

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Klíčové enzymy v biochemii stresu rostlin**

**Bakalářská práce**

**Annemarie Hamplová**

**Výživa a potraviny**

**Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.**

**© 2021 ČZU v Praze**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Klíčové enzymy v biochemii stresu rostlin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Matyáši Orsákovi, Ph.D. za výjimečnou podporu, důvěru a za veškeré poznatky, které mi poskytl v průběhu psaní této práce. Mé nemalé poděkování patří i mé konzultantce Ing. Zoře Kotíkové, Ph.D. za její čas a cenné rady. Dále děkuji své rodině a partnerovi za jejich velikou podporu během studia a psaní této práce. Speciální poděkování patří mé tetě Ing. Bronislavě Slepíčkové za její ochotu a pomoc s gramatickou úpravou textu.

# Klíčové enzymy v biochemii stresu rostlin

## Souhrn

Tato bakalářská práce pojednává o klíčových enzimech v biochemii stresu rostlin. V průběhu stresu u rostlin dochází k řadě spletitých chemických reakcí, které utváří komplexní děj značně ovlivňující fyziologické fungování rostlin. Stres rostlin je způsoben biotickými a abiotickými stresory, přičemž platí, že abiotické stresory meziročně způsobují značné ztráty ve výnosu zemědělských plodin. V přírodě často dochází ke kombinaci biotických a abiotických stresů, se kterými se rostliny musí současně vypořádat. Během působení abiotického stresu jsou rostliny vystaveny zvýšené náchylnosti i na stres biotické povahy. Biotický stres je způsobován především herbivory, dále pak patogeny, kam se řadí zástupci z řad virů, bakterií a hub. Sucho, chlad a mráz, zasolení a toxické kovy jsou nejvýznamnějšími zástupci z řad abiotických stresů.

Vzhledem k usedlému způsobu života byly rostliny nuceny vyvinout účinné adaptační a toleranční mechanismy, které jim v průběhu působení stresorů, poskytnou dostatečně účinnou ochranu. Dále se pak u rostlin v průběhu evoluce vyvinuly chemické látky, které se aktivně účastní fyziologie stresu a jsou schopny do značné míry zajišťovat zvýšenou odolnost rostlin vůči stresorům. Nezpochybnitelně sem patří histidinkinázy, dehydriny, abscisová kyselina (ABA), nemrznoucí proteiny (AFP), proteiny teplotního šoku (HSP) a mnoha dalších. V neposlední řadě mezi velice významné látky, které aktivně chrání rostliny před oxidačním stresem, jsou neenzymatické a enzymatické obranné mechanismy.

Enzymy jsou vysoce specializované chemické látky mající v rostlinách řadu nenahraditelných úloh. Enzymy spadají do nejúčinnějších obranných mechanismů rostlin v průběhu oxidativního stresu. Působení oxidativního stresu vyvolá v rostlinách tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS). Do této rozmanité skupiny spadají látky, které jsou samy o sobě reaktivnější než samotný molekulární kyslík. Hovoříme o singletovém kyslíku, superoxidovém radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylovém radikálu. V této práci se konkrétně věnuji třem významným enzymům. Kataláza přeměňuje peroxid vodíku na kyslík a vodu. Askorbát peroxidáza taktéž odstraňuje peroxid vodíku. Superoxid dismutáza se aktivně podílí na odstraňování superoxidu za vzniku peroxidu vodíku a kyslíku.

**Klíčová slova:** askorbát peroxidáza, kataláza, peroxidáza, prolin, SOD, sucho

# Key enzymes in biochemistry of plant stress

## Summary

This bachelor thesis deals with key enzymes in plant stress biochemistry. During stress in plants, there are a number of complex chemical reactions that form a complex event that greatly affects the physiological functioning of plants. Plant stress is caused by biotic and abiotic stressors, with abiotic stressors causing significant losses in crop yield year-to-year. In nature, there is often a combination of biotic and abiotic stress that plants must deal with at the same time. During abiotic stress, plants are also subject to biotic stress. Biotic stress is mainly caused by herbivores and pathogens, which include representatives from viruses, bacteria and fungi. Drought, cold and frost, salting and toxic metals, are the most prominent representatives from the ranks of abiotic stress.

Due to the sedentary way of life, plants have been forced to develop effective adaptation and tolerance mechanisms to provide them with sufficient effective protection during stressors. In addition, during evolution, plants developed chemicals that actively participate in stress physiology and are able to largely ensure increased resistance of plants to stressors. Undoubtedly, this includes histidine kinases, dehydrins, abscisic acid (ABA), antifreeze proteins (AFP), heat shock proteins (HSP) and many others. Last but not least, nonenzymatic and enzymatic defence mechanisms are among the very important substances that actively protect plants from oxidative stress.

Enzymes are highly specialised chemicals with a number of irreplaceable roles in plants. Enzymes fall under the most effective plant protection mechanisms during oxidative stress. The activity of oxidative stress causes the formation of reactive oxygen species (ROS) in plants. This diverse group includes substances that are in themselves more reactive than molecular oxygen itself. We are talking about singlet oxygen, superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. In this work I specifically dedicate myself to the three important enzymes. Catalase converts hydrogen peroxide into oxygen and water. Ascorbate peroxidase also removes hydrogen peroxide. Superoxide dismutase is actively involved in the elimination of the superoxide to produce hydrogen peroxide and oxygen.

**Keywords:** ascorbate peroxidase, catalase, peroxidase, proline, SOD, drought

## Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>2 Cíl práce</b> .....	<b>10</b>
<b>3 Stres rostlin</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1 Biotické stresy</b> .....	<b>12</b>
3.1.1 Interakce s ostatními živočichy .....	12
3.1.1.1 Ochrana proti živočichům:.....	13
3.1.2 Interakce s pathogenními organismy.....	13
3.1.2.1 Viry .....	14
3.1.2.2 Bakterie .....	14
3.1.2.3 Houby.....	14
3.1.3 Alelopatie .....	14
3.1.4 Antropogenní vlivy .....	15
<b>3.2 Abiotické stresy</b> .....	<b>15</b>
3.2.1 Sucho .....	15
3.2.1.1 Poškození suchem .....	16
3.2.1.2 Adaptace na sucho .....	17
3.2.1.3 Biochemie stresu suchem.....	18
3.2.2 Chlad a mráz.....	19
3.2.2.1 Poškození chladem a mrazem .....	19
3.2.2.2 Adaptace na chlad a mráz .....	21
3.2.2.3 Biochemie stresu chladem a mrazem.....	21
3.2.3 Zasolení půdy .....	22
3.2.3.1 Poškození při zasolení.....	23
3.2.3.2 Adaptace na zasolení půdy.....	23
3.2.3.3 Biochemie stresu zasolením.....	24
3.2.4 Toxické a těžké kovy.....	25
3.2.4.1 Poškození toxickými a těžkými kovy .....	25
3.2.4.2 Adaptace na přítomnost toxických a těžkých kovů .....	27
3.2.4.3 Biochemie stresu toxickými a těžkými kovy .....	28
<b>3.3 Průběh stresové reakce</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4 Enzymy</b> .....	<b>29</b>
3.4.1 Enzymové komplexy.....	31
3.4.2 Struktura enzymů .....	32

3.4.3	Klasifikace a názvosloví enzymů .....	34
3.4.3.1	Oxidoreduktázy .....	35
3.4.3.1.1	Podskupiny oxidoreduktáz: .....	35
3.4.3.2	Transferázy .....	36
3.4.3.3	Hydrolázy .....	36
3.4.3.4	Lyázy .....	36
3.4.3.5	Isomerázy .....	37
3.4.3.6	Ligázy .....	37
3.4.4	Enzymová katalýza a reakční podmínky .....	37
3.4.4.1	Vliv substrátu.....	38
3.4.4.2	Vliv teploty.....	39
3.4.4.3	Vliv pH.....	40
3.4.4.4	Vliv efektorů.....	41
3.4.4.4.1	Aktivátory .....	41
3.4.4.4.2	Inhibitory .....	41
3.4.4.4.2.1	Reverzibilní inhibitory .....	42
3.4.4.4.2.2	Ireverzibilní inhibitory .....	42
<b>3.5</b>	<b>ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species) .....</b>	<b>43</b>
3.5.1	Druhy ROS .....	44
3.5.1.1	Singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ).....	44
3.5.1.2	Superoxidový radikál ( $\text{O}_2^-$ ).....	44
3.5.1.3	Peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) .....	45
3.5.1.4	Hydroxylový radikál ( $\text{OH}\cdot$ ).....	45
3.5.2	Vznik ROS v organelách .....	46
3.5.2.1	Chloroplasty .....	46
3.5.2.2	Peroxisomy .....	47
3.5.2.3	Mitochondrie .....	47
3.5.3	ROS jako signální molekuly .....	48
3.5.3.1	ROS a stomata .....	49
3.5.3.2	Buněčná smrt .....	49
3.5.4	Neenzymatické ochranné mechanismy.....	49
3.5.4.1	Askorbát .....	50
3.5.4.2	Gluthathion .....	50
3.5.4.3	Tokoferoly .....	51
3.5.4.4	Karotenoidy .....	51

3.5.4.5	Flavonoidy .....	52
3.5.5	Antioxidační enzymy .....	52
3.5.5.1	Kataláza (CAT).....	53
3.5.5.1.1	Struktura enzymu .....	54
3.5.5.1.2	Princip stanovení.....	54
3.5.5.2	Askorbát peroxidáza (APX).....	54
3.5.5.2.1	Struktura enzymu .....	55
3.5.5.2.2	Princip stanovení.....	55
3.5.5.3	Superoxid dismutáza (SOD) .....	55
3.5.5.3.1	Izoformy SOD.....	56
3.5.5.3.2	Princip stanovení.....	57
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>59</b>



# 1 Úvod

Lidská populace neustále roste, a i z tohoto důvodu jsou kladeny vysoké nároky na pěstování a produkci plodin. Environmentální stresy jsou tak pro udržení potřebné produkce značnou hrozbou. Velmi často dochází k současnému působení více stresorů najednou, a tak se rostliny musí v jeden okamžik vypořádat s několika stresy. V průběhu stresu dochází ke značnému ovlivnění fyziologických funkcí rostlin. Nejčastěji bývá zasažena fotosyntéza a s ní spojené elektronové transportní řetězce. U rostlin může taktéž docházet ke hromadění toxických látek, které následně vyúsťují v oxidativní stres. Oxidativní stres v krajních případech může způsobit buněčnou smrt a úhyn celé rostliny. Úhyn je způsoben nadměrným zatížením rostlin stresem, se kterým si nedokáží poradit a nemají vůči němu vytvořené adaptační či toleranční mechanismy. Poškození rostlin stresem je značně ovlivněno silou působení a časovou expozicí, po kterou na rostliny působí.

V průběhu stresu rostlin se uplatňuje velká škála adaptačních a obranných systémů, které jsou mnohdy na sobě závislé a navzájem utvářejí velice složitý systém, bez kterého by se rostliny nemohly účinně bránit vůči jednotlivým environmentálním stresům a přečkávat tyto nelehká období. Uplatňuje se v nich celá řada enzymů, rostlinných hormonů, signálních molekul a mnohé prvky metabolických drah, které na sebe vzájemně navazují a vytváří tak spleť sítí chránící rostlinu. Rostliny se danému stresoru brání buď nepřímými cestami, kdy se snaží účinek stresoru zmírnit např. uzavřením stomat, anebo rostliny využívají přímé prostředky v boji se stresorem. Nejčastěji se jedná o enzymy, které dokáží svým specifickým působením přeměňovat toxické látky na látky méně toxické. Toxické látky jsou přímým důsledkem metabolismu rostlin, nebo se do rostliny dostávají z vnějšího prostředí (pesticidy, těžké kovy). Enzymy jsou nepostradatelnou složkou všech organismů. Zajišťují řadu důležitých a pro život nezbytných úkonů. Aktivně se účastní chemických reakcí v metabolických procesech. To z nich činí látky nezbytně nutné pro život organismů.

## **2 Cíl práce**

V literárním přehledu se zaměřit na problematiku stresu. Zjistit, které enzymy jsou u rostlin zodpovědné za odolnost vůči stresu a které enzymy jsou se stresem rostlin spojovány. Jaký je mechanismus účinku těchto enzymů. Z literatury zjistit i metody stanovení aktivity těchto enzymů.

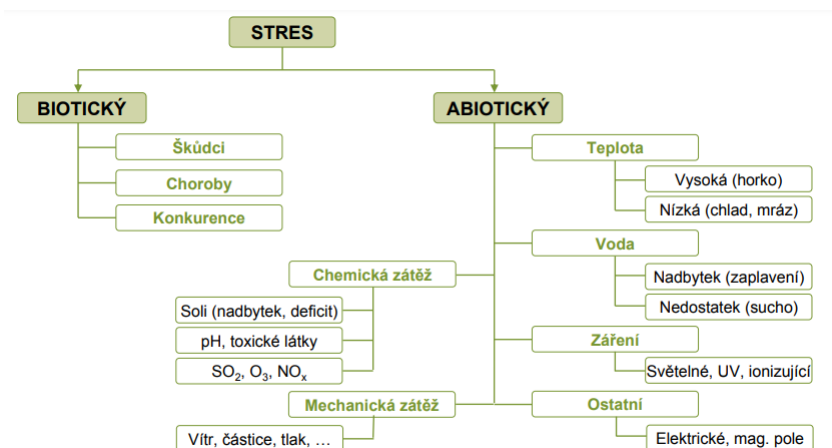
## Literární rešerše

### 3 Stres rostlin

Rostliny představují heterogenní, otevřený a dynamický systém. Jako živý a otevřený celek mají schopnost udržovat svoji homeostázu. Homeostáza znamená, že jsou schopny udržovat svůj původní rovnovážný stav po ústupu určitého stresového faktoru (Tůma & Tůmová 1998). Rostliny jsou neustále vystavovány proměnlivým vnějším podmínkám (Hnilička & Středa 2016). Vnější podmínky mohou zpomalovat jejich životní funkce, způsobovat poškození určitých částí, či v neposlední řadě způsobit jejich úhyn (Procházka 1998). Hnilička & Středa (2016) doplňují, že v krajních případech může dojít i k úhynu celé populace. Vliv negativních podmínek prostředí působících na rostlinu lze charakterizovat jako stresovou reakci, čili stres rostlin (Hnilička & Středa 2016). Jen málokdy působí na rostlinu pouze jeden stresor. Zpravidla dochází k překryvu negativně působících stresorů (Kmeť & Kurjak 2014). Stres rostlin může být buď biotický či abiotický. V případě biotického stresu rostlinu negativně ovlivňují ostatní organismy (Shinozaki et al. 2015). Biotický stres je způsoben patogeny, okusem či antropogenním působením (Hnilička & Středa 2016). Abiotický stres může být z nadbytku či nedostatku fyzikálně-chemických faktorů (Shinozaki et al. 2015). Abiotickým stresem je například: světlo, sucho, chlad či působení toxických kovů (Hnilička & Středa 2016). Za příklad lze uvést nedostatek vody v půdě, který je velmi často doprovázen vysokými teplotami (Kmeť & Kurjak 2014). Neustále měnící se klimatické podmínky abiotický stres stále zhoršují (Tuteja & Gill 2016).

Stres u rostlin je podstatně složitější, než u živočichů. Rostliny na rozdíl od živočichů mají usedlý způsob života, a tak nemohou před působením stresoru utéct. V neposlední řadě je u rostlin mnohem větší mezidruhovná variabilita i heterogenita vnitřního prostředí (Procházka 1998). Aby mohly rostliny odolávat působícím stresům, vyvinuly si obranné mechanismy. Začaly manipulovat se svým tolerančním potenciálem prostřednictvím integrace (Tuteja & Gill 2016). Vnější prostředí taktéž významně ovlivňuje expresi genetické informace (Hnilička & Středa 2016). Tímto způsobem došlo k přizpůsobení se a adaptování se vůči jednomu či vícero stresorům (Šebánek et al. 1983). Rostliny jsou schopné změnit své morfologické, anatomické, fyziologické, biochemické a molekulární parametry, které mají za úkol udržovat homeostázu jako odpověď na působení stresu (Kmeť & Kurjak 2014).

Během posledních dvou desetiletí je zaznamenávám obrovský pokrok v oblasti genomiky a molekulární genetiky, které významně přispěly k pochopení odolnosti rostlin vůči biotickým stresům a toleranci abiotických stresů (Varshney & Tuberosa 2013).



Obr. č. 1. Rozdělení biotických a abiotických stresů a jejich činitelé. (Cerkal 2011) (Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_sklad/habilitacni\\_prednasky/habilitacni\\_prednaska\\_cerkal.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_291_sklad/habilitacni_prednasky/habilitacni_prednaska_cerkal.pdf) ke dni 29.11. 2020)

### 3.1 Biotické stresy

Původci biotických stresů rostlin jsou ostatní organismy. Do těchto organismů řadíme zástupce z řad bakterií, virů, hmyzu, býložravců a parazitických rostlin. Jedná se o potenciální příčiny narušení růstu, vývoje a reprodukce. Rostliny vzhledem ke způsobu svého života musí s těmito organismy bojovat přímo, aniž by opustily své místo (Shabala 2017).

Biotické stresy představují velkou hrozbu pro produktivitu rostlin. Opatření na ochranu rostlin jako je využívání pesticidů či zavádění rezistentních genů do kultivarů byla doposud účinnou ochranou. Zároveň toto ale bohužel vedlo k neustálému vývoji biotypů, patotypů, kmenů škůdců a chorob, které se na tyto způsoby ochrany zadaptovaly a staly se tak rezistentní (Varshney & Tuberosa 2013).

#### 3.1.1 Interakce s ostatními živočichy

Rostliny jsou neustále v nebezpečí poškození částí svého rostlinného těla živočichy. Těmito živočichy jsou především zástupci fytofágního hmyzu a evolučně vyšších býložravců (Procházka et al. 1998). Samotný suchozemský býložravý hmyz představuje cca 25 % ze všech živočišných a rostlinných druhů (Peterson & Higley 2000). Během interakce rostliny s těmito herbivorními živočichy dochází buď k přímému ožeru rostlinné části, poškození rostlinných pletiv jedovatými látkami, nebo k přenosu jiných škodlivých činitelů (např. viry) (Hurňák et al. 1986). Nadměrný okus či ožer vede například k fotoinhibici, což znamená dočasné přerušení transportu elektronů. Přerušení transportu elektronů může vyústit až v fotodestrukci, kdy dochází k trvalému poškození buněčných membrán (Kmet' & Kurjak 2014). Někteří živočichové mohou rostlinu vystavovat stresu nepřímou činností. Rostlinu zatěžují ku příkladu svými výměšky a výkaly, což může vést až k úhynu rostliny (Hurňák et al. 1986).

Organizmy, které mají za zdroj potravy rostliny, se nazývají obecně jako herbivoři. Herbivoři se dělí na selektivní a neselektivní herbivory. První skupina si vybírá buď jen určité druhy rostlin, pouze určité části rostliny nebo pouze určitou vývojovou etapu rostliny. Druhá skupina požírá bez výběru celou rostlinu (Bláha et al. 2003).

### 3.1.1.1 Ochrana proti živočichům:

Aby se rostliny mohly herbivorům bránit, vyvinuly se u nich morfologické a morfogenetické adaptace. Lze uvést ostré trny, ostré trichomy, tuhá sklerenchymatická pletiva nebo i rychlá regenerace jednotlivých rostlinných částí/orgánů (Procházka et al. 1998). Rostliny jsou také schopné využívat své energetické produkty k vytvoření ochranných struktur. Ochranné struktury, jako jsou celulóza a lignin, tvoří následně skořápky či slupky okolo semen, nebo tvoří dřevité ostny na stoncích rostlin (Bláha et al. 2003).

Některé sekundární metabolity rostlin působí odpudivě či přímo toxicky na herbivory. Kvalitativně významné metabolity se sice vyskytují v nízkých koncentracích, ale jsou toxické. Jedná se o alkaloidy, glykosidy uvolňující kyanovodík a mnoho dalších (Procházka et al. 1998). Někteří škůdci si však v průběhu evoluce tolerance vytvořili rezistenci vůči těmto látkám (Procházka et al. 1998; Bláha et al. 2003). Kvantitativní metabolity se nachází v rostlinách ve větší míře, ale nejsou toxické (Bláha et al. 2003). Následkem je špatná stravitelnost, nechutnost až toxicita. Do této skupiny se řadí lignin, taniny a fenolické látky. Syntéza kvantitativních metabolitů je energeticky náročná, proto rostliny vybaveny těmito látkami zpravidla rostou pomaleji (Procházka et al. 1998).

Peterson & Higley (2000) ve své publikaci dále uvádějí, že rostliny také mohou využívat jinou strategii. Mohou růst v blízkosti jiných rostlinných druhů, které jsou konkrétními herbivory více preferovány. Bláha et al. (2003) doplňují, že řada rostlin v tropickém deštném pralese také mystifikují býložravé organismy tím, že simulují zmenšení své listové plochy střídáním zelených a tmavých barev na listové čepeli. Vytvářejí tak dojem, že jsou již herbivorem poškozeny.

### 3.1.2 Interakce s pathogenními organismy

Reakce rostlin na patogeny je rozdílná, a to podle toho, jakým škůdcem je rostlina napadena a v jaké vývojové fázi rostliny k napadení došlo. Napadení rostliny těmito organismy se projeví symptomaticky. Projev symptomů je závislý na času. Jinak vypadá projev na začátku napadení a jinak vypadá v konečné fázi napadení. Intenzita projevu symptomů je ovlivněna podmínkami prostředí (Kazda et al. 2001). Původci různých onemocnění rostlin pronikají do rostliny různými cestami. K pasivnímu průniku, čili při sání hmyzem nebo mechanickém poškození, se uchylují nejčastěji bakterie a viry. Houbové patogeny pronikají do vnitřních pletiv přes nepoškozený povrch orgánů rostlin (Šebánek et al. 1983). Bláha et al. (2003) doplňují, že řada houbových patogenů proniká do rostliny aktivně díky řadě lytických enzymů, které narušují buněčnou stěnu.

Patogenie spadá pod parazitismus. Ačkoliv parazité nezpůsobují okamžitý úhyn rostliny, přenášejí infekční onemocnění. Nejobvyklejší je přenos onemocnění za pomoci mezihostitele-nejčastěji hmyzem (Bláha et al. 2003). Průnik patogenních organismů do rostliny je značně ztížen pevnou buněčnou stěnou (Procházka et al. 1998). Odolnější rostliny mají silnější epidermis nebo i vyšší obsah ligninu, který zpevňuje buněčné stěny. Odolnost (imunita) rostlin má proti jednotlivým parazitům genetický základ (Bláha et al. 2003). Podnět k obranné reakci dává specifický metabolit (elicitor). Ten se uvolňuje při interakci buňky s patogenem. Elicitory mohou být polysacharidy, enzymy, peptidy, oligomery chitinu, glykoproteiny... Elicitor za pomoci přenašečů signálu nepřímo ovlivňuje genovou aktivitu. Nejčastěji se aktivuje tzv. fosfoinositidový systém, který při hydrolýze lipidů plasmatické membrány generuje dvě signální sloučeniny-inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol, kteří za pomoci iontů vápníku

aktivují proteinkinázy a nakonec i expresi genů (Procházka et al. 1998). Aktivací specifických genů se spustí tvorba superoxidu, který je důležitý pro zvýšenou iniciaci genové exprese (Bláha et al. 2003).

Během napadení rostliny dojde k poruchám fyziologických funkcí v různé míře. Mění se fyzikálně-chemické vlastnosti protoplazmy (především propustnost, vodní provoz, fotosyntéza i dýchání). Podstatné změny nastávají v metabolismu sacharidů, dusíkatých látek i některých kyselin (Šebánek et al. 1983).

### 3.1.2.1 Viry

Viry se množí v buňkách rostliny. Uvnitř buňky brzdí syntézu látek (Hurňák et al. 1986). Po mykózách se virózy řadí k ekonomicky nejzávažnějším chorobám a způsobují značné škody (Čača et al. 1981). Viry jsou organismy tvořené pouze RNA či DNA a bílkovinou (Kazda et al. 2001). Jejich infekčnost spočívá právě v jejich nukleové kyselině, která je tvořena i kompletními virovými částicemi (Čača et al. 1981). Viry jsou nejvíce přenášeny hmyzem a to především mšicemi a křísy (Bláha et al. 2003). Nejčastějším projevem virů je změna tvaru jednotlivých orgánů a změna barev listů či jiných částí. Viry nejvíce zasahují do normálního fungování fotosyntézy (snižují ji), zvyšují dýchání a snižují aktivitu látek, které mají za úkol usměrňovat růst (Hurňák et al. 1986).

### 3.1.2.2 Bakterie

V našem mírném pásmu mají bakterie jako původci bakteriózy menší význam než viry a houby (Čača et al. 1981). K napadení rostlin dochází pouze v případech, kdy je již rostlina nějakým mechanickým způsobem poškozena či je již poškozena jinými parazity (Hurňák et al. 1986). Bakterie náleží do třídy prokaryot. Jako fytopatogenní bakterie se nejvíce vyskytují v podobě aerobních bičíkatých tyčinek. Nejznámější patogenní rod je *Streptomyces* (Kazda et al. 2001). Příznaky bakteriózy jsou např. nekrózy, hnilobné procesy, hypertrofie, tumory a vadnutí a žloutnutí (Čača et al. 1981).

### 3.1.2.3 Houby

Ze všech původců chorob představovaly houby v roce 1981 cca 84 % ekonomicky závažných ztrát (Čača et al. 1981). Fytopatogenní houby se nachází téměř ve všech taxonech (Kazda et al. 2001). Do rostliny vnikají průduchy či poraněnými místy tak, že jejich spóry vyklíčí a následně dochází k prorůstání do těla rostliny. Na konci klíčku má spóra ztenčený hrot, kterým je schopna prorazit pokožku listu a následně do něj proniknout. Odolnost rostlin proti houbám závisí na pevnosti a síle kutikuly (Hurňák et al. 1986). Houby žijí v mezibuněčných prostorách. Jejich škodlivost spočívá především v jejich enzymatické činnosti a v toxinech, které houby produkují. Symptomy nákazy jsou nekrózy, hypertrofie a hyperplazie (Bláha et al. 2003).

### 3.1.3 Alelopatie

Pakliže si rostliny navzájem konkurují či mezi sebou mají antagonistické vztahy, mluvíme o alelopatii (Čača et al. 1981). Alelopatie je způsob boje rostlin o své místo v daném ekosystému (Bláha et al. 2003). Vybrané sekundární metabolity produkované jednou rostlinou působí na ostatní rostliny v bezprostřední blízkosti inhibičně až toxicky (Procházka et al. 1998). Alelopatické rostliny zasahují ostatní rostliny tím, že do půdy rozptylují chemické látky, které mohou bránit růstu sousedních rostlin, vychytávání živin i samotnému

klíčení (Pisula & Meiners 2010). Ze zdrojové rostliny musí být vyloučeny účinné látky v dostatečné koncentraci, aby došlo k ovlivnění cílových rostlin (Procházka et al. 1998). Pod alelopatii spadá i tzv. únava půdy, která se projevuje snížením výnosů, ale i viditelnými příznaky chorobného vztahu (Čača et al. 1981).

Alelopatie je i potencionálním vysvětlením pro problematiku invazivních druhů rostlin. Nová invazní rostlina může totiž produkovat nové evoluční chemické látky (Pisula & Meiners 2010). Citlivosti jednotlivých druhů rostlin na chemické látky jsou značně rozdílné. Z tohoto důvodu se předpokládá, že každý daný druh má rozdílné detoxikační mechanismy. Mezi nejčastější pozorované projevy alelopatie patří inhibice membránových funkcí, špatný příjem iontů, inhibice růstu buněk a klíčení (Procházka et al. 1998).

### **3.1.4 Antropogenní vlivy**

Do biotických stresů řadíme bohužel i lidskou činnost. Člověk svými činnostmi znečišťuje povrchové i podzemní vody. Ovlivňuje i atmosféru a ekosystémy. Díky lidským činnostem každoročně vymírá množství druhů organismů a snižuje se tak druhová rozmanitost. Člověk ovlivňuje globálně Zemi zemědělstvím, průmyslem, urbanizací a dopravou (Bláha et al. 2003).

## **3.2 Abiotické stresy**

Abiotický stres je především způsoben nadměrným či deficitním působením chemicko-fyzikálních činitelů. Pod abiotické stresy spadá také působení environmentálního prostředí (povodně, sucho, vysoké či nízké teploty, salinita půdy atd.) Všechny tyto environmentální faktory mohou na rostliny působit značně nepříznivě. Fytotoxické sloučeniny, jako je např. ozon, mohou taktéž poškozovat rostlinné tkáně (Shinozaki et al. 2015). Abiotické stresy patří k hlavním příčinám omezování produktivity plodin napříč světem. Nejkritičtější částí zemědělské produkce jsou neustále měnící se klimatické podmínky, čili abiotické faktory (Chakraborty & Chakraborty 2015). Pokud dochází u rostliny k abiotickému stresu, tak je zde riziko, že rostlina se stane náchylnější i ke stresu biotickému. Bylo zjištěno, že při současném výskytu biotického a abiotického stresu může docházet k překrývání různých signálních drah, které se navzájem mohou ovlivňovat či inhibovat. V nedávných studiích bylo také prokázáno, že rostliny, na které působí stresy v kombinaci, upřednostňují své obranné reakce pouze na jeden stres (Suzuki et al. 2014).

### **3.2.1 Sucho**

Voda má v ekosystému rychlý koloběh. Zásoby vody v půdě jsou proto velmi proměnlivé (Procházka et al. 1998). Optimální obsah vody je specifický pro každý rostlinný druh. Voda je pro rostlinu životně důležitá. Má nespočet funkcí. Mezi nejdůležitější funkce patří: termoregulace, rozpouštěcí schopnost (translokace), stavební složka a schopnost fotosyntetizovat (Nováček 2008). Časté sucho v kombinaci s vysokými teplotami je hrozcí nebezpečí globálního oteplování v zemědělství. Sucho mění strukturu i samotnou funkci rostlin (Shabala 2017). Chakraborty & Chakraborty (2015) doplňují, že expozice tepelnému stresu může způsobit řadu změn v morfologii, anatomii a fyziologii rostlin. Toto vede až k přeskupení buněk, což negativně ovlivňuje růst a samotný vývoj rostliny. V konečném důsledku nastává snížení výnosu. Lidská populace neustále roste a z tohoto důvodu je vyvíjen velký tlak na zemědělství a produkci plodin (Shinozaki et al. 2015). Aby zemědělství bylo schopné zajistit zdroj potravy pro narůstající lidskou populaci, je nutné šlechtění nových kultivarů. Nezbytné pro rozvoj kultivarů tolerujících sucho je pochopení dopadu, mechanismů a vlastností, které jsou

základem tolerance sucha (Shabala 2017). Je zde snaha nalézt QTL geny (quantitative trait locus), které jsou úzce spjaty s tolerancí a odolností vůči suchu (Hnilička & Středa 2016). Jedná se o geny, které jsou základem kvantitativních znaků (Kearsey 1998). Komplikace ve šlechtění vůči suchu spočívá v nízké heritabilitě této polygenní vlastnosti (Hnilička & Středa 2016).

Z meteorologického hlediska je sucho obdobím s výrazně méně srážkami (Jenks & Hasegawa 2014). Doplnování vody srážkami není navíc ani pravidelné (Procházka et al. 1998). Voda se doplňuje nejen v podobě atmosférických srážek (děšť, sníh), ale i kondenzačními srážkami (mlha, rosa). Množství srážek, které dopadají na danou lokaci, je dáno zeměpisnou polohou i nadmořskou výškou. Množství srážek pro Českou republiku bylo v roce 1986 500 až 600 mm za rok (Slavíková 1986). Jsou ale i případy, kdy sucho nesouvisí pouze s nedostatkem srážek. V jistých lokalitách se zvýšeným obsahem soli v půdě může tato sůl ztěžovat příjem vody rostlinnými kořeny, ačkoliv množství vody v půdě je dostačující (Shinozaki et al. 2015). Pro zdárný růst a vývoj rostlin je důležité správné rozložení srážek přes celý rok. Pokud je přes rok přetrvávající sucho s malým výskytem srážek, dochází ke značnému omezení rozšíření rostlin (Slavíková 1986).

I pouze malé změny v zásobování vodou ze země mohou zhoršit denní příjem vody rostlinou. Během dne jsou tak rostliny vystavovány dehydrataci. Přes den má rostlina svá stomata otevřena a je nízká relativní vlhkost. To se mění v noci, kdy jsou ale stomata zavřená a rehydratují se. Průduchy reagují na světlo. Otevírají se, jakmile je dostatek světla pro fotosyntézu. Po západu slunce, kdy již není dostatek světla, se průduchy zavírají (Vlasáková 2011). Rostlina při přetrvávajícím suchu nakonec nebude schopna udržet hydrataci ani při zavřených stomatech (Jenks & Hasegawa 2014). Bylo prokázáno, že rostliny mohou při rychlé transpiraci ztrácet rychleji vodu. Rostliny jsou však v tomto případě schopné přivřít průduchy a zpomalit tak transpiraci, a to bez ohledu na vodní potenciál listů, který se nemusel změnit. Reakce rostliny na vodní deficit vzniká v kořenech a signál je následně přenášen do nadzemních částí rostlin (Gloser 2014). Kořen je část rostliny, která primárně zodpovídá za příjem vody. Kořenové vlásky rostoucí z kořene slouží ke zvětšení plochy kořene a tím dochází i k většímu příjmu vody (Slavíková 1986).

Stav vody v rostlině nám udává tzv. vodní potenciál (Gloser 2014). Vodní potenciál vzduchu v oblasti listů je velmi nízký, to je důvod, proč jsou rostliny vystavovány nebezpečí vodního stresu (Procházka et al. 1998). Jednotkou vodního potenciálu je pascal (Jenks & Hasegawa 2014). Měřením vodního potenciálu listů se dá stanovit stres suchem. V hodnotách do -0,5 MPa se jedná o mírný stres, kdy rostlina zpomalí svůj růst. Při hodnotách -0,5 do -1,5 MPa se jedná o střední stres. V hodnotách pod -1,5 MPa se jedná již o velmi silný stres a dochází k vadnutí rostlin v důsledku prudkého poklesu turgorového tlaku v buňkách listů (Procházka et al. 1998; Hnilička & Středa 2016). Pakliže vodní potenciál dosáhne hodnoty okolo -1,0 MPa, dochází u některých druhů k syntéze aminokyseliny prolinu, cukrů, alkoholů a dalších látek. Pokud nedostatek vody bude přetrvávat, pak se začnou projevovat metabolické změny. Největší a nejznatelnější metabolické změny se týkají fotosyntézy a transportních vlastností buněk (Bláha et al. 2003).

### 3.2.1.1 Poškození suchem

Reakci rostliny na vodní deficit může ovlivňovat mnoho faktorů, včetně trvání nedostatku vody, rychlosti nástupu a potažmo možné aklimatizace na stres (Shinozaki et al. 2015). Při nedostatku vody se snižuje nejen růst a schopnost rostlin fotosyntetizovat, dochází i ke snižování aktivity řady enzymů (Bláha et al. 2003). Snižováním své aktivity jsou specifické



např. nitrátreduktázy. Některé enzymy ale naopak svoji aktivitu zvyšují. Jedná se o  $\alpha$ -amylázy, ribonukleázy a o některé hydrolázy (Procházka et al. 1998). Sucho jde ruku v ruce s vysokými teplotami. Pakliže dojde k překročení teploty nad enzymová metabolická optima, dochází k inaktivaci až denaturaci enzymů (Begon et al. 1997). Při teplotě nad 40°C dochází u rostlin k závažným změnám ve vlastnostech buněčných membrán a proteinů (Procházka et al. 1998). Přesto ale byl objeven antagonistický vztah mezi suchem a vysokými teplotami. Během vysokých teplot mají rostliny svá stomata otevřená, aby docházelo k ochlazování listů. V kombinaci se suchem jsou ale stomata zavřená. Dochází tak ke zvýšení teploty na povrchu listů a ke snížení aktivity fotosyntézy (Shaar-Moshe et al. 2017).

Za přímý účinek sucha se pak považuje vadnutí v důsledku poklesu turgoru a ztráty vodivosti pletiv xylému (Hnilička & Středa 2016). Turgor hraje velkou roli v růstu a v prodlužování buněk. Je taktéž důležitý pro otevírání průduchů, pohyb listů a květních obalů. Pro správné udržení turgidity je nutný stálý přísun vody (Bláha et al. 2003). Nejcitlivěji reagují buňky zajišťující dlouhivý růst buněk. Rychlost růstu totiž značně závisí na turgorovém tlaku. K největšímu poškození dochází na listech (Procházka et al. 1998). Při deficitu vody stoupá vodní potenciál do stále zápornějších hodnot. Rostlina nedokáže vodou zaplnit xylém, což vede k tzv. kativaci, která vede ke ztrátě turgoru a vadnutí rostlin (Shabala 2017).

V důsledku sucha rostlina omezuje svoji fotosyntézu a tím dochází k menšímu příjmu CO<sub>2</sub>. Jsou dva způsoby, jak dochází k omezení fotosyntézy, a to konkrétně stomatální a nestomatální inhibicí. Zkoumáním určitých druhů rostlin bylo zjištěno, že dočasně může být při nestomatální inhibici v mezibuněčných prostorách zvýšený obsah CO<sub>2</sub>. Tato zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> pak způsobuje uzavření průduchů (Bláha et al. 2003). Na snížení aktivity fotosyntézy mají taktéž vliv chloroplasty, které snižují v důsledku sucha svoji aktivitu. K tomu dochází primárně z důvodu uzavření průduchů, čímž se sníží dostupnost CO<sub>2</sub> v chloroplastech (Vlasáková 2011).

### 3.2.1.2 **Adaptace na sucho**

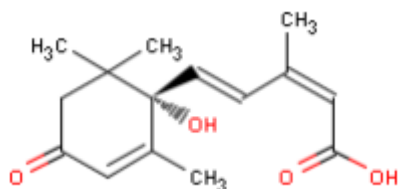
Rostlina brání úbytku vody chráněním svých odpařovacích ploch, např. uzavřením průduchů (Begon et al. 1997). Průduchy jsou pro rostlinu velmi důležité, jednak zajišťují transpiraci, chod fotosyntézy, a jednak regulují příjem CO<sub>2</sub> (Vlasáková 2011). Co se týče vodního potenciálu, mechanismy předcházející suchu se snaží zachovat homeostázu tím, že šetří vodu a udržují potenciál vody v tkáních na vysoké úrovni (Jenks & Hasegawa 2014). Další taktikou rostliny, jak se vyhnout vodnímu stresu je zredukování listové plochy, nižší vzrůst, svinování listů a tvorba voskové vrstvy, která brání neproduktivní transpiraci odrážením sluneční radiace. Díky voskové vrstvě se list ochlazuje a snižuje transpiraci bez ohledu na nutnost uzavření průduchů (Hnilička & Středa 2016). Krátký životní cyklus rostliny taktéž chrání rostlinu před obdobím sucha (např. dřívější kvetení, nasazení semen) (Řepková 2013).

Určité rostliny snášejí sucho bez zjevné ztráty turgoru. Pro získání vody z půdy musí kořen rostliny upravit gradient vodního potenciálu tak, aby voda proudila směrem k povrchu. To znamená, že vodní potenciál musí být nižší než v okolní půdě. Mnohé rostliny také provádí úpravu svého osmotického potenciálu tím, že začnou regulovat počet rozpuštěných látek. Osmotická úprava je výsledkem čistého nárůstu počtu rozpuštěných látek v buňkách (Shinozaki et al. 2015). Osmotický tlak je rostlina schopná regulovat akumulací některých látek, jako např. prolinem, sacharidy či proteiny ze skupiny dehydrinů (Hnilička & Středa 2016). Dehydriny plní v rostlině obdobnou funkci jako osmotika (Řepková 2013). Předpokládá se, že osmotická úprava je zásadní v procesu aklimatizace rostliny na sucho (Shinozaki et al. 2015).

### 3.2.1.3 Biochemie stresu suchem

Plasmatická membrána je první, která čelí nadměrnému teplu. Po začátku stresu buňky plasmatické membrány začnou vysílat signály a na základě těchto signálů začne probíhat exprese genů (Chakraborty & Chakraborty 2015). Snímání stresu provádějí membránově vázané receptory, které signál posílají do intrasignalizační sítě rostliny. Mezi dva nejdůležitější snímací proteiny patří kinázy a histidinkinázy. Transdukcce signálu je složitý jev, protože stres ze sucha může přijít v různých fázích vývoje. Přesný mechanismus, jak receptory přenáší stresové signály na navazující signální molekuly, není doposud zcela objasněn (Tuteja & Gill 2016).

Genů podílejících se na stresové reakci je celá škála. Geny zapojené ve stresové odpovědi na sucho konkrétně kódují dvě skupiny proteinů. První skupina proteinů zajišťuje toleranci ke stresu suchem, a to konkrétně produkcí enzymů, které hrají roli v biosyntéze osmolytů, produkcí proteinů vodních kanálů, produkcí detoxikačních enzymů, dále syntézou transportních bílkovin cukrů, prolinu a proteázy. Druhá skupina proteinů má na starost bílkoviny (např. proteinkináza), které se účastní přenosu signálu a expresi genů, které jsou pro stresovou reakci důležité jako transkripční faktory (Hnilička & Středa 2016). Během nedostatku vody reaguje rostlina syntézou mnoha látek. Za nejdůležitější látku se považuje abscisová kyselina (ABA). Její syntéza je jedna z prvních po detekci sucha v signalizačním procesu (Tuteja & Gill 2016). ABA má primárně za úkol v listech uzavírání průduchů (Bláha et al. 2003). Geny, které se podílí reakcí na vodní deficit lze zařadit do 3 skupin, a to dle jejich citlivosti k ABA. Neresponzivní k ABA jsou geny, u kterých je jejich exprese regulována nedostatkem vody. Ovšem nereagují na ABA, která byla dodána z vnějšku. Jako responzivní k ABA lze charakterizovat geny, u kterých je jejich exprese podnícena nedostatkem vody či dodáním ABA z vnějšku. Poslední jsou geny, které ke své expresi potřebují ABA (Řepková 2013). Místo syntézy ABA v rostlině je v cytoplazmě, kde se následně i hromadí. Místo hromadění ABA najdeme i v chloroplastech. Bylo popsáno, že ABA vzniká z větších molekul, zřejmě se jedná o molekuly karotenoidů. Při působení stresoru se ABA transpiračním proudem přemístí ke svěracím buňkám (Vlasáková 2011). K tomu dochází již při vadnutí listů. Koncentrace ABA se v rostlině může během 20-30 minut zvýšit až 50x. Následně po přesunu ABA z cytoplazmy, v listech dochází k uzavírání průduchů (Řepková 2013). Na koncentraci ABA v jejím místě působení závisí na pH apoplastu v listech. Během stresu dochází ke zvyšování pH v apoplastech a ABA jako slabá kyselina se pohybuje z buněk právě do apoplastu, a tím se zvyšuje přivírání průduchů (Gloser 2014). Po uzavření průduchů nastává pokles v rychlosti výměny plynů. Tím se pak sníží rychlost fotosyntézy a transpirace (Procházka et al. 1998). Signály ABA jsou vnímány různými buněčnými receptory (Jain et al. 2014).



Obr. č. 2. Chemický vzorec abscisové kyseliny. (Vlasáková 2011)

### 3.2.2 Chlad a mráz

Řadu let jsou nepříznivé teploty uznávané jako stresory. Tyto stresy mají velký dopad na růst rostlin. Rostliny jsou v rámci svých rostlinných druhů různě citlivé k nízkým teplotám. K nejvíce zasaženým druhům patří rostliny z tropického a subtropického pásma (Shabala 2017). Chlad a mráz omezují rostliny i v dalších faktorech. Díky nízkým teplotám dochází k omezení přežití i hojnosti ekosystému (Ahmad et al. 2019). Jednotlivé rostlinné funkce mají tzv. teplotní hranici (Slavíková 1986). Většina rostlin má optimální teplotu v rozsahu 20 až 25 °C. U mnoha rostlin hrozí poškození chladem již při 10 °C v důsledku destrukce membránových struktur (Begon et al. 1997). Pokud dojde k překročení ideální teplotní hranice, dochází k poškození protoplazmy buněk, což může vyústit až k jejich odumření (Slavíková 1986). Některé rostliny jsou vůči nízkým teplotám odolné a expozice stresem u nich může vyústit až k vývojovým změnám. U druhů, které se nedokážou se stresem správně vyrovnat, dochází k nachlazení. Získání tolerance vůči nepříznivým teplotám je spojeno se změnou v obsahu metabolitů. Dochází ke hromadění rozpustných cukrů, dehydrinů a látek, které mají detoxikační vlastnosti proti reaktivním formám kyslíku. Proces nachlazení neprobíhá pouze jedním mechanismem. Nachlazení je vnímáno velkou škálou sensorických úrovní (Shabala 2017). Větší náchylnost k teplotním stresům mají užitkové rostliny. Pro stupeň poškození rostliny chladem je důležitá doba expozice tohoto stresoru (Procházka et al. 1998). Poškození se tedy nemusí projevit okamžitě (Bláha et al. 2003). Okurkové listy jsou například poškozovány až po týdenní expozici, kdy teplota dosahovala okolo 10 °C. Nejcitlivěji reagují na chlad květní orgány, které se nachází v raném stádiu vývoje (Procházka et al. 1998).

Je nutné rozlišovat citlivost na chlad a citlivost na mráz. Jako chladový stresor se označuje teplota, která se pohybuje nad bodem mrazu. K poškození rostlin tak dochází i při teplotách nad bodem mrazu. Většina rostlin v našem podnebném pásmu je proti mrazu odolná (Bláha et al. 2003). Chladový stres na rozdíl od mrazu musí působit déle, aby se poškození mohlo projevit (Begon et al. 1997; Shinozaki et al. 2015).

Nízké teploty ovšem nejsou pouze negativně působící. Vystavení chladovým teplotám je nutné k urychlení přechodu z vegetativní fáze do fáze reprodukční. Chladné teploty jsou taktéž nutné pro tvorbu pupenů a v neposlední řadě lze chladem aktivovat semena, která nebyla činná (Shabala 2017).

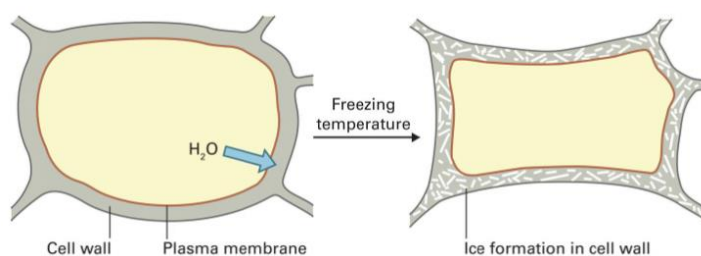
#### 3.2.2.1 Poškození chladem a mrazem

Přímý účinek **poškození chladem** zahrnuje ztuhnutí membránových proteinů a snížení aktivity enzymů, k čemuž dochází během krátké doby. Nepřímý účinek zahrnuje únik rozpuštěných látek, nerovnováhu v dýchání a fotosyntéze, hromadění toxických látek a v důsledku ztráty vody i vadnutí (Shinozaki et al. 2015). Bylo taktéž prokázáno, že chladový stres zvyšuje akumulaci singletního kyslíku, peroxidu vodíku a superoxidových radikálů. Mezi různé příznaky nachlazení rostliny patří špatné klíčení, zakrnělé sazenice, zežloutnutí listů a vadnutí (Tuteja & Gill 2016). Zrychlením dýchání se rostlina snaží vyrovnat poškození a přizpůsobit se (Bláha et al. 2003). Dále Bláha et al. (2003) ve své publikaci uvádí fakt, že při teplotě v rozmezí 0-5 °C se průduchy uzavírají, a tím se proces dýchání znemožní.

Během namáhání rostliny chladem dochází ke snižování schopnosti fotosyntetizovat, což zásadně omezuje její životní projevy (Ahmad et al. 2019). Nízká teplota výrazně poškozují elektronový transportní řetězec, ale nevykazuje takřka žádný vliv na příjem fotoenergie. Následkem toho jsou chloroplasty vystaveny nadměrné excitační energii a při

souběžné produkci ROS dochází k fotodestrukci molekul kyslíku. Vzniká oxidační stres se zvýšenou hladinou volných radikálů, který poškozuje membránové lipidy a proteiny, taktéž poškozuje makromolekuly v chloroplastech (Shinozaki et al. 2015). K nejvíce zasaženým organelám patří právě chloroplasty, méně pak mitochondrie a peroxizomy. Bláha et al. (2003) doplňují, že tyto změny jsou vratné. Záleží však na délce expozice chladem. Platí, že čím déle působil na rostlinu chlad, tím delší je pak návrat k normální fotosyntéze a dýchání. Byly taktéž pozorovány změny ve struktuře cytoskeletu. Naopak plasmatická membrána je vůči chladu stabilní (Procházka et al. 1998). Shinozaki et al. (2015) ale dodávají, že plasmatická membrána je vlivem mrazu primárně poškozena. Největší poškození způsobuje chlad ve fyzikálně-chemických vlastnostech jednotlivých membrán. Za normálních okolností má lipidová dvojvrstva polotekutou konzistenci. Vlivem chladu přechází z této konzistence na konzistenci gelovitou (Shinozaki et al. 2015). Příčinou změny stavu konzistence je oslabení vazby lipidů k membránovým proteinům. Po uběhnutí určité doby dojde k vyčerpání energetických zásob a odumření buněk (Procházka et al. 1998). Při nízké teplotě taktéž dochází ke zpomalování metabolických procesů či může dojít až k jejich úplnému útlumu (Begon et al. 1997).

Nebezpečí **stresu mrazem** spočívá v tvorbě ledových krystalů a jejich růstu v extracelulárních prostorech. Zmrazení vody v extracelulárních prostorech má za následek osmotickou dehydrataci. Dochází ke zvýšení koncentrace rozpustných látek uvnitř buňky. Zvýšená koncentrace rozpustných látek v cytoplasmě a dalších extracelulárních prostorech může inaktivovat enzymatické a transportní aktivity, které jsou spojené s membránou (Shinozaki et al. 2015). Led se může nacházet ve všech částech rostliny, které jsou bohaté na vodu. Způsobuje nevratné poškození struktur a k nevratnému poškození buněk (Procházka et al. 1998). Led taktéž dle Shinozakiho et al. (2015) deformuje buňku a ledové krystaly mohou přímo poškodit plasmatickou membránu. Vzniká tak inverzní šestiúhelníková membránová struktura vlivem buněčné dehydratace a tvoří se led v extracelulárních prostorech (Sakina et al. 2019). Během delšího působení mrazu se krystaly ledu mohou zvětšovat, a to z důvodu transportem vody z cytosolu vzhledem k nízkému vodnímu potenciálu na povrchu ledu. Rostoucí krystaly ledu pronikají z apoplastu do okolních tkání a zároveň podporují další tuhnutí vody v buňkách (Procházka et al. 1998; Bláha et al. 2003). Voda v xylémech rostlin začíná mrznout při teplotě -1 až -3 °C. Proces mrznutí závisí na obsahu osmotik, které přispívají ke snížení bodu tuhnutí. K tvorbě krystalů jsou nutná vhodná krystalizační jádra. Pakliže nejsou přítomna, tak voda zůstává v podchlazeném tekutém stavu (Procházka et al. 1998). Zmrazení vede k acidifikaci cytoplasmy, pravděpodobně z důsledku poruchy transportních systémů  $H^+$ , které jsou spojené s tonoplastem. Tato způsobená acidifikace významně ovlivňuje metabolické reakce v cytoplasmě (Shinozaki et al. 2015).



Obr. č. 3. Deformace buňky vlivem vzniklých ledových krystalů. (Buchanan, Grussem & Jones 2015)

### 3.2.2.2 **Adaptace na chlad a mráz**

Aby se rostlina mohla proti nižším teplotám bránit, musí se tzv. aklimatizovat. Jako účinná ochrana proti chladu působí hromadění osmoticky aktivních látek. Neméně důležitá je tvorba stresových hormonů (Procházka et al. 1998). Dalšími důležitými prvky jsou i fytohormony, především ABA (Bláha et al. 2003). V lipidové vrstvě membrán dochází ke změnám chemického složení (Procházka et al. 1998). Zvyšuje se zastoupení nenasycených mastných kyselin, což vede ke snížení teploty přechodu z polotekuté konzistence na gelovitou v lipidové dvojvrstvě (Bláha et al. 2003). Další důležitou roli v obraně proti nachlazení hraje i fyziologický věk dané rostliny. U některých druhů bylo zpozorováno, že starší listy jsou proti nachlazení odolnější, než listy mladší (Shabala 2017).

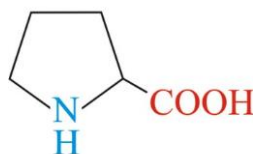
Velkou v roli v tom, zda rostliny přežijí teploty pod bodem mrazu, hraje genotyp. Rostliny původem z mírného či subarktického pásma přežívají teploty pod bodem mrazu. Některé druhy přežívají i teplotu pod  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jejich odolnost vůči mrazu ale netrvá celé jejich vegetační období. Tolerance na stres na teplotu pod bodem mrazu se vyvíjí v procesu aklimatizace za studena. Jedná se o teploty, které nejsou mrazivé, ale které se vyskytují právě před mrazem (Shinozaki et al. 2015). Odolnost vůči mrazu se nazývá mrazuvzdornost. Mrazuvzdornost spojujeme s rostlinami jako schopnost zabránit tvorbě ledových krystalů v buňkách a tolerovat jejich odvodnění, pakliže dojde k zamrznutí vody v apoplastu (Procházka et al. 1998). Rostlina sníží bod tuhnutí tím, že zvýší koncentraci osmoticky aktivních látek, jako jsou cukry, aminokyseliny apod. (Bláha et al. 2003). Tento mechanismus ovšem funguje pouze za mírných mrazů. Pro rostliny je nejdůležitější obranou i při silných mrazech udržovat vodu v buňkách v tekutém stavu. Slabá buněčná stěna nedokáže zabránit hrozící deformaci buňky. Pouze silná buněčná stěna je schopná udržet tvar buňky a zabránit její deformaci při tvorbě ledu v apoplastu a při dehydrataci cytosolu (Procházka et al. 2003).

### 3.2.2.3 **Biochemie stresu chladem a mrazem**

Jakmile teplota klesne pod hraniční limit rostliny, dojde k aktivizaci signálních drah (Shabala 2017). U huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) bylo identifikováno 19 mikroRNA genů, u kterých byly nalezeny změny při vystavení chladovému stresu. Tyto mikroRNA geny přímo či nepřímo ovlivňují různé signální dráhy (Sakina et al. 2019). Signální dráhy jsou kaskády reakcí, které jsou vysoce regulované (Pirzadah et al. 2014). Je zde domněnka, že změny v membránové tekutosti hrají roli při snímání poklesu teploty mimo buňku (Shinozaki et al. 2015). Existuje hned několik signálních drah, kterými je informace o chladu přenášena. Jedná se o složky ROS, proteinkinázy, ABA a  $\text{Ca}^{2+}$ , přičemž ABA se ukazuje jako nejlepší (Pirzadah et al. 2014; Gull et al. 2019). Koncentrace ABA se rapidně zvyšuje v počátečních fázích reakce. Uzavřením průduchů reguluje stav vody. ABA taktéž stimuluje expresi řady genů, které souvisí se stresem, včetně transkripčních faktorů, které jsou nenahraditelné v procesu přeprogramování metabolismu. Bylo zjištěno, že se zvýšenou koncentrací ABA se ve stejném časovém úseku snížil obsah stresových hormonů, konkrétně salicylové kyseliny a jasmonové kyseliny. Tento jev byl zjištěn během rané fáze reakce pšenice na stres. Může se tedy jednat o možný antagonistický vztah (Thomas et al. 2016). Proteiny, které se účastní reakce na chladový stres, se nazývají nemrznoucí proteiny (AFP) a aktivují se pouze v případě, kdy je rostlina vystavena nízké teplotě. Tyto bílkoviny jsou uvolňovány z apoplastu vegetativních i reproduktivních výhonků, včetně listů a nachází se ve velkých koncentracích. AFP inhibují agregaci molekul vody na zvětšujícím se krystalu a tím zabraňují dalšímu růstu krystalu (Pirzadah et al. 2014; Thomas et al. 2016). Bláha et al. (2003) doplňují informaci o AFP o fakt, že tyto proteiny mají schopnost přilnout na povrch vznikajících krystalů a právě díky tomu se

růst krystalu zpomalí. Účinek AFP regulují ionty  $\text{Ca}^{2+}$ , které se uvolňují z pektinu nebo se vážou na specifické proteiny (Pirzadah et al. 2014). Existují také proteiny teplotního šoku (HSP), které vykazují funkci dozoru (Thomas et al. 2016). O HSP se dříve tradovalo, že mají termoprotektivní roli při vysokých teplotách. U některých druhů se však obsah HSP zvyšoval i při nízkých teplotách. Později bylo potvrzeno, že hrají ochrannou roli při všech teplotních šocích a při udržování homeostázy. Ve významných koncentracích se objevují pouze v podmínkách stresu. HSP jsou zodpovědné za termotoleranci, překlad DNA, skládání a stabilizaci proteinů v zátěžových podmínkách. Pomáhají a udržují tempo v různých biochemických reakcích v rámci udržení i obnovy proteinů v nativní konformaci a tím udržují již zmíněnou homeostázu (Pirzadah et al. 2014). Neméně důležitou složkou v biochemii stresu chladem a mrazem jsou dehydriny. Dehydriny jsou tepelně stabilní LEA proteiny, které jsou bohaté na glycin či lysin, a stimulují se při vystavení stresových podmínek za nízkých teplot, které vedou obvykle k dehydrataci (Pirzadah et al. 2014; Sakina et al. 2019). Brání destabilizaci membrán, ke které dochází vlivem osmotického působení při vzniku krystalů vody (Shabala 2017).

Během stresu za nízkých teplot také dochází ke hromadění dusíkatých látek (Pirzadah et al. 2014). Během chladového stresu byly objeveny změny na úrovni exprese genů pro GLU a PRO. Byla prokázána pozitivní korelace mezi hladinou PRO a tolerancí vůči mrazu (Thomas et al. 2016). Prolin má zásadní roli v primárním metabolismu (Pirzadah et al. 2014). Významnou funkcí prolinu je vyrovnávání osmotického účinku tvorby ledu v apoplastu, dokáže stabilizovat i membrány. Taktéž dokáže stabilizovat proteiny a je nápomocný i při tvorbě peptidů (Shabala 2017). Některé zdroje uvádějí, že biosyntéza prolinu je regulována světlem a osmotickým stresem. Prekurzorem prolinu je glutamát a ornithin, přičemž jeho následná syntéza probíhá v cytosolu či v chloroplastu (Pirzadah et al. 2014).



Obr. č. 4. Chemická struktura aminokyseliny Prolinu  
(Dostupné z:  
<https://glossary.periodni.com/glossary.php?en=proline>  
ke dni 9. 2. 2021)

### 3.2.3 Zasolení půdy

Jedná se o současný problém, který se v budoucnu stane ještě kritičtější. Různé druhy jsou na zasolení různě citlivé a je zde velká variabilita. Obecně však platí, že rostliny jsou na zasolení citlivé (Thomas et al. 2016). Existují rostliny nazývané jako halofyty, které snášejí zasolení. Naopak rostliny, které se označují jako glykofyty, nesnášejí zasolení (Hnilička & Středa 2016). V průběhu roku se koncentrace solí v půdě mění a dále se mění v závislosti na srážkách a teplotách (Bláha et al. 2003).

Zasolené půdy vznikají vlivem špatné techniky zavlažování a používání nadměrného množství hnojiv (Gull et al. 2019). Přibližně 7 % světové rozlohy, 20 % světově obdělávané půdy a téměř polovina zavlažovaných půd je postižena vysokým obsahem solí. K zasolení může potenciálně docházet i v okolí silnic, kdy se během zimy komunikace posypávají posypovou solí (Procházka et al. 1998). Zasolení negativně ovlivňuje produkci plodin (Singh 2016). Při

stresu ze zasolení se nedaří rostlinám udržet potřebnou rovnováhu vedoucí k potlačenému růstu a produkci (kadukov et al. 2014). V půdě je široké zastoupení různých druhů solí, nejnebezpečnější je chlorid sodný. Chlorid sodný má dominantní postavení, a to z důvodu dobré rozpustnosti a následnou vysokou koncentrací  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  iontů v půdě. U většiny druhů rostlin je nejtoxičtější iont  $\text{Na}^+$  (Thomas et al. 2016). Obecně je známo, že  $\text{Na}^+$  soutěží s  $\text{K}^+$  ionty o vstup do rostliny kvůli podobným vlastnostem (Tuteja & Gill 2016).

### 3.2.3.1 Poškození při zasolení

Pakliže se dosáhne vysoké koncentrace  $\text{NaCl}$  v kořenové zóně, spustí se osmotický a iontový stres. Osmotický stres vzniká, když se sůl začne hromadit v půdním roztoku. Začne se zvyšovat osmolalita a naopak se začne snižovat vodní potenciál. Snížení vodního potenciálu brání kořenům rostlin přijímat vodu. Iontovým stresem rozumíme nepřiměřené hromadění  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  (Roosa 2015).  $\text{Na}^+$  se do rostliny dostává pasivním pohybem. Uvnitř může buď zůstat v cytosolu, nebo se může přesunout do vakuoly a tam setrvat, či se hromadit v apoplastu. Z apoplastu může opětovně vstupovat do buněk. Nejvíce bývá nacházen v xylému rostlin, kde se následně ukládá v listech (Thomas et al. 2016). Rostliny, které se na zasolení nezadaptovaly, hromadí ve svých buňkách ionty solí, čímž dojde ke značnému omezení funkce enzymatické činnosti. K největšímu hromadění soli v rostlině dochází v listech (Procházka et al. 1998). Některé rostliny snášející zasolení mohou především  $\text{Ca}^{2+}$  ionty z listů vytlačovat přes specializované solné žlázy. Tato modifikace je však vzácná (Thomas et al. 2016). Během krátké doby dojde k zastavení dělivého i dlouhivého růstu, až nakonec dojde ke skonu celé rostliny (Procházka et al. 1998). Při stresu zasolením bývají vidět nejčastěji 4 symptomy. Rostliny vystavené nadměrnému množství soli mívají nažloutlé listy (příčina zřejmě bude předčasná senzibilace listů), pomalý vývoj nových listů, růst menších listů a zhoršené odnožování (Thomas et al. 2016).

Stres ze zasolení je komplexní povahy. Kromě vysoké koncentrace solí, bývá problém i nízký vodní potenciál a zhoršené vlastnosti půdy (Procházka et al. 1998).

### 3.2.3.2 Adaptace na zasolení půdy

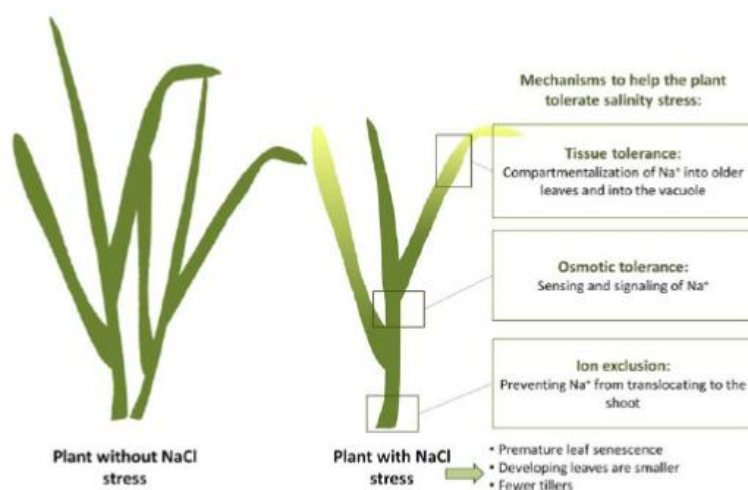
Iontová homeostáza je klíčová pro toleranci nadměrného množství soli. Vyjma deficitu vody způsobují změny poměru  $\text{K}^+$  a  $\text{Na}^+$  iontový stres. Ke změnám v poměru dochází z důvodu přesunu  $\text{Na}^+$  přes  $\text{K}^+$  transportní systém. Fyziologická koncentrace  $\text{K}^+$  je mezi 100- 150 mM a je nezbytná pro syntézu proteinů in vitro. Tuto funkci  $\text{Na}^+$  inhibuje už při koncentraci nad 100 mM (Chakraborty & Chakraborty 2015). Shabala (2017) doplňuje, že aby byl zachován standardní růst, musí rostlina upravit zvýšenou vnější osmolalitu. Toho rostlina může dosáhnout hromaděním různých molekul v cytoplasmě. Tím zabrání působení vnějšího osmotického tlaku. Existují 3 různé cesty, jak toho docílit:

1. Akumulace řady organických osmolytů, které přijímá z vnějších médií.
2. Syntéza de novo kompatibilních rozpuštěných látek a tím dosáhnout osmotické úpravy.
3. Rostliny mohou využít spíše anorganické osmolyty.

Využívání organických osmolytů je nejpreferovanější možnost. Jedná se především o cukry a aminokyseliny. Mohou být akumulovány v buňkách ve vysokých koncentracích, aniž by ovlivňovaly metabolismus buňky. Rostliny tyto osmolyty ve většině případů syntetizují de novo z důvodu jejich nízkého zastoupení v půdě (Shabala 2017). Osmolyty chrání enzymy před denaturací, stabilizují membrány, nebo zprostředkovávají právě osmotické úpravy. Mezi

osmolyty se řadí i prolin a glycin betain. Prolin má v rostlině řadu funkcí. Stabilizuje membrány, funguje jako osmolyt a zachycuje volné radikály vzniklých za stresových podmínek. Glycin betain kromě osmolytické funkce také degraduje ROS vzniklých za stresových situací. Výskyt glycin betainů není tak častý jako u prolinu. Neméně důležitá je i salicylová kyselina, která obnovuje membránový potenciál (Singh 2016).

Role xylému při adaptaci na zasolení je nenahraditelná. Právě xylém je zasolením nejvíce zatížen. Mechanismus tolerance, kterou lze přičíst parenchymovým buňkám xylému, spočívá v omezení iontové zátěže v xylému a tím pádem snížením koncentrace  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  v listech (Roosa 2015).



Obr. č. 5. Viditelné změny vzhledu rostlin při působení  $\text{NaCl}$ . (Roosa 2015)

### 3.2.3.3 Biochemie stresu zasolením

Změny v osmotické a iontové homeostáze spustí sled reakcí, které vedou ke změnám metabolismu, výměně plynů, hormonální rovnováze a k produkci ROS, čímž se sníží expanze a dělení buněk. Výsledkem je omezení růstu a zvýšení citlivosti tkání. Primární signály ze snímání stresu jsou vnímány při iontové nerovnováze a při hyperosmotickém stresu. V plasmatické membráně rostlinných buněk dochází ke zpracování signálu (Chakraborty & Chakraborty 2015). Primární signály ze snímání stresu jsou vnímány při iontové nerovnováze a při hyperosmotickém stresu. Primární signály jsou následovány sekundárními signály, jež produkují ABA a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . S nástupem solného stresu byla zaznamenána změna v obsahu cytosolických  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  řídí kalciové kanály lokalizované ve vakuolární membráně a v endoplasmatickém retikulu (Tuteja & Gill 2016). Jako první se při stresu ze zasolení začne syntetizovat ABA, která se začne transportovat do buněk, kde začne uzavírat průduchy. Zavřené průduchy způsobí omezení fotosyntézy až k fotoinhibici a oxidačnímu stresu (Gull et al. 2019). ABA taktéž společně s ROS regulují osmotickou a iontovou homeostázu. Senzory pro  $\text{Na}^+$  taktéž řídí cytosolické  $\text{Ca}^{2+}$ , který má dvě zásadní funkce. Plní roli kritické signalizační funkce (SOS signální dráha) pro regulaci homeostázy a inhibiční funkci pro vstup  $\text{Na}^+$  do rostliny (Chakraborty & Chakraborty 2015).



Byly prováděny pokusy u kultur *Arabidopsis Thaliana*. U těchto pokusů bylo zjištěno, že přibližně 24 hodin po expozici solným stresem se v rostlině koncentruje velké množství glycerolu a inositolu. Po 48 hodinách dochází ke hromadění laktátu a sacharózy (Gull et al. 2019).

### 3.2.4 Toxické a těžké kovy

Platí, že jako těžké kovy se označují kovy s molekulovou hmotností větší než 20 g/mol a nebo hustotou větší než 5 g/ml (Shahid et al. 2015; Fryzova et al. 2018). Do této skupiny se řadí zástupci z řad přechodových kovů, lanthanoidů a aktinoidů (Shahid et al. 2016). Těžké kovy negativně ovlivňují fyziologii růstu rostlin, ale představují i vážné nebezpečí pro lidské zdraví, pokud se dostanou do potravy v rámci potravinového řetězce (Kumar & Trivedi 2016). Některé kovy jako jsou například: Cu, Zn, Ni, Mo, Mn, Co a Cr mají ale zásadní biologický význam pro rostliny. V rostlině jsou nezbytnými prvky pro správné metabolické fungování (Shahid et al. 2016). Např. zinek je nepostradatelný prvek pro stabilitu proteinů. Podílí se na regulaci transkripce a translace. Železo a měď jsou důležité pro správné mitochondriální dýchání a pro dobré fungování metabolismu zpracování C a N. Železo má další význam v produkci a následném zpracování ROS (Shabala 2017). To ovšem platí, pokud jsou tyto esenciální prvky v přiměřeném množství. Pakliže koncentrace překročí fyziologický limit, stávají se tyto prvky pro rostliny toxické (Sytar et al. 2019). Je proto důležité je od těžkých kovů oddělovat s ohledem na jejich fyziologickou funkci. Mezi těžké kovy nejvíce poškozující rostliny patří: As, Pb, Hg a Cd (Shahid et al. 2016). Nejhojněji se pak z těžkých kovů vyskytuje Fe. Pohyblivost těchto kovů v půdě je značně závislá na půdní topografii, obsahu organické hmoty a na množství přítomných oxidů (Fryzova et al. 2018).

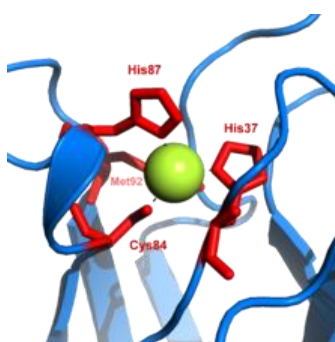
Těžké kovy jsou v půdě mobilizovány tak, že jsou zachyceny kořenovými buňkami z půdních částic. Následně jsou přenášeny přes plasmatickou membránu. Při vázání vytlačují  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  z buněčných stěn a membrán (Fryzova et al. 2018).

V Evropě a USA byla provedena studie, která odhalila, že těžkými kovy je kontaminováno přes 100 000 ha půdy. Velmi často se s kontaminovanou zemínou zachází jako s odpadem. I když v dnešní době již existují metody, jak půdu zbavit těchto kovů, z ekonomického hlediska jde o velmi drahou a nákladnou záležitost (Kadukova & Kavulicova 2010). Těžké kovy představují riziko hned z několika důvodů. První důvod je vysoká perzistence v prostředí. Druhý důvod je vysoká toxicita a v neposlední řadě jejich nebezpečí spočívá ve snadném přenosu v rámci potravinového řetězce (Fryzova et al. 2018). Z hlediska nebezpečí pro lidskou populaci jsou těžké kovy na druhém místě. Předběhly už pesticidy a známé znečišťující látky jako je např. oxid siřičitý. Je zde předpoklad, že těžké kovy se stanou ještě více nebezpečnými, než je pevný jaderný odpad (Sytar et al. 2019). Nejvíce se těžkých kovů dostalo do půdního oběhu vlivem lidské činnosti. Tyto činnosti zahrnují těžbu kovů, používání fungicidů, pesticidů a potažmo i herbicidů, spalování uhlí a používání fosilních paliv bohatých na olovo (Shabala 2017). Množství těžkých kovů v půdách závisí i na mnoha dalších faktorech. Mezi nejdůležitější faktory řadíme přirozené složení půd, intenzitu zvětrávacích procesů, obsah jílových minerálů a zastoupení humusových a organických látek (Richter 2004).

#### 3.2.4.1 Poškození toxickými a těžkými kovy

Negativní dopad těžkých kovů je do značné míry dán jejich koncentrací v půdě a v samotné rostlině. Pro rozpustnost těžkých kovů v půdě je klíčová hodnota pH. Al a Fe se

stávají toxickými a rozpustnými při hodnotě  $\text{pH} < 7$  (Fryzova et al. 2018). Do rostlin těžké kovy vstupují společně s živinami z půdního roztoku (Shahid et al. 2016). Drtivá většina kovů se hromadí a ukládá v kořenech rostlin. Právě u kořene lze pozorovat jeho nadměrné prodloužení v důsledku působení kovů. Část kovů je translokována do nadzemních částí rostlin, kde toxicky působí v listech a kde negativně ovlivní fotosyntézu. Mladé rostliny bývají zpravidla citlivější (Kadukova & Kavulicova 2010). Těžké kovy způsobují mimo jiné i narušení struktury chlorofylu, které je způsobeno substitucí Mg těžkým kovem v chlorofylu. Správné syntéze chlorofylu také brání nesprávná funkce enzymů důležitých pro správnou syntézu chlorofylu. Dále výzkumy potvrdily substituci mědi rtuť v tzv. plastocyaninu, díky čemuž se blokuje elektronový tok k fotosyntetickému systému PSI (Jan & Parray 2016). Plastocyanin je protein obsahující Cu, který působí jako redoxní centrum. Jedná se o modrý protein nacházející se v thylakoidech rostlin, kde funguje jako elektronový nosič. Je to typický  $\beta$ -barelový protein s měděným středem, na kterém jsou navázané dva histidiny, methionin a cystein v deformované čtyřstěnné geometrii (Gross 1993).



Obr. č. 6. Znárodněná struktura plastocyaninu.  
(Dostupné z:  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Plastocyanin> ke  
dni 21.2.2021)

Dle Shabaly (2017) se těžké kovy v rostlinách projevují takto:

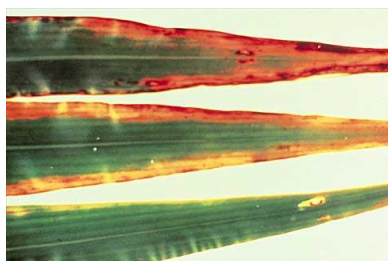
- Kadmium (Cd) - nahnědlé okraje listů, načervenalé žíly, chloróza, stočené listy, nahnědlý kořen a jeho pomalý růst. Nejvíce citlivé jsou na kadmium luštěniny, špenát, mrkev, oves a ředkev.
- Olovo (Pb) - tmavě zelené listy, odumírání starších listů, zakrslý růst a zčernalé kořeny.
- Rtuť (Hg) - žluté listy, chloróza listů, hnědnutí špiček listů, červené stonky, zakrnělý růst a pomalý růst kořene. Nejcitlivěji reagují na rtuť cukrová řepa a kukuřice.

Jak zde ale již bylo zmíněno, i esenciální kovy v přemíře působí toxicky. Jako příklady lze uvést:

- Zinek (Zn) - žluté listy s nekrotickými špičkami, listová chloróza, zakrnělý růst a krátké kořeny. Nejvíce náchylné jsou pak obiloviny, cereálie a citrusy.
- Mangan (Mn) - nekrotické léze na starých listech, akumulace černých částic, zasychající špičky listů, zakrnělý růst a zpomalený růst kořenů. Náchylné jsou obiloviny (ječmen), košťáloviny (květák, zelí), luštěniny (vojtěška, fazole), cukrová řepa, brambory a rajčata.

- Měď (Cu) - tmavě zelené až namodralé listy s následnou chlorózou, mladé listy s tmavě hnědou interveinální chlorózou, zakrnělé rostliny s krátkými kořeny. Citlivé jsou luštěniny, obiloviny, špenát a citrusy.

Nejběžnějším projevem působení těžkých kovů je zpomalení růstu rostlin. Struktura a fyziologie listů se mění spolu se snížením dýchání a fotosyntézy. V důsledku těchto změn dochází k ovlivnění metabolismu a snížení produkce energie. Zasažen je i transport látek mezi rostlinnými orgány. Schopnost kořenů přijímat vodu během stresu kovy je snížena. Výsledkem takového působení je tvorba mnoha forem ROS, včetně peroxidu vodíku, superoxidů a hydroxylových radikálů (Shahid et al. 2016).



Obr. č. 7. Toxické působení kadmia na rostlinu čiroku. Typický projev toxicity kadmia je hnědnutí okrajů listů. (Richter 2004)



Obr. č. 8. Toxické působení olova na rostlinu čiroku. (Richter 2004)

### 3.2.4.2 Adaptace na přítomnost toxických a těžkých kovů

Adaptace rostliny na prostředí kontaminované těžkými kovy je účinný proces. Jedná se o souhrn molekulárních, fyziologických, genetických vlastností, díky kterým mají určité druhy schopnost přežít, či těžké kovy hyperakumulovat (Fryzova et al. 2018). Hyperakumulátoři mohou koncentrovat kovy ve svých nadzemních částech v takové míře, že tato míra přesáhne úroveň koncentrace kovů v půdě (Kadukova & Kavulicova 2010). Je známo, že adaptace je řízená geneticky a je druhově specifická (Jan & Parray 2016).

Produkce stresových fytohormonů je obecný následek působení stresu. Mezi základní fytohormony patří ABA a jasmonová kyselina. ABA je považována za nejdůležitější, protože se dokáže rychle hromadit a zprostředkovává se během různých stresových reakcí. Je to fytohormon, který zásadně napomáhá rostlině přežít stres a z velké části se podílí i na procesu adaptace/aklimatizace rostliny během působení stresoru. Je známo, že i salicylová kyselina má důležitou roli v ochraně rostlin před účinky těžkých kovů (Kadukova & Kavulicova 2010). Odolné rostliny mají schopnost ve velké míře znemožnit průnik těžkých kovů do cytosolu. Rostliny tuto obranu provádí vylučováním organických kyselin do rhizosféry. V neposlední řadě odolné rostliny mohou ve větší míře selektovat transportní proteiny v plasmatické membráně. Další obranný mechanismus rostliny zahrnuje tvorbu fytochelátů. Fytocheláty jsou schopné inaktivovat těžké kovy, a to konkrétně jejich vazbou do tzv. chelátových komplexů. Syntéza fytochelátů probíhá přímou biochemickou cestou a je indukována až přítomností iontů kovů v cytosolu. Vázané toxické ionty jsou transportovány do vakuoly. Ani po uvolnění z chelátového komplexu toxické ionty nejsou aktivní. To je dáno vysokou koncentrací organických kyselin (Procházka et al. 1998).

### 3.2.4.3 Biochemie stresu toxickými a těžkými kovy

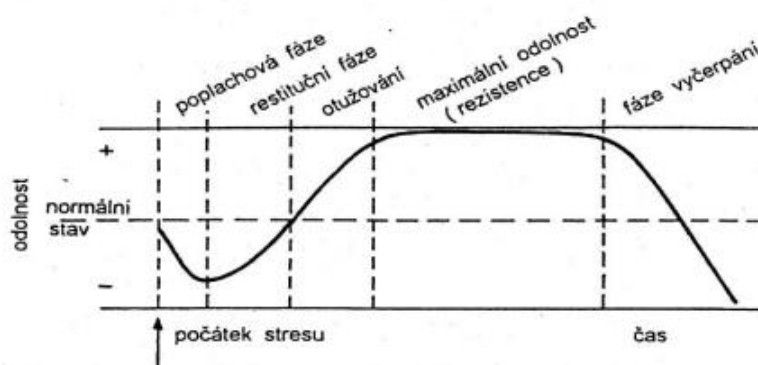
Různé studie prokázaly, že  $\text{Ca}^{2+}$  působí jako posel během normálního fyziologického fungování rostlin a také i během stresového působení. Vyskytuje se v cytoplasmatické membráně, tonoplastu a v dalších různých organelách.  $\text{Ca}^{2+}$  přenáší různé vnitřní i vnější signály a je nezbytný pro proces reakce rostlin na stres (Kumar & Trivedi 2016). Zaznamenání signálů vede k vytváření modulace biochemických a molekulárních mechanismů buňky. Konečná odpověď rostliny spočívá v tvorbě specifických proteinů, které transportují a vážou kovy. Složitá komunikace a spolupráce hned několika signálních drah vede k regulaci některých transkripčních faktorů vedoucích k aktivaci některých genů reagujících na stres. Tyto geny zahrnují geny pro chelátory kovů a transportéry kovů (Jalmi et al. 2018).

Tvorba ROS, které zatěžují rostliny oxidačním stresem, je typickým příznakem působení těžkých kovů v rostlinách. Mezi zmíněné ROS patří peroxid vodíku, superoxidové radikály a hydroxylové radikály. Vznikají jako vedlejší produkty při transportu elektronů propojených membránami, jakož i řadou metabolických drah (Kadukova & Kavulicova 2010). ROS odbourávají antioxidantní enzymy. Tyto enzymy se buď přímo podílejí na zpracování ROS, nebo tuto reakci katalyzují. Mezi tyto enzymy se řadí SOD (superoxid dismutáza), CAT (kataláza) a APX (askorbát peroxidáza). Mimo jiné rostliny disponují i neenzymatickými antioxidanty jako např. askorbátem, prolinem a tokoferolem (Shabala 2017). Jedny z nejdůležitějších signálních molekul jsou mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK). Signalizace MAPK zprostředkovává přenos signálů spojených se stresem a reguluje velký počet buněčných pochodů. Je známo, že MAPK se aktivují při snímání ligandu kovu a také při detekci ROS, které jsou produkovány při namáhání rostliny kovem (Jalmi et al. 2018). Nedílnou součástí reakce rostliny na stres jsou fytohormony, které jsou zapojeny do komunikace mezi jednotlivými signálními dráhami a které řídí reakce rostlin na daný stres. Primárně spojovány s reakcí na abiotický stres jsou jasmonová kyselina, salicylová kyselina a ethylen. Hlavní signalizační komponenty a dráhy jsou aktivovány jasmonovou kyselinou a salicylovou kyselinou. V nedávné studii bylo prokázáno, že expozice jasmonovou kyselinou má silnější antioxidantní účinek, to svědčí o účinku proti ROS (Kumar & Trivedi 2016). Vystavení stresu z těžkých kovů může mít ještě za následek produkci oxidu dusnatého (NO) v rostlinách. Oxid dusnatý je klíčový prostředník v signalizačních kaskádách regulující procesy růstu, vývoje, dozrávání a stomatální uzávěry. Exprese genů spojených s obranou rostlin a programovaná buněčná smrt je pravděpodobně úkolem klasických regulátorů růstu (Shabala 2017).

## 3.3 Průběh stresové reakce

Před vystavením stresoru rostliny fungují ve svém přirozeném fyziologickém režimu. Když dojde k narušení přirozeného fyziologického fungování rostliny v důsledku působení stresoru, v rostlině začne probíhat stresová fyziologie jako odpověď na stresor. Stres v rostlinách má různé fáze, které na sebe navzájem navazují. Jedná se o základní 4 fáze a o jednu regenerační fázi. Je potřeba vzít v potaz, že průběh stresu je značně závislý na dávce daného stresoru (Lichtenthaler 1998). První fází po začátku působení jakéhokoliv stresoru je tzv. poplachová fáze. Během poplachové fáze dochází k poruchám buněčných struktur a jejich funkcí (Procházka et al. 1998). Taktéž dochází ke značnému poklesu vitality. Katabolické procesy převyšují procesy anabolické (Lichtenthaler 1998). Pakliže nedojde během působení stresoru v poplachové fázi k překročení letální dávky, stres pokročí do restituční fáze. Restituční fáze se vyznačuje mobilizací kompenzačních mechanismů (Procházka et al. 1998; Bláha et al. 2003). Povolání kompenzačních mechanismů vede ke zvýšené odolnosti

rostliny vůči stresoru - fáze rezistence (Procházka et al. 1998). Fáze rezistence nemá vždy stálou povahu. Při působení dlouhého a dostatečně silného stresu může dojít k poklesu odolnosti a nastává fáze vyčerpání (Bláha et al. 2003). Ve fázi vyčerpání je rostlina vystavena chronickým onemocněním a v krajních případech dochází k úhynu. Regenerační fáze nastává v případě, kdy stresor odezněl a zároveň nezpůsobil tak silné poškození. Jedná se o částečnou či úplnou obnovu fyziologických funkcí rostliny (Lichtenthaler 1998).



Obr. č. 9. Průběh stresové reakce.  
(Procházka et al. 1998)

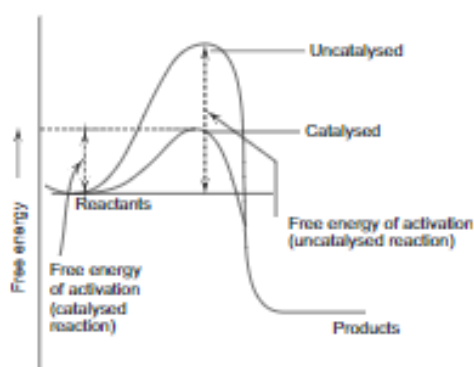
Lichtenthaler (1998) má ve svém článku uvedeno, že na počátku stresu rostliny reagují poklesem jedné či vícero fyziologických funkcí (pokles fotosyntézy, pokles metabolických aktivit...). Vlivem omezení těchto funkcí klesá vitalita rostlin. Naopak akutní poškození vzniká u rostlin, které nejsou obdařeny tolerančními mechanismy, nebo je jejich množství nedostatečné. V opačném případě rostliny, které disponují obdobnými mechanismy, začnou dané mechanismy aktivně využívat. Začnou aklimatizovat metabolické toky, aktivují opravné mechanismy a z dlouhodobého hlediska využívají své morfologické adaptace.

### 3.4 Enzymy

Enzymy byly člověkem využívány od nepaměti (Vodrážka et al. 1998). Využití enzymů při fermentačních procesech využíval člověk již v Babylonu. Enzymy hrály a doteď hrají roli při výrobě sýra, vína, octa, pečiva apod. (Copeland 2000). Kolem roku 1947 bylo známo okolo 200 enzymů. V roce 1972 to již bylo přes 1770 enzymů. V dnešní době se přirozeně získávají enzymy nejčastěji z různých mikroorganismů. Získávání enzymů tímto způsobem je ekonomicky jednak přijatelné, jednak je možno tímto způsobem enzymy dostávat v poměrně velkém množství. Podmínkou tohoto získávání bylo úplné zvládnutí průmyslových kultivací. Zhruba 50 % celkové produkce západní Evropy představují proteázy. Z celkové světové produkce je 25-30 % enzymů využito v potravinářském průmyslu (Vodrážka et al. 1998). V potravinářském průmyslu se uplatňují enzymy štěpící škrob (amylázy), při sladkém srážení mléka (chymosin), výroba piva ( $\beta$ -glukanázy) (Kodíček et al. 2018). Vodrážka et al. (1998) dále poukazují na to, že enzymy jsou dále hojně využívané pro analytické účely a farmaceutické přípravky. Kodíček et al. (2018) doplňují, že enzymy nacházejí uplatnění nadále v textilním průmyslu (pektolytické enzymy) a i v zemědělství (celuláza, fytáza).

K tomu, aby organismy měly zajištěny přísun energie, stavebního materiálu pro výstavbu jednotlivých součástí jsou zapotřebí spletité sítě chemických reakcí, které na sebe navzájem navazují (Vodrážka 1996). Enzymy jsou taktéž základní katalytické kameny

v metabolismu (Copeland 2000). Tyto organizované chemické reakce společně s energetickými změnami zajišťuje soubor látek zvaných biokatalyzátory (Vodrážka 1996). Katalyzátory zvyšují hodnotu rychlostní konstanty, přitom však nemění rovnovážnou konstantu u vratných reakcí. Nemění tedy stechiometrii reakce (Šípál et al. 1992). Reakční rychlost reakce závisí na množství dostupné aktivační energie, čili energie, která je zapotřebí k zahájení reakce. Aktivační energie pro nekatalyzovanou reakci je mnohem vyšší, než pro reakci katalyzovanou. Jako zdroj aktivační energie se dá využít například teplo. Mnoho chemických reakcí neprobíhá rychle, pokud nejsou reakční složky zahřáty na poměrně vysoké teploty. V živých buňkách ale reakce probíhá za poměrně nízkých teplot, a to z důvodu, že enzymy snižují nutné množství aktivační energie, proto reakce není natolik energeticky náročná a může probíhat i v energeticky nepříznivé teplotě (Bhutani 2019).



Obr. č. 10. Reakční koordináta katalyzované a nekatalyzované reakce. (Bhutani 2019)

Do skupiny biokatalyzátorů nejhojněji patří látky mající právě schopnost katalyzovat chemické reakce, čili je urychlovat (Vodrážka 1996). Enzymy rozumíme makromolekulární látky bílkovinné povahy, které katalyzují reakce v živých organismech (Doubrava et al. 1984). Pouhá jedna molekula enzymu je schopna za 1 s přeměnit až  $5 \times 10^4$  molekul substrátu. Jsou to značně specifické látky, jak do reakční specifity, tak i co se týče struktury přeměňovaných substrátů. Pracují za mírných podmínek. Pro jejich funkci je ideální teplota okolo 20-40 °C, tlak 0,1 MPa a pH okolo 7. Jejich účinek je regulovatelný na několika úrovních. Jejich velká přednost je jejich netoxičnost. Jejich nevýhoda spočívá ve složité struktuře a jejich citlivosti k velké škále podmínek. Enzymy vzhledem k jejich velkému opotřebení jsou neustále odbourávány a znovu syntetizovány (Vodrážka 1996).

Studiem enzymů se zabývá vědní obor zvaný enzymologie (Doubrava et al. 1984). V posledních desetiletích se ale prokázalo, že i určité molekuly RNA katalyzují určité reakce. Zajímavou skupinou je i skupina tzv. uměle vytvořených protilátek (abzymů, antibody enzyme), které specifickým způsobem vážou meziprodukt dané reakce a tuto reakci často katalyzují (Kodíček et al. 2018).

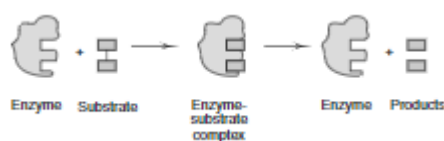
Enzymy jako bílkoviny mají schopnost reagovat změnou své konformace, která vede ke změně funkce na základě vnějších podmínek. Z tohoto důvodu se tak uplatňují jako regulátoři životních pochodů (Šípál et al. 1992). Nacházejí se ve všech živých systémech. Je zde předpoklad, že i ty nejjednodušší organismy mají přes 3000 enzymů, které mají na starost řízení rychlosti všech reakcí, které v těchto organismech probíhají. Počet všech existujících enzymů se odhaduje na miliardy (Vodrážka 1996). Enzymy jsou rozpustné a fungují ve vodním roztoku v živých buňkách. Mnoho reakcí, které poskytují, jsou reversibilní (Bhutani 2019).

### 3.4.1 Enzymové komplexy

Enzymová katalýza probíhá přes mezistupně (komplex enzym-substrát). Schéma je následovné:  $E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$  (Kindl & Günter 1981).

Při enzymatické reakci se enzym váže na substrát, a tím vznikne komplex enzym- substrát (ES). Substrát se navazuje nekovalentními interakcemi na enzym v jeho aktivním místě. Aktivní místo je malá část enzymu, která se nachází ve štěrbině jeho proteinu. Protein enzymu je složen z určitých aminokyselin, které jsou nutné k enzymatické aktivitě. Reakce probíhá v aktivním místě v několika krocích. První krok je vazba substrátu na enzym v jeho aktivním místě. Po navázání substrátu vznikne meziproduct (ES). Vazby se přeuspořádají a může proběhnout katalýza. Ve třetím kroku se vazby rozbíjí a vznikají vazby nové. S tím pak vzniká ze substrátu produkt této reakce. Nakonec dojde k uvolnění produktu z enzymu. Enzym může katalyzovat vícero substrátů za vzniku vícero produktů (Bhutani 2019).

Sloučení substrátu s enzymem je specifický děj. Tzv. „kotevní“ oblasti enzymu mají určitý geometrický tvar, do kterého substrát zapadá. Tyto oblasti k sobě přesně přiléhají jako klíč k příslušnému zámku (Doubrava et al. 1984). Tento model navrhl v roce 1896 Emil Fischer. Substrát musí zapadat do enzymu v jeho aktivním místě jako klíč do zámku. Model vyžaduje k vytvoření komplexu enzym-substrát, aby tvary reakčních složek a tvary aktivních center enzymů se navzájem doplňovaly a zapadaly do sebe (Bhutani 2019). Tvar substrátu je tedy analogický „otisk“ geometrického tvaru enzymu. Toto specifické „kotevní“ místo enzymů vzniká zřasením bílkovinného vlákna do jeho terciární struktury. Zřasení se pravděpodobně vyvinulo dlouhým vývojem bílkovinné molekuly (Doubrava et al. 1984).



Obr. č. 11. Model zámku a klíče. Substrát a enzym se tvarově zcela shodují a zapadají do sebe. (Bhutani 2019)

Kodíček et al. (2018) tuto informaci doplňují o poznatek, že se nejedná jenom a pouze o geometrických přizpůsobeních reagujících struktur. Nýbrž i o schopnosti sladění vazebných partnerů. Musí dojít k přímým interakcím mezi donory a akceptory vodíkových můstků, pozitivně i negativně nabitých skupin umožňující elektrostatické interakce atd. Ve 20. století proto zformuloval Dainel Koshland teorii indukovaného přizpůsobení. Tato teorie vychází z myšlenky, že substrát, který je konformačně pohyblivý, přizpůsobuje svoji prostorovou strukturu danému substrátu. To samé platí i naopak- enzym přizpůsobuje svoji strukturu substrátu. Bhutani (2019) dále doplňuje, že dle tohoto modelu se tvar aktivního centra mění, když se substrát naváže na enzym. Vazba substrátu podmíní konformační změnu enzymu. Po vytvoření komplexu enzym-substrát se změní tvar. Tento model proto představuje uspokojivější vysvětlení pro snížení aktivační energie, ke které dochází při reakci katalyzované enzymem.

Teorie zámku a klíče je v dnešní době již historického rázu, a to právě z důvodu, že nezohledňuje konformační flexibilitu jakožto důležitou vlastnost proteinů (Bhutani 2019).



Obr. č. 12. Model indukovaného přizpůsobení. Enzym pozměnil své aktivní místo, aby do sebe se substrátem zapadly. (Buthani 2019)

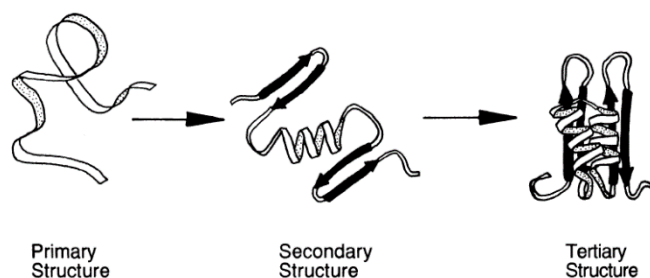
### 3.4.2 Struktura enzymů

Enzymy jsou globulární bílkoviny (Vodrážka 1996). Globulární bílkoviny jsou složeny z částí, které mají šroubovicovou strukturu, a z částí, které mají neuspořádané klubky. Aby vznikla bílkovina, je zapotřebí spojení jednotlivých aminokyselin do řetězce. Toto spojení není nahodilé, ale je dáno genetickou informací v podobě DNA. Pořadí aminokyselin v řetězci je kódováno pořadím nukleotidů (Vodrážka 1996).

Propojení jednotlivých aminokyselin do řetězce zajišťuje peptidová vazba (Copeland 2000). Řetězec aminokyselin se označuje jako peptid. Molekulám obsahujících do 10 aminokyselin se říká oligopeptidy. Větším molekulám pak polypeptidy, které navazují na samotné bílkoviny (Vodrážka 1996).

Frekvence jednotlivých aminokyselin v řetězci má za následek primární strukturu bílkovin. Následná konformace seřazených úseků řetězce udává sekundární strukturu. Terciální strukturu tvoří následné poskládání jednotlivých částí řetězců daných sekundární strukturou. Tato struktura nemá pravidelné uspořádání (Vodrážka et al. 1998). Kvarterní struktura znamená pravidelnost prostorového uložení molekulových podjednotek tvořící celkové molekuly s kovalentně navázanými polymerními řetězci a s přítomností vlastní terciální struktury ve větší celky. Tento útvar je vysoce uspořádaný a lze jej popsat geometrickými tvary jako např. tetraedr, ikosaedr, šroubovice atd. (Vodrážka et al. 1998).

Enzymy jsou z chemického pohledu polyamidy vzniklé několikanásobnou polykondenzací aminokyselin (Vodrážka et al. 1998).



Obr. č. 13. Primární, sekundární a terciální struktura bílkoviny. (Copeland 2000)

Z 60 - 70 % se jedná o složené bílkoviny (Vodrážka 1996). Jako všechny ostatní bílkoviny, jsou i bílkoviny enzymů složeny z 20 proteinogenních aminokyselin (Copeland 2000). Všech těchto 20 proteinogenních aminokyselin (vyjma Glycinu) obsahuje tzv. chirální uhlík. Díky chirálnímu uhlíku mohou tyto aminokyseliny existovat ve dvou formách: D a L enantiomery (Vodrážka et al. 1998). Copeland (2000) ve své publikaci doplňuje tuto informaci o skutečnost, že všechny aminokyseliny, které se podílí na stavbě bílkovin, se vyskytují výlučně v L- formě. Což znamená, že uhlík aminokyseliny je v jejím hlavním řetězci v nejvyšším možném oxidovaném stupni ve Fischerově vzorci nahoře a aminokyselina se nachází na levé



straně. Substituent R, který je připojený na skelet aminokyseliny, udává charakteristické vlastnosti pro danou aminokyselinu. Postranní řetězec je také rozhodující pro polaritu, velikost i acidobazický charakter aminokyselin.

Zhruba polovina z 20 proteinogenních aminokyselin má hydrofobní charakter (Vodrážka et al. 1998). Tento hydrofobní charakter mají aminokyseliny složené pouze z uhlovodíků. Do této skupiny náleží valin, leucin, alanin, isoleucin, prolin, methionin atd. (Copeland 2000). Tyto aminokyseliny jsou méně rozpustné ve vodě, než ostatní aminokyseliny (Vodrážka et al. 1998). Hydrofobní molekuly mají tendenci se ve vodném prostředí shlukovat, aby zmenšily plochu, která je vystavena vodnému rozpouštědлу (Copeland 2000). Jejich postranní řetězce hrají velkou roli v hydrofobních interakcích bílkovin (Vodrážka et al. 1998). Vodrážka et al. (1998) dělí hydrofilní aminokyseliny v neutrálním prostředí na aminokyseliny s nabitým postranním řetězcem a nenabitým postranním řetězcem. Do první skupiny patří aminodikarboxylové kyseliny - asparagová kyselina a glutamová kyselina. Dále sem náleží bazické kyseliny histidin, lysin a arginin. Do druhé skupiny se řadí serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin a glutamát. Dále zdůrazňují, že významnou vlastností aminokyselin je jejich dipolární charakter. Z tohoto důvodu se řadí mezi amfolyty, což znamená, že se chovají jako kyseliny, tak i jako zásady. Zda se budou chovat jako kyseliny nebo jako zásady závisí na tom, jaké je pH prostředí, ve kterém se nachází.



Obr. č. 14. Fischerova projekce u aminokyselin. U L- formy se aminoskupina vyskytuje na levé straně vzorce. (Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~dolezala/CHPP/4%20Aminokyseliny.pdf> ke dni 7.7 2020)

Pokud enzym obsahuje pouze bílkovinnou složku, hovoříme o něm jako o jednoduchém enzymu (apoenzymu) (Doubrava et al. 1984). Jak již ale bylo v této kapitole zmíněno, téměř 70 % bílkovin je složených. To znamená, že kromě bílkovinné části, mají ještě nebílkovinnou část. Tato nebílkovinná část je kofaktor. Jeho funkcí je přenášení skupin atomů či elektronů (Vodrážka et al. 1998). Společná úloha enzymových kofaktorů je poskytovat lokus pro oxidačně- redukční reakce v aktivním centru (Copeland 2000). Struktura kofaktorů byla objasněna ještě před objasněním struktury bílkovin enzymů. Jejich molekula mnohdy obsahuje heterocyklus. Heterocyklus pak tvoří buď reaktivní část kofaktoru, nebo má funkci rozpoznávacího prvku (Vodrážka et al. 1998).

Kofaktor může být buď kovový iont, či jiná organická molekula. Popřípadě se mohou obě tyto složky vyskytovat naráz (Šípál et al. 1992). V případě organických molekul se může jednat např. o lipidy, cukry, vitamíny apod. Kovové ionty jako kofaktory se vyskytují buď volně vázané (aktivační), nebo pevně vázané (metaloenzymy). Aktivačními (volně vázanými) ionty jsou  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$ . Metaloenzymy pak obsahují zinek, měď, železo a kobalt (Buthani 2019).

Některé enzymy potřebují právě kofaktory ke své katalytické aktivitě. Kofaktory, které jsou pevně navázány na enzym, se označují jako prosthetické skupiny. Jedná se např. o lipidy, cukry, vitamíny apod. (Buthani 2019). Během katalytické reakce neopouštějí

aktivní centrum enzymu (Kodíček et al. 2018). Naopak kofaktory, které jsou na bílkovinnou složku vázány pouze slabě a mohou se tedy snadno disociovat, se označují jako koenzymy. Komplex koenzymu s apoenzymem se označuje jako holoenzym (Vodrážka et al. 1998). Vodrážka et al. (1998) upozorňují, že často je náročné odlišit prosthetickou skupinu a koenzym z důvodu široké škály v pevnosti vazby kofaktoru. Bhutani (2019) dodává, že koenzymy jsou teplotně stabilní a dodávají tak jistou odolnost enzymům vůči vyšším teplotám. Toto neplatí o jednoduchých enzymech skládajících se pouze z bílkovin. Bílkoviny samy o sobě jsou totiž náchylně k degradaci při vyšších teplotách (Vodrážka 1996).

Důležitou strukturou enzymu je tzv. aktivní centrum (Kindl & Wöber 1981). Zde se nachází vazebné místo, to je místo, kde bude probíhat reakce, nebo také místo, kde je připojen koenzym. Některé enzymy mají aktivních center i vícero (Doubrava et al. 1984). Aktivní centrum se dá představit jako prohlubeň či záhyb ve struktuře enzymu. Toto místo obsahuje nejvíce hydrofobní oblasti. V okolí aktivního centra má terciární struktura za úkol provádět selekci substrátu, která je podmíněna substrátovou konformací. Dále také terciární struktura zajišťuje optimální prostorové uspořádání reakčního partnera (substrátu) (Kindl & Wöber 1981).

### 3.4.3 Klasifikace a názvosloví enzymů

Klasifikace enzymů není doposud zcela vyřešena. To je dáno jejich značným množstvím a složitou strukturou (Doubrava et al. 1984). Nejstarší historicky objevené enzymy byly pojmenovány dle jejich výskytu a funkcí v organismu (např. pepsin) (Šípál et al. 1992). Zpočátku se enzymy pojmenovávaly povětšinou s koncovkou- in. Dodnes se některé tyto názvy stále využívají, viz již zmiňovaný pepsin. Později se začalo využívat koncovky- áza a název byl tvořen dle substrátu, který enzym katalyzoval (např. amyláza) (Vodrážka 1996). S narůstajícím počtem objevených enzymů bylo nutné je systematizovat (Šípál et al. 1992).

Z tohoto důvodu zavedla v roce 1961 Mezinárodní biochemická unie (IUB) systematickou klasifikaci enzymů (Kodíček et al. 2018). Klasifikace tímto způsobem se řídí třemi principy (Šípál et al. 1992):

1. Enzymy jsou klasifikovány a pojmenovány na základě reakce, kterou katalyzují.
2. Názvy enzymů smí být použity pouze pro jednotlivé enzymy. Nelze je použít pro pojmenování systému obsahující více než jeden enzym.
3. Enzymy jsou rozděleny do skupiny na základě toho, jaké reakce katalyzují.

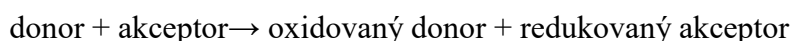
Enzymy dělíme do 6 skupin dle toho, jaké reakce katalyzují. Enzymy byly takto rozděleny do 6 tříd, které tvoří následně ještě podtřídy a skupiny. Toto umožnilo vznik čtyřmístného číselného kódu EC (enzyme commission). První číslice nám udává třídu, druhá podtřídu, třetí skupinu a poslední čtvrté číslo je číslo enzymu ve skupině (Kodíček et al. 2018).

TŘÍDA	% ZASTOUPENÍ
1. Oxidoreduktázy	25,6
2. Transferázy	27,6
3. Hydrolázy	22,9
4. Lyázy	13,1
5. Isomerázy	5,3
6. Ligázy	5,5

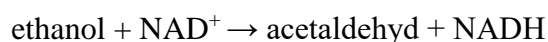
Tab. č. 1.: Četnost zastoupení jednotlivých tříd enzymů. (Zdroj: Vodrážka et al. 1998, upraveno)

### 3.4.3.1 Oxidoreduktázy

Oxidoreduktázy katalyzují intermolekulární oxidačně- redukční přeměny. Redukční činidla se označují jako donory (vodíku nebo elektronů), oxidační činidla jako akceptory (Kodíček et al. 2018). V systému enzymů se název tvoří takto: donor: akceptor- oxidoreduktáza (Doubrava et al. 1984). Dělí se na podtřídy na základě funkčních skupin, které jsou donory buď H, nebo elektronů (Vodrážka 1996).



Jako příklad lze uvést systémem názvem ethanol: NAD<sup>+</sup> - oxidoreduktázu, či doporučeným názvem alkoholdehydrogenázu [1.1.1.1.] (Vodrážka 1996). Její reakce probíhá takto:



#### 3.4.3.1.1 Podskupiny oxidoreduktáz:

Kodíček et al. (2018) popisují ve své publikaci podskupiny oxidoreduktáz takto:

##### 1. Dehydrogenázy

Jedná se o enzymy odštěpující atomy vodíku z donoru a následně je přenášejí na akceptor, který musí být jiný, než molekulový kyslík. Akceptory jsou v tomto případě nejčastěji koenzymy NAD (P)<sup>+</sup>, avšak jím také může být i jiný koenzym oxidoreduktáz.

##### 2. Transhydrogenázy

Enzymy přenášející vodíkové atomy mezi dvěma substráty.

##### 3. Oxidázy

Jde o enzymy, které přenášejí vodíkové atomy ze substrátu na molekulový kyslík. Produktem reakce u oxidas obsahujících FAD (např. glukosaoxidázy) je často peroxid vodíku, nebo i voda.

##### 4. Oxygenázy

Jako oxidační činidlo používají molekulový kyslík. Jeden (monooxygenáza) nebo dva (dioxygenáza) atomy kyslíku se začleňují do substrátu.

## 5. Peroxidázy

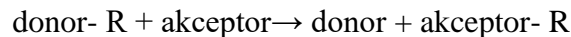
Enzymy, které oxidují pomocí peroxidu vodíku (akceptoru) různé substráty. U těchto substrátů je nejčastější prosthetickou skupinou hem.

## 6. Katalázy

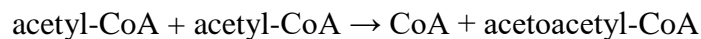
Tyto enzymy mají mimořádně velkou katalytickou účinnost. Pouhá jedna molekula enzymu je schopna přeměnit za minutu 5 miliónů molekul  $H_2O_2$ . Využívají disproportionaci toxického peroxidu vodíku s hemem jako prosthetickou skupinu.

### 3.4.3.2 Transferázy

Jedná se o enzymy přenášející skupinu (např. methylovou či glykosylovou) z jedné sloučeniny (donor) na sloučeninu druhou (akceptor). Ve většině případů je donorem koenzym, který nese přenášenou skupinu. Podtřídy se dělí dle přenášených skupin (Šípál et al. 1992). Systémový název je tvořen takto: donor: akceptor-skupinatransferáza (Doubrava et al. 1984). Je nutno uvádět, jaká skupina je těmito enzymy přenášena. Dle toho se pak také transferázy dělí na patřičné podtřídy (Kodíček et al. 2018).

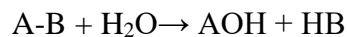


Příkladem je např. systémovým názvem acetyl-CoA: acetyl-CoA-C-acetyl-transferáza, doporučeným názvem acetyl-CoA-acetyltransferáza [2.3.1.9] (Vodrážka 1996).

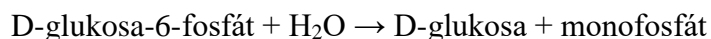


### 3.4.3.3 Hydrolázy

Vodrážka et al. (1998) tuto skupinu popisuje jako enzymy štěpící hydrolyticky vazby vzniklé kondenzací (příkladem této vazby je vazba peptidová). Během tohoto štěpení dochází k odštěpení vody. Systémový název má tato skupina: substrát (skupina) hydroláza. Skupina se uvádí v případě, kdy není jasné, která část molekuly se hydrolyticky odštěpuje. Tato třída se dělí na podtřídy dle typu štěpené vazby (Kodíček et al. 2018).

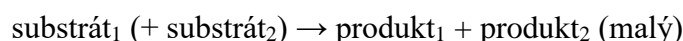


Za příklad lze uvést D- glukosu-6-fosfát-fosfohydrolázu (doporučeným názvem glukóza-6-fosfatáza) [3.1.3.9.] (Vodrážka 1996).



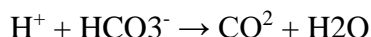
### 3.4.3.4 Lyázy

Lyázy nehydrolyticky štěpí vazby C-C, C-O, C-N. Od ostatních enzymů mají lyázy jistou odlišnost. Působí na dva substráty v jednom směru, ale ve směru opačném už pouze na jeden substrát (Šípál et al. 1992). Zařazení enzymů do této třídy bývá složité (Kodíček et al. 2018). Lyázy tvoří málo početnou skupinu enzymů. Na podtřídy se dělí na základě štěpených nebo syntetizovaných vazeb (Vodrážka et al. 1998).



Jeden enzym z této skupiny je i karbonáthydrolyáza, doporučeným názvem karbonátdehydratáza [4.2.1.1.] (Vodrážka 1996).

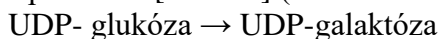
Jejíž reakce je:



#### 3.4.3.5 Isomerázy

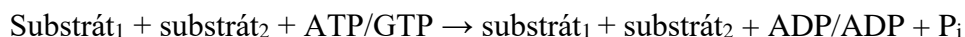
Mají na starost realizaci vnitromolekulových přesunů atomů a jejich skupin. Jedná se o vzájemné přeměny izomerů (Vodrážka 1996). Dle typu reakce se dělí na racemázy a epimerázy (změny konfigurace), intramolekulární oxidoreduktázy (např. přeměna aldózy na ketózy), intramolekulární transferázy (tzv. mutázy- přesunují skupiny uvnitř jedné molekuly), na topoisomerázy (měníci prostorovou strukturu DNA) a na další. Typ reakce se objevuje i v názvu systémovém, který je: substráttyp. Proto někdy bývá systematický název shodný s názvem doporučeným (Kodíček et al. 2018).

Příkladem je UDPglukóza-4-epimeráza [5.1.3.2.] (Vodrážka 1996). Jejíž reakci lze popsat:



#### 3.4.3.6 Ligázy

Enzymy katalyzující energeticky náročné slučování dvou substrátů (S1, S2). Pro tuto reakci se využívá energie obvykle z ATP či GTP. (Kodíček et al. 2018). Jedná se o poměrně málo zastoupenou skupinu enzymů (Vodrážka 1996). Triviálně se tato skupina nazývá jako syntetáza. Systémovým názvem pak substrát1:susbrát2-ligáza (ADP-, AMP, či GDP tvořící) (Kodíček et al. 2018).



Příkladem ligázy je enzym systémovým názvem L-alanin: t-RNA<sup>Ala</sup>- ligáza. Doporučeným názvem se nazývá alanyl-tRNA- syntetáza [6.1.1.7.]. (Vodrážka 1996). Poskytující reakci:



#### 3.4.4 Enzymová katalýza a reakční podmínky

Při reakčních podmínkách hraje velkou roli stabilita enzymů. Stabilitou enzymů rozumíme schopnost enzymů zachovat si svoji katalytickou aktivitu, pokud se změní vnější podmínky reakce (Kotal et al. 1989). Rychlost enzymatické reakce může vykazovat velkou citlivost na tyto změny (Copeland 2000). Stabilita enzymů je závislá na jejich struktuře, ale i na původu samotných enzymů. Například enzymy původem z termofilních mikroorganismů jsou teplotně lépe stabilnější, než enzymy z jiných mikroorganismů (Kotal et al. 1989). Kotal et al. (1989) dále ve své publikaci doplňují, že v dnešní době se využívají látky, které například zafixují strukturu enzymu, či ji pozměňují tak, aby se pozměnila. Mezi tyto látky se řadí různá aditiva. Aditivy pak jsou kovové ionty, cukry, glycerol apod.

Enzymová katalýza probíhá různými rychlostmi v závislosti na koncentraci substrátů, množství daného enzymu, fyzikálně chemických podmínkách prostředí a na přítomnosti efektorů (modifikátorů) (Vodrážka et al. 1998).

Primární veličinou chemické kinetiky je reakční rychlost. Ta se dá definovat změnou látkového množství za určitý čas, jakéhokoliv z účastníků dané reakce (Kodíček et al. 2018). Aktivitu enzymů nejčastěji měříme na základě úbytku substrátu či příbytku produktu v reakční směsi (Kotal et al. 1989). Katalytická jednotka enzymů je katal (kat) (Kodíček et al. 2018). Katal označuje aktivitu, během které se za sekundu přemění jeden mol substrátu (Koolman & Röhm 2012). Druhou jednotkou je pak mezinárodně užívaná jednotka Unit (U) (Kodíček et al. 2018). Ta charakterizuje 1 μmol přeměny za minutu (Koolman & Röhm 2012). Jedná se o veličiny charakterizující množství aktivního enzymu (Kodíček et al. 2018).

#### 3.4.4.1 Vliv substrátu

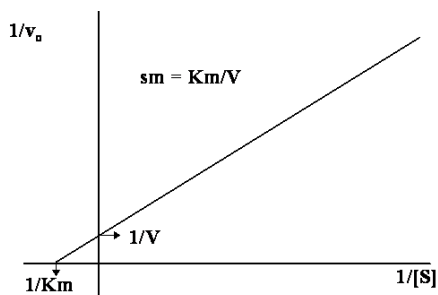
V roce 1913 L. Michaelis a M. L. Mentenová měřili rychlost hydrolytického štěpení sacharózy na fruktózu a glukózu za různých podmínek (Vodrážka et al. 1998). Odhalili dvě skutečnosti, které vypovídají o faktech enzymových reakcích. (Zehnálek 1999). Vodrážka et al. (1998) tyto dvě fakta charakterizoval takto:

1. Pakliže byla udržována při počáteční rychlosti reakce koncentrace sacharózy konstantní a docházelo ke změně množství enzymu, byla počáteční rychlost reakce lineární v závislosti na koncentraci katalyzátoru.
2. Pakliže naopak byla udržována koncentrace enzymu lineární a docházelo ke změně množství substrátu, počáteční rychlost byla hyperbolická v závislosti na koncentraci sacharózy.

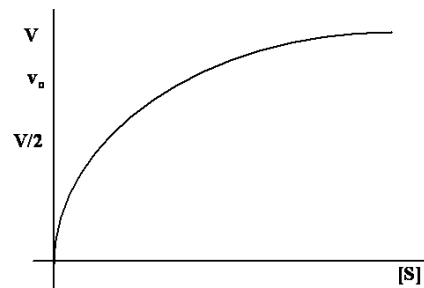
Dle teorie Michealise a Mentenové se křivka závislosti rychlosti enzymové reakce vyjadřuje ke vztahu sycením enzymu substrátem. Nazývá se proto jako saturační křivka (Vodrážka et al. 1998). Matematické vyjádření této saturační křivky nám umožňuje zpracovávat kinetické parametry (Zehnálek 1999). Zároveň nám dle Vodrážky et al. (1998) toto matematické vyjádření křivky poskytne rovnici nazývanou jako rovnice Michealise a Mentenové.

$$v = \frac{V[S]}{K_M + [S]}$$

V této rovnici jsou obsaženy dva konstantní parametry. Jedná se o parametr mezní rychlost  $V$  a o parametr  $K_M$ , který se nazývá jako Michaelisova konstanta (Zahnálek 1999). Michaelisova konstanta  $K_M$  vyjadřuje afinitu enzymu k substrátu. Rychlost  $V$  vyjadřuje maximální rychlost reakce (Koolman & Röhm, 2012). Dle Kodíčka et al. (2018) je ovšem označení jako maximální rychlost nesprávné, protože hyperbola nemá své maximum. Ve své publikaci tuto hodnotu označují jako  $V_{lim}$  (limitující). Michaelisova konstanta udává takové množství substrátu, při které  $v$  dosáhne poloviny  $V$  (Koolman & Röhm, 2012). Narozdíl od parametru  $V$  je Michaelisova konstanta nezávislá na množství enzymu, ale je závislá na svém prostředí (pH, teplota, přítomnost efektorů apod.) (Vodrážka et al. 1998). Vysoká afinita enzymu k substrátu je typická pro nízkou hodnotu  $K_M$  a naopak (Koolman & Röhm, 2012). Hodnota  $K_M$  má velice široké rozmezí a to  $10^{-1}$  až  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>.  $K_M$  se dá stanovit na základě experimentálních měření reakčních rychlostí při různých koncentracích substrátu a následným zpracováním dat, buď graficky, nebo matematicky (Kotal et al. 1989).



Obr. č. 15. Vynesení dle Lineweavera a Burka, kdy dostaneme tvar přímky. Jedná se o dvojnásobné reciproké vynesení. Musíme získat lineární závislost k určení kinetických parametrů. (Dostupné z: [http://orion.chemi.muni.cz/e\\_learning/=Texty/14-Enzymov%C3%A1%20kinetika/14-Kinetika-1.htm](http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/14-Enzymov%C3%A1%20kinetika/14-Kinetika-1.htm) ke dni 2. 10. 2020)



Obr. č. 16. Grafickým vyjádřením rovnice dle Michaelise-Mentenové je hyperbola. (Dostupné z: [http://orion.chemi.muni.cz/e\\_learning/=Texty/14-Enzymov%C3%A1%20kinetika/14-Kinetika-1.htm](http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/14-Enzymov%C3%A1%20kinetika/14-Kinetika-1.htm) ke dni 2. 10. 2020)

Kotal et al. (1989) vyvozují z daných skutečností tyto závěry:

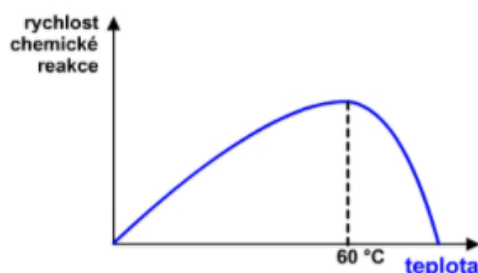
1. Čím je hodnota  $K_M$  nižší, tím je enzym účinnější.
2. U enzymů, které působí na více substrátů, je hlavní ten substrát, který má nejnižší hodnotu  $K_M$ .
3. Koncentraci substrátu, která je nutná k dosažení limitní rychlosti reakce (maximální), můžeme spočítat z hodnoty  $K_M$ .
4. Srovnáním hodnot  $K_M$  u různých enzymů z různých zdrojů, lze vybrat ten nejúčinnější, či si ověřit jeho identitu.

### 3.4.4.2 Vliv teploty

Enzymová závislost na teplotě okolí je zpravidla nesymetrická (Koolman & Röhm 2012). Se zvyšováním teploty roste rychlost enzymové reakce (Doubrava et al. 1984). Při zvýšení teploty o  $10^\circ\text{C}$  se rychlost enzymatické reakce zvýší přibližně 1,5 - 2krát (Kotal et al. 1989). Avšak s rostoucí rychlostí reakce dochází taktéž ke zrychlení rozkladu enzymu (Doubrava et al. 1984). To je způsobeno denaturací bílkovinné části enzymu. V některých případech i odštěpováním kofaktoru (Vodrážka et al. 1998). Denaturace nastane vlivem teploty, která bude již za hranicí teplotního optima jednotlivých enzymů a enzym přestane být stabilní (Koolman & Röhm, 2012). Z tohoto důvodu bude rychlost reakce enzymů stoupat do svého teplotního maxima. Po překročení této hranice, kdy začne docházet k denaturaci bílkovin, se rychlost reakce začne výrazně snižovat (Copeland 2000).

Pojmem optimální teplota enzymu rozumíme výsledek těchto protichůdných dějů (Zehnálek, 1999). Teplota u enzymů ovlivňuje další faktory: afinitu enzymu k substrátu, ionizaci funkčních skupin, pH pufrů i rozpustnost kyslíku během oxidačních reakcí (Šípál et al. 1992). Poloha teplotního maxima je tedy dána termostabilitou enzymů. Termostabilita živočišných enzymů je zpravidla kolem  $50-60^\circ\text{C}$  (Zehnálek 1999). Ale existují i výjimky, například enzymy termofilních bakterií mohou být aktivní i nad  $100^\circ\text{C}$  (Koolman & Röhm 2012).

Drtivá většina enzymatických testů se provádí při teplotě od 25°C do teploty 37°C (tzn. při fyziologické teplotě) (Copeland 2000).



Obr. č. 17. Vliv teploty na rychlost enzymatické aktivity.

Po dosažení teplotního maxima, rychlost reakce rychle klesne. (Dostupné z:

[http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni\\_latky\\_enzymy.html](http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky_enzymy.html) ke dni 3.10 2020)

### 3.4.4.3 Vliv pH

Na hodnotě pH výrazně závisí enzymová aktivita (Koolman & Röhm, 2012). Jedná se totiž o polyamfolyty, proto jejich aktivita závisí na pH. Katalytická aktivita enzymů závisí na koncentraci vodíkových iontů, což podmiňují protonovatelné skupiny. Protonovatelné skupiny jsou součástí aktivních center a taktéž součástí molekul mnoha substrátů (Vodrážka et al. 1998). Reakce mezi enzymem a substrátem pak závisí na stupni jejich protonace (Zehnálek 1999).

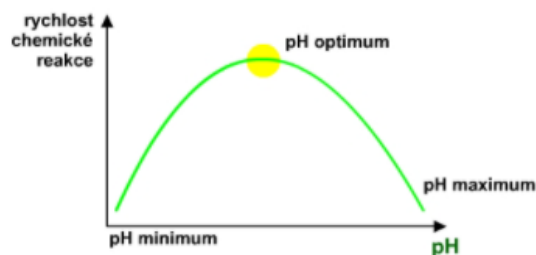
Je mnoho způsobů, jak může hodnota pH ovlivnit průběh reakce. Jde především o změny v disociacích substrátů a produktů (Kotal et al. 1989). Kotal et al. (1989) dále doplňují, že změny v disociacích ovlivňují hodnotu rovnovážné konstanty. Aktivita enzymů je vymezená na úzkou oblast hodnot pH (Šípala et al. 1992). Velká škála enzymů působí katalyticky pouze ve vymezeném rozsahu hodnot pH. Mimo tento rozsah aktivita enzymů klesá (Zehnálek 1999). Díky změně pH lze regulovat a řídit rychlost enzymatické reakce, což je typické například pro buňku (Doubrava et al. 1984).

Velká většina enzymů má své pH optimum v neutrální oblasti (Kotal et al. 1989). Při této oblasti dosahuje katalytická reakce nejvyšší možné aktivity. Neutrální oblast zaujímá hodnotu pH v rozmezí 5-7 (Zehnálek 1999). Mimo neutrální prostředí působí například trávicí enzymy, které mají své pH optimum v kyselém prostředí (např. proteáza pepsin [3.4.23.1] má pH optimum 2) (Koolman & Röhm 2012). V zásaditém prostředí má pak své pH optimum například enzym Argináza [3.5.3.1], který má pH optimum 9-10 (Doubrava et al. 1984).

Dle Šípala et al. (1992) je úzká oblast pH maxima u enzymů dána těmito třemi faktory:

1. Při extrémní hodnotě pH dochází k ireversibilní změně ve sktruktuře bílkoviny enzymu.
2. Pokud jsou substráty schopny disociace, tak díky vlivu jejich ionizace.
3. Kvůli vlivu pH na katalytickou reakci a na disociaci vazebných skupin enzymu.





Obr. č. 18. Vliv pH na průběh reakce. Po dosažení pH optima, začne rychlost reakce klesat. (Dostupné z: [http://www.studiumbiochemie.cz/prirodn\\_i\\_latky\\_enzymy.html](http://www.studiumbiochemie.cz/prirodn_i_latky_enzymy.html) ke dni 2.10 2020)

#### 3.4.4.4 Vliv efektorů

Efektory nazýváme látky, jež ovlivňují aktivitu enzymů (Kotal et al. 1989). Pokud je enzymová reakce danou látkou pozitivně podporována, mluvíme o pozitivních efektech (aktivátorech). Pozitivní efektor vede ke zvýšení katalytické aktivity enzymu (Šípál et al. 1992). Pokud ale naopak dochází ke zpomalení enzymové reakce, tak se jedná o negativní efekty (inhibitory) (Zehnálek 1999).

Efektory dělíme na efekty přirozené a efekty nepřirozené (Vodrážka et al. 1998). Přirozený efektor je normální složka buňky (koenzymy a metabolity). Modelové látky a léčiva se řadí k nepřirozeným efektorům (Vodrážka et al. 1998). Celá řada léků využívá svého inhibičního účinku na enzymy (Koolman & Röhm 2012).

##### 3.4.4.4.1 Aktivátory

Různé kovové ionty působí jako aktivátory. Buď umožňují vznik komplexu enzym-substrát, nebo jej dokážou zpevnit (Kotal et al. 1984). Ionty, které takto mohou povzbudit aktivitu enzymu, mají zpravidla své protonové číslo od 11 do 30. (Šípál et al. 1992). Ionty s vyšším protonovým číslem už působí jako ireverzibilní inhibitory (Zehnálek 1999). Zehnálek (1999) dále doplňuje, že k aktivátorům se řadí ještě řada organických látek či vzácněji anionty (fosfátové, chloridové). Za aktivátor se považuje ta látka, která se vratně váže na enzym a není pevnou součástí bílkoviny enzymu či jeho prostetické skupiny (Vodrážka et al. 1998). U některých enzymů je přítomnost efektoru dokonce nutná k tomu, aby zahájily svoji aktivitu (Vodrážka 1996).

##### 3.4.4.4.2 Inhibitory

Pokud látka snižuje rychlost enzymové reakce, může se jednat o inhibitor (Kodíček et al. 2018). Většina inhibitorů je reversibilních, čili nezpůsobují trvalé změny. V případě ireverzibilních inhibitorů dochází k trvalým modifikacím (Koolman & Röhm 2012). Inhibitorů je celá škála a jsou různých povah (Vodrážka 1996). Mohou to být ionty, nízkomolekulární látky, vysokomolekulární látky, organické a anorganické látky (Zehnálek 1999). Znakem těchto látek je jistá afinita k nějakému aktéru enzymové reakce (Šípál et al. 1992). Způsobí buď změnu struktury

enzymu, působí jako konkurent substrátu v boji o místo na aktivním centru nebo mohou již inaktivovat vzniklý komplex enzym- substrát (Vodrážka 1996).

Mohou být specifické nebo nespecifické (Kotal et al. 1984). Kotal et al. (1984) ve své publikaci uvádí jako specifické inhibitory látky snižující reakční rychlost pouze u vybraných enzymů. Nespecifické inhibitory působí na vícero různých enzymů. Řadí se sem různá denaturační činidla, látky narušující strukturu enzymu, látky blokující funkční skupinu, jež je součástí aktivních center... Jedná se například o formaldehyd či ionty těžkých kovů.

Jedním z hlavních regulačních prostředků buňky je právě inhibice (Zehnálek 1999).

Dle pevnosti vazby na enzym se inhibitory dělí na reverzibilní a nereverzibilní (Šípál et al. 1992).

#### 3.4.4.4.2.1 Reverzibilní inhibitory

V této oblasti se nachází 4 druhy inhibice (Zehnálek 1999). Dají se od sebe odlišit kinetickým měřením (Vodrážka et al. 1998). Kinetickým měřením můžeme odlišit kompetitivní, akompetitivní a nekompetitivní inhibici (Šípál et al. 1992). Zehnálek (1999) ve své publikaci má ještě uvedenou čtvrtou reverzibilní inhibici-smíšenou.

1. Kompetitivní- inhibitor je svojí strukturou podobný substrátu (Kotal et al. 1984). Dochází k soutěži o vazebné místo inhibitoru se substrátem (Vodrážka et al. 1998). Kompetitivní inhibitory se na enzymy navážou, ale nezpůsobí jeho přeměnu (Koolman & Röhm 2012). Tímto dochází k blokaci enzymu (Vodrážka et al. 1998). Inhibitor neovlivňuje mezní rychlost, ale zvyšuje Michaelisovu konstantu (Vodrážka 1996).
2. Nekompetitivní- Tyto inhibitory neovlivňují vazbu substrátu na enzym, ale zpomalují proces jeho přeměny v produkt (Vodrážka 1996). Neovlivní vazbu ani ve vysokých koncentracích inhibitoru (Doubava et al. 1984). Neovlivňují hodnotu Michaelisovy konstanty, ale snižují mezní rychlost (Kotal et al. 1984).
3. Akompetitivní- Při této inhibici se inhibitor váže na komplex enzym- substrát (ES). Komplex inhibitoru s enzymem a substrátem (ESI) se pak dále nemůže přeměňovat na produkt (Kodíček et al. 2018). Snižuje se stejnou mírou mezní rychlost a Michaelisova konstanta (Zehnálek 1999).
4. Smíšená- Dochází ke změně Michaelisovy konstanty, mezní rychlosti, ale i jejich samotnému poměru (Vodrážka 1996).

#### 3.4.4.4.2.2 Ireverzibilní inhibitory

Tyto inhibitory nevratně blokují enzymovou aktivitu. Vytváří velmi pevný komplex enzym-inhibitor (EI) (Zehnálek 1999). Disociační konstanta má nulovou hodnotu (Šípál et al. 1992). Průběh křivky připomíná nekompetitivní inhibici. Hodnota Michaelisovy konstanty je stejná, ale snižuje mezní rychlost z důvodu klesání koncentrace aktivního enzymu (Kodíček et al. 2018). S každým přidáním inhibitoru se enzymová aktivita postupně snižuje (Šípál et al. 1992).

### 3.5 ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

Pod pojmem reactive oxygen species (ROS) rozumíme v českém překladu reaktivní formy kyslíku. ROS mohou v rostlině v prudké míře vznikat pod vlivem působení stresu, který jako důsledek svého působení vyvolá oxidativní stres (Piterková et al. 2005). Tyto reaktivní formy kyslíku jsou nevyhnutelným důsledkem aerobního metabolismu (Sharma et al. 2012). Molekulární kyslík v atmosféře je málo reaktivní. Různými procesy se tento málo reaktivní kyslík může přeměnit na jeho aktivnější formy či na oxidační sloučeniny (Procházka et al. 1998). ROS jsou molekuly nesoucí kyslík, který je více reaktivní než samotný  $O_2$  (Waszczak et al. 2018). Zařazují se zde volné radikály jako je superoxidový aniont ( $O_2^-$ ), hydroxilový radikál ( $OH^\cdot$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a singletní kyslík ( $^1O_2$ ) (Sharma et al. 2012). Produkce singletního kyslíku podmiňuje produkci dalších reaktivních forem kyslíku (Piterková et al. 2005).

V přítomnosti kyslíku vedou buněčné reakce charakterizované vysokou rychlostí přenosu elektronů nebo energie nevyhnutelně k tvorbě ROS. Vyvinulo se i několik enzymatických reakcí, které produkují ROS jako hlavní produkt nebo jako vedlejší produkt. Potenciál poškození těmito látkami byl zmírněn vývojem a rozšířením řady enzymatických i neenzymatických rozkladačů ROS (Waszczak et al. 2018). ROS mohou způsobit inaktivaci enzymů, oxidovat proteiny a poškozovat RNA a DNA. Při zvýšené koncentraci vzniká hypersenzitivní reakce rostlin následovaná programovanou buněčnou smrtí. Každý typ ROS má jedinečné chemické vlastnosti (Mhamdi & Van Breusegem 2018). Hydroxylový radikál je důvodem poškození především lipidů, nukleových kyselin a proteinů (Piterková et al. 2005). Singletový kyslík oproti tomu oxiduje lipidy a proteiny (Mhamdi & Van Breusegem 2018). Pomocí enzymů jako je superoxid dismutáza [1.15.1.1], peroxidáza [1.11.1.7], kataláza [1.11.1.6] a enzymy askorbát - glutathionového cyklu se mohou rostliny proti ROS účinně bránit (Piterková et al. 2005).

Původně byl předpoklad, že ROS jsou pouze toxické produkty aerobního metabolismu. Nicméně v posledních letech se prokázalo, že ROS mají v rostlinách i důležité signalizační role. Jsou důležité pro řízení růstu, vývoje a v neposlední řadě se podílí na procesu reakce na různé abiotické či biotické podněty (Piterková et al. 2005; Bailey-Serres & Mittler 2006). V ROS homeostáze dochází k rychlým změnám při výkyvech stavu prostředí. Rostliny tyto změny monitorují a využívají je k přenosu signálů, které pak slouží k úpravě metabolismu či fyziologie, a to jak na buněčné úrovni, tak na úrovni celé rostliny (Waszczak et al. 2018). Ze všech ROS je nestabilnější peroxid vodíku, a proto je považován za převažující prvek během buněčné signalizace (Mhamdi & Van Breusegem 2018).

ROS jsou kontinuálně produkovány jako vedlejší produkt metabolických drah. Za běžných podmínek jsou tyto molekuly degradovány především antioxidantními mechanismy. Během stresu se může významně narušit rovnováha mezi produkcí a degradací ROS. V důsledku tohoto narušení může koncentrace ROS v rostlině nebezpečně stoupat (Pitzschke et al. 2006). Pakliže je nárůst koncentrace ROS malý, antioxidantní mechanismy mají dostatečnou kapacitu na to, aby koncentraci ROS vrátily do původních hodnot přirozené homeostázy. Koncentrace ROS se v průběhu stresu zvyšuje 3 až 10x oproti normálnímu stavu (Van Breusegem & Dat 2006).

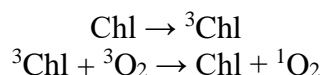
### 3.5.1 Druhy ROS

Molekuly kyslíku jsou nezbytně nutné pro život. Molekula kyslíku má nenahraditelnou funkci v aerobních reakcích. Kyslík vzniká v chloroplastech oxidací vody ve fotosyntetickém elektronovém řetězci (Saed-Moucheshi et al. 2014). Molekulární kyslík je málo reaktivní. Jeho reaktivita se mění různými mechanismy (Piterková et al. 2005). Jedná se o dva základní mechanismy. Prvním je fotodynamická aktivace, která končí především produkcí singletního kyslíku. Za druhé může dojít k redukci, která je následovaná tvorbou peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu. Hydroxylový radikál je nejreaktivnější látkou v biologickém světě. Redukce se značně urychluje v přítomnosti přechodných kovů (např. měď, železo), nebo i v přítomnosti některých enzymů, konkrétně monooxidáz (Garg & Manchanda 2009). Aby proběhla celková redukce kyslíku na vodu, jsou zapotřebí čtyři elektrony. Tato redukce probíhá s doprovodem jedno až tří elektronovou redukcí za vzniku superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu. Reakce vyžaduje iniciaci pouze v prvním kroku. Ostatní kroky probíhají samovolně z toho důvodu, že jsou exotermní (Piterková et al. 2005).

#### 3.5.1.1 Singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ )

Singletový kyslík, nebo také triplet kyslíku, je důsledkem osvětlení chloroplastů (Garg & Manchanda 2009). Chlorofylové pigmenty, jež jsou spojené s elektronovým transportním řetězcem, jsou primárním zdrojem (Saed-Moucheshi et al. 2014). Nedostatečné rozptýlení energie během fotosyntézy může vést k vytvoření tripletu chlorofylu. Triplet chlorofylu může převést svoji excitační energii na  $\text{O}_2$  a vytvořit tak  $^1\text{O}_2$  (Garg & Manchanda 2009). Dalším zdrojem singletového kyslíku jako vedlejšího produktu může být aktivita lipoxygenázy (Saed-Moucheshi et al. 2014). Singletový kyslík může způsobit poškození obou fotosyntetických systémů PS I i PS II a ohrozit celý proces fotosyntézy. Přestože má krátký poločas rozpadu (3  $\mu\text{s}$ ), dokáže urazit až 100 nm a způsobit řadu poškození (Das & Roychoudhury 2014). Garg & Manchanda (2009) ve svém článku doplňují, že molekula singletního kyslíku dokáže vydržet ve vodě téměř 4 ms, a v nepolárním prostředí až 100 ms. Poškození zahrnuje molekuly proteinů, pigmenty, nukleové kyseliny a lipidy. Jedná se o hlavní ROS, který je zodpovědný indukovanou ztrátou aktivity PS II za světla, což vede k buněčné smrti (Das & Roychoudhury 2014). Singletový kyslík je velmi reaktivní molekula, která může reagovat s ostatními molekulami, anebo jim dokáže předávat svoji excitační energii (Garg & Manchanda 2009).

Rovnice vzniku dle Dase & Roychoudhuryho (2014) je:



Environmentální stresy jako je slanost, sucho a přítomnost těžkých kovů, vede k uzavření průduchů. Což také přispěje ke zvýšené intracelulární koncentraci  $\text{CO}_2$ . Tato situace podporuje tvorbu  $^1\text{O}_2$ . Rostlina se může bránit proti singletnímu kyslíku za pomoci  $\beta$ -karotenu či tokoferolu jako neenzymatickými obrannými mechanismy (Das & Roychoudhury 2014). Singletní kyslík je také někdy využíván rostlinou jako signální molekula (Garg & Manchanda 2009).

#### 3.5.1.2 Superoxidový radikál ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )

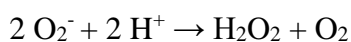
Jedná se o produkt jednoelektronové redukce  $\text{O}_2$ . Má jeden nepárový elektron, a to z něj činí volný radikál. Původně se mylně předpokládalo, že fotoredukci  $\text{O}_2$  se vytváří acetaldehyd

za přítomnosti ethanolu a katalázy a za fotoredukovaný produkt se považoval peroxid vodíku. Toto se vyvrátilo v 70. letech, kdy byl detekován jako primární produkt superoxid (Saed- Moucheshi et al. 2014).

Superoxid má poločas rozpadu cca 2-4  $\mu$ s. Jedná se o mírně reaktivní molekulu, která nedokáže procházet přes buněčné membrány. Z tohoto důvodu je superoxid snadno dismutován na peroxid vodíku (Garg & Manchanda 2009). Tvoří se hlavně v thylakoidech lokalizovaných v PS I během necyklického elektronového transportního řetězce (Das & Roychoudhury 2014). Funguje jako oxidační, ale i redukční činidlo. Oxiduje síru, NADPH, aminokyseliny (histidin, methionin, tryptofan). Dále dokáže oxidovat i komplexy přechodných kovů, čímž dokáže ovlivnit aktivitu metaloenzymů (Piterková et al. 2005).

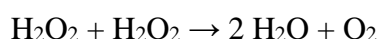
### 3.5.1.3 Peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Peroxid vodíku v rostlině vzniká druhou redukcí kyslíku (Das & Roychoudhury 2014), a to dle následující reakce:



Jedná se o stabilní sloučeninu, která má poločas rozpadu 1 ms (Piterková et al. 2005). Rozptýlit se dokáže jen do určité vzdálenosti od místa produkce (Garg & Manchanda 2009). Peroxid vodíku je čirá a mírně viskóznější kapalina než je voda. Ve zředěném roztoku se jeví jako bezbarvý (Saed-Moucheshi et al. 2014). Nejedná se o volný radikál, protože veškeré dostupné elektrony jsou spárované (Garg & Manchanda 2009). Vzniká v chloroplastech dismutací superoxidového radikálu ve většině reakcí, které jsou katalyzované superoxid dismutázou (Das & Roychoudhury 2014). Peroxid vodíku snadno prostupuje přes membrány. Dokáže inaktivovat některé enzymy oxidační jejich thiolových skupin, jako např. enzymy Calvinova cyklu, Cu/Zn SOD a Fe-SOD (Garg & Manchanda 2009).

Osud vzniklého peroxidu vodíku popisují ve svém článku Piterková et al. (2005). Uvádějí, že může být disproportionován na vodu a kyslík za přítomnosti katalázy, dle reakce:



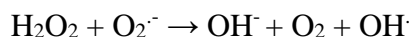
Dále může být peroxid vodíku použit jako substrát pro reakce peroxidáz. Poslední možností je detoxikace askorbátperoxidázou, která spolupracuje s dehydrogenaskorbátperoxidázou a glutathion reduktázou v Halliwellově-Asadově dráze.

Dle Das & Roychoudhury (2014) se peroxid vodíku netvoří v rostlině pouze v běžném režimu rostliny, ale i během oxidativního stresu, který je způsoben suchem, chladem, intenzivním světlem, UV zářením či při interakci s patogeny. Ze 70 % je nadměrná tvorba H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> způsobena suchem.

### 3.5.1.4 Hydroxylový radikál (OH·)

Tříelektronovou redukcí O<sub>2</sub> vzniká hydroxylový radikál- nejreaktivnější forma kyslíku (Piterková et al. 2005). Zároveň je i nejvíce toxický ze všech ROS, které jsou známy. Ačkoliv peroxid vodíku a superoxidový radikál jsou poměrně málo reaktivní, společně dokáží tvořit velmi reaktivní hydroxylový radikál (Saed-Moucheshi et al. 2014). Ten je vytvářen

v neutrálním pH prostředí ve Fentově reakci mezi  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2^-$ . Tato reakce je katalyzována kovy jako je železo, resp. jeho  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  ionty (Das & Roychoudhury 2014).



Nízká dostupnost železnatých iontů může do značné míry omezit produkci  $\text{OH}^\cdot$ . Železité ionty ale mohou být převedeny do redukčního stavu železnatých iontů za asistence redukčních činidel (superoxid). A tak i málo koncentrace zapříčiní vznik hydroxylového radikálu. Potenciálně se dají ionty železa nahradit jinými ionty kovů, např. ionty mědi jako jsou  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{3+}$  ionty (Saed-Moucheshi et al. 2014).

Hydroxylový radikál dokáže poškozovat rostlinné složky peroxidací lipidů, poškozením proteinů a membránové struktury. Neexistuje žádný antioxidační systém, který by dokázal hydroxylový radikál rozložit, a tak jeho nadměrná koncentrace v buňce způsobuje buněčnou smrt (Garg & Manchanda 2009; Das & Roychoudhury 2014).

### 3.5.2 Vznik ROS v organelách

Hlavní místo vzniku těchto molekul se nachází v elektronovém transportním řetězci v chloroplastech a v mitochondriích. Další důležité místo vzniku je v peroxizomech, kde se vyskytují monooxygenázy a oxidázy. Produkce ROS dále probíhá i v apoplastickém prostoru mezi buněčnou stěnou a plasmatickou membránou (Kumar et al. 2021).

#### 3.5.2.1 Chloroplasty

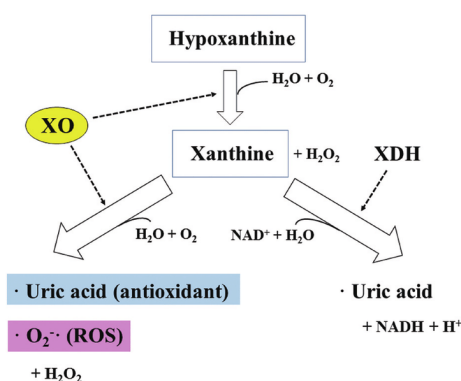
Chloroplast je hlavní fotosyntetická organela. Považuje se za nejvýznamnějšího producenta ROS (Piterková et al. 2005). Hlavním místem výroby ROS v chloroplastu jsou fotosystémy I a II (Kumar et al. 2021). V chloroplastech se hromadí velké množství energie během absorpce záření asimilačními pigmenty. Současně je během světla v chloroplastech zvýšená koncentrace kyslíku, která vzniká z rozkladu vody ve fotosystému II (Procházka et al. 1998). Fotosystém I obsahuje redukční místo obsahující centra skládající se z Fe-S. Zde může docházet k redukci kyslíku Mehlerovou reakcí (Piterková et al. 2005). Primárním produktem této reakce je superoxid (Procházka et al. 1998). Superoxid může být přeměněn superoxid dismutázou a přetvořen na vodu skrze různé antioxidační systémy (Kumar et al. 2021). Pokud tomu tak není, může se ze superoxidu dále tvořit nebezpečné hydroxylové radikály a peroxid vodíku (Procházka et al. 1998).

Fotoredukce kyslíku za současné tvorby superoxidu je možná i ve fotosystému II. Zde se ale může jednat i o pozitivní jev. Je zde předpoklad, že vzniklý superoxid chrání fotosystém II před fotoinhibičním poškozením. Superoxid je pravděpodobně schopen přeměnit vzniklou excitační energii (Procházka et al. 1998; Piterková et al. 2005). Chrání fotosyntetický elektronový transportní řetězec před redukcí a umožňuje tak účinnou ochranu. Tvorba ROS se tak nabízí jako možná strategie pro přežití rostlin vystavené vysokému světelnému stavu (Kumar et al. 2021). V chloroplastu za vysoké ozářenosti může docházet také ke tvorbě singletového kyslíku, kdy dochází k přenosu excitační energie z chlorofylu na kyslík, jenž je v základním stavu (Procházka et al. 1998).

### 3.5.2.2 Peroxisomy

Hlavními metabolickými procesy, při kterých vzniká peroxid vodíku, jsou fotorespirační glykolát oxidázová reakce,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin, enzymatické reakce flavin oxidáz a dismutace superoxidového radikálu. Peroxisomy jsou zřejmě největším intracelulárním zdrojem  $H_2O_2$  (Piterková et al. 2005). Ovšem ne vždy musí nutně tok fotorespirační cestou vést ke zvýšené tvorbě  $H_2O_2$ . Peroxisomy jsou vybaveny silným mechanismem čištění, který za normálních okolností zabraňuje zvýšenému množství  $H_2O_2$  (Waszczak et al. 2018).

Obdobně jako chloroplasty a mitochondrie, tak i peroxisomy produkují  $O_2^-$  jako produkt jejich primárního metabolismu (Sharma et al. 2012). V matrixu peroxisomů jsou uloženy enzymy v podobě multienzymového komplexu. Tento komplex zprostředkovává přenos metabolitů z peroxisomů přes jejich membránu pomocí prolinových kanálků (Piterková et al. 2005). Byly identifikována dvě místa produkce  $O_2^-$  v peroxisomech. První místo bylo nalezeno v matrixu, kde byla nalezena spojitost s xantinoxidázou [1.1.3.22] a jejími procesy. Druhé místo se nachází v peroxisomální membráně, kdy je produkce  $O_2^-$  spojena s flavoproteinovou NADPH: ferrichelát reduktázou. Používání NADPH jako dárce elektronů vede přímo k produkci radikálů. Xantinoxidáza katalyzuje oxidační přeměnu xanthinu a hypoxanthinu na kyselinu močovou a je zdrojem ROS (Ahmad 2014). Za tvorbu superoxidu jsou dle Piterkové et al. (2005) zodpovědné 3 polypeptidy o molekulové hmotnosti 18, 29 a 32 kDa. Dále Piterková et al. (2005) doplňují, že během působení stresu bylo pozorováno zvýšené uvolňování superoxidu z membrány peroxisomu do cytosolu. Superoxidový radikál se velmi rychle přeměňuje na  $H_2O_2$  a vodu.



Obr. č. 19. Produkce kyseliny močové a superoxidu

xanthin oxidázou. (Dostupné z:

[https://www.researchgate.net/publication/318416994\\_Is\\_Serum\\_Uric\\_Acid\\_a\\_Biomarker\\_but\\_not\\_a\\_Media\\_tor\\_in\\_Patients\\_With\\_Lifestyle\\_and\\_Cardiovascular\\_Diseases/figures](https://www.researchgate.net/publication/318416994_Is_Serum_Uric_Acid_a_Biomarker_but_not_a_Media_tor_in_Patients_With_Lifestyle_and_Cardiovascular_Diseases/figures) ke dni 2. 4. 2021)

### 3.5.2.3 Mitochondrie

Produkce ROS v mitochondriích probíhá přes elektronový transportní řetězec. Tento elektronový transportní řetězec se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně, a to v mitochondriálních komplexech I, II a III, kde se produkuje nejvíce superoxidu (Waszczak et al. 2018). Dále Waszczak et al. (2018) ve svém článku uvádějí, že význam produkce v těchto místech nelze jednoznačně posoudit. Většina poznatků totiž pochází z živočišných mitochondrií. Avšak vzhledem k podobné stavbě s rostlinnými mitochondriemi je zde předpoklad, že se mezi nimi nenacházejí žádné významné rozdíly.

Syntéza mitochondriálních radikálů je ve srovnání s chloroplasty či peroxisomy nižší. Zatímco chloroplasty a peroxisomy využívají fotorespirační energie fotosyntézy, mitochondrie jsou zdrojem radikálů v tmavých a nezelených tkáních. Tvorba ROS probíhá v mitochondriálním elektronovém transportním řetězci, který zahrnuje komplexy I a III. Zde je  $O_2^-$  vytvořen a redukován dismutací na peroxid vodíku (Ahmad 2014).

### 3.5.3 ROS jako signální molekuly

Vliv na rostlinu je do značné míry dán koncentrací ROS. Příliš vysoké koncentrace mají za následek velkou škálu negativních reakcí, či v krajních případech buněčnou smrt. Nízká koncentrace naopak může být pro rostlinu prospěšná (Bhattacharjee 2012). Vzhledem k tomu, že ROS mohou ovlivňovat řadu genů a různé signální dráhy, začaly je rostliny využívat i jako signální molekuly. Jako signální molekuly jsou vhodné i proto, že jejich molekuly jsou malé a mohou se šířit na krátké vzdálenosti (Pitzschke et al. 2006). Také jsou velmi reaktivní a dokáží interagovat s dalšími molekulami (Nafees et al. 2019). Životnost ROS jako signálních molekul je značně dána rovnováhou mezi produkcí oxidantů a produkcí jejich antioxidantů (Sharma et al. 2012). Rostliny jsou schopny s největší pravděpodobností uměle zvýšit produkci ROS pro účely signalizace. Superoxid a peroxidu vodíku slouží jako druzí poslové při procesech růstu a vývoje. O změnách prostředí navíc informují superoxidy nacházející se v membránách rostlin (Garg & Manchanda 2009). ROS jsou tvořeny redoxními reakcemi, nebo jsou přímými deriváty kyslíku. Ze všech ROS může procházet buněčnými membránami pouze  $H_2O_2$ , takže na buněčné signalizaci se zřejmě podílí nejvíce (Nafees et al. 2006). Ale je velmi nepravděpodobné, že by peroxid vodíku byl snímán receptorem jako rozpoznatelná signální molekula. Nicméně jako slabě oxidující látka pravděpodobně touto činností předává své zprávy dál (Smirnov 2005).

Receptory pro ROS nejsou známy. Mnohými studiemi bylo však naznačeno, že ROS jsou rostlinami vnímány nejméně třemi mechanismy. První mechanismus je pravděpodobně vázán na neidentifikované receptorové proteiny. Další možný mechanismus zřejmě probíhá na redoxně senzitivních transkripčních faktorech. Posledním potenciálním mechanismem může být přímá inhibice fosfatáz ROsem (Mittler et al. 2004). Dle Choudhuryho et al. (2014) reagují s cílovými molekulami selektivně. Když je zvýšená koncentrace ROS, vyvolá se změna genové exprese. Dále uvádí, že ke změnám na úrovni genu dochází vlivem oxidace komponentů signální drah. Oxidace těchto komponentů vede k aktivaci transkripčních faktorů. Jeden z mechanismů, který se podílí na signalizaci vyvolané oxidačním stresem, je právě aktivace obranných genů. Celý mechanismus signalizace se dá popsat u *Arabidopsis*. Rostliny prokazatelně reagují vlivem signalizace ROS zvýšením antioxidantní ochrany prostřednictvím zvýšené regulace exprese antioxidantních genů (Bhattacharjee 2012).

Přenos signálu, který nese ROS, musí vykazovat buněčnou odpověď. Smirnov (2005) ve své publikaci popisuje možný přenos signálu následovně. ROS může být vnímán různými proteiny paralelně. Odpovědí tedy může být více současně. V ideálním případě musí vykazovat odpověď cílová molekula. Čili další člen signalizační dráhy se může zapojit do vedení signálu za pomoci inhibičních či aktivačních procesů. Další složkou této kaskády by potenciálně mohla být bílkovina, která je navázaná na cílový protein. Cílový protein pak může třeba účinkem  $H_2O_2$  např. měnit konformaci/funkci partnerského proteinu, který zprostředkovává signalizační kaskádu.



### 3.5.3.1 ROS a stomata

Bylo prokázáno, že ROS jsou základní signály pro zprostředkování uzavření stomatálních průduchů vyvolaných činností ABA. Stimulovaná ABA indikuje stomatální uzávěr za pomoci  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů (Garg & Manchanda 2009). Fyttohormon ABA se významným podílem podílí na řadě adaptací vůči stresu. Již dřívější práce prokázaly, že  $\text{H}_2\text{O}_2$  indikuje stomatální uzávěr. Buňky syntetizují  $\text{H}_2\text{O}_2$  na výzvu elicitoru. U *Arabidopsis* je  $\text{H}_2\text{O}_2$  endogenní složkou signalizace ABA (Pitzschke et al. 2006). Bylo zjištěno, že u mutanta, jenž ztratil funkci ethylenového receptoru *etr1-7*, byl zcela narušen stomatální uzávěr indukovaný  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Předpokládá se, že receptor *etr1* hraje roli v signalizaci ROS na uzávěr stomat (Garg & Manchanda 2009).

### 3.5.3.2 Buněčná smrt

Buněčná smrt je nedílnou součástí života rostlin. Je nezbytně nutná pro udržení růstu a obnovu buněk (Kumar et al. 2021). Zvýšená tvorba ROS, ať už nárazově nebo stabilně, je reakcí rostliny na různé podmínky. Tato reakce může vést k programované buněčné smrti (Mhamdi & Van Breusegem 2018). Termín programovaná buněčná smrt je definován jako jakákoliv forma buněčné smrti vykazující jeden či vícero molekulárních a buněčných procesů bez ohledu na spouštěče či znaky, které vykazuje. U rostlin zřejmě dochází i k překryvu znaků nekrózy a buněčné smrti. To značně ztěžuje její identifikaci. Zatímco nekróza vyplývá z dlouhodobého a těžkého traumatu a není jakkoliv geneticky regulována, tak buněčná smrt je procesem geneticky regulovaným (Bhattacharjee 2012). Buněčná smrt způsobená ROS byla dlouho spíše hypotetickou otázkou. Negativní až toxické účinky ROS maskovaly jejich funkci v zapojení do různých signálních drah. Navíc chyběly přesné detekční a spolehlivé metody pro jejich stanovení (Van Breusegem & Dat 2006).

Klíčový faktor zodpovědný za programovanou buněčnou smrt je  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Buněčnou smrt indikuje na základě dávky a času. Předpokládá se, že  $\text{H}_2\text{O}_2$  indikuje buněčnou smrt prostřednictvím interakce s ostatními signálními molekulami, jako je např. ethylen či kyselina salicylová (Bhattacharjee 2012). Navzdory všemu, konkrétní typy ROS a mechanismy jejich zapojení do tohoto procesu jsou stále nejasné a musí se ještě podrobit bližšímu zkoumání (Mhamdi & Van Breusegem 2018).

### 3.5.4 Neenzymatické ochranné mechanismy

Rostliny disponují rozsáhlým antioxidačním systémem, který je chrání před nebezpečným nárůstem koncentrace ROS. Tyto systémy zahrnují neenzymatické a enzymatické antioxidační mechanismy. Jejich místo produkce se od místa produkce ROS liší. Jakmile se začne prudce zvyšovat koncentrace ROS v rostlině, rostlina začne zvyšovat svoji antioxidační obranu (Sharma et al. 2012). Antioxidační kapacita těchto systémů je proměnlivá a závisí na působení stresorů, ale i na druhu, věku a stádiu vývoje rostliny (Piterková et al. 2005).

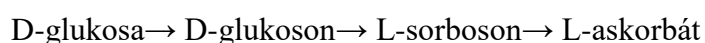
Neenzymatické antioxidanty se skládají z nízkomolekulárních sloučenin. Tento obranný mechanismus může ovlivnit růst a vývoj rostliny za pomoci modulačních procesů od mitózy, prodloužení buněk až do stárnutí (Ahmad 2014). Zahrnují askorbát, glutathion, tokoferoly, flavonoidy, karotenoidy a některé alkaloidy (Pitzschke et al. 2006). Askorbová kyselina a glutathion jsou aktivní ve vodní fázi. Naopak lipofilní sloučeniny jako  $\alpha$ -tokoferol a  $\beta$ -karoten jsou aktivní v membránovém prostředí (Ahmad 2014). Tato skupina chránící proti oxidačnímu poškození patří do skupiny přímé deaktivace (Piterková et al. 2005).

### 3.5.4.1 Askorbát

L-askorbát, vitamín C hraje nezastupitelnou roli ve fyziologických systémech rostlin. Je nutný ke správnému růstu, diferenciaci buněk a v řadě metabolických drah. Navíc je vitamín C silný reduktant volných radikálů, a tak významně snižuje možné poškození rostliny oxidačním stresem (Piterková et al. 2005). Askorbát je všudypřítomná látka u eukaryot. Vyskytuje se buď v redukované formě - askorbová kyselina, nebo ve dvou oxidačních formách - monodehydroaskorbová a dehydroaskorbová kyselina. Poměr mezi nimi je významný pro správnou odolnost rostlin vůči oxidačnímu stresu (Ahmad 2014).

Za normálních fyziologických podmínek se askorbát nachází v redukované formě v listech. Taktéž se nachází v hojně míře v chloroplastu (Saed-Moucheshi et al. 2014). Koncentrace v listech je zpravidla větší než v kořenech. Taktéž bývá hojně zastoupen v meristémech. Téměř 90 % askorbátu je přítomno v cytoplasmě, ale na rozdíl od ostatních antioxidantů se jeho podstatná část transportuje do apoplastu (Sharma et al. 2012). Při fyziologickém pH je askorbát převážně zastoupen jako askorbátový aniont (Smirnoff 2005). Askorbát v redukované formě je schopen uvolnit elektrony, což je zásadní krok v jeho antioxidačních schopnostech proti ROS, jenž se nachází ve vodní fázi (Piterková et al. 2005). Askorbát ve své podstatě funguje jako redukční činidlo. Gluthathion využívá dvě molekuly askorbátu v askorbát-gluthathioném cyklu k redukci  $H_2O_2$  na vodu. Současně se tvoří monodehydroaskorbát. Jedná se o radikál s krátkou životností. Může se disproportionovat na dehydroaskorbát a přímo na askorbát. NADPH poskytuje této reakci elektrony a je katalyzován monodehydroaskorbát reduktázou [1.6.5.4] (Ahmad et al. 2010). Askorbát dokáže vyjma přímé redukce  $H_2O_2$  na vodu, taktéž degradovat superoxid a hydroxylový radikál (Saed-Moucheshi et al. 2014).

Místo syntézy askorbátu se nachází v mitochondriích a následně je transportován do ostatních buněčných složek. Ačkoliv se ví, že prekurzorem jeho syntézy je D-glukosa, jeho biosyntetická cesta není doposud zcela objasněná (Ahmad et al. 2010). Nicméně Piterková et al. (2005) ve svém článku mají schéma syntézy askorbátu znázorněnou následovně:



V neposlední řadě askorbát regeneruje tokoferol z tokoferoxyckého radikálu, čímž dokáže chránit membránu (Piterková et al. 2005; Saed-Moucheshi et al. 2014).

### 3.5.4.2 Gluthathion

Gluthathion je tripeptid obsahující cystein, zároveň je to jeden z nejdůležitějších metabolitů rostlin (Saed-Moucheshi et al. 2014). Ve srovnání s ostatními látkami obsahující síru (thioly), je hladina gluthathionu velmi vysoká (1-4 mM). Nejvyšší koncentrace se nachází v chloroplastech. Dále je lokalizován v cytosolu, endoplasmatickém retikulu, vakuolách, mitochondriích, peroxisomech a v apoplastu (Ahmad 2014). Stejně jako ve zvířecích buňkách funguje gluthathion jako redukční činidlo ROS. V redukovaném stavu je thiolová skupina cysteinu schopna prostřednictvím výměny poskytnout svůj redukční ekvivalent jiným molekulám, mimo jiné právě ROS a proteinům (Czarnecka & Karpiński 2018).

Jeho biosyntetická cesta je dobře známá. Ve dvou ATP-dependentních krocích katalyzovaných  $\gamma$ -glutamylcystein syntetázou [6.3.2.2] a glutathion syntetázou [6.3.2.3] se tvoří aminokyseliny, které jsou následně spojeny do jednoho kompletního tripeptidu (Ahmad et al. 2010). Zároveň je glutathion substrátem pro glutathion transferázu [2.5.1.18] nutnou k detoxikaci dehydroaskorbátoreduktázy. Tím se významně podílí na správné funkci askorbátu jako antioxidantu (Saed-Moucheshi et al. 2014).

Díky svým schopnostem dokáže zabránit peroxidaci lipidů. K jeho nejdůležitějším vlastnostem lze také přiřadit odstraňování cytotoxického peroxidu vodíku. Dále reaguje i s ostatními ROS, konkrétně se singletovým kyslíkem, superoxidem a hydroxylovým radikálem (Piterková et al. 2005).

### 3.5.4.3 Tokoferoly

Tokoferoly jsou lipofilní antioxidanty, které jsou účinné pro odstraňování ROS a lipidových radikálů (Czarnecka & Karpiński 2018). Jsou syntetizovány pouze fotosyntetickými organismy a vyskytují se pouze v zelených částech rostlin (Sharma et al. 2012). Jsou to základní složky biologických membrán, kde mají antioxidantní i neantioxidantní funkce (Saed-Moucheshi et al. 2014). Jejich neantioxidantní funkce spočívají např. ve stabilizaci membrán (Piterková et al. 2005). Jsou známé 4 tokoferolové izomery  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -, které jsou složeny z chromanového kruhu a fytylového řetězce (Piterková et al. 2005). Antioxidantní kapacita tokoferolů *in vivo* byla určena  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$  dle počtu methylových skupin navázaných na fenolický kruh (Sharma et al. 2012). Nejúčinnější antioxidant je tedy  $\alpha$ -tokoferol hojně se nacházející v listech,  $\gamma$ -tokoferol je nejvíce obsažen v semenech. Méně zastoupené v rostlinách jsou  $\beta$ -tokoferoly a  $\delta$ -tokoferoly (Ahmad 2014). Bylo zjištěno, že až 120 molekul singletového kyslíku může být degradováno pouhou jedinou molekulou  $\alpha$ -tokoferolu. Taktéž  $\alpha$ -tokoferol likviduje lipidové radikály a vytváří tokoferoxylové radikály. Ten ale může být přeměněn zpět na svojí původní sloučeninu  $\alpha$ -tokoferol reakcí s askorbátem či jinými antioxidanty (Ahmad et al. 2010).

Tokoferolům je přisuzována účast na mechanismu, který chrání PUFA před možnou oxidací. ROS, které jsou vedlejším produktem fotosyntézy a metabolismu, jsou možným zdrojem peroxidace lipidů (Ahmad et al. 2010). Činnost tokoferolu ve snaze zabránit snižování ochranných funkcí membrán oxidací probíhá ve spolupráci s askorbátem a glutathionem. Tato úloha zřejmě spočívá v opětovné regeneraci tokoferolu. Ireversibilní oxidací  $\alpha$ -tokoferolu se z buňky dá snadno odstranit singletový kyslík (Piterková et al. 2005).

Tokoferol musí být transportován z plastidů do míst působení. U zvířat je pro tuto činnost znám tokoferolový transportní protein. Zda tento protein mají i rostliny nebylo dosud objasněno (Smirnov 2005).

### 3.5.4.4 Karotenoidy

Karotenoidy se taktéž řadí do lipofilních antioxidantů schopných detoxikovat různé druhy ROS (Sharma et al. 2012). V rostlinách jsou syntetizovány *de novo* ve většině plastidů (Ahmad 2014). Pohlcují světlo ve viditelném spektru světla od 450 do 570 nm a přenášejí zachycenou energii na chlorofyly (Saed-Moucheshi et al. 2014). Ke kontrole metabolismu a akumulace karotenoidů používají rostliny vícestupňové regulační procesy. Jejich množství v zelených a nezelených tkáních se značně liší (Ahmad 2010). Karotenoidy zachytávají světlo, které následně přenáší zachycenou energii na chlorofyly (Czarnecka & Karpiński 2018).

V chloroplastech jsou karotenoidy integrovány do fotosyntetických membrán a souvisí s bílkovinami, které váží chlorofyl (Ahmad 2014). Mají zásadní vliv na průběh fotosyntézy. Xantofyly jsou lokalizovány v komplexu, který má za úkol zachytávat světlo. Xantofyly jsou rovněž spojeny s reakčním centrem PS II. Jestliže dojde k inhibici tvorby karotenoidů vlivem různých herbicidů/inhibitorů, nebo dojde k inhibici přenosu elektronů z PS II, dochází k rychlému fotooxidačnímu bělení chloroplastů (Smirnov 2005).

V rostlinách se vyskytují různé druhy karotenoidů. Ve vyšších rostlinách ale převažují  $\beta$ -karotenoidy, které dokáží zabránit tvorbě singletního kyslíku tím, že dokáží změnit tripletový stav molekul chlorofylu (Saed-Moucheshi et al. 2014). Taktéž mají roli jako prekurzory signálních molekul, které mají na starost vývoj a stresové reakce rostlin (Sharma et al. 2012). Tlumit singletový kyslík dokáží karotenoidy obdobným způsobem jako tokoferoly. Taktéž jako tokoferoly dokážou přímo reagovat se superoxidem a dalšími radikály (Smirnov 2005). Svoji antioxidační funkcí chrání fotosyntetické systémy. Přebytkovou excitační energii rozptylují v xantofylovém cyklu, čímž účinně brání vzniku  $^1\text{O}_2$  reakcí s excitovanými molekulami chlorofylu (Czarnecka & Karpiński 2018).

Singletový kyslík odstraňuje karotenoidy velmi rychle z protein-pigmentových komplexů chlorofylu. Tato reakce vyvolá excitovaný tripletový stav karotenoidů, který se rychle vrací do normálu uvolněním tepla (Piterková et al. 2005). Zvýšená koncentrace karotenoidů v rostlinách taktéž zvyšuje toleranci vůči abiotickému stresu (Czarnecka & Karpiński 2018). Dále se potvrdilo, že  $\beta$ -karoten má inhibiční vliv na peroxidaci lipidů (Piterková et al. 2005).

#### 3.5.4.5 Flavonoidy

Flavonoidy poskytují v rostlinné říši červenou, modrou a fialovou pigmentaci. Dlouhou dobu byly flavonoidy považovány pouze za filtr proti UV záření. Nicméně v dnešní době jsou považovány za antioxidanty při fotoochraně (Czarnecka & Karpiński 2018). Řadí se do kategorie organických sloučenin (Saed-Moucheshi et al. 2014). A spadají do široké skupiny fenolických sloučenin (Ahmad et al. 2010). Běžně se vyskytují v listech, květových částech a v pylu. Flavonoidy se hromadí převážně ve vakuolách. Jejich exsudáty je možné najít i na listech či jiných vzdušných částech rostlin (Saed-Moucheshi et al. 2014). Při nadměrném světelném napětí se indukuje biosyntéza flavonoidů. Flavonoidy umístěné v chloroplastech zachycují singletový kyslík, který je generovaný při nadměrné světelné zátěži (Czarnecka & Karpiński 2018).

#### 3.5.5 Antioxidační enzymy

Nejuniverzálnější ochrannou rostlin proti ROS jsou antioxidační enzymy, které se vyskytují ve všech typech buněk. Jedná se o specializované enzymy a jejich systémy (Piterková et al. 2005). Tyto enzymy působí v různých subcelulárních kompartmentech a na oxidační stres reagují společně, jakmile se objeví. Tento ochranný mechanismus se skládá hned z několika typů enzymů (Sharma et al. 2012). Mechanismus působení spočívá v zabránění oxidačních reakcí a to tím, že odstraňují částečně redukované formy ROS jako je např. superoxid a peroxid vodíku (Piterková et al. 2005). Spadá sem široká škála enzymů jako je kataláza, askorbát peroxidáza, superoxid dismutáza, glutathionreduktáza, monodehydroaskorbátreduktáza a dehydroaskorbátperoxidáza (Czarnecka & Karpiński 2018). O prvních třech enzymech podávají více informací následující podkapitoly.

### 3.5.5.1 Kataláza (CAT)

Kataláza [1.11.1.6] společně s peroxidázou jsou dva zásadní enzymy nezbytné pro odstraňování peroxidu vodíku v rostlinách (Senthilkumar et al. 2021). Jedná se o první antioxidantní enzym, který byl objeven a specifikován (Sharma et al. 2012). Kataláza přímo disociuje peroxid vodíku na kyslík a vodu (Willekens et al. 1995). Těto skutečnosti odpovídá i fakt, že kataláza odstraňuje peroxid vodíku produkovaného v peroxisomech při  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin. Dále ho odstraňuje i při katabolismu purinů (Piterková et al. 2005). Tento intracelulární enzym byl nalezen v prokaryotických i eukaryotických organismech. Je přítomen u všech aerobů i fakultativních anaerobů. Nebyl však nalezen u obligátních anaerobů (Willekens et al. 1995).

Jako jediný enzym kataláza pracuje i při vysokých koncentracích peroxidu vodíku, nebo ve spolupráci s ostatními antioxidantními enzymy, aby společně zabránily tvorbě dalších reaktivních forem kyslíku (Baker & Graham 2002). Katalázová aktivita je přímo úměrná k množství disociace peroxidu vodíku (Senthilkumar et al. 2021). Peroxid vodíku je generován hned několika oxidázami přenášejícími dva elektrony na molekulární kyslík  $O_2$  či disproporciací  $O_2^-$  po redukci  $O_2$ . Jak peroxid vodíku, tak i superoxid vznikají ve fotosyntetických a respiračních systémech přenášejícími elektrony v chloroplastech/mitochondriích. Rychlost tvorby peroxidu vodíku byla udána na 80-160  $\mu M/s$  v 1 chloroplastu. Průběh fotosyntézy je peroxidem vodíku velmi rychle inaktivován z toho důvodu, že dochází k inhibici fixace  $CO_2$  (Smirnov 2005). Kataláza dokáže konvertovat okolo 6 milionů molekul peroxidu vodíku na vodu a kyslík za minutu (Ahmad 2014).

Bylo objeveno, že kataláza se nachází ve vícero izomerech (Piterková et al. 2005; Ahmad 2014). Tyto izomery se nazývají CAT1, CAT2 a CAT3 a jejich syntéza probíhá mnoha geny (Ahmad 2014). Taktéž dle Piterkové et al. (2005) se tyto izoenzymy rozdělují do třech skupin. Skupina I zahrnuje enzymy, které se nacházejí v listech a zasahují do odstranění  $H_2O_2$  během fotorespirace. Do skupiny II se řadí enzymy cévnatých svazků. A enzymy skupiny III odstraňují  $H_2O_2$  z glyoxysomů. Existence izoenzymů katalázy naznačuje strukturální a funkční univerzálnost u různých druhů rostlin (Ahmad 2014). V buňce je kataláza lokalizována v peroxisomech a zabírá až 25 % celkového peroxisomálního proteinu. Peroxisom katalázu široce využívá i jako marker (Baker & Graham 2002).

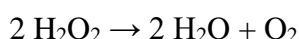
Kataláza hraje zásadní role hned během několika environmentálních stresů. Willekens et al. (1995) popisuje aktivitu katalázy během působení stresorů. **Při světelném stresu** se u sazenic žita, které byly vystaveny světlu o síle 30 000 luxů a nízké teplotě při 4 °C, došlo ke snížení aktivity katalázy o 28 % oproti kontrolním hodnotám, které byly prováděny při světlu o 5 000 luxech a při 20 °C. Přesto, že se nikterak nezvýšila koncentrace peroxidu vodíku, tak došlo ke zvýšení aktivity askorbátu, askorbát peroxidázy a glutathionu. Zřejmě jako náhrada ztráty katalázové aktivity. Dále popisují aktivitu katalázy **během chladového stresu**. U řady druhů, které jsou citlivé na chlad, došlo k inaktivaci katalázy. Obecně při nízké teplotě došlo u některých druhů ke snížení aktivity katalázy až o 50 %. Pokud ale došlo k aklimatizaci, aktivita se snížila jenom o 25%. **Vystavení vysokým teplotám** opět u sazenic žita byl zpozorován pokles fotoaktivity, a tím i snížení aktivity katalázy při teplotách nad 40 °C po dobu 4 hodin. Fotoinhibice se vrátila do normálního stavu, když se teplota snížila na hodnotu okolo 25 °C. Ale inaktivita katalázy trvala i 24 hodin po ustoupení stresoru.

### 3.5.5.1.1 Struktura enzymu

Krystalová struktura rostlinné katalázy není doposud zcela objasněna (Smirnov 2005). Molekula katalázy obsahuje hemovou skupinu (Piterková et al. 2005; Ahmad 2014). Dle Ahmada (2014) je hemová skupina klíčová pro zachování enzymové aktivity. Enzym má tetramerní strukturu ve tvaru činky se čtyřmi totožnými monomerními podjednotkami. Hemová prothetická skupina každé monomerní podjednotky se skládá z centrálního atomu železa (Ahmad 2014). Molekulová hmotnost těchto podjednotek je od 220 do 240 kD dle druhu rostliny (Baker & Graham 2002).

### 3.5.5.1.2 Princip stanovení

Kataláza katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík následovně:



Pro stanovení je dle Senthilkumariho et al. (2021) vhodné použít spektrofotometr. Rozklad peroxidu vodíku katalázou se dá měřit při 240 nm za jednotku času. Rozdíl v rozkladu peroxidu vodíku za danou jednotku času je míra aktivity katalázy.

### 3.5.5.2 Askorbát peroxidáza (APX)

Askorbát peroxidáza [1.11.1.11] se v rostlinách vyskytuje nejméně v 5 izoformách, a to jako mitochondriální izoforma, cytosolová izoforma, peroxisomální izoforma, glyoxysomální izoforma a chloroplastická izoforma (Dąbrowska et al. 2007). Chloroplastická izoforma je velice nestabilní a její poločas života je 30 sekund, pakliže není přítomen askorbát. Poločas jiné izoformy - cytosolová izoforma má naproti tomu má poločas života 40-60 minut (Ahmad et al. 2010; Sharma et al. 2012). V podmínkách, kdy koncentrace askorbátu klesne pod 20 mM, je aktivita APX rychle ztracena (Shigeoka et al. 2002).

Askorbát peroxidáza se podílí na odstraňování peroxidu vodíku, a to i v askorbát-gluthathionovém cyklu, kde využívá konkrétně askorbát jako donor elektronu, který využívá při redukci peroxidu vodíku na vodu (Sharma et al. 2012). Bylo prokázáno, že detoxikace ROS v tomto cyklu způsobuje dočasné změny ve většině meziproduktů (Pandey et al. 2017). Zároveň během tohoto procesu vzniká monodehydroaskorbát (Shigeoka et al. 2002). Askorbát peroxidáza se nachází ve většině eukaryot, včetně vyšších rostlin (Anjum et al. 2016). Vzhledem k tomu, že askorbát peroxidáza je v nepřítomnosti askorbátu značně nestabilní, je pro správnou funkci působení askorbát peroxidázy nutný vysoký obsah endogenního askorbátu (Caverzan et al. 2012). APX má obecně vyšší afinitu k peroxidu vodíku, než má kataláza (Ahmad et al. 2010).

Stres způsobený nepřiměřenou koncentrací peroxidu vodíku v rostlině inaktivuje fotosyntézu, naruší elektronový transportní systém a v konečném důsledku zastaví i buněčné dýchání. Různé izoenzymy askorbát peroxidázy jsou klasifikovány dle jejich lokalizace, ale vykazují i různé strukturální a kinetické vlastnosti. Chloroplastická izoforma, která je lokalizována v chloroplastu, je zřejmě první, která zachytí molekulu peroxidu vodíku, a to proto, že thylakoidy chloroplastu jsou blízko akceptoru PS I (Pandey et al. 2017). Je to právě především chloroplastická izoforma, která má vysokou afinitu k askorbátu a je závislá na její koncentraci (Shigeoka 2002).

Studie potvrdily, že exprese APX s ohledem na stresové stavy a patogenní útoky naznačují důležitost APX při kontrole intracelulární signalizace peroxidu vodíku (Shigeoka et al. 2002). Akumulace peroxidu vodíku je pro buňku vysoce toxická. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> může jako jediný ze všech ROS procházet skrz membrány a touto cestou do značné míry ovlivňovat i ostatní subcelulární oddíly. V přítomnosti dvojmocných kationtů se navíc z peroxidu vodíku dokážou vytvořit o to více nebezpečné a reaktivní hydroxylové radikály. Právě i z tohoto důvodu je vychytávání peroxidu vodíku APX nesmírně důležité pro dostatečně silný antioxidační systém (Pandey et al. 2017). Významná úloha APX se prokázala u různých abiotických stresů. Nadměrná **salinita půdy** zapříčiňuje produkci ROS. Expozice rostliny NaCl v koncentraci 150 mM po dobu 4 dní značně sníží aktivitu askorbát peroxidázy u pšenice seté (*Triticum aestivum*). Obecně platí, že zvýšená koncentrace APX v rostlině v průběhu solného stresu, značně přispívá k včasné aklimatizaci rostlin (Anjum et al. 2016). Dále Anjum et al. (2016) uvádějí, že několik studií APX, prokázaly její nezastupitelnou roli v reakci na **sucho**. Zvýšená aktivita APX byla zjištěna při nadměrném nedostatku vody v půdě s následným vzrůstem množství peroxidu vodíku. Během sucha APX toto množství do značné míry redukuje. Další významný vliv na průběh reakce APX byl prokázán i při stresu z vysoké teploty a z chladu.

#### 3.5.5.2.1 Struktura enzymu

APX patří k enzymům, které ve své struktuře obsahují hemovou skupinu. Hemová skupina obsahující železo je stejně jako u katalázy rozhodující pro správnost činnosti. Katalytická činnost APX je značně ovlivněna množstvím obsaženého železa. Místo pro vazbu peroxidových substrátů je na samém okraji hemu. To přispívá ke snazšímu přístupu substrátu k hemové skupině. Výsledky výzkumu poukazují na to, že APX může mít i alternativní vazebné místo. Ke klíčovým aminokyselinám, které umožňují vazbu askorbátu, patří Arg172, který je kritický pro správnou funkci askorbát peroxidázy (Smirnov 2005).

#### 3.5.5.2.2 Princip stanovení

Askorbát peroxidáza katalyzuje následující reakci:



Princip reakce popisují Senthilkumari et al. (2021) následovně. Askorbát peroxidáza redukuje peroxid vodíku na vodu za použití askorbové kyseliny jako substrátu a vytvoří oxidovanou formu kyseliny askorbátu – monodehydroaskorbát. Ta se spontánně redukuje na dehydroaskorbát. To probíhá za pomoci jejich příslušných reduktáz. Rychlost oxidace askorbátu může být zaznamenána jako pokles absorbance při 290 nm.

#### 3.5.5.3 Superoxid dismutáza (SOD)

Superoxid dismutáza [1.15.1.1] katalyzuje dismutaci přeměny superoxidu na peroxid vodíku a kyslíku (Raychaudhuri & Deng 2000). Vzniklý peroxid vodíku následně odstraňuje buď gluthathionperoxidázou nebo katalázou (Piterková et al. 2005). Dismutace je jev, kdy jedna molekula superoxidu poskytuje elektron molekule druhé. Tedy dochází k současné oxidaci a redukcii superoxidu (Matoušková et al. 2014). U vyšších rostlin SOD bojuje proti kyslíkovým radikálům. Superoxid dismutáza je vůbec první enzym, který přijde do kontaktu s ROS a působí jako první obranná linie (Kumar et al. 2021).

Byly identifikovány tři druhy SOD v závislosti na kovech, které jsou přítomné na aktivním místě a působí jako kofaktory. Konkrétně to jsou Cu/Zn SOD, Mn-SOD a Fe-SOD (Raychaudhuri & Deng 2000). Tyto jednotlivé izoenzymy jsou lokalizovány v různých částech buňky. Fe-SOD je lokalizován v chloroplastech, Mn-SOD má místo působení v mitochondriích a Cu/Zn SOD se nachází v chloroplastech, cytosolu a je možné jej nalézt i v extracelulárním prostoru (Alsher et al. 2002). Mn-SOD a Fe-SOD jsou považovány za nejstarší enzymy, které se vyskytují i v prokaryotách. Cu/Zn SOD je přítomna pouze v eukaryotách. Z tohoto důvodu se považuje za evolučně mladší (Ahmad 2014).

Zprvu byla SOD izolována v hovězí krvi jako zelený měděný protein. Později byla SOD nalezena i v rostlinách a byla uznána jako metaloprotein, ale bohužel se neznala jeho funkce. Následně byl potvrzen účinek Cu/Zn SOD ve veterinárním léčivu při zánětlivých procesech. V dnešních dobách se předpokládá, že SOD se nachází ve všech buňkách metabolizujících kyslík a taktéž všech extracelulárních oddílech (Gill et al. 2015). Jednotlivé enzymy SOD se liší nejen v zastoupením kovech, ale taktéž i svojí citlivostí. Fe-SOD je odolný vůči KCN, ale už méně je odolný vůči peroxidu vodíku. Oběma těmito látkami může být inaktivována Cu/ZnSOD (Ahmad 2014). A poslední ze skupiny Mn-SOD je rezistentní jak vůči KCN, tak i vůči peroxidu vodíku (Piterková et al. 2005). Aktivitu SOD do značné míry, dle některých výzkumů, ovlivňuje ABA prostřednictvím genové exprese. Tento jev byl upozorován i u askorbát peroxidázy (Ahmad 2014).

V průběhu environmentálních stresů byla hlášena zvýšená aktivita SOD, a to včetně toxicity suchem a během působení kovů. Zvýšená aktivita SOD souvisí se zvýšenou tolerancí na namáhání v průběhu působení stresu. Bylo potvrzeno, že SOD vede ke zvýšené odolnosti a toleranci vůči oxidačnímu stresu (Sharma et al. 2012).

#### 3.5.5.3.1 Izoformy SOD

Nejvíce zastoupenou třídou ze všech SOD je **Cu/Zn SOD**. Struktura může být jak homodimerní, tak i homotetramerní. Nicméně se v rostlinách může objevovat ještě jedna forma této SOD, a tou je monomerní forma. Vyskytuje se v především v cytosolu, chloroplastu, peroxisomu a v apoplastu. Byla zjištěna větší citlivost cytosolického Cu/Zn SOD k H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, než například u chloroplastické Cu/Zn SOD (Gill et al. 2015). U těchto dvou izoform je cca z 68 % podobné složení aminokyselinových frekvencí (Alsher et al. 2002). V Cu/Zn SOD jsou připojené dvoumocné atomy mědi a zinku připojené disulfidickou vazbou. Nicméně měď je důležitější než zinek, a proto při vyloučení mědi, či při substituci jiným kovem, dochází k inaktivaci enzymu (Gill et al. 2015). Elektrické vlastnosti této třídy SOD jsou odlišné od Mn-SOD a Fe-SOD, a proto došlo ke změně struktury enzymu poté, co se měď stala kovovým kofaktorem (Alsher et al. 2002).

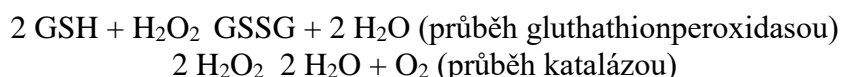
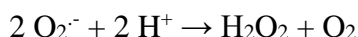
**Fe-SOD** je patrně nejstarší třída ze skupiny SOD. Železo bylo ve svém aktivním stavu používáno jako první kovový kofaktor. Lze se domnívat, že původně pochází z plastidu, odkud se přemístil do jaderného genomu (Gill et al. 2015). Jsou známé dvě formy tohoto enzymu. První formu tvoří dva shodné podjednotkové proteiny s obsahem 1-2 g atomu železa v aktivním centru. Toto uspořádání je v důsledku homodimerní. Čtyři podjednotky obsahující 2-4 g atomu železa v aktivním centru naopak vytvoří tetramerní uspořádání (Alsher et al. 2002). Tato poslední možnost byla dle Alshera et al. (2002) nalezena především u vyšších rostlin.



Když docházelo k poklesu dostupného množství železa, způsobilo to přesun k dostupnější variantě kovu - manganu. Z této skutečnosti vyplývá fakt, že **Mn-SOD** je zřejmě druhý nejstarší izomer (Alsher et al. 2002). Bez manganu tento enzym nemůže fungovat. Obnova Mn-SOD železnatým kationtem i přes určitou podobnost s Fe-SOD není možná. Dále byla zjištěna určitá podobnost mezi rostlinnou Mn-SOD a bakteriální Mn-SOD (Gill et al. 2015).

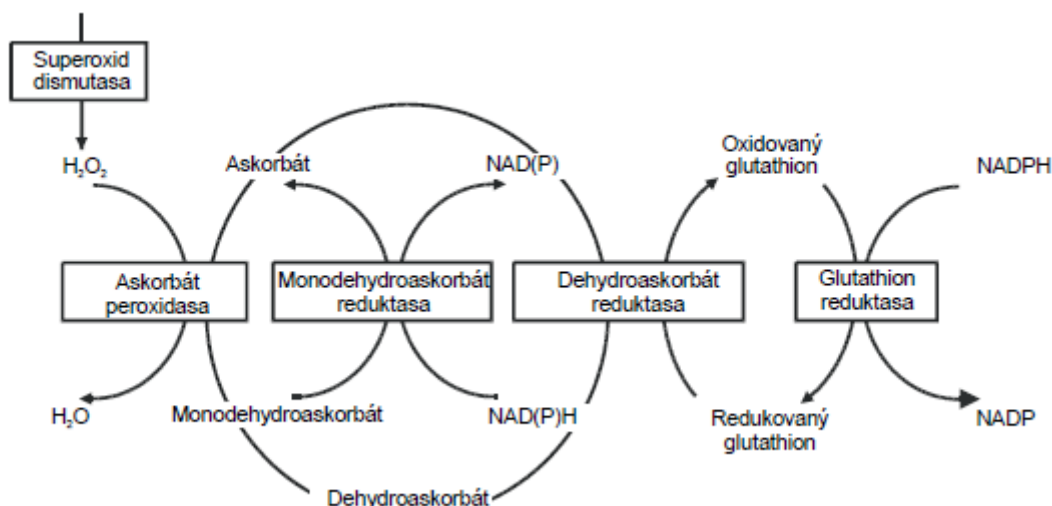
### 3.5.5.3.2 Princip stanovení

Dle Piterkové et al. (2005) je reakce katalyzovaná superoxid dismutázou až 4x rychlejší, než průběh samovolné dismutace. Průběh reakce je následovný:



Aktivitu superoxid dismutázy lze dle Senthilkumariho et al. (2021) určit inhibicí nitro modrého barviva tetrazolia (NBT) superoxidovým radikálem. NBT se redukuje v přítomnosti EDTA, která způsobuje zvýšení absorbance nad 560 nm. Enzymatická aktivita superoxid dismutázy je definována jako požadované množství enzymu k inhibici redukcí chromagenu o 50 %.

Dle Matouškové et al. (2014) se ke stanovení aktivity superoxid dismutázy používají nepřímé metody založené na schopnostech SOD redukovat reakce vyvolané superoxidy. Ke stanovení její aktivity slouží míra inhibice produkce superoxidů.



Obr. č. 20. Askorbát-gluthathionový cyklus.  
(Piterková et al. 2005)

## 4 Závěr

V práci jsou shrnuty nejdůležitější poznatky o stresu rostlin. Práce se zaměřovala na nejdůležitější zástupce z řad biotických a abiotických stresů. Obsáhla nejdůležitější fakta o jejich působení na rostliny, o jejich negativních dopadech, možnostech adaptace rostlin a v neposlední řadě o biochemických reakcích, jež daný stresor v rostlině vyvolá. Velká pozornost byla upřena na ROS a antioxidační enzymy, které v rostlinách hrají nezastupitelnou roli během oxidativního stresu. Kataláza, askorbát peroxidáza a superoxiddismutáza se aktivně účastní odstraňování reaktivních forem kyslíku. Každý tento enzym má v celém procesu odstraňování ROS v rostlinách svůj úkol. Jejich aktivita lze stanovit spektroskopicky, přičemž kataláza a askorbát peroxidáza se stanovuje v UV oblasti záření, zatímco superoxiddismutáza se dá stanovit ve viditelné oblasti spektra. Na závěr je nutno vyzdvihnout pár důležitých bodů:

- Rostliny se svým usedlým způsobem života nedokáží před působením stresorů utéct. Pro udržení jejich existence a zachování rostlinného druhu je pro ně naprosto nezbytné, aby měly mechanismy, které je dokáží před nebezpečím stresorů chránit. Neméně důležité jsou pro rostliny jejich kompenzační mechanismy a mechanismy, které jim poskytují určitou míru adaptace a tolerance.
- Různé environmentální stresory působí na rostliny rozdílně. Z tohoto důvodu musí být rostliny vybaveny mnoha příslušnými obrannými mechanismy, které je dokáží chránit před jednotlivými stresory. Mnohdy dochází k tomu, že se tyto jednotlivé mechanismy navzájem doplňují a je nutná jejich vzájemná spolupráce.
- Řady biochemických pochodů v rostlinách nejsou zcela objasněné a jsou málo probádané. Nebylo provedeno dostatek relevantních výzkumů, které by nám přinesly bližší informace o tom, jaké jsou konkrétní mechanismy účinků těchto pochodů. Stejně tak nejsou doposud známy všechny látky, které se na metabolismu rostlin a jejich biochemických reakcích, aktivně podílejí.
- Jako zajímavý rostlinný hormon se jeví abscisová kyselina (ABA). Hraje velice důležitou roli v různých abiotických stresech. Během sucha se koncentrace ABA dokáže zvýšit až 50x během 20-30 minut. V průběhu mrazu má ABA v rostlině za úkol proces aklimatizace a dále je ABA součástí signální dráhy. Její funkci nalezneme i u stresu ze zasolení, kdy dochází k její spolupráci s ROS během udržení osmotické a iontové homeostázi. Jako stresový hormon ji nalezneme i během zatížení rostlin těžkými kovy.
- ROS zastávají v rostlinách dvě protichůdné funkce. Když je koncentrace ROS přiměřená, rostlina je dokáže využít ve svůj prospěch a do jisté míry je přítomnost ROS v rostlinách žádoucí. Vzhledem k tomu, že ROS jsou značně reaktivní molekuly, dokáží interagovat s ostatními buněčnými komponenty. Z tohoto důvodu je rostliny využívají jako signální molekuly. Jako signální molekula se nejlépe uplatňuje z této skupiny peroxid vodíku, který jako jediný ze známých ROS dokáže prostupovat buněčnými membránami. Pakliže ale hladina ROS překročí únosnou hranici, dochází již k negativním účinkům a oxidativnímu stresu. To nastává hlavně v případech, kdy buněčné antioxidanty nedokáží udržet koncentraci ROS a ta se nekontrolovatelně zvýší. Oxidativní stres může způsobit buněčnou smrt a tím i úhyn dané rostliny.

## 5 Literatura

- AHMAD, P., ed., 2014. *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling* [online]. USA: Elsevier Science & Technology [cit. 2021-3-19]. ISBN 9780128004609. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=1629242&query=ROS+production+in+plants#>
- AHMAD, P., M. ABASS AHANGER, M. NASSER ALYEMENI a P. ALAM, ed., 2019. *Photosynthesis, Productivity and Environmental Stress* [online]. UK: Oxford: John Wiley [cit. 2021-2-2]. ISBN 9781119501770. Dostupné z: doi:10.1002/9781119501800
- AHMAD, P., C. A. JALEEL, M. A. SALEM, G. NABI a S. SHARMA, 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. **30**(3), 161-175 [cit. 2021-3-27]. ISSN 0738-8551. Dostupné z: doi:10.3109/07388550903524243
- ALSHER, R. G., N. ERTURK a L. S. HEATH, 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* [online]. Oxford University Press, **53**(372), 1331-1341 [cit. 2021-4-1]. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/23697508?seq=1>
- ANJUM, N. A., P. SHARMA, S. S. GILL, et al., 2016. Catalase and ascorbate peroxidase—representative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. **23**(19), 19002-19029 [cit. 2021-3-30]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-016-7309-6
- BAILEY- SERRES, J. a R. MITTLER, 2006. The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiology* [online]. (141), 311 [cit. 2021-3-4]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1104/pp.104.900191>
- BAKER, A. a I. A. GRAHAM, ed., 2002. *Plant Peroxisomes* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands [cit. 2021-3-28]. ISBN 978-90-481-6007-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-015-9858-3
- BEGON, Michael, John L. HARPER a Colin R. TOWNSEND, 1997. *Ekologie: jedinci, populace a společenstva*. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého. ISBN 80-7067-695-7.
- BHATTACHARJEE, S., 2012. The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Journal of Botany* [online]. **2012**, 1-22 [cit. 2021-3-25]. ISSN 2090-0120. Dostupné z: doi:10.1155/2012/985298
- BHUTANI, S. P., 2019. *Chemistry of biomolecules* [online]. 2nd ed. Boca Raton: CRC Taylor & Francis [cit. 2020-6-27]. ISBN 9781000650723. Dostupné z: <https://www-taylorfrancis-com.infozdroje.czu.cz/books/9780429266423>
- BLÁHA, L., R. BOCKOVÁ, F. HNILIČKA, H. HNILIČKOVÁ, V. HOLUBEC, J. MORRELOVÁ, J. ŠTOLCOVÁ a J. ZIEGLEROVÁ, 2003. *Rostlina a stres*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN 80-86555-32-1.

- CAVERZAN, A., G. PASSAIA, S. B. ROSA, C. W. RIBEIRO, F. LAZZAROTTO a M. MARGIS-PINHEIRO, 2012. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* [online]. Brasil: Sociedade Brasileira de Genética, **35**(4), 1011-1019 [cit. 2021-3-30]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/275948129> Plant responses to stresses Role of a scorbate peroxidase in the antioxidant protection
- COPELAND, R. A., 2000. *ENZYMES: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* [online]. 2nd ed. New York: John Wiley [cit. 2020-10-2]. ISBN 0-471-22063-9. Dostupné z: <https://books.google.cz/bkshp?hl=cs&tab=pp>
- CZARNOCKA, W. a S. KARPIŃSKI, 2018. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **122**, 4-20 [cit. 2021-3-27]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011
- ČAČA, Z., V. KOLLÁR, J. B. NOVÁK a J. ZVÁRA, 1981. *Zemědělská fytopatologie*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství.
- DĄBROWSKA, G., A. KATA, A. GOC., M. SZECHYNSKA-HEBDA a E. SKRZYPEK, 2007. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family: Series Botanica. *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA* [online]. Cracow: Polish Academy of Sciences, **49**(1), 7-17 [cit. 2021-3-30]. ISSN 0001-5296. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/224028994> Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family
- DAS, K. a A. ROYCHOUDHURY, 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* [online]. **2** [cit. 2021-3-20]. ISSN 2296-665X. Dostupné z: doi:10.3389/fenvs.2014.00053
- DOUBRAVA, J., J. V. KOŠTÍŘ a J. POSPÍŠIL, 1984. *Základy biochemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. Pomocné učební texty.
- FRYZOVA, R., M. POHANKA, P. MARTINKOVA, H. CIHLAROVA, M. BRTNICKY, J. HLADKY a J. KYNICKY, 2018. Oxidative Stress and Heavy Metals in Plants. DE VOOGT, P., ed. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 245* [online]. Cham: Springer International Publishing, 15. 10. 2017, s. 129-156 [cit. 2021-2-13]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. ISBN 978-3-319-75036-1. Dostupné z: doi:10.1007/398\_2017\_7
- GARG, N. a G. MANCHANDA, 2009. ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* [online]. **143**(1), 81-96 [cit. 2021-3-20]. ISSN 1126-3504. Dostupné z: doi:10.1080/11263500802633626

GILL, S. S., N. A. ANJUM, R. GILL, et al., 2015. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 22(14), 10375-10394 [cit. 2021-4-1]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-015-4532-5

GLOSER, V., 2014. Role dálkových signálů v reakci rostlin na sucho. In: HNILIČKA, F. *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, s. 48-50. ISBN 978-80-213-2475-6.

GROSS, E. L., 1993. Plastocyanin: Structure and function. *Photosynthesis Research* [online]. (37), 103-116 [cit. 2021-2-21]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02187469>

GULL, A., A. AHMAD LONE a N. ISLAM WANI, 2019. Biotic and Abiotic Stresses in Plants. BOSCO DE OLIVEIRA, A., ed. *Abiotic and Biotic Stress in Plants* [online]. IntechOpen, 23. 10. 2019 [cit. 2021-2-6]. ISBN 978-1-78923-811-2. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.85832

HNILIČKA, F. a T. STŘEDA, ed., 2016. *Rostliny v podmínkách stresu - abiotické stresory*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2680-4.

HURŇÁK, A., L. BAŘINKA, D. MÍŠA a V. ZACHA, 1986. *Ochrana rostlin*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství.

CHAKRABORTY, U. a B. CHAKRABORTY, ed., 2015. *Abiotic Stresses in Crop Plants* [online]. UK: Croydon: CABI [cit. 2020-11-29]. ISBN 9781780643731. Dostupné z: <https://www-cabi-org.infozdroje.czu.cz/cabebooks/FullTextPDF/2015/20153251273.pdf>

CHOUDHURY, S., P. PANDA, L. SAHOO a S. K. PANDA, 2014. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* [online]. 8(4) [cit. 2021-3-25]. ISSN 1559-2324. Dostupné z: doi:10.4161/psb.23681

JAIN, M., R. GARG a R. K. VARSHNEY, ed., 2014. *ABIOTIC STRESS: MOLECULAR GENETICS AND GENOMICS* [online]. [cit. 2021-2-1]. ISBN 978-2-88919-359-2. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/research-topics/1863/abiotic-stress-molecular-genetics-and-genomics>

JALMI, S. K., P. K. BHAGAT, D. VERMA, S. NORAYANG, S. TAYYEBA, K. SINGH, D. SHARMA a A. K. SINHA, 2018. Traversing the Links between Heavy Metal Stress and Plant Signaling. *Frontiers in Plant Science* [online]. 9 [cit. 2021-2-21]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2018.00012

JAN, S. a J. A. PARRAY, 2016. Heavy Metal Stress Signalling in Plants. JAN, Sumira a Javid Ahmad PARRAY. *Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plants* [online]. Singapore: Springer Singapore, 8. 9. 2016, s. 33-55 [cit. 2021-2-21]. ISBN 978-981-10-1692-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-1693-6\_3

JENKS, M. A. a P. M. HASEGAWA, ed., 2014. *Plant Abiotic Stress* [online]. 2nd ed. Oxford: John Wiley [cit. 2020-11-29]. ISBN 978-1-118-76437-4. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/reader.action?docID=1486348>

KADUKOVA, J. a J. KAVULICOVA, ed., 2010. *Phytoremediation and Stress: Evaluation of Heavy Metal-Induced Stress in Plants* [online]. New York: Nova Science Publishers [cit. 2021-2-13]. ISBN 978-1-61122-108-4. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=3018722>

KAZDA, J., Z. JINDRA, J. KABÍČEK, E. PROKINOVÁ, P. RYŠÁNEK a V. STEJSKAL, 2001. *Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny*. 2. doplněné vydání. Praha: Farmář-Zemědělec. ISBN 80-902413-3-6.

KEARSEY, M. J., 1998. The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany* [online]. Oxford University Press, **49**(327), 1619-1623 [cit. 2021-4-16]. Dostupné z: [https://www.jstor.org/stable/23696089?seq=1#metadata\\_info\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/23696089?seq=1#metadata_info_tab_contents)

KINDL, H. a G. WÖBER, 1981. *Biochemie rostlin*. Přeložil Milan STREIBL, přeložil Ladislav NOVOTNÝ, přeložil Miroslav HOLUB. Praha: Academia.

KMETĚ, J. a D. KURJAK, 2014. Odozva lesných dřevín na environmentálne stresy: Od semenáčikov po dospelé stromy. In: HNILIČKA, F., ed. *Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2014*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, s. 13-18. ISBN 978-80-213-2475-6.

KODÍČEK, M., O. VALENTOVÁ a R. HYNEK, 2018. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 2. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7592-013-3.

KOOLMAN, J. a K.-H. RÖHM, 2012. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2977-0.

KOTAL, V., K. HOLUB, J. KÁŠ, E. MAREČEK a V. PODRAZKÝ, 1989. *Enzymy v zemědělství*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. ISBN 80-209-0022-5.

KUMAR, R. R., G. KUMAR RAI, V. CHINNUSAMY a S. PRAVEEN, 2021. Reactive Oxygen Species: Boon or Bane. KUMAR RAI, G. a R. R. KUMAR. *Plant Abiotic Stress Tolerance: Physicochemical and Molecular Avenues* [online]. Indie: Deepika Book Agency, s. 1-10 [cit. 2021-3-6]. ISBN 978-81-932436-5-7. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/349083060\\_Reactive\\_Oxygen\\_Species\\_Boon\\_or\\_Bane](https://www.researchgate.net/publication/349083060_Reactive_Oxygen_Species_Boon_or_Bane)

KUMAR, S. a P. K. TRIVEDI, 2016. Heavy Metal Stress Signaling in Plants. *Plant Metal Interaction* [online]. Elsevier, 2016, s. 585-603 [cit. 2021-2-13]. ISBN 9780128031582. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803158-2.00025-4

LICHTENTHALER, H. K., 1998. The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. **851**(STRESS OF LIFE), 187-198 [cit. 2021-3-1]. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x

MATOUŠKOVÁ, M., B. RUTTKAY-NEDECKÝ a R. KIZEK, 2014. Antioxidační enzymy - biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. **1**(3), 53-56 [cit. 2021-4-1]. ISSN 2336-3940. Dostupné z: [https://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/J\\_Met\\_Nano/0314/pdf/jmn3-13.pdf](https://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0314/pdf/jmn3-13.pdf)

MHAMDI, A. a F. VAN BREUSEGEM, 2018. Reactive oxygen species in plant development. *Development* [online]. **145**(15) [cit. 2021-3-6]. ISSN 0950-1991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.164376

MITTLER, R., S. VANDERAUWERA, M. GOLLERY a F. VAN BREUSEGEM, 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* [online]. **9**(10), 490-498 [cit. 2021-3-25]. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2004.08.009

NAFEES, M., S. FAHAD, A. N. SHAH, M. A. BUKHARI, MARYAM, I. AHMED, S. AHMAD a S. HUSSAIN, 2019. Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. HASANUZZAMAN, M., K. R. HAKEEM, K. NAHAR a H. F. ALHARBY, ed. *Plant Abiotic Stress Tolerance* [online]. Cham: Springer International Publishing, 5. 4. 2019, s. 259-272 [cit. 2021-3-25]. ISBN 978-3-030-06117-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-06118-0\_11

NAJI ALHASNAWI, A., A. A. KADHIMI, A. ISAHAK, A. MOHAMAD, F. DONI a Ch. R. CHE MOHD ZAIN, 2014. Salinity Stress in Plant and An important Antioxidant Enzyme. *Life Science Journal* [online]. (11(10), 913-920 [cit. 2021-2-9]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/266392316\\_Salinity\\_Stress\\_in\\_Plant\\_and\\_An\\_important\\_Antioxidant\\_Enzyme](https://www.researchgate.net/publication/266392316_Salinity_Stress_in_Plant_and_An_important_Antioxidant_Enzyme)

NOVÁČEK, František, [2008]. *Fytochemické základy botaniky*. Vyd. 2., dopl. Olomouc: Fontána. ISBN 978-80-7336-457-1.

PANDEY, S., D. FARTYAL, A. AGARWAL, et al., 2017. Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase. *Frontiers in Plant Science* [online]. **8** [cit. 2021-3-30]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2017.00581

PETERSON, R. K. D. a L. G. HIGLEY, ed., 2000. *Biotic Stress and Yield Loss* [online]. Boca Raton: CRC Press [cit. 2020-10-30]. ISBN 9780429118340. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.468.6775&rep=rep1&type=pdf>

PIRZADAH, T. B., B. MALIK, R. REHMAN, K. R. HAKEEM a M. I. QURESHI, 2014. Signaling in Response to Cold Stress. HAKEEM, K. R., R. REHMAN a I. TAHIR, ed. *Plant signaling: Understanding the molecular crosstalk* [online]. New Delhi: Springer India, 29. 8. 2014, s. 193-226 [cit. 2021-2-6]. ISBN 978-81-322-1541-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-81-322-1542-4\_10

PISULA, N.L. a S.J. MEINERS, 2010. Relative allelopathic potential of invasive plant species in a young disturbed woodland. *Journal of the Torrey Botanical Society* [online]. 2010, (1), 81-87 [cit. 2020-10-31]. Dostupné z: <https://bioone-org.infozdroje.czu.cz/journals/the-journal-of-the-torrey-botanical-society/volume-137/issue-1/09-RA-040.1/Relative-allelopathic-potential-of-invasive-plant-species-in-a-young/10.3159/09-RA-040.1.full>

- PITERKOVÁ, J., K. TOMÁNKOVÁ, L. LUHOVÁ, M. PETŘIVALSKÝ a P. PEČ, 2005. Oxidativní stres: Lokalizace forem aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chemické listy* [online]. (99), 455-466 [cit. 2021-3-4]. Dostupné z: [http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_07\\_455-466.pdf](http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_07_455-466.pdf)
- PITZSCHKE, A., C. FORZANI a H. HIRT, 2006. Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. **8**(9-10), 1757-1764 [cit. 2021-3-6]. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2006.8.1757
- PROCHÁZKA, S. a et al., 1998. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0586-2.
- RAYCHAUDHURI, S. S. a X. W. DENG, 2000. The Role of Superoxide Dismutase in Combating Oxidative Stress in Higher Plants. *Botanical Review* [online]. **66**(1), 89-98 [cit. 2021-4-1]. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/4354363?seq=1>
- RICHTER, R., 2004. TĚŽKÉ KOVY V PŮDĚ. *Mendelova univerzita v Brně* [online]. Brno: Ústav agrochemie a výživy rostlin [cit. 2021-2-21]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_221\\_multitext/vyziva\\_rostlin/html/agrochemie\\_pudy/puda\\_tk.htm](http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/agrochemie_pudy/puda_tk.htm)
- ROOSA, L., ed., 2015. *Molecular Mechanisms in Plant Adaptation* [online]. New Jersey: John Wiley [cit. 2021-2-12]. ISBN 978-1-118-86017-5. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=1895677&query=Molecular%20Mechanisms%20in%20Plant%20Adaptation>
- ŘEPKOVÁ, J., 2013. *Genetika rostlin* [online]. Brno: Masarykova univerzita [cit. 2020-12-28]. ISBN 978-80-210-6408-9. Dostupné z: <http://is.muni.cz/elportal/?id=1119341>
- SAED-MOUCHESHI, A., A. SHEKOOFA a M. PESSARAKLI, 2014. Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Detoxifying in Plants. *Journal of Plant Nutrition* [online]. **37**(10), 1573-1585 [cit. 2021-3-20]. ISSN 0190-4167. Dostupné z: doi:10.1080/01904167.2013.868483
- SAKINA, A., W. WANI, M. MUSHTAQ, S. H. WANI a A. B. SHIKARI, 2019. Omics Approaches for Cold Stress Tolerance in Plants. WANI, S. H., ed. *Recent Approaches in Omics for Plant Resilience to Climate Change* [online]. Cham: Springer International Publishing, 14. 8. 2019, s. 331-356 [cit. 2021-2-6]. ISBN 978-3-030-21686-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-21687-0\_14
- SENTHILKUMAR, M., N. AMARESAN a A SANKARANARAYANAN, 2021. *Plant-Microbe Interactions* [online]. New York, NY: Springer US [cit. 2021-3-28]. Springer Protocols Handbooks. ISBN 978-1-0716-1079-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-0716-1080-0
- SHAAR-MOSHE, L., E. BLUMWALD a Z. PELEG, 2017. Unique Physiological and Transcriptional Shifts under Combinations of Salinity, Drought, and Heat. *Plant Physiology* [online]. American Society of Plant Biologists, **174**(1), 421-434 [cit. 2020-12-28]. Dostupné z: doi:10.1104/pp.17.00030



- SHABALA, S., ed., 2017. *Plant Stress Physiology* [online]. 2nd ed. Croydon: CABI [cit. 2020-10-31]. ISBN 9781780647296. Dostupné z: <https://www-cabi-org.infozdroje.czu.cz/cabebooks/FullTextPDF/2017/20173015065.pdf>
- SHAHID, M., S. KHALID, G. ABBAS, N. SHAHID, M. NADEEM, M. SABIR, M. ASLAM a C. DUMAT, 2015. Heavy Metal Stress and Crop Productivity. HAKEEM, K. R., ed. *Crop Production and Global Environmental Issues* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015, s. 1-25 [cit. 2021-2-13]. ISBN 978-3-319-23161-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-23162-4\_1
- SHARMA, P., A. B. JHA, R. S. DUBEY a M. PESSARAKLI, 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* [online]. **2012**, 1-26 [cit. 2021-3-4]. ISSN 2090-0120. Dostupné z: doi:10.1155/2012/217037
- SHIGEOKA, S., T. ISHIKAWA, M. TAMOI, Y. MIYAGAWA, T. TAKEDA, Y. YABUTA a K. YOSHIMURA, 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* [online]. **53**(372), 1305-1319 [cit. 2021-4-1]. ISSN 1460-2431. Dostupné z: doi:10.1093/jxb/53.372.1305
- SHINOZAKI, K., J. BAILEY-SERRES, E. A. BRAY, E. WERETYLNIK a M. UEMURA, 2015. Responses to abiotic stress. BUCHANAN, B. B., W. GRUISSEM a R. L. JONES, ed. *Biochemistry & molecular biology of plants*. West Sussex, UK: John Wiley, s. 1051-1097. ISBN 978-0-470-71421-8.
- SINGH, A., 2016. Varied Responses and Tolerant Mechanisms towards Salinity Stress in Plants. *International Journal of Plant & Soil Science* [online]. **11**(5), 1-13 [cit. 2021-2-9]. ISSN 23207035. Dostupné z: doi:10.9734/IJPSS/2016/24703
- SLAVÍKOVÁ, J., 1986. *Ekologie rostlin*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství.
- SMIRNOFF, N., ed., 2005. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing [cit. 2021-3-25]. ISBN 9780470988565. Dostupné z: doi:10.1002/9780470988565
- SUZUKI, N., R. M. RIVERO, V. SHUEALEV a R. MITTLER, 1999-. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* [online]. **2014**(203), 32-43 [cit. 2020-11-29]. Dostupné z: doi:10.1111/nph.12797
- SYTAR, O., P. KUMARI, S. YADAV, M. BRESTIC a A. RASTOGI, 2019. Phytohormone Priming: Regulator for Heavy Metal Stress in Plants. *Journal of Plant Growth Regulation* [online]. **38**(2), 739-752 [cit. 2021-2-13]. ISSN 0721-7595. Dostupné z: doi:10.1007/s00344-018-9886-8
- ŠEBÁNEK, J., L. GRÉC, A. JAVOR a J. ŠVIHRA, 1983. *Fyziologie rostlin*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství.
- ŠÍPAL, Z., 1992. *Biochemie*. Praha: SPN. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). ISBN 80-04-21736-2.

THOMAS, B., D. J. MURPHY a B. G. MURRAY, ed., 2016. *Encyclopedia of applied plant sciences* [online]. 2nd ed. Boston: Elsevier Academic [cit. 2021-2-6]. ISBN 9780123948083. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=4675431>.

TŮMA, J. a L. TŮMOVÁ, 1998. *Fyziologie rostlin*. Hradec Králové: Gaudeamus. ISBN 80-7041-542-8.

TUTEJA, N. a S. S. GILL, ed., 2016. *Abiotic Stress Response in Plants* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH [cit. 2020-10-9]. ISBN 978-3-527-69459-4. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/reader.action?docID=4332424>

VAN BREUSEGEM, F. a J. F. DAT, 2006. Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death. *Plant Physiology* [online]. **141**(2), 384-390 [cit. 2021-3-6]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.106.078295

VARSHNEY, R. a R. TUBEROSA, ed., 2013. *Translational Genomics for Crop Breeding: Biotic Stress* [online]. John Wiley [cit. 2020-10-30]. ISBN 978-1-118-72847-5. Dostupné z: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=1390828>

VLASÁKOVÁ, E., 2011. *Vliv teploty a sucha na obsah kyseliny abscisové v rostlinách obilnin* [online]. Praha [cit. 2020-12-28]. Dostupné z: <http://www.agrobiologie.cz/pds/dp/vlasakova.pdf>. Disertace. Česká zemědělská univerzita. Vedoucí práce Josef Pulkrábek.

VODRÁŽKA, Z., 1996. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-0600-4.

VODRÁŽKA, Z., P. RAUCH a J. KÁŠ, 1998. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-7080-330-4.

WASZCZAK, C., M. CARMODY a J. KANGASJÄRVI, 2018. Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology* [online]. **69**(1), 209-236 [cit. 2021-3-4]. ISSN 1543-5008. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-arplant-042817-040322

WILLEKENS, H., D. INZÉ, M. VAN MONTAGU a W. VAN CAMP, 1995. Catalases in plants. *Molecular Breeding* [online]. **1**(3), 207-228 [cit. 2021-4-28]. ISSN 1380-3743. Dostupné z: doi:10.1007/BF02277422

ZEHNÁLEK, J., 1999. *Biochemie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-7157-366-3.

