

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Michaela Nikodymová**

Antokyany v listech rostlin: ochranná funkce a detekce spektrálními metodami

Anthocyanins in plant leaves: protective function and spectroscopic detection

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

V Praze, 6.5.2017

Podpis:

**Poděkování:**

Mé poděkování patří zejména mé školitelce prof. RNDr. Janě Albrechtové, Ph.D. za vedení práce a cenné rady. Dále pak děkuji své konzultantce Mgr. Zuzaně Lhotákové, Ph.D. za ochotu a trpělivost. Děkuji také své rodině, která mě při psaní práce podporovala. Velký dík patří zejména mé mamince a sestře, které mi pomohly s korekturou práce.

## **Abstrakt:**

Rostliny se během svého života musí vypořádat se změnou různých faktorů vnějšího prostředí, z nichž některé vyvolávají u rostlin stres. Stresory mohou v rostlinách způsobit poškození vedoucí k inhibici růstu a fotosyntézy, to může v extrémním případě nebo po dlouhodobém vystavení stresu vést ke smrti celého organismu a negativně se odrážet v zemědělských výnosech. Rostliny si musely vyvinout obranné mechanismy, mezi něž patří i akumulace antokyanů, které se při vystavení rostliny stresovému faktoru mohou hromadit v listech.

Cílem práce je shrnout poznatky o vlivu stresových faktorů na akumulaci antokyanů v listech a o funkci antokyanů v ochraně před těmito faktory. Antokyany mají nejčastěji funkci antioxidantů, které reagují s ROS a tím je inaktivují, mohou fungovat i jako filtry chránící fotosystémy před UV zářením, a jako ochrana před herbivory. V práci jsou také shrnuty poznatky o spektrálních metodách detekce antokyanů v listech s důrazem na nedestruktivní metody detekce.

Spektrální metody umožňují analyzovat antokyany na základě interakce listu a látek v něm obsažených se zářením, které na list dopadá. Nejčastěji používanou metodou je UV-VIS spektrofotometrie. Pro studium změny pigmentů v listech během ontogenetického vývoje je třeba použít nedestruktivní metody jejich detekce. Použití vhodné metody může umožnit sledovat změnu pigmentace listů v čase a lépe pochopit tyto obranné mechanismy rostlin.

**Klíčová slova:** antokyany, stresové faktory, stresové reakce u rostlin, spektrální metody, nedestruktivní metody detekce

**Abstract:**

Plants have to cope with the change in the various environmental factors, the change of these factors means stress for plants. Stress factors can cause damage that lead to inhibition of growth and photosynthesis, resulting in the extreme cases in the death of the whole organism and negatively affect farm yields. Plants have to develop defensive mechanisms, including the accumulation of anthocyanins in leaves.

The aim of the present review is to summarize the knowledge about the influence of stress factors on the accumulation of anthocyanins in leaves and about the function of anthocyanins in the protection. Anthocyanins most often act as antioxidants that react with ROS and inactivate them, they can also act as filters against UV radiation and as a protection against herbivores. Further, there are summarized the knowledge about spectral methods of detection of anthocyanins in leaves with emphasis on non-destructive detection methods.

Spectral methods allow the analysis of anthocyanins based on the interaction of the leaf and its chemical components with the incident radiation. The most commonly used method is UV-VIS spectrophotometry. In order to study pigment change in leaves during ontogenetic development, non-destructive methods of pigment detection should be used. Suitable method can allow us to observe the change in leaf pigmentation over time and to better understand these defense mechanisms of plants.

**Key words:** anthocyanins, stress factors, plant stress response, spectral methods, non-destructive detection

### **Seznam použitých zkratek:**

ARI = index reflektance antokyanů (anthocyanin reflectance index)

AOT40 = akumulovaná expozice ozonu nad prahovou hodnotou 40 ppb (accumulated ozone exposure over a threshold of 40 ppb)

[CO<sub>2</sub>] = koncentrace oxidu uhličitého

DNA = deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)

NIR = blízké infračervené záření (near-infrared)

[O<sub>3</sub>] = koncentrace ozonu

PAL = fenylalanin-amoniak-lyáza (phenylalanine-ammonia-lyase)

ppm = miliontina, jednotka koncentrace (parts per million; 10<sup>-6</sup>)

ppb = miliardtina, jednotka koncentrace (parts per billion; 10<sup>-9</sup>)

ROS = reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

UV = ultrafialové záření (ultra-violet)

VIS = viditelné světlo (visible)

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Syntéza antokyanů .....	3
3. Stresové faktory .....	5
4. Ochranná funkce antokyanů v listech při působení stresových faktorů.....	7
4.1. UV záření.....	7
4.2. Ozon.....	9
4.3. Sucho .....	12
4.4. CO <sub>2</sub> .....	14
4.5. Teplota .....	16
4.6. Patogeny .....	18
4.7. Herbivoři.....	19
5. Detekce antokyanů spektrálními metodami.....	23
5.1. Spektrální křivka odrazivosti.....	24
5.2. UV-VIS spektrofotometrie .....	25
5.3. Nedestruktivní metody detekce antokyanů.....	27
5.3.1. Index reflektance antokyanů (ARI).....	27
5.3.2. Výhody použití nedestruktivních spektrálních metod.....	28
Závěr.....	29
Seznam zdrojů a použité literatury .....	31

# 1. Úvod

Na rostliny během života působí velká řada vnějších faktorů. Některé z těchto faktorů, pokud vybočí z optimálních podmínek, představují pro rostliny stres, se kterým je třeba se vypořádat. Faktory prostředí, které jsou pro rostlinu stresové, nazýváme též stresory. Stresory způsobují různá poškození rostlin, což může vést až ke snížení produkce biomasy nebo úplnému odumření rostliny, to se později projevuje v zemědělských ztrátách. Vzhledem k tomu, že rostliny mají přisedlý způsob života, nemohou se před stresem schovat nebo utéct. Je třeba, aby se rostliny na změnu optimálních podmínek způsobenou stresem adaptovaly nebo aklimovaly, a tedy vytvořily obranné mechanismy. Obranné strategie mohou být mechanické nebo chemické, přičemž jedním z chemických mechanismů je tvorba sekundárních metabolitů.

Sekundární metabolity jsou látky, které nejsou nezbytně nutné pro život rostliny a rostlina je vytváří obvykle jako součást svých obranných mechanismů nebo součást rozmnožovací strategie, navíc jsou druhově specifické. Sekundární metabolity lze najít jen v určitých buňkách určitých částí rostlin, často pouze v určité části roku nebo za určitých vnějších podmínek, někdy jen u určitého vývojového stadia. Jsou to látky, které slouží rostlinám k usnadnění přežití v určitých podmínkách jejich životního prostředí. Mezi sekundární metabolity patří tři základní skupiny látek: izoprenoidy, alkaloidy a fenolické látky, mezi které patří flavonoidy, jejichž součástí jsou i antokyany.

Antokyany jsou ve vodě rozpustné pigmenty, které se vyskytují uvnitř vakuol některých rostlinných buněk. Antokyany se vyskytují ve formě glykosidů, obsahují tedy cukr a necukernou složku (aglykon). Antokyany bez cukerné složky, tedy pouze aglykony, se nazývají antokyanidiny. Nejběžnějším antokyanovým pigmentem, který je ve většině pletiv dominantní, je cyanidin (Gitelson et al., 2001) (Tabulka 1). Antokyany běžně zbarvují květy či plody rostlin do červena, fialova a modra. V květech je účelem antokyanů lákat opylovače, v plodech zase živočichy roznášející semena. Často lze ale také vidět rostliny s červeně až fialově zbarvenými listy, které jsou běžně zelené. Takto zbarvené listy lze vidět především na podzim před opadem listů, ale také na jaře nebo i během celé sezóny. Zbarvení listů se objevuje u rostlin, které jsou vystaveny působení některých stresorů, buď celoročně nebo v určité části roku.

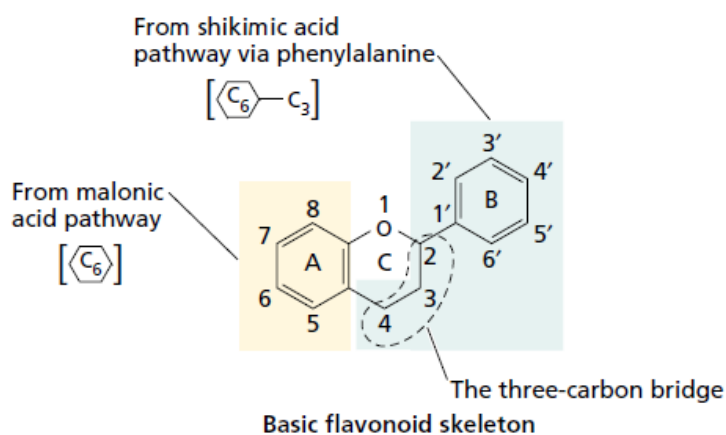
<b>ANTOKYANIDIN</b>	<b>BARVA</b>
<b>pelargonidin</b>	oranžovo-červená
<b>cyanidin</b>	fialovo-červená
<b>delfinidin</b>	modro-fialová
<b>peonidin</b>	červená
<b>petunidin</b>	fialová

*Tabulka 1: Nejběžnější antokyanidiny v rostlinách a barvy, které způsobují. Různá barva je dána rozdíly v substituentech na aromatickém kruhu B (viz obrázek 1). Upraveno podle: (Taiz a Zeiger, 2002).*

Úvodní část práce je věnována vysvětlení konceptu rostlinného stresu a stresových faktorů, jejich vlivu na rostliny a změnám, které se v rostlinách jejich vlivem odehrávají. V hlavní části práce jsou probrány stresové faktory, které způsobují hromadění antokyanů v listech. Je zde popsáno, jak stresové faktory na rostlinu působí a zda opravdu indukují syntézu antokyanů. Poslední část práce popisuje spektrální metody, kterými lze detekovat antokyaniny v pletivech rostlin, důraz je kladem na nedestruktivní metody detekce.

## 2. Syntéza antokyanů

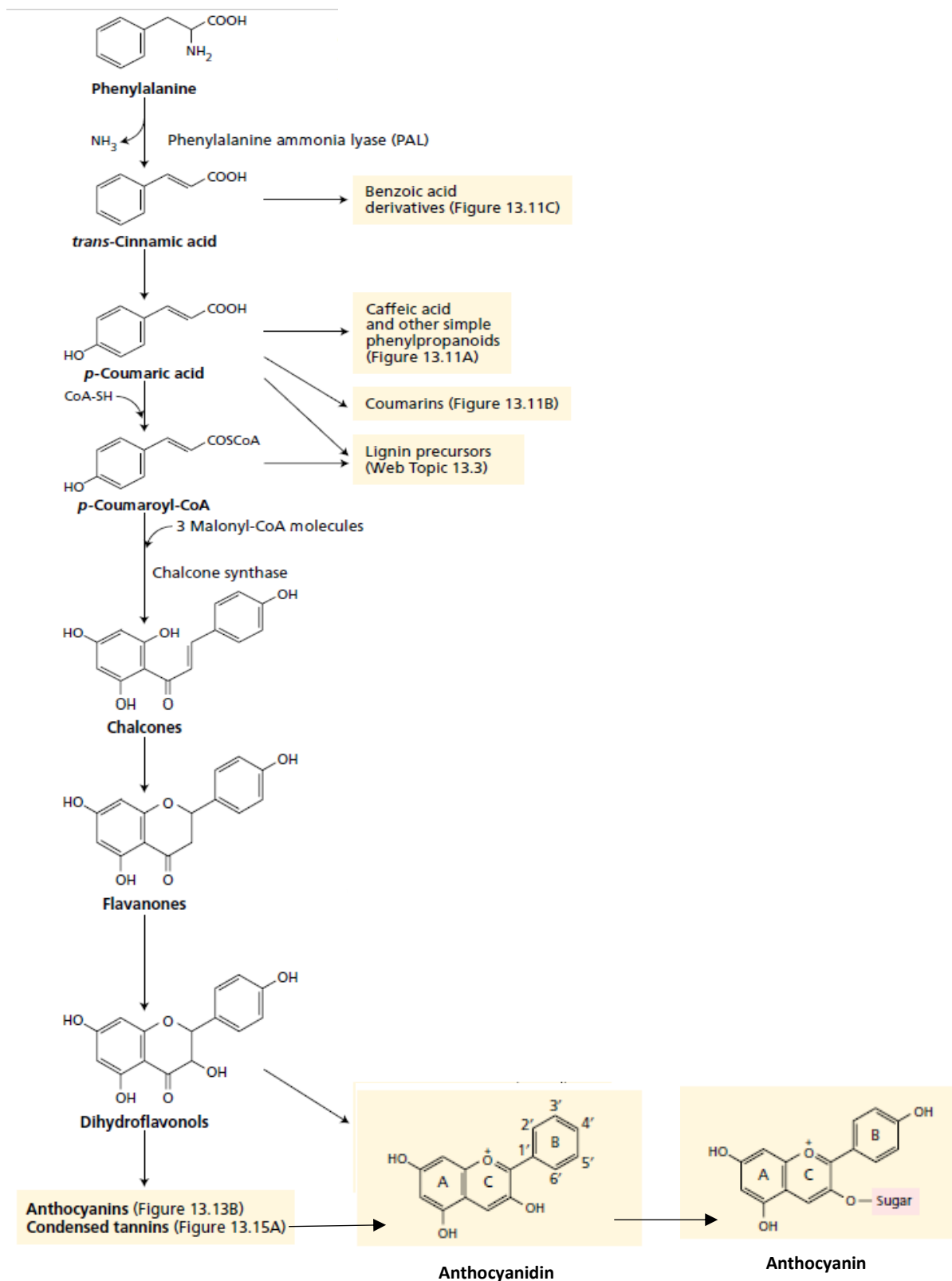
Jednou z největších skupin fenolických látek jsou flavonoidy, které mají 15 uhlíků uspořádaných do 2 aromatických jader spojených 3-uhlíkatým řetězcem (Obrázek 1). Základní struktura flavonoidů může obsahovat různé substituenty, například hydroxylovou skupinu nebo cukr. Flavonoidy zahrnují flavony, flavonoly, izoflavonoly a antokyany. Antokyany se vyskytují ve formě glykosidů, substituentem je zde cukr, nejčastěji na třetím uhlíku. Antokyany bez cukerné skupiny se nazývají antokyanidiny. Cukr a hydroxylová skupina zvyšují rozpustnost ve vodě, proto jsou antokyany ve vodě rozpustné.



Obrázek 1: Základní struktura flavonoidu – 2 šestiuhlíkatá aromatická jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem. Každé jádro vzniká v jiné biosyntetické dráze: aromatické jádro A – malonátová syntetická dráha; aromatické jádro B a tříuhlíkatý můstek – šikimátová dráha.

Převzato z: (Taiz a Zeiger, 2002).

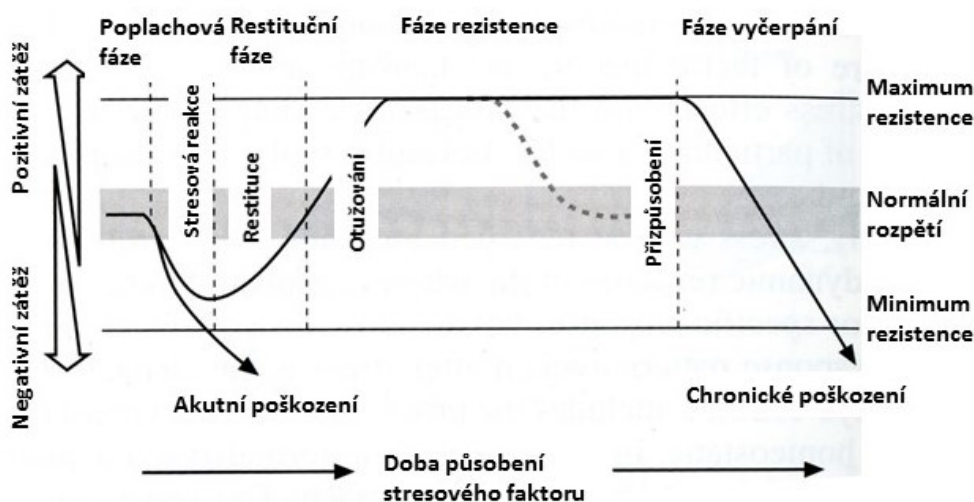
Pro syntézu všech flavonoidů jsou důležité dvě biosyntetické dráhy: šikimátová a malonátová. Šikimátovou dráhou vzniká v chloroplastu tyrosin, tryptofan a fenylalanin (Chalker-Scott, 2002), které jsou následně transportovány do cytosolu, kde fenylalanin startuje fenylpropanovou dráhu. Z fenylalaninu je za pomoci PAL (fenylalanin-amoniak-lyáza) odstraněna molekula amoniaku a vzniká kyselina skořicová. Během dalších reakcí se ke kyselině skořicové přidávají hydroxylové skupiny a jiné substituenty za vzniku fenylpropanoidů, kumarinu a ligninu. V dalším kroku syntézy flavonoidů dochází k připojení molekuly 3-malonyl-CoA, která vznikla během malonátové dráhy. Pomocí chalkon syntázy vznikají chalkony, které následně dají vznik flavonům, flavonolům, izoflavonolům a antokyanům (Obrázek 2).



Obrázek 2: Schéma fenylypropanové dráhy syntézy antokyanů. Na začátku stojí fenylylalanin, konečným produktem po glykosylaci antokyanidinů jsou antokyaniny. Převzato z: (Taiz a Zeiger, 2002).

### 3. Stresové faktory

Stres je stav rostliny vyvolaný stresovým faktorem neboli stresorem (Obrázek 3). Stresor v rostlinách vyvolává stresovou reakci, která vede k aktivaci obranných mechanismů. Vyvolání stresové odezvy závisí na intenzitě a délce působení stresoru. Když míra intenzity působení stresoru překročí určitou hranici, dojde k první poplachové fázi stresové odezvy. Během poplachové fáze dochází k narušení buněčných struktur a funkcí, což může vést až k akutnímu poškození buněčných struktur. V lepším případě poplachovou fází vystřídá fáze restituční, během které dojde k aktivaci obranných mechanismů. Následně se rostlina stresoru přizpůsobuje a zvyšuje svou odolnost proti tomuto stresoru, nastává fáze rezistence. V případě, že stresor působí dlouhodobě a intenzivně, obranné mechanismy nemusejí stačit a může dojít až k chronickému poškození rostliny. U každé rostliny je průběh odezvy na stres jiný, druhově specifický, závisí na typu stresoru a velikosti a délce zátěže, kterou stresor způsobuje, také na kombinaci více stresorů, ale i na genotypu rostliny, jejím stavu a vývojovém stádiu.



Obrázek 3: Schéma průběhu stresové reakce. Upraveno dle: (Larcher, 2003).

Rostliny se mohou na stres adaptovat nebo aklimovat. Adaptace je přizpůsobení, které vzniká v průběhu evoluce. Během adaptace dochází k modifikaci, ztrátě či získání genů v důsledku vystavení extrémním podmínkám, a tato modifikace se přenáší do dalších generací. Naproti tomu aklimace probíhá během ontogeneze rostliny a dochází při ní pouze ke změnám na úrovni fenotypu. Díky změnám, ať už na úrovni genotypu nebo fenotypu, mohou rostliny zvýšit svou toleranci vůči stresu nebo se mu vyhnout (avoidance) uzpůsobením životního cyklu.

Stresové faktory mohou být přírodní nebo antropogenní. Přírodní stresory lze dále rozdělit na biotické a abiotické. Mezi abiotické faktory patří například nadměrná či

nedostatečná ozáření, nedostatek nebo nadbytek vody, vysoká či nízká teplota, stav minerálních látek, těžké kovy, toxické látky atd. K biotickým faktorům patří ty, které jsou vyvolány živými organismy, jsou to virové, bakteriální nebo houbové patogeny, herbivoři, především býložravý hmyz, ale také konkurující rostliny. Antropogenní stresory jsou vyvolané činností člověka. Mezi antropogenní stresory patří látky, které se dostávají do prostředí díky činnostem člověka, jsou to například látky znečišťující ovzduší, vodu a půdu, agrochemikálie jako jsou pesticidy, herbicidy či fungicidy. Některé faktory prostředí samy o sobě nejsou pro rostlinu škodlivé, jsou-li v optimální koncentraci, například esenciální kovy. Železo, měď, zinek nebo nikl jsou kovy, které se v rostlinách běžně vyskytují ve stopovém množství. Pokud se ale koncentrace těchto kovů zvýší nad optimální úroveň, může to pro rostlinu znamenat stres.

Různé primární stresové faktory, jako sucho, salinita, teplota, ozáření či chemické znečištění, mohou svým působením vyvolat sekundární stres, a sice osmotický nebo oxidativní stres. Při osmotickém stresu dochází ke ztrátě vody a zvýšení osmotického potenciálu v buňkách. Rostliny při osmotickém stresu uzavírají průduchy, aby nedocházelo k odpařování vody, a pomocí osmoticky aktivních látek zvyšují příjem vody. Oxidativní stres je způsoben nadměrnou tvorbou reaktivních forem kyslíku („reactive oxygen species“, dále jen ROS). ROS vznikají v rostlinách i přirozeně. Mezi ROS patří volné radikály (např. superoxid  $O_2^-$ , hydroxylový radikál, singletový kyslík) a sloučeniny kyslíku, ze kterých mohou volné radikály vznikat (např.  $O_3$  nebo peroxid vodíku). ROS se vytvářejí například v chloroplastech nebo mitochondriích a pro mnohé děje v buňce jsou nezbytné. ROS musejí být striktně kontrolovány, pokud jich je nadbytek jsou pro živé buňky toxické, neboť narušují struktury řady chemických sloučenin. Toxicita ROS může vést až ke smrti buněk. V důsledku silného záření vzniká nadbytek excitační energie, chlorofyl může přejít do tripletového stavu, přenést energii na kyslík a tím se tvoří ROS. Některé druhy rostlin disipují nadbytečnou světelnou energii ve formě tepla pomocí karotenoidů, zejména karotenoidů xantofylového cyklu. V případě, že skutečně dojde k nadbytku ROS, rostlina zapojí obranné mechanismy, chemické či na strukturální úrovni. Mezi chemické obranné mechanismy patří neenzymatické a enzymatické antioxidační mechanismy, tzv. zhášče volných radikálů, které reagují s ROS a tím je inaktivují. Příkladem enzymatického antioxidantu je superoxid dismutáza, která mění superoxid  $O_2^-$  na peroxid vodíku, který je méně toxický. Neenzymatické zhášče volných radikálů jsou cukerné alkoholy a také antokyany. Obranné mechanismy na strukturální úrovni jsou například trichomy či vosky, které sluneční záření odrážejí.

Obranné strategie mohou být tedy mechanické nebo chemické. Mezi chemické mechanismy patří syntéza různých látek, například sekundárních metabolitů. K sekundárním metabolitům se řadí také antokyany, které patří k neenzymatickým zhášečům volných radikálů a zbarvují listy do červena až fialova během působení stresoru. Mezi abiotické faktory vyvolávající zvýšenou syntézu a hromadění antokyanů patří UV záření, O<sub>3</sub>, nízká teplota a faktory spojené s klimatickou změnou, a sice sucho a zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> (dále jen [CO<sub>2</sub>]), z biotických faktorů je to působení patogenů a herbivorů. V další části práce budou probrány jednotlivé stresory a jejich působení na syntézu a hromadění antokyanů v rostlinách.

## 4. Ochranná funkce antokyanů v listech při působení stresových faktorů

### 4.1. UV záření

Ultrafialové záření je pro lidské oko neviditelné záření s vlnovou délkou od 10 do 400 nm, které se dělí do několika skupin podle rozsahu vlnové délky: UV-A, UV-B a UV-C (Tabulka 2). Pro rostliny je škodlivé především UV-B záření, které má vlnovou délku od 280 do 310 nm. Největší energii má sice UV-C záření, toho ale prochází skrz atmosféru jen málo, proto je mnohem škodlivější UV-B záření. U rostlin může UV-B záření poškodit oba fotosystémy a tím snížit účinnost fotosyntézy, navíc chloroplasty mohou produkovat ROS, které mohou být toxické. Dále je UV-B záření zodpovědné za narušení růstu rostlin nebo snížení biomasy, ale také poškozuje DNA.

Typ záření	Vlnová délka (nm)
UV-A	310-400
UV-B	280-310
UV-C	pod 280

Tabulka 2: Základní skupiny UV záření a jejich vlnové délky.

Rostliny si vyvinuly různé mechanismy, kterými se mnohou chránit před škodlivými účinky slunečního záření. Jedním z mechanismů obrany je syntéza flavonoidů, včetně antokyanů. Antokyany v listech fungují v podstatě jako filtry, které chrání fotosystémy v listech tím, že absorbují záření v UV oblasti elektromagnetického spektra. Rostliny se syntézou těchto pigmentů mohou přizpůsobit změně intenzity slunečního záření (Burger a Edwards, 1996). Již v 90. letech minulého století byly provedeny mnohé experimenty, které ukázaly, že rostliny uměle vystavené UV-B záření syntetizovaly antokyany jako odpověď na nadměrné záření

(Burger a Edwards, 1996; Gould a Quinn, 1999; Ormrod et al., 1995; Reuber et al., 1996; Stapleton a Walbot, 1994). Zvýšená syntéza antokyanů byla pozorována především ve svrchních buněčných strukturách listu – v buňkách epidermis, kde byly antokyaniny ukládány ve voskové vrstvě adaxiální strany listu, a v trichomech listu (Harborne a Williams, 2000).

Podle Harborne a Williams (2000) jsou nejsilnějšími důkazy o funkci flavonoidů, zejména antokyanů, v ochraně před UV zářením pokusy s mutanty různých druhů rostlin. Prováděly se experimenty s mutanty *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh s deficicientem chalkon syntázy (Ormrod et al., 1995) nebo s mutanty ječmene obsahující pouze 7 % flavonoidů oproti běžnému ječmenu (Reuber et al., 1996). Obilovinami se zabývali i Stapleton a Walbot (1994), konkrétně se jednalo o kukuřici setou.

Stapleton a Walbot (1994) studovali poškození DNA vlivem UV záření na mutantech kukuřice, u kterých měřili míru poškození různými testy. Autoři měli dvě linie kukuřice seté. U první linie kukuřice byly funkční biosyntetické dráhy všech typů flavonoidů. Druhá linie kukuřice měla defekt v syntéze flavonoidů, tedy i antokyanů. První linie tudíž byla zbarvená do fialova díky přítomnosti antokyanů, zatímco druhá linie byla zelená. Autoři změřili počet fotoproduktů DNA, které vznikají jako reakce na vysoké UV záření a indikují tak poškození DNA, a porovnali toto množství mezi zelenou a fialovou linií. V zeleném pletivu došlo vlivem ozáření k většímu poškození DNA než v pletivu fialovém. Konkrétně v pletivu zelené linie zůstalo jen 10 % DNA nepoškozené, u fialové linie to bylo 54 % nepoškozené DNA, ovšem až po delší době ozařování. Z výsledku jejich experimentu tedy vyplynulo, že pletiva s obsahem antokyanů byla vůči UV záření odolnější než pletiva bez antokyanů. U fialových pletiv navíc byla potřeba delší doba ozařování, aby vůbec došlo k poškození DNA.

Další důkaz funkce antokyanů v ochraně před UV zářením poskytla studie Burger a Edwards (1996). Červené a zelené odrůdy rostliny *Coleus* (Lour.) byly vystaveny nejprve UV-C a poté UV-B záření. V obou případech došlo ke snížení výtěžku fotosyntézy u zelené odrůdy, která neobsahovala antokyaniny. Červená odrůda byla díky obsahu antokyanů chráněna před poškozením od záření s nižší vlnovou délkou.

Aby mohly antokyaniny fungovat jako UV filtry, musí se vyskytovat ve svrchní části pletiv, tedy v pozici vhodné pro absorpci UV záření. Touto hypotézou se zabývali Gould a Quinn (1999). Během jejich experimentu bylo pozorováno 25 druhů rostlin z Nového Zélandu. Pouze u 4 druhů z těchto rostlin se antokyaniny vyskytovaly ve svrchní části epidermis, u dalších druhů byly antokyaniny v hlubších vrstvách palisádového a houbového parenchymu. Tato studie

tedy ukázala na fakt, že ochrana před UV zářením nemůže být jedinou funkcí antokyanů v listech, protože jen malé procento zkoumaných rostlin mělo pigmenty ve vhodné pozici pro tuto funkci. Zároveň byla tato studie jedna z mála, která se zabývala konkrétními typy antokyanů. Autoři identifikovali jednotlivé typy antokyanů, rozlišili cyanidin (Cy), peonidin (Pn), petunidin (Pt), malvidin (Mv), delphinidin (Dp) a pelargonidin (Pg). V listech zkoumaných rostlin se nejčastěji vyskytoval Cy, jeden z nejběžnějších antokyanů vůbec. Naopak Pg a Mv nebyly v listech pozorovány vůbec.

Z výsledků vyplývá, že antokyaniny jednoznačně hrají důležitou roli v ochraně rostlin před intenzivním UV zářením. Vzhledem k výsledkům poslední zmíněné práce (Gould a Quinn, 1999) je ale jasné, že antokyaniny mají i jiné funkce v listech. Vyskytují se totiž i v hlubších vrstvách, kde by jako filtry před UV zářením nebyly využitelné. (Gould a Quinn, 1999)

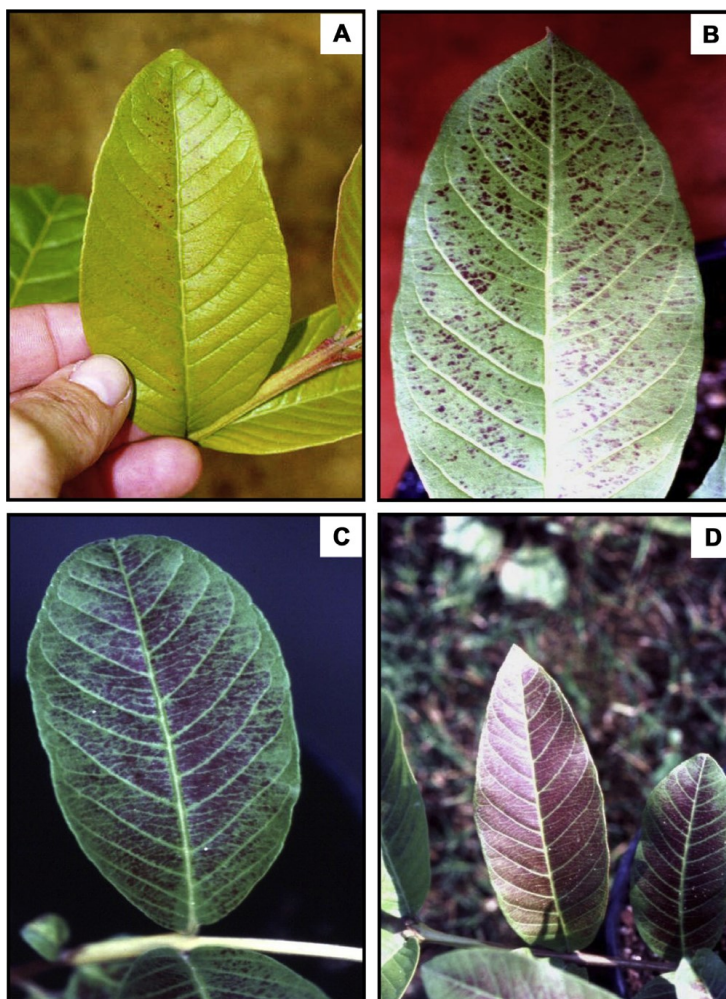
## 4.2. Ozon

Ozon je důležitou složkou stratosféry, kde funguje jako ochrana před UV zářením. Pokud se ale hromadí v troposféře, je pro živé organismy nebezpečný. V troposféře představuje  $O_3$  jednu z hlavních znečišťujících látek. Koncentrace ozonu ( $[O_3]$ ) se vyjadřuje pomocí indexu AOT40, který vyjadřuje sumu diferencí mezi hodinovými koncentracemi v ppb a prahovou hodnotou 40 ppb (AMET [online]).  $[O_3]$  se postupně zvyšuje především v horkých letních dnech, což může způsobit vážná poškození všech živých organismů. V případě rostlin je hlavním poškozením snížená účinnost fotosyntézy a inhibice růstu, to vede ke značným zemědělským ztrátám.

Když je  $[O_3]$  v troposféře zvýšená, pro rostliny to znamená stres. Při vystavení stresovým podmínkám mohou být obranné mechanismy rostlin narušené a nejsou pak schopné inaktivovat ROS. Navíc z  $O_3$  mohou vznikat volné radikály a obsah ROS se tedy ještě víc zvyšuje. Proto je třeba, aby rostlina měla vyvinuté různé způsoby inaktivace ROS, tzv. antioxidační systémy. Mezi tyto systémy neenzymatického charakteru patří i flavonoidy včetně antokyanů, které mají schopnost zhášet volné radikály, což potvrzuje i práce Francini et al. (2008), která zkoumala vliv  $O_3$  na citlivější a odolnější formu chrpy luční.

Rezende a Furlan (2009) studovali vliv  $O_3$  na listy rostliny *Psidium guajava* (Burm.f.) Krug & Urb, tropického stromu, který je v tropech využíván jako bioindikátor působení  $O_3$ . Autoři listy vystavovali působení  $O_3$  po dobu 30 dnů a zjišťovali, zda existuje korelace mezi poškozením listu a množstvím antokyanů v listech. Po 30 dnech působení  $O_3$  pozorovali změny na listech ve formě červeného zbarvení na adaxiální straně listů (Obrázek 4). 64 % především

starších listů vystavených působení  $O_3$  vykazovalo poškození, listy měly sníženou fotoinhibici. Vzhledem ke zvýšenému množství antokyanů v poraněných listech mohli autoři vyvodit závěr, že syntéza antokyanů souvisí se sníženou fotoinhibicí, která je způsobena zvýšenou  $[O_3]$ , a tedy že antokyaniny mohou být syntetizovány v důsledku zvýšeného působení  $O_3$ .

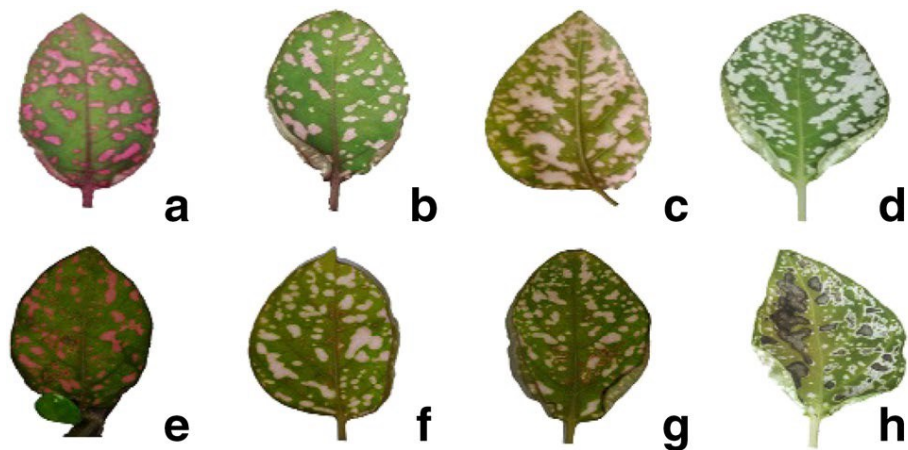


Obrázek 4: Viditelné poškození ozonem na listech *Psidium guajava* po 30 dnech vystavení  $O_3$ . Fialové zbarvení odpovídá akumulaci antokyanů v listech. Procento poškození listu: A – 5 %, B – 25 %, C – 50 %, D – 75 %. Převzato z: (de Rezende and Furlan, 2009).

Podobný výzkum provedli i da Rosa Santos a Furlan (2013) na brazilském stromu *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn, jehož listy vystavili vzduchu filtrovanému uhlíkem, nefiltrovanému vzduchu a nefiltrovanému vzduchu s příměsí  $O_3$ . Autoři pozorovali zejména celkový obsah fenolických látek, ale i obsah flavonoidů a dalších dílčích složek. Po 25 dnech se u listů vystavených nefiltrovanému vzduchu s příměsí  $O_3$  objevilo červené zbarvení okolo žilnatiny. Po 60 dnech došlo ke stejné změně i u listů vystavených vzduchu bez příměsí  $O_3$

navíc. Pomocí spektrofotometru autoři kvantifikovali fenolické sloučeniny a zbarvení přisoudili na základě výsledků této analýzy flavonoidům včetně antokyanů.

V loňském roce se tato problematika řešila ve studii Sui et al. (2017), kde byl hlavním zájmem vliv ozonu na 4 kultivary rostliny *Hypoestes phyllostachya* Baker. Tato rostlina je charakteristická tečkovaným vzorem na listech, každý kultivar měl jinou barvu tohoto vzoru. Po 14 dnech fumigace O<sub>3</sub> bylo vyhodnoceno několik parametrů včetně obsahu antokyanů. Nejvyšší míra poškození byla u kultivaru „White“, naopak nejnižší byla u kultivaru „Rose“ (Obrázek 5). To naznačuje, že „White“ byl nejcitlivějším kultivarem a „Rose“ tím nejodolnějším. Nejvíce antokyanů bylo po fumigaci u „Rose“, dále u „Pink“, „Blush“ a nakonec u „White“. Největší obsah antokyanů byl tedy u nejodolnějšího kultivaru, což ukazuje na možnou roli antokyanů v ochraně před škodlivými účinky O<sub>3</sub>.



Obrázek 5: Viditelné poškození listů *H. phyllostachya* po vystavení uhlíkem filtrovanému vzduchu nebo po vystavení O<sub>3</sub>. a-d: „Rose“ (a), „Pink“ (b), „Blush“ (c) a „White“ v uhlíkem filtrovaném vzduchu. e-h: „Rose“ (e), „Pink“ (f), „Blush“ (g) a „White“ (h) po vystavení O<sub>3</sub>. Převzato z: (Sui et al., 2017).

Výsledky těchto studií ukazují, že k syntéze antokyanů dochází při stresu z vystavení rostliny zvýšené [O<sub>3</sub>]. Antokyaniny ale nefungují jako bezprostřední ochrana před účinky O<sub>3</sub>, protože jsou syntetizovány až v době, kdy O<sub>3</sub> způsobí hromadění ROS. Syntetizované antokyaniny pak volné radikály vychtávají a tím zamezují poškození, které by jinak ROS mohly způsobit. V případě působení O<sub>3</sub> se tedy nedá říct, že antokyaniny před O<sub>3</sub> rostliny chrání. Nicméně jsou účinnými látkami, které zabraňují následkům nadměrné [O<sub>3</sub>].

### 4.3. Sucho

Nedostatek vody v rostlinách negativně ovlivňuje mnohé fyziologické funkce rostlin a tím pádem snižuje jejich produktivitu. Jednou z nejdůležitějších rostlinných funkcí je fotosyntéza. V důsledku sucha se k chloroplastům nedostává dostatečné množství CO<sub>2</sub> pro Calvinův cyklus, protože průduchy se uzavírají a jejich vodivost je narušena. V suchém prostředí, jako jsou například semiaridní a aridní oblasti či pouště, na rostliny často působí i intenzivní sluneční záření. Kromě narušení Calvinova cyklu tedy dochází ještě k nadbytku elektronů, které fotosystémy nejsou schopny zpracovat. Chloroplasty reagují tvorbou ROS a může dojít k poškození reakčních center fotosytémů. Kombinovaný stres ze sucha a slunečního záření tedy inhibuje fotosyntézu.

V suchém prostředí je dále potřeba zabránit úniku vody z rostliny, k tomu slouží u různých druhů rostlin různá adaptační přizpůsobení morfologických struktur, například trichomy či vosky, ale roli hraje především vodní potenciál. Vodní potenciál je veličina, která představuje stav vody v rostlině. Jednou ze složek vodního potenciálu je osmotický potenciál, který je určen koncentrací rozpuštěných látek. Čím více je v roztoku rozpuštěných látek (solutů), tím je nižší koncentrace vody, a tedy i nižší vodní potenciál, a naopak. Voda protéká z prostředí s vyšším vodním potenciálem (a tedy nižším osmotickým potenciálem) do prostředí s nižším vodním potenciálem (a tedy vyšším osmotickým potenciálem). Pokud má rostlina nižší vodní potenciál, proudí do ní voda z okolí, vakuola zvětšuje objem a vznikne tlak (turgor), který zajišťuje pevnost rostliny, rostlina tedy vodu neztrácí. V suchém prostředí je pro rostlinu výhodné mít více rozpuštěných látek, které sníží vodní potenciál, a tím zabrání úniku vody. Nejčastějšími soluty jsou ionty solí, cukry nebo kompatibilní soluty, což jsou nízkomolekulární látky, které dále nezasahují do metabolismu (prolin, glycin betanin, atd.).

Stres z nedostatku vody způsobuje zejména inhibici prodlužovacího růstu rostlin, který je založen na udržení turgoru, následovat může i inhibice fotosyntézy. Jedním z mechanismů obrany před narušením fotosyntézy je syntéza antokyanů, proto mnohé rostliny žijící v suchém prostředí mají listy zbarvené těmito pigmenty. Jelikož je suché prostředí často spojené i s intenzivním zářením, je možné, že k akumulaci antokyanů dochází v reakci na nadměrné záření (Eppel et al., 2013). Existuje ale i hypotéza, že antokyaniny se přímo účastní ochrany listů před nedostatkem vody tím, že fungují jako soluty snižující vodní potenciál (Chalker-Scott, 2002).

Touto hypotézou se zabývají nedávné studie autorů Hughes et al. (2010, 2013). Starší studie zkoumala 6 druhů stálezelených rostlin, které během zimy mění díky antokyanům barvu listů, a 5 druhů, které to nevykazují. Vodní potenciál autoři měřili v zimě a v létě, tedy ještě před zbarvením listů. Chtěli ověřit hypotézu, že druhy syntetizující v zimě antokyaniny zároveň procházejí výrazným snížením vodního potenciálu. Nejprve autoři měřili vodní potenciál přímo v terénu, pak se soustředili na děje v buňce, které ukazují na aklimaci na dlouhodobý stres z nedostatku vody. V zimě červenající druhy vykazovaly obecně nižší vodní potenciál v zimě než druhy nečervenající. Některé červenolisté druhy se ale poklesem vodního potenciálu zásadně nelišily od určitých nečervenajících druhů. Naopak u některých druhů, které by červenat neměly, došlo k patrné změně barvy. Informace o vodních potenciálech autoři studie propojili s dalšími daty (křivky tlaku a objemu, výměna plynů) a hledali charakteristické vlastnosti ukazující na aklimaci. Ve výsledku pouze 3 ze 6 červenolistých druhů vykazovaly tyto vlastnosti, to naznačuje, že hypotéza antokyanů jako solutů snižujících vodní potenciál je nepravděpodobná. Pro rostlinu je mnohem méně energeticky nákladné využít jako soluty ionty solí nebo cukry, které nejsou o nic méně účinné než antokyaniny, ale jejich syntéza je mnohem méně náročná. To je patrné z pozdější studie Hughes et al. (2013), kde navíc došlo ke zvýšení obsahu několika cukrů, které též fungují jako osmoprotektanty.

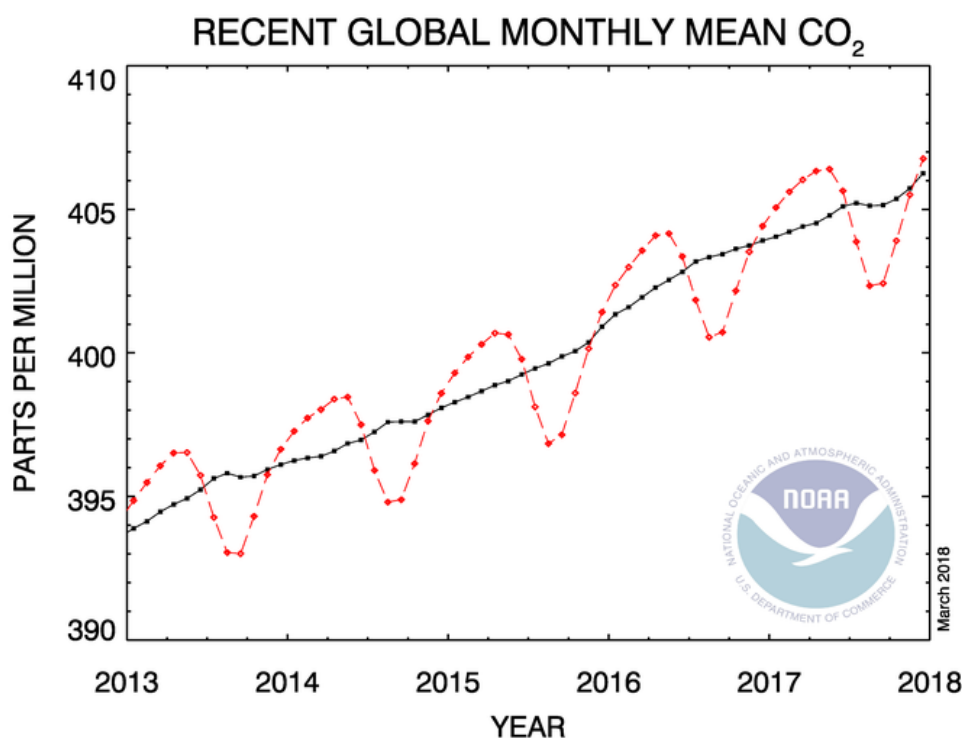
Akumulace antokyanů v suchých oblastech nejspíš opravdu souvisí pouze s intenzivním zářením, což potvrzuje studie Eppel et al. (2013), kde je porovnáván ekotyp ječmene z pouště a z mediteránu s ječmenem pěstovaným v dobře zavlažovaném prostředí. První 2 ekotypy byly vystaveny nejen suchu, ale také nadměrnému záření. Nejvíce se zbarvily listy pouštního ječmene, u mediteránního ekotypu došlo jen k nepatrné změně. Se zvýšením obsahu antokyanů u pouštního ekotypu došlo i ke zvýšení absorpce záření v oblasti 500–600 nm, tedy v oblasti absorpce záření antokyanů. Podobných výsledků dosáhli i Ramirez-Valiente et al. (2015), kteří provedli experiment na 4 druzích dubu, které vystavili kontrastním teplotám a různě zavlažovanému prostředí. Duby z mírného podnebí, které mají vyšší toleranci k mrazu a nižší toleranci k suchu, aktivovaly syntézu xantofylů, díky nimž zvýšily svou toleranci vůči suchu. Naopak duby z teplejšího podnebí, zvyklé na teplé zimy, měly toleranci k mrazu nízkou, proto syntetizovaly antokyaniny, aby toleranci k mrazu zvýšily.

Tyto studie ukazují, že syntéza antokyanů přímo nesouvisí se stresem ze sucha. Výsledky naznačují, že k syntéze antokyanů docházelo spíše vlivem nadměrného záření, které působí na rostliny spolu se suchem, zejména v pouštních oblastech. V případě poslední zmíněné studie (Ramirez-Valiente et al., 2015) bylo dokonce prokázáno, že v reakci na suchu byly

syntetizovány xantofyly, antokyany tedy byly ovlivněny pouze zářením. Zimní červenaní lze také vysvětlit intenzivním zářením, případně lze uvažovat o jiné funkci antokyanů, například výstražné zbarvení jako ochrana před zimními býložravci.

#### 4.4. CO<sub>2</sub>

Oxid uhličitý je důležitou součástí atmosféry. Jako jeden ze skleníkových plynů CO<sub>2</sub> zajišťuje skrze skleníkový efekt dostatečně teplé podmínky pro vývoj organismů. Pro rostliny je CO<sub>2</sub> dále důležitý v procesu fotosyntézy, kdy je substrátem pro fotosyntézu a tvorbu biomasy. Z odumřelých těl rostlin vznikaly v minulosti velké zásoby fosilních paliv. Vzhledem k rozsáhlému využívání fosilních paliv se dnes díky jejich spalování do ovzduší vrací CO<sub>2</sub>, který byl v těchto nerostných surovinách uložen. Od počátku průmyslové revoluce s rozvojem výroby energie skrze spalování koncentrace CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>]) stále stoupá. Během roku sice dochází ke kolísání [CO<sub>2</sub>], ale celoroční trend je vzestupný. Ještě v roce 2014 byla [CO<sub>2</sub>] okolo 396 ppm, dnes dosahuje přibližně 407 ppm (Obrázek 6) (ESRL [online]).



Obrázek 6: Graf zobrazuje průměrnou globální měsíční [CO<sub>2</sub>] v ppm v atmosféře měřenou nad mořskou hladinou v oblasti Mauna Loa, Hawaii. Měření probíhalo v letech 2013–2018 (březen). Červená křivka reprezentuje měsíční průměrné hodnoty. Černá křivka ukazuje průměrný celoroční trend. Z grafu je patrné, že [CO<sub>2</sub>] klesá a stoupá v závislosti na ročním období. Převzato z: (ESRL [online]).

Pro rostliny je dostatek CO<sub>2</sub> nezbytný, protože s nárůstem [CO<sub>2</sub>] se rychlost fotosyntézy může zvyšovat a tím pádem se může zvyšovat i produkce biomasy, pokud rostlina nebude vystavena jiným limitujícím faktorům. Navíc rostlina může při dostatku CO<sub>2</sub> omezit vodivost průduchů jejich uzavřením, díky tomu se snižuje transpirace, rostlina zlepšuje hospodaření s vodou a je tak odolnější vůči suchu. Zvyšující se [CO<sub>2</sub>] se ale významně podílí na stále rostoucím skleníkovém efektu, jehož důsledkem je stále teplejší klima. Se změnou klimatu se mění i další podmínky prostředí, kterým se rostliny musí přizpůsobit, tím pro ně vznikají vícenásobné stresové situace jako například větší sucho v důsledku vyšší teploty.

Zvyšující se [CO<sub>2</sub>] a jiných skleníkových plynů způsobuje změnu životních podmínek pro všechny živé organismy. Rostliny vystavené nepříznivým podmínkám vykazují vyšší obsah antokyanů v listech. Nabízí se tedy otázka, zda k syntéze antokyanů v listech dochází právě vlivem zvyšující se [CO<sub>2</sub>], která způsobuje změny klimatu, a zda tedy antokyaniny fungují také jako ochrana před negativními důsledky působení zvýšené koncentrace tohoto skleníkového plynu. Tomuto tématu se zatím nedostává příliš velkého zájmu, existuje jen málo prací, které se mu věnují. Jednou z nich je studie Ren et al. (2014), kde je středem zájmu asijská tropická rostlina, *Gynura bicolor* (Roxb ex. Willd) DC. Tato rostlina byla pěstována při třech koncentracích CO<sub>2</sub> – běžná (450 ppm), zvýšená (1500 ppm) a nadměrně zvýšená (8000 ppm). Zároveň byly rostliny vystaveny záření s různým složením spektra – bílému, červenému (85%) + modrému (15%) a červenému (70%) + modrému (30%). Při osvětlení listů bílým světlem nedošlo k téměř žádné akumulaci antokyanů, ať už byla [CO<sub>2</sub>] jakákoli. Po osvětlení modrým světlem se už ale antokyaniny akumulovaly a při zvýšení intenzity modrého světla z 15 % na 30 % se akumulace ještě zvýšila. Současně se zvýšením intenzity modrého světla se zvyšovala i [CO<sub>2</sub>]. Výsledky tedy ukazují, že [CO<sub>2</sub>] nejspíš souvisí s nárůstem obsahu antokyanů. Na druhou stranu je ale třeba vzít v potaz vliv modrého světla a uvažovat i možnost, že [CO<sub>2</sub>] má na obsah antokyanů vliv pouze při ozáření modrým světlem.

Další dostupné studie (Ghasemzadeh et al., 2012; Tallis et al., 2010) potvrzují domněnku, že CO<sub>2</sub> potřebuje nějaký další faktor, aby byly schopny v interakci indukovat akumulaci antokyanů. V případě práce Ghasemzadeh et al. (2012) byla tímto faktorem aplikace fytohormonu, rostlinného aktivátoru – kyseliny salicylové. Kombinace vyššího množství této kyseliny a CO<sub>2</sub> způsobila výrazný nárůst antokyanů v listech. Obě látky zvlášť sice také vedly k akumulaci antokyanů, ale už ne v takové míře. Je tedy možné, že kyselina salicylová se zapojuje do signalizační dráhy pro antokyaniny. Ve druhé studii se autoři zaměřili na zvyšující

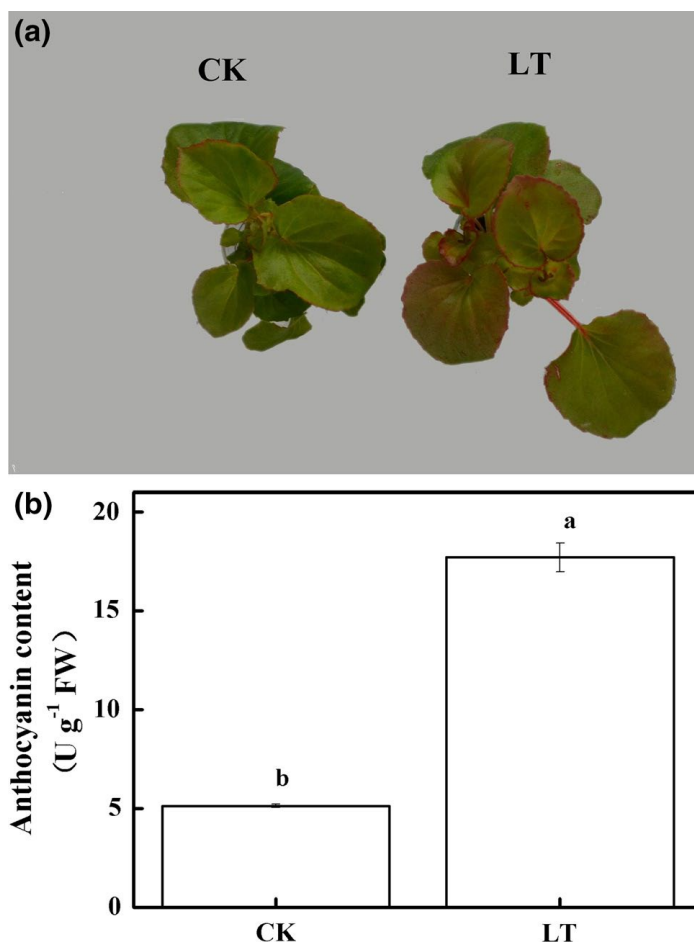
se obsah antokyanů během senescence, je tedy možné, že zvýšení CO<sub>2</sub> vlastně na antokyany vliv nemělo, a že k jejich akumulaci došlo přirozeně v důsledku nástupu podzimu.

Dle výsledků se zdá, že akumulaci antokyanů způsobily spíše ostatní podmínky, kterým byly listy rostlin vystaveny, například světlo nebo exogenně dodaná kyselina salicylová. Zvýšená [CO<sub>2</sub>] vede k teplejším podmínkám, a to s sebou přináší další stresové faktory. S teplejším klimatem se pojí nedostatek vody, a tedy i sucho. Z předchozích kapitol vyplývá, že během období sucha je rostlina vystavena nejen nedostatku vody, ale také vysokému slunečnímu záření, což vede k vzniku ROS, které antokyany zhašejí. Výsledky zmíněných studií ukazují, že zvýšená [CO<sub>2</sub>] může mít za následek další jevy a procesy, které mohou vyvolat akumulaci antokyanů. Existují ovšem i studie, které upozorňují na možnost, že mezi zvýšenou [CO<sub>2</sub>] a hromaděním antokyanů je přímý vztah (Günthardt-Goerg a Vollenweider, 2015). Zvýšená [CO<sub>2</sub>] může postupně vést k vyšší produkci biomasy, ale pouze v případě, že ostatní živiny jsou také v dostatečném množství. Pokud by například rostlina měla nedostatek dusíku, pak by uhlík přebýval. Některé rostliny proto syntetizují sekundární metabolity na bázi uhlíku, mezi něž patří i antokyany, tyto metabolity poté fungují jako sink pro nadbytečný uhlík. (Günthardt-Goerg a Vollenweider, 2015). Zvýšená [CO<sub>2</sub>] tedy může přímo indukovat akumulaci antokyanů, je ale třeba testovat tuto hypotézu na širší škále druhů rostlin.

#### **4.5. Teplota**

Každý druh či ekotyp rostlin je adaptovaný na určité teplotní podmínky. Rostliny rostoucí v mírném pásmu, kde jsou chladnější zimy, mají vyšší toleranci k chladu a nižší toleranci ke zvýšeným teplotám. Naopak rostliny subtropů a tropů mají toleranci k chladu nižší, protože jsou zvyklé na teplé zimy, a jsou adaptované spíše na vyšší teploty. Pro rostliny může být tedy velmi stresující jak vysoká, tak nízká teplota. K červenání listů dochází u rostlin rostoucích například v pouštích. Červené zbarvení ale souvisí s ochranou před intenzivním zářením, jak bylo popsáno výše. Antokyany se ale akumulují i v listech rostlin, které obývají mírnější podnebí, a to zejména s nástupem zimy. Nabízí se tedy možnost, že antokyany chrání rostliny před příliš nízkou teplotou. Touto hypotézou se zabývala studie Ramirez-Valiente et al. (2015), která byla zmíněna již v souvislosti se suchem. Kromě sucha ale autoři vystavili čtyři druhy dubu i různým teplotám. V případě vystavení nízké teplotě došlo k akumulaci antokyanů. Podobných výsledků dosáhli i Tian et al. (2015) u třech kultivarů jabloně, u nichž množství antokyanů ukazovalo na toleranci daného kultivaru k mrazu, nebo nedávná studie Bi et al. (2018), která se věnovala listům begonie (Obrázek 7). Autoři většinou předpokládají, že antokyany fungují jako antioxidanty.

Je ale možné, že antokyany přímo před mrazem nechrání a že jejich akumulace souvisí s jiným faktorem, například opět se světlem (Zhang et al., 2011). Tato možnost byla testována na rostlinách *Arabidopsis thaliana*, které lze najít na většině míst Evropy i Asie, jsou tedy adaptované na různé klimatické podmínky. Rostliny byly pěstovány při různých teplotách, buď na světle nebo ve tmě. Rostliny reagovaly na nízké teploty akumulací antokyanů pouze za světla. Ve tmě měla nízká teplota jen nepatrný vliv na obsah antokyanů. V tomto případě tedy největší roli hrálo záření. Na druhou stranu studie Schulz et al. (2015), která pracovala také s rostlinami *A. thaliana*, dosáhla jiných výsledků. Aby autoři předešli hromadění antokyanů v důsledku intenzity záření, snížili intenzitu světla. Přestože byly rostliny pěstovány při nízké ozáření, došlo při snížení teploty k akumulaci antokyanů.



Obrázek 7: Listy begonie (a) a obsah antokyanů (b) za nízké teploty (LT) a kontrolní teploty (CK). Na první pohled je patrný zvýšený obsah antokyanů po vystavení nízké teplotě (rostlina vpravo), zejména na okrajích listů a v řapících. Akumulaci antokyanů potvrzuje graf (b). Převzato z: (Bi et al., 2018).

Několik studií ale také poukazuje na možnost, že syntéza antokyanů je spuštěna nadbytkem sacharidů, které se v rostlinách hromadí za nízkých teplot (Bi et al., 2018; Schulz et al., 2015; Zhang et al., 2013). V důsledku snížení rychlosti respirace a růstu vlivem nízkých teplot dochází u mnoha druhů rostlin k akumulaci sacharidů, které indukují syntézu antokyanů (Zhang et al., 2013). Jelikož antokyany se vyskytují ve formě glykosidů a mají tedy navázaný cukr, mohou být syntetizovány při nadbytku sacharidů, aby jejich koncentraci snížily jejich navázáním (Bi et al., 2018).

Výsledky studií ukazují, že antokyany skutečně hrají roli při aklimaci rostlin na nízké teploty. Z výsledků ale nevyplývá, že antokyany přímo chrání před chladem. Nízká teplota vede ke snížení rychlosti fotosyntézy. V chladnějším období bývá sluneční záření relativně intenzivní, při snížené rychlosti fotosyntézy pak vzniká nadbytek světlené energie, což může vést ke vzniku nadměrného množství ROS. V tom případě antokyany opět fungují jako antioxidanty, které tyto radikály zhašejí (Bi et al., 2018). Dalším možným vysvětlením akumulace antokyanů v chladu je indukce jejich syntézy díky nadbytku sacharidů (Bi et al., 2018). V chladných obdobích dochází k inhibici respirace a růstu, v důsledku toho rostliny akumulují sacharidy, nadbytek sacharidů pak může spustit syntézu antokyanů. Zdá se tedy, že antokyany hrají významnou roli v přizpůsobení se rostlin na snížení teploty. Přímo ovšem antokyany nechrání rostliny před chladem, ale před jeho následky.

#### **4.6. Patogeny**

Významným stresovým faktorem může pro rostliny být přítomnost patogenů. Jedněmi z nejčastějších patogenů rostlin jsou houby, například padlí nebo sněť. Houby napadají živé buňky rostlin a berou si z nich živiny, tedy parazitují na nich – tzv. biotrofní patogeny. Některé houby ale dokáží způsobit smrt buněk, kompletně je vysávat a tím zabijí celou rostlinu – tzv. nekrotrofní patogeny. Dále mohou rostlinu napadnout bakterie, které vylučují toxiny, nebo viry. Rostliny se patogenům brání v první řadě mechanicky. Před proniknutím patogenu do těla rostliny brání kutikula tvořená zejména kutinem, buněčná stěna obsahující případně lignin či vosky uvnitř a na povrchu kutikuly. Kromě toho se rostliny brání patogenům také chemickou cestou, tedy syntézou antimikrobiálních látek.

Vzhledem k mnoha dokázaným ochranným funkcím antokyanů se lze domnívat, že by mohly fungovat i jako ochrana před napadením patogenem v listech. Na toto téma zatím neexistuje moc prací. Starší studie Coley a Aide (1989) formulovala hypotézu, že mnoho tropických dřevin tvoří červené mladé listy právě z důvodu jejich ochrany před patogeny.

Autoři provedli zajímavý experiment, při němž využili mravence *Atta columbica*. Těmto mravencům se říká střihači, protože odkusují kousky listů či květů, nosí je do mraveniště a vytvářejí z nich substrát, na kterém následně pěstují houby. Tyto houby potom využívají jako potravu pro dospělé, ale hlavně pro larvy. Mravenci proto musí vybírat rostliny vhodné pro pěstování hub. Při experimentu měli mravenci k dispozici 20 různých druhů rostlin s různým obsahem antokyanů. Výsledky ukázaly, že druhům rostlin s vysokým obsahem antokyanů se mravenci úplně vyhýbali. Nicméně mezi ostatními druhy s nižší koncentrací antokyanů už rozdíl v preferenci mravenci nebyl. Poté autoři mravencům připravili ovesné vločky, do kterých přidali čistý antokyan. Mravenci si vybrali pouze vločky, ve kterých byla nulová koncentrace antokyanů. Dle výsledků se tedy lze domnívat, že antokyaniny hrají roli v ochraně rostlin před patogeny, ovšem u některých druhů jsou rozhodující i jiné faktory.

Stejnou hypotézu testovali o 27 let později Tellez et al. (2016). Opět bylo testováno několik druhů tropických rostlin, kterým byl patogen přímo naočkován, jednalo se houbu *Calonectria*. U všech pozorovaných listů se po několika dnech objevila nekróza, ovšem míra tohoto poškození klesala s rostoucí koncentrací antokyanů u jednotlivých druhů. Antokyaniny nejspíš skutečně hrají důležitou roli v ochraně rostlin před houbovými patogeny. Vzhledem k tomu, že se této problematice zatím nevěnovalo příliš pozornosti, je třeba vzít v úvahu i další faktory. Navíc byly experimenty provedeny jen na několika málo tropických druzích a bylo prozkoumáno málo patogenů, a to pouze houbových. Také není jisté, jestli jsou antokyaniny pro patogeny přímo toxické nebo jen deterentní a jaký je tedy mechanismus ochrany rostlin.

#### **4.7. Herbivoři**

Herbivorie je přirozený vztah mezi herbivorem a rostlinou, který je nezbytný pro udržení přirozeného stavu ekosystému. Pro rostlinu je ovšem napadení herbivorem dalším stresovým faktorem, způsobujícím poškození pletiv, snížení růstu nebo i smrt. Rostlina se brání podobně jako v případě napadení patogenem, tedy mechanicky a chemicky. Mechanická obrana spočívá především ve vytváření krycích pletiv, zpevnění ligninem či suberinem nebo tvořením mechanických útvarů, například trnů. Chemická obrana je založená na produkci látek, které jsou pro herbivory deterentní nebo toxické, například flavonoidy. Kromě toho některé rostliny žijí v symbióze s jinými organismy, které je před herbivory chrání, například s mravenci. Rostliny jsou nejvíce ohroženy býložravým hmyzem.

Existuje celá řada prací, které studují obranné mechanismy rostlin v reakci na herbivorii, nicméně se nezaměřují pouze na obsah antokyanů, nýbrž na celkové zbarvení listů způsobené

i jinými pigmenty. Existuje několik hypotéz, které vysvětlují podzimní zbarvení jako ochranu před herbivory. Nejvíce probíranou hypotézou je koevoluční hypotéza, se kterou přišli Hamilton a Brown (2001). Podle této hypotézy je výrazné podzimní zbarvení signálem pro býložravý hmyz, který jej upozorňuje na přítomnost obranných mechanismů v rostlině. Na podzim totiž dochází ke kolonizaci rostlin hmyzem, například mšicemi, které hledají vhodnou rostlinu k přezimování a naklazení vajíček, ze kterých se v následující sezóně vylíhnou býložravé larvy. Hypotéza předpokládá, že hmyz kolonizuje přednostně ty nejméně zbarvené rostliny. Hamilton a Brown (2001) ale také upozorňují, že tento varovný signál musí být energeticky náročný, aby byl věrohodný. V případě, že by u slabého jedince došlo k předstírání silného obranného mechanismu, spolehlivost signálu by byla narušena.

Koevoluční hypotézu ověřili Hagen et al. (2003) na horské bříze *Betula pubescens* (Ehrh.). Autoři zjistili, že míra podzimního zbarvení negativně ovlivňuje poškození hmyzem v následující sezóně, čímž potvrdili koevoluční hypotézu. Zároveň autoři zkoumali i načasování podzimní změny barvy. Stromy, které se zbarvily dříve, vykazovaly v následující sezóně menší poškození než stromy, které se zbarvily později. Brzy zbarvené stromy ale musely dříve ukončit sezónu fotosyntézy, čímž přišly o část primární produkce, a tedy ztratily oproti později se barvicím stromům více energie. To potvrzuje domněnku, že vytvořený signál musí být energeticky nákladný (Hamilton a Brown, 2001). Ukončení sezóny fotosyntézy v souvislosti s koncem vegetačního období ale také souvisí s ubýváním chlorofylu, který způsobuje zelené zbarvení, místo něj se projevuje zbarvení žluté způsobené karotenoidy. Podzimní listy ovšem mají i červenou až fialovou barvu, způsobenou antokyany. Tvorba červeného zbarvení je také energeticky náročná, protože antokyany se syntetizují na podzim zcela nově (Hamilton a Brown, 2001).

V další studii Hagen et al. (2004) autoři poukazují na to, že všichni hmyz nemá červený fotoreceptor, a tudíž nemůže vidět červené zbarvení listů. Fotoreceptor chybí například již zmiňovaným mšicím, které tedy nedokážou rozeznat červenou barvu od zelené. Döring et al. (2009) se pokusili vysvětlit, proč se mšice vyhýbají červenajícím listům, když je nedokážou rozeznat. Výsledky jejich experimentu ukazují, že pro mšice je mnohem atraktivnější žlutá barva, která se na podzim objevuje v souvislosti s ubýváním chlorofylu. Rostlina produkuje antokyany, které sice mšice nerozeznají, ale dokáže jimi zamaskovat žlutou barvu, která by mohla mšice lákat k naklazení vajíček.

Červené zbarvení se v listech neobjevuje jen na podzim před opadem. Existují i rostliny, které mají permanentně červený okraj listů. Studie Cooney et al. (2012) aplikuje koevoluční

hypotézu právě na takové rostliny, konkrétně na stálezelenou dřevinu *Pseudowintera colorata* (Raoul) Dandy. Podle jejich teorie mají tyto typy rostlin zbarvené pouze okraje listů proto, že je hmyz napadá od kraje. Rostliny *P. colorata* s různou šířkou zbarvených okrajů autoři vystavili útoku larev mola *Ctenopseustis obliquata* a bílému, červenému nebo zelenému světlu a nakonec tmě. Larvy nejvíce konzumovaly za bílého světla listy s nejméně zbarvenými okraji. Při změně barvy světla nebo při vystavení tmě larvy žádnou preferenci nevykazovaly. Když larvy dostaly za bílého světla na výběr mezi červeným a zeleným okrajem, vybraly si zelený, když ale dostaly pouze list s červeným okrajem, konzumovaly ho ve stejné míře jako předtím list zelený. Tyto výsledky ukazují, že preference zelených listů není vrozená, ale naučená (Cooney et al., 2012).

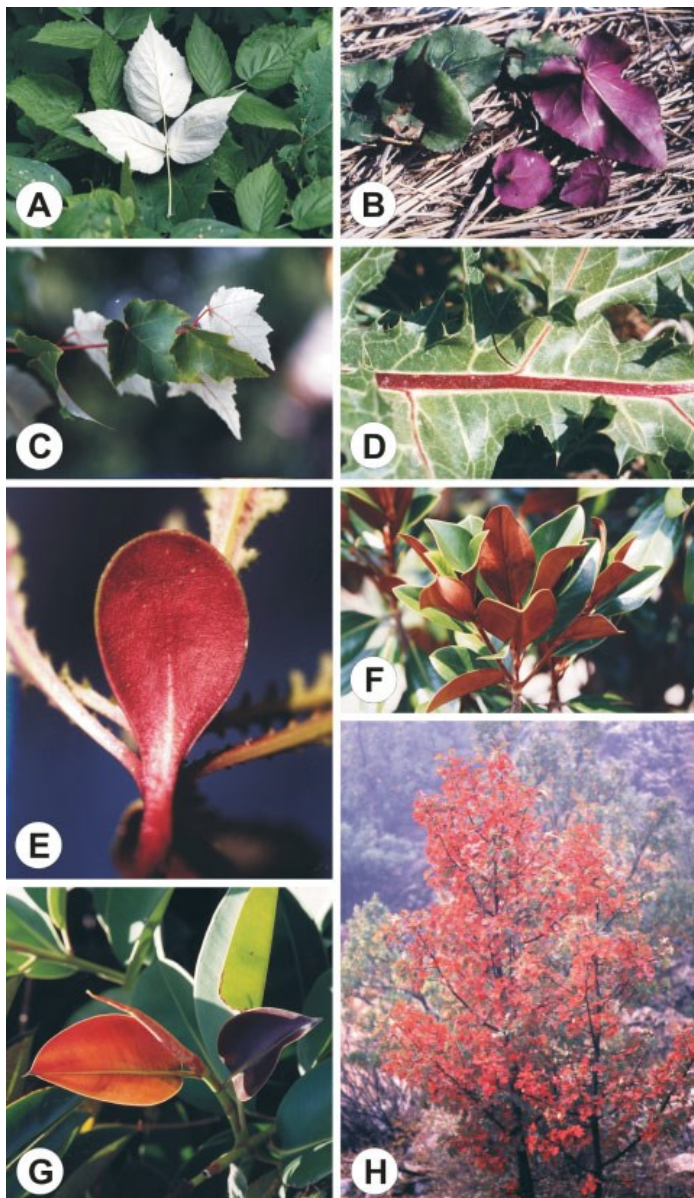
V předchozí kapitole bylo zmíněno, že mladé listy některých rostlin také vykazují akumulaci antokyanů v reakci na útok patogenů. Je tedy přirozené domnívat se, že se kromě patogenů brání mladé listy tímto způsobem i před herbivory. Karageorgou a Manetas (2006) proto porovnali zralé zelené listy a mladé červené listy dubu, *Quercus coccifera* (Linnaeus), mezi sebou. Největší poškození hmyzem vykazovaly zelené listy. Navíc červené listy s obsahem antokyanů obsahovaly i vysoké množství dalších fenolických látek. Je tedy možné, že obrannou látkou jsou ostatní fenoly, a antokyaniny jsou pouze důsledkem jejich syntézy, jelikož stojí na konci biosyntetické dráhy fenolických sloučenin.

Kromě koevoluční hypotézy byla navržena ještě jedna hypotéza, a sice že červené zbarvení listů narušuje ochranné zbarvení hmyzu (Lev-Yadun et al., 2004). Rostliny vykazují různé barevné vzory na listech (Obrázek 8), hmyz je pak lépe vidět a spíš si ho všimne predátor. Hmyz velice často využívá zelené maskování (například housenky či kobylky), proto je pro rostliny výhodné toto maskování narušit výraznou barvou, změnou odstínu na různých stranách listu nebo alespoň zbarvením části listu – žilnatiny, řapíku, kůry stromu apod. Tato hypotéza, ač zní zajímavě, prozatím nebyla experimentálně prokázána.

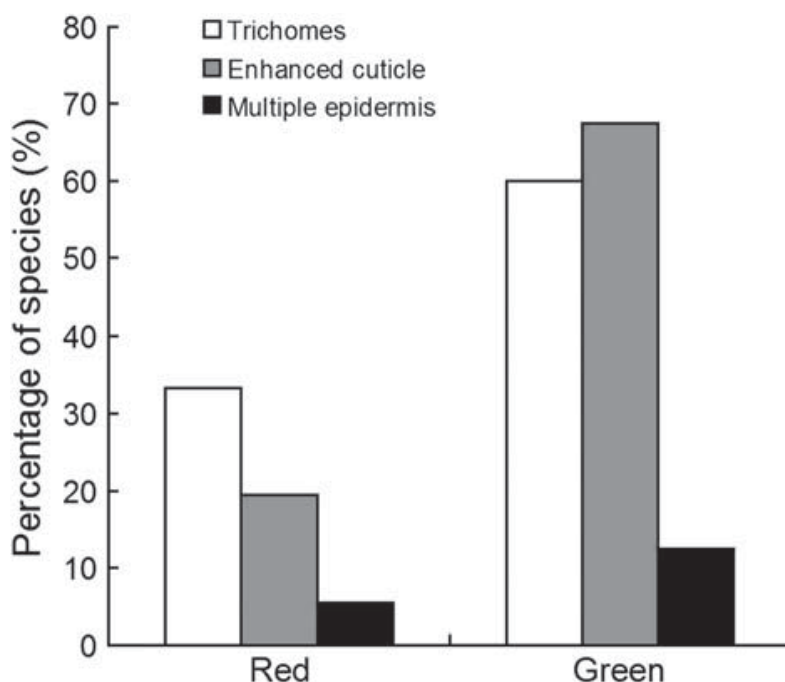
K červenání listů dochází v závislosti na výskytu či druhu rostliny, stáří listu nebo okolních podmínkách. Jsou ale rostliny, u kterých, přestože jsou vystaveny útoku herbivorů, k červenání listů vůbec nedochází. Tyto druhy se musí bránit jiným způsobem, zejména mechanickým. Mechanická obrana ve formě trnů, silné kutikuly či vícevrstevné epidermis by tedy mohla být alternativní obrannou strategií (Chen a Huang, 2013). Autoři této hypotézy porovnali zelené a červené listy 76 druhů dřevin. Některé listy byly chráněny červenou barvou, jiné mechanicky a některé kombinovaly oba způsoby. Celkově ale červené listy neobsahovaly příliš mechanických ochranných struktur, naproti tomu zelené listy byly mechanicky velmi

silně chráněné (Obrázek 9). Mohlo by tedy jít o dvě alternativní obranné strategie před útokem herbivorního hmyzu.

Závěrem lze říci, že červená barva způsobená akumulací antokyanů během podzimní senescence určitě souvisí s ochranou před herbivorním hmyzem, který hledá vhodnou živnou rostlinu pro budoucí larvy. Antokyany ovšem nejsou přímo tou látkou, která hmyz odrazuje, zejména proto, že velké množství druhů býložravého hmyzu červenou barvu nedokáže rozeznat. Antokyany tedy fungují spíše jako maskování zelené a žluté barvy, která je pro hmyz atraktivní. Ale též mohou antokyany chránit před ožerem herbivorů díky jejich deterrentní funkci.



Obrázek 8: Obvyklé barevné vzory listů rostlin. A: *Rubus* sp. – rozdílný odstín zelené barvy na adaxiální a abaxiální straně. B: *Cyclamen persicum* Miller – zelená adaxiální strana a fialová abaxiální strana listu. C: *Acer* sp. – zelená adaxiální strana, bílá abaxiální strana a červené řapíky a žilnatina. D: *Gudelia tounefortii* L. – červené žíly. E: *Matricaria* sp. – červená spodní strana děložního listu kotyledonu. F: *Magnolia* sp. – zelená adaxiální strana a hnědá abaxiální strana. G: *Ficus elastica* Roxb – červené mladé listy. H: Opadavý strom z Izraele – červené podzimní listy. Převzato z: (Lev-Yadun et al., 2004).



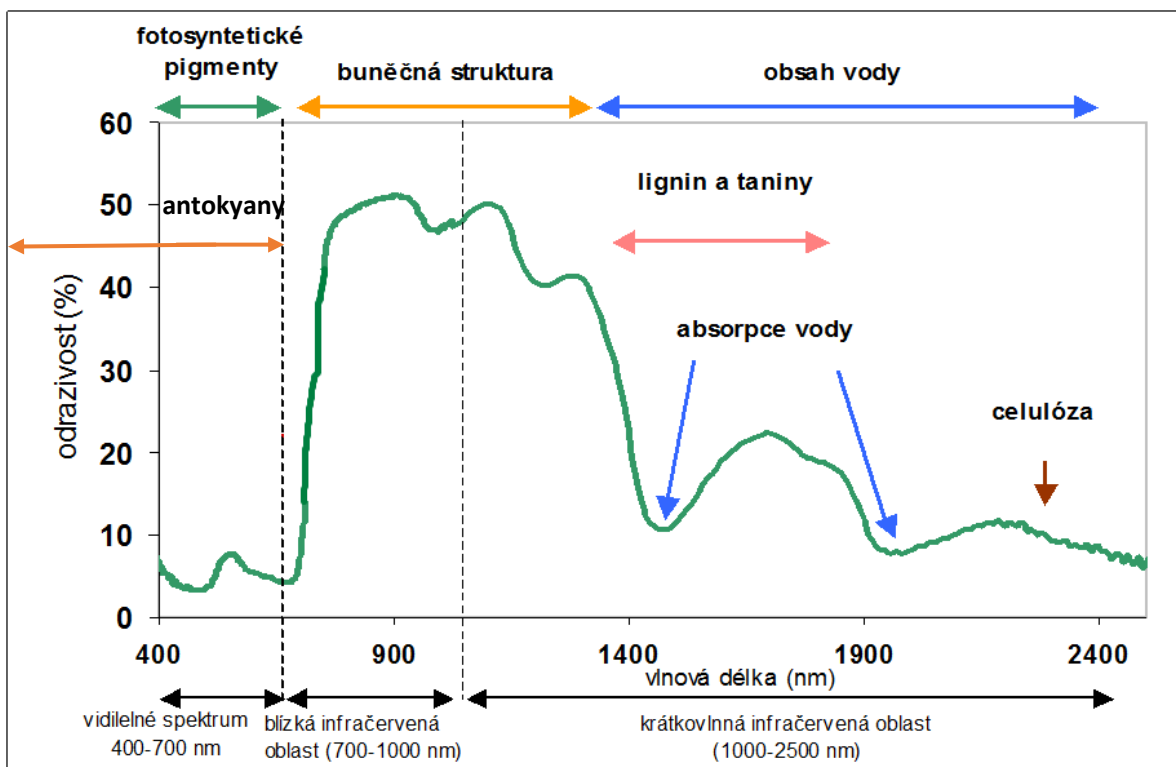
Obrázek 9: Graf ukazuje procento druhů rostlin, které využívají různé druhy mechanické ochrany (bíle trichomy, šedě zesílená kutikula, černě vícečetná epidermis) v porovnání mezi červenými (vlevo) a zelenými (vpravo) listy. Převzato z: (Chen a Huang, 2013).

## 5. Detekce antokyanů spektrálními metodami

Analýza obsahu antokyanů, ale i dalších pigmentů, poskytuje informace o celkovém fyziologickém stavu zkoumané rostliny. Obsah antokyanů a jejich poměr vůči jiným pigmentům je důležitý pro zjištění odpovědi rostliny na stres způsobený faktory prostředí a následné adaptace na tuto změnu prostředí (Gitelson et al., 2001; Merzlyak et al., 2003; Sims a Gamon, 2002). Antokyaniny, stejně jako jiné sekundární metabolity, lze detekovat různými metodami. Metody detekce antokyanů mohou být například histochemické, biochemické nebo spektrální. Typickou biochemickou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která je používána v mnoha studiích (Cooney et al., 2012; Ghasemzadeh et al., 2012; Ren et al., 2014; Reuber et al., 1996). Histochemické metody jsou založené na specifických barvených reakcích činidla s určitou látkou a jejím pozorováním pomocí světelného mikroskopu (Eppel et al., 2013). Při spektrální analýze se věnuje pozornost interakci listu a látek v něm obsažených se zářením, které na list dopadá. Pomocí spektrofotometru se detekují změny záření, které se od listu odrazilo nebo jím prošlo (Bi et al., 2018; Burger a Edwards, 1996; Gitelson et al., 2001; Hughes et al., 2010; Karageorgou a Manetas, 2006; Spurdouli a Moustakas, 2012; Sui et al., 2017; Zhang et al., 2011).

## 5.1. Spektrální křivka odrazivosti

Záření, které dopadá na list, může mít různý osud. Část dopadajícího záření projde skrz list (transmitance), část je pohlcena listem (absorbance) a část je odražena zpět (reflektance). Spektrální metody (spektroskopie) jsou založeny na kvantifikaci optických vlastností listu, tedy na poměru procházejícího, absorbovaného a odraženého světla. Tento poměr je vyjádřen spektrální křivkou (Obrázek 10). Spektrální křivka ukazuje kolik % světla bylo odraženo v jednotlivých vlnových délkách v porovnání s referenčním bílým panelem (spektralónem), jehož odrazivost se blíží 100 %. V oblasti viditelného světla (VIS) je reflektance velmi nízká z důvodu přítomnosti fotosyntetických pigmentů, které dopadající světlo z velké části pohlcují. Při přechodu do blízké infračervené oblasti spektra (NIR) se reflektance výrazně zvyšuje až do 1400 nm. Do 2000 nm je reflektance relativně proměnlivá, závisí na obsahu opticky aktivních látek, včetně vody. Při vyšších vlnových délkách se reflektance opět výrazně snižuje v závislosti na obsahu celulózy a ligninu.

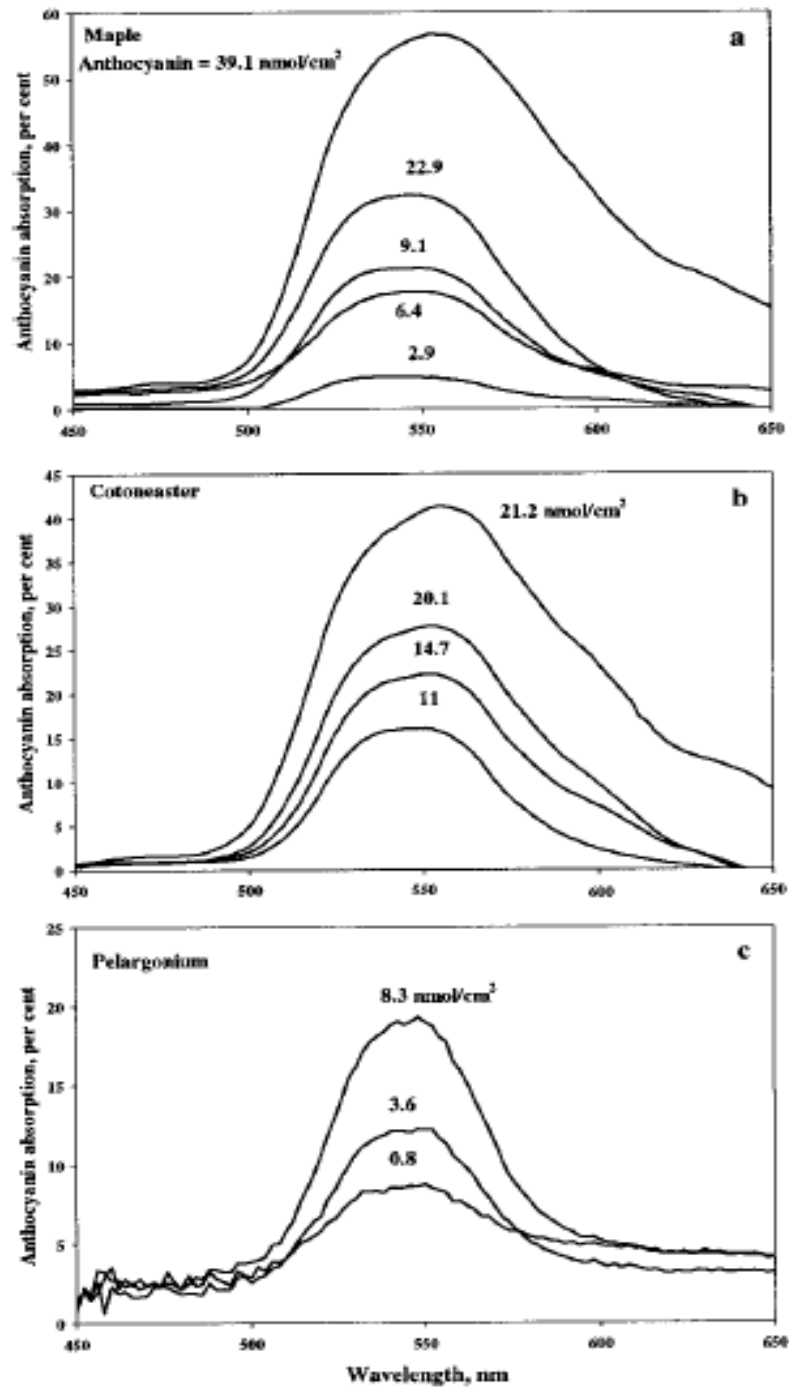


Obrázek 10: Spektrální křivka odrazivosti. Převzato a upraveno dle: Lhotáková 2009, podle (Gates et al., 1965).

## 5.2. UV-VIS spektrofotometrie

Spektroskopii lze rozdělit na absorpční a emisní spektroskopii. Při emisní spektroskopii se měří záření emitované látkou či vzorkem, kterému byla dodána energie. Absorpční spektroskopie měří absorpci záření látkou ve vzorku. Při detekci antokyanů v listech se hojně používá právě absorpční spektrální analýza, kterou lze použít pro různé oblasti elektromagnetického spektra. Touto metodou lze kvantifikovat množství dané látky ve vzorku. Výhodou této analýzy je možnost detekovat látky, které se ve vzorku vyskytují i v nízkých koncentracích. Mezi metody absorpční spektroskopie patří kolorimetrie, fotometrie a spektrofotometrie. Pro detekci antokyanů se využívá UV-VIS spektrofotometrie, při které se měří absorpční spektrum extraktu vzorku pomocí spektrofotometru. Pro extrakci pigmentů se používají organická rozpouštědla, například aceton nebo metanol. Následně se pomocí spektrofotometru změří absorpce látek přítomných v extraktu.

Identifikace jednotlivých pigmentů je ovšem obtížná, jelikož se v extraktu vyskytují i další složky a navíc se jejich absorpční spektra mohou překrývat (Gitelson et al., 2001, 2006; Merzlyak et al., 2003; Sims a Gamon, 2002; Solovchenko et al., 2001). Mnoho prací se shoduje, že absorpční maximum antokyanů je okolo 550 nm (Obrázek 11) (Gitelson et al., 2001, 2017; Merzlyak et al., 2003; Solovchenko et al., 2001), což odpovídá zelenému světlu. V listech se spolu s antokyanem vyskytují i chlorofyly. Chlorofyly mají absorpční maxima v červené a modré oblasti, ovšem zasahují i do oblasti zelené, proto se jejich absorpce překrývá s absorpcí antokyanů. Pro stanovení obsahu samotných antokyanů je tedy třeba z celkové absorpce odečíst příspěvek chlorofylu. S tímto problémem se potýkal například Gitelson et al. (2001). Aby autoři získali informace o absorbanci antokyanů bez vlivu chlorofylu, porovnali listy se stejným obsahem chlorofylu a různým obsahem antokyanů. Jiným způsobem překrývající se absorpční spektra řešila studie Solovchenko et al. (2001). Autoři se zajímali především o extrakci chlorofylu a karotenoidů dvěma způsoby. Analýza těchto pigmentů také není snadná, jelikož absorpční spektrum může být ovlivněno nečistotami absorbujícími světlo nebo lipidy. Vzorky nejprve ošetřili chloroformem, aby se zbavili lipidů, následně extrahovali pigmenty pomocí metanolu či acetonu. Ve druhém způsobu extrakce použili při homogenizaci směs chloroformu a metanolu. Při centrifugaci se od sebe oddělily chloroformová a metanolová frakce, ve které již nebyl přítomen chlorofyl. Z metanolové frakce byly následně za pomoci HCl extrahovány antokyanem.



Obrázek 11: Spektrální křivky absorpce antokyanů 3 druhů rostlin – javoru, skalníku a pelargonie. Absorpce byla měřena u listů se stejným obsahem chlorofylu, ale různým obsahem antokyanů. Všechny druhy vykazují vrchol absorpce okolo 550 nm v závislosti na obsahu antokyanů. Na ose x jsou vlnové délky v nm, na ose y jsou absorpce antokyanů v procentech. Převzato z: (Gitelson et al., 2001).

### **5.3. Nedestruktivní metody detekce antokyanů**

Absorpční spektroskopie a histochemické a biochemické metody detekce antokyanů jsou energeticky náročné. Vzorek listu je pro účely těchto metod třeba zničit, což znemožňuje jeho opětovné využití a sledování změn pigmentů v průběhu času (Gitelson et al., 2001, 2006; Merzlyak et al., 2003; Sims a Gamon, 2002). Z tohoto důvodu mnozí autoři uvažovali nad alternativní metodou, která by umožnila nedestruktivně zjistit obsah antokyanů v listech rostlin, touto metodou je reflektanční spektroskopie.

Měření reflektance na intaktních listech se provádí pomocí spektrometru, který lze použít v terénu i v laboratorních podmínkách. Pro měření spektrometrem v terénu je potřeba optické vlákno nebo pistolový nástavec, díky kterému můžeme měřit odrazivost rozsáhlých povrchů. V případě terénního měření je zdrojem světla slunce. Při měření odrazivosti v laboratoři se k měření spektrometrem používá kontaktní sonda nebo integrační sféra. Kontaktní sondou se provádí dotykové měření odrazivosti listů, kdy se měří odrazivost na několika místech listu, který je umístěný na černé podložce s téměř nulovou odrazivostí. Integrační sonda měří jak odražené záření, tak propuštěné záření, navíc je tato metoda velice přesná. Naměřené hodnoty je třeba normalizovat oproti odraženému záření od bílé reference, výsledkem je odrazivost daného vzorku (Albrechtová a kol., 2017).

Příkladem nedestruktivní metody detekce antokyanů je odhad obsahu antokyanů pomocí poměru odrazivosti zeleného a červeného světla (Gamon a Surfus, 1999). Tento index se osvědčil u mladých listů dubu, u nichž se postupně během dozrávání snižoval obsah antokyanů a zvyšoval obsah chlorofylu. Není ovšem jasné, zda tento index bude fungovat i v jiných stádiích vývoje, kdy obsah pigmentů může různě kolísat (Gitelson et al., 2001), proto je potřeba vyvinout univerzálnější index pro zjišťování obsahu antokyanů.

#### **5.3.1. Index reflektance antokyanů (ARI)**

Gitelson et al. (2001) nejprve studovali spektrální vlastnosti antokyanů pomocí klasické absorpční spektroskopie. Autoři stanovili specifický spektrální znak antokyanů, a sice absorpci v zelené části spektra přibližně okolo 550 nm. Následně zjišťovali, zda by bylo možné stanovit obsah antokyanů pomocí reflektance v případě, že znají absorpční maximum antokyanů. Stejně jako v případě absorpční spektroskopie, tak i v reflektanční spektroskopii se reflektance antokyanů překrývá s reflektancí chlorofylu, bylo tedy potřeba odečíst příspěvek chlorofylu od celkové odrazivosti listu. Autoři zjistili korelaci mezi reflektancí v červené oblasti spektra

okolo 700 nm a obsahem chlorofylu. Jelikož antokyany v červené části reflektanci neovlivňují, souvisí reflektance při 700 nm pouze s chlorofyly. Naopak reflektance okolo 550 nm souvisí jak s chlorofyly, tak s antokyany. Převrácené hodnoty těchto vlnových délek představují absorbanci. Díky těmto zjištěním autoři navrhli index reflektance antokyanů (ARI = anthocyanin reflectance index) jako:

$$\text{ARI} = (R_{550})^{-1} - (R_{700})^{-1},$$

kde  $(R_{550})^{-1}$  představuje absorpci chlorofylu a antokyanů a  $(R_{700})^{-1}$  pouze absorpci chlorofylu. Tento index byl ověřen v práci Merzlyak et al. (2003).

Gitelson et al. (2006) rozšířili index ARI o další složku. Při stanovování obsahu antokyanů je třeba vzít v potaz ještě rozptyl záření na vnitřních strukturách listu, který ovlivňuje odhad výsledného obsahu antokyanů z reflektance. Autoři studie aplikovali třípásmový index, který byl úspěšně použit pro stanovení vztahu mezi reflektancí a obsahem chlorofylu (Gitelson et al., 2003), na detekci antokyanů. Aby mohl být tento třípásmový model použit na různé druhy rostlin, byly původní koeficienty absorpce upraveny. Výsledný modifikovaný index mARI byl navržen takto:

$$\text{mARI} = (R_{530-570}^{-1} - R_{690-710}^{-1}) \cdot R_{\text{NIR}},$$

kde  $R_{\text{NIR}}$  představuje reflektanci v blízkém infračerveném světle, tedy za 760 nm.

### 5.3.2. Výhody použití nedestruktivních spektrálních metod

Nedestruktivní spektrální metody detekce antokyanů tedy představují možnost zjistit obsah těchto látek v nepoškozených listech, a navíc pozorovat jejich změnu během ontogenetického vývoje listu. Navíc jsou tyto metody rychlé, protože není potřeba připravovat extrakty z listů. Na druhou stranu vztahy mezi zmíněnými indexy a reálným obsahem pigmentů mohou být druhově specifické, a navíc ovlivněné ontogenetickou fází listu. Aby byly výsledky nedestruktivních metody co nejpřesnější, je vždy nejprve potřeba provést biochemickou analýzu listů současně s měřením optických vlastností. Následně je nutné otestovat vztah mezi indexem a reálným obsahem pigmentů v listech. Teprve poté je možné aplikovat nedestruktivní metody odhadu obsahu pigmentů na větší množství vzorků, které už nebude třeba podrobit biochemické analýze, a využít takové metody například v zemědělství.

## Závěr

Rostliny jsou celý život vystavovány různým faktorům vnějšího prostředí. Pokud jsou tyto faktory v optimálním rozmezí, nepředstavují pro rostliny riziko, a navíc jsou mnohdy pro jejich život nezbytné. Pokud ale tyto faktory vybočí z optimálního rozmezí, stávají se stresovými faktory. Dlouhodobým působením stresových faktorů, které hrozí například kvůli stále probíhající klimatické změně, může dojít k odumírání velkého množství rostlin a následným velkým zemědělským ztrátám. V krajním případě hrozí i nedostatek potravy pro stále se rozrůstající lidskou populaci.

Vzhledem k přisedlému způsobu života si rostliny v průběhu evoluce, ale i ontogeneze, vyvinuly různé obranné mechanismy, díky kterým dokáží přežít změny podmínek prostředí. Rostliny se v první řadě brání mechanicky, důležitá je ale také obrana chemická. V práci je probrána ochranná funkce antokyanů, které se běžně vyskytují v květech či plodech, kde fungují jako atraktanty pro opylovače a roznašeče semen. Mohou se ale také vyskytovat v listech různých rostlin, v různých vývojových stádiích nebo během různých částí roku. V práci je rozebrána jejich funkce v ochraně listů při působení některých stresových faktorů. Antokyaniny mají nejčastěji funkci antioxidantů, které reagují s ROS a tím je inaktivují. ROS se v rostlinách hromadí v důsledku působení nadměrné  $[O_3]$  nebo nadměrné ozáření, která je spojena například se suchem nebo nízkou teplotou. Antokyaniny ale mohou fungovat i jako filtry chránící fotosystémy před UV zářením. Z biotických faktorů byla prokázána funkce antokyanů v ochraně před herbivory, zejména hmyzem. Antokyaniny maskují zelenou a žlutou barvu způsobenou chlorofyly a karotenoidy, která je pro herbivory atraktivní. Znalost obranných mechanismů rostlin je důležitá, aby bylo možné kultivovat rostliny nejlépe přizpůsobené na měnící se podmínky prostředí a zabránit tak zemědělským ztrátám a možnému nedostatku rostlinných zdrojů v potravinářství.

K určení celkového fyziologického stavu rostliny je třeba analyzovat složení pigmentů, jejich poměr a lokalizaci v pletivech. K určení obsahu či lokalizace antokyanů lze použít různé metody, biochemické, histochemické nebo spektrální. V práci je vysvětlen princip spektrálních metod, které umožňují analyzovat antokyaniny podle spektrální změny záření, které je absorbováno extrakty z listu a nebo záření, které se od listu odrazí či listem projde. Nejčastěji používanou metodou je UV-VIS spektrofotometrie, která ale, stejně jako většina dalších metod, vyžaduje zničení vzorku listu za účelem získání extraktu. Aby bylo možné studovat změnu pigmentů v listech během ontogenetického vývoje, je třeba využít nedestruktivní metody

detekce pigmentů, například reflektanční spektroskopii. Nedestruktivním metodám se v posledních dvou dekáдах věnuje značná pozornost, ale většina těchto metod se zatím nedá použít na větší spektrum nepříbuzných druhů rostlin, proto je potřeba v budoucnu vyvinout obecnější metodu aplikovatelnou na širší škálu druhů rostlin.

## Seznam zdrojů a použité literatury

- Albrechtová, J., Kupková, L., Campbell, P. K. E. a kol. (2017). *Metody hodnocení fyziologického stavu smrkových porostů*. Česká geografická společnost, Praha, ISBN: 978-80-904521-9-0.
- Bi, H., Guo, M., Wang, J., Qu, Y., Du, W., and Zhang, K. (2018). Transcriptome analysis reveals anthocyanin acts as a protectant in *Begonia semperflorens* under low temperature. *Acta Physiol. Plant.* 40.
- Burger, J., and Edwards, G.E. (1996). Photosynthetic Efficiency, and Photodamage by UV and Visible Radiation, in Red versus Green Leaf Coleus Varieties. *Plant Cell Physiol.* 37, 395–399.
- Chalker-Scott, L. (2002). Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues? In *Advances in Botanical Research*, (Elsevier), pp. 103–127.
- Chen, Y.-Z., and Huang, S.-Q. (2013). Red young leaves have less mechanical defence than green young leaves. *Oikos* 122, 1035–1041.
- Coley, P.D., and Aide, T.M. (1989). Red coloration of tropical young leaves: a possible antifungal defence? *J. Trop. Ecol.* 5, 293–300.
- Cooney, L.J., van Klink, J.W., Hughes, N.M., Perry, N.B., Schaefer, H.M., Menzies, I.J., and Gould, K.S. (2012). Red leaf margins indicate increased polygodial content and function as visual signals to reduce herbivory in *Pseudowintera colorata*. *New Phytol.* 194, 488–497.
- Doring, T.F., Archetti, M., and Hardie, J. (2009). Autumn leaves seen through herbivore eyes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 121–127.
- Eppel, A., Keren, N., Salomon, E., Volis, S., and Rachmilevitch, S. (2013). The response of *Hordeum spontaneum* desert ecotype to drought and excessive light intensity is characterized by induction of O<sub>2</sub> dependent photochemical activity and anthocyanin accumulation. *Plant Sci.* 201–202, 74–80.
- Francini, A., Nali, C., Pellegrini, E., and Lorenzini, G. (2008). Characterization and isolation of some genes of the shikimate pathway in sensitive and resistant *Centaurea jacea* plants after ozone exposure. *Environ. Pollut.* 151, 272–279.
- Gamon, J.A., and Surfus, J.S. (1999). Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytol.* 143, 105–117.
- Gates, D.M., Keegan, H.J., Schleter, J.C., and Weidner, V.R. (1965). Spectral Properties of Plants. *Appl. Opt.* 4, 11.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z., Karimi, E., and Ibrahim, M.H. (2012). Combined effect of CO<sub>2</sub> enrichment and foliar application of salicylic acid on the production and antioxidant activities of anthocyanin, flavonoids and isoflavonoids from ginger. *BMC Complement. Altern. Med.* 12.

- Gitelson, A., Chivkunova, O., Zhigalova, T., and Solovchenko, A. (2017). In situ optical properties of foliar flavonoids: Implication for non-destructive estimation of flavonoid content. *J. Plant Physiol.* *218*, 258–264.
- Gitelson, A.A., Merzlyak, M.N., and Chivkunova, O.B. (2001). Optical Properties and Nondestructive Estimation of Anthocyanin Content in Plant Leaves. *Photochem. Photobiol.* *74*, 38.
- Gitelson, A.A., Gritz †, Y., and Merzlyak, M.N. (2003). Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *J. Plant Physiol.* *160*, 271–282.
- Gitelson, A.A., Keydan, G.P., and Merzlyak, M.N. (2006). Three-band model for noninvasive estimation of chlorophyll, carotenoids, and anthocyanin contents in higher plant leaves. *Geophys. Res. Lett.* *33*.
- Gould, K.S., and Quinn, B.D. (1999). Do anthocyanins protect leaves of New Zealand native species from UV-B? *N. Z. J. Bot.* *37*, 175–178.
- Günthardt-Goerg, M.S., and Vollenweider, P. (2015). Responses of beech and spruce foliage to elevated carbon dioxide, increased nitrogen deposition and soil type. *AoB Plants* *7*, plv067.
- Hagen, S.B., Folstad, I., and Jakobsen, S.W. (2003). Autumn colouration and herbivore resistance in mountain birch (*Betula pubescens*). *Ecol. Lett.* *6*, 807–811.
- Hagen, S.B., Debeausse, S., Yoccoz, N.G., and Folstad, I. (2004). Autumn coloration as a signal of tree condition. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *271*, S184–S185.
- Hamilton, W.D., and Brown, S.P. (2001). Autumn tree colours as a handicap signal. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *268*, 1489–1493.
- Harborne, J., Williams, Ch. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* *55*, 481-504.
- Hughes, N.M., Reinhardt, K., Feild, T.S., Gerardi, A.R., and Smith, W.K. (2010). Association between winter anthocyanin production and drought stress in angiosperm evergreen species. *J. Exp. Bot.* *61*, 1699–1709.
- Hughes, N.M., Carpenter, K.L., and Cannon, J.G. (2013). Estimating contribution of anthocyanin pigments to osmotic adjustment during winter leaf reddening. *J. Plant Physiol.* *170*, 230–233.
- Karageorgou, P., and Manetas, Y. (2006). The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. *Tree Physiol.* *26*, 613–621.
- Koncentrace troposférického ozonu v ČR a jejich vliv na výnosy. *AMET – sdružení Litschmann & Suchý* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <http://www.amet.cz/aot40.html>.

- Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. Springer, New York. ISBN: 978-3-540-43516-7.
- Lev-Yadun, S., Dafni, A., Flaishman, M.A., Inbar, M., Izhaki, I., Katzir, G., and Ne'eman, G. (2004). Plant coloration undermines herbivorous insect camouflage. *BioEssays* 26, 1126–1130.
- Merzlyak, M.N., Gitelson, A.A., Chivkunova, O.B., Solovchenko, A.E., and Pogosyan, S.I. (2003). Application of Reflectance Spectroscopy for Analysis of Higher Plant Pigments. 50, 8.
- Ormrod, D.P., Landry, L.G., and Conklin, P.L. (1995). Short-term UV-B radiation and ozone exposure effects on aromatic secondary metabolite accumulation and shoot growth of flavonoid-deficient *Arabidopsis* mutants. *Physiol. Plant.* 93, 602–610.
- Ramirez-Valiente, J.A., Koehler, K., and Cavender-Bares, J. (2015). Climatic origins predict variation in photoprotective leaf pigments in response to drought and low temperatures in live oaks (*Quercus* series *Virentes*). *Tree Physiol.* 35, 521–534.
- Ren, J., Guo, S., Xu, C., Yang, C., Ai, W., Tang, Y., and Qin, L. (2014). Effects of different carbon dioxide and LED lighting levels on the anti-oxidative capabilities of *Gynura bicolor* DC. *Adv. Space Res.* 53, 353–361.
- Reuber, S., Bornman, J.F., and Weissenbock, G. (1996). A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity to UV-B radiation in the primary leaf. *Plant Cell Environ.* 19, 593–601.
- de Rezende, F.M., and Furlan, C.M. (2009). Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. *Chemosphere* 76, 1445–1450.
- da Rosa Santos, A.C., and Furlan, C.M. (2013). Levels of phenolic compounds in *Tibouchina pulchra* after fumigation with ozone. *Atmospheric Pollut. Res.* 4, 250–256.
- Schulz, E., Tohge, T., Zuther, E., Fernie, A.R., and Hinch, D.K. (2015). Natural variation in flavonol and anthocyanin metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* accessions: Flavonoids and cold acclimation. *Plant Cell Environ.* 38, 1658–1672.
- Sims, D.A., and Gamon, J.A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sens. Environ.* 81, 337–354.
- Solovchenko, A.E., Chivkunova, O.B., Merzlyak, M.N., and Reshetnikova, I.V. (2001). A Spectrophotometric Analysis of Pigments in Apples. 48, 8.
- Sperdouli, I., and Moustakas, M. (2012). Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *J. Plant Physiol.* 169, 577–585.
- Stapleton, A.E., and Walbot, V. (1994). Flavonoids Can Protect Maize DNA from the Induction of Ultraviolet Radiation Damage. *Plant Physiol.* 105, 881–889.

- Sui, J.X., Wen, M.X., Jia, L.L., Chen, Y.J., Li, C.H., and Zhang, L. (2017). Effects of Elevated Ozone on Polka Dot Plant (*Hypoestes phyllostachya*) with Variegated Leaves. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *99*, 445–451.
- Taiz, L., and Zeiger, E. (2002). *Plant physiology*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, ISBN: 0878938230.
- Tallis, M.J., Lin, Y., Rogers, A., Zhang, J., Street, N.R., Miglietta, F., Karnosky, D.F., De Angelis, P., Calfapietra, C., and Taylor, G. (2010). The transcriptome of *Populus* in elevated CO<sub>2</sub> reveals increased anthocyanin biosynthesis during delayed autumnal senescence. *New Phytol.* *186*, 415–428.
- Tellez, P., Rojas, E., and Van Bael, S. (2016). Red coloration in young tropical leaves associated with reduced fungal pathogen damage. *Biotropica* *48*, 150–153.
- Tian, J., Han, Z., Zhang, L., Song, T.-T., Zhang, J., Li, J.-Y., and Yao, Y. (2015). Induction of Anthocyanin Accumulation in Crabapple (*Malus* cv.) Leaves by Low Temperatures. *50*, 10.
- Trends in Atmospheric Carbon Dioxide. *Earth System Research Laboratory (ESRL): Global Monitoring Division* [online]. [cit. 2018-05-06]. Dostupné z: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html>.
- Zhang, K.M., Li, Z., Li, Y., Li, Y.H., Kong, D.Z., and Wu, R.H. (2013). Carbohydrate accumulation may be the proximate trigger of anthocyanin biosynthesis under autumn conditions in *Begonia semperflorens*. *Plant Biol.* *15*, 991–1000.
- Zhang, Y., Zheng, S., Liu, Z., Wang, L., and Bi, Y. (2011). Both HY5 and HYH are necessary regulators for low temperature-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* seedlings. *J. Plant Physiol.* *168*, 367–374.