

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra experimentální biologie rostlin**

Studijní program: Biologie  
Obor: Experimentální biologie rostlin



**Bc. Barbara Kramná**

Oxidační poškození buněčných komponent po indukci oxidačního stresu specifickými  
herbicidy

Oxidative damage to cellular components after oxidative stress induction by specific  
herbicides

Diplomová práce

**Vedoucí práce:** RNDr. Nad'a Wilhelmová, CSc.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

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

V Praze, 11. 8. 2015

Podpis

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Nadě Wilhelmové, CSc. za cenné rady a vedení při práci, naší milé laborantce Lence Kolčabové za technickou pomoc v laboratoři a kolegyni Mgr. Renátě Schnablové, PhD. za ochotu při práci s konfokálním mikroskopem. V neposlední řadě bych chtěla velice poděkovat RNDr. Tomáši Gichnerovi, DrSc., který mne trpělivě v začátcích vedl a ukázal mi krásy kometového testu, díky kterému jsem mohla pokračovat v práci. Dále patří velké díky přátelům a rodině, kteří mne během psaní podporovali a věnovali mi čas – jmenovitě Anně Fabryové, Barboře Koudelkové, Janu Kramnému a Kateřině Šebestové. A nakonec díky i Tomáši Zelenkovi za počáteční povzbuzení k práci.

## 1. Abstrakt

Oxidační stres je způsoben nadměrnou produkcí a akumulací ROS (reaktivních forem kyslíku) a je častým důvodem buněčného poškození za nepříznivých environmentálních podmínek, např. za sucha, chladu, zasolení. Ve své práci jsem využila specifického působení herbicidů MV (methylviologen) a 3-AT (3-aminotriazol) k přímé indukci oxidačního stresu u rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi). Míra oxidačního poškození byla sledována na úrovni DNA pomocí kometového testu, dále na peroxidaci lipidů, hladině karbonylovaných proteinů a modifikaci aktivit antioxidantních enzymů CAT (katalázy) a APX (askorbátperoxidázy). Konfokální fluorescenční mikroskopie zdokumentovala změnu redoxního stavu buněk po aplikaci herbicidů a při vyšších koncentracích byl pozorovaný signál specificky lokalizován do peroxizómů. Použité herbicidy působily v řádově odlišných koncentracích, MV v  $\mu\text{M}$  a 3-AT v mM a oba způsobily výrazné poškození jaderné DNA. Jako další průkazný marker oxidačního stresu po aplikaci MV se ukázala být karbonylace proteinů. Inhibice antioxidantních enzymů CAT a APX byla oproti 3-AT méně výrazná. Klesající stabilita membrán se ukázala být univerzálním markerem oxidačního poškození pro oba herbicidy, zatímco peroxidace lipidů byla neprůkazná. MV a 3-AT mají rozdílné módy účinku, a každý působí na buněčné komponenty poněkud odlišně.

**Klíčová slova:** reaktivní formy kyslíku, oxidační poškození, herbicidy, kometový test, peroxidace lipidů, antioxidantní enzymy, karboxy-DCFDA

## **Abstract**

Oxidative stress is caused by overproduction and overaccumulation of ROS (reactive oxygen species). This state is responsible for cellular damage during unfavorable environmental conditions such as drought, low temperatures, salinity. In order to directly study oxidative stress at tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) I used specific herbicides, MV (methyl viologen) and 3-AT (3-aminotriazole). There were several markers used for monitoring oxidative damage to cellular components: DNA damage detected by a comet assay, lipid peroxidation, carbonylated proteins and modification of activities of antioxidant enzymes CAT (catalase) and APX (ascorbate peroxidase). Fluorescent microscopy documented changes in a redox state of tobacco cells and a specific signal for peroxisomes was observed after treatment with higher concentrations of MV and 3-AT. Application of both herbicides caused significant DNA damage, while they worked in a different concentrations, MV in  $\mu\text{M}$  and 3-AT in mM. Another convincing oxidative stress marker for MV was protein carbonylation. The inhibition of antioxidant enzymes CAT and APX was less significant when compared to the effects of 3-AT. Decreasing membrane stability proved to be an universal oxidative stress marker for both herbicides. On the other hand, lipid peroxidation was inconclusive. Herbicides MV and 3-AT have different modes of action and each of them caused an oxidative stress with distinct effects on cellular components.

**Key words:** reactive oxygen species, oxidative damage, herbicides, comet assay, lipid peroxidation, antioxidative enzymes, carboxy-DCFDA

## 2. Obsah

<b>1. Abstrakt</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Obsah</b> .....	<b>6</b>
<b>3. Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>8</b>
<b>4. Úvod</b> .....	<b>10</b>
<b>5. Cíle práce</b> .....	<b>12</b>
<b>6. Přehled literatury</b> .....	<b>13</b>
6.1. <i>Oxidační stres</i> .....	13
6.1.1. Reaktivní formy kyslíku .....	14
6.1.2. Molekulární a buněčné poškození .....	16
6.2. <i>Účast ROS v odpovědích k abiotickým stresorům v signalizaci i oxidačním poškození</i> .....	18
6.2.1. Ozáření.....	18
6.2.2. Zasolení a těžké kovy .....	18
6.2.3. Vysoké teploty .....	19
6.2.4. Chlad .....	20
6.2.5. Sucho .....	20
6.3. <i>Antioxidační obrana</i> .....	21
6.3.1. Neenzymatické antioxidanty .....	21
6.3.2. Antioxidační enzymy.....	23
6.4. <i>Herbicidy</i> .....	26
6.4.1. Methylviologen/Paraquat.....	26
6.4.2. 3 – Aminotriazol.....	26
<b>7. Materiál a metody</b> .....	<b>28</b>
7.1. <i>Rostliny tabáku (Nicotiana tabacum, cv. Xanthi)</i> .....	28
7.2. <i>Kometový test – poškození rostlinné jaderné DNA dle Gichner et al., (2008)</i> .....	31
7.3. <i>Peroxidace lipidů a její stanovení pomocí metody TBARS dle Hodges et al. (1999)</i> .....	33
7.4. <i>Měření obsahu karbonylových skupin u proteinů podle Levine et al., (1990)</i> .....	34
7.5. <i>Určení aktivity CAT dle Chance and Maehly (1955) a APX dle Nakano et al., (1981)</i> .....	36
7.6. <i>Měření stability plasmatické membrány Yun et al. (2000)</i> .....	38
7.7. <i>Stanovení proteinů (podle Bradford, 1976)</i> .....	39
7.8. <i>Histochemická lokalizace ROS pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie</i> .....	40
7.9. <i>Statistika</i> .....	40
<b>8. Výsledky</b> .....	<b>41</b>
8.1. <i>Poškození jaderné DNA</i> .....	41
8.1.1. Optimalizace kometového testu a výběr pokusné rostliny .....	41
8.1.2. Efekt herbicidu MV na jadernou DNA.....	41

8.1.3.	Efekt herbicidu 3-AT na jadernou DNA.....	42
8.2.	<i>Peroxidace lipidů a stabilita membrán</i> .....	43
8.2.1.	Peroxidace lipidů po ošetření MV .....	43
8.2.2.	Peroxidace lipidů po ošetření 3-AT.....	43
8.2.3.	Stabilita membrán .....	44
8.3.	<i>Oxidační poškození proteinů</i> .....	45
8.3.1.	MV .....	45
8.3.2.	3-AT .....	45
8.4.	<i>Antioxidační systém – CAT, APX</i> .....	45
8.4.1.	CAT a MV .....	45
8.4.2.	CAT a její inhibice 3-AT .....	45
8.4.3.	APX a její ovlivnění MV .....	46
8.4.4.	APX a 3-AT .....	46
8.5.	<i>Fluorescenční vizualizace ROS</i> .....	47
8.5.1.	MV a ROS .....	48
8.5.2.	3-AT a oxidační stres.....	52
<b>9.</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>54</b>
9.1.	<i>Poškození jaderné DNA</i> .....	54
9.1.1.	Kometový test.....	54
9.1.2.	Oxidační změny DNA a herbicidy.....	55
9.2.	<i>Peroxidace lipidů a stabilita membrán</i> .....	56
9.3.	<i>Oxidační poškození proteinů</i> .....	57
9.4.	<i>Antioxidační systém – APX a CAT</i> .....	58
9.4.1.	APX a její porovnání s CAT .....	58
9.4.2.	CAT.....	60
9.5.	<i>Vizualizace ROS</i> .....	60
9.5.1.	Specifická MV, 3-AT a produkce $O_2^{\cdot-}$ nebo $H_2O_2$ .....	61
<b>10.</b>	<b>Závěry.....</b>	<b>62</b>
<b>11.</b>	<b>Seznam citované literatury .....</b>	<b>63</b>

### 3. Seznam použitých zkratek

- 2-Cys Prx** (2-cysteine peroxidase) 2-cystein peroxidase
- 3-AT** (3-amino-1,2,4-triazole) 3-amino-1,2,4-triazol
- APX** (ascorbate peroxidase) askorbátperoxidáza
- ASC** (ascorbate) askorbát
- BSA** (bovine serum albumin) hovězí sérový albumin
- CAT** (catalase) kataláza
- DCF** (dichlorofluorescein) dichlorofluorescein
- DHA** (dehydroascorbate) dehydroaskorbát; oxidovaná forma askorbátu
- DHAR** (dehydroascorbate reductase) dehydroaskorbátreduktáza
- dH<sub>2</sub>O** (deionized water) deionizovaná voda
- DNPH** (dinitrophenylhydrazin) dinitrofenylhydrazin
- EtBr** (ethidium bromide) ethidium bromid
- EPR spectroscopy** (electron paramagnetic resonance) elektronová paramagnetická rezonance
- ETC** (electron transport chain) elektrontransportní řetězec
- GR** (glutathione reductase) glutathionreduktáza
- GRX** (glutathione peroxidase) glutathionperoxidáza
- GSH/GSSH** (reduced glutathione/ oxidized glutathione) redukovaný/oxidovaný glutathion
- karboxy-DCFDA** (5-(-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate) 5-(-6)-karboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetát
- LMPA** (low melting point agarose) LMPA agaróza tající při nízké teplotě
- MDA** (malondialdehyde) malondialdehyd
- MDHAR** (monodehydroascorbate reductase) monodehydroaskorbátreduktáza
- MK** mastné kyseliny
- MV** (methyl viologen) methyl viologen
- NBT** (nitroblue tetrazolium) nitrotetrazoliová modř
- NMPA** (normal melting point agarose) NMPA agaróza tající při normální teplotě
- PAR** (photosynthetically active radiance) fotosynteticky aktivní záření
- PBS** (phosphate buffered saline) pufovaný fyziologický roztok
- PSI** (photosystem I) fotosystém I
- PSII** (photosystem II) fotosystém II
- ROS** (reactive oxygen species) reaktivní formy kyslíku
- RNS** (reactive nitrogen species) reaktivní formy dusíku
- RWC** (relative water content) relativní obsah vody
- SCGE** (single cell gel electrophoresis) gelová elektroforéza jednotlivých buněk
- SD** (standard deviation) směrodatná odchylka
- SOD** (superoxid dismutase) superoxid-dismutáza
- TBA** (thiobarbituric acid) kyselina thiobarbiturová



**TBARS** (thiobarbituric acid reactive substances) látky reagující s kyselinou barbiturovou

**TCA** (trichloroacetic acid) kyselina trichloroctová

**TM** (tail moment) = tail length x tail DNA (%) / 100 %

#### 4. Úvod

Oxidační stres je termín spojený s životem živočichů, rostlin i prokaryot a může mít více významů. Z čistě chemického hlediska se jedná o situaci, při které se elektrony v důsledku nepříznivých/neoptimálních podmínek dostanou na atomy/sloučeniny, které se tak stávají reaktivní. Typickým projevem je proto redoxní nerovnováha a za takových podmínek může docházet k chemickému oxidačnímu poškození různých buněčných komponent. Pojem oxidační stres je projevem působení mnoha stresových faktorů např. zasolení, sucho, atd., poškozuje buňku. Mimoto ROS spouští signalizační dráhy a obranné reakce.

Reaktivní formy kyslíku (ROS) představují skupinu látek, které jsou s oxidačním stresem neodmyslitelně spjaty. Jedná se o molekuly obsahující jeden či více aktivovaných atomů kyslíku, ale nemusí se jednat nezbytně o radikály. Volné radikály jsou samostatně se vyskytující chemické látky, které mají nepárový elektron. Některé z nich vůbec neobsahují kyslíkový atom, např. přechodné kovy. Obě tyto skupiny způsobují oxidační stres oxidací buněčných struktur. ROS poškozují všechny biopolymery vyskytující se v rostlinných buňkách od DNA přes lipidy po proteiny. Původně byly považovány pouze za toxické vedlejší produkty aerobního metabolismu s výhradně negativním dopadem na buněčnou fyziologii. V současnosti je známo, že v organismech hrají roli při řadě procesů a řadí se mezi důležité signální molekuly. Mohou aktivovat kationtové kanály vyskytující se v plasmatické membráně spolu s annexiny a spouštět signalizaci pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  či  $\text{K}^+$  iontů. V konečném důsledku může dojít k ovlivnění transkripčních faktorů a genové exprese. ROS jsou přirozeně produkovány v chloroplastech, peroxizómech a mitochondriích při reakcích zahrnujících transport elektronů, ale mohou být také syntetizovány NADPH oxidázami či peroxidázami. Mezi nejzákladnější řadíme  $\text{O}^{\cdot}_2$  (singletový kyslík),  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (superoxidový anion),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peroxid vodíku) a  $\text{OH}^{\cdot}$  (hydroxylový radikál), který je z této skupiny nejreaktivnější a z buněčného hlediska tudíž nejnebezpečnější.

Oxidační stres, nejen v rostlinných buňkách, představuje komplexní chemický a fyziologický fenomén. Ten odráží nerovnováhu mezi produkcí ROS a schopností buňky tyto molekuly likvidovat, dříve než dojde k poškození buněčných komponent. Jeho účinky se projeví i v situaci, pokud buňka není schopna již vzniklé defekty opravit. Oxidační stres doprovází v podstatě veškeré typy biotických a abiotických stresů, se kterými se rostlina během svého života setká, a můžeme ho řadit mezi exogenní faktory. Mezi ně patří např. i sucho, nadměrné ozáření, extrémní teploty, zaplavení a s ním spojená anoxie, zasolení půdy či působení patogenů spolu s herbivory. Příčiny endogenního charakteru jsou nejčastěji spojeny s nefunkčností antioxidantního systému, a to jednak jeho enzymatickými částmi představovanými především SOD (superoxiddismutázou), CAT (katalázou) a APX (askorbátperoxidázou), tak i sníženou hladinou samotných antioxidantů. Mezi nejhojněji zastoupené antioxidanty řadíme askorbát (ASC), glutathion (GSH) a tokoferol. Výsledné dopady oxidačního stresu na buňku mohou být různé a závisí na stáří a druhu rostliny, typu ovlivněného

pletiva, ale i na podnětu, který jej vyvolal, jeho intenzitě a délce. Mezi typické projevy na úrovni buněčných biopolymerů řadíme oxidaci DNA a peroxidaci lipidů vedoucí ke vzniku chemicky odlišných molekul. Některé z nich mohou sloužit i jako markery oxidačního stresu. Dále dochází k oxidaci proteinů, jejíž úroveň se nejčastěji určuje na základě obsahu jejich karbonylových skupin. Takto oxidačně modifikované buněčné složky pak nemohou zajišťovat svou fyziologickou funkci.

Pro studium této oblasti existuje několik přístupů. Rostliny či jejich jednotlivé části můžeme vystavit vybranému druhu biotického či abiotického stresoru a sledovat mj. oxidační poškození. Další metodu představuje aplikace herbicidů, které svým typickým účinkem na rostlinnou fyziologii způsobují zvýšenou produkci specifických ROS. Následně je možno detekovat přímo míru oxidačního poškození spojenou s aplikací těchto látek.

Oxidační stres představuje širokou problematiku v rámci biologie organismů a nejen v případě rostlin má její studium velký potenciál do budoucna. Porozumění vzniku ROS a jejich rozmanitých interakcí v rámci buňky může směřovat až k vytvoření rostlin rezistentních k vybraným abiotickým a biotickým stresům. Další možností je bioinženýrský přístup modifikující aktivitu antioxidantních enzymů spolu s modifikací mechanismů pro vnímání ROS a následným přenosem informace v rámci komplexní buněčné signalizační sítě. Cílem mé práce je porovnání účinků herbicidů, lišících se typem ROS, jehož akumulaci indukují, oxidačního poškození jednotlivých buněčných biopolymerů a zhodnotit jejich vliv na celkovou fyziologii rostlinné buňky.

## **Hypotézy**

- 1. Specifické herbicidy MV a 3-AT budou u rostlinného materiálu způsobovat oxidační poškození, které se projeví na různých buněčných komponentách – DNA, proteinech, lipidech a dalších funkčních částech buňky jako jsou membrány a antioxidantní enzymy.**
- 2. Vzhledem k módu účinku použitých herbicidů bude mezi nimi možné odlišit projevy oxidačního stresu.**
- 3. Fluorescenční mikroskopií bude možné vizualizovat vznikající ROS a specificky je lokalizovat do určitých organel – chloroplastů u MV.**

## 5. Cíle práce

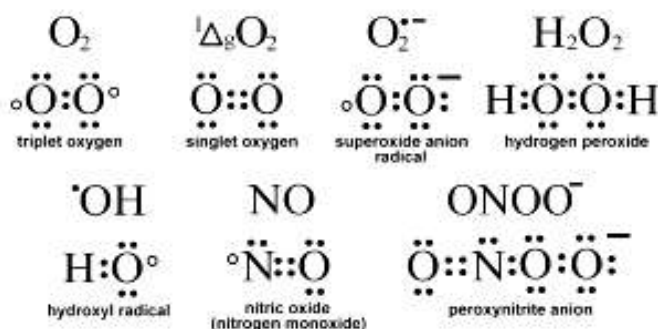
1. Chemicky navodit detekovatelný oxidační stres v rostlinných buňkách vybranými herbicidy – metylviologenem (MV) a 3-aminotriazolem (3-AT), které způsobují produkci specifických ROS.
2. Určit míru oxidačního poškození DNA v rostlinném jádře pomocí kometového testu a na jeho základě sestavit koncentrační řady pro jednotlivé herbicidy k dalším experimentům.
3. Stanovit a porovnat oxidační poškození dalších buněčných komponent – proteinů a lipidů spolu s poškozením buněčných membrán. Určit rozdíly v citlivosti vybraných buněčných komponent k ataku ROS po působení obou herbicidů.
4. Ověřit zapojení antioxidantních enzymů při stresových reakcích.
5. Pomocí konfokálního mikroskopu sledovat produkci ROS v rostlinných pletivech a ověřit specifitu fluorescenčního barvení pro jednotlivé ROS.

## 6. Přehled literatury

### 6.1. Oxidační stres

Všechny environmentální a biotické stresy spouští obecnou signální odpověď vedoucí skrze nadprodukcí ROS (reaktivní formy kyslíku) k následnému oxidačnímu stresu, který může poškodit jednotlivé buněčné komponenty a způsobovat jejich nefunkčnost. Projevy oxidačního stresu v rámci buňky jsou tedy způsobeny nadprodukcí a akumulací molekul obsahujících aktivovaný atom kyslíku a které jsou souhrnně nazývány ROS. Jejich vznik je zároveň základní složkou stresové signalizace a imunitní odpovědi potřebné k obraně a adaptaci. Nicméně mnoho vývojových procesů zahrnuje signalizaci pomocí ROS, které jsou pro tyto účely tvořeny v nižší koncentraci. Z tohoto pohledu lze oxidační stres definovat jako stav, kdy ROS ovlivňují a způsobují výrazné změny v celkovém redoxním stavu buňky a mají tak významný dopad na metabolické procesy uplatňující se během rostlinného růstu (Noctor *et al.*, 2014).

Kyslík je plynný prvek tvořící druhou hlavní složku zemské atmosféry, kde se majoritně vyskytuje ve stavu  $O_2$ , označovaném jako tripletový kyslík. V této podobě má dva nepárové elektrony, a protože existuje jako volná molekula, jedná se o volný biradikál. Oba nepárové elektrony mají stejné spinové číslo neboli „paralelní spin“, což limituje potenciální cíle pro  $O_2$ , neboť většina molekul neobsahuje 2 elektrony s antiparalelním spinem. Popsaná situace se označuje jako spinová reskripcie a výrazně snižuje reaktivitu molekulárního kyslíku, který ve svém tripletovém stavu není chemicky aktivní a není tedy pro aerobní organismy toxický. Pokud  $O_2$  přijme energii, dojde k odstranění spinové reskripcie a zvýšení jeho reaktivity. Tato energie může pocházet z mnoha chemických a biochemických reakcí, ultrafialového či ionizujícího záření atd. V buňce molekulární  $O_2$  může zejména přijmout elektron z ETC a dojde k neúplné redukci. Přijetím až 4 elektronů je redukován na vodu. Mezi základní ROS, které nacházíme v biologických systémech, řadíme singletový kyslík  $O_2^1$ , superoxidový radikál  $O_2^{\cdot-}$ , peroxid vodíku  $H_2O_2$  a hydroxylový radikál  $OH^{\cdot}$ . Ty se spolu s vybranými RNS (reaktivními formami dusíku) jako např. oxid dusnatý ( $NO^{\cdot}$ ) nebo peroxodusitan ( $ONOO^{\cdot-}$ ) (Obr. 1.) zásadním způsobem podílejí na indukci oxidačního stresu (Demidchik, 2014).



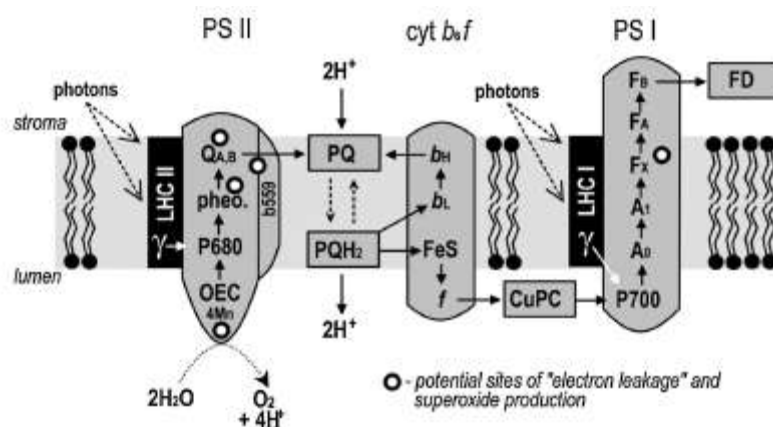
**Obr. 1.** Lewisovo zobrazení základních ROS, které se spolu s RNS podílejí na indukci oxidačního stresu. Převzato z (Demidchik, 2014).

### 6.1.1. Reaktivní formy kyslíku

#### 6.1.1.1. Superoxidový radikál $O_2^-$

Tripletový kyslík  $O_2$  může přijít o spinovou restrikcí po příjmu jediného elektronu za vzniku superoxidového radikálu  $O_2^-$ . Dochází k tomu buď díky úniku elektronů z ETC (Obr. 2.) anebo činností NADPH oxidázy vázané na plasmatickou membránu (Dagmara *et al.*, 2015).  $O_2^-$  může omezeně procházet biologickou plasmatickou membránou, ale ne čistou lipidovou dvojrůstvou (Mao & Poznansky, 1992). Předpokládá se, že při vysokých ozářenostech dochází k produkci ROS, které přispívají nebo se přímo podílí na procesech fotoinhibice, které ve výsledku vedou ke snížení účinnosti fotochemických reakcí v rámci fotosyntézy.

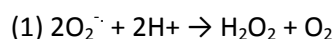
V chloroplastech je možné způsobit na světle kontinuální produkci superoxidu účinkem methylviologenu (MV) neboli paraquatu, systematický název N, N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid (Babb *et al.*, 1989) a proto tento herbicid může být specificky použit k indukci oxidačního stresu. MV je akceptorem elektronů z PSI, vzniká jeho radikál. Ten podléhá v přítomnosti kyslíku autooxidaci za vzniku superoxidového radikálu. Ve studii, kterou provedli Krieger-Liszkay *et al.* (2011) bylo využito jeho účinků na thylakoidní membrány rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* var. petit Havana). Po 5 min na bílém světle  $500 \mu\text{mol (PAR) m}^{-2}\text{s}^{-1}$  v přítomnosti  $100 \mu\text{M}$  MV byla specifická produkce superoxidu ověřena pomocí EPR spektroskopie, která se využívá pro detekci radikálových meziproduktů chemických reakcí. Dále byl potvrzen negativní účinek na PSII (fotosystém II) a PSI (fotosystém I). Data ukázala, že konkrétně produkce kyslíku v rámci PSII byla po ošetření MV narušena výrazněji než funkce PSI. Vznik superoxidu ve fotosynteticky aktivních chloroplastech listů rostlin *Arabidopsis thaliana* pozorovali Scarpeci *et al.*, (2008). Dva týdny staré rostliny byly ošetřeny  $50 \mu\text{M}$  MV a po dobu 0-6 hod ponechány na světle  $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Zvyšující se produkce superoxidu byla ověřena značením nitrotetrazoliovou modří (NBT).



**Obr. 2.** Hypotetická místa úniku elektronů v rámci PSI a PSII, které reakcí s  $O_2$  dávají vznik superoxidu. Převzato a upraveno dle (Demidchik, 2014).

### 6.1.1.2. Singletový kyslík $O^1_2$

Negativní účinky aktivovaného kyslíku v buňkách jsou v první řadě způsobeny  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$  a singletovým kyslíkem  $O^1_2$ . Singletový kyslík je molekulou neradikálové povahy a v buňkách je primárně produkován v odpověď na fotooxidační stres a poranění. Vzniká po pohlcení množství energie většího, než může být zpracováno ve fotosystémech. Chlorofyl v základním singletovém stavu je excitován do vyššího singletového stavu, díky spin-orbitální interakci mezisystémovou konverzí může zrelaxovat do tripletového stavu. Ten může snadno reagovat s tripletovým kyslíkem za vzniku velice reaktivního  $O^1_2$ . Jeho cytotoxické účinky se mohou konkrétně projevit při oxidaci nenasycených mastných kyselin (MK) v plastidové membráně, např. kyseliny linolenové (op den Camp *et al.*, 2003).  $O^1_2$  je spolu s dalšími ROS produkován dismutací  $O_2^-$  a redoxní reakcí (1) (Asada & Kanematsu, 1976).



Oproti tomu signální role  $O^1_2$  se ukázala při aktivaci specifických stresových reakcí u *flu* mutantů *Arabidopsis*, které v plastidech za tmy akumulují prekurzor chlorofylu protochlorofylid. Po přesunu rostlin ze tmy na světlo ( $80-100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) došlo v plastidech během prvních pár minut k výrazné produkci  $O^1_2$  což se oproti WT rostlinám projevilo vznikem nekrotických lézí na listech a celkové inhibicí růstu. Po 15 min došlo k aktivaci skupiny genů, které se lišily od těch, které jsou aktivovány  $O_2^-/H_2O_2$ . Konkrétně se jednalo o drought-induced-like protein (*DIL*) a c2h2 transkripční faktor s motivem zinkového prstu (*ZP*). Nicméně při vyšším ozáření  $600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se selektivita aktivace těchto genů ztratila (op den Camp *et al.*, 2003).

### 6.1.1.3. Peroxid vodíku $H_2O_2$

Peroxid vodíku je jednou z nejintenzivněji studovaných molekul nejen ve spojitosti s oxidačním stresem, což souvisí s přehodnocením původní představy o výlučně negativních účincích ROS. Mimo jeho roli v reakcích rostlin na vnější prostředí je považován za důležitou signální molekulu při celkové regulaci metabolismu. Jeho přirozená akumulace je přísně hlídána antioxidačním systémem a schopnost buňky citlivě reagovat na změny jeho hladiny je základní součástí stresové odpovědi (Jing *et al.*, 2015). V buňkách vzniká nejčastěji dismutací  $O_2^-$ , dále v metabolismu účinkem oxidáz jako NADPH oxidáza, glykolát oxidáza, oxalát oxidáza, xanthin oxidáza, peroxidázy, aminoxidáza a při  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin. Oproti jiným ROS proniká efektivněji skrze buněčné membrány, protože není radikálové povahy (Asada & Kanematsu, 1976; Asada K., 1992). Navíc bylo zjištěno, že některé třídy aquaporinů, konkrétně ZmPIP2;5 z kukuřice (*Zea mays*), usnadňuje jeho difúzi přes membránu (Bienert *et al.*, 2014).

Dynamika produkce  $H_2O_2$  oproti jiným ROS se může lišit v návaznosti na konkrétní stresor i použitý rostlinný druh. U rostlin *A. thaliana* starých 2 týdny ošetřených 50  $\mu M$  MV po dobu 0-6 hod na světle ( $120 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ ) nebyla v listech pozorována akumulace  $H_2O_2$ , oproti tomu za stejných podmínek došlo k navyšující se produkci superoxidu (Scarpeci *et al.*, 2008).

#### 6.1.1.3.1. Ochranné účinky $H_2O_2$

$H_2O_2$  v určitých nižších koncentracích může fungovat i jako přímá ochrana proti oxidačnímu poškození. V případě vysokého ozáření (500  $\mu mol m^{-2}s^{-1}$  po 24h; 14h světlo/10h tma) kontrolních rostlin tabáku (*N. tabacum* cv. Petit Havana) nebo jejich ošetření 10 mM aminotriazolem (AT) u nich došlo k výraznému zvýšení peroxidace lipidů a navýšení aktivity antioxidantních enzymů CAT a APX. Nicméně u rostlin, které byly předem ošetřeny postřikem 5 mM  $H_2O_2$  byla peroxidace lipidů omezena a aktivita CAT spolu s APX zvýšena více. Aplikace  $H_2O_2$  zde měla ochranný efekt výraznější aktivací antioxidantního systému (Gechev *et al.*, 2002). Vysoké koncentrace  $H_2O_2$  však měly opačný efekt a zvyšovaly oxidační stres. U rajčete (*Lycopersicon esculentum* Mill.) vedlo ponoření kořenů do roztoku 1 mM  $H_2O_2$  na dobu 1h k aklimaci před nadcházejícím chladovým stresem (3 °C na 16h). Takto ošetřené rostliny vykazovaly oproti kontrole vyšší relativní obsah vody (RWC), zvýšenou stabilitu membrán a  $H_2O_2$  pomohl také v udržení vyššího obsahu antokyanů v listech (Işeri *et al.*, 2013).

### 6.1.2. Molekulární a buněčné poškození

#### 6.1.2.1. Lipidy, MK a membrány

Oxidační stres v rámci buněk primárně negativně ovlivňuje fungování biologických membrán. Z chemického hlediska jde nejčastěji o oxidační modifikace nenasycených MK v kontextu membránových lipidů při jejich peroxidaci. Tento proces může mít za následek produkci molekul, které slouží jako obecné markery oxidačního stresu, v čele s malondialdehydem (MDA) (Hodges *et al.*, 1999). Kromě řetězové neenzymatické, indukované ROS, probíhá i enzymatická peroxidace nenasycených MK např. lipoxygenázami a cyklooxygenázami. V některých případech je možno detekovat specifické deriváty oxygenace určité MK. Takovým případem je kyselina linolenová ( $C_{17;3}$ ), která je preferenčním cílem ROS během peroxidace lipidů v plastidových membránách. Ve *flu* mutantech *A. thaliana* může hydroxyoktadekatrienová kyselina (HOTE), jakožto specifický derivát kyseliny linolenové, vznikat buď přímým působením  $O_2^{\cdot-}$  nebo enzymaticky pomocí lipoxygenáz díky regio a stereospecifické oxygenaci. Analýzou jednotlivých hydroxyderivátů bylo zjištěno, že u *flu* mutant dochází k produkci stereoizomeru 13-HOTE enzymatickou cestou a ne v důsledku přímého toxického působení  $O_2^{\cdot-}$  (op den Camp *et al.*, 2003).



Jiný přístup ke stanovení funkčnosti buněčných membrán je měření jejich stability a propustnosti pro ionty pomocí konduktometrie. Výsledky těchto měření vypovídají spíše o celkovém stavu membrán než o určité molekulární změně. Listové disky transgenních rostlin tabáku (*N. tabacum*) exprimující peroxidázu (POD) povijnice batátové (*Ipomoea batatas*) po aplikaci 10  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  MV vykazovaly oproti těm z WT rostlin o 25% nižší membránové poškození (Yun *et al.*, 2000). Ošetření 50  $\mu\text{M}$  MV rostlin *A. thaliana* po různou dobu na světle ( $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) vedlo k porušení integrity plasmatické membrány. Poškození v porovnání s listy WT rostlin postupně vzrůstalo s délkou ošetření MV, kdy nejvyšší hodnoty 70% dosáhlo po 7 hod inkubace (Scarpeci *et al.*, 2008). Konduktometrické stanovení poškození membrán spolu s daty o aktivitě antioxidantních enzymů často slouží ke komplexnímu zhodnocení schopnosti rostlin vyrovnávat se s oxidačním stresem (Kwon *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2011).

#### 6.1.2.2. Proteiny

Mezi další komponenty rostlinné buňky, které jsou ovlivněny oxidačním stresem, patří proteiny. V rámci studií lze sledovat jejich celkový obsah, oxidační modifikace jako je např. tvorba karbonylových skupin (Levine *et al.*, 1990; Rinalducci *et al.*, 2008). Při oxidaci proteinů vlivem ROS dochází k modifikacím postranních řetězců, síťování proteinů a štěpení peptidů. Oxidaci podléhají také sulfhydrylové skupiny aminokyselin, které jsou u řady enzymů součástí katalytického centra. K  $\text{H}_2\text{O}_2$  jsou zejména citlivé některé enzymy Calvinova cyklu. Enzymy s thiolovými skupinami jsou citlivé i k  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$  a  $^1\text{O}_2$  (Asada, 1996).

Nejčastějším produktem oxidace proteinů jsou sloučeniny s karbonylovou skupinou, aldehydy a ketony, vznikající na postranních řetězcích aminokyselin (Cheng *et al.*, 1998). Radikál na postranním řetězci reaguje s kyslíkem za vzniku nestabilního peroxylového radikálu, který se dále rozpadá na alkoxylové radikály. Štěpením alkoxylových radikálů se tvoří karbonylový radikál a sloučenina s karbonylovou skupinou. Karbonylové skupiny vznikají kromě přímého působení ROS také reakcemi proteinů s produkty peroxidace lipidů (4-hydroxy-2-nonenal, malondialdehyd), nebo s ketoaminy a ketoaldehydy, které se tvoří při neenzymových glykacích (Berlett, 1997).

#### 6.1.2.3. DNA

Poškození jaderné DNA a oxidační stres souvisí s těžkými kovy, alkylačními činidly či  $\gamma$ -zářením (Gichner *et al.*, 2008a). Zvýšená koncentrace těžkých kovů v půdě u rostlin způsobuje typické poškození buněčných komponent, produkci ROS a modifikaci aktivit antioxidantních enzymů. Rostliny bobu (*Vicia faba*) vystaveny Cd o koncentraci 5 a 10 mg/L po dobu 4 dnů vykazovaly v listech oproti kontrolním rostlinám výrazně vyšší peroxidaci lipidů a v kořenech akumulovaly  $\text{H}_2\text{O}_2$ . V korelaci

s těmito výsledky bylo v listech detekováno významné poškození DNA, což naznačuje, že akumulace ROS a následný oxidační stres jsou příčinou fyto toxicity Cd (Lin *et al.*, 2007).

Jádra v kořenech rostlin bramboru (*Solanum tuberosum* L. cv. Korela), které byly vystaveny Cd<sup>2+</sup> po dobu 2h a 24h vykazovaly v závislosti na zvyšující se koncentraci i odpovídající navýšení poškození DNA oproti kontrolním rostlinám. V listech bylo detekovatelné poškození DNA až po ošetření trvajícím 2 týdny při vyšších koncentracích Cd<sup>2+</sup> (5 – 12,5 μM). Nicméně tyto rostliny měly celkově inhibovaný růst a výrazně žluté listy, takže poškození DNA nemuselo být vázáno na oxidační stres specificky způsobený Cd (Gichner *et al.*, 2008a).

## **6.2. Účast ROS v odpovědích k abiotickým stresorům v signalizaci i oxidačním poškození**

### **6.2.1. Ozáření**

Vznik ROS v rostlinných buňkách je primárně studován ve spojitosti s fungováním PSI a PSII a jejich případným poškozením za nadměrného ozáření. Mimoto se také uvažuje o ROS a jejich roli ve fotomorfogenezi. Kryptochromy jsou flavoproteiny sloužící v rostlinné říši jako fotoreceptory pro modré světlo a významně se podílejí např. na de-etiolizaci a fotoperiodické indukci kvetení.

Fyziologické spojení ROS a signalizace pomocí kryptochromů zkoumali Consentino *et al.*, (2015). Protoplasty wild type (WT) a dvojitého mutantu *cry1cry2* *A. thaliana* byly po dobu 2-4 hod ozářeny modrým světlem (vlnová délka 400-500 nm) o intenzitě 100 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. Mutanty *cry1cry2* postrádají oba geny pro kryptochromy a tak citlivost k modrému světlu. Za těchto podmínek došlo u WT protoplastů k výrazně vyšší tvorbě ROS a buněčné smrti oproti mutantům, a to bez ohledu na to zda pocházely z fotosynteticky aktivních částí rostlin.

Konkrétní signální role O<sub>2</sub><sup>1</sup> ve spojitosti se světlem byla mj. prokázána u *flu* mutant *A. thaliana*. Kdy produkce O<sub>2</sub><sup>1</sup> po přemístění mutant ze tmy na světlo (80 -100 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) vedla po 15 min ke specifické aktivaci genů pro drought-induced-like protein (*DIL*) a c2h2 transkripční faktor s motivem zinkového prstu (*ZP*) (op den Camp *et al.*, 2003).

### **6.2.2. Zasolení a těžké kovy**

V dnešní době představuje zasolení spolu s nedostatkem voda vážný problém. Naprostá většina kulturních plodin nadměrnou koncentraci iontů v půdě špatně snáší, a proto hledání způsobu pro navýšení jejich tolerance skýtá do budoucna velký potenciál.

Expres heat-shock transkripčního faktoru *PeHSF* topolu rezistentního k zasolení (*Populus euphratica*) byla indukována silným stresem v podobě aplikace 150 mM NaCl na listy a kalusové kultury a byla regulována  $H_2O_2$  spolu s ionty  $Ca^{2+}$ . Transgenní rostliny tabáku (*N. tabacum*) overexprimující *PeHSF* vykazovaly po ošetření 100 mM NaCl zvýšenou toleranci k zasolení dokumentovanou vyšší klíčivostí semen, kořenovým růstem a celkově efektivnější schopností regulovat rovnováhu ROS v porovnání s WT. Transgenní rostliny např. vykazovaly o 30-50% nižší akumulaci  $H_2O_2$  než WT ve stresových podmínkách. I když *PeHSF* hraje roli při detoxifikaci ROS během stresu zasolením, nepodílí se na regulaci osmotické části stresové odpovědi, zejména poměru  $K^+/Na^+$ , který byl u všech rostlin více méně konstantní (Shen *et al.*, 2013). V případě transgenních rostlin tabáku (*N. tabacum*) vedla overexpres genu *KcCSD* (pocházející z rostliny *Kandelia candel*) pro Cu/Zn SOD oproti WT rostlinám ke zvýšené toleranci k  $Na^+$  (Jing *et al.*, 2015).

Přítomnost těžkých kovů v půdě a jejich příjem rostlinami u nich může navodit stav oxidačního stresu. Existují avšak i rostliny, které jsou schopny tolerovat vyšší koncentraci těchto kovů v prostředí, anebo je dokonce akumulovat ve své biomase. Do skupiny hyperakumulátorů řadíme i čajovník (*Camellia sinensis* L.). U této rostliny byl nedávno naklonován a charakterizován nový gen pro glutathionperoxidázu (GPX) označený jako *CsGPX2* a který má potenciální funkci chránit čajovník proti oxidačnímu poškození. Jeho exprese byla stimulována krom toxické koncentrace těžkých kovů Fe a Cu (200  $\mu$ M  $FeSO_4$ ; 200  $\mu$ M  $CuSO_4$ ) i dalšími abiotickými stresory (Fu, 2014).

### 6.2.3. Vysoké teploty

Vzhledem k sesilnému způsobu života se rostliny musí během svého života často vyrovnávat s extrémními výkyvy teplot. Enzym 2-cystein peroxidoxin (2-Cys Prx) je členem skupiny antioxidačních enzymů, které rostlinám pomáhají čelit environmentálním stresům. Podílí se na odstraňování peroxidů a tím brání oxidačnímu poškození thylakoidů fotosyntetických membrán. Expres *At2-Cys Prx* (pocházejícího z *A. thaliana*) pod promotorem *SWPA2* indukovaným stresem u rostlin bramboru (*Solanum tuberosum* cv. Atlantic) vedla ke zvýšené odolnosti transgenních rostlin k vysoké teplotě (42°C, 10h). V porovnání s netransformovanými rostlinami, které rostly při kontinuální teplotě 25°C, klesla fotosyntetická aktivita transgenních brambor po působení vysokých teplot o 7 %, zatímco u netransformovaných brambor vystavených vysoké teplotě došlo k poklesu až o 31 % (Kim *et al.*, 2011).

Heat shock transkripční faktory (HSF) ovlivňují především expresi heat shock proteinů (HSP), jejichž produkce je klíčovou adaptací rostlin k teplu (Li *et al.*, 2014). Nicméně některé HSF jsou součástí odpovědi rostlin i k jiným stresům, např. zasolení (Shen *et al.*, 2013). Ve studii provedené Li *et al.*, (2014), se prokázala důležitá role *HSP45.9* a *HSP70* při navození tolerance rostlin okurky (*Cucurbita sativus* L., cv. Jinyan) k vysokým teplotám. Dosáhli toho naroubováním na podnož

příbuzného druhu ze skupiny tykvovitých, lufy (*Luffa cylindrica* Roem, cv. Xiangfei), která je přirozeně odolná k vysokým teplotám. Takto vzniklé rostliny po ošetření 40°C po dobu 12h vykazovaly mj. nižší hladinu MDA a oxidovaných proteinů, což ukazuje na odolnost vůči oxidačnímu stresu, v porovnání s rostlinami, které vznikly naroubováním na podnož (*Cucumis sativus* L., cv. Jinyan). Na indukci exprese zmíněných HSP se podílela signalizace ABA spolu s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 6.2.4. Chlad

Chladový stres se u rostlin projevuje několika způsoby, kdy nejdříve dochází k narušení hospodaření s vodou až viditelnému vadnutí. Následuje peroxidace lipidů s následným navýšením obsahu MDA, nebo např. akumulace prolinu jako představitele kompatibilních solutů (Işeri *et al.*, 2013).

U kořenů rostlin okurky (*Cucumis sativus* L.) vystavených nízké teplotě (8-13° C) došlo k významnému poklesu hydraulické vodivosti a poklesu aktivity H<sup>+</sup> ATPázy asociované s plasmatickou membránou. S těmito změnami korelovala akumulace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v oblasti buněčné stěny a plasmatické membrány již 15 min po vystavení nízkým teplotám. Omezení vodního transportu v kořenech okurky v důsledku chladu tak ukazuje na možný vztah mezi koncentrací H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a modulací aktivity H<sup>+</sup> ATPázy (Seong *et al.*, 2004).

Dalším příkladem mohou být rostliny rajčete (*Lycopersicon esculentum* Mill.), které byly vystaveny stresu chladem při teplotě 3° C po dobu 16h. Tento zásah způsobil výrazné snížení RWC a došlo i k celkovému mírnému poklesu obsahu chlorofylu a navýšení obsahu prolinu. Nicméně změny chlorofylu a prolinu nebyly statisticky významné. Chlad způsobil také v listech zvýšení hladiny MDA, avšak jeho hladina v kořenech zůstala stejná jako za nestresových podmínek. To vše v porovnání s rostlinami, jejichž kořeny byly předem ponořeny do 1 mM roztoku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 1 hod. V tomto případě se projevila fyziologická role H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kdy jeho exogenní aplikace vedla aklimaci k chladovému stresu (3° C, 16h) (Işeri *et al.*, 2013).

#### 6.2.5. Sucho

K významným problémům trápící současné zemědělství řadíme také sucho. Reakce rostlin na tento samotný environmentální stres v prvních fázích běžně zahrnuje prodloužení růstu kořenů, pokles RWC v nadzemních částech ale zároveň snížení celkové sušiny. Typicky dochází k modifikaci jednotlivých enzymatických složek antioxidačního systému a regulaci genové exprese např. v návaznosti na akumulaci kompatibilních solutů (Cui *et al.*, 2015). V přirozených podmínkách se rostlina vyrovnává s komplexním spektrem podnětů z prostředí a často musí reagovat na různé kombinace stresů. Její odpověď za takové situace se může lišit od odpovědi na stresy jednotlivé (Rizhsky *et al.*, 2002). V případě rostlin tabáku (*N. tabacum*) došlo v důsledku oxidačního stresu ke

specifické změně genové exprese enzymů APX, CAT a SOD za podmínek sucha, horka a v kombinaci obou stresů (Lubovská *et al.*, 2014). Podobný případ byl popsán již u *A. thaliana*, kdy při kombinaci stresu horkem a suchem docházelo k uzavírání průduchů, potlačení fotosyntézy, posílení fotorespirace a zvýšení teploty listu. Geny indukované pouze za sucha, např. kódující dehydriny či CAT a ty indukované za horka, př. APX byly při kombinaci stresů utlumeny. Na druhou stranu exprese alternativní oxidázy (AOX), GPX, fenylalaninamoniaklyázy (PAL) nebo transkripčního ko-aktivátoru pro odpověď k ethylenu (ET) byla specificky detekována pouze za kombinace stresů v podobě horka a sucha (Rizhsky *et al.*, 2002).

Během odpovědi na environmentální stresy je běžné zapojení fytohormonů. Na regulaci reakce rostlin *A. thaliana* k vodnímu deficitu se mj. podílí ET, který se zdá být důležitý pro vyrovnávání se s oxidačním stresem za těchto podmínek. Mutanty necitlivé k ET *ein2-5* a *ein3-1* a WT kontrolní rostliny (Col-0) byly porovnány v odpovědi na vodní deficit stimulovaný polyethylenglykolem (PEG). Mutantní rostliny vykazovaly vyšší oxidační poškození v podobě peroxidace lipidů, obsahovaly více H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nedocházelo u nich k tak výrazné akumulaci ochranných sacharidů představovaných sacharózou, glukózou a fruktózou. Z pohledu kompatibilních solutů byl analyzován gen *P5CS1*, který je nezbytný pro biosyntézu prolinu. Jeho transkripce byla během vodního stresu zvýšena u Col-0 i obou mutantů, nicméně ke zvýšení exprese za stejných podmínek došlo pouze u kontrolních Col-0 rostlin. ET tak může být zapojen do zpětnovazebné regulace navýšení biosyntézy prolinu za podmínek vodního deficitu (Cui *et al.*, 2015).

### **6.3. Antioxidační obrana**

Antioxidační systém sloužící buňce k udržování stabilního redoxního stavu zahrnuje látky souhrnně nazývané jako antioxidanty, její součástí jsou nízkomolekulární sloučeniny i enzymy. Mezi nejdůležitější antioxidanty řadíme askorbát (ASC), glutathion (GSH),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) a karotenoidy aj. Mezi nejdůležitější antioxidační enzymy považujeme SOD (superoxiddismutázu), CAT (katalázu), APX (askorbátperoxidázu) a GPX (glutathionperoxidázu).

#### **6.3.1. Neenzymatické antioxidanty**

##### **6.3.1.1. Glutathion a askorbát**

Zvýšená hladina GSH je spojena s reakcí rostlin na různé abiotické stresy (Rizhsky *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2010). V případě rostlin tabáku (*N. tabacum*) vystavení rostlin vysokým teplotám a ošetření 3-AT, což vedlo ke specifickému nastolení oxidačního stresu, způsobilo akumulaci redukované formy GSH. Nicméně důležitý je také poměr GSH/GSSH mezi jeho redukovanou a

oxidovanou formou. Vyšší hladina oxidované formy v buňkách snižuje schopnost vyrovnávat se stresovými podmínkami (Gechev *et al.*, 2002).

Stejně je to i v případě ASC. Změny v poměru ASC/DHA (dehydroaskorbát; oxidovaný ASC) jsou důležitým indikátorem redoxní kapacity buněk, kdy jeho vyšší hladina značí lepší schopnost buněk vyrovnávat se s oxidačním stresem (Hernandez *et al.*, 2010).

#### **6.3.1.2. Tokoferoly a karotenoidy**

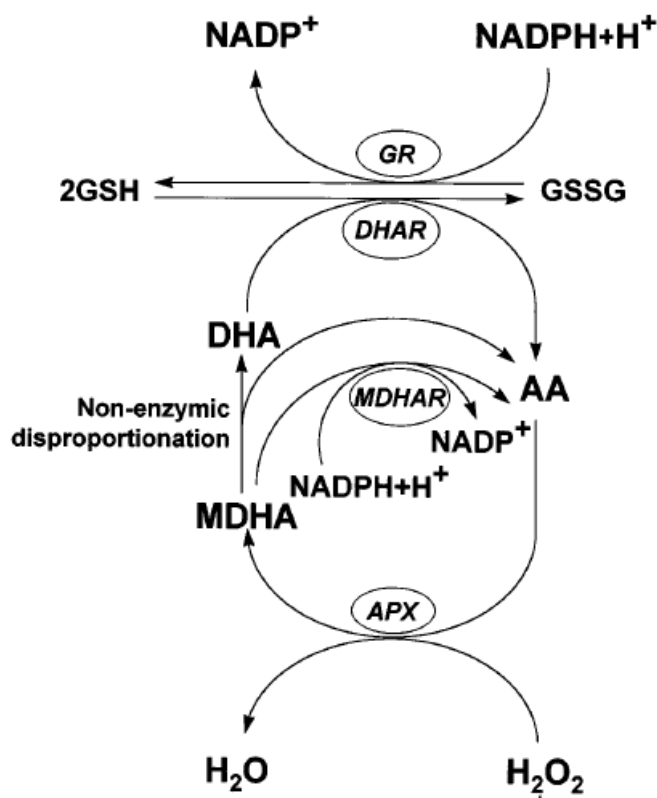
Akumulace ROS a od nich odvozených molekul je v prostředí membrán pod kontrolou lipofilních antioxidantů, především tokoferolů a karotenoidů. V tomto kontextu jsou karotenoidy schopny jednak zabránit samotné produkci ROS např. v xyntofylovém cyklu a fungovat i jako antioxidanty. Obě skupiny chemicky vznikají z geranylgeranylpyrofosfátu terpenoidní cestou a svým výskytem jsou silně spjaty s plastidy. Přičemž tokoferoly se ve větší míře nachází v semenech než v listech (shrnuto spolu s odkazy v Noctor *et al.*, 2014).

#### **6.3.1.3. Glutathion-askorbátový cyklus**

Tento cyklus v sobě zahrnuje enzymatické přeměny ASC a GSH, které funkčně doplňují antioxidační enzymy přímou vazbou na aktivitu APX a společně se podílejí na regulaci množství ROS v rostlinných buňkách (Obr. 3.) Při likvidaci  $H_2O_2$  pomocí APX vzniká monodehydroaskorbát (MDHA), který je zpět redukován enzymem monodehydroaskorbátreduktázou (MDHAR) do formy ASC, ten je opětovně využit jako kofaktor pro APX. Mimoto může být v chloroplastech zpětně redukován redukováním ferredoxinem. MDHA může být neenzymaticky přeměněn na dehydroaskorbát (DHA), který je do redukované formy ACS přeměněn aktivitou dehydroaskorbátreduktázy (DHAR). DHAR využívá jako redukční sílu GSH, jehož dostatek je zajišťován aktivitou enzymu glutathionreduktázy (GR). Enzymy MDHAR a GR využívají pro redukční reakce  $NADPH+H^+$  (Noctor & Foyer, 1998).

Sledování vlivu krátkodobého a dlouhodobého stresu zasolením u kořenů rostlin brokolice (*Brassica oleracea* cv. Marathon) potvrdilo důležitost antioxidantů na udržení redoxního stavu buněk a při vývoji a růstu za těchto stresových podmínek. ASC byl během ošetření NaCl (40mM; 80 mM 24h - 7dnů) v kořenech výrazně akumulován a jeho redoxní stav (poměr ACS/DHA) se zvyšoval spolu s délkou trvání stresu. Snižovaná aktivita APX během solného stresu značí nižší potřebu ASC v askorbát-glutathionovém cyklu. ASC však může přímo redukovat  $H_2O_2$ , který byl v zasolených kořenech významně akumulován. Během dlouhodobého solného stresu byl redoxní stav ASC udržován nezměněnou aktivitou DHAR a MDHAR. Oproti tomu GSH byl významně akumulován pouze během 24h (80 mM NaCl) a pak jeho koncentrace a redoxní stav (GSH/GSSH) klesly. GSH je pravděpodobně

potřeba během osmotické stresové složky prvotně nastávající během zasolení, kdy aktivuje alternativní cesty pro likvidaci ROS a kompenzuje nepřítomnost aktivity APX (Hernandez *et al.*, 2010).



**Obr. 3.** Reakce askorbát-glutathionového cyklu. GR (glutathionreduktáza), DHAR (dehydroaskorbátreduktáza), MDHAR (monodehydroaskorbátreduktáza, APX (askorbátperoxidáza). GSH (redukovaný glutathion), GSSG (oxidovaná forma glutathionu), DHA (dehydroaskorbát – oxidovaná forma), MDHAR (monodehydroaskorbát – jiná oxidovaná forma askorbátu), AA (zde jako ASC – askorbát). Převzato z (Noctor & Foyer, 1998) a upraveno.

### 6.3.2. Antioxidační enzymy

Enzymy řadící se do této kategorie primárně představují ucelený a propojený systém ochrany proti oxidačnímu stresu. Typicky zde řadíme SOD, CAT, APX, GPX a jejich aktivitou dochází k regulaci hladin jednotlivých ROS (Gechev *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2013). Funkce antioxidačních enzymů úzce souvisí se skutečností, že ROS nemají uplatnění pouze při indukci stresových, ale i fyziologických reakcí. Vysoké hladiny O<sub>2</sub><sup>-</sup> a <sup>•</sup>OH v rané fázi vývoje lusku u hrachu (*Pisum sativum*) naznačují jejich uplatnění při rozvolňování a elongaci buněčné stěny. Zvýšená hladina <sup>•</sup>OH i v pozdních fázích vývoje ukazuje napojení na lignifikaci buněčných stěn. Zdravý růst lusku byl ovlivněn kontrolou produkce ROS především díky SOD a CAT (Liu *et al.*, 2014).

### 6.3.2.1. SOD

Tento enzym katalyzuje dismutaci  $O_2^-$ , při které vzniká  $H_2O_2$  a primárně se podílí na jeho zneškodnění v rámci buněčných reakcí a to nejen na stresové podmínky (Asada & Kanematsu, 1976; Jing *et al.*, 2015). Modulací exprese lze dosáhnout navození tolerance k určitým stresovým faktorům. U druhu mangrovových porostů *Kandelia candel* dochází za podmínek extrémního zasolení (300 mM NaCl) k navýšení exprese genu *KcCDS* pro Cu/Zn SOD a následně k vyšší aktivitě SOD v listech. Pozorování transgenních rostlin tabáku (*N. tabacum*) exprimující tento gen vystavených 150 mM NaCl po dobu 1 -7 dnů prokázalo podíl *KcCDS* na ochraně chloroplastů proti ROS během stresu NaCl. Potvrdil se tím podíl Cu/Zn SOD na ochraně chloroplastů během stresu zasolením (Jing *et al.*, 2015).

Jak již bylo naznačeno, ROS se mohou uplatňovat i v průběhu normálního vývoje. SOD a její regulace produkce  $O_2^-$  hraje roli např. při vývoji lusku u *P. sativum* a *Brassica chinensis*, dvou důležitých druhů z oblasti jižní Číny. Během zrání lusku postupně docházelo k poklesu hladiny  $O_2^-$ , což korespondovalo se zvyšující se aktivitou SOD (Liu *et al.*, 2014).

### 6.3.2.2. CAT

Kataláza je stěžejní enzym antioxidantního systému katalyzující rozklad  $H_2O_2$  a představuje důležitou složku kontroly rovnováhy ROS v buňce. Vyznačuje se extrémně vysokou maximální katalytickou rychlostí, ale nízkou substrátovou afinitou (Noctor & Foyer, 1998). Je lokalizována téměř výlučně v peroxizómech, zatímco odpovídající funkci konverze  $H_2O_2$  v chloroplastech, mitochondriích i cytoplazmě zajišťuje APX (Asada K., 1992). U *A. thaliana* geny *CAT* kódují malou rodinu proteinů zahrnující *CAT1*, *CAT2* a *CAT3*. Expresní profily a aktivity se liší jak za normálních, tak různých stresových podmínek. *CAT1* za běžného stavu vykazuje nízkou hladinu exprese, avšak její exprese a aktivita je stimulována environmentálními stresy zahrnující mj. sucho, chlad a oxidační stres. *CAT2* zajišťuje homeostázi  $H_2O_2$  na světle a je exprimována ve fotosynteticky aktivních částech, hlavně listech. Za nestresových podmínek vykazuje nejvyšší hladinu exprese oproti *CAT1* a *CAT3*. Její aktivita je zřetelně posílena suchem, chladem a oxidačním stresem. *CAT3* je přednostně aktivována v noci, nicméně na zvýšení její aktivity má pozitivní vliv ABA, oxidační stres a také senescence (Du *et al.*, 2008).

CAT hraje svou roli během fotorespirace, kdy v peroxizómech likviduje  $H_2O_2$  vznikající přeměnou glykolátu na glyoxylát. Fotorespirace je procesem, ke kterému v rostlinách dochází zejména za stresových podmínek díky oxygenázové aktivitě enzymu Rubisco. U rostlin hrachu (*P. sativum*) přenesených do podmínek vysokého obsahu  $CO_2$  byl pozorován pokles aktivity CAT, který byl výraznější při vyšší koncentraci  $CO_2$ . Zatímco u rostlin již pěstovaných v podmínkách bohatých na  $CO_2$  po dobu 14 dnů k významné modulaci aktivity nedošlo. Je tedy zřejmé, že inhibice CAT je reakcí na měnící se koncentraci  $CO_2$  (Thibaud *et al.*, 1995). Geny pro CAT z různých tříd byly analyzovány u



rýže (*Oryza sativa*) v návaznosti na fotoperiodu, cirkadiánním rytmus a stresové podmínky sucha. CAT z třídy I fungují při fotorespiraci a jejich overexprese vedla k ochraně rostlinných pletiv oproti suchu (Joo *et al.*, 2014).

Uplatnění CAT v rostlinné říši je široké. Reguluje hladinu  $H_2O_2$  při vývoji lusku u rostlin hrachu (*P. sativum*) a podílí se na určení velikosti plodu (Liu *et al.*, 2014). Její účinek v podobě ochrany proti oxidačnímu stresu se spolu s dalšími antioxidantními enzymy projevil u rostlin tabáku (*N. tabacum*) předem ošetřených 5 mM  $H_2O_2$  (Gechev *et al.*, 2002). Aktivita CAT se podílí i při aklimaci rostlin rajčete (*Lycopersicon esculentum* Mill.) proti chladovému stresu (Işeri *et al.*, 2013).

U transgenních rostlin tabáku (*N. tabacum*) overexprimujícího gen pro Cu/Zn SOD *KcCSD* nedošlo po ošetření 100 mM NaCl oproti WT k výraznému navýšení obsahu  $H_2O_2$  v listech. Udržení nízké hladiny  $H_2O_2$  jako důsledku oxidačního stresu bylo dosaženo mj. zvýšenou aktivitou CAT. Ta při delším trvání solného stresu (4-7 dnů) dokázala redukovat koncentraci  $H_2O_2$ , který vznikl konverzí  $O_2^-$  za katalýzy SOD (Jing *et al.*, 2015).

#### 6.3.2.3. APX

Askorbátperoxidáza (APX) katalyzuje odstraňování  $H_2O_2$  či hydroperoxidů za vzniku  $H_2O$ . APX má k  $H_2O_2$  vysokou afinitu. Jako kofaktor a zároveň redukční substrát používá hlavně ASC a jedná se o enzym specifický pro rostliny. V listech čajovníku byly nejprve identifikovány 2 izoenzymy, jeden jako chloroplastová a druhý jako cytosolická APX, která byla lokalizována mimo chloroplasty. Celkově APX slouží především k ochraně chloroplastů a dalších částí buňky proti  $H_2O_2$  a v důsledku i  $\cdot OH$  (Asada K., 1992). U rostlin hrachu byly následně objeveny zkoumány i mitochondriální a peroxizómová izoforma APX (Jimenez *et al.*, 1998).

V rámci genové studie odezvy rostlin tabáku (*N. tabacum*) na stres suchem, horkem a kombinaci těchto stresů byla sledována i exprese tří genů pro APX, cytosolická (*cAPX*) stromatální (*sAPX*) a thylakoidní (*tAPX*). Jejich expresní profily se lišily při odpovědi na jednotlivé stresy či jejich kombinaci a také v rámci rostliny mezi různě starými listy (Lubovská *et al.*, 2014). APX se ve spolupráci s dalšími enzymy antioxidantního systému může podílet na aklimaci rostlin ke stresovým podmínkám jako např. u rostlin rajčete (*Lycopersicon esculentum* Mill.) k chladu (Işeri *et al.*, 2013), nebo v případě tabáku (*N. tabacum*/cv. Xanthi) na obraně proti specificky indukovanému oxidačnímu stresu (Gechev *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2002).

#### 6.3.2.4. Další enzymy

Mezi antioxidantními enzymy se řadí i 2-Cys Prx (2-cystein peroxiredoxin). Jedná se o enzym ze skupiny thiol-specifických peroxidáz, který se podílí na odstraňování ROS vznikajících během elektronových přenosů. Likviduje peroxidy a chrání tak chloroplastové membrány. Pod silným

oxidačním či teplotním stresem dochází ke změně funkce z peroxidázy na molekulární chaperon (odkazy v (Kim *et al.*, 2011). Transgenní rostliny bramboru (*Solanum tuberosum* L. cv. Atlantic) exprimující *At-Cys Prx* pod kontrolou stresem indukovaného promotoru *SWPA2* vykazovaly zvýšenou odolnost k oxidačnímu stresu navozenému postřikem 300  $\mu$ M herbicidu MV (Kim *et al.*, 2011).

GPX je enzym katalyzující redukci  $H_2O_2$ , organických hydroperoxidů a lipidických peroxidů za užití GSH i dalších redukčních ekvivalentů (Ursini *et al.* 1995). U *A. thaliana* byl zkoumán jeden z 8 nalezených genů pro GPX a rostliny jej overexprimující vykazovaly oproti kontrolám zvýšenou odolnost vůči oxidačnímu poškození vyvolanému ošetřením MV (Gaber *et al.*, 2012). U čajovníku (*Camellia sinensis* L.) byl nedávno naklonován a charakterizován nový gen pro GPX označený jako *CsGPX2* s potenciálem ochrany proti oxidačnímu poškození. Jeho exprese byla stimulována zasolením, těžkými kovy, suchem, horkem a z řad fytohormonů gibereliny a methyljasmonátem (MeJA). Naopak biotický stres v podobě poškození herbivory nevedl ke změně exprese (Fu, 2014).

## 6.4. Herbicidy

### 6.4.1. Methylviologen/Paraquat

Jeho systematický název je N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid a patří mezi skupinu neselektivních herbicidů. Módem účinku je produkce ROS v chloroplastech u ošetřených a následně světlu vystavených rostlin (Babbs *et al.*, 1989). MV konkrétně vystupuje jako akceptor elektronů v primárních fotochemických reakcích PSI a na světle redukuje kyslík za vzniku  $O_2^{\cdot-}$  (Hiyama, Ohinata, & Kobayashi, 1993).

Díky své chemické povaze se v rostlinné biologii využívá ke specifické indukci oxidačního stresu v podobě nadprodukce  $O_2^{\cdot-}$ . MV se ve studiích používá různým způsobem, primárně na fotosynteticky aktivní části rostlin. Často se přistupuje ke sprejování listů, popř. celého prýtu (Yun *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2011). Zkoumat lze reakce pouze vybrané části listů – tzv. listové disky (Kim *et al.*, 2011). Lze také sledovat reakce chloroplastů a thylakoidních membrán na ošetření MV (Krieger-Liszka *et al.*, 2011). Vzhledem k principu účinku MV, který vyžaduje fotochemické procesy, je potřeba po jeho aplikaci vystavit rostliny, popř. jejich části světelnému záření.

### 6.4.2. 3 – Aminotriazol

Má schematický název 3-amino-1,2,4-triazol. Jedná se o neselektivní herbicid, ale vzhledem ke svému specifickému účinku se 3-AT používá při studiu oxidačního stresu nejen u rostlin. Je schopen ireverzibilně inhibovat aktivitu CAT v přítomnosti  $H_2O_2$  tím, že se váže na intermediát zvaný komplex

1 (Margoliash & Hospital, 1962). Inhibice CAT pomocí 3-AT byla studována na vzorcích z myších jater a ledvin, popř. lidské krve. V tomto případě bylo k inhibici enzymu vždy zapotřebí kyslíku a ve většině případů i určitá koncentrace  $H_2O_2$  (Int & Ind, 1958). U rostlin tabáku (*N. sylvestris*) bylo zjištěno, že 3-AT způsobuje *in vivo* preferenčně inhibici CAT-1 a CAT-2 oproti CAT-3. Při porovnání inhibice CAT-1 a CAT-3 bylo ověřeno, že je potřeba přítomnost  $H_2O_2$ , nicméně nejednalo se o limitující faktor. Listové katalázy tabáku tedy byly inhibovány 3-AT, avšak izoenzym se zvýšenou „peroxidatickou“ aktivitou byl inaktivován nejméně (Havir, 1992).

U rostlinných studií zaměřených primárně na oxidační stres se 3-AT využívá buď k jeho přímé indukci, kdy po jeho aplikaci dochází u rostlin k akumulaci  $H_2O_2$  (Gechev *et al.*, 2002), nebo k funkčnímu studiu rostlinných CAT (Du *et al.*, 2008).

## 7. Materiál a metody

### 7.1. Rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum*, cv. Xanthi)

1. Semena (80 – 100 ks) byla prekultivována *in vitro* na Petriho miskách o průměru 10 cm a médiem podle (Murashige & Skoog, 1962) v kultivační místnosti při teplotě 25/20 °C 150  $\mu\text{mol}$  (PAR)  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  a světelné periodě 16 hod světlo/8 hod tma. Po čtyřech týdnech byly rostlinky přemístěny do plastových skleničků (asi 40 ks) se substrátem. Po dalších 3 týdnech byla každá rostlina přemístěna do květináče se substrátem.
2. Rostliny byly pěstovány v kultivační místnosti při teplotě 21 °C, ozáření 150  $\mu\text{mol}$  (PAR)  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  za denního režimu 16 hod světlo/8 hod tma v samostatných květináčích na plastových platech, viz Obr. 4.
3. Každá rostlina byla zalévána 2x týdně 50 ml živného roztoku (Tab. 1.), jinak každý den deionizovanou vodou ( $\text{dH}_2\text{O}$ ).
4. Listové fragmenty byly odebírány ze 4. - 5. listů odshora rostlin starých cca 4 měsíce.



**Obr. 4.** Rostliny tabáku (*N. tabacum*, cv. Xanthi), stáří 4 měsíce.

Koncentrace látky v živném roztoku		
	[g · l <sup>-1</sup> ]	[mM]
Fe EDTA	0,656	4
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	0,945	
KNO <sub>3</sub>	0,404	4
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,368	1,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,208	1,33
MnSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	0,00241	
MnSO <sub>4</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0,00223	0,01
CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	0,000125	0,0005
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0,00029	0,001
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00186	0,03
NaCl	0,0059	0,1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 4 H <sub>2</sub> O	0,000121	0,0005

Tab. 1. Složení živného roztoku. Pro zalití tabákových rostlin jej bylo nutno zředit 10x.

#### Inkubace rostlin a příprava vzorků

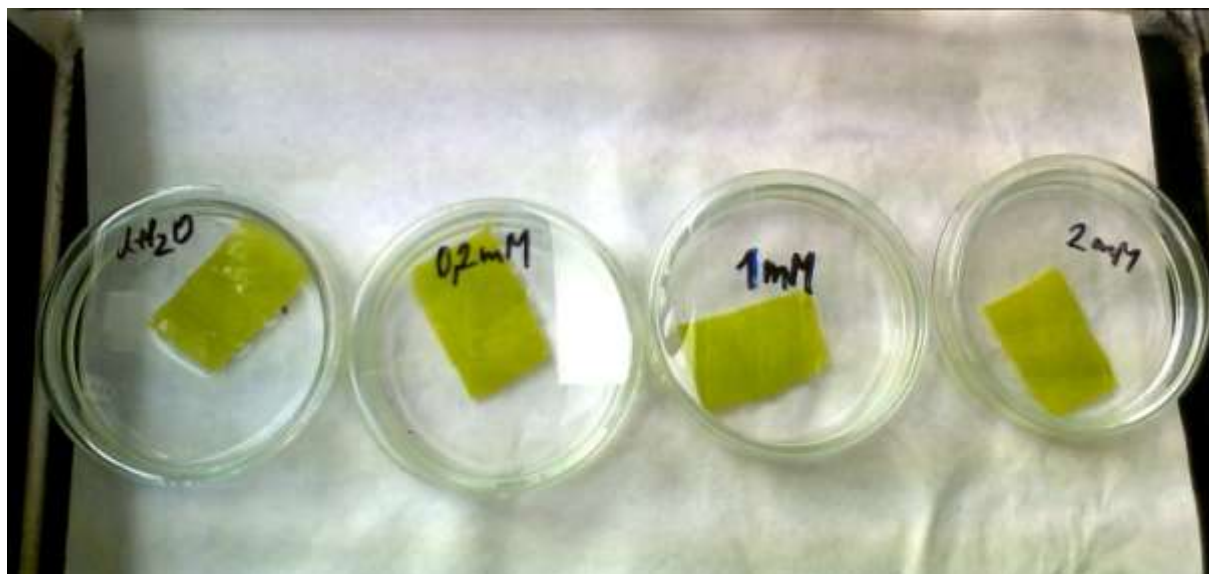
1. Odebrala jsem 4. – 5. pravý list odhora tabákových rostlin. Pro jednu koncentrační řadu jsem připravila vzorky z jednoho listu.
2. V oblasti mimo střední žebro jsem vyřízla fragment o velikost cca 1,5 x 2,5 cm a zvážila jej na analytických vahách.
3. Do Petriho misek o průměru 5 cm jsem připravila koncentrační řady roztoků herbicidů vždy v objemu 10 ml (Tab. 2., Tab. 3.) a zvážené fragmenty jsem do nich přenesla v počtu 1 fragment/miska.
4. Misky s roztoky MV jsem umístila na třepačku (150 ot/min), zakryla černou látkou a nechala inkubovat 16 hod. Poté jsem vzorky odkryla a nechala 1 hod na světle (150 μmol (PAR) m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Při ozáření mohla v zelených listových pletivech probíhat fotosyntéza. MV funguje jako akceptor elektronů z PSI a v chloroplastech reakcí s molekulárním O<sub>2</sub> dochází ke specifické produkci O<sub>2</sub><sup>-</sup> a následnému oxidačnímu poškození rostlinné buňky (Hiyama *et al.*, 1993).
5. V případě 3-AT jsem nechala listové fragmenty v roztocích inkubovat po dobu 8 hod na světle (150 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), viz. Obr. 5.
6. Po ukončení inkubace jsem fragmenty přenesla na buničitou vatou a jemně osušila. Následně jsem je zabalila do alobalu, označila koncentrací a takto připravené je umístila do tekutého N<sub>2</sub>. Poté jsem je přenesla do mrazáku, kde byly až do zpracování uchovány při teplotě – 83 °C.

Koncentrační řada MV		
[ $\mu$ M]	MV zásobní [ml]	H <sub>2</sub> O [ml]
0	0	10
10	0,1	9,9
20	0,2	9,8
50	0,5	9,5
80	0,8	9,2
100	1	9

**Tab. 2.** Koncentrační řada MV pro inkubace listových fragmentů.

Koncentrační řada 3-AT		
[mM]	3-AT zásobní [ $\mu$ l]	H <sub>2</sub> O [ml]
0	0	10
0,1	1	9,999
0,2	2	9,998
0,5	5	9,995
1	10	9,99
2	20	9,98

**Tab. 3.** Koncentrační řada 3-AT pro inkubace listových fragmentů.



**Obr. 5.** Roztoky 3-AT o různé koncentraci s listovými fragmenty připravenými k inkubaci.

## 7.2. Kometový test – poškození rostlinné jaderné DNA dle Gichner *et al.*, (2008)

### Roztoky:

**10 N NaOH; 1% NMPA** (normal melting point agarose)

### **PBS (pH = 7,4) zásobní sterilizovat**

2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,14 M NaCl; 1,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O

### **Alkalický elektroforetický pufr (pH > 13)**

Pro V = 2000 ml – 60 ml 10 N NaOH; 10 ml 200 mM EDTA; 1930 ml studené dH<sub>2</sub>O.

**200 mM EDTA** (pH = 10 pomocí 10 N NaOH)

### **Ethidium bromid (EtBr)**

0,5 mM EtBr jako zásobní roztok skladovaný v tmavé lahvičce. Pro barvení jsem 10x zředila a filtrovala přes jednorázový filtr Millex GV 0,22 µm (Millipore, USA).

### **1% LMPA (low melting point agarose)**

Rozpustit v PBS, přelit do průhledných vialek pro uchování vzorků o V = 4 ml. Skladovat v lednici.

### **Neutralizační pufr (pH = 7,5)**

0,4 M Tris-HCl

### **Příprava podložních sklíček**

1. Jednotlivá sklíčka jsem otřela bavlněnou látkou a ponořila na týden do nádoby s ethanolem. Zakryla jsem ji alobalem, aby nedošlo k přílišnému odpaření ethanolu.
2. Po týdnu jsem jednotlivá sklíčka vytáhla a opět otřela bavlněnou látkou, abych z nich odstranila možné přebývající nečistoty. Následně jsem je ponořila do čistého ethanolu a opálila nad lihovým kahanem.
3. Sklíčka jsem nechala chvíli vychladnout, pak je ponořila do 1% NMPA agarózy, zadní stranu otřela kouskem buničiny a vyskládala je na filtrační papír. Takto připravená sklíčka jsem po zaschnutí druhý den schovala do krabičky.

### **Izolace jader – při tlumeném světle**

1. Listové fragmenty pro inkubaci jsem vyřízla tak, aby obsahovaly část středního žebra pro jednodušší manipulaci.
2. Před dokončením inkubace s herbicidem jsem dala rozehrát dri-block DB-2D (Techne, U.K.) na 70 °C pro LMPA. Další dri-block jsem nastavila na teplotu 42°C a vložila do něj mikrozkušavky – jednu pro každou koncentraci herbicidu. Do každé mikrozkušavky jsem napipetovala 150 µl LMPA a zavřela ji.
3. Do nádoby s ledem jsem umístila buničitou vatu a položila na ní spodní části Petriho misek o průměru 6 cm.
4. Po ukončení inkubace s herbicidy jsem vzorky přenesla do laboratoře a ihned zpracovala. Listový fragment jsem opláchla destilovanou vodou a přenesla na vychlazené dno Petriho misky, kde jsem k němu přidala 350 µl neutralizačního pufru (Tris - HCl). Fragment jsem pomocí žiletky a pinzety nařezala na co nejjemnější proužky a takto nařezaný list jsem promyla v izolačním pufru, aby se vyplavila jádra.
5. 150 µl suspenze jader jsem napipetovala do mikrozkušavky s LMPA umístěné v dri-blocku při 42 °C a několikrát promíchala (poměr LMPA a suspenze v poměru 1:1).
6. 115 µl směsi jsem pomocí pipety přenesla na podložní sklíčka potažená NMPA ve třech rovnoměrných kapkách. Připravila jsem 2 sklíčka pro každou koncentraci. Přikryla je krycím sklíčkem a nechala po dobu 5 – 10 min ztuhnout na skle na ledu. Preparáty jsem zakryla tmavou látkou, abych je uchránila před světlem a možným nežádoucím poškozením.

### **Elektroforéza**

1. Preparáty zbavené krycích sklíček jsem umístila do vychlazeného elektroforetického tanku naplněného elektroforetickým pufrem a nechala 10 min stát.
2. Elektroforéza běžela při 26 V a 300 mA po dobu 25 min.
3. Preparáty jsem třikrát promyla neutralizačním pufrem, cca po 1 min. Opláchla je dH<sub>2</sub>O, vyskládala na filtrační papír a druhý den schovala do krabičky.

### **Barvení – v temné místnosti při žlutém světle; hodnocení komet**

1. Preparáty jsem ponořením do nádoby s dH<sub>2</sub>O propláchla a položila na buničinu. Na každé sklíčko jsem ve 3 kapkách nanesla 115 µl EtBr a nechala 5 min barvit.
2. Pak jsem je opět ponořila do nádoby s dH<sub>2</sub>O, otřela zadní stranu a opatrně přiložila krycí sklíčko.
3. Obarvené preparáty bylo nutno vyhodnotit za pomoci fluorescenčního mikroskopu (Nikon Eclipse E600, Japan) ten samý den. V rámci cca 6 hod, jelikož nebyly fixovány.
4. Následné hodnocení komet pomocí softwaru Komet 3.1. (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK).



### 7.3. Peroxidace lipidů a její stanovení pomocí metody TBARS dle Hodges *et al.* (1999)

#### Roztoky:

**80:20 (v:v) ethanol: voda**

**20% kyselina trichloroctová/ bez přidání kyseliny thiobarbiturové (TCA/TBA –)**

20% (w:v) TCA; 0,01% butylovaný hydroxytoluen (BHT)

**20% TCA/TBA+**

20% (w:v) TCA; 0,01% butylovaný hydroxytoluen (BHT); 0,65% (w:v) TBA

Metoda stanovení TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) se používá pro spektrofotometrické stanovení množství MDA, který je považován jako obecný ukazatel peroxidace lipidů. MDA, jakožto druhotný produkt oxidace polynenasycených MK, může v buňkách vznikat autooxidací či enzymatickou degradací MK. Metoda stanovení TBARS je často používaná pro svou jednoduchost a minimální manipulaci se vzorkem. Jejím principem je reakce MDA s TBA a následné odečtení absorbance při vlnové délce 532 nm.

Ve starších studiích docházelo k nadhodnocení množství MDA v důsledku přítomnosti interferujících cukrů a pigmentů, např. flavonoidů a antokyanů, které mají absorpční maximum typické pro MDA. Hodges *et al.*, (1999) tuto skutečnost vzali v potaz a vyvinuli nový protokol, podle něhož je možné spolehlivě určit peroxidaci lipidů v rostlinných pletivech, která za normálních podmínek obsahují interferující látky. Může být také použit pro pletiva, která interferující látky akumulují po vystavení environmentálnímu stresu. Ve studii analyzující přítomnost interferujících látek při měření MDA, Wang *et al.*, (2013) prokázali, že pro většinu experimentálních rostlinných druhů je nejvhodnější extrakční médium TCA.

#### Extrakce

1. Vzorek jsem vyjmula z mrazícího boxu, kde byl uchováván při teplotě – 83 °C a přenesla jej v tekutém dusíku, abych zabránila jeho rozmrazení a dodatečnému poškození.
2. Vzorek jsem za postupného přidávání roztoku ethanolu důkladně rozetřela ve vychlazené třecí misce pomocí tekutého N<sub>2</sub>. Množství ethanolu jsem přidala dle hmotnosti vzorku v poměru 40 mg: 1 ml. Pro důkladnější extrakci jsem přidala i mořský písek (Lachema). Takto připravený vzorek jsem přelila do mikrozkušavky, umístila na led a nechala 20 min sonikovat (Tesla UC 006 DM1, Orava, Československo).

### Reakce s TBA

1. Centrifugace při 14 000xg, 20 min při 4 °C (Sigma 3K30, U.K.). Ze supernatantu jsem odpipetovala 0,65 ml do dvou mikrozkušavek a přidala 20% TCA/TBA+ nebo 20% TCA/TBA- vždy do jedné z nich v poměru 1:1. Supernatant: TCA+/- = 0,65 ml: 0,65 ml.
2. Obsah jsem protřepala a umístila mikrozkušavky do dri-blocku s teplotou 95 °C na 25 min. Poté jsem je ochladila ponořením do ledu na cca 3 min a centrifugovala při 14 000xg, 20 min při 4 °C (Sigma 3K30).
3. Supernatant jsem umístila do spektrofotometrické mikrokvyety a jako blank použila dH<sub>2</sub>O. Na spektrofotometru (Hitachi U3300, Tokyo, Japonsko) jsem odečetla absorbanční při vlnové délce 440 nm, 532 nm, 600 nm a vypočetla koncentraci MDA dle následujících vzorců. Výsledné množství MDA jsem vyjádřila jako nmol · ml<sup>-1</sup>.

$$A = [(Abs\ 532_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) - (Abs\ 532_{-TBA} - Abs\ 600_{-TBA})]$$

$$B = [(Abs\ 440_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) * 0,0571]$$

$$C_{MDA} [nmol \cdot ml^{-1}] = [(A - B/157000) * 10^6]$$

### 7.4. Měření obsahu karbonylových skupin u proteinů podle Levine *et al.*, (1990)

#### Roztoky:

#### Izolační pufr (pH =7)

0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 mM EDTA; 0,01 mM fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

#### 10 % streptomycinsulfát v 50 mM HEPES (pH =7,2)

#### 10 mM 2,4 – dinitrofenylhydrazin (DNPH) v 2 M HCl

#### ethanol : ethylacetát (1 : 1)

#### 6 M guanidin

20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=2,3) – titrace pomocí koncentrované kyseliny trifluoroctové (TFA); 6 M guanidin (guanidin hydrochlorid G4505-100G, Sigma-Aldrich, MO, USA)

Metoda využívá schopnosti DNPH vázat se na karbonylové skupiny proteinů. Touto reakcí vzniká dinitrofenylhydrazon, který se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 365 nm. Oxidaci

proteinů můžeme řadit mezi posttranslační kovalentní modifikace. Karbonylové skupiny vznikají na aminokyselinových řetězcích proteinů při jejich reakci s volnými kyslíkovými radikály a jejich množství odpovídá míře oxidačního poškození.

### **Izolace proteinů**

1. Vzorek jsem vyjmula z mrazícího boxu (-83 °C) a přenesla jej v tekutém N<sub>2</sub>, aby nedošlo k jeho rozmrazení a dodatečnému poškození. Rozetřela jsem ho ve vychlazené třecí misce pomocí tekutého N<sub>2</sub> na prášek a přidala izolační pufr (pH=7) dle hmotnosti vzorku v poměru 1 g: 5 ml pufru.
2. Vzniklou směs jsem přelila do nechlazené plastové kyvety a centrifugovala při 15 000xg, 25 min, při 4 °C (Sigma 3K30). Tím došlo k oddělení rozpustné části proteinů od membránové.
3. Sediment jsem odstranila a ze supernatantu odpipetovala 100 µl do mikrozkušavky pro stanovení obsahu rozpustných proteinů (metodou podle Bradford, 1976).

### **Odstranění nukleových kyselin**

V dalším kroku bylo nutné odstranit nukleové kyseliny. Ty také obsahují karbonylové skupiny, které by mohly reagovat s DNPH a poskytovat nadhodnocené výsledky pro oxidačně modifikované proteiny.

1. Do plastové kyvety jsem odpipetovala 9 dílů supernatantu (2,7 ml) a 1 díl (0,3 ml) 10% sulfátu streptomycinu v 50 mM HEPES (pH=7,2). Streptomycin sulfát váže a sráží nukleové kyseliny.
2. Kyvety jsem umístila na led a nechala na třepačce (150 ot/min) 15 min. Poté jsem je dala centrifugovat při 15 000xg, 10 min při 4 °C (Sigma 3K30) a sediment i tentokrát odstranila.
3. Ze supernatantu jsem odpipetovala vždy 500 µl do čtyř mikrozkušavek. Do každé jsem přidala 500 µl 20% TCA, která sráží proteiny, a nechala centrifugovat při 11 000xg, 15 min při 4 °C (Sigma 3K30). Supernatant jsem odstranila.

### **Barvení DNPH**

1. Pro barvení DNPH jsem vybrala tři mikrozkušavky a přidala do nich 500 µl 10 mM DNPH v 2 M HCl. Čtvrtou mikrozkušavku jsem vedla jako blank a napipetovala do ní 500 µl HCl. Vzniklou sraženinu jsem důkladně rozetřela, aby se barvivo lépe dostalo ke všem proteinům.
2. Vzorky jsem nechala za laboratorní teploty na třepačce (150 ot/min) po dobu 1 hod. Každých 15 min jsem vzorky navíc protřepala.
3. Po hodině jsem do mikrozkušavek přidala 500 µl 20% TCA a dala je centrifugovat při 11 000xg, 5 min při laboratorní teplotě (Sigma 3K30). Supernatant jsem odstranila.

4. K sedimentu jsem přidala 1 ml směsi ethanol:ethylacetát (1:1), aby se odstranilo volné barvivo. Vzorky jsem nechala 10 min stát při laboratorní teplotě a poté centrifugovala při 14 000xg, 5 min při 21°C (Sigma 3K30). Promytí ethanol:ethylacetátem jsem zopakovala třikrát.
5. Po odstranění barviva jsem k sedimentu napipetovala 600 µl 6 M guanidinu a nechala vzorky inkubovat 15 min při teplotě 37 °C. Tímto krokem došlo k rozpuštění proteinů.
6. Centrifugace při 14 000xg, 5 min při 21°C (Sigma 3K30). Odstranila jsem sediment a supernatant napipetovala do spektrofotometrické mikrokyvety. Blank jsem umístila jako referenci a měřila absorbanci vzorků při vlnové délce 365 nm.
7. Pro výpočet obsahu karbonylových skupin jsem použila molární absorpční koeficient  $\epsilon = 22\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Výsledek jsem vyjadřovala jako nmol karbonylu · mg proteinu.

$$c [\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}] = \text{Abs } 365 (\text{vzorek} - \text{blank}) * 10^6$$

### 7.5. Určení aktivity CAT dle Chance and Maehly (1955) a APX dle Nakano *et al.*, (1981)

#### Roztoky CAT:

##### Extrakční pufr

0,1 M Tris-HCl (pH = 7,8); 1 mM dithiothreitol (DTT); 1 mM EDTA Na<sub>2</sub>; 1 % Triton X-100; 5 mM kyselina askorbová

##### 0,1 M fosfátový pufr (pH = 7)

0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (x); 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (y); 39 ml x + 61 ml y – ředit na 200 ml

##### 60 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### Roztoky APX:

Extrakční pufr – stejný jako pro CAT; + 5 mM Na – askorbát

##### 0,1 M HEPES - EDTA pufr (pH = 7)

V = 500 ml – 11,91 g HEPES ; 18,6 mg Na<sub>2</sub>EDTA

##### 30 mM Na-askorbát

##### 176 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### Extrakce a centrifugace

1. Vzorek, který byl po inkubaci uchován v mrazáku za teploty  $-83\text{ }^{\circ}\text{C}$ , jsem vyjmula a přenesla v Dewarově nádobě s tekutým  $\text{N}_2$ . Mezitím jsem v mrazáku při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dala vychladit třecí misky s tloučky.
2. Vzorek jsem na chvíli ponořila do tekutého  $\text{N}_2$  a po vyndání jej kleštěmi rozdrtila ještě v alobalu. Přesypala jsem jej do vychlazené misky a za sucha třela na prášek.
3. Poté jsem přidala extrakční pufr v poměru 5: 1 (v:w) čerstvé hmotnosti. Vzorek jsem přelila do centrifugační plastové kyvety, umístila do nádoby s ledem, přikryla jej černou látkou a nechala 30 min stát.
4. Centrifugace při 14 000xg; 10 min při  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Sigma 3K30).
5. Do nádoby s ledem jsem si připravila zkumavky a jednotlivé vzorky slila do příslušné zkumavky přes 4 vrstvy gázy. Do mikrozkušavky jsem odebrala 30  $\mu\text{l}$  supernatantu na stanovení bílkovin. (Metoda dle Bradford, 1976).

### Spektrofotometrické stanovení aktivity CAT a APX na spektrofotometru Hitachi U3300

1. Celé měření jsem prováděla v míchaných termostatových kyvetách při  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro referenci jsem použila  $\text{dH}_2\text{O}$  a vzorek připravila dle Tab. 4.; nebo Tab. 5. Jako poslední jsem přidala  $\text{H}_2\text{O}_2$  a míchadlo. Před samotným měřením jsem vzorek protřepala za pomoci parafilmu.
2. Měření po dobu 1 min jsem opakovala 4x pro daný vzorek za použití jedné reference. Pozorovala jsem úbytek absorbance  $\text{H}_2\text{O}_2$  mezi 20. a 40. vteřinou, nebo v části křivky, kde byl úbytek lineární, ale vždy v časovém úseku 20 vteřin.
3. To vše při vlnové délce 240 nm (CAT). Pro výpočet aktivity katalázy jsem použila extinkční koeficient  $\text{H}_2\text{O}_2$  při 240 nm o hodnotě  $\epsilon = 39,4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ . Výsledek jsem vyjádřila úbytkem  $\text{H}_2\text{O}_2$  v jednotkách  $\mu\text{M H}_2\text{O}_2\text{ min}^{-1} \cdot \text{mg proteinu}$ .
4. V případě APX jsem pro výčet použila extinkční koeficient 2,8  $\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  a sledovala úbytek askorbátu při 290 nm. Výsledek je vyjádřen jako  $\mu\text{M ASC min}^{-1} \cdot \text{mg proteinu}$ .

	konečná konc.	reference [ml]	vzorek [ml]
0,1 M fosfátový pufr pH 7	0,1 M	2,9	2,4
extrakt		0,1	0,1
60 mM $\text{H}_2\text{O}_2$	10 mM	-	0,5 ml

**Tab. 4.** Složení vzorku a reference pro měření enzymatické aktivity katalázy.

$$\text{Act } [\mu\text{M H}_2\text{O}_2\text{ min}^{-1} \cdot \text{mg protein}] = \Delta\text{Abs} \cdot 3 \cdot \epsilon \cdot d$$

	konečná konc.	reference	vzorek
0,1 M Hepes - EDTA pufr pH 7	0,1 M	2,935 ml	2,835 ml
30 mM Na-askorbát	0,5 mM	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
extrakt		-	100 $\mu$ l
176 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,88 mM	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l

**Tab. 5.** Složení vzorku a reference pro měření enzymatické aktivity askorbátperoxidázy.

$$\text{Act} [\mu\text{M ASC min}^{-1} \cdot \text{mg protein}] = \Delta\text{Abs} \cdot 3 \cdot \varepsilon \cdot d$$

d = tloušťka kyvety (prostředí, ve kterém dochází k zeslabování – absorpanci procházejícího záření)

## 7.6. Měření stability plasmatické membrány Yun *et al.* (2000)

Integritu plasmatické membrány inkubovaných listových fragmentů jsem stanovovala konduktometricky na základě měření změn vodivosti roztoků herbicidů o různé koncentraci. V nepoškozených buňkách prochází skrze plasmatickou membránu pouze omezené množství iontů. Za nepříznivých či stresových podmínek dochází mj. k poškození plasmatické membrány a následně k vyjití iontů do okolního prostředí, což vede ke zvýšení vodivosti roztoku.

1. Listové fragmenty jsem po inkubaci vyjmula z Petriho misek. Jednotlivé roztoky herbicidů o různé koncentraci jsem slila do skleněných scintilačních lahvíček (V = 50 ml) a u každého změřila jeho vodivost (C<sub>i</sub>) pomocí konduktometru (Conductivity meter 4520, Jenway, Essex UK).
2. Ke slitým roztokům jsem zpět přidala příslušné listové fragmenty. Lahvičky jsem přetáhla alobalem a dala autoklávovat při 120°C po dobu 20 min (Chirana PS20A, Czechoslovakia), aby došlo k uvolnění veškerých iontů a buněčných solutů.
3. Poté jsem měřila jejich vodivost (C<sub>f</sub>) a vypočítala hodnotu integrity membrány a index její stability (MSI).

$$\text{relativní poškození integrity membrány} = C_i/C_f * 100$$

$$\text{MSI [\%]} = [1 - (C_i/C_f)] * 100$$

## 7.7. Stanovení proteinů (podle Bradford, 1976)

**Roztoky:**

**Hovězí sérový albumin (BSA)**

Standardní koncentrace:  $1,45 \text{ mg BSA} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $0 - 14,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

**Bradford reagent (B6916, Sigma-Aldrich, MO, USA)**

Principem metody je adsorpční vazba barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu účinkem Van der Waalsových sil a hydrofóbních interakcí. Výsledkem této reakce je modré zbarvení roztoku, jehož intenzita odpovídá koncentraci proteinů. Samotná koncentrace proteinů je spektrofotometricky stanovena při vlnové délce 595 nm.

**Kalibrační křivka**

1. Do mikrozkušavek jsem připravila triplikáty standardů s BSA pro kalibrační křivku dle Tab. 6.
2. Protřepala jsem je a nejdříve po 5 min změřila jejich absorbanci při 595 nm.
3. Dle Tab. 7. jsem v triplikátech napipetovala vzorky a následně změřila jejich absorbanci při 595 nm. Koncentraci proteinů jsem vyjádřila v  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

BSA [ $\mu\text{l}$ ]	H <sub>2</sub> O [ $\mu\text{l}$ ]	Bradford. činidlo [ $\mu\text{l}$ ]	koncentrace proteinů [ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]
0	800	200	0
1	799	200	1,45
2,5	797,5	200	3,26
5	795	200	7,25
7,5	792,5	200	10,88
10	790	200	14,5

**Tab. 6.** Složení standardů pro spektrofotometrické měření obsahu proteinů.

Vzorek [ $\mu\text{l}$ ]	H <sub>2</sub> O [ $\mu\text{l}$ ]	Bradford. činidlo [ $\mu\text{l}$ ]
5	795	200

**Tab. 7.** Složení vzorku pro měření obsahu proteinů.

## 7.8. Histochemická lokalizace ROS pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie

### Roztoky:

0,001% (w/v) karboxydichlorofluorescein diacetát (karboxy-DCFDA) v PBS

### PBS (pH =7,4)

0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,9% NaCl

Karboxy-DCFDA pronikne plasmatickou membránou a uvnitř buněk je pomocí specifických esteráz konvertován na nefluorescenční dichlorofluorescein (DCF), který téměř neprochází zpět a nefluoreskuje. Tato forma je oxidována buněčným H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spolu s dalšími peroxidy (Tarpey *et al.*, 2004). Fluorescenční produkt DCF (excitace při 488 nm, emise při 505-530 nm) a fluorescence chlorofylu (emise při 680-730 nm) je pozorovatelná pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu.

### Inkubace a barvení

1. Čerstvé vzorky dospělých plně vyvinutých tabákových listů o ploše cca 400 mm<sup>2</sup> byly přes noc inkubovány v roztocích o různé koncentraci MV (0 μM, 20 μM, 50 μM, 80 μM, 100 μM MV) nebo 3-AT (0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM 3-AT). Vzorky ošetřeny MV byly ráno navíc inkubovány 1 hod na světle 150 μmol PAR m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>. Všechny vzorky byly následně promyty dH<sub>2</sub>O a ihned nařezány žiletkou.
2. Ručně udělané příčné řezy tabákových listů byly inkubovány při 25°C ve tmě spolu s 0,001% karboxy-DCFDA v PBS po dobu 1 hod. Řezy pak byly dvakrát promyty v PBS a pozorovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (Zeiss LSM 5).

## 7.9. Statistika

Data jsem graficky a statisticky analyzovala v programu GraphPad Prism 6/ GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc. San Diego, USA). Hodnoty v grafech vyjadřují průměr ± směrodatnou odchylku (SD) z daného počtu nezávislých biologických měření (n). Pro zjištění trendů jsem provedla korelační analýzu a hledala lineární závislosti. Rozdíly průměrů mezi kontrolou a ošetřenými skupinami jsem zhodnotila pomocí one-way ANOVA analýzy. Při hladině významnosti P < 0,05 jsem použila Dunnett's test pro srovnání mezi ošetřenými a kontrolní skupinou. Pro zhodnocení signifikantních rozdílů mezi jednotlivými skupinami jsem použila Tukey's test (P < 0,05).



## 8. Výsledky

### 8.1. Poškození jaderné DNA

K analýze poškození jaderné DNA účinkem specifických herbicidů jsem použila kometový test, známý také pod zkratkou SCGE (single cell gel electrophoresis). Jedná se o metodu využívající elektroforézy a mikroskopie pro detekci oxidačního poškození DNA v jednotlivých buňkách. V tomto případě se jednalo o alkalickou verzi testu (A/A) – kdy rozvolňování poškozené DNA i následná elektroforéza probíhají v alkalickém (pH > 13) prostředí.

#### 8.1.1. Optimalizace kometového testu a výběr pokusné rostliny

Pro účely mé studie byl původně jako pokusná rostlina vybrán fazol (*Phaseolus vulgaris* L.), nicméně po zkušebních pokusech se ukázalo, že kometový test ve své alkalické verzi není u tohoto druhu pro detekci poškození DNA vhodný. Přípravná fáze na elektroforézu tzv. „unwinding time“, během které dochází k rozvolnění poškozené DNA, již při délce 5 min způsobovala rozpad jader a při pozorování pod fluorescenčním mikroskopem nebylo co hodnotit. Veškeré pokusy jsem následně prováděla na tabáku (*N. tabacum*, cv. Xanthi).

Výsledkem optimalizace jsme našli tyto podmínky pro úspěšný alkalický kometový test: ponechání vzorků v elektroforetickém pufru před elektroforézou pro rozvolnění poškozené DNA 10 min při 4° C, pH > 13; elektroforéza při 4° C, 26 V, 300 mA po dobu 25 min.

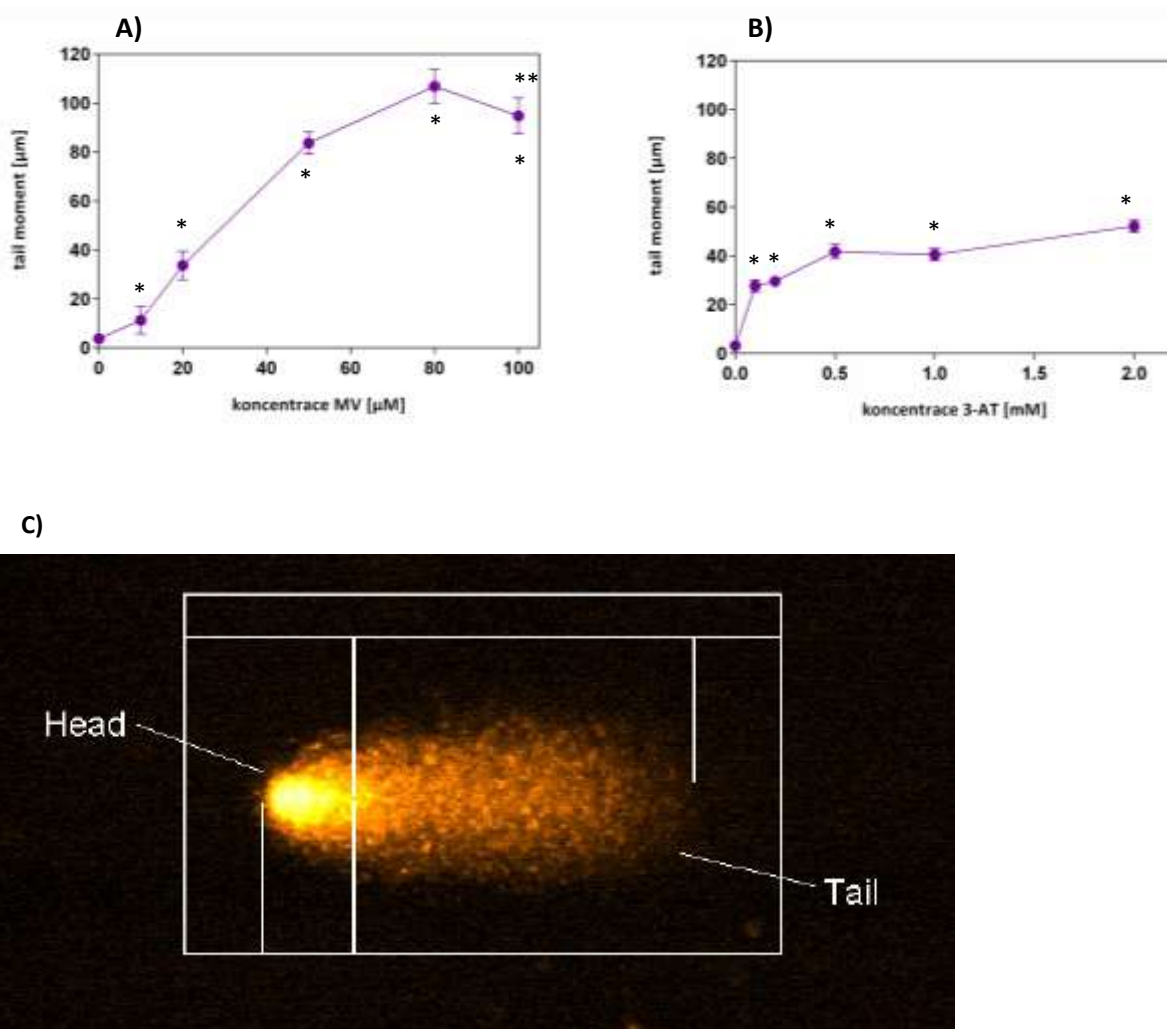
#### 8.1.2. Efekt herbicidu MV na jadernou DNA

Pro herbicid MV jsem na základě předběžných pokusů stanovila koncentrační řadu: 0; 10; 20; 50; 80 a 100 µM. Ošetření listových fragmentů těmito koncentracemi vedlo k detekovatelnému poškození DNA, jehož hodnota je znázorněna níže (Obr. 6A) Míra poškození je vyjádřena jako tail moment (TM) (= tail length (µm) x tail DNA (%) / 100 %) viz Obr. 6C. „Tail“ neboli ocas komety je výsledkem migrace zlomů DNA v agaróze na sklíčku během elektroforézy (Obr. 6, Obr. 7.).

TM spolu se zvyšující se koncentrací MV narůstal. Všechny hodnoty TM u stresovaných rostlin byly signifikantně vyšší oproti kontrole ( $3,78 \pm 1,88$  µm). Prezentované výsledky vykazují silnou pozitivní lineární závislost ( $r = 0,93$ ) mezi mírou oxidačního poškození jaderné DNA a koncentrací MV. Nejvyšší hodnotu TM ( $106,87 \pm 6,88$  µm) jsem naměřila po použití koncentrace 80 µM MV. Oproti tomu TM po aplikaci 100 µM ( $94,75 \pm 7,20$  µm) byl oproti zmíněné hodnotě u 80 µM signifikantně nižší.

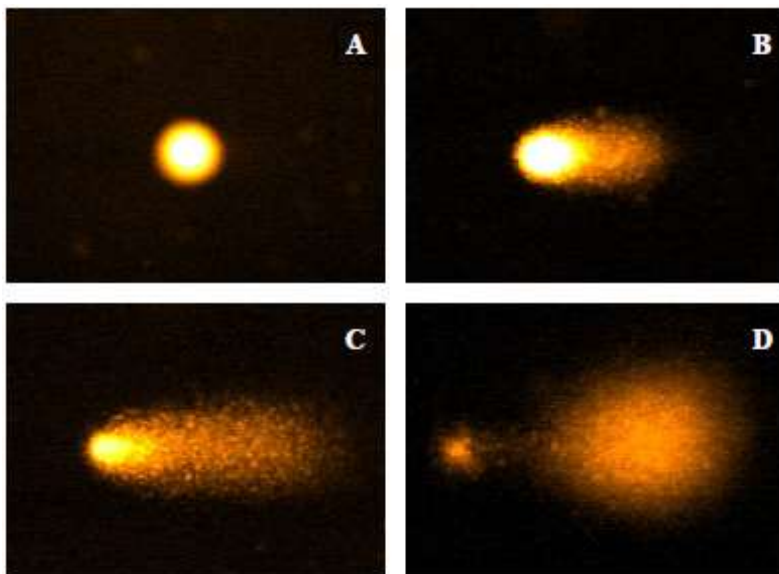
### 8.1.3. Efekt herbicidu 3-AT na jadernou DNA

Koncentrační řadu 3-AT pro další pokusy jsem opět na základě předběžných pokusů určila následovně: 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 mM. Hodnoty TM u všech stresovaných rostlin byly signifikantně vyšší oproti kontrole ( $3,23 \pm 0,45 \mu\text{m}$ ), znázorněno v Obr. 6B. Vzrůstající TM spolu s koncentrací 3-AT naznačuje pozitivní korelaci mezi mírou oxidačního poškození jaderné DNA a koncentrací 3-AT, kdy nejvyšší TM ( $53,20 \pm 2,59 \mu\text{m}$ ) jsem naměřila pro použitou koncentraci 2mM. Nicméně nejedná se o lineární závislost jako v případě MV. Celkové TM naměřené po ošetření 3-AT byly oproti těm získaným po aplikaci MV nižší. Nicméně použití vyšších koncentrací 5; 10; 20 mM 3-AT vedlo k formaci komet, které nebylo možno spolehlivě ohodnotit anebo přímo k degradaci jader. Efekt MV měl tedy v porovnání s 3-AT na buněčná jádra negativnější efekt a v řádově nižších koncentracích způsoboval vážnější poškození jaderné DNA.



**Obr. 6.** Poškození jaderné DNA vyjádřené jako TM.

Listové fragmenty ošetřeny koncentrační řadou **A)** MV; **B)** 3-AT. Data reprezentují průměry  $\pm$  SD z nezávislých biologických opakování;  $n=5$ . \* hodnota průkazně vyšší ( $P<0,05$ ) než kontrola. \*\* průkazně nižší ( $P<0,05$ ) než TM při ošetření 80  $\mu\text{M}$  MV. **C)** Kometa a její části „head“ hlava a „tail“ ocas. Foto: Gichner *et al.* Laboratoř mutační genetiky ÚEB AV ČR .



**Obr. 7.** Komety jader z tabákových listů dokumentující narůstající poškození DNA. **A)** Kontrola.  
Foto: Gichner *et al.* Laboratoř mutační genetiky, ÚEB AV ČR.

## 8.2. Peroxidace lipidů a stabilita membrán

K peroxidaci nenasycených MK dochází zejména účinkem volných kyslíkových radikálů, kdy se spouští řetězová reakce, autooxidace, ale i enzymatickou reakcí účinkem např. lipoxygenázy v rámci buněčných membrán. Jako jeden z druhotných stabilních produktů vzniká MDA, který se využívá jako marker oxidačního stresu.

### 8.2.1. Peroxidace lipidů po ošetření MV

Hodnoty MDA zprvu vykazovaly pozitivní trend spolu se zvyšující se koncentrací MV (Obr. 8A). Nejvyšší hladinu MDA,  $0,42 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ , jsem naměřila po aplikaci  $50 \mu\text{M}$  MV a jednalo se o jedinou hodnotu, která se signifikantně lišila od kontroly. Vyšší koncentrace MV nezpůsobily výraznější peroxidaci lipidů, naopak došlo k mírnému poklesu hladin MDA. Naměřené hodnoty se mezi sebou významně nelišily. Nicméně celkové změny obsahu MDA byly velice nízké a nelze dle nich usuzovat, že by v buňkách docházelo k oxidačnímu poškození lipidů.

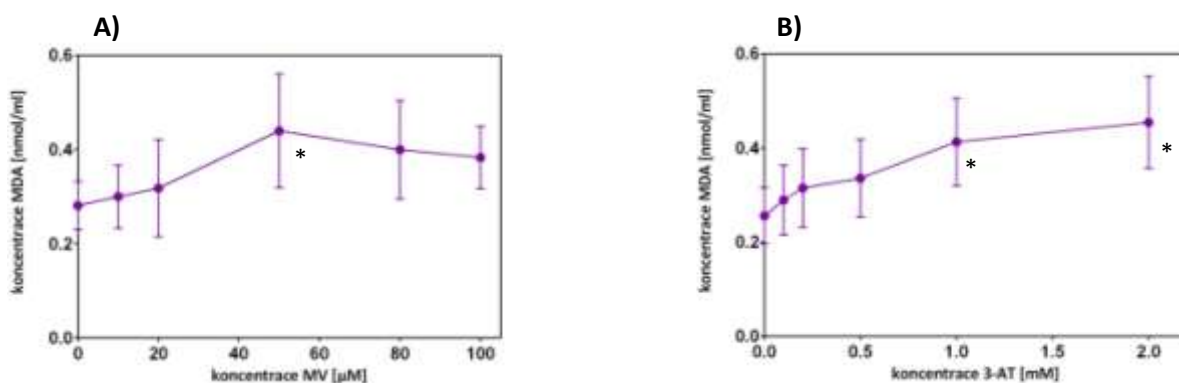
### 8.2.2. Peroxidace lipidů po ošetření 3-AT

Hladina MDA po ošetření 3-AT pozitivně korelovala se stoupající koncentrací 3-AT, kdy nejvyšší hladinu,  $0,45 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ , jsem detekovala v případě koncentrace  $2 \text{ mM}$  (Obr. 8B). U koncentrací  $1$  a  $2 \text{ mM}$  3-AT byly hladiny MDA signifikantně vyšší než kontrola. Jednotlivé hodnoty se od sebe významně nelišily a stejně jako v případě aplikace MV, ani v tomto případě z celkových hodnot nelze usoudit, že by v důsledku oxidačního stresu došlo k poškození lipidů.

### 8.2.3. Stabilita membrán

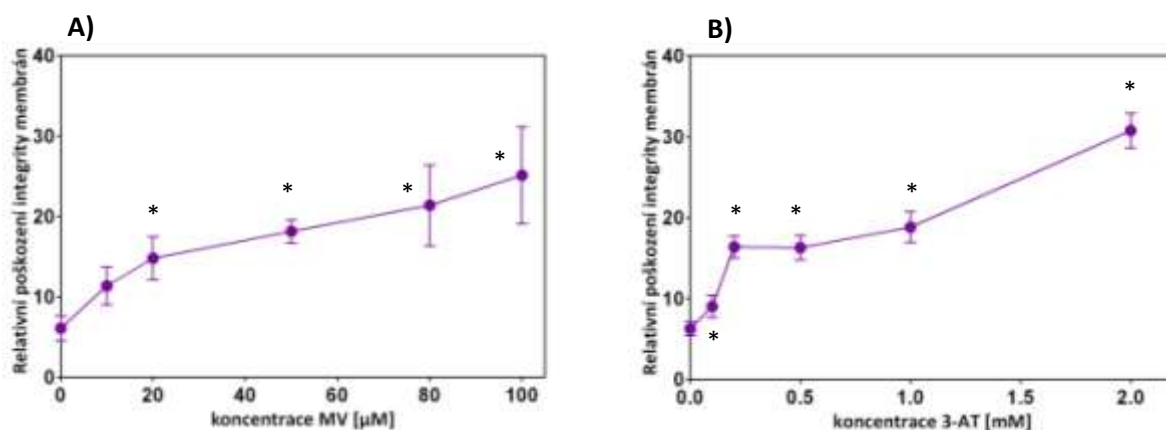
Oxidační poškození navozené herbicidy MV a 3-AT je dokumentováno na iontové propustnosti buněčných membrán (Obr. 9). Výsledky ukazují pozitivní lineární závislost míry poškození na zvyšujících se koncentracích ( $r = 0,86$ ; MV /  $r = 0,93$ ; 3-AT). Nejvyšší hladiny propustnosti pro ionty u 100  $\mu\text{M}$  MV a 2 mM 3-AT činily 25 % a 31 %, což bylo v obou případech signifikantně více než u příslušné kontroly. Hladina poškození u kontrolních vzorků (6 %; MV/3-AT) byla pravděpodobně způsobena samotnou manipulací při provádění pokusu.

Výsledné hodnoty poukazují na značné narušení buněčné rovnováhy, nicméně nelze specificky určit druh poškození. Zajímavé je, že neexistuje korelace mezi membránovým poškozením a peroxidací lipidů.



**Obr. 8.** Peroxidace lipidů vyjádřena hodnotou MDA.

Listové fragmenty ošetřeny koncentrační řadou **A)** MV; **B)** 3-AT. Data reprezentují průměry  $\pm$  SD z nezávislých biologických opakování;  $n=9$ . \* hodnota průkazně vyšší ( $P<0,05$ ) než kontrola.



**Obr. 9.** Relativní poškození buněčných membrán, určeno v %.

Listové fragmenty ošetřeny koncentrační řadou **A)** MV; **B)** 3-AT. Data reprezentují průměry  $\pm$  SD z nezávislých biologických opakování;  $n=5$ . Symbol \* značí hodnotu průkazně vyšší ( $P<0,05$ ) než kontrola.

### 8.3. Oxidační poškození proteinů

#### 8.3.1. MV

Aplikace MV vedla k oxidačním změnám proteinů vyjádřeným pomocí obsahu karbonylových skupin (C=O) ve vzorku (Obr. 10A). Výsledky neprokazují lineární závislost mezi mírou poškození a zvyšující se koncentrací. Jedná se spíše o závislost exponenciální, kdy nejvyšší hladina C=O při použití 100  $\mu\text{M}$  činila 3,3  $\mu\text{mol (C=O)} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteinu. Signifikantně vyšší hladiny karbonylovaných proteinů jsem naměřila až při aplikaci 20  $\mu\text{M}$ , zatímco nejnižší koncentrace nevedla k významnému oxidačnímu poškození.

#### 8.3.2. 3-AT

I v případě 3-AT z příslušného grafu (Obr. 10B) není vidět lineární závislost. Již nejnižší koncentrace 0,1 mM způsobila signifikantní nárůst karbonylace proteinů oproti kontrole, což ukazuje na silný účinek 3-AT. Nicméně při zvyšujících se koncentracích již oxidační poškození významně nenarůstalo. Nejvyšší hladinu C=O jsem naměřila po aplikaci 2 mM, a to 1,02  $\mu\text{mol (C=O)} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteinu, což je hodnota řádově 3,5 x nižší oproti maximu po aplikaci MV. Z výsledků lze usuzovat, že proteiny byly celkově oxidačně více poškozeny MV.

### 8.4. Antioxidační systém – CAT, APX

#### 8.4.1. CAT a MV

Aplikace MV vedla k modifikaci fungování antioxidačního systému. I když tento herbicid působí primárně produkci  $\text{O}_2^-$  v chloroplastech (Babbs *et al.*, 1989), jednotlivé ROS jsou spolu úzce propojeny a dochází k jejich rychlé vzájemné přeměně. Aktivita CAT nevykazovala žádnou průkaznou lineární závislost na koncentraci MV (Obr. 11A). I když je možno pozorovat určitý snižující se trend při aplikaci vyšších koncentrací MV a aktivita CAT byla pro 100  $\mu\text{M}$  MV signifikantně nižší než u kontroly. V rámci celé koncentrační řady došlo k dvojnásobnému snížení aktivity CAT.

#### 8.4.2. CAT a její inhibice 3-AT

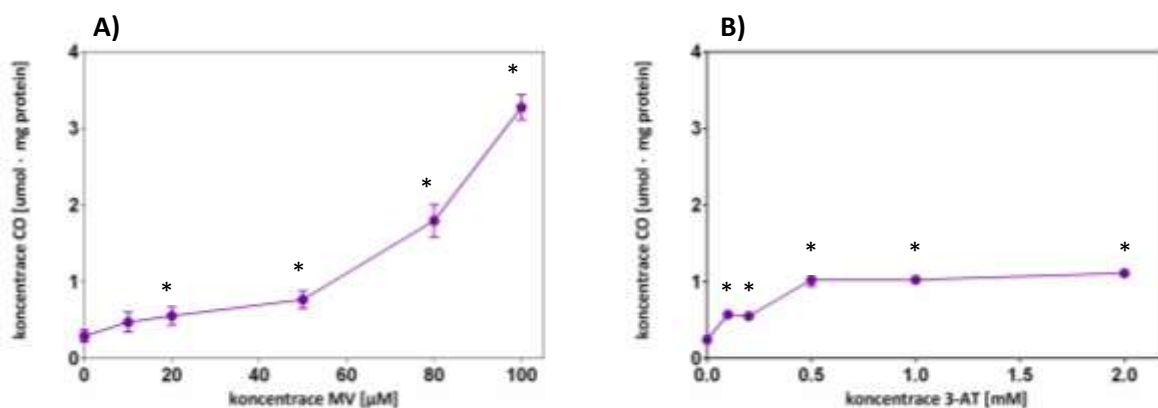
Aktivita CAT byla aplikací 3-AT výrazně negativně ovlivněna (Obr. 11B), kdy již použití nejnižší koncentrace 0,1 mM vedlo k významnému poklesu schopnosti CAT likvidovat  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Výsledky naznačují exponenciální závislost mezi snižující se aktivitou CAT a narůstající koncentrací 3-AT. Použití 3-AT tedy vedlo k signifikantní inhibici CAT, kdy v rámci koncentrační řady došlo řádově k poklesu 9,5x. Její schopnost konvertovat  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $\text{H}_2\text{O}$  byla při maximu 3-AT řádově 3x nižší než po aplikaci 100  $\mu\text{M}$  MV.

#### 8.4.3. APX a její ovlivnění MV

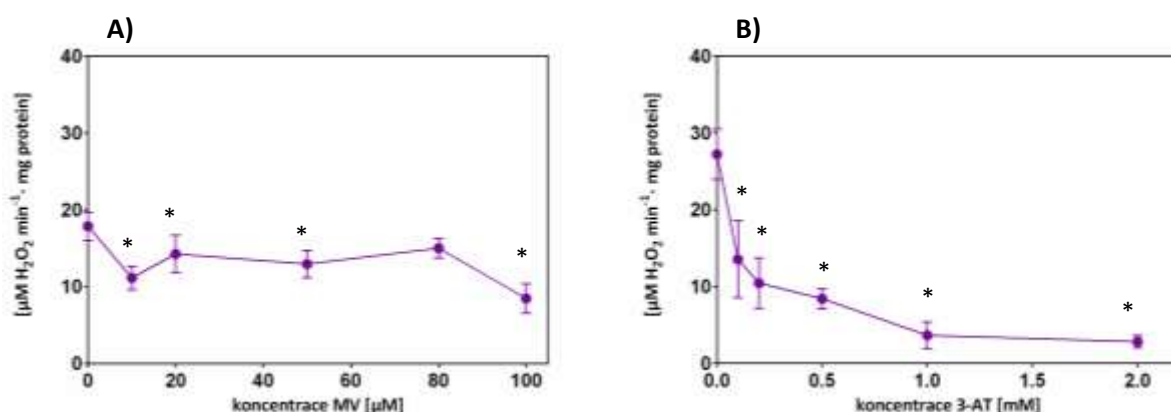
Odpověď APX na MV se zpočátku podobala průběhu u CAT (Obr. 11), kdy nejnižší použitá koncentrace, 10  $\mu\text{M}$ , vedla k signifikantnímu poklesu její aktivity oproti kontrole (Obr. 12A). Oproti tomu 20  $\mu\text{M}$  vedlo k obnovení její aktivity téměř na hodnotu u kontroly. Vyšší koncentrace vedly opět ke změnám, které se signifikantně lišily od kontrolní skupiny. Lze vypožorovat jistý negativní trend závislosti aktivity APX na zvyšující se koncentraci MV. Nicméně její činnost nevykazovala v rámci koncentrační řady lineární závislost. Její maximální aktivitu jsem naměřila u kontrolní skupiny a aplikace 100  $\mu\text{M}$  způsobila řádově 1,5x pokles aktivity.

#### 8.4.4. APX a 3-AT

Účinky 3-AT na aktivitu APX byly oproti MV částečně odlišné (Obr. 12B). V rámci koncentrační řady není viditelná žádná lineární závislost ani jednoznačný trend modulace aktivity. Nicméně nízké koncentrace 3-AT vedly k tvorbě maxima, kdy po aplikaci 0,1 mM došlo k signifikantnímu nárůstu aktivity na její nejvyšší hodnotu a ošetření 0,2 mM znamenalo její pokles na hodnotu téměř kontrolní. Minimální aktivitu jsem naměřila u 0,5 mM a celkový pokles byl řádově 2,5x. U vyšších použitých koncentrací je pozorovatelný opětovný nárůst aktivity APX.

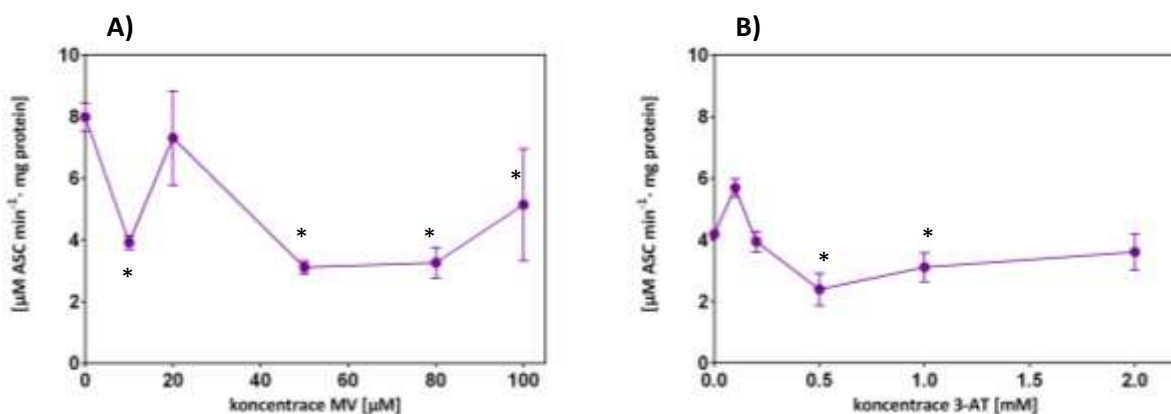


**Obr. 10.** Oxidační poškození proteinů vyjádřeno obsahem karbonylových skupin (C=O). Listové fragmenty ošetřeny koncentrační řadou **A)** MV; **B)** 3-AT. Data reprezentují průměry  $\pm$  SD z nezávislých biologických opakování; n=6. Symbol \* značí hodnotu průkazně vyšší ( $P < 0,05$ ) než kontrola.



**Obr. 11.** Aktivita CAT

Listové fragmenty ošetřeny koncentrační řadou **A)** MV; **B)** 3-AT. Data reprezentují průměry  $\pm$  SD z nezávislých biologických opakování;  $n=5$ . Symbol \* značí hodnotu průkazně nižší ( $P<0,05$ ) než kontrola.



**Obr. 12.** Aktivita APX

Listové fragmenty ošetřeny koncentrační řadou **A)** MV; **B)** 3-AT. Data reprezentují průměry  $\pm$  SD z nezávislých biologických opakování;  $n=3$ . Symbol \* značí hodnotu průkazně nižší ( $P<0,05$ ) než kontrola.

## 8.5. Fluorescenční vizualizace ROS

Konfokální laserovou skenovací mikroskopií jsem využila k tomu, abych v tabákových buňkách vizualizovala vznikající ROS v důsledku inkubace s herbicidy. Původní předpoklad byl, že karboxy-DCFDA je dostatečně specifickým fluorescenčním barvivem pro  $\text{H}_2\text{O}_2$  a bude možné sledovat určitou závislost jeho produkce na použitých koncentracích herbicidů. Dalším předpokladem bylo, že bude možné odlišit specifická místa vzniku  $\text{H}_2\text{O}_2$ . V případě MV chloroplasty, u 3-AT peroxizómy, popř. cytoplazma.

Obrazová dokumentace z konfokálního mikroskopu - Mgr. Renata Schnablová, Ph.D, ÚEB AV ČR (nepublikované výsledky).

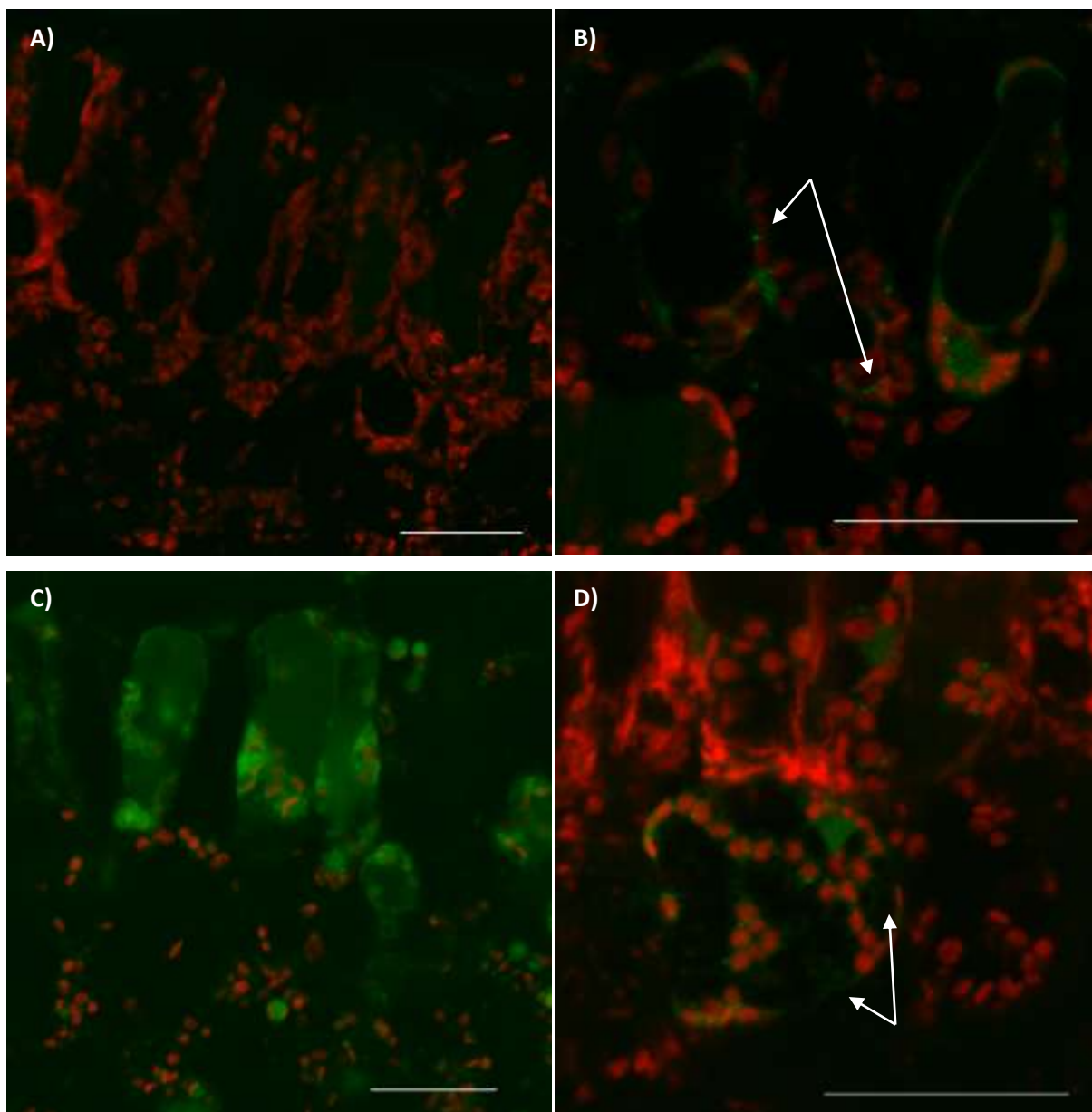
### 8.5.1. MV a ROS

Listové fragmenty inkubované po dobu 16 hod pouze v dH<sub>2</sub>O a následně 1 hod na světle posloužily jako kontrola k fragmentům inkubovaným v roztocích MV. Příčné řezy získané z listů inkubovaných v dH<sub>2</sub>O a během barvení inkubované pouze v PBS a ne ve fluorescenční barvě karboxy-DCFDA posloužily jako kontrola proti samotné fluorescenční barvě (Obr. 13A). Snímky příčných řezů zobrazují nejčastěji vrstvy buněk palisádového parenchymu. V některých případech je viditelná i vrstva parenchymu houbového. Z obrázku (Obr. 13A) je vidět, že samotná autofluorescence tabákového listu významně nezasahovala do emisního spektra DCF a u této kontroly barvení tak není viditelné zelené pozadí.

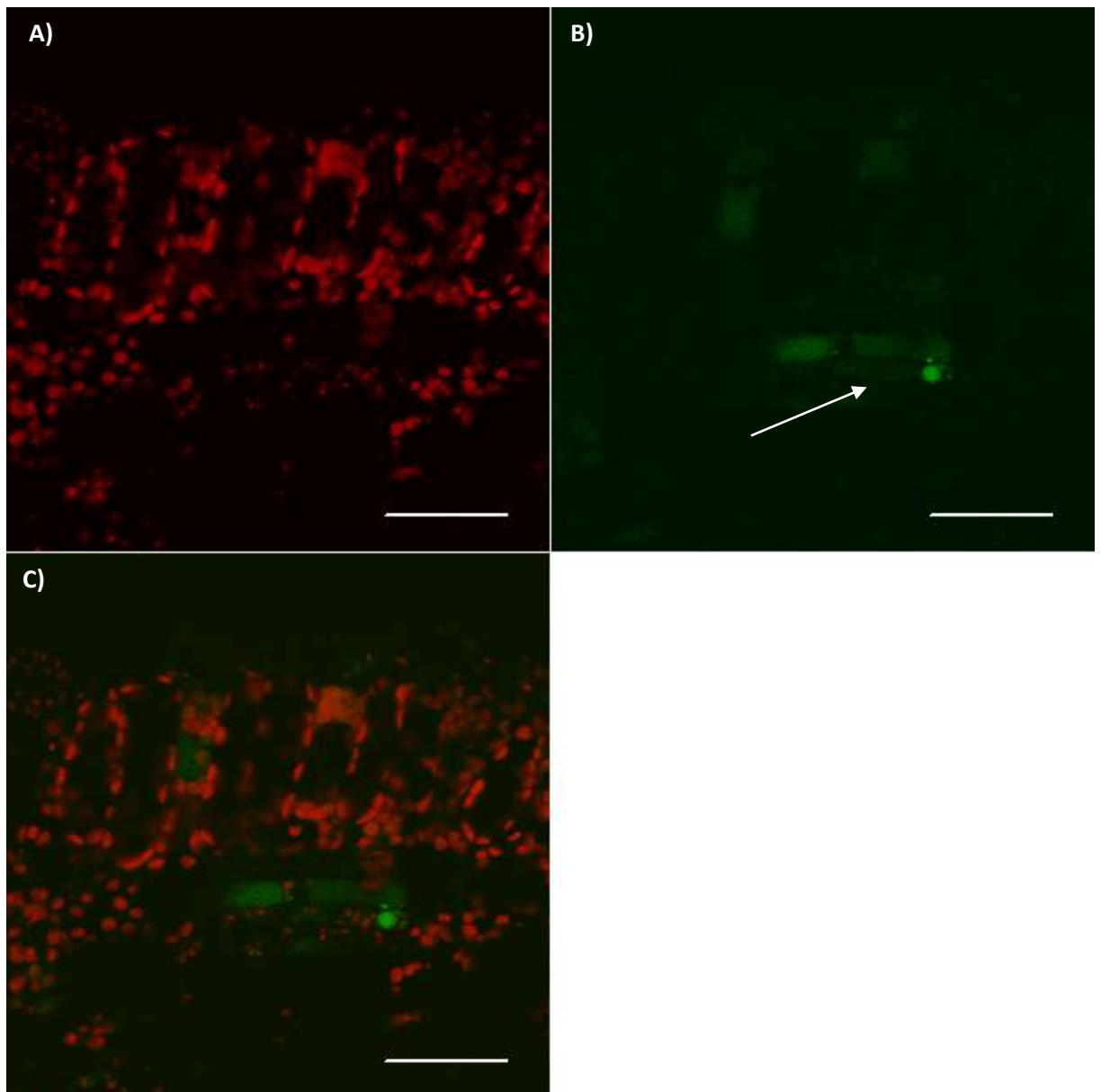
Na detailu tabákových buněk po ošetření 50 μM MV (Obr. 13B) je zelený signál přednostně lokalizován do nástěnné cytoplazmy a nejspíše peroxizómů (malé, jasně ohraničené kulovité útvary – viz šipky). Nejlépe patrná specifická produkce ROS je viditelná u buněk palisádového parenchymu ošetřených 80 μM MV, kde můžeme pozorovat výrazné zelené zbarvení odpovídající navýšené koncentraci ROS v samotných chloroplastech či jejich bezprostřední blízkosti (Obr. 13C). Výrazný zelený signál, poukazující na vyšší obsah ROS, je možno vidět i v buněčných stěnách. U buněk ošetřených nejvyšší koncentrací, 100 μM MV, je zelený signál kolokalizován s chloroplasty (viz šipky) spolu s jejich nejbližším okolím a částečně s peroxizómy (Obr. 13D).

Fluorescenční obraz kontrolních tabákových listů ukazuje, že nedošlo k žádné specifické produkci ROS (Obr. 14B). Slabý zelený signál naznačující jistou míru akumulace ROS byl pravděpodobně způsoben manipulací se vzorkem. Šipka ukazuje na xylémovou cévu, která je dobře viditelná a zelený signál je spojen s procesem lignifikace, při kterém se uplatňuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i další látky vystupující jako oxidanty (Obr. 14B). Nejvyšší koncentrace 100 μM MV vedla produkcí ROS k silnému oxidačnímu stresu (Obr. 15C). Zelený signál je lokalizován výlučně do prostoru cytoplazmy a v buňkách palisádového parenchymu jsou jasně viditelné vakuoly bez jakéhokoli signálu (Obr. 15B). V tomto případě nedošlo ke kolokalizaci signálu s žádnou buněčnou organelou jako peroxizómy či chloroplasty. Snímek vypovídá o celkové změně redoxního stavu buněk, kdy je vidět, že ošetření MV vedlo k detekovatelnému oxidačnímu stresu v porovnání s kontrolou (Obr. 14). Pro porovnání, příčné řezy na Obr. 15 a Obr. 13D pocházely ze stejného listového fragmentu. Můžeme vidět velký rozdíl v zelené fluorescenci i při ošetření stejnou koncentrací MV. Nekonkrétní lokalizace do určité organely, slabší zelený signál u některých řezů či velké rozdíly mezi zelenou fluorescencí u řezů ošetřených stejnou koncentrací herbicidu mohl být způsoben rychlou difuzí ROS v rámci buňky, např. u MV z chloroplastu do cytoplazmy.

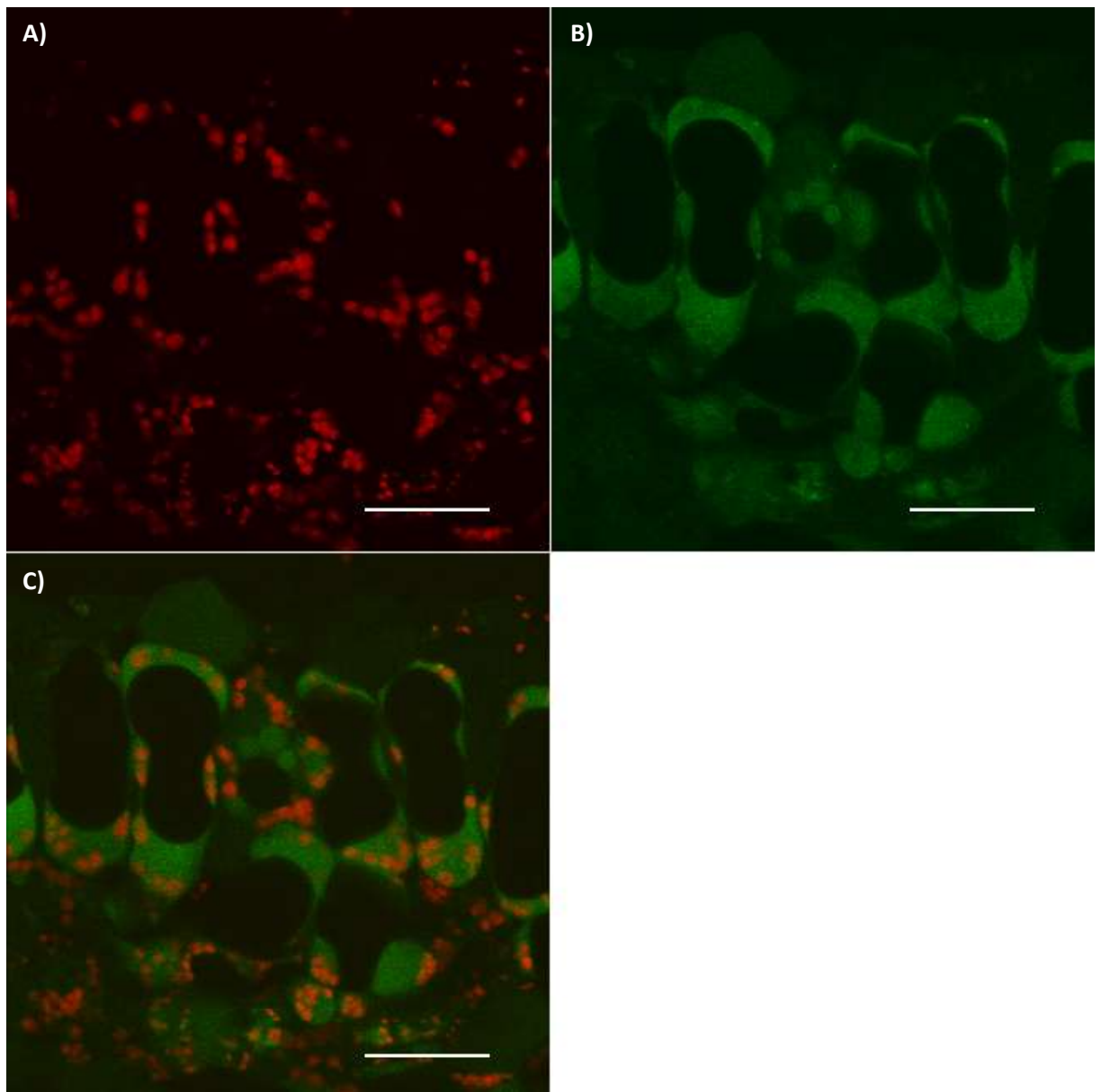




**Obr. 13.** Snímky příčných řezů (zejména palisádového parenchymu) listů tabáku, *N. tabacum* cv. Xanthi. Listové fragmenty byly inkubovány po dobu 16 hod v roztocích MV o koncentraci **A)** 0  $\mu\text{M}$ . **B)** 50  $\mu\text{M}$ . **C)** 80  $\mu\text{M}$ . **D)** 100  $\mu\text{M}$ . Následovala inkubace na světle (1 hod při 150  $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Vybrané příčné řezy byly ošetřeny 0,001% karboxy-DCFDA, ponechány 1 hod ve tmě a následně promyty v PBS, nebo ponechány po celou dobu pouze v PBS (**A**). Červená autofluorescence chlorofylů v chloroplastech, zelená znázorňuje ROS vznikající v buňkách. Bílé šipky ukazují peroxizómy. Měřítka odpovídá vzdálenosti 50  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 14.** Příčné řezy listy tabáku *N. tabacum* cv. Xanthi. Listové fragmenty byly inkubovány po dobu 16 hod v dH<sub>2</sub>O, sloužící jako kontrola. Následovala inkubace na světle (1 hod při 150 μmol PAR m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>). Příčný řez ošetřen 0,001% karboxy-DCFDA a ponechán 1 hod ve tmě, následně promyt v PBS. **A)** Červená odpovídá autofluorescenci chlorofylů v chloroplastech. **B)** Zelená specificky barví vznikající ROS. **C)** Spojení jednotlivých barevných kanálů konfokálního mikroskopu. Měřítka odpovídá vzdálenosti 50 μm.

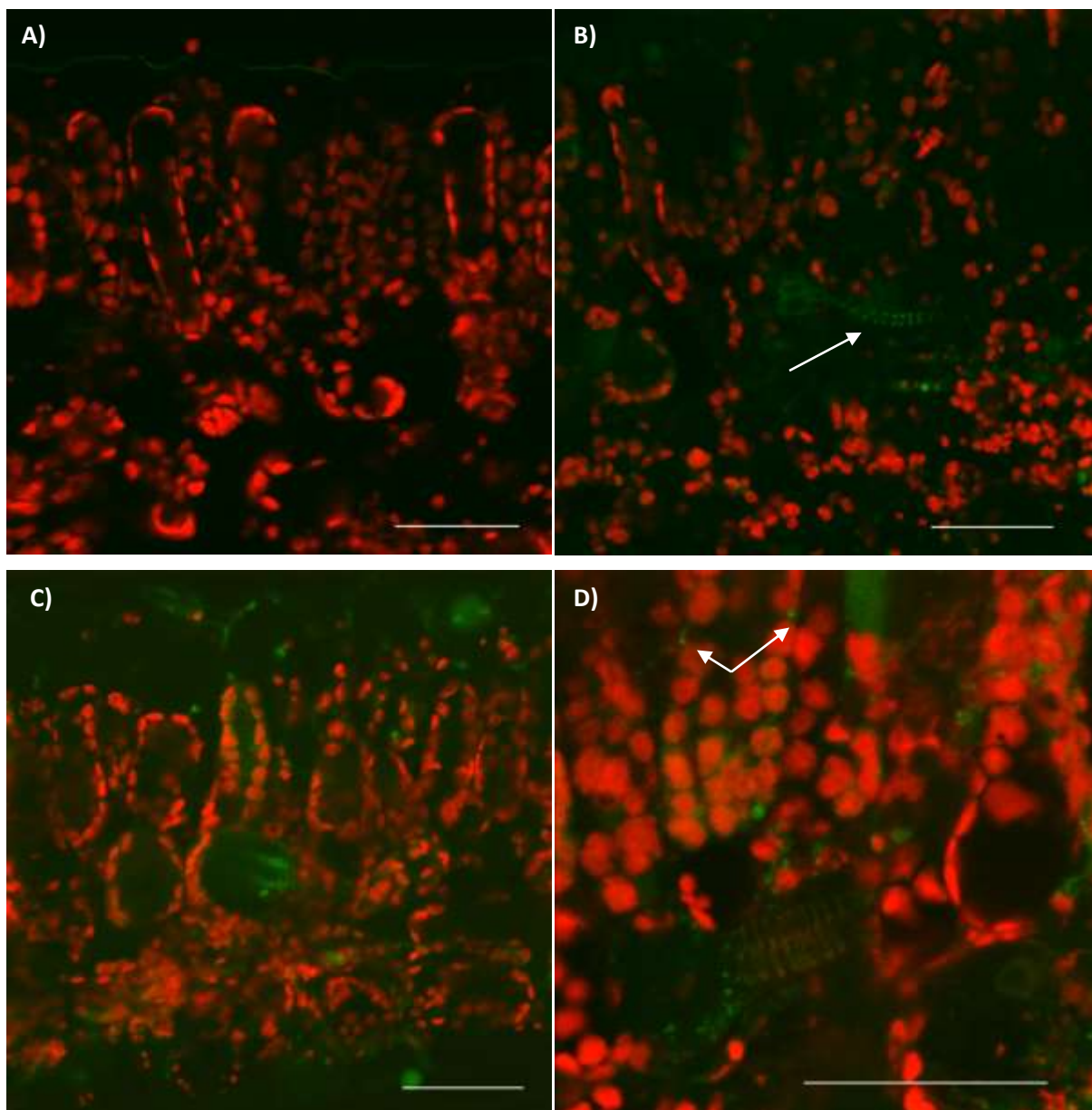


**Obr. 15.** Příčné řezy listy tabáku *N. tabacum* cv. Xanthi. Listové fragmenty inkubovány po dobu 16 hod v roztoku MV o koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Následovala inkubace na světle (1 hod při 150  $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Příčný řez ošetřen 0,001% karboxy-DCFDA a ponechán 1 hod ve tmě, následně promyt v PBS. **A)** Červená odpovídá autofluorescenci chlorofylů v chloroplastech. **B)** Zelená specificky barví vznikající ROS. **C)** Spojení jednotlivých barevných kanálů konfokálního mikroskopu. Měřítka odpovídá velikosti 50  $\mu\text{m}$ .

### 8.5.2. 3-AT a oxidační stres

Snímky příčných řezů listem tabáku zobrazují vrstvy palisádového a houbového parenchymu s typicky červenými chloroplasty, což je způsobeno jejich autofluorescencí (Obr. 16A, B, C). Příčné řezy z fragmentů inkubovaných v dH<sub>2</sub>O a obarvených karboxy-DCFDA posloužily jako kontrola oproti barveným řezům z listů inkubovaných v roztocích 3-AT. Na kontrolním snímku nelze v buňkách vidět zelený signál, což potvrzuje, že nedošlo k signifikantní produkci ROS. Nicméně signál je pozorovatelný ve vnějších stěnách svrchních pokožkových buněk (Obr. 16A). V případě buněk ošetřených 0,5 mM lze pozorovat určitou zvýšenou hladinu zeleného signálu, tudíž již tato koncentrace vedla k produkci ROS, i když je těžké určit konkrétní lokalizaci. Šipka poukazuje na xylémovou cévu, kde zelené zbarvení odpovídá lignifikovaným částem buněčné stěny (Obr. 16B).

Koncentrace 1 mM 3-AT vedla rovněž k indukci oxidačního stresu, jelikož je na snímku viditelný jasný signál (Obr. 16C). Ani u tohoto řezu ale nejde s jistotou říci, kde konkrétně k produkci ROS došlo. Na detailu buněk palisádového parenchymu ošetřených 2 mM 3-AT již můžeme vidět peroxizómy, které byly pravděpodobně zdrojem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a na snímku jim odpovídá silný zelený signál, viz šipky (Obr. 16D). 3-AT vedl v buňkách k oxidačnímu stresu a ROS, které jej způsobily, byly pomocí fluorescenčního mikroskopu detekovatelné. Se zvyšující se koncentrací 3-AT došlo k určitému zesílení zeleného signálu DCF, ale především k jeho konkrétnější lokalizaci, kdy u buněk ošetřených 2 mM už jsou pozorovatelné jednotlivé peroxizómy (Obr. 16D).



**Obr. 16.** Snímky příčných řezů listů tabáku, *N. tabacum* cv. Xanthi, zobrazující palisádový i houbový parenchym. Listové fragmenty byly inkubovány po dobu 16 hod v roztocích 3-AT o různé koncentraci. **A)** 0 mM. **B)** 0,5 mM. **C)** 1 mM. **D)** 2 mM. Vybrané příčné řezy byly ošetřeny 0,001% karboxy-DCFDA, ponechány 1 hod ve tmě a následně promyty v PBS, nebo ponechány pouze v PBS (**A**). Červená odpovídá autofluorescenci chlorofylů v chloroplastech, zelená znázorňuje vzniklé ROS. Měřítka odpovídá vzdálenosti 50  $\mu$ m.

## 9. Diskuze

### 9.1. Poškození jaderné DNA

#### 9.1.1. Kometový test

Pro monitorování oxidačních změn v jaderné DNA po aplikaci herbicidů jsem využila kometový test, neboli SCGE. Jedná se o jednoduchou a rychlou molekulárně biologickou metodu, která byla poprvé použita k detekci poškození DNA způsobeného ionizačním zářením u savčích buněk (Ostling & Johanson, 1984). Tato metoda je schopna detekce ss (jednořetězcových) a ds (dvouřetězcových) zlomů, specifického oxidačního poškození bází, spojení mezi různými místy řetězce DNA nebo mezi místy DNA a proteiny pomocí elektroforézy. Ve své alkalické verzi je navíc schopna odhalit apurinní a apyrimidinní místa spolu s alkalicky labilními. Buněčná jádra jsou umístěna do tenké vrstvy agarózy na mikroskopickém sklíčku a ponechána k rozvinutí jejich DNA ve vhodném pufru. Během elektroforézy dochází v slabém elektrickém poli k migraci „polámané“ negativně nabitě DNA směrem k anodě, migrační vzdálenost je nepřímo úměrná velikosti úlomkům DNA. Po elektroforéze následuje barvení fluorescenční barvou pro DNA, v mém případě EtBr, a vizualizace pod fluorescenčním mikroskopem. Migrující DNA vytváří v agaróze na sklíčku tvar komety a dle délky jejího ocasu a množství DNA v něm lze kvantifikovat míru poškození, zatímco hlavová část je tvořena samotným buněčným jádrem, detailně Liao *et al.*, (2009).

Nejprve jsem svou studii chtěla provádět na fazolu (*P. vulgaris* L.) kde jako zdroj materiálu měly sloužit listy z několika týdnů starých rostlin. Práce Khan *et al.* (2002) popisuje detekci DNA poškození u různých druhů fazolu po účinku ionizujícího záření. Nicméně pro mé pokusy se alkalická verze kometového testu ukázala být nevhodnou. Silně alkalické prostředí elektroforetického pufru, ve kterém jsou jádra před samotnou elektroforézou ponechána, aby se mohla rozvolnit poškozená DNA, způsobilo úplnou degradaci celých jader i při trvání pouhých 5 min. Po kontrolním barvení jader ještě bez proběhnuté elektroforézy následně pod fluorescenčním mikroskopem nebylo co hodnotit. Proto jsem veškeré pokusy prováděla na rostlinách tabáku (*N. tabacum*, cv. Xanthi), kterou jsem zvolila na základě dřívějších studií provedených v naší laboratoři (Gichner *et al.*, 2008b). Jako výhodu těchto mutantů jsme spatřovali snížení obsahu chlorofylu, který tak méně interferoval při některých pokusech, např. pozorování pod fluorescenčním mikroskopem.

Kometový test v alkalickém provedení byl mimo typicky pokusné rostliny použit i u důležitých agronomických druhů, mj. cukrová řepa nebo vojtěška (Gichner *et al.*, 2004b). Využívá se k detekci poškození DNA v různých rostlinných orgánech, nejčastěji kořenech a listech a často se v pracích popisuje rozdíl mezi těmito orgány (Gichner *et al.*, 2004a). Oxidační změny DNA byly v minulosti zkoumány především v souvislosti s účinky těžkých kovů, např. Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> (Gichner *et al.*, 2004a,

2008b), ionizujícího záření nebo ve spojitosti s mutacemi způsobenými alkylačními činidly jako EMS (ethylmethansulfonát) (Gichner *et al.*, 2008a). Podmínky izolace jader i následné elektroforézy je nutno přizpůsobit konkrétnímu pokusnému systému, nicméně pro svou práci jsem vycházela ze studie Gichner & Plewa, (1998). Mnou optimalizovaná verze alkalického kometového testu zahrnovala elektroforézu při 26 V, 300 mA po dobu 25 min, které předcházelo 10 min „unwinding time“ – čas nutný pro rozvinutí.

### 9.1.2. Oxidační změny DNA a herbicidy

Pro vyjádření oxidačních změn v jaderné DNA jsem použila parametr TM, který je považován za optimální kritérium zhodnocující poškození DNA v jádře a zohledňuje jednak délku ocasu i množství DNA v něm. Přizpůsobení podmínek kometového testu pro jednotlivé pokusné systémy je nutné zejména pro určení hladiny minimálního TM u kontrol. Ve své práci se mi podařilo detekovat a kvantifikovat poškození DNA způsobené oxidačním stresem po aplikaci herbicidů MV a 3-AT. Chemická podstata účinku těchto látek je známa a jsou nejen v rostlinné biologii využívány ke studiu oxidačního poškození buněk specifickou produkcí ROS. Nicméně každý z nich působí v různých řádech koncentrací, jejich činností dochází primárně k nadměrnému vzniku odlišných ROS, a proto se může lišit jejich negativní oxidační účinek na jednotlivé buněčné komponenty. Určení jejich vlivu na DNA bylo prvním krokem k tomu, abych mohla posoudit i jejich účinek na lipidy, proteiny a zhodnotit případný zásah do fungování antioxidačního systému.

Hodnoty TM po aplikaci MV lineárně stoupaly spolu se zvyšující se koncentrací až do hodnoty 80  $\mu\text{M}$ , kdy dosáhly maxima v hodnotě  $106,87 \pm 6,88 \mu\text{m}$ . Oproti tomu koncentrace 100  $\mu\text{M}$  způsobila výrazný pokles TM. K obdobným výsledkům se došlo i v jiných studiích, kdy nejvyšší míra aplikovaného stresoru, př.  $\text{Pb}^{2+}$ , způsobovala výrazný pokles TM. Tento jev se vysvětluje tvorbou křížových vazeb (cross-links) mezi DNA-DNA či DNA-proteiny v důsledku poškození, které brání migraci DNA zlomů při elektroforéze (Gichner *et al.*, 2008b).

V případě 3-AT byl charakter odpovědi odlišný. Nižší použité koncentrace (0,1; 0,2 mM) vedly k výraznému nárůstu TM, ale tento trend se zvyšující se koncentrací 3-AT lineárně nepokračoval. Při aplikaci vyšších koncentrací (5; 10; 20 mM – data neprezentována) se ve vzorcích objevovalo velké množství komet s kompletně dezintegrovanou hlavovou částí, označovaných jako „hedgehog“, které značí vyšší míru poškození, ale zároveň je není možné spolehlivě kvantitativně ohodnotit. Mancini *et al.*, (2006) ve své studii na transgenních rostlinách tabáku, (*N. tabacum*) s modifikovanou expresí CAT a SOD, sledovali míru DNA migrace a procentuální zastoupení „hedgehog“ komet jako možného ukazatele toxicity  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nicméně tento typ komet nelze automaticky spojovat s apoptotickými buňkami a představují pouze další úroveň změn v rámci DNA (Lorenzo *et al.*, 2013). Omezený nárůst TM u koncentrací 0,5; 1; 2 mM 3-AT může naznačovat, že během inkubace došlo k částečné opravě.

Oxidační změny DNA u rostlin bramboru způsobené ionizačním zářením se po 24 hod intervalu bez ozáření výrazně snížily. Nicméně v případě použití alkylačního činidla EMS bylo naměřené poškození DNA naopak ještě vyšší. Důvodem ale nejspíše bude jiný chemický princip působení EMS a ionizujícího záření, kdy škody na vláknech DNA způsobené vysokoenergetickým zářením budou opravovány efektivněji (Gichner *et al.*, 2008a). V mém případě nejspíše nepůjde o případ opravy DNA vzhledem k relativně krátkému trvání inkubace (8 hod). Celkově i u 3-AT bylo možno sledovat pozitivní vztah míry poškození DNA na jeho použité koncentraci. Maximální TM v případě 2 mM 3-AT činil  $53,20 \pm 2,59 \mu\text{m}$ , což je hodnota poloviční oproti maximu po aplikaci 80  $\mu\text{M}$  MV.

Oba herbicidy vyvolaly akumulaci ROS a tím oxidační stres na jadernou DNA a to silně negativně. Aplikace MV vedla k dvojnásobnému poškození DNA oproti 3-AT, i když působil v řádově nižších koncentracích. Z porovnání absolutních hodnot TM lze usuzovat, že MV a jím způsobená nadprodukce  $\text{O}_2^-$  způsobil vážnější oxidační poškození, což se projevilo rozsáhlejší migrací DNA a vznikem výraznějších komet.

## 9.2. Peroxidace lipidů a stabilita membrán

Hladina peroxidace lipidů je velmi často užívaným parametrem ve spojení s oxidačním stresem. ROS reagují se všemi základními buněčnými komponentami a ovlivňují i lipidy. MDA je sekundárním produktem peroxidace nenasycených MK v rámci lipidických molekul (Hodges *et al.*, 1999) a používá se jako marker oxidačního poškození. Ve své studii jsem sledovala jeho měnící se hladinu v závislosti na koncentraci obou aplikovaných herbicidů.

Navýšení peroxidace lipidů jako spolehlivého indikátoru oxidačního stresu bylo dokumentováno u mnoha druhů za různých stresových podmínek. Při chladovém stresu u rostlin rajčete (Işeri *et al.*, 2013), po vystavení těžkým kovům (Lin *et al.*, 2007) při zasolení u mangrovového druhu *Kandelia candel* nebo kukuřice (de Azevedo Neto *et al.*, 2006; Jing *et al.*, 2015). V souvislosti s membránami bylo dokumentováno, že se ROS, konkrétně  $\text{O}_2^-$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  generované aplikací MV, podílejí na transportu proteinů spojených se stresem z chloroplastů do jádra a účastní se tak stresové signalizace (Kwon *et al.*, 2013).

V mé práci jsem výrazný nárůst peroxidace lipidů nepozorovala, a to po aplikaci zejména MV. Přesto poškození membrán pozitivně korelovalo se stoupajícími koncentracemi obou herbicidů. Pro 3-AT rostla hodnota obsahu TBARS přímo úměrně s jeho koncentrací. Maximální hodnota obsahu TBARS byla pro oba herbicidy stejná. U MV však nebyla dosažena při maximální použité koncentraci herbicidu, ale v polovině koncentrační řady (50  $\mu\text{M}$ ) a poté se opět snížila. Můžeme předpokládat, že takováto koncentrace MDA potom iniciuje další reakce této reaktivní molekuly, např.



s aminoskupinami za vzniku vazeb a zesíťování molekul. Tím už vyšší obsah MDA nereaguje s TBA za vzniku TBARS (Nair *et al.*, 1986) Obsah karbonylovaných proteinů, obzvláště po ošetření MV, či změna aktivit vybraných antioxidantních enzymů vypovídá o herbicidy indukovaném oxidačním stresu. Lipidy zřejmě nemusí být tak citlivé jako jádra nebo proteiny. Mohly by být např. chráněny lipofilními antioxidanty, zejména tokoferoly a karoteny. MDA navíc není úplně specifickým ukazatelem peroxidace lipidů. V mé studii se peroxidace lipidů ukázala jako neprůkazný marker oxidačního stresu, což platilo pro oba herbicidy.

### 9.3. Oxidační poškození proteinů

Další buněčnou komponentou, která může být při oxidačním stresu navozeném nadprodukcí ROS poškozena, jsou proteiny. Může se jednat o enzymy i proteiny strukturní a oxidační modifikace mohou vést ke změně jejich struktury, funkce či aktivity. V nodulech sóji (*Glycine max* L.) vytvořených po inokulaci bakterií *Bradyrhizobium japonicum* byla sledována aktivita enzymů pro asimilaci dusíku GS/GOGAT (glutaminsyntetáza/glutamátsyntáza) po ošetření  $\text{Cd}^{2+}$  spolu s jejich oxidačními modifikacemi. Přidáním  $200 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  na dobu 48 h do živného roztoku došlo ke snížení aktivity GS a GOGAT o 17 %, respektive 52 % oproti kontrole, což korespondovalo také s výrazným nárůstem oxidovaných proteinů o 34 % (Balestrasse *et al.*, 2006). Při dlouhodobém skladování semen buku (*Fagus sylvatica* L.) narůstající hladina karbonylovaných proteinů významně přispívá k jejich snížené klíčivosti (Kalemba & Pukacka, 2013). Ve své studii jsem sledovala celkovou hladinu oxidovaných proteinů jakožto jednoho z ukazatelů oxidačního poškození a to pomocí spektrofotometrické detekce obsahu karbonylovaných skupin.

V případě ošetření MV došlo k nárůstu karbonylace proteinů, která byla jasně závislá na jeho zvyšující se koncentraci. MV tedy způsobil dostatečně silný oxidační stres, který měl na proteiny negativní účinek, i když nejnižší koncentrace,  $10 \mu\text{M}$ , ještě nevedla k významné karbonylaci. Maximální hodnota po aplikaci  $100 \mu\text{M}$  činila  $3,3 \mu\text{mol CO} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteinu a jedná se o hladinu řádově 3x vyšší než maximum po užití 3-AT, které bylo  $1,02 \mu\text{mol CO} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteinu. Výrazný rozdíl může být dán tím, že MV způsobuje primárně produkci  $\text{O}_2^-$ , který je velmi reaktivní a jelikož je produkován v chloroplastech, organelách bohatých na proteiny, může být jeho vliv na tuto buněčnou komponentu výraznější než po aplikaci 3-AT.

I za běžných podmínek je v buňkách určitá hladina karbonylovaných proteinů poukazující na oxidační poškození způsobené ROS. Degradace těchto proteinů je proto důležitým regulačním mechanismem pro udržování homeostázy buněk. Inhibicí proteazomu S26 bylo u oddělených listů *A. thaliana* za tmy významně zabráněno úbytku karbonylovaných proteinů. Oproti tomu inhibice

autofagické cesty neměla žádný vliv a po 6 hod ve tmě došlo k významnému úbytku obsahu karbonylů. Za degradaci oxidačně modifikovaných proteinů jsou zodpovědné různé enzymy a cesty v závislosti na tom, ve kterém buněčném kompartmentu se karbonylované proteiny nachází (Jain *et al.*, 2008). Rozdílná úroveň karbonylovaných proteinů mezi chloroplasty a mitochondriemi v listech a kořenech byla dokumentována na WT rostlinách okurky (*Cucumis sativus* L.) i mutantech MSC16, které se fenotypově projevují menším vzrůstem nežli WT. V případě extraktů z listů byla hladina karbonylovaných proteinů u WT i MSC16 rostlin stejná, nicméně aktivita proteáz byla u MSC16 extraktů oproti WT dvojnásobná. Je proto možné, že se chloroplastové proteázy významně podílejí na degradaci karbonylovaných proteinů (Juszczuk *et al.*, 2008). 3-AT působí přednostně na aktivitu CAT a k oxidačnímu poškození proteinů proto nejspíše dochází až následně po nadměrném vzniku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v peroxizómech. Jelikož jsem ve své práci nesledovala aktivitu proteáz, nelze říci, zda jejich účinkem došlo k degradaci oxidačně modifikovaných proteinů a tak omezení hladiny karbonylace při aplikaci vyšších koncentrací 3-AT.

Rozdílná dynamika oxidačního poškození proteinů do jisté míry koresponduje s odpovědí DNA na ošetření herbicidy. V případě 3-AT vedly nižší koncentrace (0,1; 0,2 i 0,5 mM) k signifikantnímu navýšení oxidačního poškození, ale pak se dostavilo jisté plató až po koncentraci nejvyšší. Je možné, že aplikace vyšších koncentrací 3-AT vedla v buňkách k aktivaci antioxidačního systému jako odpovědi k nadprodukci ROS. Antioxidační enzymy by tak mohly nadměrné karbonylaci proteinů zabránit. Aktivita APX se po aplikaci vyšších koncentrací (1; 2 mM) mírně zvýšila, nicméně nešlo o signifikantní změny a vzhledem k tomu, že CAT byla aplikací 3-AT inhibována, tyto enzymy se zřejmě významně nepodílely na zmírnění oxidačních modifikací proteinů. Zato poškození a iontová propustnost membrán v reakci na 1 mM a 2 mM 3-AT signifikantně stoupala. Je proto možné, že za těchto podmínek oxidačního stresu byly přednostně oxidačně modifikovány lipidy před samotnými proteiny.

## **9.4. Antioxidační systém – APX a CAT**

### **9.4.1. APX a její porovnání s CAT**

APX je enzym specifický pro rostliny díky svému kofaktoru v podobě askorbátu (Asada, 1992) a podílí se na odstraňování H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generovaného různými abiotickými stresory jak v cytoplazmě, mitochondriích, peroxizómech i chloroplastech, kde se vyskytuje ve 2 izoformách – stromatální a thylakoidální (Lubovská *et al.*, 2014). Sledování její aktivity v rámci antioxidačního systému podává užitečné informace o mechanismech, které rostliny využívají během odpovědi na nepříznivé podmínky prostředí. Při krátkodobém stresu zasolením (40 mM, 80 mM NaCl po dobu 24 hod) –

došlo v kořenech rostlin brokolice (*Brassica oleracea* cv. *Marathon*) k dramatickému poklesu aktivity APX i CAT. A i když v případě trvání stresu po dobu 7-14 dnů byla APX stále inhibována, aktivita CAT byla naopak obnovena a podílela se na snižování hladiny  $H_2O_2$  v kořenových pletivech (Hernandez *et al.*, 2010). Modifikace exprese antioxidantních enzymů SOD a APX v chloroplastech transgenních tabáků (*N. tabacum* cv. *Xanthi*) vedla ke zvýšení odolnosti proti oxidačnímu stresu způsobeného aplikací MV. Nejvyšší odolnost vykazovaly rostliny nadměrně exprimující obě zkoumané izoformy SOD (CuZnSOD, MnSOD) zároveň s APX (Kwon *et al.*, 2002). Fungování antioxidantního systému se v reakci na stresové podmínky liší u jednotlivých stresorů i mezi rostlinnými orgány. U kořenů rostlin rajčete (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bylo možno pozorovat různou odpověď APX a CAT na chladový stres a aplikaci nízké koncentrace  $H_2O_2$  vedoucí k výsledné aklimaci. Zatímco u APX došlo ke zvýšení aktivity jak u stresovaných rostlin tak u předem ošetřených  $H_2O_2$ , v případě CAT její aktivita stoupla pouze v případě rostlin vystavených nízkým teplotám (Işeri *et al.*, 2013). Rozdílná modulace aktivity APX v rostlinných orgánech po ošetření rostlin fazolu (*Phaseolus vulgaris* L. cv. *Morgan*) Cd a Zn byla dokumentována v práci Chaoui *et al.* (1997). V odpovědi na oxidační stres vyvolaný těmito těžkými kovy došlo k významnému zvýšení aktivity APX v listech, zatímco v kořenech a stonku nedošlo oproti kontrole k výrazné změně.

Zjistila jsem, že oxidační stres způsobený vyššími koncentracemi MV (50; 80; 100  $\mu$ M) měl na aktivitu APX v porovnání s kontrolou jasný negativní účinek. Jelikož doba aplikace byla pro všechny koncentrace stejná, je možné, že tuto inhibici je zodpovědná nadměrná produkce  $O_2^-$  v chloroplastech. Je zajímavé, že střední koncentrace 20  $\mu$ M znamenala navrácení aktivity APX téměř na úroveň zjištěnou u kontroly a podobný nárůst se dal opět vyzorovat u nejvyšších koncentrací (80; 100  $\mu$ M). Pro objasnění zdali se jedná o periodickou záležitost, bylo by nutné aplikovat podrobnější a rozšířenější koncentrační řadu.

APX vykazovala po ošetření 3-AT rozdílnou odpověď v porovnání s MV a to především, pokud se jednalo o nižší koncentrace. Nejprve došlo k výraznému nárůstu aktivity, což by se dalo částečně vysvětlit akumulací  $H_2O_2$  v důsledku inhibice CAT. APX by v tomto případě citlivě reagovala na takto vyvolaný oxidační stres. Následné snížení mohlo být způsobeno již příliš vysokou hladinou  $H_2O_2$ , kdy buňka nebyla schopna efektivně oxidačnímu stresu čelit, nebo nedostupností ASC v jeho redukované formě. Rozdílné reakce APX na působení MV a 3-AT bude pravděpodobně spojena s jejich rozdílným působením. Prudký pokles aktivity po použití již nejnižší koncentrace MV (10  $\mu$ M) mohl být spojen s prudkým navýšením koncentrace  $H_2O_2$ , ke kterému došlo přeměnou primárně vznikajícího  $O_2^-$  v chloroplastech činností SOD (Hiyama *et al.*, 1993). Za těchto podmínek mohla být koncentrace  $H_2O_2$  přímo v chloroplastu tak vysoká, že nejprve došlo k silné inhibici APX.

#### 9.4.2. CAT

CAT má rovněž primární funkci v regulaci rovnováhy  $H_2O_2$  v návaznosti na stresové abiotické podmínky a je lokalizovaná v peroxizómech (Lubovská *et al.*, 2014), což může být jednou z příčin její odlišné aktivace za stresových podmínek (Işeri *et al.*, 2013) oproti APX. Aplikace 3-AT působícího jako specifický inhibitor CAT (Havir, 1992) v buňkách vede k omezené přeměně  $H_2O_2$  na  $H_2O$  a v důsledku hromadění  $H_2O_2$  k oxidačnímu stresu. Enzymatická aktivita CAT skutečně po aplikaci 3-AT významně klesala po použití všech koncentrací. Oxidační poškození, ke kterému v důsledku vzniku  $H_2O_2$  mohlo dojít, se nejvíce projevilo na klesající stabilitě membrán. Nicméně k žádné významné oxidační modifikaci buněčných komponent ve srovnání s MV nedošlo. Za nevýrazné oxidační modifikace buněčných komponent po aplikaci 3-AT může být do jisté míry zodpovědná APX, jejíž aktivita se s narůstající koncentrací 3-AT postupně zvyšovala a docházelo tak k přeměně škodlivého  $H_2O_2$  na  $H_2O$ .

MV není inhibitorem CAT, její aktivitu ovlivňoval nepřímo a to díky produkci  $O_2^{\cdot-}$  v chloroplastech, který byl účinkem SOD přeměňován na  $H_2O_2$  (Hiyama *et al.*, 1993). Ten díky tomu, že není radikálové povahy, může snadno procházet skrze buněčné membrány a difundovat do cytoplazmy (Asada K., 1992). Proto by se dalo očekávat, že dojde k navýšení aktivity CAT. Nicméně k žádnému signifikantnímu nárůstu aktivity CAT nedošlo. Zato se zdá, že nadměrně vznikající  $H_2O_2$  již v rámci chloroplastů likvidovala APX, jejíž aktivita při vyšších koncentracích MV narůstala. Aktivita CAT tak byla u obou herbicidů částečně kompenzována opětovně narůstající aktivitou APX. Celkově snížená aktivita CAT spolu s APX oproti kontrolám mohla být způsobena kyselinou salicylovou, u které bylo prokázáno, že je schopna inhibice těchto dvou antioxydačních enzymů (Durner & Klessig, 1995). Po ošetření herbicidy došlo v pletivu ke spuštění stresové odpovědi a v důsledku toho pravděpodobně i ke zvýšení koncentrace SA. Její přítomnost mohla proto při vyšších koncentracích herbicidů vést k částečné inhibici CAT i APX.

#### 9.5. Vizualizace ROS

Sledování ROS v rámci buněk *in vivo* není v dnešní době již nepřekonatelným problémem. Existuje mnoho přístupů využívající histochemické barvení pomocí NBT specificky reagující se  $O_2^{\cdot-}$ , nebo barvivo DAB (diaminobenzidin), které se využívá k vizualizaci  $H_2O_2$  (Scarpeci *et al.*, 2008). Při fluorescenční vizualizaci ROS se často využívá konfokální laserové skenovací mikroskopie ve spojení s fluorescenční barvou karboxy-DCFDA, která byla použita i v mé studii.

### 9.5.1. Specifická MV, 3-AT a produkce $O_2^{\cdot-}$ nebo $H_2O_2$

Původním záměrem bylo specificky vizualizovat vznikající  $H_2O_2$  po aplikaci 3-AT a porovnat jeho lokalizaci v buňce po ošetření MV. Vzhledem k rozdílnému principu účinku jsem očekávala odlišnou lokalizaci zeleného signálu a také jsem hledala pozitivní závislost fluorescence na zvyšující se koncentraci herbicidů.

V některých pracích je karboxy-DCFDA používán specificky pro detekci  $H_2O_2$  (Hernandez *et al.*, 2010; Jing *et al.*, 2015). Při fluorescenční vizualizaci ROS, zejména detekci  $H_2O_2$ , je ale velice důležitá interpretace výsledků (Grisham, 2013). Nejčastěji používané fluorescenční sondy mohou spolehlivě podat informaci o změnách redoxního stavu v buňkách. Nicméně nejsou specifické pro žádný jednotlivý oxidant a vznik fluorescenčního signálu je ovlivněn mnoha chemickými interakcemi, nejen zvýšením koncentrace určitého oxidantu, shrnuto v Winterbourn, (2014).

Ve své studii jsem zjistila, že použití karboxy-DCFDA nevedlo ke specifické detekci produkce  $H_2O_2$ , čímž jsem vyvrátila svou původní hypotézu. Nicméně ze snímků bylo možno určit jistou pozitivní závislost síly signálu na zvyšující se koncentraci obou herbicidů. Navíc jsem pozorovala rozdíl ve fluorescenčním signálu mezi MV a 3-AT. Ke specifické lokalizaci signálu do buněčných částí identifikovaných jako peroxizómy došlo oproti předpokladům převážně po aplikaci vyšších koncentrací MV, a ne 3-AT. U vyšších koncentrací MV byl mimo chloroplastů signál lokalizován také do cytoplazmy, což pravděpodobně koreluje s celkově narušeným redoxním stavem buněk. Tato pozorování tedy potvrdila nespecifitu karboxy-DCFDA pro  $H_2O_2$ . Zároveň ale zdokumentovala oxidační stres v tabákových buňkách po ošetření herbicidy, který vedl k narušení redoxní rovnováhy.

## 10. Závěry

1. Ošetření herbicidy MV a 3-AT vedlo k detekovatelnému oxidačnímu poškození tabákových buněk (*N. tabacum cv. Xanthi*), které jsem nejprve sledovala na jaderné DNA.
2. Kometový test ve své alkalické verzi jsem optimalizovala a pak se ukázal jako vhodný pro specifickou detekci a zhodnocení míry oxidačního poškození DNA v jádrech tabáku. Díky této metodice jsem stanovila koncentrační řady pro používané herbicidy – MV: 10; 20; 50; 80 a 100  $\mu\text{M}$ . 3-AT: 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 mM.
3. Výchozím parametrem bylo oxidační poškození DNA. Řetězce DNA byly mnohem citlivější k působení MV, kdy při nejvyšší koncentraci dokonce došlo k dalšímu poškození zesíťováním molekul. Po aplikaci MV jsem rovněž detekovala výraznou karboxylaci proteinů. Také 3-AT indukoval oxidaci proteinů, ale v mnohem menší míře než MV. Oproti tomu nárůst peroxidace lipidů detekovaný jako TBARS nebyl v takovém řádu jako u proteinů, zejména po působení MV. Rozdíly v poškození na úrovni membrán a lipidů po aplikaci obou herbicidů nebyly výrazné, přesto bylo toto poškození větší po aplikaci 3-AT než MV. Oba herbicidy se tedy lišily v místě primárního poškození.
4. 3-AT moduloval aktivity antioxidantních enzymů, kdy jeho aplikace vedla k významné inhibici CAT v rámci celé koncentrační řady a APX při vyšších koncentracích. MV měl na APX a CAT rovněž inhibiční charakter, ale jeho účinek byl oproti 3-AT méně výrazný a pouze za použití nižších koncentrací. Krátkodobé ošetření herbicidy vedlo k poklesu aktivit antioxidantních enzymů, což částečně odpovídá narůstajícímu oxidačnímu poškozením buněčných komponent. Při vyšších koncentracích herbicidů APX do jisté míry kompenzovala inhibici CAT.
5. Laserovou fluorescenční konfokální mikroskopií se mi podařilo vizualizovat produkci ROS jakožto zdroje oxidačního poškození buněk. Barva karboxy-DCFDA specificky nebarvila  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ale na základě snímků lze usuzovat na změnu redoxního stavu buněk v reakci na ošetření herbicidy. Při vyšších koncentracích MV byly specificky viditelné peroxizomy a u obou herbicidů se ukázala pozitivní závislost produkce ROS na stoupajících koncentracích herbicidů.

## 11. Seznam citované literatury

- Asada K. 1992.** Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants: *Physiologie Plantarum* **2**: 235–241.
- Asada K, Kanematsu S. 1976.** Reactivity of thiols with superoxide radicals. *Agricultural and Biological Chemistry* **40**: 1891–1892.
- De Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, Abreu CEB De, Gomes-Filho E. 2006.** Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* **56**: 87–94.
- Babbs CF, Pham J a, Coolbaugh RC. 1989.** Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiology* **90**: 1267–1270.
- Balestrasse KB, Gallego SM, Tomaro ML. 2006.** Oxidation of the enzymes involved in nitrogen assimilation plays an important role in the cadmium-induced toxicity in soybean plants. *Plant and Soil* **284**: 187–194.
- Berlett BS. 1997.** Protein Oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 20313–20316.
- Bienert GP, Heinen RB, Berny MC, Chaumont F. 2014.** Maize plasma membrane aquaporin ZmPIP2;5, but not ZmPIP1;2, facilitates transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1838**: 216–222.
- Cui M, Lin Y, Zu Y, Efferth T, Li D, Tang Z. 2015.** Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in Arabidopsis. *Journal of Plant Biology* **58**: 193–201.
- Dagmara J, Małgorzata JR, Katarzyna K, Magdalena M, Małgorzata R. 2015.** Modification of plasma membrane NADPH oxidase activity in cucumber seedling roots in response to cadmium stress. *Plant Science* **234**: 50–59.
- Demidchik V. 2014.** Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* **109**: 212–228.
- Du YY, Wang PC, Chen J, Song CP. 2008.** Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in Arabidopsis thaliana. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 1318–26.
- Durner J, Klessig DF. 1995.** Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 11312–11316.
- Fu JY. 2014.** Cloning of a new glutathione peroxidase gene from tea plant (*Camellia sinensis*) and expression analysis under biotic and abiotic stresses. *Botanical Studies* **55**: 1–6.
- Gaber A, Ogata T, Maruta T, Yoshimura K, Tamoi M, Shigeoka S. 2012.** The involvement of Arabidopsis glutathione peroxidase 8 in the suppression of oxidative damage in the nucleus and cytosol. *Plant and Cell Physiology* **53**: 1596–1606.
- Gechev T, Gadjev I, Breusegem F Van, Inzé D, Dukiandjiev S, Toneva V, Minkov I. 2002.** Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**: 708–714.

- Gichner T, Patková Z, Száková J, Demnerová K. 2004a.** Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **559**: 49–57.
- Gichner T, Patková Z, Száková J, Žnidar I, Mukherjee A. 2008a.** DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and  $\gamma$ -rays. *Environmental and Experimental Botany* **62**: 113–119.
- Gichner T, Patková Z, Kim JK. 2004b.** DNA damage measured by the comet assay in eight agronomic plants. *Biologia Plantarum* **47**: 185–188.
- Gichner T, Plewa MJ. 1998.** Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutation Research* **401**: 143–52.
- Gichner T, Žnidar I, Száková J. 2008b.** Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **652**: 186–190.
- Grisham MB. 2013.** Methods to detect hydrogen peroxide in living cells: Possibilities and pitfalls. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* **165**: 429–438.
- Havir E a. 1992.** The in vivo and in vitro inhibition of catalase from leaves of *Nicotiana glauca* by 3-Amino-1,2,4-Triazole. *Plant Physiology* **99**: 533–537.
- Hernandez M, Fernandez-Garcia N, Diaz-Vivancos P, Olmos E. 2010.** A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. *Journal of Experimental Botany* **61**: 521–535.
- Hiyama T, Ohinata A, Kobayashi S ichi. 1993.** Paraquat ( Methylviologen ): Its interference with primary photochemical reactions. *ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C. Volume 48*, Issue 3-4, Pages 374–378.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. 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.
- Huang C, Verrillo F, Renzone G, Arena S, Rocco M, Scaloni A, Marra M. 2011.** Response to biotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*: Analysis of variably phosphorylated proteins. *Journal of Proteomics* **74**: 1934–1949.
- Chaoui A, Mazhoudi S, Habib M. 1997.** Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean ( *Phaseolus vulgaris* L .). *Plant Science* **127**: 139–147.
- Cheng WH, Ho YS, Valentine B a, Ross D a, Combs GF, Lei XG. 1998.** Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *The Journal of Nutrition* **128**: 1070–1076.
- Int C, Ind C. 1958.** A study of the inhibition of catalase by 3-Amino-1,2,4-Triazole. *Biochemical Journal* : 468–475.
- Işeri ÖD, Körpe DA, Sahin FI, Haberal M. 2013.** Hydrogen peroxide pretreatment of roots enhanced oxidative stress response of tomato under cold stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**: 1905–1913.
- Jain V, Kaiser W, Huber SC. 2008.** Cytokinin inhibits the proteasome-mediated degradation of carbonylated proteins in *Arabidopsis* leaves. *Plant and Cell Physiology* **49**: 843–852.



- Jing X, Hou P, Lu Y, Deng S, Li N, Zhao R, Sun J, Wang Y, Han Y, Lang T, et al. 2015.** Overexpression of copper / zinc superoxide dismutase from mangrove *Kandelia candel* in tobacco enhances salinity tolerance by the reduction of reactive oxygen species in chloroplast. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–14.
- Joo J, Lee YH, Song SI. 2014.** Rice CatA, CatB, and CatC are involved in environmental stress response, root growth, and photorespiration, respectively. *Journal of Plant Biology* **57**: 375–382.
- Juszczuk IM, Tybura A, Rychter AM. 2008.** Protein oxidation in the leaves and roots of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.), mutant MSC16 and wild type. *Journal of Plant Physiology* **165**: 355–365.
- Kalemba EM, Pukacka S. 2013.** Carbonylated proteins accumulated as vitality decreases during long-term storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Trees* **28**: 503–515.
- Khan A a, Khan HM, Delincée H. 2002.** Detection of radiation treatment of beans using DNA comet assay. *Radiation Physics and Chemistry* **63**: 407–410.
- Kim MD, Kim YH, Kwon SY, Jang BY, Lee SY, Yun DJ, Cho JH, Kwak SS, Lee HS. 2011.** Overexpression of 2-cysteine peroxiredoxin enhances tolerance to methyl viologen-mediated oxidative stress and high temperature in potato plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 891–897.
- Krieger-Liszkay A, Kós PB, Hideg É. 2011.** Superoxide anion radicals generated by methylviologen in photosystem I damage photosystem II. *Physiologia Plantarum* **142**: 17–25.
- Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS. 2002.** Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Environment* **25**: 873–882.
- Kwon KC, Verma D, Jin S, Singh ND, Daniell H. 2013.** Release of proteins from intact chloroplasts induced by reactive oxygen species during biotic and abiotic stress. *PLoS One* **8**.
- Levine BRL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A g, Ahn B whan. 1990.** [ 49 ] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *METHODS IN ENZYMOLOGY* **186**: 464–478.
- Li H, Liu SS, Yi CY, Wang F, Zhou J, Xia XJ, Shi K, Zhou YH, Yu JQ. 2014.** Hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced HSP70 accumulation and heat tolerance in grafted cucumber plants. *Plant, Cell and Environment*: 2768–2780.
- Liao W, McNutt M a, Zhu WG. 2009.** The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *METHODS (San Diego, Calif.)* **48**: 46–53.
- Lin AJ, Zhang XH, Chen MM, Cao Q. 2007.** Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Sciences* **19**: 596–602.
- Liu N, Lin Z, Guan L, Gaughan G, Lin G. 2014.** Antioxidant enzymes regulate reactive oxygen species during pod elongation in *pisum sativum* and *brassica chinensis*. *PLoS ONE* **9**: 1–10.
- Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, Azqueta A. 2013.** The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: Hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis* **28**: 427–432.
- Lubovská Z, Dobrá J, Štorchová H, Wilhelmová N, Vanková R. 2014.** Cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression modifies antioxidant defense against heat, drought and their combination in *Nicotiana tabacum* plants. *Journal of Plant Physiology* **171**: 1625–1633.
- Mancini A, Buschini A, Restivo FM, Rossi C, Poli P. 2006.** Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Science* **170**: 845–852.

- Mao GD, Poznansky MJ. 1992.** Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. *FEBS Letters* **305**: 233–236.
- Margoliash E, Hospital G. 1962.** Kinetics of the Irreversible Inhibition of Catalase in the Presence of Hydrogen Peroxide and Peroxide Complex I Hydrogen. *The Journal of Biological Chemistry* **237**: 2359–2363.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
- Nair V, Cooper CS, Vietti DE, Turner G a. 1986.** The chemistry of lipid peroxidation metabolites: Crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids* **21**: 6–10.
- Nakano Y. 1981.** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology* **22**(5): 867–880.
- Noctor G, Foyer CH. 1998.** Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249–279.
- Noctor G, Lelarge-Trouverie C, Mhamdi A. 2015.** The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry* **112**: 33–53.
- op den Camp RGL, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg E, Göbel C, Feussner I, et al. 2003.** Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. *The Plant cell* **15**: 2320–2332.
- Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L. 2008.** Redox proteomics: Basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3781–3801.
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R. 2002.** The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* **130**: 1143–1151.
- Scarpeci TE, Zanor MI, Carrillo N, Mueller-Roeber B, Valle EM. 2008.** Generation of superoxide anion in chloroplasts of Arabidopsis thaliana during active photosynthesis: A focus on rapidly induced genes. *Plant Molecular Biology* **66**: 361–378.
- Seong HL, Singh AP, Gap CC. 2004.** Rapid accumulation of hydrogen peroxide in cucumber roots due to exposure to low temperature appears to mediate decreases in water transport. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1733–1741.
- Shen Z, Ding M, Sun J, Deng S, Zhao R, Wang M, Ma X, Wang F, Zhang H, Qian Z, et al. 2013.** Overexpression of PeHSF mediates leaf ROS homeostasis in transgenic tobacco lines grown under salt stress conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **115**: 299–308.
- Tarpey MM, Wink D a, Grisham MB. 2004.** Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **286**: R431–R444.
- Thibaud MC, Cortez N, Rivière H, Betsche T. 1995.** Photorespiration and related enzymes in Pea (*Pisum sativum*) grown in high CO<sub>2</sub>. *Journal of Plant Physiology* **146**: 596–603.
- Wang Y, Ding M, Gu X, Wang J, Pang Y, Gao L, Xia T. 2013.** Retracted: Analysis of interfering substances in the measurement of malondialdehyde content in plant leaves. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* **9**: 235–242.

**Winterbourn CC. 2014.** The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1840**: 730–8.

**Yun BW, Huh GH, Lee HS, Kwon SY, Jo JK, Kim JS, Cho KY, Kwakl SS. 2000.** Differential resistance to methyl viologen in transgenic tobacco plants that express sweet potato peroxidases. *Journal of Plant Physiology* **156**: 504–509.