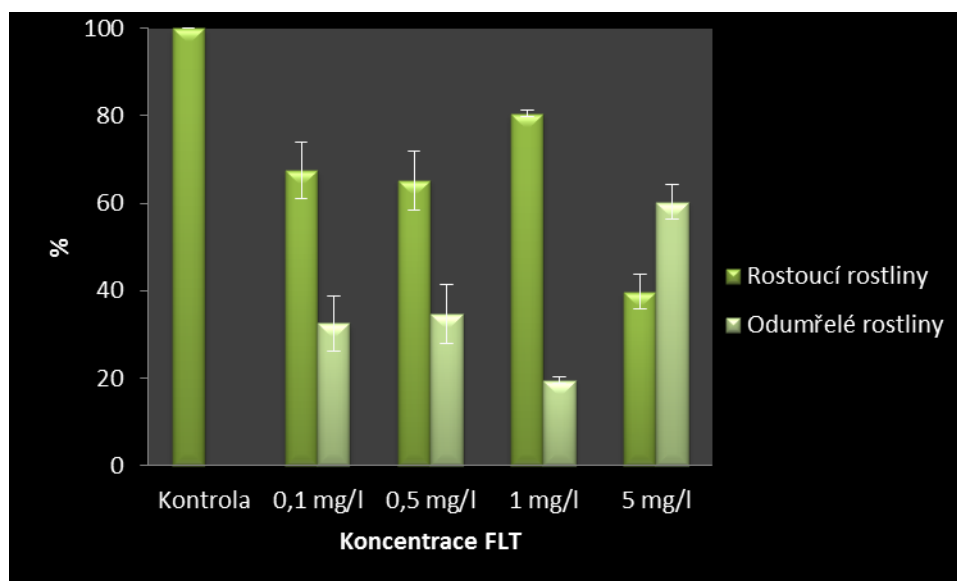
U kontrolních rostlin se délka kořenů výrazně zvyšovala až po 21 dnech kultivace rostlin okřehku. Kořeny u rostlin, které byly ošetřeny FLT, vykazovaly výrazné rozdíly v porovnání s rostlinami kontrolními (graf 2). Ke změně délky kořenů u všech experimentálních variant docházelo po pěti dnech kultivace. Statisticky průkazný je nárůst délky kořenů mezi rostlinami, ošetřenými 0,1 mg FLT/l a 5 mg FLT/l, a mezi kontrolními rostlinami. Ke snížení délky kořenů došlo u všech experimentálních variant po 12 a 21 dnech trvání experimentu. Statisticky průkazné je snížení délky kořenů po 21 dnech kultivace mezi rostlinami, které byly ošetřeny 0,5 a 5 mg FLT/l, a mezi rostlinami kontrolními.



Graf 2: Délka kořenů v jednotlivých variantách kultivace

5.4 Vliv FLT na viabilitu rostlin *Lemna minor* L.

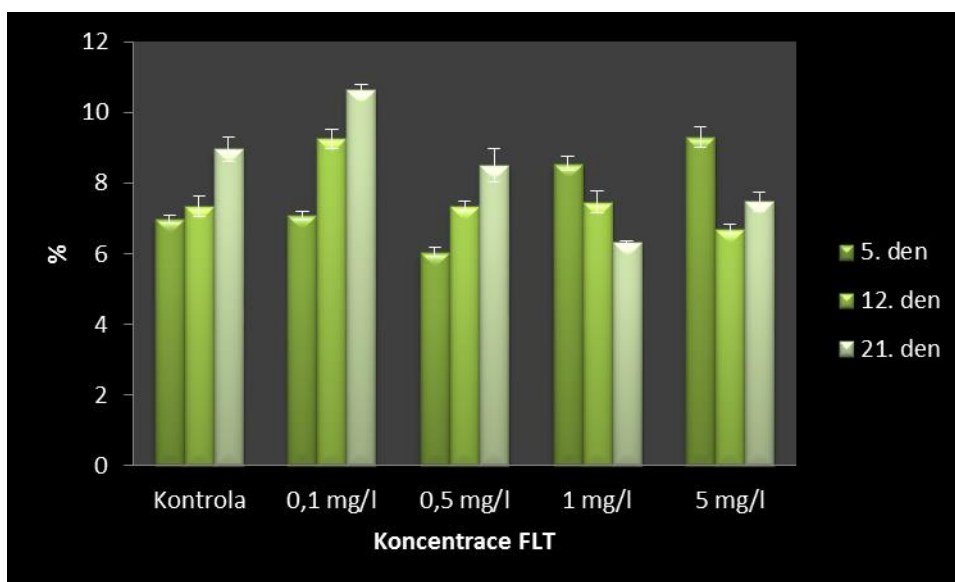
U rostlin okřehku, které byly kultivovány ve všech variantách koncentrací, bylo zjištěno, že jsou rostliny schopny růstu i po 21 dnech kultivace. U rostlin však docházelo k výrazné redukci ve vývoji a růstu oproti rostlinám, kultivovaným bez přídavku FLT (graf 3). Rostliny s úplnou ztrátou pigmentace byly považovány za odumřelé rostliny. U rostlin, ošetřených 0,1; 0,5; 1 a 5 mg FLT/l, docházelo ke snížení počtu rostlin, které byly schopny dalšího růstu, a naopak k nárůstu počtu rostlin, odumírajících. Tyto vzniklé hodnoty mezi kontrolními rostlinami a rostlinami ošetřenými všemi koncentracemi FLT jsou statisticky průkazné. Při kultivaci rostlin v 5 mg FLT/l docházelo k odumření rostlin až z 65 %.



Graf 3: Viabilita rostlin v jednotlivých variantách experimentu

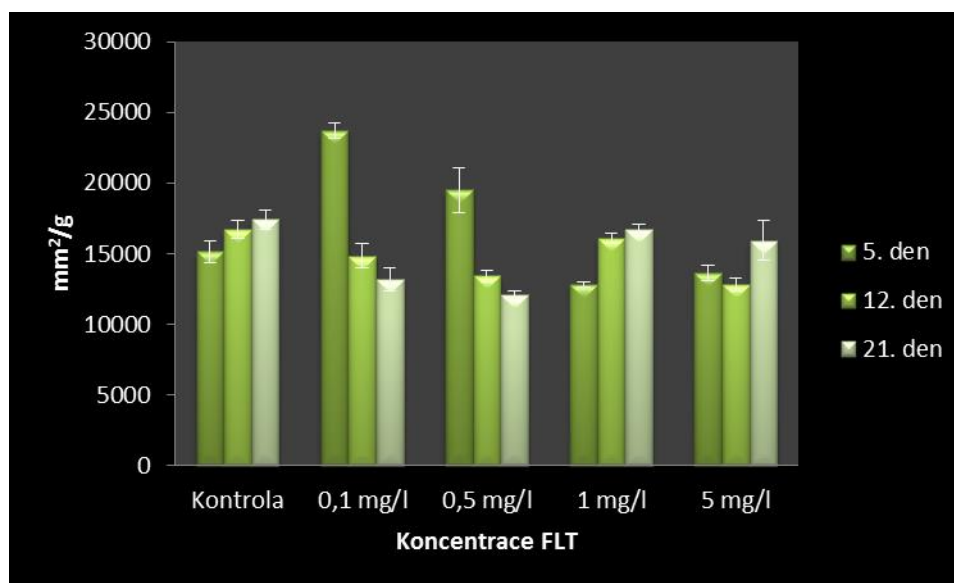
5.5 Vliv FLT na obsah sušiny a specifickou listovou plochu

U kontrolních rostlin a u rostlin, kultivovaných ve Steinbergově mediu s přidavkem 0,1 a 0,5 mg FLT/l obsah sušiny výrazně stoupal. U rostlin okřehku, které byly ošetřeny 1 mg FLT/l, naopak hodnoty sušiny výrazně klesaly. U koncentrace 5 mg FLT/l došlo u rostlin po 12 dnech kultivace k výraznému poklesu hodnot sušiny, tyto hodnoty opět stouply po 21 dnech od založení experimentu (graf 4). Statisticky průkazné je snížení hodnoty sušiny po pěti dnech kultivace u rostlin, kultivovaných v mediu s 0,5 mg FLT/l oproti kontrolním rostlinám. I u zvýšených hodnot sušiny po pěti dnech kultivace u rostlin, ošetřených 1 a 5 mg FLT/l, je prokázána statistická průkaznost. Mezi kontrolními rostlinami a rostlinami, ošetřenými 0,1 a 5 mg FLT/l, které byly kultivovány po dobu 12 dní, jsou hodnoty sušiny statisticky průkazné. Statistická průkaznost je také mezi kontrolními rostlinami a rostlinami, kultivovanými 21 dní, které byly ošetřeny všemi koncentracemi FLT použitými v experimentu.



Graf 4: Množství sušiny v jednotlivých variantách experimentu

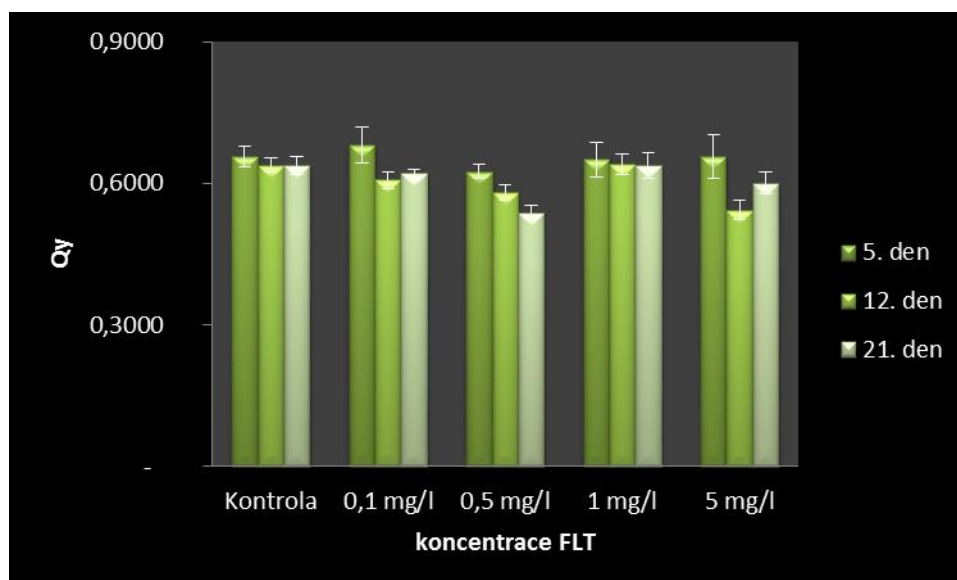
U rostlin okřehku hodnoty specifické listové plochy (SLA) stoupaly od pátého k 21 dni kultivace u kontrolních rostlin. Naopak k poklesu hodnot SLA od pátého k 21 dni kultivace docházelo u rostlin, ošetřených 0,1 a 0,5 mg FLT/l. K postupnému vzrůstu hodnot specifické listové plochy od prvního ke třetímu odběru došlo u rostlin, kultivovaných v mediu s přidavkem 1 mg FLT/l. Podobně jako u hodnot obsahu sušiny došlo k výraznému poklesu hodnoty specifické listové plochy po 12 dnech kultivace u koncentrace 5 mg FLT/l, kdy tato hodnota p 21 dnech kultivace opět stoupla (graf 5). Statistická průkaznost je prokázána mezi rostlinami, kultivovanými bez přidavku FLT, a rostlinami, ošetřenými 0,1 a 0,5 mg FLT/l, kultivovanými po dobu pěti, 12 a 21 dnů. Podle grafického znázornění jsou rozdíly, mezi kontrolními rostlinami a rostlinami, ošetřenými 5 mg FLT/l, po pěti a 12 dnech od založení experimentu, považovány za statisticky průkazné. Hodnoty specifické listové plochy u rostlin, ošetřených 1 mg FLT/l, jsou statisticky průkazné pouze po pěti dnech kultivace rostlin okřehku menšího.



Graf 5: SLA u rostlin v jednotlivých variantách kultivace

5.6 Vliv FLT na kvantový výtěžek elektronového transportu ve fotosystému PSII

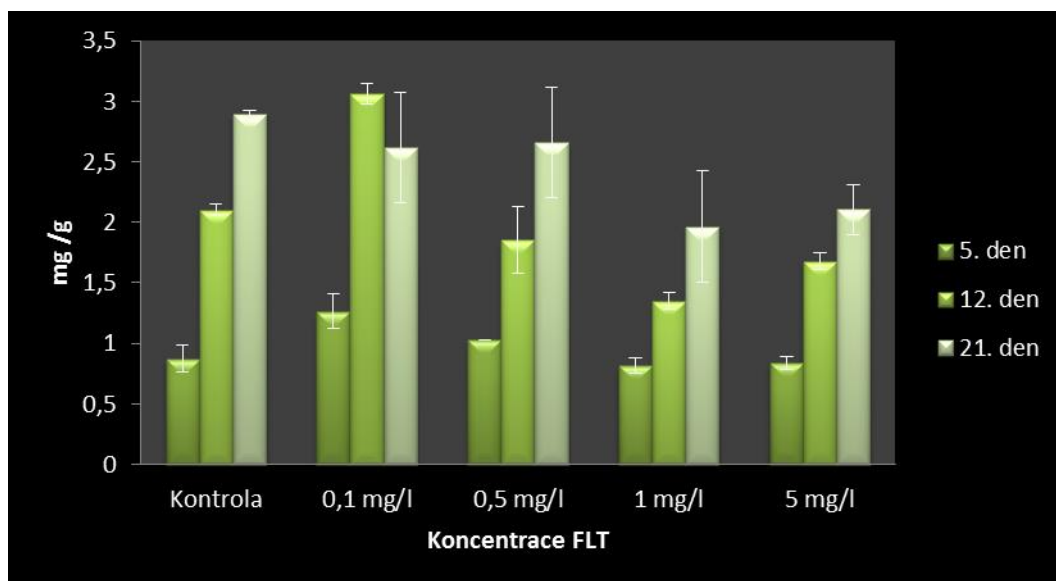
Z grafického znázornění hodnot kvantového výtěžku elektronového transportu ve fotosystému PSII je patrné, že u okřehku menšího, ošetřeného 0,1; 0,5; 1 a 5 mg FLT/l, nedocházelo oproti kontrolním rostlinám k významným změnám (graf 6). Pouze u rostlin, kultivovaných v mediu s přidavkem 0,5 a 5 mg FLT/l, byly zaznamenány nepatrné změny. U koncentrace 0,5 mg FLT/l se jednalo o změny ve 12. a 21. dni kultivace. V druhém případě (5 mg FLT/l) pak po 12 dnech od založení experimentu. Snížené hodnoty mezi kontrolou a rostlinami, které byly ošetřeny 0,5 mg FLT/l po 21 dnech kultivace okřehku menšího, jsou statisticky průkazné. I snížené hodnoty mezi rostlinami kontrolními a rostlinami, kultivovanými v mediu s přidavkem 5 mg FLT/l, které byly získány po 12 dnech kultivace, jsou považovány za statisticky průkazné.



Graf 6: *Kvantový výtěžek elektronového transportu ve fotosystému PSII v jednotlivých variantách kultivace*

5.7 Vliv FLT na obsah chlorofylu „a“ a „b“ u *Lemna minor* L.

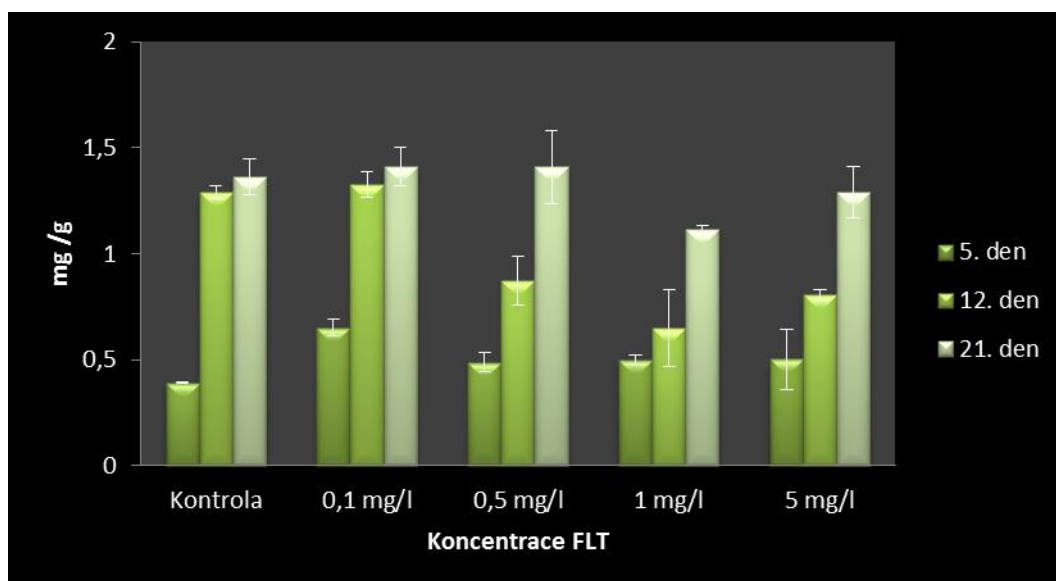
S porovnáním kontrolních rostlin s rostlinami kultivovanými po dobu pěti a 12 dní, a které byly ošetřeny 0,1 mg FLT/l, bylo zaznamenáno výrazné zvýšení chlorofylu *a*. Tyto zvýšené hodnoty jsou statisticky průkazné (graf 7). Další varianty experimentálních koncentrací (0,5; 1 a 5 mg FLT/l) nevykazovaly žádné velké změny v obsahu chlorofylu *a*. Pouze však u koncentrací 1 a 5 mg FLT/l bylo u rostlin, kultivovaných 12 a 21 dnů, zaznamenáno mírné snížení v obsahu chlorofylu *a*. Toto snížení hodnot je statisticky průkazné.



Graf 7: Obsah chlorofylu „a“ v jednotlivých variantách kultivace

V případě obsahu chlorofylu *b* došlo ke zvýšení hodnot oproti rostlinám bez přídavku FLT, a to u rostlin, ošetřených 0,1 mg FLT/l po pěti dnech kultivace. Podle

grafického znázornění (graf 8) se jedná o statisticky průkazné zvýšení obsahu chlorofylu *b*. Výrazné snížení obsahu chlorofylu *b* bylo zaznamenáno u rostlin po 12 dnech od založení experimentu, kultivovaných v mediu s 0,5; 1 a 5 mg FLT/l. I toto snížení hodnot je statisticky průkazné. Statisticky průkazné je snížení hodnot obsahu chlorofylu *b* u rostlin po 21 dnech kultivace. Tyto rostliny byly ošetřeny 1 mg FLT/l.

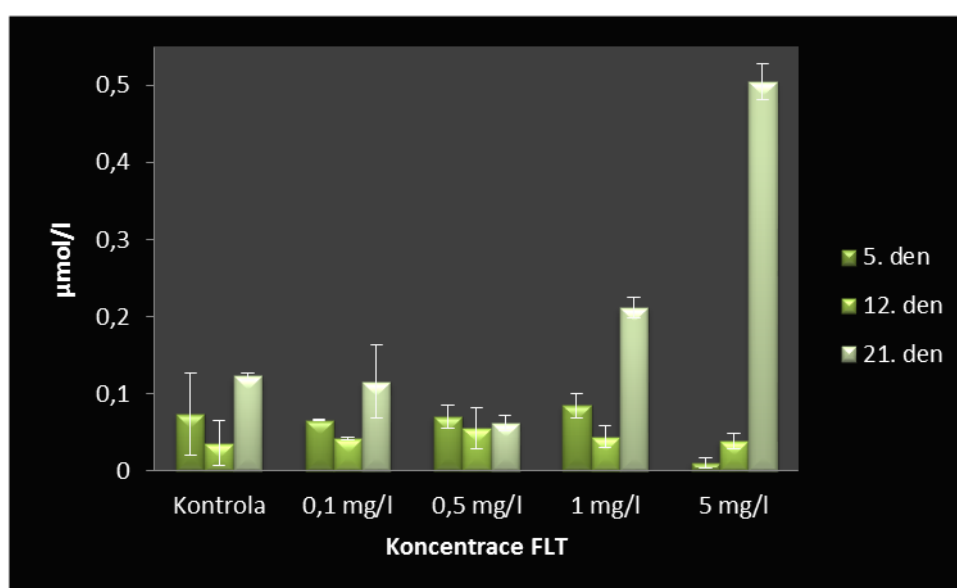


Graf 8: Obsah chlorofylu „b“ v jednotlivých variantách kultivace

5.8 Vliv FLT na tvorbu MDA jako markeru poškození membrán

Z grafického znázornění (graf 9) je patrné, že i kontrolní rostliny po pěti dnech kultivace vykazují poškození membránových lipidů, protože byla stanovena nepatrná produkce MDA. Přičemž po 21 dnech kultivace od založení experimentu došlo k výraznému nárůstu vytvořeného MDA oproti rostlinám po pěti dnech jejich kultivace. Během pěti a 12 dnů nedocházelo k výrazným změnám v poškození membránových lipidů u rostlin okřehku. Po 21 dnech kultivace však došlo k výraznému nárůstu hodnoty MDA u rostlin, kultivovaných v mediu s přídatkem 1 a 5 mg FLT/l oproti

kontrolním rostlinám. Za statisticky průkazné byly považovány rozdíly mezi kontrolními rostlinami a rostlinami, které byly ošetřeny 0,1; 0,5 a 1 mg FLT/l po pěti dnech kultivace. Po 12 dnech od založení experimentu byly statisticky průkazné rozdíly mezi kontrolními rostlinami a rostlinami, ošetřenými všemi koncentracemi FLT, které byly využity v experimentu. Po 21 dnech kultivace rostlin byly statisticky průkaznými pouze rozdíly u rostlin, kultivovaných v mediu s přísávkem 0,1 mg FLT/l.

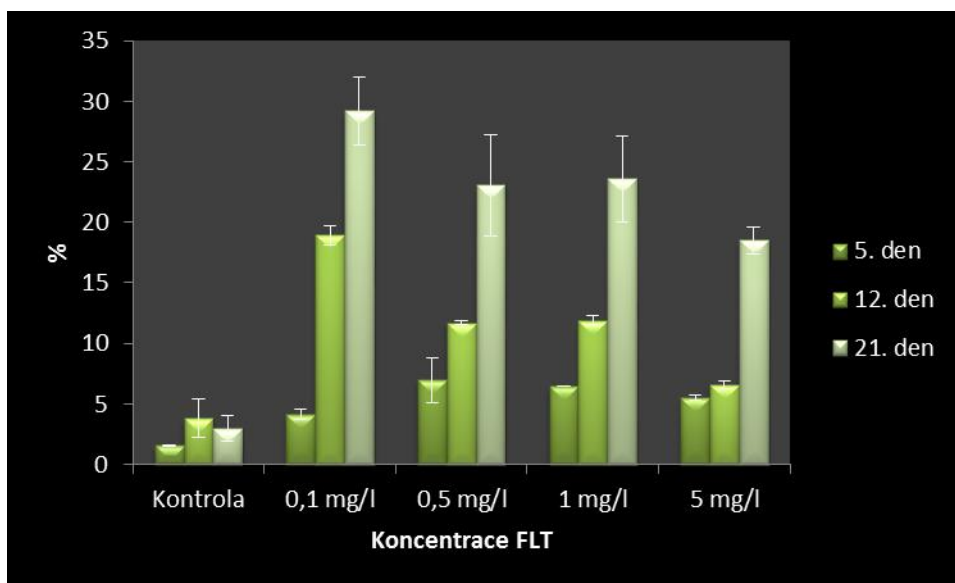


Graf 9: MDA v rostlinném materiálu v jednotlivých variantách kultivace

5.9 Vliv FLT na intaktnost membrán u rostlin okřehku

Konduktometrické stanovení intaktnosti membrán vyjadřuje recipročně jejich poškození v procentech. Kontrolní rostliny okřehku měly nejvyšší poškození membrány po 21 dnech kultivace stanovené do 3-4 %. Stanovená porušenost membrán u rostlin okřehku kultivovaných na FLT se zvyšovala od pátého do 21 dne kultivace ve všech

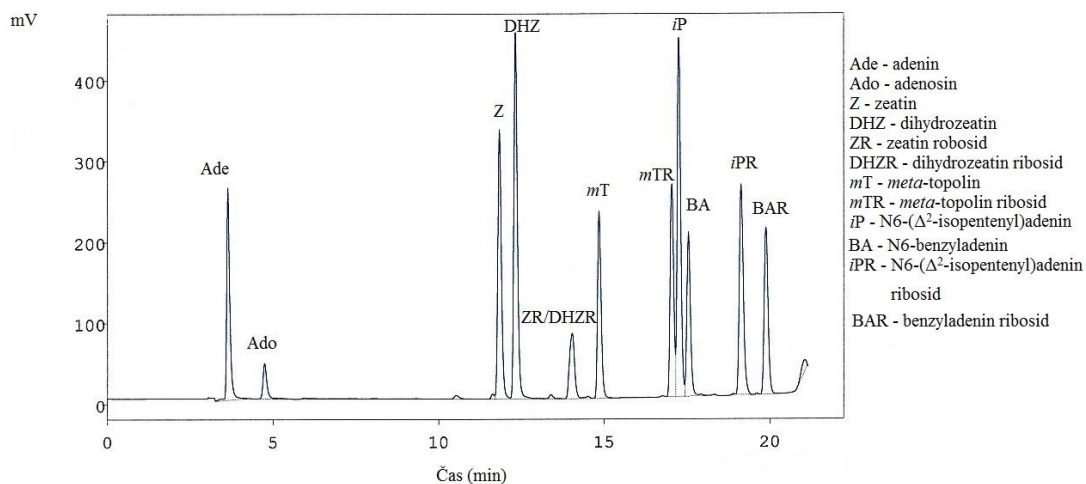
použitých koncentrací FLT (graf 10). Nejvíce poškozené membrány měly rostliny, ošetřené 0,1 mg FLT/l po 21 dnech kultivace a to až 30 %. V ostatních variantách toto poškození přesahovalo 20 %. Za statisticky průkazné byly považovány pouze hodnoty u rostlin, ošetřených 5 mg FLT/l po 21 dnech kultivace od založení experimentu.



Graf 10: Poškození membrán u rostlin v jednotlivých variantách kultivace

5.10 Vliv FLT na hladinu endogenních cytokininů u rostlin

Grafické znázornění (graf 11) představuje chromatogram cytokininových standardů, z kterého byly odvozeny retenční časy. Podle těchto retenčních časů byly poté pomocí HPLC sbírány jednotlivé frakce endogenních cytokininů (tab. 2).



Graf 11: Chromatogram HPLC dělení cytokininových standardů

Retenční čas (min)	Cytokinin
11:84	Z
12:33	DHZ
14:04	ZR/DHZR
14:86	mT
17:05	mTR
17:27	iP
17:55	BA
19:15	iPR
19:90	BAR

Tab. 2: Retenční časy pro sběr jednotlivých frakcí endogenních cytokininů

V největším množství ze všech endogenních cytokininů byl po pěti dnech kultivace rostlin nalezen N6-benzyladenin (BA) a N6-benzyladenin ribosid (BAR) (tab. 3). BA byl nejvíce produkován rostlinami, které byly ošetřeny 0,1 mg FLT/l. U takto ošetřených rostlin se vyskytoval ve vyšším množství BAR, který se vyskytoval i u okřehku, kultivovaném v mediu s přidavkem 1 mg FLT/l. V tomto případě se u rostlin vyskytoval v trojnásobně vyšším množství než u rostlin, ošetřených 0,1 mg FLT/l. Po 12 dnech expozice bylo oproti hodnocení po pěti dnech patrné snížení BA. Hladina BAR výrazně vzrostla u rostlin, které byly ošetřeny 0,5 mg FLT/l. Po 21 dnech kultivace došlo u rostlin okřehku, které byly ošetřeny 0,5 a 5 mg FLT/l, k produkci *iP* a *iPR*. *iPR* byl nalezen i u okřehku, kultivovaném v mediu s přidavkem 1 mg FLT/l (tab. 4). U koncentrace 0,5 mg FLT/l došlo navíc u rostlin k produkci zeatinu (ojedinělá hodnota). Tento endogenní cytokinin se podobně jako *iP* a *iPR* nevyskytoval u okřehku v předchozích dnech kultivace rostlin. Zbylé známé endogenní cytokininy se u rostlin vyskytovaly v nepatrném množství.

Koncentrace	5. den		12. den		21. den	
	BA	BAR	BA	BAR	BA	BAR
0 mg/l	18,4 ± 0,07	0,5 ± 0,03	2,4 ± 0,01	-	3,2 ± 0,1	-
0,1 mg/l	12,2 ± 0,37	12,5 ± 0,04	1,5 ± 0,06	-	6,8 ± 0,04	0,9 ± 0,01
0,5 mg/l	5,5 ± 0,11	1,0 ± 0,01	5,0 ± 0,07	3,0 ± 0,02	1,5 ± 0,05	1,6 ± 0,02
1 mg/l	9,6 ± 0,11	36,3 ± 0,02	1,2 ± 0,04	-	2,5 ± 0,11	0,5 ± 0,01
5 mg/l	7,0 ± 0,36	-	1,6 ± 0,03	-	3,1 ± 0,01	-

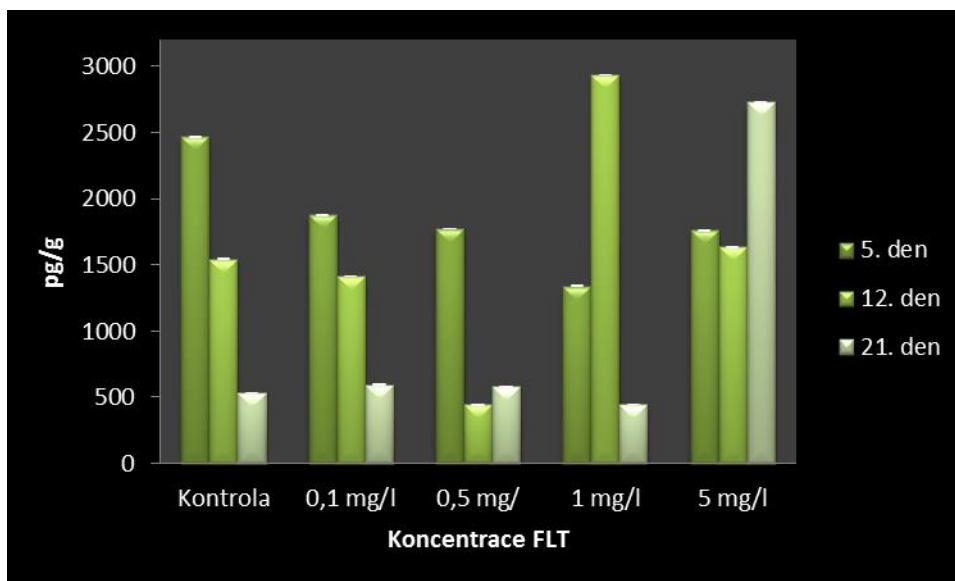
Tab. 3: Obsah BA a BAR v jednotlivých variantách kultivace

Koncentrace	5. den		12. den		21. den	
	<i>iP</i>	<i>iPR</i>	<i>iP</i>	<i>iPR</i>	<i>iP</i>	<i>iPR</i>
FLT						
0 mg/l	-	-	-	-	-	-
0,1 mg/l	-	-	-	-	-	-
0,5 mg/l	-	-	-	-	97,8 ± 1,32	7,19 ± 0,24
1 mg/l	-	-	-	-	-	8,6 ± 0,16
5 mg/l	-	-	-	-	10,54 ± 0,00	4,8 ± 0,02

Tab. 4: Obsah *iP* a *iPR* v jednotlivých variantách kultivace

5.11 Vliv FLT na obsah kyseliny abscisové u rostlin

U rostlin okřehku menšího, ošetřených 0,1; 0,5; 1 a 5 mg FLT/l, došlo po pěti dnech od založení experimentu k výraznému snížení v obsahu ABA oproti rostlinám, kultivovaným v mediu bez přídavku FLT. K nárůstu kyseliny abscisové došlo u rostlin, které byly ošetřeny 0,1; 1 a 5 mg FLT/l, po 12 dnech kultivace. Obsah ABA se také nepatrně zvýšil u okřehku, který byl kultivován v mediu s přídavkem 0,1 a 0,5 mg FLT/l, po 21 dnech od založení experimentu. Obsah ABA se zvýšil až o 80 % oproti kontrole u rostlin, které byly ošetřeny 5 mg FLT/l po 21 dnech kultivace rostlin. Za statisticky průkazné lze považovat hodnoty obsahu ABA mezi rostlinami, kultivovanými bez přídavku FLT a rostlinami, které byly ošetřeny všemi koncentracemi FLT, využitými v experimentu (graf 12).

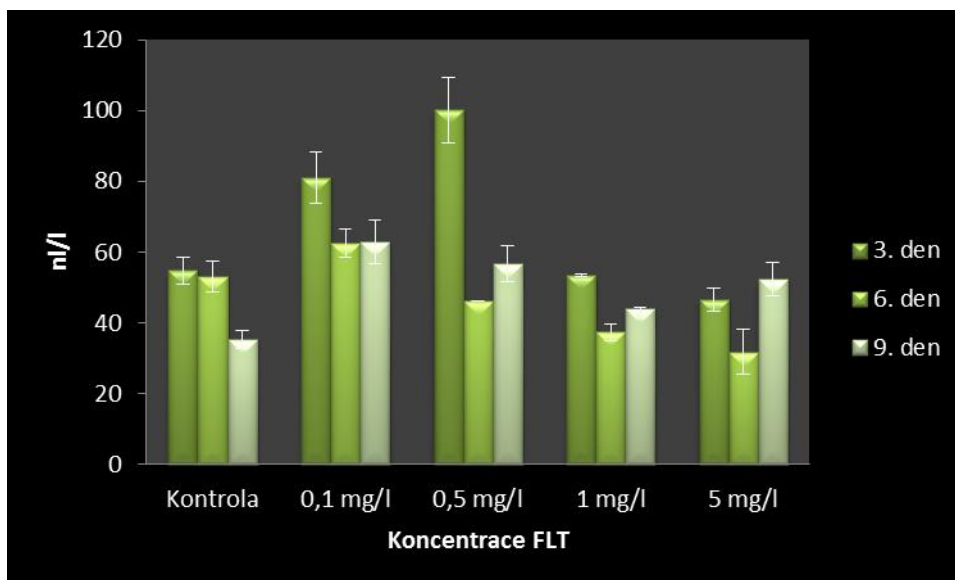


Graf 12: Obsah kyseliny abscisové u rostlin v jednotlivých variantách kultivace

5.12 Vliv FLT na produkci etylénu rostlinami

K výraznému nárůstu produkce etylénu rostlinami, které byly ošetřeny 0,1 a 0,5 mg FLT/l, oproti rostlinám kontrolním, docházelo již po třech dnech kultivace rostlin. Produkce etylénu se zvýšila i po šesti dnech kultivace od založení experimentu, ovšem pouze u rostlin, které byly ošetřeny 0,1 mg FLT/l. Také po devíti dnech kultivace byl pozorován nárůst produkce etylénu rostlinami, které byly kultivovány v mediu s přidavkem 0,1; 0,5; 1 a 5 mg FLT/l. Statisticky průkazné je zvýšení hodnot vyprodukovaného etylénu po třech dnech kultivace mezi rostlinami, které byly ošetřeny 0,1 a 0,5 mg FLT/l a mezi kontrolními rostlinami. Po šesti dnech kultivace od založení experimentu je zvýšení hodnot produkce etylénu u rostlin, kultivovaných v mediu s přidavkem 0,1 mg FLT/l také považováno za statisticky průkazné. Hodnoty zvýšené produkce etylénu je i po devíti dnech statisticky průkazné mezi kontrolními rostlinami a rostlinami, ošetřenými všemi koncentracemi fluoranthenu, využitými v experimentu (0,1; 0,5; 1 a 5 mg FLT/l). Statisticky průkazné je i snížení hodnot produkce etylénu

mezi rostlinami kontrolními a rostlinami, které byly kultivovány s přidavkem 0,5; 1 a 5 mg FLT/l, po šesti dnech od založení experimentu (graf 13).



Graf 13: *Produkce etylénu rostlinami v jednotlivých variantách kultivace*

6 DISKUZE

Současným problémem v oblasti životního prostředí je jeho znečištění. Toto znečištění může být původu biologického, chemického nebo fyzikálního. Nejčastějším původcem znečištění životního prostředí jsou však chemické látky, kdy nejvíce náchylným je v současné době vodní ekosystém. Kontaminace vodního prostředí toxickými látkami je významným faktorem, ovlivňujícím stav vodních rostlin. Na působení těchto stresových faktorů reagují rostliny řadou morfogenních odpovědí. Z tohoto důvodu jsou vodní rostliny hojně využívány ve fyziologickém výzkumu. Drobné byliny *Lemna minor* L. z čeledi *Araceae* (*Lemnaceae*) s volně plovoucími listy na vodní hladině jsou vhodnými rostlinami pro biomonitoring, především díky jejich vysoké citlivosti na fytotoxické účinky. U předkládané diplomové práce představoval fluoranthen toxickou látku, která se z řady perzistentních organických polutantů, nejčastěji vyskytuje v České republice (SUEDEL et al. 1993). Jeho zvolené koncentrace (0,1; 0,5; 1 a 5 mg FLT/l) představují v životním prostředí běžnou a mírně zvýšenou zátěž (HOLOUBEK 2000). Kořen představuje u rostlin nejčastější místo akumulace toxických látek z vnějšího prostředí. Tyto látky působí na uspořádání kořenového systému především z hlediska morfologického, zejména pak na jeho strukturu a růst. Podle KUMMEROVÁ et al. (2010), kteří provedli experimenty na klíčících rostlinách *Zea mays*, *Helianthus annuus* a *Vicia faba*, působí negativně na kořeny rostlin i polycyklické aromatické uhlovodíky. Podle experimentálních výsledků, které byly provedeny v diplomové práci je patrné, že perzistentní organický polutant fluoranthen působí ve vyšších koncentracích (1 a 5 mg FLT/l) inhibičně na růst délky kořenů u rostlin okřehku menšího. Kořeny byly navíc přímé (rovné), oproti rostlinám, které nebyly ošetřeny koncentracemi FLT, a rostlinám, ošetřených koncentracemi 0,1 a 0,5 mg FLT/l. Rostliny mají kromě jiného kořenovou schopnost odolávat stresovým podmínkám na buněčné úrovni. V kořenech, zatížených faktorem stresu dochází ke zvýšení produkce glutathionu kořenovými buňkami o 12 % již po jednom dni kultivace rostlin v nadměrně zasoleném substrátu (PANDA a UPADHYAY 2003). Okřehek menší má vysokou schopnost vyrovnat se s toxicitou kovů pomocí kořenového systému (KANOUN-BOULE et al. 2009). Toxické látky mohou mít kromě jiného také negativní

vliv na rostliny i z hlediska listových čepelí, kdy může docházet k intenzivním chlorózám a nekrotám (DAVIS et al. 2011). U okřehku menšího kultivovaného v mediu s přidavkem vyšších koncentrací fluoranthenu docházelo ke ztrátě listových pigmentů, kdy docházelo ke ztrátě barviv nejčastěji po 21 dnech kultivace rostlin. Tyto rostliny pak byly zbarveny žlutě až bíle. Bílé zbarvení je důsledkem odumření listových pletiv. Ztráty listového barviva byly zaznamenány i u rostlin okřehku, zatíženého mědí a kadmíem (KHELAF a ZERDAOUI 2009). U rostlin okřehku menšího, které byly ovlivněny působením fluoranthenu došlo ke změnám u fyziologických parametrů rostlin. Ke změnám došlo zejména u specifické listové plochy, která představuje poměr listové plochy k hmotnosti sušiny. U rostlin, které byly zatíženy vyššími koncentracemi FLT, byl prokázán pokles hodnot v akumulaci obsahu sušiny rostlinami. Toto zvýšení obsahu sušiny v rostlinném těle okřehku by mohlo představovat urychlení procesu ontogeneze u rostlin a sloužit tak jako marker pro posouzení úrovně stresu (ANSQUER et al. 2009). K fluorescenci chlorofylu u rostlin dochází absorpcí energie záření, které dopadá na rostliny pomocí molekul chlorofylu *a*. Část této energie je následně vyzářena zpět do okolí. K získání informací o absorpci a využití energie dopadajícího záření rostlinami slouží stanovení intenzity fluorescence chlorofylu. Vzhledem k tomu, že rostliny, které jsou vystaveny stresovému faktoru, mají omezenější možnost využít dopadající energii. Z tohoto důvodu by se intenzita fluorescence chlorofylu u rostlin měla zvyšovat (MAXWELL a JOHNSON 2000). V diplomové práci byla fluorescence chlorofylu vyjádřena jako kvantový výtěžek elektronového transportu ve fotosystému PSII. Z výsledků však není patrná míra poškození fotosyntetických procesů u stresovaných rostlin. Jednu z hlavních reakcí na působení stresových faktorů mohou představovat změny v obsahu fotosyntetických pigmentů. Tyto změny mohou také souviset s narušeným příjmem a tokem živin, způsobeného poškozením kořenového systému (KUMMEROVÁ et al. 2001). Rozpad molekul chlorofylu pod tíhou stresového faktoru může vést k poškození fotosyntézy (KÜPPER et al. 1996). Za rozpadem molekul chlorofylů mohou stát i produkty ROS. Je známo, že chlorofyl *a* bývá náchylnější než chlorofyl *b* (APPENROTH et al. 2010). PRASAD et al. (2011) vystavili rostliny *Lemna trisulca* L. působení kadmia a mědi. V případě kadmia nedocházelo k výrazným změnám v obsahu fotosyntetických pigmentů. U mědi však docházelo k významné degradaci chlorofylů, které mohou být způsobeny peroxidací membrán

chloroplastů. Herbicide fluomioxazin a diuron způsobují u rostlin výrazné zvýšení obsahu fotosyntetických pigmentů (TEISSEIRE et al. 1999, GEOFFROY et al. 2004). Olovo však u rostlin *Lemna minor* L. způsobilo výrazný pokles chlorofylů, svědčící o jeho negativním vlivu na rostliny (LEBLEBICI a AKSOY 2011). V experimentálních výsledcích diplomové práce měl fluoranthen značný vliv na snížení obsahu chlorofylů až po 12 a 21 dnech u rostlin, zatížených všemi použitými koncentracemi, kromě nejnižší koncentrace (0,1 mg FLT/l). Se snížením obsahu chlorofylů může souviset i inhibice růstu rostlin. Při kultivaci *Wolffia arrhiza* v mediu, které bylo zatíženo těžkými kovy, došlo u rostlin k současnému snížení obsahu fotosyntetických pigmentů a inhibici růstu rostlin. Zároveň u rostlin dochází k aktivaci antioxidantních procesů, při kterých docházelo ke tvorbě GSH a askorbátu (PIOTROWSKA et al. 2010). Snížení rychlosti růstu a snížení obsahu fotosyntetických pigmentů bylo pozorováno i u rostlin okřehku, zatížených 0,1 mg/l K_2CrO_4 (BASSI et al. 1990, CHANDRA a KULSHRESHTHA 2004). Snížená rychlost růstu byla pozorována i u rostlin okřehku, kultivovaném v mediu s přidavkem kadmia (TKALEC et al. 2008). I u okřehku menšího, který byl vystaven fluoranthenu v našem experimentu docházelo k výraznému poklesu růstu. Součástí experimentů diplomové práce bylo stanovit míru poškození membrán v buňkách rostlin okřehku menšího, které souvisí s tvorbou MDA ve vzorcích rostlinného materiálu během analytického procesu (produkt při peroxidaci lipidů). Čím více vzniká MDA, tím dochází ke značnější peroxidaci lipidů a následnému poškození membrán v buňkách rostlin (REZINGERA et al. 2008). Z výsledků experimentu je patrný výrazný nárůst produkce MDA v korelaci s procentuálním poškozením membrán stanoveným konduktometricky po 21 dnech kultivace rostlin, které byly zatíženy fluranthenem. Zvýšená produkce fytohormonů představuje jednu z mnoha reakcí rostlin na působení stresových faktorů. Produkce rostlinných hormonů, jako jsou cytokininy, etylén a kyselina abscisová, hraje významnou roli v obranných mechanismech u rostlin (BARI a JONES 2009). Je známo, že kyselina jasmonová je svými účinky podobná etylénu a podílí se na aktivaci signálních drah, které vedou k vyšší odolnosti fotosyntetických pigmentů vůči stresovým faktorům (PIOTROWSKA et al. 2009). Také kyselina abscisová hraje významnou roli při vývojových a signalizačních procesech v rostlinných odpovědích na nepříznivé podmínky prostředí (ROBERT-SEILANIANZ et al. 2007). Na zvýšené biogenezi chloroplastů v závislosti na obranné reakci rostlin se

podílejí cytokininy. Nárůst hladiny ABA u rostlin byl zjištěn již po 12 dnech od založení experimentu u koncentrací 0,1; 1 a 5 mg FLT/l. Po 21 dnech kultivace rostlin se hladina kyseliny abscisové zvýšila až na 180 % oproti rostlinám bez přídatku FLT. Rostliny okřehku zatížené fluoranthenem dále vykazovaly zvýšenou produkci etylénu. Podobných výsledků bylo dosaženo v experimentu KUMMEROVÉ et al. (2010) u rostlin hrachu, kultivovaném v prostředí, zatíženém FLT. Z hlediska endogenních cytokininů byly u rostlin okřehku, které byly uchovány v mediu s přídatkem FLT převážně nalezeny BA, BAR a po 21 dnech kultivace *iP*, *iPR* a Z.

7 ZÁVĚR

Studium diplomové práce bylo zaměřeno na ovlivnění vývojových, metabolických a bioenergetických odpovědí rostlin *Lemna minor* L., kultivovaných po dobu 21 dnů v kultivačním Steinbergově mediu s přidavkem 0,1; 0,5; 1 a 5 mg/l perzistentního organického polutantu fluoranthenu. Dále byl pozorován růst a změny obsahu kyseliny abscisové, etylénu a cytokininů. Kultivace rostlin okřehku menšího pro stanovení vyprodukovaného etylénu rostlinami trvala pouhých devět dnů oproti ostatním experimentům, které byly provedeny v předkládané diplomové práci. Z výsledků této práce vyplynulo, že polycyklická aromatický uhlovodík fluoranthen způsobuje u rostlin okřehku chlorózy a nekrózy. Dále bylo prokázáno, že vlivem fluoranthenu dochází ke snížení rychlosti růstu rostlin. I přesto jsou rostliny okřehku schopny růstu a vývoje i při zatížení 5 mg FLT/l. U rostlin okřehku, které byly ošetřeny FLT, byl také pozorován negativní vliv na růst a tvar kořenů. V diplomové práci byl také prokázán vliv na SLA a celkový obsah sušiny. Působením fluoranthenu však patrně nedošlo k poškození fotosyntetických procesů, jelikož zatížený okřehek nevykazoval změny ve fluorescenci chlorofylu oproti kontrolním rostlinám. Fluoranthen se podílí po 21 dnech od založení experimentu na lipidové peroxidaci a následnému poškození membrán vzhledem k vysoké MDA ve vzorcích rostlinného materiálu. Vlivem FLT došlo také ke snížení obsahu chlorofylu *a* a *b* po 12 a 21 dnech kultivace rostlin u vyšších koncentrací FLT. Tento polyaromát má také významný vliv na produkci rostlinných hormonů, jehož vlivem dochází k nárůstu hladiny ABA, etylénu a dále také k produkci endogenních cytokininů BA a BAR a po 21 dnech od založení experimentu byly nalezeny *iP*, *iPR* a *Z*.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITARATURY

- ABELES, F. B., LONSKI, J. (1969): Stimulation of lettuce seed germination by ethylene. *Plant. Physiol.* 44:277-280.
- AGGARWAL, G., SHARMA, C., SRIVASTAVA, D. K. (2012): Thidiazuron: a potent cytokinin for efficient plant regeneration in Himalayan poplar (*Populus ciliata* Wall.) using leaf explants. *Ann. For. Res.* 55(2):179-188.
- ALSCHER, R. G. (1989): Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plantarum.* 77:457-464.
- ANSQUER, P., KHALED, R. A. H., CRUZ, P., THEAU, J. P., THEROND, O., DURU, M. (2009): Characterizing and predicting plant phenology in species rich grasslands. *Grass. Forage. Sci.* 64:57-70.
- APEL, K., HIRT, H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
- APPENROTH, K-J., KRECH, K., KERESZTES, Á., FISCHER, W., KOLOCZEK, H. (2010): Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere.* 78:216-223.
- ARGUESO, C. T., HANSEN, M., KIEBER, J. J. (2007): Regulation of ethylene biosynthesis. *J. Plant Growth Regul.* 26:92-105.
- ARNOTT, H. J. (1966): Studies of calcification in plants. *Calcified tissues.* Springer Berlin Heidelberg. 152-157.
- BARI, R., JONES, J. D. G. (2009): Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant. Mol. Biol.* 69:473-488.
- BARTOSZ, G. (1997): Oxidative stress in plants. *Acta. Physiologiae. Plantarum.* 19:47-64.
- BASSI, M., CORRADI, M. G., REALINE, M. (1990): Effects of chromium (VI) on two fresh water plants, *Lemna minor* and *Pistia stratiotes*, 1. Morphological observations. *Cytobios.* 62: 27-38.
- BLEECKER, A. B., KENDE, H. (2000): Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:1-18.

- BOG, M., BAUMBACH, H., SCHWEEN, U., HELLWIG, F., LANDOLT, E., APPENROTH, K. J. (2010): Genetic structure of the genus *Lemna* L. (*Lemnaceae*) as revealed by amplified fragment length polymorphism. *Planta*. 232: 609-619.
- BRADFORD, K. J. (2008): Shang Fa Yang: pioneer in plant ethylene biochemistry. *Plant Sci*. 175:2-7.
- BRÄNDLI, R. H., BUCHELI, T. D., KUPPER, T., MAYER, J., STADELMANN, F. X., TARRADELLAS, J. (2007): Fate of PCBs, PAHs and their source characteristic ratios during composting and digestion of source-separated organic waste in full-scale plants. *Environ. Pollut*. 148:520-528.
- BRÜGGEMANN W., BEYEL V., BRODKA M., POTH H., WEIL M., STOCKHAUS J. (1999): Antioxidants and antioxidative enzymes in wild type and transgenic *Lycopersicon* genotypes of different chilling tolerance. *Plant Sci*. 140:145–154.
- BRYSELBOUT, C., HENNER, P., CARSIGNOL, J., LICHTFOUSE, È. (2000): Polycyclic aromatic hydrocarbons in highway plants and soils. Evidence for a local distillation effect. *Analyst*. 28(4): 290-293.
- BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. (2000): *Biochemistry and molecular biology of plants*. MD: Am. Soc. Plant. Physiol.
- BUSK, P. K., PAGES, M. (1998): Regulation of abscisic acid – induced transcription. *Plant Mol. Biol*. 37:425-435.
- CASTAÑO-VINYALS, G., D'ERRICO, A., MALATS, N., KOGEVINAS, M. (2004): Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup. Environ. Med*. 61:4-12.
- CLARK, D. G., GUBRIUM, E. K., BARRETT, J. E., NELL, T. A., KLEE, H. J. (1999): Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiol*. 121:53-59.
- CUBAS, P., LAUTER, N., DOEBLEY, J., COEN, E. (1999): The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth end development. *Plant J*. 18(2):215-222.
- DAVIS, B., SCOTT, R. C., NORSWORTHY, J. K., GBUR, E. (2011): Response

of rice (*Oriza sativa*) to low rates of glyphosate and glukosinate. Weed Technol. 25:198-203.

- EI-D, A. M. S. A., SALAMA, A., WAREING, P. F. (1979): Effect of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). J. Exp. Bot. 30(5):971-981.
- ELMO, M., BAYER, J. R. (1976): A potent inhibitor of ethylene action in plants. Plant. Physiol. 58:268-271.
- FLETCHER, J. S., MCFARLENE, J. C., PFLEEGER, T., WICKLIFF, C. (1990): Influence of root exposure concentration on the fate of nitrobenzene in soybean. Chemosphere 20:513-523.
- FRANCESCHI, V. R. (1989): Calcium oxalate formation is a rapid and reversible proces in *Lemna minor* L. Protoplasma. 148:130-137.
- GAJDOŠOVÁ, S., SPÍCHAL, L., KAMÍNEK, M., HOYEROVÁ, K., NOVÁK, O., DOBREV, P., GALUSZKA, P., KLÍMA, P., GAUDINOVÁ, A., ŽIŽKOVÁ, E., HANUŠ, J., DANČÁK, M., TRÁVNÍČEK, B., PEŠEK, B., KRUPÍČKA, M., VAŇKOVÁ, R., STRNAD, M., MOTYKA, V. (2011): Distribution biological activities, matabolism, and the conceivable function of cis-zeatine-type cytokinins in plants. J. Exp. Bot. 62(8):2827-2840.
- GAN, S., AMASINO, R. M. (1996): Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play. BioEssays. 18(7):557-565.
- GANE, R. (1934): Production of ethylene by some fruits. Nature. 134:1008.
- GAO, C., HU, J., ZHANG, Y., KNAPP, A. (2009): Association of polyamines in govering the chilling sensitivity of maize genotypes. Plant. Growth. Regul. 57:31-38.
- GAO, J., GARRISON, A. W., HOEHAMER, C., MAZUR, C. S., WOLFE, N. L. (2000): Uptake and phytotransformation of o, p' – DDT and p, p' – DDT by axenically cultivated aquatic plants. J. Agr. Food Chem. 48:6121-6127.
- GEOFFROY, L., FRANKART, C., EULLAFFROY, P. (2004): Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. Environ. Pollut.131:233-241.
- GIANFREDA, L., RAO, M. A. (2004): Potential of extra cellular enzymes in

remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb. Technol.* 35:339-354.

- GLICK, B. R., PENROSE, D. M., JIPING, L. (1998): A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190:63-68.
- GROSSMANN, K. (1991): Induction of leaf abscission in cotton is a common effect of urea-and adenine-type cytokinins. *Plant. Physiol.* 95:234-237.
- GUTMAN, I., DURDEVIĆ, J., BALABAN, A. T. (2009): A regularity for cyclic conjugation in acenaphthylene, fluoranthene and their congeners. *Polycyclic aromatic compounds.* 29(1):3-11.
- HEUSEMANN, W., REINERT, J. (1976): Regulating growth and morphogenesis of cell cultures of *crepis-capillaris* by light and phytohormones. *Protoplasma.* 90:353-367.
- HILMI, Z. S., RAMLAH, M. T., DZARAINI, K., NORAZAH, A. R. (2011): Phytoremediation of nutrient contaminants from golf courses surface water. *Empowering science, technology and innovation toward a better tomorrow.* 205-211.
- HOLOUBEK, I. (2000): Persistent, bioaccumulative and toxic chemicals in Central and Eastern Europe – levels and risks. *Cent. Eur. J. Public. Health.* 2:3-4.
- HULTÉN, E. (1971): Atlas över växternas utbredning i Norden. *Fanerogamer och ormbunksväxter. [Atlas of the distribution of plants in the Nordic countries. Phanerogames and pteridophytes.]* 2nd ed.—Generalstabens Litografiska Anstalts Förlag, Stockholm. 56 + 531 pp.
- CHANDRA, P., KULSHRESHTHA, K. (2004): Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *Botan. Rev.* 70(3):313-327.
- CHEESEMAN K. H., (1993): Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec. Aspects Med.* 14:191-197.
- CHETIYANUKORNKUL, T., TORIBA, A., KAMEDA, T., TANG, N., HAYAKAWA, K. (2006): Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluorethene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal.*

Bioanal. Chem. 386:712-718.

- CHROMA, L., MACKOVÁ, M., KOČEROVÁ, P., IN DER WIESCHE, C., BURKHARD, J., MACEK, T. (2002): Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs. Acta. Biotechnol. 22(1-2):35-41.
- KAKIMOTO, T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. J. Plant. Res. 116:233-239.
- KAMÍNEK, M. (1992): Progress in cytokinin research. Trends Biotech. 10:159-164.
- KAMÍNEK, M., MOTYKA, V., VAŇKOVÁ, R. (1997): Regulation of cytokinin content in plant cells. Physiol. Plant. 101:689-700.
- KANOUN-BOULE, M., VICENTE, J., NABAIS, C., PRASAD, M. N. V., FREITAS, H. (2009): Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper. Aquat. Toxicol. 91:1-9.
- KHELLAF, N., ZERDAOUI, M. (2009): Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal pollution. Iran. J. Environ. Health. 6:161-166.
- KHELLAF, N., ZERDAOUI, M. (2010): Growth, photosynthesis and respiratory response to copper in *Lemna minor*: a potential use of duckweed in biomonitoring. Iran. J. Environ. Health. Engin. 7(4):299-306.
- KLINGLER, J. P., BATELLI, G., ZHU, J-K. (2010): ABA receptors: the start of a new paradigm in phytohormone signalling. J. Exp. Bot. 61(12):3199-3210.
- KOTAK, S., LARKINDALE, J., LEE, U., KOSKULL-DÖRING, P., VIERLING, E., SCHARF, K-D. (2007): Complexity of the heat stress response in plants. Cur. Op. Plant. Biol. 10:310-316.
- KŘÍŽKOVÁ, S., ADAM, V., KIZEK, R. (2009): Fytotoxicita stříbrných iontů. Chem. Listy. 103:559-568.
- KUANG, S., WU, Z., ZHAO, L. (2011): Accumulation and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils around oil sludge in Zhongyuan oil field, China. Environ. Earth. Sci. 64:1353-1362.
- KUČEROVÁ, P., MACKOVÁ, M., MACEK T. (1999): Perspektivy fytoremediace při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí. Chem. Listy. 93:19-26.
- KUMMEROVÁ, M., BARTÁK, M., DUBOVÁ, J., TŘÍSKA, J., ZUBROVÁ,

- E., ZEŽULKA, Š. (2006): Inhibitory effect of fluoranthene of photosynthetic processes in lichens detected by chlorophyll fluorescence. *Ecotoxicology*. 15:121-131.
- KUMMEROVÁ, M., KMENTOVÁ, E., KOPTÍKOVÁ, J. (2001): Effect of fluoranthene on growth and primary processes of photosynthesis in faba, bean and sunflower. *Plant Production*. Praha. 47:344-351.
 - KUMMEROVÁ, M., VÁŇOVÁ, L., FIŠEROVÁ, H., KLEMŠ, M., ZEŽULKA, Š., KRULOVÁ, J. (2010): Understanding the effect of organic pollutant fluoranthene on pea *in vitro* using cytokinins, ethylene, ethane and carbon dioxide as indicators. *Plant Growth Regul.* 61:161-174.
 - KUMMEROVÁ, M., ZEŽULKA, Š., VÁŇOVÁ, L. (2010): The use of chlorophyll fluorescence for evaluation of phytotoxicity of organic pollutants. *Listy cukrovarnické řepařské*. 126:410-411.
 - KÜPPER, H., KÜPPER, F., SPILLER, M. (1996): Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J. Exp. Bot.* 47(295):259-266.
 - KURAKAWA, T., UEDA, N., MAEKAWA, M., KOBAYASHI, K., KOJIMA, M., NAGATO, Y., SAKAKIBARA, H., KYOZUKA, J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin – activating enzyme. *Nature*. 445:652-655.
 - LABRA, M., GIANAZZA, E., WAITT, R., EBERINI, I., SOZZI, A., REGONDI, S., GRASSI, F., AGRADI, E. (2006): *Zea mays* L. protein changes in response to potassium dichromate treatments. *Chemosphere*. 62:1234-1244.
 - LEBLEBICI, Z., AKSOY, A. (2011): Growth and lead accumulation capacity of *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza* (*Lemnaceae*): Interactions with nutrient enrichment. *Water Air. Soil Pollut.* 214:175-184
 - LINN, Y., HUDSON, J. B., TOWERS, G. H. N. (1995): Isolation of the anthropogenic compound fluoranthene in a screening of Chinese medicinal plants for antiviral compounds. *Planta Medica*. 61(02):187-188.

- LIOTENBERG, S., NORTH, H., MARION-POLL, A. (1999): Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37(5):341-350.
- LIU, N., GAO, Y. B., JIA, C. Y. (2000): Changes in POD activity, free proline content and cytomembrane permeability of *Lolium multiflorum* leaves under different levels of osmotic stress. *Plant Physiol. Commun.* 36:11-14.
- LONGSTRETH, D. J. (1989): Photosynthesis and photorespiration in freshwater emergent and floating plants. *Aquat. Bot.* 34:287-299.
- MALAWSKA, M., EKONOMIUK, A., WILKOMIRSKI, B. (2006): Polycyclic aromatic hydrocarbons in peat cores from southern Poland: distribution in stratigraphic profiles as an indicator of PAH sources. *Mires and peat.* 1(05):1-14.
- MAXWELL K., JOHNSON, G. N. (2000): Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-668.
- MELARAGNO, J. E., WALSH, M. A. (1976): Ultrastructural features of developing sieve elements in *Lemna minor* L. - the protoplast. *Amer. J. Bot.* 63(8):1145-1157.
- MILBORROW, B. V. (2001): The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 52(359):1145-1164.
- MILLER, C. O., SKOOG, F., SALTZA, V. N. H., STRONG, M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77:1329-1334.
- MITHÖFER, A., SCHULZE, B., BOLAND, W. (2004): Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters.* 566:1-5.
- MKANDAWIRE, M., DUDEL, E. G. (2007): Are *Lemna* spp. effective phytoremediation agents?. *Biorem. Biodiv. Bioavail.* 1: 56-71.
- MKANDAWIRE, M., TAUBERT, B., DUDEL, E. G. (2003): Biosorption capacity and limits in uranium immobilisation by dead and living *Lemna gibba* L. biomass. In Kalogerakis. N. (Ed): *Proceedings of Second European*

Bioremediation conference, Technical university of Crete and European community. Chania, Creta Greece, pp 357-360.

- MOK, D. W. S., MOK, M. C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52:89-118.
- MUKHERJEE, A. K., KALITA, P., UNNI, B. G., WANN, S. B., SAIKIA, D., MUKHOPADHYAY, P. K. (2010): Fatty acid composition of four potential aquatic weeds and their possible use as fish-feed neutraceuticals. *Food. Chem.* 123: 1252-1254.
- NEILL, S. J., DESIKAN, R., CLARKE, A., HANCOCK, J. T. (2002): Nitric oxid is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 128:13-16.
- NOCTOR G., MHAMDI, A., CHAOUCH, S., HAN, Y., NEUKERMANS, J., MARQUEZ-GARCIA, B., QUEVAL, G., FOYER, C. H. (2012): Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant. Cell. Environment.* 35:451-484.
- NOCTOR, G., QUEVAL, G., MHAMDI, A., CHAOUCH, S., FOYER, CH. (2011): Glutathione. *The arabidopsis book.*
- NOVÁK, O., TARKOWSKI, P., TARKOWSKA, D., DOLEŽAL, K., LENOBEL, R., STRNAD, M. (2003): Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography-single-quadrupole mass spektrometry. *Anal. Chem. Acta.* 480:207-218.
- OBEK, E., HASAR, H. (2002): Role of duckweed (*Lemna minor* L.) harvesting in biological phosphate removal from secondary treatment effluents. *Fresen. Environ. Bull.* 11:27-29.
- PANDA, S. K., UPADHYAY, R. K. (2003): Salt stress in jury induces oxidative alterations and antioxidative defence in the roots of *Lemna minor*. *Biolog. Plant.* 48(2):249-253.
- PIERIK, R., THOLEN, D., POORTER, H., VISSER, E. J. W., VOESENEK, L. A. C. J. (2006): The janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends Plant Sci.* 11(4):176-183.
- PIOTROWSKA, A., BAJGUZ, A., GODLEWSKA-ŻYŁKIEWICZ, B.,

- CZERPAK, R., KAMIŃSKA, M. (2009): Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Environ. Exp. Bot.* 66:507-513.
- PIOTROWSKA, A., BAJGUZ, A., GODLEWSKA-ŻYŁKIEWICZ, B., ZAMBRZYCKA, E. (2010): Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae) exposed to cadmium and lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58:594-604.
 - PITERKOVÁ, J., TOMÁNKOVÁ, K., LUHOVÁ, L., PETŘIVALSKÝ, M., PEČ, P. (2005): Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem. Listy.* 99:455-466.
 - PODLEŠÁKOVÁ, K., TARKOVSKA, D., PĚNČÍK, A., OKLEŠŤKOVÁ, J., TUREČKOVÁ, V., FLOKOVÁ, K., TARKOWSKI, P. (2012): Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chem. Listy.* 106:373-379.
 - PRASAD, M. N. V., MALEC, P., WALOSZEK, A., BOJKO, M., STRZAŁKA, K. (2001): Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Sci.* 161: 881-889.
 - QIUSHNANG, L., YONGLONG, L., YAJUAN, S., TIEYU, W., KUN, N., LI, X., SHIJIE, L., WANG, L., XIONG, Q., GIESY, J. P. (2013): Combined effects of cadmium and fluoranthene on germination, growth and photosynthesis of soybean seedlings. *J. Environ. Sci.* 25(9):1936-1946.
 - QUARRIE, S. A., WHITFORD, P. N., APPLEFORD, N. E. J., WANG, T. L., COOK, S. K., HENSON, L. E., LOVEYS, B. R. (1988): A monoclonal antibody to (s)-abscisic acid: its characterization and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta.* 183: 330-339.
 - RAZINGERA, J., DERMASTIAB, M., KOCEC, J. D., ZRIMECA, A. (2008): Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environ. Poll.* 153(3):687-694.
 - ROBERT-SEILANIANZ, A., NAVARRO, L., BARI, R., JONES, J. D. G. (2007): Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biolog.* 10:372-379.
 - SAKAKIBARA, H. (2006): Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:431-449.

- SAKAKIBARA, H., TAKEI, K., HIROSE, N. (2006): Interactions between nitrogene and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends Plant Sci.* 11:440-448.
- SHARP, R. E. (2002): Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell Environ.* 25:211-222.
- SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2007): Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58(2):221-227.
- SHULAEV, V., CORTES, D., MILLER, G., MITTLER, R. (2008): Metabolomics for plant stress response. *Physiol. Plant.* 132:199-208.
- SCHROLL, R., SCHEUNERT, I. (1992): A laboratory system to determine separately the uptake of organic chemicals from soil by plant roots and by leaves after vaporization. *Chemosphere* 24:97-108.
- SKILLICORN, P., SPIRA, W., JOURNEY, W. (1993): Duckweed aquaculture. A new aquatic farming system for developing countries. The World Bank. Washington, DC. USA. 76s.
- SKOOG, F., MILLER, C.O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: Porter HK (ed) *The biological action of growth substance*. New York: Acad. Press, pp 118-131.
- SMIGOCKI, A. C., OWENS, L. D. (1988): Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5131-5135.
- SMIRNOFF, N. (1993): Tansley review no. 52. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessication. *New Phytologist.* 125:27-58.
- SONDHEIMER, E., TZOU, D. S., GALSON, E. C. (1968): Abscisic acid levels and seed dormancy. *Plant. Physiol.* 43:1443-1447.
- SRINIVASAN, M., NACHIAPPAN, V., RAJASEKHARAN, R. (2006): Potential application of urea-derived herbicides as cytokinins in plant tissue culture. *J. Biosci.* 31:599-605.
- STRNAD, M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.* 101:674-688

- STRNADOVÁ, Z. (1990): Okřehky jako modelové organismy pro studium vývoje. *Živa*. 2:53-55.
- SUEDEL, B. C., RODGERS, J. H., CLIFFORD, P. A. (1993): Bioavailability of fluoranthene in freshwater sediment toxicity tests. *Environ. Toxic. Chem.* 12:155-165.
- TAN, B. C., SCHWARTZ, S. H., ZEEVAART, J. A. D., MCCARTY, D. R. (1997): Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:12235-12240.
- TARKOWSKI, P., DOLEŽAL, K., STRNAD, M. (2004): Analytické metody studia cytokininů. *Chem. Listy*. 98:834-841.
- TAUSZ, M., ŠIRCELJ, H., GRILL, D. (2004): The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid?. *J. Exp. Bot.* 55(404):1954-1962.
- TAVERNE, Y., BOGERS J. C., DUNCKER J. D., MERKUS D. (2013): Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxidative medicine and cellular longevity*. *Med. Cell. Longevity*. 2013:1-15.
- TEHRANY, S. M. (2013): Bakteriální degradace perzistentních látek. *Živa*. 3:101-102.
- TEISSEIRE, H., COUDERCHET, M., VERNET, G. (1999): Phytotoxicity of diuron alone and in combination with copper or folpet on duckweed (*Lemna minor*). *Environ. Pollut.* 106:39-45.
- TKALEC, M., PREBEG, T., ROJE, V., PEVALEK-KOZLINA, B., LJUBESIC, N. (2008): Cadmium-induced responses in duckweed *Lemna minor*. *Acta. Physiol. Plant.* 30:881-890.
- VANSTRAELEN, M., BENKOVÁ, E., (2012): Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 28:463-487.
- VÁVROVÁ, M., ŠUCMAN, E., ZLÁMALOVÁ – GARGOŠOVÁ, H., KOŘÍNEK, P. (2003): Plant bioindicators as a tool for evaluation of agrarian ecosystems. *Fresen. Environ. Bull.* 12(2):219-226.
- WANG, M. C., BOHMANN, D., JASPER, H. (2005): JNK extends life span and

limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell*. 121(1):115-125.

- WANG, W., WINOCUR, B., SHOSEYOV, O., ALTMAN, A. (2004): Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant. Sci.* 9(5):244-252.
- WEN, S. H., ZHANG T., TAN T. W. (2005): Optimization of the amino acid composition in glutathione fermentation. *Process Biochem.* 40 (11): 3474-3479.
- WERNER, T., MOTYKA, V., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. *Plant Biol.* 98(18):10487-10492.
- WERNER, T., SCHMÜLLING, T. (2009): Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 12:527-538.
- WILD, S. R., JONES, K. C. (1992): Polynuclear aromatic hydrocarbon uptake by carrots grown in sludge-amended soil. *J. Environ. Qual.* 21:217-225.
- WOJTOWICZ, P., DOSTÁLOVÁ, E., ADAM, T. (2012): Analýza biologického materiálu dvojrozměrnou plynovou chromatografií. *Klin. Biochem. Metab.* 20(41):38-40.
- XU, L. B., PORTER N. A. (2014): Reactivities and products of free radical oxidation of cholestadienols. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (14):5443-5450.
- YAMAUCHI, Y., FURUTERA, A., SEKI, K., TOYODY, Y., TANAKA, K., SUGIMOTO, Y. (2008): Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification on heat-stressed plants. *Plant Physiol. Biochem.* 46:786-793.
- YIP, W-K., YANG, S. F. (1986): Effect of thidiazuron, a cytokinin-dependent ethylene production systems. *Plant Physiol.* 80:515-519.
- ZHANG, Y., WANG, J. (2011): Distribution and source of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the surface soil along main transportation routes in Jiaxing city, China. *Environ. Monit. Assess.* 182:535-543.
- ZHU, J. K. (2002): Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53(1):247-273.

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1: *Hlavní role GSH v metabolismu rostlin*
- Obr. 2: *Chemická struktura molekuly fluoranthenu*
- Obr. 3: *Strukturní vzorce isoprenoidních a aromatických cytokininů*
- Obr. 4: *Strukturní vzorce cytokininů syntetického původu*
- Obr. 5: *Biosyntéza cytokininů (KAKIMOTO 2003)*
- Obr. 6: *Strukturní vzorec etylénu*
- Obr. 7: *Biosyntéza etylénu*
- Obr. 8: *Strukturní vzorec opticky aktivní kyseliny abscisové*
- Obr. 9: *Biosyntéza isopentenylldifosfátu jako prekurzoru ABA (MILBORROW 2001)*
- Obr. 10: *Lemna minor L.*
- Obr. 11: *Rozšíření okřehku ve světě (HULTÉN 1971)*
- Obr. 12: *Obranný mechanismus na buněčné úrovni u rostlin okřehku (MKANDAWIRE a DUDEL 2007)*
- Obr. 13: *Kultivace okřehku v laboratorních podmínkách*
- Obr. 14: *A) lyofilizátor Christ Alpha 1-2 B) lyofilizované vzorky okřehku menšího*
- Obr. 15: *Schématické znázornění postupu čištění cytokininů*
- Obr. 16: *Princip ELISA analýzy*
- Obr. 17: *Schématické znázornění plynového chromatografu*
- Obr. 18: *Rozdělení vodné a etherické frakce v dělicích nálevkách*
- Obr. 19: *Schématické znázornění postupu stanovení obsahu kyseliny abscisové*

- Obr. 20: *Princip imunoprecipitační reakce při radioimunoanalýze*
- Obr. 21: *Kontrolní rostliny okřehku menšího*
- Obr. 22: *Rostliny ošetřené 0,1 mg FLT/l*
- Obr. 23: *Rostliny ošetřené 0,5mg FLT/l*
- Obr. 24: *Rostliny ošetřené 1 mg FLT/l*
- Obr. 25: *Rostliny ošetřené 5 mg FLT/l*
- Obr. 26: *Kontrolní rostliny s listy bez překryvu (A) a rostliny ošetřené 5 mg FLT/l s překrývajícími se listy (B)*
- Obr. 27: *Detail kořene okřehku*
- Obr. 28: *Rostlina okřehku menšího*
- Obr. 29: *Nekutinizovaná spodní strana epidermis*
- Obr. 30: *Parenchymatické pletivo s mezibuněčnými prostory*
- Obr. 31: *Produkce nového dceřiného článku*
- Obr. 32: *Okřehek ošetřený 5 mg FLT/l*
- Obr. 33: *Odumírání mateřského článku*
- Obr. 34: *Okřehek ošetřený 0,1 mg FLT/l*
- Obr. 35: *Zobrazení listové plochy po 21 dnech kultivace*

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: *Počet rostlin v jednotlivých variantách kultivace*

Graf 2: *Délka kořenů v jednotlivých variantách kultivace*

Graf 3: *Viabilita rostlin v jednotlivých variantách experimentu*

Graf 4: *Množství sušiny v jednotlivých variantách experimentu*

Graf 5: *SLA u rostlin v jednotlivých variantách kultivace*

Graf 6: *Kvantový výtěžek elektronového transportu ve fotosystému PSII v jednotlivých variantách kultivace*

Graf 7: *Obsah chlorofylu „a“ v jednotlivých variantách kultivace*

Graf 8: *Obsah chlorofylu „b“ v jednotlivých variantách kultivace*

Graf 9: *MDA v rostlinném materiálu v jednotlivých variantách kultivace*

Graf 10: *Poškození membrán u rostlin v jednotlivých variantách kultivace*

Graf 11: *Chromatogram HPLC dělení cytokininových standardů*

Graf 12: *Obsah kyseliny abscisové u rostlin v jednotlivých variantách kultivace*

Graf 13: *Produkce etylénu rostlinami v jednotlivých variantách kultivace*

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: *Složení koncentrátů Steinbergova media*

Tab. 2: *Referenční časy pro sběr jednotlivých frakcí endogenních cytokinů*

Tab. 3: *Obsah BA a BAR v jednotlivých variantách kultivace*

Tab. 4: *Obsah iP a iPR v jednotlivých variantách kultivace*

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

^3H -ABA – radioaktivně značená (tritiem) kyselina abscisová

ABA – kyselina abscisová

ACC – 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina

ACS – 1-aminocyklopropan-1-karboxyláza syntáza

Ade – adenin

Ado - adenosin

ADP – adenosin-difosfát

AFLP – analýza polymorfismu délek amplifikovaných fragmentů DNA

ATP – adenosin-trifosfát

BA – N6-benzyladenin

BAR – N6-benzyladenin ribosid

BHT – 2,6-di-t-butyl-4-hydroxytoluen

BSA – hovězí sérový albumin

CK – cytokininy

cZ – *cis*-zeatin

DHZ – dihydrozeatin

DHZR – dihydrozeatin ribosid

DNA – deoxynukleová kyselina

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FH – fytohormon

FLT – fluoranthen

Glu – glukóza

GSH – glutation

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HSP – proteiny tepelného šoku

IAA – kyselina indolyl-3-octová

iP – N6-(Δ^2 -isopentenyl)adenin

IPP – isopentenyladenosinfosfát

iPR – N6-(Δ^2 -isopentenyl)adenin ribosid

IPT – isopentenyltransferáza

LDMC – leaf dry mass content – obsah sušiny listů

MDA – malondialdehyd (malonyldialdehyd, propandialdehyd)

MemT – *meta*-methoxytopolin

MeoT – *ortho*-methoxytopolin

Met – methionin

MT – metalothionein

mT – *meta*-topolin

MTA – methylthioadenin

mTR – *meta*-topolin ribosid

NA – nikotinamin

OA – organická kyselina

oT – *ortho*-topolin

PAU – polycyklické aromatické uhlovodíky

PBS – phosphate buffered saline – fosfátový pufr s chloridem sodným

POP – perzistentní organické polutanty

Qy – kvantový výtěžek elektronového transportu PSII

REL – membránová permeabilita

RIA – radioimunoanalytická metoda

ROS – reaktivní formy kyslíku

S-AdoMet – S-adenosilmethionin

SLA – specific leaf area – specifická listová plocha

TBS – tris-pufrovaný fyziologický roztok

TDZ – thidiazuron

TFA – trifluoroctová kyselina

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

tZ – *trans*-zeatin

ÚKZÚZ – ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

ZEP – zeaxantin-epoxidáza

ZR – zeatin ribosid