

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Vliv biologicky aktivních látek na elektronový transport
v chloroplastech špenátu při fotosyntéze**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Natálie Holoušková
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. PharmDr. Josef Jampílek, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2024

Jméno a příjmení autora	Natálie Holoušková
Název práce	Vliv biologicky aktivních látek na elektronový transport v chloroplastech špenátu při fotosyntéze
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	prof. PharmDr. Josef Jampílek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	<p>Předkládaná diplomová práce se zabývá vlivem biologicky aktivních látek na elektronový transport v chloroplastech špenátu při fotosyntéze. V teoretické části této práce je shrnuta problematika herbicidů, rizik spojených s jejich používáním a mechanismů účinku inhibitorů elektronového transportu. Cílem experimentální části bylo nalézt novou molekulu s potenciálním herbicidním účinkem. Byly testovány herbicidní účinky molekul odvozených od substituované kyseliny skořicové a jejich vliv na inhibici elektronového transportu v izolovaných chloroplastech špenátu. Nejúčinnější identifikovaná látka byla (2<i>E</i>)-3-(4-chlorfenyl)-<i>N</i>-[3-(trifluormethyl)fenyl]prop-2-enamid s inhibiční aktivitou $IC_{50} = 76,8 \mu\text{M}$.</p>
Klíčová slova	elektrontransportní řetězec, herbicidy, chloroplasty, kyselina skořicová, rezistence
Počet stran	56
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Author's first name and surname	Natálie Holoušková
Title of Thesis	Effect of Biologically Active Compounds on Electron Transport in Spinach Chloroplasts during Photosynthesis
Type of Thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. PharmDr. Josef Jampílek, Ph.D.
Year of Presentation	2024
Abstract	<p>The diploma thesis studies the effect of biologically active substances on electron transport in spinach chloroplasts during photosynthesis. The theoretical part of this thesis summarizes the problematics about herbicides, risks associated with their use and mechanisms of action of electron transport inhibitors. The experimental part aims to identify a new molecule with potential herbicidal properties. The herbicidal effects of molecules derived from substituted cinnamic acid were tested along with their role in inhibiting electron transport in isolated spinach chloroplasts. (2E)-3-(4-Chlorophenyl)-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]prop-2-enamide with inhibitory activity $IC_{50} = 76.8 \mu\text{M}$ was identified as the most effective agent.</p>
Keywords	chloroplasts, cinnamic acid, electron transport chain, herbicides, resistance
Number of Pages	56
Number of Appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně pod vedením prof. PharmDr. Josef Jampílka, Ph.D. za použití citované literatury.

.....

V Olomouci dne

.....

Natálie Holoušková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu prof. PharmDr. Josefu Jampilkovi, Ph.D. za mnoho cenných rad, konzultací, trpělivost a čas, který se mnou strávil při vypracování mé diplomové práce. Velké díky patří také doc. PharmDr. Jiřímu Kosovi, Ph.D. za jeho cenné rady při práci v laboratoři a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	8
SEZNAM TABULEK.....	9
SEZNAM ZKRATEK.....	10
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	11
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
2.1. Herbicidy	12
2.1.1 Dělení herbicidů.....	12
2.1.2 Historie herbicidů	14
2.1.3 Herbicidy a jejich rizika.....	15
2.1.3.1 Rizika pro člověka.....	15
2.1.3.2 Rizika environmentální	16
2.1.4 Rezistence a herbicidy	17
2.1.4.1 Rezistence a její vývoj	18
2.1.5 Vývoj nových herbicidů.....	20
2.2 Chloroplasty a elektrontransportní řetězec.....	21
2.2.1 Chloroplasty.....	21
2.2.2 Fotosyntetické pigmenty.....	22
2.2.2.1 Chlorofyly	22
2.2.2.2 Karotenoidy.....	23
2.2.2.3 Fotosyntetické pigmenty v zapojení do elektrontransportního řetězce... 24	
2.2.3 Fotosyntéza	25
2.2.4 Elektrontransportní řetězec	26
2.2.5 Inhibitory elektrontransportního řetězce	28
2.2.5.1 Inhibitory fotosystému II	28
2.2.5.2 Inhibitory fotosystému I.....	31

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
3.1 Rostlinný materiál	33
3.2 Materiál a metodika.....	33
3.2.1 Seznam použitých chemikálií	33
3.2.2 Seznam použitých přístrojů	34
3.2.3 Příprava chloroplastů	35
3.2.3.1 Příprava izolačního pufu	35
3.2.3.2 Izolace chloroplastů	35
3.2.3.3 Stanovení chlorofylu v chloroplastech.....	36
3.2.4 Stanovení inhibice elektronového transportu v chloroplastech.....	36
3.2.4.1 Stanovení chloroplastové aktivity	36
3.2.4.2 Stanovení inhibice elektronového transportu v chloroplastech	37
3.2.5 Výpočty jednotlivých kroků	38
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	40
4.1 Anilidy kyseliny 4-chlorskořicové	40
4.2 Estery trimethoxycinnamátů.....	43
4.3 Alkyl adamantylkarbonyloxycinnamáty	46
5 ZÁVĚR	50
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: *Struktura herbicidu 2,4-D (kyselina dichlorfenoxyoctová).* 17
- Obrázek 2: *Struktura triazinu vyskytujícího se ve třech izomerech: 1,2,3-triazin (1), 1,2,4-triazin (2) a 1,3,5-triazin (3).* 18
- Obrázek 3: *Stavba chloroplastu.* 22
- Obrázek 4: *Struktura chlorofylu a a b.* 23
- Obrázek 5: *Struktura β -karotenu a luteinu.* 24
- Obrázek 6: *Absorpční spektrum chlorofylu a, b a β -karotenu.* 25
- Obrázek 7: *Schéma přenosu elektronů mezi fotosystémem I a fotosystémem II.* 28
- Obrázek 8: *Struktura atrazinu.* 30
- Obrázek 9: *Struktura simazinu.* 30
- Obrázek 10: *Struktura bentazonu.* 31
- Obrázek 11: *Struktury paraquat-dichloridu a diquat-dibromidu.* 32
- Obrázek 12: *Filtrační aparatura.* 36
- Obrázek 13: *Aparatura na ozařování kyvety se vzorkem (a = zdroj světla, b = vodní filtr, c = stojan s kyvetou se vzorkem).* 37
- Obrázek 14: *Syntéza (2E)-3-(4-chlorfenyl)-N-arylprop-2-enanilidů **1a–m**. Reagenty a podmínky: (a) PCl_3 , chlorbenzen, MW, 45 min.* 40
- Obrázek 15: *Závislost PET inhibice v chloroplastech špenátu vyjádřené jako $\log(1/\text{IC}_{50} [\text{M}])$ chlorcinnamanilidů na lipofilitě vyjádřené jako $\log P$ (A) a elektronových $\sigma_{(\text{Ar})}$ parametrech celé N-arylové části jednotlivých anilidů (B). (Sloučeniny znázorněné prázdnými symboly nejsou zahrnuty do diskuse pro jejich zanedbatelnou aktivitu.)* 43
- Obrázek 16: *Syntéza aryl (2E)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoátů **2a–i**. Reagenty a podmínky: (a) SOCl_2 , suchý toluen, reflux 1 h; (b) Et_3N , suchý toluen, reflux 1 h.* 43
- Obrázek 17: *Závislost PET inhibice v chloroplastech špenátu vyjádřené jako $\log(1/\text{IC}_{50} [\text{M}])$ sloučenin série TCMA na lipofilitě vyjádřené jako $\log P$ (A) a elektronových $\sigma_{(\text{Ar})}$ parametrech celé O-arylové části jednotlivých esterů (B). (Sloučeniny znázorněné prázdnými symboly nejsou zahrnuty do diskuse pro jejich zanedbatelnou aktivitu.)* 46
- Obrázek 18: *Syntéza substituovaných ((E)-3-alkoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)fenyl adamantankarboxylů **3a–ch**. Reagenty a podmínky: (a) suchý MeOH, Et_3N , pokojová teplota, 24 h; (b) SOCl_2 , suchý toluen, reflux 1 h; (c): Et_3N , suchý toluen, reflux 1 h.* 46
- Obrázek 19: *Závislost PET inhibice v chloroplastech špenátu vyjádřené jako $\log(1/\text{IC}_{50} [\text{M}])$ alkyl adamantylkarbonyloxycinnamátů na lipofilitě vyjádřené jako $\log P$. (Sloučeniny znázorněné prázdnými symboly nejsou zahrnuty do diskuse pro jejich zanedbatelnou aktivitu.)* 49

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1:</i>	<i>Klasifikace herbicidů dle HRAC.</i>	<i>13</i>
<i>Tabulka 2:</i>	<i>Roztoky pro stanovení aktivity chloroplastů.</i>	<i>37</i>
<i>Tabulka 3:</i>	<i>Složení roztoků s testovanou látkou.</i>	<i>38</i>
<i>Tabulka 4:</i>	<i>Struktury chlorcinnamanilidů, predikované hodnoty lipofility ($\log P$) a elektronové σ parametry a hodnoty PET inhibice jednotlivých sloučenin.</i>	<i>41</i>
<i>Tabulka 5:</i>	<i>Struktury trimethoxycinnamátů, predikované hodnoty lipofility ($\log P$) a elektronové σ parametry a hodnoty PET inhibice jednotlivých sloučenin.</i>	<i>44</i>
<i>Tabulka 6:</i>	<i>Struktury substituovaných alkyl adamantylkarbonyloxy-cinnamátů a hodnoty jejich PET inhibice.</i>	<i>47</i>

SEZNAM ZKRATEK

2,3,4-T	kyselina trichlorfenoxyoctová
2,4-D	kyselina dichlorfenoxyoctová
A	akceptor elektronu
A ₆₅₂	absorbance při vlnové délce 652 nm
ATP	adenosintrifosfát
Bn	benzyl
DCPIP	2,6-dichlorfenol-indofenol
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EU	Evropská unie
F _d	ferredoxin
FNR	ferredoxin-NADP ⁺ reduktáza
H ⁺	proton vodíku
H ₂ A	donor elektronu
HRAC	Herbicide Resistance Action Committee
IC ₅₀	koncentrace látky způsobující 50% inhibici
MCPA	kyselina (4-chlor-2-methylfenoxy)octová
MÚ	mechanismus účinku
NADP ⁺	kationt nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NTSR	mutace mimo cílové místo
PET	fotosyntetický elektronový transport
Ph	fenyl
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniového kationtu
PQ ₂	redukovaný plastochinon B
PS I	fotosystém I
PS II	fotosystém II
RNA	ribonukleová kyselina
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
TSR	mutace cílového místa
WHO	Světová zdravotnická organizace

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Herbicidy jsou přípravky zaměřující se na hubení nežádoucích rostlin, plevelů. Představují tak klíčový nástroj v moderním zemědělství, jenž umožňuje efektivní regulaci nežádoucích rostlin, které za normálních podmínek konkurují účelně pěstovaným plodinám v boji o živiny, vodu a světlo.

S rozšířeným používáním herbicidů se neobjevují pouze pozitivní účinky, ale i ty negativní. Hlavním problémem je pronikání herbicidů do okolního prostředí, které způsobují další škody na necíleně zasažených rostlinách, a také se mohou přes půdu dostávat do povrchových a vstřebávat do podzemních vod. Některé herbicidy mají navíc toxické účinky na jednotlivé živočišné druhy, a to bohužel včetně člověka.

V dnešní době jsou herbicidy používány v menší míře, neboť bylo zjištěno, že plevele se staly vůči některým látkám rezistentní. Tato skutečnost zapříčinila snahu o objevení nových ekologicky nezávadných látek anebo vytváření geneticky modifikovaných plodin, které zvyšují bezpečnost plodin a zlepšují selektivitu herbicidů.

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se problematiky herbicidů a rizikům spojených s jejich používáním. Dále bylo cílem zpracovat problematiku mechanismu účinku inhibitorů elektronového transportu a z něj vyplývající přehledový seznam v současnosti používaných herbicidů. Experimentální část byla zaměřena na nalezení nové molekuly s potenciálním herbicidním účinkem. Testované látky se řadí do herbicidní skupiny inhibitorů fotosystémů. Experimenty byly prováděny na izolovaných chloroplastech pocházejících z rostlin špenátu setého (*Spinacia oleracea* L.), pomocí umělého akceptoru elektronů 2,6-dichlorfenol-indolfenol (DCPIP).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Herbicidy

Herbicidy jsou chemické látky používané v zemědělství. Mají být používány účelně pro regulaci plevelů a dalších nežádoucích rostlin. Existují dva důsledky jejich použití, a to zpomalení anebo úplné přerušení vývoje a růstu rostlin. Herbicidy účinkují především na metabolismus rostliny a její hormonální regulaci. Jejich použití je součástí integrované ochrany proti plevelům v zemědělství a zahradnictví. Umožňuje zlepšení produktivity žádoucích rostlin (Jursík a kol., 2018).

Herbicidy jsou druhem pesticidů. Jsou to biocidy, které jsou vytvořeny k usmrcování, odpuzování anebo zpomalování organismů nežádoucích pro lidi a zemědělství. Mezi ně se řadí plevely, plísně a živočišní škůdci. Mohou být děleny podle určení, např. akaricidy (hubí roztoče), fungicidy (hubí houby), insekticidy (hubí hmyz) a rodenticidy (hubí hlodavce) (Dvořák a Smutný, 2003).

2.1.1 Dělení herbicidů

Herbicidy dělíme do několika skupin podle různých kritérií. Mohou být rozděleny podle místa působení na kontaktní a systémové. Kontaktní herbicidy působí přímo na části rostlin, s nimiž přijdou do kontaktu a fungují lépe při slunečním záření. Herbicidy systémové pronikají ihned do nitra rostliny skrze místo průniku, což bývají nejčastěji kořeny, a postupně rostlinu likvidují zevnitř (Liao a kol., 2021).

Dále jsou herbicidy rozděleny dle selektivity na selektivní a neselektivní. Herbicidy selektivní jsou používány pro odstranění specifické nežádoucí skupiny vegetace za takových podmínek, aby nebyly poškozeny cíleně pěstované rostliny. Neselektivní herbicidy devastují veškerou vegetaci na místě použití (Sherwani a kol., 2015).

Jako další kritérium pro dělení herbicidů se udávají mechanismy působení herbicidů. Ty mohou být různé, avšak jediný cíl mají společný, narušit některý z důležitých fyziologických procesů, které jsou pro normální růst a vývoj rostliny nezbytné. Nejčastějším mechanismem je inhibice jednoho anebo více enzymů katalyzující reakci při biosyntéze důležitých organických sloučenin. Klasifikace herbicidů podle mechanismu účinku je celosvětově známá jako HRAC (Herbicide Resistance Action Committee), a ta rozděluje herbicidy do několika skupin podle jejich místa a mechanismu účinku (MÚ) (Tabulka 1) (HRAC, 2005; Menne a Kücher, 2008; Jursík a kol., 2018).

Herbicidy mohou být rozděleny dle jejich aplikace na nežádoucí rostliny. Jedná se o aplikaci před setím rostliny, kdy se herbicidy ošetřuje půda. Tento druh aplikace je vhodný zejména pro herbicidy rozkládající se slunečním zářením a pro herbicidy vysoce těkavé. Další způsob aplikace je preemergentní, v tomto případě se jedná o ošetření herbicidy po zasetí plodiny, ale ještě před tím, než rostlina vzejde. Tyto látky jsou přijímány rostlinnými kořeny. Posledním druhem aplikace je postemergentní, kdy se herbicidní látky aplikují až po vzejití rostliny a jsou přijímány hlavně listovými částmi rostliny, ale v některých případech i kořeny (Sosnoskie, 2006; Jursík a kol., 2018).

Tabulka 1: Klasifikace herbicidů dle HRAC.

<i>Členění HRAC</i>	<i>Herbicidní skupina</i>	<i>Příklad chemické skupiny</i>
A	Inhibitory ACCasy	Aryloxy-fenoxy propionáty, cyklohexandiony
B	Inhibitory syntézy acetolaktátu	Sulfonylmočoviny, imidazoliny, triazolové pyrimidiny, triazonoly
C1	Inhibitory fotosystému II	Triaziny, triazinony, uracily, fenyلكarbamáty
C2	Inhibitory fotosystému II	Substituované močoviny
C3	Inhibitory fotosystému II	Benzothiadizoly, nitrily, fenyلpyridaziny
D	Inhibitory fotosystému I	Bipyridily
E	Protoporfyrinogen oxidázové (PPO) inhibitory	Difenytl ethery, aryl triazoliny, fenyلfthalimidy
F1	Inhibitory syntézy fytoendesaturázy (PDS)	Pyrolidiny, karbaxamidy, amidy
F2	Inhibitory 4-hydroxyfenyلpyruvátde- hydrogenázy	Isoxazoly, triketony
F3	Inhibitory syntézy karotenoidů	Isoxazolidinony
F4	Inhibitory syntézy 1-deoxy- D-xylulóza-5-fosfátu	Isoxazolidinony
G	Inhibitory 5-enolpyruvylšikimát- 3-fosfát syntetázy	Deriváty aminokyselin

Tabulka 1: Pokračování klasifikace herbicidů dle HRAC.

H	Inhibitory glutamin syntetázy	Deriváty aminokyselin
I	Inhibitory syntézy dihydroopteroátu	Karbamáty
K1	Inhibitory stavby mikrotubulů	Dinitroaniliny, benzamidy
K2	Inhibitory stavby mikrotubulů při mitóze	Karbamáty
K3	Inhibitory prodlužování řetězců mastných kyselin	Oxyacetamidy, chloracetamidy, propanacetamidy
L	Inhibitory syntézy buněčné stěny	Benzamidy, nitrily
M	Rozpojování buněčné membrány	Dinitrofenoly
N	Inhibitory syntézy lipidů	Thiokabamáty, benzofurany
O	Mechanismus účinku syntetických auxinů	Fenoxykyseliny, benzoové kyseliny, pyridin-karboxylové kyseliny
P	Inhibitory transportu auxinů	Ftaláty, semikarbazony
Z	Neznámý mechanismus účinku	Kyselina arylaminopropionová, organický arzen

2.1.2 Historie herbicidů

První organické herbicidy se začaly používat už koncem 19. století. Počátkem éry herbicidů bylo zavedení hnojení dusíkatým vápnem, což, jak se následně prokázalo, mělo i herbicidní účinky. V roce 1892 se poprvé uplatnily jako insekticid dinitrofenoly. Později, ve 30. letech 20. století, se začal využívat i dinitro-*o*-kresol, přičemž se zjistilo, že tyto látky mají také neselektivní herbicidní účinky. Toto zjištění vedlo k jejich rozšířenému použití v ochraně rostlin, čímž došlo k významnému pokroku v této oblasti. Látky jsou ale velmi toxické a představovaly nebezpečí pro veškeré živé organismy, a proto se přestaly používat na konci 50. let 20. století (Jursík a kol., 2018).

Na začátku 40. let 20. století pak byly objeveny první syntetické auxiny, konkrétně kyseliny dichlorfenoxyoctová (2,4-D), trichlorfenoxyoctová (2,3,5-T) a (4-chlor-2-methylfenoxy)octová (MCPA), které otevřely nové možnosti opravdu účinné selektivní regulace dvouděložných rostlin, které se používají dokonce dodnes. Následně byly postupně objeveny další velmi úspěšné herbicidy, jako jsou triaziny, chloracetamidy anebo deriváty močoviny (Levin, 2013).

V dnešní době je známo přibližně 150 herbicidních látek, které se společně formulují do stovek, ne-li tisíců, různých komerčních produktů (Senseman a Armbrust, 2007). Většina z nich jsou organickými sloučeninami a obsahují uhlík, vodík, kyslík a další chemické prvky (Levin, 2013).

2.1.3 Herbicidy a jejich rizika

Většina herbicidů nemá pouze pozitivní účinky a jejich použití s sebou nese velká rizika. Aby nedocházelo k žádným ekologickým katastrofám, musí být herbicidy použity v přesném množství a na správných rostlinách. Herbicidy mohou být toxické pro své okolí, a to nejen pro okolní rostliny a jejich plody, ale také pro všechny živočichy, včetně člověka. V dnešní době se proto dbá na to, jaké herbicidy se používají. Dochází k velmi složitému posuzování ekotoxického profilu. Musí se zohledňovat mnoho vlastností a jejich interpretace nebývá vždy jednoznačná (Jursík a kol., 2018).

2.1.3.1 Rizika pro člověka

Expozice pesticidům převážně pochází z absorpce kůží, inhalačně nebo požití, zejména prostřednictvím potravin, kdy se herbicidy buď vyskytují na povrchu nebo uvnitř ovoce a zeleniny anebo se také objevují v mase ryb a jiných zvířat, které konzumujeme. Jako další způsob, jak může být lidský organismus vystaven herbicidům, je prostřednictvím kontaminované pitné vody nebo ve vzduchu, který lidé dýchají (WHO, 2019). Zdraví člověka nemusí ohrozit pouze látka působící herbicidně, ale také další složky vyskytující se v přípravku (Nicolopoulou-Stamati a kol., 2016).

Mezi nejčastější projevy expozice lidského organismu herbicidům se řadí kožní reakce, jako jsou vyrážky, podráždění a také alergické reakce. Mohou se také objevit neurologické symptomy, mezi které patří bolesti hlavy, závratě, ale také závažnější stavy. Požití herbicidů může vyvolat nevolnosti, zvracení anebo další zažívací problémy. Některé herbicidy jsou známy svými disruptivními účinky na endokrinní systém, a tím narušují celkovou hormonální rovnováhu organismu. Mezi nejzávažnější důsledky expozice herbicidům může být řazena karcinogenita, ke které dochází při dlouhodobé expozici určitým herbicidům. Dále může být také ovlivněn reprodukční systém, kdy dochází ke snížené fertilitě anebo celkovým problémům během gravidity (Nicolopoulou-Stamati a kol., 2016).

Profesní expozice herbicidům je spojena s různými respiračními onemocněními, včetně astmatu, chronické obstrukční plicní nemoci a plicního karcinomu (Tarmure

a kol., 2020). Studie Boulanger a kol. z roku 2018 ukázala, že druh zemědělské činnosti může ovlivnit riziko výskytu určitých typů rakoviny plic u zemědělců. Například u vinařů bylo zjištěno vyšší riziko vzniku adenokarcinomu, zatímco u pěstitelů hrachu bylo zvýšené riziko malobuněčného karcinomu plic. U pracovníků pěstujících slunečnice, provádějících řez ovocných stromů a používajících pesticidy na řepě bylo zaznamenáno zvýšené riziko spinocelulárního karcinomu. Dále kupříkladu herbicid atrazin, používaný proti dvouděložným plevelům při pěstování kukuřice, sóji anebo cukrové třtiny je potenciálně karcinogenní a způsobuje adrenokortikální karcinomy (Caron-Beaudoin a kol., 2016).

2.1.3.2 Rizika environmentální

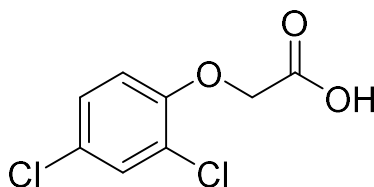
Nejenže se postupně v posledním desetiletí snižuje počet používaných účinných látek herbicidů v České republice ale i v celé Evropské unii, dochází také k restrikci přípravků, které mají horší ekotoxický profil. Jelikož se zároveň se snižováním počtu používaných herbicidů nedaří vyvíjet nové ekologicky nezávadné prostředky, dochází k dalšímu důležitému problému, a to k mnohočetnému výskytu rezistentních populací plevelů (Jursík a kol., 2018).

Herbicidy nepůsobí pouze na nežádoucí rostlinu, ale dostávají se jejich aplikací i do okolí. Jak již bylo zmíněno výše, herbicidy působí i na jiné organismy. Je to způsobeno například přímým kontaktem s látkou anebo mohou herbicidy proniknout do podzemních vod. Jedná se tedy o riziko znečištění vodních zdrojů, což může negativně ovlivnit kvalitu vody a vodní ekosystémy. Herbicidy také mohou ohrozit biodiverzitu, neboť mohou toxicky působit na necílové rostliny a živočichy, což může narušit ekosystémovou rovnováhu. Dále existuje riziko vývoje rezistence škůdců a plevelů na herbicidy, což vyžaduje použití silnějších chemikálií (Ruuskanen a kol., 2022).

Herbicidy narušují mikrobiální rovnováhu v půdě a ovlivňují její úrodnost (Wagner a kol., 1996). Většinou herbicidní látky neovlivňují mikroflóru půdy dlouhodobě. Může se však stát, že při opakovaném používání stejného herbicidu dochází k adaptaci mikroorganismů a následně k jeho rychlejší degradaci a předčasné ztrátě účinnosti. Například herbicid 2,4-D (Obrázek 1) ovlivňuje užitečné bakterie fixující dusík v hlízách bobovitých rostlin, aktinomycety a jiné organismy rozkládající organické sloučeniny (Ruuskanen a kol., 2022).

Negativní vliv mají i na prospěšné druhy, jako jsou opylovači. Tato rizika poukazují na nutnost regulace a kontrolu používání herbicidů a vývoje ekologičtějších

metod ochrany rostlin. Právě úhyn opylovačů, jako jsou nejznámější včely, je velmi nebezpečné pro budoucnost života na Zemi. Opylovači jsou zodpovědní za pohlavní rozmnožování rostlin a bez tohoto procesu by vznikly katastrofické, ne-li fatální důsledky nejen pro lidstvo (Evropský parlament, 2018; Sharma a kol., 2018).



Obrázek 1: Struktura herbicidu 2,4-D (kyselina dichlorfenoxyoctová).

2.1.4 Rezistence a herbicidy

Rezistence obecně znamená odolnost nebo neúčinnost určitého organismu vůči něčemu, čemu dříve podléhal. V kontextu herbicidů, se rezistence na herbicidy týká schopnosti určitých druhů plevelů přežít a růst i přes aplikace herbicidů, které jsou navrženy k jejich hubení. Tato rezistence je často důsledkem genetických mutací v plevelných rostlinách a může se rozvíjet, když jsou herbicidy používány opakovaně a v dlouhodobém horizontu nebo naopak v nedostatečných dávkách. To vede k potřebě používat silnější nebo různé/jiné typy herbicidů k efektivnímu ovládnutí odolných plevelů (Ghazi a kol., 2023).

Rezistence rostlin na herbicidy může vzniknout různě, proto jejich mechanismus vzniku dělíme na několik druhů. Prvním z nich je mutace cílového místa (*target-site mutation*, TSR), to znamená, že rezistence vzniká změnami v místě, na které má herbicid působit. Rostliny v tomto případě mohou mutovat na úrovni enzymů, které jsou cílem herbicidů a stávají se tak rezistentními vůči jejich účinkům. Jelikož tedy mutují enzymy, dochází ke změně aminokyselin v primární struktuře enzymu, kam se herbicid za normálního stavu navazuje, a tím herbicid ztrácí své vazebné místo (Murphy a Tranel, 2019).

Dalším typem je rezistence k herbicidům mimo cílové místo (*non-target-site mutation*, NTSR), kdy dochází ke vzniku rezistence u plevele v důsledku změn v procesech, které ale nejsou přímým cílem herbicidu. Také se tento typ rezistence nazývá metabolicky založený typ. Může se například jednat o zvýšený metabolismus pomocí P450 monooxygenáz, který představuje stále vážnější hrozbu pro údržbu

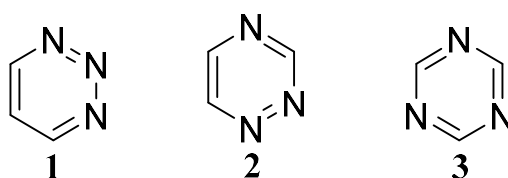
plevele, jelikož účinnost herbicidů působících na několik skupin může být tímto narušena (Jugulam a Shyam, 2019).

Třetí typ je nazývaný křížovou rezistencí (*cross-resistance*). Jedná se o rezistenci mezi různými herbicidy. Je charakteristický jediným odpovídajícím mechanismem, který může být buďto spojen s TSR, jako jsou mutace, anebo s NTSR, kdy souvisí se změněným metabolismem rostliny. Nejčastěji se jedná o zvýšený metabolismus rostliny, který ji umožňuje odolávat účinkům herbicidů různých skupin (Beckie a Tardif, 2012).

Posledním typem je rezistence vícečetná (*multiple-resistance*). Zde je v rostlině přítomna kombinace dvou anebo více mechanismů rezistence. Může to být rezistence na jeden typ herbicidu, ale i na více, které mají různé místo účinku (Jursík a kol., 2011).

2.1.4.1 Rezistence a její vývoj

Poprvé se herbicidy začaly používat na konci 40. let 20. století a přibližně dalších 20 let se neobjevovaly téměř žádné informace ohledně rezistence rostlin na jejich použití. Změna nastala v roce 1968, kdy byla objevena triazin-rezistentní rostlina, starček obecný (*Senecio vulgaris* L.). Od tohoto roku se postupně zvyšoval počet rezistentních rostlin na herbicidy, primárně na látku triazin (Obrázek 2) (Ryan, 1970; Shaner, 2014).



Obrázek 2: Struktura triazinu vyskytujícího se ve třech izomerech: 1,2,3-triazin (1), 1,2,4-triazin (2) a 1,3,5-triazin (3).

Důvodů vývoje rezistence na herbicidy v populacích plevelu je hned několik. Patří mezi ně například genetická variabilita plevelu, kdy mohou různé genetické mutace poskytnout jednotlivým rostlinám odolnost vůči herbicidům. Jako další je uveden selekční tlak herbicidů čili dlouhodobé a opakované používání stejného herbicidu, které zvyšuje pravděpodobnost vývoje odolného biotypu. S předešlým důvodem souvisí také nedostatečné obměňování herbicidů, kdy dochází k používání stejného druhu anebo skupiny herbicidů se stejným mechanismem účinku bez střídání s jinými přípravky. Dalším častým důvodem vývoje rezistence je nesprávná aplikace herbicidů. V tomto případě se herbicidy používají nedostatečně anebo nesprávně, což může způsobit přežití některých jedinců plevelu, k selekci odolných biotypů

a předání těchto odolných genů dalším generacím (Mikulka a Slavíková, 2008; Qu a kol., 2021).

2.1.4.1.1 Rezistence a její vývoj v ČR

Doposud bylo v České republice zaznamenáno 16 druhů plevelů, které jsou rezistentní vůči herbicidům. Většina těchto rezistentních plevelů byla objevena na půdě a stanovištích, která jsou intenzivně chemicky ošetřována. Jsou to například železnice anebo ovocné sady. Tyto druhy rezistentních plevelů (starček obecný, laskavec ohnutý, turanka kanadská, rdesno červivec a další) byly popsány už v 70. letech 20. století, jak již bylo zmíněno výše a jsou rezistentní vůči triazinovým herbicidům. Ve většině případů se jedná o rezistenci TSR (Chodová a kol., 2004; Jursík a kol., 2018).

Po roce 2000 se začaly postupně objevovat rezistentní polní plevely. Byly nalezeny rezistentní druhy vůči inhibitorům fotosystému II (PS II) v kukuřičných a řepových polích (Mikulka a Slavíková, 2008 a Jursík a kol., 2018). Jako další riziko představuje zvýšená spotřeba glyfosátů nejen na zemědělských půdách (Chodová a kol., 2009).

2.1.4.1.2 Prevence vůči rezistenci

Aby se rezistenci předcházelo, musí se důkladně dodržovat podmínky použití herbicidů. Primárně je nutné sledovat účinnost herbicidů na použitých plochách. V případě výskytu snížené účinnosti jinak účinného herbicidního přípravku na některý z plevelů, může se jednat o první projev vývoje herbicidní rezistence a je důležité ji zastavit ještě dříve, než se rozšíří do veškeré populace. Pokud se tento vývoj nezastaví včas, je možnost potlačení omezená a často také velmi nákladná (Qu a kol., 2021).

Nejčastějšími příčinami vzniku rezistence je opakované používání stejného herbicidu, minimální zpracování půdy a monokulturní způsob pěstování rostlin. Aby bylo možné rezistenci potvrdit, musí se změnit tři výše zmiňované příčiny. Účinné je tedy střídání plodin, zpracovávání půdy – mechanické odstranění plevelu a regulace plevelu v meziprostorech. Stěžejním opatřením je však používání odlišného herbicidu; důležité je podotknout, že to nesmí být provedeno opožděně. Pokud je použit herbicid z jiné skupiny než z té, na kterou si rostliny vyvinula rezistenci, pak je toto řešení účinné a jednoduché. Komplikace použití jiného přípravku může být křížová rezistence, ale ne vždy se vyvine rezistence na veškeré herbicidy se stejným mechanismem účinku (Jursík a kol., 2018).

2.1.5 Vývoj nových herbicidů

V roce 2019 tvořila tržní hodnota herbicidů přibližně 52 % celkového světového trhu s pesticidy. To znamená, že více než polovina tržeb z prodeje pesticidů pocházela právě z prodeje herbicidů (Qu a kol., 2021). Ačkoliv generace prvních herbicidů přinesly výhody pro zemědělství, měly také negativní dopady na životní prostředí a zdraví lidí kvůli jejich dlouhodobé přítomnosti v prostředí a nežádoucím toxickým účinkům mimo určený cíl. S rostoucím pochopením důležitosti ochrany zdraví a životního prostředí se stalo klíčovým, aby nově vyvíjené herbicidy splňovaly níže uvedené požadavky (Gianessi, 2013).

Seznam požadavků pro nově vyvíjené herbicidy (Jursík a kol., 2018):

- vysoká a rychlá účinnost při nízkém dávkování;
- vysoká selektivita k rostlině;
- bezpečnost a příznivost pro ekotoxikologii;
- přijatelnost chování v prostředí;
- cenová dostupnost.

Vývoj nových herbicidů je velmi náročný proces. Nejedná se pouze o velkou finanční zátěž, kdy je potřeba pro vývoj a zavedení nového herbicidu investice až 5 miliard korun. Dalším úskalím je i čas, od prvního objevení herbicidního účinku u nějaké chemické látky až po její uvedení na trh se jedná přibližně o 8 až 10 let. Patentová ochrana činí pouze 20 let, a proto není vždy možno očekávat návrat investice během 10-12 lety (Naylor a kol., 2002; Jursík a kol., 2018). V dnešní době jsou vyvíjeny hlavně herbicidy, které mají uplatnění u celosvětově významných plodin, jako je sója, pšenice, kukuřice a rýže.

Vývoj nových herbicidů také ale čelí dalším výzvám. Jednou z nich je právě rezistence plevelů, která byla popsána v kapitole *2.1.4 Rezistence a herbicidy*. V posledních letech bylo provedeno mnoho výzkumů týkajících se mechanismů rezistence na herbicidy, stejně jako souvisejících metod detekce a managementu. Několik přehledových studií poskytlo návrhy a myšlenky, jak bojovat proti rezistenci na herbicidy a dosáhnout udržitelného rozvoje v průmyslu herbicidů z více úhlového pohledu. Vývoj rezistentních plevelů však de facto předběhl vývoj nových herbicidních účinných látek v posledních 20 letech, což lze poznat i z toho, že se v tomto období dostalo pouze malé množství herbicidů s novými MÚ z laboratoří na veřejnost (Duke, 2012).

Identifikace nových MÚ je vzácná. První komerčně dostupný syntetický auxinový herbicid, 2,4-D, byl uveden na trh ve 40. letech a zahájil novou éru managementu plevelů v moderním zemědělství. Od té doby se výrazně rozšířily chemické technologie používané pro kontrolu plevelů a objevilo se mnoho nových herbicidů zaměřených na specifické proteiny. Tyto proteiny jsou zapojeny do procesů, jako je fotosyntéza, dělení a růst buněk a buněčný metabolismus. Cílově zaměřené herbicidy byly od poloviny 20. století neúčinnějším prostředkem pro management plevelů. Nicméně, s rozsáhlým výskytem plevelů odolných vůči herbicidům po celém světě (přibližně od 90. let) již vyvinuté cílově zaměřené herbicidy nedokázaly dostatečně pokrýt potřeby zemědělské produkce, a proto došlo k vývoji transgenních plodin a tím k historickému zvýšení bezpečnosti plodin zlepšením selektivity herbicidů. Nejznámějším příkladem je komerční využívání sójových bobů, kukuřice a bavlny odolných vůči glyfosátu od roku 1996. Tyto transgenní plodiny poskytly jednoduchý a stabilní systém managementu plevelů, který byl rychle přijat na západní polokouli a je zde široce používán (Qu a kol., 2021).

Bioherbicidy nejsou nejnovějším typem herbicidů, první se objevily již v 70. letech 20. století, ale až v této době se stávají preferovanějšími. Bioherbicidy představují různé mikroorganismy, a dále se může jednat o různé fytoxiny produkované mikroorganismy, hmyzem anebo rostlinami. Jsou to tedy přírodní produkty, které lze použít ke kontrole a ovládnutí plevelů. Tyto látky jsou společností považovány za „zelenější“, ale samy o sobě mají také nevýhody a nejsou naprosto nezávadné. V každém případě jsou ale šetrnějšími látkami než syntetické herbicidy a nepovažují se za environmentální riziko. Aby bylo ale možno říct, že jsou bioherbicidy efektivní náhradou těch syntetických, musí být provedeny další studie (Hasan a kol., 2021).

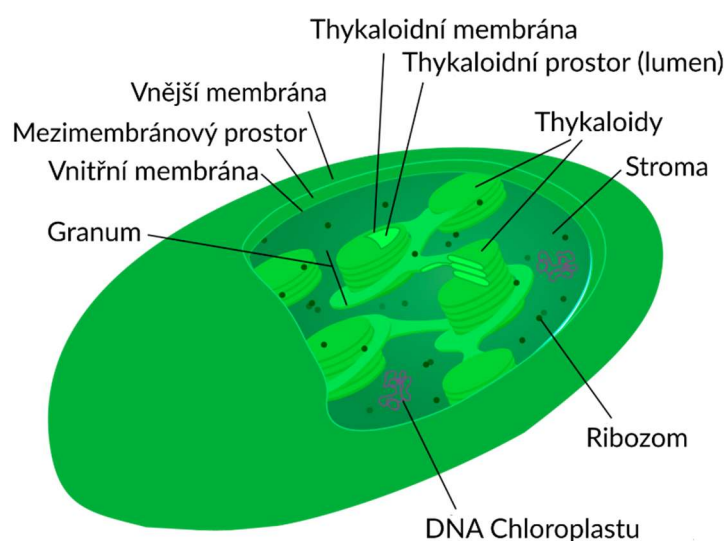
2.2 Chloroplasty a elektrontransportní řetězec

2.2.1 Chloroplasty

Chloroplasty se řadí mezi plastidy. Jsou to semiautonomní organely, které se nachází v buňkách všech autotrofních eukaryot, konkrétně v rostlinách jsou přítomny téměř ve všech buňkách. Plastidová semiautonomita je charakteristická tím, že jsou částečně samostatné od zbytku buňky. Mají svou vlastní DNA, která však kóduje pouze některé proteiny potřebné k jejich funkci. Obsahují dvě membrány, vnitřní a vnější, stroma a thylakoidy. Plastidy se dělí na pigmentované (chloroplasty a chromoplasty) a nepigmentované (leukoplasty) (Taiz a kol., 2018).

Jak již bylo zmíněno výše, chloroplasty jsou semiautonorní organely v buňkách rostlin a řas. Jsou klíčovými komponenty pro proces fotosyntézy. Chloroplasty jsou okolo 3-10 μm dlouhé, 1-3 μm široké a mají tvar elipsoidu. Z vnějšku jsou ohraničeny vnější permeabilní membránou, která propouští ionty a molekuly do velikosti 10 kDa. Uvnitř se nachází vnitřní téměř nepropustná membrána obsahující transportní proteiny, ta obklopuje systém nazývaný se stroma. Zde se vyskytuje velké množství enzymů a chloroplastová DNA, RNA, ribozomy, škrob a další struktury (Jones a kol., 2013; Taiz a kol., 2018).

Vnitřní membrána invaginuje a vytváří vnitřní membránový thylakoidní systém. Thylakoidy, základní strukturní jednotky chloroplastů, jsou ploché váčky. Mohou být uspořádány do „stohů“ jmenující se grana. V granech se nachází molekulární komplex pigmentů, jako je například chlorofyl, a ten zachycuje a využívá světelnou energii. Probíhá zde tedy světelná fáze fotosyntézy, kde se přeměňuje světelná energie na chemickou. Vnitřní prostor thylakoidů tvoří lumen (Obrázek 3) (Jones a kol., 2013).



Obrázek 3: Stavba chloroplastu. (Převzato z: KhanAcademy.)

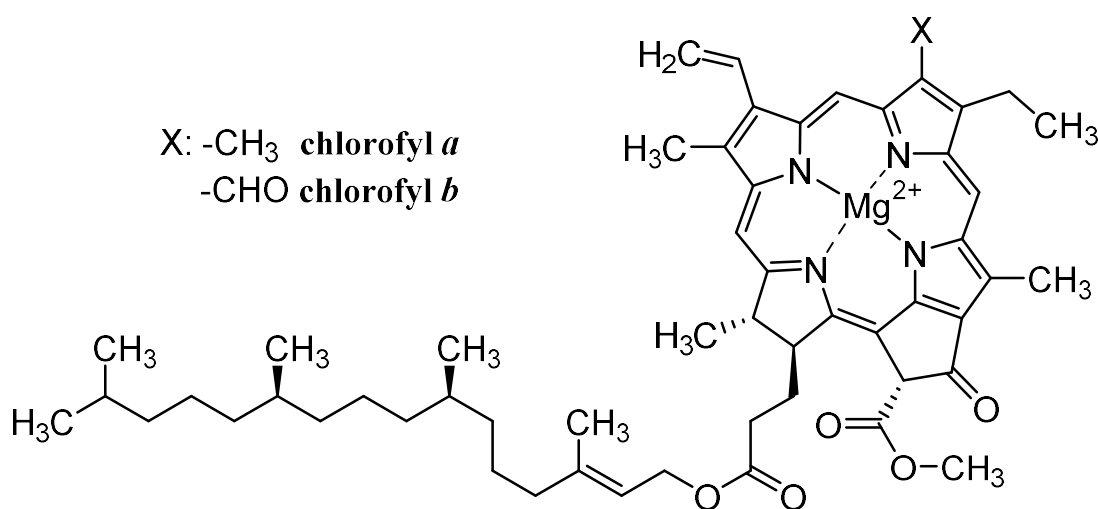
2.2.2 Fotosyntetické pigmenty

2.2.2.1 Chlorofyly

Chlorofyl patří mezi fotosyntetická barviva a je zelené barvy. Je obsažen v zelených rostlinách, sinicích a také některých řasách. Nachází se v chloroplastech a je navázán na proteinech na membráně thylakoidů ještě s dalšími pigmenty, které jsou fotosynteticky aktivní. Struktura chlorofylu je složena ze čtyř pyrolových jader, které se spojují do plochého prstence, porfyriu. Jednotlivá pyrolová jádra jsou mezi sebou

spojena methionovými skupinami (-CH=). V centru tetrapyrolového prstence se nachází atom hořčíku, konkrétně ve formě hořečnatého kationtu (Mg^{2+}), a je stěžejní pro absorpci světla chlorofylem a účasti ve fotosyntetických procesech. Existuje několik typů chlorofylů (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*), každý z nich má svou unikátní chemickou strukturu, a tím se také liší jejich absorpční vlastnosti (Jones a kol., 2013).

Chlorofyl *a* je nejčastější typ, nacházející se ve všech fotosynteticky aktivních organismech, absorbuje hlavně v modré a červené oblasti světelného spektra. Na pozici 3. uhlíku pyrolového kruhu má navázanou methylovou skupinu (-CH₃) (Obrázek 4). Chlorofyl *b* je přítomen hlavně v zelených řasách a rostlinách, absorbuje světlo zejména v modré a zelené oblasti spektra a tím se stává doplňkovým pigmentem (Obrázek 4). Na pozici 3. uhlíku je navázaná aldehydová skupina (-CHO) (Taiz a kol., 2018).



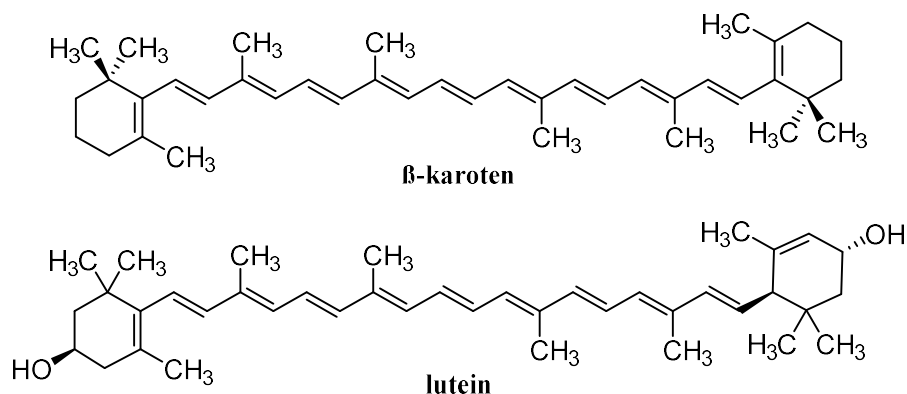
Obrázek 4: Struktura chlorofylu *a* a *b*.

2.2.2.2 Karotenoidy

Mezi doplňkové fotosyntetické pigmenty se řadí karotenoidy. Jedná se o přírodní barviva vyskytující se v rostlinách, řasách, houbách ale také v živočiších. Jsou zodpovědná za žlutou, oranžovou, červenou anebo také fialovou barvu. Dělí se na karoteny a xantofyly. V rostlinách jsou nejčastěji navázány na thylakoidní membráně jako chloroplasty, také se můžou v rostlinách vyskytovat v nevázaných formách v chromoplastech. Světelnou energii, kterou karotenoidy absorbují, přenášejí na chloroplasty pro další potřebu k fotosyntéze. V poměru s chlorofyly se vyskytují v rostlinách v nižším počtu, asi 1:5 (Taiz a kol., 2018).

Z hlediska chemické struktury se jedná o tetraterpenoidní molekuly, které jsou složeny z 8 pětiuhlíkatých zbytků isoprenu. Základem je tedy skelet o 40 uhlíkových

atomech, který je lineární a obsahuje několik konjugovaných dvojných vazeb (Armstrong a Hearst, 1996). Nejvíce se v zelených částech rostlin vyskytují dva karotenoidy, a to β -karoten a lutein (Obrázek 5).

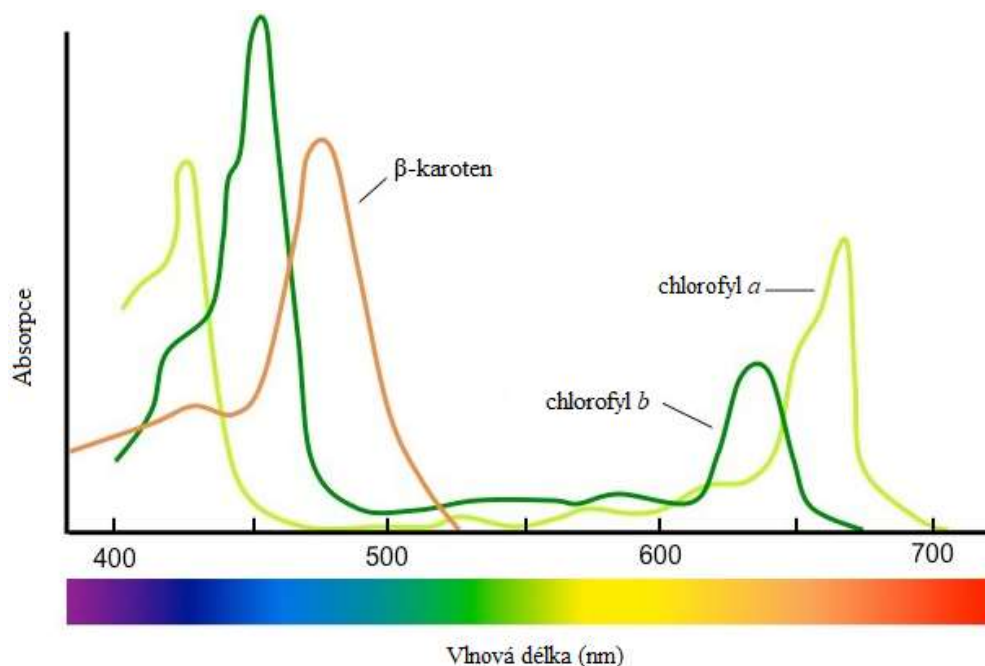


Obrázek 5: Struktura β -karotenu a luteinu.

2.2.2.3 Fotosyntetické pigmenty v zapojení do elektrontransportního řetězce

Chlorofyly a karotenoidy jsou fotosynteticky významné pigmenty, jejich zapojení do elektrontransportního řetězce během fotosyntézy je základním procesem, díky kterému dokáží rostliny a řasy přeměnit světelnou energii na tu chemickou. Nejzásadnějším pigmentem je chlorofyl *a*, na který je přenášena světelná energie z chlorofylu *b* a z karotenoidů. Veškeré pigmenty se nachází na thylakoidní membráně. Karotenoidy mají také význam v ochraně organismu před poškozením způsobeným právě světlem, kdy mohou vznikat kyslíkové radikály a poškozovat jednotlivé systémy fotosyntézy (Garret a Grisham, 2008; Taiz a kol., 2018).

Absorpční spektra chlorofylu se nachází v modré oblasti pásu 350–450 nm a poté se vyznačuje dvěma pásy v oblasti červené, a to okolo 660 nm. Jak již bylo zmíněno výše, karotenoidy jsou zbarveny do žluta až červena, a proto je pro ně typická spektrální oblasti 400–500 nm (Obrázek 6). Rostliny obsahují dva fotosystémy. Rozlišují se dle absorbovaného světelného záření na fotosystém I (PS I) a fotosystém II (PSII). PS I absorbuje světelné záření hlavně v daleké červené oblasti, o vlnové délce větší než 680 nm, kdežto PS II absorbuje záření o vlnové délce 680 nm (Garret a Grisham, 2008; Taiz a kol., 2018).

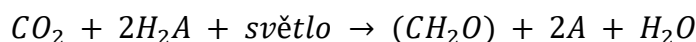


Obrázek 6: Absorpční spektrum chlorofylu *a*, *b* a β -karotenu. (Upraveno dle: BYJU'S.)

2.2.3 Fotosyntéza

Fotosyntéza je složitý biochemický proces, při kterém se mění energie pocházejícího ze světelného záření na energii chemickou. Tento proces probíhá v zelených částech rostlin, konkrétně v chloroplastech, které jsou popsány výše, viz kapitola 3.1.1, a má zásadní význam pro život na Zemi.

Fotosyntéza je tedy redoxní proces s vodou jako donorem elektronů a CO_2 jako akceptorem elektronů. Pomocí světelné energie redukuje CO_2 na karbohydráty s empirickým vzorcem $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Celý proces je možno shrnout do velmi zjednodušené rovnice, kde je donor elektronu označen obecně H_2A (Jones a kol., 2013):



Děje fotosyntézy jsou rozděleny na dvě části – primární (světelnou) a sekundární (temnostní). Světelná fáze fotosyntézy, probíhající v membránách thylakoidů chloroplastů, je závislá na světle a zahrnuje několik klíčových procesů. Nejprve fotosyntetické pigmenty absorbují světelnou energii, což vede k excitaci elektronů. Tyto excitované elektrony jsou přeneseny přes řadu přenašečů elektronů (fotofosforylační řetězec), přičemž je vytvářena chemická energie ve formě ATP (adenosin trifosfát) a redukční síla v podobě NADPH (nikotinamidadenin dinukleotidfosfát). Souběžně probíhá fotolytické štěpení vody, při kterém se uvolňují elektrony, protony (H^+) a kyslík (O_2). Uvolněný kyslík je vypouštěn do atmosféry, zatímco ATP a NADPH jsou využity

v následující temnostní fázi fotosyntézy. Světelná fáze je tedy nezbytným prvním krokem fotosyntetického procesu, který umožňuje přeměnu světelné energie na chemickou energii uchovatelnou v organických molekulách. Proces je detailněji popsán v následující kapitole – 2.2.4 (Buchanan a kol., 2015).

Sekundární, temnostní fáze fotosyntézy, známá také jako Calvinův cyklus, probíhá ve stromatu chloroplastů a je nezávislá na světle. V této fázi je atmosférický CO₂ vázán na cukr ribulóza-1,5-bisfosfát a přeměněn na 3-fosfoglycerát, který je následně redukován na glyceraldehyd-3-fosfát. Tento produkt je použit pro syntézu glukózy a jiných sacharidů, zatímco část slouží k obnově ribulóza-1,5-bisfosfátu pro další cyklus (Buchanan a kol., 2015).

2.2.4 Elektrontransportní řetězec

PS II je komplexní a zásadní součástí procesu fotosyntézy, který se odehrává v tylakoidních membránách chloroplastů rostlin, řas a některých typů bakterií. Tento proces je klíčový pro přeměnu světelné energie na chemickou energii, která napomáhá v produkci organických molekul z anorganických substrátů. PS II hraje zásadní roli v prvních krocích fotosyntetického elektronového transportního řetězce tím, že zahajuje sérii reakcí, jež vedou k vytvoření ATP a NADPH (Jones a kol., 2013, Buchanan a kol., 2015, Taiz a kol., 2018).

Jádro PS II tvoří dimer komplexů proteinů obsahujících pigmenty, jako jsou chlorofyl a karotenoidy, které jsou zodpovědné za absorpci světelné energie. Když foton světla dopadne na pigmentový systém v PS II, energie tohoto fotonu je přijata a předána mezi pigmenty až do speciálního páru chlorofylů známých jako P680, což je místo primární fotochemické reakce v PS II. Excitace P680 způsobí to, že jeho elektrony dosáhnou vyššího energetického stavu, čímž se stanou dostatečně reaktivními na to, aby byly předány feofytinu, prvnímu akceptoru elektronů v řetězci. Ztráta elektronů z P680 je kompenzována prostřednictvím procesu známého jako fotolýza vody, který se odehrává na straně PS II obrácené k lumen tylakoidů. Enzym zvaný kyslík-vyvíjející komplex, umístěný v bezprostřední blízkosti P680, katalyzuje rozštěpení molekul vody na elektrony, protony a kyslík. Elektrony uvolněné z vody jsou pak předány zpět do P680, díky čemuž se obnovuje jeho schopnost absorbovat světelnou energii a pokračovat v transportu elektronů (Jones a kol., 2013, Buchanan a kol., 2015, Taiz a kol., 2018).

Po přijetí elektronů z P680, feofytin předává elektrony na plastochinon A a následně na plastochinon B. Tento proces zahrnuje dvoustupňovou redukci, při které jsou elektrony předány postupně, což umožňuje plastochinonu B vázat dva elektrony před jeho migrací z aktivního místa. Když je plastochinon B (PQ2) plně redukován, migruje z PS II do lipidové dvouvrstvy tylakoidní membrány, kde se setkává s cytochromem *b₆f*, což je další klíčový komponent tohoto řetězce (Jones a kol., 2013, Buchanan a kol., 2015, Taiz a kol., 2018).

Cytochrom *b₆f* funguje jako prostředník, který je schopen přijímat elektrony z PQ2 a předávat je na další molekulu, plastocyanin. Tento proces je současně spojen s transportem protonů přes tylakoidní membránu, což vytváří protonový gradient, který je následně využit ATP-syntázou k produkci ATP. V tomto kontextu PS II nejenže zahajuje transport elektronů, ale také přispívá k vytváření protonového gradientu nezbytného pro syntézu ATP (Jones a kol., 2013, Buchanan a kol., 2015, Taiz a kol., 2018).

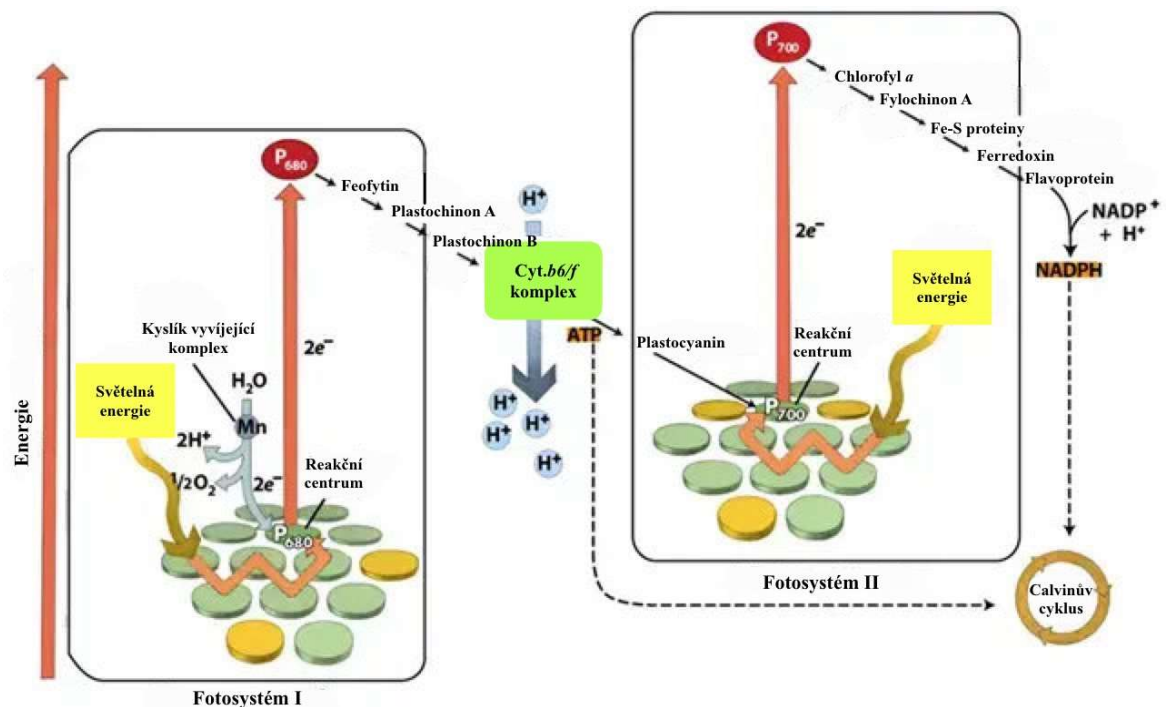
PS I je základním komponentem světelných reakcí fotosyntézy, který hraje klíčovou roli v přenosu elektronů směrem k produkci NADPH, jedné z hlavních molekul využívaných v Calvinově cyklu pro syntézu organických sloučenin. PS I je komplexní struktura skládající se z mnoha proteinů a pigmentů, včetně chlorofylu a karotenoidů, které společně umožňují efektivní absorpci světelné energie a její přeměnu na chemickou energii (Jones a kol., 2013, Buchanan a kol., 2015, Taiz a kol., 2018).

Elektronový transport v rámci PS I začíná absorpcí světelné energie pigmenty nacházejícími se v anténovém komplexu. Tato energie je následně přenášena směrem k reakčnímu centru PS I, známému jako P700 z důvodu jeho absorpčního maxima při 700 nm. P700 se skládá z dvou molekul chlorofylu *a*, které při absorpci fotonu světla přecházejí do excitovaného stavu, což vede k jejich schopnosti předat elektron na další molekulu v elektronovém transportním řetězci (Jones a kol., 2013, Buchanan a kol., 2015, Taiz a kol., 2018).

Po excitaci P700 se elektrony přesouvají na primární akceptor elektronů, kterým je chlorofyl nazývaný *A₀*. Následně jsou elektrony předávány na další molekulu, fylochinon *A₁*, a poté pokračují přes řadu Fe-S proteinů, známých jako *F_X*, *F_A* a *F_B*. Tyto proteiny fungují jako transportní molekuly pro elektrony a směřují k poslednímu akceptoru v řetězci, molekule ferredoxinu (*F_d*), což je rozpustný protein nacházející se na stromální straně tylakoidní membrány (Jones a kol., 2013, Buchanan a kol., 2015, Taiz a kol., 2018).

Ferredoxin je klíčovým proteinem v procesu přenosu elektronů v PS I, protože slouží jako významný donor elektronů pro ferredoxin-NADP⁺ reduktázu (FNR). To je enzym odpovědný za redukci NADP⁺ na NADPH. Tento krok je zásadní pro další využití NADPH v Calvinově cyklu, kde slouží jako redukční činidlo pro přeměnu CO₂ na glukózu a další organické sloučeniny (Jones a kol., 2013, Buchanan a kol., 2015, Taiz a kol., 2018). Cesta přenosu elektronu mezi PS I a PS II je znázorněna na Obrázku 7.

PS I tedy nejenže efektivně přeměňuje světelnou energii na chemickou energii, ale také zajišťuje, že elektrony, které byly získány z hydrolyzy vody v PS II jsou předány na NADP⁺, a tím se tvoří NADPH. Tento proces, společně s ATP vyrobeným v důsledku protonového gradientu vytvořeného během transportu elektronů, poskytuje základní energetické molekuly potřebné pro Calvinův cyklus a syntézu organických molekul (Jones a kol., 2013, Buchanan a kol., 2015, Taiz a kol., 2018).



Obrázek 7: Schéma přenosu elektronů mezi fotosystémem I a fotosystémem II. (Upraveno dle: MajorDifferences.)

2.2.5 Inhibitory elektrontransportního řetězce

2.2.5.1 Inhibitory fotosystému II

Herbicidy, které cílí na PS II, blokují přenos elektronů přes membránu thylakoidů v chloroplastech, čímž zabraňují přenosu elektronů uvolněných při fotolýze vody prostřednictvím plastochinonu Q_B. Tím se akumulují volné elektrony, jejichž energie

je pohlcena chlorofylem a karotenoidy, což vede k jejich fotooxidaci a následně k poškození rostliny v důsledku tvorby kyslíkových radikálů, které poškozují membrány buněk, způsobují únik buněčného obsahu, a nakonec odumření tkání. Blokování fotosyntézy tedy poškozuje rostliny, i když ne hladověním. Kvůli mutacím v genech kódujících proteiny PS II dochází k výskytu rezistence u některých druhů plevelů vůči těmto herbicidům (Jursík a kol., 2018).

Herbicide zaměřené na PS II ovlivňují tento proces tím, že se vážou na konkrétní protein thylakoidní membrány, přičemž se rozlišují tři typy vazebných míst. Plevely rezistentní na herbicid vázající se na místo A mohou být ovlivněny herbicidy cílenými na místa B nebo C, i když všechny působí na stejný enzym. Existuje mnoho účinných látek inhibujících PS II, které patří do různých chemických skupin. Tyto látky lze dále rozdělit podle způsobu aplikace a chování v prostředí na herbicide aplikované přes půdu a herbicide, které jsou přijímány hlavně listy (Jursík a kol., 2018).

2.2.5.1.1 Inhibitory fotosystému II působící přes půdu

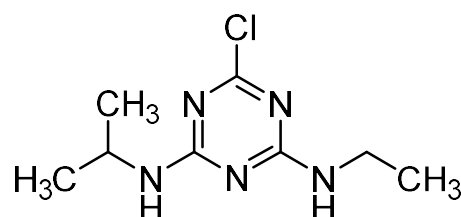
Mezi inhibitory PS II, které působí přes půdu, jsou řazeny triaziny, triazinony, uracily, substituované močoviny a také pyridazinony. Tyto herbicide se používají primárně preemergentně, čili jsou aplikovány přímo do půdy. Proto jsou převážně tyto látky rostlinami přijímány kořeny, avšak rostliny jsou schopny je přijímat i listy. Jelikož jsou používány preemergentně, účinkují hlavně na klíčící plevely anebo na rostliny v počátečních fázích růstu. Tyto látky jsou v rostlinách transportovány prostřednictvím xylému do těch nejmladších rostlinných částí. Inhibitory PS II zasahují rostliny až po tom, co vzejdou, a to je fáze, kdy se začínají živit autotrofně. Projevy poškození rostlin těmito herbicidy se projevují až ve chvíli, kdy rostliny asimilují. Nejprve se objevují na nejstarších listech chlorózy a nekrózy a postupně se dostávají k růstovému vrcholu. Nastává zde poškození buněčných membrán, a tím dochází k vysychání pletiv ošetřených rostlin (Jursík a kol., 2018).

Problémem při používání těchto herbicidů je jejich dlouhodobá perzistence v půdě. Půdní mikroorganismy sice velmi pomalu degradují tyto látky, avšak dostávají se i do podzemních vod a kontaminují ji. Postupně jsou inhibitory PS II vyřazovány a nahrazovány jinými látkami, např. triaziny a substituované močoviny jsou vyřazovány ze seznamu v ČR registrovaných přípravků, neboť zůstávají dlouhodobě v půdě. Přípravky s obsahem triazinonů, uracilů anebo pyridazinonů jsou sice ekologicky

šetrnější, ale do budoucna se plánuje jejich používání také omezit a vyškrtnout ze seznamu registrovaných přípravků (Jursík a kol., 2018).

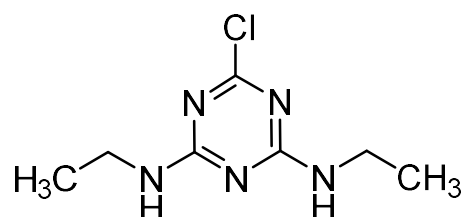
Nejstarší a nejznámější zástupce inhibitorů PS II je skupina triazinů. Jsou to herbicidy používané proti dvouděložným plevelům; pokud jsou používány ve vysokých dávkách, stávají se z nich herbicidy totální. Tyto látky jsou schopny zasahovat do metabolismu pyrimidinových bází, které jsou důležitou součástí nukleových kyselin (Sass a Colangelo, 2006).

Atrazin patří mezi triaziny už není v EU a tím pádem ani v ČR používán, a to od roku 2004, kdy byl vyřazen ze seznamu registrovaných přípravků (Evropská komise, 2004). Jedná se o chlorovaný herbicid (Obrázek 8). Byl zakázán z důvodu ohrožování životního prostředí. Působí toxicky na endokrinní systém některých obojživelníků; pro člověka je přímá toxicita minimální. Může způsobovat podráždění očí a kůže, také nevolnosti a zvracení. Je ale klasifikován dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny jako možný lidský karcinogen. U ostatních zvířat působí neurotoxicky a hepatotoxicky. V USA a různých dalších státech je však použití atrazinu stále povoleno (Sass a Colangelo, 2006).



Obrázek 8: Struktura atrazinu.

Mezi další nejznámější zástupce triazinů patří také simazin (Obrázek 9). Jedná se o selektivní herbicid, který byl v minulosti používán k hubení plevelů a řas rostoucích pod vodou. V současnosti je v EU zakázán stejně jako výše zmíněný atrazin, avšak stále velmi často používán v USA a Austrálii. Je pravděpodobně toxický na stejné úrovni jako atrazin. Po použití zůstává v půdě až jeden rok (Grasselli a kol., 2018).

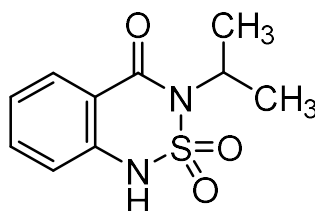


Obrázek 9: Struktura simazinu.

2.2.5.1.2 Inhibitory fotosystému II působící přes listy

Inhibitory PS II působící přes listy jsou benzodiathiazoly, nitrily, fenyropyridaziny a také fenyلكarbaniláty. Tyto herbicidy jsou řazeny mezi kontaktní a na rozdíl od inhibitorů PS II působících přes půdu, nejsou transportovány v rostlinách cévními svazky. Pro úspěšnou herbicidní účinnost je potřeba zasáhnout celý povrch nadzemní části nežádané rostliny. Několik dní po úspěšné aplikaci se na listech tvoří postupně chlorózy a od okrajů postupně nekrotizují, dochází zde k porušení buněčných stěn. Tyto herbicidy nemají dlouhou perzistenci v půdě, a navíc jsou zde metabolizovány bakteriemi (Jursík a kol., 2018).

Mezi nejznámější zástupce tohoto typu herbicidů patří bentazon (Obrázek 10). Účinkuje na široké spektrum plevelů. Umožňuje vyšší tvorbu volných radikálů a vede tak k poškození buněčných membrán a k následnému odumření.



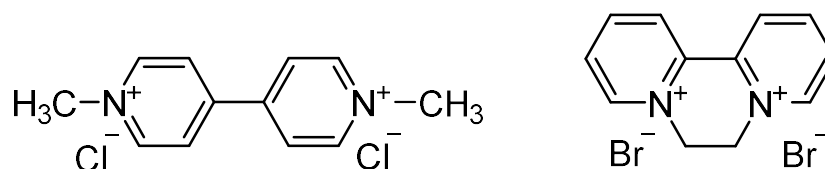
Obrázek 10: Struktura bentazonu.

2.2.5.2 Inhibitory fotosystému I

Herbicidy, jejichž cílem je PS I, jsou bipyridylové dvojmocné kationty, které jsou schopné zachytit volné elektrony cestující elektrontransportním řetězcem, a tím vytvářející volné radikály. Tyto radikály sice samy o sobě pro rostlinu toxické nejsou, ale nebezpečná je jejich nestabilita, a v přítomnosti kyslíku a vody může dojít k jejich autooxidaci. Autooxidace vede k redukci kyslíku na superoxidový iont, a z tohoto je ihned vytvořen peroxid vodíku. Takto vzniklé superoxidové ionty reagující s peroxidem vodíku dávají vznik nestabilním hydroxylovým radikálům. Ty pak poškozují buněčné membrány s mastnými kyselinami – nastává peroxidace lipidů. Tento proces narušuje membrány a způsobuje únik obsahu buněk do extracelulárního prostoru (Jursík a kol., 2018).

Paraquat a diquat jsou bipyridylové dvojmocné kationty, jsou neselektivními herbicidy a jsou aplikovány těsně před sklizní plodů (Obrázek 11). Nejefektivnější jsou při použití v podvečer, když není světlo. Jsou také v rostlinách špatně transportovány, takže je potřeba dokonale rostlinu zasáhnout na celém povrchu. V případě těchto

herbicidů nejsou zasaženy podzemní části rostlin, takže vytrvalejší plevely jsou schopny snadné regenerace. Účinek se dostavuje velice rychle po aplikaci, již za 1-2 hodiny lze vidět poškození zasažených pletiv – praskání buněčných membrán, hnědnutí rostliny a následné uschnutí. Tyto látky mají negativní účinek také na okolní citlivé rostliny. Po absorpci půdou jsou rychle degradovány půdními mikroorganismy (Kervégant a kol., 2013; Hawkes, 2014).



Obrázek 11: Struktury paraquat-dichloridu a diquat-dibromidu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimenty byly prováděny na Biochemickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a molekuly byly připraveny pracovníky RCPTM PŘF UPOL (J. Jampílek, J.Kos, T. Strhársky) mezi lety 2019-2021.

3.1 Rostlinný materiál

Pro experimentální část této diplomové práce byly použity listy rostliny špenátu setého (*Spinacia oleracea* L.).

3.2 Materiál a metodika

3.2.1 Seznam použitých chemikálií

- 100% aceton
- 2,6-Dichlorfenol-indofenol (DCPIP, Sigma-Aldrich)
- 3-(3,4-Dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea (diuron, DCMU, Sigma-Aldrich)
- 70% a 96% ethanol (EtOH)
- Deionizovaná voda
- Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich)
- Chlorid sodný (NaCl, Riedel-de Haën)
- Magnesium chloride hexahydrate (Sigma-Aldrich)
- Sacharóza (Lach-Ner, Česká republika)
- Trizma base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Sigma-Aldrich)
- (2*E*)-*N*-Fenyl-3-(4-chlorfenyl)prop-2-enamid (**1a**)
- (2*E*)-*N*-(2-Fluorfenyl)-3-(4-chlorfenyl)prop-2-enamid (**1b**)
- (2*E*)-*N*-(3-Fluorfenyl)-3-(4-chlorfenyl)prop-2-enamid (**1c**)
- (2*E*)-*N*-(4-Fluorfenyl)-3-(4-chlorfenyl)prop-2-enamid (**1d**)
- (2*E*)-*N*-(3-Chlorfenyl)-3-(4-chlorfenyl)prop-2-enamid (**1e**)
- (2*E*)-*N*,3-*bis*(4-Chlorfenyl)prop-2-enamid (**1f**)
- (2*E*)-3-(4-Chlorfenyl)-*N*-[3-(trifluormethyl)fenyl]prop-2-enamid (**1g**)
- (2*E*)-3-(4-Chlorfenyl)-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]prop-2-enamid (**1h**)
- (2*E*)-*N*-(2,4-Difluorfenyl)-3-(4-chlorfenyl)prop-2-enamid (**1ch**)
- (2*E*)-*N*-(2,5-Difluorfenyl)-3-(4-chlorfenyl)prop-2-enamid (**1i**)
- (2*E*)-*N*-(2,6-Difluorfenyl)-3-(4-chlorfenyl)prop-2-enamid (**1j**)
- (2*E*)-*N*-(3,5-difluorfenyl)-3-(4-chlorfenyl)prop-2-enamid (**1k**)

- (2E)-N-(2,4-Dichlorfenyl)-3-(4-chlorfenyl)prop-2-enamid (**1l**)
- (2E)-N-(3,5-Dichlorfenyl)-3-(4-chlorfenyl)prop-2-enamid (**1m**)
- fenyl (2E)-3-(3,4,5-Trimethoxyfenyl)prop-2-enoát (**2a**)
- 4-Methoxyfenyl (2E)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoát (**2b**)
- 4-Methylfenyl (2E)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoát (**2c**)
- 4-Fluorfenyl (2E)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoát (**2d**)
- 4-Bromfenyl (2E)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoát (**2e**)
- 2-Fluorfenyl (2E)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoát (**2f**)
- 2-Chlorfenyl (2E)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoát (**2g**)
- 2,6-Dimethoxyfenyl (2E)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoát (**2h**)
- 5-Methyl-2-(propan-2-yl)fenyl (2E)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoát (**2ch**)
- Benzyl (2E)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoát (**2i**)
- 3-[(1E)-3-Methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl]fenyl adamantan-1-karboxylát (**3a**)
- 3-[(1E)-3-Ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl]fenyl adamantan-1-karboxylát (**3b**)
- 3-[(1E)-3-Oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl]fenyl adamantan-1-karboxylát (**3c**)
- 4-[(1E)-3-Ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl]fenyl adamantan-1-karboxylát (**3d**)
- 4-[(1E)-3-Oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl]fenyl adamantan-1-karboxylát (**3e**)
- 2-Methoxy-4-[(1E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl]fenyl adamantan-1-karboxylát (**3f**)
- 4-[(1E)-3-Ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl]-2-methoxyfenyl adamantan-1-karboxylát (**3g**)
- 4-[(1E)-2-Kyano-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl]fenyl adamantan-1-karboxylát (**3h**)
- 4-[(1E)-2-Kyano-3-oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl]fenyl adamantan-1-karboxylát (**3ch**)

3.2.2 Seznam použitých přístrojů

- Analytické váhy
- Halogenová žárovka (~100 W/m²;250 W)
- Kyvety (1 cm, křemenné)
- Lednice
- Magnetická míchačka
- pH metr
- Předvážky
- Spektrofotometr (Genesys 6, Thermo Scientific)

3.2.3 Příprava chloroplastů

3.2.3.1 Příprava izolačního pufru

Pro izolaci chloroplastů byl připraven izolační pufr. Na 1 litr tohoto pufru bylo použito 2,43 g látky TRIS (2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol); 4,1 g hexahydrátu chloridu horečnatého; 0,87 g chloridu sodného a také 136,9 g sacharózy. To vše bylo rozpuštěno a promícháno pomocí magnetické míchačky. Pomocí pH metru a 36% kyseliny chlorovodíkové bylo upraveno pH na hodnotu 7,2. Takto připravený roztok byl uchováván v lednici.

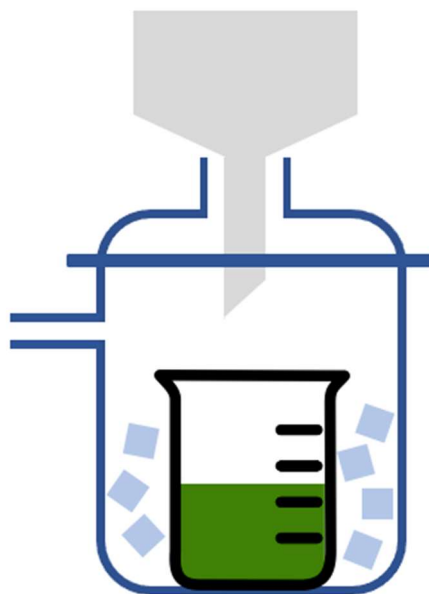
3.2.3.2 Izolace chloroplastů

Izolace chloroplastů z rostliny špenátu setého byla provedena dle metody Masarovičová a Kráľová (2005). Veškeré následující kroky byly prováděny za konstantního chlazení. Pro izolaci bylo použito výše popsané izolační médium – TRIS pufr o pH 7,2. Listy špenátu byly rozdrceny a smíchány s izolačním TRIS médiem a přefiltrovány za sníženého tlaku. Filtrační aparaturu použitou k izolaci chloroplastů, která se skládala z Büchnerovy nálevky s přidanou filtrační přepážkou z vrstev nylonové tkaniny pokrytých rovnoměrně navlhčenou vrstvou vaty a odsávací baňky, ve které byla vložena malá kádinka jako sběrná nádoba na chloroplasty, lze vidět na Obrázku 12. Prostor mezi stěnami odsávací baňky a kádinky byl vyplněn ledem.

Zachycené chloroplasty při filtraci byly odděleny za použití centrifugy:

1. 5 minut, 50 RCF, s následným oddělením sedimentu s hrubými nečistotami od supernatantu s chloroplasty;
2. 20 minut, 5000 RCF, s následným odlitím supernatantu a oddělením sedimentovaných chloroplastů.

Takto izolované chloroplasty byly naředěny izolačním médiem pro lepší manipulaci s pipetou, V době nečinnosti byly izolované chloroplasty uchovávány v chladu a ve tmě.



Obrázek 12: Filtrační aparatura.

3.2.3.3 Stanovení chlorofylu v chloroplastech

Do 10ml odměrné baňky bylo napipetováno 50 μ l suspenze chloroplastů a doplněno 80% roztokem acetonu. Takto připravený roztok byl přefiltrován a následně použit jako vzorek pro měření absorbance spektrofotometrem při vlnové délce 652 nm (A_{652}). Množství chlorofylu ve vzorku bylo vypočítáno ze vztahu:

$$n = 5,8 \times A_{652}$$

Zjištěné množství chlorofylu bylo využito k výpočtu objemu izolovaných chloroplastů, které bylo potřebné pro přípravu základní suspenze chloroplastů v izolačním médiu TRIS (dále jen základní suspenze). Základní suspenze byla používána k přípravě roztoků v následujících spektrofotometrických měřeních. Pro výpočet výsledného objemu chloroplastů, které byly zředěny 10 ml izolačního média TRIS byl využit následující vztah:

$$V = \frac{300}{1,6 \times n} \mu\text{l} / 10 \text{ ml}$$

3.2.4 Stanovení inhibice elektronového transportu v chloroplastech

3.2.4.1 Stanovení chloroplastové aktivity

Aby bylo možné zjistit inhibiční koncentraci IC_{50} jednotlivých testovaných látek, musela být nejdříve zjištěna aktivita chloroplastů bez přidané látky, který by způsobila inhibici fotosyntetického elektronového transportu (Tabulka 2). Inhibiční koncentrace

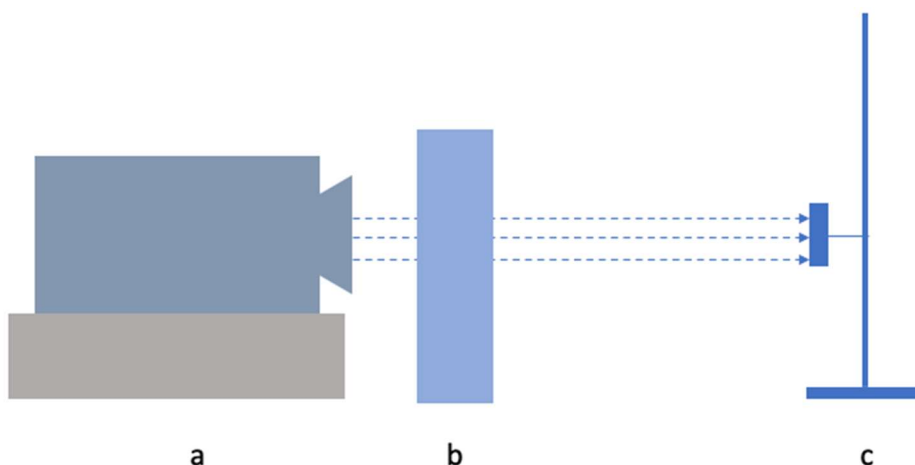
IC₅₀ látky způsobuje pokles aktivity chloroplastů přesně o polovinu a je mírou jejich herbicidní aktivity.

Roztok barviva 2,6-dichlorfenol-indolfenol (DCPIP) o koncentraci 40 μmol/l byl použit jako elektronakceptor. Pokles absorbance DCPIP je mírou elektronového transportu (Kráľová a kol. 1992; Kráľová a kol 1999). Aktivita chloroplastů byla vyhodnocena spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm se složením roztoků:

Tabulka 2: Roztoky pro stanovení aktivity chloroplastů.

<i>Vzorek</i>	<i>Referenční vzorek (blank)</i>	<i>Vzorek s barvivem</i>
Základní suspenze [μl]	1800	1800
TRIS pufr [μl]	200	100
DCPIP [μl]	-	100

Nejprve byla změřena absorbance referenčního vzorku a následně vzorku s DCPIP, který byl nadále ozařován halogenovou žárovkou (250 W) ze vzdálenosti 10 cm s 4 cm vodní bariérou pro ochranu před zahřátím vzorku po dobu 30 vteřin (Obrázek 13). Následně byla opět změřena absorbance vzorku s DCPIP a rozdíl absorbancí byl stanoven jako míra aktivity chloroplastů.



Obrázek 13: Aparatura na ozařování kyvety se vzorkem (a = zdroj světla, b = vodní filtr, c = stojan s kyvetou se vzorkem).

3.2.4.2 Stanovení inhibice elektronového transportu v chloroplastech

Při stanovování inhibice elektronového transportu v chloroplastech bylo postupováno stejně jako při stanovení chloroplastové aktivity (viz část 3.2.4.1). Pro měření byl používán jako referenční vzorek – vzorek s barvivem DCPIP. Následně byly testovány

látky, které byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO), jehož koncentrace nepřesahovala 5 %, aby neovlivnila měření. Složení jednotlivých měřených vzorků je uvedeno v Tabulce 3. Testované látky byly měřeny vždy ve třech základních koncentracích, a to 1, 2 a 3. Dále byly měřeny další dvě ze zbylých možností. V případě vysoké inhibiční aktivity byly použity i koncentrace nižší.

Tabulka 3: Složení roztoků s testovanou látkou.

Koncentrace č.	1	2	3	4	5	6	7	8
Základní suspenze [μl]	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800	1800
DCPIP [μl]	100	100	100	100	100	100	100	100
Látka [μl]	100	50	10	75	30	5	3	1
TRIS pufr [μl]	0	50	90	25	70	95	97	99

Účinek testovaných látek na PET (fotosyntetický elektronový transport) inhibici se projevuje snížením aktivity čistých chloroplastů. Míra této aktivity je uváděna jako hodnota IC_{50} .

3.2.5 Výpočty jednotlivých kroků

Pro určení míry, jakou je ovlivněna efektivita chloroplastů ve špenátu působením testovaných chemických látek, byla použita metoda stanovení hodnoty IC_{50} . Tato hodnota představuje koncentraci, při níž je aktivita chloroplastů snížena o 50 %. K výpočtu IC_{50} byl použit specifický postup, který je shrnut níže:

Aktivita čistých chloroplastů byla stanovena pomocí vztahu:

$$X_A = A_{A1} - A_{A2}$$

kde X_A značí aktivitu čistých chloroplastů, A_{A1} absorbanci vzorku čistých chloroplastů před ozářením a A_{A2} absorbanci vzorku čistých chloroplastů po ozáření. Pro pokračující výpočty byla stanovena hodnoty $X_{1/2}$, jako polovina hodnoty X .

Aktivitu chloroplastů s testovanou látkou byla stanovena pomocí vztahu:

$$X = A_1 - A_2$$

kde X značí aktivitu chloroplastů po přidání testované látky, A_1 absorbanci vzorku chloroplastů s testovanou látkou před ozářením a A_2 absorbanci vzorku chloroplastů s testovanou látkou po ozáření.

Pro každou testovanou látku bylo vypočítané procento inhibice (X/X_A). Byl sestaven graf závislosti aktivity (procento inhibice) chloroplastů po přidání testované látky na koncentraci této látky pomocí programu Microsoft Excel – $X/X_A=f(c)$. V tomto programu byla vyhotovena také rovnice lineární regrese z minimálně pěti bodů:

$$\frac{X}{X_A} = Y \cdot c + Z$$

kde $\frac{X}{X_A}$ označuje aktivitu (procento inhibice) chloroplastů po přidání testované látky, c koncentraci přidané testované látky a Y a Z koeficienty rovnice pro testovanou látku.

Z této rovnice byla zjištěna koncentrace příslušná hodnotě IC_{50} . Hodnotu IC_{50} jsme stanovili dle následujícího vztahu:

$$0,5 = Y \cdot IC_{50} + Z$$

kde $\frac{X}{X_A}$ označuje pokles aktivity čistých chloroplastů na polovinu (procento inhibice = 0,5), IC_{50} koncentraci přidané testované látky, který způsobila pokles aktivity čistých chloroplastů o polovinu a Y a Z koeficienty pro testovanou látku.

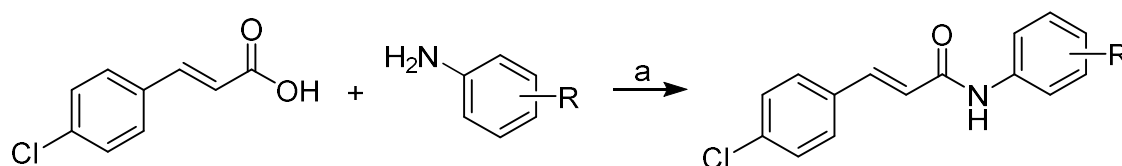
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Byly hodnoceny tři série sloučenin odvozených od skeletu kyseliny skořicové. Prvním typem byly anilidy kyseliny 4-chlorskořicové, označovány níže jako **1a-m** v Tabulce 4. Druhým typem hodnocených sloučenin byly estery kyseliny 3,4,5-trimethoxyskořicové, označovány níže jako **2a-i**, viz Tabulka 5. Třetí, poslední, typy sloučenin byly estery adamantylkarbonyloxycinnamátů, označené jako **3a-ch**, viz Tabulka 6.

Pomocí komerčního programu ACD/Percepta ver. 2012 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, ON, Kanada, 2012) byla pro všechny hodnocené sloučeniny predikována lipofilita jako hodnota $\log P$, zároveň byly také pro první a druhou sérii látek predikovány elektronové σ parametry substituovaného anilidového, resp. fenoxo/benzyloxy kruhu. Veškeré vypočítané hodnoty $\log P$ a σ jsou uvedeny v Tabulkách 4-6, zároveň s experimentálně zjištěnou schopností jednotlivých sloučenin inhibovat PET v chloroplastech špenátu setého. PET inhibice je pro jednotlivé sloučeniny vyjádřena jako hodnota IC_{50} [μM], která způsobuje 50% pokles rychlosti vývoje kyslíku vzhledem ke kontrole. Aktivity jednotlivých látek byly porovnávány s aktivitou DCMU (diuronu).

4.1 Anilidy kyseliny 4-chlorskořicové

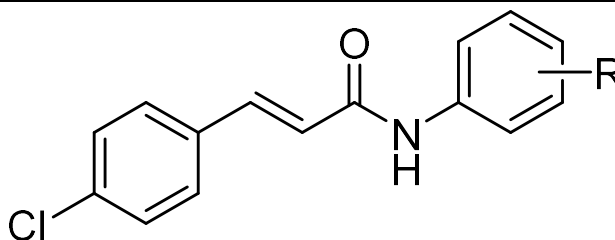
Všechny studované 4-chlorcinnamanilidy byly připravovány dle Obrázku 14. Mikrovlnná syntéza (MW) poskytla sérii cílových *N*-aryl-chlorcinnamamidů **1a-m**, viz Tabulka 4, kondenzací 4-chlorskořicové kyseliny s vhodnými substituovanými aniliny za katalýzy chloridem fosforitým v suchém chlorbenzenu (Strharsky a kol., 2022).



Obrázek 14: Syntéza (2E)-3-(4-chlorfenyl)-*N*-arylprop-2-enamidů **1a-m**. Reagenty a podmínky:

(a) PCl_3 , chlorbenzen, MW, 45 min. (Převzato z: Strharsky a kol., 2022.)

Tabulka 4: Struktury chlorcinnamanilidů, predikované hodnoty lipofility ($\log P$) a elektronové σ parametry a hodnoty PET inhibice jednotlivých sloučenin.



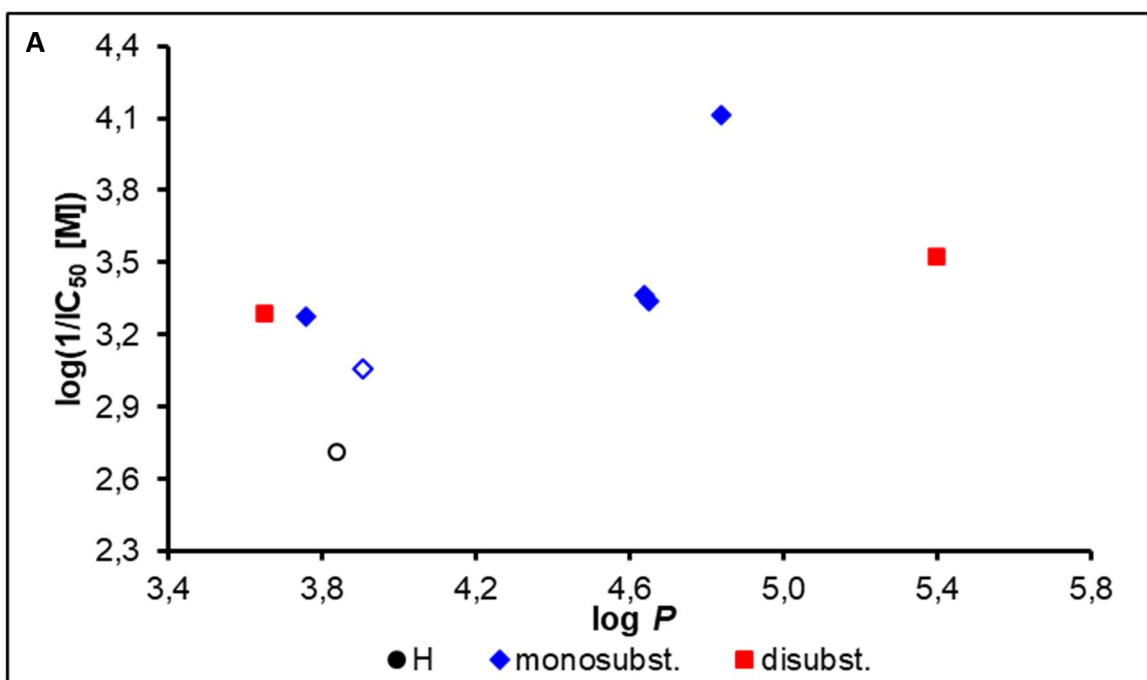
<i>No</i>	<i>R</i>	<i>log P</i> *	$\sigma_{(Ar)}$ *	<i>PET IC</i> ₅₀ [μ M]
1a	H	3,84	0,60	1940
1b	2-F	3,65	1,02	NA
1c	3-F	3,91	0,82	874
1d	4-F	3,76	0,62	533
1e	3-Cl	4,64	0,85	431
1f	4-Cl	4,49	0,75	NA
1g	3-CF ₃	4,84	0,89	76,8
1h	4-CF ₃	4,65	0,95	460
1ch	2,4-F	3,73	1,04	NA
1i	2,5-F	3,77	1,24	NA
1j	2,6-F	3,65	1,44	511
1k	3,5-F	4,24	1,12	NA
1l	2,4-Cl	5,23	1,12	NA
1m	3,5-Cl	5,40	1,11	297
DCMU		–	–	2,1

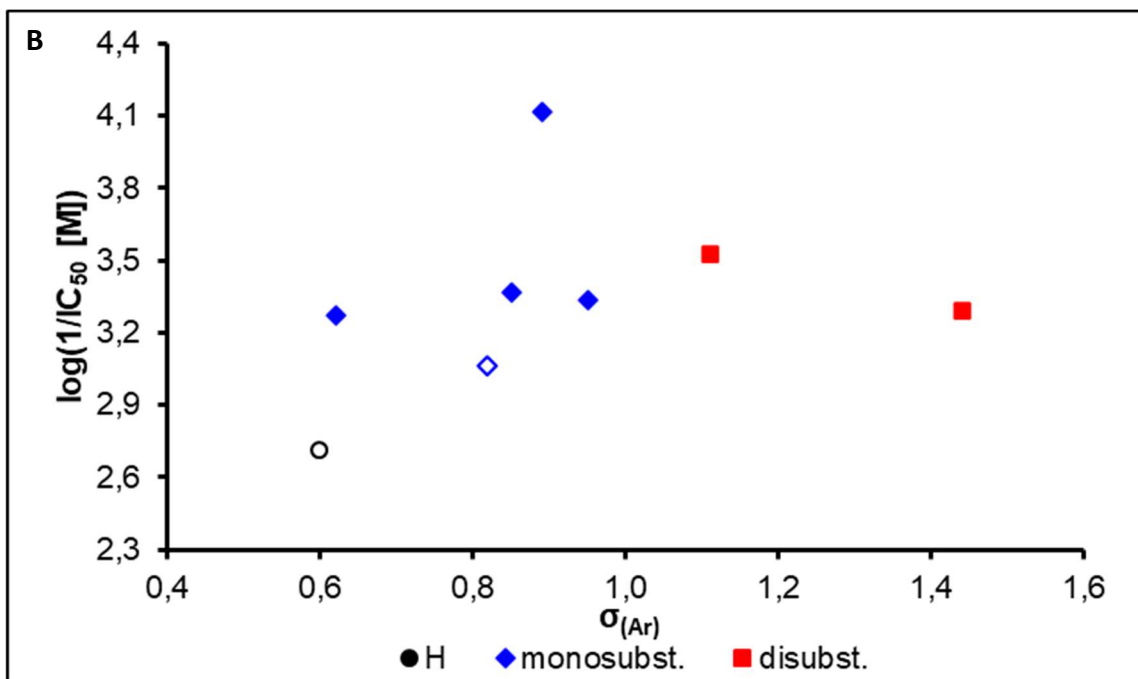
* predikováno pomocí programu ACD/Percepta ver. 2012 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, ON, Kanada, 2012), $\sigma_{(Ar)}$ = elektronové parametry celého substituovaného anilidového kruhu, NA = žádná aktivita

Sloučeniny z řady 4-chlorcinnamanilidů vykázaly hodnoty IC₅₀ v širokém intervalu od 76.8 do 1940 μ M, z tohoto vyplývá, že hodnocené sloučeniny nevykazovaly prakticky žádnou PET aktivitu v porovnání s účinností standardu. U šesti sloučenin se žádnou PET inhibicí detekovat nepodařilo. Z celé této hodnocené řady byla nejúčinnější látka označená **1g** – (2*E*)-3-(4-chlorfenyl)-*N*-[3-(trifluormethyl)fenyl]prop-2-enamid s hodnotou IC₅₀ 76,8 μ M.

Jako substituenty anilidového kruhu byly použity poměrně „monotónně“ fluor a chlor. Vzhledem k chloraci fenylového kruhu skořicové kyseliny se tedy celkově jedná o lipofilní halogenované sloučeniny, jejichž predikované hodnoty $\log P$ se nacházejí v rozmezí 3,65 až 5,40. Na druhou stranu představuje tato série zajímavou ukázkou různých polohových izomerů, které jsou schopny výrazně ovlivňovat parciální náboj amidového můstku díky svému mezomernímu efektu. Z výsledků tohoto screeningu je zřejmé, že rozhodující pro aktivitu je právě poloha substituentů. Poloha *meta* (3, resp. 3,5) je spíše preferovaná před polohami *para* nebo *ortho*. Přestože se jedná o méně početnou sérii sloučenin, k tomu s docela nízkou aktivitou, aby mohly být formulovány vztahy mezi strukturou a aktivitou, byly vyneseny závislosti hodnot PET inhibice, vyjádřené jako $\log(1/IC_{50} [M])$, zkoumaných sloučenin na lipofilitě ($\log P$), Obrázek 15A, a na elektronových $\sigma_{(Ar)}$ vlastnostech anilidových substituentů, Obrázek 15B.

Na Obrázku 15A je vidět možný bilineární trend, kdy PET aktivita vzrůstá s lipofilitou do optima $\log P$ 4,8 (sloučenina **1g**, R = 3-CF₃) a následně aktivita klesá. Z Obrázku 15B vyplývá, že nejvyšší aktivita je spojena s přibližnou hodnotou $\sigma_{(Ph-3-CF_3)}$ 0,9; tedy spíše elektron-akceptorovými vlastnostmi substituentu.

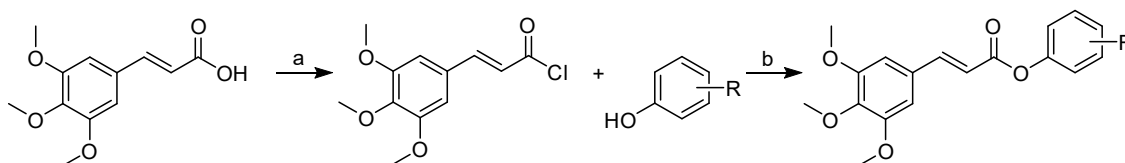




Obrázek 15: Závislost PET inhibice v chloroplastech špenátu vyjádřené jako $\log(1/IC_{50} [M])$ chlorcinnamanilidů na lipofilitě vyjádřené jako $\log P$ (A) a elektronových $\sigma_{(Ar)}$ parametrech celé *N*-arylové části jednotlivých anilidů (B). (Sloučeniny znázorněné prázdnými symboly nejsou zahrnuty do diskuse pro jejich zanedbatelnou aktivitu.)

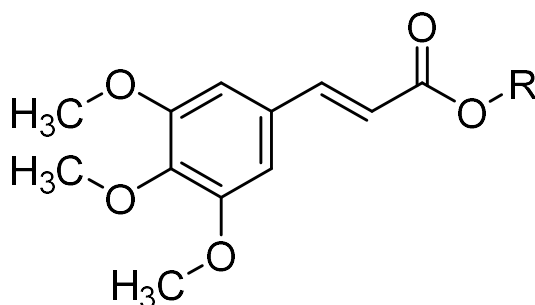
4.2 Estery trimethoxycinnamátů

Všechny studované estery trimethoxycinnamátů (TMCA) byly připravovány dle Obrázku 16. Karboxylová skupina trimethoxyskořicové kyseliny byla převedena pomocí thionylchloridu na acylchlorid, který po následné reakci s vhodným alkoholem anebo fenolem poskytl cílové estery **2a-i**, viz Tabulka 5 (Kos a kol., 2021).



Obrázek 16: Syntéza aryl (2*E*)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-enoátů **2a-i**. Reagenty a podmínky: (a) $SOCl_2$, suchý toluen, reflux 1 h; (b) Et_3N , suchý toluen, reflux 1 h. (Převzato z: Kos a kol., 2021.)

Tabulka 5: Struktury trimethoxycinnamátů, predikované hodnoty lipofility ($\log P$) a elektronové σ parametry a hodnoty PET inhibice jednotlivých sloučenin.



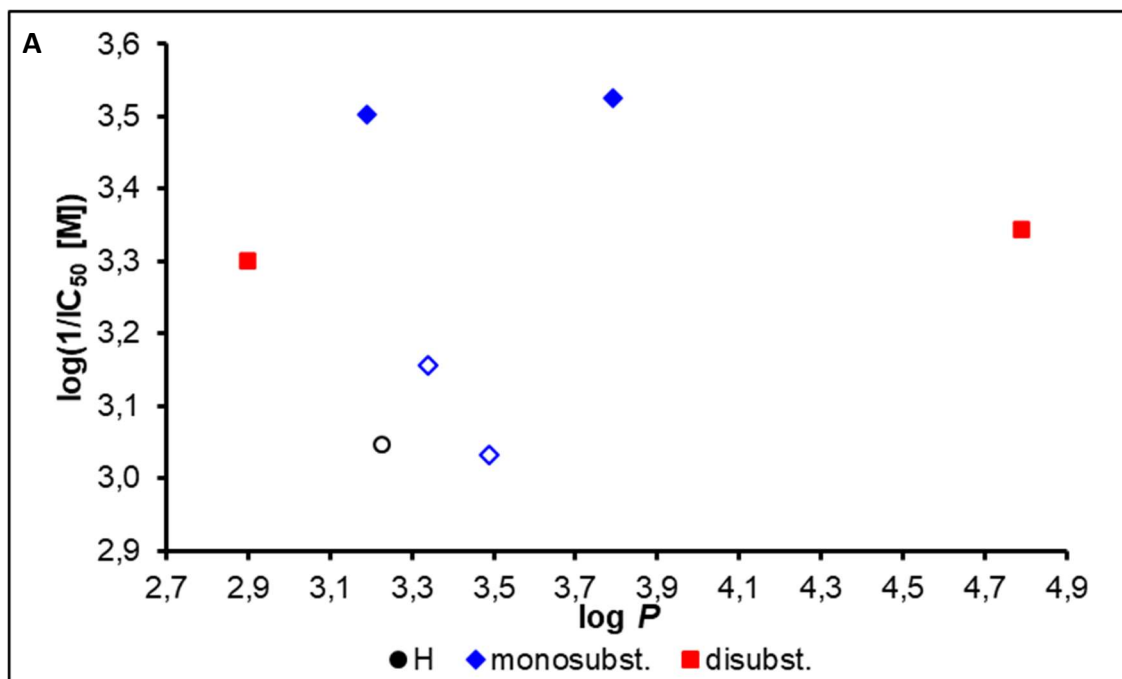
<i>No</i>	<i>R</i>	<i>log P</i> *	$\sigma_{(Ar)}$ *	<i>PET IC</i> ₅₀ [μ M]
2a	Ph	3,23	0,60	900
2b	Ph-4-OCH ₃	3,19	0,36	314
2c	Ph-4-CH ₃	3,49	0,46	931
2d	Ph-4-F ₃	3,34	0,62	699
2e	Ph-4-Br	3,79	0,74	298
2f	Ph-2-F	3,15	1,02	NA
2g	Ph-2-Cl	3,72	1,05	NA
2h	Ph-2,6-OCH ₃	2,90	0,09	501
2ch	Ph-2-CH(CH ₃) ₂ -5-CH ₃	4,79	0,60	453
2i	Bn	3,17	0,23	NA
	DCMU	–	–	2,1

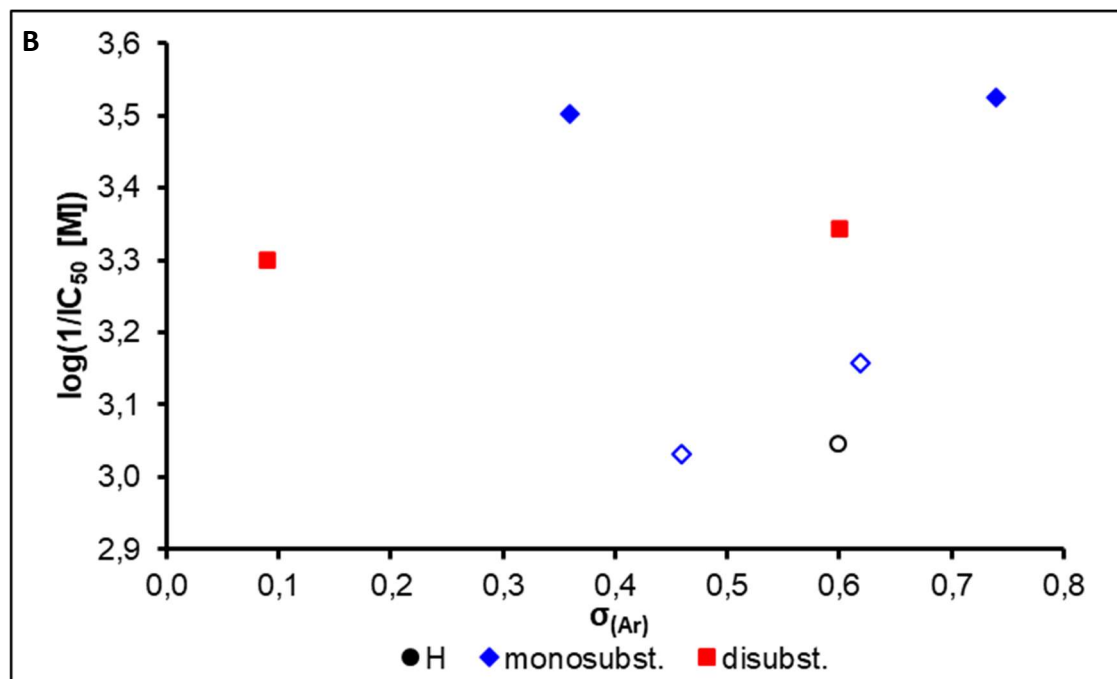
* predikováno pomocí programu ACD/Percepta ver. 2012 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, ON, Kanada, 2012), $\sigma_{(Ar)}$ = elektronové parametry celého substituovaného anilidového kruhu, NA = žádná aktivita.

Sloučeniny z řady TCMA vykázaly hodnoty PET inhibice v intervalu IC_{50} od 298 do 931 μ M; tedy ani deriváty této druhé hodnocené série nevykazovaly prakticky žádnou PET aktivitu v porovnání s DCMU. Z celé této hodnocené řady byla nejúčinnější látka označená **2e** – 4-bromfenyl (*2E*)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoát s hodnotou $IC_{50} = 298 \mu$ M. Kromě toho u 3 derivátů z 10 testovaných sloučenin nebyla jakákoli PET aktivita detekovaná.

Oproti předchozí sérii **1**, vykazuje esterová část větší rozmanitost substituentů a celkově se jedná o méně lipofilní sloučeniny opět v porovnání se sérií **1**. Totální ztrátu PET aktivity způsobila záměna benzylu (sloučenina **2i**) za fenyl (sloučenina **2a**).

Stejně tak přesun substituentu z *para* polohy (sloučenina **2d**) do *ortho* polohy (sloučenina **2f**) fenylového kruhu. Jako u předchozí série byla vynesena PET inhibiční aktivita vyjádřená jako $\log(1/IC_{50} [M])$, zkoumaných sloučenin na lipofilitě ($\log P$), Obrázek 17A, a na elektronových $\sigma_{(Ar)}$ vlastnostech substituovaného aromatického kruhu esteru, Obrázek 17B. Po vyloučení zanedbatelně aktivních sloučenin (**2a**, **2c**, **2d** s $IC_{50} > 550 \mu M$) je možné spekulovat o bilineárním, resp. kvazi-parabolické závislosti vlivu lipofility s hodnotou optima $\log P$ cca. 3,8 (derivát **2e**). Na druhou stranu je evidentní, že elektronové parametry na PET inhibici vliv nemají. Výrazný rozdíl v účinnosti fluorovaného a bromovaného derivátu (**2d/2e**) byl již popsán v minulosti, např. Gonec a kol., 2013, zatímco vždy byla pozorována vyšší aktivita u derivátů substituovaných methylem v porovnání s methoxy deriváty (**2b/2c**) (Gonec a kol., 2013; Kralova a kol., 2015; Michnová a kol., 2019).

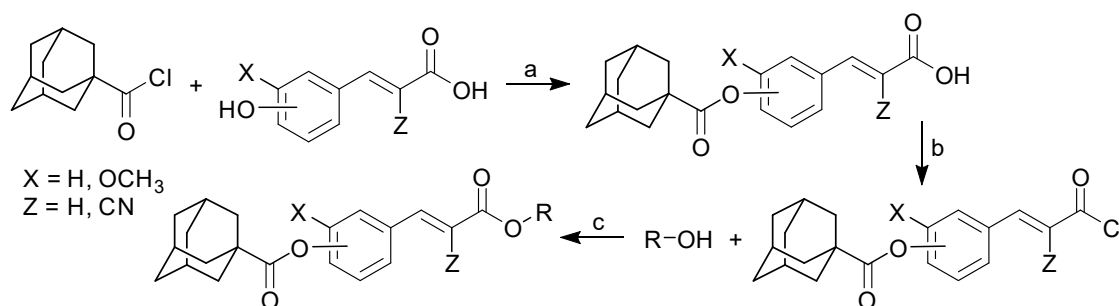




Obrázek 17: Závislost PET inhibice v chloroplastech špenátu vyjádřené jako $\log(1/IC_{50} [M])$ sloučenin série TCMA na lipofilitě vyjádřené jako $\log P$ (A) a elektronových $\sigma_{(Ar)}$ parametrech celé O-arylové části jednotlivých esterů (B). (Sloučeniny znázorněné prázdnými symboly nejsou zahrnuty do diskuse pro jejich zanedbatelnou aktivitu.)

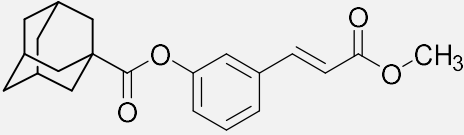
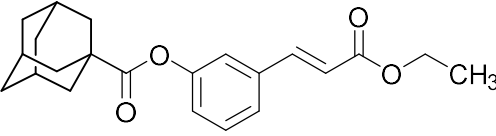
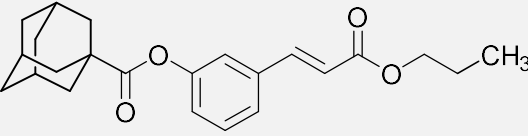
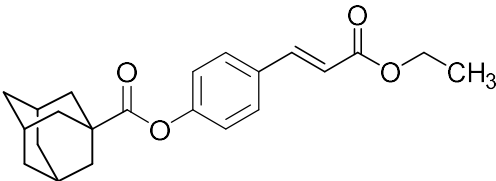
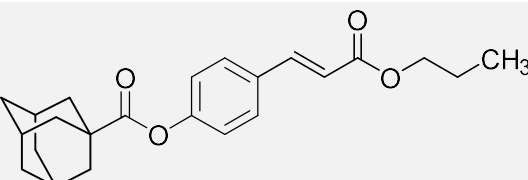
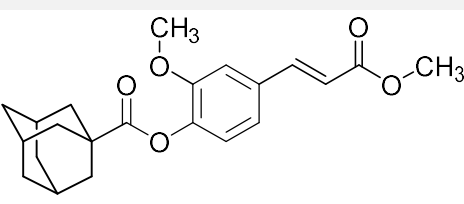
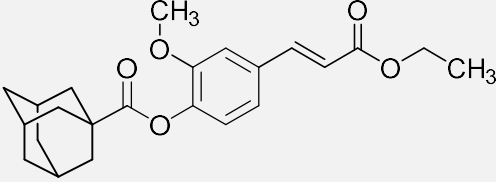
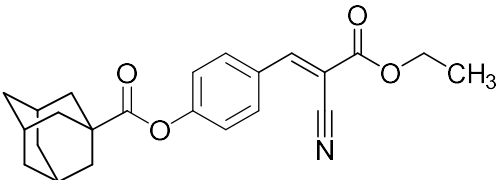
4.3 Alkyl adamantylkarbonyloxycinnamáty

Studované alkyl adamantylkarbonyloxycinnamáty byly připravovány dle Obrázku 18. V prvním kroku byla fenolická skupiny esterifikována adamantan-1-karbonylchloridem. Následně byla karboxylová skupina modifikovaná skořicové kyseliny transformovaná thionylchloridem na chlorid kyseliny, který další reakcí s vhodným alkoholem poskytl substituovaný alkyl adamantylkarbonyloxycinnamát **3a-ch**, viz Tabulka 6.

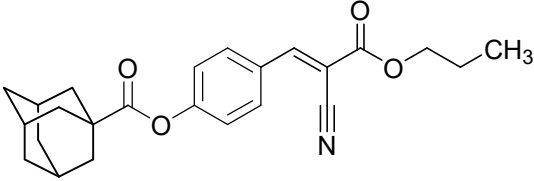


Obrázek 18: Syntéza substituovaných ((E)-3-alkoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)fenyl adamantankarboxylů **3a-ch**. Reagenty a podmínky: (a) suchý MeOH, Et_3N , pokojová teplota, 24 h; (b) $SOCl_2$, suchý toluen, reflux 1 h; (c): Et_3N , suchý toluen.

Tabulka 6: Struktury substituovaných alkyl adamantylkarbonyloxycinnamátů a hodnoty jejich PET inhibice.

<i>No.</i>	<i>Sloučenina</i>	<i>log P*</i>	<i>PET IC₅₀ [μM]</i>
3a		4,51	261
3b		4,90	143
3c		5,37	350
3d		4,97	353
3e		5,42	204
3f		4,58	594
3g		4,87	510
3h		4,96	212

Tabulka 6: Pokračování struktur substituovaných alkyl adamantylkarbonyloxycinnamátů a hodnoty jejich PET inhibice.

3ch		5,40	230
DCMU		–	2,1

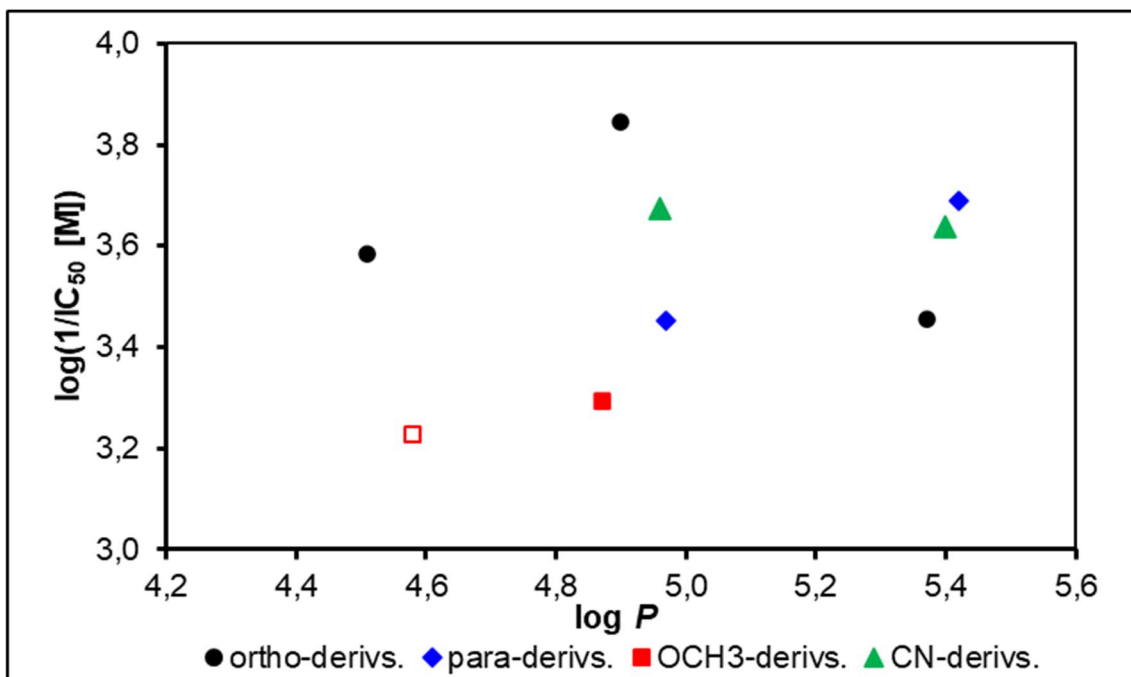
* predikováno pomocí programu ACD/Percepta ver. 2012 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, ON, Kanada, 2012)

Sloučeniny z řady alkyl adamantylkarbonyloxycinnamátů vykázaly hodnoty IC_{50} v intervalu od 143 do 594 μM , z tohoto vyplývá, že sloučeniny této třetí série, ač výrazně méně PET aktivní než standard diuron, vykazovaly celkově nejvyšší/nejkonzistentější aktivitu v porovnání s předchozími dvěma sériemi. Z celé této hodnocené řady byla nejúčinnější látka označená **3b** – 3-[(1*E*)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl]fenyl adamantan-1-karboxylát s hodnotou $IC_{50} = 143 \mu\text{M}$.

PET aktivity jsou přehledně zobrazeny na grafu na Obrázku 19, kde je vynesena závislost PET inhibice vyjádřená jako $\log(1/IC_{50} [\text{M}])$ zkoumaných sloučenin na lipofilitě ($\log P$). Je evidentní, že lipofilita má důležitý, ale nikoli jediný vliv na aktivitu (srovnej **3b**, **3h** vs. **3d** s hodnotami $\log P$ 4,90–4,97). Je proto možné říci, že výrazný vliv má poloha a typ substituce: adamantanem *meta*-substituované deriváty (**3a-c**) mají vyšší aktivitu než adamantanem *para*-substituované deriváty (**3d**, **3e**). Zavedení nitrilové skupiny (sloučeniny **3h**, **3ch**) na alfa-uhlík v propenylovém řetězci aktivita vzrostla, zatímco substituce methoxy skupinou benzenového jádra kyseliny skořicové (sloučeniny **3f**, **3g**) vedla k výraznému poklesu PET inhibice.

Z hlediska délky řetězce esteru se v rámci homologické řady methyl až propyl zdá nejvýhodnější ethyl, tj. C_2 , kdy s prodloužením na C_3 dochází k mírnému poklesu aktivity (s výjimkou **3c/3d**). Podobný vliv délky alkylového řetězce byl zjištěn a diskutován např. Gonec a kol., 2017. Vzhledem k výrazně lipofilním vlastnostem jednak celé diskutované série **3** ($\log P$ v rozmezí 4,51 až 5,42), jednak subsérie **3a–3c** ($\log P$ 4,51–5,37) je pravděpodobné, že se již při délce řetězce ethyl/propyl začíná uplatňovat tzv. „cut-off” efekt (Balgavy a Devinsky, 1996; Sarapuk a Kubica, 1998). V důsledku nejkonzistentější aktivity v porovnání se sériemi **1** a **2** by bylo možné

spekulovat, zda tyto alifatické estery nemohou kromě PET inhibice také ovlivňovat integritu thylakoidní membrány.



Obrázek 19: Závislost PET inhibice v chloroplastech špenátu vyjádřené jako $\log(1/IC_{50} [M])$ alkyl adamantylkarboxycinnamátů na lipofilitě vyjádřené jako $\log P$. (Sloučeniny znázorněné prázdnými symboly nejsou zahrnuty do diskuse pro jejich zanedbatelnou aktivitu.)

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo nalézt novou molekulu s potenciálně herbicidním účinkem, která by se řadila do herbicidní skupiny inhibitorů fotosystémů. Pro splnění tohoto cíle byly použity izolované chloroplasty z listů špenátu setého (*Spinacia oleracea* L.) za pomoci umělého elektronakceptoru 2,6-dichlorfenol-indolfenolu (DCPIP) a látky z řady anilidů kyseliny 4-chlorskořicové, esterů trimethoxycinnamátů a alkyl adamantylkarbonyloxycinnamátů. Aktivita měřených látek byla vyjádřena jako IC₅₀, což odpovídá koncentraci látky, která způsobuje pokles aktivity čistých chloroplastů o polovinu.

Výsledky ukázaly, že účinnost testovaných sloučenin se liší v závislosti na jejich chemické struktuře, lipofilitě, a typu a poloze substituentů. Obzvláště významné bylo zjištění, že některé sloučeniny vykazovaly výrazně vyšší inhibiční účinek než ostatní, což naznačuje potenciál pro další vývoj jako účinných herbicidů. Bylo pozorováno, že především lipofilita a u některých typů sloučenin i elektronové vlastnosti substituentů hrají roli v modulaci herbicidní aktivity, přičemž strukturální změny vedly k výrazným změnám ve velikosti PET aktivity.

Při testování látek pocházejících z řady anilidů kyseliny 4-chlorskořicové byla zjištěna nejúčinnější látka, a to konkrétně (2*E*)-3-(4-chlorfenyl)-*N*-[3-(trifluormethyl)fenyl]prop-2-enamid (**1g**). Nejvyšší účinek měla pravděpodobně z důvodu přítomnosti substituentu fluoru v poloze *meta*.

U látek pocházejících z řady esterů trimethoxycinnamátů byla objevena nejúčinnější látka 4-bromfenyl (2*E*)-3-(3,4,5-trimethoxyfenyl)prop-2-enoát (**2e**). V tomto případě měl na účinnost pravděpodobně opět důležitý dopad substituent, tentokrát v podobě bromu v *para* poloze fenylového kruhu.

Ze všech testovaných sérií vykazovaly nejvyšší aktivitu látky patřící do skupiny alkyl adamantylkarbonyloxycinnamátů. Nejúčinnější látkou byl zde zjištěn 3-[(1*E*)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl]fenyl adamantan-1-karboxylát (**3b**). Účinek této sloučeniny byl pozitivně ovlivněn jednak substitucí adamantem v poloze *meta* benzenového jádra skořicové kyseliny, jednak ethylovým esterovým řetězcem.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Absorpční spektrum chlorofylu a karotenů. <https://byjus.com/> [online]. [cit. 2023-12-29]. Dostupné na: https://search-static.byjusweb.com/questionimages/byjus/ckeditor_assets/pictures/860847/original_Absorbance.jpg

Armstrong, G.A., Hearst, J.E. (1996). Carotenoids 2. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *Faseb Journal*, 10, 228-237.

Balgavy, P., Devinsky, F., (1996). Cut-off effects in biological activities of surfactants. *Advances In Colloid And Interface Science*, 66, 23–63.

Beckie H.J., Tardif F.J. (2012). Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*, 35, 15-28.

Boulangier M., Tual S., Lemarchand C., Guizard A.V., Delafosse P., Marcotullio E., Pons R., Piel C., Pouchieu C., Baldi I., Clin B., Lebailly P.; AGRICAN group. (2018). Lung cancer risk and occupational exposures in crop farming: results from the AGRiculture and CANcer (AGRICAN) cohort. *Occupational and Environmental Medicine*, 75, 776-785.

Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (second edition). Wiley Blackwell. ISBN 978-0-470-71421-8

Caron-Beaudoin É., Denison M.S., Sanderson J.T. (2016). Effects of neonicotinoids on promoter-specific expression and activity of aromatase (CYP19) in human adrenocortical carcinoma (H295R) and primary umbilical vein endothelial (HUVEC) cells. *Toxicological Sciences*, 149(1), 134-144.

Duke S.O. (2012). Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? *Pest Management Science*, 68, 505–512.

Dvořák J., Smutný V. (2003) *Herbologie: Integrovaná ochrana proti polním plevelům*. (1. vydání). Mendelova univerzita. ISBN 978-80-7157-732-4

Evropský parlament. (2018). Urgent action needed to protect EU bee population, urge MEPs [online]. [cit. 2024-1-10] Dostupné na: <http://www.europarl.europa.eu/news/en/press-room/20180123IPR92314/urgent-action-needed-to-protect-eu-bee-population-urge-meps>

Garret, R.H., Grisham, C.M. *Biochemistry* (fourth edition). (2008) Brooks & Cole. ISBN 978-0-495-10935-8.

Ghazi R.M., Raihan N., Yusoff N., Halim N. S. A., Wahab I. R. A., Latif N. A., Hasmoni S. H., Zaini M. A. A., Zakaria Z. A. (2023). Health effects of herbicides and its current removal strategies. *Bioengineered*, 14, 2259526.

Gianessi L.P. (2013). The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. *Pest Management Science*, 47, 1099-1105.

Gonec T., Kos J., Zadrazilova I., Pesko M., Keltosova S., Tengler J., Bobal P., Kollar P., Cizek A., Kralova K., Jampilek, J. (2013). Antimycobacterial and herbicidal activity of ring-substituted 1-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 6531–6541.

Gonec T., Kralova K., Pesko M., Jampilek J. (2017). Antimycobacterial N-alkoxyphenylhydroxynaphthalenecarboxamides affecting photosystem II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27, 1881-1885.

Grasselli, F., Bussolati, S., Ramoni, R., Grolli, S., Basini, G. (2018). Simazine, a triazine herbicide, disrupts swine granulosa cell functions. *Animal Reproduction*, 15, 3–11.

Hasan M., Ahmad-Hamdani M.S., Rosli A.M., Hamdan H. (2021). Bioherbicides: An eco-friendly tool for sustainable weed management. *Plants*, 10, 1212.

Hawkes, T.R. (2014). Mechanisms of resistance to paraquat in plants. *Pest Management Science*, 70, 1316-1323.

HRAC. (2005). Classification of herbicides according to mode of action. [online]. [cit. 2023-12-27]. Dostupné na: <http://www.hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideModeofAction/tabid/222/Default.aspx>

Chodová D., Mikulka M., Kočová M., Salava J. (2004). Origin, mechanism and molecular basis of weed resistance to herbicides. *Plant Protection Science*, 40, 151-168.

Chodová D., Salava J., Martincová O., Cvikrová M. (2009). Horseweed with reduced susceptibility to glyphosate found in Czech Republic. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 6957-6961.

Jones R. L., Qugham H., Thomas H., Waaland S. (2013). *The Molecular Life of Plants*. Wiley-Blackwell. ISBN 978-04-70870-13-6.

- Jugulam M., Shyam C. (2019). Non-target-site resistance to herbicides: Recent developments. *Plants*, 8, 417.
- Jursík M., Hamouzová K., Soukup J., Holec J. (2011). Rezistence plevelů vůči herbicidům a problémy s rezistentními populacemi v ČR. *Listy cukrovarnické a řepářské*, 127(4), 123-129.
- Jursík M., Holec J., Hamouz P., Soukup J. (2018). *Biologie a regulace plevelů*. Kurent. ISBN 978-80-87111-71-0.
- Kervégant M., Merigot L., Glazial M., Schmitt C., Tichadou L., de Haro L. (2013). Paraquat poisonings in France during the european ban: Experience of the Poison Control Center in Marseille. *Journal of Medical Toxicology*, 9, 144-147.
- KhanAcademy. Struktura chloroplastu. <https://cs.khanacademy.org/> [online]. [cit. 2024-1-13]. Dostupné na: <https://cs.khanacademy.org/science/biology/structure-of-a-cell/tour-of-organelles/a/chloroplasts-and-mitochondria>
- Kos J., Strharsky T., Stepankova S., Svrckova K., Oravec M., Hosek J., Imramovsky A., Jampilek J. (2021). Trimethoxycinnamates and their cholinesterase inhibitory activity. *Applied Sciences*, 11, 4691.
- Kralova K., Perina M., Waisser K., Jampilek J. (2015). Structure-activity relationships of N-benzylsalicylamides for inhibition of photosynthetic electron transport. *Medicinal Chemistry*, 11, 156-164.
- Král'ová K., Šeršeň F., Kubicová L., Waisser K. (1999). Inhibitory effects of substituted benzanilides on photosynthetic electron transport in spinach chloroplasts, *Chemical Papers*, 53, 328-331.
- Král'ová K., Šeršeň F., Sidóová E. (1992). Photosynthesis inhibition produced by 2-alkylthio-6-R-benzothiazoles. *Chemical Papers*, 46, 348-350.
- Levin, S.A. (2013). *Encyclopedia of biodiversity* (second edition). Elsevier. ISBN 978-01-23847-19-5
- Liao, H., Li, X., Yang, Q., Bai, Y., Cui, P., Wen, C., Liu, C., Chen, Z., Tang, J., Che, J., Yu, Z., Geisen, S., Zhou, S., Friman, V. P., Zhu, Y. G. (2021). Herbicide selection promotes antibiotic resistance in soil microbiomes. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 2337-2350.

- Masarovičová E., Kráľová K. (2005). Approaches to measuring plant photosynthesis activity. *Handbook of Photosynthesis*, (Second edition) Pessaraki, M., Ed.; Taylor & Francis Group, 617-656. ISBN 978-08-24758-39-4.
- Menne, H.J., Köcher, H. (2008). HRAC classification of herbicides and resistance development. *Modern Crop Protection Compounds*, 5-26.
- Michnova H, Pospisilova S, Gonec T, Kapustikova I, Kollar P, Kozik V, Musiol R, Jendrzewska I, Vanco J, Travnicek Z., Cizek A., Bak A., Jampilek J. (2019). Bioactivity of methoxylated and methylated 1-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. comparative molecular surface analysis. *Molecules*, 24, 2991.
- Mikulka J., Slavíková L. (2008) *Metody diagnostiky a regulace rezistentních populací plevelů vůči herbicidům*. Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN 978-80-8701-150-8.
- Murphy B.P., Tranel P.J. (2019). Target-site mutations conferring herbicide resistance. *Plants*, 8, 382.
- Naylor R.E.L. (2002). *Weed Management Handbook*. British Crop Protection Council & Blackwell Science. ISBN 978-06-32057-32-0.
- Nicolopoulou-Stamati P., Maipas S., Kotampasi C., Stamatis P., Hens L. (2016). Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in Public Health*, 4, 148.
- Qu R.Y., He B., Yang J.F., Lin H.Y., Yang W.C., Wu Q.Y., Li Q.X., Yang G.F. (2021). Where are the new herbicides? *Pest Management Science*, 77, 2620-2625.
- Rozhodnutí Evropské komise. (2004). 2004/248/EC. [online]. [cit. 2023-02-04]. Dostupné na: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2004.078.01.0053.01.ENG
- Ruuskanen S., Fuchs B., Nissinen R., et al. (2023). Ecosystem consequences of herbicides: The role of microbiome. *Trends in Ecology & Evolution*, 38, 35-43.
- Ryan G.F. (1970). Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science*, 18, 614-616.
- Sarapuk, J., Kubica, K. (1998). Cut-off phenomenon. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 3, 261–269.

Sass B. J., Colangelo A. (2006). European Union bans atrazine, while the United States Negotiates continued use. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 12, 260-267.

Senseman, S.A., Armbrust K. (2007) *Herbicide Handbook* (ninth edition), Weed Science Society of America. ISBN 978-18-91276-56-9.

Shaner D.L. (2014). Lessons learned from the history of herbicide resistance. *Weed Science*, 62, 427-431.

Sharma A., Jha P., Reddy G.V.P. (2018). Multidimensional relationships of herbicides with insect-crop food webs. *Science of The Total Environment*, 643, 1522-1532.

Sherwani S.I., Arif I.A., Khan H.A. (2015). Modes of action of different classes of herbicides. In: Price A., Kelton J., Sarunaite L., Eds., *Herbicides, Physiology of Action, and Safety. InTech*, 165-186.

Sosnoskie L.M. (2006). Herbicide related definitions: A review. *Pure and Applied Chemistry*, 78, 20752154.

Strharsky T., Pindjakova D., Kos J., Vrablova L., Michnova H., Hosek J., Strakova N., Lelakova V., Leva L., Kavanova L., Oravec M., Cizek A., Jampilek J. (2022). Study of biological activities and ADMET-related properties of novel chlorinated N-arylcinnamamides. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 3159.

Struktura elektrontransportního řetězce. <https://www.majordifferences.com/> [online]. [cit. 2023-02-04]. Dostupné na: <https://www.majordifferences.com/ezoimgfmt/lh3.ggpht.com/-B4luyAfQRj8/Uql9HWzc6sI/AAAAAAAAApc/TDMyrX4y344/image%25255B9%25255D.png?imgmax=800&ezimgfmt=rs:640x392/rscb1/ng:webp/ngcb1>

Taiz L., Zeiger E., Møller I.M., Murphy A.S. (2018). *Plant physiology and development* (sixth edition). Sinauer. ISBN 978-16-05353-26-5.

Tarmure S., Alexescu T.G., Orasan O., et al. (2020). Influence of pesticides on respiratory pathology – a literature review. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 27, 194-200.

Wagner S.C., Zablotowicz R.M., Gaston L.A., Locke M.A., Kinsella J. (1996). Bentazon degradation in soil: influence of tillage and history of bentazon application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1593-1598.

WHO. (2019). WHO/CED/PHE/EPE/19.4.6, Preventing disease through healthy environments. [online]. [cit. 2023-02-04]. Dostupné na: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/329501/WHO-CED-PHE-EPE-19.4.6-eng.pdf?sequence=1%26isAllowed=y>