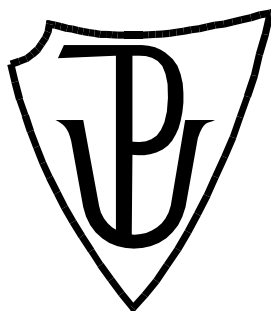


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochemie



**Vplyv teplotného stresu na metabolizmus reaktívnych
foriem kyslíka v listoch rajčiaka Micro-Tom**

BAKALÁRSKA PRÁCA

| | |
|-------------------|---------------------------------|
| Autor: | Nina Kucháriková |
| Študijný program: | B1406 Biochemie |
| Študijný odbor: | Biochemie |
| Forma štúdia: | Prezenčná |
| Vedúci práce: | Mgr. Tereza Tichá, Ph.D. |
| Rok: | 2018 |

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverjením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámena s tým, že se na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 09.05. 2018

.....

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce Mgr. Tereze Tiché, Ph.D. za cenné rady a pripomienky. Rovnako by som chcela poďakovať katedre biochémie za vrelý a priateľský prístup.

Bibliografická identifikácia

| | |
|--------------------------|---|
| Meno a priezvisko autora | Nina Kucháriková |
| Názov práce | Vplyv teplotného stresu na metabolizmus reaktívnych foriem kyslíka v listoch rajčiaka Micro-Tom |
| Typ práce | Bakalárska |
| Pracovisko | Katedra biochémie |
| Vedúci práce | Mgr. Tereza Tichá, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2018 |
| Abstrakt | |

Bakalárska práca je zameraná na charakterizáciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS), kľúčových molekúl a radikálov zapojených v signálnych drahách rastlín. Následkom nadmernej produkcie ROS vplyvom pôsobenia teplotného stresu (TS) môže dochádzať k oxidatívnym poškodením bunkových komponentov, ale aj k aktivácii ďalších signálnych dráh spojených s obranou proti oxidatívne stresu prostredníctvom enzýmových aj neenzýmových antioxidantov a syntézy heat shock proteínov (Hsp).

V experimentálnej časti bol študovaný vplyv TS pri 40, 45 a 50°C pod dobu 2 h na aktiváciu obranných mechanizmov modelovej rastliny *Solanum lycopersicum* kultivaru Micro-Tom v časovom úseku 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h od vystavenia TS. Vplyvom TS pri 45 a 50°C došlo k významnému poklesu obsahu chlorofylu *b*. Ďalej TS inicioval nárast dvoch hlavných markerov oxidatívneho stresu, a to peroxidu vodíka a lipidovej peroxidácie. V rámci obranných mechanizmov bola zvýšená aj celková antioxidačná kapacita a pomer GSH²/GSSG počas neskoršej fáze TS. U guajakolperoxidázy bol zaznamenaný signifikantný nárast aktivity najmä po 4 h, aktivita superoxididmutázy a katalázy vzrástla po 4 a 6 h od vystavenia TS. V ranej fáze boli detekované metódou Western blot vyššie hladiny Hsp70.

| | |
|---------------|---|
| Kľúčové slová | ROS, oxidatívny stres, antioxidanty, heat shock proteíny, superoxididmutáza, guajakolperoxidáza, kataláza |
| Počet strán | 67 |
| Počet príloh | 0 |
| Jazyk | Slovenský |

Bibliographical identification

| | |
|--------------------------|--|
| Author's name | Nina Kucháriková |
| Title | Effect of heat stress stimuli on reactive oxygen species metabolism in leaves of tomato genotype Micro-Tom |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Department of Biochemistry |
| Supervisor | Mgr. Tereza Tichá, Ph.D. |
| The year of presentation | 2018 |

Abstract

The bachelor thesis is focused on the characterization of reactive oxygen species (ROS), the key molecules and radicals involved in the plant signaling pathways. As a result of excessive production of ROS due to heat stress (TS), oxidative damage of cellular components can occur. At the same time proceeds activation of other signaling pathways associated with protection against oxidative stress through enzyme and non-enzyme antioxidants and heat shock protein (Hsp) synthesis.

In the experimental part the influence of TS at 40, 45 and 50 °C for 2 h was studied on the activation of the defensive mechanisms of *Solanum lycopersicum* cultivar Micro-Tom in the 2, 3, 4, 6, 8 and 26 h period after exposure to TS. The effect of TS at 45 and 50 °C showed a significant decrease in chlorophyll *b* content. Furthermore, TS initiated an increase in two major markers of oxidative stress, namely hydrogen peroxide and lipid peroxidation. Within the defensive mechanisms, the overall antioxidant capacity and the GSH²/GSSG ratio were also increased during the later phase of TS. Guajacol peroxidase showed a significant increase in activity, especially after 4 h, the activity of superoxide dismutase and catalase increased 4 and 6 h after TS exposure. Using Western blot, in the early phase were detected higher levels of Hsp70.

| | |
|----------------------|--|
| Keywords | ROS, oxidative stress, antioxidants, heat shock proteins, superoxid dismutase, guaiacol peroxidase, catalase |
| Number of pages | 67 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Slovak |

OBSAH

| | |
|--|----|
| CIELE PRÁCE | 8 |
| 1 ÚVOD..... | 9 |
| 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENIA PROBLEMATIKY..... | 10 |
| 2.1 Kyslík v biologických systémoch | 10 |
| 2.2 Produkcia ROS u rastlín..... | 12 |
| 2.2.1 Mitochondrie..... | 13 |
| 2.2.2 Chloroplasty..... | 14 |
| 2.2.3 Peroxizómy a iné zdroje produkcie ROS v rastlinách | 15 |
| 2.3 Úloha ROS pri pôsobení abiotického stresu | 16 |
| 2.3.1 Pôsobenie ťažkých kovov | 17 |
| 2.3.2 Vplyv sucha | 18 |
| 2.3.3 Povodne | 18 |
| 2.3.4 Salinita | 18 |
| 2.3.5 Vplyv extrémnych teplôt | 19 |
| 2.4 Signálne dráhy ROS..... | 21 |
| 2.5 NADPH oxidáza | 23 |
| 2.6 ROS a biochemické deje v bunke | 25 |
| 2.6.1 Peroxidácia lipidov | 25 |
| 2.6.2 Oxidácia proteínov..... | 27 |
| 2.6.3 Poškodenie DNA | 28 |
| 2.7 Antioxidačné systémy v bunke | 29 |
| 2.7.1 Enzýmové antioxidanty | 29 |
| 2.7.2 Neenzýmové antioxidanty | 33 |
| 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ..... | 35 |
| 3.1 Materiál a prístroje..... | 35 |
| 3.1.1 Chemikálie | 35 |
| 3.1.2 Prístroje a vybavenie..... | 35 |
| 3.2 Biologický materiál..... | 36 |
| 3.2.1 <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom..... | 36 |
| 3.2.2 Teplotný stres..... | 36 |
| 3.3 Experimentálne metódy | 37 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.3.1 | Stanovenie obsahu chlorofylu..... | 37 |
| 3.3.2 | Stanovenie obsahu peroxidu vodíka | 37 |
| 3.3.3 | Stanovenie obsahu redukovaného a oxidovaného glutatiónu | 38 |
| 3.3.4 | Stanovenie lipidovej peroxidácie..... | 38 |
| 3.3.5 | Stanovenie celkovej antioxidačnej kapacity | 39 |
| 3.3.6 | Stanovenie enzýmovej aktivity | 40 |
| 3.3.7 | Detekcia Hsp70 metódou Western blot | 42 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUSIA | 45 |
| 4.1 | Zmeny obsahu chlorofylu v listoch po expozícii teplotnému stresu..... | 45 |
| 4.2 | Vplyv teplotného stresu na produkciu peroxidu vodíka a lipidovú peroxidáciu..... | 47 |
| 4.3 | Zapojenie neenzýmových antioxidantov v obrannej reakcii | 49 |
| 4.4 | Zapojenie enzýmových antioxidantov v obrannej reakcii | 51 |
| 4.4.1 | Aktivita guajakolperoxidázy | 51 |
| 4.4.2 | Aktivita katalázy | 52 |
| 4.4.3 | Aktivita superoxidodismutázy | 53 |
| 4.5 | Zmeny hladín heat shock proteínu 70 | 54 |
| 5 | ZÁVER | 56 |
| 6 | LITERATÚRA | 57 |
| 7 | ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK..... | 65 |

CIELE PRÁCE

Teoretická časť

Cieľom teoretickej časti bakalárskej práce bolo spracovanie literárnej rešerše zameranej na úlohu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) u rastlín pri pôsobení abiotických stresových podmienok so zameraním na heat shock proteíny a kľúčové enzýmy zapojené v antioxidantných mechanizmoch. Ďalej boli spracované poznatky týkajúce sa oxidatívneho stresu a jeho toxického pôsobenia u rastlín.

Experimentálna časť

Cieľom experimentálnej časti bolo štúdium obranných mechanizmov so zameraním na produkciu a degradáciu ROS v ranej a neskoršej fáze od vystavenia teplotnému stresu (TS) u odrody rajčiaka *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom.

1. Príprava rastlinného materiálu, kultivácia za podmienok TS pri 40 °C, 45 °C a 50 °C, zber vzoriek v časových intervaloch 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po vystavení TS.
2. Spektrofotometrické stanovenie obsahu chlorofylu, peroxidu vodíka, redukovaného a oxidovaného glutatiónu, antioxidantnej kapacity a lipidovej peroxidácie.
3. Meranie aktivity antioxidantných enzýmov guajakolperoxidázy, katalázy a superoxiddismutázy.
4. Detekcia heat shock proteínu 70 metódou Western blot.

1 ÚVOD

Behom svojho života sú rastliny vystavované mnohým nepriaznivým faktorom životného prostredia. Biotické stresové faktory sú predovšetkým biologickej povahy, zahŕňajú pôsobenie patogénu, iných druhov rastlín, živočíchov a človeka, či starnutie. Medzi abiotické stresové faktory, ktoré sú najmä fyzikálne a chemické, patrí extrémna teplota – nízka alebo vysoká, nedostatok vody, ťažké kovy, vysoké alebo nízke pH, vietor a herbicídy. Pôsobenie biotických a abiotických stresových faktorov u rastliny je príčinou spomalených životných funkcií, poškodenia orgánov a môže viesť až k uhynutiu rastliny.

Stresové faktory pôsobiace na rastlinu vyvolávajú tzv. oxidatívny stres prejavujúce sa ako náhla tvorba reaktívnych foriem kyslíka (ROS). V nízkych koncentráciách sú ROS nevyhnutné pre lignifikáciu a slúžia ako signálne molekuly, avšak ich nadmerná produkcia má negatívny dopad na život rastlín. ROS zahŕňajú voľné radikály a zlúčeniny neradikálovej povahy. Ako voľný radikál definujeme ktorúkoľvek chemickú entitu, ión, atóm či molekulu, ktorá obsahuje vo vonkajšej sfére svojho elektrónového obalu minimálne jeden nespárovaný elektrón. ROS môžu vznikať enzýmovou a neenzýmovou cestou. Medzi zástupcov ROS zaraďujeme singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), superoxidový anión-radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$), perhydroxylový radikál ($\cdot\text{O}_2\text{H}$) a peroxid vodíka (H_2O_2). Na odstránenie ROS si rastliny vyvinuli účinné obranné systémy v podobe špecifických enzýmov a neenzýmových antioxidantov.

2 SÚČASNÝ STAV ŘIEŠENIA PROBLEMATIKY

2.1 Kyslík v biologických systémoch

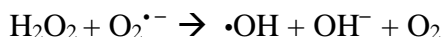
Z chemického hľadiska je molekulárny kyslík paramagnetická molekula s tripletovým základným stavom, vzhľadom k tomu, že má dva nepárové elektróny s rovnakým spinovým kvantovým číslom. Avšak, obmedzenie spinu robí kyslík ochotným prijímať svoje elektróny, čo vedie ku vzniku ROS. Interakcia s iným paramagnetickým centrom je spôsob ako môže kyslík toto spinové obmedzenie prekonať, prechodné kovy, ako napríklad železo či meď, majú často nepárové elektróny. Z celkovej spotreby kyslíku, bolo odhadnutých 1-2 % spejúcich k tvorbe ROS v rastlinných pletivách (Bhattacharjee, 2005). Molekulárny kyslík je relatívne nereaktívny a môže byť aktivovaný rôznymi mechanizmami (Blokhina *et al.*, 2003). Prvým spôsobom aktivácie je absorpcia dostatočnej energie, kedy dochádza k obráteniu spinu nepárového elektrónu a vzniká $^1\text{O}_2$. Druhým mechanizmom aktivácie kyslíka je jedoelektrónová redukcia za vzniku $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 či $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Tvorba singletového kyslíka ($^1\text{O}_2$) je podmienená reakciou medzi tripletovým kyslíkom ($^3\text{O}_2$) a chlorofylom v tripletovom stave, ku ktorého formácii dochádza pri energetických stratách počas fotosyntézy. Jeho tvorba má škodlivý účinok ako na fotosystém I (PSI) tak aj na fotosystém II (PSII) a v krajnom prípade môže viesť k narušeniu celej fotosyntézy. V porovnaní s molekulárnym kyslíkom je $^1\text{O}_2$ veľmi reaktívny, nadmerná produkcia môže vyústiť peroxidáciu lipidov či poškodením nukleových kyselín (Wagner *et al.*, 2003; Krieger-Liszkay *et al.*, 2008). Nízka vnútrobunková koncentrácia CO_2 v chloroplastoch, podmienená rôznymi abiotickými stresovými faktormi, priaznivo podporuje tvorbu $^1\text{O}_2$. Popri jeho negatívnych účinkoch na život bunky, využívajú $^1\text{O}_2$ niektoré druhy, produkujúce rôzne typy sekundárnych metabolitov s fotosyntetickými vlastnosťami, na zvýšenie ich účinnosti ako antimikrobiálnych látok (Flors a Nonell, 2006). Bolo dokázané, že životnosť $^1\text{O}_2$ v bunke je približne 3 μs , vo vode je schopný zotrvať skoro 4 μs a v polárnom rozpúšťadle 100 μs (Hatz *et al.*, 2007).

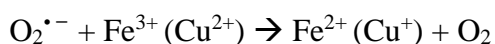
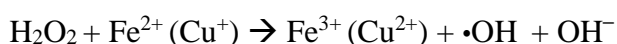
Najreaktívnejšia forma kyslíka je $\cdot\text{OH}$ (Winston, 1990), ktorý môže vznikať priamo v tzv. Haber-Weissovej reakcii H_2O_2 a $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Rovnica 1.) (Haber a Weiss, 1934). Avšak, táto reakcia je za normálnych podmienok pomalá a neúčinná. Naopak Fentonovou reakciou

(rovnica 2.), ktorá zahŕňa oxidáciu prechodných kovov, ako meďnaté a železnaté ióny, sa tvorí značné množstvo $\cdot\text{OH}$ (Fenton, 1894). Vzhľadom k faktu, že $\cdot\text{OH}$ je veľmi silným oxidantom, môže slúžiť ako iniciátor radikálovej reťazovej reakcie, ktorá vedie k peroxidácii lipidov, inaktivácii enzýmov a poškodeniu nukleových kyselín (Lamb a Dixon, 1997).

Rovnica 1. Haber-Weissova reakcia vzniku $\cdot\text{OH}$



Rovnica 2. Fentonova reakcia vzniku $\cdot\text{OH}$ zahŕňajúca oxidáciu prechodných kovov

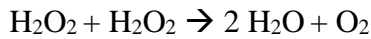


Univalentná redukcia molekulárneho kyslíka podmieňuje tvorbu $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Winston, 1990). Hlavným miestom produkcie $\text{O}_2^{\cdot-}$ je primárny elektrónový akceptor PSI, ktorý je viazaný na tylakoidnú membránu. $\text{O}_2^{\cdot-}$ má funkciu ako oxidačné aj redukčné činidlo, schopné oxidovať napríklad síru, niektoré aminokyseliny, NADPH a askorbát (Dat *et al.*, 2000). $\text{O}_2^{\cdot-}$ sa v živých bunkách nachádza spolu so svojou protonovanou formou, perhydroxylovým radikálom ($\cdot\text{O}_2\text{H}$), ktorý je viac hydrofóbny a jednoduchšie preniká lipidovou dvojvrstvou membrán, kde iniciuje oxidáciu lipidov odoberaním protónov z polynenasýtených mastných kyselín (Vranová *et al.*, 2002).

Mierne reaktívny s pomerne dlhým polčasom rozpadu (1 ms) je peroxid vodíka (H_2O_2), ku ktorého formácii dochádza jednostrannou redukciou $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Vranová *et al.*, 2002). Vzniká enzymatickou reakciou glykolát oxidázy (EC 1.1.3.1) v glyoxizómoch počas fotorespirácie, enzymovými reakciami flavin oxidáz či β -oxidáciou mastných kyselín. Jeho nadmerná tvorba môže inhibovať fixáciu CO_2 a inaktivovať enzýmy Calvinovho cyklu. H_2O_2 hrá dvojakú rolu u rastlín, jednak je kľúčovým regulátorom viacerých fyziologických procesov ako napríklad senescencia (Peng *et al.*, 2005), bunkový cyklus (Mittler *et al.*, 2002), fotorespirácia, fotosyntéza (Noctor a Foyer, 1998), rast a vývoj rastlín (Foreman *et al.*, 2003), v tolerancii voči rôznym biotickým a abiotickým stresom, avšak v opačnom prípade, vo vysokých koncentráciách vedie k programovanej bunkovej smrti (Quan *et al.*, 2008). V rastlinnej bunke môže H_2O_2 podliehať disproporcionácii katalyzovanej katalázou (EC 1.11.1.6) za vzniku vody a kyslíka (rovnica č. 3), naďalej môže byť využitý ako

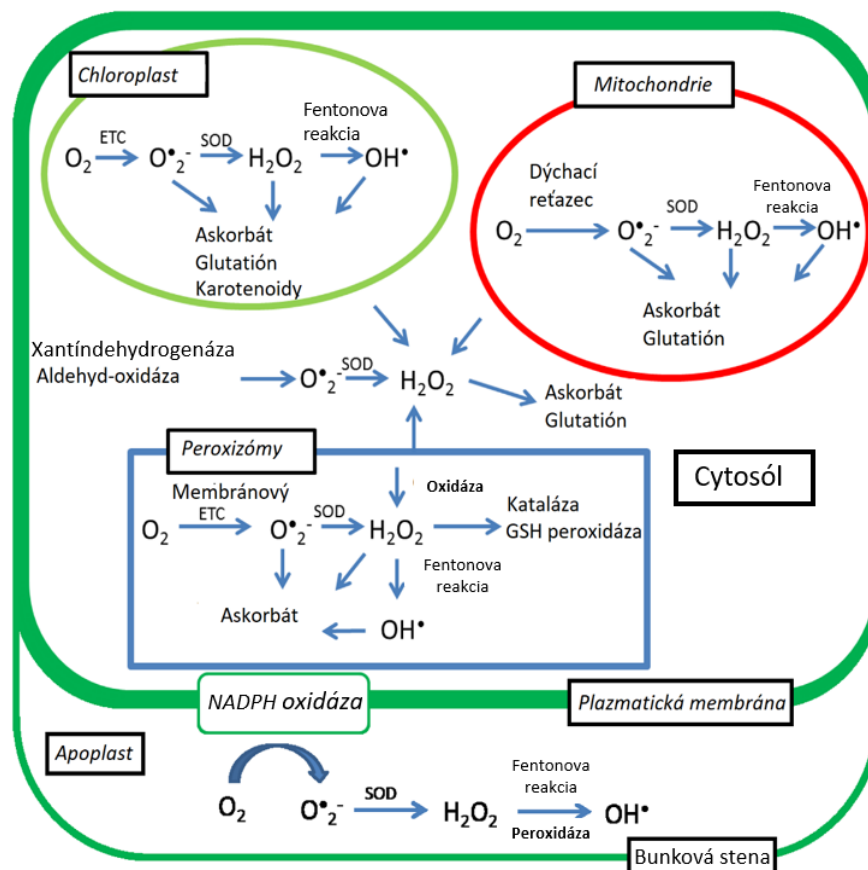
substrát u rôznych peroxidáz či detoxifikovaný v tzv. askorbát-glutatiónovom cykle (viď podkapitola 2.3.5).

Rovnica č. 3 – disproporcionácia H₂O₂



2.2 Produkcia ROS u rastlín

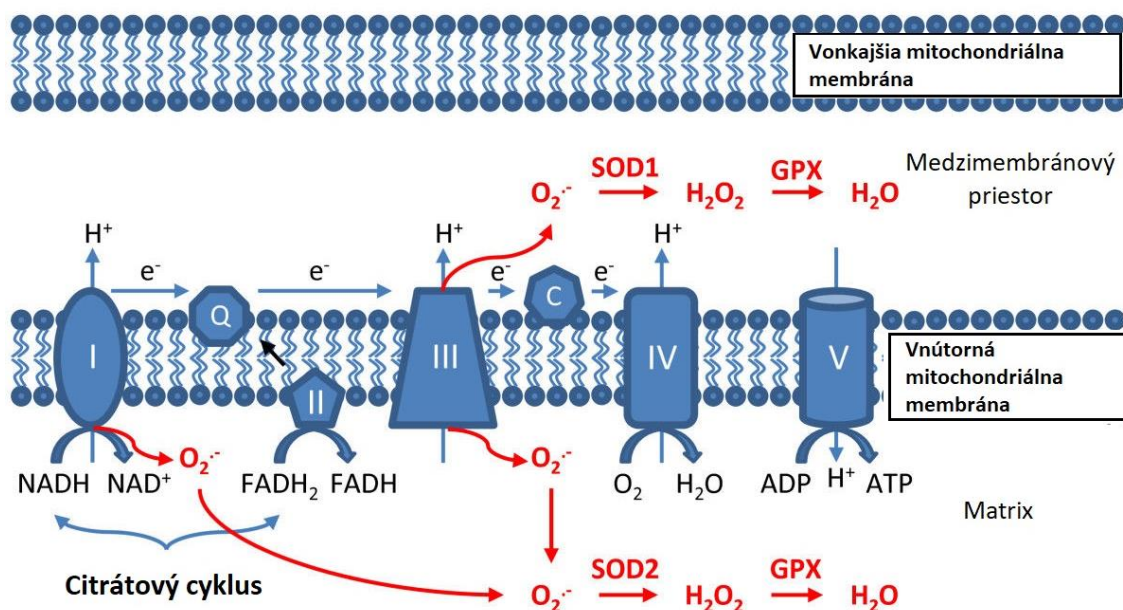
Hlavných zdrojov ROS v rastlinných bunkách sú organely ako chloroplasty, mitochondrie a peroxizómy vďaka ich metabolickej aktivite s vysokými oxidačnými schopnosťami a intenzívnej rýchlosti toku elektrónov (Temple *et al.*, 2005). Pre vývojové procesy i stresové reakcie v rastlinnej bunke sú kľúčové redoxné reakcie prebiehajúce medzi intracelulárnymi oddeleniami (Obr. 1).



Obr. 1 Stresové reakcie prebiehajúce medzi jednotlivými intracelulárnymi oddeleniami v rastlinnej bunke (prevzaté z Jajic *et al.*, 2015).

2.2.1 Mitochondrie

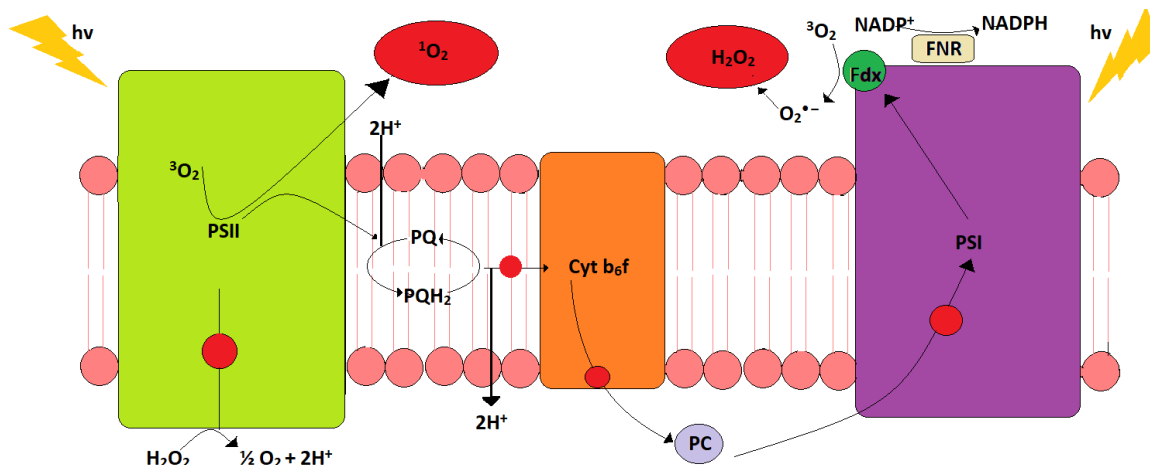
Vnútoraná mitochondriálna membrána obsahuje komplexy proteínov, kde sa prenosom elektrónov tvorí protónový gradient naprieč membránou, pričom sa tento proces spája s produkciou ATP. Pri úniku elektrónov na kyslík za normálnych respiračných podmienok dochádza k produkcii ROS, avšak stresové podmienky zintenzívňujú proces ich tvorby. Hlavným miestom produkcie ROS v mitochondriách je komplex I (NADH-Q-oxidoreduktáza alebo ubichinon-reduktáza) a komplex III (cytochrom *c* reduktáza) (Obr. 2) (Møller, 2001). Primárnym donorom elektrónov pre tvorbu ROS je semichinón (\bullet QH), esenciálna súčasť dýchacieho reťazca vzniknutá z chinónovej štruktúry ubichinónu (Q) prijatím jedného elektrónu a jedného protónu. Za stresových podmienok dochádza však k priamemu prenosu elektrónov z komplexu I a III na kyslík. Produkcia ROS v mitochondriách nastáva, keď rýchlosť prenosu elektrónov prekročí kapacitu dráhy alternatívnych oxidáz a cyklooxygenázy (EC 1.14.99.1) v dôsledku nadprodukcie elektrónov (Møller, 2001; Rhoads *et al.* 2006). K poškodeniu mitochondriálnych proteínov dochádza prostredníctvom ROS napríklad oxidačnou modifikáciou sulfhydrylových skupín v štruktúre kyseliny lipoovej, čo vedie k inhibícii komplexu glycínkarboxylázy (EC 4.1.1.64), komplexu 2-oxoglutarátdehydrogenázy (EC 2.3.1.61) a pyruvátdehydrogenázy (EC 1.2.4.1) či oxidáciou proteínových reziduí ako Cys, Met, Arg, Lys, Pro a Thr (Dean *et al.*, 1997). ROS interagujú s mitochondriálnou DNA, čo má vážny vplyv na replikáciu a dochádza k aktivácii opravných mechanizmov a tiež ovplyvňuje spätnú signalizáciu (Rhoads *et al.*, 2006).



Obr. 2 Tvorba a odstraňovanie ROS v mitochondriách. Elektróny prechádzajúce od donorov, ktorými sú NADH a FADH₂ reťazcom ku O₂ za jeho následnej redukcie za vzniku H₂O v komplexe IV. Mitochondriálne ROS sa produkujú v dôsledku úniku elektrónov za tvorby O₂^{•-} v komplexe I a III. Vzniknutý O₂^{•-} je náhle dismutovaný na H₂O₂ superoxididismutázou 1 v medzimembránovom priestore a superoxididismutázou 2 v matrixe. Následne je H₂O₂ redukovaný na H₂O glutatiónperoxidázou (prevzaté z Madamanchi a Runge, 2007).

2.2.2 Chloroplasty

Počas svetelnej fázy fotosyntézy sú chloroplasty hlavným miestom produkcie ROS vďaka intenzívnemu prenosu elektrónov. Pri slabom osvetlení je v PSII produkovaný ¹O₂ ako vedľajší produkt fotosyntézy. Iný spôsob smerujúci k tvorbe O₂^{•-} v chloroplastoch je Mehlerova reakcia, pri ktorej dochádza k odklonu elektrónov od ferredoxínu ku kyslíku, ktorý je redukovaný pričom primárnym produktom je už spomenutý O₂^{•-}, z ktorého môže vzniknúť nebezpečnejší •OH alebo H₂O₂ (Polle, 2001) (Obr. 3). Pomocou výkonných antioxidantných mechanizmov môžu byť ROS udržiavané pod kontrolou, ale pôsobením rôznych stresových faktorov dochádza k obmedzenej fixácii a redukcii oxidu uhličitého v Calvinovom cykle a k následnému zníženiu využitia NADPH, ktoré vedie k odchýleniu elektrónov z elektrónového transportného reťazca za vzniku O₂^{•-} (Asada, 1999).

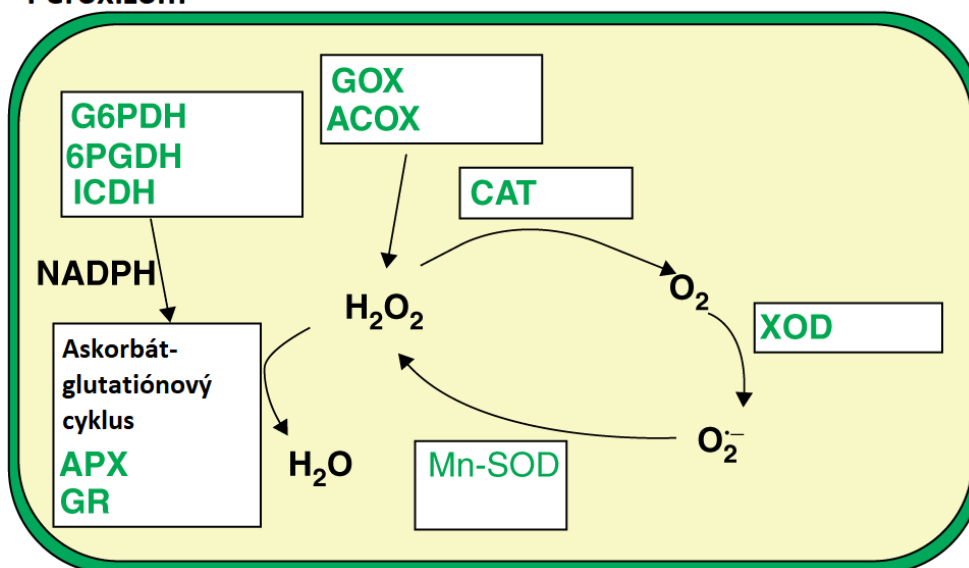


Obr. 3 Najväčším zdrojom reaktívnych foriem kyslíka (ROS) v rastlinách sú chloroplasty a fotochemické procesy fotosyntézy. Pri fotosyntetickom toku elektrónov v tylakoidnej membráne chloroplastu sa uplatňujú molekuly elektrónových prenášačov. V tylakoidných membránach sa nachádzajú integrálne svetlozberné antény a integrálne proteínové komplexy, ktoré dokopy tvoria fotosyntetický aparát: fotosystém II (PSII) so svojím svetlozberným komplexom, cytochróm b6f komplex (Cyt b6f), fotosystém I (PSI) so svojím svetlozberným komplexom a ATP-syntázy. Tieto proteínové komplexy sa uplatňujú pri transportu elektrónov a protónov cez tylakoidnú membránu. Počas tohto procesu môžu byť niektoré elektróny prenesené na kyslík, ktorý je aktivovaný, a tým vznikajú ROS. Ak elektróny na zredukovanom ferredoxíne (Fdx) zostávajú nevyužitú, môže dochádzať k tvorbe H₂O₂ či O₂^{•-}. Skratky: Cyt, cytochróm; FNR, ferredoxín- NADP⁺ reduktáza; PC, plastocyanín (prevzaté z Kumar, 2014).

2.2.3 Peroxizómy a iné zdroje produkcie ROS v rastlinách

Dôsledkom metabolickej aktivity peroxizómov, zahrňujúcej β -oxidáciu mastných kyselín, fotorespiračný cyklus a glyoxalátový cyklus, je vytváraný H₂O₂ a O₂^{•-} (Obr. 4) (Corpas *et al.*, 2001). Oxidáciou xantínu alebo hypoxantínu na kyselinu močovú aktivitou enzýmu xantínoxidázy (XOD, EC 1.17.3.2) vznikajú v peroxizónoch O₂^{•-}. Následne superoxiddismutáza (SOD, EC 1.15.1.1) rozkladá O₂^{•-} za vzniku H₂O₂, ktorý je degradovaný katalázou (CAT, EC 1.11.1.6), najrozšírenejším enzýmom prítomným iba v peroxizónoch. Účinok CAT je výrazne nižší ako účinok iných antioxidačných systémov, napríklad askorbátperoxidázy (APX, EC 1.11.1.11), pretože znižuje obsah H₂O₂ len na milimolárne koncentrácie (Igambardiev a Lea 2002). Ďalším dôležitým účastníkom udržiavania rovnováhy ROS v peroxizomálnych membránach prostredníctvom oxidácie NADH je enzým monodehydroaskorbátreduktáza (MDAR, EC 1.6.5.4) (Corpas *et al.*, 2001) (viď podkapitole 2.7.1).

Peroxisóm

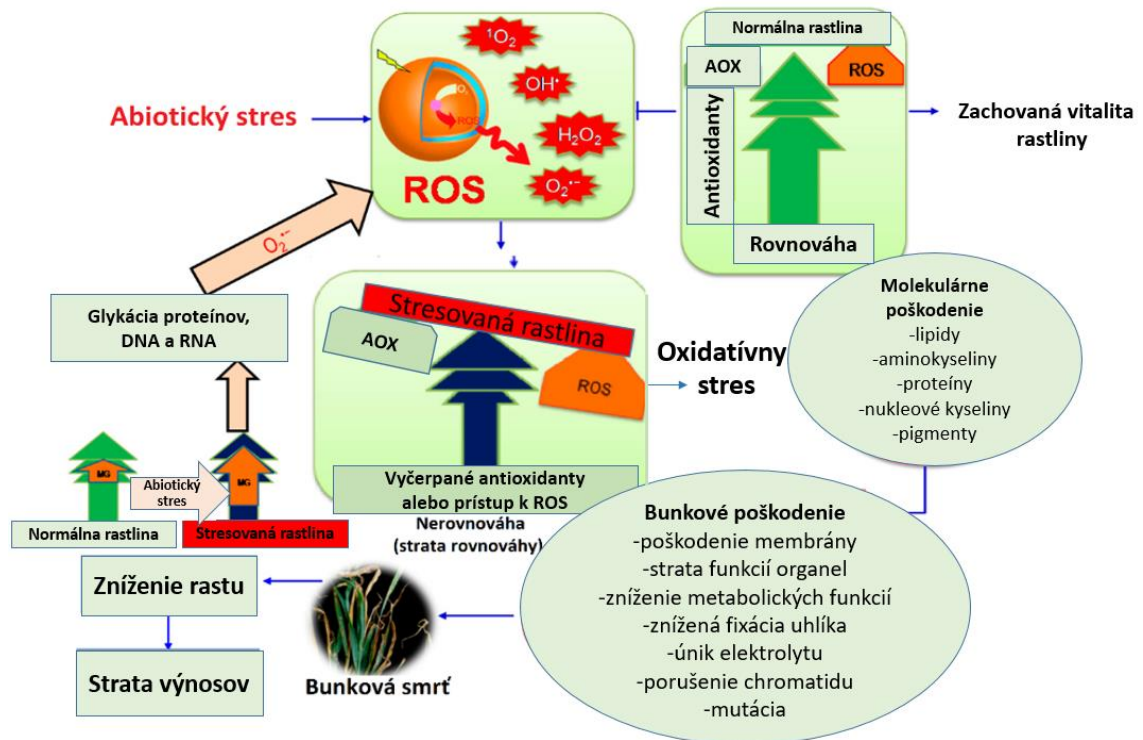


Obr. 4 Model metabolizmu ROS v peroxizómoch. H₂O₂ je generovaný fotorespiračným enzýmom glykolátoxidázou (GOX) a acyl-CoA oxidázou (ACOX) z β -oxidácie mastných kyselín a zachytávaný katalázou (CAT) a askorbátperoxidázou (APX). Glutatiónreduktáza (GR) využíva NADPH produkovaný glukóza-6-fosfát dehydrogenázou (G6PDH), 6-fosfoglukonát dehydrogenázou (6PGDH) a isocitrátdehydrogenázou (ICDH). Substrátom pre Mn-superoxiddismutázu (Mn-SOD) je O₂⁻ vytvorený xantinoxidázou (XOD) (prevzaté z Mateos *et al.*, 2003).

Ďalšími dôležitými zdrojmi produkcie ROS sú detoxikačné reakcie katalyzované cytochrómom P450 v cytoplazme a endoplazmatickom retikule (Dybing *et al.*, 1976). pH-dependentné peroxidázy nachádzajúce sa v bunkovej stene, oxalátoxidáza (EC 1.2.3.4) a aminooxidáza (EC 1.4.3.2) apoplastu rastlinnej bunky sa taktiež považujú za zdroje produkcie ROS (Bolwell a Woftastek, 1997). Rovnako sú ROS produkované aj v plazmatickej membráne, kde rastlina behom stresovej reakcie tvorí O₂⁻ vďaka enzymovej aktivite NADPH-oxidázy (EC 1.6.3.1) (viď podkapitola 2.5).

2.3 Úloha ROS pri pôsobení abiotického stresu

Pod pojmom abiotický stres sa rozumie pôsobenie extrémnej teploty, solí, ťažkých kovov, enormného vetra či povodní na život rastliny. Za stresových podmienok v závislosti na intenzite dochádza k výraznej akumulácii ROS, spôsobujúcej oxidatívny stres a v konečnom dôsledku môže viesť až k bunkovej smrti (Obr. 5).



Obr. 5 Úloha reaktívnych foriem kyslíka (ROS) pri pôsobení abiotického stresu u rastlín. K vzniku oxidačného stresu v bunkách dochádza pri nadmernej produkcii ROS napríklad vplyvom pôsobenia abiotických stresových faktorov. V závislosti na indukcii obranných mechanizmov rastliny môže dôjsť k zamedzeniu toxického pôsobenia ROS prostredníctvom aktivácie antioxidačných systémov (AOX). V prípade nerovnováhy medzi produkciou ROS a nedostatočnej aktivity AOX je vyvolaný oxidatívny stres, ktorého pôsobením dochádza k molekulárnym poškodeniam bioaktívnych molekúl. Na bunkovej úrovni dochádza k nezvratným zmenám vedúcim až k bunkovej smrti, zníženie rastu rastliny a strate výnosov. Za abiotických stresových podmienok dochádza k produkcii metylglyoxalu (MG). MG je toxický pri vysokých koncentráciách, ale v nízkych koncentráciách má signalizačné úlohy. U stresovaných rastlín dochádza vplyvom nadmernej produkcie MG ku glykácii proteínov a nukleových kyselín. Počas glykácie sú generované voľné radikály, napríklad superoxidový radikál $O_2^{\cdot-}$. Skratky: hydroxylový radikál $\cdot OH$, peroxid vodíka H_2O_2 , superoxidový radikál $O_2^{\cdot-}$, singletový kyslík 1O_2 , metylglyoxal MG, antioxidanty AOX (prevzaté z Hasanuzzaman *et al.*, 2012).

2.3.1 Pôsobenie ťažkých kovov

V rastlinnej fyziológii je termín "ťažký kov" všeobecne zaužívaný na označenie akéhokoľvek kovu alebo polokovu, ktorý je aj za nízkych koncentrácií pre rastlinu toxický (Singh *et al.*, 2011). Prostredníctvom transportérov prítomných v plazmatickej membráne vstupujú ťažké kovy do rastlinných buniek a môžu byť buď transportované do nadzemnej časti rastliny alebo zadržované v koreňoch v závislosti od detoxikačných mechanizmov u jednotlivých druhov (Tangahu *et al.*, 2011). V súčasnosti je známe, že jeden z prvých bunkových signálov v reakcii na prebytok ťažkých kovov je zvyšovanie hladín ROS. Práve

ťažké kovy môžu iniciovať produkciu ROS v mitochondriách, chloroplastoch a apoplaste, kde stimulujú aktivitu NADPH oxidázy (EC 1.6.3.1) (Chmielowska-Bak *et al.*, 2014).

2.3.2 Vplyv sucha

Deficit vody značne obmedzuje rast a produktivitu rastlín. ROS a oxid dusnatý (NO) sú veľmi dôležitými prvkami u rastlín tolerantných na sucho, ktoré majú zväčša prísnu kontrolu nad pohybmi prieduchov a rovnováhou bunkového metabolizmu. Tvorba ROS počas sucha zahŕňa zmeny v metabolických procesoch rastliny, a to napríklad pokles aktivity RUBISCA (Parry *et al.*, 2002), čo prostredníctvom Calvinovho cyklu ohrozuje fixáciu CO₂ a regeneráciu NADP⁺. Výsledkom je nadmerná redukcia transportu elektrónov elektrónovým transportným reťazcom v chloroplastoch a únik elektrónov ku kyslíku za vzniku ROS, najmä Mehlerovou reakciou a fotorespiráciou (Carvalho, 2008).

2.3.3 Povodne

Niekoľko dôkazov naznačuje, že zníženie obsahu kyslíka spôsobeného záplavami môžu rastliny vnímať rôznymi spôsobmi. Niektoré z týchto mechanizmov môžu byť vnímané ako zmeny v dynamike produkcie či spotreby ROS a NO, k čomu dochádza inhibíciou mitochondriálneho elektrónového transportu (Rhoads a Subbaiah, 2007). Štúdie, ktoré sa zamerali na Arábkovku thalovú (*Arabidopsis thaliana*), naznačujú, že deficit kyslíka indukuje tvorbu ROS v komplexe III, čím je spustená prechodná aktivácia signalizačnej MAP-kinázovej kaskády (Chang *et al.*, 2012). Navyše, regulačné odpovede sú v spolupráci s etylénom, hormónom zodpovedným za reakcie rastlín na stresové podmienky (Steffens *et al.*, 2012).

2.3.4 Salinita

V dôsledku zvýšenej koncentrácie solí v pôde dochádza u rastlín k zníženiu vodného potenciálu či narušeniu intracelulárnej iónovej homeostázy smerujúcej k membránovej dysfunkcii a bunkovej smrti. Negatívny účinok salinity je pozorovaný na úrovni celej rastliny. Je ovplyvnené klíčenie, rast, produkcia fotosyntetických pigmentov, fotosyntéza,

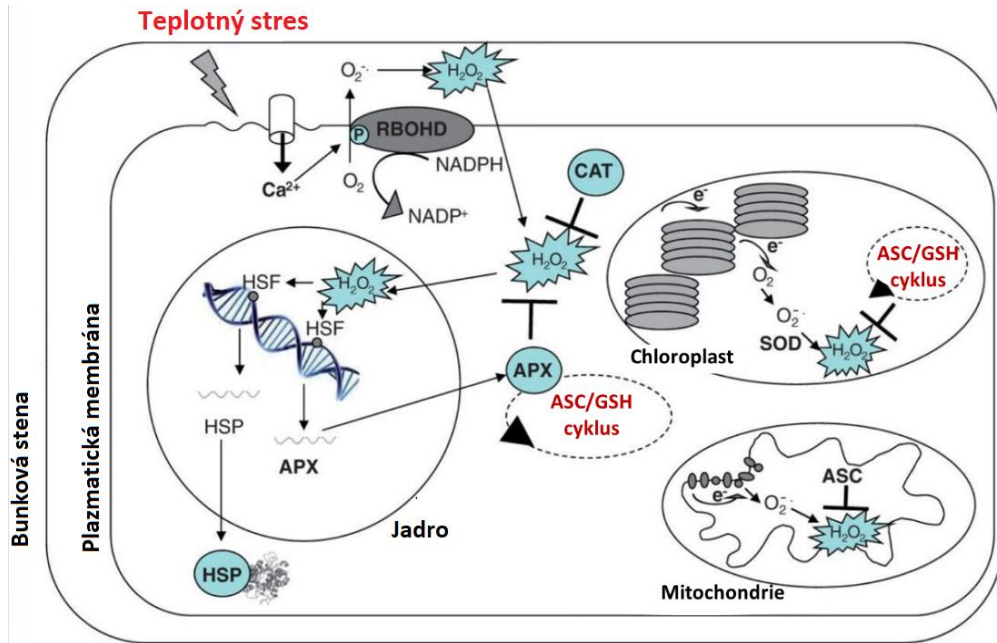
rovnováha živín, dochádza k oxidatívne stresu, čo následne významne ovplyvňuje vývoj rastlín a s tým spojený výnos poľnohospodársky dôležitých plodín. V dôsledku salinitného stresu môže dochádzať až k uhynutiu rastliny (Fernández-Torquemada a Sánchez-Lizaso, 2013). Rastliny tolerantné voči salinitnému stresu si vyvinuli radu rôznych obranných mechanizmov, medzi ktoré patrí iónové členenie, homeostáza, transport a vychytávanie iónov, aktivácia antioxidantných enzýmov či syntéza antioxidantných zlúčenín a polyamínov (Gupta a Huang, 2014). Všetky tieto procesy sú spúšťané prostredníctvom signalizačných molekúl, najmä ROS, NO a rastlinných hormónov. Spomedzi ROS, je významnou molekulou H₂O₂, ktorá zvyšuje aktivitu špecifických enzýmov a taktiež mení expresiu génov v odozve na vysokú koncentráciu solí predovšetkým v koreňových bunkách (Miller *et al.*, 2010).

2.3.5 Vplyv extrémnych teplôt

Obdobne ako aj vplyv ostatných abiotických stresov, extrémne teploty zahŕňajú zvýšené hladiny ROS, ktoré sú esenciálne v aklimatizácii na vysoké či nízke teploty (Obr. 6) (Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

Heat shock proteíny (Hsp) slúžia ako tzv. molekulárne chaperoniny, ktoré sú dôležité pri posttranslačnom skladaní proteínov. Ďalej stimulujú opravné mechanizmy, čiastočne sa podieľajú na translokácii a doprave nestabilných proteínov určených pre degradáciu v lyzozómoch alebo proteazómoch (Zhang *et al.*, 2005). Hsp sú schopné rozpoznať nestabilné alebo inaktívne proteíny a interagovať s nimi. Veľká časť Hsp sa v bunke exprimuje konštitutívne v nízkych hladinách, avšak v niektorých vývojových štádiách a pri pôsobení stresových faktorov dochádza k ich intenzívnejšej expresii. Expresia Hsp je primárne regulovaná na úrovni transkripcie tzv. heat shock faktorov (Hsf) (Obr. 6) (Mishra *et al.*, 2002). Hsf sú lokalizované v cytosóle, kde tvoria triméry, fosforylujú sa a ďalej sú translokované do jadra. V jadre sa Hsf viažu na konkrétne časti promotora v géne, ktorý kóduje Hsp a indukujú tak ich expresiu (Morimoto *et al.*, 1992). Významnú úlohu v regulácii produkcie Hsp zohrávajú ROS, hlavne molekula H₂O₂, ktorá sa podieľa na signálnych procesoch, zvyšuje expresiu týchto proteínov (Obr. 6) (Konigshofer *et al.*, 2008). Hsf sú priamo aktivované teplotou alebo zvýšenou hladinou ROS, a to buď priamou cestou alebo cez dráhu mitogénom aktivovaných proteín kináz (MAPK). Hsf iniciujú

expresiu génu pre Hsp, ktorého vysoká hladina môže pozitívne regulovať aktivitu antioxidantných enzýmov (Driedonks *et al.*, 2015).



Obr. 6 Redoxné systémy zapojené v obrannej reakcii pri pôsobení teplotného stresu. Percepcia signálu pôsobením zvýšenej teploty na plazmatickú membránu aktivuje Ca^{2+} kanál s následným zvýšením hladín Ca^{2+} v cytosóle. Influx Ca^{2+} aktivuje NADPH oxidázu (RBOHD) jeho fosforyláciou, čo vedie k zvýšenej produkcii reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Pri teplotnom strese sa produkcia ROS zvyšuje tiež v chloroplastoch a mitochondriách. Peroxid vodíka (H_2O_2) pôsobí ako druhý posol a v jadre aktivuje expresiu obranných génov kódujúcich napr. heat shock proteíny (Hsp) či cytosolárnu askorbátperoxidázu (APX). Ďalšie redoxné enzýmy, ako je napríklad superoxiddismutáza (SOD), kataláza (CAT) a enzýmy askorbát-glutathionového cyklu (Ask-GSH), ktoré pracujú v rôznych bunkových kompartmentoch, aby udržali príslušné hladiny ROS (prevzaté z Hasanuzzaman *et al.*, 2013).

Hsp sú klasifikované do piatich hlavných tried v závislosti od ich molekulovej hmotnosti, malé Hsp (s veľkosťou medzi 15-30 kDa), Hsp60, Hsp70, Hsp90 a Hsp100 (Wang *et al.*, 2004). Jednotlivé triedy môžu byť ďalej rozdelené na podtriedy v závislosti od ich intracelulárnej lokalizácii alebo funkcii. Najvýznamnejšia skupina rastlinných Hsp proteínov, ktorá je navodená teplotným stresom, je Hsp70. Podieľajú sa na translácii a translokácii proteínov, ďalej na ich skladaní, potlačení agregácie alebo renaturácii proteínov (Zhang *et al.*, 2005). Hsp70 majú má veľký vplyv na získanie termotolerancie a ochrany buniek pred oxidatívnym stresom (Vierling *et al.*, 1991). V bunkách sú lokalizované v cytosóle, endoplazmatickom retikule, mitochondriách, chloroplastoch a peroxizómoch spolu s ko-chaperoniny Hsp40 a GrpE (Vierling *et al.*, 1991; Boston *et al.*, 1996; Bukau a Horwich, 1998). U väčšiny rastlín dochádza k akumulácii Hsp70 inkubáciou pri 37-45 °C a u niektorých druhov sa hladina Hsp70 zvyšuje aj po inkubácii v chladových podmienkach (Li *et al.*, 1999).

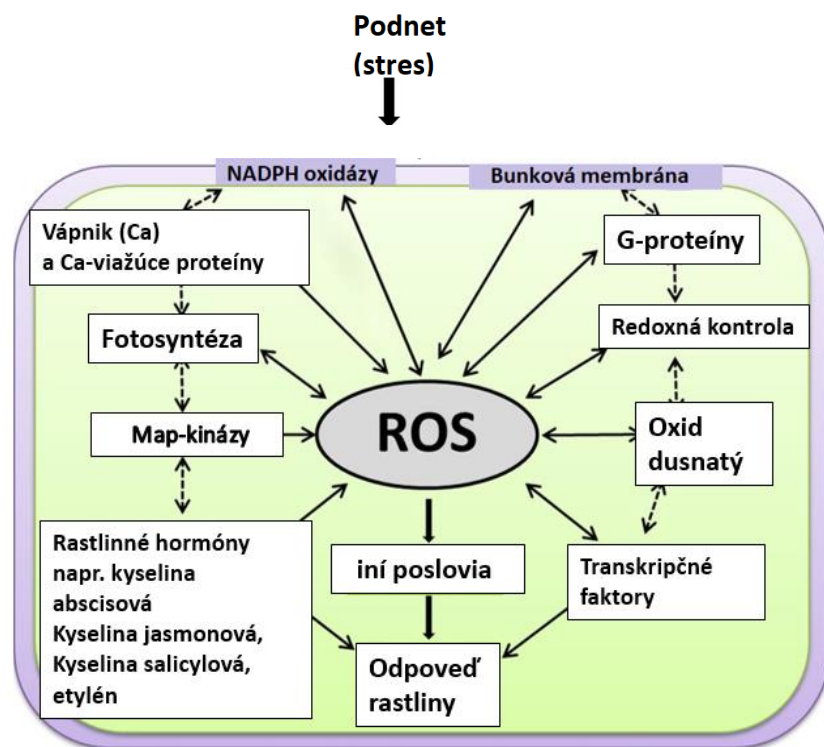
2.4 Signálne dráhy ROS

Pre vysoký stupeň účinnosti signalizačnej molekuly je nutné, aby bola vytvorená rýchlo a efektívne na požiadanie, aby vyvolala jednoznačné účinky v bunke a v prípade, že už nie je potrebná, aby dochádzalo k jej odstráneniu (Neill *et al.*, 2003). Po vyvolaní stresu sa ROS produkujú okamžite, navyše sú veľmi reaktívne, čo spočíva v ich reakciách so sacharidmi, membránovými lipidmi či DNA. Živé bunky si vyvinuli antioxidačné systémy v podobe účinných enzýmových a neenzýmových mechanizmov (viď podkapitola 2.7.1 a 2.7.2), ktoré udržiavajú ROS v normálnych hladinách (Foyer a Noctor, 2005) a robia z nich ideálne komponenty signalizácie. ROS zohrávajú ústrednú signalizačnú úlohu prostredníctvom ich interakcií s ďalšími kľúčovými signalizačnými zložkami vrátane membrán, NADPH oxidázy, G-proteínov, vápniku, redoxnej homeostázy, mitogen-aktivovanými proteinkinázami (MAPK), rastlinnými hormónmi (kyselina salicylová, jasmonová, abscisová a etylén) a transkripčnými faktormi (TF) (Obr. 7).

H₂O₂ produkovaný v chloroplastoch je schopný aktivovať včasné signalizačné reakcie, vrátane TF, čo sú akékoľvek proteíny, ktoré spúšťajú a regulujú transkripciu DNA a biosyntetických génov podieľajúcich sa na produkcii sekundárnych signalizačných poslov. Na druhej strane, H₂O₂ vytváraný v peroxizómoch indukuje transkripciu génov podieľajúcich sa na odpovedi obnovy proteínov (Sewelam *et al.*, 2014). H₂O₂ je slabým

oxidantom a len mierne reaguje s voľne viazanými kovmi, klastrami Fe-S, GSH a voľným cysteínom (Cys). Môže tiež vystupovať ako tzv. druhý posol. Za pomoci zvyškov Cys v signálnych proteínoch a peptidoch, ako sú tioredoxíny, peroxiredoxíny a GSH, je molekula H_2O_2 schopná signálnej transdukcie (Paulsen a Carroll, 2010).

Molekula $O_2^{\cdot-}$, ako vedľajší produkt elektrónových transportných reťazcov v procesoch fotosyntézy a dýchania, je produkovaná oxidázami a peroxidázami bunkových stien. Jej nestabilita sa odráža v zníženej schopnosti plniť funkciu signálnej molekuly, čo je spôsobené jej negatívnym nábojom, v dôsledku ktorého nemôže difundovať cez membrány. Vďaka vysokej reaktivite oxiduje zoskupenia Fe-S rýchlosťou, ktorá je však obmedzená difúziou (Storz *et al.*, 1990). Kľúčovú rolu signalizačných dráh rastlinnej bunky hrá aj plazmatická membrána, ktorá kontroluje účinnosť signalizácie ROS medzi bunkami. Za stresových podmienok polynenasýtené mastné kyseliny interagujú s $\cdot OH$ a 1O_2 , čo spôsobuje tvorbu hydroperoxidov lipidov a zníženie fluidity membrány (Møller *et al.*, 2007).



Obr. 7 Schéma signalizácie ROS. Plné šípky znázorňujú priame interakcie ROS s inými signalizačnými komponentmi, prerušované šípky znázorňujú nepriame interakcie (prevzaté z Sewelam *et al.*, 2016).

2.5 NADPH oxidáza

Na produkcii ROS sa u rastlín významne podieľa enzým NADPH oxidáza (EC 1.6.3.1), viazaný na plazmatickú membránu (Obr. 8), u rastlín nazývaná RBOH (Respiratory Burst Oxidase Homolog) (Lamb a Dixon, 1997).

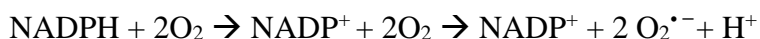
Štruktúrne je NADPH oxidáza viaczložkový enzým tvorený šiestimi transmembránovými doménami obsahujúci dva integrálne membránové proteíny, a to adaptérový proteín p22^{phox} a glykoproteín gp91^{phox}, ktoré navzájom vytvárajú heterodimérny flavocytochróm b558 tvoriaci jadro enzýmu. Multipodjednotkové regulačné domény p40P^{phox}, p47^{phox} a p67^{phox}, organizované ako komplex, sú umiestnené v cytosóle (Obr. 8). Skupina rastlinných RBOH má N-koncovú oblasť, ktorá je väčšinou regulovaná Ca²⁺ prostredníctvom priamej väzby na EF-hand motívy a fosforyláciou proteínkinázami regulovanými Ca²⁺ (Marino *et al.*, 2012).

Rastlinné RBOH sú transmembránové proteíny, ktoré v redoxnom reťazci spájajú donor elektrónov, ktorým je NADPH na cytosólovej strane membrány, s akceptorom elektrónov - kyslíkom, nachádzajúcim sa na vonkajšej strane membrány. NADPH prenáša 2 elektróny (rovnicu 3.), čo vrcholí redukciou dvoch molekúl kyslíka (rovnicu 4.). V prvom kroku sú elektróny prostredníctvom dvojelektrónového prenosu prenášané z NADH na FAD. V postupných jedoelektrónových prenosoch do centra železa vnútorného hemu je redukovaný FAD reoxidovaný. K stratám oxidázovej aktivity dochádza pri odstránení FAD, napríklad solubilizáciou v detergentoch, ale v prípade, že je FAD pridaný späť dochádza k obnove. Na vonkajšom povrchu plazmatickej membrány dochádza k uvoľneniu O₂^{•-}, ktorý následne dismutuje na H₂O₂, a to buď spontánnou cestou alebo pomocou SOD prítomnej v apoplaste (Lamb a Dixon, 1997).

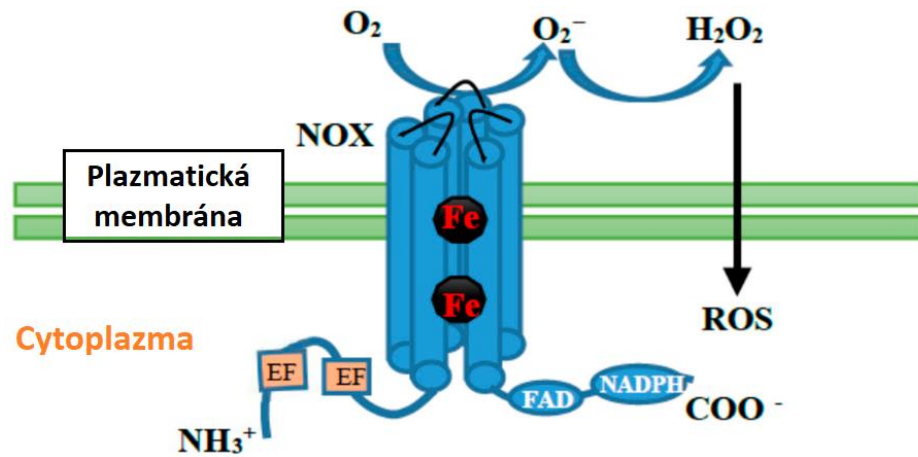
Rovnica 3.



Rovnica 4.



Najznámejším inhibítorom NADPH oxidázy je difenyljódium (DPI). Bolo dokázané, že DPI inhibuje produkciu ROS, konkrétne extracelulárne produkovaný H_2O_2 z mitochondriálnej respirácie či $\text{O}_2^{\cdot -}$ prostredníctvom inhibície NADH ubichinon-reduktázy (EC 1.6.5.3) (Li *et al.*, 1998).



Obr. 8 Schematické znázornenie NADPH oxidázy v rastlinnej bunke pozostávajúcej zo šiestich transmembránových domén, dvoch hemových skupín, dvoch N-terminálnych EF-hand motívov, C-terminálnej FAD a NADPH hydrofilnej domény (prevzaté z Sagi a Fluhr, 2006).

2.6 ROS a biochemické deje v bunke

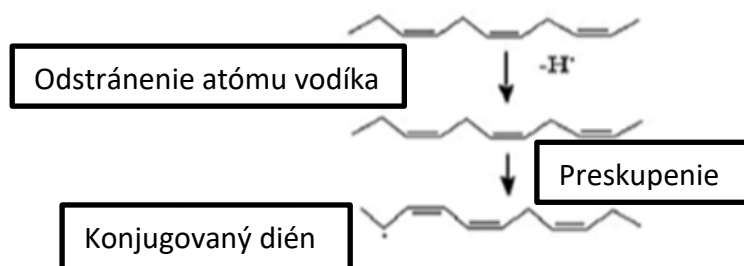
V súčasnosti sú procesy lipidovej peroxidácie, oxidácie proteínov a poškodenie DNA považované za hlavné molekulárne mechanizmy podieľajúce sa na oxidačnom poškodení bunkových štruktúr a v procesoch toxicity, čo vyvrcholí bunkovou smrťou. Mechanizmus biologického poškodenia ROS a s tým súvisiaca toxicita sú vysvetlené postupnými fázami vratného oxidatívneho stresu a irreverzibilného oxidatívneho poškodenia. Oxidatívny stres je vysvetlený ako stav nerovnováhy so zvýšenou koncentráciou oxidantov či zníženou koncentráciou antioxidantov (Boveris *et al.*, 2008).

2.6.1 Peroxidácia lipidov

Lipidová peroxidácia zahŕňa tvorbu a rozširovanie lipidových radikálov, vychytávanie kyslíka, v nenasýtených lipidoch preskupovanie dvojítých väzieb a taktiež deštrukciu membránových lipidov s následnými produktmi rozpadu ako sú alkoholy, ketóny, alkány, aldehydy a étery (Dianzani a Barrera, 2008). V patologických situáciách dochádza k zvýšenej rýchlosti produkcie ROS a výsledná lipidová peroxidácia je dôsledkom nedostatku α -tokoferolu, známeho ako vitamín E.

Reťazová reakcia lipidovej peroxidácie je iniciovaná odberom vodíka alebo prídavkom kyslíkového radikálu čo vedie k poškodeniu polynenasýtených mastných kyselín (PUFA), pričom môže prebiehať enzymaticky či neenzymaticky. Enzymatická cesta je katalyzovaná skupinou lipoxygenáz (EC 1.13.11.), lipidových peroxidačných enzýmov, ktoré okysličujú voľné a esterifikované PUFA v dôsledku čoho sú vytvárané peroxyradikály. Neenzymatická lipidová peroxidácia je iniciovaná prítomnosťou molekulárneho kyslíka, pričom ióny Fe^{2+} tento proces uľahčujú (Repetto *et al.*, 2010). V porovnaní s nasýtenými mastnými kyselinami sú nenasýtené oveľa citlivejšie, pričom kritické cieľové miesto predstavuje metylénový mostík (RH), vďaka prítomnosti dvojitej väzby susediacej s metylénovou skupinou s väzbou C-H, ktorá je slabšia a náchylná na odstránenie vodíka. Na uhlíku je zanechaný nepárový elektrón, formujúci radikál, ktorý je stabilizovaný molekulárnym preskupením dvojítých väzieb za tvorby konjugovaného diénu schopného vytvoriť peroxylový radikál po spojení s kyslíkom. Peroxylový radikál môže následne odobrať atóm vodíka z inej PUFA a spustiť reťazovú reakciu (Halliwell a Gutteridge, 1984) (Obr. 9). Rozklad lipidových peroxidov je katalyzovaný komplexmi prechodných

kovov a výsledkom sú alkoxylové (RO•) a hydroxylové radikály (HO•). Lipidová peroxidácia spôsobuje pokles membránovej fluidity a tým aj zníženie bariérovej funkcie membrány. Produkty lipidovej peroxidácie, hydroperoxydy alebo ich aldehydové deriváty, inhibujú syntézu proteínov či znižujú enzýmovú aktivitu (Fridovich a Porter, 1981).

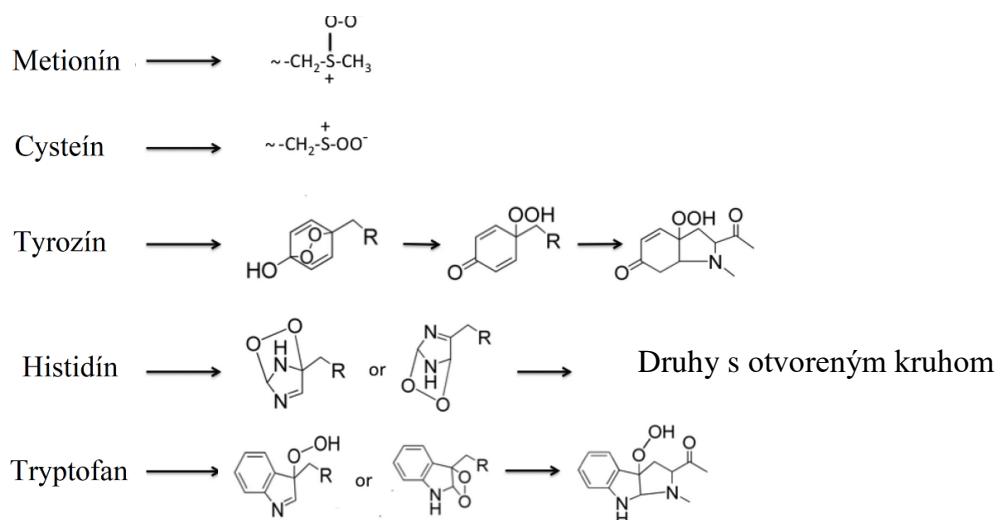


Obr. 9 Iniciačný krok lipidovej peroxidácie, pri ktorej najskôr dochádza odstráneniu vodíkového atómu za následného preskupenia dvojitých väzieb a tvorby konjugovaného diénu (prevzaté z Halliwell a Gutteridge, 1984).

2.6.2 Oxidácia proteínov

Proteíny sú hlavným cieľom radikálov a dvojelektrónových oxidantov v biologických systémoch vďaka ich vysokému zastúpeniu a značnej rýchlosti reakcie. Následná modifikácia proteínov môže mať mnoho podôb, a to napríklad zvýšená hydrofilnosť a fragmentácia vedľajšieho reťazca, agregácia prostredníctvom kovalentného zosieťovania alebo hydrofóbných interakcií, rozvoľnenie štruktúry proteínov a výsledná zmena konformácie a interakcie s biologickými partnermi.

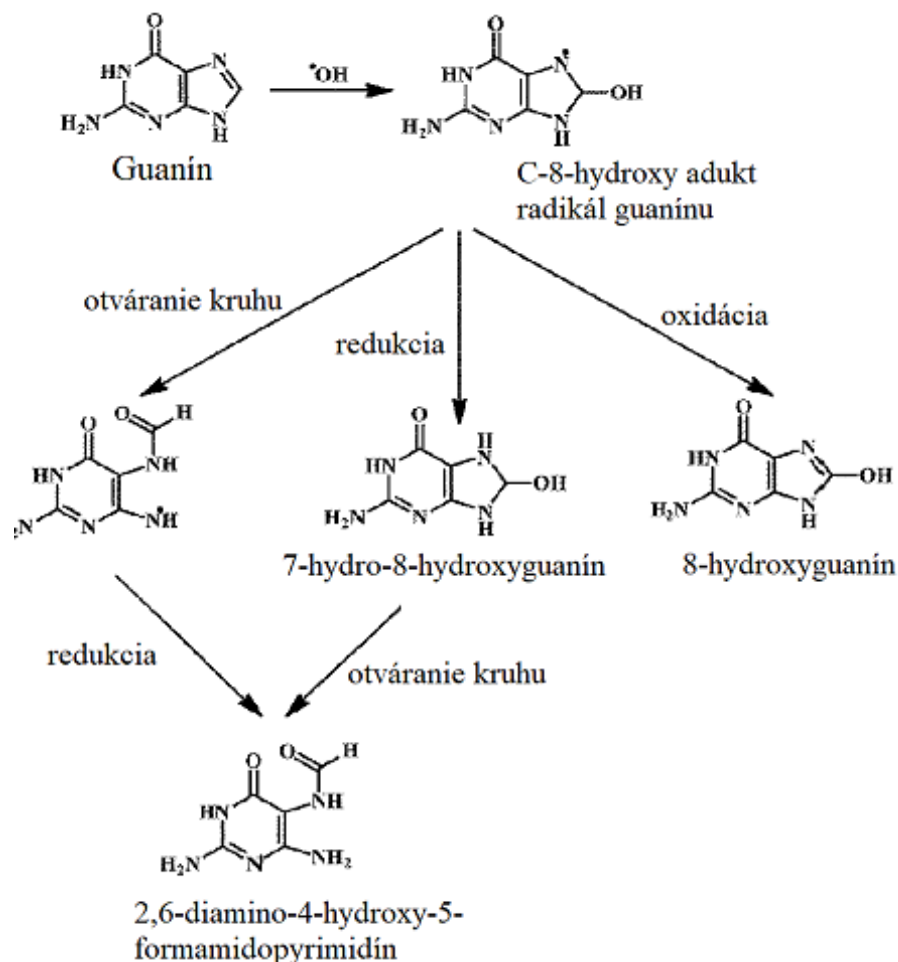
Keďže existuje 20 bežných bočných reťazcov aminokyselín, ako aj peptidový reťazec, na proteínoch sa môže vytvoriť veľké množstvo rôznych radikálov. (Obr. 10). Bežnejšie ako nukleofilné radikály sú elektrofilné radikály, napríklad alkoxyyl $\text{RO}\cdot$ a peroxyyl $\text{ROO}\cdot$, ktoré prednostne oxidujú miesta bohaté na elektróny. Hlavnou cestou je odstránenie vodíka z väzby C-H, v prípade cysteínu z väzby S-H (tiolovej skupiny), čo je považované za pomerne rýchlu reakciu poskytujúcu tiolové radikály ($\text{RS}\cdot$). Nukleofilné radikály, ako je fenylyl či iné druhy na báze uhlíka, napádajú prednostne elektrón deficitné miesta. Výsledné produkty adičných reakcií podliehajú rôznym následným reakciám, medzi ktoré patrí tvorba peroxylových radikálov či produktov obsahujúcich hydroxylovaný a karbonylovaný zvyšok (Ehrenshaft *et al.*, 2015). Aminokyseliny ako metionín a cysteín sú pomerne reaktívne najmä s $^1\text{O}_2$ a $\text{HO}\cdot$. Alternatívne môže byť kyslík pridaný na metionínový zvyšok za tvorby derivátov metionínsulfoxidu (Sadanandom *et al.*, 2000).



Obr. 10 Peroxidické druhy pri reakcii $^1\text{O}_2$ s reaktívnymi metionínovými, cysteínovými, tyrozínovými, histidínovými a tryptofanovými postrannými reťazcami (prevzaté z Saito *et al.*, 1977).

2.6.3 Poškodenie DNA

Aj napriek faktu, že rastlinný genóm je veľmi stabilný, môže dôjsť k poškodeniu DNA v dôsledku vystavenia rastlinnej bunky biotickým či abiotickým faktorom, ktoré by mohli vyvolať genotoxický stres - zástavu bunkového cyklu a reparáciu poškodenia alebo indukciu apoptózy (Tuteja *et al.*, 2009). K endogénne spôsobenému poškodeniu DNA dochádza v dôsledku reakcie s reaktívnymi radikálmi HO•, O₂^{•-} a NO•. Najreaktívnejší z nich je hydroxylový radikál HO•, ktorý zapríčiňuje poškodenie všetkých zložiek molekuly DNA, poškodzujúc purínové tak aj pyrimidínové bázy a deoxyribózový základ (Obr. 11). ¹O₂ primárne napadá guanín. Za nereaktívne sa považujú H₂O₂ a O₂^{•-} (Wiseman a Halliwell, 1996). Poškodenie zahŕňa najmä deléciu a modifikáciu báz, ako alkyláciu či oxidáciu, taktiež pyrimidínové diméry, krížové väzby, jedno a dvojreťazové zlomy (Wiseman a Halliwell, 1996). Poškodenie DNA vyúsťuje deštrukciou bunkovej membrány, redukciou syntézy proteínov a poškodením proteínov zúčastňujúcich sa fotosyntézy, čo ovplyvňuje rast a vývoj rastliny (Britt, 1999). Naďalej môžu mať tieto škody za následok zastavenie transkripcie, chyby v replikácii či genómovú nestabilitu (Britt, 1999; Cooke, 2003). Najčastejším typom poškodenia DNA je tvorba dimérov medzi susednými pyrimidínmi vystavením UV-B žiareniu, pričom primárne UV fotoprodukty pozostávajú z cyklobután-pyrimidínových dimérov (CPD) a 6-4 pyrimidínových dimérov. V mitochondriách a v jadre sa na oprave poškodenej DNA podieľa množstvo mechanizmov – nukleotidová excízna (vyštepovacia) oprava, mismatch oprava, dvojreťazová oprava zahrňujúca homológnu rekombináciu a nehomológne spájanie koncov DNA (Tuteja *et al.*, 2009).



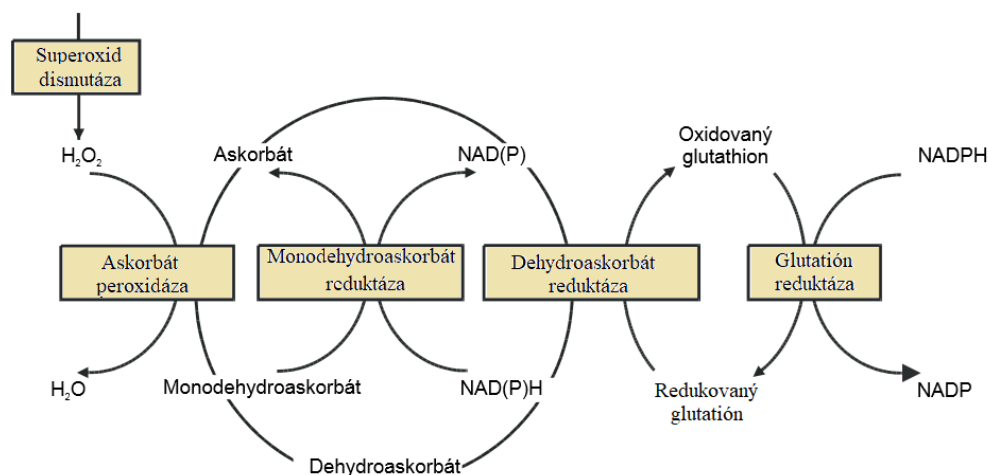
Obr. 11 Reakcia HO• s guanínom. V reakcii HO• s guanínom vzniká adukt C-8-hydroxy radikál guanínu, ktorý môže podliehať oxidácii, redukcii či otváraniu kruhu. Redukciou vzniknutého produktu 7-hydro-8-hydroxyguanínu môže následným otvorením kruhu vznikať 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidín (prevzaté z Dizdaroglu a Jaruga, 2012).

2.7 Antioxidačné systémy v bunke

2.7.1 Enzýmové antioxidanty

Hlavným systémom, ktorým je detoxifikovaný H₂O₂, je askorbát-glutatiónový cyklus (Obr. 12) prítomný v cytosóle, chloroplastoch, mitochondriách a peroxizómoch (Asada, 1992). Askorbátperoxidáza (APX, EC 1.11.1.1) katalyzuje prenos elektrónov z L-askorbátu (L-Ask) na redukciiu H₂O₂ za tvorby dehydroaskorbátu a vody (Asada, 1992, 1999; Noctor a Foyer, 1998). Dehydroaskorbátoreduktáza (DHAR, EC 1.8.5.1) je enzým, ktorý katalyzuje redukciiu dehydroaskorbátu na L-Ask v reakcii vyžadujúcej glutatión (GSH) (Chen *et al.*, 2003). Monodehydroaskorbátoreduktáza (MDAR, EC 1.6.5.4)

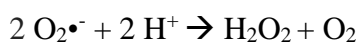
redukujúca monodehydroaskorbát na L-Ask s využitím molekuly NAD(P)H ako donoru elektrónov (Hossain *et al.*, 1984). Glutatiónreduktáza (GR, EC 1.8.1.7) sa podieľa na redukcii glutatióndisulfidu (GSSG) na GSH, molekulu prítomnú v mnohých metabolických regulačných a antioxidačných procesoch v rastline (vid' kapitola 2.7.2) (Reddy a Raghavendra, 2006).



Obr. 12 Askorbát-glutatiónový cyklus, ktorý tvoria enzýmy: askorbátperoxidáza (APX), monodehydroaskorbátreduktáza (MDAR), dehydroaskorbátreduktáza (DHAR), glutatiónreduktáza (GR). Ďalej sú v tomto cykle zapojené neenzymatické antioxidanty askorbát (Ask) a glutatión (GSH). Cyklus prebieha v sérii reakcií katalyzovaných antioxidačnými enzýmami. APX katalyzuje reakciu H₂O₂ a Ask za vzniku monodehydroaskorbátu (MDA), prípadne dehydroaskorbátu (DHA). Pokiaľ nie je MDA znovu redukovaný prostredníctvom MDAR na Ask, samovoľne disproporcionuje na Ask a DHA. DHAR premieňa DHA na askorbát za prítomnosti GSH za vzniku GSSG. GSH je regenerovaný aktivitou NADPH-dependentnej GR (prevzaté z Inzé *et al.*, 1995).

Metaloenzým superoxiddizmutáza (SOD, EC 1.15.1.1) sa považuje za najúčinnější enzým antioxidačnej ochrany, ktorý katalyzuje premenu $O_2^{\bullet -}$ na H_2O_2 (rovnica 5.) (Obr. 13a). Odstránením $O_2^{\bullet -}$ znižuje riziko vzniku $HO\bullet$ prostredníctvom Haber-Weissovy reakcie. SOD sa klasifikujú na základe prítomných kovových kofaktorov do troch skupín: meď/zinok (Cu/Zn-SOD), mangán (Mn-SOD) a železo (Fe-SOD) lokalizované v rôznych bunkových oddieloch (Mittler, 2002). Cu/Zn-SOD sú prítomné najmä v cytosóle, peroxizómoch, plastidoch či koreňových hľúzkach. Mn-SOD prevažne v mitochondriách a Fe-SOD v plastidoch (Del Río, 2002).

Rovnica 5.



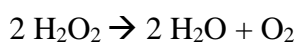
Na redukciu H_2O_2 a organických či lipidových hydroperoxidov využíva cytosolický enzým glutatiónperoxidáza (GPX, EC 1.11.1.9) (Obr. 13b) GSH (rovnica 6.), čím pomáha rastlinnej bunke v ochrane pred oxidačným stresom a redoxnej regulácii signálnych dráh (Noctor *et al.*, 2002). GPX obsahuje selenocysteín vo svojom aktívnom mieste (Forstrom *et al.*, 1978).

Rovnica 6.



Kataláza (CAT, EC 1.11.1.6) predstavuje ďalší významný antioxidačný enzým (Obr. 13c). Vo svojej štruktúre obsahuje tetramérny hem s potenciálom priamo dismutovať H_2O_2 na vodu a kyslík (Rovnica 7.) (Garg a Manchanda, 2009). Podieľa sa na odstraňovaní H_2O_2 vytváraného v peroxizómoch v procese β -oxidácie mastných kyselín enzýmom oxidázou či pri katabolizme purínov. Jedna molekula CAT dokáže konvertovať ≈ 6 miliónov molekúl H_2O_2 na vodu a kyslík, vzhľadom k čomu sa CAT považuje za enzým s najvyššou rýchlosťou obratu spomedzi všetkých enzýmov. Sú známe tri isoformy, a to CAT1 lokalizovaná najmä v listoch, CAT2 v cievnych zväzkoch a CAT3 v semenách (Dat *et al.*, 2000).

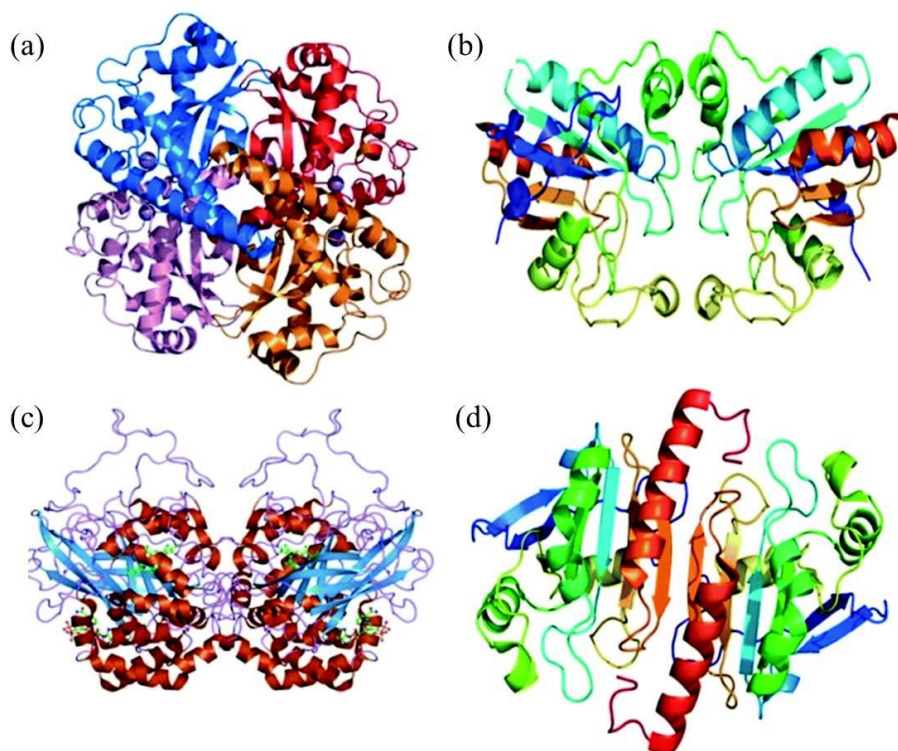
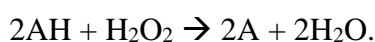
Rovnica 7.



Ďalším antioxidačným, hem obsahujúcim enzýmom, je guajakolperoxidáza (GPOX, EC 1.11.1.7), ktorej donorom elektrónov na úkor rozkladu H_2O_2 (Rovnica č. 8) sú fenolové látky ako guajakol či pyrogallol. Aktivita guajakolperoxidázy bola preukázaná v mnohých,

životné prostredie ohrozujúcich podmienkach, ako napríklad ťažké kovy, ozón a herbicídy (Ivanov *et al.*, 2013). Glutatión-S-transferáza (GST, EC 2.5.1.18) je enzým známy pre svoju schopnosť katalyzovať konjugáciu redukovaného glutatiónu s toxickými substrátmi. Peroxiredoxíny (Prx, EC 1.11.1.15) sú taktiež všade prítomná skupina antioxidantov regulujúce hladiny hydroperoxidov indukovaných cytokíninmi. Tieto tiolové peroxidázy majú dôležitú úlohu pri regulácii apoptózy a považujú sa za biomarkery redoxných zmien od začiatku až po priebeh bunkovej smrti (Rhee *et al.*, 2005).

Rovnica 8.



Obr. 13 Enzýmové antioxidačné mechanizmy (a) superoxidodismutáza, (b) glutatiónperoxidáza, (c) kataláza, (d) peroxiredoxín (Prx-I) (prevzaté z Nimse a Pal, 2015).

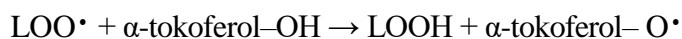
2.7.2 Neenzýmové antioxidanty

Kyselina askorbová, askorbát (Ask), taktiež známa ako vitamín C, je u rastlín dôležitým vo vode rozpustným antioxidantom (Smirnoff, 2005). Najvyššia koncentrácia Ask sú prítomné v zrelých listoch s úplne vyvinutými chloroplastmi a najvyšším obsahom chlorofylu (Smirnoff, 2000). Ask je syntetizovaný v cytosóle z hexózových cukrov. U vyšších rastlín dochádza najskôr k premene D-glukózy na Ask priamou konverziou, pričom proces zahŕňa oxidáciu C1 na D-glukóze a následnú tvorbu endiolu medzi C2 a C3 (Loewus, 1988).

Tripeptid glutatión (γ -glutamylcysteinylglycín, GSH) je ďalším z kľúčových metabolitov podieľajúcich sa v obrane proti oxidatívne stresu. Syntéza GSH prebieha v dvoch krokoch závislých od ATP. V prvom kroku glutamát-cysteínová ligáza (EC 6.3.2.2) katalyzuje tvorbu γ -glutamylcysteínu z glutamátu a cysteínu. V druhom kroku glutatiónsyntetáza (EC 6.3.2.3) pridá glycín ku γ -glutamylcysteínu za vzniku GSH (Meyer, 2008). GSH pôsobí ako zachytávač $^1\text{O}_2$, H_2O_2 a najmä $\text{HO}\cdot$ (Obr. 14) (Noctor a Foyer, 1998).

Za najúčinnšie antioxidanty v biomembránach sa považujú tokoferoly podieľajúce sa na udržiavaní stability membrány vychytávaním ROS, a to najmä $^1\text{O}_2$. U rastlín sú lokalizované v tylakoidnej membráne chloroplastov. Sú známe štyri izoméry tokoferolov – $\alpha, \beta, \gamma, \delta$, pričom najvyššiu antioxidantnú aktivitu vykazuje α -tokoferol, známy ako vitamín E, vďaka prítomnosti troch metylových skupín vo svojej štruktúre (Kamal-Eldin a Appelqvist, 1996). Pri autooxidácii lipidov slúžia tokoferoly na zachytenie lipidových peroxylových radikálov ($\text{LOO}\cdot$) a podieľajú sa na ukončení reťazových peroxidáčnych reakcií (Rovnica 9.).

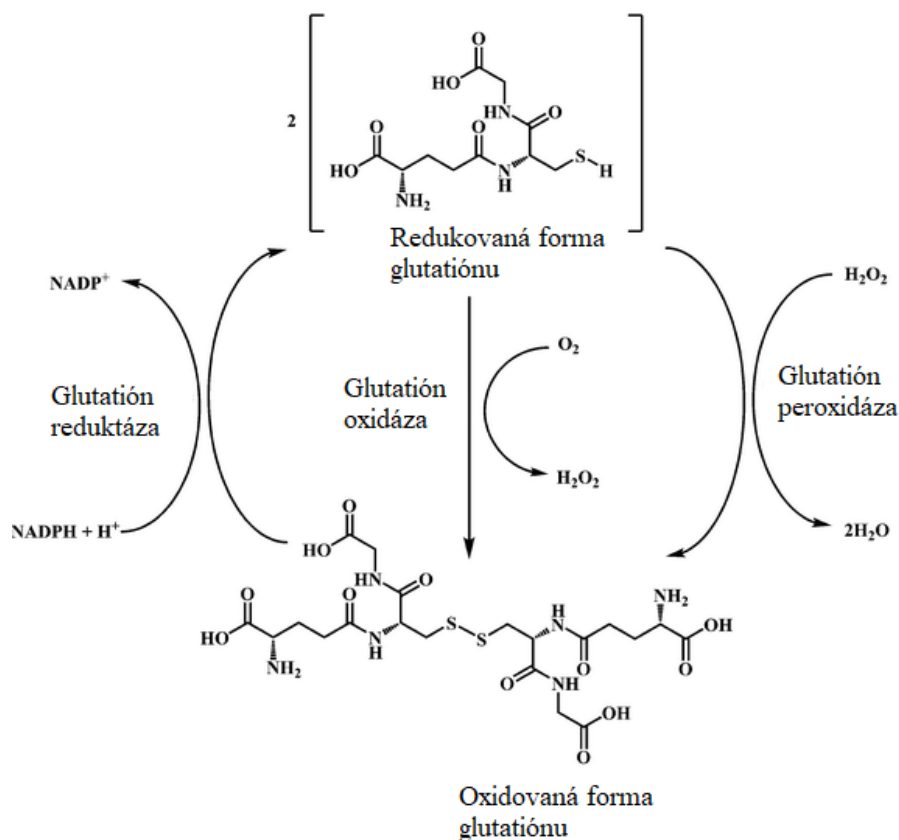
Rovnica 9.



Vo všetkých fotosyntetických organizmoch majú karotenoidy dôležitú fotoprotektívnu úlohu, tým, že odštiepujú nadbytočnú excitačnú energiu ako teplo či potláčajú lipidovú peroxidáciu vychytávaním ROS. Karotenoidy sú známe ako pigmenty, ktoré sa vyskytujú jednak v rastlinách, ale aj v mikroorganizmoch. Majú tri základné funkcie, a to zachytávanie svetla vo vlnovej dĺžke od 400-500 nm a zabezpečujú jeho prenos do chlorofylu (Sieferman-Harms, 1987). Druhou funkciou je ochrana fotosyntetického

aparátu vychytávaním chlorofylu v tripletovom stave, $^1\text{O}_2$ či iných škodlivých ROS, ktoré sa behom fotosyntézy tvoria (Collins, 2001). Treťou dôležitou funkciou je podiel pri zostavení PSI, udržiavaní stability proteínov svetlozberného komplexu a tylakoidnej membrány (Kamal-Eldin a Appelqvist, 1996).

Medzi ďalšie známe neenzýmové antioxidanty patria napríklad flavonoidy, ktoré sa zväčša hromadia v rastlinnej vakuole (Ashraf *et al.*, 2007). Významným antioxidantom je aminokyselina prolín, ktorá pôsobí ako osmoprotektant, stabilizátor proteínov, chelatačné činidlo, lapač $\text{HO}\cdot$ a $^1\text{O}_2$ a inhibítor lipidovej peroxidácie (Trovato *et al.*, 2008).



Obr. 14 Schéma interkonverzie glutatiónu vo svojej redukovanej (GSH) a oxidovanej forme (GSSG) pôsobením enzýmov glutatiónoxidázy, glutatiónreduktázy a glutatiónperoxidázy (prevzaté z Nimse a Pal, 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

3.1 Materiál a prístroje

3.1.1 Chemikálie

Lach-Ner (Česká republika): acetón; chlorovodíková kyselina; chlorid sodný; dihydrogenfosforečnan draselný; etanol; hydrogenfosforečnan draselný; metanol; peroxid vodíka; trichlóroctová kyselina

Sigma-Aldrich (Nemecko): akrylamid; 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolín-6-sulfonová kyselina); bisakrylamid; butylhydroxytoluén; dietyléntriáminpentaacetát; ditiotreitól; 2,2-difeny-1-pikrylhydrazyl; ethyléndiamidtetraoctová kyselina; guajakol; monochlórbiman; nitrotetrazoliová modrá v spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátom; Triton X-100; persíran amonný; pefabloc; polyvinylpolypyrrolidón; Ponceau S; primárna monoklonálna myšia anti-biotin protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatou; pyrogalol; 2-tiobarbiturová kyselina; tris(2-karboxyetyl)fosfín; Tween 20; xylenolová oranž

AppliChem (Nemecko): dodecylsíran sodný; hovädzí sérový albumín frakcie V.

Bio-Rad (USA): bromfenolová modrá; Coomassie Brilliant Blue R-250; marker molekulovej hmotnosti Precision Plus DualXtraStandards

3.1.2 Prístroje a vybavenie

Analytické váhy (Sartorius, Nemecko); automatické pipety (Eppendorf, Nemecko); blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA); blotovací systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); centrifuga 5415R (Eppendorf, Nemecko); digitálne predvážky (KERN, Nemecko); digitálny pH meter (InoLab pH level1, Nemecko); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická miešačka IKA (Labortechnik, Nemecko); inkubátor EN120 (Nüve, Turecko); mikrodštičky Test plate 96F (TPP, Švajčiarsko); mikrodštičkový reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA); trepačka 3D (BioSan, Litva); vortex (Stuart, UK); zdroj pro elektroforézu Power Pac Basic (Bio-Rad, USA).

3.2 Biologický materiál

3.2.1 *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

Pre experimenty bol zvolený kultivar Micro-Tom rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). Tento kultivar sa prejavuje trpasličím fenotypom (Marti *et al.*, 2006). Malý vzrast, krátky životný cyklus (70-90 dní) a malý genóm s veľkosťou 350 Mpb, tvoria vhodné vlastnosti pre modelový organizmus (Meissner *et al.*, 1997; Eyal a Levy, 2002).

Semená *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom boli vysiate do vlhkého perlitu. Semenáčiky s vyvinutými kľúčnymi listami (približne 10 denné) boli presadené do zmesi záhradného substrátu a rašeliny v pomere 2:1. Rastliny pestované v skleníku pri teplote 18-20 °C s fotoperiódou 12/12 h (deň/noc) boli pravidelne polievané a hnojené. Pre experimenty boli použité 60 denné rastliny, ktoré boli pestované nezávisle v troch sériách.

3.2.2 Teplotný stres

Pre štúdium teplotného stresu boli 60 denné rastliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom inkubované po dobu 2 h pri teplotách 40, 45 alebo 50 °C. V časových intervaloch 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po vystavení teplotnému stresu (TS) boli odobrané listy zo 4., 5. a 6. poschodia rastliny a ihneď prenesené do kvapalného dusíka. Rovnaké poschodia boli odobrané kontrolným rastlinám, ktoré boli inkubované pri laboratórnej teplote (25 °C).

Zo všetkých listov odobraných z poschodí bola pre každú teplotu a čas pripravená zmiešaná vzorka, ktorá bola homogenizovaná v kvapalnom dusíku. Zmes bola pre jednotlivé stanovenia (stanovenie pomeru $[GSH]^2/[GSSG]$, H_2O_2 , lipidovej peroxidácie, antioxidačnej kapacity, aktivity enzýmov a detekcie Hsp70) odvážená po 0,25 g do pripravených skúmaviek. Na stanovenie obsahu chlorofylu bolo odobratých 0,1 g vzorky. Všetky skúmavky boli uchované v -80 °C.

3.3 Experimentálne metódy

3.3.1 Stanovenie obsahu chlorofylu

Obsah chlorofylu *a* a obsah chlorofylu *b* bol stanovený spektrofotometricky pri 647 a 663 nm. Listy boli homogenizované v kvapalnom dusíku v trecej miske a navážky 0,1 g boli extrahované s 1 ml 80% acetónu. Po 5 minútach centrifugácie pri 5000 g a teplote 4 °C bola zmeraná absorbancia supernatantu v 96 jamkovej mikrotitračnej doštičke nanesením 200 µl vzorky do každej jamky, pričom všetko bolo pipetované v triplikátoch. Pre výpočet boli použité vzorce podľa publikácie Lichtenthaler *et al.* (2001).

3.3.2 Stanovenie obsahu peroxidu vodíka

Metóda merania hydroperoxidov je založená na selektívnej oxidácii železnatých iónov peroxidom v kyslom prostredí. Vznikajúce železité ióny vytvárajú s xylenolovou oranžou farebný komplex, ktorý je detekovaný spektrofotometricky pri 560 nm (Gray *et al.*, 1999).

Listy boli homogenizované v kvapalnom dusíku v trecej miske a k navážke 0,25 g bol pridaný 1 ml 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátového pufru, pH 7. Vzorky boli centrifugované pri 15 000 g a teplote 4 °C po dobu 10 min. Obsah H₂O₂ bol stanovený na 96 jamkovej mikrotitračnej doštičke, pričom do každej jamky bolo pridaných 200 µl roztoku xylenolovej oranže a 100 µl vzorky, pričom všetko bolo pipetované v triplikátoch. Reakčná zmes bola inkubovaná 30 min. pri laboratórnej teplote a následovalo meranie absorbancie pri 560 nm.

Koncentrácia H₂O₂ bola odpočítaná z rovnice lineárnej regresie, ktorá bola zostavená z meraní kalibračných štandardov H₂O₂. Boli použité 1; 1,25; 2,5; 5; 10; 50; 100; 200 a 250 µmol·l⁻¹ roztoky H₂O₂ v 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátovom pufri, pH 7.

Použité roztoky:

- 25 mmol·l⁻¹ FeSO₄ a 25 mmol·l⁻¹ (NH₄)SO₄ v 2,5 mmol·l⁻¹ H₂SO₄.
- 1 ml vyššie pripraveného roztoku bol pridaný do 100 ml 0,125 mmol·l⁻¹ xylenolovej oranže a 100 mmol·l⁻¹ manitolu. Reakčná zmes zostáva stabilná po dobu 6-8 h.

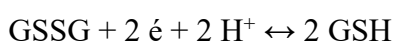
3.3.3 Stanovenie obsahu redukovaného a oxidovaného glutatiónu

Bežnou metódou na meranie obsahu GSH a GSSG, je prídavok monochlórbimanu do média, pričom vytvorený fluorescenčný adukt sa stanoví fluorimetricky. Reakcia je katalyzovaná enzýmom glutatión-S-transferázou (EC 2.5.1.18) (Komencic *et al.*, 2000).

Listy boli homogenizované v kvapalnom dusíku v trecej miske a k navážke 0,25 g bol pridaný 1 ml 0,1 mol·l⁻¹ HCl (pomer 1:4). Následovala centrifugácia pri 13 000 g a teplote 4 °C po dobu 15 min. Pre stanovenie bolo do každej jamky 96 jamkovej mikrotitračnej doštičky napipetovaných 100 µl 0,1 mol·l⁻¹ Tris pufru pH 8, následne bolo pridaných 20 µl vzorky extraktu, 20 µl 5 mmol·l⁻¹ tris(2-karboxyethyl)fosfinu (TCEP) a 20 µl pre stanovenie oxidovaného glutatiónu alebo 20 µl pufru pre stanovenie len redukovaného glutatiónu. Všetko bolo pipetované v triplikátoch. Doštička bola 20 min. inkubovaná pri laboratórnej teplote v tme s následným prídavkom 10 µl čerstvo pripraveného 15 mmol·l⁻¹ monochlórbimanu (MCIB). Po 20 min inkubácie v tme bol zmeraný nárast fluorescencie (excitácia 360 nm/ emisia 460 nm).

Koncentrácia GSH a GSSG bola odpočítaná z rovnice lineárnej regresie, ktorá bola zostavená z meraní kalibračných štandardov GSH a GSSG. Boli použité 1; 1,25; 2,5; 5; 10; 50; 100; 200 a 250 µmol·l⁻¹ roztoky GSH a GSSG v 0,1 mol·l⁻¹ HCl. Pomer bol stanovený ako [GSH]²/[GSSG] (rovnica 10.).

Rovnica 10.



3.3.4 Stanovenie lipidovej peroxidácie

Metóda TBARS využíva kyseliny tiobarbiturové (TBA) pre meranie obsahu malondialdehydu (MDA), ktorý je tvorený počas autooxidácie alebo enzýmovej degradácie PUFA v bunkách ako sekundárny koncový produkt. Stanovenie MDA spočíva v reakcii MDA s dvoma molekulami TBA nukleofilnou adíciou v kyslom prostredí, kedy vzniká ružovočervené sfarbenie s maximom absorpcie pri 532 nm. Nevýhodou použitia tejto metódy u rastlinných extraktov je možnosť, že vplyvom interferujúcich látok ako sú antokyany a sacharidy, môže dôjsť k nadhodnoteniu obsahu MDA (Taulavuori *et al.*, 2001). Korigovaná metóda TBARS využíva odpočítanie absorpcie pri 532 nm roztoku

obsahujúceho rastlinný extrakt inkubovaný bez prídavku TBA od identickej vzorky, ktoré TBA obsahoval (Hodges *et al.*, 1999).

Listy boli homogenizované v kvapalnom dusíku v trecej miske a k navážke 0,25 g bolo pridaných 0,5 ml extrakčného pufru (pomer 1:2). Následovala centrifugácia pri 16 000 g a teplote 4 °C po dobu 20 min. Podľa metódy TBARS stanovenia sekundárnych produktov lipidovej peroxidácie bolo do 2 ml mikrozkušaviek napipetovaných 0,5 ml vzorky či extrakčného pufru v prípade blanku. Do všetkých mikrozkušaviek bolo pridaných 0,5 ml činidla A alebo činidla B. Zmes v mikroskúmvkách bola inkubovaná 45 min pri teplote 75 °C a po ochladení v ľade nasledovala centrifugácia pri 15 000 g po dobu 5 min. Z každej mikroskúmvky bolo odpipetovaných 100 µl roztoku do jamky mikrotitračnej doštičky, pričom všetko bolo pipetované v triplikátoch a bola zmeraná absorbancia pri 440, 532 a 600 nm.

Koncentrácia MDA bola odpočítaná z rovnice lineárnej regresie, ktorá bola zostavená z meraní kalibračných štandardov MDA. Boli použité 1; 1,25; 2,5; 5; 10; 50; 100; 200 a 250 µmol·l⁻¹ roztoky MDA v 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátovom pufri, pH 7.

Použité roztoky:

- Extrakčný pufo: 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátový pufo, pH 7.0; 1% Triton X-100; 0,01% butylhydroxytoluén v etanole.
- Činidlo A: 20% kyselina trichlóroctová; 0,01% butylhydroxytoluén v metanole.
- Činidlo B: 20% kyselina trichlóroctová; 0,01% butylhydroxytoluén; 0,65% 2-tiobarbiturová kyselina.

3.3.5 Stanovenie celkovej antioxidačnej kapacity

Metóda využíva schopnosť antioxidantov zhasať radikál DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), čo je stabilný voľný radikál, ktorý môže byť vďaka svojej štruktúre akceptorom atómu vodíka, čím prechádza do formy stabilnej diamagnetickej molekuly. Pokles absorbancie je meraný spektrofotometricky pri absorpčnom maxime 515 nm a je daný zmenou purpurového sfarbenia na žlté podľa Paulová *et al.* (2004).

Listy boli homogenizované v kvapalnom dusíku v trecej miske a k navážke 0,25 g bolo pridaných 0,5 ml extrakčného pufru 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátovom pufri (pomer 1:2). Všetky

operácie boli vykonané za stáleho chladenia. Následovala centrifugácia pri 12 000 g a teplote 4 °C po dobu 30 min., pričom supernatant bol použitý pre následujúce meranie. Do jamiek mikrotitračnej doštičky bolo napipetovaných 50 µl 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátového pufru, pH 7 (blank) a 50 µl extraktu. Reakcia bola odštartovaná prídavkom 15 µl 670 µmol·l⁻¹ radikálu DPPH. Zmes bola inkubovaná 10 min. pri laboratórnej teplote a následne po uplynutí inkubačnej doby bol nameraný pokles absorbancie pri vlnovej dĺžke 515 nm.

Koncentrácia askorbátu bola odpočítaná z rovnice lineárnej regresie, ktorá bola zostavená z meraní kalibračných štandardov kyseliny askorbovej. Boli použité 10, 20, 40, 60, 80 a 100 µmol·l⁻¹ roztoky kyseliny askorbovej v 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátovom pufru, pH 7.

Použité roztoky:

- 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátový pufor, pH 7.0
- 10 mmol·l⁻¹ kyselina askorbová
- 670 µmol·l⁻¹ DPPH v metanole

3.3.6 Stanovenie enzýmovej aktivity

Listy boli homogenizované v kvapalnom dusíku v trecej miske a k navážke 0,25 g bol pridaný 1 ml extrakčného pufru (pomer 1:4). Následovala centrifugácia pri 15 000 g a teplote 4 °C po dobu 10 min. Následne bol odobraný 0,5 ml supernatantu, v ktorom bola meraná enzýmová aktivita.

Použité roztoky:

- Extrakčný pufor: 0,1 mol·l⁻¹ K-fosfátový pufor, pH 7.0; 1% PVPP; 2 mmol·l⁻¹ DTT; 0,5 mmol·l⁻¹ Pefabloc (inhibitor proteáz)

3.3.6.1 Guajakolperoxidáza

Metóda merania aktivity guajakolperoxidázy je založená na oxidácii guajakolu čerstvo pripraveným H₂O₂, prídavkom ktorého sa odštartuje reakcia. Aktivita enzýmu je meraná spektrofotometricky nárastom absorbancie pri 436 nm.

Pre stanovenie aktivity guajakolperoxidázy bolo do každej jamky mikrotitračnej doštičky napipetovaných 125 µl 0,1 mol·l⁻¹ fosfátového pufru, pH 7,0; 72 µl 35 mmol·l⁻¹

guajakolu; 15 μl 10x zriedeného extraktu či 15 μl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru (blank). Reakcia bola odštartovaná prídavkom 38 μl 0,7 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ čerstvo pripraveného roztoku H_2O_2 do každej jamky (vo výslednej koncentrácii 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ v jamke). Bol zaznamenaný nárast absorbancie pri 436 nm v intervaloch 10 s po dobu 1 min.

3.3.6.2 Kataláza

Aktivita katalázy je meraná spektrofotometricky, pričom reakcia sa štartuje prídavkom čerstvo pripraveného H_2O_2 do reakčnej zmesi. Zmena absorbancie je zmeraná pri 240 nm.

Pre stanovenie aktivity katalázy bolo do každej jamky mikrotitračnej doštičky určenej k meraniu v UV oblasti napipetovaných 220 μl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru, pH 7,0; 20 μl extraktu či 60 μl destilovanej vody (blank). Reakcia bola odštartovaná prídavkom 60 μl 60 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ čerstvo pripraveného roztoku H_2O_2 . Bol zaznamenaný pokles absorbancie pri 240 nm v intervaloch 15 s po dobu 8 min.

3.3.6.3 Superoxiddismutáza

Metóda stanovenia aktivity enzýmu superoxid-dismutázy spočíva v autooxidácii pyrogallolu podľa Marklund (1974). Aktivita enzýmu bola meraná spektrofotometricky zmenou absorbancie pri 420 nm.

Pre stanovenie aktivity superoxid-dismutázy bolo do každej jamky mikrotitračnej doštičky napipetovaných 220 μl 50 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosfátového pufru, pH 7,5 obsahujúcim 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dietylén-triamín-pentaacetát (DTPA), 20 μl 10x zriedeného extraktu či 20 μl 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ K-fosfátového pufru (blank). Reakcia bola odštartovaná prídavkom 10 μl čerstvo pripraveného roztoku pyrogallolu. Bol zaznamenaný nárast absorbancie pri 420 nm v intervaloch 10 s po dobu 5 min.

Použité roztoky:

- 6 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pyrogallol v 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl.

3.3.7 Detekcia Hsp70 metódou Western blot

Proteíny boli separované pomocou SDS-PAGE v 8% deliacim (spodnom) polyakrylamidovom gélu, pH 8,8 (Laemmli, 1970) a 4% zaostrovacím (hornom) polyakrylamidovom gélu, pH 6,8. Gély boli pripravené podľa Tab. 1. Polymerizácia spodného i horného gélu medzi sklami trvala 30 min. Potom boli sklá s gélom premiestnené do elektroforetické komory a zaliate elektródovým pufrom. Po nanesení vzoriek do jamiek v zaostrovacím gélu bola komora pripojená k zdroju napätia a bola spustená separácia. Elektroforetická separácia prebiehala spočiatku pri napätí 120 V, po zaostrení v hornom géli sa začali proteíny v spodnom géli deliť a napätie bolo zvýšené na 180 V.

Tab. 1 Zloženie deliaceho a zaostrovacieho gélu. Objemy sú uvedené v ml. Rozpis roztokov je uvedený na prípravu 2 gélov pre sklá so spacermi 0,75 mm.

| Typ gélu | AA/BIS 30%/0,8% | 1,5 mol·l ⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8 | 0,5 mol·l ⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8 | H ₂ O | 10% SDS |
|-----------------|--------------------|--|--|------------------|---------|
| Deliace 10%* | 3,3 | 2,5 | - | 4,1 | 0,1 |
| Zaostrovací 4%* | 1,3 | - | 2,5 | 6,1 | 0,1 |

*Polymerizácia gélu bola zahájená prídavkom 10 µl komerčného roztoku tetrametyletyléndiaminu (TEMED) a 100 µl 10% persíranu amonného (APS)

Príprava vzoriek na SDS-PAGE:

Vzorky boli zmiešané v pomere 3:1 s 4x koncentrovaným Laemmliho vzorkovacím pufrom a 10 min inkubované pri teplote 95 °C. Vzorky boli potom ochladené na laboratórnu teplotu a nanosené do jamiek gélu. Pre detekciu Hsp70 bolo do jamiek nanosené 25 µl rastlinného extraktu. Na každý gél bol taktiež nanosený štandard molekulovej hmotnosti v objeme 3 µl, a to bez predchádzajúcej inkubácie pri teplote 100 °C.

Separované proteíny metódou SDS-PAGE boli prenesené z gélu na povrch nitrocelulózovej membrány pomocou blottingu v tankovom usporiadaní. Membrána, filtračný papier a blotovacie porézne hubky boli ponorené po dobu 5 min do blotovacieho pufru. Na čiernu stranu blotovacej kazety boli umiestnené jednotlivé vrstvy v poradí: porézna hubka, filtračný papier, gél, nitrocelulózová membrána, filtračný papier a porézna hubka. Uzavretá blotovacia kazeta bola umiestnená do blotovacej komôrky a bola naplnená blotovacím pufrom.

Prvým krokom imunochemickej detekcie proteínov na membráne bolo blokovanie nešpecifických miest v 5% roztoku BSA v TTBS pufrí po dobu 2 h. Po blokovaní bola membrána prenesená do roztoku primárnej myšej monoklonálnej protilátky anti-Hsp70 v 5% roztoku BSA (1:1000). Membrány boli potom cez noc inkubované za mierneho miešania pri 4 °C. Nasledovalo trikrát opakované premývanie 20 ml roztoku TTBS po dobu 20 min. Membrány boli potom prenesené do roztoku s koziou anti-myšou sekundárnou protilátkou značenou alkalickou fosfatázou (AP) v 5% roztoku BSA, riedenie 1: 5000. Membrány boli znovu 3x 20 min. premývané 20 ml TTBS a potom bol pridaný farbivý roztok NBT-BCIP pre vizualizáciu proteínových bandov. Membrány boli následne premyté deionizovanou vodou, odfotené a vyhodnotené v programe ImageJ.

Použité roztoky:

- 4x koncentrovaný Laemmliho vzorkovací pufor: 0,125 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 0,2% brómfenolová modrá; 5% merkaptóetanol
- Blotovacie pufrí: 0,025 mol·l⁻¹ Tris-HCl; 0,192 mol·l⁻¹ glycín, 20% (v/v) metanol
- TTBS: 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl; 0,5 mmol·l⁻¹ NaCl; pH 7,5; 0,1% Tween-20
- AP pufrí: 100 mmol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 9,5); 5 mmol·l⁻¹ MgCl₂; 100 mmol·l⁻¹ NaCl
- NBT roztok: 10% NBT v 70% DMF

- BCIP roztok: 5% NBT v 100% DMF
- Farbiaci roztok NBT-BCIP: 10 ml AP pufoer, 33 μ l roztoku NBT, 33 μ l roztoku BCIP

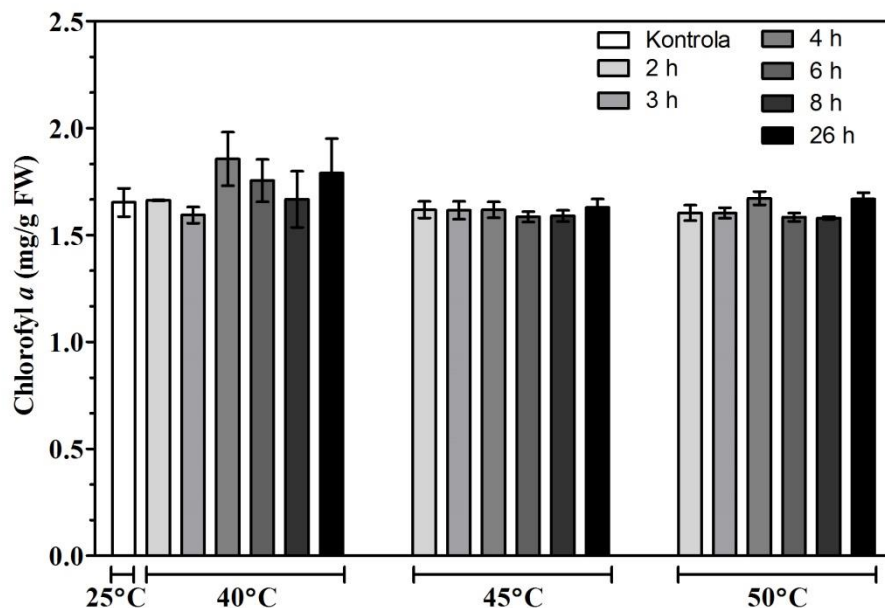
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Zmeny obsahu chlorofylu v listoch po expozícii teplotnému stresu

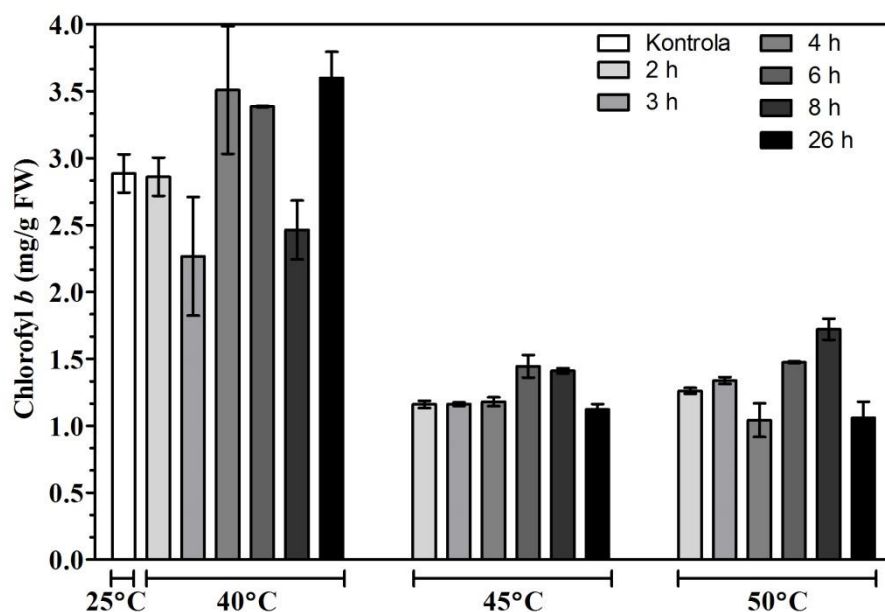
Zelené farbivo chlorofyl, nachádzajúce sa v chloroplastoch, má dôležitú úlohu pri premene svetelnej energie na chemickú, ku ktorej dochádza počas fotosyntézy. Na absorpcii najúčinnnejšej oblasti svetelného žiarenia v rozmedzí vlnových dĺžok 400–700 nm sa podieľa chlorofyl *a* (modrozelený). Chlorofyl *b* (žltozelený) sa odlišuje v substitúcii metylovej skupiny za aldehydovú na treťom uhlíku (Woodward *et al.*, 1960).

Na Obr. 16 je zobrazené grafické vyhodnotenie spektrofotometrického stanovenia obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* v listoch rajčiaka cv. Micro-Tom. Hodnoty obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* (prepočítané na mg/g čerstvej váhy) pre jednotlivé teploty sú uvedené ako priemerné hodnoty vzťahnuté ku kontrolnej vzorke inkubovanej pri 25 °C. Po aplikácii TS nebol pozorovaný významný pokles obsahu chlorofylu *a* oproti kontrolnej vzorke (Obr. 16(a)). V prípade chlorofylu *b* (Obr. 16(b)) došlo k výraznému zníženiu jeho obsahu po vystavení TS 45 °C a k výraznému poklesu najmä po 4 h a 26 h po vystavení TS pri 50 °C. Obsah chlorofylu výrazne závisí od druhu a jeho fyziologických reakcií či schopností tolerovať stres (Siddiqui *et al.*, 2015). Podľa Berova *et al.* (2009) došlo u rajčiaka jedlého kultivarov Marty a Topaz po vystavení dlhodobému TS pri 35°C k najvýraznejšiemu poklesu obsahu chlorofylu *a* o 10-32%, avšak u chlorofylu *b* neboli zmeny významne pozorovateľné. Camejo *et al.* (2005) podrobili dva kultivary rajčiaka jedlého TS pri 45 °C počas 2 h a pozorovali zníženie rýchlosti fotosyntézy a fotochemickej účinnosti PSII u náchylného kultivaru Campbell-28. Pri dlhodobom pôsobení TS (35°C, 15 dní) bol detekovaný signifikantný pokles obsahu chlorofylu *a* aj *b* u kultivarov *Solanum lycopersicum* cv. Boluda, Monsanto, Torre Pacheco, Murcia, Spain (Martinez *et al.*, 2018). V ďalšej štúdii bola analyzovaná fotosyntetická aktivita po 24 h expozícii pri teplote 37 °C u rastlín rajčiaka cv. Micro-Tom a mutantu so zvýšenou expresiou mitochondriálneho sHSP23.6 (*MT-sHSP23.6*). Divoký typ cv. Micro-Tom vykazoval významné zníženie fluorescencie chlorofylu *b*. U mutantu *MT-sHSP23.6* detekovali zvýšenie aktivity akceptorov elektrónov PSII, ako aj zvýšenú kapacitu absorpcie, zachytávanie a prenosu energie (Huther *et al.*, 2013).

(a)



(b)



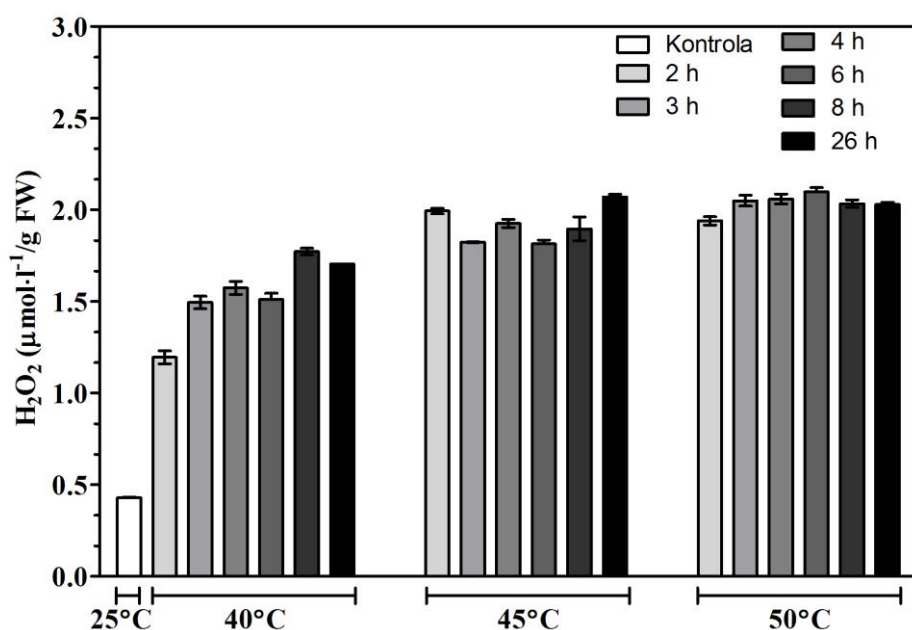
Obr. 16 Stanovenie obsahu chlorofylu *a* a chlorofylu *b* v priebehu obrannej odpovedi modelovej rastliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na pôsobenie teplotného stresu (TS). Vzorky boli odoberané v časoch 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozícii TS pri 40, 45 a 50 °C. Obsah chlorofylu *a* a chlorofylu *b* bol stanovený spektrofotometricky pri vlnových dĺžkách 647 a 663 nm, obsah bol prepočítaný na mg/g čerstvej váhy a porovnaný s kontrolnou nestresovanou vzorkou inkubovanou pri teplote 25 °C.

4.2 Vplyv teplotného stresu na produkciu peroxidu vodíka a lipidovú peroxidáciu

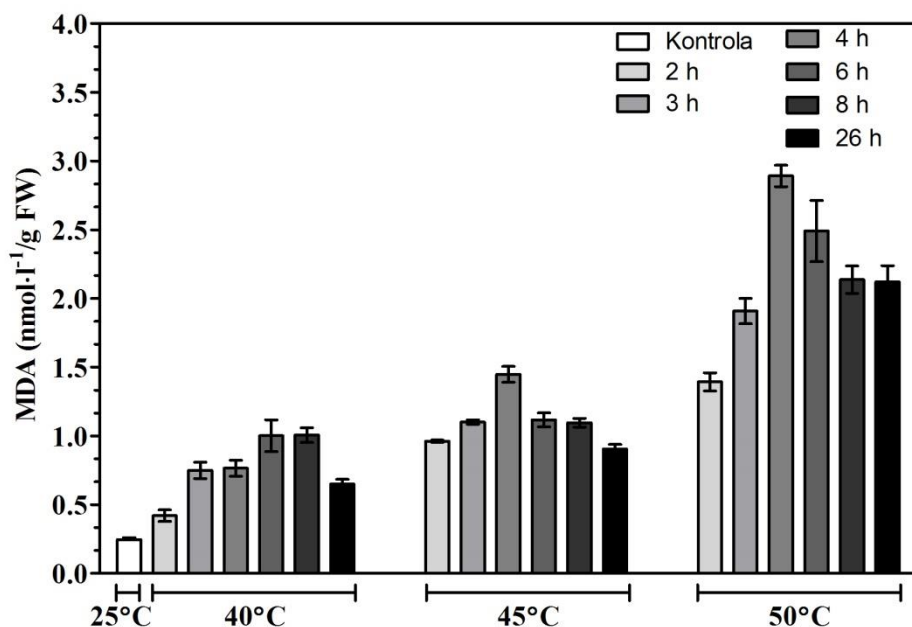
H₂O₂ je aktívnou signálnou molekulou, avšak jej vysoké hladiny môžu výrazne poškodiť jednotlivé organely, čo v konečnom dôsledku môže viesť k bunkovej smrti (Vranová *et al.*, 2002). Vplyvom TS dochádza k poškodeniu membránovej integrity a zvýšenému obsahu MDA ako jedného z významných markerov lipidovej peroxidácie. Okrem iných produktov vzniká MDA ako následok rozkladu polynenasýtených lipidov pôsobením ROS (Halliwell a Gutteridge, 1984).

Na Obr. 17 je graficky znázornené vyhodnotenie spektrofotometrického stanovenia obsahu H₂O₂ v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}/\text{g}$ čerstvej váhy. Po vystavení rastlín TS pri 40, 45 a 50 °C došlo k výraznému nárastu obsahu H₂O₂ vo všetkých časových intervaloch (Obr. 17). Signifikantný nárast oproti kontrolnej vzorke bol spozorovaný najmä v neskoršej fáze TS, a to po 26 h pri 45 °C a 4 h pri 50 °C. Obr. 18 graficky znázorňuje vyhodnotenie spektrofotometrického stanovenia lipidovej peroxidácie s použitým štandardom MDA, pričom jeho obsah je vyjadrený v $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}/\text{g}$ čerstvej váhy. Po expozícii TS bol spozorovaný mierny nárast lipidovej peroxidácie v ranej fáze. Najvýraznejší nárast bol zaznamenaný pri 50 °C predovšetkým po 4 h.

Podľa štúdie Mohammed a Tarpley (2010) došlo k významnému nárastu obsahu H₂O₂ a O₂^{•-} (124% a 43%) v ciroku po vystavení TS 40/30 °C po dobu 2 h. U pšenice exponovanej teplote 33 °C počas 2 dní došlo k výraznému zvýšeniu produkcie O₂^{•-} (68 %) a obsah MDA tiež vzrástol o 27% v 2 dni po expozícii TS v počiatočných štádiách vývoja semenáčikov a tento trend pokračoval aj v neskorších fázach vývoja, kedy bol pozorovaný nárast obsahu MDA o 58% (Savicka & Škute, 2010). Trojnásobne zvýšené hladiny H₂O₂ boli stanovené u rajčiaka *S. lycopersicum* cv. Tmknvf2 vystavenému dlhodobému TS (35 °C, 30 dní) (Rivero *et al.*, 2004). V listoch *S. lycopersicum* cv. Puhong 968 boli sledované zmeny aktivity antioxidantných enzýmov u rastlín kultivovaných v režime 38/28 °C deň/noc po dobu 7 dní a súčasne bol sledovaný vplyv exogénne aplikovaného spermidínu (Spd). Exogénne aplikácie 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Spd na listy zmiernila inhibíciu rastu vyvolaného TS. Vplyvom TS boli výrazne zvýšené hladiny MDA a H₂O₂, ktoré boli znížené aplikáciou Spd (Sang *et al.*, 2017).



Obr. 17 Stanovenie produkcie peroxidu vodíka v priebehu obrannej odpovedi *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na pôsobenie teplotného stresu (TS). Vzorky boli odoberané v časoch 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozícii TS pri 40, 45 a 50 °C. Produkcia peroxidu vodíka bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 560 nm.



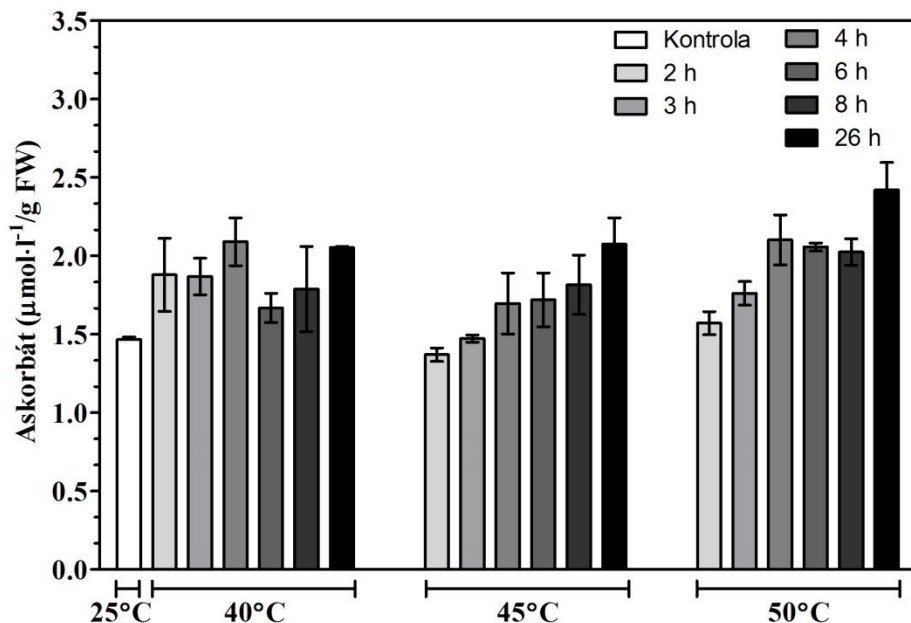
Obr. 18 Stanovenie lipidovej peroxidácie v priebehu obrannej odpovedi *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na pôsobenie teplotného stresu (TS). Vzorky boli odoberané v časoch 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozícii TS pri 40, 45 a 50 °C. Produkcia sekundárnych produktov lipidovej peroxidácie – malondialdehydu (MDA) bola stanovená metódou TBARS spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 532 nm.

4.3 Zapojenie neenzýmových antioxidantov v obrannej reakcii

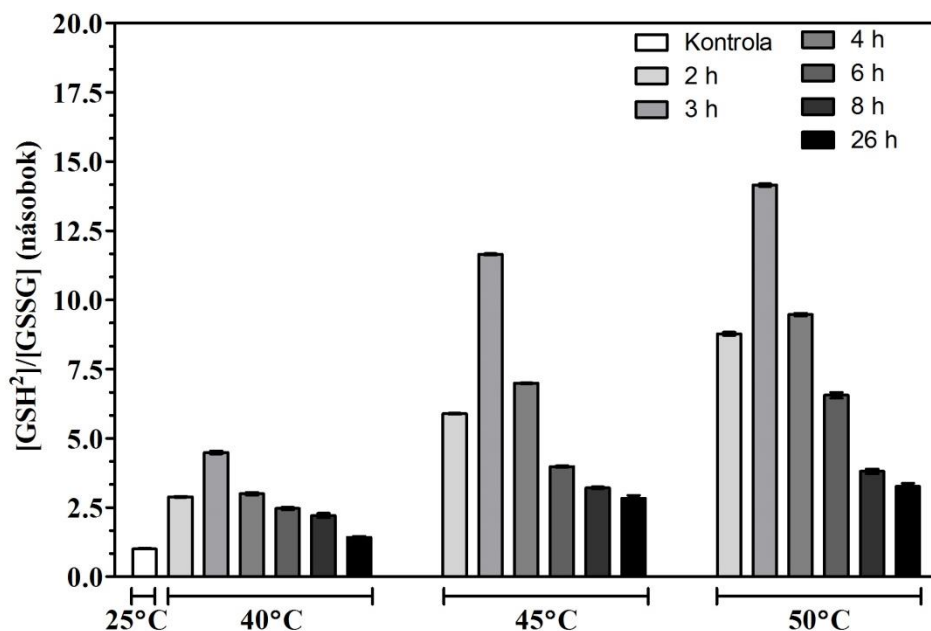
Medzi veľmi účinné antioxidanty zaraďujeme kyselinu askorbovú (Ask) a redukovaný glutatión (GSH). Antioxidačná kapacita (AOX) poskytuje informáciu o dĺžke trvania antioxidačného účinku (Šulc *et al.*, 2007). Pomer $GSH^2/GSSG$ je uvádzaný ako marker oxidačného stresu a spolu s redoxným stavom GSH a jeho reguláciou, sú kľúčovými komponentami pre termotoleranciu (Szalai *et al.*, 2009).

Na Obr. 19 je graficky znázornené vyhodnotenie spektrofotometrického stanovenia celkovej AOX s použitím askorbátu ako štandardu, pričom množstvo je vyjadrené v $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}/\text{g}$ čerstvej váhy. Po vystavení TS došlo k zvýšeniu celkovej AOX prevažne po 4 h a 26 h pri 40 °C. V rámci TS pri 45 °C bol zaznamenaný najvyšší nárast po 26 h rovnako ako aj pri teplote 50 °C. Na Obr. 20 je graficky vyhodnotené stanovenie pomeru hladín $GSH^2/GSSG$. Po expozícii TS bol spozorovaný najvyšší nárast po 3 h od vystavenia stresu pri 40, 45 i 50 °C. V neskorších fázach od expozície TS sa hladiny GSH postupne znižovali. U TS pri 40°C sa po 26 h hladina znížila na úroveň nestresované vzorky (Obr. 20).

Dôležitá úloha GSH a Ask, najvýznamnejších antioxidantov podieľajúcich sa na vychytávanie ROS počas TS, sa skúmala v niekoľkých štúdiách. V štúdiu Kocsy *et al.* (2002) bola skúmaná rôzna tolerancia voči TS (40 °C, 1 deň) v dvoch genotypov pšenice, pričom bolo zistené, že vplyvom TS došlo k akumulácii GSH, čím sa zvýšila aktivita enzýmov, ktoré sa podieľajú na jeho syntéze a v konečnom dôsledku sa zvýšil pomer $GSH^2/GSSG$. U rastliny *Malus domestica* Borkh vystavené pôsobeniu 40 °C počas 2 h bolo stanovené najvyššie množstvo celkového GSH a zníženie obsahu Ask (Ma *et al.*, 2008). Zvýšené hladiny antioxidantov Ask, GSSG a GSH boli detekované u rajčiaka *S. lycopersicum* cv. Tmknvf2 vystavenému dlhodobému TS (35 °C, 30 dní) (Rivero *et al.*, 2004). Podobne, u *S. lycopersicum* cv. Floradade citlivého na TS, boli pozorované zvýšené hladiny $GSH^2/GSSG$ a celková AOX oproti rezistentným kultivarom Tamasabro, Heat Wave, LHT-24 a Solar Set pri TS 34 °C po dobu 30 dní (Rainwater *et al.*, 1996). TS pri 35 °C po dobu 2 h vyvolal u *S. lycopersicum* cv. 9021 nárast pomeru $GSH^2/GSSG$ o 150 % a obsahu Ask o 30 % po 24 h od začiatku expozície TS (Ogweno *et al.*, 2009).



Obr. 19 Stanovenie celkovej antioxidačnej kapacity v priebehu obrannej odpovedi *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na pôsobenie teplotného stresu (TS). Vzorky boli odoberané v časoch 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozícii TS pri 40, 45 alebo 50 °C. Pre stanovenie bola použitá metóda s DPPH. Absorbancia vzniknutého redukovaného DPPH-H bola meraná spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 515 nm.



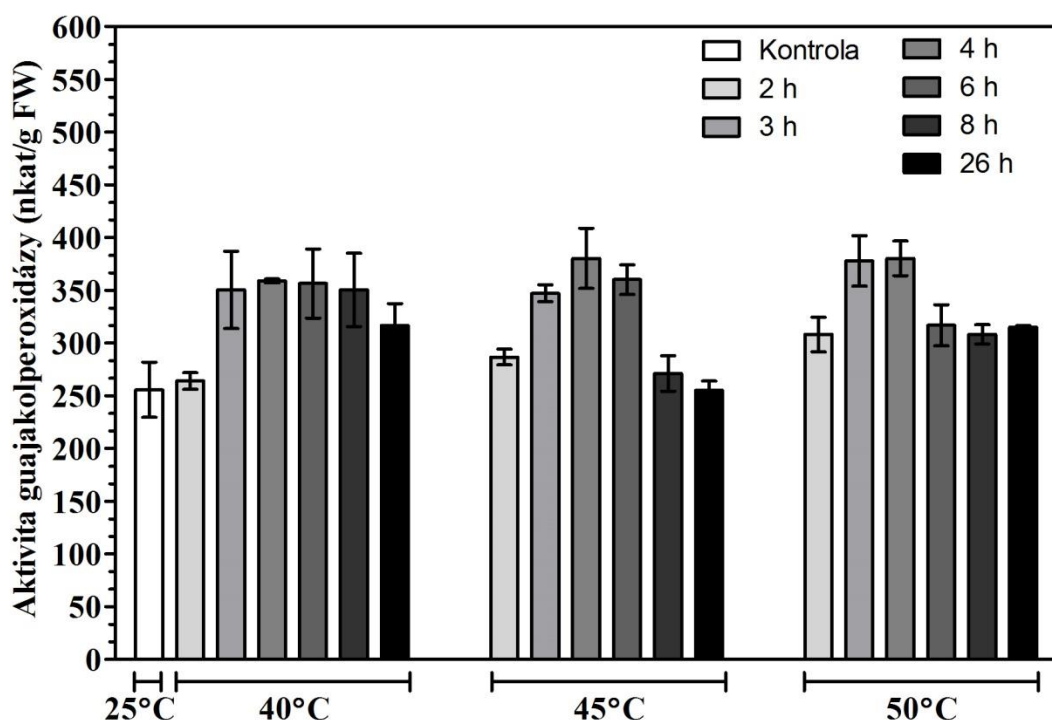
Obr. 20 Pomer hladín redukovaného a oxidovaného glutatiónu ($GSH^2/GSSG$) v priebehu obrannej odpovedi *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na pôsobenie teplotného stresu (TS). Vzorky boli odoberané v časoch 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozícii TS pri 40, 45 a 50 °C. Bola použitá fluorescenčná metóda s monochlórobimánom či tris(2-karboxyethyl)fosfinom (excitácia 360 nm, emisie 460 nm).

4.4 Zapojenie enzýmových antioxidantov v obrannej reakcii

4.4.1 Aktivita guajakolperoxidázy

Guajakolperoxidáza (GPOX, EC 1.11.1.7) je významným antioxidantným enzýmom z rodiny peroxidáz. Jedná sa o hem obsahujúci enzým, ktorý ako donor elektrónov k rozkladu H_2O_2 , využíva fenolové látky ako napríklad pyrogallol či guajakol (Ivanov *et al.*, 2013).

Na Obr. 21 je znázornené grafické vyhodnotenie spektrofotometrického merania aktivity GPOX vyjadrenej v nkat/g čerstvej váhy. Bol zaznamenaný dvojfázový nárast aktivity po 3, 4 h od vystavenia TS pri 40, 45 i 50 °C. Ďalej bol významný nárast pozorovaný po 6 h a 8 h TS pri 40 °C, 6 h pri 45 °C.

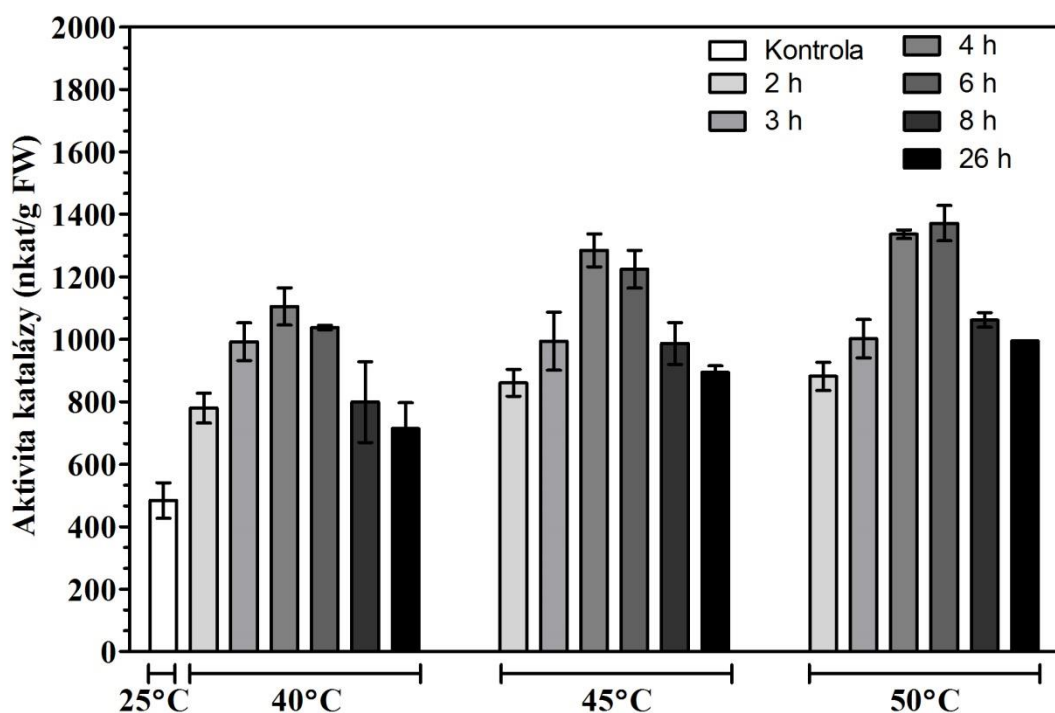


Obr. 21 Stanovenie aktivity guajakolperoxidázy v priebehu obrannej odpovedi *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na pôsobenie teplotného stresu (TS). Vzorky boli odoberané v časoch 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozícii TS pri 40, 45 alebo 50 °C. Aktivita enzýmu bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 436 nm. Ako substrát bol do reakcie pridaný guajakol v koncentrácii $35 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a H_2O_2 v koncentrácii $0,7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

4.4.2 Aktivita katalázy

Kataláza (CAT, EC 1.11.1.6) je antioxidačným enzýmom, ktorý vo svojej štruktúre obsahuje tetramérny hem, vzhľadom k tomu má potenciál priamo dismutovať H_2O_2 na H_2O a O_2 (Garg a Manchada, 2009).

Na Obr. 22 je graficky znázornené vyhodnotenie spektrofotometrického stanovenia aktivity CAT uvedenej v nkat/g čerstvej váhy. Po vystavení TS 2 h pri 40 °C bola najvyššia aktivita zaznamenaná po 4 a 6 h od vystavenia TS oproti kontrolnej vzorke. V rámci TS pri 45 °C a 50 °C bol tento trend výraznejší – aktivita CAT sa zvýšila 2,5x. V neskoršej fáze obrannej reakcie (8 a 26 h) bolo pozorované zníženie aktivity CAT.

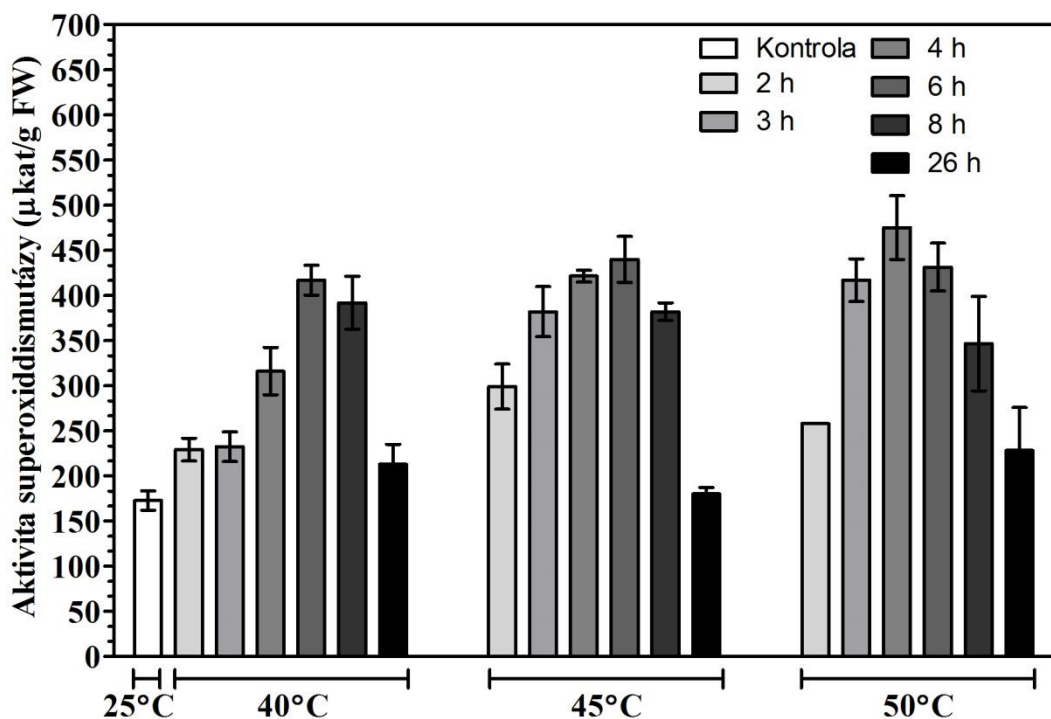


Obr. 22 Stanovenie aktivity katalázy v priebehu obrannej odpovedi modelovej rastliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na pôsobenie teplotného stresu (TS). Vzorok boli odoberané v časoch 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozícii TS pri 40, 45 a 50 °C. Aktivita enzýmu bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 240 nm. Ako substrát bol do reakcie pridaný H_2O_2 v koncentrácii $60 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

4.4.3 Aktivita superoxidodismutázy

V snahe zachovať fyziologické koncentrácie ROS v rámci rastlinnej bunky sa podieľa aj metaloenzým superoxidodismutáza (SOD, EC 1.15.1.1), ktorý katalyzuje premenu $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 (Mittler, 2002).

Na Obr. 23 je graficky znázornené vyhodnotenie spektrofotometrického stanovenia aktivity SOD v $\mu\text{kat/g}$ čerstvej váhy. Po vystavení TS 40 °C a 45 °C bol pozorovaný takmer 2,5 násobný nárast aktivity po 6 a 8 h. Pri TS 50 °C došlo k najvyššiemu nárastu aktivity po 4 h, pričom po 8 h bolo pozorované výrazné zníženie aktivity SOD. V neskoršej fáze obrannej reakcie (26 h) bolo stanovené zníženie aktivity SOD na hodnotu aktivity kontrolnej nestresovanej vzorky.



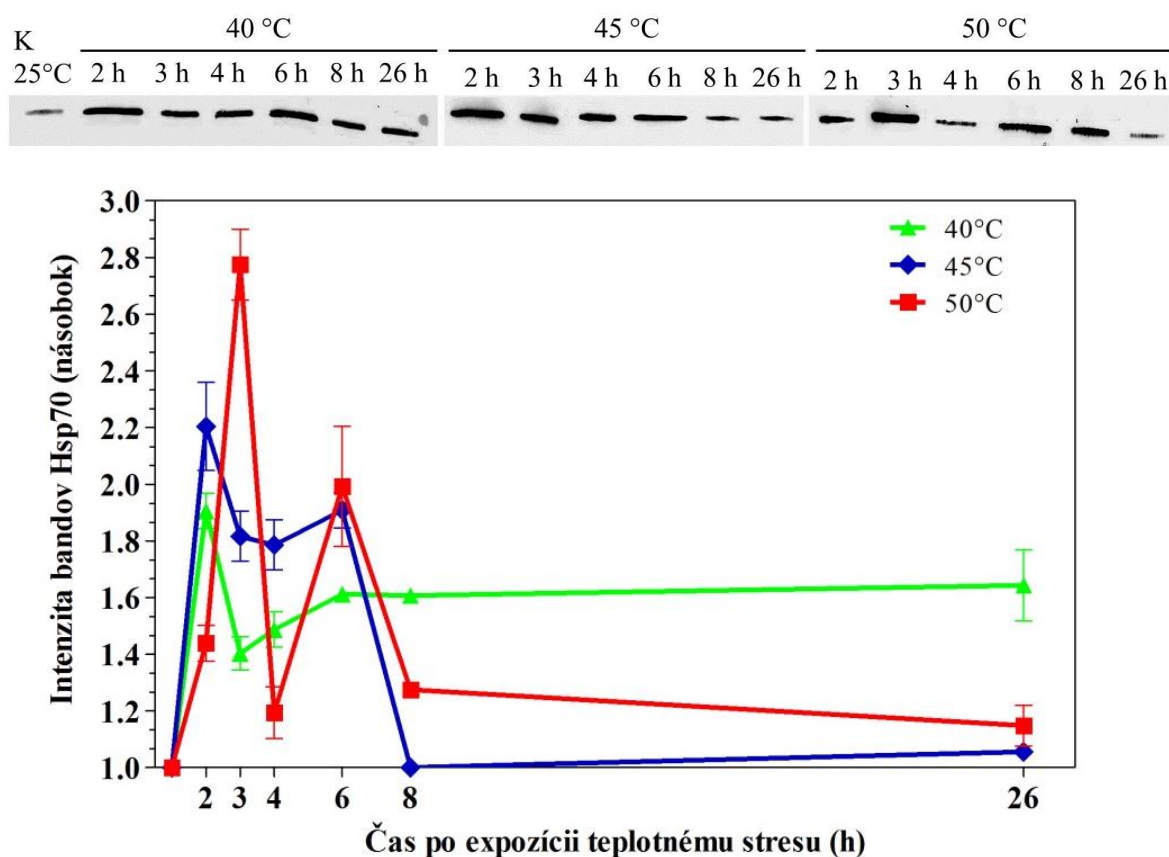
Obr. 23 Stanovenie aktivity superoxidodismutázy (SOD) v priebehu obrannej odpovedi modelovej rastliny *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom na pôsobenie teplotného stresu (TS). Vzorky boli odoberané v časoch 2, 3, 4, 6, 8 a 26 h po 2 h expozícii TS pri 40, 45 alebo 50 °C. Aktivita enzýmu bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 420 nm. Ako substrát bol do reakcie pridaný pyrogallol v koncentrácii $6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Rastliny majú veľmi dômyselne vyvinuté účinné obranné mechanizmy pre ich prežitie pred oxidatívnym stresom indukovaným vysokými teplotami. Tolerancia rastlín voči TS býva často spojená so zvýšením antioxidačnej kapacity vďaka enzymatickým detoxifikačnom systému. Aktivita rady antioxidačných enzýmov je citlivá voči teplote. Chakrabortty a Pradhan (2011) uvádza, že CAT a SOD vykazujú zvýšenie svojej enzymovej aktivity pri TS v rozsahu 35-40 ° C u semenáčikov šošovky, avšak pri teplote 50 °C ich aktivita klesá. V prípade POX bol pozorovaný pokles aktivity v rozmedzí TS od 20 do 50 °C. Balla *et al.* (2009) demonštroval význam antioxidačného enzymového systému pri obrane voči TS (35/20 °C, deň/noc) v zrnách pšenice ozimnej. Aktivita CAT bola zvýšená, čo svedčí o zvýšenej tolerancii voči TS. Ďalej bolo zistené, že zvýšená tolerancia odrôd pšenice koreluje s nárastom hladiny antioxidantov Ask a GSH. 5 dňový termotolerantný genotyp kapusty sitinovej BPR-542-6 a citlivý genotyp NPJ-119 boli exponované TS 45,0 ± 0,5 °C podľa Rani *et al.* (2013). Výsledky ukázali zvýšenie aktivity antioxidačných enzýmov GR, APX, CAT, SOD aj POX, avšak u termotolerantného genotypu boli významne vyššie. Rastliny *Raphanus sativus* boli vystavené TS (40 °C deň/30 °C noc) po dobu 9 dní. Zvýšenie obsahu H₂O₂, ako aj aktivity SOD, CAT a GPOX boli pozorované po 1 dni expozície a zvýšili sa počas 3 dní. Po tejto dobe sa ich aktivita znížila na úroveň kontrolných rastlín do 9. dňa (Chen *et al.*, 2014b).

4.5 Zmeny hladín heat shock proteínu 70

Heat shock proteíny (Hsp), známe tiež ako tzv. molekulárne chaperoniny, sú esenciálnou súčasťou pri procese skladania proteínov. Sú schopné rozpoznania a následnej interakcie s nestabilnými alebo inaktívnymi proteínmi. Za fyziologických podmienok sa exprimujú v nízkych hladinách, avšak pôsobením stresových faktorov dochádza k ich intenzívnejšej expresii. U vyšších rastlín je produkcia Hsp indukovaná teplotami okolo 38 - 40 °C (Iba, 2002). Hsp sú klasifikované do piatich hlavných tried v závislosti na ich molekulovej hmotnosti, avšak skupina, ktorej sa kladie najväčší dôraz je Hsp70, indukovaná teplotným stresom (Vierling *et al.*, 1991). Podľa štúdií Piterková *et al.* (2013) a Kubienová *et al.* (2013) boli zaznamenané signifikantné zmeny produkcie Hsp70 TS pri 40 °C po 2 h expozícii listových diskov alebo celých genotypov rajčiaka (*S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicum* cv. Amateur).

Na Obr. 24 je znázornená imunochemická detekcia Hsp70 v listoch *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom a denzitometrické vyhodnotenie intenzity detekovaného Hsp70. Po vystavení TS (40, 45 či 50°C po dobu 2 h) bolo overené zvýšenie produkcie Hsp70 proteínov najmä v ranej fázi obrannej reakcie, a to 2 h po ukončení TS, kedy ďalej so vzrastajúcim časom klesá intenzita bandov Hsp70. To značí intenzívnu syntézu v ranej fázi v rámci obrannej reakcie a následne pokles v neskoršej fáze (Obr. 24). Výsledky potvrdzujú významnú úlohu Hsp70 v obranných reakciách ako molekulárnych chaperonov, ktoré sú kľúčové pre správne posttranslačné zloženie proteínov, ďalej tiež stimulujú opravné mechanizmy a sú schopné zabrániť poškodeniu proteínov či strate aktivity enzýmov (Huang & Xu, 2008).



Obr. 24 Detekcia Hsp70 v priebehu obrannej odpovedi na pôsobenie teplotného stresu (TS) u *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom. (a) imunochemická detekcia Hsp70 u vzoriek, ktoré boli odoberané v časoch 2, 3, 4, 6, 8, 26 h po 2 h expozícii TS pri 40, 45 a 50 °C. Do jamiek bolo nanosených 25 μ l extraktu. Primárna myšia monoklonálna anti-Hsp70 protilátka (1:1000), kozia sekundárna anti-myšia IgG protilátka značená AP (1:5000), farbenie NBT-BCIP. (b) Denzitometrické vyhodnotenie intenzity detekovaného bandu Hsp70 v programe ImageJ.

5 ZÁVER

Cieľom bakalárskej práce bolo štúdium vplyvu teplotného stresu (TS), ako abiotického stresového faktora, na produkciu reaktívnych foriem kyslíka u *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom. V rámci štúdia obrannej odpovede tohto kultivaru rajčiaka bolo cieľom preukázať využitie enzýmových a neenzýmových mechanizmov ako aj syntézy heat shock proteínov počas rannej a neskoršej fáze od vystavenia teplotnému stresu.

1. Po aplikácii TS nebol pozorovaný významný pokles obsahu chlorofylu *a*. V prípade chlorofylu *b* došlo k výraznému zníženiu jeho obsahu po vystavení TS pri 45 °C a 50 °C.
2. Zvýšenie hladiny peroxidu vodíka a taktiež peroxidácie lipidov bolo pozorované počas rannej aj neskoršej fáze obrannej odpovede.
3. V rámci celkovej antioxidačnej kapacity bol potvrdený nárast obsahu askorbátu ako aj nárast pomeru GSH²/GSSG najmä v neskoršej fáze TS.
4. Vplyvom TS vzrástla aktivita antioxidačných enzýmov. U guajakolperoxidázy bol zaznamenaný signifikantný nárast aktivity najmä po 4 h, aktivita superoxiddismutázy vzrástla po 4 a 6 h TS a aktivita katalázy taktiež prevažne po 4 a 6 h od vystavenia TS.
5. V rámci obrannej odozvy prostredníctvom heat shock proteínov bola pozorovaná najvýraznejšia syntéza predovšetkým v ranej fáze TS a následne, v neskoršej fáze TS, došlo k jej poklesu.

6 LITERATÚRA

Asada K. (1992): Ascorbate Peroxidase- Hydrogen Peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**, 235-241.

Asada K. (1999): The water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 601-639.

Ashraf M., Foolad M.R. (2007): Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**, 206-216.

Balla K., Bencze S., Janda T., Veisz O. (2009): Analysis of heat stress tolerance in winter wheat. *Acta Agronomica Hungarica* **57**, 437- 444.

Berova M., Stoeva N., Zlatev Z., Ganeva D. (2008): Physiological response of some tomato genotypes (*Lycopersicon esculentum L.*) to high temperature stress. *Journal of Central European Agriculture* **9**, 1-10.

Bhattacharjee S. (2005): Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant. *Current Science* **89**, 1113-1121.

Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. (2003): Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Annals of Botany* **91**, 179-194.

Bolwell G.P., Woitasek P. (1997): Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defense-broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**, 347-349.

Boston R. S., Viitanen P. V., Vierling E. (1996): Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology* **32**, 191-222.

Boveris A., Navarro A. (2008): Brain mitochondrial dysfunction in aging. *Life* **60**, 308-314.

Britt A.B. (1999): Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in Plant Science* **4**, 20-25.

Bukau B., Horwich A. L. (1998): The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351-366.

Camejo D., Rodríguez P., Morales A., Dell Amico J. M., Torrecillas A., Alarcon, J. J. (2005): High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology* **162**, 281-289.

Carvalho M.H.C. (2008): Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior* **3**, 156-165.

Collins A. (2001): Carotenoids and genomic stability. *Mutation Research* **475**, 1-28.

Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. (2003): Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *The FASEB Journal* **17**, 1195-1214.

Corpas F.J., Barroso J.B., del Río L.A. (2001): Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**, 145-150.

Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 779-795.

Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. (1997): Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* **324**, 1-18.

- del Río L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gómez M., Barroso J.B. (2002): Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1255-1272.
- Dianzani M., Barrera G. (2008): Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products. In: *Free Radical Pathophysiology*. (Alvarez S., Evelson P., eds.), Transworld Research Network, Kerala, India, 19-38.
- Dizdaroglu M., Jaruga P. (2012): Mechanism of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research* **46**, 382-419.
- Driedonks N., Xu J., Peters J. L., Park S., Rieu I. (2015): Multi-Level Interactions Between Heat Shock Factors, Heat Shock Proteins, and the Redox System Regulate Acclimation to Heat. *Frontiers in Plant Science* **6**, 999-1008.
- Dybing E., Nelson J.R., Mitchel J.R., Sesame H.A., Gillete J.R. (1976): Oxidation of a methyl dopa and other catechols by cytochromes R450-generated superoxide anion: possible mechanism of methyl dopa hepatitis. *Molecular Pharmacology* **12**, 911-920.
- Ehrenshaft M., Deterding L.J., Mason R.P. (2015): Tripping up Trp: Modification of protein tryptophan residues by reactive oxygen species, modes of detection and biological consequences. *Free Radical Biology & Medicine* **89**, 220-228.
- Eyal E., Levy A.A. (2002): Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 112-117.
- Fenton H.J.H. (1894): Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society* **65**, 899-910.
- Fernández-Torquemada Y., Sánchez-Lizaso J. L. (2013): Effects of salinity on seed germination and early seedling growth of the Mediterranean seagrass. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **119**, 64-70.
- Flors C., Nonell S. (2006): Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenolone phytoalexins. *Accounts of Chemical Research* **39**, 293-300.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D., Davies J.M., Dolan L. (2003): Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulated plant cell growth. *Nature* **422**, 442-446.
- Forstrom J.W., Zakowski J.J., Tappel A.L. (1978): Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry* **17**, 2639-44.
- Foyer C.H., Noctor G. (2005): Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* **17**, 1866-1875.
- Fridovich S., Porter N. (1981): Oxidation of arachidonic acid in micelles by superoxide and hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry* **256**, 260-265.
- Garg N., Manchanda G. (2009): ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems* **143**, 8-96.
- Gray M.W., Burger G., Lang B.F. (1999): Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Gupta B., Huang, B. (2014): Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics* **12**, 1-18.
- Haber F., Weiss J. (1934): The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceeding of the Royal Society of London* **147**, 332-35.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* **218**, 1-14.

Hasanuzzaman M., Hossain M.A., Teixeira da Silva J.A., Fujita M. (2012): Plant responses and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. In: *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies*. (Bandi V., Shanker A.K., Shanker C., Mandapaka M., eds.), Springer, Berlin, Germany, 261–316.

Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M. M., Roychowdhury R., Fujita M. (2013): Physiological, biochemical and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 9643–9684.

Hatz S., Lambert J.D.C., Ogilby P.R. (2007): Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochemical and Photobiological Sciences* **6**, 1106–1116.

Hodges D.M., John M.D., Charles F.F., Robert K.P. (1999): Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**, 604–611.

Hossain M.A., Nakano Y., Asada K. (1984): Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiology* **25**, 385–395.

Huang B., Xu C. (2008): Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1230–1237.

Huther C. M., Ramm A., Rombaldi C. V., Bacarin, M. A. (2013): Physiological response to heat stress of tomato ‘Micro-Tom’ plants expressing high and low levels of mitochondrial sHSP23. 6 protein. *Plant Growth Regulation* **70**, 175–185.

Chakraborty U., Pradhan D. (2011): High temperature-induced oxidative stress in *Lens culinaris*, role of antioxidants and amelioration of stress by chemical pre-treatments. *Journal of Plant Interactions* **6**, 43–52.

Chang R., Jang C. J., Branco-Price C., Nghiem P., Bailey-Serres J. (2012): Transient MPK6 activation in response to oxygen deprivation and reoxygenation is mediated by mitochondria and aids seedling survival in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **78**, 109–122.

Chen W.-L., Yang W.-J., Lo H.-F., Yeh D.-M. (2014b): Physiology, anatomy and cell membrane thermostability selection of leafy radish (*Raphanus sativus* var. *oleiformis* Pers.) with different tolerance under heat stress. *Scientia horticulturae* **179**, 367–375.

Chen Z., Young T.E., Ling J., Chang S.-C., Gallie D.R. (2003): Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **100**, 3525–3530.

Chmielowska-Bak J., Gzyl J., Rucinska-Sobkowiak R., Arasimowicz-Jelonek M., Deckert J. (2014): The new insights into cadmium sensing. *Frontiers in Plant Science* **5**, 245.

Iba K. (2002): Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 225–245.

Igamberdiev A.U., Lea P.J. (2002): The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. *Phytochemistry* **60**, 651–674.

Inzé D., Van Montagu M. (1995): Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **6**, 153–158.

Ivanov S., Shopova E., Kerchev P., Sergiev I., Miteva L., Polizoev D., Alexieva V. (2013): Long-term impact of sublethal atrazine perturbs the redox homeostasis in pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Protoplasma* **250**, 95–102.

Jajic I., Sarna T., Strzalka K. (2015): Senescence, Stress, and Reactive Oxygen Species. *Plants* **4**, 393–411.

- Kamal-Eldin A., Appelqvist L.A. (1996): The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* **31**, 671-701.
- Kocsy G., Szalai G., Galiba G. (2002): Effect of heat stress on glutathione biosynthesis in wheat. *Acta Biologica Szegediensis* **46**, 71–72.
- Komencic H., Lyon A., Paterson P.G., Juurlink B.H. (2000): Monochlorbiman fluorimetric method to measure tissue glutathione. *Analytical Biochemistry* **286**, 7-35.
- Königshofer H., Tromballa H. W., Löppert H. G. (2008): Early events in signaling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production. *Plant, Cell & Environment* **31**, 1771–1780.
- Krieger-Liszka A., Fufezan C., Trebst A. (2008): Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* **98**, 551-564.
- Kubienová L., Sedlářová M., Vítěčková-Wunchová A., Piterková J., Luhová L., Mieslerová B., Lebeda A., Navrátil M., Petřivalský M. (2013): Effect of extreme temperatures on powdery mildew development and Hsp70 induction in tomato and wild *Solanum* spp. *Plant Protection Science* **49**, 41–54.
- Kumar K. S. (2014): Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **104**, 51–71.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lamb C., Dixon R.A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 25–275.
- Li Q. B., Haskell D. W., Guy C. L. (1999): Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Molecular Biology* **39**, 21-34.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C. (2001): Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry (CPFA)*. (Wrolstad, R.E., Acree, T.E., An, H., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F. and Sporns, P., eds.), John Wiley and Sons, New York, 1-8.
- Loewus F. A. (1988): Ascorbic acid and its metabolic products. *The Biochemistry of Plants* (Preiss J. ed.), Academic Press, New York, 8.
- Ma X., Ma F., Mi Y., Ma Y., Shu H. (2008): Morphological and physiological responses of two contrasting *Malus* species to exogenous abscisic acid application. *Plant growth regulation* **56**, 77.
- Madamanchi N.R., Runge M.S. (2007): Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation Research* **100**, 460-473.
- Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. (2012): A burst of plant NADPH oxidases. *Trends in Plant Science* **17**, 9-15.
- Marklund (1974): Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* **47**, 469-474.
- Marti E., Gisbert C., Bishop G. J., Dixon M. S., Garcia-Martinez J. L. (2006): Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 2037-2047.
- Martinez V., Nieves-Cordones M., Lopez-Delacalle M., Rodenas R., Mestre TC., Garcia-Sanchez F., Rubio F., Nortes P.A., Mittler R., Rivero R.M. (2018): Tolerance to stress

combination in tomato plants: New insights in the protective role of melatonin. *Molecules* **23**, 1059-1073.

Mateos R.M., León A.M., Sandalio L.M., Gómez M., del Río L.A., Palma J.M. (2003): Peroxisomes from pepper fruits (*Capsicum annuum* L): Purification, characterization and antioxidant activity. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1507–1516.

Meissner R., Jacobson Y., Melamed S., Levyatuv S., Shalev G., Ashri A., Elkind Y. and Levy A.A. (1997): A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal* **12**, 1465-1472.

Meyer A.J. (2008): The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of Plant Physiology* **165**, 390-1403.

Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R. (2010): Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment* **33**,453–467.

Mishra S. K., Tripp J., Winkelhaus S., Tschiersch B., Theres K., Nover L., Scharf K. D. (2002): In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes & Development* **16**, 1555-1567.

Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.

Mohammed A. R., Tarpley L. (2010): Effects of high night temperature and spikelet position on yield-related parameters of rice (*Oryza sativa* L.) plants. *European Journal of Agronomy* **33**, 117–123.

Møller I. M., Jensen P. E., Hansson A. (2007): Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 459–481.

Møller I.M. (2001): Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 561–591.

Morimoto R. I., Sarge K. D., Abravaya K. (1992): Transkriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 21987-21990.

Neill S. J., Desikan R., Hancock J. T. (2003): Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist* **159**, 11–35.

Nimse S.B., Pal D. (2015): Free radicals, natural antioxidants, and their reactions and mechanisms. *RSC Advances* **5**, 27986-28006.

Noctor G., Foyer C.H. (1998): Ascorbate glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249-279.

Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H. (2002): Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1283-1304.

Ogweno J. O., Song X. S., Hu W. H., Shi K., Zhou Y. H., Yu J. Q. (2009): Detached leaves of tomato differ in their photosynthetic physiological response to moderate high and low temperature stress. *Scientia Horticulturae* **123**, 17-22.

Parry M. A. J., Andralojc P. J., Khan S., Lea P. J., Keys A. J. (2002): Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany* **89**, 833–839.

Paulová H., Bochořáková H., Táborská E. (2004): Metódy stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy* **98**, 174-179.

Paulsen C. E., Carroll K. S. (2010): Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chemical Biology* **5**, 47–62.

Peng C.L., Ou Z.Y., Liu N., Lin G.Z. (2005): Response to high temperature in flag leaves of super high-yielding rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu. *Rice Science* **12**, 179-186.

Piterková J., Luhová L., Mieslerová B., Lebeda A., Petřivalský M. (2013): Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection. *Plant Science* **207**, 57–65.

Polle A. (2001): Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate peroxidase–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* **126**, 445–462.

Quan L.-J., Zhang B., Shi W.-W., Li H.-Y. (2008): Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 2-18.

Rainwater D. T., Gossetp D. R., Millhollon E. P., Hanna H. Y., Banks S. W., Lucas M. C. (1996): The relationship between yield and the antioxidant defense system in tomatoes grown under heat stress. *Free Radical Research* **25**, 421-435.

Rani M., Nischal A., Sahoo G.C., Khattri S. (2013): Computational Analysis of the 3-D structure of Human GPR87 Protein: Implications for Structure-Based Drug Design. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **14**, 7473-7482.

Reddy A.R., Raghavendra A.S. (2006): Photooxidative stress. In: *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. (Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Reddy K.J., eds.), Springer, The Netherlands, 157-86.

Repetto M., Boveris A. (2010): Bioactivity of sesquiterpenes: novel compounds that protect from alcohol-induced gastric mucosal lesions and oxidative damage. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **10**, 615-623.

Rhee S., Chae H., Kim K. (2005): Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **38**, 1543–52.

Rhoads D.M., Subbaiah C.C. (2007): Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* **7**, 177–194.

Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., Siedow J.N. (2006): Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiology* **141**, 357–366.

Rivero R. M., Ruiz J. M., Romero L. (2004): Oxidative metabolism in tomato plants subjected to heat stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **79**, 560-564.

Sadanandom A., Poghosyan Z., Fairbairn D.J., Murphy D.J. (2000): Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptides methionine sulfoxide reductase in Arabidopsis. *Plant Physiology* **123**, 1299-1309.

Saito I., Matsuura T., Nakagawa M., Hino T. (1977): Peroxidic intermediates in photosensitized oxygenation of tryptophan derivatives. *Accounts of Chemical Research* **10**, 346–352.

Sang Q., Shan X., An Y., Shu S., Sun J., Guo S. (2017): Proteomic analysis reveals the positive effect of exogenous spermidine in tomato seedlings' response to high-temperature stress. *Frontiers in plant science* **8**, 120.

Savicka M., Škute N. (2010): Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija* **56**, 26–33.

- Scandalios J. G. (1990): Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics* **28**, 1-41.
- Sewelam N., Jaspert N., Kelen K. V. D., Schmitz J., Frerigmann H., Tognetti, V.B., Stahl E., Zeier J., Breusegem F.V., Maurino V.G. (2014): Spatial H₂O₂ signaling specificity: H₂O₂ from chloroplasts and peroxisomes differentially modulates the plant transcriptome. *Molecular Plant* **7**, 1191–1210.
- Sewelam N., Kazan K., Schenk P.M. (2016): Global plant stress signalling: reactive oxygen species at the cross-road. *Frontiers in Plant Science* **7**, 187.
- Siddiqui M.H., Al-Khaishany M.Y., Al-Qutami M.A., Al-Whaibi M.H., Grover A., Ali H.M., Al-Wahibi M.S. (2015): Morphological and physiological characterization of different genotypes of faba bean under heat stress. *Saudi Journal of Biological Sciences* **22**, 656-63.
- Sieferman-Harms D. (1987): The light harvesting function of carotenoids in photosynthetic membrane. *Plant Physiology* **69**, 561-568.
- Singh R., Gautam N., Mishra A., Gupta R. (2011): Heavy metals and living systems: an overview. *Indian Journal of Pharmacology* **43**, 246–253.
- Smirnoff N. (2000): Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 229-235.
- Smirnoff N. (2005): Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. (N. Smirnoff ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, United Kingdom, 53-86.
- Steffens B., Kovalev A., Gorb S. N., Sauter M. (2012): Emerging roots alter epidermal cell fate through mechanical and reactive oxygen species signaling. *Plant Cell* **24**, 3296–3306.
- Storz G., Tartaglia L. A., Ames B. N. (1990): Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**, 189–194.
- Szalai G., Kellos T., Galiba G., Kocsy G. (2009): Glutathione as an Antioxidant and Regulatory Molecule in Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**, 66-80.
- Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horáčková V. (2007): Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidantní aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické Listy* **101**, 584-591.
- Tangahu B.V., Abdullah S.R.S., Basri H., Idris M., Anuar N., Mukhlisin M. (2011): A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical engineering* **21**, 1-31.
- Taulavuori E, Hellström EK, Taulavuori K, Laine K (2001) Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2375-2380.
- Temple M.D., Perrone G.G., Dawes I.W. (2005): Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in Cell Biology* **15**, 319-326.
- Trovato M., Mattioli R., Costantino P. (2008): Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rendiconti Lincei* **19**, 325-346.
- Tuteja N., Ahmad P., Panda B.B., Tuteja R. (2009): Genotoxic stress in plants Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutation Research* **681**, 134-149.
- Vierling E. (1991): The roles of heat shock proteins in plant. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 579-620.
- Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F. (2002): Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1227 -1236.

Wagner D., Hideg E., Gobel C., Feussner I., Nater M., Apel K. (2003): Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 2320-2332.

Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004): Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* **9**, 244-252.

Winston G. W. (1990): Physiological basis for free radical formation in cells: Production and defenses. In: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*. (Alscher R.G., Cumming J.R., eds.), Wiley-Liss, John Wiley and Sons, Inc., New York, 57-86.

Wiseman H., Halliwell B. (1996): Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal* **313**, 17-29.

Woodward R.B., Ayer W.A., Beaton J.M., Bickelhaupt F., Bonnett R., Buchschacher P., Closs G.L., Dutler H., Hannah J., Hauck F.P., Itô S., Langemann A., Le Goff E., Leimgruber W, Lwowski W., Sauer J.,Valenta Z., Volz H. (1960): The total synthesis of chlorophyll. *Journal of the American Chemical Society* **82**, 3800–3802.

Zhang H., Fu X., Jiao W., Zhang X., Liu C., Chang Z. (2005): The association of small heat shock protein Hsp16.3 with the plasma membrane of Mycobacterium tuberculosis: dissociation of oligomers is a prerequisite. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **330**, 1055-1061.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

| | |
|-----------------------------------|--|
| (NH ₄)SO ₄ | síran amónny |
| •O ₂ H | perhydroxylový radikál |
| •OH | hydroxylový radikál |
| ¹ O ₂ | singletový kyslík |
| ³ O ₂ | tripletový kyslík |
| 6PGDH | 6-fosfoglukonátdehydrogenáza |
| AA | akrylamid |
| ACOX | acyl-Coa oxidáza |
| AOX | antioxidanty |
| AP | alkalická fosfatáza |
| APS | persíran amónny |
| APX | askorbátperoxidáza |
| Ask | askorbát |
| bp | páry bázi |
| BSA | hovädzí sérový albumín |
| CAT | kataláza |
| CPD | cyklobután-pyrimidínové diméry |
| cv | kultivar |
| cyt | cytochróm |
| DHAR | dehydroaskorbátreduktáza |
| DMF | dimetylformamid |
| DPI | difenyljódium |
| DPPH | 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) |
| DTPA | dietyléntriámín-pentaoctová kyselina |
| DTT | ditiotreitol |
| ETC | elektrónový transportný reťazec |
| FD | ferredoxín |
| FeSO ₄ | síran železný |
| FNR | ferredoxín NADP ⁺ reduktáza |
| FW | fresh weight (čerstvá váha) |
| G-6-PDH | glukóza-6-fosfátdehydrogenáza |
| GOX | glykolát oxidáza |
| GPX | glutatiónperoxidáza |
| GPX | guajakolperoxidáza |

| | |
|-------------------------------|---|
| GR | glutatiónreduktáza |
| GSH | redukovaný glutatión |
| GSSG | oxidovaný glutatión |
| GST | glutatión-S-transferáza |
| H ₂ O ₂ | peroxid vodíku |
| Hsf | faktory teplotného šoku |
| Hsp | proteíny teplotného šoku |
| ICDH | isocitrátdehydrogenáza |
| IgG | imunoglobulín G |
| LOO• | lipidové peroxylové radikály |
| MAP-K | mitogénom aktivované proteínkinázy |
| MCIB | monochlórbiman |
| MDA | malondialdehyd |
| MDAR | monodehydroaskorbátreduktáza |
| MDHA | monodehydroaskorbát |
| MG | metylglyoxal |
| mg/g | miligram/ gram |
| MgCl ₂ | chlorid horečnatý |
| MT-sHsp | malé mitochondriálne proteíny teplotného šoku |
| NaCl | chlorid sodný |
| NBT-BCIP | nitrotetrazoliová modrá v spojení s 5-bromo-4-chloro-3- indolylfosfátom |
| nm | nanometer |
| NO | oxid dusnatý |
| NO• | radikál oxidu dusnatého |
| O ₂ ^{-•} | superoxidový radikál |
| PC | plastocyanín |
| PQ | plastoquinón |
| Prx | peroxiredoxín |
| PS I | fotosystém I |
| PS II | fotosystém II |
| PUFA | polynenasýtené mastné kyseliny |
| PVPP | polyvinylpolypyrolidón |
| Q | ubichinón |
| QH• | semichinón |

| | |
|---------|---|
| RBOH | Respiratory Burst Oxidase Homologue (rastlinná oxidáza) |
| RO• | alkoxylový radikál |
| ROS | reaktívne formy kyslíka |
| RS• | tiolový radikál |
| RUBISCO | ribulóza-1,5- bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza |
| SDS | dodecylsírán sodný |
| SOD | superoxiddismutáza |
| Spd | spermidín |
| TBA | kyselina tiobarbiturová |
| TBARS | reaktívne substancie kyseliny tiobarbiturovej |
| TCEP | triskarboxyetylfosfín |
| TEMED | tetrametyléndiamín |
| TS | teplotný stres |
| TTBS | tris pufrovaný fyziologický roztok obsahujúci detergent Tween-20 |
| XOD | xantínoxidáza |