

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**VLIV VYBRANÝCH HERBICIDŮ NA EXPRESI
UGT A AKTIVITU ANTIOXIDAČNÍCH ENZYMŮ
HUŠENÍČKU ROLNÍHO**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Samanta Rysová

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce paní doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za její odbornou pomoc v laboratoři, za rady a připomínky při psaní mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat paní RNDr. Radce Podlipné, Ph.D. za pomoc s experimentální částí mé práce v laboratoři rostlinných biotechnologií Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Samanta Rysová

Školitel: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv vybraných herbicidů na expresi UGT a aktivitu antioxidantních enzymů huseníčku rolního

Herbicide se hojně využívají k regulaci plevelů v zemědělství. Přestože je jejich použití esenciální pro zajištění dostatečné produkce zemědělských plodin, dochází ke snížení jejich účinku kvůli vzniku herbicidní rezistence. Je proto důležité objasnit mechanismy vzniku herbicidní rezistence, aby byly herbicide používány efektivně a mohly být případně vyvinuty nové látky. Zároveň působí herbicide na rostlinu jako abiotický stresový faktor a dochází tak k ovlivnění antioxidantního aparátu rostlinných buněk. Hlavním cílem této práce bylo zjistit vliv vybraných herbicidů – tribenuron-methylu (TBM), pinoxadenu (PNX) a sulcotrionu (SLC), na expresi vybraných UGT, které by mohly hrát roli ve vzniku herbicidní rezistence a dále prozkoumat vliv TBM na aktivitu vybraných antioxidantních enzymů – askorbátperoxidasy (APX), katalasy (CAT) a superoxidodismutasy (SOD). Jako modelová rostlina byl použit huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), experiment byl prováděn na buněčných suspenzích a hydroponických kulturách. U vzorků vystavených působení PNX byl pomocí qPCR zaznamenán signifikantní nárůst exprese u více vybraných UGT (UGT74E2, UGT73C6 a UGT84A2). U TBM a SLC nebyly změny v expresi signifikantní. Enzymatická aktivita antioxidantních enzymů byla měřena spektrofotometricky a výsledky ukázaly, že některé koncentrace TBM způsobují u CAT a SOD nárůst aktivity, naopak u APX snížení aktivity. Nicméně nebyla pozorována závislost mezi koncentrací herbicidu a aktivitou enzymů.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Samanta Rysová

Supervisor: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Consultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effect of selected herbicides on UGTs expression and activity of antioxidant enzymes in *Arabidopsis thaliana*

Herbicides are widely used to control weeds in agriculture. Although their use is essential to ensure crop production, their effect occurs to be reduced due to the development of herbicide resistance. Therefore it is important to clarify the mechanism of herbicide resistance, so that herbicides can be used effectively and new substances can be developed if necessary. At the same time, herbicides acts as an abiotic stress factor on the plant, thus affecting the antioxidant apparatus of plant cells. The aim of this work was to investigate the effect of selected herbicides – tribenuron-methyl (TBM), pinoxaden (PNX) and sulcotrione (SLC), on the expression of selected UGTs that could play a role in herbicide resistance. Secondary, we want to find out the effect of TBM on the activity of selected antioxidant enzymes – ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). *Arabidopsis thaliana* was used as a model plant and the experiment was performed on cell suspensions and hydroponic cultures. In samples exposed to PNX, qPCR showed a significant increase in expression in multiple selected UGTs (UGT74E2, UGT73C6 and UGT84A2). Expression changes were not significant for TBM and SLC. The enzymatic activity of antioxidant enzymes was measured spectrophotometrically and the results showed that some concentrations of TBM cause an increase in activity in CAT and SOD, and a decrease in activity in APX. However, no relationship was observed between herbicide concentration and the level of enzyme activity.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část	9
2.1	Huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	9
2.2	Herbicidy.....	11
2.2.1	Úvod	11
2.2.2	Příjem a transport herbicidu v rostlině	11
2.2.3	Mechanismus účinku herbicidů.....	12
2.2.4	Herbicidní rezistence	17
2.3	Biotransformace xenobiotik a role UGT	19
2.3.1	I. fáze biotransformace.....	19
2.3.2	II. fáze biotransformace.....	20
2.3.3	III. fáze biotransformace.....	22
2.4	Antioxidační ochrana rostlin před stresovými faktory	23
2.4.1	Úvod	23
2.4.2	Reaktivní formy kyslíku a jejich vznik v buňce.....	23
2.4.3	Antioxidační ochrana.....	25
3	Cíle práce	28
4	Experimentální část.....	29
4.1	Příprava biologického materiálu	29
4.1.1	Příprava buněčných suspenzí <i>A. thaliana</i>	29
4.1.2	Příprava hydroponických kultur <i>A. thaliana</i>	30
4.2	Stanovení exprese vybraných genů pro UGT	31
4.2.1	Chemická reagentia.....	31
4.2.2	Přístrojové vybavení	31
4.2.3	Zpracování rostlinných vzorků.....	31
4.2.4	Izolace RNA a změření koncentrace	32
4.2.5	Ošetření vzorků DNAsou	32
4.2.6	Reverzní transkripce	33
4.2.7	Real-Time PCR = kvantitativní PCR v reálném čase	34
4.3	Stanovení aktivity antioxidačních enzymů	35
4.3.1	Chemická reagentia.....	35
4.3.2	Přístrojové vybavení	36

4.3.3	Test viability	36
4.3.4	Zpracování vzorků pro stanovení aktivity – extrakce proteinů	37
4.3.5	Stanovení celkových proteinů – Bradfordova metoda	38
4.3.6	Stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů	39
5	Výsledky	41
5.1	Ovlivnění vybraných genů pro UGT herbicidy	41
5.1.1	Vyhodnocení qPCR po ovlivnění <i>A. thaliana</i> tribenuron-methylem	41
5.1.2	Vyhodnocení qPCR po ovlivnění <i>A. thaliana</i> sulcotrionem	42
5.1.3	Vyhodnocení qPCR po ovlivnění <i>A. thaliana</i> pinoxadenem	43
5.2	Vizuální zhodnocení rostlin po expozici vybraným herbicidům	44
5.3	Ovlivnění antioxidačního aparátu <i>A. thaliana</i> tribenuron-methylem	47
5.3.1	Stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů u buněčných suspenzí	47
5.3.2	Stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů u rostlin	50
6	Diskuse	53
7	Závěr	55
8	Seznam použitých zkratk	56
9	Zdroje	58
9.1	Literární zdroje	58
9.2	Elektronické zdroje	64

1 Úvod

V dnešním vyspělém světě, kdy je potřeba efektivně získat co největší úrodu, je použití herbicidů esenciální. U velkého množství plevelných rostlin ale dochází k nárůstu rezistence vůči herbicidům. Vědci po celém světě zkoumají mechanismy vzniku rezistence ve snaze zabránit jejímu rozšíření. Jedním z mechanismů, kterým by mohla vznikat rezistence vůči herbicidům je rodina enzymů UGT (UDP-glykosyltransferas). Tyto enzymy jsou důležité pro metabolismus rostlin a zajišťují glykosylaci různých substrátů, což vede například k aktivaci rostlinných hormonů anebo naopak i k detoxikaci xenobiotik včetně herbicidů. Pro rostlinu jsou tyto enzymy nezbytné pro její ochranu před nebezpečnými cizími látkami a vlivem herbicidů může být jejich aktivita zvýšena, což je ale pro zemědělství nežádoucí, neboť rezistentní plevele mohou značně snížit výnos pěstovaných plodin.

V návaznosti na tyto skutečnosti byl založen experiment, který má objasnit funkci UGT v toleranci vybraných herbicidů – tribenuron-methylu (TBM), pinoxadenu (PNX) a sulcotrionu (SLC). Modelovým organismem použitým pro tento experiment je huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) obsahující 107 genů pro UGT, z nichž 44 je aktivních proti xenobiotikům (Brazier-Hicks *et al* 2018).

Herbicide působí na rostlinu jako stresový faktor, což může mít za následek také ovlivnění celé řady procesů a enzymů včetně antioxidantního aparátu rostliny, kterým se rostlina brání proti zvýšenému vzniku reaktivních forem kyslíku, a proto se tato práce dále zabývá také ovlivněním aktivity vybraných antioxidantních enzymů rostliny vlivem působení herbicidu TBM.

2 Teoretická část

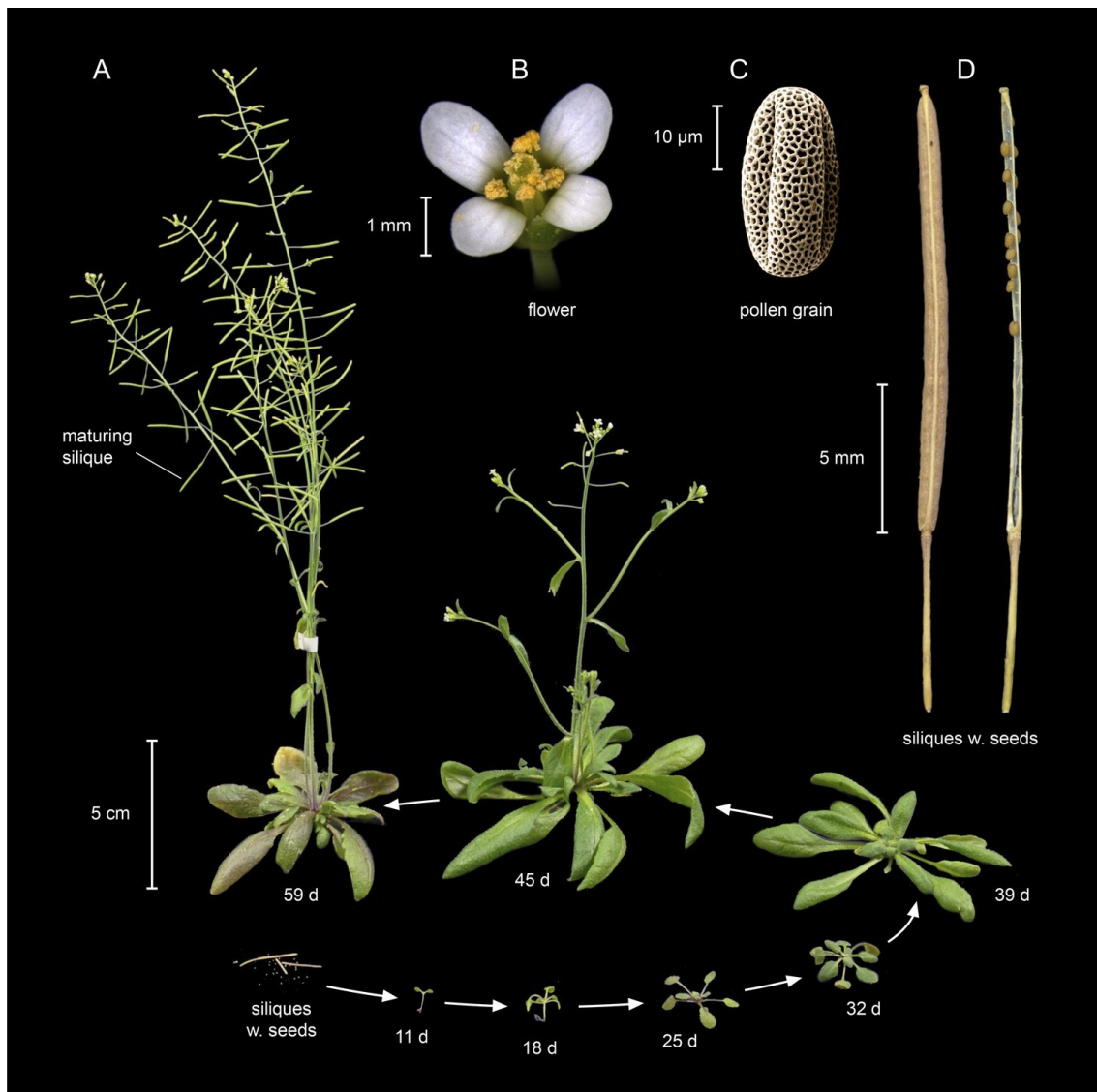
2.1 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) je první rostlinou, u které byl v roce 2000 sekvenován celý genom. Podle výsledků projektu skupiny The Arabidopsis Genome Initiative obsahuje rostlina 25 498 genů, které kódují 11 601 typů proteinů, což je podobný rozsah jako u jiných mnohobuněčných eukaryot, jakými je např. octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*) či háďátko obecné (*Caenorhabditis elegans*) (The Arabidopsis Genome Initiative 2000).

Rostlina má malý genom o velikosti 125 Mbp (mega base pairs), který je organizován do 5 chromosomů, a tak se široce využívá ve vývojové a molekulární biologii jako modelový organismus (web 1). Další výhodou je krátký vývojový cyklus a nenáročnost rostliny na pěstování. Během jednoho roku lze získat několik generací. Rostlina kvete po 4-5 týdnech od vyklíčení, je samosprašná a semena jsou zralá po 8-10 týdnech. Lze ji pěstovat na umělých půdách na velice malém prostoru (Krämer 2015, Rivero *et al* 2014, The Arabidopsis Genome Initiative 2000).

Jedná se o jednoleté nebo ozimé drobné byliny s přízemní listovou růžicí. Listy přízemní růžice dosahují délky 1-3 cm a jsou obkopynaté, celokrajné nebo oddáleně tupě zubaté. Lodyha obvykle dosahuje 5-30 cm, případné lodyžní lístky jsou přisedlé a úzce eliptické. Přízemní listy a dolní třetina lodyhy je pokryta trichomy. Květenstvím je hrozen složený z drobných čtyřčetných pravidelných květů, ty jsou tvořeny až 2 mm dlouhými zelenožlutými kališními lístky a 2-4 mm dlouhými bílými korunními lístky, které jsou na bázi nažloutlé. Každý květ obsahuje šest tyčinek, dvě krátké a čtyři dlouhé, uprostřed se nachází pestík vzniklý srůstem dvou plodolistů. Plodem jsou rovné nebo mírně zahnuté šešule dosahující délky 8-18 mm, které šikmo odstávají od lodyhy. Zralá šešule obsahuje 30-60 semen (Štěpánek 1992, Meyerowitz 1987).

Huseníček rolní je rozšířen po celé Evropě mimo nejsevernějších oblastí, dále ve Střední Asii, při pobřeží Malé Asie, v severní a východní Africe, sekundárně se vyskytuje i v Severní Americe, jižní Africe, Číně, Japonsku nebo Austrálii. Roste jako plevelná rostlina na poli, při okraji cest, na kamenitých a skalnatých svazích (Štěpánek 1992).



Obrázek 1 znázorňuje životní cyklus *A. thaliana* (A) od semene až k dospělé rostlině, která je schopna reprodukce – se znázorněním dnů, kdy se rostlina v dané fázi nachází. Dále je znázorněn květ (B), pylové zrno (C) a plod (D). Převzato z: Krämer 2015.

2.2 Herbicidy

2.2.1 Úvod

Jako herbicidy jsou označovány chemické látky, které zpomalují nebo zcela zastavují růst a vývoj rostlin. Využívají se především v zemědělství k zajištění co nejhojnější úrody díky regulaci plevelů (Jursík a kol. 2010a).

Herbicidy mohou působit různými mechanismy, v naprosté většině případů blokuje některý z důležitých enzymů pro správný vývoj rostliny. Jedná se o enzymy katalyzující biosyntézu základních organických sloučenin – aminokyselin, lipidů, karotenoidů a dalších látek. V důsledku nedostatku těchto látek pak chybí stavební jednotky a jsou zasaženy i další biochemické dráhy v buňkách (Jursík a kol. 2010a).

Jelikož dochází k nárůstu herbicidní rezistence, je na místě snaha o vývoj herbicidů s novým mechanismem účinku, který bude dostatečně splňovat následující kritéria. Ideální herbicid:

- je vysoce selektivní k rostlině, nepoškozuje pěstované plodiny a neohrožuje další organismy včetně člověka,
- má rychlý a efektivní účinek již při použití nízkých dávek,
- snadno a rychle se rozkládá v životním prostředí,
- není příliš finančně náročný na produkci (Reade & Cobb 2002).

2.2.2 Příjem a transport herbicidu v rostlině

Pro správný účinek herbicidu je důležité, aby byl ve správném čase dopraven na správné místo v dostatečném množství. Jednotlivé druhy herbicidů mají různé fyzikálně-chemické vlastnosti a jejich transport v rostlině je tak ovlivňován faktory prostředí, které se mohou měnit i během vývoje rostliny. Nutno vzít v potaz také fakt, že jakmile dojde ke vstupu molekul herbicidu do rostlinných buněk, dochází k jejich postupnému odbourávání a ke snížení koncentrace herbicidu (Hamouzová a kol. 2021).

Herbicid se může do rostliny dostat dvěma způsoby. Prvním způsobem je příjem kořenovým systémem po koncentračním spádu, takto přijímané herbicidy se aplikují v době klíčení a vzcházení plevelů. Herbicid je následně poměrně rychle transportován xylémem k vegetujícím pletivům. Absorpci zde ztěžuje Casparyho proužek tvořený pásem ligninu a suberinu, který je voskovitou bariérou a ztěžuje tak průnik herbicidů do rostliny. Je jakousi obdobou kutikuly, která se nachází na listech rostliny (Hamouzová a kol. 2021, Colquhoun 2011, Naseer *et al* 2012).

Druhý způsob spočívá v aplikaci herbicidu post-emergentně, tedy na již vzrostlé rostliny a dochází tak k příjmu herbicidu listy. Transport látky z listů do celé rostliny je pomalejší, neboť musí látka projít přes kutikulu a rostlinné buňky do floému, odkud se pak dostane na cílové místo, účinek se tak projeví později (2-3 týdny). Pro zlepšení absorpce se přidávají surfaktanty, které snižují povrchové napětí kapek a ty tak lépe pokryjí celou plochu listu, což umožní lepší vstřebávání (Hamouzová a kol. 2021, Colquhoun 2011).

Může být využita i kombinace těchto dvou způsobů, aby došlo k účinku na již vzrostlé plevelné rostliny, ale i semena klíčící v půdě. V tomto případě musí být použit herbicid, který může být přijímán kořeny i listy nebo lze využít kombinace dvou herbicidů, a to zejména v případě, pokud plevelné rostliny vzchází etapovitě a je nutné působit na všechna vývojová stádia rostliny (Hamouzová a kol. 2021).

Při absorpci a transportu herbicidu v rostlině záleží na vlastnostech herbicidu, zejména na jeho rozpustnosti. Optimální herbicid by měl být rozpustný jak ve vodě, tak i v lipidech. Rozpustnost ve vodě je důležitá pro jeho transport přes apoplast a cytoplasmu buněk, a aby pronikl herbicid skrz kutikulu a fosfolipidové membrány, musí být rozpustný i v lipidech (Hall 1999).

2.2.3 Mechanismus účinku herbicidů

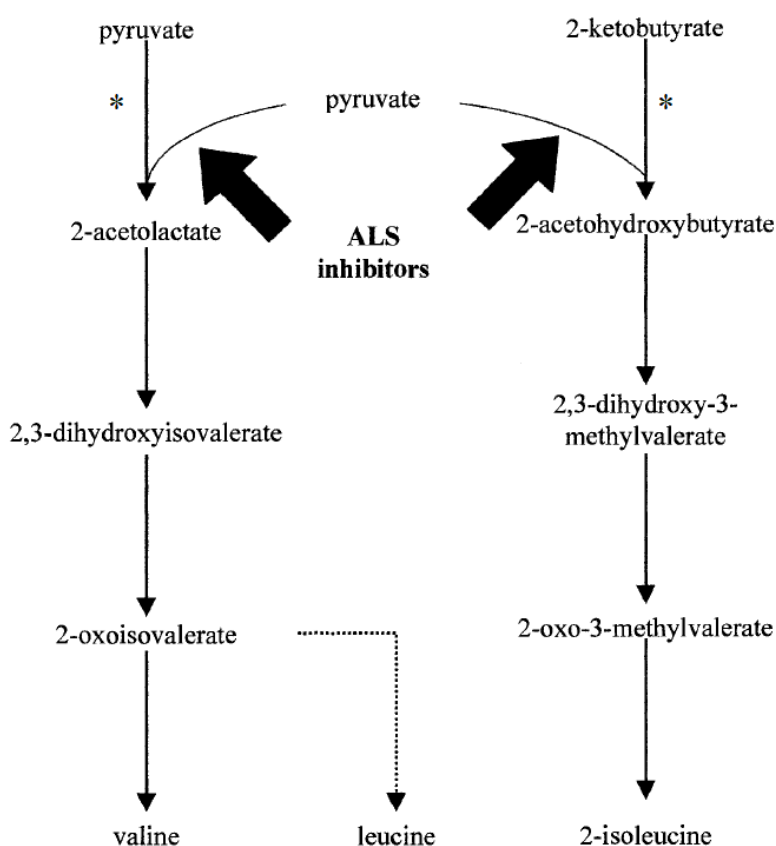
Jak již bylo zmíněno, každá skupina herbicidů inhibuje některý z klíčových enzymů pro zajištění fyziologických pochodů v rostlinných buňkách. Skupina s názvem Herbicide Resistance Action Committee (HRAC) vytvořila klasifikační systém herbicidů právě dle cílového místa – proteinu, který daný herbicid inhibuje příp. ovlivňuje jiným způsobem. Dále jsou pak jednotlivé skupiny rozděleny dle chemické struktury (Beffa *et al* 2019).

Tato práce se bude zabývat zejména inhibitory acetolaktát syntasy (ALS), inhibitory acetyl-CoA-karboxylasy (ACC) a inhibitory *p*-hydroxyfenylpyruvát dioxygenasy (HPPD), neboť v experimentu byly použity tři herbicidy, z nichž každý spadá do jedné z výše uvedených skupin. Existují ale i další mechanismy účinku herbicidů, mezi další nejpoužívanější skupiny mimo výše zmíněných patří například inhibitory stavby mikrotubulů (pendimethalin), syntetické auxiny (kyselina dichlorfenoxycetová), inhibitory fotosystému II (chlorotoluron, terbuthylazin) a mnohé další (Beffa *et al* 2019, Hamouzová a kol. 2021).

V současné době obsahuje HRAC klasifikace 26 skupin herbicidů včetně poslední skupiny, kde jsou zařazeny herbicidy s neznámým mechanismem účinku (web 2).

2.2.3.1 Inhibitory acetolaktát syntasy

Herbicidy tohoto typu inhibují klíčový enzym pro biosyntézu rozvětvených aminokyselin (valin, leucin, isoleucin) nacházející se v chloroplastech rostlin. ALS je enzymem katalyzujícím první reakci v biosyntetické cestě rozvětvených aminokyselin. Při syntéze valinu a leucinu katalyzuje ALS kondenzaci dvou molekul pyruvátu za vzniku 2-acetolaktátu, při syntéze isoleucinu katalyzuje kondenzaci jedné molekuly pyruvátu s 2-ketobutyrátem za vzniku 2-acetohydroxybutyrátu (Reade & Cobb 2002).

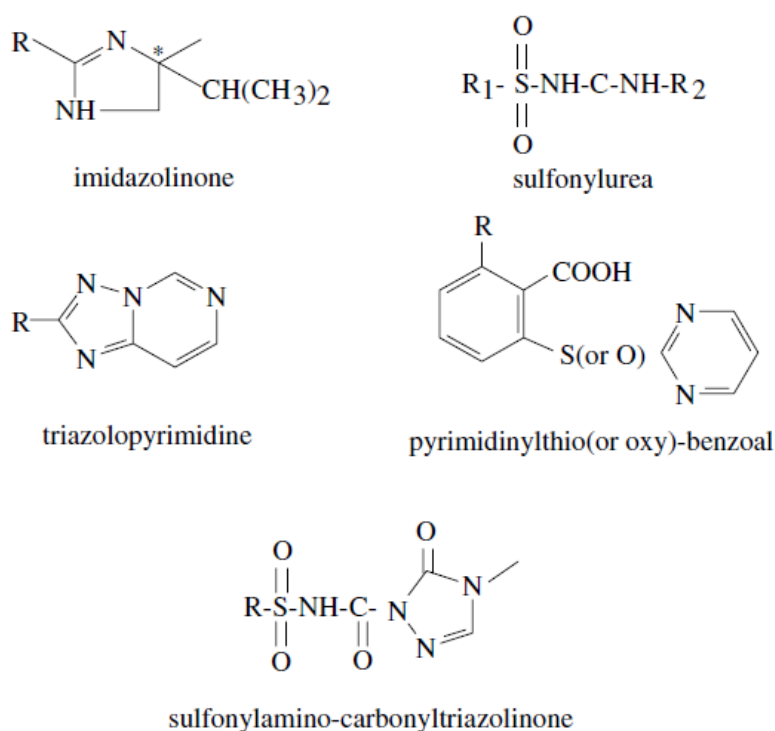


Obrázek 2 Schéma biosyntézy rozvětvených aminokyselin. Převzato z: Reade & Cobb 2002. * znázorňuje místo působení ALS

Pokud tedy dojde vlivem herbicidu k zablokování ALS, netvoří se zmíněné aminokyseliny a následně ani proteiny. Sekundárně pak dochází k inhibici syntézy DNA (deoxyribonukleové kyseliny) a zástavě buněčného dělení, dále je omezen proud asimilátů floémem a v konečném výsledku dochází k zastavení růstu rostlin (Jursík a kol. 2010b).

Herbicidy s tímto mechanismem účinku jsou nejpoužívanější skupinou, předpokládá se, že jsou pro savce, ptáky, ryby atp. poměrně bezpečné, neboť u živočichů se nenachází ALS. Avšak časté a zejména opakované používání těchto herbicidů způsobilo u mnoha plevelných populací rezistenci (Whitcomb 1999).

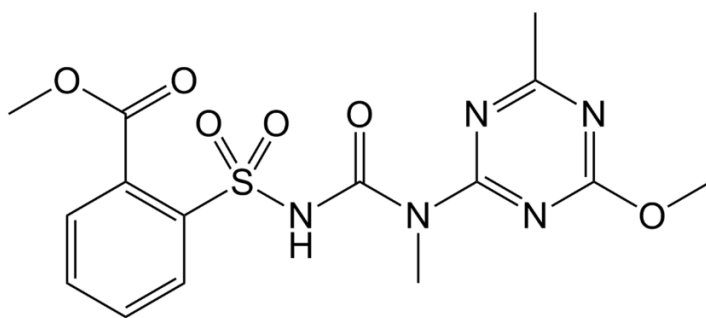
Inhibitory ALS lze rozdělit dle struktury na pět skupin – sulfonylmočoviny, imidazolinony, triazolopyrimidiny, pyrimidinylthio(oxy)benzoáty a sulfonylamino-karbonyltriazolinony (Zhou *et al* 2007).



Obrázek 3 Chemická struktura pěti skupin ALS inhibitorů. Převzato z: Zhou *et al* 2007.
* označuje centrum chiraloty

2.2.3.1.1 Tribenuron-methyl

Tento herbicid spadá do nejrozsáhlejší skupiny ALS inhibitorů – sulfonylmočoviny, které nachází největší uplatnění zejména při regulaci plevelů v porostech obilnin. Používají se zejména časně post-emergentně, ale mohou být použity i pre-emergentně (Jursík a kol. 2010b).



Obrázek 4 Struktura tribenuron-methylu: methyl 2-[[[4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)-methylkarbamoyl] sulfamoyl]benzoát (web 3)

2.2.3.2 Inhibitory acetyl-CoA-karboxylasy

Jedná se o klíčový enzym při biosyntéze lipidů – esterů glycerolu s vyššími mastnými kyselinami. Syntéza mastných kyselin probíhá opakovaným navazováním dvouuhlíkatých jednotek pocházejících z acetyl-CoA, jehož zdrojem je zejména Calvinův cyklus v chloroplastech a glykolýza při syntéze mastných kyselin v cytoplazmě. Acetyl-CoA-karboxylasa je hlavním enzymem v prvním kroku syntézy mastných kyselin – transkarboxylace acetyl-CoA na malonyl-CoA. Pokud je v rostlině nedostatek mastných kyselin, tak nedochází k esterifikaci acylů mastných kyselin glycerolem a nevznikají lipidy, které jsou nezbytné pro regulaci enzymatické aktivity, tvorbu buněčných membrán a kutikuly a jsou důležitou zásobárnou energie buněk (Jursík a kol. 2010c).

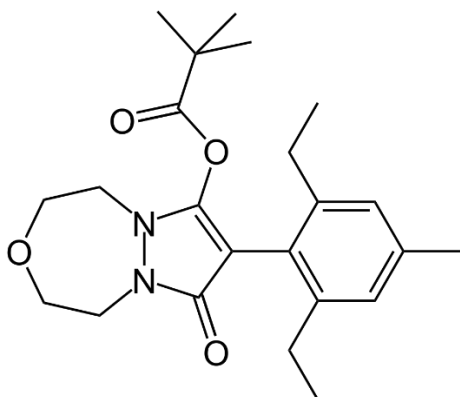
Většina herbicidů ze skupiny inhibitorů ACC inhibuje tento enzym zejména v chloroplastech, jediný pinoxaden má duální efekt a inhibuje ACC také v cytoplazmě rostlinných buněk. Sekundárně je inhibováno také buněčné dělení a syntéza DNA (Jursík a kol. 2010c).

Inhibitory ACC lze rozdělit dle struktury do tří skupin – aryloxy-fenoxypropionáty, cyklohexandiony a fenylpyrazoliny. Jedná se zejména o post-emergentně používané herbicidy, které se aplikují na listy mladých rostlin (Jursík a kol. 2010c).

2.2.3.2.1 Pinoxaden

Jediný zástupce nejnovější skupiny fenylpyrazolinů, jak již bylo zmíněno, také jako jediný působí duálně a inhibuje ACC nejen v chloroplastech, ale také v cytoplazmě (Jursík a kol. 2010c). Používá se zejména pro kontrolu vytrvalých trávovitých plevelů v porostech ozimých obilovin. První projevy inhibice ACC se objevují již v prvním týdnu po použití – zejména chlorosa, následující nekrosou rychle rostoucích meristematičtých

pletiv. Obvykle jsou vyžadovány 2-3 týdny pro kontrolu citlivého porostu (Pintar *et al* 2021).



Obrázek 5 Struktura pinoxadenu: [8-(2,6-diethyl-4-methylfenyl)-7-oxo-1,2,4,5-tetrahydropyrazolo[1,2-d][1,4,5]oxadiazepin-9-yl]-2,2-dimethylpropanoát (web 4)

2.2.3.3 Inhibitory *p*-hydroxyfenylpyruvát dioxygenasy

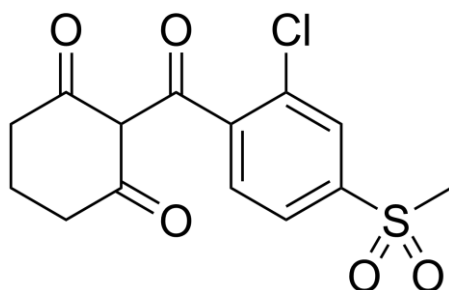
Herbicidey spadající do této skupiny inhibují enzym, který je důležitý pro biosyntézu karotenoidů. Karotenoidy jsou esenciální pro život rostlin, neboť chrání chlorofyl před destruktivním účinkem singletového kyslíku, který může v rostlinách vznikat při nadbytku slunečního záření. Funkce karotenoidů spočívá v přeměně nadbytečné světelné energie na teplo. HPPD katalyzuje přeměnu tyrosinu na plastochinon a také syntézu α -tokoferolu, který má rovněž jako antioxidant ochrannou funkci. Plastochinon je důležitým kofaktorem fytoendesaturasy, která zajišťuje tvorbu lykopenu, ale zároveň je také nezbytný pro přenos protonů a elektronů na thylakoidní membráně chloroplastů při světelné fázi fotosyntézy. Následně dochází k zastavení procesu fotosyntézy, poškození chlorofylu a postupně i celých chloroplastů, což se projeví albifikací listů, rostlina následně umírá (Jugulam a Shyam 2019, Jursík a kol. 2010d).

Dle struktury je můžeme rozdělit na isoxazoly (isoxaflutol) a triketony (sulcotrion, mesotrion). Tyto herbicidey je nutné aplikovat ve velmi raných fázích vývoje rostliny, někdy ještě před jejich vzejitím, neboť starší rostliny již obsahují větší množství karotenoidů, a tak inhibice jejich syntézy nemá takový efekt. Dle typu herbicideu mohou být přijímány kořeny anebo listy (Jursík a kol. 2010d).

Mj. existují i další typy herbicideů inhibující jiné enzymy v biosyntéze karotenoidů – inhibitory fytoendesaturasy, inhibitory diterpenů.

2.2.3.3.1 Sulcotrion

Jedná se o aromatický keton odvozený od cyklohexan-1,3-dionu. Tento herbicid je používán převážně post-emergentně k regulaci širokého spektra plevelů zejména v kukuřici, ale použít se dá i u jiných druhů obilovin (Chaabane *et al* 2008).



Obrázek 6 Struktura sulcotrionu: 2-(2-chloro-4-methylsulfonylbenzoyl) cyklohexan-1,3-dion (web 5)

2.2.4 Herbicidní rezistence

Herbicidní rezistence je jev, kdy dochází k adaptační evoluci plevelné populace na intenzivní selekční tlak způsobený herbicidy. Opakovaným působením herbicidu postupně dochází k vyselektování nejodolnějších jedinců v populaci, tedy těch nejméně citlivých k danému herbicidu (Hamouzová a kol. 2021).

Existují dva základní mechanismy rezistence, a to rezistence v místě účinku („*target-site resistance*“) a rezistence mimo místo účinku („*nontarget-site resistance*“).

2.2.4.1 „*Target-site resistance*“

Prvním mechanismem je rezistence v místě účinku, kdy dochází nejčastěji ke změně struktury vazebného místa na cílovém enzymu. Stačí pouze, aby došlo k mutaci jediného nukleotidu v genu, který kóduje daný protein, na který se herbicid váže, a změna jediné aminokyseliny způsobí, že herbicid ztratí schopnost se na dané místo navázat, přestože tato změna neovlivní fyziologické fungování enzymu v rostlině. V tomto případě bývá postižena celá skupina herbicidů působící na daném místě. Pro vznik herbicidní rezistence je tedy klíčová znalost mechanismu účinku herbicidů. Může také dojít ke zvýšené expresi cílového místa, a tak nebude obvyklé množství herbicidu stačit na to, aby byla všechna vazebná místa obsazena. (Beffa *et al* 2019, Gaines *et al* 2020, Hamouzová a kol. 2021).

2.2.4.2 „Nontarget-site resistance“

Druhým mechanismem je rezistence mimo místo účinku, kdy dochází ke snížení množství aktivní formy herbicidu, který se dostane na místo účinku, a to na úrovni příjmu, transportu a metabolizace herbicidu v rostlině. Při aplikaci herbicidu na listy, kde může dojít ke změnám v povrchových strukturách ale také v transportním systému, může dojít ke vzniku herbicidní rezistence z důvodu sníženého příjmu látky a její translokace, což v případě kořenového příjmu nebývá moc časté. Rostliny také obsahují enzymové systémy, které katalyzují metabolickou přeměnu xenobiotik včetně herbicidů obvykle na polárnější sloučeniny, jejichž fytotoxicita je mnohem menší případně žádná. Nejdůležitějším systémem v rostlinách je komplex cytochromu P450 katalyzující řadu oxidačních přeměn molekuly herbicidu. Dále pak glutathion S-transferasa, která katalyzuje nukleofilní reakci redukováného glutathionu (GSH) s elektrofilními substituenty na molekule herbicidu, a v neposlední řadě UGT, o nichž bude pojednáno v kapitole 2.3.2.1 (Jugulam a Shyam 2019, Beffa *et al* 2019, Hamouzová a kol. 2021).

Oba zmíněné mechanismy vzniku rezistence se vyvíjí v dané populaci současně. V závislosti na druhu plevelné rostliny, typu a aplikaci herbicidu převládá jeden z nich. Pokud se aplikují opakovaně herbicidy se stejným mechanismem účinku zvyšuje se počet jedinců rezistentních vůči danému herbicidu. Jedinci, kteří jsou rezistentní, se morfologicky nijak neliší od jedinců citlivých k danému herbicidu, a proto není možné je od sebe odlišit jen na základě morfologických znaků. Byly však vyvinuty metody, jak toto rozlišení provést. Jednou z nejjednodušších a zároveň rychlých a spolehlivých metod je tzv. RISQ (Resistance In-Season Quick) test, při kterém se brzy na jaře, příp. na podzim odebere rostlina ve velmi brzkém stádiu vývoje (alespoň 100 jedinců) a umístí se do Petriho misky s agarovým médiem obsahujícím herbicid o známé koncentraci. Po dvou týdnech v kontrolovaných podmínkách lze dle symptomů snadno rozlišit mezi citlivými a rezistentními rostlinami a vzhledem k testování na začátku sezóny, lze poté i vybrat správný herbicid pro použití na daný porost (Hamouzová a kol. 2021, Gaines *et al* 2020).

2.3 Biotransformace xenobiotik a role UGT

Xenobiotika jsou cizorodé látky, které vstupují do organismu, aniž by zde měly fyziologické uplatnění. Jedná se o látky přírodního či syntetického původu jakými jsou např. polutanty či agrochemikálie (Skálová a kol. 2017).

Jelikož xenobiotika představují pro organismus potenciální nebezpečí, vyvinuly si rostliny detoxikační enzymatický aparát. Některé enzymy jsou podobné těm, co se nachází u živočichů, je ale i několik enzymů, které jsou specifické právě pro rostliny. Metabolismus xenobiotik obecně zahrnuje jejich biotransformaci a transport z organismu a můžeme ho rozdělit do tří fází. I. a II. fáze zahrnuje biotransformační enzymy, většina z nich se účastní také metabolizace endogenních sloučenin. Jako III. fáze bývá označován transport xenobiotika z organismu pomocí transportních proteinů (Bártíková a kol. 2015, Skálová a kol. 2017).

2.3.1 I. fáze biotransformace

I. fáze biotransformace zahrnuje oxidační, redukční a hydrolytické reakce. Dochází k vlození nebo odhalení hydrofilní skupiny ve struktuře xenobiotika, což zjednoduší vyloučení látky z organismu (Bártíková a kol. 2015, Skálová a kol. 2017).

Cytochromy P450 (CYP) jsou nejpodstatnější skupinou enzymů I. fáze biotransformace. Jedná se o rozsáhlou nadrodinu hemoproteinů, které se vyskytují ve vysokém množství isoform spadájící do různých rodin a podrodin dle podobnosti v aminokyselinové sekvenci. Množství isoform v rostlinách je signifikantně větší než u jiných taxonů. Geny kódující CYP tvoří přibližně 1% genů kódujících proteiny. CYP spadající do jedné rodiny (případně podrodiny u větších skupin) katalyzují následné kroky v určité biosyntetické cestě nebo podobné reakce různých substrátů. CYP katalyzují rozštěpení O–O vazby v molekule kyslíku a vazbu atomu kyslíku na inaktivní substrát. Přestože CYP katalyzují obvykle monooxygenaci substrátů (zahrnující hydroxylaci, epoxidaci, dealkylaci, dekarboxylaci a izomeraci), tak v určitých případech se mohou chovat jako peroxidasy či reduktasy (Bártíková a kol. 2015, Nelson a Werck-Reichhart 2011).

Dále do této skupiny řadíme **peroxidasy**. Jedná se o hemoproteiny katalyzující redoxní reakci mezi peroxidem vodíku a různými substráty. V rostlinách se peroxidasy účastní celé řady procesů jako je regulace růstu nebo stresová reakce a jsou také považovány za biomarkery stresu. Na základě rozdílů v primární struktuře jsou rozděleny

do tří tříd, ve vyšších rostlinách se nachází pouze peroxidasy z třídy I (askorbát peroxidasy) a III (sekreční peroxidasy) (Jouili *et al* 2011).

Alkoholdehydrogenasy (ADH) a aldehyddehydrogenasy (ALDH) katalyzují oxidaci endogenních i exogenních alkoholů a aldehydů na příslušné karboxylové kyseliny. Zejména ALDH jsou důležitými enzymy při metabolizaci xenobiotik. Nadrodina ALDH zahrnuje enzymy zapojené v NAD⁺/NADP⁺-dependentních konverzích velkého množství xenobiotik. Některé ALDH vychytávají a odstraňují reaktivní endogenní aldehydy, které vznikají například při peroxidaci lipidů. ALDH dle nedávných studií také představují skupinu genů, která se účastní adaptace vyšších rostlin na stres (Bártíková a kol. 2015).

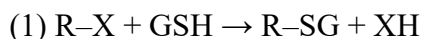
Méně časté než oxidační jsou pak redukční přeměny xenobiotika za účasti **reduktas/dehydrogenas**, avšak u ketonů, aldehydů, chinonů, nitrosloúčenin, N-oxidů a S-oxidů mohou představovat hlavní metabolickou cestu (Bártíková a kol. 2015).

Hydrolasy jako např. karboxylesterasy či epoxidhydrolasy, které se účastní zejména metabolismu endogenních sloučenin, se mohou podílet i na hydrolýze xenobiotik – esterů, amidů a epoxidů (Bártíková a kol. 2015).

2.3.2 II. fáze biotransformace

Ve II. fázi biotransformace dochází ke konjugaci s endogenní hydrofilní molekulou, což opět vede ke zvýšení hydrofility dané látky a ke snadnějšímu vyloučení z rostliny. Ke konjugaci může dojít díky přidání hydrofilní skupiny do molekuly xenobiotika v I. fázi biotransformace (Bártíková a kol. 2015, Skálová a kol. 2017).

Glutathion-S-transferasy (GST) jsou cytosolické multifunkční proteiny, které hrají roli v detoxikaci xenobiotik, při ochraně před oxidativním poškozením a v neposlední řadě se účastní endogenního metabolismu. GST zprostředkovává konjugaci redukované formy glutathionu (GSH) s hydrofobním, elektrofilním a obvykle cytotoxickým substrátem za vzniku netoxického peptidového derivátu. Toho je docíleno buď substituční (1) nebo adiční reakcí (2).



GST jsou aktivní ve formě dimerů, které se mohou skládat buď ze dvou stejných (homodimery) nebo rozdílných podjednotek (heterodimery), každá podjednotka je kódována nezávislým genem, což přispívá k rozmanitosti GST. V rostlinách se účastní převážně odstranění herbicidů, organických polutantů a přírodních toxinů z organismu.

Některé GST se mohou chovat jako glutathion-dependentní peroxidasy či isomerasy. V posledních studiích se ukazuje, že jsou GST zapojeny také do stresem indukovaných procesů (Frova 2003).

Sulfotransferasy (ST) katalyzují přenos sulfátové skupiny z 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu na hydroxylovou skupinu nacházející se na substrátu, kterým může být opět eobiotikum či xenobiotikum, jedná se zejména o glukosinoláty, brassinosteroidy, flavonoidy aj. Sulfatace hraje také důležitou roli při adaptaci organismu na stres a při růstu a vývoji rostlin. V *A. thaliana* se nachází 21 genů, které kódují ST (Bártíková a kol. 2015).

Methyltransferasy (MT) využívají S-adenosyl-L-methionin (SAM) jako zdroj methylové skupiny. MT jsou zodpovědné za modifikaci širokého spektra substrátů zahrnující signální molekuly, pigmenty, prostetické skupiny, kofaktory, buněčné membrány a buněčné stěny. Methyl je navázán zejména na atomy O, N, C nebo S. Methylace ovlivňuje bioaktivitu a reaktivitu dané molekuly, přestože jsou MT nedílnou součástí mnoha endogenních metabolických cest, mají velký význam i pro detoxikaci xenobiotik v rostlinách (Bártíková a kol. 2015).

V neposlední řadě spadají mezi enzymy II. fáze biotransformace **UDP-glykosyltransferasy (UGT)**. Jelikož ovlivnění exprese UGT-genů vlivem stresu způsobeného herbicidy je jedním z hlavních cílů této práce, budu se jimi zabývat poněkud podrobněji.

2.3.2.1 UDP-glykosyltransferasy

UGT jsou enzymy, které katalyzují přenos sacharidových skupin na aglykony, jimiž mohou být rostlinné hormony, sekundární metabolity rostlin, ale i xenobiotika včetně herbicidů. Při biosyntéze přírodních rostlinných produktů je glykosylace klíčovým způsobem pro zlepšení jejich rozpustnosti, stability, transportu a schopnosti uložení v rostlinných buňkách. Přenos jednoduchých sacharidů na lipofilní molekulu změní její chemické vlastnosti, ovlivní její bioaktivitu a umožní prostup membránovými transportními systémy, což je důležité také pro odstranění nežádoucích látek z rostlinného organismu (Bowles *et al* 2006, Li *et al* 2001).

2.3.2.1.1 Rozdělení

Nadrodina UGT nacházející se v *A. thaliana* je velice široká a rozmanitá. Bylo zjištěno, že geny pro UGT jsou rozptýleny po celém genomu, ale vykazují shlukování

do skupin po dvou až sedmi genech. Geny v rámci jedné skupiny vykazují vysokou podobnost sekvence aminokyselin. Dle podobnosti sekvence aminokyselin jsou rozděleny do 14 skupin, ve kterých se dohromady nachází 107 UGT. Systém nomenklatury vychází právě z podobnosti aminokyselinové sekvence. Na prvním místě je označení nadrodiny UGT, za touto zkratkou se nachází rodina vyjádřena arabskou číslicí, poté velkým písmenem podrodina a poslední arabská číslice označuje individuální gen pro daný enzym (Ross *et al* 2001).

2.3.2.1.2 Struktura UGT

UGT se skládají ze 435-507 aminokyselin. Každý enzym obsahuje N- a C-konec, N-konec je část peptidu obsahující aminoskupinu $-NH_2$, tato část enzymu je více variabilní, neboť zde dochází k rozpoznání a navázání různých aglykonů. C-konec je část peptidu končící karboxylovou skupinou $-COOH$ a v tomto případě i méně proměnlivá část enzymu, která váže UDP-glukosu. Na tomto konci se nachází tzv. konsenzuální sekvence zahrnující 42 aminokyselin, která definuje UGT. Úroveň podobnosti v této sekvenci aminokyselin mezi jednotlivými UGT se pohybuje mezi 30-95% (Mackenzie *et al* 1997, Ross *et al* 2001).

V *in vitro* studiích bylo zjištěno, že jedna UGT může rozpoznat a glykosylovat více substrátů různého původu a zároveň více UGT může rozpoznat a glykosylovat stejný substrát (Bowles *et al* 2006).

2.3.2.1.3 Mechanismus účinku enzymu

Jak již bylo zmíněno, UGT slouží k přenosu cukrů aktivovaných UDP (uridindifosfát) na menší molekuly aglykonů. V rostlinách je aktivovaným cukrem nejčastěji UDP-glukosa, ale najdeme zde i další cukry jako je např. UDP-xylosa, UDP-rhamnosa či UDP-galaktosa. Konjugací cukru a aglykonu vzniká široké rozmezí produktů zahrnující estery glukózy, fenolické glykosidy, kyanogenní glykosidy a glukosinoláty. Některé aglykony, které mají více míst pro glykosylaci (např. flavonoly), mohou navázat více než jednu cukernou jednotku (Bowles *et al* 2006, Ross *et al* 2001).

2.3.3 III. fáze biotransformace

Většina xenobiotik, metabolitů a konjugátů nemohou prostoupit lipidovou membránou pasivním transportem, proto existují specifické transportní proteiny. Transportéry mají obvykle širokou substrátovou specifitu a mohou tak přenést na druhou

stranu membrány strukturálně odlišné sloučeniny. Mimo xenobiotik, slouží také k přenosu endogenních látek jako jsou např. auxiny nebo flavonoidy. Mezi dvě nejrozsáhlejší skupiny transportních proteinů řadíme tzv. ABC-transportéry (ATP-binding cassette) a MATE-transportéry (multi-drug and toxins extrusion). *A. thaliana* obsahuje více než sto ABC-transportérů, které se účastní metabolismu xenobiotik, biosyntézy chlorofylu a růstu a vývoje rostliny. MATE-transportéry jsou zapojeny do odstranění kovů z organismu a metabolismu fenolických látek. Transportní proteiny také hrají důležitou roli v herbicidní rezistenci (Conte a Lloyd, 2011, Bártíková a kol. 2015).

2.4 Antioxidační ochrana rostlin před stresovými faktory

2.4.1 Úvod

V průběhu života rostliny na ni působí celé spektrum abiotických stresových faktorů, které mohou ovlivnit její životní funkce, poškodit jednotlivé části rostlin a vést až k úhynu rostliny. Takovými stresovými faktory může být například chlad, teplo, nedostatek živin, ale také působení chemických látek včetně herbicidů. Odpovědí rostliny na působení stresových faktorů je tvorba velkého množství reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species), dojde k narušení rovnováhy a začne převládat tvorba ROS nad jejich odbouráváním. Přestože ROS vznikají i při obecném metabolismu rostlin (fotosyntéza, respirace) a fungují v rostlinách jako signální molekuly pro expresi genů, tak při nadměrné tvorbě dochází k jejich akumulaci a k poškození rostlinných buněk. Odbourávání ROS v buňkách zajišťují antioxidační neenzymové a enzymové obranné systémy. Mezi neenzymové obranné mechanismy patří antioxidanty, a to zejména askorbát, α -tokoferol, karotenoidy a redukovaný glutathion. Univerzálnější ochranu pak poskytují specializované enzymové systémy, konkrétně katalasa, peroxidasy (askorbátperoxidasa, glutathionperoxidasa aj.) a superoxidodismutasa (Piterková a kol. 2005, Racek a Holeček 1999).

2.4.2 Reaktivní formy kyslíku a jejich vznik v buňce

Jedná se o volné radikály, samostatně existující atomy či molekuly, které mají ve svém obalu nepárový elektron, který je příčinou jejich vysoké reaktivity. Takové molekuly se snaží chybějící elektron doplnit a zajistit si tak stabilní konfiguraci. Mohou reagovat nejen s jinými volnými radikály, ale také se stabilními molekulami,

čímž dochází ke vzniku dalšího radikálu a následně k řetězové reakci. Tímto způsobem může dojít k jejich navázání na lipidy v buněčné membráně, na proteiny včetně enzymů a nukleové kyseliny, což má za následek poškození buňky až celých tkání a orgánů (Racek a Holeček 1999).

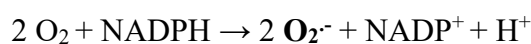
Tabulka 1 Přehled reaktivních forem kyslíku v rostlinách (Piterková a kol. 2005).

Singletový kyslík	Superoxidový anion-radikál	Hydroxylový radikál	Hydroxylový ion	Perhydroxylový radikál	Peroxid vodíku
$^1\text{O}_2$	$\text{O}_2^{\cdot-}$	$\text{OH}\cdot$	OH^-	$\text{O}_2\text{H}\cdot$	H_2O_2

Místem vzniku ROS v rostlinné buňce jsou chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy a dále také endoplazmatické retikulum a plazmatická membrána. Zdrojem reaktivních forem kyslíku mohou být v rostlinné buňce neenzymové a enzymové reakce (Piterková a kol. 2005).

Molekulární kyslík ($^3\text{O}_2$) je stabilní molekula a aby došlo k jeho aktivaci a vzniku reaktivní formy, tedy singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$), musí být dodána dostatečná energie, aby došlo k obrácení paralelního spinu nepárového elektronu. Neefektivním přenosem energie, kdy rostlina absorbuje více světla, než dokáže využít pro fotosyntézu, dojde ke vzniku tripletového chlorofylu, který reaguje s tripletovým kyslíkem a vzniká tak vysoce reaktivní singletový kyslík, který může snadno reagovat s biomolekulami (Tripathy & Oelmüller 2012).

Reaktivní formy kyslíku ale mohou vznikat také při reakcích katalyzovaných enzymy. Nejznámější z těchto enzymů je xanthinoxidasa nacházející se v peroxisomech, právě při katalytické oxidaci xanthinu na kyselinu močovou dochází ke vzniku superoxidového radikálu ($\text{O}_2^{\cdot-}$), který se následně redukuje na peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$) cestou Haberovy-Weissovy a Fentonovy reakce. Xanthinoxidasová reakce se také využívá při *in vitro* studiích právě pro produkci kyslíkových radikálů (Piterková a kol. 2005). Dalším zdrojem ROS v rostlinách je NADPH-oxidasa (nikotinamidadeninukleotidfosfát-oxidasa) nacházející se v plazmatické membráně rostlinných buněk. Tento enzym katalyzuje redukci molekulárního kyslíku ($^3\text{O}_2$) za vzniku superoxidového radikálu ($^1\text{O}_2^{\cdot-}$), který následně dismutuje na peroxid vodíku (H_2O_2) (Piterková a kol. 2005, Racek a Holeček 1999).



Dalšími enzymy, které se podílejí na tvorbě volných radikálů v rostlinném organismu jsou glykolát oxidasa, lipoxygenasa, oxalát oxidasa a mnoho dalších (Piterková a kol. 2005).

2.4.3 Antioxidační ochrana

Jelikož reaktivní formy kyslíku vznikají v určitém množství i při normálním metabolismu rostliny, musí mít vyvinuté obranné systémy, kterými dokážou tyto reaktivní formy odbourat a nedojde tak k oxidačnímu poškození organismu. První skupinou jsou neenzymové antioxidanty, druhou skupinou pak antioxidační enzymy (Piterková a kol. 2005). Tyto mechanismy jsou v případě běžných podmínek exprimovány konstitutivně, aby se vyrovnaly s množstvím ROS, které vzniká při obecném metabolismu rostliny. Nicméně působením biotického a abiotického stresu na organismus může dojít k indukci těchto mechanismů, aby bylo zajištěno co nejnižší množství ROS a nedocházelo tak k oxidačnímu poškození organismu (García-Limones *et al* 2002).

2.4.3.1 Neenzymové antioxidanty

Jedním z neenzymových antioxidantů je kyselina askorbová neboli vitamin C, který je zároveň kofaktorem mnoha enzymů. Vyskytuje se ve většině rostlinných buněk a účastní se řady biologických reakcí včetně fotosyntézy a podílí se na růstu a vývoji buněčné stěny (Waśkiewicz *et al* 2014). Ve své redukované formě má schopnost redukovat velké množství volných radikálů (superoxidový a hydroxylový radikál, singletový kyslík, peroxid vodíku) a snížit tak riziko poškození způsobené oxidativním stresem (Piterková a kol. 2005). Neméně důležitými neenzymovými antioxidanty jsou tokoferoly, které jsou produkovány pouze fotosyntetizujícími organismy. V listech rostlin se nachází zejména α -tokoferol, semena jsou naopak bohatá na γ -tokoferol. β - a δ -tokoferoly nejsou ve většině rostlinných druhů příliš zastoupeny. Jejich antioxidační funkce spočívá v inhibici peroxidace lipidových membrán a odstranění singletového kyslíku (Waśkiewicz *et al* 2014). Dalším zástupcem neenzymových antioxidantů je redukovaný glutathion, který odstraňuje lipoxylové radikály a chrání před peroxidací lipidů, má schopnost odstraňovat peroxid vodíku, ale i další ROS. Zároveň má schopnost regenerovat askorbát cestou askorbát-glutathionového cyklu. Poslední skupinou jsou karotenoidy, zejména β -karoten, který účinně a rychle odstraní singletový kyslík z chloroplastů. Za uvolnění tepla se pak excitovaný karotenoid snadno vrátí zpět

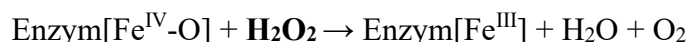
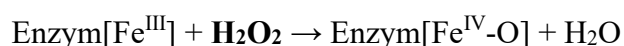
do základního stavu. β -karoten se také podílí na inhibici peroxidace lipidových membrán (Piterková a kol. 2005).

2.4.3.2 Vybrané antioxidační enzymy

Nejvšestrannější ochranu před oxidačním poškozením poskytují speciální antioxidační enzymy zabraňující iniciaci řetězových oxidačních reakcí odstraněním ROS (Piterková a kol. 2005).

2.4.3.2.1 Katalasa

Katalasa (CAT, EC 1.11.1.6) je redoxní enzym vyskytující se ve všech aerobních prokaryotních i eukaryotních organismech. Nachází se zejména v peroxisomech, ale její aktivita byla pozorována i v chloroplastech, cytosolu a mitochondriích. Strukturně jde o hemoprotein s tetramerní strukturou, která se skládá ze čtyř monomerních podjednotek o velikosti 220-350 kDa a právě hemová prostetická skupina je klíčová pro enzymatickou aktivitu katalasy (Sharma & Ahmad 2014). Vyskytuje se ve třech isoformách: CAT1 – monofunkční katalasy, CAT2 – katalasové peroxidasy a CAT3 nehemové katalasy. Většina rostlinných druhů obsahuje zejména CAT1, která odstraňuje peroxid vodíku vzniklý zejména v listech při fotorespiraci. CAT2 působí v cévních svazcích a CAT3 se nachází v semenech a mladých semenáčcích (Piterková a kol. 2015, Sharma & Ahmad 2014). Její katalasová aktivita spočívá v rozkladu dvou molekul peroxidu vodíku na molekulární kyslík a dvě molekuly vody ve dvoukrokové reakci popsané níže dle Nandi *et al* (2019).

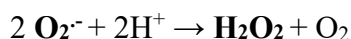


Pokud je ale koncentrace H_2O_2 nižší než 10^{-6} mol/l, tak dochází k uplatnění peroxidasové aktivity katalasy a k oxidaci substrátů jakými je např. methanol, ethanol, fenoly, formaldehyd aj. (Sharma & Ahmad 2014).

2.4.3.2.2 Superoxiddismutasa

Superoxiddismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) je metaloenzym nacházející se v aerobních a fakultativně aerobních organismech. Existují 3 isoformy SOD, které jsou klasifikovány dle obsaženého kovového kofaktoru – Fe, Mn a Cu-Zn (Piterková a kol. 2005). Fe-SOD se nachází v chloroplastech, Mn-SOD v mitochondriích a peroxisomech a Cu-Zn-SOD v chloroplastech, cytosolu a pravděpodobně i v extracelulárním prostoru.

Je stěžejní, aby SOD byly přítomné ve všech kompartmentech, kde dochází ke vzniku superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$), neboť nedochází k jeho přestupu přes fosfolipidové membrány a nemohl by být jinak z daných kompartmentů odstraněn (Alscher *et al* 2002). SOD katalyzuje disproportionaci superoxidového radikálu na méně agresivní peroxid vodíku a molekulární kyslík následovně:



Přeměna superoxidového radikálu je tak urychlena oproti samovolné dismutaci. (Bowler *et al* 1994, Racek a Holeček 1999). Vzniklý peroxid vodíku je dále odstraněn katalasou nebo v chloroplastech v askorbát-glutathionovém cyklu, který zbavuje buňku peroxidu vodíku zejména v místech, kde není přítomna katalasa (Piterková a kol. 2005).

2.4.3.2.3 Askorbátperoxidasa

Askorbátperoxidasa (APX, EC 1.11.1.11) je hemoprotein spadající do skupiny peroxidas, jak je již z názvu enzymu patrné. Jejím cílem je chránit rostlinné buňky před poškozením peroxidem vodíku a radikály, které by z něj mohly následně vzniknout (Asada 1992). Existuje několik isoform APX, které jsou rozděleny dle jejich lokalizace v buňce. Rozpustné isoformy se nachází v cytosolu, mitochondriích a ve stromatu chloroplastů, zatímco isoformy vázané na membrány se nachází v peroxisomech, glyoxysomech a na thylakoidech chloroplastů (Caverzan *et al* 2012). APX je prvním enzymem askorbát-glutathionového cyklu, katalyzuje reakci askorbátu s peroxidem vodíku (H_2O_2) za vzniku monodehydroaskorbátu, příp. dehydroaskorbátu a vody. Monodehydroaskorbátreduktasa (EC 1.6.5.4) nebo dehydroaskorbátreduktasa (EC 1.8.5.1) pak katalyzuje přeměnu zpět na askorbát v přítomnosti redukováného glutathionu za vzniku jeho oxidované formy. Druhý enzym tohoto cyklu – glutathionreduktasa (EC 1.6.4.2) následně obnoví redukováný glutathion za účasti NADPH (Piterková a kol. 2005).

3 Cíle práce

Cílem této práce bylo stanovit expresi vybraných genů pro UGT u *A. thaliana* po ovlivnění vybranými herbicidy a porovnat naměřené hodnoty s rostlinami, které ovlivněny nebyly.

K dosažení daného cíle bylo nutno provést tyto kroky:

- Příprava hydroponických kultur *A. thaliana*.
- Zpracování rostlinných vzorků pro izolaci RNA.
- Izolace RNA ze vzorků listů vypěstovaných rostlin ovlivněných herbicidy a kontrolních rostlin.
- Ošetření získané RNA pomocí DNAsy a převedení RNA do cDNA reverzní transkripcí.
- Analýza genové exprese vybraných genů pro UGT pomocí qPCR.
- Zpracování dat, porovnání vzorků a vyhodnocení.

Dalším cílem bylo zjistit, zda byla pod vlivem herbicidů změněna aktivita vybraných antioxidantních enzymů *A. thaliana*.

K dosažení tohoto cíle bylo nutno provést následující kroky:

- Příprava buněčných suspenzí *A. thaliana*.
- Test viability buněčných suspenzí.
- Zpracování vzorků pro stanovení aktivity antioxidantních enzymů.
- Stanovení aktivity vybraných antioxidantních enzymů pomocí spektrofotometrie.
- Zpracování dat, porovnání vzorků a vyhodnocení.

4 Experimentální část

4.1 Příprava biologického materiálu

Pro tento experiment byly použity rostliny *A. thaliana* ekotyp Columbia-0. Byly připraveny buněčné suspenze a hydroponické kultury.

4.1.1 Příprava buněčných suspenzí *A. thaliana*

Pro experiment byla nezbytná příprava buněčných suspenzních kultur *A. thaliana*. Suspenzní kultury se získávají z kalusových kultur, kdy se buňky rozptýlí ve vhodném médiu, které obsahuje potřebné živiny a stopové prvky důležité pro přežití a namnožení buněk, a dále je doplněno o rostlinné růstové hormony – syntetické auxiny. Tento proces probíhá ve tmě a za neustálého míchání, aby buňky měly neustále přístup k živinám, neboť v důsledku absence chlorofylu nemohou provádět fotosyntézu.

Tabulka 2 Složení média pro suspenzní kultury *A. thaliana*.

Zásobní roztok	Komponenty	[g/l zás. roztoku]	[ml/l média]
V4-A	KCl NaNO ₃ MgSO ₄ *7H ₂ O NaH ₂ PO ₄	7,5 6 2,5 1,25	100
V4-B	CaCl ₂ *2H ₂ O CaCl ₂ *6H ₂ O CaCl ₂	3,75 5,59 2,85	10
V4-C	ZnSO ₄ *7H ₂ O MnSO ₄ *4H ₂ O CuSO ₄ *5H ₂ O H ₃ BO ₃ KI AlCl ₃ *6H ₂ O NiCl ₂ *6H ₂ O	0,10 0,01 0,03 0,10 0,01 0,03 0,03	1
F-MS	Na ₂ EDTA FeSO ₄ *7H ₂ O	3,724 2,784	10
Vitamins-V4	thiamin hydrochlorid pyridoxin hydrochlorid kyselina nikotinová glycin	0,001 0,001 0,005 0,030	10
NAA	kyselina 1-naftyloctová	0,001	10
2,4-D	2,4-D	0,001	10
			[g/l média]
Inositol			0,1
Kasein hydrolyzát			1
Sacharosa			30
pH	5,75-5,8		

Po dostatečném namnožení buněk bylo vytvořeno 40 suspenzních kultur, aby byl zajištěn adekvátní počet vzorků a to tak, že z jedné suspenze o objemu 100 ml bylo vytvořeno 5 buněčných suspenzních kultur tj. 20 ml z původní suspenze bylo doplněno médiem do 100 ml. Bylo nezbytné pracovat v laminárním boxu v rukavicích, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků.

4.1.2 Příprava hydroponických kultur *A. thaliana*

Rostlinky *A. thaliana* byly pěstovány v hydroponických systémech Araponics, do nichž byl nalit 25% Hoaglandův živný roztok. Do insertů byl napipetován 0,7% agar, do něhož byla sázena semínka. Bylo nutné, aby byl agar hlavně zpočátku ponořen v médiu. Do každého insertu se pak vysévalo pomocí pipety cca 5 semínek a po dvou týdnech se rostliny prothávaly tak, aby zůstala v každém insertu jen jedna. Médium bylo potřeba vyměnit po dvou týdnech a pak každý týden. Rostliny byly pěstovány při krátkém dni, aby hned nekvetly, tj. 8 hodin světlo a 16 hodin tma, při 21 °C a 75% vlhkosti. Vzduchování bylo nastaveno na 15 min každé 3 hodiny.

Tabulka 3 Složení 25% Hoaglandova živného roztoku.

Zásobní roztok	Komponenty	Obsah látky v zásobním roztoku [g/l]	25% H. roztok [ml/l média]
A	1M NH ₄ H ₂ PO ₄	115,0	0,125
B	1M KNO ₃	101,1	0,75
C	1M Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	236,1	0,5
D	1M MgSO ₄ *7H ₂ O	246,5	0,25
F	citrát železitý	6,0	0,25
		[mg/l]	
E	KI H ₃ BO ₃ MnSO ₄ *4H ₂ O ZnSO ₄ *7H ₂ O Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O CuSO ₄ *5H ₂ O CoCl ₂ *6H ₂ O Na ₂ EDTA FeSO ₄ *7H ₂ O	7,50 30,00 132,00 20,00 2,50 0,25 0,25 373,00 278,00	2,5
E vit	inositol nikotinová kyselina pyridoxin hydrochlorid thiamin hydrochlorid	1000 10 10 100	2,5
pH	6,2-6,3		

4.2 Stanovení exprese vybraných genů pro UGT

4.2.1 Chemická reagentia

- Diethylpyrokarbonát (DEPC) – Sigma-Aldrich
- Dithiotreitol (DTT) – New England BioLabs
- Ethanol (99,9%) – Sigma-Aldrich
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) – Sigma-Aldrich
- Chloroform – Sigma-Aldrich
- Isopropanol – Sigma-Aldrich
- PNX – Sigma-Aldrich
- Reverzní transkriptasa (RT) – ProtoScript II – New England BioLabs
- SLC – Sigma-Aldrich
- TRIzol (TriReagent) – Molecular Research Center
- TBM – Sigma-Aldrich
- Xceed qPCR SG Mix (2x) – Institute of Applied Biotechnologies

4.2.2 Přístrojové vybavení

- Automatické pipety – Research Plus, Eppendorf
- Centrifuga – Biofuge stratus Heraeus, Thermo scientific
- Kuličkový homogenizátor – BeadBlaster 24, Benchmark Scientific
- Přístroj pro Real-Time PCR – QuantStudio6, Applied Biosystems
- PCR cyklér – MJ mini, Bio-Rad
- Spektrofotometr – Tecan SPARK
- Termomixér – Thermomixer comfort, Eppendorf
- Vortex – Vortex V-1 plus, BioSan

4.2.3 Zpracování rostlinných vzorků

Čtyři týdny staré rostliny byly stresovány třemi vybranými herbicidy – TBM, SLC a PNX o koncentraci 20 μ M. Rostliny byly sklizeny po 24 h a 48 h, před sklizením se opláchly vodou a osušily. Odvážilo se 100mg listů do mikrozkušavek a zalilo se 1 ml TRIzolu. TRIzol je směs fenolu a guanidin isothiokyanátu, která umožňuje izolaci RNA z malého množství vzorku. Takto připravené vzorky byly převezeny v termoizolačním boxu z Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Praze na farmaceutickou fakultu Univerzity Karlovy v Hradci Králové, kde se pokračovalo v experimentu. Kořínky

a zbylé části rostlin byly rychle zamrazeny v tekutém dusíku a byly uloženy do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro případné pozdější použití.

4.2.4 Izolace RNA a změření koncentrace

Při samotné izolaci RNA bylo nutno vše provádět rychle a v rukavicích, neboť všudypřítomné RNAsy by mohly RNA snadno rozložit. Vzorky v TRIzolu byly zhomogenizovány pomocí kuličkového homogenizátoru, kuličky byly přidány pomocí dávkovače do mikrozkuvek a homogenizovalo se dvakrát po 40 s rychlostí 6 m/s. Poté se vzorky nechaly 5 minut stát při laboratorní teplotě a následně se přidalo 200 μl chloroformu a protřepalo se. Opět se vzorky nechaly 2-3 minuty odstát a následně byly stočeny ve vychlazené centrifuze (15 min, 12000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Centrifugace rozdělila směs na vodní a organickou fázi, přičemž RNA se nacházela v horní vodné fázi. Tu bylo nutné opatrně přepipetovat do nové zkumavky (400 μl). Při tomto kroku bylo nutné dávat pozor, aby se špička pipety nedotýkala mezifáze, aby nedošlo ke kontaminaci vodné fáze genomovou DNA a proteiny z organické fáze, bylo tedy na místě pipetovat 2x200 μl . K přepipetované vodní fázi se následně přidalo 500 μl isopropanolu, který selektivně vysrážel RNA, vše se promíchalo a nechalo alespoň 10 minut stát při laboratorní teplotě. Vzorky byly stočeny ve vychlazené centrifuze (10 min, 12000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), poté se ihned odsál supernatant pomocí skleněné pipety, vzniklá peleta RNA se omyla 1 ml 75 % ethanolu (naředěný z absolutního ethanolu (99,9 %) vodou), promíchalo se a opět se stočilo po dobu 5 minut (7500 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Opět se odstranil supernatant, tentokrát s mnohem větší opatrností, neboť peleta hůře držela na dně a snadno by mohlo dojít k jejímu odsátí. Poté se nechala peleta usušit na vzduchu v průběhu několika minut, jakmile začala peleta zprůhledňovat, tak bylo nutné ji rozpustit v 20 μl DEPC vody (voda ošetřená diethylpyrokarbonátem).

U takto připravených vzorků byla změřena koncentrace RNA pomocí spektrofotometru. Na destičku NanoQuant Plate byly pipetovány vzorky o objemu 2 μl a vloženy do přístroje, který na základě absorbance změřil koncentraci RNA v $\text{ng}/\mu\text{l}$ a data byla exportována do MS Excel.

4.2.5 Ošetření vzorků DNAsou

Dalším krokem bylo ošetření vzorků RNA DNAsou, aby se odstranila případná kontaminace vzorků genomovou DNA.

Dle zjištěné koncentrace se vypočítalo, kolik μl vzorku obsahovalo 10 μg RNA a kolik se tedy muselo přidat vody, aby celkový objem byl 26 μl . DNAsa se naředila pufrům v poměru 1:3 a do mikrozkušavek se připravila reakční směs o celkovém objemu 30 μl , která byla složena z 26 μl naředěného vzorku obsahující 10 μg RNA a 4 μl naředěné DNAsy. Takto připravená směs se promíchala a nechala inkubovat v termomixeru 25 minut při 37 °C s třepáním 500 rpm. Poté se připipetovalo 1,5 μl 0,1M EDTA a inkubovalo se v termomixeru dalších 10 minut při 75 °C, aby došlo k inaktivaci DNAsy. Poté byly vzorky vyndány z termomixeru do ledu a ke každému vzorku se přidalo 18,5 μl DEPC vody. Koncentrace takto ošetřené RNA byla 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a byla uchovávána při -70 °C. Tímto byly vzorky připraveny na reverzní transkripci.

4.2.6 Reverzní transkripce

Aby se mohlo provést kvantitativní PCR v reálném čase, musela se nejprve z RNA získat jednořetězcová cDNA. Tento proces se nazývá reverzní transkripce, kdy za pomoci reverzní transkriptasy (RT) s využitím náhodných hexamerů dojde k syntéze DNA komplementární k RNA ve vzorcích.

Byly připraveny dvě paralelní sady vzorků, jedna na reverzní transkripci a druhá jako kontrola bez přidané RT. Do každé mikrozkušavky se napipetoval 1 μl hexamerů a 5 μl RNA o koncentraci 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Takto připravená směs se zamíchala na vortexu a vzorky se vložily do PCR cykléru a po dobu 5 minut byly zahřívány při 65 °C, poté se vyndaly a uložily do mrazícího stojánku a do jedné sady se přidalo 14 μl MasterMixu obsahující reverzní transkriptasu (RT+) a do druhé sady 14 μl MasterMixu bez reverzní transkriptasy (RT-), v druhém případě je RT nahrazena vodou.

Tabulka 4 Složení MasterMixu RT+ a RT-.

	RT+ [μl]	RT- [μl]
Reakční pufr 5x	4	4
DTT	2	2
dNTPs 5mM	4	4
RT	0,5	-
H ₂ O	3,5	4

Pozn. množství je uvedeno pro 1 vzorek, nutno vynásobit počtem vzorků + 1-2 navíc kvůli pipetovací chybě.

dNTPs – deoxyribonukleotidtrifosfáty

Směs se zamíchala na vortexu a opět vložila do PCR cykléru, nejprve docházelo k zahřívání při 25 °C po dobu 10 minut a poté při 42 °C 50 minut, v tomto kroku dochází

k syntéze cDNA. Nakonec byla teplota na 5 minut zvýšena na 80 °C, aby došlo k denaturaci RT. Po ukončení reverzní transkripce byly vzorky zředěny 80 μ l redestilované vody. 5 μ l takto připraveného vzorku odpovídá 50 ng RNA. Takto připravená cDNA byla uchovávána při -20 °C.

4.2.7 Real-Time PCR = kvantitativní PCR v reálném čase

Kvantitativní polymerasová řetězová reakce se používá k určení exprese určitého genu. Používá se speciální PCR cyklér, který umožní v průběhu reakce kontinuálně zaznamenávat množství DNA, a to díky přítomnosti fluorescenčního substrátu SYBR Green I, který se na přítomnou DNA naváže. Reakce byla provedena v 96-jamkové destičce vždy pro cílový a referenční gen. Byly připraveny MasterMixy, jejichž složení je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5 Složení MasterMixu pro qPCR.

	Do jedné jamky [μ l]
voda	4,20
2x SG mix	10,00
F-primer (5 μ M)	0,4
R-primer (5 μ M)	0,4
Smíchat MasterMix a pipetovat 15 μ l do jamky	
cDNA (ředěná 1:4)	5,00
Celkem	20,00

Pozn. Pro NTC (negativní kontrolu) bylo místo cDNA pipetováno 5 μ l vody. Směs SYBR Green I 2x koncentrovaná obsahovala DNA polymerasu, dNTPs, pufr a interkalační barvivo SYBR Green I.

Tabulka 6 Použité primery.

Gen	F-primer	R-primer
UGT84A2	<i>CGTTCTTGTTGGGTGATTAGACA</i>	<i>CCCTTAACTTCTTCCGGCA</i>
UGT72B1	<i>GAGCTTGCTCTTGGTCTTGC</i>	<i>TGTCAATGGATCTGTTTGGCT</i>
UGT91C1	<i>TGGTGGAAGGGTTAGGGT</i>	<i>ACGGTCCCATGAAACAGAGA</i>
UGT74E2	<i>GTTCTGCAAACGCTTAGCCT</i>	<i>GAGACGAGGACCAGAGTGAG</i>
UGT73C6	<i>GCCCATCAACCTAGTGCAAG</i>	<i>CTTGTCCTTCTTGCAGACCAG</i>
claN	<i>ACAACCTGGTCGCGCTAAATAC</i>	<i>CATTTGGATCGGTGGCCTTG</i>

Poté co byla qPCR směs a cDNA napipetována do jamek, byla destička přelepena uzavírací fólií a byla vložena do PCR cykléru. V systému se označily jednotlivé geny,

vzorky a jejich rozložení do jamek. Poté byl spuštěn příslušný program a po jeho ukončení byla získaná data v podobě tabulky exportována do MS Excel.

Tabulka 7 Znárodnění rozmístění vzorků do jamek pro jeden cílový gen (v duplikátech).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Slc1	Slc2	Slc3	Slc4	Pnx1	Pnx2	Pnx3	Pnx4	Tbm1	Tbm2	Tbm3	Tbm4
B	Slc1	Slc2	Slc3	Slc4	Pnx1	Pnx2	Pnx3	Pnx4	Tbm1	Tbm2	Tbm3	Tbm4
C	Kon1	Kon2	Kon3	Kon4	NTC							
D	Kon1	Kon2	Kon3	Kon4								

Slc – sulcotrion, Pnx – pinoxaden, Tbm – tribenuron-methyl, Kon – kontrola

Pro zhodnocení genové exprese byla použita relativní kvantifikace, při které byla změna exprese testovaného genu vztažena ke kontrolnímu genu. Výpočet byl realizován za použití komparativní C_T metody. Nejprve bylo normalizováno C_T testovaného genu k referenčnímu genu, v našem případě byl použit gen pro klathrin (claN), jehož stabilita v našem systému byla ověřena a poté bylo ΔC_T vzorku normalizováno k ΔC_T kontroly. Následně byla data statisticky zhodnocena programem GraphPad Prism a vyhodnocena pomocí Studentova t-testu, kde byl porovnáván vliv jednotlivých herbicidů vůči kontrole.

$$\Delta C_T (\text{vzorek}) = C_T \text{ cílového genu} - C_T \text{ referenčního genu}$$

$$\Delta C_T (\text{kontrola}) = C_T \text{ cílového genu} - C_T \text{ referenčního genu}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T (\text{vzorek}) - \Delta C_T (\text{kontrola})$$

Pro výpočet R (normalizovaný expresní poměr) byl pak použit vzorec: $R = 2^{(-\Delta \Delta C_T)}$

(Schmittgen a Livak 2008)

4.3 Stanovení aktivity antioxidantních enzymů

4.3.1 Chemická reagentia

- 2,3,5-trifenyl-tetrazoliumchlorid – Sigma-Aldrich
- Bradfordovo činidlo – Sigma-Aldrich
- Dihydrogenfosforečnan draselný – Penta
- EDTA – Sigma-Aldrich
- Hovězí sérový albumin (BSA, bovine serum albumine) – Sigma-Aldrich
- Hydrogenfosforečnan draselný – Penta

- L-askorbová kyselina – Sigma-Aldrich
- Methanol – Penta
- Nitroblue tetrazolium chlorid (NBT) – Sigma-Aldrich
- Peroxid vodíku – Penta
- Polyvinylpyrrolidon K-30 (PVP K-30) – Sigma-Aldrich
- TBM – Sigma-Aldrich
- Triton-X 100 – Sigma-Aldrich
- Xanthin – Sigma-Aldrich

4.3.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy – Sartorius
- Automatické pipety – Research Plus, Eppendorf
- Centrifuga – Biofuge stratus Heraeus, Thermo scientific
- Laminární box – Holten Laminair model 1.2
- pH metr – WTW InoLab
- Spektrofotometr – Tecan Infinite 200 PRO
- Tkáňový homogonizátor – Precellys 24, Bertin Technologies
- Vortex – Vortex V-1 plus, BioSan

4.3.3 Test viability

Pro stanovení IC_{50} , tedy inhibiční koncentrace, a určení subletální dávky byly buněčné suspenze doplněny o různé koncentrace daného herbicidu. IC_{50} představuje koncentraci herbicidu, při které dojde k poškození 50 % buněk. V našem případě byly vzorky stresovány TBM v pěti koncentracích, šestá sada vzorků sloužila jako kontrola a místo roztoku TBM v methanolu byl použit pouze příslušný objem methanolu. Stejnou koncentrací byly vždy stresovány čtyři buněčné suspenze.

Tabulka 8 Koncentrační řada vzorků stresovaných TBM.

Roztok č.	1	2	3	4	5	6
Koncentrace TBM [mg/l]	50	5	0,5	0,05	0,005	0

Vzorky byly shromážděny po 24 h a byl proveden 2,3,5-trifenyl-tetrazoliumchlorid (TTC) redukční test.

4.3.3.1 TTC redukční test

Test spočívá v redukci TTC na červený formazan díky metabolické aktivitě životaschopných buněk a následném spektrofotometrickém vyhodnocení. V první řadě byl připraven 1/15M Sørensenův fosfátový pufr o pH 7,5 a to tak, že do kyselějšího dihydrogenfosforečnanu draselného byl postupně přidáván zásaditější hydrogenfosforečnan sodný, dokud nebylo dosaženo na požadované pH 7,5.

Tabulka 9 Složení 1/15M Sørensonova fosfátového pufru.

roztok KH_2PO_4	2,26 g/ 250 ml destilované vody
roztok Na_2HPO_4	4,73 g/ 500 ml destilované vody

Poté byl připraven 0,8% roztok TTC rozpuštěním 4 g TTC v 500 ml připraveného fosfátového pufru. Vzorek byl upraven následujícím způsobem – buňky byly odfiltrovány přes Büchnerovu nálevku a propláchnuty puftrem. K samotnému testu se pak odvážil 1 g buněk, který se zalil 15 ml připraveného roztoku TTC. Takto připravené vzorky byly uloženy do tmy, po 2 hodinách byla provedena centrifugace (4000 g, 20 min), následně se odpipetovalo TTC a buňky se zalily 30 ml ethanolu, po 24 h se odfiltroval ethanol a byla změřena absorbance při 485 nm.

V rámci experimentu jsme chtěli zjistit, zda v buněčných suspenzích, které byly stresovány TBM a nedošlo u nich k výraznému úhynu, došlo k ovlivnění aktivity antioxidantních enzymů, jimiž jsou APX, CAT a SOD. Aktivita těchto enzymů pak byla zkoušena i u rostlin stresovaných TBM.

4.3.4 Zpracování vzorků pro stanovení aktivity – extrakce proteinů

Aby bylo možné provést stanovení aktivity enzymů, bylo nutné předem extrahovat proteiny z buněčného a rostlinného materiálu. Celý proces bylo nutno provádět v rukavicích a na ledu.

500 mg buněk ze suspenzí, které byly uloženy v $-80\text{ }^\circ\text{C}$, bylo vždy z každého vzorku odebráno do třecí misky. Buňky byly rozetřeny s tekutým dusíkem a následně byly přidány 4 ml extrakčního pufru. Základem extrakčního pufru byl 50mM fosfátový pufr, který byl připraven zředěním (10x) ze zásobního 0,5M fosfátového pufru ($\text{K}_2\text{HPO}_4 : \text{KH}_2\text{PO}_4 = 61,5\% : 38,5\%$, pH 7). K němu byly dále přidány další látky – EDTA, PVP K 30 a Triton X-100, jak je uvedeno v tabulce 10.

Tabulka 10 Složení extrakčního pufru.

Komponenty	Množství
Fosfátový pufr 0,5M	20 ml
Destilovaná H ₂ O	180 ml
EDTA	5,8 mg
PVP K 30	2 g
Triton X-100	1 ml

Takto připravený extrakční pufr byl uchováván v lednici.

Zhomogenizovaný materiál byl ze třecí misky přemístěn do mikrozkušavek a zcentrifugován (20 min, 4 °C, 14000 g). Poté byl supernatant obsahující extrahované proteiny odpipetován a zamrazen při -80 °C po 0,5 ml. U takto připravených vzorků pak bylo možné stanovit aktivitu jednotlivých enzymů.

V případě rostlinného materiálu se od každého vzorku odvážilo 100 mg do zkumavek s kuličkami, zamrazilo se v tekutém dusíku a poté se rozemlelo v tkáňovém homogenizátoru po dobu 20 s. Po dostatečném rozemletí bylo přidáno 1,5 ml extrakčního pufru, po dobu 15 minut se nechalo extrahovat za občasného protřepání a udržování v chladu. Následovala centrifugace (20 minut, 4 °C, 14000 g) a poté byl supernatant odpipetován a zamrazen obdobně jako u buněčných suspenzí.

4.3.5 Stanovení celkových proteinů – Bradfordova metoda

U každé sady mikrozkušavek bylo nutné nejprve zjistit koncentraci proteinů a potažmo i enzymů ve vzorcích. To bylo zjištěno pomocí Bradfordovy metody, která je založena na interakci proteinů s barvivem Coomassie brilliant blue G-250 v kyselém prostředí, jakmile dojde k navázání barviva na protein, změní se zbarvení z červenohnědé na modrou. Následným změřením absorbance se pak zjistí koncentrace proteinů ve vzorcích. Před začátkem měření bylo třeba vytvořit kalibrační řadu koncentrací BSA.

Tabulka 11 Koncentrační řada BSA.

koncentrace BSA [mg/ml]							
0	0,125	0,25	0,5	0,75	1,0	1,5	2,0

Pozn. Jako blank byl použit extrakční pufr.

Na 96-jamkovou destičku s plochým dnem bylo pipetováno 5 μ l vzorku a 250 μ l Bradfordova činidla. Všechny vzorky byly připraveny v triplicátech. Po 10 minutách

inkubace při laboratorní teplotě byla měřena absorbance při vlnové délce 595 nm ve spektrofotometru.

4.3.6 Stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů

4.3.6.1 Askorbát peroxidasa (APX)

Do 96-jamkové UV mikrotitrační destičky s plochým dnem bylo napipetováno 20 μl proteinového vzorku, 144 μl 50 mM fosfátového pufru, 18 μl 6mM roztoku L-askorbové kyseliny ve fosfátovém pufru (předem bylo rozpuštěno 10 mg L-askorbové kyseliny v 10 ml 50mM fosfátového pufru) a úplně nakonec bylo přidáno 18 μl 2mM roztoku H_2O_2 , díky čemuž došlo k nastartování reakce a ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 290 nm po 20 s při 25 °C (16 cyklů).

Rozdíl absorbance v čase byl následně použit pro výpočet enzymatické aktivity, která byla vyjádřena na mg proteinu ve vzorku.

$$E_A = (k \cdot V) / (\varepsilon \cdot v \cdot d)$$

E_A – enzymatická aktivita

k – směrnice přímky

V – celkový objem roztoku v jamce (200 μl)

ε – extinkční koeficient (2,8 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

v – objem vzorku (20 μl)

d – výška hladiny roztoku v jamce (0,594 cm)

4.3.6.2 Katalasa (CAT)

Pro stanovení aktivity CAT byla připravena směs skládající se z 7,9 ml H_2O , 2 ml 50mM fosfátového pufru a 102,15 μl 100mM H_2O_2 . Následně bylo do 96-jamkové UV mikrotitrační destičky s plochým dnem pipetováno 10 μl proteinového vzorku a 140 μl připravené směsi. Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 240 nm po 20 s při 25 °C (16 cyklů).

Rozdíl absorbance v čase byl následně použit pro výpočet enzymatické aktivity, která byla vyjádřena na mg proteinu ve vzorku.

$$E_A = (k \cdot V) / (\varepsilon \cdot v \cdot d)$$

E_A – enzymatická aktivita

k – směrnice přímky

V – celkový objem roztoku v jamce (150 μl)

ε – extinkční koeficient (0,036 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

v – objem vzorku (10 μl)

d – výška hladiny roztoku v jamce (0,463 cm)

4.3.6.3 Superoxid dismutasa (SOD)

Jako první bylo nutné si připravit roztok xanthinu, neboť jeho rozpouštění je poněkud časově náročné. Bylo odváženo 75 mg xanthinu a toto množství bylo rozpuštěno v 1,5 ml 1M NaOH. Dále byl připraven 50mM fosfátový pufr a do 100 ml tohoto pufru bylo naváženo 215 mg NBT a pH bylo upraveno na hodnotu 7. Redukcí této tzv. nitrotetrazoliové modři pak bylo možno hodnotit aktivitu SOD spektrofotometricky. Do tmavé zkumavky bylo připraveno 10 ml reakční směsi obsahující 9,89 ml připraveného 50mM fosfátového pufru s NBT, 277 μ l xanthin-oxidasy (Sigma 40 UN, 0,3 U/mg, 15mg prot./ml) a 10,5 μ l katalasy (Sigma SRE0041-10G, 11933 U/mg, lyofilizovaný prášek byl rozpuštěn v 50mM fosfátovém pufru a alikvoty uloženy v -80°C, 0,1U odpovídá 0,84 μ l). Množství enzymů v reakční směsi bylo nastaveno tak, aby na 800 μ l 50mM fosfátového pufru s NBT bylo 0,1U od každého enzymu. Na 96-jamkovou destičku s plochým dnem bylo napipetováno 20 μ l enzymového extraktu, 170 μ l reakční směsi s NBT a enzymy, a nakonec 10 μ l roztoku xanthinu pro nastartování reakce. Ihned byla měřena absorbance při vlnové délce 560 nm po 20 s při 25 °C (12 cyklů).

Rozdíl absorbance v čase byl následně použit pro výpočet enzymatické aktivity, která byla vyjádřena na mg proteinu ve vzorku.

$$E_A = [(k_{bl} - k_{vz}) / k_{bl}] * 100$$

E_A – enzymatická aktivita

k_{bl} – směrnice přímky blanku

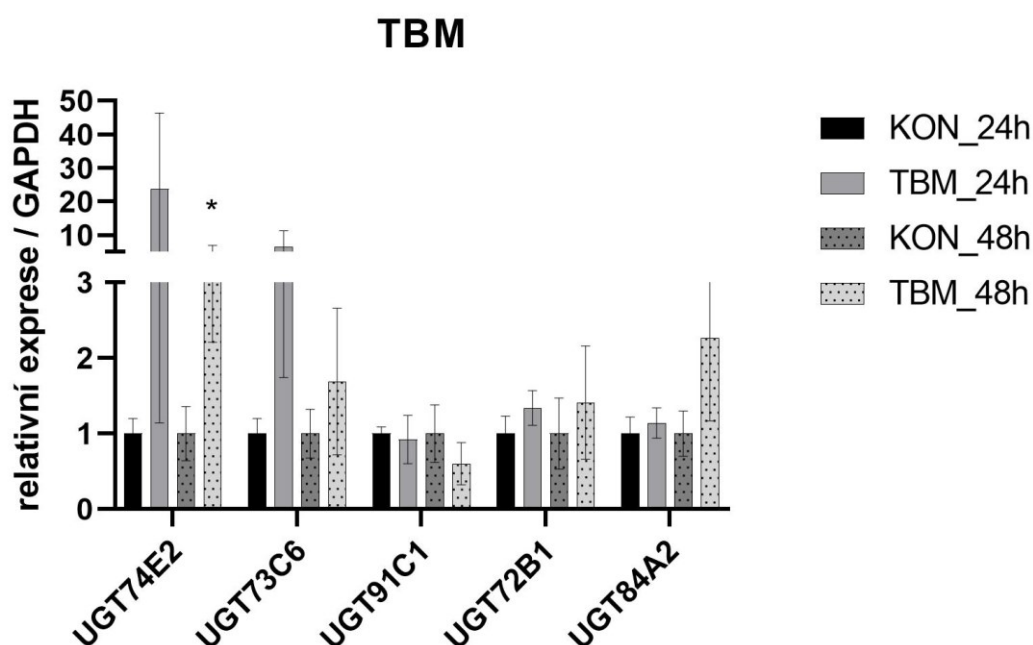
k_{vz} – směrnice přímky vzorku

5 Výsledky

5.1 Ovlivnění vybraných genů pro UGT herbicidy

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda pod vlivem herbicidů dojde k ovlivnění genové exprese UGT u rostliny *A. thaliana*. Výběr referenčních a UGT genů byl proveden doc. Ing. Petrou Matouškovou Ph.D. dle odborné literatury, která popisuje působení herbicidů na *A. thaliana* (Brazier-Hicks *et al* 2018) a pomocí programu Genvestigator, který obsahuje veškeré transkriptomické studie u této rostliny. Jako referenční gen byl použit *claN*, jehož stabilní exprese v našem experimentu byla ověřena. Vybrané geny pro UGT použity pro tento experiment byly UGT74E2, UGT73C6, UGT91C1, UGT72B1 a UGT84A2. Pro experiment byly použity tři herbicidy, každý s jiným mechanismem účinku – tribenuron-methyl, sulcotrion a pinoxaden, u kterých bylo již v předchozích studiích zjištěno, že indukují UGT u různých rostlinných druhů (Huang *et al* 2021, Matzrafi *et al* 2017, Yang *et al* 2016).

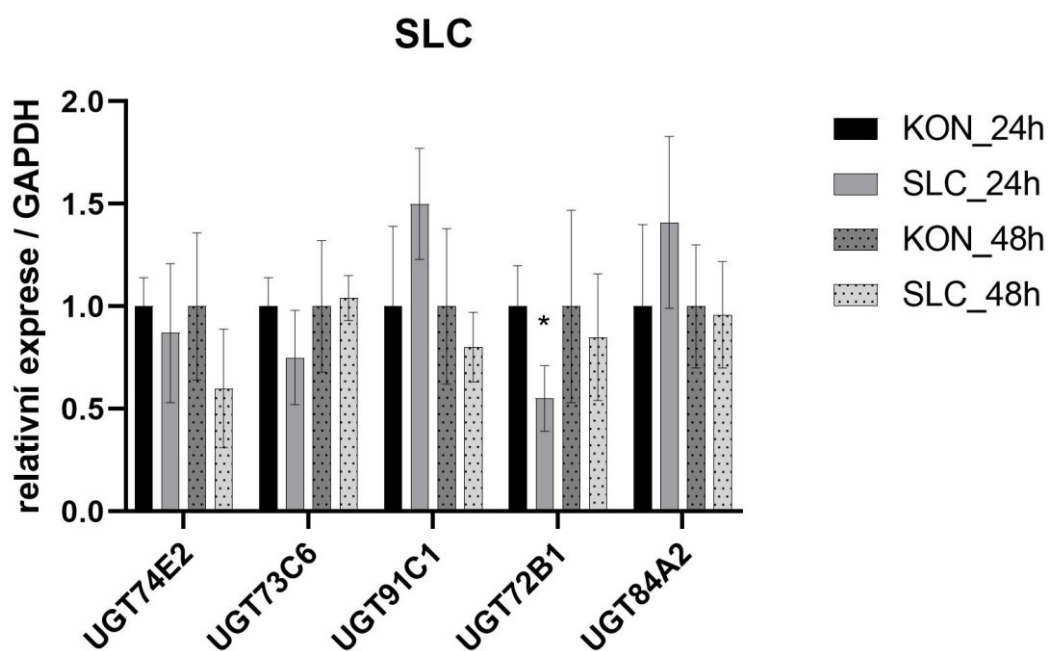
5.1.1 Vyhodnocení qPCR po ovlivnění *A. thaliana* tribenuron-methylem



Obrázek 7 Porovnání relativní exprese vybraných UGT u rostlin *A. thaliana* stresovaných TBM a kontrolních rostlin po 24 a 48 h. * označuje výsledky s hladinou významnosti $p \leq 0,05$.

Na obrázku 7 je vidět, že relativní exprese UGT74E2 vzrostla po 24 i 48 h po expozici rostlin TBM, a rovněž u UGT73C6 došlo k výraznému nárůstu relativní exprese po 24 h a u UGT84A2 po 48 h, avšak z důvodu vysoké směrodatné odchylky se nárůst nejeví jako statisticky významný.

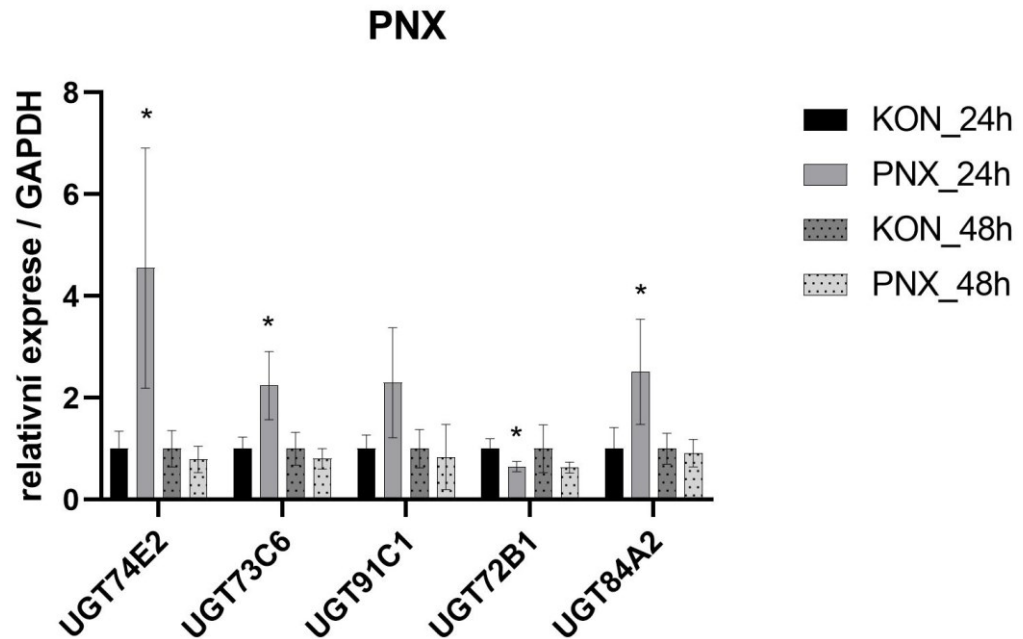
5.1.2 Vyhodnocení qPCR po ovlivnění *A. thaliana* sulcotrionem



Obrázek 8 Porovnání relativní exprese vybraných UGT u rostlin *A. thaliana* stresovaných SLC a kontrolních rostlin po 24 a 48 h. * označuje výsledky s hladinou významnosti $p \leq 0,05$.

Na obrázku 8 vidíme, že došlo k mírnému nárůstu relativní exprese UGT91C1 a UGT84A2 po 24 h od expozice SLC, nicméně ani jeden z těchto nárůstů se dle statistického vyhodnocení nejeví jako signifikantně významný rozdíl. Naopak u UGT72B1 došlo k významnému snížení exprese po 24 h.

5.1.3 Vyhodnocení qPCR po ovlivnění *A. thaliana* pinoxadenem



Obrázek 9 Porovnání relativní exprese vybraných UGT u rostlin *A. thaliana* stresovaných PNX a kontrolních rostlin po 24 a 48 h. * označuje výsledky s hladinou významnosti $p \leq 0,05$.

Na obrázku 9 můžeme pozorovat nárůst relativní exprese u více vybraných UGT po 24 h od expozice PNX. Dle statistického vyhodnocení můžeme za signifikantní považovat nárůst exprese UGT74E2, UGT73C6 a UGT84A2. Naopak u UGT72B1 byl pozorován pokles exprese po 24 h.

5.2 Vizuální zhodnocení rostlin po expozici vybraným herbicidům

Vypěstované rostliny byly po aplikaci TBM, SLC a PNX fotograficky zdokumentovány.



Obrázek 10 *A. thaliana* v den aplikace herbicidu.

Na obrázku 10 můžeme vidět, jak vypadaly rostliny v den, kdy byly stresovány jednotlivými herbicidy. Vizuálně vypadaly rostliny srovnatelně s kontrolní rostlinou i při odběru vzorků po 24 h a 48 h. I přesto, že po této době nejsou patrné žádné vizuální změny rostliny, předpokládá se, že již dochází k ovlivnění exprese UGT a aktivity antioxidantních enzymů.



Obrázek 11 Kontrolní rostliny *A. thaliana* po 7 (vlevo) a 14 (vpravo) dnech.

Na obrázku 11 vidíme, že kontrolní rostliny, které nebyly stresovány žádným herbicidem, pokračují v normálním vývoji.



Obrázek 12 A. thaliana po 7 (vlevo) a 14 (vpravo) dnech od aplikace TBM.

Na obrázku 12 můžeme vidět působení TBM na rostlinu. Vlivem inhibice ALS došlo k zastavení růstu rostliny, postupnému zežloutnutí listů, a nakonec až k úhynu rostliny. Ke změnám dochází až po několika dnech od vystavení působení TBM, neboť určitá zásoba aminokyselin nacházející se v rostlině dokáže ještě zajistit fungování metabolismu.



Obrázek 13 A. thaliana po 7 (vlevo) a 14 (vpravo) dnech od aplikace SLC.

Na obrázku 13 můžeme vidět, že SLC, který zasahuje do biosyntézy karotenoidů, způsobil v rostlině zastavení procesu fotosyntézy a poškození chloroplastů, což se projevilo typickou albifikací listů, následně došlo k úhynu rostliny.



Obrázek 14 A. thaliana po 7 (vlevo) a 14 (vpravo) dnech od aplikace PNX.

Na obrázku 14 lze pozorovat, že po aplikaci PNX, narozdíl od předchozích dvou herbicidů, rostlina pokračovala ve svém vývoji. Došlo k lehkému zežloutnutí listů a rostlina tolik neprosperovala v porovnání s rostlinami kontrolními (obrázek 11). PNX navíc působí zejména v meristematických pletivech, a tudíž staré listy mohou po dlouhou dobu vypadat zdravě.

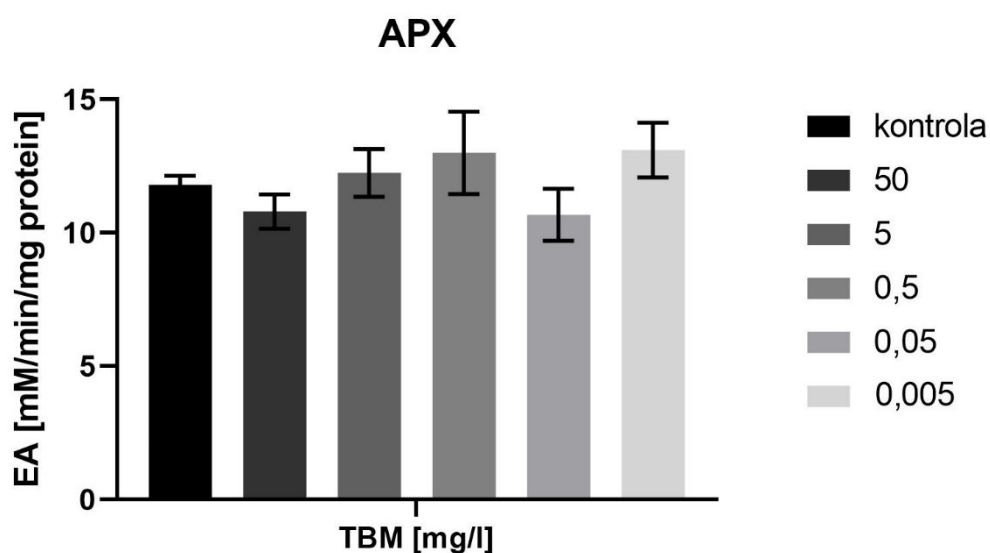
5.3 Ovlivnění antioxidačního aparátu *A. thaliana* tribenuron-methylem

Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda došlo k ovlivnění vybraných antioxidačních enzymů *A. thaliana* po vystavení působení vybraného herbicidu – TBM, koncentrace byly vybrány dle odborné literatury (Huang *et al* 2021, Yu *et al* 2017). Byla zkoumána aktivita APX, CAT a SOD. Experiment byl proveden u buněčných suspenzí i u rostlin.

V prvé řadě byl proveden test viability buněčných suspenzí pro zjištění subletální dávky TBM. Tento test nevyšel dle předpokladu a buňky ze suspenzí stresovaných TBM v rozmezí koncentrací 0,005-50 mg/l zůstaly životaschopné. Jedním z důvodů může být mechanismus účinku TBM – inhibuje ALS, která se nachází zejména v chloroplastech. V buněčných suspenzích, které rostou ve tmě, je funkce chloroplastů potlačena a je tedy možné, že jsou vůči TBM tolerantnější. Následně byly suspenze použity k prozkoumání vlivu TBM v různých koncentracích na antioxidační aktivitu vybraných enzymů.

5.3.1 Stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů u buněčných suspenzí

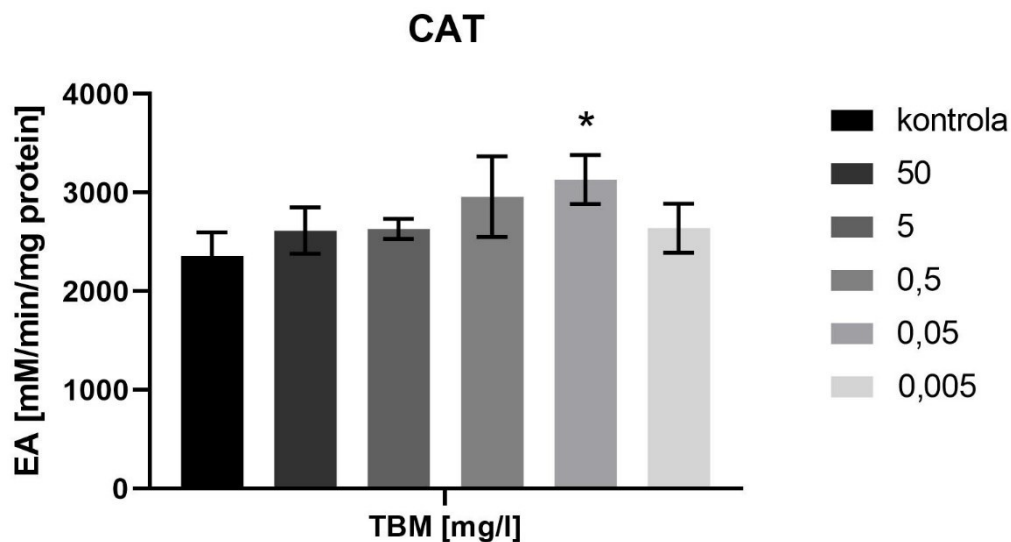
5.3.1.1 Vyhodnocení enzymatické aktivity APX



Obrázek 15 Porovnání enzymatické aktivity APX u buněčných suspenzí *A. thaliana* stresovaných vybranými koncentracemi TBM.

Na obrázku 15 je vidět, že v enzymatické aktivitě APX nejsou signifikantní rozdíly vzhledem ke kontrolnímu vzorku, a to v žádné použité koncentraci TBM.

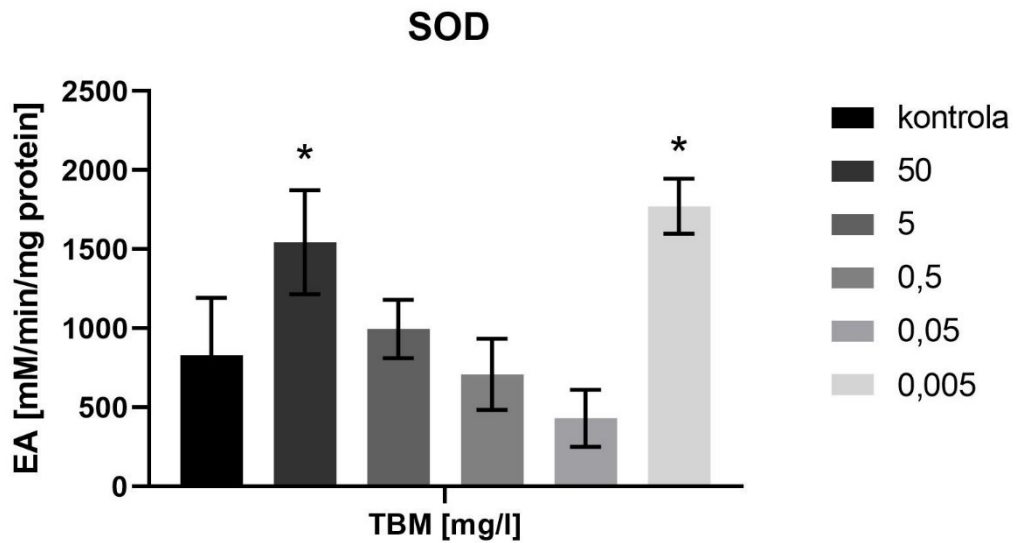
5.3.1.2 Vyhodnocení enzymatické aktivity CAT



Obrázek 16 Porovnání enzymatické aktivity CAT u buněčných suspenzí *A. thaliana* stresovaných vybranými koncentracemi TBM. * označuje výsledky s hladinou významnosti $p \leq 0,05$.

Na obrázku 16 můžeme pozorovat, že enzymatická aktivita CAT je vyšší u suspenzí stresovaných TBM. Dle statistického vyhodnocení můžeme za signifikantní nárůst enzymatické aktivity v porovnání s kontrolním vzorkem považovat pouze působení TBM o koncentraci 0,05 mg/l.

5.3.1.3 Vyhodnocení enzymatické aktivity SOD



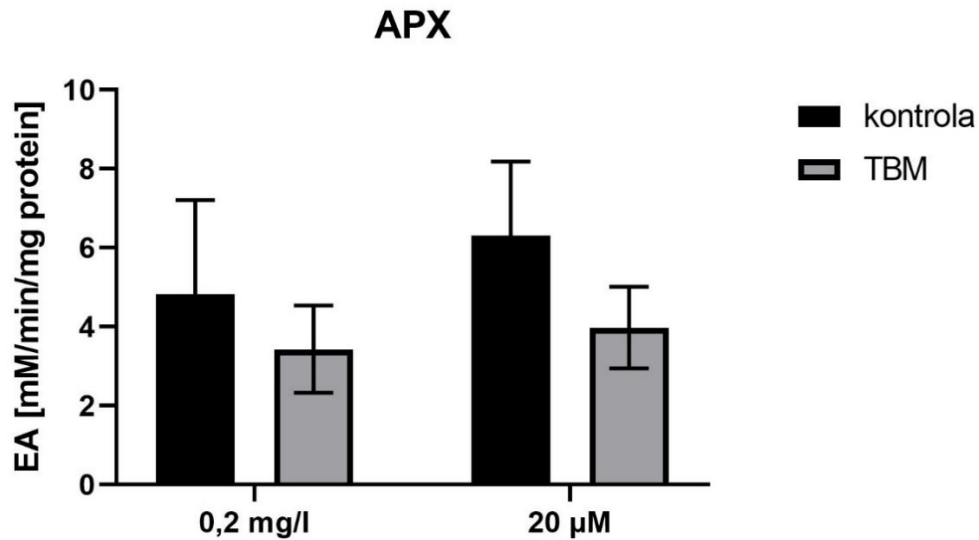
Obrázek 17 Porovnání enzymatické aktivity SOD u buněčných suspenzí *A. thaliana* stresovaných vybranými koncentracemi TBM. * označuje výsledky s hladinou významnosti $p \leq 0,05$.

Na obrázku 17 je patrné, že u vzorků stresovaných TBM o koncentraci 50 mg/l a 0,005 mg/l došlo k výraznému nárůstu enzymatické aktivity SOD vůči kontrole a tento nárůst se dle statistického vyhodnocení jeví jako signifikantní.

5.3.2 Stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů u rostlin

U rostlin byly použity pouze dvě koncentrace TBM – 0,2 mg/l ($\approx 5 \mu\text{M}$) a 20 μM .

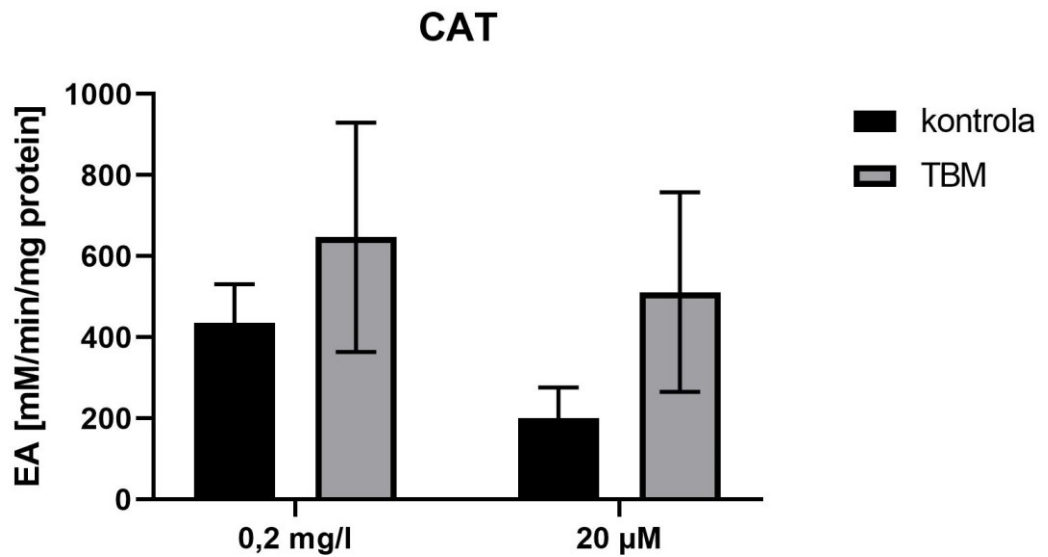
5.3.2.1 Vyhodnocení enzymatické aktivity APX



Obrázek 18 Porovnání enzymatické aktivity APX u rostlin *A. thaliana* stresovaných vybranými koncentracemi TBM.

Na obrázku 18 lze pozorovat mírné snížení enzymatické aktivity APX v obou použitých koncentracích TBM. Nicméně se v ani jednom případě nejedná o statisticky významný rozdíl.

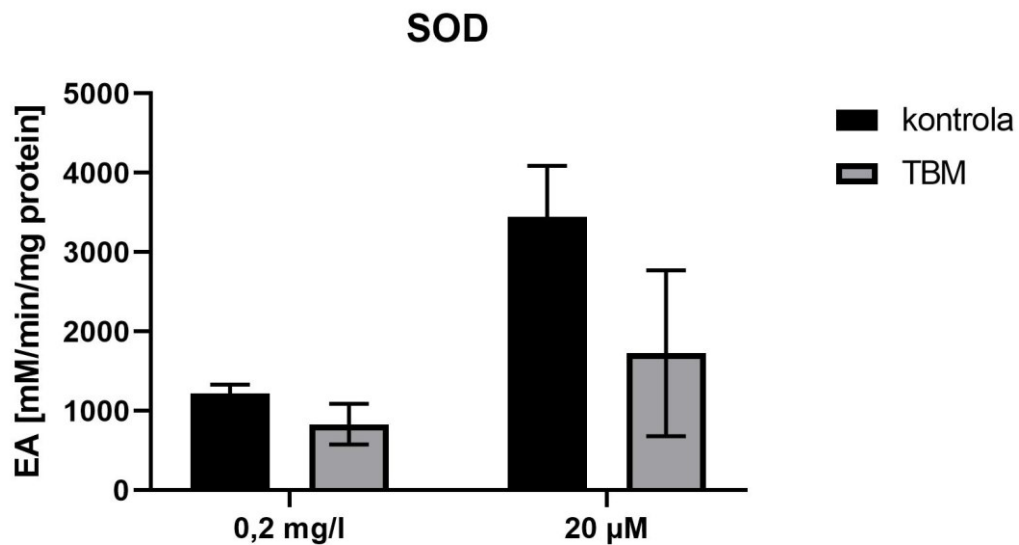
5.3.2.2 Vyhodnocení enzymatické aktivity CAT



Obrázek 19 Porovnání enzymatické aktivity CAT u rostlin *A. thaliana* stresovaných vybranými koncentracemi TBM.

Na obrázku 19 pozorujeme mírný nárůst v enzymatické aktivitě CAT při porovnání stresovaných a kontrolních rostlin v obou použitých koncentracích. Avšak tento nárůst se nejeví jako statisticky významný rozdíl.

5.3.2.3 Vyhodnocení enzymatické aktivity SOD



Obrázek 20 Porovnání enzymatické aktivity SOD u rostlin *A. thaliana* stresovaných vybranými koncentracemi TBM.

Na obrázku 20 je vidět, že při použití koncentrace 0,2 mg/l nedošlo k ovlivnění enzymatické aktivity SOD, při koncentraci 20 µM lze pozorovat mírné snížení aktivity SOD v porovnání s kontrolou, avšak kvůli velké směrodatné odchylce nelze považovat tento rozdíl za statisticky významný.

6 Diskuse

Vznik a mechanismy herbicidní rezistence je důležité znát zejména pro budoucnost zemědělství, aby byly zvoleny či vyvinuty účinné herbicidy pro zajištění dostatečného množství a kvality zemědělských plodin.

Existují mnohé studie, které potvrzují, že UGT hraje roli v rezistenci vůči xenobiotikům (např. léčiva, insekticidy) u různých organismů (např. Ma *et al* 2021, Wang *et al* 2020, Kellerová *et al* 2020). Avšak studie zabývající se herbicidní rezistencí se zaměřují zejména na komplex cytochromu P450, glutathion-S-transferasu a transportní proteiny (např. Bai *et al* 2018, Yang *et al* 2018, Wang *et al* 2020), zatímco UGT jsou opomíjeny, a tak existuje pouze omezené množství studií, které se zabývají UGT v rámci vzniku herbicidní rezistence, a proto je na místě, abychom se jim více věnovali. Některé studie mechanismu herbicidní rezistence založené na RNA-sekvenaci odhalily, že exprese určitých UGT genů jsou významně zvýšeny, například studie Yang *et al* (2016) zkoumala mechanismus vzniku rezistence k herbicidu TBM u plevelné rostliny *Descurainia sophia* L., kde se zabývala nejen UGT, ale i CYP450 a ABC transportéry. Dle studie Zhao *et al* (2019), která zkoumala herbicid ze skupiny inhibitorů ALS – mesosulfuron, došlo rovněž ke zvýšení exprese UGT a ke zvýšení glykosylace daného herbicidu u rostliny *Alopecurus aequalis*.

V této práci byla použita rostlina *Arabidopsis thaliana*, která se jeví jako vhodný modelový organismus pro studii herbicidní rezistence, jelikož lze vypěstovat poměrně rychle další generace a sledovat jejich ovlivnění. Z vybraných UGT a herbicidů, kterými se tato práce zabývala došlo k významnému zvýšení exprese některých UGT, konkrétně UGT74E2, UGT73C6 a UGT84A2 po expozici herbicidu PNX ze skupiny inhibitorů ACC. Přestože u TBM bylo pozorováno určité zvýšení exprese některých UGT, nelze výsledky kvůli vysoké směrodatné odchylce považovat za signifikantní. U UGT91C1, která je více prozkoumána, bylo zjištěno, že vlivem některých herbicidů došlo ke zvýšení její exprese např. ve studii Huang *et al* (2021). V rámci této práce jsme u UGT91C1 pozorovali pouze mírné zvýšení po expozici SLC a PNX, avšak dle statistického vyhodnocení nelze tyto hodnoty považovat za signifikantní. Naopak u UGT72B1 jsme po expozici SLC a PNX pozorovali určité snížení exprese po 24 h.

Vybrané UGT byly v rámci práce zkoumány pouze jednou a pro potvrzení, zda opravdu dochází k ovlivnění exprese vlivem herbicidů, je nutné provést další studie se

zaměřením zejména na herbicid PNX a výše zmíněné UGT. Dále by bylo vhodné provést testování další generace rostlin po ošetření PNX.

Ve druhé části práce jsem zjišťovala, jaký vliv mají herbicidy na antioxidační aparát rostliny. Existuje velké množství studií, které se zabývají působením nejrůznějších stresových faktorů (salinita, extrémní teplotní podmínky, těžké kovy aj.) na antioxidační aparát rostliny (např. Aazami *et al* 2021, Soengas *et al* 2018, Lyubenova *et al* 2009). V některých studiích, kde byly použity jako stresový faktor herbicidy ze skupiny ALS-inhibitorů, konkrétně sulfonylmočoviny, do nichž spadá i námi používaný TBM, došlo k ovlivnění aktivity antioxidačních enzymů u různých rostlinných druhů. Dle studie prováděné Zhao *et al* (2019) došlo působením herbicidu mesosulfuronu na rostlinu *Alopecurus aequalis* vlivem stresové reakce ke zvýšení aktivity peroxidasy a CAT. Výsledky další studie Jain *et al* (2021) zase ukázaly, že vlivem metsulfuronu se zvýšila aktivita SOD a CAT v porovnání s kontrolními rostlinami, a naopak aktivita APX a glutathionreduktasy byla snížena.

V této práci jsem se konkrétně zabývala vlivem TBM na APX, CAT a SOD, a to u buněčných suspenzí a u rostlin *A. thaliana*. Z naměřených hodnot vyplývá, že TBM má v různých koncentracích určitý vliv na aktivitu APX, CAT i SOD u této rostliny. Tyto výsledky lze očekávat v porovnání s výše uvedenými studiemi vlivu ALS-inhibitorů na antioxidační enzymy, avšak také záleží na druhu rostliny a podmínkách, ve kterých se dané rostliny vyskytují. V případě CAT a SOD u buněčných suspenzí bylo pozorováno určité zvýšení aktivity enzymů, u CAT jsme pak zvýšení aktivity pozorovali i u rostlin, naopak u APX byla aktivita spíše snížena, což se shoduje se studií prováděnou Jain *et al* (2021). Nicméně nebyla pozorována významná závislost mezi koncentrací herbicidu a mírou ovlivnění antioxidačních enzymů a pro upřesnění výsledků a vyslovení jasných závěrů by bylo nutné provést opakovaná měření.

7 Závěr

V této práci byl zkoumán vliv herbicidů na expresi vybraných UDP-glykosyltransferas u rostliny *Arabidopsis thaliana*. V rámci experimentu bylo pomocí qPCR zjištěno, že herbicid pinoxaden ze skupiny inhibitorů ACC významně zvyšuje expresi některých UDP-glykosyltransferas, které pravděpodobně budou hrát roli ve vzniku herbicidní rezistence.

Dále byl zkoumán vliv abiotického stresu v podobě herbicidu tribenuron-methylu na antioxidační aparát rostliny. U antioxidačních enzymů katalasy a superoxiddismutasy došlo po expozici herbicidu k výrazným změnám v enzymatické aktivitě. Nicméně tyto skutečnosti by bylo třeba potvrdit rozsáhlejšími studii.

8 Seznam použitých zkratek

2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
ABC	ATP-binding cassette
ACC	acetyl-CoA-karboxylasa
ADH	alkoholdehydrogenasa
ALDH	aldehyddehydrogenasa
ALS	acetolaktát syntasa
APX	askorbátperoxidasa
BSA	bovine serum albumine – hovězí sérový albumin
CAT	katalasa
cDNA	komplementární DNA
clathN	klathrin
Ct	cycle threshold
CYP	cytochromy P450
DEPC	diethylpyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNAsa	deoxyribonukleasa
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
F-primer	forward primer
GST	glutathion-S-transferasa
HPPD	<i>p</i> -hydroxyfenyl pyruvát dioxygenasa
HRAC	Herbicide Resistance Action Committe
MATE	multi-drug and toxins extrusion
Mbp	mega base pair
MT	methyltransferasa
NADPH-oxidasa	nikotinamidadeninukleotidfosfát-oxidasa
NTC	no template control – negativní kontrola
qPCR	quantitative polymerase chain reaction – kvantitativní polymerázová řetězová reakce
R-primer	reverse primer
ROS	reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku

RNA	ribonukleová kyselina
RNAsa	ribonukleasa
RT	reverzní transkriptasa
SOD	superoxiddismutasa
ST	sulfotransferasa
TBM	tribenuron-methyl
TTC	2,3,5-trifenyl-tetrazoliumchlorid
UDP	uridindifosfát
UGT	UDP-glykosyltransferasa

9 Zdroje

9.1 Literární zdroje

AAZAMI M. A., RASOULI F., EBRAHIMZADEH A. (2021), *Oxidative damage, antioxidant mechanism and gene expression in tomato responding to salinity stress under in vitro conditions and application of iron and zinc oxide nanoparticles on callus induction and plant regeneration*, BMC Plant Biology 21:597, doi: 10.1186/s12870-021-03379-7.

ALSCHER R. G., ERTURK N., HEATH L. S., (2002), *Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants*, Journal of Experimental Botany 53, s. 1331-1341, doi: 10.1093/jexbot/53.372.1331.

ASADA K., *Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants* (1992), Physiologia plantarum 85, s. 235-241, doi: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04728.x.

BAI S., LIU W., WANG H., ZHAO N., JIA S. ZOU N., GUO W., WANG J. (2018). *Enhanced herbicide metabolism and metabolic resistance genes identified in tribenuron-methyl resistant Myosoton aquaticum L.*, Journal of Agricultural and Food Chemistry , 66(37): 9850-9857, doi: 10.1021/acs.jafc.8b02740.

BÁRTÍKOVÁ H., SKÁLOVÁ L., STUHLÍKOVÁ L., VOKŘÁL I., VANĚK T., PODLIPNÁ R. (2015), *Xenobiotic-metabolizing enzymes in plants and their role in uptake and biotransformation of veterinary drugs in the environment*, Drug Metabolism Reviews, Taylor & Francis, doi: 10.3109/03602532.2015.1076437.

BEFFA R., MENNE H., KÖCHER H. (2019), *Modern Crop Protection Compounds – Herbicide Resistance Action Committee (HRAC): Herbicide Classification, Resistance Evolution, Survey, and Resistance Mitigation Activities*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Německo. DOI:10.1002/9783527699261.ch1

BOWLER CH., CAMP W. V., MONTAGU M. V., INZÉ D., ASADA K. (1994), *Superoxide dismutase in plants*, Critical Reviews in Plant Sciences 13(3), s. 199-218, doi: 10.1080/07352689409701914.

BOWLES D., LIM E.-K., POPPENBERGER B., VAISTIJ F.E. (2006), *Glycosyltransferases of lipophilic small molecules*, The Annual Review of Plant Biology, 57, s. 567-597, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105429.

BRAZIER-HICKS M., GERSHATER M., DIXON D., EDWARDS R. (2018), *Substrate specificity and safener inducibility of the plant UDP-glucose-dependent family I glycosyltransferase super-family*, Plant Biotechnology Journal 16, s. 337-348, doi: 10.1111/pbi.12775.

CAVERZAN A., PASSAIA G., ROSA S. B., RIBEIRO C. W., LAZZAROTTO F., MARGIS-PINHEIRO M. (2012), *Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection*, Genetics and Molecular Biology 35, s. 1011-1019, doi: 10.1590/s1415-47572012000600016.

COLQUHOUN J. (2011), *How herbicides work in terms that we can all understand*, University of Wisconsin-Madison.

CONTE S. S., LLOYD A. M. (2011), *Exploring multiple drug and herbicide resistance in plants – Spotlight on transporter proteins*, Plant Science 180, s. 196-203, doi:10.1016/j.plantsci.2010.10.015.

FROVA C. (2003), *The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution*, Physiologia plantarum 119, s. 469-479, doi:10.1046/j.1399-3054.2003.00183.x.

GAINES T.A., DUKE S.O., MORRAN S. *et al.* (2020), *Mechanisms of evolved herbicide resistance*, Journal of Biological Chemistry, Papers in Press, doi:10.1074/jbc.REV120.013572.

GARCÍA-LIMONES C., HERVÁS A., NAVAS-CORTÉS J. A., JIMÉNEZ-DÍAZ R. M., TENA M. (2002), *Induction of antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris**, Physiological and Molecular Plant Pathology 61(6), s. 325-337, doi: 10.1006/pmpp.2003.0445, ISSN 0885-5765.

HALL L. M., BECKIE H. J., WOLF T. M. (1999 (reprinted 2014)), *How herbicides work: Biology to Application*, Edmonton, Alberta: Alberta Agriculture, Food, and Rural Development, Publishing Branch, ISBN 0-7732-6131-1.

HAMOUIZOVÁ K., KOŠNAROVÁ P., SOUKUP J. (2021), *Herbicidní rezistence: vývoj, prevence a management*, Syngenta, katedra agroekologie a rostlinné produkce ČZU v Praze.

HUANG X., ZHAO S., ZHANG Y., LI Y., SHEN H., LI X., HOU B. (2021), *A novel UDP-glycosyltransferase 91C1 confers specific herbicide resistance through detoxification reaction in Arabidopsis*, *Plant Physiology and Biochemistry* 159, s. 226-233, doi: 10.1016/j.plaphy.2020.12.026.

CHAABANE H., VULLIET E., CALVAYRAC CH. *et al* (2008), Behavior of sulcotrione and mesotrione in two soils, *Pest Management Science* 64, s. 86-93, doi: 10.1002/ps.1456

JAIN S., RAI P., SINGH J., SINGH V. P., PRASAD R., RANA S., DESHMUKH R., TRIPATHI D. K., SHARMA S. (2021), *Exogenous addition of silicon alleviates metsulfuron methyl induced stress in wheat seedlings*, *Plant Physiology and Biochemistry* 167, s. 705-712, doi: 10.1016/j.plaphy.2021.07.031.

JOUILI H., BOUAZIZI H., FERJANI E. E. (2011), *Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress*, *Acta Phydiol Plant* 33, s. 2075-2082, doi:10.1007/s11738-011-0780-2.

JUGULAM M., SHYAM CH. (2019), *Non-Target-Site Resistance to Herbicides: Recent Developments*, *Plants (Basel)*, DOI: 10.3390/plants8100417

JURSÍK M., SOUKUP J., HOLEC J. (2010a), *Mechanizmy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny: Úvod do problematiky mechanismu působení herbicidů*, *Listy cukrovarnické a řepařské* 126, č.1, Česká zemědělská univerzita v Praze, ISSN 1805-9708.

JURSÍK M., SOUKUP J., HOLEC J., ANDR J. (2010b), *Mechanizmy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny: Inhibitory acetolaktát syntázy (ALS inhibitory)*, *Listy cukrovarnické a řepařské* 126, č.11, Česká zemědělská univerzita v Praze, ISSN 1805-9708.

JURSÍK M., SOUKUP J., HOLEC J., VENCLOVÁ V. (2010c), *Mechanizmy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny: Inhibitory biosyntézy lipidů – Inhibitory ACCasy (listové graminicidy)*, *Listy cukrovarnické a řepařské* 126, č.12, Česká zemědělská univerzita v Praze, ISSN 1805-9708.

JURSÍK M, SOUKUP J., HOLEC J., VENCLOVÁ V. (2010d), *Mechanismy účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny: Inhibitory biosyntézy karotenoidů*, Listy cukrovarnické a řepářské 126, č.4, Česká zemědělská univerzita v Praze, ISSN 1805-9708.

KELLEROVÁ P., NAVRÁTILOVÁ M., NGUYEN L.T., DIMUNOVÁ D., RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ L., ŠTĚRBOVÁ K., SKÁLOVÁ L., MATOUŠKOVÁ P. (2020), *UDP-Glycosyltransferases and Albendazole Metabolism in the Juvenile Stages of Haemonchus contortus*, *Frontiers in Physiology* 11: 594116, doi: 10.3389/fphys.2020.594116.

KRÄMER U. (2015), *Planting molecular functions in an ecological context with Arabidopsis thaliana*, *Elife*, doi:10.7554/eLife.06100.

LI Y., BALDAUF S., LIM E.K., BOWLES D.J. (2001), *Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.*, DOI: 10.1074/jbc.M007447200.

LYUBENOVA L., NEHNEVAJOVA E., HERZIG R., SCHRÖDER P. (2009), *Response of antioxidant enzymes in Nicotiana tabacum clones during phytoextraction of heavy metals*, *Environmental Science and Pollution Research* 16(5), s. 573–581, doi:10.1007/s11356-009-0175-8.

MA K., TANG Q., LIANG P., LI J., GAO X. (2021), *UDP-glycosyltransferases from the UGT344 family are involved in sulfoxaflor resistance in Aphis gossypii glover*, *Insects* 12: 356, doi: 10.3390/insects12040356.

MACKENZIE P. I., OWENS I. S., BURCHELL B., BOCK K. W., BAIROCH A., BÉLANGER A., FOURNEL-GIGLEUX S., GREEN M., HUM D. W., IYANAGI T., LANCET D., LOUISOT P., MAGDALOU J., CHOWDHURY J. R., RITTER J. K., SCHACHTER H., TEPHLY T.R., TIPTON K. F., NEBERT D. W. (1997), *The UDP-glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature updates based on evolutionary divergence*. *Pharmacogenetics* 7, s. 255-269, doi: 10.1097/00008571-199708000-00001.

MATZRAFI M., SHAAR-MOSHE L., RUBIN B., PELEG Z. (2017), *Unraveling the Transcriptional Basis of Temperature-Dependent Pinoxaden Resistance*

in Brachypodium hybridum, *Frontiers in Plant Science* 8: 1064, doi: 10.3389/fpls.2017.01064.

MEYEROWITZ, E. M. (1987), *Arabidopsis thaliana*, *Annual review of genetics*, s. 93-111, doi:10.1146/annurev.ge.21.120187.000521.

NANDI A., YAN L-J., JANA CH. K., DAS N. (2019), *Role of catalase in oxidative stress – and age associated degenerative diseases*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi: 10.1155/2019/9613090.

NASEER S., YUREE L., LAPIERRE C. *et al* (2012), *Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin*, *PNAS*, <https://doi.org/10.1073/pnas.1205726109>.

NELSON D., WERCK-REICHHART D. (2011), *The plant genome: An evolutionary view on structure and function: A P450-centric view of plant evolution*, *The Plant Journal* 66, s. 194-211, doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04529.x.

PINTAR A., SVEČNJAK Z., ŠOŠTARČIĆ V. *et al* (2021), *Growth stage of Alopecurus myosuroides Huds. Determines the efficacy of pinoxaden*, *Plants (Basel)*, DOI: 10.3390/plants10040732

PITERKOVÁ J., TOMÁNKOVÁ K., LUHOVÁ L., PETŘIVALSKÝ M., PEČ P. (2005), *Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu*, *Chemické listy* 99, Katedra biochemie a Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, s. 455-466, ISSN 1213-7103.

RACEK J., HOLEČEK V. (1999), *Enzymy a volné radikály*, *Chemické listy* 93, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, Lékařská fakulta UK, Fakultní nemocnice v Plzni, s. 774-780, ISSN 1213-7103.

READE P. H., COBB A. H. (2002), *Weed Management Handbook – Chapter 8 Herbicides: Modes of Action and Metabolism*, British Crop Protection Council, Blackwell Science, Oxford.

RIVERO L., SCHOLL R., HOLOMUZKI N., CRIST D., GROTEWOLD E., BRKLJACIC J. (2014), *Handling Arabidopsis plants: growth, preservation of seeds, transformation, and genetic crosses*. *Methods Mol Biol.*, doi:10.1007/978-1-62703-580-4_1.

ROSS J., LI Y., LIM E.K., BOWLES D. J. (2001), *Higher plant glycosyltransferases*, Genome Biol 2, doi: 10.1186/gb-2001-2-2-reviews3004.

SHARMA I., AHMAD P. (2014), *Oxidative Damage to Plants: Chapter 4 – Catalase: A versatile antioxidant in plants*, Academic Press, s. 131-148, doi: 10.1016/B978-0-12-799963-0.00004-6.

SKÁLOVÁ, L. a kol. (2017). *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum, 171 s., ISBN: 978-80-246-3733-4.

SOENGAS P., RODRÍGUEZ V. M., VELASCO P., CARTEA M. E. (2018), *Effect of temperature stress on antioxidant defenses in Brassica oleracea*, ACS Omega 3, s. 5237-5243, doi: 10.1021/acsomega.8b00242.

ŠTĚPÁNEK J. (1992): *Arabidopsis Heynh. – huseníček*. – In: Hejný S., Slavík B., Kirschner J. & Křísa B. (eds), *Květena České republiky* 3, s. 115–116, Academia, Praha.

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE (2000), *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana*, Nature 408, s. 796–815, doi:10.1038/35048692.

TRIPATHY B. CH., OELMÜLLER R. (2012), *Reactive oxygen species generation and signaling in plants*, Plant Signaling & Behavior, s. 1621-1633, doi: 10.4161/psb.22455.

WANG J., CHEN J., LI X., LI D., LI Z., CUI H. (2020), *Pro-197-Ser Mutation in ALS and High-Level GST Activities: Multiple Resistance to ALS and ACCase Inhibitors in Beckmannia syzigachne*. Frontiers in Plant Science 11:572610. doi: 10.3389/fpls.2020.572610.

WANG M., LIU X., SHI L., LIU J., SHEN G., ZHANG P., LU W., HE L. (2020), *Functional analysis of UGT201D3 associated with abamectin resistance in Tetranychus cinnabarinus (Boisduval)*, Insect Science 27, s. 276-291, doi: 10.1111/1744-7917.12637.

WAŚKIEWICZ A., BESZTERDA M., GOLÍŃSKI P. (2014), *Oxidative Damage to Plants: Chapter 7 – Nonenzymatic antioxidants in plants*, Academic Press, s. 201-234, doi: 10.1016/B978-0-12-799963-0.00007-1.

WHITCOMB C. E., *An introduction to ALS-inhibiting herbicides* (1999), Lacebark Inc., Publications and Research, Oklahoma USA, DOI: 10.1191/074823399678846592.

YANG Q., DENG W., LI X., YU Q., BAIL., ZHENG M. (2016), *Target-site and non-target-site based resistance to the herbicide tribenuronmethyl in flixweed (Descurainia sophia L.)*, BMC Genomics 17: 551, doi: 10.1186/s12864-016-2915-8.

YANG Q., LI J., SHEN J., XU Y., LIU H., DENG W., LI X., ZHENG M. (2018), *Metabolic resistance to acetolactate synthase (ALS)- inhibiting herbicide tribenuron-methyl in Descurainia sophia L. mediated by cytochrome P450 enzymes*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 66(17): 4319-4327, doi: 10.1021/acs.jafc.7b05825.

YU C., DONG J., HU S., XU A (2017), *Exposure to trace amounts of sulfonylurea herbicide tribenuron-methyl causes male sterility in 17 species or subspecies of cruciferous plants*, BMC Plant Biology 17:95, doi: 10.1186/s12870-017-1019-1.

ZHAO N., YAN Y., LUO Y., ZOU N., LIU W., WANG J. (2019), *Unravelling mesosulfuron-methyl phytotoxicity and metabolism-based herbicide resistance in Alopecurus aequalis: Insight into regulatory mechanisms using proteomics*, Science of the Total Environment 670, s. 486-497, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.089.

ZHOU Q., LIU W., ZHANG Y., LIU K. K. (2007), *Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides*, Pesticide Biochemistry and Physiology, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.04.004>. ISSN 0048-3575.

9.2 Elektronické zdroje

Web 1 Plants of the world online: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [online]. [cit. 2022-01-06]. Dostupné z: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:277970-1#descriptions>

Web 2 Herbicide resistance action committee: *Global herbicide classification lookup* [online]. [cit. 2022-01-13]. Dostupné z: <https://hracglobal.com/tools/classification-lookup>

Web 3 *Tribenuron-methyl structuur* [online] [cit. 2022-01-21]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tribenuron-methyl_structuur.png

Web 4 *Pinoxaden* [online] [cit. 2022-01-21]. Dostupné z:
<https://www.wikidata.org/wiki/Q15632855#/media/File:Pinoxaden.svg>

Web 5 *Chemical structure of sulcotrione* [online] [cit. 2022-01-21]. Dostupné z:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chemical_structure_of_sulcotrione.png