

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta



Charakterizace fermentovaných kopřiv v závislosti na roční době
Characterisation of fermented nettles depending on the season

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Veronika Hýsková, Ph.D.
Konzultantka: RNDr. Kateřina Bělonožníková, Ph.D.

2024

Andrei Larkov

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne.....

Podpis:

Poděkování:

Rád bych poděkoval své vedoucí práce paní RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D za její nezastupitelnou pomoc při vypracování teoretických a praktických části této práce a za její trpělivost a své konzultantce paní RNDr. Kateřině Bělonožníkové, Ph.D. za vstřícnost při orientaci v laboratoři a provedení experimentů. Chtěl bych taky poděkovat paní prof. RNDr. Heleně Ryšlavé za rady při problémech s experimenty.

Dále bych chtěl poděkovat paní Mgr. Denise Vlčkové za rady ohledně provedení experimentů.

Abstrakt

Fermentované kopřivy (jícha) jsou pro rostliny bohatou směsí živin, esenciálních prvků a mikroorganismů, které se tradičně využívají pro zvýšení růstu, odolnosti a výnosu zahradních plodin. Tato práce se zaměřuje na biochemickou charakterizaci jíchy v závislosti na ročním období sběru kopřiv. Pro možné porovnání byly všechny výsledky vztaženy na množství lyofilizované jíchy. Zatímco množství proteinů se mezi jarní, letní a podzimní jíchou nelišilo, množství neutrálních sacharidů bylo vyšší v podzimní jíše. Naopak jarní jícha vynikala vyšším obsahem fenolických látek a vyšší antioxidační kapacitou, která může se zvýšenou obranyschopností rostlin souviset. Následně byla provedena optimalizace stanovení a porovnání aktivit vybraných hydrolytických enzymů, konkrétně proteas, fosfatasy a β -glukosidas, které pak v půdě souvisejí s degradací a poskytováním živin rostlinám. Výsledky nenaznačily rozdíly v enzymové aktivitě v závislosti na roční době sběru kopřiv a zdůraznily význam fermentujících mikroorganismů jako zdroje těchto enzymů. Nakonec byla provedena detekce proteolytické aktivity, což ukázalo rozmanitost i rozdílnou stabilitu proteas kopřivové jíchy v závislosti na způsobu jejího uchování. Studie přispívá k hlubšímu pochopení biostimulačních vlastností fermentovaných kopřiv a jejich potenciálnímu využití v zemědělství a zahradnictví.

Klíčová Slova: kopřivová jícha, biostimulanty, proteasy, fosfatasy, β -glukosidasa

Abstract

Fermented nettles are a rich blend of nutrients, essential elements and microorganisms that have traditionally been used to increase the growth, resistance and yield of garden crops. The present study focuses on the biochemical characterization of fermented nettles in relation to the season of nettle harvesting. For possible comparison, all results were related to the amount of freeze-dried fermented nettles. While the amount of protein did not differ between spring, summer and autumn fermented nettles, the amount of neutral carbohydrates was higher in autumn fermented nettles. On the other hand, spring fermented nettles were distinguished by a higher phenolic content and a higher antioxidant capacity, which may be related to increased plant defences. Subsequently, optimization of the determination and comparison of the activities of selected hydrolytic enzymes, namely proteases, phosphatases and β -glucosidases, which in turn are related to the degradation and provision of nutrients to plants in the soil, was carried out. The results indicated no differences in enzyme activity depending on the time of year of nettle harvest and highlighted the importance of fermenting microorganisms as a source of these enzymes. Finally, the detection of proteolytic activity was carried out, which showed the diversity as well as the different stability of nettle proteases depending on the storage method. The study contributes to a deeper understanding of the biostimulatory properties of fermented nettles and their potential use in agriculture and horticulture.

Key Words: nettle slurry, biostimulants, protease, phosphatase, β -glucosidase

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	9
1.1 Biostimulanty	9
1.1.1 Proteinové hydrolyzáty	11
1.1.2 Mikrobiální biostimulanty	12
1.1.3 Extrakty z mořských řas	13
1.1.4 Huminové látky	15
1.1.5 Anorganické látky	15
1.2 Kopřiva dvoudomá	16
1.3 Rostlinné enzymy	17
1.3.1 Rostlinné proteasy	17
1.3.2 Rostlinné fosfatasy	18
1.3.3 Rostlinná β -glukosidasa	19
2 Cíle práce	20
3 Materiál a metody	21
3.1 Použité přístroje	21
3.2 Použité chemikálie	21
3.3 Rostlinný materiál	22
3.4 Metody	23
3.4.1 Příprava extraktu z lyofilizované kopřivové jíchy	23
3.4.2 Stanovení koncentrace proteinů podle Lowryho	23
3.4.3 Stanovení celkového množství neutrálních sacharidů	24
3.4.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek	25
3.4.5 Stanovení antioxidační kapacity kopřivové jíchy	26
3.4.5.1 Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP	26
3.4.5.2 Stanovení antioxidační kapacity metodou ABTS	28
3.4.5.3 Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH	30
3.4.6 Optimalizace stanovení aktivity proteas	31
3.4.6.1 Stanovení závislosti aktivity proteas na pH	31
3.4.6.2 Stanovení závislosti aktivity proteas na čase	32
3.4.7 Optimalizace stanovení aktivity fosfatasy	32
3.4.7.1 Stanovení závislosti aktivity fosfatasy na pH	32
3.4.7.2 Stanovení závislosti aktivity fosfatasy na čase	33
3.4.8 Stanovení aktivity β -glukosidasy	33
3.4.9 Detekce aktivity proteas v gelu	33
3.4.9.1 Složení pufrů a gelů	34
3.4.9.2 Příprava vzorků	34
3.4.9.3 Elektroforetická separace	34
4 Výsledky	36
4.1 Obsah proteinů v kopřivové jíše	36
4.2 Obsah sacharidů v kopřivové jíše	37
4.3 Obsah celkových fenolických látek v kopřivové jíše	37
4.4 Antioxidační kapacita kopřivové jíchy	38
4.5 Aktivita proteas v kopřivové jíše	39
4.5.1 Závislost aktivity proteas na čase	39
4.5.2 Závislost aktivity proteas na pH	40

4.6	Aktivity fosfatas v kopřivové jíše.....	41
4.6.1	Závislost aktivity fosfatas na čase	41
4.6.1	Závislosti aktivity fosfatas na pH	43
4.7	Aktivita β -glukosidasy v jíše	43
4.8	Detekce proteolytické aktivity v jíších v závislosti na způsobu skladování	44
5	Diskuse.....	46
6	Závěr	48
	Seznam použité literatury.....	49

Seznam použitých zkratek

•ABTS	z angl. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
•BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
•DPPH	2,2-diphenyl-1-pikrylhydrazyl
•FRAP	antioxidační síla schopná redukovat železité ionty (z angl. ferric ion reducing antioxidant power)
•PH	proteinové hydrolyzáty
•PGPG	rhizobakterie podporující růst rostlin (z angl. plant growth promoting rhizobacteria)
•pNP	p-nitrofenol
•PSA	peroxodisíran amonný
•PVP	polyvinylpolypyrrolidon
•ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
•SDS	dodecylsíran sodný (z angl. sodium dodecyl sulphate)
•TPTZ	2,4,6-Tris(2-pyridyl-s-triazin)
•TEMED	N,N,N',N',-tetramethylethyldiamin
•Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 Úvod

1.1 Biostimulanty

Jedním z největších problémů moderního zemědělství je jeho negativní dopad na životní prostředí. Intenzivní chemické ošetřování pesticidy a anorganickými hnojivy může mít vliv na klíčové ekofyziologické vlastnosti rostlin a oslabit jejich symbiózu s mykorhizními houbami a endofytickými mikroorganismy^{1,2}. To může mít za následek nižší výnosy, horší kvalitu plodin a negativní dopad na půdu a vodní zdroje. Zvyšující se růst lidské populace a změna klimatu vyžaduje hledat nové způsoby udržitelného zemědělství a možnosti zvýšení výnosu plodin.

Hnojení zvyšuje efektivitu a zajišťuje lepší kvalitu produktů v zemědělských činnostech. Neorganická hnojiva hlavně obsahují fosfáty, dusičnany, amonné a draselné soli. V posledních letech došlo ke značnému nárůstu spotřeby hnojiv po celém světě, což způsobuje vážné environmentální problémy. Hnojení vede k znečištění vody, půdy a ovzduší. Alternativní cestou k řešení problému vyvolaných tradičními hnojivy jsou biostimulanty.

Termín biostimulant nebo biogenní stimulant definoval poprvé V.P. Filatov v roce 1954 jako „látky nespécifické povahy, které se tvoří v živých tkáních jako odpověď na nepříznivé, avšak neletální podmínky. Tyto látky mají schopnost stimulovat životní reakce organismu, do kterého jsou zavedeny.“³. Termín dále rozvinuli Russo a Berlyn. Podle nich jsou biostimulanty látky zvyšující růst a vitalitu rostlin tím, že zlepšují efektivitu příjmu živin a vody⁴. V následujících letech probíhalo další rozšíření a vývoj definice biostimulantu. McCarty popisoval biostimulanty jako „nejednoznačný termín, který se používá pro látky, které nepatří mezi živiny, ale podporují růst, např. se jedná o mikroby, růstové hormony rostlin, látky upravující půdu a látky, které jsou zdrojem energie pro mikroby“⁵. Moderní pohled na biostimulant představuje Du Jardin, který uvedl, že biostimulanty mohou modifikovat fyziologické procesy rostlin, což vede k potenciálnímu zlepšení růstu a reakce na stres, přičemž se zaměřil na konečný dopad na produktivitu rostlin, a Bulgari, který definoval biostimulanty jako produkty, které zlepšují růst rostlin v malých dávkách a jsou šetrné k životnímu prostředí, čímž potvrdil jejich ekologický aspekt^{6,7}. Podle autora přehledného článku o vývoji termínu biostimulant, Yahkina et al. 2017 biostimulanty jsou „produkty převážně založené na přírodních látkách, používané ve velmi malých a malých dávkách k modifikaci fyziologických a biochemických procesů v rostlinách s cílem co nejvíce využít jejich genetický potenciál produktivity prostřednictvím změn hormonálního stavu, aktivace metabolických procesů, zvýšení účinnosti výživy, stimulace růstu, vývoje a posílení schopnosti odolávat negativním vlivům různých stresových faktorů“. Legislativa týkající se biostimulantů je složitá a vyžaduje pečlivé zvažování, jak tento termín vyhovuje daným právním rámcům pro produkty ochrany rostlin a hnojiva. Nařízení (EU) č. 2019/1009 o uvedení hnojiv a dalších produktů na trh v EU obsahuje ustanovení, která se týkají biostimulantů. Podle tohoto nařízení musí biostimulanty splňovat specifické požadavky na označování a složení a mohou obsahovat přírodní nebo syntetické složky, které pozitivně ovlivňují růst rostlin. Nařízení v EU definuje biostimulanty jako produkty, které zlepšují růst a odolnost rostlin a přispívají k využití živin, aniž by byly považovány za hnojiva nebo pesticidy⁸.

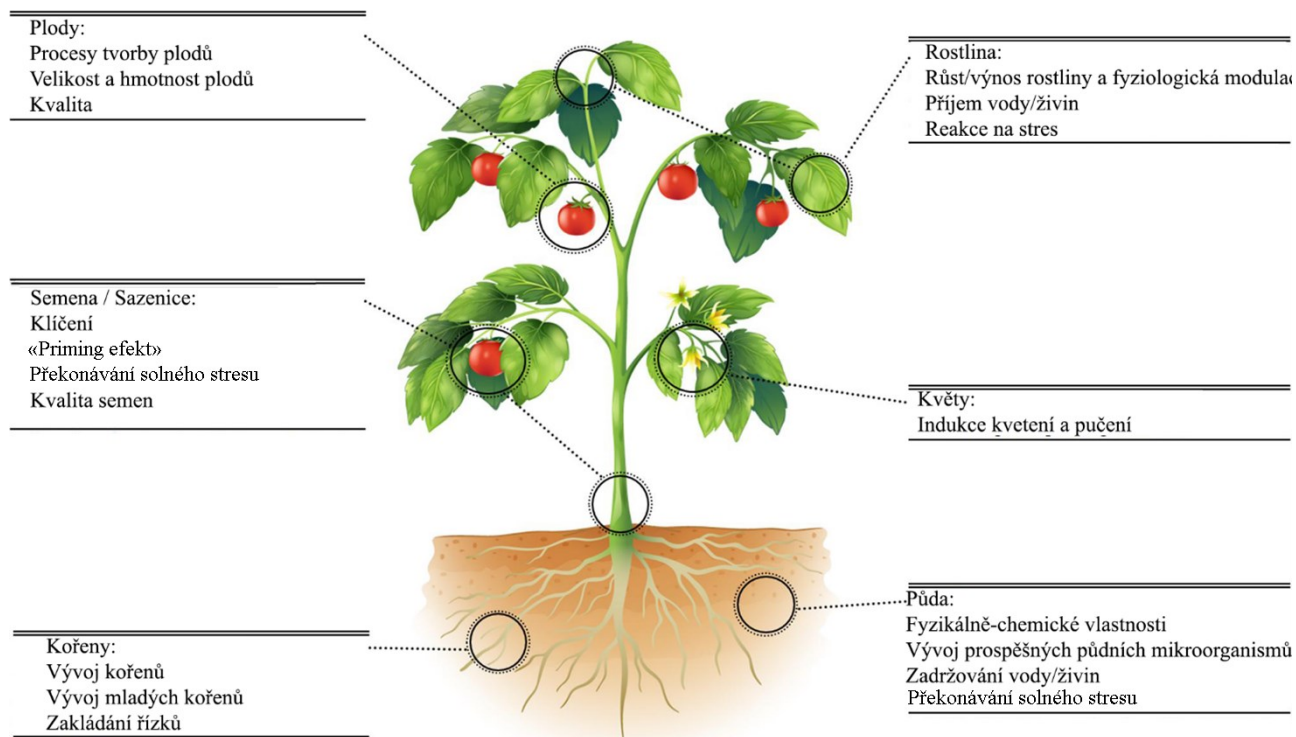
Biostimulanty nejsou jenom definovány různými termíny, ale rovněž jsou klasifikovány do různých skupin. Přehled různých typů biostimulantů tak jak byly klasifikovány různými autory je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Klasifikace biostimulantů navrhována ve vybraných studiích ⁹.

Studie	Filatov, 1951b	Calvo et al. (2014)	Halpern et al. (2015)	Du Jardin (2015)	Torre et al. (2016)
1. Skupina	Karboxylové kyseliny (kyselina šťavelová a kyselina jantarová)	Humínové látky, humínové a fulvové kyseliny			
2. Skupina	Hydroxykyseliny (kyselina jablečná a vinná)	Složité organické materiály	Inokula mikrobiálních látek	Přípravky obsahující proteinové hydrolyzáty a aminokyseliny	Proteinové hydrolyzáty a další sloučeniny obsahující dusík
3. Skupina	Nenasycené mastné kyseliny, aromatické a fenylové kyseliny (kyselina skořicová a hydroxykyselina skořicová, kumarin)	Rostlinám prospěšné chemické prvky	Mikroorganismy podporující růst rostlin (včetně mykorrhizních hub)	Výtažek z mořských řas	Extrakty z mořských řas a rostlinné extrakty
4. Skupina	Aromatické kyseliny obsahující několik benzenových kruhů spojených přes uhlíkové atomy (humínové kyseliny)	Proteinové hydrolyzáty a aminokyseliny	Anorganické sloučeniny	Chitosan a další biopolymery	Anorganické soli
5. Skupina	–	Extrakty z mořských řas	Rostlinám prospěšné houby	–	–
6. Skupina	–	–	Rostlinám prospěšné bakterie	–	–

V úvodu této práce budou podrobněji zmíněna inokula mikrobiálních látek, humínové látky, proteinové hydrolyzáty, anorganické sloučeniny a extrakty z mořských řas.

Biostimulanty vyvolávají v rostlinách biochemické reakce, které jsou často spojeny s aktivací genů nebo s regulací exprese genů^{10,11}. Tyto reakce mohou zahrnovat zvýšenou syntézu enzymů, které podporují rozklad organických sloučenin a zvyšují dostupnost živin, jako jsou fosfatasy, které hydrolyzují organické fosfáty. Dále mohou biostimulanty stimulovat biosyntézu fytohormonů, jako je auxin, cytokinin nebo kyselina abscisová, což má za následek podporu růstu kořenů, zvýšenou tvorbu listů a stimulaci kvetení a tvorbu plodů. Biostimulanty mohou také interagovat s půdní mikroflórou a mikroorganismy, což vede k rozvoji symbiotických vztahů a zvýšení bioaktivních procesů v půdě. Mezi tyto interakce patří zvýšená produkce půdních enzymů, které zlepšují mineralizaci organické hmoty a uvolňování živin pro rostliny, nebo produkci auxinu, hormonu stimujícího růst mikroorganismy v rhizosféře. Na obrázku 1 jsou znázorněny doposud objasněné účinky biostimulantů.



Obrázek 1. Přehled hlavních fyziologických účinků rostlinných biostimulantů¹².

1.1.1 Proteinové hydrolyzáty

Proteinové hydrolyzáty jsou v podstatě směsí aminokyselin a rozpustných peptidů, které se převážně získávají enzymovými, tepelnými a chemickými procesy z bílkovin živočišného nebo rostlinného původu.

Aplikace proteinových hydrolyzátů (PH) ovlivňuje růst a výživu rostlin, toleranci vůči abiotickým stresům a také mikroorganismy v rhizosféře^{13,14}. Tyto produkty podporují růst nadzemní části rostlin a kořenů například díky přítomnosti biostimulačních peptidů a aminokyselin, které jsou prekurzory některých fytohormonů (např. tryptofan jako prekurzor auxinu).

PH také mohou pozitivně ovlivnit asimilaci dusíku rostlinami. Organický dusík obsažený v aminokyselinách a peptidech může představovat přímý zdroj dusíku pro rostliny, protože jsou rychle absorbovány, asimilovány a translokovány do nadzemní části. Nicméně je důležité zdůraznit, že PH jsou obvykle aplikovány ve velmi nízkých koncentracích, takže samy nepředstavují významný zdroj dusíku pro rostliny. Navíc bylo prokázáno, že některé PH živočišného původu mohou snížit příjem dusičnanů kořeny a negativně ovlivnit efektivitu využití dusíku.

Pozitivní účinky PH na výživu rostlin jsou spojeny se zvýšením dostupnosti živin díky schopnosti peptidů a aminokyselin tvořit komplexy s minerálními látkami a zvýšit tak jejich rozpustnosti. Tento efekt je velmi užitečný zejména pro zvýšení bio-dostupnosti mikroživin, jako je železo, mangan a zinek v alkalických půdách.

PH také mohou zlepšit výživu plodin aktivací specifických kořenových enzymů zapojených do procesu vstřebávání živin¹⁵. Například kořenové a foliární aplikace PH z rostlinných zdrojů stimulovala aktivitu ferric-chelát-reduktasy (EC 1.16.1.7) v kořenech rajčat tím, že zvýšila absorpci

kationtů železa za podmínek alkalického stresu. Tento vliv na aktivitu ferric-chelát-reduktasy byl méně výrazný při použití PH živočišného původu¹⁶.

Kromě zlepšení příjmu, translokace a akumulace živin mohou PH také zvýšit toleranci rostlin vůči abiotickým stresům, jako jsou suboptimální teploty, salinita, sucho a nízké světelné podmínky. Například foliární aplikace PH zvýšila toleranci salátu vůči nízkým teplotám¹⁷.

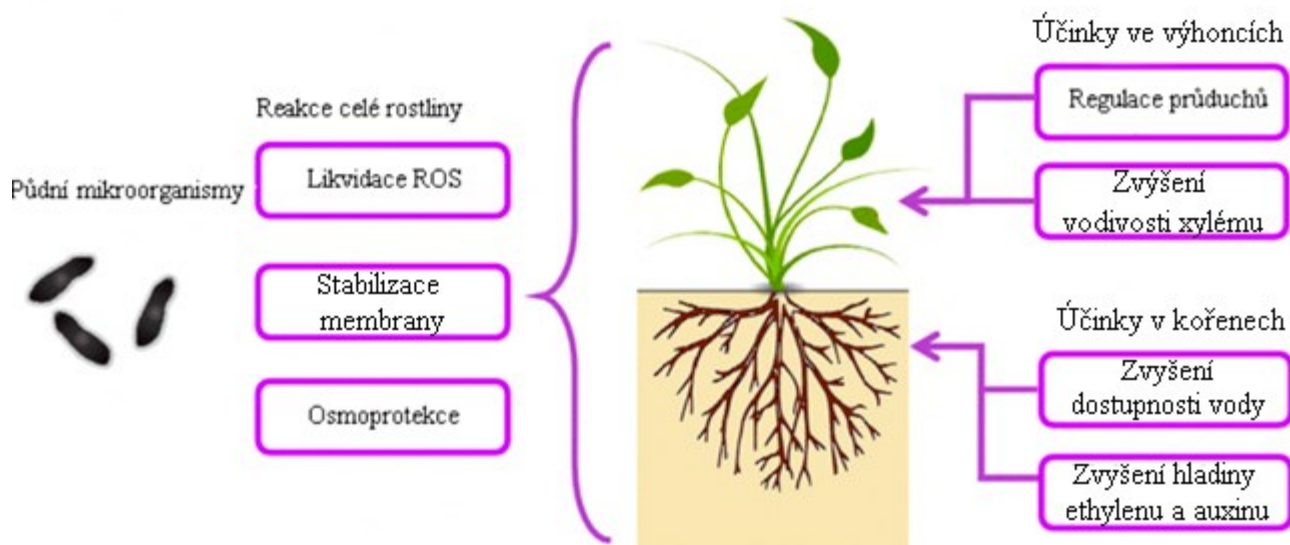
Obecně jsou pozitivní účinky PH na toleranci vůči abiotickým stresům přičítány lepšímu růstu kořenového systému, vyššímu poměru kořenů/květů, lepšímu stavu výživy rostlin, vyšší stabilitě buněčných membrán, akumulaci osmolitů (např. prolinu) a antioxidantů a také aktivaci enzymových systémů podílejících se na prevenci oxidačního stresu a modifikaci hormonálního stavu.

PH mohou zlepšit kvalitu ovoce a zeleniny díky zvýšení fotosyntézy a aktivaci sekundárního metabolismu v buňkách. Foliární aplikace rostlinných PH indukovala vysokou akumulaci cukrů a antioxidantů (karotenoidy, polyfenoly atd.)¹⁸.

PH také mohou zvýšit další kvalitativní atributy ovoce, protože PH dodávají mnoho aminokyselin, které jsou prekurzory sloučenin odpovědných za aroma (alanin, isoleucin, leucin a valin), barvu (například fenylalanin je prekurzor biosyntézy anthokyaninů) a chuť¹⁹.

1.1.2 Mikrobiální biostimulanty

Mikrobiální biostimulanty představují skupinu produktů využívajících mikroorganismy, jako jsou bakterie, jednobuněčné houby nebo řasy, k podpoře růstu rostlin. Tyto mikroorganismy mohou být buď přímo součástí půdy nebo jsou aplikovány jako doplňkový produkt. Jednou z kategorií mikroorganismů, které patří do biostimulantů jsou rhizobakterie stimulující růst rostlin (PGPR z angl. Plant growth-promoting rhizobacteria). PGPR prokázaly schopnost vyvolat příznivý účinek na růst rostlin za podmínek nutričního a abiotického stresu nebo při obnově znečištěných půd.



Obrázek 2. Klíčové mechanismy působení půdních mikroorganismů jako biostimulantů²⁰.

Některé druhy PGPR jsou například schopny produkovat 1-aminocyklopropan-1-karboxylát deaminasu (ACC-deaminasu), enzym, který katalyzuje přeměnu ACC, prekurzoru ethylenu, na α -ketobutyrát a amoniak^{21,22}. Následně vylučování ACC-deaminasy způsobuje snížení hladiny ethylenu jak v rostlině, tak v půdě, s následným snížením účinků stresu na rostliny. Bakterie produkující ACC-

deaminasu regulací syntézy ethylenu regulují v signálních drahách i syntézu kyseliny jasmonové a salicylové. Kyselina jasmonová je endogenní regulační fytohormon, který hraje důležitou roli v různých vývojových procesech, protože je zapojen do klíčových signálních drah v biotických i abiotických odpovědích.

Různé studie prokázaly, že rostliny inokulované PGPR měly vyšší efektivitu odstraňování reaktivních forem kyslíku (ROS)²³⁻²⁶. V důsledku toho bylo v pletivech inokulovaných rostlin detekováno nižší množství peroxidu vodíku a malondialdehydu, markeru lipidové peroxidace, ve srovnání s neošetřenými rostlinami. Snížení hladin ROS za různých stresových podmínek může být částečně vysvětleno zvýšením aktivity antioxidantních enzymů inokulovaných rostlin za abiotických stresových podmínek. Na druhé straně v některých rostlinách např. v kultivaru obilovin citlivého na sucho bylo detekováno snížení aktivity antioxidantních enzymů v mykorhizních kořenech. Důsledkem interakce PGPR s rostlinami jsou také neenzymové antioxidanty, jako jsou polyfenoly, organické kyseliny, vitamíny, karotenoidy a glutathion, které rovněž významně ovlivňují reakce rostlin na oxidativní stres. Například bylo již dříve prokázáno, že akumulace prolinu a glycin-betainu může být užitečná pro prevenci buněčného oxidačního poškození v případě PGPR inokulovaných rostlin.

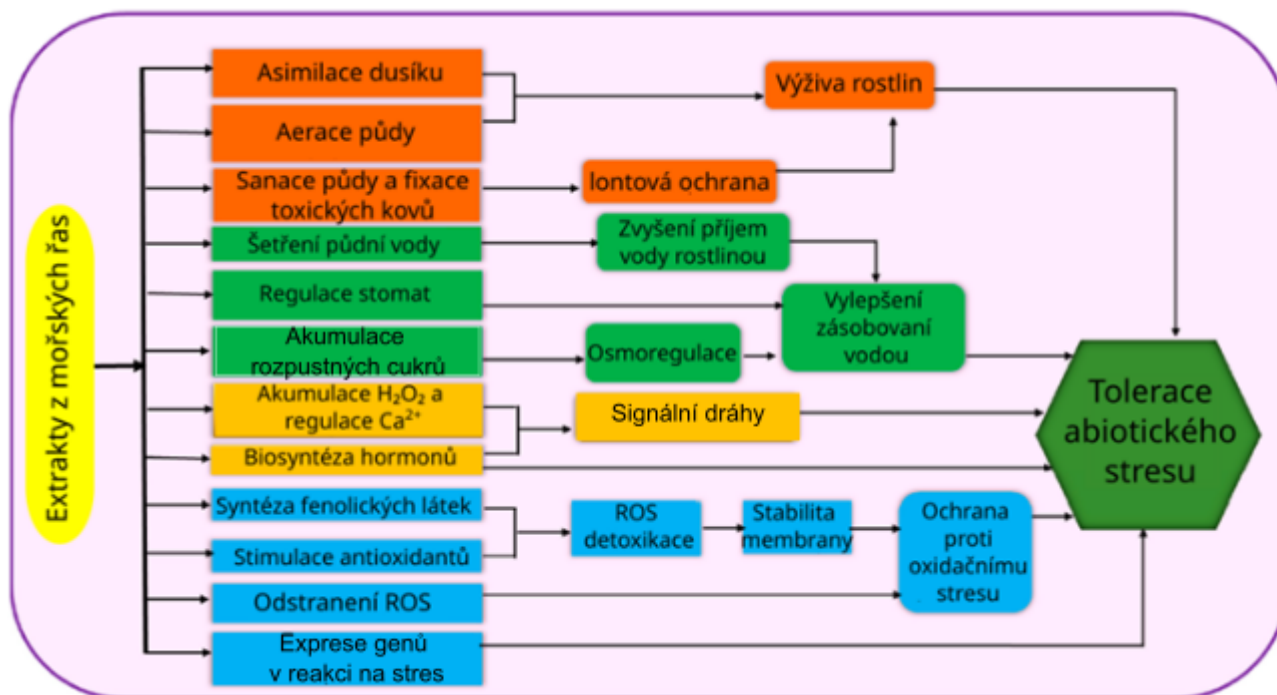
Několik studií prokázalo, že aplikace PGPR může ovlivnit rostlinné parametry související se zvyšováním vodního potenciálu v listech (rychlostí transpirace listů, vodivosti průduchů a relativního obsahu vody, nebo jiných faktorů, které mohou mít pozitivní účinky na efektivitu využití vody) a může ovlivnit fotosyntetickou aktivitu nejen za stresových podmínek sucha a zasolení, ale i za optimálních podmínek^{27,28}. Navíc byl pozorován nárůst obsahu fotosyntetických pigmentů u několika druhů rostlin. Zejména byl patrně nejvíce ovlivněn obsah chlorofylů. Důvodem může být, že symbióza s PGPR neutralizuje negativní účinek stresujících podmínek, potlačuje degradaci fotosyntetických pigmentů a zvyšuje maximální výtěžek fotosystému II.

Zároveň bylo prokázáno, že inokulace PGPR může přispět k příjmu minerálů, produkci sideroforů, fixaci atmosférického dusíku a solubilizaci fosfátů, čímž ovlivňuje efektivitu využívání živin²⁹. Pokud jde o příjem minerálů, zdá se, že některé důležité prvky, jako jsou K, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn a Cu, jsou lépe absorbovány, zatímco toxické prvky, včetně Na, jsou lépe sekretovány³⁰. Různé studie spojovaly vyšší příjem minerálů s morfologickým zlepšením architektury kořenů zaznamenaným po inokulaci PGPR. Nicméně tyto jevy by mohly být také vysvětleny nadměrnou tvorbou selektivních iontových kanálů, které v některých případech vedou ke zlepšení poměru K^+/Na^+ , což je důležitý mechanismus, který zvyšuje toleranci rostlin k salinitě prostředí³¹.

Další možný mechanismus, jak mohou PGPR pomoci rostlinám efektivně přijímat živiny, souvisí s jejich schopností acidifikovat půdu^{32,33}. Některé PGPR jsou schopny syntetizovat organické kyseliny a vylučovat je do půdy, čímž usnadňují solubilizaci anorganických fosfátů a draselných iontů. Navíc studie ukázaly, že jsou PGPR také schopny produkovat fytasy a kyselou fosfatasu, které zvyšují mineralizaci fosfátů^{34,35}.

1.1.3 Extrakty z mořských řas

Extrakty z mořských řas jsou novým typem produktů, které se v současné době mohou používat v pěstování rostlin. Mořské řasy jsou podle vědců klasifikovány jako důležitá skupina organismů, které lze široce využít v rostlinné výživě. Na obrázku 2 jsou uvedeny mechanismy působení extraktů z mořských řas na rostliny.



Obrázek 3. Obecné mechanismy působení extraktu z mořských řas na růst a vývoj rostlin³⁶.

Výzkumy ukazují, že aplikace extraktů z mořských řas má pozitivní účinek na pěstované rostliny^{37,38}. Extrakt z řas zvyšuje odolnost rostlin proti mrazu a suchu a zvyšuje výnos plodin. Rostliny postříkované extrakty z mořských řas jsou také charakterizovány vyšší odolností vůči škůdcům a patogenům a efektivnějším využíváním živin z půdy. Extrakt z mořských řas přispívá k obnově škod způsobených hmyzem a bakteriálními nebo plísňovými chorobami.

Přípravky založené na extraktech z řas jsou bohaté na fytohormony (gibereliny, auxiny, cytokininy), které jsou hlavně zodpovědné za zpoždění stárnutí rostlin, indukci mitózy, stimulaci zrání chloroplastů, růst lodyh a postranních pupenů, aminokyseliny a mastné kyseliny, které jsou zodpovědné za růst, vývoj a odolnost rostlin vůči patogenům³⁹⁻⁴¹. Množství cytokininů v extraktech různých řas se mění a jejich poměr k dalším růstovým hormonům rostlin závisí na druhu řas, což má za následek různé účinky extraktů z mořských řas na metabolismus rostlin.

Extrakt z mořských řas lze aplikovat na rostliny několika způsoby. Namáčení semen v extraktech z řas představuje jednu z těchto metod. Tento způsob aplikace ovlivňuje zejména klíčení semen. Dále může být také použito klasické postříkávání listů nebo aplikace do půdy. Účinnost extraktů z mořských řas jako biostimulantů ovlivňuje zejména koncentrace samotného extraktu, způsob aplikace stejně jako druh řas a odrůda rostlin.

Extrakt jak mikro-, tak makrořas byly použity k zvýšení výnosů plodin a potravinářské produkce v různých částech světa zejména v souvislosti s pozitivním vlivem na půdní vlastnosti⁴².

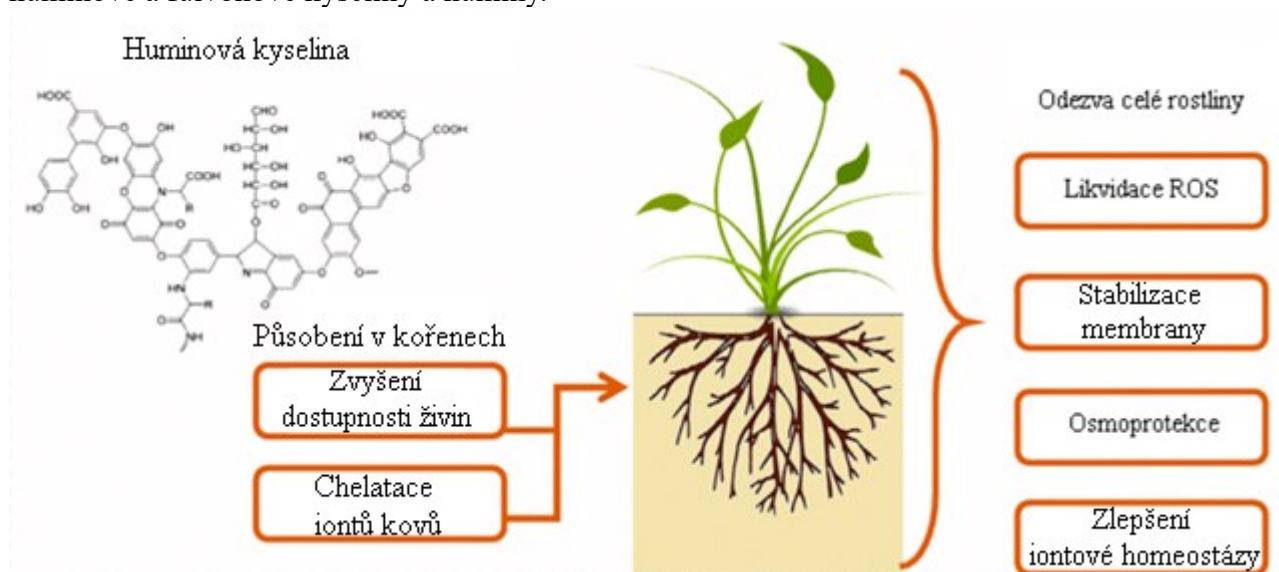
Vyšší obsah živin v listech způsobující intenzivnější růst a zvýšená odolnost vůči suchu byla prokázána u vinné révy ošetřené extrakty z mořských řas⁴³. Foliární aplikace extraktů získaných z chaluhy *Ascophyllum nodosum* na ovocné stromy (například jabloně) vedla k intenzivnějšímu růstu listů⁴⁴. Plody byly obvykle větší a i úroda byla bohatší.

Byl také pozorován pozitivní účinek aplikace extraktů z mořských řas na výnos sóji^{45,46}. Foliární aplikace extraktů v různých koncentracích vedla k vyššímu výnosu, intenzivnějšímu růstu a lepšímu

vstřebávání živin sóji. Reakce rostlin mrkve a petržele ošetřené extrakty z mořských řas je dalším příkladem pozitivního účinku na jejich metabolismus⁴⁷. Bylo prokázáno, že namáčení semen v extraktech z řas zlepšilo schopnost klíčení a mělo pozitivní vliv na makronutrienty v kořenech mrkve.

1.1.4 Huminové látky

Huminové látky přítomné v půdě vznikají prostřednictvím mikrobiálních procesů a přispívají k regulaci mnoha zásadních ekologických a environmentálních procesů. Například huminové látky regulují jak cyklus uhlíku a dusíku v půdě, tak růst rostlin a mikroorganismů, osud a transport antropogenních sloučenin a těžkých kovů a stabilizaci struktury půdy. Hlavními zástupci jsou huminové a fulvonové kyseliny a huminy.



Obrázek 4. Klíčové mechanismy působení huminových a fulvových kyselin jako biostimulantů²⁰.

Transport dusičnanů přes plazmatickou membránu je usnadněn iontovými kanály, tj. sekundárním aktivním transportem, který vyžaduje protonový elektrochemický gradient generovaný indukci H^+ -ATPasy (primární transport)⁴⁸⁻⁵⁰. Huminové látky indukují aktivitu H^+ -ATPasu, která následně může dodávat energii sekundárním iontovým transportérům a podporovat příjem živin. Vytváření rozpustných komplexů huminových látek s mikronutrienty, tj. ion kovu–huminové komplexy, je často popisováno jako strategie ke zlepšení výživy rostlin stopovými prvky, protože ionty kovů mohou být chráněny před vymýváním a stát se tak více dostupnými pro rostliny.

Huminové látky mohou podporovat růst rostlin prostřednictvím indukce metabolismu uhlíku a dusíku⁵¹. Nitrátreduktasa (EC 1.7.1.1), glutamátdehydrogenasa (EC 1.4.1.2-4) a glutaminsyntetasa (EC 6.3.1.2) jsou rostlinné enzymy spojené s asimilačními dráhami dusíku a mohou být stimulovány různými huminovými látkami za různých podmínek.

Po ošetření plodin huminovými látkami byl zjištěn 50 % pokles obsahu celkových sacharidů v listech ve srovnání s kontrolními rostlinami, zatímco však obsah glukosy a fruktosy klesl, zvýšil se obsah škrobu^{52,53}.

1.1.5 Anorganické látky

Chemické prvky, které podporují růst rostlin a mohou být zásadní pro určité taxony, ale nejsou nezbytné pro všechny rostliny, se nazývají prospěšné prvky. Těchto pět hlavních prvků je Al, Co, Na, Se a Si, které jsou přítomné v půdách a rostlinách ve formě různých anorganických solí, případně nerozpustných forem, jako je amorfní křemičitan^{54,55}. Například bylo prokázáno, že hliník podporuje

růst rostliny *Miscanthus sinensis*⁵⁶. Bylo prokázáno, že ionty sodíku jsou nezbytným prvkem pro rostliny využívající C4 nebo CAM fotosyntetické dráhy⁵⁷. Selen má několik příznivých účinků na růst rostlin, ačkoliv pro většinu rostlin není považován za esenciální⁵⁸.

Vliv prospěšných prvků zahrnuje podporu růstu rostlin, podporu kvality rostlinných produktů a toleranci vůči abiotickému stresu⁵⁹. Konkrétně se jedná například o zpevnění buněčných stěn, osmoregulaci, sníženou transpiraci krystalickými inkrustacemi, termoregulaci prostřednictvím odrazu záření a zvýšenou aktivitu enzymů, výživu rostlin prostřednictvím interakcí s jinými prvky během příjmu a mobility, ochranu proti oxidaci, interakce se symbiotickými mikroorganismy, obranná odpověď vůči patogeny a býložravce, ochranu proti toxicitě těžkých kovů, syntézu a signalizaci rostlinných hormonů.

1.2 Kopřiva dvoudomá

Kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica* L.) je vytrvalá rostlina z čeledi kopřivovitých (*Urticaceae*), patřící do rodu *Urtica*⁶⁰⁻⁶². Bylina roste v mírných oblastech Evropy, Asie, severní Afriky a Severní Ameriky. Drobné dvoudomé květy, které se objevují od května do září, jsou hnědé až zelené. Kopřiva má oddenek a kořenový systém s hlavním kořenem a jemnými kořínky, což umožňuje její rozšiřování.

Různé druhy rodu *Urtica* jsou uváděny jako bohaté zdroje živných složek, jako jsou aminokyseliny, organické kyseliny, sacharidy, steroidy a terpenoidy, mastné kyseliny a ceramidy, karotenoidy a fenolické látky, vitamíny a minerály⁶³.

Flavonoidy, jako jsou kvercetin a kaempferol, jsou jedny z nejvýznamnějších složek kopřivy^{64,65}. Kvercetin je známý svou silnou antioxidační aktivitou, která pomáhá redukovat volné radikály a chrání buňky před oxidačním stresem.

Kopřiva rovněž obsahuje fenylové kyseliny, zejména kyselinu chlorogenovou^{64,65}. Tato kyselina má silné antioxidační účinky, které pomáhají ochránit lipidy, proteiny a DNA před oxidačním poškozením.

Významné složky jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2. Bioaktivní chemické složky kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*)^{66,67}.

Chemická skupina	Sloučeniny
Flavonoidy	Amentoflavon, apiin, apigenin, apigenin 7-O-β-D-glukosid, bajkalin, bajkalein, katechin, epikatechin, epigalokatechin galát, chrysoeriol, genistein, isorhamnetin, kvercetin, kempferol, kempferol 3-O-β-D-glukosid, luteolin, luteolin 7-O-β-D-glukosid, myricetin, naringenin, rutin, vitexin.
Fenolické kyseliny	Kyselina gallová, kyselina vanilová, kyselina syringová, kyselina protokatechová, kyselina gentisová, kyselina skořicová, kyselina kávová, kyselina p-kumarová, kyselina ferulová, kyselina chlorogenová, kyselina sinapová.
Esenciální olej	Estery 14,7 %, volné alkoholy 2 %, a ketony 38,5 % identifikované jako 2-methyl-2-hepten-2-on, acetoferon a ethylketon, a stopy dusíkatých látek, fenolů, aldehydů
Mastné kyseliny	6,8 % kyselina palmitová, 1,1 % kyselina stearová, 3,6 % kyselina olejová, 20,2 % kyselina linolová, 12,4 % kyselina linolenová, kyselina arachidonová, kyselina behenová, kyselina eruková, kyselina laurová, atd.
Karotenoidy	β-Karoten (2,95–20 mg/100 g v čerstvých rostlinách, 20,2 mg/100 g v mladých rostlinách), hydroxy-α-karoten (0,9 %), lutein epoxid (13,1 %), a violaxanthin (14,7 %), β-karoten, neoxanthin, violaxanthin
Aminokyseliny	Alanin, γ-aminomáselná kyselina (GABA), kyselina glutamová, isoleucin, leucin, fenylalanin, prolin, tyrosin, valin
Organické kyseliny	Kyselina octová (36–269 mg/100g), kyselina citrónová, kyselina mravenčí, kyselina jablečná, kyselina jantarová
Vitaminy	Kyselina askorbová (36–269 mg/100g), Vitamin B2-riboflavin 1,5mg/100 g v sušených listech, kyselina pantotenová, Vitamin K1 0,64 g/100 g
Minerály	Silikáty ve velkém množství (1–4 % SiO ₂) vápník, železo, hořčík, fosfor, draslík a sodík

1.3 Rostlinné enzymy

1.3.1 Rostlinné proteasy

Proteasy jsou enzymy, které štěpí peptidovou vazbu v peptidech a proteinech. Proteasy mají v organismech mnoho funkcí a úloh^{68–71}. Proteasy hrají klíčovou roli v růstu, reprodukci, vývoji, fotosyntéze, programované buněčné smrti, imunitní odpovědi a obraně proti nežádoucímu stresu u rostlin. Klasifikace proteas může být založena na různých kritériích, jako je struktura enzymu, mechanismus štěpení vazeb, substrátová specifita. Podle substrátové specifity mohou být proteasy klasifikovány jako „trypsin-like“ (štěpí po argininu a lysinu), „chymotrypsin-like“ (štěpí po aromatických aminokyselinách), „elastasa-like“ (štěpí po alaninu a glycinu), aminoproteasy (štěpí aminokyselinové zbytky na N-konci) a karboxyproteasy (štěpí aminokyselinové zbytky na C-konci).

Podle aminokyselin v aktivním centru mohou být proteasy rozděleny do pěti tříd: serinové, cysteinové, aspartátové, metaloproteinasy a threoninové. Serinové proteasy jsou nejpočetnější třídou

a mají katalytické serinové zbytky, cysteinové proteasy obsahují cysteinové zbytky, aspartátové proteasy obsahují katalytické aspartátové zbytky a metaloproteiny obsahují kovové ionty jako kofaktory. Threoninové proteasy jsou vzácné a mají katalytické threoninové zbytky.

Podle mechanismu štěpení vazeb mohou být proteasy klasifikovány jako endoproteasy, které štěpí peptidové vazby uvnitř peptidového řetězce, a exoproteasy, které štěpí peptidové vazby na koncích peptidového řetězce.

Proteasy mají zásadní význam pro programovanou buněčnou smrt a reakci na environmentální podněty⁷²⁻⁷⁴. Proteasy regulují kvalitu a homeostázu proteinů v různých rostlinných organelách a degradaci foto-poškozených proteinů. Homeostáza proteinů je udržována kontrolou rychlosti syntézy a degradace proteinů prostřednictvím regulačního mechanismu rostlin. Proteasy hrají klíčovou roli ve zvyšování dostupnosti peptidů v půdě pro rostliny.

1.3.2 Rostlinné fosfatasy

Fosfatasy (EC 3.1.3.1-2) katalyzují hydrolyzu esterů kyseliny fosforečné na fosfátový ion a příslušný alkohol. Fosfatasy jsou důležité pro mnoho biochemických procesů v organismech, včetně regulace metabolismu sacharidů, tuků a nukleových kyselin, a také pro řízení signálních drah v buňkách^{75,76}.

Fosfatasy se dělí podle jejich pH optima na dvě skupiny: kyselé a alkalické⁷⁷.

Některé kyselé fosfatasy recyklují fosfát ve vakuolách rostlin trpících nedostatkem anorganického fosfátu, zatímco jiné získávají fosfát z extracelulárních fosfátových esterů. Aby bylo možné uvolnit volný rozpustný fosfát a zpřístupnit ho pro různé reakce v rostoucích semenáčcích, musí být fosfát v semenech nejprve hydrolyzován pomocí cytosolové fosfatasy. Kyselé fosfatasy v kořenech napomáhají rozkladu organických fosfátů na rozpustné fosfáty a jejich efektivnímu příjmu rostlinami⁷⁸.

Existují důkazy, že některé rostliny vylučují více kyselých fosfatů při nízké hladině fosfátu⁷⁹. Předpokládá se, že intracelulární a vylučované kyselé fosfatasy hrají významnou roli při získávání a využívání fosfátů z bohatých fosfátových zdrojů. Je nepochybné, že intracelulární kyselé fosfatasy se podílejí na běžném využívání fosfátových rezerv nebo jiných sloučenin obsahujících fosfát. Rostliny vyvinuly různé adaptační mechanismy pro zlepšení dostupnosti a zvýšení příjmu fosfátů v reakci na dlouhodobý nedostatek fosfátu, přičemž jedním z těchto mechanismů je uvolnění fosfátu z organických forem. Například v rajčatech a jiných rostlinách bylo pozorováno zvýšení hladiny kyselých fosfatů v době stresu a nedostatku živin, zejména fosfátu. Výzkumy ukazují, že raná deprivace fosfátu v rajčatech zvyšuje aktivitu kyselých fosfatů v celých rostlinách i v suspenzních kulturách buněk, což naznačuje obranné mechanismy při nedostatku fosfátů u vyšších rostlin⁸⁰.

Bylo také zjištěno, že solný stress zvyšuje aktivitu kyselých fosfatů v semenech *Arabidopsis thaliana*⁸¹. Snížení klíčivosti za podmínek solného stresu je pravděpodobně způsobeno sníženou aktivitou fosforolytických enzymů, zejména kyselých fosfatů. Schopnost tolerance vůči soli je tedy spojena s vyšší aktivitou kyselých fosfatů a jejich aktivací při solném stresu.

1.3.3 Rostlinná β -glukosidasa

β -glukosidasy (β -D-glukosid glukohydrolasa, EC 3.2.1.21) patří mezi jedny z prvních objevené a dobře prostudované enzymy díky své univerzální distribuci, široké škále substrátů a jednoduchému způsobu testování⁸². Tyto enzymy jsou biologicky významné, jelikož katalyzují přenos glykosylových skupin mezi kyslíkovými nukleofily. Tento přenos vede k hydrolyze β -glukosidových vazeb mezi zbytky sacharidů v různých sloučeninách, jako jsou aryl-amino-, nebo alkyl- β -D-glukosidy, kyanogenní glukosidy, krátké oligosacharidy a disacharidy za fyziologických podmínek.

V rámci obranných odpovědí β -glukosidasy mohou řídit rozklad glykosidů, které uvolňují toxické sloučeniny, jako jsou kyanidy a hydroxamové kyseliny, a jejich aktivace je řízena β -glukosidasami⁸³⁻⁸⁵. Tyto obranné sloučeniny jsou často skladovány ve vakuolách, zatímco enzymy, které je aktivují, se nacházejí v jiných buněčných kompartmentech a teprve po poškození buňky vlivem stresu vyvolaném býložravcem se β -glukosidasa dostává ke svému substrátu, kyanogennímu glykosidu a uvolňuje se HCN. Obranné mechanismy zprostředkované β -glukosidasami jsou také nezbytné pro endofytické houby k vytvoření symbiotických vztahů s rostlinami, přičemž zřejmě modulují růst těchto mikroorganismů⁸⁶.

V rostlinách se nachází mnoho fytohormů ve formě glukosidů, u nichž není jasné, zda jsou konečnými inaktivními produkty nebo skladovacími formami, které mohou být aktivovány specifickými β -glukosidasami⁸⁷. U částečně purifikovaných rýžových β -glukosidas bylo prokázáno, že hydrolyzují glukosidy gibberelinů, zatímco kukuřičná β -glukosidasa aktivuje cytokininy v glukosidové formě. Identifikován byl také enzym, který hydrolyzuje auxinový glukosylester, ale jeho povaha zatím není zcela objasněna⁸⁸.

Striktosidin, meziprodukt monoterpenoidních alkaloidů, je hydrolyzován specifickou cytoplazmatickou β -glukosidasou, což umožňuje jeho přeměnu na různé monoterpenové alkaloidy v závislosti na rostlině⁸⁹. Tento enzym byl charakterizován u několika rostlin, včetně *Rauvolfia serpentina*, kde byla jeho struktura detailně popsána⁹⁰. Jedním z produktů striktosidinu je raucaffricin, který je dále metabolizován na ajmalin pomocí raucaffricinové β -glukosidasy. Nedávno byla izolována další β -glukosidasa hydrolyzující alkaloidní glukosidy z *Psychotria ipecacuanha*, čímž se toto téma dále rozšířilo⁹¹. β -Glukosidasy tedy hrají klíčovou roli v metabolismu, kde uvolňují D-glukosu z meziproduktů.

Buněčná stěna rostlin je největším rezervoárem sacharidů v přírodě, přičemž mnoho z nich tvoří β -vázané glukosylové zbytky, což naznačuje významnou roli β -glukosidas při vývoji buněčné stěny^{92,93}. β -Glukosidasy se podílejí jak na degradaci oligosacharidů vznikajících při obnově buněčné stěny, tak na uvolňování monolignolů z jejich glykosidů, což umožňuje lignifikaci a stabilizaci sekundárních buněčných stěn⁹⁴.

2 Cíle práce

1. Charakterizace přírodního biostimulantu v podobě fermentovaných kopřiv (jíchy) připravené z podzimních, jarních a letních rostlin z hlediska obsahu proteinů, sacharidů, fenolických látek a antioxidační kapacity.
2. Optimalizace a stanovení aktivit vybraných hydrolytických enzymů (tj. proteas, fosfatas a β -glukosidas) v kopřivové jíše.
3. Detekce a stanovení proteolytické aktivity kopřivové jíchy v závislosti na vegetační době sběru kopřiv

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

Analytické váhy XE-100 A	(Denver Instrument Company, USA)
Centrifuga Universal 32 R	(Hettich Zentrifugen, Německo)
Čtečka mikrotitračních destiček Multiscan Go	(Thermo Fisher Scientific, USA)
Elektroforetická sada Biometra	(Biometra, Německo)
Elektroforetická sada Mini-PROTEAN	(Bio-Rad, USA)
Iluminační deska na gely Slimlite plano	(Kaiser Fototechnik, Německo)
Laboratorní váhy Kern 440-45	(Kern, SRN)
Lyofilizátor Lyovac GT 2 E	(Finn-Aqua, Finsko)
Magnetická míchačka RH basic	(IKA, Německo)
Mini inkubátor	(Labnet, USA)
pH metr UltraBASIC UB-10	(Denver Instruments Company, USA)
Stolní centrifuga miniSpin	(Eppendorf, Německo)
Termoblok Elite	(Major Science, Taiwan)
TermoMixer C	(Eppendorf, Německo)
Vortex V-1 plus	(Biosan, Litva)
Zdroj napětí Power Pack P25 T	(Biometra, Německo)

3.2 Použité chemikálie

1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)	(Sigma Aldrich, USA)
2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH)	(Sigma Aldrich, USA)
2,4,6-Tris(2-pyridyl-s-triazin) (TPTZ)	(Sigma Aldrich, USA)
Akrylamid	(Sigma Aldrich, USA)
Azokasein	(Sigma Aldrich, USA)
Bisakrylamid	(Sigma Aldrich, USA)
Bromfenolová modř	(Sigma Aldrich, USA)
Coomassie Brilliant Blue G 250	(Sigma Aldrich, USA)
Dihydrogenfosforečnan draselný	(Lachema Chemapol, ČR)
Dihydrogenfosforečnan sodný	(Lachema Chemapol, ČR)
Dodecylsírán sodný (SDS)	(Sigma Aldrich, USA)
Dusičnan stříbrný	(Sigma Aldrich, USA)
Ethanol 96 % (w/v)	(Lach-Ner, ČR)
Ethylendiamintetraoctan sodný dihydrát (EDTA)	(Sigma Aldrich, USA)

Fenazin methosulfát (PMS)	(Sigma Aldrich, USA)
Fenol	(VWR Chemicals, USA)
Folin-Ciocalteuovo fenolové reagens	(Lach-Ner, ČR)
Glukosa	(Sigma Aldrich, USA)
Glycerol	(Lach-Ner, ČR)
Hovězí sérový albumin (BSA)	(Sigma Aldrich, USA)
Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát	(Penta, ČR)
Hydroxid sodný	(VWR, USA)
Chlorid hořečnatý	(Penta, ČR)
Kyselina askorbová	(Lachema, ČR)
Kyselina citronová bezvodá	(Sigma Aldrich, USA)
Kyselina chlorovodíková 35 % (w/v)	(Sigma Aldrich, USA)
Kyselina octová 99 % (w/v)	(Sigma Aldrich, USA)
N,N,N',N' tetrametyletylendiamin (TEMED)	(Sigma Aldrich, USA)
Nitroblue tetrazolium chlorid (NTB)	(Sigma Aldrich, USA)
Octan sodný trihydrát	(Thermo Scientific, USA)
Peroxid vodíku 30 % (w/v)	(Sigma Aldrich, USA)
Peroxodisíran amonný	(Sigma Aldrich, USA)
p-nitrofenol	(Sigma Aldrich, USA)
p-nitrofenylfosfát sodný hexahydrát (PNPP)	(Sigma Aldrich, USA)
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	(Sigma Aldrich, USA)
Proteinový standard 6,5–26,6 kDa	(Thermo Scientific, USA)
Sacharosa	(Penta, ČR)
Síran amonno-železitý dodekahydrát	(Penta, ČR)
Síran měďnatý pentahydrát	(Lachema, ČR)
Thiosíran sodný	(Roche Diagnostics, Německo)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	(Sigma Aldrich, USA)
Trolox	(Sigma Aldrich, USA)
Uhličitan sodný	(Lachema, ČR)
Vinan sodno-draselný	(Lachema, ČR)
β-merkptoethanol	(Sigma Aldrich, USA)

3.3 Rostlinný materiál

Pro charakterizaci kopřivové jíchy byly využity extrakty lyofilizátů, roztoky jíchy a roztoky čerstvé jíchy z podzimního, jarního a letního sběru kopřiv. Místo sběru, hmotnost čerstvých kopřiv a objem přidané vody pro fermentace jsou znázorněny v Tabulka . Fermentace probíhala 4 týdny v otevřené nádobě. Před lyofilizací byla jícha filtrována přes dvě vrstvy gázy a zmrazena. Pro lyofilizace byl využit přístroj LYOVAC GT 2E firmy Finn-Aqua®.

Tabulka 3. Místo sběru, hmotnost čerstvých kopřiv a objem vody pro jednotlivé sběry.

Sběr	Místo sběru	Hmotnost čerstvých kopřiv, g	Objem vody, l	Koncentrace jíchy, g/l
Jarní	Praha, Divoká Šárka	485	2,50	194
Letní	Bělá nad Svitavou	348	1,00	348
Podzimní	Hradištko	115	3,45	33

3.4 Metody

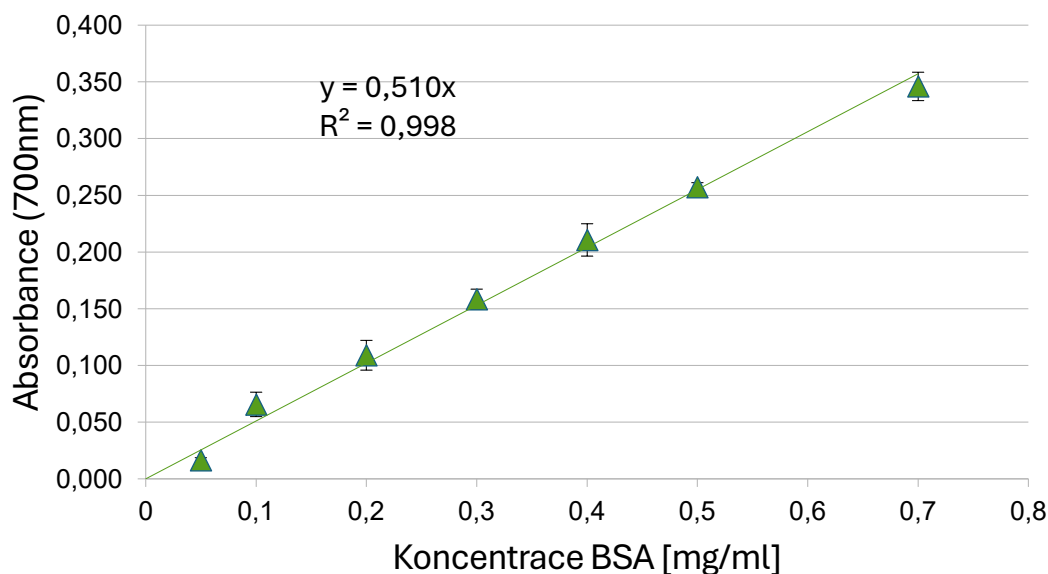
3.4.1 Příprava extraktu z lyofilizované kopřivové jíchy

Nejprve 20 nebo 40 mg kopřivové jíchy bylo resuspendováno v 1ml vhodného rozpouštědla (ethanol, destilovaná voda) a takto bylo ponecháno extrahovat při laboratorní teplotě. Po 30 minutách extrakce byla zkumavka s extraktem centrifugovaná 5 minut při 9000× g při 4 °C. Supernatant byl dále byl používán jako extrakt z kopřivové jíchy o příslušném množství lyofilizátu.

3.4.2 Stanovení koncentrace proteinů podle Lowryho

Stanovení koncentrace proteinů podle Lowryho je metoda, která spojuje reakce iontů mědi s peptidovými vazbami v alkalickém prostředí s oxidací aromatických zbytků proteinů⁹⁵⁻⁹⁷. Proces probíhá tak, že Cu⁺ vzniklý oxidací peptidových vazeb reaguje s Folin-Ciocalteuovým činidlem, které obsahuje směs fosfowolframové a fosfomolybdenové kyseliny. Absorbance redukovaného Folinova činidla se sleduje při 700 nm. Na základě roztoku standardního proteinu lze vypočítat celkové množství proteinů v biologickém vzorku. Pro stanovení je nutné sestavit kalibrační graf pro roztok čistého proteinu o známých koncentracích.

Smísením 10 ml 2 % (w/v) roztoku Na₂CO₃ v 0,1M NaOH a 0,2ml 0,5 % (w/v) roztoku CuSO₄ v 1 % (w/v) vinanu sodném byl získán roztok A. Extrakt z kopřivové jíchy (kapitola 3.4.1) o objemu 15 μl o koncentracích 2,5–20 mg/ml nebo 15 μl čerstvé jíchy ředěné 1x až 16x byly v triplicátech pipetovány do mikrotitrační destičky. Poté do každé jamky s extraktem bylo přidáno 165 μl roztoku A. Směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo do každé jamky pipetováno 20 μl Folin-Ciocalteuového činidla ředěného destilovanou vodou v poměru 1:1. Po 30 minutách inkubace byla změřena absorbance při 700nm proti slepému pokusu, který obsahoval místo extraktu destilovanou vodu. Pro vytvoření kalibračního grafu místo roztoků jíchy byly požitky roztoky hovězího sérového albuminu nebo BSA (z angličtiny Bovine serum albumin) o koncentracích 0,05–0,7 mg/ml. Příslušná rovnice kalibrační přímky byla pak použita pro vypočtení koncentrace proteinů v extraktu.



Obrázek 5. Kalibrační přímka pro stanovení celkového obsahu proteinu podle Lowryho.

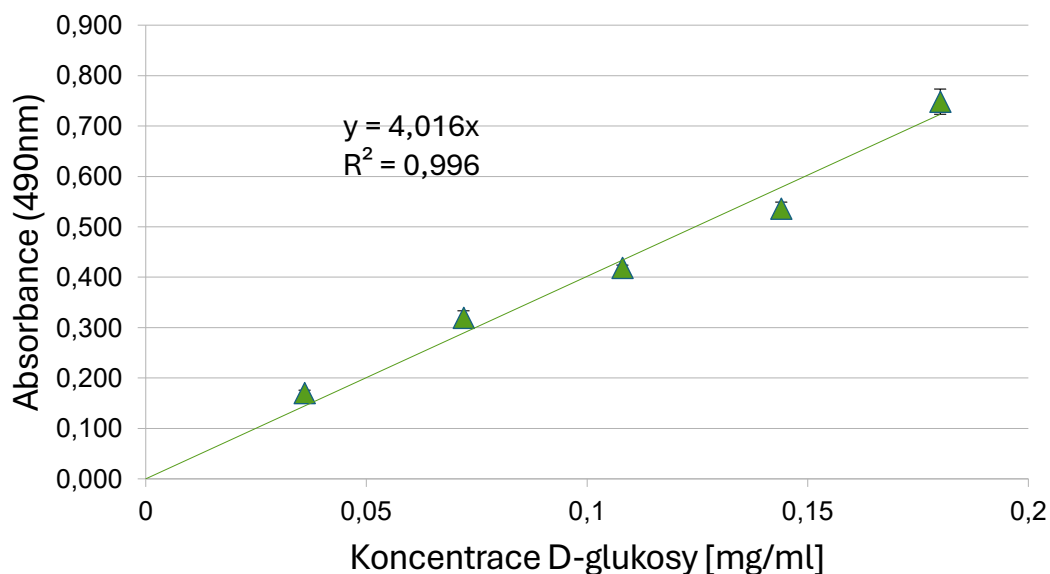
Graf znázorňuje závislost absorbance při 700 nm na koncentraci roztoků BSA.

3.4.3 Stanovení celkového množství neutrálních sacharidů

Ke stanovení obsahu neutrálních sacharidů byla použita metoda dle Duboise⁹⁸. Tato metoda využívá dehydratace sacharidů koncentrovanou kyselinou sírovou, přičemž vzniklý fural (v případě pentos) nebo 5-hydroxy-methylfural (v případě hexos) kondenzuje s fenolem a vytváří červené zbarvení s absorpčním maximem při 490 nm.

Metabolity z lyofilizátu kopřivové jáchy byly extrahovány pětinasobným množstvím 1M kyseliny chloristé. Ke směsi bylo přidáno 5mg PVP na 1ml 1M kyseliny chloristé a směs byla centrifugována 15 minut při 12000× g a 20 °C. Supernatant byl neutralizován 5M roztokem K₂CO₃ na pH 7. Pak bylo přidáno 5mg PVP na 1 ml a suspenze byla centrifugována 15 minut při 12000× g a 20 °C.

K 1ml extraktu lyofilizátu (kapitola 3.4.3.1) byl přidán 1 ml 5 % (w/v) fenolu a 5 ml 96 % (w/v) kyseliny sírové. Po 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 490 nm proti slepému pokusu, který místo vzorku obsahoval 1 ml destilované vody. Kalibrace byla provedena pomocí roztoků D-glukosy o koncentracích 0,036-0,18 mg/ml.



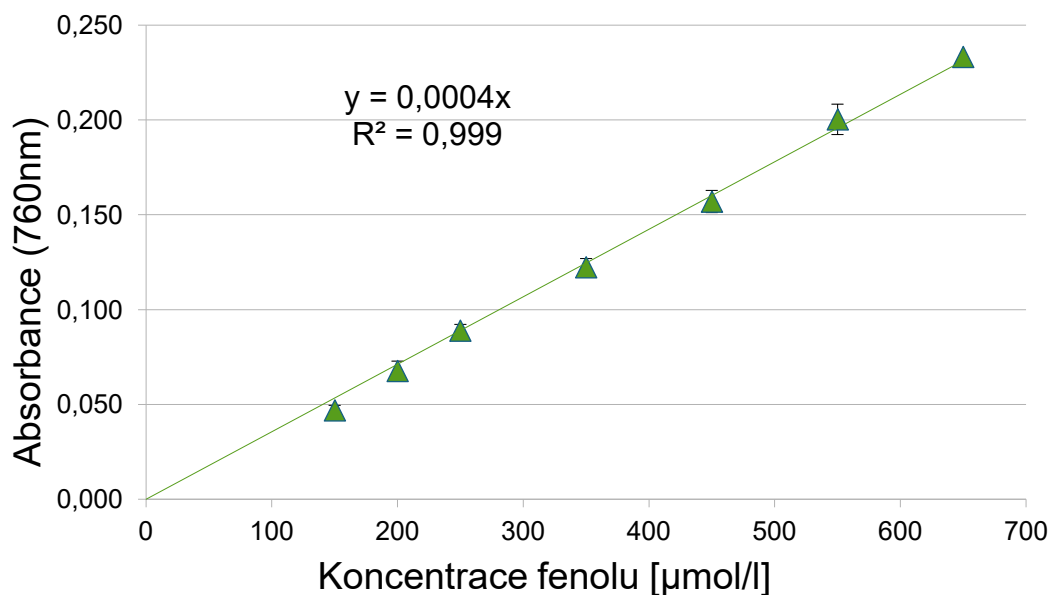
Obrázek 6 Kalibrační přímka pro stanovení celkového množství sacharidů podle Duboise.

Graf znázorňuje závislost absorbance při 490 nm na koncentraci roztoků D-glukosy.

3.4.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Obsah fenolických látek byl měřen reakcí Folin-Ciocalteuovo činidlem s fenolátovým aniontem⁹⁹. Při této reakci vznikají sloučeniny o modrém zabavení, které mají absorpční maxima při vlnové délce 760nm.

Extrakt lyofilizátu o objemu 20 μ l o koncentracích 2,5–20 mg/ml ve 50 % (v/v) roztoku ethanolu nebo 20 μ l 1x až 16x ředěné čerstvé jichy a 100 μ l 20 % (v/v) Folin-Ciocalteuova činidla byla pipetována do jamek mikrotitrační destičky. Po 4 minutách inkubace při laboratorní teplotě bylo do směsi přidáno 80 μ l roztoku 75 g/l (w/v) Na_2CO_3 . Po 30 minutách inkubace byla změřena absorbance roztoků při 760 nm oproti slepému vzorku, který místo extraktu obsahoval destilovanou vodu. Pro kalibraci byl extrakt nahrazen roztoky fenolu o koncentracích 150–650 μ mol/l.

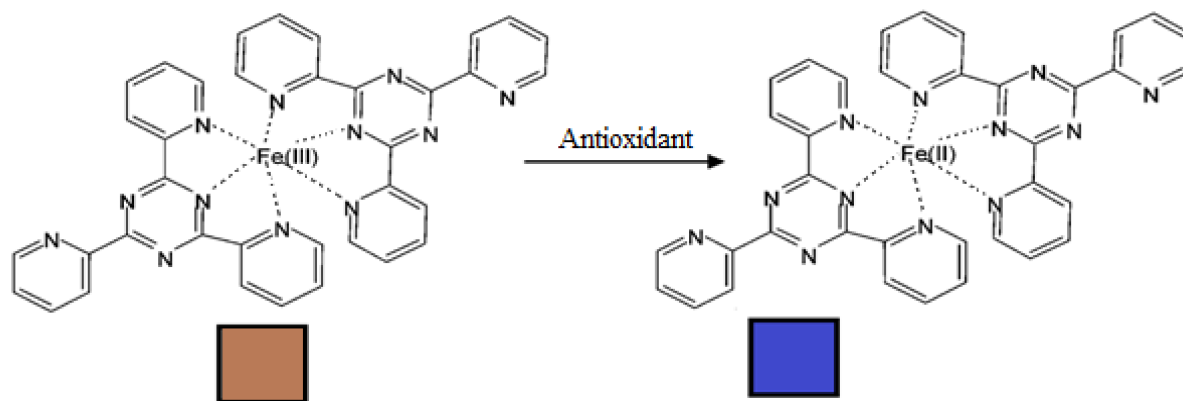


Obrázek 7 Kalibrační přímka pro stanovení celkového obsahu fenolických látek pomocí Folin-Ciaocalteuova činidla. Graf znázorňuje závislost absorpance při 760 nm na koncentraci fenolu.

3.4.5 Stanovení antioxidační kapacity kopřivové jičhy

3.4.5.1 Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP

FRAP (z angličtiny ferric reducing antioxidant power) metoda sloužící k posouzení antioxidační kapacity vzorku tím, že se měří jeho schopnost redukovat oxidační stres způsobený železitými kationty (Fe^{3+}) ve vzorku¹⁰⁰. Komplex s centrálně vázaným iontem železitým reagují s antioxidanty v pozorovaném vzorku a dochází k redukci železitých kationtů na železnaté (Fe^{2+}). Tuto reakci mezi železitými kationty a antioxidanty lze sledovat spektrofotometricky měřením absorpance při vlnové délce 593 nm. Výsledky FRAP testu se vyjadřují jako ekvivalenty kyseliny askorbové, což je standard používaný k porovnání antioxidační kapacity různých vzorků, a je založen na schopnosti troloxu redukovat oxidační stres.

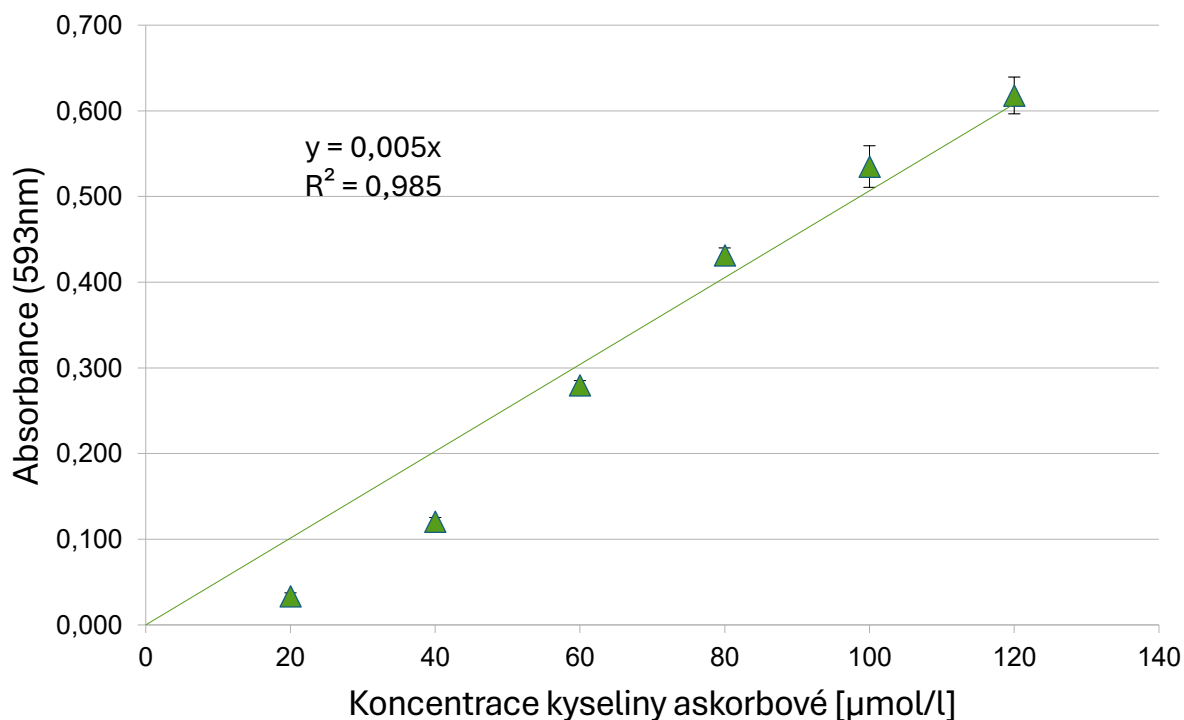


Obrázek 8: Princip metody FRAP se znázorněnou změnou barvy činidla TPTZ

Bylo připraveno 10 ml činidla FRAP smísením 2,5 ml roztoku TPTZ o koncentraci 0,7 mmol/l v 40 mM HCl, 1 ml roztoku FeCl₃ o koncentraci 20 mM a 6,5 ml octanového pufru o koncentraci 300 mM a pH 3,6.

Extrakt lyofilizované kopřivové jíchy ve 50 % (v/v) ethanol o objemu 40 µl o koncentracích 2,5-40 mg/ml nebo 40 µl čerstvé jíchy ředěné 1x až 16x bylo pipetováno do jamek mikrotitrační destičky, obsahujících 200 µl FRAP. Inkubace probíhala 10 minut při laboratorní teplotě. Absorbance byla změřena při vlnové délce 593 nm proti slepému pokusu, který místo extraktu jíchy obsahoval 50 % (v/v) roztok ethanolu.

Pro sestavení kalibrační přímky místo extraktu byly použity roztoky kyseliny askorbové v rozmezí koncentracích 20–120 µmol/l.



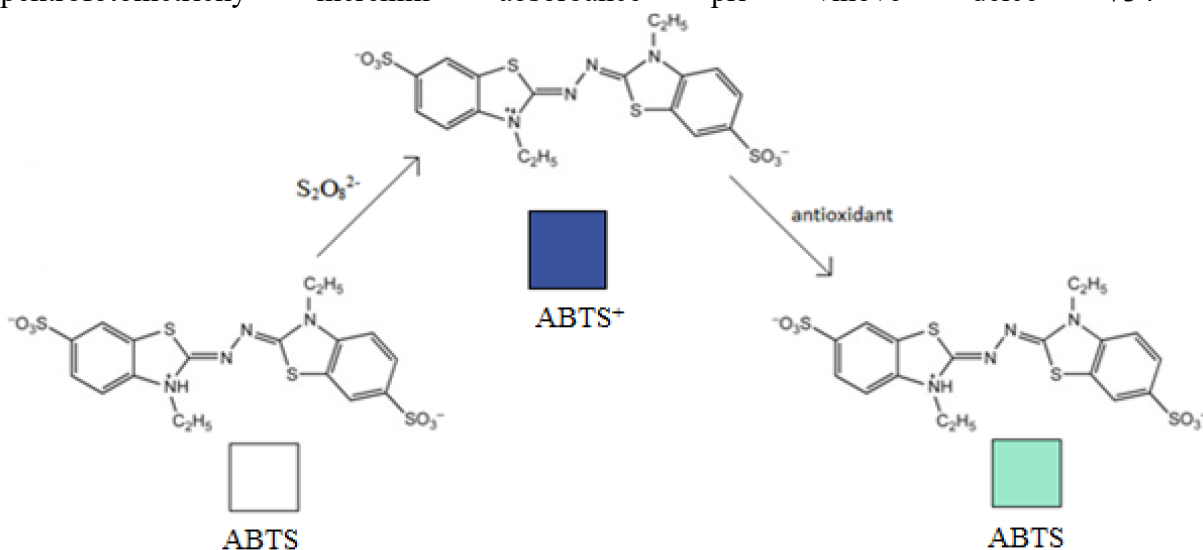
Obrázek 9 Kalibrační přímka pro stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP.

Graf znázorňuje závislost absorbance při 593nm na koncentraci roztoků kyseliny askorbové.

3.4.5.2 Stanovení antioxidační kapacity metodou ABTS

Metoda ABTS (z angl. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) spočívá v měření schopnosti vzorku redukovat stabilizovaný kationradikál ABTS^+ , který vzniká reakcí ABTS a peroxodisíranu sodného a má modro-černou barvu^{101,102}. Studovaný vzorek s antioxidačními vlastnostmi se smíchá s roztokem ABTS, přičemž dochází k redukci tohoto radikálu na světle

tyrkysovou až bezbarvou formu ABTS. Reakce mezi antioxidantem a radikálem $ABTS^+$ je sledována spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 734 nm.

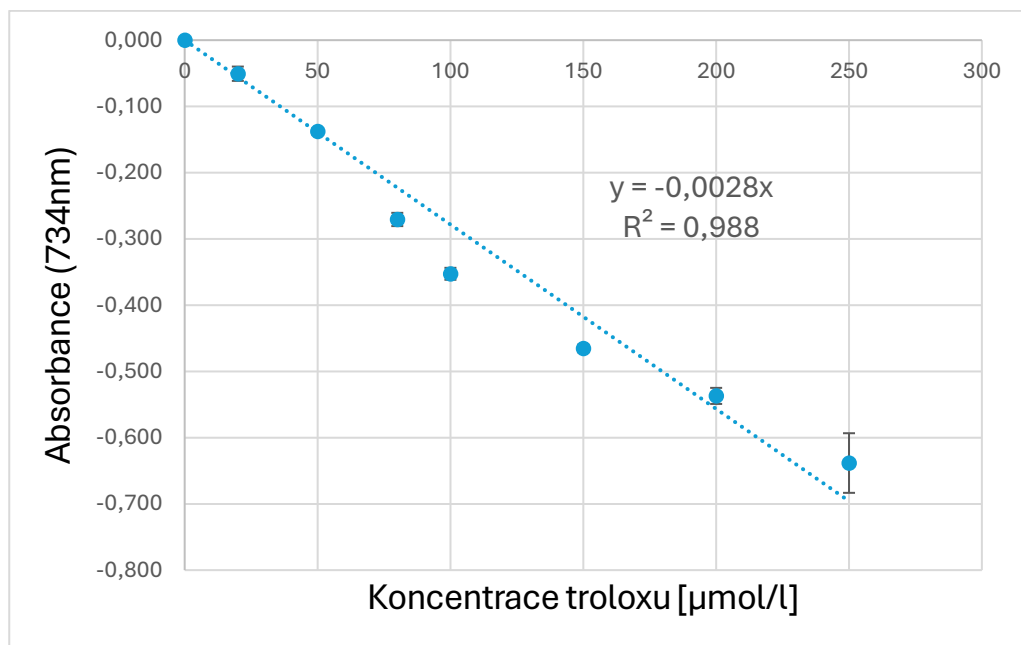


Obrázek 10. Princip metody ABTS v roztoku peroxidisíranu sodného.

Nejprve v roztoku peroxidisíranu sodného vzniká z ABTS modro-černý kationradikál $ABTS^+$, který je antioxidantem zoxidován na světle modrou až bezbarvou formu ABTS.

Výsledky metody ABTS jsou vyjádřeny jako ekvivalenty troloxu (derivátu vitamínu E) vztažené na gram lyofilizované jichy nebo na ml čerstvé jichy.

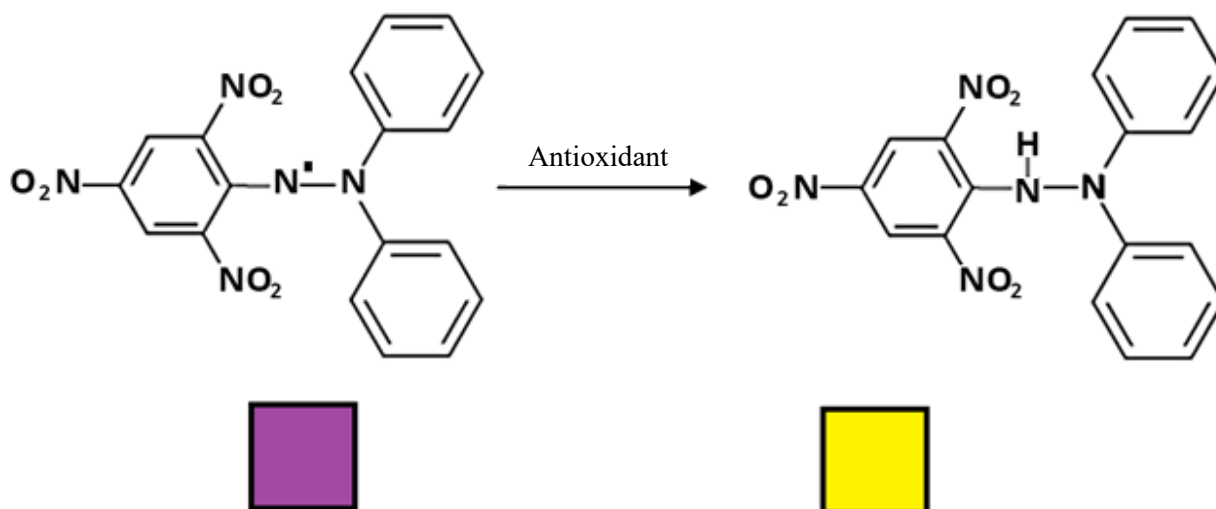
Do mikrotitrační destičky bylo přeneseno 20 μ l extraktu lyofilizované kopřivové jichy v destilované vodě o koncentracích 4–40 mg/ml nebo 20 μ l 1x až 8x ředěné čerstvé jichy a 100 μ l roztoku kationradikálu $ABTS^+$ o koncentraci přibližně 110 mmol/l. Inkubace probíhala 10 minut při laboratorní teplotě. Byl sledován pokles absorbance při 734nm oproti referenci, která obsahovala směs 20 μ l destilované vody a 100 μ l ABTS. Pro sestavení kalibrační přímky byly místo extraktu použité vodné roztoky troloxu v rozmezí koncentrací 20–250 μ mol/l.



Obrázek 11. Kalibrační přímka pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS.

Graf znázorňuje pokles závislosti absorpance při 734nm na koncentraci roztoků troloxu oproti referenci.

3.4.5.3 Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH



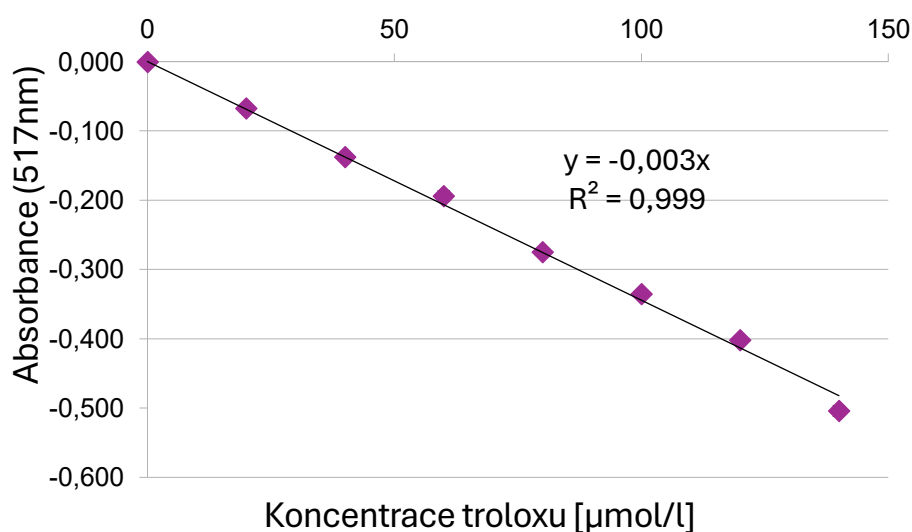
Obrázek 12. Princip metody DPPH se znázorněnou změnou barvy DPPH.

DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) je stabilním volným radikálem s tmavo-fialovou barvou, která vzniká díky nepárovému elektronu^{103,104}. Princip této metody spočívá v schopnosti antioxidantů poskytovat elektrony, což má za následek redukci fialového radikálu DPPH na jeho nemodifikovanou formu. Tato redukce vede ke postupné ztrátě fialového zbarvení roztoku DPPH, která může být kvantitativně měřena sledováním poklesu absorpance při vlnové délce 517nm. Stanovení se provádí v polárním organickém rozpouštědle, v tomto případě to je 96 (w/v) ethanolu roztok ethanolu.

Výsledky metody DPPH jsou vyjádřeny jako ekvivalenty troloxu vztažené na gram čerstvé lyofilizované jíchy nebo ml čerstvé jíchy.

Do mikrotitrační destičky bylo přeneseno 50 μ l extraktu kopřivové jíchy v 50 % (v/v) ethanolu, 100 μ l 96 % (w/v) ethanolu a 50 μ l 400 μ M DPPH. Inkubace probíhala 10 minut při laboratorní teplotě. Absorbance byla pak změřena při 517 nm proti referenci, která obsahovala 100 μ l 96 % (w/v) ethanolu, 50 μ l destilované vody, 50 μ l 400 μ M DPPH v 96 % (w/v) ethanolu.

Pro kalibrace místo extraktu byly použité roztoky troloxu v 50 % (v/v) ethanolu v rozmezí koncentracích 20–140 μ mol/l.



Obrázek 13. Kalibrační přímka pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH.

Graf znázorňuje pokles absorbance při 517nm v závislosti na koncentraci roztoků troloxu oproti referenci.

3.4.6 Optimalizace stanovení aktivity proteas

Jedním ze substrátů, který pomáhá snadno stanovit aktivitu nescifických proteas je azokasein¹⁰⁵. Po inkubaci s proteasami se uvolní aromatické aminokyseliny, které mohou být detekovány spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm.

3.4.6.1 Stanovení závislosti aktivity proteas na pH

McIlvainovy pufo o objemu 25 μ l o příslušném pH, připravené podle tabulky 2 strana 20, byly pipetovány do mikrozkušavky s 50 μ l 2,5 % (w/v) roztoku azokaseinu a 15 μ l destilované vody. Pro iniciaci reakce bylo přidáno 50 μ l extraktu kopřivové jíchy o koncentraci 40 mg/ml. Inkubace probíhala 1 hodinu při 35 °C. Pro zastavení reakce bylo do reakční směsi přidáno 17 μ l 25 % (v/v) trichloroctové. Reakční směs byla centrifugována 5 minut při 9000 \times g při 4 °C. 100 μ l supernatantu bylo převedeno do jamky mikrotitrační destičky se 100 μ l 2M roztoku NaOH. Dále byla změřena absorbance při 450nm proti slepému pokusu, ve kterém do mikrozkušavek se substrátem bylo nejprve pipetováno 17 μ l 25 % (v/v) kyseliny trichloroctové a až poté 50 μ l extraktu kopřivové jíchy o koncentraci 40 mg/ml.

Tabulka 4. Objemy 0,1M kyseliny citronové a 0,2M Na₂HPO₄ použité pro přípravu McIlvainových pufrů o požadovaném pH.

pH	0,1M kyselina citronová, ml	0,2M Na ₂ HPO ₄ , ml
3,0	32,0	8,0
4,0	24,5	15,5
4,5	22,0	18,0
5,0	19,5	20,5
5,5	17,5	22,5
6,0	14,5	25,5
6,5	11,5	28,5
7,0	7,0	33,0
8,0	1,0	39,0
9,0	0,0	40,0

3.4.6.2 Stanovení závislosti aktivity proteas na čase

Do mikrozkušavek bylo pipetováno 50 μ l azokaseinu (2,5 % w/v), 15 μ l destilované vody, 25 μ l McIlvainova pufru o pH 6 (tabulka 2 strana 20). Pro iniciaci reakce bylo přidáno 50 μ l extraktu kopřivové jíchy o koncentraci 40 mg/ml. Inkubace probíhala při 35 °C. Po určitých časových intervalech reakce byly zastaveny přidáním 17 μ l 25 % (v/v) kyseliny trichloroctové. Reakční směs byla centrifugována 5 minut při 9000 \times g a teplotě 4 °C. Poté 100 μ l supernatantu bylo převedeno do jamky mikrotitrační destičky se 100 μ l 2M roztoku NaOH. Dále byla změřena absorbance při 450nm proti slepému pokusu, ve kterém bylo do mikrozkušavek se substrátem nejprve pipetováno 17 μ l 25 % (v/v) kyseliny trichloroctové a až poté 50 μ l extraktu kopřivové jíchy o koncentraci 40 mg/ml.

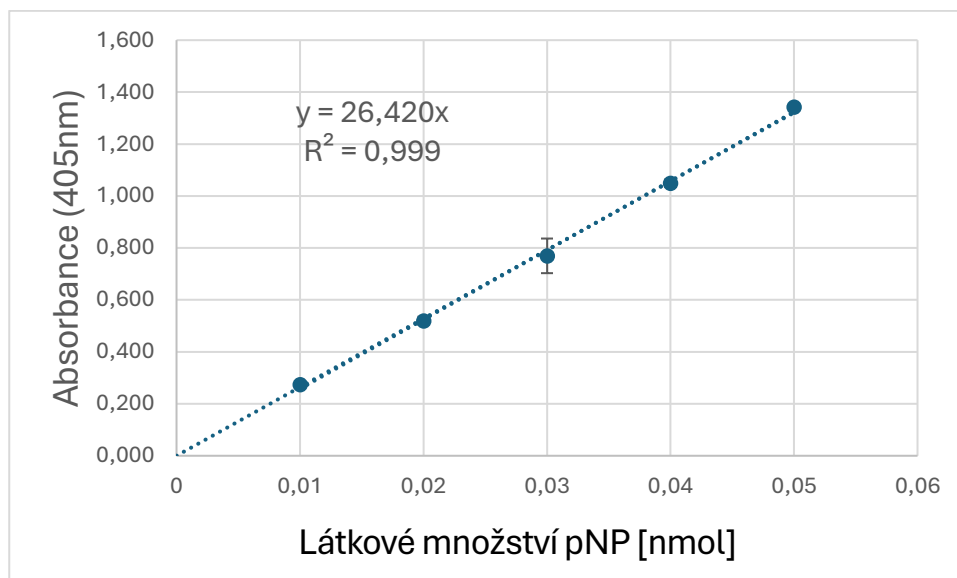
3.4.7 Optimalizace stanovení aktivity fosfatas

Pro stanovení aktivity fosfatas se často využívá hydrolyzy p-nitrofenylfosfátu, při které dochází k defosforylaci této sloučeniny¹⁰⁶. V důsledku toho vzniká p-nitrofenol, který má specifické absorpční maximum při vlnové délce 405 nm.

3.4.7.1 Stanovení závislosti aktivity fosfatas na pH

McIlvainovy pufrů o objemu 125 μ l a příslušném pH, připraveného podle tabulky 2 strana 20, byly pipetovány do mikrozkušavky s 50 μ l 20mM roztoku p-nitrofenylfosfátu. Pro iniciaci reakce bylo přidáno 25 μ l extraktu kopřivové jíchy o koncentraci 40 mg/ml. Po 1 hodině inkubace při 25 °C byla reakce zastavena přidáním 800 μ l 0,1M borátového pufru o pH 9. Dále byla změřena absorbance při 405 nm proti slepému pokusu, ve kterém do mikrozkušavek se substrátem a pufrům bylo nejprve pipetováno 800 μ l 0,1M borátového pufru o pH 9 a až poté 50 μ l extraktu kopřivové jíchy.

Pro vytvoření kalibračního grafu byly použity roztoky o látkových množstvích p-nitrofenolu 0,01–0,05 nmol.



Obrázek 14. Kalibrační přímka pro stanovení aktivity fosfatas.

Graf znázorňuje závislost absorbance při 405nm na látkovém množství p-nitrofenolu.

3.4.7.2 Stanovení závislosti aktivity fosfatas na čase

McIlvainův pufr o objemu 125 μ l o pH 5,5, připravený podle tabulky 2 strana 20, byl pipetován do mikrozkuhavky s 50 μ l 20mM roztoku p-nitrofenylfosfátu. Pro iniciaci reakce bylo přidáno 25 μ l extraktu kopřivové jáchy o koncentraci 40 mg/ml. Inkubace probíhala při 25 $^{\circ}$ C. Po určitých časových intervalech byly reakce zastaveny 800 μ l 0,1M borátového pufru o pH 9. Dále byla změřena absorbance při 405 nm proti slepému pokusu, ve kterém bylo do mikrozkuhovek se substrátem a pufrům nejdříve pipetováno 800 μ l 0,1M borátového pufru o pH 9 a až poté 50 μ l extraktu kopřivové jáchy.

3.4.8 Stanovení aktivity β -glukosidasy

Pro stanovení aktivity β -glukosidasy byla připravena reakční směs, která obsahovala 50 μ l 0,5 mM p-nitrofenyl- β ,D-glukopyranosidu, dále 100 μ l 50 mM citrátového pufru o pH 4,6 a 50 μ l extraktu lyofilizátu (kapitola 3.4.1). Extrakty pro každou jáchu byly připraveny tak, aby každý obsahoval stejné množství proteinů a to 10 mg. Reakce probíhala po dobu 1 hodiny při 25 $^{\circ}$ C. Reakce byla zastavena přidáním 800 μ l 0,1M borátového pufru o pH 9. Absorbance výsledného roztoku byla změřena při vlnové délce 405 nm proti kontrolnímu vzorku, do kterého byl přidán borátový pufr před extraktem.

Pro určení množství přeměněného substrátu byla použita kalibrační přímka s využitím komerčního p-nitrofenolu o látkovém množství 0,01–0,05 nmol. Aktivita β -glukosidasy byla vyjádřena jako látkové množství přeměněného substrátu za minutu na gram lyofilizátu.

3.4.9 Detekce aktivity proteas v gelu

Tato elektroforetická metoda je založena na selektivní enzymové aktivitě proteas, které katalyzují hydrolýzu želatiny přímo obsaženou v separačním gelu. Tento proces vede k bránění vazbě a difuzi barviva do gelu. V důsledku toho místa štěpení jsou na výsledném gelu průhledná.

3.4.9.1 Složení pufrů a gelů

- *Elektrodový pufr*
 - 124mM Tris
 - 0,95M glycin
 - 17mM SDS
- *Inkubační pufr*
 - 50 ml 50mM Tris-HCl o pH 8,4
 - 0,0278 g CaCl₂
- *4 % zaostřovací gel*
 - 625 μl 0,5M Tris-HCl pH 6,8
 - 1520 μl destilované vody
 - 325 μl 30 % (w/v) směsi akrylamidu a bisakrylamidu
 - 25 μl 10 % (w/v) SDS
 - 3,8 μl TEMED
 - 35 μl 10 % (w/v) PSA
- *12 % separační gel*
 - 2,5 ml 0,5M Tris-HCl pH 8,8
 - 3,3 l destilované vody
 - 4 ml 30 % (w/v) směsi akrylamidu a bisakrylamidu
 - 100 μl 10 % (w/v) SDS
 - 4,5 μl TEMED
 - 100 μl 10 % (w/v) PSA
 - 0,015 g želatiny
- *Neredukující vzorkový pufr*
 - 0,063 M Tris-HCl o pH 6,8
 - 10 % (w/v) glycerol
 - 2 % (w/v) SDS
 - 0,0013 % (w/v) bromfenolová modř
- *Odbarvovací roztok*
 - 10 % (v/v) kyselina octová
 - 25 % (v/v) ethanol
- *barvivo Coomassie Brilliant Blue*
 - 9,2 % (v/v) kyselina octová;
 - 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB);
 - 46 % (v/v) ethanol

3.4.9.2 Příprava vzorků

Extrakty z lyofilizátu byly připraveny podle návodu v kapitole 3.4.1. lyofilizáty byly extrahovány destilovanou vodou na výslednou koncentraci 20 mg/ml. Extrakt o objemu 100 μl nebo 100 μl zmražené jíchy nebo 100 μl čerstvé jíchy bylo dále inkubováno s 100 μl vzorkového pufru (kapitola 3.4.9.1) 1 hodinu při 37 °C. Získané vzorky byly dále použity v elektroforéze.

3.4.9.3 Elektroforetická separace

Nejprve byl připraven 12 % separační gel (kapitola 3.4.9.1), který byl nechán polymerovat po dobu 1 hodiny. Ztuhlý gel byl převrstven 4 % zaostřovacím gelem (kapitola 3.4.7.1), do kterého pak byla vložena šablona pro tvorbu jamek gelu. Gely byly po 15 minutách umístěny do aparatury od firmy

Bio-Rad. Do aparatury byl přidán elektrodový pufr (kapitola 3.4.7.1), šablona pro tvorbu jamek gelu byla odstraněna, a do jamek byly aplikovány vzorky z kapitoly 3.4.7.2. Koncentrace proteinu ve vzorcích byla stanovena dle Lowry. Objem přidaného vzorku byl upraven tak, aby v každé jamce bylo stejné množství proteinu, a to 0,8 mg. Do elektrodového prostoru bylo také přidáno přibližně 0,5 ml 0,1 % (w/v) bromfenolové modři.

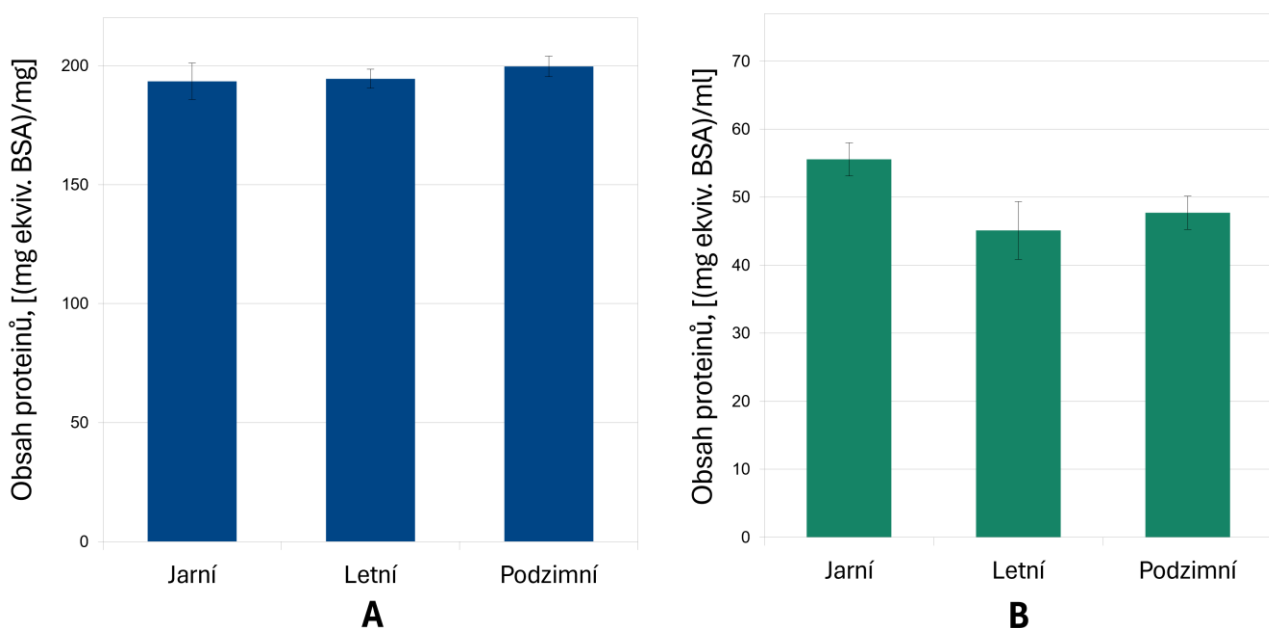
Elektroforéza byla prováděna za konstantního napětí při laboratorní teplotě, na začátku 70V, a až vzorky prošly zaostřovacím gelem, napětí bylo zvýšeno na 140V. Poté, co bromfenolová modř dosáhla konce gelu, elektroforéza byla ukončena. Gel byl dále promyt třikrát po 20 sekundách destilovanou vodou. Pak gel byl během 1 hodiny čtyřikrát promyt 2,5 % roztokem Tritonu X-100. Po promytí třikrát po 20 sekundách destilovanou vodou byl gel inkubován přes noc v inkubačním pufru (kapitola 3.4.7.1). Po inkubaci byl gel promyt destilovanou vodou a pak bylo do gelu přidáno barvivo Coomassie Brilliant Blue (kapitola 3.4.9.1). Po 4 hodinách barvivo bylo odstraněno a byl přidán odbarvovací roztok (kapitola 3.4.9.1). Po 12-ti hodinovém odbarvování byl gel promyt destilovanou vodou.

4 Výsledky

Byly provedeny experimenty zaměřené na biochemickou charakterizaci kopřivové jíchy z různých období sklizně: jarního, letního a podzimního sběru rostlin kopřiv. Tyto experimenty měly za cíl podrobně analyzovat, jaký je obsah proteinů, sacharidů, antioxidačních látek a hydrolytických enzymů jích připravených v průběhu vegetačního období kopřiv. Aby bylo možné porovnání mezi jednotlivými jíchami, byly nejprve lyofilizovány a z lyofilizátů poté připravovány vodné extrakty s definovaným množstvím lyofilizátu. Zároveň byly výše jmenované parametry pro kontrolu, zda lyofilizací nedošlo ke ztrátě enzymové aktivity, sledovány v čerstvých jíchách. Při jednotlivých přípravách jíchy byl poměr navážky čerstvých kopřiv a vody teprve optimalizován (tabulka 3) a nebyl tedy vždy totožný. Největší obsah kopřivové biomasy na 1 l vody obsahovala letní jícha (348 g/l), poté jarní jícha (194 g/l) a nejméně podzimní (33 g/l).

4.1 Obsah proteinů v kopřivové jíše

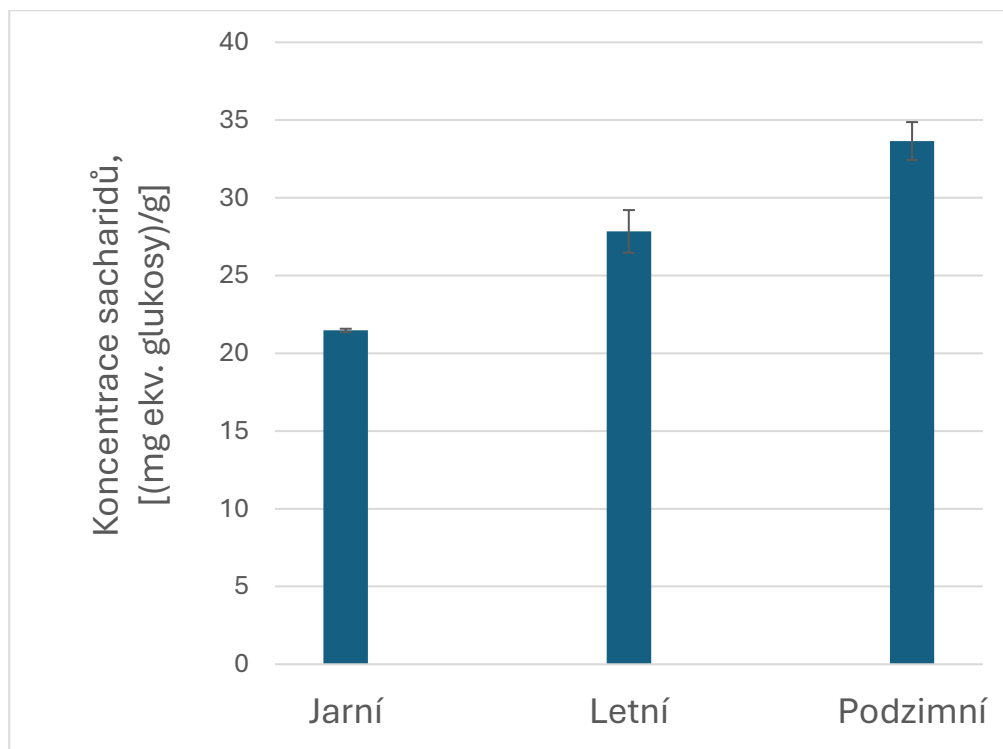
Celkový obsah proteinu byl stanoven pro lyofilizáty a čerstvé jíchý jarních, letních a podzimních sběrů kopřiv. Koncentrace byla vyjádřena jako ekvivalent BSA na mg pro lyofilizátu a jako ekvivalent BSA na ml čerstvé jíchý. V lyofilizátech kopřivové jíchý nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v obsahu proteinů v závislosti na ročním období, kdy byly rostliny sbírány. Naopak, analýza čerstvých jíchý ukázala, že obsah proteinů byl v jarních vzorcích mírně vyšší, konkrétně o 14 % než podzimní a o 19 % než letní. Tento trend je podrobně znázorněn na obrázku 11, kde je vidět, že jarní jícha vykazuje zvýšenou koncentraci proteinů ve srovnání s ostatními obdobími sběru.



Obrázek 15. Celkový obsah proteinu *A*) v lyofilizátech kopřivové jíchý z jarního, letního a podzimního sběru kopřiv (v jednotce mg proteinu na mg lyofilizátu) a *B*) v čerstvých jíchách (v jednotce mg proteinu na ml čerstvé jíchý) v závislosti na roční době sběru kopřiv. Při extrakci jíchý bylo použito 20 mg lyofilizátu/ml destilované vody.

4.2 Obsah sacharidů v kopřivové jíše

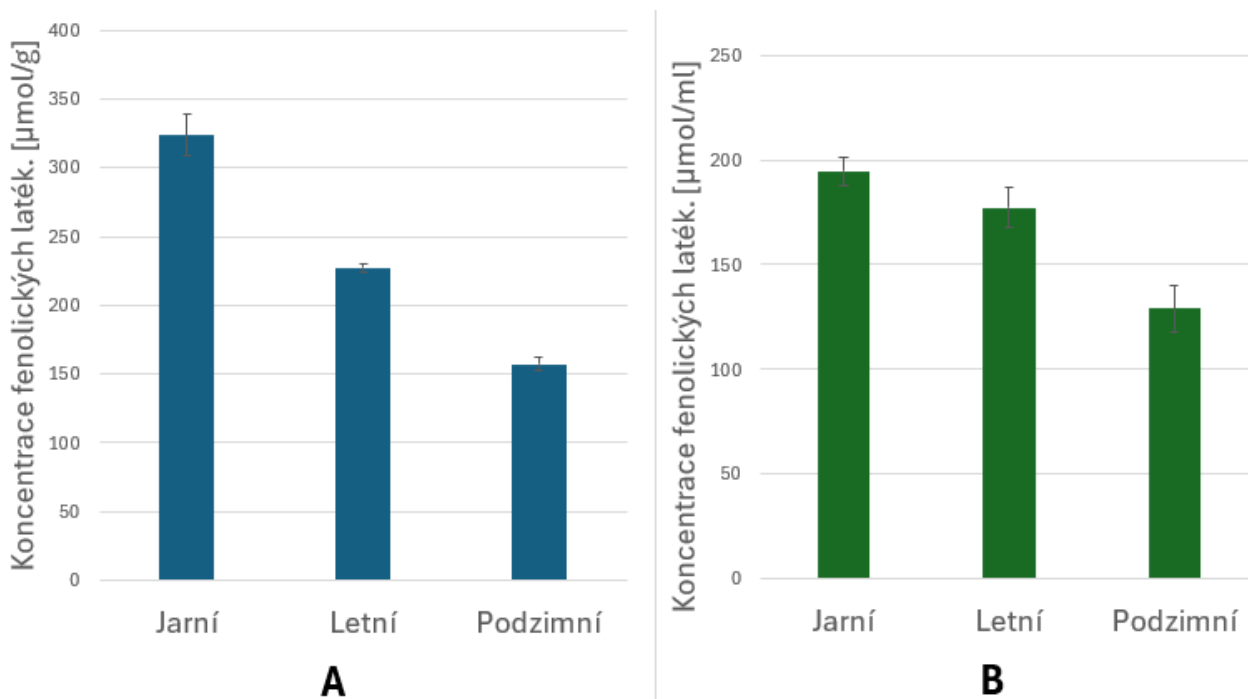
Pro kvantifikaci celkového množství neutrálních sacharidů podle Duboise (kap. 3.4.4.3) byly využity rovnice regrese získaného grafu (**Obrázek 6**) k výpočtu koncentrace sacharidů v extraktech lyofilizátu jarní, letní a podzimní jíchy. Konkrétní hodnoty jsou znázorněny na obrázku 16. Nejvyšší obsah sacharidů vykazovala podzimní jícha, která měla o 18 % sacharidů více než letní jícha a o 38 % více než jarní jícha.



Obrázek 16. Koncentrace celkových sacharidů v lyofilizátech jíchy z jarního, letního a podzimního sběru kopřiv v jednotce mg ekvivalentů glukosy na g lyofilizátu. Při extrakci jíchy bylo použito 40 mg lyofilizátu/ml 1M kyseliny chloristé.

4.3 Obsah celkových fenolických látek v kopřivové jíše

Obsah fenolických látek byl stanoven ve lyofilizátech a čerstvých jíchách připravených z jarních, letních a podzimních kopřiv. Analýza dat ukazuje, že obsah fenolických látek vykazuje klesající trend jak v lyofilizátech, tak i v čerstvých jíchách během vegetačního cyklu. Nejvyšší obsah fenolických látek vykazoval z extraktu jarní sběr, až o 54 % vyšší než v podzimním sběru a o 31 % vyšší než v letním. V čerstvých jíchách je tento trend zachován, jarní obsahuje o 5 % fenolických látek více než letní a o 34 % více než podzimní.

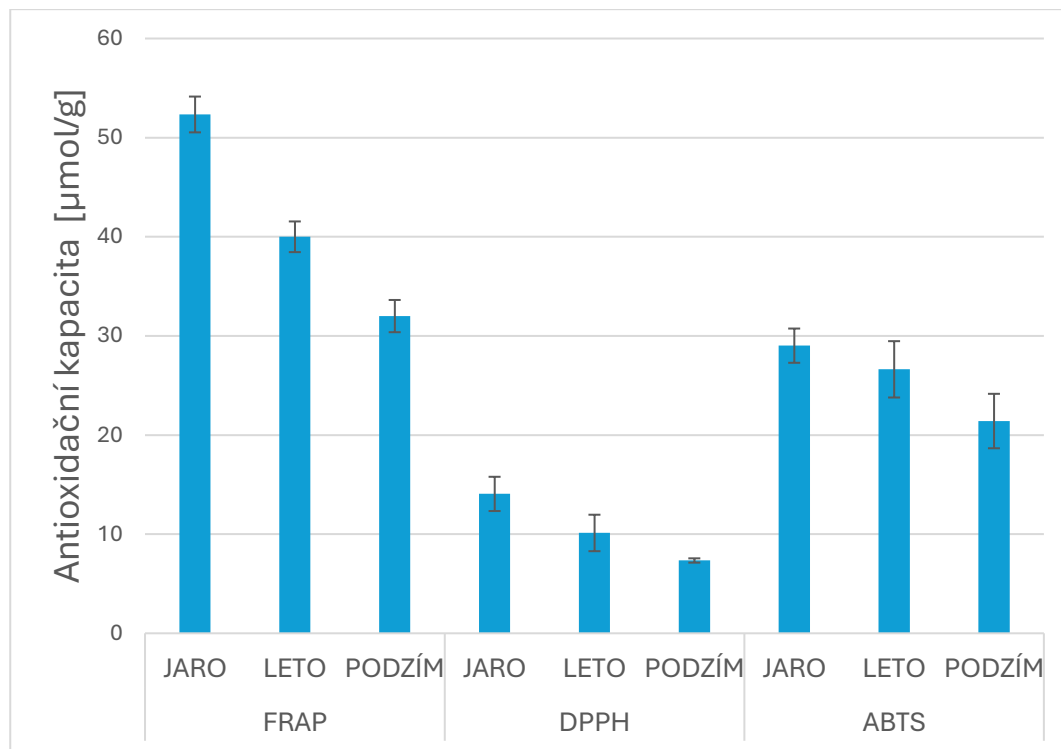


Obrázek 17. Celkový obsah fenolických látek v lyofilizátech z jarního, letního a podzimního sběru kopřiv v (jednotce μmol ekvivalentů fenolu na g lyofilizátu) (A) a čerstvých jíchách (B) s jarního, letního a podzimního sběrů (v jednotce μmol ekvivalentů fenolu na ml čerstvé jíchy). Při extrakci jíchy bylo použito 40 mg lyofilizátu na ml destilované vody.

4.4 Antioxidační kapacita kopřivové jíchy

Antioxidační kapacity extraktů z lyofilizátu jarních, letních a podzimních jích byly stanoveny prostřednictvím tří různých metod: ABTS, DPPH a FRAP. Nejvyšší antioxidační kapacitu podle všech uvedených metod vykazovala jícha z jarních kopřiv. Pro metodu FRAP byla antioxidační kapacita o 23 % vyšší než v letní a o 38 % vyšší než v podzimní. Při stanovení metodou DPPH jarní jícha vykazovala o 28 % vyšší antioxidační kapacitu než letní a o 50 % než podzimní. U hodnot

získaných metodou ABTS zůstává trend se zachovaný: jarní má antioxidační kapacitu o 10 % procent vyšší než letní a o 27 % vyšší než podzimní.

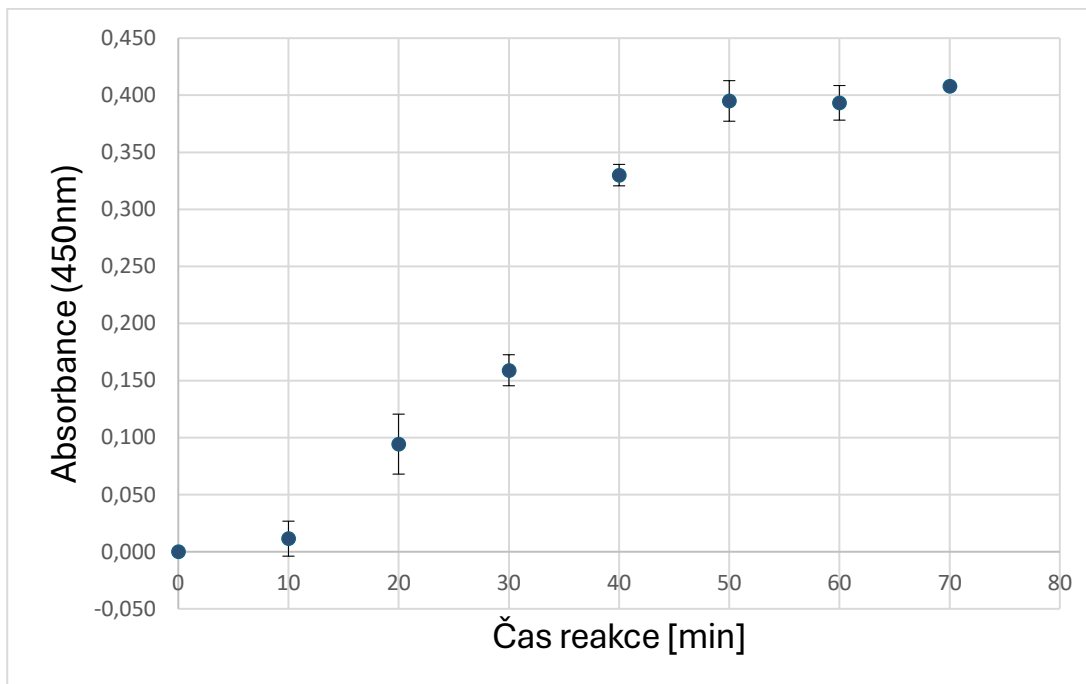


Obrázek 18. Antioxidační kapacita v μmol ekvivalentů troloxu pro DPPH a ABTS a v μmol ekvivalentů kyseliny askorbové pro FRAP vztahované na g lyofilizátu. Při extrakci jíchy bylo použito 40 mg lyofilizátu na ml 50 % (v/v) ethanolu.

4.5 Aktivita proteas v kopřivové jíše

4.5.1 Závislost aktivity proteas na čase

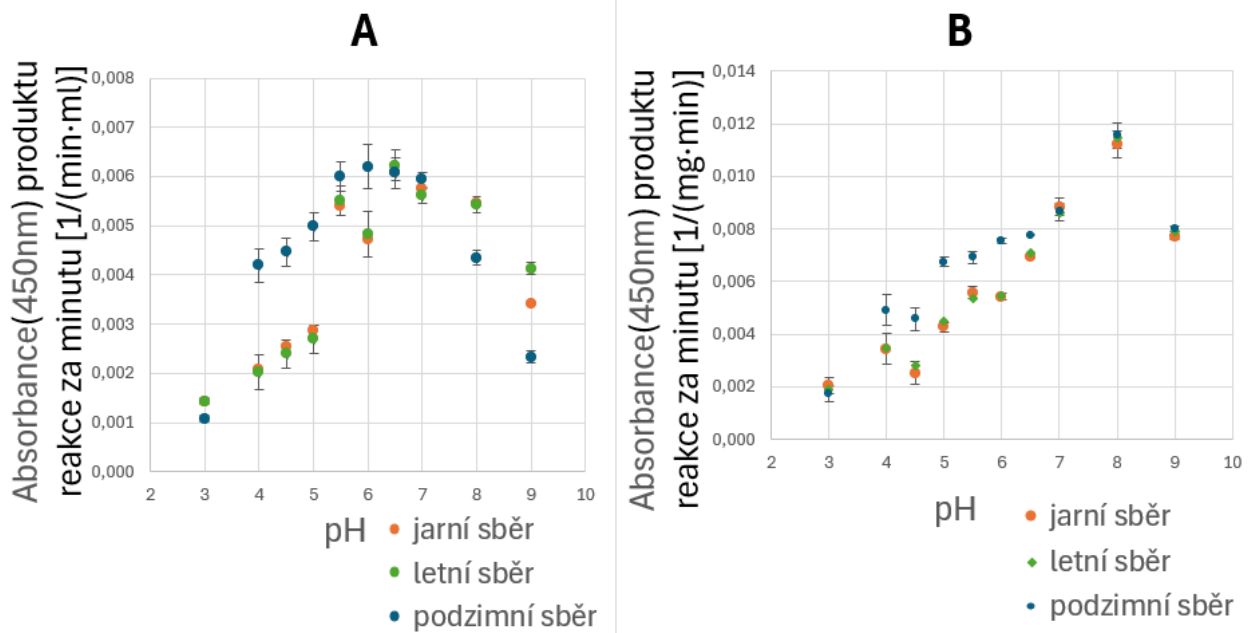
Závislost proteolytické aktivity na čase byla stanovena na základě štěpení substrátu azokaseinu. Na obrázku 16 je znázorněn graf absorbance produktu (barevných fragmentů azokaseinu) reakce katalyzované proteasami v závislosti na čase. Po uplynutí 50 minut od iniciace reakce absorbance zůstává konstantní, což naznačuje, že došlo k vyčerpání celkového množství substrátu.



Obrázek 19. Závislost absorbance odpovídající množství barevného produktu proteasy na čase reakce. Reakční směsi obsahovaly McIlvanův pufr o pH 6, azokasein a extrakt z lyofilizátu jáchy podzimního sběru. Při extrakci jáchy bylo použito 40 mg lyofilizátu na ml destilované vody.

4.5.2 Závislost aktivity proteas na pH

Při stanovení proteolytické aktivity v extraktech lyofilizátu kopřivové jáchy a čerstvých kopřivových jáchách bylo zjištěno, že v lyofilizovaných vzorcích vykazují nejvyšší aktivitu proteasy s pH optimem 8, což naznačuje převahu alkalických proteas. Naopak, v čerstvých kopřivových jáchách byly nejaktivnější proteasy s pH v intervalu 5–8, což ukazuje na přítomnost proteas s kyselým a neutrálním pH optimem. Tento rozdíl v optimálním pH proteolytických enzymů může odrážet různé složení a stabilitu enzymů v závislosti na způsobu zpracování kopřivové jáchy. V pH optimu hodnoty aktivity proteas ve všech vzorcích extraktů z lyofilizátu vykazují minimální odchylky v rámci roční doby sběru kopřiv.



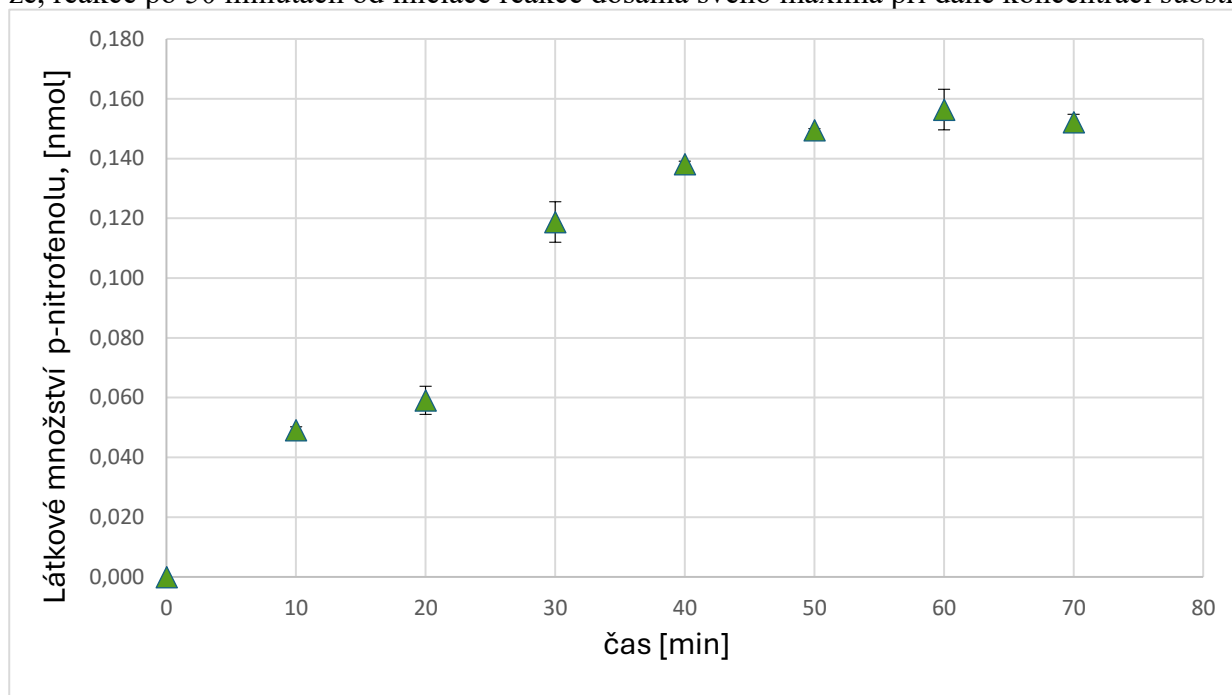
Obrázek 20. Závislost aktivity proteasy, odpovídající absorbančí produktu vzniklého za minutu, na pH reakční směsi pro A) čerstvé jíchy v jednotce 1/min na ml jíchy a B) lyofilizáty v jednotce 1/min na mg lyofilizátu jarních, letních a podzimních sběrů v jednotce min⁻¹ na ml čerstvé jíchy. Při extrakci jíchy bylo použito 40 mg lyofilizátu na ml destilované vody.

4.6 Aktivity fosfatas v kopřivové jíše

4.6.1 Závislost aktivity fosfatas na čase

Aktivita fosfatas byla optimalizována s využitím extraktů lyofilizátu kopřivové jíchy z podzimních kopřiv. Metoda spočívá ve využití substrátu p-nitrofenylfosfátu a měření absorbance produktu reakce p-nitrofenolu. Výsledné hodnoty shrnuje **Obrázek 21**. Na obrázku je vidět, že látkové množství produktu reakce katalyzované fosfatasami zůstává konstantní po 50 minutě, co ukazuje,

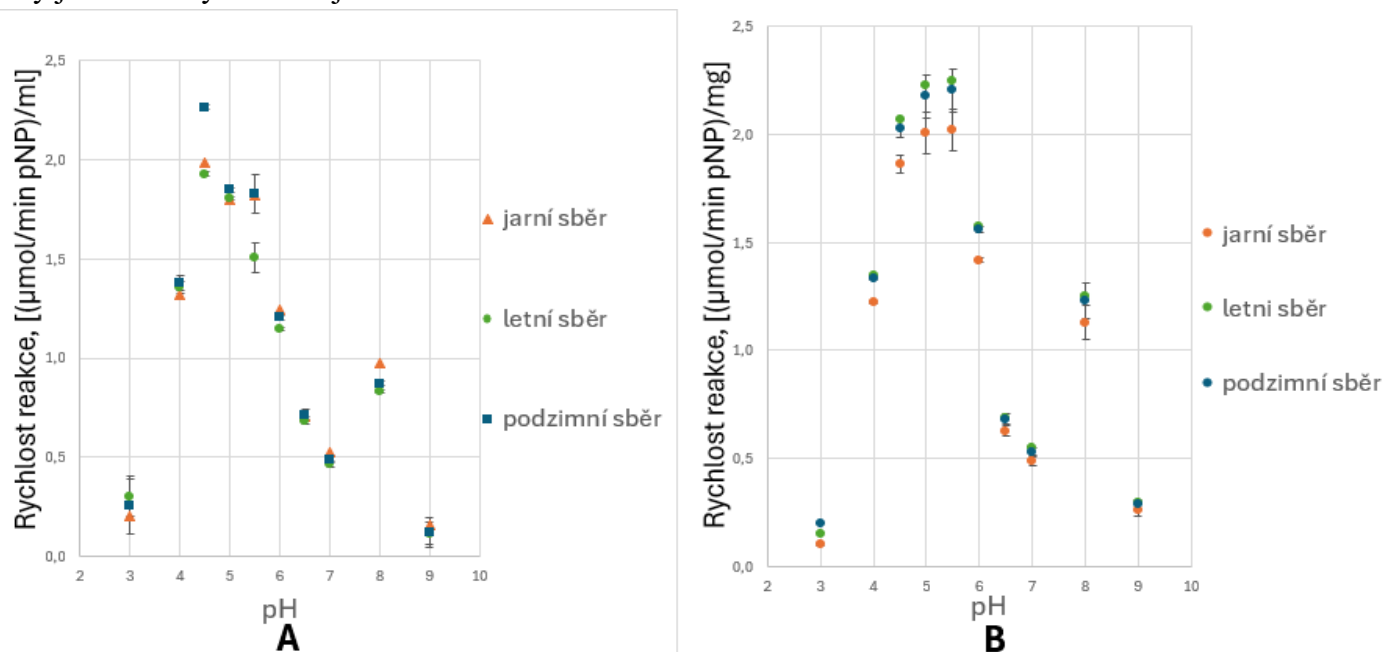
že, reakce po 50 minutách od iniciace reakce dosáhla svého maxima při dané koncentraci substrátu.



Obrázek 21. Závislost látkového množství produktu reakce katalyzované fosfatasou (*p*-nitrofenolu) v reakční směsi na čase reakce. Pro stanovení byl využit extrakt lyofilizátu jichy z podzimního sběru kopřiv. Při extrakci jichy bylo použito 40 mg lyofilizátu/ml destilované vody.

4.6.1 Závislosti aktivity fosfatas na pH

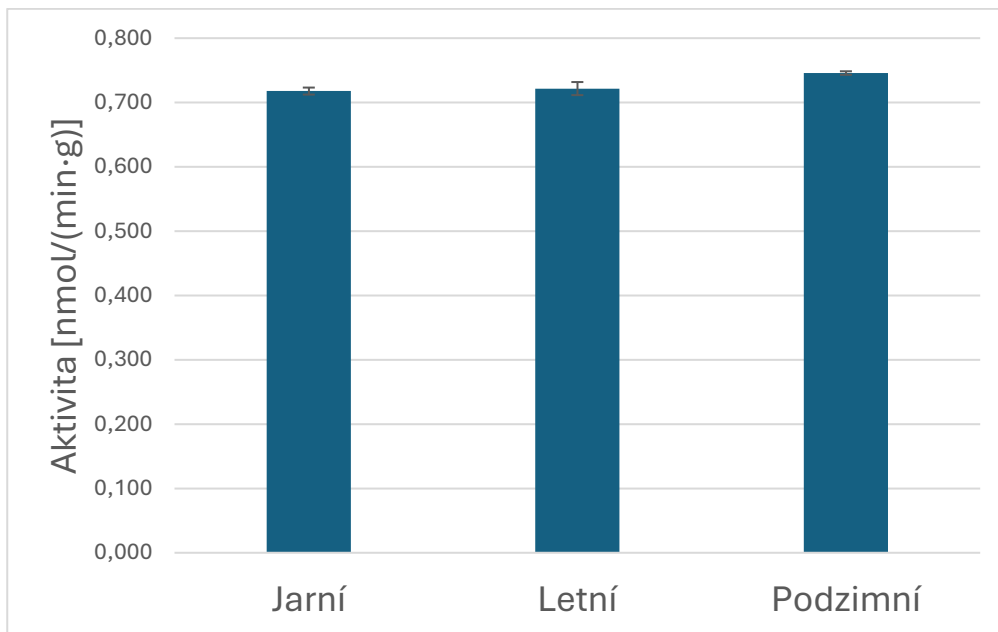
Aktivita fosfatas byla stanovena v extraktech lyofilizátu kopřivové jíchy a čerstvé kopřivové jíše z jarních, letních, podzimních kopřiv. Aktivita byla pak vyjádřena jako množství produktu p-nitrofenolu za minutu na ml v případě čerstvé jíchy a na mg v případě lyofilizátu. Výsledné hodnoty jsou uvedeny na **Obrázek 22**. Byla zjištěna přítomnost alkalických fosfatas s optimumem kolem 8 a kyselých fosfatas s optimumem v rozmezí 4,5 až 5,5. Tato zjištění naznačují přítomnost obou typů fosfatas v analyzovaných vzorcích kopřivových jích. Aktivita kyselých fosfatas z podzimní čerstvé jíchy je o 11 % vyšší než z jarní a letní.



Obrázek 22. Závislost rychlosti reakce katalyzované fosfatasami na pH reakční směsi pro A) čerstvou jíchu v jednotce $\mu\text{mol pNP}$ za minutu reakce na ml jíchy z jarních, letních a podzimních kopřiv a B) lyofilizáty v jednotce $\mu\text{mol pNP}$ za minutu reakce na mg lyofilizátu z jarních, letních a podzimních kopřiv. Při extrakci jíchy bylo použito 40 mg lyofilizátu na ml destilované vody.

4.7 Aktivita β -glukosidasy v jíše

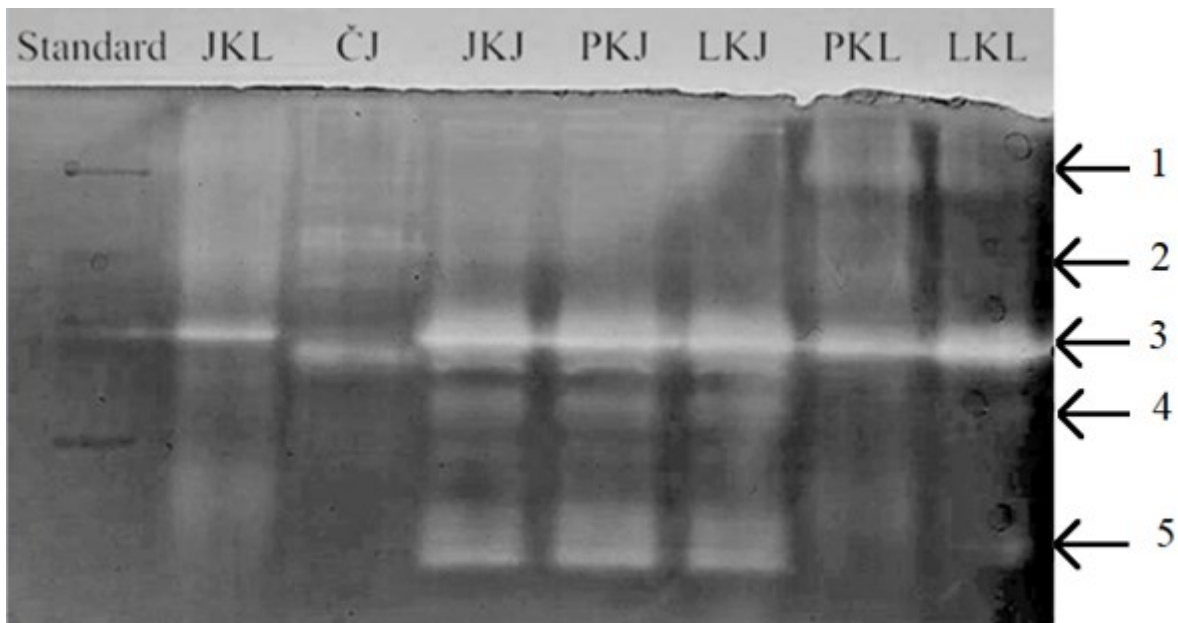
Aktivita glykosidas byla měřena v extraktech lyofilizátu kopřivové jíchy z jarních, letních a podzimních kopřiv. S využitím substrátu p-NP- β -D-glukopyranosidu byla aktivita vyjádřena jako množství vzniklého produktu (p-nitrofenolu) za čas na g lyofilizátu. Hodnoty aktivity β -glukosidasy ve všech vzorcích extraktu z lyofilizátu vykazují minimální odchylky v rámci roční doby sběru kopřiv.



Obrázek 23. Aktivita β -glukosidasy v lyofilizátech jíchy z jarních, letních a podzimních kopřiv. Aktivita je vyjádřena jako nmol produktu reakce (*p*-nitrofenolu) za minutu reakce na g lyofilizátu. Při extrakci jíchy bylo použité takové koncentrace lyofilizátu, aby každý vzorek obsahoval stejné množství proteinů a to 10 mg.

4.8 Detekce proteolytické aktivity v jíchách v závislosti na způsobu skladování

Pro porovnání aktivity proteas v závislosti na způsobu skladování byla provedena želatinová zymografie extraktů lyofilizátu, zmražených kopřivových jích a čerstvé jíchy z kopřiv letního sběru. Výsledný gel je prezentován na obrázku 24. Proteolytická aktivita ve zmražených jíchách byla výrazně vyšší než v lyofilizovaných vzorcích (viz tabulka 5). Ve všech vzorcích nejvyšší aktivitu vykazuje proteasa č. 3. Zatímco jenom v čerstvých jíchách se vyskytují proteasy označené 4 a 5, ve všech lyofilizátech kopřiv je výrazně přítomná proteasa č. 1 (viz tabulka 5).



Obrázek 24. Detekce proteolytické aktivity ve 12 % separačním gelu obsahujícím želatinu jako substrát.

JKL – jarní lyofilizát jíchy, JKJ – jarní čerstvá jícha, PKJ – podzimní zmražená čerstvá jícha, LKJ – letní zmražená čerstvá jícha, PKL – podzimní zmražená lyofilizát jíchy, LKL – letní lyofilizát jíchy, ČJ – čerstvá, nezmražená jícha letního sběru. Obsah proteinů ve všech vzorcích je stejný, a činí 0,8 mg.

V následující tabulce je vyhodnocení intenzity jednotlivých proužků z gelu (obrázek č. 24), které představují jednotlivé proteasy.

Tabulka 5. Vyhodnocení relativní aktivity proteas v gelu z obrázku 24 pomocí programu GelAnalyzer.

Proteasa	JKL	ČJ	JKJ	PKJ	LKJ	PKL	LKL
	Intenzita						
1	1856	–	–	–	–	1700	1965
2	–	2186	–	–	–	–	–
3	3707	2259	3657	3328	4004	3395	4154
4	–	–	1151	1546	1272	–	–
5	2401	–	2388	2584	2577	2498	2350

5 Diskuse

Biostimulanty v podobě např. extraktů mořských řas, huminových a fulvových kyselin, proteinových hydrolyzátů a mikrobiálních produktů představují klíčové prvky moderního zemědělství a zahradnictví, které hrají významnou roli ve zlepšování růstu rostlin, jejich celkové vitality i odolnosti vůči stresu. Tyto prostředky jsou obzvláště ceněny pro svůj ekologický a přírodní charakter, který je v souladu s principy udržitelného zemědělství^{107,108}.

V této práci byla charakterizována kopřivová jícha v závislosti na různé roční době. Jícha, tradičně používaná k podpoře růstu zahradních plodin, vzniká fermentací, kdy se kopřivy ponoří do vody a nechají několik týdnů kvasit. Následně se ředí a aplikuje na rostliny, aby podpořila jejich růst a tvorbu plodů. Soustředili jsme se na potenciální mechanismy blahodárného působení jíchy na rostliny, které spočívají jak v podpoře růstu, tak také v ochraně před abiotickým stresem^{109–111}. Jedním z hlavních účinků kopřivové jíchy je pravděpodobně zlepšení dostupnosti živin pro rostliny. To vyplývá, nejen z vysokého obsahu makromolekul: proteinů a sacharidů (obr. **Obrázek 15** a **Obrázek 16** str. 36 a 37.), případně i esenciálních prvků jako je Mg, Mn, Fe, Si⁶⁶, ale také v přítomnosti hydrolytických enzymů, štěpících makromolekuly na jednodušší, pro rostlinu lépe využitelné látky. Kopřivová jícha vykazovala vysokou aktivitu proteas, fosfatas a β -glukosidas (**Obrázek 20**, **Obrázek 22**, **Obrázek 23** str. 41, 43, 44), což jsou enzymy, které nejen že pocházejí z rostlin, ale jsou také produkovány fermentujícími bakteriemi a dalšími mikroorganismy. V naší laboratoři se jednalo o pilotní pokus zaměřující se na biochemické vlastnosti jíchy, proto byl v průběhu práce optimalizován, jak postup přípravy jíchy (tab. 3), tak metody stanovení aktivity hydrolytických enzymů (obr. 19–23, str. 41–45). Nalezená pH optima byla pro proteasy jíchy 5–8 (obr. 20, str. 41), kyselé fosfatasy 4,5–5,5 a alkalické fosfatasy jíchy okolo 8. Pro fosfatasy izolované z listů tabáku bylo nalezeno pH optimum v oblasti 5–6¹¹². Širší interval pH optima proteas (5–11) byl popsán také pro půdní bakterie¹¹³, u rostlinných proteas převládá pH optimum okolo 7–8¹¹⁴. Závislost množství produktů na čase ukázala pro tyto enzymy reakční dobu 50 minut (obr. 19, 21 str. 40 a 42), což je nižší než pro půdní proteasy a fosfatasy, pro které se většinou reakční doba musí prodloužit až na 24 hodin¹¹⁰. Vzhledem k tomu, že postup přípravy kopřivové jíchy je empirický, většinou se uvádí pouze to, aby kopřivy byly ponořené, zkusili jsme (také s ohledem na objem kopřivové biomasy), použít různá množství vody, nejméně vody bylo použito u letní jíchy (348 g čerstvých kopřiv/l vody), poté jarní (194 g/l) a nejvíce u podzimní (33 g/l). Aby tedy mohla být enzymová aktivita kvantifikována a porovnávána, byla jícha lyofilizována, a poté znovu extrahována v destilované vodě. Lyofilizací nedošlo ke ztrátě aktivity žádného sledovaného enzymu. Překvapivě na aktivitu hydrolytických enzymů nemělo prvotní rozdílné množství vody při přípravě až takový vliv a aktivita hydrolytických enzymů v jíchách kopřiv různého vegetačního období vztažená na ml čerstvé jíchy byla srovnatelná; nejvíce se lišila jarní a letní jícha od podzimní v aktivitě kyselé fosfatasy, ale pouze o 11 % (obr. 22 str. 43). Zřejmě se tedy jedná především o obsah fermentujících mikroorganismů, které k výsledné hydrolytické aktivitě přispívají. Zatímco aktivita hydrolytických enzymů a obsah proteinů v lyofilizátu jíchy se v závislosti na roční době sběru kopřiv nelišily (obr. 15, 20, 22, 23, str. 36–44), podzimní jícha se vyznačovala vyšším obsahem celkových neutrálních sacharidů (o 38 % než jarní jícha, obr. 16, str. 37). Kdyby obsah sacharidů závisel pouze na rostlinách kopřiv mohl by vyšší obsah sacharidů souviset se senescencí listů, a tím zvýšenou aktivitou glyoxylátového cyklu a glukoneogeneze přeměňujících

membránové lipidy listů na sacharidy. Avšak jak obsah sacharidů, tak hydrolytické enzymy jíchy nejsou pouze rostlinného původu, ale jsou také ovlivňovány a produkovány fermentujícími bakteriemi, případně i dalšími mikroorganismy. Půdní proteolýza je považována za důležitý proces koloběhu C a N, proto by kopřivová jícha mohla být účinným nástrojem pro zvýšení vitality a biochemických procesů půdy, obzvláště při její remediaci. Proteiny fermentovaných kopřiv jsou rozkládány mnoha různými proteasami (obr 24, str. 45). Na obsah a aktivitu proteas jíchy měl také vliv způsob skladování, mražené jíchy vykazovaly vyšší proteolytickou aktivitu než lyofilizované (obr 24, str. 45). Na rozkladu makromolekul živin v půdě se podílejí také fosfatasy, opět produkované jak rostlinnými kořeny, tak bakteriemi. Jejich hydrolytickým působením se z heterogenní směsi organických fosfátových sloučenin uvolňuje fosfát, který je v půdních ekosystémech často v nedostatku a pro růst rostlin je klíčový¹¹⁵. Především v podmínkách nedostatku fosfátu pro rostliny a v alkalických půdách je aktivita kyselých fosfatasy klíčová. V jíše byla vyšší aktivita kyselých fosfatasy (obr. 22, str. 43), které mineralizaci fosfátů zvyšuje^{34,35}. Posledním sledovaným enzymem jíchy byla β -glukosidasa. V půdě tento enzym katalyzuje finální, rychlost-limitující krok rozkladu celulosy, nejhojnějšího polysacharidu, čímž pro mikrobiální populace poskytuje jednoduchý sacharid, D-glukosu¹¹⁶. Zároveň se podílí na rozkladu hemicelulosy a různých glykanů. Aktivita β -glukosidasy vztahovaná na množství lyofilizátu jíchy se s vegetačním obdobím kopřiv neměnila (obr. 23, str. 44) a byla o 14 % nižší než aktivita půdní β -glykosidasy¹¹⁷.

Dalším potenciálním mechanismem účinku kopřivové jíchy by mohl být vysoký obsah fenolických látek a antioxidačních enzymů, které v jíchách z různých období mezi sebou korelovaly. Především jarní jícha vynikala vyšším celkovým obsahem fenolických látek a vyšší antioxidační kapacitou (obr. 17, 18 str. 38–39). Antioxidační kapacita kopřivové jíchy byla srovnatelná s vodným extraktem ze sušených bylin vlašovičnicku většího a hluchavky bílé¹¹⁸. Za antioxidační vlastnosti jíchy zřejmě odpovídají rozmanité fenolické látky a vitamíny, které byly v listech kopřiv identifikovány¹¹⁹. Právě tyto látky s významným antioxidačním účinkem by se mohly podílet na zvýšené odolnosti rostlin ošetřovaných kopřivovou jíchou, a to především v době, kdy rostlina čelí působení abiotického stresu doprovázeného oxidačním stresem a následným poškozením. V naší laboratoři bylo zjištěno, že aplikace kopřivové jíchy na rostliny kukuřice (*Zea mays L.*) může zvýšit odolnost vůči stresu suchem¹¹⁰. Zároveň by mechanismus účinku kopřivové jíchy jako biostimulantu mohl spočívat v obsahu fytohormonů typu auxinu, giberelinů a cytokininů nebo jejich prekurzorů, což bude předmětem dalšího výzkumu.

6 Závěr

1. Byla provedena biochemická charakterizace přírodního biostimulantu ve formě fermentovaných kopřiv (jíchy), připravené z podzimních, jarních a letních rostlin. Podle výsledných hodnot vztažených na množství lyofilizované jíchy měly všechny jíchy přibližně stejné množství proteinu, avšak podzimní jícha měla vyšší obsah sacharidů. Největší obsah fenolických látek a antioxidační kapacitu vykazovala jícha z jarního sběru kopřiv.
2. Dále byla provedena optimalizace a stanovení aktivit vybraných hydrolytických enzymů, konkrétně proteas, fosfatas a β -glukosidas přítomných v kopřivové jíše. Aktivita těchto hydrolytických enzymů nezávisela na vegetační době sběru kopřiv ani přípravě jíchy, pravděpodobně byla spíše spojena s fermentujícími mikroorganismy.
3. Variabilitu ve složení proteas v rámci biostimulantu dokumentovala i detekce proteolytické aktivity v kopřivové jíše, která rovněž ukázala, že zastoupení proteas se mění v závislosti na způsobu uchovávání jíchy.

Seznam použité literatury

- (1) Nicholson, P. S.; Hirsch, P. R. The Effects of Pesticides on the Diversity of Culturable Soil Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. **84**, 551–558, (1998).
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00381.x>.
- (2) Boehme, L.; Langer, U.; Böhme, F. Microbial Biomass, Enzyme Activities and Microbial Community Structure in Two European Long-Term Field Experiments. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. **109**, 141–152(2005).
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.01.017>.
- (3) Filatov V. P. Tissue Treatment. (Doctrine on Biogenic Stimulators). II. Hypothesis of Tissue Therapy, or the Doctrine on Biogenic Stimulators. *Priroda* 12. pp 20–28, (1951).
- (4) Ricardo O. Russo, G. P. B. The Use of Organic Biostimulants to Help Low Input Sustainable Agriculture. *Journal of Sustainable Agriculture*. **1** (1991).
https://doi.org/10.1300/J064v01n02_04.
- (5) McCarty L., Lambert B. *Best Golf Course Management Practices : Construction, Watering, Fertilizing, Cultural Practices, and Pest Management Strategies to Maintain Golf Course Turf with Minimal Environmental Impact*, 2nd ed.; Prentice Hall, (2005).
- (6) du Jardin, P. *The Science of Plant Biostimulants – a Bibliographic Analysis*. 27–30 (2012).
- (7) Bulgari, R.; Cocetta, G.; Trivellini, A.; Vernieri, P.; Ferrante, A. Biostimulants and Crop Responses: A Review. *Biological Agriculture & Horticulture*. **31**, 1–17 (2015).
<https://doi.org/10.1080/01448765.2014.964649>.
- (8) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/1009 ze dne 5. června 2019, kterým se stanoví pravidla pro dodávání hnojivých výrobků EU na trh a kterým se mění nařízení (ES) č. 1069/2009 a (ES) č. 1107/2009 a zrušuje nařízení (ES) č. 2003/2003 (Text s významem pro EHP); 2019; Vol. 170. <http://data.europa.eu/eli/reg/2019/1009/oj/ces> (accessed 2024-08-14).
- (9) Yakhin, O. I.; Lubyantsev, A. A.; Yakhin, I. A.; Brown, P. H. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science*. **7**, (2016).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>.
- (10) Brown, P.; Saa, S. Biostimulants in Agriculture. *Frontiers in Plant Science*. **6**, (2015).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00671>.
- (11) Roche, D.; Rickson, J. R.; Pawlett, M. Moving towards a Mechanistic Understanding of Biostimulant Impacts on Soil Properties and Processes: A Semi-Systematic Review. *Frontiers in Agronomy*. **6**, 1–14, (2024).
<https://doi.org/10.3389/fagro.2024.1271672>.
- (12) Povero, G.; Mejia, J. F.; Di Tommaso, D.; Piaggese, A.; Warrior, P. A Systematic Approach to Discover and Characterize Natural Plant Biostimulants. *Frontiers in Plant Science*. **7**, (2016).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00435>.
- (13) Colla, G.; Rouphael, Y.; Cardarelli, M.; Švecová, E.; Reynaud, H.; Canaguier, R.; Planques, B. Effectiveness of a Plant-Derived Protein Hydrolysate to Improve Crop Performances under Different Growing Conditions. *Acta Horticulturae*. **1009**, 175–179 (2013).
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1009.21>.
- (14) Ertani, A.; Pizzeghello, D.; Francioso, O.; Sambo, P.; Sanchez-Cortes, S.; Nardi, S. Capsicum Chinensis L. Growth and Nutraceutical Properties Are Enhanced by Biostimulants in a Long-Term Period: Chemical and Metabolomic Approaches. *Frontiers in Plant Science*. **5**, (2014). 375. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00375>.
- (15) Cerdán, M.; Sánchez-Sánchez, A.; Oliver, M.; Juárez, M.; Sánchez-Andreu, J. J. Effect of Foliar and Root Applications of Amino Acids on Iron Uptake by Tomato Plants. *Acta Horticulturae*. **830**, 481–488 (2009).

- <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.830.68>.
- (16) Colla, G.; Nardi, S.; Cardarelli, M.; Ertani, A.; Lucini, L.; Canaguier, R.; Roupael, Y. Protein Hydrolysates as Biostimulants in Horticulture. *Scientia Horticulturae*. **196**, 28–38 (2015).
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>.
- (17) Botta, A. Enhancing Plant Tolerance to Temperature Stress with Amino Acids: An Approach to Their Mode of Action. *Acta Horticulturae*. **1009**, 29–35 (2013).
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1009.1>.
- (18) Colla, G.; Nardi, S.; Cardarelli, M.; Ertani, A.; Lucini, L.; Canaguier, R.; Roupael, Y. Protein Hydrolysates as Biostimulants in Horticulture. *Scientia Horticulturae*. **196**, 28–38 (2015).
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.037>.
- (19) Colla, G.; Roupael, Y.; Lucini, L.; Canaguier, R.; Stefanoni, W.; Fiorillo, A.; Cardarelli, M. Protein Hydrolysate-Based Biostimulants: Origin, Biological Activity and Application Methods. *Acta Horticulturae*. **1148** 27–34 (2016).
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1148.3>.
- (20) Oosten, M.; Pepe, O.; De Pascale, S.; Silletti, S.; Maggio, A. The Role of Biostimulants and Bioeffectors as Alleviators of Abiotic Stress in Crop Plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. **4**, (2017).
<https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>.
- (21) Glick, B. R. Bacteria with ACC Deaminase Can Promote Plant Growth and Help to Feed the World. *Microbiological Research*. **169**, 30–39 (2014).
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>.
- (22) Chandra, D.; Srivastava, R.; Glick, B. R.; Sharma, A. K. Drought-Tolerant *Pseudomonas* Spp. Improve the Growth Performance of Finger Millet (*Eleusine Coracana* (L.) Gaertn.) Under Non-Stressed and Drought-Stressed Conditions. *Pedosphere*. **28**, 227–240 (2018).
[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60013-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60013-X).
- (23) Chiappero, J.; Cappellari, L. del R.; Sosa Alderete, L. G.; Palermo, T. B.; Banchio, E. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Improve the Antioxidant Status in *Mentha Piperita* Grown under Drought Stress Leading to an Enhancement of Plant Growth and Total Phenolic Content. *Industrial Crops and Products*. **139**, 1115-53 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111553>.
- (24) Bázquez, G.; Aroca, R.; Ruiz-Lozano, J. M. Localized and Non-Localized Effects of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis on Accumulation of Osmolytes and Aquaporins and on Antioxidant Systems in Maize Plants Subjected to Total or Partial Root Drying. *Plant, Cell & Environment*. **38**, 1613–1627 (2015).
<https://doi.org/10.1111/pce.12507>.
- (25) Ait-El-Mokhtar, M.; Laouane, R. B.; Anli, M.; Boutasknit, A.; Wahbi, S.; Meddich, A. Use of Mycorrhizal Fungi in Improving Tolerance of the Date Palm (*Phoenix Dactylifera* L.) Seedlings to Salt Stress. *Scientia Horticulturae*. **253**, 429–438 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.066>.
- (26) Abd Allah, E. F.; Hashem, A.; Alqarawi, A. A.; Bahkali, A. H.; Alwhibi, M. S. Enhancing Growth Performance and Systemic Acquired Resistance of Medicinal Plant *Sesbania Sesban* (L.) Merr Using Arbuscular Mycorrhizal Fungi under Salt Stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*. **22**, 274–283 (2015).
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.03.004>.

- (27) Ansari, F. A.; Ahmad, I.; Pichtel, J. Growth Stimulation and Alleviation of Salinity Stress to Wheat by the Biofilm Forming *Bacillus Pumilus* Strain FAB10. *Applied Soil Ecology*. **143**, 45–54 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.05.023>.
- (28) Eke, P.; Kumar, A.; Sahu, K. P.; Wakam, L. N.; Sheoran, N.; Ashajyothi, M.; Patel, A.; Fekam, F. B. Endophytic Bacteria of Desert Cactus (*Euphorbia Trigonas* Mill) Confer Drought Tolerance and Induce Growth Promotion in Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.). *Microbiological Research*. **228**, 126302 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126302>.
- (29) Bargaz, A.; Lyamlouli, K.; Chtouki, M.; Zeroual, Y.; Dhiba, D. Soil Microbial Resources for Improving Fertilizers Efficiency in an Integrated Plant Nutrient Management System. *Frontiers in Microbiology*. **9** (2018).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01606>.
- (30) Nawaz, A.; Shahbaz, M.; Asadullah; Imran, A.; Marghoob, M. U.; Imtiaz, M.; Mubeen, F. Potential of Salt Tolerant PGPR in Growth and Yield Augmentation of Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Under Saline Conditions. *Frontiers in Microbiology*. **11** (2020).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02019>.
- (31) Santander, C.; Sanhueza, M.; Olave, J.; Borie, F.; Valentine, A.; Cornejo, P. Arbuscular Mycorrhizal Colonization Promotes the Tolerance to Salt Stress in Lettuce Plants through an Efficient Modification of Ionic Balance. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. **19**, 321–331(2019).
<https://doi.org/10.1007/s42729-019-00032-z>.
- (32) Kour, D.; Rana, K. L.; Yadav, A. N.; Yadav, N.; Kumar, M.; Kumar, V.; Vyas, P.; Dhaliwal, H. S.; Saxena, A. K. Microbial Biofertilizers: Bioresources and Eco-Friendly Technologies for Agricultural and Environmental Sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **23**, 101487 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>.
- (33) Santos-Torres, M.; Romero-Perdomo, F.; Mendoza-Labrador, J.; Gutiérrez, A. Y.; Vargas, C.; Castro-Rincon, E.; Caro-Quintero, A.; Uribe-Velez, D.; Estrada-Bonilla, G. A. Genomic and Phenotypic Analysis of Rock Phosphate-Solubilizing Rhizobacteria. *Rhizosphere*. **17**, 100290 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100290>.
- (34) Santos-Torres, M.; Romero-Perdomo, F.; Mendoza-Labrador, J.; Gutiérrez, A. Y.; Vargas, C.; Castro-Rincon, E.; Caro-Quintero, A.; Uribe-Velez, D.; Estrada-Bonilla, G. A. Genomic and Phenotypic Analysis of Rock Phosphate-Solubilizing Rhizobacteria. *Rhizosphere*. **17**, 100290 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100290>.
- (35) Hii, Y. S.; Yen San, C.; Lau, S. W.; Danquah, M. K. Isolation and Characterisation of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Peat. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **26**, 101643 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101643>.
- (36) Hasanuzzaman, M.; Parvin, K.; Bardhan, K.; Nahar, K.; Anee, T. I.; Masud, A. A. C.; Fotopoulos, V. Biostimulants for the Regulation of Reactive Oxygen Species Metabolism in Plants under Abiotic Stress. *Cells*. **10**, 2537 (2021).
<https://doi.org/10.3390/cells10102537>.
- (37) Sadasivam, V.; Packiaraj, G.; Sundari; Kalamani, V. Evaluation of Seagrass Liquid Extract on Salt Stress Alleviation in Tomato Plants. *Asian Journal of Plant Sciences*. **16**, 172–183 (2017).

- <https://doi.org/10.3923/ajps.2017.172.183>.
- (38) Dalal, A.; Bourstein, R.; Haish, N.; Shenhar, I.; Wallach, R.; Moshelion, M. Dynamic Physiological Phenotyping of Drought-Stressed Pepper Plants Treated With “Productivity-Enhancing” and “Survivability-Enhancing” Biostimulants. *Frontiers in Plant Science*. **10** (2019).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00905>.
- (39) Ali, O.; Ramsubhag, A.; Jayaraman, J. Biostimulatory Activities of *Ascophyllum Nodosum* Extract in Tomato and Sweet Pepper Crops in a Tropical Environment. *PLOS ONE*. **14**, e0216710 (2019).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216710>.
- (40) Li, Y.; Mattson, N. S. Effects of Seaweed Extract Application Rate and Method on Post-Production Life of Petunia and Tomato Transplants. *HortTechnology Hortte*. **25**, 505-510 (2015). <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.25.4.505>.
- (41) Kapur, B.; Sarıdaş, M. A.; Çeliktöpez, E.; Kafkas, E.; Paydaş Kargı, S. Health and Taste Related Compounds in Strawberries under Various Irrigation Regimes and Bio-Stimulant Application. *Food Chemistry*. **263**, 67–73 (2018).
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.108>.
- (42) Susilorini, R. M. I. R.; Hardjasaputra, H.; Tudjono, S.; Hapsari, G.; Wahyu, S. R.; Hadikusumo, G.; Sucipto, J. The Advantage of Natural Polymer Modified Mortar with Seaweed: Green Construction Material Innovation for Sustainable Concrete. *Procedia Engineering*. **95**, 419–425 (2014).
<https://doi.org/10.1016/j.proeng.2014.12.201>.
- (43) Frioni, T.; Sabbatini, P.; Tombesi, S.; Norrie, J.; Poni, S.; Gatti, M.; Palliotti, A. Effects of a Biostimulant Derived from the Brown Seaweed *Ascophyllum Nodosum* on Ripening Dynamics and Fruit Quality of Grapevines. *Scientia Horticulturae*. **232**, 97–106 (2018).
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.054>.
- (44) Malaguti, D.; Rombolà, A. D.; Gerin, M.; Simoni, G.; Tagliavini, M.; Marangoni, B. Effect Of Seaweed Extracts-Based Leaf Sprays On The Mineral Status, Yield And Fruit Quality Of Apple. *Acta Horticulturae*. **594**, 357–359 (2002).
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.594.44>.
- (45) Martynenko, A.; Shotton, K.; Astatkie, T.; Petrash, G.; Fowler, C.; Neily, W.; Critchley, A. T. Thermal Imaging of Soybean Response to Drought Stress: The Effect of *Ascophyllum Nodosum* Seaweed Extract. *SpringerPlus*. **5**, 1393 (2016).
<https://doi.org/10.1186/s40064-016-3019-2>.
- (46) Shukla, P. S.; Shotton, K.; Norman, E.; Neily, W.; Critchley, A. T.; Prithiviraj, B. Seaweed Extract Improve Drought Tolerance of Soybean by Regulating Stress-Response Genes. *AoB PLANTS*. **10**, plx051 (2018).
<https://doi.org/10.1093/aobpla/plx051>.
- (47) Kiraci, S. Effects of Seaweed and Different Farm Manures on Growth and Yield of Organic Carrots. *Journal of Plant Nutrition*. **41**, 716–721 (2018).
<https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1425435>.
- (48) Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; Okorokova-Façanha, A. L.; Façanha, A. R. Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiology*. **130**, 1951–1957 (2002).
<https://doi.org/10.1104/pp.007088>.

- (49) Pinton, R.; Cesco, S.; Iacoletti, G.; Astolfi, S.; Varanini, Z. Modulation of NO₃⁻ Uptake by Water-Extractable Humic Substances: Involvement of Root Plasma Membrane H⁺ ATPase. *Plant and Soil*. **215**, 155–161 (1999).
<https://doi.org/10.1023/A:1004752531903>.
- (50) Nardi, S.; Concheri, G.; Dell’Agnola, G.; Scrimin, P. Nitrate Uptake and ATPase Activity in Oat Seedlings in the Presence of Two Humic Fractions. *Soil Biology and Biochemistry*. **23**, 833–836 (1991).
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90094-Z](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90094-Z).
- (51) Jannin, L.; Arkoun, M.; Ourry, A.; Laine, P.; Goux, D.; Garnica, M.; Fuentes, M.; Francisco, S. S.; Baigorri, R.; Cruz, F.; Houdusse, F.; Garcia-Mina, J.; Yvin, J.-C.; Etienne, P. Microarray Analysis of Humic Acid Effects on Brassica Napus Growth: Involvement of N, C and S Metabolisms. *Plant and Soil*. **359**, 297–319 (2012).
<https://doi.org/10.1007/s11104-012-1191-x>.
- (52) Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; Aguiar, N. O.; Jones, D. L.; Nebbioso, A.; Mazzei, P.; Piccolo, A. Humic and Fulvic Acids as Biostimulants in Horticulture. *Scientia Horticulturae*. **196**, 15–27 (2015).
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>.
- (53) Canellas, L. P.; Balmori, D. M.; Médiçi, L. O.; Aguiar, N. O.; Campostrini, E.; Rosa, R. C. C.; Façanha, A. R.; Olivares, F. L. A Combination of Humic Substances and Herbaspirillum Seropedicae Inoculation Enhances the Growth of Maize (Zea Mays L.). *Plant and Soil*. **366**, 119–132 (2013).
<https://doi.org/10.1007/s11104-012-1382-5>.
- (54) Pilon-Smits, E. A.; Quinn, C. F.; Tapken, W.; Malagoli, M.; Schiavon, M. Physiological Functions of Beneficial Elements. *Current Opinion in Plant Biology*. **12**, 267–274, (2009).
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.009>.
- (55) Wu, J.; Liang, J.; Björn, L. O.; Li, J.; Shu, W.; Wang, Y. Phosphorus-Arsenic Interaction in the “soil-Plant-Microbe” System and Its Influence on Arsenic Pollution. *The Science of the Total Environment*. **802**, 149796 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149796>.
- (56) Yoshii, Y. Aluminium Requirements of Solfataria-Plants. *The Botanical Magazine*. **51**, 262–270 (1937).
<https://doi.org/10.15281/jplantres1887.51.262>.
- (57) Ohnishi, J.; Flügge, U.-I.; Heldt, H. W.; Kanai, R. Involvement of Na⁺ in Active Uptake of Pyruvate in Mesophyll Chloroplasts of Some C₄ Plants 1: Na⁺/Pyruvate Cotransport. *Plant Physiology*. **94**, 950–959 (1990).
<https://doi.org/10.1104/pp.94.3.950>.
- (58) Shrift, A. Aspects of Selenium Metabolism in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology*. **20**, 475–494 (1969).
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.20.060169.002355>.
- (59) Zargar, S. M.; Mahajan, R.; Bhat, J. A.; Nazir, M.; Deshmukh, R. Role of Silicon in Plant Stress Tolerance: Opportunities to Achieve a Sustainable Cropping System. *3 Biotech*. **9**, 73 (2019).
<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1613-z>.
- (60) Kk, M. A.; Parsuraman, S. Urtica Dioica L., (Urticaceae): A Stinging Nettle. *Systematic Reviews in Pharmacy*. **5**, 6–8 (2014).
<https://doi.org/10.5530/srp.2014.1.3>.
- (61) Cummings, A. J.; Olsen, M. Mechanism of Action of Stinging Nettles. *Wilderness & Environmental Medicine*. **22**, 136–139 (2011).

- <https://doi.org/10.1016/j.wem.2011.01.001>.
- (62) Joshi, B. C.; Mukhija, M.; Kalia, A. N. Pharmacognostical Review of *Urtica Dioica* L. *International Journal of Green Pharmacy*. **8**, 201–209 (2014).
<https://doi.org/10.4103/0973-8258.142669>.
- (63) Kregiel, D.; Pawlikowska, E.; Antolak, H. *Urtica* Spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. *Molecules*. **23**, 1664 (2018).
<https://doi.org/10.3390/molecules23071664>.
- (64) Otles, S.; Yalcin, B. Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. *The Scientific World Journal*. **2012**, 564367 (2012).
<https://doi.org/10.1100/2012/564367>.
- (65) Orčić, D.; Francišковиć, M.; Bekvalac, K.; Svirčev, E.; Beara, I.; Lesjak, M.; Mimica-Dukić, N. Quantitative Determination of Plant Phenolics in *Urtica Dioica* Extracts by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometric Detection. *Food Chemistry*. **143**, 48–53 (2014).
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.097>.
- (66) Fatima, T.; Naseer, B.; Hussain, S. Z. Stinging Nettle: A Herb with Tremendous Pharmacological Potential. *International Journal of Unani and Integrative Medicine*. **2**, 24–28 (2018).
<https://doi.org/10.33545/2616454X.2018.v2.i2a.29>.
- (67) Devkota, H. P.; Paudel, K. R.; Khanal, S.; Baral, A.; Panth, N.; Adhikari-Devkota, A.; Jha, N. K.; Das, N.; Singh, S. K.; Chellappan, D. K.; Dua, K.; Hansbro, P. M. Stinging Nettle (*Urtica Dioica* L.): Nutritional Composition, Bioactive Compounds, and Food Functional Properties. *Molecules*. **27**, 5219 (2022).
<https://doi.org/10.3390/molecules27165219>.
- (68) Gurumalles, P.; Alagu, K.; Ramakrishnan, B.; Muthusamy, S. A Systematic Reconsideration on Proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*. **128**, 254–267(2019).
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>.
- (69) McDonald, J. K. An Overview of Protease Specificity and Catalytic Mechanisms: Aspects Related to Nomenclature and Classification. *The Histochemical Journal*. **17**, 773–785(1985).
<https://doi.org/10.1007/BF01003313>.
- (70) Hellinger, R.; Gruber, C. W. Peptide-Based Protease Inhibitors from Plants. *Drug Discovery Today*. **24**, 1877–1889(2019).
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.026>.
- (71) Sharma, P.; Gayen, D. Plant Protease as Regulator and Signaling Molecule for Enhancing Environmental Stress-Tolerance. *Plant Cell Reports*. **40**, 2081–2095 (2021).
<https://doi.org/10.1007/s00299-021-02739-9>.
- (72) Bailey, S.; Thompson, E.; Nixon, P. J.; Horton, P.; Mullineaux, C. W.; Robinson, C.; Mann, N. H. A Critical Role for the Var2 FtsH Homologue of *Arabidopsis Thaliana* in the Photosystem II Repair Cycle *in Vivo**. *Journal of Biological Chemistry*. **277**, 2006–2011 (2002).
<https://doi.org/10.1074/jbc.M105878200>.
- (73) Li, L.; Nelson, C.; Fenske, R.; Trösch, J.; Pružinská, A.; Millar, A. H.; Huang, S. Changes in Specific Protein Degradation Rates in *Arabidopsis Thaliana* Reveal Multiple Roles of Lon1 in Mitochondrial Protein Homeostasis*. *The Plant Journal*. **89**, 458–471 (2017).
<https://doi.org/10.1111/tbj.13392>.
- (74) Schuhmann, H.; Adamska, I. Deg Proteases and Their Role in Protein Quality Control and Processing in Different Subcellular Compartments of the Plant Cell. *Physiologia Plantarum*. **145**, 224–234 (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01533.x>.

- (75) Singh, A.; Pandey, A.; Srivastava, A. K.; Tran, L. S.; Pandey, G. K. Plant Protein Phosphatases 2C: From Genomic Diversity to Functional Multiplicity and Importance in Stress Management. *Critical Reviews in Biotechnology*. **36**, 1023–1035 (2016). <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1083941>.
- (76) Jia, Q.; Kong, D.; Li, Q.; Sun, S.; Song, J.; Zhu, Y.; Liang, K.; Ke, Q.; Lin, W.; Huang, J. The Function of Inositol Phosphatases in Plant Tolerance to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. **20**, 3999 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20163999>.
- (77) Davies, D. R. The Phosphatase Activity of Spleen Extracts. *The Biochemical Journal*. **28**, 529–536 (1934). <https://doi.org/10.1042/bj0280529>.
- (78) Sharma, L.; Kahandal, A.; Kanagare, A.; Kulkarni, A.; Tagad, C. K. The Multifaceted Nature of Plant Acid Phosphatases: Purification, Biochemical Features, and Applications. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **38**, 2282379 (2023). <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2282379>.
- (79) Ding, N.; Huertas, R.; Torres-Jerez, I.; Liu, W.; Watson, B.; Scheible, W.; Udvardi, M. Transcriptional, Metabolic, Physiological and Developmental Responses of Switchgrass to Phosphorus Limitation. *Plant, Cell & Environment*. **44**, 186–202 (2021). <https://doi.org/10.1111/pce.13872>.
- (80) Baldwin, J. C.; Karthikeyan, A. S.; Raghothama, K. G. LEPS2, a Phosphorus Starvation-Induced Novel Acid Phosphatase from Tomato. *Plant Physiology*. **125**, 728–737 (2001). <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.728>.
- (81) Nasri, N.; Maatallah, S.; Kaddour, R.; Lachâal, M. Effect of Salinity on Arabidopsis Thaliana Seed Germination and Acid Phosphatase Activity. *Archives of Biological Sciences*. **68**, 17–23 (2016). <https://doi.org/10.2298/ABS150620003N>.
- (82) Shewale, J. G. β -Glucosidase: Its Role in Cellulase Synthesis and Hydrolysis of Cellulose. *International Journal of Biochemistry*. **14**, 435–443 (1982). [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(82\)90109-4](https://doi.org/10.1016/0020-711X(82)90109-4).
- (83) Niemeyer, H. M. Hydroxamic Acids (4-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-Ones), Defence Chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry*. **27**, 3349–3358 (1988). [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80731-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80731-3).
- (84) Poulton, J. E. Cyanogenesis in Plants. *Plant Physiology*. **94**, 401–405 (1990). <https://doi.org/10.1104/pp.94.2.401>.
- (85) Morant, A. V.; Jørgensen, K.; Jørgensen, C.; Paquette, S. M.; Sánchez-Pérez, R.; Møller, B. L.; Bak, S. β -Glucosidases as Detonators of Plant Chemical Defense. *Phytochemistry*. **69**, 1795–1813 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.03.006>.
- (86) Sherameti, I.; Venus, Y.; Drzewiecki, C.; Tripathi, S.; Dan, V. M.; Nitz, I.; Varma, A.; Grundler, F. M.; Oelmüller, R. PYK10, a β -Glucosidase Located in the Endoplasmatic Reticulum, Is Crucial for the Beneficial Interaction between Arabidopsis Thaliana and the Endophytic Fungus Piriformospora Indica. *The Plant Journal*. **54**, 428–439 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03424.x>.
- (87) Brzobohatý, B.; Moore, I.; Kristoffersen, P.; Bako, L.; Campos, N.; Schell, J.; Palme, K. Release of Active Cytokinin by a Beta-Glucosidase Localized to the Maize Root Meristem. *Science*. **262**, 1051–1054 (1993). <https://doi.org/10.1126/science.8235622>.

- (88) Jakubowska, A.; Kowalczyk, S. A Specific Enzyme Hydrolyzing 6-O(4-O)-Indole-3-Ylacetyl-Beta-D-Glucose in Immature Kernels of Zea Mays. *Journal of Plant Physiology*. **162**, 207–213 (2005).
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.05.015>.
- (89) Stöckigt, J.; Zenk, M. H. Strictosidine (Isovincoside): The Key Intermediate in the Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 646–648 (1977).
<https://doi.org/10.1039/C397770000646>.
- (90) Barleben, L.; Panjekar, S.; Ruppert, M.; Koepke, J.; Stöckigt, J. Molecular Architecture of Strictosidine Glucosidase: The Gateway to the Biosynthesis of the Monoterpenoid Indole Alkaloid Family. *The Plant Cell*. **19**, 2886–2897 (2007).
<https://doi.org/10.1105/tpc.106.045682>.
- (91) Nomura, T.; Quesada, A. L.; Kutchan, T. M. The New β -D-Glucosidase in Terpenoid-Isoquinoline Alkaloid Biosynthesis in *Psychotria Ipecacuanha*. *Journal of Biological Chemistry*. **283**, 34650–34659 (2008). <https://doi.org/10.1074/jbc.M806953200>.
- (92) Leah, R.; Kigel, J.; Svendsen, I.; Mundy, J. Biochemical and Molecular Characterization of a Barley Seed Beta-Glucosidase. *The Journal of Biological Chemistry*. **270**, 15789–15797 (1995).
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.26.15789>.
- (93) Hrmova, M.; MacGregor, E. A.; Biely, P.; Stewart, R. J.; Fincher, G. B. Substrate Binding and Catalytic Mechanism of a Barley Beta-D-Glucosidase/(1,4)-Beta-D-Glucan Exohydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**, 11134–11143 (1998).
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11134>.
- (94) Hösel, W.; Surholt, E.; Borgmann, E. Characterization of β -Glucosidase Isoenzymes Possibly Involved in Lignification from Chick Pea (*Cicer Arietinum* L.) *Cell Suspension Cultures. European Journal of Biochemistry*. **84**, 487–492 (1978).
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12190.x>.
- (95) Kielkopf, C. L.; Bauer, W.; Urbatsch, I. L. Methods for Measuring the Concentrations of Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*. **2020**, 97–101 (2020).
<https://doi.org/10.1101/pdb.top102277>.
- (96) Noble, J. E.; Bailey, M. J. A. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*. **463**, 73–95 (2009).
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1).
- (97) Everette, J. D.; Bryant, Q. M.; Green, A. M.; Abbey, Y. A.; Wangila, G. W.; Walker, R. B. A Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes Towards the Folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **58**, 8139–8144 (2010).
<https://doi.org/10.1021/jf1005935>.
- (98) DuBois, Michel.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, Fred. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. **28**, 350–356 (1956).
<https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- (99) Everette, J. D.; Bryant, Q. M.; Green, A. M.; Abbey, Y. A.; Wangila, G. W.; Walker, R. B. A Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes Towards the Folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **58**, 8139–8144 (2010).
<https://doi.org/10.1021/jf1005935>.
- (100) Benzie, I. F.; Strain, J. J. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous

- Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods Enzymol.* **299**, 15–27 (1999).
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)99005-5).
- (101) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine.* **26**, 1231–1237 (1999).
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).
- (102) Huang, Y.; Zou, J.; Lin, J.; Yang, H.; Wang, M.; Li, J.; Cao, W.; Yuan, B.; Ma, J. ABTS as Both Activator and Electron Shuttle to Activate Persulfate for Diclofenac Degradation: Formation and Contributions of ABTS^{•+}, SO₄^{•-}, and •OH. *Environmental Science & Technology.* **57**, 18420–18432 (2023).
<https://doi.org/10.1021/acs.est.2c04318>.
- (103) Kedare, S. B.; Singh, R. P. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *Journal of Food Science and Technology.* **48**, 412–422 (2011).
<https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>.
- (104) Gulcin, İ.; Alwasel, S. H. DPPH Radical Scavenging Assay. *Processes.* **11**, 2248 (2023).
<https://doi.org/10.3390/pr11082248>.
- (105) Coêlho, D. F.; Saturnino, T. P.; Fernandes, F. F.; Mazzola, P. G.; Silveira, E.; Tambourgi, E. B. Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. *BioMed Research International.* **2016**, 8409183 (2016).
<https://doi.org/10.1155/2016/8409183>.
- (106) Goris, J.; Merlevede, W. Stimulation of the ATP, Mg-Dependent Protein Phosphatase by p-Nitrophenyl Phosphate. *Analytical Biochemistry.* **171**, 423–428 (1988).
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90509-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90509-x).
- (107) Shahrajabian, M. H.; Chaski, C.; Polyzos, N.; Petropoulos, S. Biostimulants Application: A Low Input Cropping Management Tool for Sustainable Farming of Vegetables. *Biomolecules.* **11**, 698 (2021).
<https://doi.org/10.3390/biom11050698>.
- (108) Sible, C. N.; Seebauer, J. R.; Below, F. E. Plant Biostimulants: A Categorical Review, Their Implications for Row Crop Production, and Relation to Soil Health Indicators. *Agronomy.* **11**, 1297 (2021).
<https://doi.org/10.3390/agronomy11071297>.
- (109) Prisa, D. Bat Guano and Nettle Slurry (*Urtica Dioica* L.) Used as Biostimulants on *Delosperma Cooperi* and *Sedum Rubrotinctum* Plants. *World Journal of Advanced Research and Reviews.* **3**, 17–23 (2019).
<https://doi.org/10.30574/wjarr.2019.3.2.0058>.
- (110) Vlčková, D. Vliv Biostimulantů Na Růst a Obranné Reakce Rostlin. Diplomová Práce. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká Fakulta, Katedra Biochemie. 2024.
- (111) Hanzelková, K. Characterization of Natural Biostimulants and Their Effect on Soil Properties. Bakalářská Práce. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká Fakulta, Katedra Biochemie. 2024.
- (112) Růžicková K. Charakterizace fosfatas v rostlinách tabáku (*Nicotiana Tabacum* L.). Diplomová Práce. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká Fakulta, Katedra Biochemie, 2011.
- (113) Sinha, P.; Singh, R.; Srivastva, R.; Sharma, R.; Prakash, S.; Tiwari. Characterization and Optimization of Alkaline Protease Enzyme Produced by Soil Borne Bacteria. *Trends in Life Sciences.* **2**, 2319–5037 (2013).

- (114) Greenberg, D. M.; Winnick, T. Plant Proteases: II. pH-Activity Curves. *Journal of Biological Chemistry*. **135**, 775–780 (1940).
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)73139-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)73139-6).
- (115) Margalef, O.; Sardans, J.; Maspons, J.; Molowny-Horas, R.; Fernández-Martínez, M.; Janssens, I. A.; Richter, A.; Ciais, P.; Obersteiner, M.; Peñuelas, J. The Effect of Global Change on Soil Phosphatase Activity. *Global Change Biology*. **27**, 5989–6003 (2021).
<https://doi.org/10.1111/gcb.15832>.
- (116) Stott, D. E.; Andrews, S. S.; Liebig, M. A.; Wienhold, B. J.; Karlen, D. L. Evaluation of β -Glucosidase Activity as a Soil Quality Indicator for the Soil Management Assessment Framework. *Soil Science Society of America Journal*. **74**, 107–119 (2010).
<https://doi.org/10.2136/sssaj2009.0029>.
- (117) Račko J. Vliv triazolových fungicidů na parametry půdy. Diplomová Práce. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká Fakulta, Katedra Biochemie, 2022.
- (118) Tupec, M.; Hýšková, V.; Bělonožníková, K.; Hraníček, J.; Červený, V.; Ryšlavá, H. Characterization of Some Potential Medicinal Plants from Central Europe by Their Antioxidant Capacity and the Presence of Metal Elements. *Food Bioscience*. **20**, 43–50 (2017).
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.08.001>.
- (119) Grauso, L.; de Falco, B.; Lanzotti, V.; Motti, R. Stinging Nettle, *Urtica Dioica* L.: Botanical, Phytochemical and Pharmacological Overview. *Phytochem Rev*. **19**, 1341–1377 (2020).
<https://doi.org/10.1007/s11101-020-09680-x>.