

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
Katedra biochemických věd

**ROZDÍL V PŮSOBENÍ HERBICIDŮ
TRIBENURON-METHYL A ISOPROTURON
U HUSENÍČKU ROLNÍHO**

Difference in the action of the herbicides tribenuron-methyl and isoproturon in
Arabidopsis thaliana

Diplomová práce

Vedoucí práce/školitel: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Markéta Kohoutová

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své vedoucí diplomové práce, paní doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D., za její odbornou pomoc v laboratoři, za její odbornou pomoc a cenné rady během psaní této práce.

Další velké poděkování patří paní RNDr. Radce Podlipné, Ph.D., za její pomoc s experimentální částí mé práce v laboratoři rostlinných biotechnologií Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Její odborná pomoc a rady významně přispěly k úspěšnému provedení experimentů.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Markéta Kohoutová

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

Konzultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Název diplomové práce: Rozdíl v působení herbicidů tribenuron-methyl a isoproturon u huseníčku rolního

Herbicidy jsou velmi důležitým nástrojem pro kontrolu plevelů v zemědělství, avšak jejich nadměrné používání může vést k rozvoji herbicidní rezistence. Jedním z mechanismů, který k této rezistenci přispívá, je zvýšená exprese genů kódujících uridindifosfát-glukuronosyltransferázu (UGT), která hraje klíčovou roli v detoxifikaci herbicidů a ochraně rostlin před jejich účinky. Tato diplomová práce se zabývá porovnáním účinku herbicidů tribenuron-methyl (TBM) a isoproturon (IPU) na expresi UGT a na aktivitu vybraných antioxidantních enzymů u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*).

Experimenty byly provedeny na hydroponických kulturách *A. thaliana*. Exprese genů byla měřena pomocí kvantitativní PCR a aktivita enzymů byla analyzována spektrofotometricky. Výsledky ukázaly, že isoproturon neměl významný vliv na expresi genů. U tribenuron-methylu bylo pozorováno signifikantní zvýšení exprese u genů UGT74E2, UGT73C6, UGT71B6 a UGT91C1, a to zejména při nejnižší koncentraci. Aktivita antioxidantních enzymů nevykazovala žádné zvýšení, a to ani při zvyšujících se koncentracích herbicidu, což naznačuje, že testované koncentrace nebyly pro rostliny dostatečně stresující, aby vyvolaly aktivaci obranných mechanismů.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Markéta Kohoutová

Supervisor: Assoc. Prof. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Consultant: RNDr. Radka Podlipná, Ph.D.

Title of diploma thesis: Difference in the action of the herbicides tribenuron-methyl and isoproturon in *Arabidopsis thaliana*

Herbicides are a crucial tool for weed control in agriculture; however, their excessive use can lead to the development of herbicide resistance. One mechanism contributing to this resistance is the increased expression of genes encoding uridine diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT), which plays a key role in the detoxification of herbicides and the protection of plants from their effects. This thesis focuses on comparing the effects of the herbicides tribenuron-methyl (TBM) and isoproturon (IPU) on the expression of UGT and the activity of selected antioxidant enzymes in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

The experiments were conducted on hydroponic cultures of *A. thaliana*. Gene expression was measured using quantitative PCR, and enzyme activity was analyzed spectrophotometrically. The results showed that isoproturon had no significant effect on gene expression. For tribenuron-methyl, a significant increase in the expression of the UGT74E2, UGT73C6, UGT71B6, and UGT91C1 genes was observed, particularly at the lowest concentration. The activity of antioxidant enzymes did not show any increase, even with rising herbicide concentrations, suggesting that the tested concentrations were not sufficiently stressful to trigger the activation of defense mechanisms in the plants.

Obsah

- 1 Úvod
- 2 Teoretická část
 - 2.1 Herbicidy
 - 2.1.1 Úvod
 - 2.1.2 Herbicidy jako stresory a jejich dopady
 - 2.1.3 Snížení negativních dopadů herbicidů na životní prostředí
 - 2.1.4 Rozdělení herbicidů dle doby aplikace
 - 2.1.5 Příjem a transport herbicidu v rostlině
 - 2.1.6 Mechanismy účinku herbicidů
 - 2.1.7 Herbicidní rezistence
 - 2.1.8 Metabolismus a detoxifikace herbicidů v rostlinách
 - 2.2 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)
 - 2.3 Glykosyltransferázy
 - 2.3.1 UDP-glykosyltransferázy
 - 2.3.2 UGT sledované v této práci
 - 2.4 Antioxidační ochrana
 - 2.4.1 Úvod
 - 2.4.2 Vybrané antioxidační enzymy
- 3 Cíle práce
- 4 Experimentální část
 - 4.1 Příprava hydroponických kultur *A. thaliana*
 - 4.2 Aplikace herbicidů na rostliny
 - 4.3 Stanovení exprese vybraných genů pro UGT
 - 4.3.1 Chemická reagentia
 - 4.3.2 Přístrojové vybavení
 - 4.3.3 Izolace RNA
 - 4.3.4 Měření koncentrace RNA ve vzorku
 - 4.3.5 Ošetření DNázou
 - 4.3.6 Reverzní transkripce
 - 4.3.7 Real-Time PCR
 - 4.3.8 Vyhodnocení a statistická analýza

- 4.4 Stanovení aktivity antioxidantních enzymů
 - 4.4.1 Chemická reagentia
 - 4.4.2 Přístrojové vybavení
 - 4.4.3 Zpracování vzorků listů z rostlin z hydroponických kultur
 - 4.4.4 Stanovení aktivity vybraných antioxidantních enzymů
 - 4.4.5 Vyhodnocení a statistická analýza
- 5 Výsledky
 - 5.1 Ovlivnění vybraných genů pro UGT herbicidy
 - 5.1.1 Vyhodnocení qPCR po ovlivnění *A. thaliana* tribenuron-methylem v živném roztoku
 - 5.1.2 Vyhodnocení qPCR po ovlivnění *A. thaliana* tribenuron-methylem po postřiku
 - 5.1.3 Vyhodnocení qPCR po ovlivnění *A. thaliana* isoproturonem v živném roztoku
 - 5.1.4 Vyhodnocení qPCR po ovlivnění *A. thaliana* isoproturonem po postřiku
 - 5.2 Vliv herbicidů na aktivitu antioxidantních enzymů *A. thaliana*
 - 5.2.1 Stanovení aktivity glutathion-S-transferázy (GST)
 - 5.2.2 Stanovení aktivity glutathion reductázy (GR)
- 6 Diskuse
- 7 Závěr
- 8 Seznam použitých zkratk
- 9 Zdroje

1 Úvod

Herbicidy hrají důležitou roli v moderním zemědělství, kde jsou používány k ochraně plodin před plevely. Bez hubení těchto nežádoucích rostlin by se mohly výnosy plodin snížit až o 40-100 % (Oztetik 2010). S rostoucím používáním herbicidů však přichází také riziko vývoje rezistence u plevelných rostlin, což představuje hrozbu pro udržitelnost produkce potravin. Výzkum zaměřený na pochopení mechanismů této rezistence je tedy zásadní, zejména v kontextu rostlinných enzymů jako jsou UGT (UDP-glykosyltransferázy), které hrají významnou roli v detoxifikaci herbicidů a mohou přispívat k rozvoji rezistence (Dimunová *et al.* 2022).

Tato práce je součástí dlouhodobého výzkumu, který probíhá ve spolupráci mezi Farmaceutickou fakultou UK a Ústavem experimentální botaniky AV ČR. Výzkum je zaměřen na studium účinků různých herbicidů na rostliny, přičemž hlavní pozornost je věnována změnám v expresi vybraných UGT a aktivitě antioxidantních enzymů. Výzkum sleduje také vliv nízkých dávek herbicidů a poddávování, které rostliny ještě nezabíjí, ale vyvolává v nich stresové reakce, což je klíčové pro pochopení mechanismů vedoucích k rezistenci.

V této práci jsou zkoumány rozdíly v působení dvou herbicidů s odlišnými mechanismy účinku – tribenuron-methylu a isoproturonu – na modelovou rostlinu huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Výsledky tohoto výzkumu mohou přispět k vývoji nových strategií v ochraně plodin, které minimalizují riziko vzniku rezistence a tím zvyšují udržitelnost zemědělské produkce.

2 Teoretická část

2.1 Herbicidy

2.1.1 Úvod

Pesticidy jsou rozděleny do několika tříd v závislosti na jejich specifických cílových organismech, a to na herbicidy, insekticidy a fungicidy. Mezi všemi pesticidy jsou nejpoužívanější právě herbicidy (Singh & Tiwari 2020), kterým je věnována tato kapitola.

Herbicidy jsou chemické látky používané ke zpomalení nebo přerušení normálního růstu a vývoje nežádoucích rostlin, někdy označovaných také jako plevel. Ty je potřeba regulovat, jelikož jejich namnožením může dojít nejen k přímému snížení výnosu plodiny, ale také ke kontaminaci plodiny jejich semeny, která mohou být agresivní až jedovatá a kontaminovat i osiva. Hodnotu plodin snižují především semena plevelů podobná semenům plodin tvarem a barvou, jelikož je těžké až nemožné je odseparovat (Jursík *et al.* 2010).

Cílovými místy herbicidů jsou obvykle enzymy. Přestože každá buňka obsahuje tisíce různých enzymů, herbicidy cílí pouze na jeden z nich. Tímto způsobem herbicidy zastavují nebo zpomalují jeho funkci, což má za následek inhibici růstu nebo metabolismu rostliny. V současnosti je známo přibližně dvacet hlavních cílových míst, na která herbicidy v rostlinách působí. Tento omezený počet míst vede k tomu, že většina herbicidů využívá podobné mechanismy účinku. Opakovaným používáním herbicidů se stejným mechanismem účinků se může časem rozvinout herbicidní rezistence, která patří mezi hlavní problémy v zemědělství (Jursík *et al.* 2010, Hall *et al.* 1999).

Ideálně jsou vyvíjeny herbicidy, u kterých je prokázána vysoká selektivita, vysoká a rychlá účinnost i v nižších dávkách, rychlý rozklad v prostředí a finanční nenáročnost (Jursík *et al.* 2010). Selektivita obvykle závisí na schopnosti plodiny rozkládat nebo metabolizovat herbicid rychleji než plevel. Například glyfosfát (RoundUp) není selektivní, jelikož ovlivňuje většinu rostlin. Některé herbicidy jsou aplikovány jako proherbicidy, které se na aktivní formu přemění až uvnitř rostliny (Hall *et al.* 1999). Díky této selektivě mohou zemědělci chránit plodiny a zajišťovat vysoké výnosy bez negativních dopadů a zdraví rostlin (Carvalho *et al.* 2009).

2.1.2 Herbicidy jako stresory a jejich dopady

Herbicidy, i když jsou účinné pro hubení plevelů, mohou i u plodin vyvolat stres a způsobit fyziologické a biochemické poškození. To zahrnuje narušení fotosyntézy, změny v genové expresi, ovlivnění růstových regulátorů a může vést až k poškození či úhynu rostlin. Mezi viditelné příznaky patří zhrubnutí, ztvrdnutí a deformace listů, chloróza, nekrotické skvrny, vadnutí a bronzové nebo spálené zabarvení listů a plodů. Tyto příznaky se často používají k hodnocení účinků herbicidů, avšak nemusí vždy přesně korelovat se ztrátou výnosu, protože poruchy fyziologie rostlin vedoucí ke snížení výnosu se mohou objevit i v případě, že viditelné příznaky nejsou pozorovány. Jedním z důležitých důsledků aplikace herbicidů v zemědělském systému je vytváření oxidačního stresu v rostlinách. Ty se s tímto stresem vyrovnávají pomocí obranných mechanismů, jako je aktivace detoxifikačních enzymů či změny genové exprese (Singh & Tiwari 2020).

2.1.3 Snížení negativních dopadů herbicidů na životní prostředí

Nadměrný vstup herbicidů do životního prostředí je vážným veřejným problémem, protože kontaminuje plodiny a ohrožuje lidské zdraví. Existují však způsoby, jak tyto negativní dopady snížit. Jedním z nich je použití propeesticidů, chemických látek, které se stávají aktivními až v přítomnosti hub, škůdců a plevelů. Tento mechanismus minimalizuje poškození necílových oblastí, protože k aktivaci dochází pouze tam, kde je to nezbytné. Dalším procesem ke snížení negativního dopadu na životní prostředí je fyto-remediace, při které jsou herbicidy díky jejich absorpci rostlinou odstraňovány z půdy, což vede k jejímu čištění. Fyto-remediace je považována za efektivní zelenou technologii a levné řešení kontaminace vody a půdy. Je však důležité zvážit riziko vstupu herbicidu či jejich metabolitů do potravního řetězce a jejich vliv na zdraví zvířat či lidí (Zhang & Yang 2021, Azab *et al.* 2020).

Využití alelopatie představuje další biologický přístup ke snižování závislosti na chemických herbicidech. Tento proces zahrnuje použití rostlin, které uvolňují toxické sloučeniny, schopné snižovat nebo inhibovat růst a vývoj jiných rostlin, zejména plevelů. Tyto toxické sloučeniny, známé jako alelochemikálie, jsou sekundární metabolity vylučované rostlinami, které mohou ovlivňovat klíčení a růst sousedních rostlin tím, že zasahují do různých fyziologických procesů, jako je fotosyntéza, dýchání a vodní nebo hormonální rovnováha. Alelopatické rostliny tak poskytují přirozenou ochranu proti plevelům, čímž se snižuje potřeba

chemických herbicidů a minimalizuje se jejich negativní dopad na necílové organismy (Teixeira *et al.* 2024, Perotti *et al.* 2020).

Geneticky modifikované rostliny jsou dalším způsobem, jak snížit negativní dopady herbicidů. Tyto rostliny jsou navrženy tak, aby byly odolné vůči specifickým herbicidům, čímž se omezuje poškození necílových druhů. Při jejich použití je však nutné zvážit ekologická rizika.

Negativní účinky herbicidů lze omezit i sekvestrací, při které jsou herbicidy ukládány do specifických částí rostlin, například z cytosolu do vakuol. Na sekvestraci se podílí také lignin, pomáhá inkorporaci herbicidních látek do buněčné stěny, čímž se sníží jejich toxický účinek (Zhang & Yang 2021).

Herbicidy mají také významný vliv na růst a vývoj samotných plodin, zejména při použití ve vyšších koncentracích. Vysoké koncentrace herbicidů mohou potlačit klíčení semen, zpomalit růst kořenů a výhonků, způsobit chlorózu v důsledku snížené produkce chlorofylu a narušit fyziologické procesy rostlin (Gar'kova *et al.* 2011).

2.1.4 Rozdělení herbicidů dle doby aplikace a typu účinku na rostlinu

Herbicidy se rozdělují dle doby jejich aplikace na preemergentní a postemergentní. Preemergentní herbicidy se aplikují před vzejitím plodiny nebo plevelů, buď přímo do půdy nebo na mladé sazenice plevelů. Jejich účinnost je zajištěna interakcí s půdním prostředím, kde se mohou vázat na organické látky díky své lipofilitě. Tento typ herbicidů je důležitým nástrojem v boji proti rezistenci plevelů, protože působí na různá místa účinku, čímž snižuje riziko vzniku rezistence. Naopak postemergentní herbicidy se aplikují na již vzrostlé rostliny, kde jsou absorbovány především listy a stonky. Úspěšné proniknutí těchto herbicidů voskovitou bariérou listů je zajištěno jejich lipofilitou, ačkoli některé jako je glyfosfát, mohou být i hydrofilní. Dále se herbicidy dělí na kontaktní a systémové podle jejich schopnosti pohybu v rostlině. Kontaktní herbicidy působí rychle a lokalizovaně na povrchové části rostlin, zatímco systémové herbicidy jsou rozváděny po celé rostlině, což zajišťuje jejich vyšší účinnost při likvidaci plevelů (Krähmer *et al.* 2021).

2.1.5 Příjem a transport herbicidu v rostlině

Účinnost herbicidů je zásadně ovlivněna jejich schopností efektivně proniknout do rostlinných buněk a akumulovat se v cílových tkáních. Tento proces je ovlivňován řadou faktorů, jako je příjem herbicidů, jejich translokace v rostlině, mechanismus účinku, metabolismus a klimatické podmínky (Colquhoun 2011, Hamouzová *et al.* 2021).

Herbicidey mohou být přijímány do rostliny prostřednictvím listů, kořenů nebo kombinovaně. Preemergentní herbicidey, které se aplikují do půdy, jsou absorbovány hlavně kořeny, především kořenovým vlášením. Vlhkost v půdě je zásadní, neboť zvyšuje dostupnost herbicidů v půdním roztoku. Nicméně, bariéry v kořenech, jako jsou Casparyho proužky, mohou snížit příjem herbicidů tím, že omezují volný pohyb látek. Naopak postemergentní herbicidey jsou aplikovány přímo na listy. Efektivitu jejich absorpce lze zlepšit použitím povrchově aktivních látek, které snižují povrchové napětí kapek a usnadňují jejich průnik přes kutikulu listu (Colquhoun 2011).

Po příjmu herbicidů následuje jejich transport v rostlině prostřednictvím dvou hlavních systémů – xylému a floému. Lipofilní herbicidey jsou rychle absorbovány, avšak pro účinnou translokaci je nezbytná jejich určitá rozpustnost ve vodě. Kontaktní herbicidey, aplikované na povrch rostlin, se pohybují minimálně a působí rychle na místě aplikace. Naopak preemergentní herbicidey, aplikované do půdy, jsou transportovány xylémem spolu s vodou, což umožňuje jejich distribuci do různých částí rostliny. Případy rezistence z důvodu omezené translokace xylémem nejsou příliš běžné. Herbicidey aplikované na listy se dostávají do floému a jsou distribuovány do kořenů a dalších částí rostliny. Tento proces je pomalejší, protože herbicidey musí projít plasmodesmy, což může trvat 2 až 3 týdny. Pomalejší transport přes plasmodesmy může snížit účinnost herbicidů a zvýšit riziko vzniku rezistence (Colquhoun 2011, Hamouzová *et al.* 2021, Kräbmer *et al.* 2021). Po absorpci a transportu v rostlině je nezbytným krokem detoxifikace a rozklad herbicidu. Tento proces zahrnuje různé biochemické reakce, jako je oxidace, redukce, hydrolýza a konjugace s glutathionem a dalšími látkami. Kromě enzymů se na detoxifikaci podílejí také signální molekuly a fytohormony, jako je kyselina salicylová. Tímto způsobem se rostlina chrání před toxickými účinky a environmentálním znečištěním. (Zhang & Yang 2021). Další zajímavou oblastí výzkumu v souvislosti s metabolismem jsou epigenetické mechanismy, jako metylace DNA a modifikace histonů, které mohou ovlivnit genovou expresi a hrát roli v adaptaci rostlin na herbicidey (Zhang & Yang 2021).

Spotřeba herbicidů je v současnosti velmi vysoká. Největším producentem a vývozcem pesticidů a druhým největším spotřebitelem je Čína. Každoročně spotřebovává až 1,8 milionu tun pesticidů ročně (Zhang & Yang 2021, Zhang *et al.* 2011), z čehož herbicidy tvoří významnou část této spotřeby. Hlavní plodinou, na kterou jsou zde pesticidy používány, je rýže. Nadměrné používání herbicidů vede často ke kontaminaci vodních zdrojů a půdy, což se projevuje například detekcí isoproturonu, běžného herbicidu, v koncentracích překračujících bezpečnostní limity. Nadměrné používání herbicidů podporuje jejich transport prostřednictvím dešťových srážek, vyplavování nebo povrchovým odtokem, čímž se zvyšuje rozsah znečištění. Nesprávným používáním herbicidů může dojít ke kontaminaci plodin a následně ohrožení zdraví člověka při jejich požití. Jako důsledek mohou vzniknout různá chronická onemocnění, jako je rakovina, cukrovka, může dojít i k poruchám plodnosti (Zhang & Yang 2021, Zhang *et al.* 2011).

2.1.6 Mechanismy účinku herbicidů

Pro herbicidy existuje také klasifikace dle jejich mechanismu účinku (Obr. 1). Nese název HRAC, a to po odborné skupině s názvem Herbicide Resistance Action Committee, která se tímto rozdělením zabývá. V současnosti se používá 24 základních mechanismů účinku, které musí být vždy uvedeny na obalu příslušného herbicidu, aby nedocházelo k opakovanému používání herbicidů pouze s jedním mechanismem účinku (Hamouzová *et al.* 2021).

Klasifikace nepoužívanějších herbicidů podle hlavních mechanismů účinku a rizika vzniku rezistence

Riziko vzniku rezistence nízké střední vysoké

Mechanismus účinku	skupina HRAC/WSSA	Chemická skupina	Příklady účinných látek
Inhibitory syntézy lipidů			
INHIBITORY ENZYMŮ ACETYL-KOENZYM A KARBOXYLÁZY (ACCÁZY)	1	Aryloxyfenoxi-propionáty 'FOPY'	fenoxaprop, fluazifop, haloxyfop, propaquizafop
		Cyclohexanediony 'DIMY'	cycloxydim
		Fenylpyrazoliny 'DENY'	pinoxaden
Inhibitory syntézy aminokyselin			
INHIBITORY ENZYMŮ ACETOLAKTÁT SYNTÁZY (ALS)	2	Sulfonylmočoviny	chlorsulfuron, mesosulfuron
			sulfosulfuron, thifensulfuron
			triflursulfuron, tribenuron
		Imidazolinony	imazamox
		Triazolové pyrimidiny	florasulam
		Sulfonylaminokarbonyl triazolinony	propoxycarbazone, thienincarbazone
Inhibitory buněčného dělení			
INHIBITORY STAVBY MIKROTUBULŮ	3	Dinitroaniliny	pendimethalin
Růstové herbicidy			
SYNTECKÉ AUXINY	4	Fenoxy-karboxylové kyseliny	2,4-D, MCPA
		Deriváty kyseliny benzoové	dicamba
		Pyridin-karboxylové kyseliny	aminopyralid, clopyralid, fluroxypyr, halauxifen

Mechanismus účinku	skupina HRAC/WSSA	Chemická skupina	Příklady účinných látek
Inhibitory fotosyntézy			
INHIBITORY FOTOSYSTÉMU II	5	Triaziny a triazinony	terbuthylazine, metatoluron, metribuzin
		Fenyl-karbamáty	desmedipham, phenmedipham
		Substituované močoviny	chlorotoluron
		Benzotriadiazinony	bentazone
Inhibitory syntézy aminokyselin			
INHIBITORY 5-ENOL-PYRUVYLŠIKIMÁT-3-FOSFÁT SYNTÁZY (EPSP)	9	Glyciny	glyphosate, sulphosate
Inhibitory biosyntézy rostlinných pigmentů			
INHIBITORY FYTOENDESATURÁZY (PDS)	12	Karboxamidy	diffenican, picolinafen
INHIBITORY DIPERTENŮ		Amidy	flurochloridone
INHIBITORY PROTOPORFYRIN OXYDÁZY (PPO)	14	Isoxazolidinony	clomazone
INHIBITORY HYDROXYFENYLPYRUVÁT DIOXYGENÁZY (HPPD)	27	Triketony	mesotrione
Inhibitory syntézy mastných kyselin			
INHIBICE SYNTÉZY MASTNÝCH KYSELIN S DLOUHÝM ŘETĚZCEM (VLCFA)	15	Chloroacetamidy	dimethachlor, S-metolachlor
			metazachlor, pethoxamid, dimethenamid
		Acetamidy	propyzamide
		Oxyacetamidy	flufenacet
Thiocarbamáty	prosulfocarb		

Obrázek 1 Klasifikace herbicidů dle systému HRAC – převzato z: Hamouzová *et al.* 2021

Aby se však herbicidní účinek projevil, musí herbicid v příslušné koncentraci, i když často komplikovaným postupem, proniknout do rostlinných buněk a jejich organel a navázat se na příslušný cílový enzym. Tento proces zahrnuje inhibici a narušení některých biochemických cest nezbytných pro život rostlin. Ačkoliv je známo více než 30 různých mechanismů účinku herbicidů, hlavními cílovými místy jejich působení jsou fotosystém II, buněčné dělení, regulace růstu a syntéza rostlinných pigmentů (Hamouzová *et al.* 2021).

2.1.6.1 Inhibitory acetolaktátsyntázy

Inhibitory acetolaktátsyntázy (ALS) jsou jednou z nejdůležitějších skupin herbicidů díky jejich schopnosti působení na široké spektrum plevelů a vysoké selektivitě. ALS je klíčovým enzymem v biosyntéze aminokyselin s rozvětveným řetězcem (leucinu, isoleucinu, valinu), který se vyskytuje pouze u rostlin a některých mikrobů, nikoliv u živočichů. Je inhibován herbicidy skupiny B (dle HRAC), včetně sulfonylmočovín, triazolopyrimidinů, imidazolinonů, pyrimidinylbenzoátů a sulfonylaminokarbonyltriazolinonů. I když má každý z nich trochu jiný způsob vazby, jedná se stále o jeden mechanismus účinku (Hamouzová *et al.* 2021, Das *et al.* 2009, Lian *et al.* 2019, Yu *et al.* 2017). Hlavní příčinou vzniku rezistence na tuto skupinu herbicidů je změna vazebného místa na cílovém enzymu (Hamouzová *et al.* 2021, Cruz-Hipolito *et al.* 2013).

2.1.6.1.1 Tribenuron-methyl (TBM)

Tribenuron-methyl (TBM, Obr. 2), komerčně dostupný jako Granstar nebo Express, je herbicid patřící do skupiny sulfonylmočovinných látek, který se široce využívá v zemědělství, zejména při ochraně obilných plodin. Tento herbicid, patřící dle HRAC do skupiny 2, působí jako specifický inhibitor enzymu acetolaktátsyntázy (ALS), klíčového enzymu v biosyntéze rozvětvených aminokyselin. Inhibicí tohoto enzymu TBM účinně blokuje buněčné dělení u citlivých plevelů, což vede k jejich rychlému odumření. Rostlina tento herbicid rychle absorbuje prostřednictvím listů a kořenů, čímž je zajištěna jeho efektivita a účinnost, následně dochází k jejímu odumření, a to často již během 2–3 hodin po aplikaci. Na druhou stranu se účinnost herbicidu výrazně snižuje již po 1 až 7 dnech (Duman *et al.* 2010, Gar'kova *et al.* 2011, Rachedi *et al.* 2018, Kokojka *et al.* 2021).

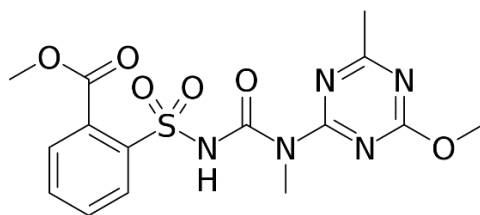
TBM je primárně postemergentní herbicid, což znamená, že se aplikuje po vzejití plodin a plevelů. Tento způsob aplikace z něj činí vysoce účinný nástroj pro hubení širokolistých plevelů v polích s obilovinami, na pastvinách a plantážích. Kromě postemergentního použití je TBM registrován také pro preemergentní aplikace, tedy použití před vzejitím plodin, což umožňuje jeho flexibilní využití v různých fázích růstu plodin. Jako systémový herbicid je TBM absorbován kořeny i listy rostlin a následně se distribuuje po celé rostlině, což zvyšuje jeho účinnost při hubení plevelů (Mukherjee *et al.* 2015).

Díky nízkému dávkovému účinku a minimální toxicitě pro plodiny, zvířata a lidi je tento herbicid považován za bezpečný a efektivní nástroj v zemědělství (Kokojka *et al.* 2021, Oztetik 2010).

TBM se využívá nejen pro své herbicidní vlastnosti, ale také pro schopnost indukovat samčí sterilitu u různých druhů brukvovitých rostlin (*Brassicaceae*), čeledi, do které zahrnujeme i *Arabidopsis thaliana*. Tento gametocidní účinek je důležitý zejména pro šlechtitele rostlin při vytváření hybridních linií, které vykazují fenomén heterozy, jev, při kterém potomci převyšují své rodiče ve výnosnosti a dalších vlastnostech. Expozice malým množstvím TBM vede k narušení tvorby pylu, což způsobuje samčí sterilitu a má nepříznivý vliv na rostlinnou reprodukci. Proto je i přes skutečnost, že je TBM velmi cenným nástrojem ve šlechtění rostlin, důležité důkladně zvážit jeho použití z důvodu negativních dopadů na reprodukci rostlin (Yu *et al.* 2017).

Aplikace TBM způsobuje řadu morfologických a fyziologických změn u rostlin, jako je chlorotická léze na mladých listech, kumulace anthokyanidů, snížení výšky rostlin a deformace květů. Dále je účinkem tohoto herbicidu snižována rychlost fotosyntézy (nevyvinuté chloroplasty, jejich grana tenká) a blokován buněčný cyklus, v pupenech více než v listech, z důvodu vyšší aktivity ALS v rychle rostoucích pletivech. Rovněž bylo zjištěno, že TBM indukuje exprese některých detoxikačních a obranných genů, včetně těch, které se podílejí na metabolismu léčiv v rodině cytochromu P450 (Yu *et al.* 2017, Lian *et al.* 2019).

TBM může potenciálně kontaminovat podzemní a povrchové vody a negativně ovlivnit půdní mikroflóru. Jedním z problémů spojených s aplikací TBM je jeho vliv na mikrobiální společenstva v půdě. Například actinobakterie, které jsou známé svou odolností vůči xenobiotikům, mohou být negativně ovlivněny tímto herbicidem. To vede ke snížení počtu těchto užitečných mikroorganismů v půdě. Nicméně, přidání glukózy do kontaminovaného prostředí zlepšuje schopnost mikroorganismů rozkládat TBM. Tento proces naznačuje, že bakterie mohou přispět k částečnému rozkladu TBM tím, že vytvářejí kyselé podmínky, které jsou nezbytné pro jeho hydrolýzu (Rachedi *et al.* 2018). Chemická hydrolýza spolu s mikrobiální degradací patří mezi dvě hlavní cesty degradace sulfonylmočoviny v půdě (Mukherjee *et al.* 2015).



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

2.1.6.2 Inhibitory fotosyntézy

Herbicidey inhibující fotosystém II (PS II) mají zásadní význam při regulaci plevelů v zemědělských plodinách po celém světě. Fotosyntéza, klíčový proces, kterým rostliny přeměňují světelnou energii na chemickou, představuje ideální cíl pro herbicidey, neboť je prováděna výhradně rostlinami. Inhibitory fotosyntézy jsou rozděleny do několika skupin, z nichž tři (skupiny 5, 6 a 7) ovlivňují fotosystém II, zatímco jedna skupina (22) působí na fotosystém I (Hall *et al.* 1999). Místa působení herbicidů jsou znázorněna na Obr. 3.

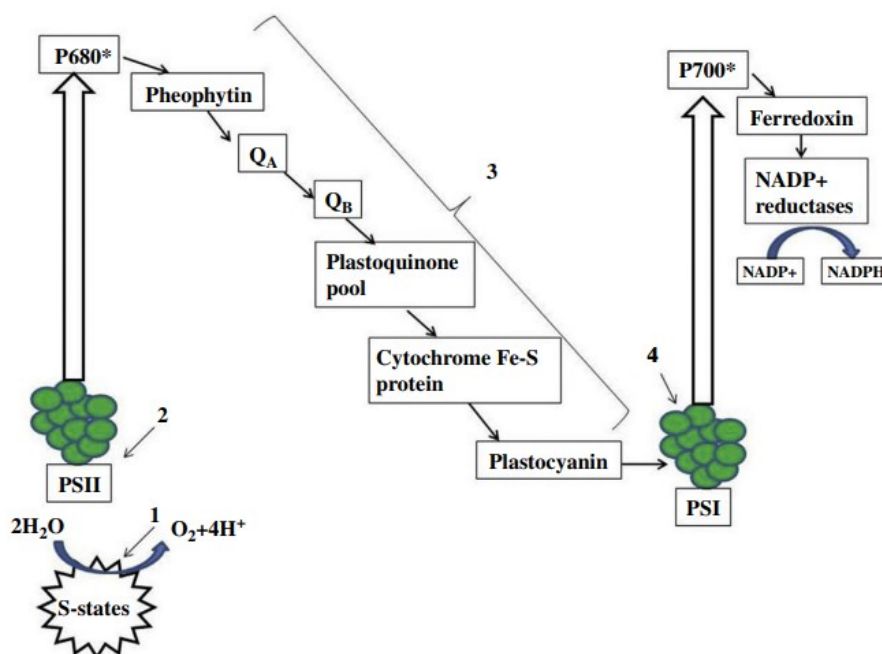
Herbicidey skupiny PS II blokují tok elektronů v thylakoidní membráně chloroplastů tím, že soutěží s plastochinonem o vazebné místo (Q_B) v reakčním centru fotosystému II (P680). Tím brání přenosu elektronů na plastochinon, čímž se narušuje elektronový transport v procesu fotosyntézy. To vede k hromadění energie v chlorofylu a následně k produkci toxických radikálů kyslíku, které poškozují proteiny a membrány chloroplastů, což v konečném důsledku způsobuje chlorózu, nekrózu a smrt rostlin (Hall *et al.* 1999, Teixeira *et al.* 2024). Vazba herbicidů na Q_B místo proteinu D1 může vést k fotopoškození PSII dvěma způsoby, jednak tím, že brání fotochemické reakci a jednak se vážou se na protein D1 a urychlují degradaci proteinu (Singh & Tiwari 2020). Různé herbicidey mají odlišné účinky v závislosti na tom, zda ovlivňují akceptorovou nebo donorskou stranu fotosystému II. Inhibitory PS II, jako jsou triaziny a fenylmočoviny, stabilizují specifické proteiny v PS II, což pomáhá chránit fotosystém před fotodestrukci (Zharmukhamedov & Allakhverdiev 2020). Herbicidey tedy interferují se světelnou reakcí fotosyntézy, přičemž největší poškození se projevuje ve fotosystému II, zatímco fotosystém I je poškozen méně (Singh & Tiwari 2020).

Fyzikálně-chemické vlastnosti těchto herbicidů, včetně jejich rozpustnosti ve vodě a adsorpce v půdě, mají zásadní vliv na jejich účinnost a environmentální rizika.

Herbicidy skupiny PS II jsou často slabé kyseliny s dobrou rozpustností ve vodě, což usnadňuje jejich pohyb v půdním profilu, ale také zvyšuje riziko vyplavování do podzemních vod, zejména v půdách s nízkým obsahem organické hmoty. Translokace těchto herbicidů v rostlinách je omezená, jelikož jsou špatně transportovány floémem a koncentrují se převážně v listových tkáních. Inhibitory PS II jsou díky svému rychlému účinku a širokému spektru účinnosti oblíbené při kontrole jednoletých plevelů v raných fázích růstu plodin, jako jsou kukuřice, sója a obilniny. Selektivita těchto herbicidů vůči plodinám je založena na schopnosti těchto plodin rychle je metabolizovat na netoxické produkty, což minimalizuje jejich negativní dopad na plodiny (Hall *et al.* 1999).

Všechny tyto herbicidy fungují tak, že přerušují fotosyntézu. Existují tři vazebná místa na proteinu D₁, A, B a C. Herbicidy vážící se na místo A (triaziny, uracily) a B (fenylmočoviny) se aplikují přednostně do půdy a jsou translokovány hlavně v xylému. Některé herbicidy, vážící se na místo C (benzothiadizoly), však umožňují aplikaci postemergetně na listy, a to kontaktním působením, bez dalšího pohybu v rostlině (Teixeira *et al.* 2024).

Mezi inhibitory PS II patří také isoproturon, člen skupiny B, který bude podrobněji diskutován v následující kapitole.



Obrázek 3 Působení herbicidů na různé cíle světelné reakce – Převzato z: Singh & Tiwari 2020

Číslem 2,3 je označeno místo působení inhibitorů fotosystému II, včetně isoproturonu, číslem 4 označeno místo působení inhibitorů fotosystému I.

2.2.6.1 Isoproturon

Isoproturon (Obr. 4), patřící do skupiny substituovaných močovín a klasifikovaný podle HRAC jako inhibitor fotosystému II (skupina 5), je jedním z nejúčinnějších selektivních herbicidů používaných především na kontrolu jednoletých trav a širokolístých plevelů na pšeničných polích. Jeho herbicidní účinek je založen na inhibici fotosyntézy, kde narušuje elektronový transportní systém v chloroplastech citlivých rostlin (Azab *et al.* 2020, Hassan & Nemat Alla 2020, Jursík *et al.* 2010).

Isoproturon působí tím, že se váže na serin 264 v D1 proteinu fotosystému II, čímž blokuje tok elektronů během fotosyntézy. U několika herbicidů, včetně isoproturonu, jsou tyto toxické účinky na fotosyntetické organismy podporovány produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Jejich vznik je způsoben přenosem elektronů na molekulární kyslík ve fotosystému I a II. Následkem je tvorba superoxidových radikálů ($O_2^{\bullet-}$), peroxidu vodíku (H_2O_2) a hydroxylových radikálů (OH^{\bullet}). ROS mohou také vznikat přenosem excitační energie z tripletového chlorofylu na molekulární kyslík, což vede k tvorbě singletového kyslíku (1O_2). Tyto reaktivní formy kyslíku způsobují oxidativní stres v buňkách, což má za následek peroxidaci lipidů, poškození membrán, inaktivaci enzymů a narušení životaschopnosti buněk (Hassan & Nemat Alla 2020).

Navzdory své účinnosti má isoproturon několik nevýhod, zejména v souvislosti s jeho dopadem na životní prostředí. Vzhledem k jeho rozsáhlému použití v zemědělství jsou rezidua tohoto herbicidu často detekována v půdě a podzemních nebo povrchových vodách. Přítomnost isoproturonu v životním prostředí může mít negativní dopady na vodní organismy, včetně řas, mikrobů a bezobratlých.

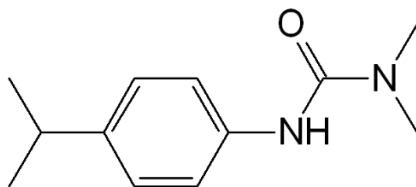
Pro snížení akumulace isoproturonu v pšenici se ukázalo jako efektivní využití kyseliny salicylové (SA), která podporuje jeho rychlejší degradaci. Rostliny, včetně pšenice, využívají glykosyltransferázy (GT) k přeměně isoproturonu na méně toxické formy konjugací s glukózou a glutathionem. Nedávné studie ukazují, že aplikace kyselina salicylová může zlepšit odolnost rostlin vůči isoproturonu a zvýšit mikrobiální aktivitu v rhizosféře, což podporuje degradaci zbytků tohoto herbicidu v půdě. Tento přístup je užitečný pro pěstování pšenice v kontaminovaných půdách a může přispět k minimalizaci akumulace isoproturonu na bezpečné úrovni (Azab *et al.* 2020, Lu *et al.* 2015). Kyselina salicylová může také iniciovat expresi skupiny genů kódující glykosyltransferázy, které jsou důležité pro metabolismus a detoxifikaci isoproturonu. Tímto způsobem se kyselina salicylová podílí na metabolismu herbicidů s pomocí

exprese obranných genů. Podobně metyljasmonát, další rostlinný hormon, rovněž ovlivňuje metabolismus isoproturonu (Lu *et al.* 2015, Zhang & Yang 2021).

Kromě toho se isoproturon vyznačuje genotoxickými účinky a potenciálem narušovat endokrinní systém, což vyvolává další obavy o jeho bezpečnost. V procesu detoxikace isoproturonu v rostlinách hraje významnou roli jeho konjugace s glukosylovými nebo malonylglukosylovými skupinami, což zvyšuje jeho rozpustnost a usnadňuje jeho eliminaci z buněk. Je zajímavé, že při aplikaci isoproturonu spolu s kyselinou salicylovou je aktivita glykosyltransferáz nižší než při aplikaci samotného isoproturonu, což naznačuje, že herbicid sám stimuluje produkci těchto enzymů (Lu *et al.* 2015, Azab *et al.* 2020).

Významné jsou také fytořediační technologie, s použitím např. transgenních rostlin, které obsahují lidský cytochrom P450-1A2. Tento gen zvyšuje schopnost rostlin metabolizovat isoproturon, což zlepšuje jejich odolnost vůči škodlivým účinkům herbicidu. Rostliny bez tohoto genu jsou více náchylné k poškození fotosyntetických procesů, což ukazuje na potenciál těchto technologií pro čištění kontaminovaných oblastí (Azab *et al.* 2020). Ve studii bylo popsáno, že u transgenní rýže, kde byla zvýšena exprese genu GT, došlo k úplnému odstranění isoproturonu z rostliny (Zhang & Yang 2021).

Rovněž bylo zjištěno, že mikrobiální degradace může hrát významnou roli v odstraňování isoproturonu z prostředí. Některé bakterie, jako jsou *Sphingomonas* a *Pseudomonas aeruginosa*, izolované z kontaminovaných lokalit, prokazují schopnost rozkládat isoproturon. Přidání uhlíku do prostředí podporuje jejich růst a zrychluje degradaci herbicidu, což naznačuje, že mikrobiální aktivita může hrát klíčovou roli v odstraňování isoproturonu z prostředí (Azab *et al.* 2020).



Obrázek 4 Struktura isoproturonu: 3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea (Web 2)

2.2.7 Herbicidní rezistence

Herbicidní rezistence je dědičná schopnost rostlin, především plevelů, odolávat takové dávce herbicidu, která by za normálních okolností danou rostlinou populaci potlačila (Jursík *et al.* 2011). Existuje i přirozená tolerance, která je příčinou nízké odolnosti například u druhů, které přežívají po ošetření herbicidu díky tomu, že vzejdou později. Také u druhů, které mají velká semena, vzcházejí z větší hloubky, a tudíž se k nim preemergentní herbicid nedostane. U jiných druhů se například projevuje snížená schopnost herbicid přijímat a translokovat. Z celkového množství herbicidu, které rostlina přijímá, se dostane na cílové místo pouze malá část (0,1 %) její účinné látky. Je to ovlivněno mnoha faktory, jako jsou vlastnosti a genetika daného druhu plevelu, klimatické podmínky, chemických vlastnostech herbicidu a jeho dávce. Zasažením populace nižší dávkou herbicidu může vést k různým genetickým modifikacím a rozvoji herbicidní rezistence (Hamouzová *et al.* 2021).

Rezistence je oproti přirozené odolnosti určitého druhu plevelu, vyvolána opakovanou aplikací herbicidu. Rozlišujeme ji na rezistenci zkříženou (cross-resistance), která vzniká, pokud je jedinec rezistentní vůči jednomu či více herbicidům působících pouze jedním mechanismem účinku a vícenásobnou (multiple resistance), kdy je populace rezistentní vůči herbicidům účinkujících na různých místech (Hamouzová *et al.* 2021, Jursík *et al.* 2011). Rezistence představuje vážnou hrozbu pro udržitelnost zemědělství na celém světě. Pro efektivní zvládnutí tohoto problému je klíčové porozumět mechanismům, které tuto rezistenci způsobují. Konkrétně je důležité se zaměřit na dva hlavní typy, a to na rezistenci specifickou (target-site resistance, TSR) a nespecifickou (non-target site resistance, NTSR). Detailnější pochopení těchto mechanismů nám umožní navrhnout účinnější strategie pro kontrolu rezistentních populací plevelů, a tím zajistit dlouhodobou účinnost plevelů.

2.2.7.1 Specifická rezistence (target-site resistance, TSR)

Specifická rezistence, známá také jako rezistence cílového místa (target-site resistance, TSR), vzniká v důsledku změn ve struktuře vazebného místa herbicidu, obvykle na enzymu, což vede ke snížené afinitě herbicidu k tomuto místu. Tyto strukturální změny jsou způsobeny substitucí aminokyselin v jedné nebo několika možných pozicích v cílovém proteinu herbicidu (Hamouzová *et al.* 2021).

Příkladem specifické rezistence je rezistence ke skupině inhibitorů acetolaktát syntázy (ALS), kterou jsme podrobně prozkoumali výše. Tento typ rezistence je způsoben mutací genu,

který kóduje právě tento enzym. Takových míst, ve kterých k takové mutaci dochází, bylo doposud popsáno sedm. Liší se jiným stupněm rezistence. Nejčastěji ke změnám dochází v místě Pro 197 (Jursík *et al.* 2011). Rezistence se projevuje také zvýšenou expresí cílového enzymu, což způsobí, že počet molekul herbicidu není dostatečný k usmrcení buňky (Hamouzová *et al.* 2021).

2.2.7.2 Nespecifická rezistence (non-target site resistance, NTSR)

V posledních letech bylo zjištěno, že k rychlé rezistenci přispívá také rezistence nespecifická, které se vyznačuje mechanismy působícími mimo cílové místo herbicidu. Tyto mechanismy vedou ke snížení koncentrace herbicidu v cílovém místě, což umožňuje plevelům přežít i při aplikaci standardních dávek herbicidů. NTSR je zejména rozšířená u skupin herbicidů HRAC 9 a HRAC 1. Tyto skupiny zahrnují inhibitory ALS (acetolaktát syntázy) a inhibitory ACCázy (acetyl-CoA-karboxylázy), kde je rezistence často spojena se zvýšeným metabolismem herbicidů nebo jejich translokací uvnitř rostliny (Hamouzová *et al.* 2021).

Mechanismy NTSR jsou často spojovány se sekundárním metabolismem, jelikož jsou po aplikaci herbicidu rostlinou využívány stejné mechanismy jako při reakci rostlin na abiotický stres. Rozsah, v kterém bude odpověď vyvolána, závisí na genetické variabilitě citlivosti daných jedinců a mechanismech použitých herbicidů. Mechanismy se po aplikaci herbicidů liší, u glyfosfátu je běžná změna v translokaci herbicidu, zatímco u inhibitorů ALS a ACCázy je znám naopak zvýšený metabolismus. NTSR je zvláště problematická, protože zahrnuje obecné stresové mechanismy, které mohou vést k rezistenci vůči herbicidům s odlišnými mechanismy účinku. Opakovaná aplikace jednoho typu herbicidu může v dlouhodobém horizontu podpořit rozvoj rezistence vůči jiným herbicidům, což výrazně komplikuje kontrolu plevelů. Tradiční strategie prevence rezistence, jako je rotace herbicidů nebo používání směsí, se v kontextu NTSR mohou stát paradoxně kontraproduktivními, protože silná selekce pro tyto nespecifické mechanismy může ve skutečnosti vést k vyšší míře rezistence. NTSR je významným problémem při likvidaci plevelů, které se dokážou navzdory aplikacím herbicidu množit a přežívat. Je těžké odlišit rezistentní druhy od citlivých. Naštěstí bylo vyvinuto mnoho metod, jak lze toto rozlišení povést. Rezistence je testována pomocí růstových esejí, na základě kterých se dá určit i stupeň rezistence (Jursík *et al.* 2011, Hamouzová *et al.* 2021).

Tento typ rezistence byl prokázán u čtyř genových rodin, a to u genů kódujících cytochromy P450 (CYP), glutathion-S-transferázy (GST), glykosyltransferáz a ABC transportéry. Tyto mechanismy spolupracují při detoxifikaci herbicidů a zajišťují odolnost

plevelů vůči více herbicidům. Jakmile je rezistence v populaci plevelů výrazně zvýšena, může se rychle šířit do dalších populací prostřednictvím pylu nebo semen a může být také přenesena na jiné druhy prostřednictvím hybridizace (Yuan *et al.* 2007). Globální rozšíření rezistentních biotypů je alarmující, k dnešnímu dni bylo dokumentováno více než 532 případů rezistentních plevelů vůči různým herbicidům v 72 zemích po celém světě. U plevelů se vyvinula rezistence vůči 21 ze 31 známých míst působení herbicidů a vůči 168 různým typům herbicidům. (Van Etten *et al.* 2020, Yuan *et al.* 2007, web 3).

Jsou vyvíjeny také safenery na ochranu plodin, jejichž aplikace stimuluje expresi určitých genů, včetně těch, které kódují enzymy CYP, GST a ABC transportéry, což vede k indukci detoxifikačních procesů. Bylo prokázáno, že různé geny P450 mohou přispívat k rezistenci vůči několika herbicidům, přičemž jediný gen pro P450 v transgenních rostlinách může poskytnout odolnost až vůči 13 různým herbicidům (Yuan *et al.* 2007).

Pro pochopení mechanismu rezistence a vývoj účinnějších herbicidů, stejně jako pro získání informací užitečných pro fytořemediaci a detoxifikaci, je klíčové zjistit, co je příčinou této rezistence. Je nezbytné určit, zda je rezistence výsledkem regulace genové transkripce, zvýšení aktivity enzymů, nebo změny substrátové specifity, a zda zvýšená aktivita enzymů souvisí s konkrétními mutacemi. Objev genů zapojených do těchto procesů bude zásadní pro efektivní řešení problému necílových mechanismů herbicidů (Yuan *et al.* 2007).

2.2.8 Metabolismus a detoxifikace herbicidů v rostlinách

Herbicidey, které jsou aplikovány na rostliny, podléhají komplexnímu procesu metabolismu a detoxifikace, který zahrnuje několik fází. Tento proces je klíčový pro snížení toxicity herbicidů a jejich efektivní odstranění z organismu rostliny (Zhang & Yang 2021, Carvalho *et al.* 2009).

V **I. fázi** dochází k primární transformaci herbicidů, kde jsou molekuly rozloženy na méně toxické formy. Tento krok zahrnuje oxidaci, redukci a hydrolýzu a je řízen enzymy jako jsou cytochromy P450 (CYP), hydrolázy a peroxidázy. Tyto enzymy připojují kyslík k hydrofobním substrátům, čímž zvyšují jejich hydrofilitu a připravují je na další fáze detoxikace (Carvalho *et al.* 2009).

Během **II. fáze**, která zahrnuje konjugaci, se herbicidey váží na různé látky, jako je glutathion (GSH), cukry a aminokyseliny, což je činí více rozpustnými ve vodě a méně fyto toxickými. Mezi nejdůležitější reakce této fáze patří konjugace s GSH, jelikož se vyskytuje u rostlinných druhů velmi často, a to především u luštěnin, jako je fazol či sója. Za konjugaci GSH s metabolity herbicidů je zodpovědná glutathion-S-transferáza (GST). Po konjugaci s glutathionem jsou tyto komplexy transportovány do vakuol. Většina herbicidů reaguje s thioley, jako jsou právě glutathion a cystein, avšak afinita k thiolům závisí na typu herbicidu. Například reakce s námi zkoumaným isoproturonem je téměř nemožná z důvodu jeho nízké afinity k thiolům. GST jsou přítomny v každé fázi rostlinného vývoje. Mezi herbicidey konjugované tímto způsobem patří zejména herbicidey ze skupin sulfonylmočoviny, imidazolinonů, aryloxyfenoxypropionátů, triazinů a chloracetanilidu (Carvalho *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2007, Zhang & Yang 2021). Dalším častým typem u rostlin je konjugace s glukózou. Jsou za ní zodpovědné enzymy nazývané glykosyltransferázy (GT), které podobně jako GST mohou konjugovat za pomoci glykosylací specifických skupin herbicidů přímo (Carvalho *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2007). Jelikož je jedna z rodin glykosyltransferáz předmětem této práce, budu se jimi zabývat podrobněji v jedné z následujících kapitol.

Důležitou součástí druhé fáze metabolismu je detoxifikační proces, zvaný acetylace. Pro metabolizaci herbicidů má klíčovou roli acetyltransferáza. Po připojení acetylové skupiny ($-\text{COCH}_3$) na molekulu herbicidu, se zvyšuje její hydrofilní povaha, je tedy lépe rozpustná ve vodě a herbicidey se snáze vylučují (Zhang & Yang 2021). Metylace je klíčový biochemický proces u rostlin, který je katalyzován methyltransferázami S-adenosylmethioninu (SAM) jako donorem methylu (Zhang & Yang 2021).

Ve **III. fázi** dochází k sekundární konjugaci, která vede ke vzniku nefytotoxických sloučenin a jejich aktivnímu transportu do vakuol pomocí ABC transportérů. ABC (ATP-binding cassette) transportéry jsou membránové proteiny, které slouží k transportu molekul. K tomu je zapotřebí energie z ATP. Kromě přenosu chemických látek, jako jsou cukry, aminokyseliny, léčiva, se také podílí na transportu herbicidů. U genů, které tyto transportéry kódují byla popsána indukce herbicidy (Carvalho *et al.* 2009, Zhang & Yang 2021).

Fáze IV zahrnuje asociaci herbicidních molekul se složkami buněčné stěny. Tato fáze zahrnuje další zpracování herbicidů, které již prošly předchozími fázemi metabolismu. Herbicidy obsahující specifické radikály mohou být konjugovány přímo a jejich metabolismus se aktivuje až v této fázi (Carvalho *et al.* 2009).

Diferenciální metabolismus herbicidů je klíčovým faktorem určujícím selektivitu herbicidů, tedy schopnost cíleně eliminovat plevel bez negativního dopadu na plodiny. Tento proces je založen na rozdílné enzymatické aktivitě, kdy plodiny disponují specifickými enzymy, jako jsou cytochrom P450 a glutathion S-transferázy (GST), které umožňují rychlou detoxifikaci herbicidních látek. Plevel, které tyto enzymy v dostatečné míře nemají, jsou naopak vůči herbicidům citlivější a podléhají jejich účinku (Carvalho *et al.* 2009).

Fytotoxicita se projevuje, když rostlina nedokáže efektivně detoxikovat aplikovaný herbicid, a to vede k poškození rostlinných tkání. Tento stav nastává, když kapacita rostliny k detoxikaci herbicidu je překročena, což se může projevovat různými formami fytotoxicity, včetně strukturálních poškození jako chloróza a nekróza, či fyziologických účinků jako zpomalení růstu. Proces detoxikace herbicidů je energeticky náročný a pokud plodina není schopna efektivně zpracovat herbicid, může to negativně ovlivnit její výnosy. Pro minimalizaci rizika fytotoxicity a zajištění optimálních výnosů plodin je nezbytné přesně dodržovat agronomická doporučení při aplikaci herbicidů a zvyšovat povědomí pěstitelů o správném používání těchto chemických látek (Carvalho *et al.* 2009).

2.2 Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je drobná dvouděložná rostlina, která patří do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Je typická drobnými bílými korunními lístky, přízemní listovou růžicí a přímou lodyhou dosahující výšky 5-30 cm (Štěpánek 1992).

Jako plevelná rostlina roste na různých stanovištích, jako jsou pole, okraje cest nebo na skalnatých a kamenitých svazích. V České republice je rozšířena na celém území s preferencí pro termofytikum a mezofytikum. Vyskytuje se nejen v Evropě, ale také v Severní Americe, jižní a východní Africe, západní Asii, Japonsku či v Austrálii (Štěpánek 1992).

Tato rostlina se používá jako modelový objekt v genetice díky své velikosti a struktuře genomu. Její genom byl klíčový pro dosažení první kompletní sekvence DNA rostlin, k níž došlo roku 2000. *A. thaliana* obsahuje 25 498 genů, které kódují přes 11 000 různých proteinů, což odráží široké spektrum biologických funkcí a procesů, které tato rostlina vykonává (The Arabidopsis Genome Initiative 2000, Řepková 2007).

Genom této modelové rostliny je relativně malý a velikostí srovnatelný s genomem modelového živočišného organismu octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*). Je asi 26x menší než genom člověka a jeho velikost odpovídá 125 Mb (megabazi). V jádru genomu se nachází 5 párů chromozomů. Poznání kompletní sekvence genomu *A. thaliana* bylo průlomové a vedlo k rozluštění genomů již významnějších plodin, např. rostlin z čeledi brukvovitých, lipnicovitých (*Poaceae*), bobovitých (*Fabaceae*) či lilkovitých (*Solanaceae*). Tato znalost umožňuje využití konkrétních genů pro zlepšení znaků a vlastností kulturních druhů prostřednictvím genetických modifikací (The Arabidopsis Genome Initiative 2000, Řepková 2007).

2.3 Glykosyltransferázy

Glykosyltransferázy (GT) jsou enzymy, které katalyzují přenos glykosylové části z donora na akceptor. Tyto enzymy, běžně přítomné v rostlinách, modifikují receptorové molekuly, a tím mění jejich fyzikální a biologické vlastnosti, což má významný potenciál při šlechtění odolnosti rostlin vůči herbicidům. Proces, kdy enzymy GT připojují cukry k různým molekulám, se nazývá glykosylace. Tím se molekuly stávají více rozpustnými ve vodě a snadněji se z rostlin odstraňují (Huang *et al.* 2021, Gharabli *et al.* 2023).

Dle databáze CAZy (web 4) lze tyto enzymy rozdělit do 137 rodin, a to na základě podobnosti sekvencí aminokyselin (k 31. červenci 2024). Rodinu 1 představují glykosyltransferázy závislé na uridindifosfátu (UGTs) (Gharabli *et al.* 2023). Vzhledem k tomu, že jedním z hlavních cílů této práce je zkoumat vliv herbicidního stresu na expresi genů UGT, budu se dále těmito enzymy zabývat podrobněji.

2.3.1 UDP-glykosyltransferázy

UDP-glykosyltransferázy (UGT) jsou klíčovými enzymy fáze II detoxifikačního systému rostlin, které katalyzují glykosylaci lipofilních sloučenin, včetně herbicidů. Tento proces, kdy se na biomolekuly přidávají cukerné zbytky, je zásadní pro regulaci fytohormonů, jako jsou auxiny, cytokininy, kyselina salicylová a jasmonáty, což ovlivňuje růst, vývoj a schopnost rostlin čelit stresovým podmínkám. UGT hrají klíčovou roli v adaptaci rostlin na abiotické (např. sucho, teplota) a biotické stresy (např. patogeny) tím, že ovlivňují metabolismus a distribuci fytohormonů a sekundárních metabolitů. Kromě toho přispívají k detoxifikaci xenobiotik, čímž snižují jejich toxicitu a akumulaci v rostlinných tkáních. Využití UGT v genetické modifikaci rostlin může zvýšit odolnost plodin vůči herbicidům a podporovat udržitelné zemědělství, zejména v kontextu změn klimatu a minimalizace chemického znečištění (Gharabli *et al.* 2023, Dimunová *et al.* 2022).

2.3.1.1 Struktura a funkce UGT

UGT enzymy se vyznačují přítomností specifické karboxy-terminální sekvence, která zajišťuje vazbu proteinu na UDP-část cukerného nukleotidu. Naopak amino-terminální sekvence je variabilnější a umožňuje interakci s různými akceptorovými substráty (Gharabli *et al.* 2023, Ross 2001, Zhang & Yang 2021).

Společným znakem celé nadrodiny UGT je přítomnost 44 aminokyselinové sekvence, která je klíčová pro vazbu UDP donora cukru. Většina rostlinných UGT enzymů používá jako donor cukru UDP-glukózu, i když mohou být využívány i další cukry, jako například UDP-rhamnóza, UDP-galaktóza či UDP-glukuronová kyselina (Zhang & Yang 2021, Bock 2015). UGT se podílejí na biologické aktivitě, rozpustnosti a transportu sekundárních metabolitů v buňce a v celé rostlině (Park *et al.* 2011). UGT katalyzují tvorbu O-, N-, S- a C – glykosidů (Gharabli *et al.* 2023). Tyto enzymy jsou převážně cytoplasmatické a hrají zásadní roli v regulaci metabolických procesů, detoxifikaci xenobiotik a udržování hormonální rovnováhy (Bock 2015).

2.3.1.2 Nomenklatura UGT

UGT enzymy jsou klasifikovány na základě sekvenční podobnosti jejich aminokyselin. V rostlinách jsou geny UGT rozděleny do rodin na základě homologických sekvencí. Rodiny, které vykazují více než 40% podobnost v aminokyselinových sekvencích, jsou dále rozděleny na podrodiny, pokud mají podobnost více než 60 %. Tento systém kategorizace umožňuje detailní identifikaci a klasifikaci jednotlivých UGT genů. Například označení UGT72A4 označuje specifický gen v rodině 72, podrodině A, kde číslo 4 identifikuje konkrétní gen v rámci této podrodiny (Ross *et al.* 2001).

2.3.1.3 UGT u *Arabidopsis thaliana*

V modelové rostlině *A. thaliana* bylo identifikováno více než sto genů kódujících UGT. V organismu této rostliny bylo nalezeno 14 odlišných skupin (A-N) UGT, přičemž skupina D, která zahrnuje 13 členů, bývá spojována s odolností vůči některým patogenům. I když má *A. thaliana* relativně malý genom, obsahuje velké množství UGT sekvencí rozmístěných po celém genomu, které se shlukují po dvou až sedmi genech. Podobné rozmístění lze předpokládat i u jiných rostlinných druhů. Toto shlukování genů na různých chromozomech naznačuje, že každá rodina má specifickou funkci v rostlině. Například UGT71B6 se podílí na konjugaci kyseliny abscisové a UGT72B1 se účastní detoxifikace xenobiotik, jako je 2,4,5-trichlorfenol. U více než poloviny genů v *A. thaliana* nejsou jejich funkce dosud zcela objasněny. Geny kódující UGT v *A. thaliana* mohou obsahovat až dva introny, ale více než polovina z nich (58 z 107) neobsahuje žádné, což svědčí o jejich evolučním vývoji (Bock 2015, Ross *et al.* 2001, Park *et al.* 2011).

Jak už bylo psáno výše, nejčastějším donorem nukleotidového cukru v rostlinách je UDP-glukóza, případně UDP-rhamnóza, UDP-galaktóza či UDP-glukuronová kyselina. Některé glykosidy pak mohou po glykosylaci reagovat dále, např. s malonyl-CoA za vzniku malonylglukosidu. Výhoda tohoto kroku navíc spočívá ve stabilitě struktury, vyšší rozpustnosti ve vodě a vyššímu transportu do vakuol. Transport do vakuol probíhá díky zápornému náboji karboxylové skupiny na glukosylové části malonylglukosidů za pomoci aniontových transportérů. Tímto přenosem se usnadní rozpad toxických látek, a tím je snížena cytoplasmatická toxicita. V *A. thaliana* byly nalezeny O-, N- a C-glykosylační produkty isoproturonu i malonylové glykosidy (Zhang & Yang 2021).

2.3.2 UGT sledované v této práci

Níže jsou uvedeny informace o několika UDP-glykosyltransferázách (UGT), které byly identifikovány v *Arabidopsis thaliana* a jsou relevantní pro tuto práci.

UGT74E2

UGT74E2 je enzym, který patří do skupiny UDP-glukosyltransferáz, konkrétně do podtřídy L, která zahrnuje i další auxinové glykosyltransferázy, jako je UGT84B1 a UGT74F2. Tento enzym se vyznačuje tím, že je nejsilněji indukován oxidačním stresem a reaguje na širokou škálu různých stresových podmínek. UGT74E2 je zodpovědný za glykosylaci auxinového prekurzoru kyseliny indol-3-máselné (IBA). Studie ukázaly, že zvýšená exprese tohoto enzymu vede k nárůstu koncentrace IBA-Glc a volných IBA v rostlinách, což zlepšuje jejich toleranci vůči suchu a zároveň mění stavbu rostlin. U rostlin se zvýšenou expresí UGT74E2 byla pozorována změněná stavba listové růžice, zkrácené řapíky a zakrslý vzrůst dospělých jedinců, což může být adaptivní reakcí na stresové podmínky, jako je sucho a vysoká salinita (Gharabli *et al.* 2023, Tognetti *et al.* 2010, Park *et al.* 2011).

Bylo popsáno, že UGT74E2 se rovněž podílí na detoxikaci xenobiotik, jako je výbušná sloučenina trinitrotoluen (TNT). Na základě zkoumání transkriptů, byla odhalena upregulace několika genů, včetně UGT74E2, u *A. thaliana*, a to v přítomnosti herbicidů, jako je isoproturon (Gharabli *et al.* 2023).

Studie také naznačují, že rostliny mohou kompenzovat nadměrnou expresi UGT74E2 zvýšenou syntézou volných hormonů, aby udržely buněčnou homeostázu (Tognetti *et al.* 2010).

Interakce mezi UGT74E2 a dalšími fytohormony, včetně kyseliny abscisové (ABA), kyseliny salicylové (SA) a giberelinů, zdůrazňuje komplexní roli tohoto enzymu v ochraně rostlin proti biotickým a abiotickým stresům. Produkce H₂O₂ závislá na ABA například podporuje uzavírání průduchů během sucha, zatímco giberelinová signalizace upravuje hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS). Kromě toho, změny ve stavbě rostlin, způsobené UGT74E2 mohou pomoci minimalizovat odpařování vody a zlepšit přežití v nepříznivých podmínkách. Enzym tedy představuje klíčový prvek v komplexním systému, který pomáhá rostlinám optimalizovat růst a přizpůsobit se měnícím environmentálním podmínkám a stresům (Gharabli *et al.* 2023, Tognetti *et al.* 2010).

UGT73C6

UGT73C6 je enzym patřící do podrodiny UGT73C, který je kódován 7 geny, z nichž šest je seskupeno v tandemové repetici na chromozomu 2. Tyto geny jsou si velmi podobné, což naznačuje jejich evoluční vývoj z jednoho genu. UGT73C6 je charakterizován širokou substrátovou specifitou, což znamená, že je schopen glukosylovat různé látky, včetně flavonoidů, hydroxykumarinů, isoflavonoidů, stilbenů a xenobiotik. Enzym je známý také jako flavonoid-7-O-glykosyltransferáza, která katalyzuje glukosylaci flavonoidů na 7-O-poloze, což ovlivňuje jejich bioaktivitu a rozpustnost. V rostlinách může UGT73C6 navíc konjugovat xenobiotika, jako je hydroxylaminodinitrotoluen, a v kvasinkách je schopen detoxikovat houbový toxin zearalenon (Husar *et al.* 2011).

Důležitou funkcí UGT73C6 je také glukosylace brassinosteroidů (BR), signálních molekul, které hrají klíčovou roli v regulaci růstu a vývoje rostlin. Tyto rostlinné hormony působí převážně lokálně a jejich aktivita je z velké části dána schopností vázat se na specifické BR receptory. UGT73C6, stejně jako UGT73C5, katalyzuje glukosylaci BR na 23-O-poloze, což vede k tvorbě BR-23-glukosidů, které chrání brassinosteroidy před degradací a katabolismem. Tento mechanismus pomáhá regulovat jejich hladiny a aktivity v rostlinách. Lokalizace UGT73C6 v cytoplazmě a jádře rostlin naznačuje jeho významnou roli v intracelulárním transportu a ochraně bioaktivních brassinosteroidů. Zvýšená exprese UGT73C6 vede k fenotypickým změnám, jako jsou tmavě zelené listy, krátké řapíky a opožděné kvetení, což naznačuje nedostatek BR a ukazuje na klíčovou roli UGT73C6 v udržování hormonální homeostázy a zdravém růstu rostlin (Husar *et al.* 2011).

UGT72B1

Tento enzym je vysoce aktivní při konjugaci perzistentních znečišťujících látek, konkrétně 3,4 - dichloranilinu (DCA) a 2,4,5 - trichlorfenol (TCP), které jsou jak syntetickými meziprodukty, tak produkty rozkladu řady pesticidů. U *A. thaliana* byly DCA a TCP rychle metabolizovány na glykosidické konjugáty jak v kořenových kulturách, tak v celých rostlinách, přičemž DCA byl převážně metabolizován na N-glukosid. Tyto glykosidy neprošly malonylací, což je v kontrastu s jinými plodinami, jako jsou pšenice, sója a bavlna, kde je malonylace cukerných konjugátů chlorovaných fenolů a anilinů hlavním konečným bodem detoxikace. Tato druhově závislá variabilita ve zpracování a intracelulárním transportu glykosidických konjugátů xenobiotik poukazuje na specifickou roli UGT72B1 jako dominantního DCA-konjugujícího enzymu u *A. thaliana*. Navíc bylo zjištěno, že u rostlin ošetřených naftalenem dochází k výrazné upregulaci UGT72B1, což zlepšuje jejich toleranci vůči tomuto stresoru a zvyšuje metabolismus. Tento enzym tak představuje důležitý nástroj pro detoxifikaci škodlivých sloučenin v rostlinách, což může být využito při šlechtění plodin s vyšší odolností vůči chemickým látkám v zemědělství (Gharabli *et al.* 2023, Zhang & Yang 2021, Bock 2015, Brazier-Hicks & Edwards 2005).

UGT71B6

UGT71B6 je enzym, který u *A. thaliana* konjuguje kyselinu abscisovou (ABA) a hraje klíčovou roli v homeostáze rostlinného růstu a v reakci na osmotický stres. Umlčení tohoto genu vedlo ke zhoršení tolerance vůči soli a růstovým vadám, avšak zvýšilo toleranci k osmotickému stresu, jako je sucho. Naopak nadměrná exprese UGT71B6 zhoršila toleranci vůči suchu, což naznačuje komplexní roli tohoto enzymu v regulaci stresových odpovědí rostlin. Upregulace tohoto genu po ošetření fenclorimenem rovněž způsobila zvýšení tolerance vůči herbicidům, což z něj činí potenciálně významný nástroj ve šlechtění rostlin (Gharabli *et al.* 2023, Zhang & Yang 2021, Bock 2015).

UGT91C1

UGT91C1 je klíčový enzym patřící do rodiny glykosyltransferáz 1, který hraje zásadní roli v detoxifikaci herbicidů u *A. thaliana*, zejména v případě sulcotrionu, který je členem skupiny triketonových herbicidů. Je absorbován nejen listy, ale také kořeny a může se kumulovat v půdě více než měsíc po aplikaci. Tyto herbicidy působí jako inhibitory hydroxyfenylpyruvát-dioxygenázy (HPPD) v metabolismu tyrosinu, čímž narušují biosyntézu plastochinonu a tokoferolu. To následně vede k poškození fotosyntetických procesů a negativnímu vlivu na růst rostlin. UGT91C1 využívá UDP-glukózu jako donor cukru a katalyzuje glykosylaci sulcotrionu, což vede k jeho kovalentní modifikaci na hydrofilní molekulu. Tím dochází k výraznému snížení toxického účinku herbicidu a zvýšení odolnosti rostlin vůči jeho negativním účinkům (Huang *et al.* 2021).

Exprese genu pro UGT91C1 je indukována přítomností více herbicidů, včetně sulcotrionu, přičemž nejvyšší míra exprese je zaznamenána mezi 6. až 12. hodinou po aplikaci. Tato rychlá a výrazná odpověď naznačuje, že je tento gen důležitou součástí obranného mechanismu rostliny proti stresu vyvolanému herbicidy. Experimentální data také ukazují, že nadměrná exprese UGT91C1 nejen zvyšuje rezistenci vůči sulcotrionu, ale také pozitivně ovlivňuje fyziologické procesy, například zvyšuje obsah chlorofylu, což může indikovat zlepšení fotosyntetických schopností rostlin. UGT91C1 má významný potenciál pro šlechtění plodin s vyšší odolností vůči herbicidům, ale také v oblasti fytoremediace, kde jeho schopnost glykosylovat sulcotrion může být využita k čištění kontaminovaných půd a vod. Zavedení tohoto genu do geneticky modifikovaných rostlin by mohlo umožnit účinnější odstranění sulcotrionu z prostředí, čímž by se snížilo ekologické zatížení spojené s použitím tohoto herbicidu. Tato aplikace naznačuje, že UGT91C1 může hrát klíčovou roli nejen v zemědělství, ale i v širších snahách o ochranu životního prostředí (Huang *et al.* 2021).

2.4 Antioxidační ochrana

2.4.1 Úvod

Rostliny čelí různým stresovým podmínkám jako jsou ozon, vysoké dávky UV záření, salinita a herbicidy, které zvyšují hladinu reaktivních forem kyslíku (ROS) v jejich buňkách. ROS, mezi které patří superoxidové radikály, hydroxylové radikály, peroxid vodíku a singletový kyslík, způsobují oxidativní poškození buněčných složek, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, což může negativně ovlivňovat fyziologické procesy v necílových rostlinných orgánech a vést ke snížení výnosů plodin (Kokojka *et al.* 2021, Duman *et al.* 2010). Aby se rostliny bránily proti potenciálně škodlivým účinkům ROS, vyvinuly si komplexní antioxidační obranný systém. Tento systém zahrnuje jak enzymatické, tak neenzymatické antioxidanty, které společně pracují na neutralizaci ROS a ochraně buněčných struktur před poškozením. Klíčovým prvkem tohoto systému jsou thiolové sloučeniny, zejména glutathion (GSH), které se podílejí na detoxikaci ROS prostřednictvím cyklu askorbát-glutathion. Tento cyklus zahrnuje důležité antioxidační enzymy jako glutathion-S-transferáza (GST) a glutathion reduktáza (GR) (Obr. 5, Hassan & Nemat Alla 2020, Kokojka *et al.* 2021).

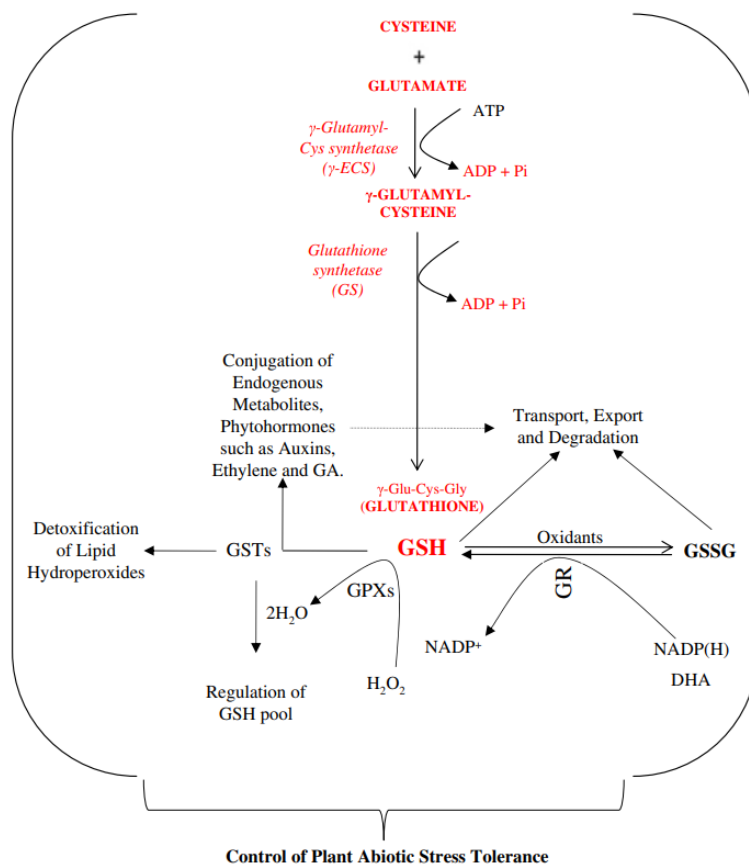
2.4.2 Vybrané antioxidační enzymy

2.4.2.1 Glutathion-S-transferáza

Tyto enzymy katalyzují konjugaci glutathionu (GSH) s elektrofilními substráty, čímž se vytvářejí méně toxické konjugáty, které jsou následně transportovány do vakuol pro další zpracování nebo ukládání (Oztetik 2010, Zhang & Yang 2021). Tento proces snižuje koncentraci toxických látek v cytosolu a tím minimalizuje jejich negativní vliv na rostlinné buňky. Kromě detoxikace xenobiotik GST enzymy rovněž neutralizují ROS, což přispívá k ochraně rostlinných buněk před oxidačním stresem (Hassan & Nemat Alla 2020). Zvýšená exprese GST zvyšuje schopnost rostlin efektivněji detoxikovat herbicidy, a tím zlepšuje jejich odolnost vůči těmto látkám. Geneticky modifikované rostliny s vyšší expresí GST vykazují zvýšenou odolnost také vůči herbicidům, což podtrhuje důležitost těchto enzymů v adaptivních reakcích rostlin na stresové podmínky (Zhang & Yang 2021).

2.4.2.2 Glutathion reduktáza

Glutathion reduktáza (GR) je klíčový enzym v antioxidační ochraně rostlinných buněk, který udržuje vysoký poměr redukovaného glutathionu (GSH) k oxidovanému glutathionu (GSSG). GR katalyzuje redukci GSSG na GSH za přítomnosti NADPH, čímž pomáhá udržovat redukovaný stav GSH, který je nezbytný pro ochranu buněk před ROS (Gill *et al.* 2013). Tento enzym je důležitou součástí dráhy askorbát-glutathion, která zahrnuje jak enzymatické, tak neenzymatické antioxidanty a hraje klíčovou roli v detoxikaci ROS a jeho reakčních produktů (Hassan & Nemat Alla 2020). GR se nachází především v chloroplastech, ale také v mitochondriích a cytosolu. Zvýšená aktivita GR je spojena s lepší tolerancí rostlin k různým stresovým podmínkám, jako jsou salinita, sucho a těžké kovy. Společně s GSH GR zajišťuje efektivní ochranu rostlinných buněk a přispívá k jejich adaptaci na stresové faktory (Kokojka *et al.* 2021, Gill *et al.* 2013).



Obrázek 5 Zjednodušené schéma biosyntézy a integrace redukovaného (GSH) a oxidovaného glutathionu (GSSG) v antioxidačním systému rostlin, včetně hlavních enzymů (GR, GPX, GST) a jejich role v odpovědi na abiotický stres – Převzato z: Gill *et al.* 2013

3 Cíle práce

Cílem práce bylo sledovat efekt dvou vybraných herbicidů při dvou různých technikách aplikace na rostlinu *Arabidopsis thaliana*, stanovit jejich vliv na expresi vybraných UGT genů a na aktivitu antioxidantních enzymů.

4 Experimentální část

Část experimentální práce jsem vykonávala v Ústavu experimentální botaniky AV v.v.i., kde byly pěstovány rostliny *A. thaliana*, aplikovány herbicidy a měřeny aktivity enzymů. Měření exprese UGT probíhalo na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

4.1 Příprava hydroponických kultur *A. thaliana*

Pro tento experiment byla použita rostlina *Arabidopsis thaliana*, pro jejíž pěstování byla zvolena metoda hydroponie. Jedná se o pěstování v živném roztoku, v našem případě v 25 % Hoaglandově roztoku. Tento roztok poskytuje vyvážené složení základních makro i mikroživin a podporuje růst rostlin právě v těchto hydroponických systémech. Jeho složení můžete vidět v následující tabulce.

Tabulka 1 Složení 25 % Hoaglandova roztoku

Zásobní roztok	látka	Obsah zásobního roztoku [g/l]	25 % Hoaglandův roztok [ml/l média]
A	1M NH ₄ H ₂ PO ₄	115,0	0,125
B	1M KNO ₃	101,1	0,75
C	Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,1	0,5
D	1M MgSO ₄ .7H ₂ O	246,5	0,25
F	Citrát železitý	6,0	0,25
		Obsah zásobního roztoku [mg/l]	
E	KI H ₃ BO ₃ MnSO ₄ .4H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ MnO ₄ .2H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O Na ₂ EDTA FeSO ₄ .7H ₂ O	7,50 30,00 132,00 20,00 2,50 0,25 0,25 373,00 278,00	2,5
E vit.	Inositol Nikotinová kyselina Pyridoxin HCl Thiamin HCl	1000 10 10 100	2,5
pH	6,2-6,3		

Do insertů byl napipetován 0,7% agar, u kterého je nutné, aby byl hlavně na začátku ponořen do média. Do jednoho insertu bylo vyseto cca 5 semenek, která byla po 2 týdnech protrhána na pouhou 1 rostlinu (Obr. 6). Efektivita hydroponických systémů spočívá nejen v zajišťování přímého kontaktu živného roztoku ke kořenům rostlin, ale také kyslíku. K tomu slouží vzduchování, které zde bylo nastaveno každé 3 hodiny na 15 minut. Pro udržení zdraví rostlin je nezbytné médium měnit, a to zhruba po 2 týdnech (poté po týdnu). Pěstujeme je při krátkém dni, tedy 8 hodin světlo 16 hodin tma, při teplotě 21 °C, s relativní vlhkostí 75 %. Rostlinám se nejvíce daří při pH 6,2 – 6,3.



Obrázek 6 Deset Araponics systémů s malými rostlinkami *A. thaliana* připravených na protrhání

4.2 Aplikace herbicidů na rostliny

Po vytřížení nových semenáčků byly do média přidány herbicidy, a to konkrétně isoproturon (I) a tribenuron-methyl (TBM). Byly přidány v různých koncentracích – a to v 1 mg/L („1“), dále pak 10 µg/L („2“), 0,1 µg/L („3“) a 0,001 µg/L („4“) a udržovány v 25 % Hoaglandově roztoku. Rostliny bez přidání herbicidů sloužily jako kontrola.

Z každé vany, kromě té s nejvyšší koncentrací 1 mg/L, která byla u obou herbicidů letální, byly sklizeny 3 vzorky rostlin po 100 mg přímo do 1 ml TRIzolu, což je specifická směs

fenolu a guanidin isothiokyanátu, která se využívá pro selektivní izolaci celkové RNA (tRNA, mRNA, rRNA, microRNA) z malého množství tkání či buněk. Vany se zbytky rostlin byly ponechány na pokus s postřikem. Ty byly nastříkány po dvou dnech příslušným herbicidem ve výrobce doporučené koncentraci (TBM: 20g/200-400L/ha; ISO: 750g/200-400L/ha). Po 24 hodinách působení byly opět odebrány vzorky rostlin do TRIzolu a uloženy do zpracování v teplotě 80 °C, na FaF UK byly převezeny na suchém ledu. Zbytky rostlin byly ihned zamrazeny tekutým dusíkem a ponechány v teplotě -80 °C pro jejich pozdější zpracování.

4.3 Stanovení exprese vybraných genů pro UGT

4.3.1 Chemická reagentia

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

4.3.2 Přístrojové vybavení

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

- Termomixér – Thermomixer comfort, Eppendorf
- Vortex – Vortex V-1 plus, BioSan

4.3.3 Izolace RNA

Vzorky listů v TRIzolu byly důkladně homogenizovány pomocí kuličkového homogenizátoru (4 cykly po 30 s při třepání 7 m/s). Po přidání chloroformu (200 μ l) do zkumavky a následnému stočení v centrifuze (12000 rpm, 10 min, 4 °C) došlo k rozdělení vodné a organické fáze. Jelikož se RNA nachází výhradně v horní fázi, došlo právě k jejímu přepipetování, a to velmi opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci. Aby se umožnila izolace čisté RNA, je provedeno selektivní vysrážení RNA pomocí isopropanolu (500 μ l). Nejprve bylo k přepipetované vodní fázi přidáno 500 μ l isopropanolu, ponecháno stát 10 min při laboratorní teplotě a zcentrifugováno (10 min, 12000 g, 4 °C). Mezitím byl smísením 9 ml absolutního ethanolu a 3 ml DEPC vody, což je sterilně filtrovaná, autoklávovaná voda bez nukleáz s přísadkou DEPC (diethyl pyrokarbonátu), připraven 75 % čistý ethanol. Po stočení v centrifuze byl ihned odstraněn supernatant. Zbylá peleta byla omyta 1ml 75 % ethanolu. Překlápním v ruce byl vzorek zamíchán a stočen na chlazené centrifuze (5 min, 7.000 g, 4 °C). Supernatant byl odstraněn skleněnou pipetou, peleta byla ponechána přibližně deset minut na vzduchu pro vysušení a následně rozpuštěna v 80 μ l DEPC vody a důkladně promíchána. RNA byla ponechána 5 minut stát, promíchána ještě jednou a po rozpuštění pelety uložena na led.

4.3.4 Měření koncentrace RNA ve vzorku

U vzorků byla změřena koncentrace RNA pomocí spektrofotometru Tecan SPARK. Na destičku NanoQuant plate byla napipetována nejdříve voda jako blank. Vzorky byly promíchány na vortexu a vždy po objemu 2 μ l pipetovány na destičku. Ta byla následně vložena do přístroje, díky kterému byla na základě absorbance změřena koncentrace RNA v ng/ μ l. Získaná data byla exportována do MS Excel.

4.3.5 Ošetření DNázou

Následně bylo provedeno ošetření vzorku RNA DNázou I, která selektivně štěpí pouze DNA a odstraní tak případnou kontaminaci vzorku genomovou DNA. Dle zjištěné koncentrace vzorku bylo vypočítáno, v kolika μl vzorku máme 2 μg RNA a kolik je třeba přidat DEPC vody, aby byl celkový objem 26 μl . DNáza se naředí pufrém (DNase buffer) v poměru 1:3 podle počtu vzorků. Do eppinek se připraví reakční směs, která byla složena z 2 μg RNA, dopočítané množství DEPC vody a 4 μl naředěné DNázy. Takto připravená směs byla promíchána, stočena a inkubována při 37 °C v termomixeru Eppendorf po dobu 25 minut. Poté bylo přidáno 1,5 μl 0,1 M EDTA a následovala desetiminutová inkubace při 75 °C, během níž došlo k inaktivaci DNázy. Následně byly vzorky z termomixeru přeneseny do ledu a k nim ke každému přidáno 8,5 μl DEPC vody tak, aby byl celkový objem vzorků 40 μl . Koncentrace ošetřené RNA byla 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (=50 $\text{ng}/\mu\text{l}$). Takto ošetřená RNA je připravena na reverzní transkripci a uchována při -70 °C.

4.3.6 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce se provádí tak, že je RNA reverzní transkriptázou (RT) převedena na jednořetězcovou cDNA (complementary DNA) s použitím jednoho specifického primeru či směsi nespecifických hexamerů.

Byly připraveny 2 paralelní sady vzorků – jedna na reverzní transkripci a jedna na *noRT* kontrolu, což znamená vzorky bez přidané RT sloužící na kontrolu případné kontaminace vzorku DNA. Do každé mikrozkušavky byla pipetováno 1 μl hexamerů a 8 μl RNA po ošetření DNázou, a to vždy po kapičce na stěnu 0,2 ml mikrozkušavek. Proběhlo lehké sklepaní, zamíchání na vortexu a následně krátké stočení. Poté byly vzorky vloženy na 5 minut do předem zapnutého PCR cykléru na 65 °C. Během zahřívání byly dle tab. 2 připraveny MasterMixy, které byly následně rozpipetovány do ochlazených a stočených vzorků. Do první sady byl přidán MasterMix RT (11 μl) dle počtu vzorků, do druhé MasterMix noRT (11 μl), kde není obsažena RT, místo toho doplněné na stejné množství vodou. Následující tabulka uvádí množství (μl) jednotlivých přísad MasterMixu v jednom vzorku.

Tabulka 2 Reakční směs pro reverzní transkripci jednoho vzorku

	RT+ [μl]	RT- [μl]
Reakční pufr 5x	4	4
DTT	2	2
dNTPs	2	2
RT	0,5	-
H₂O	2,5	3

Takto připravená směs byla sklepana, zamíchána na vortexu, stočena a opět vložena do PCR cykléru. Nejdříve v něm docházelo k zahřátí na 25 °C po dobu 10 minut, poté na 42 °C 50 min, přičemž proběhla syntéza cDNA. Nakonec aby mohlo dojít k denaturaci RT, byla teplota zvýšena na 5 minut až na 80 °C. Po proběhnutí reverzní transkripce bylo do směsi přidáno 180 μl redestilované H₂O, čímž se zředila připravená cDNA 10x. 5 μl, které budou do následných PCR přidány, odpovídají 10 ng RNA. Takto připravovaná cDNA se uchovává při 20 °C.

4.3.7 Real-Time PCR

Pro určení exprese konkrétního genu byla provedena kvantitativní polymerázová řetězová reakce, která je nejčastěji označována jako Real-Time PCR nebo také kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Ve speciálním PCR cykléru bylo v průběhu reakce kontinuálně zaznamenáváno množství DNA, a to díky přítomnosti fluorescenčního substrátu SYBR Green I, který se na dvojřetězovou DNA váže. Směs SYBR green I 2x koncentrovaná obsahovala kromě speciálního interkalačního barviva SYBR Green I také DNA polymerázu, dNTPs a pufr.

Tabulka 3 Složení směsi pro qPCR

	do jedné jamky [μl]
H₂O	4,20
2x SG mix	10,00
F primer (μM)	0,4
R primer (μM)	0,4
Smíchat MasterMix a pipetovat 15 μl do stripů	
cDNA (ředění 1:4)	5,00
celkem	20,00

Tato reakce byla provedena najednou pro náš cílový a referenční gen. Jak už bylo uvedeno výše, byla provedena izolace RNA, ošetření DNázou a reverzní transkripce. Tímto postupem byla připravena již zředěná cDNA ve dvou řadách – pro RT a noRT vzorky. RT byla připravována v duplikátech pro oba geny, noRT jen jednou, a to s genem referenčním. Nejdříve byl připraven MasterMix pro referenční a cílový gen. SYBR qPCR směs byla připravena tak, aby v každé jamce bylo 4,20 μ l vody, 10,00 μ l SG mix, 0,8 μ l R+F primerů. Následně byl MM smíchán a rozpipetován do PCR stripů (destiček) po 15 μ l. Poté se přidalo 5 μ l cDNA, zředěné 1:4, tak aby bylo získáno celkem 20 μ l (5 μ l cDNA + 15 μ l MM). Nakonec byla PCR destička zalepena fólií a umístěna po spuštění programu do PCR cykléru. Po skončení programu byla data exportována do Excelu. Po kontrole vzorků analýzou referenčního genu a jednoho cílového genu na 96jamkové destičce byly ostatní vzorky analyzovány na 384jamkové destičce, která umožní analýzu více genů najednou při ušetření množství použitého mastermixu. Vzorky byly analyzovány pomocí přístroje Quant Studio 6/7 Flex s použitím 96 nebo 384 jamkovým blokem. Program zahrnoval úvodní 2 minuty při 96 °C, 40 cyklů dvoustupňového programu 96 °C 15 s a 60 °C 20 s, kde následovala analýza bodu tání produktů.

4.3.8 Vyhodnocení a statistická analýza

Data byla zpracována pomocí metody $\Delta\Delta C_t$ dle protokolu Schmittgen a Livak 2008 (Schmittgen & Livak 2008), pro zhodnocení genové exprese byla použita relativní kvantifikace, při které byla změna exprese testovaného genu vztažena ke kontrolnímu genu, v našem případě byly výpočty provedeny s použitím referenčního genu EF a SAND. Následně byla data statisticky zhodnocena programem GraphPad Prism a vyhodnocena pomocí One-Way ANOVA, kde byl porovnán vliv jednotlivých herbicidů vůči kontrole.

4.4 Stanovení aktivity antioxidantních enzymů

4.4.1 Chemická reagentia

- Bradfordovo činidlo – Bio-Rad
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) – Penta
- EDTA – Sigma-Aldrich

- Fluordifen – Sigma-Aldrich
- Hovězí sérový albumin (BSA, bovine serum albumine) – Bio-Rad
- Hydrogenfosforečnan draselný (K₂HPO₄) – Penta
- Komplexon III (EDTA, disodná sůl, dihydrát) - Penta
- L-Glutathion oxidovaný (disodná sůl) – Sigma-Aldrich
- NADH (tetrasodná sůl) – Merck
- Polyvinylpyrrolidon K-30 (PVP K-30) – Sigma-Aldrich
- Triton-X 100 – Sigma-Aldrich

4.4.2 Přístrojové vybavení

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

4.4.3 Zpracování vzorků listů z rostlin z hydroponických kultur

200 mg rostlinné tkáň bylo po rozdrocení extrahováno v extrakčním pufru (složení pufr viz Tabulka 4) a opět promícháno. Po centrifugaci (20 minut, 4 °C, 14000 g) byl do mikroskopické pipety opatrně odpipetován supernatant - 1 ml do jedné sady a zbytek do druhé. Celý proces probíhal na ledu při 4 °C. Supernatant byl následně použit k měření aktivit glutathion-S-transferázy a glutathion reductázy. Obsah proteinů byl změřen pomocí Bradford assay za použití bovinního sérového albuminu (BSA) v koncentracích od 0,125 do 2 mg/ml jako standardu. Jako „blank“ byl použit extrakční pufr. Vše bylo spolu se vzorky napipetováno po 5 µl na 96 jamkovou destičku s plochým dnem, vždy 4x. Poté bylo do každé jamky napipetováno 250 µl Bradfordovo činidla (Coomassie brilliant blue G-250). Po 10 min inkubace

byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Základem extrakčního pufru byl fosfátový pufr (50 mM, pH = 7) s dalšími přísadami (Tab. 4).

Tabulka 4 Směs pro přípravu extrakčního pufru

Složka extrakčního pufru	Množství v 1 l
EDTA	29,22 mg
PVP	10 g
Triton-X 100	5 ml

4.4.4 Stanovení aktivity vybraných antioxidačních enzymů

4.4.4.1 Glutathion-S-transferáza

Nejdříve byl navážením 3,0285g TRISu/250 ml připraven roztok pufru, který byl velmi pečlivě dotitrován HCl až na hodnotu pH 6,4. Poté byl naředěn fluorodifen ethanolem (0,0196/2ml) a glutathion vodou (0,0389g/2ml). Z těchto naředěných přísad (23,7 ml pufru, 500 µg GSH, 250 µl fluordifenu) byla připravena směs, která byla po napipetování 40 µl vzorků na destičku transparent flat bottom UV přidána po 150 µl. Měření probíhalo v Tekanu při 400 nm po dobu 5 minut. Naměřené hodnoty byly přeneseny do tabulky v MS Excel.

Z dat získaných ve spektroskopickém měření byla vypočítána aktivita glutathion-S-transferázy, která byla vyjádřena na mg proteinu ve vzorku.

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

E_A = enzymatická aktivita

k = směrnice přímky

V = celkový objem roztoku v jamce (190 µl)

ϵ = extinkční koeficient (9,6 mM⁻¹·cm⁻¹)

v = objem vzorku (40 µl)

d = výška hladiny roztoku v jamce (0,568 cm)

4.4.4.1 Glutathion reduktáza

Následně byl připraven K-fosfátový pufr, a to přiléváním kyselějšího roztoku 200 ml KH_2PO_4 do 500 ml K_2HPO_4 . Následně bylo třeba roztok mírně okyselit HCl až do pH 7. Následně byl připraven roztok Komplexonu III (EDTA, disodná sůl, dihydrát) s horkou vodou, roztok NADH s horkou vodou a roztok GSSG disodné soli již s vodou o laboratorní teplotě. Po napipetování 50 μl vzorků na destičku byla po 150 μl napipetována směs z výše zmíněných přísad. Destička byla vždy vsunuta do přístroje Tekan při 340 nm po dobu 5-6 minut.

Z dat získaných ve spektroskopickém měření byla vypočítána aktivita glutathion reduktázy, která byla vyjádřena na mg proteinu ve vzorku.

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

E_A = enzymatická aktivita

k = směrnice přímky

V = celkový objem roztoku v jamce (200 μl)

ϵ = extinkční koeficient ($6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

v = objem vzorku (50 μl)

d = výška hladiny roztoku v jamce (0,75 cm)

4.4.5 Vyhodnocení a statistická analýza

Aktivity jednotlivých antioxidantních enzymů byly stanoveny dle popsaných metod na přístroji Tecan Infinite 200 PRO, přičemž výsledky byly vyjádřeny v jednotkách U/mg. Enzymatická aktivita (U) vyjadřuje množství enzymu potřebné k přeměně 1 μmol substrátu za minutu. Získaná data byla zpracována v programu MS Excel, kde byly vytvořeny také příslušné grafy. Pro statistické vyhodnocení byl použit software STATISTICA. CZ verze 12.0 (StatSoft, Praha, Česká republika). Data by zhodnocena pomocí One-Way ANOVA, která porovnávala aktivitu antioxidantních enzymů vůči kontrole.

5 Výsledky

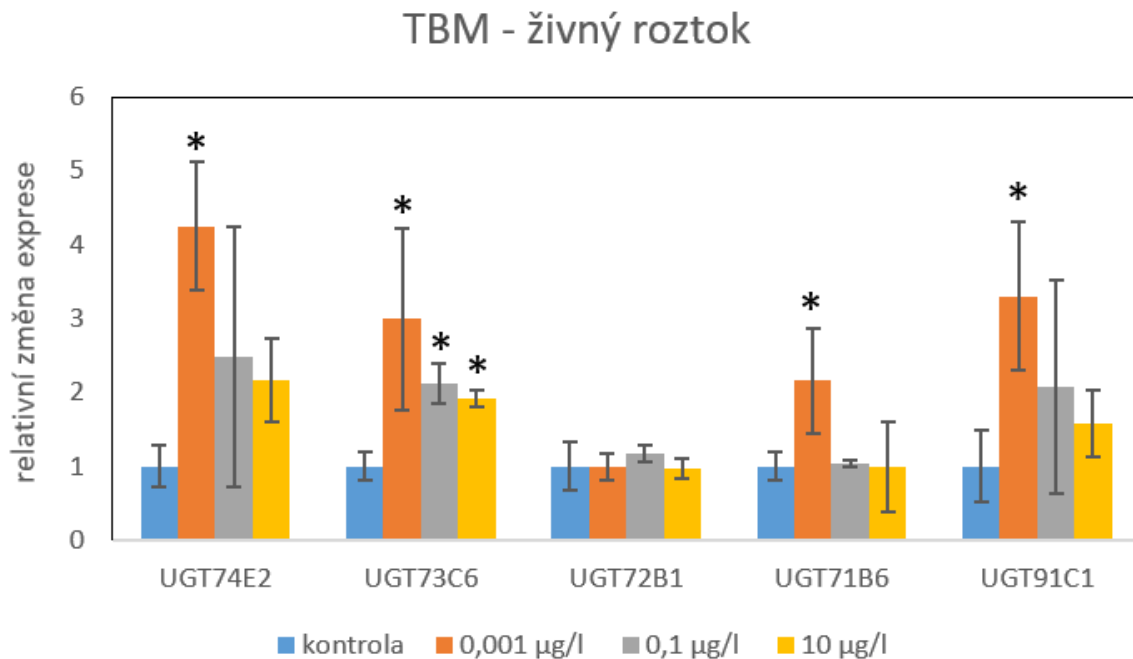
5.1 Ovlivnění vybraných genů pro UGT herbicidy

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda pod vlivem herbicidů dojde k ovlivnění genové exprese UGT u rostliny *A. thaliana*. Provedli jsme relativní zhodnocení změn exprese testovaných genů vůči referenčním v ošetřených rostlinách vůči kontrolním. Referenční gen byl vybrán dle toho, aby byl v daném experimentu stabilně exprimován. V našem experimentu byly použity dva referenční geny EF a SAND, jejichž stabilita byla ověřena v předchozích experimentech.

Mezi vybrané geny pro UGT, které byly měřeny v rámci této práce patří UGT74E2, UGT73C6, UGT72B1, UGT71B6 a UGT91C1. Enzymy těchto genů byly vybrány na základě dostupné literatury o UGT, s předpokladem, že by se mohly účastnit detoxifikace použitých herbicidů či jinak přispívat k odolnosti vůči vybraným herbicidům. Byly použity dva herbicidy, každý s jiným mechanismem účinku – tribenuron-methyl a isoproturon. Oba herbicidy byly aplikovány jak postřikem, tak do půdy (živného roztoku), což nám umožnilo zkoumat jejich vliv na genovou expresi UGT za různých podmínek.

Následující část práce se zaměřuje na výsledky získané z těchto experimentů.

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

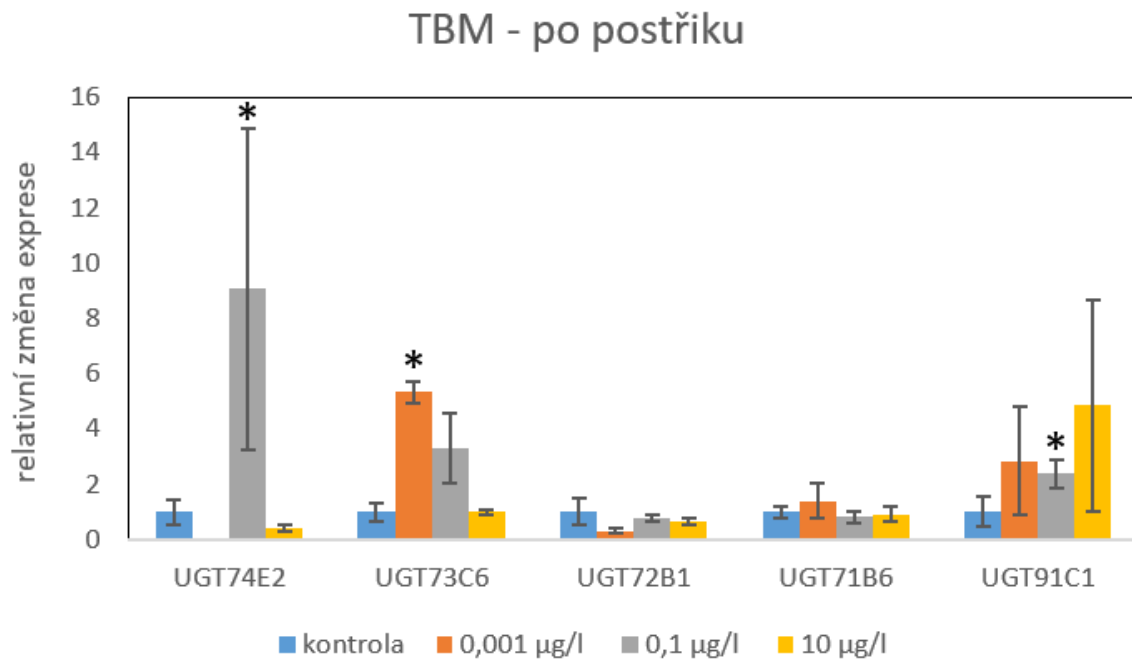


Graf 1 Vliv koncentrace tribenuron-methylu aplikovaného do živného roztoku na relativní expresi vybraných UGT genů u rostlin *Arabidopsis thaliana*. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky *označuje výsledky s hladinou významnosti $p \leq 0,05$

Výsledky z grafu 1 ukazují, že exprese vybraných UGT genů u rostlin *A. thaliana* je nejvyšší při nejnižší aplikované koncentraci TBM (0,001 µg/l). Zdá se, že při této koncentraci má rostlina dostatek energetických zdrojů, které umožňují intenzivní genovou expresi, pravděpodobně jako fyziologickou odpověď na mírný stres. S rostoucí koncentrací herbicidu však dochází k postupnému poklesu exprese, což může být důsledkem zvýšeným stresovým zatížením herbicidu a omezené dostupnosti energie, kterou rostlina přeměrovává na zajištění životních funkcí a přežití.

Statisticky významné zvýšení exprese bylo pozorováno u genů UGT74E2, UGT73C6, UGT71B6 a UGT91C1 právě při nejnižší koncentraci, přičemž určité zvýšení exprese bylo zaznamenáno také při vyšších koncentracích, i když méně výrazně. Naopak u genu UGT72B1 nebyl zaznamenán statisticky významný nárůst exprese při žádném z testovaných koncentrací.

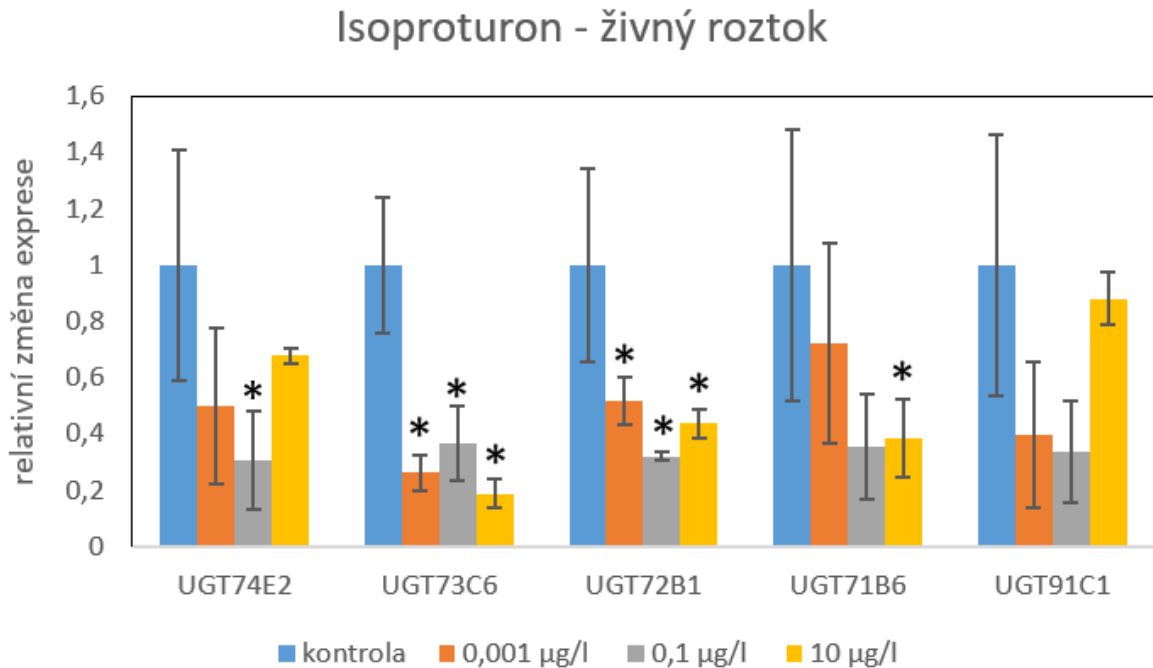
5.1.2 Vyhodnocení qPCR po ovlivnění *A. thaliana* tribenuron-methylem po postřiku



Graf 2 Vliv koncentrace tribenuron-methylu aplikovaného postřikem na relativní expresi vybraných UGT genů u rostlin *Arabidopsis thaliana*. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky. *označuje výsledky s hladinou významnosti $p \leq 0,05$

Zvýšení exprese genů UGT74E2, UGT73C6 a UGT91C1 bylo pozorováno v různých koncentracích. U genu UGT73C6 bylo signifikantní zvýšení exprese zaznamenáno při nejnižší testované koncentraci 0,001 µg/l. Naopak u genů UGT74E2 a UGT91C1 bylo signifikantní zvýšení exprese detekováno při koncentraci 0,1 µg/l. U genu UGT74E2 se bohužel vzorek odpovídající koncentraci 0,001 µg/l poškodil, a tedy tento gen nebyl stanoven.

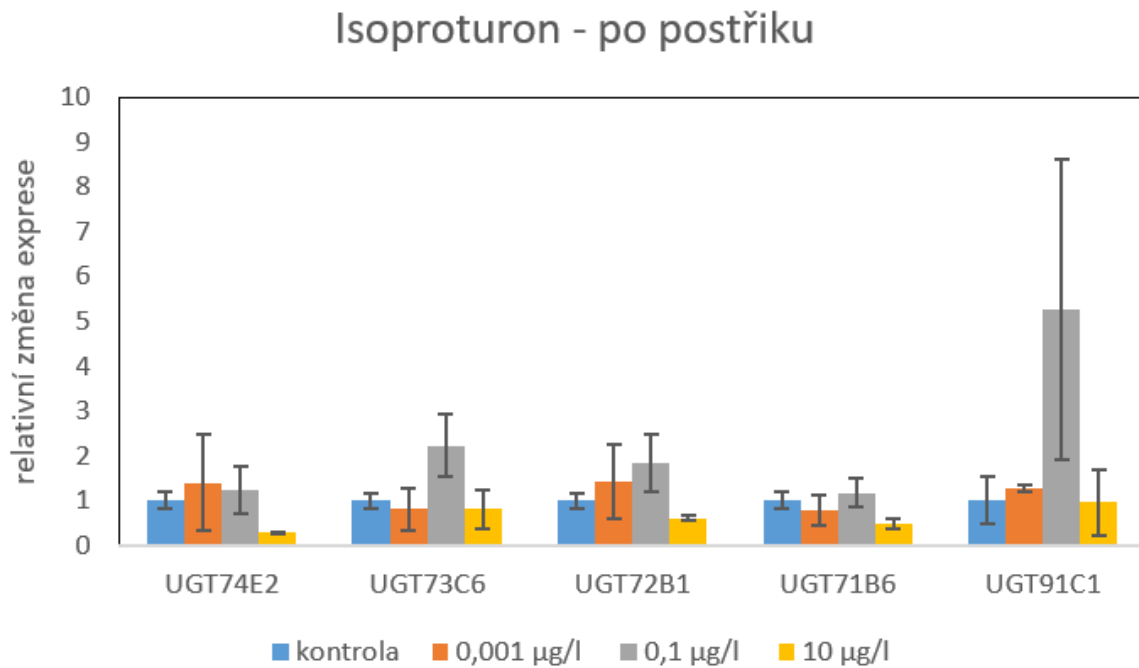
5.1.3 Vyhodnocení qPCR po ovlivnění *A. thaliana* isoproturonem v živném roztoku



Graf 3 Vliv koncentrace isoproturonu aplikovaného do živného roztoku na relativní expresi vybraných UGT genů u rostlin *A. thaliana*. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky. *označuje výsledky s hladinou významnosti $p \leq 0,05$

Výsledky ukazují, že exprese většiny sledovaných UGT genů signifikantně klesá s rostoucí koncentrací isoproturonu ve srovnání s kontrolní skupinou. Tento statisticky významný pokles exprese naznačuje, že zkoumané UGT geny nemusí být primárně zapojeny do metabolismu isoproturonu. Na základě těchto zjištění se jeví, že CYP450 mohou hrát významnější roli v metabolismu isoproturonu než UGT geny (Azab *et al.* 2020).

5.1.4 Vyhodnocení qPCR po ovlivnění *A. thaliana* isoproturonem po postřiku



Graf 4 Vliv koncentrace isoproturonu aplikovaného postřikem na relativní expresi vybraných UGT genů u rostlin *A. thaliana*. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

Na grafu 4 nebylo pozorováno signifikantní zvýšení exprese genů po aplikaci isoproturonu. Ačkoli u genu UGT91C1 došlo k výraznému zvýšení exprese, výsledky vykazují značnou variabilitu, která může být částečně způsobena omezeným počtem vzorků použitých v experimentu. Tato variabilita může ovlivnit interpretaci dat a bylo by vhodné provést další studie s větším počtem vzorků pro potvrzení a upřesnění těchto výsledků.

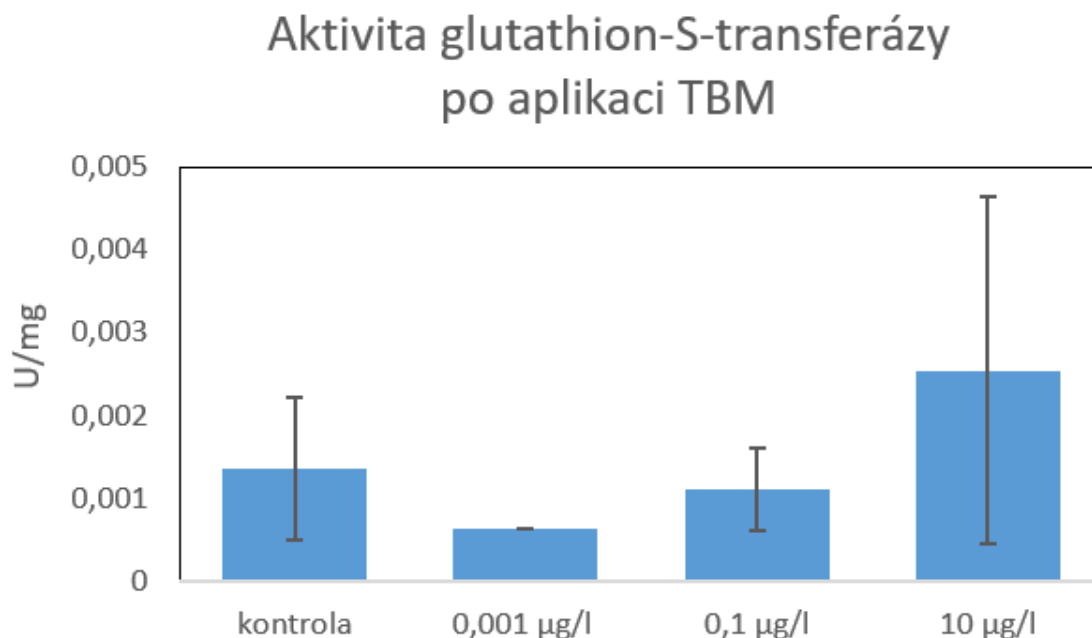
5.2 Vliv herbicidů na aktivitu antioxidantních enzymů u *A. thaliana*

V této kapitole je popsán vliv herbicidů tribenuron-methylu (TBM) a isoproturonu na aktivitu antioxidantních enzymů u rostliny *A. thaliana*, v tomto případě jsme použily pouze rostliny pěstované na živném roztoku obsahujícím příslušné herbicidy. Konkrétně je hodnocena aktivita glutathion-S-transferázy (GST) a glutathion reductázy (GR). Tyto enzymy jsou klíčové pro ochranu proti oxidačnímu stresu, který může být způsoben aplikací herbicidů.

5.2.1 Aktivita glutathion-S-transferázy (GST)

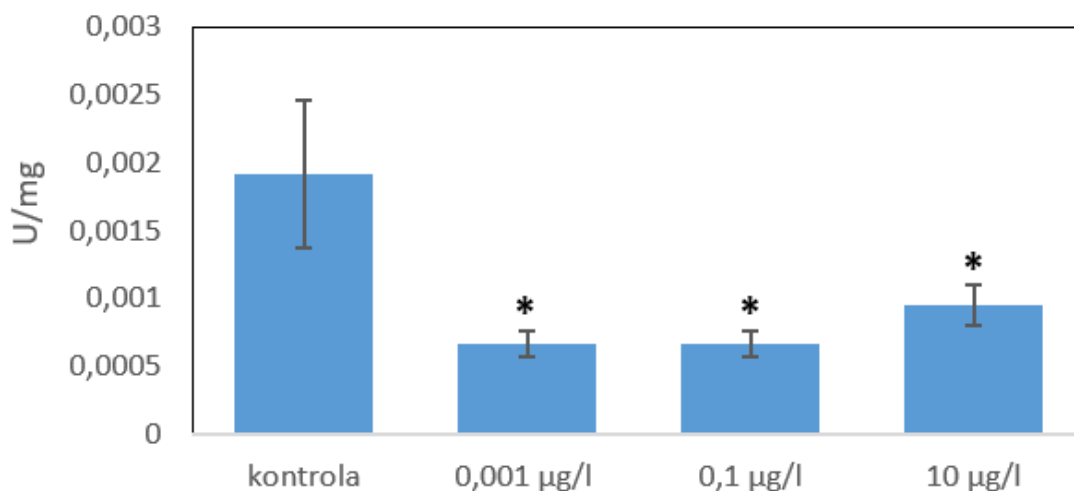
Glutathion-S-transferáza (GST) je klíčový enzym v detoxikaci toxických látek, který konjugací glutathionu s elektrofilními substráty přispívá k jejich eliminaci a ochraně rostlinných buněk před oxidačním stresem.

Při aplikaci nejvyšší koncentrace TBM (10 $\mu\text{g/l}$) byl zaznamenán nejvýraznější nárůst aktivity GST. Tento nárůst aktivity však nelze považovat za statisticky významný, měření vykazovala větší odchylky, což může naznačovat variabilitu v odpovědi jednotlivých rostlin na tento stresor (Graf 5). Naopak, po aplikaci isoproturonu je pokles glutathion-S-transferázy viditelný ve všech vybraných koncentracích (0,001 $\mu\text{g/l}$, 0,1 $\mu\text{g/l}$ a 10 $\mu\text{g/l}$) (Graf 6).



Graf 5 Porovnání enzymatické aktivity glutathion-S-transferázy (GST) na hydroponických kulturách *A. thaliana* stresovaných vybranými koncentracemi TBM

Aktivita glutathion-S-transferázy po aplikaci isoproturonem



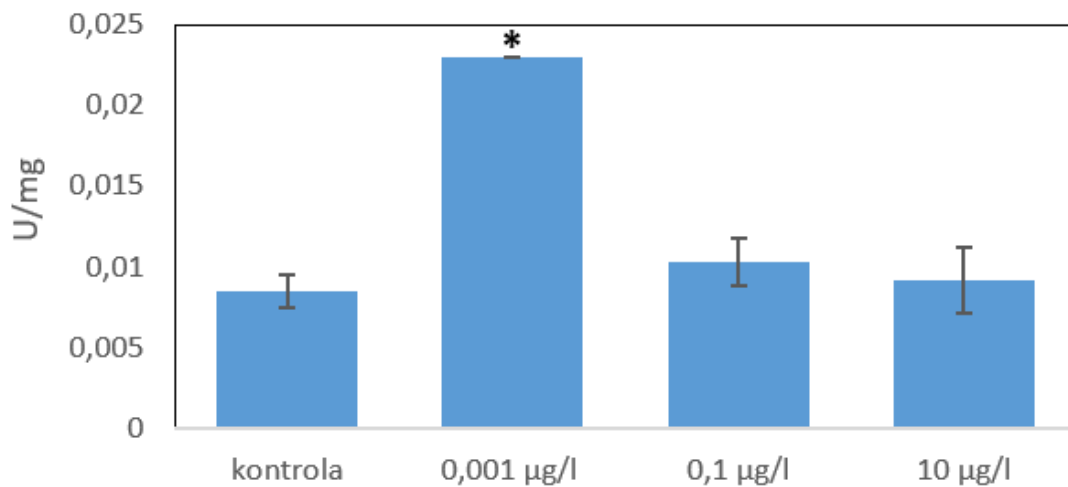
Graf 6 Porovnání enzymatické aktivity glutathion-S-transferázy (GST) na hydroponických kulturách *A. thaliana* stresovaných vybranými koncentracemi isoproturonu *označuje výsledky statisticky odlišné v porovnání s kontrolou na hladině významnosti $p \leq 0,05$

5.2.2 Aktivita glutathion reduktázy (GR)

Glutathion reduktáza (GR) je klíčový enzym v antioxidační ochraně rostlinných buněk, který udržuje vysoký poměr redukovaného glutathionu k oxidovanému glutathionu, a tím přispívá k ochraně buněk před oxidačním stresem.

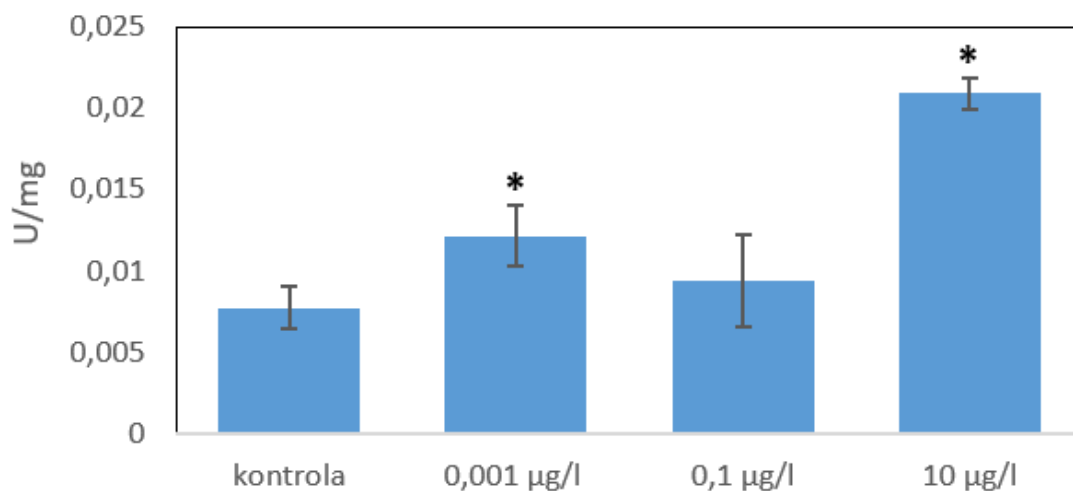
Při aplikaci nejnižší koncentrace TBM (0,001 µg/l) byla pozorována nejvyšší aktivita GR. Tato koncentrace je považována za signifikantní, což je zajímavé vzhledem k očekávání, že vyšší koncentrace herbicidu by měly vyvolat silnější stresovou odpověď, a tedy i vyšší aktivitu tohoto antioxidačního enzymu. U koncentrace 0,1 µg/l a 10 µg/l nebyly pozorovány žádné změny v porovnání s kontrolou (Graf 7). Nejvyšší hodnoty aktivity GR byly zaznamenány u nejvyšší koncentrace isoproturonu (10 µg/l), což potvrzuje, že tento herbicid skutečně vyvolává stresovou odpověď v rostlinách. Tato koncentrace se spolu s koncentrací 0,001 µg/l ukázala být signifikantní (Graf 8).

Aktivita glutathion-reduktázy po aplikaci TBM



Graf 7 Porovnání enzymatické aktivity glutathion reduktázy (GR) na hydroponických kulturách *A. thaliana* stresovaných vybranými koncentracemi TBM *označuje výsledky statisticky odlišné v porovnání s kontrolou na hladině významnosti $p \leq 0,05$

Aktivita glutathion-reduktázy po aplikaci isoproturonem



Graf 8 Porovnání enzymatické aktivity glutathion-S-transferázy (GST) na hydroponických kulturách *A. thaliana* stresovaných vybranými koncentracemi isoproturonu *označuje výsledky statisticky odlišné v porovnání s kontrolou na hladině významnosti $p \leq 0,05$

6 Diskuse

V rámci této studie byly porovnávány dva různé herbicidy, tribenuron-methyl a isoproturon. Oba herbicidy představují různé typy chemických látek s odlišným mechanismem účinku a způsobem aplikace.

Tribenuron-methyl je představitelem sulfonylmočovín, zatímco isoproturon je klasifikován jako fenylnmočovinný herbicid. Rozdíl v chemické struktuře se odráží v jejich mechanismu účinku a metabolismu. Tribenuron-methyl je známý svou schopností inhibovat acetolaktát syntázu (ALS), čímž narušuje biosyntézu esenciálních větvených aminokyselin, jako je valin, leucin či isoleucin. Naproti tomu isoproturon ovlivňuje fotosyntézu inhibicí fotosystému II.

Spektrum účinku těchto dvou herbicidů se značně liší. Zatímco tribenuron-methyl se zaměřuje na širokolisté plevele, isoproturon nabízí širší spektrum účinku zahrnující jak trávy, tak dvouděložné plevele. To je důležité při výběru správného herbicidu v závislosti na druhu plevelů, které jsou přítomny na poli. Navíc, tribenuron-methyl je postemergentní herbicid, který se aplikuje po vzejití rostlin, zatímco isoproturon je preemergentní herbicid, jehož účinek se projevuje v půdě ještě před klíčením rostlin. Přesto byly v rámci našeho experimentu zkoumány na každý herbicid techniky obě, a to na rostlině *Arabidopsis thaliana*, která byla zvolena díky rychlému růstu a rozsáhlým znalostem o jejím genomu. Na této rostlině byly oba herbicidy testovány i při opačné technice aplikace, což umožnilo zhodnotit jejich účinnost mimo tradiční podmínky použití. Na základě toho mohlo být zjištěno, jaký vliv má změna aplikační techniky na efektivitu herbicidů u modelového organismu.

S rostoucí oblibou herbicidů roste však v zemědělství fenomén rezistence, který však není u naší modelové rostliny dostatečně zkoumán, jelikož tato rostlina vážně nekonkuruje žádné plodině. U TBM se často vyskytuje rezistence způsobená mutacemi v ALS enzymu, čímž se výrazně snižuje účinnost tohoto herbicidu. Rezistence může být překonána použitím herbicidů s odlišným mechanismem účinků nebo jejich rotací. Isoproturon může čelit rezistenci prostřednictvím cytochromu P450 nebo GST, což urychlí jeho metabolismus v rezistentních plevelech. Tento typ rezistence je možné řešit kombinací isoproturonu s jinými herbicidy nebo nahrazením jinými látkami (Singh 2007).

Na základě mnoha studií se na herbicidní rezistenci podílí především cytochrom P450, glutathion-S-transferázy a transportní proteiny, ale také UGT enzymy, kterými se tato práce v souvislosti s rolí v rezistenci herbicidů zabývá.

Předpokládali jsme, že když budou rostliny pěstovány v médiu obsahujícím herbicid, bude po postřiku jejich exprese UGT genů výrazně vyšší ve srovnání s kontrolou, jelikož už se jednou s tímto stresorem setkaly. Tato hypotéza se však v naší studii nepotvrdila.

V rámci této diplomové práce bylo u rostlin po aplikaci TBM do živného roztoku pozorováno signifikantní zvýšení exprese UGT, a to zejména při nejnižší zkoumané koncentraci tohoto herbicidu. S největší pravděpodobností je to dáno tím, že rostlina má při této koncentraci dostatek energetických zdrojů, které umožňují intenzivní genovou expresi, pravděpodobně jako fyziologickou odpověď na mírný stres. S rostoucí koncentrací herbicidu však dochází k postupnému poklesu exprese, což může být důsledkem zvýšeným stresovým zatížením herbicidy a omezené dostupnosti energie, kterou rostlina přeměrovává na zajištění životních funkcí a přežití. Zajímavé je, že gen UGT74E2, který se více zapojuje do stresové reakce rostlin, ale pravděpodobně nemetabolizuje xenobiotika, vykazuje největší nárůst exprese při nízkých koncentracích, což podporuje hypotézu o jeho roli v obraně proti mírnému stresu. Signifikantní zvýšení exprese většiny UGT zde naznačuje, že jimi kódované enzymy jsou důležité při detoxifikaci TBM u *A. thaliana* zapojeny. Hlavními metabolity v rostlinách po aplikaci TBM jsou methyl-2-aminosulfonylbenzoát, 4-methoxy-6-methyl-2-methylamino-1,3,5-triazin a sacharin (Bhattacharjee & Dureja 1998).

Na druhé straně, isoproturon vedl po aplikaci do živného roztoku k signifikantnímu poklesu exprese všech sledovaných UGT genů. To naznačuje, že UGT enzymy nejsou pro metabolismus isoproturonu klíčové. Na základě dostupných údajů se zdá, že hlavní roli v metabolismu isoproturonu hrají enzymy cytochromu P450 (CYP450) (Azab *et al.* 2020). Tyto enzymy se podílejí na první fázi metabolismu isoproturonu v rostlinách a mohou být zodpovědné za vyšší úroveň degradace v rostlinách. CYP450 enzymy se účastní procesů hydroxylace a N-demethylace, což jsou metabolické cesty, kterými isoproturon prochází v rostlinách, půdě a mikroorganismech. Hlavními metabolity isoproturonu jsou 2-hydroxy-isoproturon, monodesmethyl-isoproturon a 2-hydroxy-monodesmethyl-isoproturon (Schuelein *et al.* 1996, Gläßgen *et al.* 1999, Lehr *et al.* 1996).

V druhé části práce bylo zkoumáno stresové zatížení rostlin vlivem herbicidů, konkrétně na aktivitu antioxidantních enzymů glutathion-S-transferázy a glutathion reduktázy.

Přestože bylo po aplikaci TBM pozorováno určité zvýšení aktivity glutathion-S-transferázy, nelze výsledky kvůli vysoké směrodatné odchylce považovat za signifikantní. Z jiných studií (Kokojka *et al.* 2021, Oztetik 2010) vyplývá, že tribenuron-methyl (TBM) indukuje expresi

detoxikačních genů a zvyšuje aktivitu glutathion-S-transferázy (GST), přičemž jeho použití může ovlivnit metabolismus glutathionu a snížit ochranné schopnosti plodin vůči stresu, zejména při vyšších koncentracích, které mohou inhibovat syntézu aminokyselin a omezit růst rostlin. Výsledky této studie podporují myšlenku, že herbicidy, včetně TBM, stimulují aktivity GST v různých rozmezech v závislosti na typu rostliny, koncentraci herbicidu a podmínkách aplikace. GR u TBM byla nejvýrazněji zvýšena pouze při nejnižší koncentraci.

Po aplikaci isoproturonu bylo zaznamenáno výrazné snížení aktivity glutathion-S-transferázy (GST), zatímco aktivita glutathion reduktázy (GR) vzrostla, zejména při nejvyšší koncentraci herbicidu. Tento jev může být vysvětlen mechanismem, jakým isoproturon ovlivňuje antioxidační systém rostlin. Dle studie (Hassan & Nemat Alla 2020) bylo zjištěno, že isoproturon kompetitivně inhibuje aktivitu GST a GR. Inhibice GST tímto herbicidem tedy může vést ke snížené schopnosti rostliny detoxikovat isoproturon a jiné škodlivé látky, což by mohlo přispět k hromadění oxidačního stresu v buňkách. Na druhé straně, zvýšená aktivita GR může být reakcí na zvýšený oxidační stres vyvolaný isoproturonem. GR je enzymem, který regeneruje glutathion, jehož úroveň může být vyčerpána a při snaze rostlin kompenzovat oxidační stres a obnovit GST může vést ke zvýšení aktivity tohoto enzymu.

Závěrem lze říci, že tribenuron-methyl a isoproturon představují rozdílné přístupy v regulaci plevelů s odlišnými metabolickými drahami a ekologickými dopady. Zatímco TBM je účinný proti širokolistým plevelům a je metabolizován hlavně prostřednictvím UGT enzymů, isoproturon je metabolizován převážně CYP450 a má širší spektrum účinku. Toto srovnání podtrhuje důležitost pečlivého výběru herbicidu.

Další výzkum by měl být zaměřen na podrobnější analýzu role CYP450 enzymů v metabolismu isoproturonu, aby se objasnilo jejich konkrétní zapojení a mechanismy působení, a na zkoumání dalších faktorů, které mohou ovlivnit efektivitu a bezpečnost herbicidů v zemědělství.

7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala srovnáním rozdílů účinků dvou herbicidů, tribenuron-methyl (TBM) a isoproturon, na modelové rostlině huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) se zaměřením na jejich vliv na expresi UDP-glukosyltransferáz (UGT) a aktivitu antioxidantních enzymů (GST a GR).

TBM a isoproturon byly zvoleny s ohledem na jejich metabolismus, který probíhá přes II. fázi detoxifikace, při kterém dochází k přenosu glukózy na substrát. Na základě tohoto mechanismu bylo předpokládáno, že u obou herbicidů dojde ke zvýšené expresi UGT genů, které zajišťují tento přenos glukózy.

Výsledky experimentů se potvrdily u TBM aplikovaném do živného roztoku, kde bylo pomocí qPCR zjištěno výrazné zvýšení exprese UGT. U isoproturonu bylo naopak zaznamenáno signifikantní snížení UGT, což naznačuje, že se pravděpodobně na detoxifikaci herbicidu prostřednictvím UGT nepodílí.

Dále byl zkoumán vliv těchto herbicidů na aktivitu antioxidantních enzymů, konkrétně glutathion reductázy a glutathion-S-transferázy, v reakci na aplikaci herbicidů, která je pro rostliny stresem. Výsledky ukázaly, že aktivita antioxidantních enzymů nevykazovala žádné zvýšení, a to ani při zvyšujících se koncentracích herbicidu, což naznačuje, že testované koncentrace nebyly pro rostliny dostatečně stresující, aby vyvolaly aktivaci obranných mechanismů.

8 Seznam použitých zkratek

ABC = ATP-binding cassette
ACC = acetyl-CoA-karboxyláza
ALS = acetolaktát syntáza
BR = brassinosteroidy
CYP = cytochromy P450
DCA = 3,4 – dichloranilin
EDTA = kyselina ethylendiaminotetraoctová
GR = glutathionreduktáza
GSH = glutathion
GSSG = glutathion disulfid
GST = glutathion-S-transferáza
GT = glykosyltransferáza
HPPD = p-hydroxyfenyl pyruvát dioxygenáza
HRAC = Herbicide Resistance Action Committe
IBA = kyselina indol-3-máselná
MM = MasterMix
NTC = no template control – negativní kontrola
NTSR = non-target site resistance
PS II = fotosystém II
qPCR = quantitative polymerase chain reaction
ROS = reactive oxygen species
RT = reverzní transkriptáza
SA = kyselina salicylová
TBM = tribenuron-methyl
TCP = 2,4,5 - trichlorfenol
TNT = 2,4,6-trinitrotoluene
TSR = target-site resistance
UDP = uridindifosfát
UGT = UDP-glykosyltransferáza

9 Zdroje

9.1 Literární zdroje

AZAB, E., HEGAZY, A. K., GOBOURI, A. A., & ELKELISH, A. (2020). Impact of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants on herbicide isoproturon phytoremediation through expressing human cytochrome P450-1A2. *Biology*, 9(11), 362.

BHATTACHERJEE, A. K., & DUREJA, P. (1998). Simultaneous estimation of tribenuron-methyl and its major metabolites by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 12(4), 196-198.

BOCK, K. W. (2016). The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal plant arms-race and co-evolution. *Biochemical pharmacology*, 99, 11-17.

BRAZIER-HICKS, M., & EDWARDS, R. (2005). Functional importance of the family 1 glucosyltransferase UGT72B1 in the metabolism of xenobiotics in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 42(4), 556-566.

CARVALHO, S. J. P. D., NICOLAI, M., FERREIRA, R. R., FIGUEIRA, A. V. D. O., & CHRISTOFFOLETI, P. J. (2009). Herbicide selectivity by differential metabolism: considerations for reducing crop damages. *Scientia agricola*, 66, 136-142.

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

CRUZ-HIPOLITO, H., ROSARIO, J., IOLI, G., OSUNA, M. D., SMEDA, R. J., GONZÁLEZ-TORRALVA, F., & DE PRADO, R. (2013). Resistance mechanism to tribenuron-methyl in white mustard (*Sinapis alba*) from southern Spain. *Weed science*, 61(3), 341-347.

DAS, M., REICHMAN, J. R., HABERER, G., WELZL, G., ACEITUNO, F. F., MADER, M. T., ... & OLSZYK, D. M. (2010). A composite transcriptional signature differentiates responses towards closely related herbicides in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant molecular biology*, 72, 545-556.

DIMUNOVÁ, D., MATOUŠKOVÁ, P., PODLIPNÁ, R., BOUŠOVÁ, I., & SKÁLOVÁ, L. (2022). The role of UDP-glycosyltransferases in xenobiotic resistance. *Drug metabolism reviews*, 54(3), 282-298.

DUMAN, F., UREY, E., TEMIZGUL, R., & BOZOK, F. (2010). Biological responses of a non-target aquatic plant (*Nasturtium officinale*) to the herbicide, tribenuron-methyl. *Weed biology and management*, 10(2), 81-90.

GAR'KOVA, A. N., RUSYAEVA, M. M., NUSHTAEVA, O. V., AROSLANKINA, Y. N., & LUKATKIN, A. S. (2011). Treatment with the herbicide granstar induces oxidative stress in cereal leaves. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58, 1074-1081.

GHARABLI, H., DELLA GALA, V., & WELNER, D. H. (2023). The function of UDP-glycosyltransferases in plants and their possible use in crop protection. *Biotechnology advances*, 67, 108182.

GILL, S. S., ANJUM, N. A., HASANUZZAMAN, M., GILL, R., TRIVEDI, D. K., AHMAD, I., ... & TUTEJA, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 204-212.

GLÄßGEN, W. E., KOMOßA, D., BOHNENKÄMPER, O., HAAS, M., HERTKORN, N., MAY, R. G., ... & SANDERMANN JR, H. (1999). Metabolism of the herbicide isoproturon in wheat and soybean cell suspension cultures. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63(2), 97-113.

HALL, L., BECKIE, H., & WOLF, T. M. (1999). *How herbicides work: biology to application*.

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

HASSAN, N. M., & NEMAT ALLA, M. M. (2020). Kinetics of inhibition of isoproturon to glutathione-associated enzymes in wheat. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(7), 1505-1518.

HUANG, X. X., ZHAO, S. M., ZHANG, Y. Y., LI, Y. J., SHEN, H. N., LI, X., & HOU, B. K. (2021). A novel UDP-glycosyltransferase 91C1 confers specific herbicide resistance through detoxification reaction in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 159, 226-233.

HUSAR, S., BERTHILLER, F., FUJIOKA, S., ROZHON, W., KHAN, M., KALAIIVANAN, F., ... & POPPENBERGER, B. (2011). Overexpression of the UGT73C6 alters brassinosteroid glucoside formation in Arabidopsis thaliana. *BMC plant biology*, 11(1), 51.

JURSÍK, M., SOUKUP, J., & HOLEC, J. (2010). Úvod do problematiky mechanismu působení herbicidů. *Listy cukrovarnické a řepářské*, 126(1).

JURSÍK, M., HAMOUZOVÁ, K., SOUKUP, J., & HOLEC, J. (2011). Rezistence plevelů vůči herbicidům a problémy s rezistentními populacemi v ČR. *Listy cukrovarnické a řepářské*, 127(4).

KOKOJKA, F., BACU, A., SHAHINI, S., & MEDHA, G. (2023). Tribenuron-methyl treatment affects glutathione metabolization and other physiological processes in bread wheat. *International Journal of Pest Management*, 69(3), 248-254.

KRÄHMER, H., WALTER, H., JESCHKE, P., HAAF, K., BAUR, P., & EVANS, R. (2021). What makes a molecule a pre- or a post-herbicide—how valuable are physicochemical parameters for their design?. *Pest Management Science*, 77(11), 4863-4873.

LEHR, S., GLÄSSGEN, W. E., SANDERMANN, H., BEESE JR, F., & SCHEUNERT, I. (1996). Metabolism of isoproturon in soils originating from different agricultural management systems and in cultures of isolated soil bacteria. *International journal of environmental analytical chemistry*, 65(1-4), 231-243.

LIAN, J. L., REN, L. S., ZHANG, C., YU, C. Y., HUANG, Z., XU, A. X., & DONG, J. G. (2019). How exposure to ALS-inhibiting gametocide tribenuron-methyl induces male sterility in rapeseed. *BMC plant biology*, 19, 1-22.

LU, Y. C., ZHANG, S., & YANG, H. (2015). Acceleration of the herbicide isoproturon degradation in wheat by glycosyltransferases and salicylic acid. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 806-814.

MUDROVÁ, D. (2023): Úloha UDP-glykosyltransferáz v rezistenci k herbicidům. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.

MUKHERJEE, I., DAS, T. K., KUMAR, A., SARKAR, B., & SHARMA, K. K. (2015). Behavior and bioefficacy of tribenuron-methyl in wheat (*Triticum aestivum* L.) under irrigated agro-ecosystem in India. *Environmental monitoring and assessment*, 187, 1-9.

OZTETIK, E. (2010). Effects of tribenuron-methyl treatment on glutathione S-transferase (GST) activities in some wheat and barley varieties. *Pure and Applied Chemistry*, 82(1), 289-297.

PARK, H. J., KWON, C. S., WOO, J. Y., LEE, G. J., KIM, Y. J., & PAEK, K. H. (2011). Suppression of UDP-glycosyltransferase-coding *Arabidopsis thaliana* UGT74E2 gene expression leads to increased resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection. *The Plant Pathology Journal*, 27(2), 170-182.

PEROTTI, V. E., LARRAN, A. S., PALMIERI, V. E., MARTINATTO, A. K., & PERMINGEAT, H. R. (2020). Herbicide resistant weeds: A call to integrate conventional agricultural practices, molecular biology knowledge and new technologies. *Plant Science*, 290, 110255.

RACHEDI, K., ZERMANE, F., TIR, R., AYACHE, F., DURAN, R., LAUGA, B., ... & BOULAHROUF, A. (2018). Effect of sulfonylurea tribenuron methyl herbicide on soil Actinobacteria growth and characterization of resistant strains. *brazilian journal of microbiology*, 49, 79-86.

ROSS, J., LI, Y., LIM, E. K., & BOWLES, D. J. (2001). Higher plant glycosyltransferases. *Genome biology*, 2, 1-6.

RYSOVÁ, S. (2022): Vliv vybraných herbicidů na expresi UGT a aktivitu antioxidantních enzymů huseníčku rolního. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biochemických věd.

ŘEPKOVÁ, J. (2007). Huseníček rolní a současný výzkum rostlinného genomu. *Živa*, 1, 2007.

SCHMITTGEN, T. D., & LIVAK, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.

SCHUELEIN, J., GLAESSGEN, W. E., HERTKORN, N., SCHROEDER, P., JR, H. S., & KETTRUP, A. (1996). Detection and identification of the herbicide isoproturon and its metabolites in field samples after a heavy rainfall event. *International journal of environmental analytical chemistry*, 65(1-4), 193-202.

SINGH, S. (2007). Role of management practices on control of isoproturon-resistant littleseed canarygrass (*Phalaris minor*) in India. *Weed Technology*, 21(2), 339-346.

SINGH, S., & TIWARI, S. (2020). Responses of plants to herbicides: Recent advances and future prospectives. *Plant Life Under Changing Environment*, 237-250.

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

TEIXEIRA, M. M., AGUIAR, G. R., DA SILVA, J. M., DA SILVA, K. T. M., SIEBENEICHLER, S. C., JÚNIOR, O. J. F., ... & DE OLIVEIRA, M. (2024). Photosystem II inhibitor herbicides. *OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA*, 22(7), e5856-e5856.

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

TOGNETTI, V. B., VAN AKEN, O., MORREEL, K., VANDENBROUCKE, K., VAN DE COTTE, B., DE CLERCQ, I., ... & VAN BREUSEGEM, F. (2010). Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance. *The Plant Cell*, 22(8), 2660-2679.

VAN ETTEN, M., LEE, K. M., CHANG, S. M., & BAUCOM, R. S. (2020). Parallel and nonparallel genomic responses contribute to herbicide resistance in *Ipomoea purpurea*, a common agricultural weed. *PLoS genetics*, 16(2), e1008593.

YU, C. Y., DONG, J. G., HU, S. W., & XU, A. X. (2017). Exposure to trace amounts of sulfonyleurea herbicide tribenuron-methyl causes male sterility in 17 species or subspecies of cruciferous plants. *BMC plant biology*, 17, 1-11.

YUAN, J. S., TRANEL, P. J., & STEWART, C. N. (2007). Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in plant science*, 12(1), 6-13.

ZHANG, J. J., & YANG, H. (2021). Metabolism and detoxification of pesticides in plants. *Science of the Total Environment*, 790, 148034.

ZHANG, W., JIANG, F., & OU, J. (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the international academy of ecology and environmental sciences*, 1(2), 125.

ZHARMUKHAMEDOV, S. K., & ALLAKHVERDIEV, S. I. (2021). Chemical inhibitors of photosystem II. *Russian Journal of Plant Physiology*, 68, 212-227.

9.2 Elektronické zdroje

Web 1 *Tribenuron-methyl* [online] [cit. 2021-07-12] Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tribenuron_methyl.svg#/media/File:Tribenuron_methyl.svg>

Web 2 *Isoproturon* [online] [cit. 2008-03-08] Dostupné z: <<https://en.wikipedia.org/wiki/File:Isoproturon.png>>

Web 3 *Heap, I. Mezinárodní databáze plevelů rezistentních vůči herbicidům* [online] [cit. 2024-08-29] Dostupné z: <<https://weedscience.org/Home.aspx>>

Web 4 *CAZY* [online] [cit. 2024-07-09] Dostupné z: <<http://www.cazy.org/GlycosylTransferases>>