



**Antioxidační aktivity okřehku *Lemna minor* L.
v abiotickém stresu**
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
Ing. RNDr. Marek Klemš, Ph.D.

Vypracovala:
Jana Petrovičová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: „Antioxidační aktivity okřehku *Lemna minor L.* v abiotickém stresu“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:.....

.....
podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Ing. Markovi Klemšovi, Ph.D. za odborné vedení.

Touto cestou bych také chtěla poděkovat Ing. Kamile Lónové za cenné rady a pomoc při stanoveních.

Mé poděkování patří i Ústřednímu kontrolnímu a zkušebnímu ústavu zemědělskému v Brně za věnování rostlin *Lemna minor* L.

Děkuji všem blízkým za podporu, pomoc a pochopení při psaní této práce.

ABSTRAKT

Perzistentní organické polutanty a pesticidy mají na rostliny obecně škodlivý vliv. Cílem bakalářské práce bylo sledovat a zhodnotit vliv koncentrací (0,5 mg/l a 5 mg/l) flurochloridonu a fluorantenu na rostliny okřehku menšího (*Lemna minor L.*). Z morfologického hlediska byly pozorovány změny vzhledu a růstu rostlin okřehku. Byl zjištěn značný vliv flurochloridonu na rostliny. Z fyziologického hlediska byl sledován vliv na biologické membrány – měření obsahu malonyldialdehydu pomocí spektrofotometrie a vliv na míru stresu v rostlině – stanovení kyseliny abscisové pomocí radioimunoanalýzy. Ve čtvrtém dni kultivace na uvedených xenobiotických měly všechny experimentální varianty zvýšený obsah kyseliny abscisové oproti kontrole. Zatímco malonyldialdehyd jako marker stresu způsobeného poškozením lipidů se měnil z hlediska kvantity u jednotlivých variant nerovnoměrně.

Klíčová slova: okřehek menší, oxidativní stres, perzistentní organické polutanty, malonyldialdehyd, kyselina abscisová

ABSTRACT

Persistent organic pollutants and pesticides have on plants generally injurious effect. The aim of this bachelor thesis was monitoring and evaluating the impact of concentrations (0.5 mg / l and 5 mg / l) flurochloridone and fluoranthene on plants of duckweed (*Lemna minor L.*). From the morphological view were observed changes of appearance and growth of plants of duckweed. It was found flurochloridone considerable influence on plants. From the physiological view, were observed the influence to biological membranes - measurement of malonyldialdehyde content using spectrophotometry and influence on the degree of stress in plants - abscisic acid determination by radioimmunoassay. At the 4th day of cultivation on these xenobiotic have all experimental variants increased abscisic acid content different from controls. While malonyldialdehyd as a marker of stress caused damage to lipids varied in terms of quantity of individual variants unevenly.

Keywords: duckweed, oxidative stress, persistent organic pollutants, malonyldialdehyd, abscisic acid

OBSAH

	Str.
1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	10
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1 Vliv lidské činnosti na životní prostředí	11
3.2 Rostliny a toxické látky	12
3.2.1 Příjem a akumulace toxických látek rostlinami	12
3.3 Organické polutanty průmyslové depozice	12
3.3.1 Použití a účinky organických polutantů průmyslové depozice na organismy	13
3.4 Herbicidy	14
3.4.1 Flurochloridon.....	14
3.4.2 Fluoranthen	15
3.4.3 Použití, účinky herbicidů na organismy a jejich rezidua	15
3.5 Vliv organických polutantů průmyslové depozice a herbicidů na rostliny	16
3.6 Abiotický stres u rostlin	17
3.7 Antioxidační aktivity u rostlin, antioxidační systém v odpovědi na oxidativní stres	18
3.7.1 Lipidová peroxidace.....	19
3.8 Glutathion	19
3.9 Rostlinné fytohormony	20
3.9.1 Kyselina abscisová (ABA).....	21
3.10 Karotenoidy	22
3.11 Biologie a fyziologie okřehku menšího (<i>Lemna minor L.</i>)	23
3.12 Okřehek menší (<i>Lemna minor L.</i>) jako modelová rostlina	24
4 MATERIÁL A METODY	25
4.1 Kultivace rostlinného materiálu	25
4.1.1 Složení kultivačního Steinbergova média	25
4.1.2 Srovnávací test pro stanovení 50% letality	25
4.1.3 Varianty experimentu.....	26
4.1.4 Odběry vzorků.....	26
4.2 Morfologické hodnocení	26
4.2.1 Pozorování počtu rostlin	26
4.2.2 Viabilita rostlin	27

4.3 Sledování stresových markerů a jejich kvantifikace	27
4.3.1 Spektrofotometrie.....	27
4.3.1.1 Stanovení lipidové peroxidace	27
4.3.2 Radioimunoanalýza.....	28
4.3.2.1 RIA analýza.....	29
5 VÝSLEDKY	30
5.1 Stanovení 50% úhynu rostlin.....	30
5.2 Hodnocení morfologie rostlin.....	31
5.2.1 Vzhled rostlin.....	31
5.3 Hodnocení růstu rostlin	35
5.4 Hodnocení sledování stresových markerů a jejich kvantifikace.....	37
5.4.1 Lipidová peroxidace.....	37
5.4.2 Radioimunoanalýza kvantifikace kyseliny abscisové	38
6 DISKUZE.....	40
7 ZÁVĚR.....	42
8 POUŽITÁ LITERATURA.....	44
9 SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK.....	51
10 SEZNAM ZKRATEK.....	53

1 ÚVOD

Organické polutanty průmyslové depozice jsou látky, dostávající se do životního prostředí vlivem lidské činnosti, a to buď cílenou aplikací různých chemických látek, nebo neúmyslně neopatrnou lidskou činností zapříčiněnou především únikem z antropogenních aktivit.

Hlavním důvodem sledování obsahu těchto látek v životním prostředí je široké spektrum prokázaných toxických účinků těchto látek na všechny organismy.

Mezi perzistentní organické polutanty řadíme především polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), polychlorované bifenyly (PCB) a organické pesticidy. Tam řadíme především herbicidy, fungicidy a ostatní zooticidy, většina z nich je karcinogenní, mutagenní a teratogenní, poškozují hormonální systémy, jsou toxické pro vodní organismy a jedná se též o látky ohrožující rozmnožování - reprotoxické.

Polycyklické aromatické uhlovodíky a polychlorované bifenyly se do ovzduší a životního prostředí dostávají nejvíce prostřednictvím průmyslového zpracování, hořením a nedokonalými spalovacími procesy. Další zdroje představuje vznik sazí a tmavého kouře, kouření a automobilová doprava, kde tyto látky významně působí na snížení produkce biomasy, fyziologické a biochemické procesy uvnitř organismu, ovlivňují obsah fotosynteticky aktivních látek a životaschopnost rostliny až její úplný úhyn.

Tyto látky nazýváme jako perzistentní, tedy schopné se v rostlině či organismech kumulovat a způsobovat tak zpomalení jejich přirozených životních pochodů či biochemických a fyziologických procesů. Pesticidy kontaminují povrchové vody, narušují ekosystémy, u živočichů jsou příčinou nemocí srdce a cév, podílí se na hormonálních a nervových poruchách, jejich zvýšená aplikace zapříčiní zpomalení fyziologických procesů.

Okřehek menší (*Lemna minor*), je malou jednoděložnou vodní, na hladině volně rostoucí rostlinou. Je rozšířený takřka na všech vhodných lokalitách po celém světě, vyskytující se především ve spektru stojatých a pomalu tekoucích vod.

Za příznivých podmínek je schopen se rychle a efektivně vegetativně rozmnožovat a vytvořit tak velké množství biomasy. Proto lze na okřešku dobře pozorovat morfologické změny a projevy. Tyto vlastnosti umožňují jeho použití jako významné modelové rostliny, čehož lze využít při testování ve fyziologii rostlin, biochemii, toxikologii a dalších příbuzných disciplínách. Za pomoci optimalizovaných

ekotoxikologických biotestů můžeme dojít k požadovaným výsledkům a přistoupit na patřičná opatření.

Pokud je modelová rostlina podrobena působení toxických látek, v našem případě organickým polutantům průmyslové depozice a herbicidům, kdy jejich účinek je založen na extrémním toxickém zásahu do metabolismu organismu, dochází u ní ke změně její morfologie, ke snížení produkce biomasy, k produkci stresových fytohormonů, tripeptidu glutationu a tetraterpenů. Glutationový redoxní cyklus, který je tvořen glutationem (GSH) a glutation reduktázou (GR) je pravděpodobně nejdůležitějším buněčným antioxidačním systémem. Tetraterpeny, jako jsou karotenoidy, řadíme mezi fotosyntetická barviva s výraznými antioxidačními účinky.

Těmito mechanismy dochází k aktivaci antioxidačních systémů v rostlině a samotnému projevu antioxidačních odpovědí rostliny, čímž se brání oxidačnímu poškození svých biologicky aktivních molekul.

V případě, kdy všechny tyto obranné mechanismy nepostačují, může dojít k úhynu rostliny.

2 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši věnující se antioxidantním aktivitám rostlin, roli a funkci glutationu, karotenoidů a stresových fytohormonů. Praktická část se zaměřuje na sledování vlivu toxických látek, v našem případě flurochloridonu a fluorantenu na růst a rozmnožování rostlin okřehku menšího. Úkolem bylo sledování morfologie rostliny a hodnocení a měření stresových markerů za pomoci spektrofotometrického stanovení obsahu malonyldialdehydu, jakožto ukazatele lipidové peroxidace. Dále pak stanovení obsahu kyseliny abscisové pomocí radioimunoanalýzy, která indikuje míru stresu u rostliny. Byl sledován vliv použitých koncentrací toxických látek na růst a mortalitu rostlin.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Vliv lidské činnosti na životní prostředí

Životní prostředí člověka je ovlivněno především tím, v jakém stavu se nachází jeho hlavní složky, jedná se o ovzduší, vodu, půdu a různé ekosystémy, tyto složky jsou však také do značné míry ovlivňovány činností člověka, jehož zapříčiněním byla již přeměněna asi jedna čtvrtina zemského povrchu (VITOUSEK et al., 1997).

Člověk si uvědomuje dopady svého antropogenního působení na životní prostředí a i přitom značně narušuje jeho přirozené složení. Některé z těchto vlivů není natolik těžké omezit, nebo alespoň redukovat jejich množství, v tomto případě se jedná především o vypouštění toxických látek do životního prostředí, tvorbu skládek, kdy dochází k uvolňování nebezpečného metanu, chemikálií a škodlivin do půdy a podzemních vod. Jedná se ale i o produkci skleníkových plynů, o nadměrné množství a využívání dopravních prostředků a osobních automobilů. Ke spalování fosilních paliv a následnému znečištění ovzduší, dochází především ve velkých spalovacích zařízeních, jako jsou elektrárny a teplárny, uvolněné emise se spojí s vodní parou a vrátí se zpět v podobě kyselého deště, kdy už je opět poškozena funkce ekosystému, životní prostředí je narušeno a životní funkce a zdraví organismů jsou ohroženy.

Existuje mnoho dalších mechanismů, kterými člověk ovlivňuje prostředí, ve kterém žije a kdy dochází ke vzniku nebezpečných látek. Životní prostředí je silně ohrožováno činnostmi jako je například řízené vypalování lesů, cílené spalování v kamnech a na ohništích, průmyslová činnost a těžba, výpar z nátěrů a sprejů, uvolňování toxických plynů a další (FRIEDLANDER 1973).

Zdroje znečištění životního prostředí lze rozdělit na dvě skupiny – primární a sekundární. Mezi primární zdroje patří přímé uvolňování polutantů do ovzduší, to znamená, že znečišťující látka je do ovzduší emitována přímo ze zdroje, sekundárními zdroji je myšleno to, že se polutant uvolněný primárně spojí buď s jiným primárním polutantem, nebo se spojí s jinými látkami v atmosféře pomocí chemické reakce, patří sem například ozon a kyselý déšť.

Je nutný správný přístup a správné chování v jakémkoliv prostředí, jelikož životní prostředí, ve kterém se nacházíme, je uváděno právě vlivem člověka do současného stavu a to vede k jeho trvalým a nevratným změnám.

3.2 Rostliny a toxické látky

Toxicitu definujeme jako vlastnost a schopnost toxické látky poškozovat organismus. Závisí na fyzikálně – chemických vlastnostech této toxické látky, na způsobu vstupu látky do organismu a na schopnosti organismu metabolizovat tuto látku (WANG 1991).

3.2.1 Příjem a akumulace toxických látek rostlinami

Příjem toxických látek rostlinami lze srovnat s příjmem živin. Rostliny přijímají, přeměňují a akumulují toxické a organické látky pomocí různých mechanismů (KUČEROVÁ et al., 1999). Jedná se o přímou absorpci kořeny a následnou translokaci do rostliny. Rostliny uvolňují specifické enzymy, zvyšují mineralizaci v oblasti kořene, zvyšují absorpci povrchem listů. Některé rostliny přijímají organické a toxické látky přímo z místa výskytu kontaminace, některé látky se kumulují na povrchu kořenového systému a jiné jsou transportovány skrze membrány dále do rostliny (SIMONICH et al., 1995).

Obsah těchto látek v rostlinném těle vede k přísunu stresu a ke spuštění řady složitých biochemických, fyziologických a molekulárních procesů (SCHINOZAKI a YAMAGUCHI 2007).

3.3 Organické polutanty průmyslové depozice

Perzistentní organické polutanty jsou toxické látky, které mají schopnost kumulovat se v organismu, setrvávat v něm podstatně dlouhou dobu beze změny a postupně nenávratně poškozovat jeho přirozené funkce. Negativně působí tyto látky i na životní prostředí (JONESA a VOOGT 1999).

Vyskytují se buď jako jediná chemická látka, nebo jako jejich směs. Tyto látky jsou velmi odolné vůči chemickému i biochemickému rozkladu a též vysoce stabilní, což umožňuje jejich snadnější koloběh v životním prostředí. Je prokázáno, že mnohé z těchto látek poškozují vnitřní orgány všech organismů, způsobují reprodukční poruchy a narušují hormonální rovnováhu (BOONYATUMANOND et al., 2006).

Existuje mnoho studií potvrzujících negativní a toxické účinky těchto látek na veškeré organismy (VÁCHA et al., 2008).

3.3.1 Použití a účinky organických polutantů průmyslové depozice na organismy

Perzistentní organické polutanty dělíme na tři základní kategorie. Jedná se o rozdělení na látky vyráběné záměrně a používané cíleně pro likvidaci nežádoucích organismů – pesticidy (kam řadíme především insekticidy k hubení hmyzu a fungicidy k hubení plísní a hub). Na látky vyráběné záměrně jakožto průmyslové chemikálie širokého využití – polychlorované bifenyly (PCB) a hexachlorbenzen (HCB) používaný v pyrotechnice a při výrobě kaučuku a hliníku. Mezi látky vznikající jako vedlejší produkty různých spalovacích procesů patří polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), které vznikají jako vedlejší produkty při každém běžném spalovacím procesu, dále pak polychlorované dibenzo-p-dioxiny a polychlorované dibenzofurany. Dioxiny i furany mohou vznikat při spalování komunálního odpadu, nemocničního a nebezpečného odpadu, je možné je detekovat v emisích automobilové dopravy, ze spalování uhlí, dřeva a při spalování organických látek v přítomnosti chloru a v mnoha dalších procesech (JONESA a WOOGT 1999).

Do ovzduší se perzistentní organické polutanty dostávají z průmyslových zdrojů, jako jsou elektrárny, teplárny, spalovny, domácí topeniště, dopravní prostředky, ale také používáním zemědělských postřiků, vypařováním z vodních ploch, půdy či skládek. V ovzduší se vyskytují buď ve formě par, nebo jsou vázány na povrchu tuhých prachových částic, na zemský povrch se potom dostávají ve formě polétavého prachu nebo s deštěm. V ovzduší podléhají polutanty pomalému rozkladu působením slunečního záření, rozpustnost ve vodě je minimální a jejich setrvání v atmosféře závisí potom na tepelných a reakčních podmínkách v daném místě planety, čímž je dokázán i jejich dálkový transport, jelikož byly nalezeny v místech, kde se ani nikdy přirozeně nevyskytovaly, ani jejich výskyt není možný. Logická je pak rozpustnost těchto látek v organických kapalinách, rostlinných i syntetických olejích a palivech (LIU et al., 2005; MIGUEL et al., 1998)

V půdě jsou tyto látky obsaženy především po aplikaci pesticidů a poté se do ní dostávají suchou i mokrou depozicí z atmosféry, dochází k jejich usazování v půdní hmotě, především té, která je bohatá na humus a k prosakování do podzemních vod, kde setrvávají až desítky let.

Rostliny jsou zatěžovány perzistentními polutanty z půdy skrz kořenovou soustavu. Z ovzduší jsou uvolněny skrze spad z postřikových přípravků. Jelikož mají rostliny kutikulu, nebo se mezi nimi vyskytují olejnaté druhy, akumulují tyto látky ve svém těle. Živočichové se dostanou do styku s těmito toxickými látkami při konzumaci znečištěného krmiva, vodní organismy vstřebávají polutanty přímo z kontaminovaných vod. Dochází i k proniknutí do potravního řetězce. Je důležité udržovat tolerovatelnou hranici a dosáhnout toho, aby nebylo překročeno množství uvolněných perzistentních organických polutantů ve větší míře, než je slučitelné se životem, jelikož i množství, která jsou již přítomná, ohrožují existenci (VLČEK a POHANKA 2011).

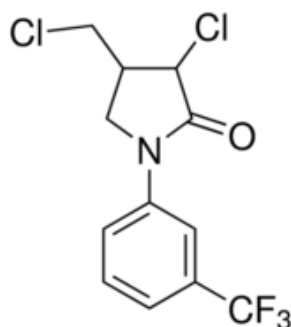
3.4 Herbicidy

Do skupiny pesticidů spadají herbicidy, které jsou definovány jako jakékoliv chemické látky, určené k hubení nebo inhibici růstu rostlin, které jsou považovány za nežádoucí a to především k likvidaci plevelů a invazních rostlin.

Přináší nám užitek v podobě hubení plevelů a mnohonásobném zvýšení výnosů pěstovaných plodin. Zároveň však může mít přítomnost cizorodých látek v životním prostředí značné negativní důsledky. Obecně platí, že některé fyzikálně – chemické vlastnosti pesticidů, především rozpustnost ve vodě, lipofilita a tenze par, jsou spoluodpovědné za míru bio – akumulace, hromadění v podzemních zdrojích vod, zvýšenou migraci anebo naopak sorpci. Následkem těchto procesů může docházet nejen k akutnímu, ale také chronickému působení látek na jedince, populace i celé ekosystémy, a to i ve velkých vzdálenostech od míst aplikace (JANŮ a LOVECKÁ 2014).

3.4.1 Flurochloridon

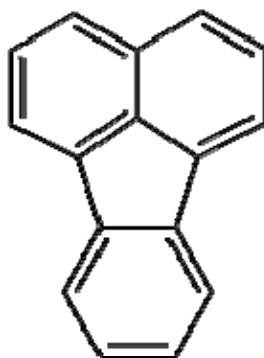
Flurochloridon je chemická sloučenina ze skupiny pyrrolidinonů, který se používá jako aktivní složka v přípravcích na ochranu rostlin. Jedná se o selektivní herbicid patřící k inhibitorům pythoen desaturázy (PDS inhibitorů), které se uplatňují v oblasti biosyntézy karotenoidů. Flurochloridon se používá proti širokolistým plevelům a některým travnatým plevelům.



Obr. 1: Strukturální vzorec flurochloridonu

3.4.2 Fluoranthen

Fluoranthen je chemická sloučenina patřící mezi perzistentní organické polutanty a polycyklické aromatické uhlovodíky. Ovlivňuje biologické a fyziologické procesy v rostlinách a v životním prostředí jsou nejvíce ohroženy vodní rostliny.



Obr. 2: Strukturální vzorec fluoranthenu

3.4.3 Použití, účinky herbicidů na organismy a jejich rezidua

Existují herbicidy selektivní, které likvidují určitou skupinu rostlin, většinou dvouděložných plevelů a nepoškozují jiné kulturní plodiny, při aplikaci jsou účinné látky translokovány do kořenů, stonků a oddenků, způsobují deformaci listů a následně odumírá celá rostlina a herbicidy širokospektrální neboli totální, které likvidují většinu porostu na pozemku. Dle způsobu účinku herbicidy dělíme na kontaktní – herbicid působí v místě kontaktu s rostlinným pletivem a systémové – účinná látka je absorbována rostlinou a posléze rozváděna xylémem, floémem i do těch částí rostliny, jež nebyly látkou přímo zasaženy. Dle mechanismu účinku jsou herbicidy rozděleny dle mezinárodně uznávané klasifikace HRAC (Herbicide Resistance Action Committee), (COBB a KIRKWOOD 2000).

Aplikace herbicidů je ovlivněna několika faktory, které mohou znehodnotit nebo naopak podpořit jejich účinnost, v tomto případě se jedná o teplotu, kdy s její rostoucí hodnotou vzrůstá i účinek herbicidů, půdní vlhkost a půdní druh, obsah humusu v půdě, kdy jsou herbicidy při stoupající kvalitě těchto vlastností účinnější. Dále pak například povětrnostní podmínky, srážky a intenzita slunečního záření se mohou spolupodílet na účinnosti herbicidů na dané rostliny.

Když herbicidy dosáhnou tzv. necílové oblasti, mohou způsobit nepříjemnou újmu na necílených druzích a samotných rostlinách zejména. Vliv herbicidů na flóru je tedy rozhodně vyšší než na faunu, avšak fauna může být taktéž postižena (LEVIN 1998).

3.5 Vliv organických polutantů průmyslové depozice a herbicidů na rostliny

Rostliny jako dominantní složky suchozemských i vodních ekosystémů mají schopnost přijímat z prostředí veškeré škodlivé a toxické látky a umožňovat tak i jejich vstup do vyšších trofických úrovní.

Mechanismus příjmu organických a znečišťujících látek se řídí chemickými a fyzikálními vlastnostmi znečišťující látky, podmínkami prostředí a rostlinnými druhy.

Jak již bylo zmíněno, organické polutanty a herbicidy mají na rostliny obecně negativní vliv, často působí toxicky a inhibičně, mnohé z nich narušují růst, vývin a produkční procesy u rostlin, dochází k ovlivnění procesů fotosyntézy a k poškození fotosyntetických struktur uvnitř rostliny, k blokování aktivity enzymů a inaktivaci redoxních systémů. Vyvolávají stresovou odpověď, kdy je rostlina nucena se vůči těmto látkám bránit a negativně ovlivňují růst a vývoj. Například z plynů nacházejících se v ovzduší jsou pro rostliny nebezpečné především oxid siřičitý a ozon, v půdě se pak mohou nacházet toxické kovy, aromatické organické látky, rezidua pesticidů a mnohé další. Obsah těchto toxických látek v prostředí je spojen převážně s již uvedenou průmyslovou a zemědělskou činností člověka, jako je spalování fosilních paliv, náhodné úniky nebezpečných látek do atmosféry, používání průmyslových hnojiv a aplikací pesticidů. Antropogenním působením se tak do životního prostředí dostávají látky, které se dříve v přírodě nevyskytovaly, obecně nazývány synonymem také jako xenobiotika (SIMONICH et al., 1995).

3.6 Abiotický stres u rostlin

Proměnlivé podmínky, kterým rostliny musí v průběhu svého života čelit, způsobují především zpomalení jejich životních funkcí, poškozují jejich orgány a dokonce mohou způsobit jejich úhyn. Jako stresové faktory tzv. stresory lze označit veškeré nepříznivé vlivy vnějšího prostředí, které rostliny určitým způsobem do jisté míry ovlivňují. Termín stres je používán pro souhrnné označení procesu, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem stresorů. Stres je velmi těžko definovatelným procesem, kterým rostliny procházejí, jedná se o dynamický komplex mnoha složitých odpovědí na působení stresorů (PITERKOVÁ et al., 2005).

Stresové faktory jsou rozděleny na biotické - atak patogenů, negativní působení okolních organismů a stárnutí, a pro tuto práci významnější abiotické faktory, kam patří obecně působení herbicidů, přílišná intenzita světla, teplo a chlad, působení mrazu a sucha, těžkých kovů a ozónu (FAROOQ et al., 2009).

Odborně jsou stresové faktory rozděleny na fyzikální abiotické faktory, kam řadíme hlavně mechanické působení větru, nadměrné ozáření a extrémní teploty, a chemické abiotické faktory, kam patří především nedostatek vody a kyslíku, nedostatek živin a nadbytek iontů solí a sodíku v půdě, toxické kovy a organické látky v půdě, a toxické plyny ve vzduchu (PITERKOVÁ et al., 2005).

Abiotické stresory jsou v podstatě všechny neživé faktory přítomné v okolí rostlin, které mohou negativně nebo dokonce škodlivě ovlivnit růst a produktivitu rostlin.

Pro rostliny, které jsou vystaveny stresu, je typické, že bojují o své přežití, snaží se stresorům přizpůsobit a vytvořit s ním určitou souhru. Je spuštěna signalizační kaskáda – příjem stresového signálu, jeho zesilování a přenos a nakonec spuštění reakce na stres.

Přenos stresového signálu neboli signální transdukce, vychází z aktivace receptoru, poté jsou generováni sekundární poslové, kteří překládají primární externí signály na signály intercelulární. Tito poslové za spolupůsobení svých partnerů vytváří na sebe navazující cesty, asociují signální komplexy, signální molekuly a kontrolují jejich životnost, dochází k aktivaci transkripčních faktorů a tím k expresi genů stresové odpovědi. Jednoduše řečeno, tzv. signální transdukce je delikátním procesem, kdy za spolupůsobení transkripčních faktorů, fosfoproteinů a na stres reagujících genů dochází k přesnému a optimálnímu spuštění ochrany rostlin před poškozením. Signální

transdukce je důležitá pro mnoho buněčných aktivit a jejich koordinaci a většina těchto kroků je velmi složitá (SCANDALIOS 1990).

3.7 Antioxidační aktivity u rostlin, antioxidační systém v odpovědi na oxidativní stres

Působení stresových faktorů může vyvolat u rostlin oxidativní stres, který je charakteristický prudkou přechodnou tvorbou velkého množství aktivních forem kyslíku (XU a PORTER 2014).

Oxidativní stres můžeme definovat jako proces překonání antioxidační obrany buňky volnými kyslíkovými radikály, nastává při porušení rovnováhy mezi tvorbou radikálů a jejich odstranění pomocí antioxidantů. Volné radikály jsou velmi reaktivní částice a vznikají elektronově symetrickým homolytickým štěpením, radikálové reakce se skládají ze tří částí – iniciace, propagace a terminace (DING et al. 2005). Radikály působí destruktivně zejména na nukleové kyseliny, lipidy a proteiny (DIZDAROGLU a JARUGA 2012). Volné radikály můžeme podle původu rozdělit na endogenní, které jsou produkované v organismu, a exogenní, které se do organismu dostávají ze zevního prostředí (ZHOU a GREENBERG 2014). Při nedostatečné obraně může vést tento stres k poškození a výskytu mutací, proteolýze, či inhibici proteosyntézy. Organismus musí tedy čelit oxidativnímu poškození svých bio-molekul tzv. antioxidační ochranou. (XU a PORTER 2014).

V různých systémech, které jsou lokalizovány v buněčných strukturách, organismy pro svoji ochranu před oxidativním poškozením aktivují enzymatické a neenzymatické systémy, které tzv. „zhasínají“ volné kyslíkové radikály neboli aktivní formy kyslíku. Neenzymatická ochrana zahrnuje redukovaný glutation, kyselinu askorbovou, tokoferol (vitamin E), β -karoten (provitamin A) a jiné sloučeniny, enzymatická ochrana pak zahrnuje specializované enzymy, jako jsou superoxidové dismutasy, katalasy, peroxidasy, glutation reduktázy a enzymy askorbát-glutathionového cyklu (XU a PORTER 2014; BRUGGEMANN et al., 1999; ALSCHER et al., 2002; VRÁNOVÁ et al., 2002; SHALATA et al., 2001).

Zdrojem aktivních forem kyslíku můžou být i redoxní reakce jako je např. redukce kyslíku v průběhu elektronového transportu v mitochondriích nebo fotolýza vody chloroplastovým elektronovým transportním řetězcem. Produkce singletového kyslíku

následně stimuluje vznik dalších aktivních forem kyslíku, tj. peroxidu vodíku, superoxidového nebo hydroxylového radikálu (KELLY et al., 2002).

3.7.1 Lipidová peroxidace

Rostliny mají vyvinutou spoustu obranných mechanismů sloužících k zabraňování průniku patogenů a toxických látek do svých pletiv. Pokud dojde k rozpoznání tohoto patogenu, snaží se rostliny před těmito vlivy bránit a omezit jejich působení, šíření a vliv na rostlinná pletiva. Tato obranná reakce však vede často k odumření pletiva (někdy může vzniknout rezistence vůči patogenu). Součástí této obranné reakce je zvýšená tvorba aktivních forem kyslíku, které jsou zodpovědné za peroxidaci mastných kyselin lipidů v buněčných membránách tzv. peroxidaci lipidů. Jako produkt metabolismu vzniká degradační produkt lipidové peroxidace malonyldialdehyd (MDA), jehož působení na lipidové membrány má nezvratný poškozující vliv vedoucí až k lýze buněk (CHEESEMAN 1993).

3.8 Glutathion

Vyskytuje se v buňkách rostlin, živočichů, hub i bakterií a působí především jako účinný antioxidant, což znamená, že jeho funkcí je tlumení kyslíkových radikálů a jejich neutralizace, svojí aktivitou též zabraňuje poškození důležitých složek v buňce (MEISTER 1988). Glutathion má významnou roli v životě a funkci buňky, z toho vyplývá, že snížení hladiny glutathionu (GSH) vede k oxidativnímu stresu, poruše buněčných funkcí a může způsobit vznik patologických stavů nebo stárnutí a hynutí (WEBBER et al., 2014).

Glutathion se z chemického hlediska řadí mezi tripeptid, který se skládá z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu a v organismu se může vyskytovat ve dvou formách – oxidované (GSSG) a redukované (GSH), (ASENSI et al., 1999; TAVERNE et al., 2013; WEN et al., 2005). Redukovaná forma glutathionu obsahuje thiolovou skupinu cysteinu, která je schopna předat redukční ekvivalent na jiné nestabilní molekuly, jako jsou například reaktivní formy kyslíku, tím se glutathion stává reaktivní a rychle reaguje s jiným glutathionem za vzniku disulfidu glutathionu (GSSG), jednou oxidovaný glutathion může být zpětně redukován enzymem glutathion reduktázou, za použití NADPH, jako donoru elektronů. Za normálních fyziologických podmínek se glutathion v buňce nachází

v redukované formě (GSH) a méně ve formě disulfidové. Zvýšení poměru GSSG/GSH (například v důsledku inaktivace glutathion reduktázy), je považováno za indikátor oxidativního stresu (WEN et al., 2005). GSH se účastní mnoha buněčných reakcí, zachycuje volné radikály a další reaktivní formy kyslíku (hydroxylový radikál a peroxid vodíku) přímo a nepřímo prostřednictvím enzymatických reakcí (WU et al., 2004).

Glutathion je zároveň převládajícím nízkomolekulárním thiolem v buňkách. Většina celulórního GSH (85-90 %) je přítomna v mnoha organelách (včetně mitochondrií, jaderné matrix a peroxizomu), extracelulární koncentrace GSH jsou relativně nízké. GSH se snadno oxiduje na neenzymatický glutathion disulfid (GSSG), který se uvolňuje z buněk a přispívá k ztrátě intracelulárního GSH. Koncentrace buněčného GSSG jsou redukovány zřetelně v reakci na podvýživu z bílkovin, oxidačním stresem a patologickými stavy. GSH + 2 [GSSG] koncentrace obvykle označují celkový glutathion v buňkách. Poměr [GSH]:[GSSG] je často využíván jako indikátor buněčného redoxního stavu. Syntéza GSH z glutamátu, cysteinu a glycinu je katalyzována postupně dvěma enzymy v cytosolu, a to γ -glutamyl cystein syntetázou (GCS) a GSH syntetázou. V reakci GCS, γ -karboxylová skupina glutamátu reaguje s aminoskupinou cysteinu za vzniku peptidové γ -vazby, která chrání GSH před hydrolyzou intracelulárních peptidáz (WEBBER et al.; 2014, SIES 1999).

3.9 Rostlinné fytohormony

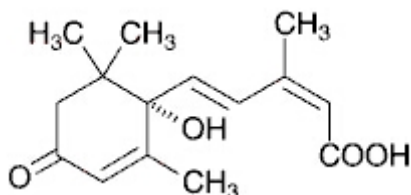
Rostlinné hormony jsou definovány jako bioaktivní nativní molekuly či látky, které ve velmi malé koncentraci způsobují fyziologickou odpověď. Mohou působit přímo v místě své syntézy, nebo mohou být po syntéze v jedné části rostliny transportovány do části jiné. Jejich účinek je stimulující i inhibující (ARMSTRONG et al., 1996).

Přirozené regulátory růstu jsou rozděleny na dvě skupiny látek – rostlinné fytohormony a další látky s regulační aktivitou. Existuje několik skupin endogenních růstových regulátorů, které jsou syntetizovány v rostlinách, považovaných za rostlinné fytohormony, jsou to auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová, ethylen, brassinosteroidy, polyaminy, kyselina jasmonová, oligosachariny a fenolické látky.

Mechanismus působení je podmíněný receptorem pro daný hormon, hormon je navázán na receptor bílkovinné povahy, umístěný buď na membráně nebo v cytosolu. Signál hormonu může být přenesen pomocí sekundárních posílů, váže se na

v cytoplasmě rozpuštěný receptor, následuje proniknutí do jádra a změna genové exprese (PODLEŠÁKOVÁ et al., 2012).

3.9.1 Kyselina abscisová (ABA)



Obr. 3: Strukturální vzorec kyseliny abscisové

Jedná se o seskviterpenoid (izoprenoidní sloučeninu s 15 cykly uhlíku) řazenou mezi fytohormony, neboli endogenní růstové regulátory, které jsou účinné ve velmi nízkých koncentracích. Kyselina abscisová (ABA) má své pevné místo v procesech, které umožňují rostlinám přizpůsobit se podmínkám prostředí. (NAMBARA a MARION-POLL 2005).

Význam ABA se mění během životních fází rostlin a liší se u jednotlivých rostlinných druhů. Hlavní fyziologické účinky ABA jsou maturace embrya během vývoje semen a plodů, indukce tvorby a akumulace zásobních proteinů během zrání semen, regulace dormance semen, plodů, hlíz, cibulí a pupenů (zabránění předčasného klíčení či rašení), urychlení stárnutí a stimulace opadu plodů a listů, regulace heterofylie u některých vodních rostlin, regulace dlouhivého růstu, inhibice růstu listů, regulace vodního režimu rostlin prostřednictvím uzavírání průduchů a regulace odpovědi na stresové faktory.

Při nedostatku vody vyvolá uzavření průduchů a mimo to zvýší hydraulickou vodivost kořenů. (PODLEŠÁKOVÁ et al., 2012).

Nejvíce ABA se tvoří v dormantních orgánech, ale i v mladých, rychle rostoucích pletivech. (ANDRADE et al., 2009)

ABA se tvoří v buňkách obsahujících chloroplasty či amyloplasty tj. v zelených částech rostlin, ale i v kořenových špičkách (ZEEVART 1980).

3.10 Karotenoidy

Tyto organické lipofilní látky s výraznými antioxidačními účinky jsou řazeny mezi tetraterpeny. Patří také mezi fotosynteticky aktivní pigmenty a vyskytují se v rostlinném těle ve dvou formách a to jako karoteny a xantofyly.

Karotenoidy odstraňují volné radikály a velmi rychle odstraňují singletový kyslík. Vznikající excitovaný tripletový stav karotenoidů se velmi snadno vrací do základního stavu za uvolnění tepla. β -karoten se podílí na odstranění radikálů produkovaných během propagačního stupně reakce (PERÉZ – VENDEREL et al., 2001).

Vlastnosti karotenoidů jsou odvozeny od jejich struktury, která spočívá v obsahu a přítomnosti konjugovaných vazeb (YOUNG a LOWE 2001). Dochází k tvorbě delokalizovaných systémů elektronů, které jsou náchylné k napadení radikálem, tato místa jsou radikály napadány nejčastěji a potom štěpeny. Karotenoidy mohou zachytit energii, pomocí které „rozvibrují“ svoji molekulu a vyzáří tuto energii ve formě tepla. Tím je umožněno absorbovat energii excitovaných molekul, jako jsou singletový kyslík, i excitovaný chlorofyl a zabránit tak poškození proteinů, nukleových kyselin či fotosyntetického aparátu (EDGE et al., 1999). Dochází k tvorbě tzv. karotenoidových radikálů (WELLBURN 1994).

3.11 Biologie a fyziologie okřehek menšího (*Lemna minor* L.)

Okřehek menší je malá vodní rostlina s plochými listy a jemnými, tenkými kořeny, zdravá kolonie je tvořena z 2 – 5 lístků, květy obvykle nejsou vyvinuty.



Obr. 4: Okřehek menší (*Lemna minor* L.)

Taxonomicky je *Lemna minor*, tedy okřehek menší řazen mezi jednoděložné, krytosemenné rostliny, patřící do řádu žabníkotvarých (*Alismatales*) a do čeledi áronovitých (*Araceae*) rostlin. Okřehek pokrývá především plochy stojatých vod, slouží například i jako potrava pro ryby a vodní ptactvo. Za příznivých podmínek tvoří kompaktní porosty, skrz které neprochází světlo, neproniká kyslík a dochází ke zhoršení kvality vody (MKANDAWIRE a DUDEL 2005).

Okřehek obvykle roste ve stojatých nebo pomalu tekoucích a živinami obohacených vodách tropických a mírných pásem. Jejich růstové podmínky zahrnují teploty pohybující se v rozmezí 6 - 33°C a širokém rozmezí pH s optimálním růstem mezi pH 5,5 a 7,5

Na rozdíl od většiny na zemi rostoucích a vodních krytosemenných rostlin, se *Lemna spp.* reprodukuje téměř výhradně nepohlavně, navzdory tomu, že se vyskytují ojediněle kvetoucí rostliny, jsou téměř všechny prostředky využity na vegetativní růst. Anatomicky, jsou rozptýlené jednotky známé jako vějířovitý list, který se skládá z lístků a kořenové soustavy. Z fylogenetického hlediska, jsou *Lemna spp.* na evoluční cestě sekundárního zjednodušení, bývalé komplexní a vysoce diferencované cévnaté rostliny (LES et al., 2002).

Okřehek lze také zařadit mezi hydrofyty, což jsou vytrvalé vodní rostliny, jejichž obnovovací meristémy a orgány přetrvávají nepříznivé roční období ponořené ve vodě, nebo pod její hladinou, okřehek menší patří konkrétně mezi tzv. splývavé hydrofyty,

což jsou rostliny, které většinou splývají na hladině či mělce pod hladinou, popřípadě se vznášejí či na vodě plavou.

3.12 Okřehek menší (*Lemna minor* L.) jako modelová rostlina

Některé druhy *Lemna spp.* mají vynikající vlastnosti, díky kterým se dá okřehek využít jako modelová rostlina. Jedná se především o rychlý růst a primární produkci, vysokou bioakumulační schopnost, schopnost transformace či degradace znečišťujících látek, schopnost regulace chemických reakcí (MKANDAWIRE a DUDEL 2007). Jejich relativně jednoduchá anatomická a fyziologická struktura má vědecký a inženýrský význam. Tyto vlastnosti umožňují snadnou manipulaci za laboratorních podmínek. V důsledku toho, že jsou považovány za vzorového zástupce vyšších rostlin - pro řadu chemických a biogeochemických studií zahrnujících regulaci prvku asimilace u vyšších rostlin. Kromě fytoremediačních studií a použití, *Lemna spp.* patří mezi nejvíce standardizované zkušební organismy ve vodní ekotoxikologii (EPA 1996, DIN 2000, ISO 2001, OECD 2002). Malá velikost okřešku, jeho jednoduchá morfologie a rychlý růst dělá okřehek velmi vhodnou rostlinou pro zkoušky toxicity (OECD 2002). Používá se také při čištění odpadních vod, k odstranění minerálních a organických chemikálií a radionuklidů.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Kultivace rostlinného materiálu

Rostliny okřehku menšího byly kultivovány v růstové komoře, při denní a noční teplotě v rozmezí 19-21 °C, při fotoperiodě 14 hodin světla a 10 hodin tmy.

Rostliny byly umístěny v černých kultivačních nádobách o objemu jeden litr se Steinbergovým médiem, určeným pro kultivaci okřehku, sloužícího pro testy toxicity (MKANDAWIRE a DUDEL 2007). Okřehek byl každých 21 dnů subkultivován za sterilních podmínek v laminárním boxu do nově připraveného média, za účelem udržování rostlin a pro založení nového pokusu.

4.1.1 Složení kultivačního Steinbergova média

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

4.1.2 Srovnávací test pro stanovení 50% letality

Test na stanovení 50% letality tzv. LT_{50} byl proveden pomocí koncentračního screeningu a bylo vybíráno z koncentrací 0,1; 0,2; 0,5; 1 a 5 mg/l flurochloridonu a fluorantenu. Na základě koncentrační řady bylo odvozeno, které dvě z koncentrací budou použity do experimentu a lze z nich určit mortalitu u více než 50 % rostlin okřehku.

4.1.3 Varianty experimentu

Experiment byl založen na rostlinách *Lemna minor* v prostředí zatíženém fluoranthenem (FLT) a flurochloridonem (FLU). Koncentrace fluoranthenu i flurochloridonu se vyskytovala ve dvou variantách (0,5 a 5 mg/l). Součástí experimentu byla kontrola, která byla provedena za stejných podmínek a se stejnými rostlinami okřehku menšího uchovávanými ve Steinbergově mediu bez přítomnosti fluoranthenu a flurochloridonu.

Pozorování byla prováděna na rostlinách, které pokrývaly hladinu media. Každá koncentrace měla dvě paralelní měření (přičemž první měření sloužilo k určení růstových parametrů a druhé měření bylo využito k morfologickému hodnocení). Dále byla obě měření využita pro fotodokumentaci.

4.1.4 Odběry vzorků

Délka trvání experimentu byla 10 dní. Odběry vzorků byly prováděny za sterilních podmínek v laminárním boxu, po 10 a 24 hodinách a po 4 a 10 dnech od založení pokusu. Vzorky byly odebrány pro stanovení obsahu kyseliny abscisové (ABA) pomocí RIA analýzy a malonyldialdehydu (MDA) pomocí spektrofotometrie. Dynamika fyziologických a morfologických změn v průběhu desetidenní kultivace ve dvou výše uvedených koncentracích FLT a FLU vedla k posouzení míry stresu rostlin okřehku menšího.

4.2 Morfologické hodnocení

U rostlin okřehku, které byly kultivovány ve Steinbergově mediu s jednotlivými koncentracemi FLT a FLU, byl pozorován růst počtu rostlin. Byla hodnocena morfologie rostlin, ke které byla pořízena v průběhu experimentu fotodokumentace.

4.2.1 Pozorování počtu rostlin

Za 10 a 24 hodin nebyl pozorován znatelný růst rostlin. V průběhu 4. a 10. dne od založení pokusu byla provedena fotodokumentace, sloužící pro stanovení počtu rostlin.

Z fotodokumentace byl stanoven počet rostlin *Lemna minor* v jednotlivých koncentracích.

4.2.2 Viabilita rostlin

Viabilita rostlin byla hodnocena po 10 dnech kultivace od založení samotného experimentu. Prostřednictvím fotodokumentace a vyhodnocením byly určeny rostliny, se schopností tvorby chlorofylu jako viabilní a byl stanoven jejich procentický podíl.

4.3 Sledování stresových markerů a jejich kvantifikace

4.3.1 Spektrofotometrie

Molekuly mají schopnost pohlcovat elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek. Je to dáno tím, že mohou existovat v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. Jestliže má molekula přejít ze stavu s nižší energií do stavu s energií vyšší, musí molekula absorbovat záření o frekvenci, která právě odpovídá rozdílu energie mezi energetickými hladinami obou kvantových stavů podle Planckovy podmínky. Energeticky nejnáročnější jsou přechody mezi elektronovými energetickými hladinami. Běžně jsou způsobeny absorpcí ultrafialového (180 – 380 nm) a viditelného záření (380 – 780 nm). Absorpci záření lze měřit na přístrojích, které nazýváme absorpční spektrometry. Při absorpčním měření se pro nastavenou vlnovou délku porovnává tok záření prošlý měrnou kyvetou s tokem záření prošlým kyvetou s čistým rozpouštědlem nebo slepým pokusem (blankem).

4.3.1.1 Stanovení lipidové peroxidace

Stanovení lipidové peroxidace bylo provedeno dle GAO et al. (2009).

Postup stanovení malonyldialdehydu:

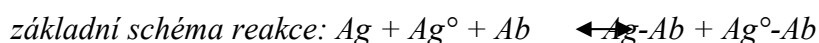
1. navážení 0,1 – 0,2 g rostlinného materiálu, smíchání s 0,1% TCA, homogenizace
2. centrifugace 10 min při 3600 g
3. odebrání 1 – 2 ml supernatantu, smíchání s 1 – 2 ml 0,67% TBA
4. vaření na 100°C po dobu 30 min

5. zchlazení na pokojovou teplotu
6. centrifugace 5 min při 1800 g
7. měření na spektrofotometru SPECTRONIC 20 GENESIS při vlnových délkách 450, 532 a 600 nm

4.3.2 Radioimunoanalýza

Radioimunoanalýza (RIA) je imunochemická analytická metoda založená na principu kompetitivní reakce stanovované látky a adekvátního radioligandu o vazebná místa specifické protilátky. Kvantitativní vyhodnocení reakce je založeno na detekci radioaktivity.

Principem této imunochemické reakce je specifická reakce založená na kompetici haptenu (stanovovaný analyt - Ag) a značeného haptenu (radioindikátor - Ag^o) o vazebná místa specifické protilátky - Ab.



Kompetice (soutěž) obou haptenuů o vazebná místa protilátky je docíleno přítomností omezeného množství protilátky. Výsledkem reakce je vznik dvou komplexů antigen-protilátka a to s neznačeným a značeným haptenu, přičemž množství značeného komplexu je nepřímo úměrné původnímu množství stanovovaného haptenu (tzn., že čím je vyšší koncentrace analytu ve stanovovaném vzorku, tím menší množství značeného komplexu [Ag^o-Ab] při reakci vznikne). Při praktickém provádění této metody se do všech reakčních zkumavek nadávkuje konstantní množství specifické protilátky Ab (resp. antiséra) a značeného haptenu Ag^o, přičemž jeho množství je větší, než je vazebná kapacita protilátky. Další reakční složkou je neznačený hapten Ag, který je určovanou látkou a jehož množství v reakční směsi se mění v závislosti na jeho obsahu v analyzovaném vzorku. Stabilita podmínek je obvykle zajišťována přidávkou vhodného reakčního pufru. Vzhledem k nedostatečnému množství vazebných míst zůstávají v reakční směsi rovněž obě formy antigenu i ve volné podobě (tj. v komplexu nevázané). Celková radioaktivita, která je do reakce dodána [T], se tak během reakce rozdělí do dvou frakcí - vázané [B] a volné [F], přičemž platí, že T=B+F. Jestliže během separace dojde k rozdělení obou frakcí, je možno na základě změření radioaktivity jedné z nich analýzu kvantitativně vyhodnotit. Nutnou podmínkou je ovšem sestavení kalibrační závislosti na základě analýzy skupiny vzorků (obvyklý počet 5-6 standardů) s deklarovanou koncentrací stanovovaného analytu. Kalibrační

křivka se sestrojí jako závislost změřené radioaktivity na koncentraci, tzn., že na osu x je vynášena koncentrace standardů, na osu y pak odpovídající hodnoty změřené odezvy (obvyklým odezvoým parametrem je radioaktivita vázané frakce B nebo poměr B/T popř. B/F, často se používá rovněž poměr B/B₀, kde se hodnotou B₀ rozumí radioaktivita standardu s nulovou koncentrací analytu).

Na základě zjištění odezvoého parametru neznámého vzorku je potom možné odečtením z kalibrační závislosti určit koncentraci analytu.

4.3.2.1 RIA analýza

Stanovení obsahu kyseliny abscisové pomocí radioimunoanalýzy bylo provedeno dle QUARRIE et al. (1988) s použitím monoklonální protilátky MAC 252 nevykazující křížové reakce (BARRIEU A SIMONNEAU 2000).

Postup radioimunoanalýzy:

1. příprava standardů, vzorků, příprava B₀ (minimální vazba), B_M (maximální vazba)
2. přidání 100 μl ³H-ABA (značená kyselina abscisová)
3. přidání 100 μl protilátky MAC 62 a 200 μl 50% roztoku PbS
4. inkubace v lednici při 4°C po dobu 45min
5. přidání 500 μl 100% roztoku (NH₄)₂SO₄
6. inkubace při laboratorní teplotě po dobu 30 minut
7. 10 min centrifugace při 6000 otáčkách/ minuta a odsátí supernatantu odsávačkou
8. přidání 1 ml 50% roztoku (NH₄)₂SO₄
9. roztřepání sedimentu na vortexu
10. centrifugace 5 min a odsátí supernatantu odsávačkou
11. přidání 100 μl destilované vody
12. roztřepání sedimentu na třepačce
13. přidání 1 ml dioxanového scintilátoru
14. vložení do měřících ampulí
15. měření na přístroji PACKARD TRIKARB 2900 TR

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení 50% úhynu rostlin

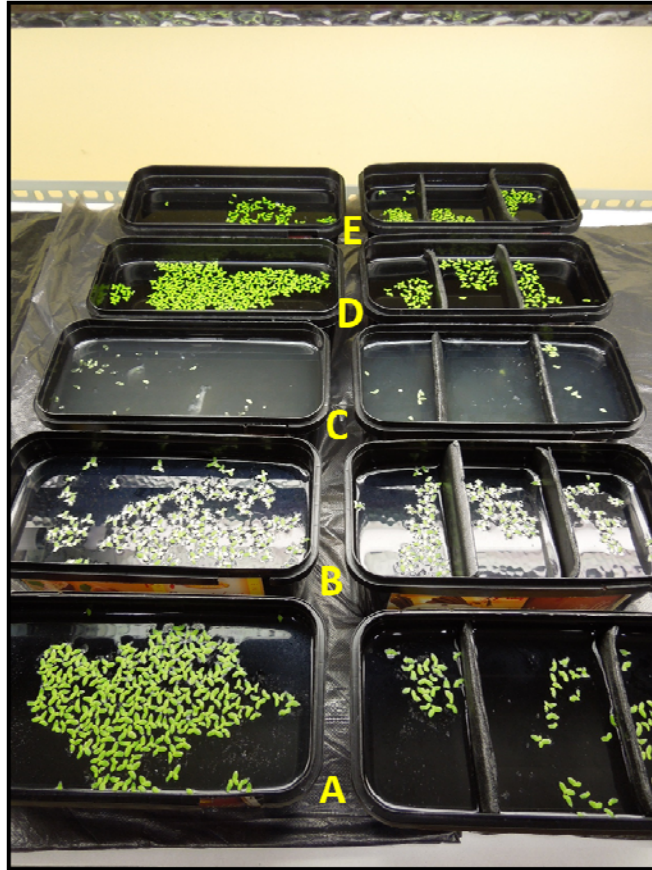
Screening pěti uvedených koncentrací 0,1; 0,2; 0,5; 1 a 5 mg/l flurochloridonu a fluorantenu poukázal na nutnost interpolace hodnot 50% úhynu rostlin okřehku, neboť k němu docházelo až při vyšších koncentracích 1 a 5 mg/l a to mnohem dříve u flurochloridonu v šestém nebo sedmém dni kultivace oproti fluorantenu, kde k tak vysokému úhynu docházelo až po 14-ti dnech kultivace. Z tohoto důvodu nejsou uvedena četná data tohoto experimentu a pro pokus byla vybrána pro každou použitou látku nejvyšší koncentrace z testovaných a dále koncentrace 10ti násobně nižší.

Tabulka 1: Screening koncentrací FLT a FLU

mg/l \ dny	2	5	7	10	14
FLT 0,1	100	100	100	100	95
FLT 0,2	100	100	100	100	94
FLT 0,5	100	100	99	98	92
FLT 1	100	95	95	94	85
FLT 5	100	98	96	95	85
FLU 0,1	100	100	97	80	60
FLU 0,2	100	98	94	75	50
FLU 0,5	95	90	75	60	40
FLU 1	95	85	72	56	35
FLU 5	91	84	50	10	0

5.2 Hodnocení morfologie rostlin

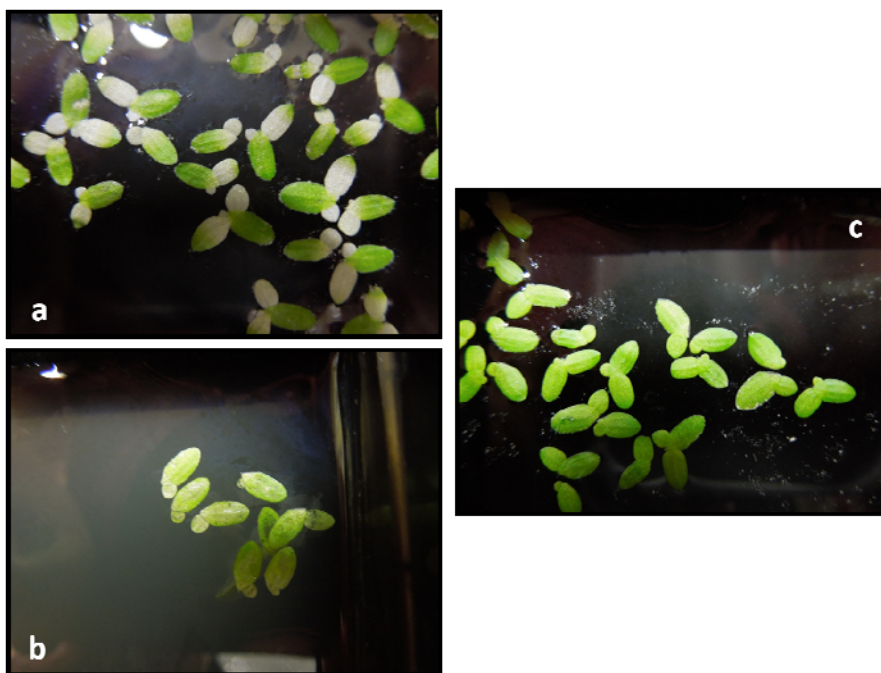
5.2.1 Vzhled rostlin



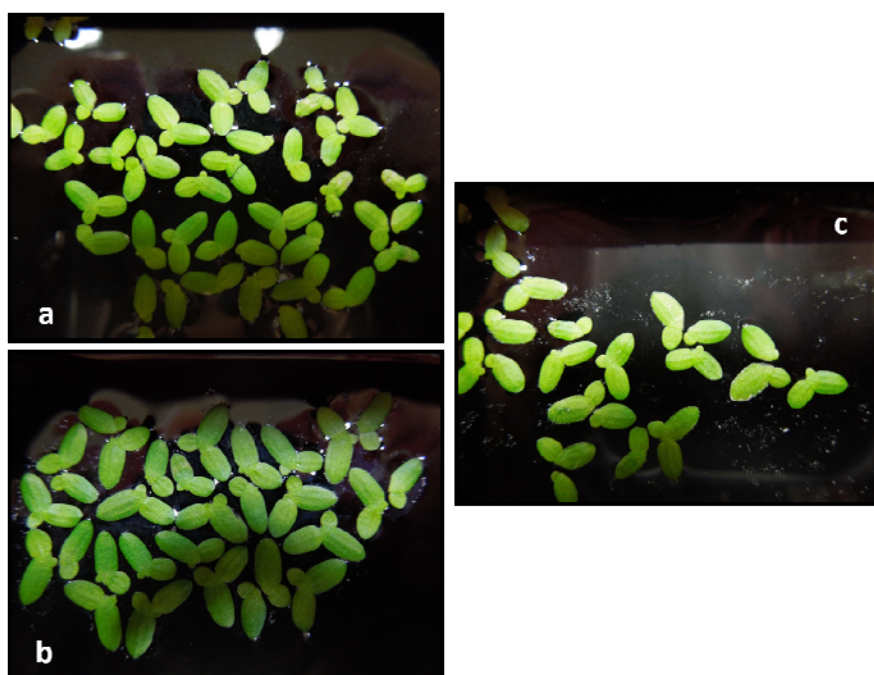
Obr. 5: Fotodokumentace experimentu po 4 dnech kultivace znázorněna na fotografii pro jednotlivé varianty žlutými písmeny (A – kontrola, B – flurochloridon 0,5 mg/l, C – flurochloridon 5 mg/l, D – fluoranten 0,5 mg/l, E – fluoranten 5 mg/l)

Kontrolní rostliny okřehku narostly typicky elipsovitého tvaru, zelené a bez výrazných změn pigmentace a obsahu chlorofylu (obr. 6 a 7; c). U rostlin, které rostly na médiu s obsahem flurochloridonu 0,5 mg/l se již po 4 dnech projevila zřetelná změna pigmentace, snížení obsahu chlorofylu a světlá až bílá barva listové plochy. U rostlin, které rostly na médiu s obsahem flurochloridonu 5 mg/l se po 4 dnech objevily skvrny a trhliny v listové ploše a mírné žloutnutí. V případě koncentrací flurochloridonu 0,5 a 5 mg/l došlo k výraznému poklesu tvorby chlorofylu.

U rostlin rostoucích na médiu s koncentrací fluorantenu 0,5 mg/l a 5 mg/l se neobjevily tak značné projevy ve změnách pigmentace a listy nebyly výrazně poškozeny.



Obr. 6: Morfologie okřehku menšího po 4 dnech růstu na médiu s přidáním flurochloridonu (a koncentrace 0,5 mg/l FLU; b koncentrace 5 mg/l FLU; c kontrola)



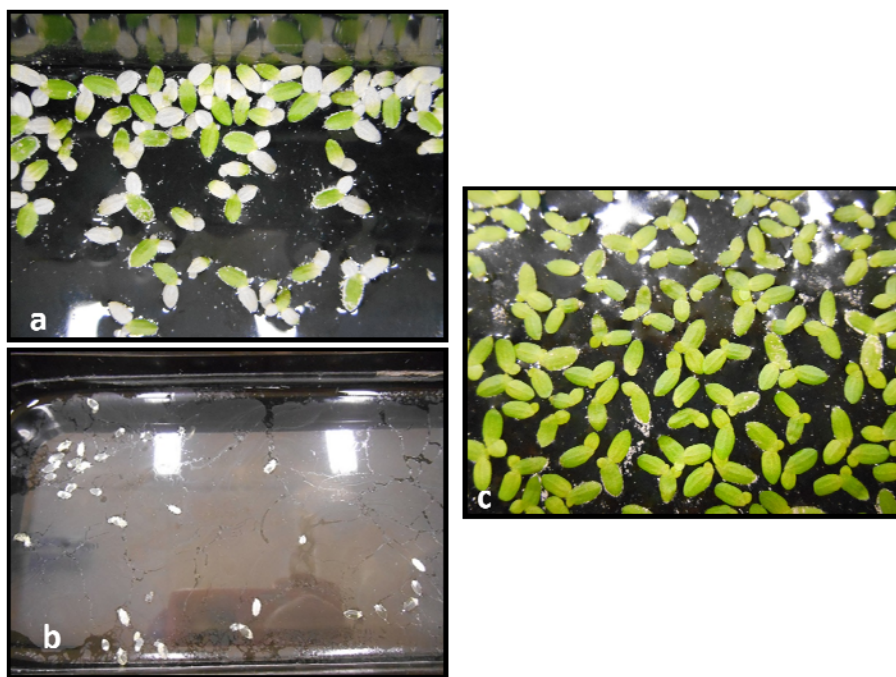
Obr. 7: Morfologie hodnocení okřehku menšího po 4 dnech růstu na médiu s přidáním fluorantenu (a koncentrace 0,5 mg/l FLT; b koncentrace 5 mg/l FLT; c kontrola)



obr. 8: Fotodokumentace experimentu po 10 dnech kultivace znázorněna na fotografii pro jednotlivé varianty žlutými písmeny (A – kontrola, B – flurochloridon 0,5 mg/l, C – flurochloridon 5 mg/l, D – fluoranten 0,5 mg/l, E – fluoranten 5 mg/l)

Po 10 dnech pozorování byly kontrolní rostliny okřehku typického elipsovitého tvaru, zelené a bez výrazných změn pigmentace (obr. 9 a 10; c). U rostlin, které rostly na médiu s obsahem flurochloridonu 0,5 mg/l se po 10 dnech projevovale zřetelná změna pigmentace a světlá až bílá barva listové plochy i nadále a růst rostlin se snižoval. Rostliny, které rostly na médiu s obsahem flurochloridonu 5 mg/l neměly po 10 dnech kultivace chlorofyl, objevily se bílé skvrny na listech a jejich růst byl nulový.

V případě koncentrací fluorantenu 0,5 a 5 mg/l došlo k výraznému poklesu tvorby chlorofylu a ke žloutnutí listů okřehku. Růst rostlin byl zvláště u koncentrace fluorantenu 0,5 mg/l vyšší než u koncentrace 5 mg/l.



Obr. 9: Morfologie hodnocení okřehku menšího po 10 dnech růstu na médiu s přidáním flurochloridonu (a koncentrace 0,5 mg/l FLU; b koncentrace 5 mg/l FLU; c kontrola)



Obr. 10: Morfologie hodnocení okřehku menšího po 10 dnech růstu na médiu s přidáním fluorantenu (a koncentrace 0,5 mg/l FLT; b koncentrace 5 mg/l FLT; c kontrola)

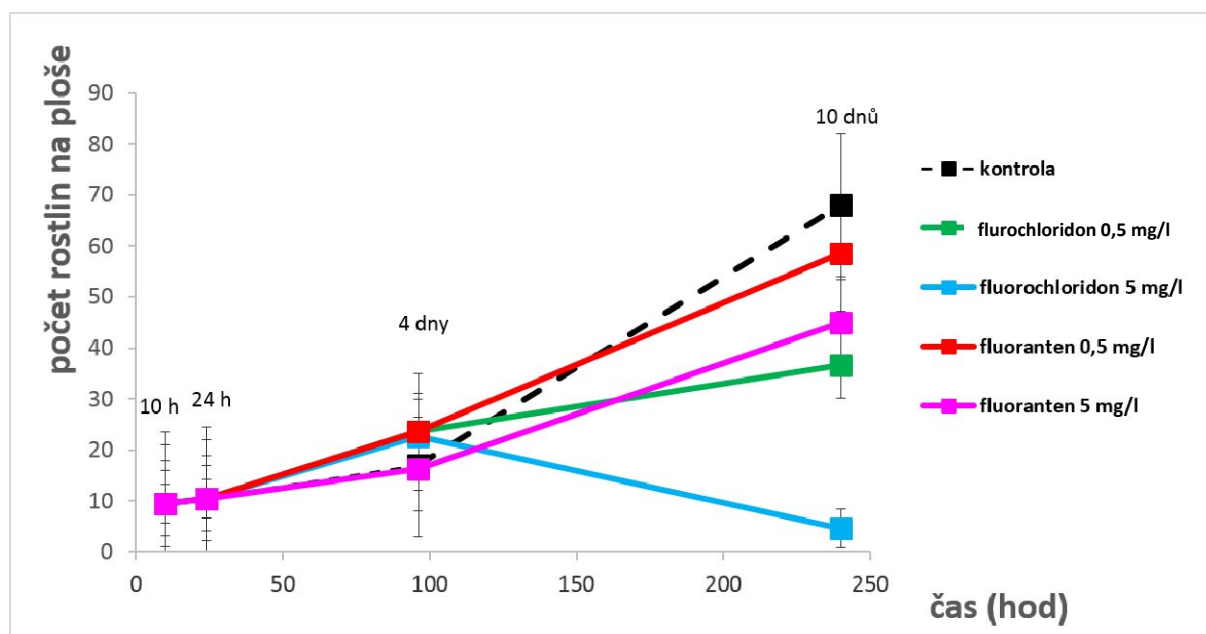
5.3 Hodnocení růstu rostlin

Byla hodnocena viabilita rostlin v procentech po 10 a 24 hodinách a po 4 a 10 dnech a počet všech rostlin, které rostly na všech variantách od 10 hodin do 10. dne.

Kontrolní rostliny po celou dobu experimentu neprojevily žádnou morfologickou deformaci ani mortalitu a rostliny rostly od prvního měření po 10 hodinách až do posledního měření po 10 dnech. Kontrolní rostliny zvýšily svůj růst o přibližně 70 % po 4 dnech a o 26,6 % po 10 dnech.

U koncentrace flurochloridonu 0,5 mg/l rostliny začaly růst až po 24 hod a 4. den měření byl jejich nárůst 23,6 %, po 10 dnech 36,6 %. Mortalita je 5,51 % po 4 dnech, po 10 dnech rostliny ztratily schopnost tvořit chlorofyl úplně a mortalita byla 100 %. U koncentrace flurochloridonu 5 mg/l rostliny začaly růst po 24 hod a 4. den měření byl růst přibližně 22,6 %, po 10 dnech však rostliny ztratily svoji schopnost tvořit chlorofyl a jejich nárůst byl téměř nulový. Mortalita byla 27,88 % po 4 dnech a 100 % po 10 dnech.

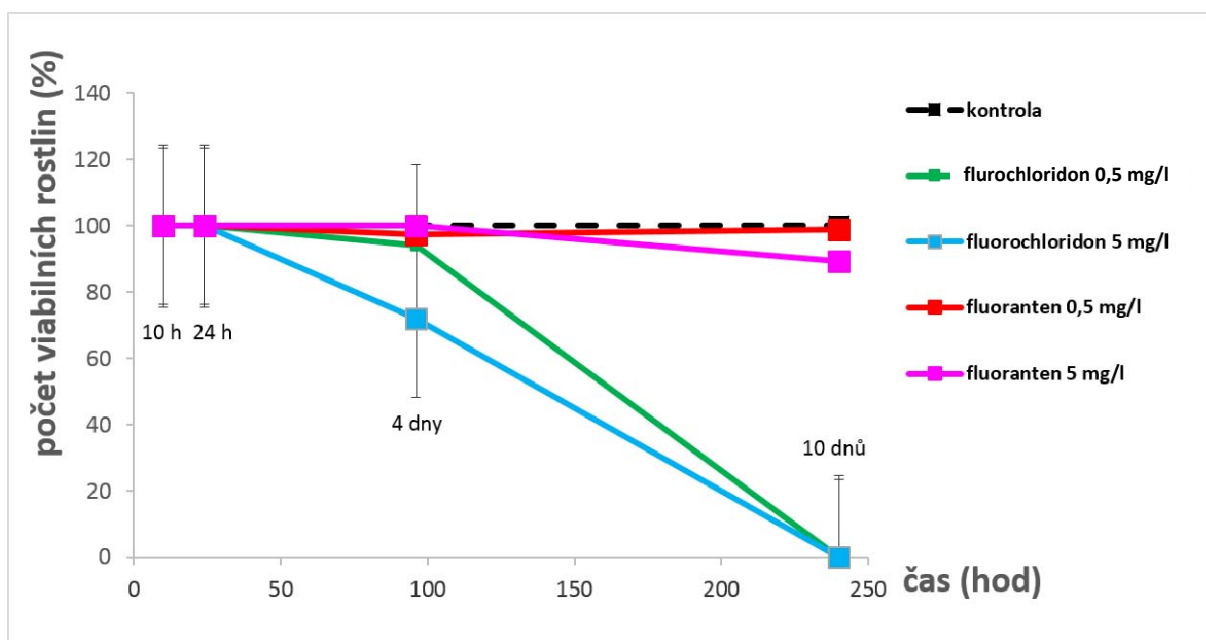
U koncentrace fluorantenu 0,5 mg/l rostliny začaly růst po 24 hod a nárůst po 4 dnech byl 23,6 %, po 10 dnech přibližně 58,6 %. Mortalita po 4 dnech je asi 2,55 % a po 10 dnech 1,03 %. U koncentrace fluorantenu 5 mg/l rostliny rostly až po 24 hod a po 4 dnech byl nárůst asi 16,3 %, po 10 dnech přibližně 45 %. Po 4 dnech byla mortalita nulová, po 10 dnech 10,45 %.



Graf 1: Závislost počtu rostlin na čase

Z grafu č. 1. je patrné, že během 10 a 24 hodin nedošlo u žádné z variant ke zvýšení, ani ke snížení růstu rostlin okřehku. Po 4 dnech kultivace na Steinbergově médiu se počet kontrolních rostlin okřehku začal zvyšovat. Na médiu s přidavkem flurochloridonu rostly rostliny po 4 dnech v případě koncentrace 0,5 mg/l, i když po 10 dnech rostly a zvyšovaly svůj růst, ztratily schopnost tvořit chlorofyl. V případě koncentrace flurochloridon 5 mg/l byl po 4 dnech výrazný pokles růstu rostlin a po 10 dnech již nebyly rostliny viabilní.

Na médiu s přidavkem fluorantenu byl růst rostlin patrný po 4 i 10 dnech a rostliny výrazně zvyšovaly svůj růst. Obě dvě koncentrace způsobují minimální mortalitu, v případě koncentrace 5 mg/l jsou rostliny méně životaschopné a ztrácejí mírně schopnost tvořit chlorofyl, což se projevuje žloutnutím.

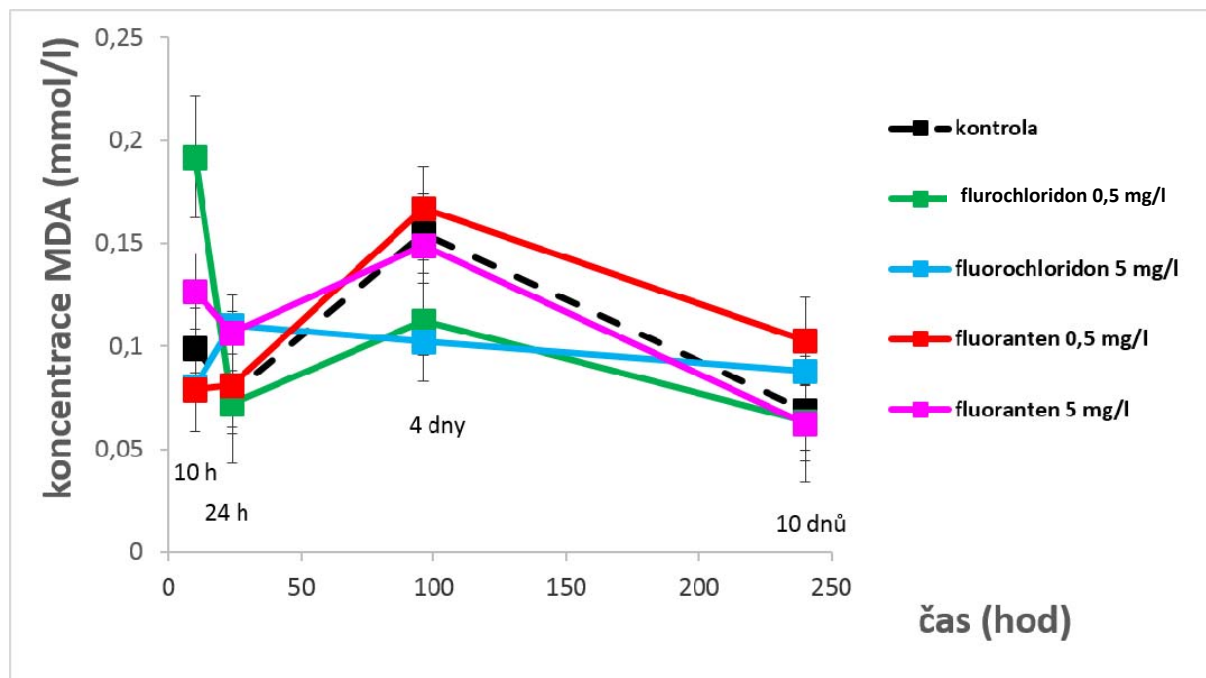


Graf 2: Závislost počtu viabilních rostlin na čase

Graf č. 2. zobrazuje procentuální zastoupení viabilních rostlin okřehku. Zřetelně lze pozorovat souvislý růst kontrolních rostlin a pokles, až úplné zastavení růstu rostlin na médiu s koncentracemi flurochloridonu 0,5 i 5 mg/l. Pozorovatelné je i nepatrné snížení růstu rostlin na médiu s koncentrací fluorantenu 5 mg/l.

5.4 Hodnocení sledování stresových markerů a jejich kvantifikace

5.4.1 Lipidová peroxidace



Graf 3: Závislost koncentrace MDA na čase (chybové úsečky zobrazují střední chybu)

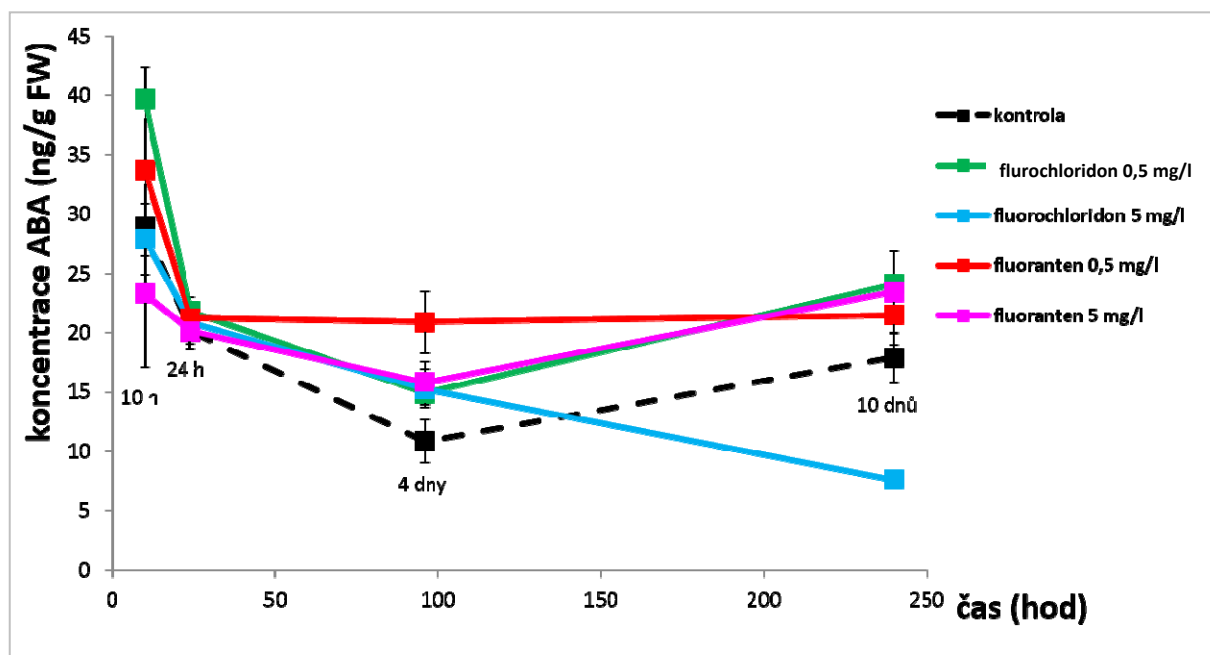
Tvorba malonyldialdehydu jakožto produktu lipidové peroxidace, vypovídá o poškození membrán v buňkách a jeho obsah se zvyšuje s výrazným zvýšením stresu u rostliny.

Kontrolní rostliny vykazují produkci malonyldialdehydu během 10 a 24 hod, avšak v rozmezí 24 hodin a 4 dnů se obsah výrazně zvýšil. Od 4. dne do 10. dne poklesl obsah malonyldialdehydu v rostlinách okřehku.

V případě koncentrace flurochloridonu 0,5 mg/l se dá konstatovat, že v rozmezí 10 a 24 hodin byla produkce malonyldialdehydu nízká a zvyšovat se začala až od 24 hodin do 4. dne. Od 4. dne do 10. dne byl pak opět zaznamenán pokles jako u kontrolních rostlin a v případě flurochloridonu 5 mg/l se produkce malonyldialdehydu snižovala již po 24 hodin, jelikož rostliny vykazovaly mortalitu a neschopnost tvorby chlorofylu.

V případě koncentrace fluorantenu 0,5 mg/l byl zaznamenán nejvyšší nárůst během 24 hod a 4. dne. Od 4. dne do 10. dne opět obsah malonyldialdehydu klesal jako u ostatních variant. Rostliny rostoucí na médiu s fluorantem 5 mg/l se chovají obdobně.

5.4.2 Radioimunoanalýza kvantifikace kyseliny abscisové



Graf 4: Závislost koncentrace ABA na čase (chybové úsečky zobrazují střední chybu)

Obsah kyseliny abscisové byl zjišťován pomocí radioimunoanalýzy, jejíž obsah upozorňuje na míru stresu a vyvolává v rostlině stresovou odpověď.

Kontrolní rostliny tvoří kyselinu abscisovou podle své aktuální potřeby a podle okolních stresorů, které se vyskytují téměř vždy. Vyšší hodnoty obsahu ABA v rostlinách okřehku byly detekovány na začátku experimentu. Výrazný pokles byl zaznamenán ve 24. hodině experimentu, do 4. dne a naopak výrazný vzestup od 4. dne do 10. dne experimentu. Statisticky průkazné rozdíly ve zvýšení obsahu ABA po působení FLU a FLT byly detekovány 4. den kultivace. Po 10 dnech kultivace rostlin okřehku na flurochloridonu 0,5 mg/l je obsah ABA po celou dobu vyšší než u kontrolních rostlin, což značí přítomnost karotenoidů v buňkách i když obsahují jejich snížené množství, je ABA stále schopna se z nich syntetizovat a upozorňovat rostlinu na působící stres. Opět je zaznamenán nejvyšší pokles od 24 hodin do 4. dne a nejvyšší nárůst od 4. dne do 10. dne. U koncentrace flurochloridonu 5 mg/l je pokles ABA značný. K tomuto poklesu začalo docházet po 24 hodinách kultivace a množství ABA stále výrazně klesalo. V případě koncentrace fluorantenu a jeho působení na rostliny se při kultivaci na médiu s koncentrací 0,5 mg/l rostliny projevovaly po celou dobu trvání experimentu od 24 hodin do 10. dne stejně a obsah ABA byl přítomen stále ve stejném

množství. Při kultivaci na mediu s koncentrací fluorantenu 5 mg/l byl zaznamenán pokles od 24 hodin do 4. dne a vzestup od 4. dne do 10. dne.

6 DISKUZE

Veškerá perzistentní xenobiotika mají na rostliny významný vliv z hlediska ovlivnění jejich růstu a produkce. Významně se to projevuje u vodních rostlin. Citlivou rostlinou je okřehek menší, často používaný v testech fytotoxicity. (MKANDAWIRE a DUDEL 2007).

Ve své bakalářské práci jsem studovala účinek flurochloridonu a fluorantenu ve dvou koncentracích (0,5 a 5 mg/l) na růst, vitalitu a markery stresu (ABA) a poškození (MDA). Co se týká morfologického i fyziologického hodnocení rostlin okřehku, existuje více studií zaměřených na zkoumání vlivu těžkých kovů. LAHIVE et al. (2011) ve své práci poukazuje na využití rostlin z čeledi *Lemnaceae*, jakožto rostlin potřebných pro testování toxicity pesticidů a jiných chemických látek, zvláště pak zkoumal toxicitu zinku a těžkých kovů na vybrané druhy rostlin z čeledi *Lemnaceae* i jiné rostlinné druhy. RAZINGER et al. (2008) ve své práci přiblížil toxicitu kadmia na rostliny okřehku, kde pozoroval jeho výraznou bioakumulaci a postupné snižování počtu rostlin při zvýšení koncentrace kadmia. V mém experimentu bylo možné sledovat souvislý růst kontrolních rostlin a pokles až úplné zastavení růstu rostlin na kultivačním médiu s přidáním flurochloridonu o koncentraci 0,5 a 5 mg/l.

V experimentu mojí bakalářské práce byly použity právě toxické látky, které jsou uvolňovány do životního prostředí činností člověka. Flurochloridon je používán jako aktivní složka přípravků na ochranu rostlin (součást herbicidů). SUEDEL et al. (1993) konstatoval, že v ČR je potvrzen nejvíce se vyskytujícím perzistentním xenobiotikem fluoranten a též má výrazný vliv na morfologické i fyziologické vlastnosti rostlin, zvláště pak vodních. FAIRCHILD et al. (1997) porovnával relativní citlivost řasy *Selenastrum capricornutum* a *Lemna minor* vůči šestnácti různým herbicidům. Bylo zjištěno, že *Lemna minor* je citlivější k herbicidům ze skupiny herbicidů na bázi sulfonylmočoviny, kam řadíme metsulfuron a chlorsulfuron. Dle jeho studie je nutné sledovat obsah těchto látek v herbicidech a zajistit jejich přísun do rostliny v únosné míře.

Ve své bakalářské práci jsem sledovala i produkci malonyldialdehydu u stresovaných rostlin okřehku, což značí míru poškození membrán v buňce. Ukázalo se, že rostliny rostoucí na médiu s přidavkem flurochloridonu 0,5 mg/l, fluorantenu 0,5 mg/l i 5 mg/l produkovaly nejvíce MDA v rozmezí 24 hodin až 4 dnů a poté se jeho produkce snižovala, to znamená, že rostliny byly nejvíce stresovány právě v tomto

časovém rozmezí experimentu. V případě koncentrace fluorantenu 5 mg/l se produkce MDA snižovala od 24 hodin po celou dobu experimentu. Lze usoudit, že fluoranten rostliny okřehku nestresuje tolik jako flurochloridon, v případě koncentrace fluorantenu 5 mg/l jsou rostliny stresovány nejméně.

RAZINGERA et al. (2008) svojí studií zjistil i to, že při zvýšeném obsahu kadmia dochází ke zvýšení peroxidace lipidů a tím k produkci MDA a k oslabení celkové antioxidační obrany.

RADICA et al. (2010) studoval účinek hliníku a zinku na rostliny okřehku a to ve smyslu zjistit, jaká je antioxidační odpověď v rámci obou zatížení těmito kovy. Dále pak měřil obsah nárůstu superoxiddismutáz a peroxidáz značících proces lipidové peroxidace. Výsledky jeho studie poukazují na indukci oxidačního stresu v případě působení hliníku a zinku na regulaci antioxidační obrany okřehku. Byla také prokázána vyšší toxicita zinku, než hliníku.

Studiem obsahu mědi a kadmia a jeho působení na okřehek se zabýval HOUA et al. (2007), kdy zkoumal změny obsahu rozpustných proteinů, fotosyntetických pigmentů a aktivitu antioxidačních enzymů. Výsledky ukázaly, že vyšší koncentrace těžkých kovů (10 mg/l) může mít vliv na rozpad antioxidačního systému okřehku.

7 ZÁVĚR

Xenobiotika jsou pro veškeré rostlinné organismy cizorodé chemické látky, které nejsou vytvářeny přirozenými přírodními procesy a jsou tedy v rostlinném těle cizí. Jedná se především o produkty chemického průmyslu a jiné odpadní látky, které vznikají antropogenní činností.

Pesticidy, jejichž součástí je studovaný flurochloridon, jsou používány za účelem ochrany polních plodin a jejich lepší využitelnosti, omezují ztráty vzniklé působením škůdců a nežádoucí působení mikroorganismů.. Mezi perzistentní organické polutanty spadá studovaný fluoranten. I tato látka má schopnost negativně ovlivňovat rostlinu, kumulovat se v ní a poškozovat její pletiva, přirozené funkce a vyvolávat stresovou reakci.

Cílem práce bylo sledovat na rostlinách okřehku menšího (*Lemna minor L.*), které mají vlastnosti modelových rostlin, stresovou odezvu prostřednictvím změny růstu a viability rostlin, produkce malonyldialdehydu a změn endogenních hladin kyseliny abscicové.

Z výsledků morfologického hodnocení lze konstatovat:

- kontrolní rostliny okřehku byly po celou dobu experimentu zelené, typického tvaru a bez výrazných změn pigmentace
- flurochloridon o koncentraci 0,5 mg/l i 5 mg/l má vliv na vzhled rostlin okřehku, listy byly zbarveny bíle
- koncentrace flurochloridonu 5 mg/l má na rostliny degenerativní vliv a hubí je, rostliny nejsou viabilní již po 4 dnech kultivace
- koncentrace fluorantenu 0,5 mg/l a 5 mg/l nemá na rostliny tak výrazný vliv jako flurochloridon, rostliny rostou, pouze mírně žloutnou

Z výsledků změn stresových markerů lze konstatovat:

- z měření obsahu malonyldialdehydu lze usoudit, že jeho nejvyšší produkce se výrazně zvýšila u všech variant od 24 hodin a 4 dnů experimentu
- od 4. dne do 10. dne byl pozorován pokles obsahu malonyldialdehydu
- endogenní hladina ABA se pohybovala u kontrolních rostlin, flurochloridonu 0,5 mg/l a fluorantenu 5 mg/l téměř ve stejném množství
- od 10 do 24 hodin endogenní ABA klesala u všech rostlin

- jako marker stresu vystoupila endogenní hladina ABA ve 4. dni pozorování, kdy rostliny všech stresovaných variant měly vyšší obsah ABA než kontrolní rostliny

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. ALSCHER R. G., ERTURK N., HEATH L. S. (2002): Role of superoxid dismutases (SODs) in controlling oxidative stress plants. *J. Exp. Bot.* 53 (372): 1331- 1341. ISSN 1460-2431.
2. ANDRADE, A., VIGLIOCCO, A., ALEMANO, S., ALVAREZ, D., ABDALA, G. (2009): Differential accumulation of abscisic acid and its catabolites in drought-sensitive and drought-tolerant sunflower seeds. *Seed Sci. Res.* 19: 201-211. ISSN 1475-2735.
3. ARMSTRON G. A., HEARST J. A. (1996): Carotenoids: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J* 10 (2): 228-37. ISSN 1530-6860.
4. ASENSI M. SASTRE J., PALLARDO F. V. (1999): Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. *Meth. Enzymol.* 299: 267-276. ISSN 0076-6879.
5. BARRIEU P., SIMONNEAU T. (2000): The monoclonal antibody MAC 252 does not react with the (-) enantiomer of abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 51 (343): 305-307. ISSN 1460-2431.
6. BOONYATUMANOND, R., WATTAYAKORN, G., TOGO, A., TAKADA, H. (2006): Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. *Mar. Poll. Bull.* 52: 942-956. ISSN 0025-326X.
7. BRÜGGEMANN W., BEYEL V., BRODKA M., POTH H., WEIL M., STOCKHAUS J. (1999): Antioxidants and antioxidative enzymes in wild type and transgenic *Lycopersicon* genotypes of different chilling tolerance. *Plant Sci.* 140: 145 – 154. ISSN 0168-9452.

8. COBB A. H., KIRKWOOD R. C. (2000): Herbicides and their mechanisms of action. *Sheffield Academic Press*. s. 295. ISBN 1-84127-109-8.
9. DING, W., HUDSON L. G., LIU K. J. (2005): Inorganic arsenic compounds cause oxidative damage to DNA and protein by inducing ROS and RNS generation in human keratinocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 279 (1-2): 105-112. ISSN 1573-4919.
10. DIZDAROGLU, M., JARUGA J. (2012): Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Rad. Res.* 46 (4): 382-419. ISSN 1029-2470.
11. EDGE R., TRUSCOTT T. G. (1999): Carotenoid radicals and the interaction of carotenoids with active oxygen species. *Adv. Photosynth. Resp.* 8: 223-234. ISSN 1573-5079.
12. FAIRCHILD J. F., RUESSLER D. S., HAVERLAND P. S., CARLSON A. R. (1997): Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides. *Arch. Environ. Contamin. Tox.* 32 (4): 353-357. ISSN 1432-0703.
13. FAROOQ M., WAHID A., KOBAYASHI N., FUJITA D., BASRA S. M. A. (2009): Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *J. Sustain. Agric.* 1: 153 – 188. ISSN 1540-7578.
14. FRIEDLANDER S. K. (1973): Chemical element balances and identification of air pollution sources. *Environ. Sci. Technol.* 7 (3): 235-240. ISSN 0013-936X.
15. GAO C., HU J., ZHANG Y. Z., KNAPP A. (2009): Association of polyamines in governing the chilling sensitivity of maize genotypes. *Plant Growth Regul.* 57: 31-38. ISSN 0167- 6903.

16. HOUA W., CHENB X., SONGC Q., WANGD Q., CHANGE CH. CH. (2007): Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol. Biochem.* 45 (1): 62 – 69. ISSN 0981-9428.
17. CHEESEMAN K. H., (1993): Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec. Aspects Med.* 14: 191-197. ISSN 0098-2997.
18. JANŮ P., LOVECKÁ P. (2014): Toxikologická rizika herbicidů bromoxynilu a ioxynilu. *Chem. Listy.* 108: 141–147. ISSN 1213-7103.
19. JONESA K. C., VOOGT DE P. (1999): Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environ. Poll.* 100 (1-3): 209-221. ISSN 0143-148X.
20. KELLY, B. S., ANTHOLINE W. E., GRIFFITH O. W. (2002): *Escherichia coli* gamma-glutamylcysteine synthetase - Two active site metal ions affect substrate and inhibitor binding. *J. Biol. Chem.* 277 (1): 50-58. ISSN 1083-351X.
21. KUČEROVÁ P., MACKOVÁ M., MACEK T. (1999): Perspektivy fytořemediace při odstraňování organických polutantů a xenobiotik z životního prostředí. *Chem. Listy.* 26: 19–26. ISSN 1213-7103.
22. LAHIVE E., HALLORAN J. O., JANSEN M. A. K. (2011): Differential sensitivity of four *Lemnaceae* species to zinc sulphate. *Environ. Exp. Bot.* 71 (1): 25–33. ISSN 0098-8472.
23. LES H. D., J. CRAWFORD D., LANDOLT E., GABEL J. D., KIMBALL T. R. (2002): Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family. *Sys. Bot.* 27 (2): 221–240. ISSN 1548-2324.
24. LEVIN S. A. (1998): Ecosystems and the biosphere as complex adaptive systems. *Ecosystems* 1 (5): 431-436. ISSN 1432-9840.

25. LIU, C. Q., ZHANG, G., LI, X. D., LI J., PENG, X. D., QI, S. H. (2005): Sedimentary record of polycyclic aromatic hydrocarbons in a sediment core from the Pearl River Estuary, South China. *Mar. Poll. Bull.* 51: 912 – 921. ISSN 0025-326X.
26. MEISTER, A. (1988): Glutathione metabolism and its selective modification. *J. of Biol. Chem.* 263 (33): 17205-17208. ISSN 1083-351X.
27. MIGUEL, A. H., KIRCHSTETTER, T. W., HARLEY, R., HERING, S. V. (1998): On-road emissions of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons and black carbon from gasoline and diesel vehicles. *Environ. Sci. Technol.* 32: 450 – 455. ISSN 1520-5851.
28. MKANDAWIRE, M., DUDEL, E. G. (2007): Are *Lemna* spp. effective phytoremediation agents?. *Biorem. Biodiv. Bioavail.* 1: 56-71. ISSN 1749-0596.
29. NAMBARA, E., MARION-POLL, A. (2005): Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 165–185. ISSN 1040-2519.
30. PERÉZ – VENDRELL A. M., HERNANDEZ J. M., LAURADO L., SCHIERLE J., BRUFAU J. (2001): Influence of source and ratio of xanthophyll pigments on broiler chicken pigmentation and performance. *Poult. Sci.* 80 (3): 320- 326. ISSN 0032-5791.
31. PITERKOVÁ J., TOMÁNKOVÁ K., LUHOVÁ L., PETŘIVALSKÝ M., PEČ P. (2005): Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem. Listy* 99: 455 –466. ISSN 1213-7103.
32. PODLEŠÁKOVÁ K., TARKOWSKÁ D., PĚNČÍK A., OKLEŠŤKOVÁ J., TUREČKOVÁ V., FLOKOVÁ K., TARKOWSKI P. (2012): Nové trendy v analýze fytohormonů. *Chem. Listy.* 106: 373 – 379. ISSN 1213-7103.

33. QUARRIE, S.A., WHITFORD, P.N., APPLEFORD, N.E.J., WANG, T.L., COOK, S.K., HENSON, L.E., LOVEYS, B.R. (1988): A monoclonal antibody to (s)-abscisic acid: its characterization and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* 183, 330-339. ISSN 0032-0935.
34. RADIĆA S., BABIĆA M., ŠKOBIĆB D., ROJEC V., PEVALEK-KOZLINAA B. (2010): Ecotoxicological effects of aluminum and zinc on growth and antioxidants in *Lemna minor* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (3): 336–342. ISSN 0147-6513.
35. RAZINGERA J., DERMASTIAB M., KOCEC J. D., ZRIMECA A. (2008): Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environ. Poll.* 153 (3): 687–694. ISSN 0143-148X.
36. SCANDALIOS J. G. (2008): Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv. Genet.* 28: 1–41. ISSN 0065-2660.
37. SHALATA A., MITTOVA V., VOLOKITA M., GUY M., TAL M. (2001): Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiol. Plant.* 112: 487 – 494. ISSN 0031-9317.
38. SHINOZAKI K., SHINOZAKI – YAMAGUCHI (2007): Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58 (2): 221-227. ISSN 1460-2431.
39. SIES, H. (1999): Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad. Biol. Med.* 27 (9-10): 916-921. ISSN 0891-5849.
40. SIMONICH S. L., HITES R. A. (1995): Organic Pollutant Accumulation in Vegetation. *Environ. Sci. Technol.* 29 (12): 2905-2914. ISSN 1520-5851.

41. SUEDEL B. C., RODGERS J. H., CLIFFORD, P. A. (1993): Bioavailability of fluoranthene in freshwater sediment toxicity tests. *Environ. Toxic. Chem.* 12:155 -165. ISSN 1552-8618.
42. TAVERNE, Y., BOGERS J. C., DUNCKER J. D., MERKUS D. (2013): Reactive oxygen species and the cardiovascular system. Oxidative medicine and cellular longevity. *Med. Cell. Longevity*. 2013: 1-15. ISSN 1942-0994.
43. VÁCHA R., ČECHMÁKOVA J., HAVELKOVA M., HORVATHOVÁ V., SKÁLA J. (2008): Possibilities of some methods for risk assessment of arsenic load in soils. *Chem. Listy*. 102: 279-287. ISSN 1213-7103.
44. VITOUSEK P. M., MOONEY H. A., LUBCHENCO J., MELILLO J. M. (1997): Human domination of earth's ecosystems. *Science*. 277 (5325): 494-499. ISSN 0036-8075.
45. VLČEK V., POHANKA M. (2011): Environmentální aspekty užití organofosforových a karbamátových pesticidů schválených k užití v České republice. *Chem. Listy*. 105: 908-912. ISSN 1213-7103.
46. VRANOVÁ E., INZÉ D., VAN BREUSEGEM F. (2002): Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53 (372): 1227 – 1236. ISSN 1460-2431.
47. WANG W. (1991): Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Poll.* 59 (3-4): 1-46. ISSN 0049-6979.
48. WEBBER V., DUTRA S. V., SPINELLI F. R., MARCON A. R., CARNIELI G. J., VANDERLINDE R (2014): Effect of glutathione addition in sparkling wine. *Food Chem.* 159: 391-398. ISSN 0308-8146.
49. WELLBURN A. R. (1994): The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307 – 313. ISSN 0176-1617.

50. WEN, S. H., ZHANG T., TAN T. W. (2005): Optimization of the amino acid composition in glutathione fermentation. *Process Biochem.* 40 (11): 3474-3479. ISSN 0032-9592.
51. WU, G. Y. (2004): Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134 (3): 489-492. ISSN: 0022-3166.
52. XU, L. B., PORTER N. A. (2014): Reactivities and products of free radical oxidation of cholestadienols. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (14): 5443-5450. ISSN 1520-5126.
53. YOUNG A. J., LOWE M. G. (2001): Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385 (1): 20–27. ISSN 1096-0384.
54. ZEEVART, J. A. D. (1980): Changes in the levels of abscisic acid and its metabolites in excised leaf blades of *Xanthium strumarium* during and after water stress. *Plant Physiol.* 66: 672-678. ISSN 1532-2548.
55. ZHOU, C., GREENBERG M. M. (2014): DNA damage by histone radicals in nucleosome core particles. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (18): 6562. ISSN 1520-5126.

9 SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

<i>Obr. 1: Strukturní vzorec flurochloridonu</i>	15
<i>Obr. 2: Strukturní vzorec fluoranthenu</i>	15
<i>Obr. 3: Strukturní vzorec kyseliny abscisové</i>	21
<i>Obr. 4: Okřehek menší (Lemna minor L.)</i>	23
<i>Obr. 5: Fotodokumentace experimentu po 4 dnech kultivace znázorněna na fotografii pro jednotlivé varianty žlutými písmeny (A – kontrola, B – flurochloridon 0,5 mg/l, C – flurochloridon 5 mg/l, D – fluoranten 0,5 mg/l, E – fluoranten 5 mg/l)</i>	31
<i>Obr. 6: Morfologie okřehku menšího po 4 dnech růstu na médiu s přidáním flurochloridonu (a koncentrace 0,5 mg/l FLU; b koncentrace 5 mg/l FLU; c kontrola)</i>	32
<i>Obr. 7: Morfologie hodnocení okřehku menšího po 4 dnech růstu na médiu s přidáním fluorantenu (a koncentrace 0,5 mg/l FLT; b koncentrace 5 mg/l FLT; c kontrola)</i>	32
<i>obr. 8: Fotodokumentace experimentu po 10 dnech kultivace znázorněna na fotografii pro jednotlivé varianty žlutými písmeny (A – kontrola, B – flurochloridon 0,5 mg/l, C – flurochloridon 5 mg/l, D – fluoranten 0,5 mg/l, E – fluoranten 5 mg/l)</i>	33
<i>Obr. 9: Morfologie hodnocení okřehku menšího po 10 dnech růstu na médiu s přidáním flurochloridonu (a koncentrace 0,5 mg/l FLU; b koncentrace 5 mg/l FLU; c kontrola)</i>	34
<i>Obr. 10: Morfologie hodnocení okřehku menšího po 10 dnech růstu na médiu s přidáním fluorantenu (a koncentrace 0,5 mg/l FLT; b koncentrace 5 mg/l FLT; c kontrola)</i>	34
<i>Graf 1: Závislost počtu rostlin na čase</i>	35
<i>Graf 2: Závislost počtu viabilních rostlin na čase</i>	36
<i>Graf 3: Závislost koncentrace MDA na čase (chybové úsečky zobrazují střední chybu)</i>	37
<i>Graf 4: Závislost koncentrace ABA na čase (chybové úsečky zobrazují střední chybu)</i>	38

10 SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Screening koncentrací FLT a FLU</i>	<i>29</i>
---	-----------

11 SEZNAM ZKRATEK

ABA - kyselina abscisová

DIN - Deutsche Industrie Norm

EPA - Environmental Protection Act

FLT - fluoranten

FLU - flurochloridon

FW - fresh weight

GCS - cystein syntetáza

GSH - redukovaná forma glutationu

GSSG - oxidovaná forma glutationu

HCB - hexachlorbenzen

HRAC - Herbicide Resistance Action Comittee

ISO - International Organization for Standardization

MDA - malonyldialdehyd

NADPH - nikotinamidadenindinukleotidfosfát redukovaný

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development

PAU - polycyklické aromatické uhlovodíky

PCB - polychlorované bifenyly

PDS - pythoen desaturáza

RIA - radioimunoanalýza

TBA - kyselina thiobarbiturová

TCA - kyselina trichloroctová