

UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA
Katedra botaniky



Stresová fyziológia rastlín

Návody na cvičenia

JOZEF KOVÁČIK

Košice 2012

© 2012 RNDr. Jozef Kováčik, PhD.

Recenzenti: Doc. RNDr. Taťána Gondová, CSc.

Doc. RNDr. Ľudmila Slováková, CSc.

Rozsah strán: 50

Elektronický vysokoškolský učebný text pre Prírodovedeckú fakultu UPJŠ v Košiciach.

Za odbornú a jazykovú stránku tohto vysokoškolského učebného textu zodpovedá autor.

Rukopis neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Umiestnenie: <http://www.upjs.sk/pracoviska/univerzitna-kniznica/e-publikacia/#pf>

Dostupné od: 15. 2. 2012

ISBN 978-80-7097-941-9

Predhovor

Výskum metabolizmu a fyziológie rastlín neustále napreduje, najmä z dôvodu potreby zvyšovania produkcie rastlinnej biomasy v potravinárstve i pre hospodárske a farmaceutické účely. Limitované množstvo obrábateľnej pôdy (sucho, salinita), rastúca environmentálna záťaž v podobe rozširovania priemyslu (emisie kovov a skleníkových plynov) a pod. sú hlavnými negatívnymi faktormi, ktoré vplyvajú na rast a úžitkovú hodnotu rastlín. Z tohto dôvodu sa metodiky fyziológie rastlín, či už progresívne alebo klasické, využívajú pri štúdiu odpovedí rastlín na rôzne formy stresu s cieľom objasniť mechanizmy tolerance rastlín (základný výskum) a tým zvýšiť ich produktivitu (aplikovaný výskum).

Tieto „Návody na cvičenia“ prezentujú stručný prehľad bežne používaných metodík i progresívne metodiky napr. s použitím kvapalinovej chromatografie a fluorescenčného mikroskopu. Jednotlivé úlohy sa selektovali na základe výskumného zamerania Katedry botaniky PF UPJŠ v Košiciach z hľadiska „stresovej fyziológie“. Niektoré úlohy je tiež možné využiť v rámci predmetu „Ekológia rastlín“. Ako modelová rastlina pre jednotlivé úlohy sa typicky používa rumanček kamilkový z dôvodu dlhoročnej histórie jeho výskumu na Katedre botaniky PF UPJŠ a jeho nenáročnosti na kultiváciu v laboratórnych podmienkach.

Jednotlivé kapitoly prezentujú aj stručný význam sledovaných parametrov, princíp stanovenia a metabolizmus (vznik alebo odbúravanie) s cieľom naznačiť ich vzájomný kontext, keďže stanovenie individuálneho parametra nemôže poskytnúť všeobecnejšiu výpoveď o celkových príčinách a dopadoch pozorovanej zmeny (ale naopak, môže poskytnúť predpoklad pre preverenie hypotézy na úrovni iných parametrov...). Pre hlbšie štúdium jednotlivých problematík existuje dostatok kvalitných zahraničných monografií a prehľadových (tzv. „review“) článkov.

Ďakujem Prof. RNDr. Miroslavovi Repčákovi, DrSc. za konzultácie k tomuto textu a recenzentkám Doc. RNDr. Taťáne Gondovej, CSc. (Katedra analytickej chémie PF UPJŠ v Košiciach) a Doc. RNDr. Ľudmile Slovákovej, CSc. (Katedra fyziológie rastlín PF UK v Bratislave) za konštruktívne a cenné pripomienky k obsahovej a formálnej stránke.

Autor

v Košiciach, 26. 9. 2011

Obsah

Použité skratky a pojmy	5
1. Antioxidačné enzýmy (spektrofotometrické stanovenia)	7
1.1. Stanovenie aktivity superoxid dismutázy	7
1.2. Stanovenie aktivity katalázy	9
1.3. Stanovenie aktivity guajakol peroxidázy	9
1.4. Stanovenie aktivity askorbát peroxidázy	11
1.5. Stanovenie aktivity glutatión reduktázy	11
1.6. Stanovenie aktivity glutatión S-transferázy	12
2. Reaktívne formy kyslíka	13
2.1. Spektrofotometrické stanovenie peroxidu vodíka	14
2.2. Spektrofotometrické stanovenie superoxidového radikálu	15
2.3. Histochemická vizualizácia peroxidu vodíka a superoxidu	16
2.4. Fluorescenčná vizualizácia peroxidu vodíka	17
3. Oxid dusnatý	19
3.1. Spektrofotometrické stanovenie oxidu dusnatého	19
3.2. Fluorescenčná vizualizácia oxidu dusnatého	20
4. Oxidačné poškodenie lipidov	21
4.1. Stanovenie malondialdehydu	22
4.2. Stanovenie konjugovaných diénov	23
4.3. Stanovenie aktivity lipoxygenázy	24
5. Antioxidanty a antioxidačná aktivita	25
5.1. Stanovenie kyseliny askorbovej	25
5.2. Stanovenie redukovaného glutatiónu	26
5.3. Stanovenie antioxidačnej aktivity	27
6. Fenolový metabolizmus	28
6.1. Stanovenie aktivity cinamát-4-hydroxylázy metódou HPLC	28
6.2. Stanovenie aktivity β -glukozidázy	29
6.3. Stanovenie fenolov viazaných na bunkovú stenu	30
6.4. Stanovenie kumarínových látok	32
7. Ťažké kovy a minerálne prvky	34
7.1. Stanovenie obsahu kadmia a príbuzných parametrov	34
7.2. Stanovenie draslíka	36
7.3. Stanovenie amónnych iónov s Nesslerovým činidlom	37
8. Výpočty a spracovanie výsledkov	40
Zoznam použitej literatúry	48

Použité skratky a pojmy

Nakoľko v anglicky písanej literatúre sa bežne uvádzajú skratky sledovaných parametrov, napr. enzýmov a chemických látok, uvádzam prehľad pojmov obsiahnutých v tomto texte. Podobne sa bežne používajú rôzne iné výrazy a skratky (napr. kit, blank, DW, FW, DM, FM) a hoci k nim existujú slovenské ekvivalenty, pre jednoduchšiu orientáciu študentov v anglicky písaných textoch uvádzam aj vysvetlenie týchto pojmov.

AAS – atómová absorpčná spektrometria (Atomic Absorption Spectrometry)

APX – askorbát peroxidáza

AsA – kyselina askorbová (ascorbic acid)

blank – porovnávací („slepá“) vzorka, ktorá sa používa na nastavenie nulovej hodnoty

C4H – cinamát-4-hydroxyláza

CAT – kataláza (catalase)

č. hm. – čerstvá hmotnosť

DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

DW/DM – suchá hmotnosť/hmota (Dry Weight/Dry Mass), častejšie sa používa DW

ϵ – mólový absorpčný koeficient (často označovaný aj ako extinkčný koeficient)

EDTA – kyselina etyléndiamín tetraoctová

eppendorfove skúmavky – mikroskúmavky (obvykle s objemom 1,5 ml od firmy Eppendorf)

FW/FM – čerstvá hmotnosť/hmota (Fresh Weight/Fresh Mass), častejšie sa používa FW

GPX – guajakol peroxidáza

GR – glutatión reductáza

GSH – redukovaný glutatión

GSSG – oxidovaný glutatión

GST – glutatión S-transferáza

HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (High-Performance Liquid Chromatography)

kit – komerčné dostupné balenie, obsahujúce všetky zložky potrebné pre dané meranie

MDA – malondialdehyd

NBT – nitroblue tetrazolium chlorid

pík – označuje chromatografickú vlnu (anglicky označovaná ako „peak“). Vid' Obr. 11 a 13

PAL – fenylalanín-amónium-lyáza

POD – peroxidáza (peroxidase), všeobecné pomenovanie bez špecifikácie používaného substrátu. Jednotlivé peroxidázy sa potom značia osobitnými skratkami (pozri APX a GPX uvedené vyššie)

PTIO – 2-fenyl-4,4,5,5-tetrametyl-imidazolín-1-oxyl-3-oxid

PVPP – polyvinylpolypyrrolidón (v tlmivých roztokoch sa používa ako absorbent na odstránenie napr. fenolových látok, ktoré by mohli inaktivovať proteíny)

ROS – reaktívne formy kyslíka (Reactive Oxygen Species, niekedy tiež **AOS** – aktívne formy kyslíka)

s. hm. – suchá hmotnosť

SNP – nitroprusid sodný (sodium nitroprusside)

SOD – superoxid dismutáza

TCA – kyselina trichlóroctová (trichloroacetic acid)

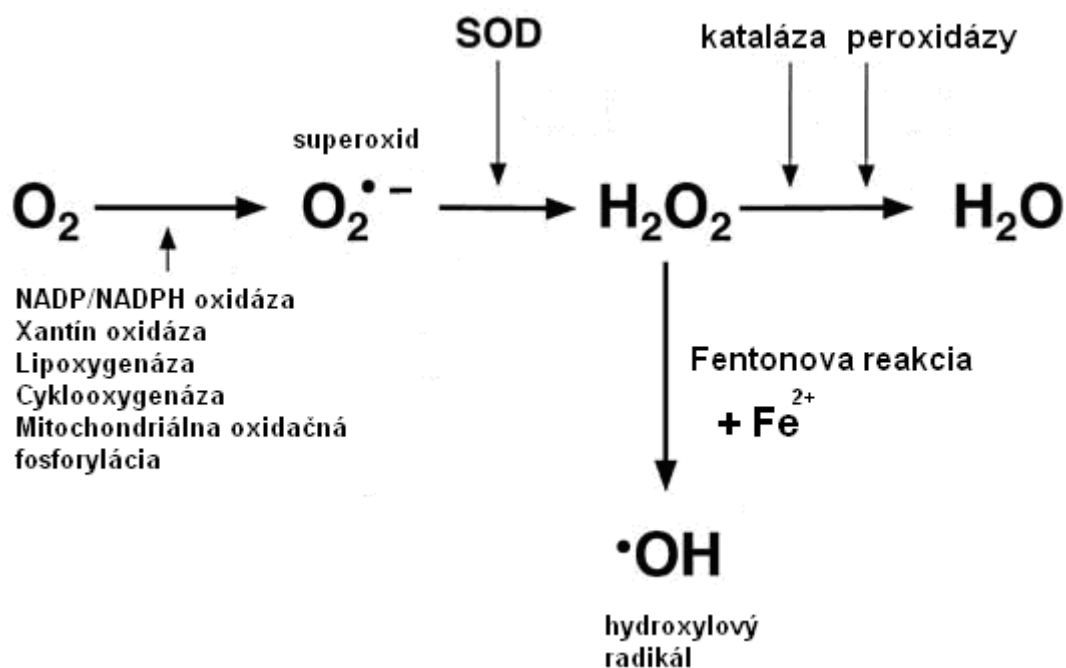
Tween-20 – bežne používaný detergent. Má podobný účinok ako saponáty (zvyšuje rozpustnosť vo vode zle rozpustných látok, napr. mastných kyselín alebo metyl jasmonátu).

WHO – World Health Organization (Svetová zdravotnícka organizácia)

XOD – xantín oxidáza

1. Antioxidačné enzýmy

Antioxidačné enzýmy sú kľúčovým nástrojom buniek pre udržiavanie hladiny reaktívnych foriem kyslíka vo fyziologicky prijateľnom rozmedzí. Majú teda význam pri regulovaní ich nadprodukcie v stresových podmienkach (pozri tiež nasledujúcu kapitolu). K hlavným antioxidačným enzýmom patria superoxid dismutáza (SOD), kataláza a rôzne peroxidázy (Obr. 1).



Obr. 1. Schematické znázornenie tvorby základných foriem kyslíkových radikálov a hlavných enzýmov zapojených v týchto procesoch (činnosťou SOD a katalázy vzniká aj O_2).

1.1. Stanovenie aktivity superoxid dismutázy

Princíp: Superoxid dismutáza (SOD, EC 1.15.1.1) katalyzuje premenu superoxidového radikálu na peroxid vodíka a kyslík. Existuje v niekoľkých izoformách, ktoré sa líšia iónom kovu ako prostetickou skupinou: v chloroplastoch je prítomná FeSOD (evolučne najstaršia skupina nachádzajúca sa aj v prokaryotických organizmoch) a Cu/Zn SOD II, v mitochondriách MnSOD (tiež v peroxizómoch), v cytosole Cu/Zn SOD I a NiSOD (v niektorých prokaryotických organizmoch, objavená len nedávno). Celková aktivita SOD sa bežne stanovuje pomocou komerčne dostupných kitov. Obvykle je princípom stanovenia inhibícia tvorby superoxidových iónov generovaných počas oxidácie xantínu xantín oxidázou (XOD) a tieto superoxidové ióny redukujú „nitroblue tetrazolium“ na „nitroblue tetrazolium“-diformazán. Prítomnosť SOD znižuje hladinu superoxidu, čím klesá aj tvorba spomenutého

diformazán-derivátu. Pre generovanie superoxidu sa používajú aj iné princípy, napr. autooxidácia pyrogallolu v alkalickom pH.

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka kamilkového (pre hydroponickú kultiváciu rastlín pozri „Návody na cvičenia z fyziológie rastlín“ – Repčák a kolektív 2009), 3 mM zásobný roztok Cu^{2+} , automatické pipety, eppendorfove skúmavky (1,5 ml), trecie misky s tlíčkmi, morský (inertný) piesok, 50 mM fosfátový tlmivý roztok (pH 7), komerčný kit na stanovenie SOD aktivity (napr. firma R&D Europe Ltd., Veľká Británia), spektrofotometer.

Postup: Rastliny rumančeka exponujeme medi vo výslednej koncentrácii 120 μM počas 24 h. Potom ich rozdelíme na listy a korene, korene opláchneme destilovanou vodou a osušíme filtračným papierom. Následne použijeme pre prípravu vzoriek buď identickú časť koreňa z rôznych rastlín, alebo celý koreň rozdrvíme s kvapalným dusíkom a až z tejto hmoty odvážeme alikvótnu časť. V prípade rastlín s menšou biomasou (v závislosti od dĺžky kultivácie) je vhodné homogenizovať celé koreňové systémy (analogicky pracujeme aj s nadzemnou biomasou). Biomasu potom homogenizujeme s malým množstvom morského piesku v chlade podobne ako pri práci so všetkými enzýmami (trecie misky ponorené v plytkej miske s ľadovou drťou) s výsledným riedením riedení 1 g č. hm./5 ml fosfátového tlmivého roztoku. Centrifugujeme (15 min. pri 4 °C a 15 000 rpm). Pracujeme v chlade a bez zbytočných časových strán. Ďalej postupujeme podľa druhu dostupného kitu.

Poznámka: pre extrakciu enzýmov sa do tlmivých roztokov pridávajú rôzne látky, ktorých cieľom je udržať funkčnosť extrahovaných proteínov. Často sa používa prídavok 1% (nerozpustného) polyvinylpolypyrrolidónu (m/V, t.j. 1 g/100 ml).

Vyhodnotenie: Zmena absorbancie (ΔA) v prípade kitu so xantín oxidázou sa sleduje pri 550 nm. Ako porovnávací vzorka (tzv. blank) sa použije reakčná zmes obsahujúca všetky zložky kitu vrátane supernatantu, ale bez pridania XOD. Po nastavení nulovej hodnoty sa do identickej kvety pridá XOD a zmena absorbancie sa sleduje počas 5 minút. Pre výpočet % inhibície je tiež potrebná negatívna kontrola, ktorá neobsahuje supernatant (tu bude teda nárast absorbancie maximálny, keďže v neprítomnosti supernatantu a teda absencie SOD enzýmu bude tvorba superoxidového radikálu maximálna). Jedna jednotka (1 U) SOD aktivity sa obvykle definuje ako inhibícia nárastu absorbancie pri danej vlnovej dĺžke o 50 % (presný spôsob výpočtu percenta inhibície je súčasťou každého komerčného kitu). Štatisticky porovnáme (napr. s použitím tzv. „Student's t-testu“ v programe Excel) kontrolné a Cu-exponované rastliny a výsledky spracujeme do grafickej podoby (napr. stĺpcové grafy) s vyznačením prípadných signifikantných rozdielov (príklady v kapitole 8).

1.2. Stanovenie aktivity katalázy

Princíp: Kataláza (CAT, EC 1.11.1.6) je tetramér štyroch polypeptidov obsahujúci porfyrínové jadro s atómom Fe^{3+} . Nachádza sa v rôznych organelách, ale nie v chloroplastoch a jej hlavnou funkciou v listoch je odbúravanie peroxidu vodíka v peroxizómoch (fotorespirácia). Je hlavným enzýmom zodpovedným za „hrubú“ deštrukciu peroxidu vodíka (udáva sa rozklad 100 000 a viac molekúl H_2O_2 za sekundu). Jej aktivita sa preto bežne stanovuje po pridaní substrátu do reakčnej zmesi obsahujúcej extrakt proteínov.

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka kamilkového, 1mM zásobný roztok Cd^{2+} , automatické pipety, eppendorfove skúmavky (1,5 ml), trecie misky s tĺčkami, morský (inertný) piesok, 50 mM fosfátový tlmivý roztok (pH 7), 35% H_2O_2 , spektrofotometer.

Postup: Rastliny rumančeka exponujeme kadmiu vo výslednej koncentrácii 100 μM počas 3 dní. Potom ich rozdelíme na listy a korene a vzorky pripravíme rovnako ako v predchádzajúcej úlohe. Pre stanovenie aktivity CAT pipetujeme do 4 ml sklenej kyvety 2,94 ml tlmivého roztoku a 0,05 ml supernatantu a reakciu zahájime pridaním 0,01 ml H_2O_2 .

Vyhodnotenie: Zmenu absorbancie (na základe rozkladu peroxidu vodíka) zaznamenáme pri 240 nm na začiatku reakcie a po minúte jej prebiehania. Ako blank sa obvykle používa daný tlmivý roztok. V prípade potreby upravíme objem supernatantu alebo peroxidu vodíka. Aktivitu CAT vypočítame s použitím mólového absorpčného koeficientu $\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a vyjadríme ako $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ č. hm. a po stanovení proteínov metodikou podľa Bradfordovej (pozri „Návody na cvičenia z fyziológie rastlín“ – Repčák a kolektív 2009) prevedieme na mg proteínov. Štatisticky porovnáme kontrolné a Cd-exponované rastliny a výsledky spracujeme do grafickej podoby.

1.3. Stanovenie aktivity guajakol peroxidázy

V genóme *Arabidopsis* sa identifikovalo 73 génov pre peroxidázy a v genóme ryže 138. Formálne sa členia na tri triedy: i) trieda („class“) I: prokaryotický pôvod, intracelulárne odstraňovanie H_2O_2 , ii) trieda II: extracelulárne enzýmy húb degradujúce lignín, iii) extracelulárne (sekrétorické) enzýmy uvoľňované do bunkovej steny a/alebo okolitého prostredia – reakčné centrum obsahuje protoporfyrín s Fe. Rastliny obsahujú peroxidázy triedy I a III. Trieda III peroxidáz sú bifunkčné enzýmy, vykazujúce dve protichodné vlastnosti: i) *peroxidačný cyklus* - odstraňovanie (redukcia) H_2O_2 s použitím elektrónov z rôznych donorov (napr. fenoly, askorbát) a ii) *hydroxylový cyklus* – vznik ROS (najmä $\cdot\text{OH}$)

z H_2O_2 (esenciálne pre rast = uvoľňuje štruktúru bunkovej steny, zdrojom elektrónov a vodíka je auxín alebo iné redukujúce molekuly).

Princíp: Guajakol peroxidáza (označovaná ako POD, POX alebo GPX, EC 1.11.1.7) využíva ako donor elektrónov pre rozklad H_2O_2 fenolové látky (H_2O_2 je potom akceptor elektrónov, pričom fenol sa oxiduje a H_2O_2 sa redukuje na H_2O). Jej aktivita sa stanovuje s použitím guajakolu (*o*-metoxyfenol). Ako substrát pre peroxidázy sa často používajú aj iné fenolové látky, napr. kyselina kávová alebo chlorogénová.

Poznámka: guajakol má intenzívnu sladkastú vôňu, preto pri práci dostatočne vetráme a zásobný roztok počas merania zatvárame.

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka kamilkového, 3 mM zásobný roztok Cd^{2+} a Ni^{2+} , pomôcky pre prípravu homogénátov (automatické pipety, eppendorfove skúmavky, trecie misky s tlčikmi, morský (inertný) piesok), 50 mM fosfátový tlmivý roztok (pH 7), 0,2% roztok H_2O_2 , koncentrovaný guajakol.

Postup: Rastliny exponujeme Cd a Ni v koncentrácii 60 μM počas 3 dní. Homogénaty pripravíme z koreňového pletiva rovnako ako v úlohe 1.1. Pre vlastné meranie pipetujeme do kyvety 3,16 ml fosfátového tlmivého roztoku, 0,3 ml 0,2% H_2O_2 , 20 μl guajakolu a reakciu zahájime pridaním 20 μl supernatantu. Obsah premiešame preklopením kyvety a okamžite zaznamenáme počiatočnú absorbanciu pri 470 nm. Po uplynutí jednej minúty opätovne zaznamenáme absorbanciu (nárast v dôsledku oxidácie guajakolu). V závislosti ak riedenia vzorky môže ΔA prekročiť hodnotu 1, potom nariedime supernatant pred vlastným meraním. Týmto spôsobom stanovíme rozpustnú formu POD. Keďže POD sa vyskytujú aj asociované s bunkovou stenou, kde katalyzujú oxidáciu lignínových prekursorov, je možné uvedení metodiku použiť aj pre stanovenie viazanej („bound“) POD. Supernatant po stanovení voľnej POD vylejeme a opakovane rozpúšťame sediment vo fosfátovom tlmivom roztoku dovtedy, kým nebude aktivita nulová. Potom pridáme 2 ml 1 M NaCl a necháme v chladničke (asi 4 °C) 30 min. Stanovenie realizujeme ako bolo popísané vyššie.

Vyhodnotenie: Určíme rozdiel absorbancií $A_{1\text{min}} - A_{0\text{min}}$ a ďalší výpočet realizujeme s použitím mólového absorpčného koeficientu 25,5 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Aktivitu vyjadríme ako $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteínov (obsah proteínov stanovíme ako bolo popísané v predchádzajúcej úlohe). Štatisticky porovnáme Cd- a Ni-exponované korene, rozpustnú a viazanú formu POD a výsledky spracujeme do grafickej podoby s vyznačením signifikancie rozdielov (kapitola 8).

1.4. Stanovenie aktivity askorbát peroxidázy

Princíp: Askorbát peroxidáza (APX, EC 1.11.1.11) je prítomná vo všetkých živých organizmoch (patrí do triedy I peroxidáz spomenutých vyššie). Má μM afinitu k H_2O_2 (jemná regulácia hladiny H_2O_2) a uplatňuje sa teda v signálnej úlohe ROS. Nachádza sa v chloroplastoch (stromálna a tylakoidná), mitochondriách, mikrotelieskach a cytoplazme. Jej aktivitu možno stanoviť ako oxidáciu askorbátu (sledujeme pokles absorbancie pri 290 nm).

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka, 3 mM zásobné roztoky Cr^{3+} a Al^{3+} , pomôcky pre prípravu homogenátov (automatické pipety, eppendorfove skúmavky, trecie misky s tĺčkami, morský (inertný) piesok), 50 mM fosfátový tlmivý roztok (pH 7), 0,5 mM roztok kyseliny askorbovej, 250 mM roztok H_2O_2 .

Postup: Rastliny exponujeme chrómu a hliníku v koncentrácii 120 μM (tieto kovy majú všeobecne nízku toxicitu) počas 5 dní. Korene opláchneme, osušíme filtračným papierom a homogenáty pripravíme rovnako ako v úlohe 1.1. Pre stanovenie pipetujeme do sklenej kvety 2 ml fosfátového tlmivého roztoku, 0,55 ml zásobného roztoku askorbátu, 0,225 ml zásobného roztoku peroxidu vodíka a reakciu zahájime pridaním 0,225 ml supernatantu. Pokles absorbancie sledujeme v priebehu 1 minúty. Zaznamenáme počiatočnú a konečnú absorbanciu.

Vyhodnotenie: Určíme rozdiel absorbancií $A_{0\text{min}} - A_{1\text{min}}$ a ďalší výpočet realizujeme s použitím mólového absorpčného koeficientu $2,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Aktivitu vyjadríme ako $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteínov. Štatisticky porovnáme Cr- a Al-exponované korene a výsledky spracujeme do grafickej podoby s vyznačením signifikancie rozdielov (kapitola 8).

1.5. Stanovenie aktivity glutatión reduktázy

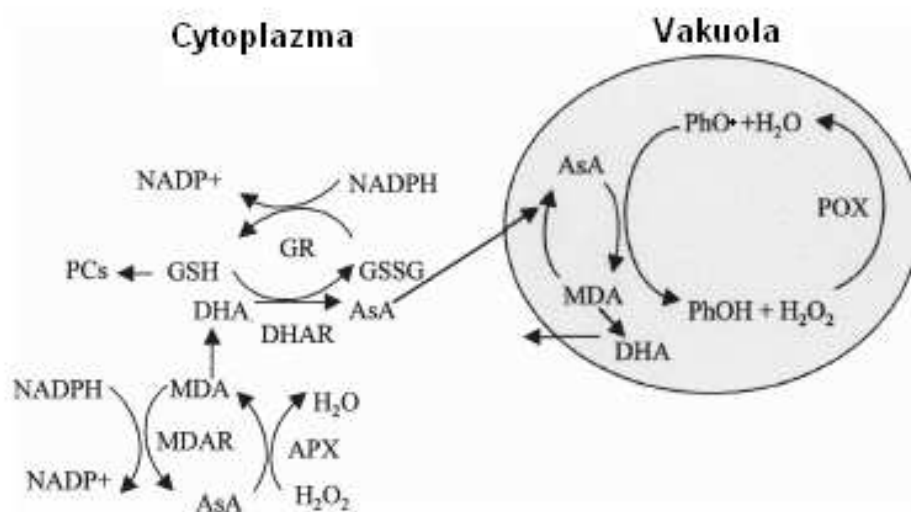
Princíp: Glutatión reduktáza (GR, EC 1.8.1.7) je enzým potrebný pre regeneráciu glutatiónu, t.j. pre jeho redukciu (z GSSG na GSH, Obr. 2, pozri tiež úloha 5.2.). Redukovaný glutatión je potrebný pre fungovanie askorbát-glutatiónového cyklu i pre syntézu fytochelatinov (Obr. 2). Aktivitu GR možno stanoviť ako nárast absorbancie v dôsledku vzniku redukovaného glutatiónu, ktorý reaguje s 5,5''-ditiobis(2-nitrobenzoovou kyselinou) za vzniku 5-tio(2-nitrobenzoovej kyseliny).

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka, 3 mM zásobný roztok Cd^{2+} , pomôcky pre prípravu homogenátov (automatické pipety, eppendorfove skúmavky, trecie misky s tĺčkami, morský (inertný) piesok), 100 mM fosfátový tlmivý roztok (pH 7,5): zložky do

reakčnej zmesi pripravíme rozpustením v tomto tlmivom roztoku, konkrétne 1 mM 5,5''-ditiobis(2-nitrobenzoová kyselina), 1 mM oxidovaný glutatión (GSSG), 0,1 mM NADPH.

Postup: Rastliny exponujeme kadmium v koncentrácii 120 μM počas 24 h. Korene opláchneme, osušíme filtračným papierom a homogenáty pripravíme rovnako ako v úlohe 1.1. (použijeme však silnejší tlmivý roztok – 100 mM). Pre stanovenie pipetujeme do kyvety 0,98 ml roztoku 5,5''-ditiobis(2-nitrobenzoovej kyseliny), 0,98 ml roztoku oxidovaného glutatiónu a 0,98 ml roztoku NADPH. Reakciu zahájime pridaním 0,06 ml supernatantu. Nárast absorbancie sledujeme v priebehu 2 minút pri 412 nm. Zaznamenáme počiatočnú a konečnú absorbanciu.

Vyhodnotenie: Určíme rozdiel absorbancií $A_{1\text{min}} - A_{0\text{min}}$ a ďalší výpočet realizujeme s použitím mólového absorpčného koeficientu $14,15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Aktivitu vyjadríme ako $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteínov. Štatisticky porovnáme kontrolné a Cd-exponované korene a výsledky spracujeme do grafu s vyznačením signifikancie rozdielov (kapitola 8).



Obr. 2. Predpokladaný fenol-askorbátový cyklus detoxifikácie peroxidu vodíka v rastlinných bunkách (podľa práce Sgherri et al. 2003). PhOH – fenol, PhO• – fenolový radikál, POX – peroxidázy, APX – askorbát peroxidáza, AsA – askorbát, MDA – monodehydroaskorbát, MDAR – monodehydroaskorbát reduktáza, DHA – dehydroaskorbát, DHAR – dehydroaskorbát reduktáza, GSH – redukovaný glutatión, GSSG – oxidovaný glutatión, GR – glutatión reduktáza, PCs – fytochelatíny.

1.6. Stanovenie aktivity glutatión S-transferázy

Princíp: Glutatión S-transferázy (GSTs, EC 2.5.1.18) zahŕňajú skupinu takmer 100 rôznych izoenzýmov. To naznačuje ich významnú úlohu v metabolizme rôznych živých organizmov.

Katalyzujú spojenie atómu síry glutatiónu s elektrofilnou časťou molekúl rôznych substrátov, tieto komplexy sa potom ukladajú vo vakuolách. Katalyzujú tiež GSH-dependentnú izomerizáciu a redukciu organických hydroperoxidov. Ich aktivita je často spojená s odpoveďou rastlín na rôzne abiotické a biotické stresové faktory a zároveň zohrávajú dôležitú úlohu počas prirodzeného vývinu rastlín. Ich význam v tolerancii voči kovom nie je jednoznačne známy, pozoroval sa však nárast aktivity GST napr. pri nadbytku niklu.

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka, 3 mM zásobný roztok Ni^{2+} a Cd^{2+} , pomôcky pre prípravu homogenátov, 50 mM fosfátový tlmivý roztok (pH 7), 1 mM redukovaný glutatión (GSH), 0,5 mM 1,2-dichlóro-4-nitrobenzén (DCNB), 1 mM 1-chlóro-2,4-dinitrobenzén (CDNB).

Postup: Rastliny exponujeme kovom v koncentrácii 120 μM počas 24 h. Korene opláchneme, osušíme filtračným papierom a homogenáty pripravíme rovnako ako v úlohe 1.1. Reakčnú zmes obsahujúcu supernatant a GSH iniciujeme pridaním DCNB alebo CDBN. Nárast absorbanie sledujeme v priebehu 5 minút pri 345 nm (DCNB) alebo 340 nm (CDNB). Zaznamenáme počiatočnú a konečnú absorbanciu.

Vyhodnotenie: Aktivita GST sa stanoví s použitím hodnôt ϵ 8,5 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pre DCNB a 9,6 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pre CDBN a vyjadrí ako $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteínov. Štatisticky porovnáme kontrolné a kov-exponované korene a spracujeme výsledky (kapitola 8).

2. Reaktívne formy kyslíka

Reaktívne formy kyslíka (anglicky Reactive Oxygen Species – ROS) zahŕňajú radikály s nespáreným elektrónom (typicky superoxidový aniónový radikál $\text{O}_2\cdot^-$ a hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$). Patrí sem aj peroxid vodíka, hoci v chemickom zmysle slova to radikál nie je. Najtoxickjšou formou ROS je hydroxylový radikál, ktorý môže iniciovať peroxidáciu lipidov v membránach (pozri kapitolu 4). ROS sa tvoria vo všetkých aerobných organizmoch napr. v miestach prenosu elektrónov (mitochondrie a chloroplasty), ale tiež špecifickými enzýmami, napr. rôznymi oxidázami. Výskumom sa zistilo, že ROS nie sú len negatívne pôsobiace molekuly, ale regulujú aj expresiu génov, rast (uvoľňovanie bunkovej steny), interakciu s patogénmi a podobne. Nárast ich obsahu v stresových podmienkach však môže prekročiť kapacitu účinnosti antioxidačných enzýmov, čím sa stávajú významnou príčinou poškodenia biomakromolekúl a pri dlhodobom pôsobení až smrti organizmov.

2.1. Spektrofotometrické stanovenie peroxidu vodíka

Princíp: Pre spektrofotometrické stanovenie peroxidu vodíka existuje niekoľko rôznych metód, napr. reakcia s roztokom TiCl_4 alebo KI, ktoré sa pridajú ku supernatantom, alebo precipitácia supernatantu s roztokom $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ a amoniakom a rozpustenie vzniknutej zrazeniny v H_2SO_4 . Pre optimalizovanie stanovenia peroxidu vodíka v jednotlivých druhoch rastlín je preto vhodné najskôr porovnať tieto metódy (keďže spektrofotometrické stanovenie dáva možnosť interferencie iných látok). Obsah H_2O_2 v rôznych druhoch rastlín sa obvykle pohybuje v jednotkách až desiatkach μmol na gram suchej hmotnosti. Princípom stanovenia je tvorba napr. žltó sfarbeného komplexu peroxidu vodíka s iónmi titánu.

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka kamilkového (pre hydroponickú kultiváciu rastlín pozri „Návody na cvičenia z fyziológie rastlín“ – Repčák a kolektív 2009), 3 mM zásobný roztok Cu^{2+} , automatické pipety, eppendorfove skúmavky (1,5 ml), trecie misky s tlčkami, morský (inertný) piesok, 50 mM fosfátový tlmivý roztok (pH 7), 0,5% roztok TiCl_4 v 20% H_2SO_4 , 1 M roztok KI (pripravuje sa čerstvý), 5% roztok $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ v 20% H_2SO_4 , 19% roztok amoniaku, 2 M roztok H_2SO_4 , sklená kyveta (hrúbka 1 cm), koncentrovaný H_2O_2 .

Postup: Rastliny rumančeka exponujeme roztoku medi v koncentrácii 120 μM počas 24 h. Potom rastliny rozdelíme na listy a korene, pričom korene opatrne osušíme filtračným papierom. Známe množstvo biomasy homogenizujeme s malým množstvom morského piesku vo fosfátovom tlmivom roztoku vo vychladenej trecej miske (výsledné riedenie asi 1 g č. hm. na 5 ml tlmivého roztoku) a prenesieme do eppendorfovej skúmavky. Vzorky ihneď centrifugujeme vo vychladenej centrifúge (15 min. pri 4°C a 15 000 rpm). Niektorí autori tiež uvádzajú pre prípravu homogenátov použitie 0,1% roztoku kyseliny trichlóroctovej. Ďalší postup závisí od použitej metódy:

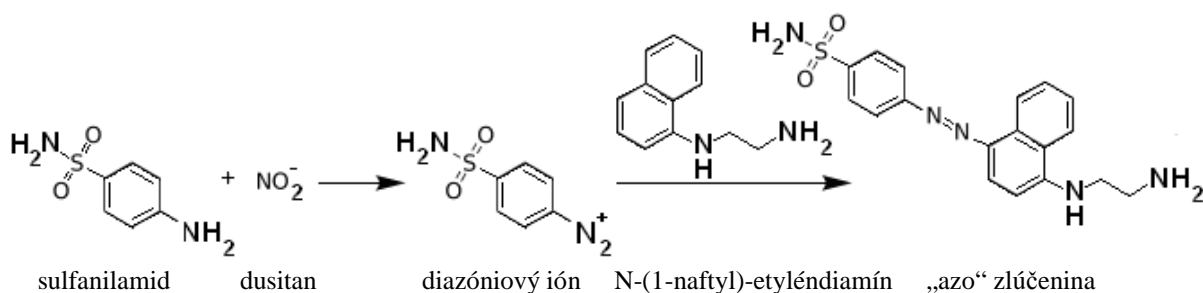
1. stanovenie H_2O_2 s roztokom TiCl_4 : ku 1 ml supernatantu pridáme 0,5 ml 0,5% roztok TiCl_4 v 20% H_2SO_4 (uvedené činidlo je dlhodobo stabilné), premiešame a opätovne centrifugujeme za vyššie uvedených podmienok. Absorbancia sa meria pri 410 nm oproti blanku, ktorý namiesto supernatantu obsahuje rovnaký objem fosfátového tlmivého roztoku.
2. stanovenie H_2O_2 s roztokom KI: ku 0,5 ml supernatantu pridáme 1 ml roztoku KI, premiešame a opätovne centrifugujeme za vyššie uvedených podmienok. Absorbancia sa meria pri 390 nm oproti blanku, ktorý namiesto supernatantu obsahuje rovnaký objem fosfátového tlmivého roztoku.
3. stanovenie H_2O_2 s roztokom $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$: ku 1,2 ml supernatantu pridáme 0,1 ml roztoku $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ a 0,2 ml 19% roztoku amoniaku. Centrifugujeme, supernatant vylejeme a sediment rozpustíme v 3 ml 2 M H_2SO_4 . Absorbancia sa meria pri 415 nm (blank 2 M H_2SO_4).

Vyhodnotenie: Obsah H_2O_2 určíme z kalibračného grafu, ktorý pripravíme nariadením známych koncentrácií z koncentrovaného peroxidu vodíka a ďalej postupujeme rovnako ako pri vzorkách (v závislosti od použitej metódy). Štatisticky porovnáme obsah peroxidu vodíka v kontrolných a kov-exponovaných rastlinách a spracujeme do grafickej podoby (kapitola 8).

2.2. Spektrofotometrické stanovenie superoxidového radikálu

Princíp: Superoxidový radikál (presnejšie superoxidový aniónový radikál) je možné kvantitatívne nepriamo stanoviť reakciou s hydroxylamínom, čím vzniká dusitan (nitrit). Obsah nitritu sa potom kvantifikuje po pridaní sulfanilamidu a naftylamínu tzv. Griessovou reakciou (Obr. 3). Uvedenou reakciou je teda možné kvantifikovať aj dusitan/nitrit (bez prídania hydroxylamínu). Nakoľko obsah nitritu je v rastlinách v prirodzených podmienkach nízky, skreslenie kvôli obsahu nitritu sa považuje za zanedbateľné, alebo sa do blanku pridá supernatant, ale bez prídavku hydroxylamínu. Obsah superoxidu stanovený touto metódou sa pohybuje rádovo do desiatok μg na gram suchej hmotnosti.

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka kamilkového, $60 \mu\text{M}$ roztok Cu^{2+} , automatické pipety, eppendorfove skúmavky, trecie misky s tĺčkami, morský (inertný) piesok, 50 mM fosfátový tlmivý roztok (pH 7), 10 mM roztok hydroxylamínu, 17 mM roztok sulfanilamidu, 7 mM roztok α -naftylamínu (posledne tri menované roztoky skladujeme v tmavých nádobách so zábrusom a s výnimkou sulfanilamidu aj v chladničke), dietyléter.



Obr. 3. Mechanizmus Griessovej reakcie: dusitan (nitrit) reaguje so sulfanilamidom a N-(1-naftyl)-etyléndiamínom za vzniku „azo“ farbiva s absorpčným maximom pri 546 nm. V prípade použitia α -naftylamínu je absorpčné maximum pri 530 nm (α -naftylamín je možné použiť namiesto N-(1-naftyl)-etyléndiamínu; typické komerčné Griessove činidlo obsahuje 0,2% N-(1-naftyl)-etyléndiamín dihydrochlorid a 2% sulfanilamid). Upravené podľa http://en.wikipedia.org/wiki/Griess_test.

Postup: Rastliny rumančeka exponujeme roztoku medi počas 24 h. Vzorky pripravíme vo fosfátovom tlmivom roztoku rovnako ako v predchádzajúcej úlohe. K 0,27 ml fosfátového

tlmivého roztoku pridáme 0,03 ml roztoku hydroxylamínu a 0,3 ml supernatantu. Premiešame a po 15 min. pridáme 0,3 ml sulfanylamiidu a po premiešaní opäť necháme reagovať pri laboratórnej teplote 15 min. Pridáme 0,3 ml naftylamínu a po premiešaní opäť necháme reagovať 15 min. Na záver pridáme 0,3 ml dietyléteru (výsledný objem reakčnej zmesi je teda 1,5 ml, celú reakčnú zmes pripravujeme v 1,5 ml eppendorfových skúmavkách). Výsledná reakčná zmes je svetlo- až tmavoružovej farby (v závislosti od obsahu vytvoreného dusitanu). Vyhodnotenie: Absorbanciu meriame pri 530 nm v sklenej kyvete (kvôli pridaniu dietyléteru) a obsah superoxidu určíme z kalibračnej krivky pripravenej s rôznymi koncentraciami NaNO_2 (namiesto supernatantu v reakčnej zmesi). Štatisticky porovnáme obsah superoxidu v kontrolných a Cu-exponovaných rastlinách a spracujeme do stĺpcového grafu s vyznačením signifikancie zistených rozdielov.

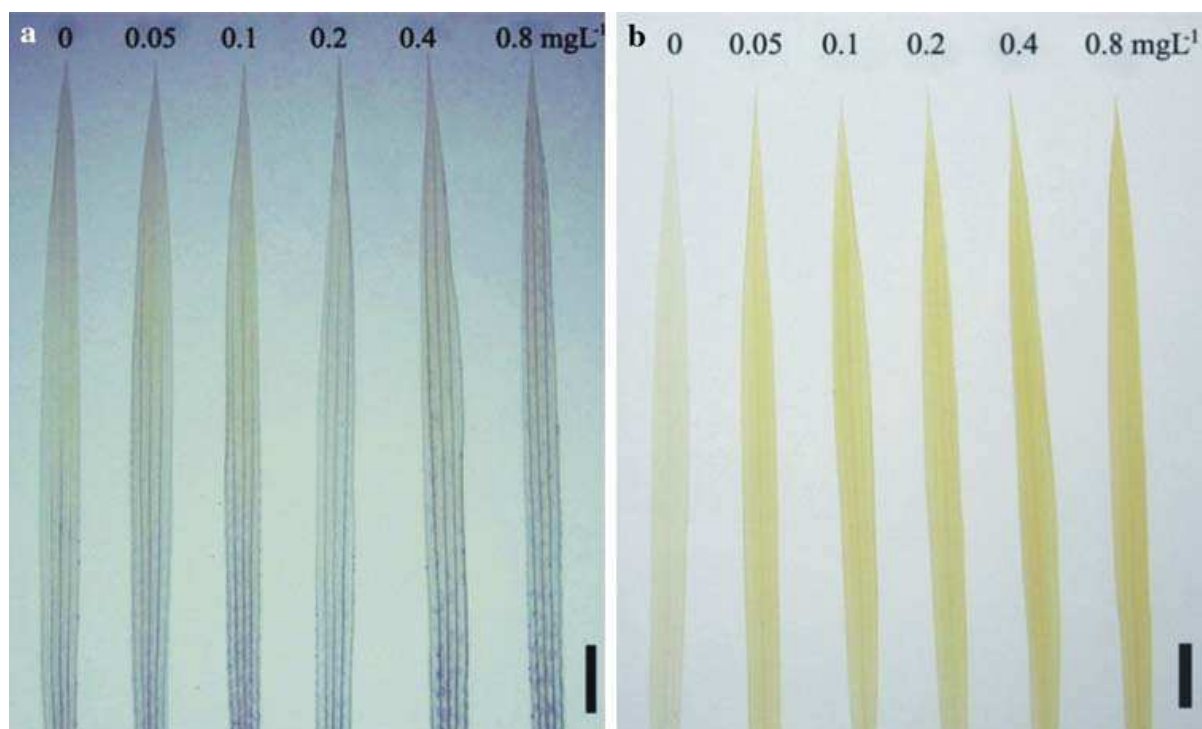
2.3. Histochemická vizualizácia peroxidu vodíka a superoxidu

Princíp: Superoxidový aniónový radikál reaguje so žltým nitroblue tetrazolium chloridom (NBT) za vzniku tmavomodrého nerozpustného formazánu. Peroxid vodíka možno vizualizovať reakciou s 3,3'-diaminobenzidínom (DAB) za vzniku žlto-hnedého produktu (Obr. 4). V prípade použitia listov je potrebné zelený prekryv kvôli prítomnosti chlorofylu odstrániť ponorením do vriaceho etanolu (Obr. 4).

Pomôcky: semená kukurice, Petriho misky, roztoky rôznych kovov (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}) s koncentraciou 10 μM , laboratórne sklo (kadičky a odmerné valce), nožnice, 10 mM sodno-citrátový tlmivý roztok (pH 6,0) obsahujúci 6 mM NBT, 0,1% roztok DAB v 50 mM Tris-HCl tlmivom roztoku (pH 3,8), etanol (95%).

Postup: Homogénne niekoľkodňové klíčence kukurice predpestované na Petriho miskách preložíme do vyšších kadičiek a exponujeme počas 24 h vybraným roztokom kovov (plus príslušná kontrola bez prídavku kovov, t.j. iba destilovaná voda). Potom odstrihneme plne vyvinuté listy a umiestnime ich do vyšších valcov (asi 100 ml), pričom listy neponoríme úplne do jednotlivých roztokov, zalejeme ich len asi 2 cm nad reznú plochu (aby sa zabezpečil normálny príjem farbivých roztokov transpiračným prúdom do všetkých častí listu). Listy necháme pri bežnom osvetlení a bežnej laboratórnej teplote ($\sim 20\text{-}25\text{ }^\circ\text{C}$) v týchto roztokoch 6 – 8 h (podľa druhu rastliny a štruktúry listu aj dlhšie). Potom odstránime zelené zafarbenie listov ponorením do vriaceho 95% etanolu na približne 10 minút.

Vyhodnotenie: Na základe získaných výsledkov (intenzity sfarbenia) posúdime vplyv rôznych kovov na tvorbu superoxidového radikálu a peroxidu vodíka.



Obr. 4. Histochemická vizualizácia akumulácie superoxidového radikálu (a) a peroxidu vodíka (b) v listoch ryže exponovanej rôznym dávkam herbicídu fluroxypyr počas 6 dní (prevzaté z práce Wu et al. 2010, *Ecotoxicology* 19: 124-132). Úsečka predstavuje 5 mm.

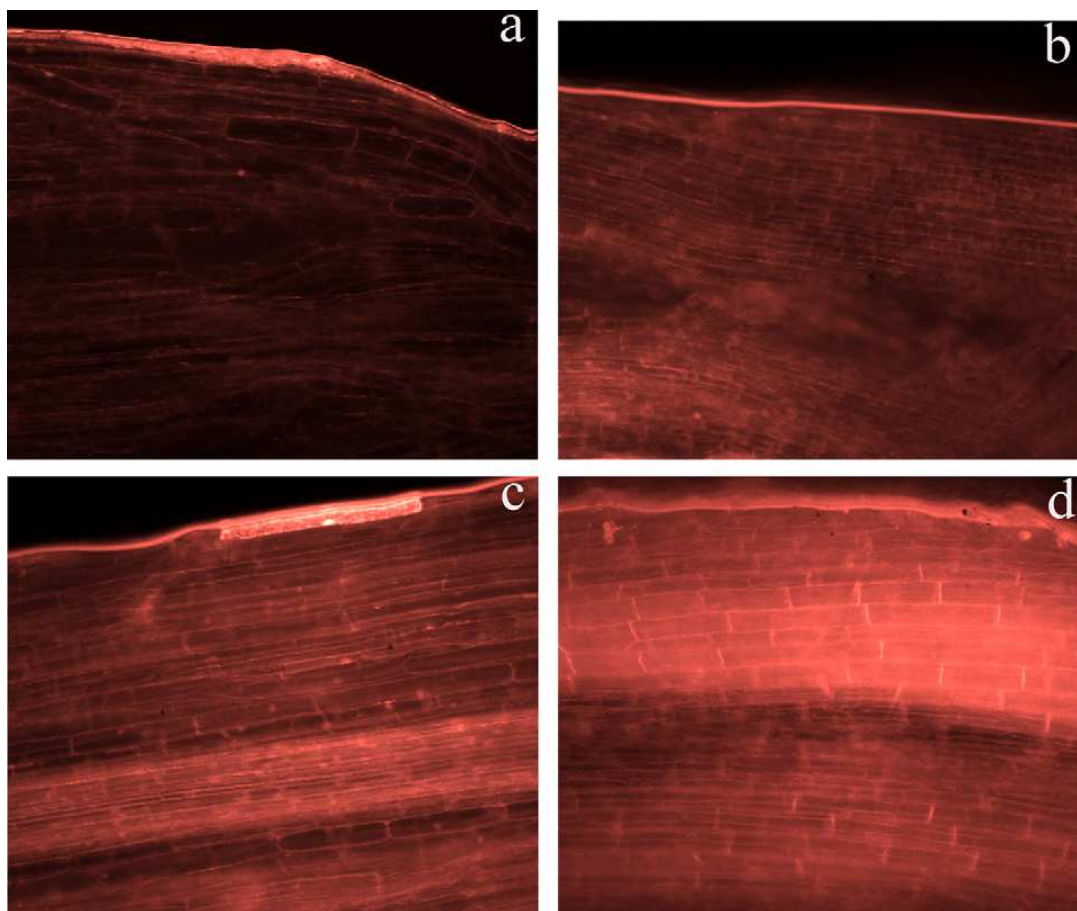
2.4. Fluorescenčná vizualizácia peroxidu vodíka

Princíp: Modernou metódou pre vizualizáciu prítomnosti peroxidu vodíka v pletivách je použitie fluorescenčných farbív. Najpoužívanejším je farbivo 2',7'-dichlorofluoresceín-diacetát (DCF-DA, Obr. 5), ktoré vstupuje do buniek, nevýhodou je vysoká cena tejto látky. Kvantitatívne je možné obsah H_2O_2 stanoviť napr. s použitím „kitu“ obsahujúceho fluorescenčné farbivo „AmplexRed“. Fluorescencia sa vždy jednoduchšie deteguje v koreňoch, nakoľko v listoch je potrebné eliminovať autofluorescenciu chlorofylu.

Pomôcky: klíčence pšenice, 1, 2 a 4 mM roztok $Pb(NO_3)_2$, 30 μM roztok DCF-DA v 10 mM Tris-HCl tlmivom roztoku (pH 7,4), automatické pipety, inkubátor, fluorescenčný mikroskop (napr. značky Leica, dostupný na Ústave biologických a ekologických vied, Katedra bunkovej biológie).

Postup: Klíčence pšenice exponujeme na Petriho miskách vyššie uvedeným koncentráciám olova. Po uplynutí expozičného času korene opláchneme v destilovanej vode a porovnateľné jedince z jednotlivých variantov preniesieme do 30 μM roztoku DCF-DA v 10 mM Tris-HCl

tlmivom roztoku. Inkubujeme aspoň 1 hodinu pri 25 °C v tme. Nadbytok farbiva potom vymyjeme aspoň 2 x 15 min. v rovnakom tlmivom roztoku. Pracujeme v zatemnenej miestnosti, aby sa eliminovala strata fluorescencie farbiva. Pre vytvorenie priečnych rezov listov alebo koreňov je možné fragmenty pletiva fixovať v 30% polyakrylamide a narezat' na mikrotóme. Fluorescenciu peroxidu vodíka pozorujeme s použitím vyššie uvedeného mikroskopu s excitáciou pri 485 nm a emisiou pri 530 nm. Vhodné je tiež použiť negatívnu kontrolu, napr. inkubáciu vzoriek v 1 mM roztoku kyseliny askorbovej (odstraňuje peroxid vodíka).



Obr. 5. Vizualizácia H₂O₂ s použitím DCF-DA farbiva v koreňoch pšenice exponovanej 0 (a), 1 (b), 2 (c) a 4 (d) mM olova počas 6 dní a s použitím fluorescenčného mikroskopu Leica (prevzaté z práce Yang et al. 2010, Ecotox. Environ. Safe. 73: 1982-1987).

Vyhodnotenie: Na základe intenzity zafarbenia preparátov posúdime vplyv olova na indukciu akumulácie peroxidu vodíka v koreňoch.

3. Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je jednoduchá zlúčenina dusíka, ktorej úloha v metabolizme živých organizmov sa skúma relatívne krátko (asi od 80. rokov 20. storočia, od roku 1992 existuje Nitric Oxide Society a špeciálny časopis). Zistila sa jeho úloha v mnohých metabolických procesoch, pričom jeho účinky možno všeobecne charakterizovať ako pozitívne (exogénna aplikácia NO v rôznych druhoch rastlín zmierňuje príznaky poškodenia v dôsledku rôznych stresových vplyvov). Obsah NO možno stanoviť rôznymi metodikami, napr. nepriamo klasickou Griessovou reakciou. Pre vizualizáciu obsahu NO bolo vyvinutých niekoľko účinných fluorescenčných farbív.

3.1. Spektrofotometrické stanovenie oxidu dusnatého

Princíp: Nakoľko NO je reaktívna molekula s krátkou životnosťou (3-5 s), veľmi často sa jeho obsah stanovuje nepriamo, t.j. na základe obsahu jeho stabilnejších produktov, vznikajúcich jeho oxidáciou. Jednou z týchto zlúčenín je dusitan (nitrit). Princíp stanovenia je teda rovnaký ako v prípade vyššie spomínaného stanovenia superoxidu (vznik nitritu z hydroxylamínu), t.j. prostredníctvom detekcie nitritu Griessovou reakciou (Obr. 3). Nitrit vzniká aj po aplikácii PTIO (2-fenyl-4,4,5,5-tetrametyl-imidazolín-1-oxyl-3-oxid, odstraňuje NO), preto sa pri aplikácii tejto látky paradoxne pozoruje nárast obsahu NO ak sa kvantifikuje Griessovou reakciou. Uvedené fakty podčiarkujú význam poznania mechanizmu reakcií pre detekciu akéhokoľvek parametra s cieľom predpokladať možné interferencie. Obsah NO stanovený touto metodikou vychádza v rumančeku nižší ako obsah superoxidu stanovený rovnakým činidlom (úloha 2.2.) a pohybuje sa v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ č. hm.

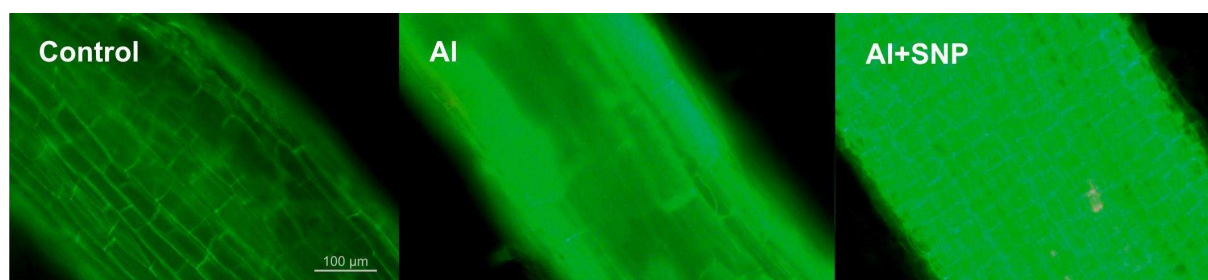
Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka, 0,6 mM roztok Al^{3+} , 50 mM sodno-acetátový tlmivý roztok (pH 3,6) obsahujúci 4 % octanu zinočnatého, pomôcky pre homogenizáciu (automatické pipety, trecie misky s tlčikmi, inertný piesok).

Postup: Rastliny rumančeka exponujeme na 24 h 0,6 mM roztoku Al. Čerstvú biomasu homogenizujeme v sodno-acetátovom tlmivom roztoku (0,5 g v 5 ml). Alikvótnu časť centrifugujeme (15 min. pri 4 °C a 15 000 rpm) a ku 0,5 ml supernatantu pridáme 0,5 ml Griessovho činidla (pripravíme zmiešaním rovnakých dielov 17 mM roztoku sulfanilamidu a 7 mM roztoku α -naftylamínu). Premiešame a vzorky necháme 30 min. stáť pri laboratórnej teplote. Absorbanciu meriame pri 530 nm (ako prípustný rozsah absorbancií pre detekciu dusitanu touto reakciou sa udáva 520 – 590 nm).

Vyhodnotenie: Obsah NO určíme ako množstvo dusitanu z kalibračnej krivky pripravenej s rôznymi koncentraciami NaNO₂. Štatisticky porovnáme kontrolné a Al-exponované rastliny a výsledky spracujeme do grafickej podoby (kapitola 8).

3.2. Fluorescenčná vizualizácia oxidu dusnatého

Princíp: Oxid dusnatý možno vizualizovať s použitím analógu fluoresceínu podobne ako v prípade fluorescenčnej detekcie peroxidu vodíka. Najbežnejšie sa pre tento účel používa farbivo 4,5-diaminofluoresceín diacetát (DAF-2DA, Obr. 6), hoci aktuálne sa diskutuje o špecifickosti jeho účinku (predpokladá sa napr. interakcia s kyselinou askorbovou a jej dehydroderivátmi). Princípom pôsobenia je reakcia NO a jeho derivátov (napr. N₂O₃) s týmto farbivom, čím vzniká vysoko fluorescenčný „triazó“ produkt.



Obr. 6. Vizualizácia NO s použitím DAF-2DA farbiva v koreňoch rumančeka exponovaných počas 7 dní 60 µM roztoku Al, Al+SNP (nitroprusid sodný) a kontrola („control“) s použitím fluorescenčného mikroskopu Leica (Kováčik et al., nepublikované).

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka, 6 mM zásobný roztok Al, 20 µM roztok DAF-2DA v 10 mM Tris-HCl tlmivom roztoku (pH 7,4), automatické pipety, inkubátor, fluorescenčný mikroskop uvedený pri vizualizácii peroxidu vodíka.

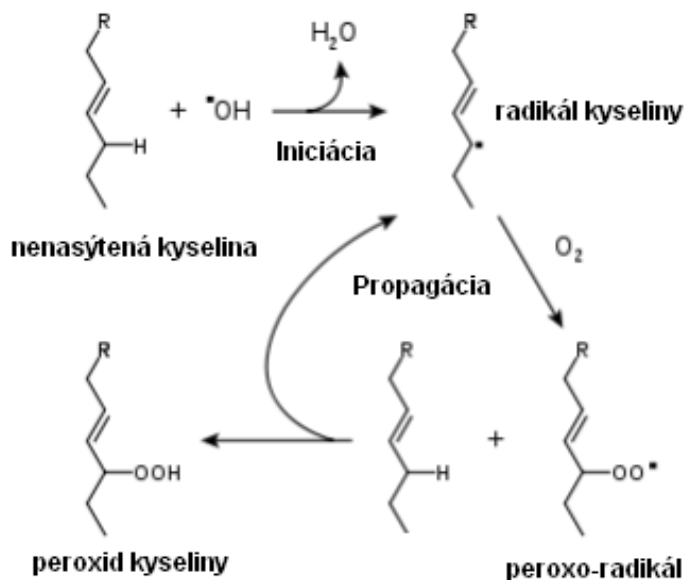
Postup: Rastliny rumančeka exponujeme koncentraciám Al (6-60-600 µM) počas 24 h. Potom korene opláchneme v destilovanej vode a porovnateľné fragmenty koreňov preniesieme do 20 µM roztoku DAF-2DA v 10 mM Tris-HCl tlmivom roztoku. Inkubujeme aspoň 1 hodinu pri 25 °C v tme. Nadbytok farbiva vymyjeme aspoň 2 x 15 min. v rovnakom tlmivom roztoku. Pracujeme v zatemnenej miestnosti, aby sa eliminovala strata fluorescencie farbiva. Fluorescenciu NO pozorujeme s použitím vyššie uvedeného mikroskopu s excitáciou pri 495 nm a emisiou pri 515 nm. Vhodné je tiež použiť pozitívnu a negatívnu kontrolu, napr.

inkubáciu vzoriek v roztoku nitroprusidu sodného (SNP, uvoľňuje NO) a v roztoku PTIO, ktorý odstraňuje NO.

Vyhodnotenie: Na základe intenzity zafarbenia koreňov posúdime vplyv hliníka na indukciu akumulácie NO v rumančeku.

4. Oxidačné poškodenie lipidov

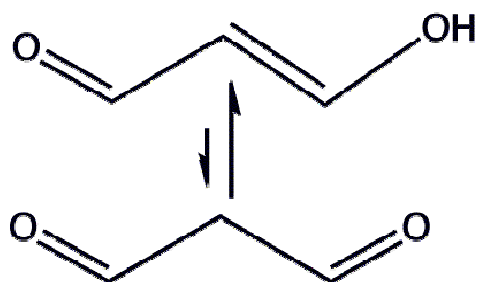
Oxidačná degradácia lipidov sa často označuje ako „lipidická peroxidácia“ alebo „peroxidácia membránových lipidov“. Princípom je atakovanie reťazcov mastných kyselín, obvykle nenasýtených mastných kyselín reaktívnymi formami kyslíka, primárne hydroxylovým radikálom (Obr. 7), pričom napr. superoxidový radikál nie je dostatočne účinný na iniciáciu tohto procesu. Mechanizmus oxidačného poškodenia lipidov prebieha formálne v troch stupňoch: 1. iniciácia (hydroxylový radikál získava atóm vodíka z mastnej kyseliny, čím vzniká radikál mastnej kyseliny), 2. šírenie/propagácia (adícia kyslíka na radikál mastnej kyseliny, čím vzniká peroxy-radikál a tento získava atóm vodíka z iného reťazca mastnej kyseliny za vzniku peroxidu na jednom reťazci a radikálu na novom reťazci), 3. ukončenie/terminácia nastáva, ak spolu reagujú dva radikály, alebo ak atóm vodíka poskytne látka, ktorá je v stave radikálu menej toxická (napr. kyselina askorbová je v oxidovanom stave prakticky nereaktívna a rýchlo sa regeneruje askorbát-glutatiónovým cyklom). Iniciáciu peroxidácie procesu môže inhibovať napr. vitamín E.



Obr. 7. Generalizovaný model peroxidácie membránových lipidov (zdroj: http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_peroxidation).

4.1. Stanovenie malondialdehydu

Princíp: Malondialdehyd (MDA, Obr. 8) je hlavný degradačný produkt polynenasýtených mastných kyselín (pravdaže vzniká aj množstvo iných minoritných aldehydov). MDA je reaktívna zlúčenina, ktorá môže atakovať napr. dusíkaté bázy v DNA. Je majoritnou látkou, ktorá reaguje s kyselinou 2-tiobarbiturovou (TBA) a preto sa stanovenie MDA presnejšie označuje aj ako „TBARS“ (Tio-Barbituric Acid Reactive Substances). Obsah MDA sa bežne prezentuje ako parameter „sily“ testovaného stresového vplyvu. Obsah TBARS sa v kontrolných rastlinách pohybuje rádovo v $\mu\text{mol.g}^{-1}$ s. hm. Je tiež nutné poznamenať, že od zavedenia tejto metodiky (r. 1968) vznikli rôzne modifikácie, napr. korekcia na obsah antokyánov, ktoré tiež môžu reagovať s TBA a tým zvyšovať obsah MDA (napr. v rastlinách červenej kapusty). Preto je potrebné pri použití na novom rastlinnom objekte porovnať rôzne spôsoby stanovenia.



Obr. 8. MDA existuje v *cis* a *trans* forme, *trans* forma je bežnejšia vo vodných roztokoch (prevzaté z <http://en.wikipedia.org/wiki/Malondialdehyde>).

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka, 120 μM roztok Cu^{2+} , 0,1% roztok kyseliny trichlóroctovej (TCA), 0,5% roztok kyseliny 2-tiobarbiturovej v 20% TCA (pre rozpustenie TBA je potrebné mierne zahrievať), automatické pipety, trecie misky s tlčíkmi, inertný piesok, eppendorfove skúmavky, sklené skúmavky.

Upozornenie: pracujeme v chirurgických rukaviciach a dostatočne vetráme, keďže TBA dráždi oči, dýchacie cesty a pokožku.

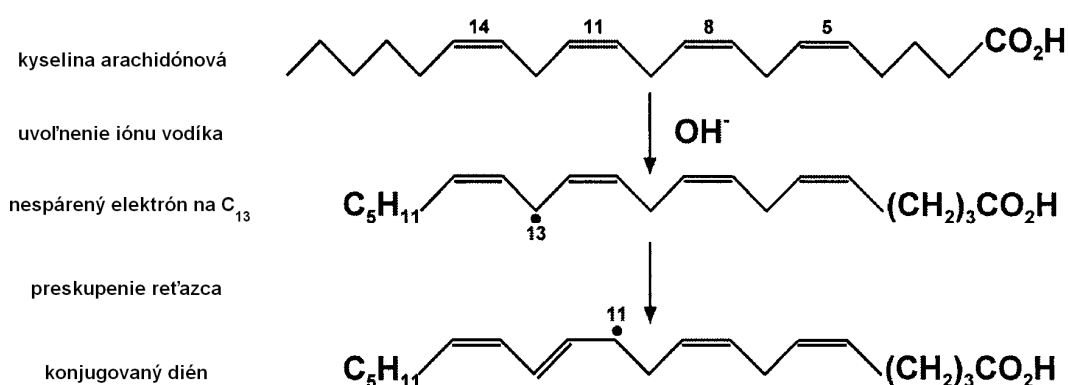
Postup: Rastliny rumančeka exponujeme roztoku medi počas 24 h. Známe množstvo biomasy homogenizujeme v trecej miske s malým množstvom inertného piesku v 0,1% roztoku kyseliny trichlóroctovej (0,2 g č. hm./2 ml). Centrifugujeme (15 min., 20 °C, 15 000 rpm) a 0,5 ml supernatantu preniesieme do sklenenej skúmavky. Pridáme 1,5 ml roztoku TBA v TCA, skúmavku zakryjeme kúskom alobalu a zahrievame na vodnom kúpeli alebo v sušiarňi 20 min. pri 90 °C. Potom skúmavky prudko ochladíme ponorením do vody s ľadovou drťou. Vzorky centrifugujeme a po zohriatí na laboratórnu teplotu meriame absorbanciu pri 532 nm

(komplex MDA-TBA) a 600 nm (korekcia nešpecifického zákalu). Blank (namiesto supernatantu použijeme rovnaký objem 0,1% roztoku TCA) inkubujeme spolu so vzorkami.

Vyhodnotenie: Obsah MDA resp. TBARS určíme ako rozdiel absorbancie $A_{532} - A_{600}$ s použitím mólového absorpčného koeficientu $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Výsledky na základe známeho riedenia vyjadríme ako $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ č. hm. a v prípade stanovenia percenta sušiny prepočítame na g s. hm. (čo je fyziologicky presnejšie, keďže rôzne stresové vplyvy obvykle znižujú obsah vody v pletive). Štatisticky porovnáme obsah MDA v kontrolných a Cu-exponovaných rastlinách a spracujeme do stĺpcového grafu s vyznačením signifikancie zistených rozdielov.

4.2. Stanovenie konjugovaných diénov

Princíp: Konjugované diény sú štruktúry v rámci reťazca uhlíkov, ktoré obsahujú dve dvojité väzby oddelené jednoduchou väzbou. Typicky vznikajú po ataku hydroxylového radikálu na reťazec polynenasýtenej mastnej kyseliny (obsahujúcej viacero dvojitých väzieb), čím sa uvoľní vodík a vytvorený radikál mastnej kyseliny má tendenciu stabilizovať sa preskupením väzieb; tým sa do kontaktu na vzdialenosť jednej jednoduchej väzby dostanú dve dvojité väzby (Obr. 9). Ďalší mechanizmus poškodenia je už rovnaký, ako bolo uvedené v Obr. 7 (vznik peroxy-radikálu po adícii kyslíka). Vznik konjugovaných diénov teda predstavuje prvý krok oxidačného poškodenia lipidov. Nie všetky konjugované diény sú škodlivé, napr. β -karotén je z chemického hľadiska konjugovaný polyén.



Obr. 9. Schéma vzniku konjugovaného diénu v reťazci kyseliny arachidónovej (upravené z práce Taylor et al. 2004, J. Exp. Bot. 55: 1-10).

Pomôcky: rastliny rumančeka exponované medi ako bolo uvedené v predchádzajúcej úlohe, pomôcky ku príprave homogenátov (pipety, trecie misky, inertný piesok), metanol, EDTA, chloroform, NaCl.

Postup: Známe množstvo biomasy homogenizujeme v trecej miske s malým množstvo morského piesku s prídavkom 3 ml metanolu, 100 mg EDTA, 3 ml chloroformu a 3 ml 5 mM EDTA v 1% roztoku NaCl. Alikvótnu časť prenesieme do sklenených skúmaviek a centrifugujeme 10 min. pri 4°C a 4 000 rpm. Potom sa chloroformová frakcia odparí do sucha v prostredí N₂ a suchý zvyšok sa rozpustí v čistom metanole. Absorbanciu meriame v sklenej kyvete pri 234 nm (metanol ako blank).

Vyhodnotenie: Výsledky sa na základe známeho množstva biomasy v reakčnej zmesi vyjadria ako absorbancia.g⁻¹ č. hm. Štatisticky sa porovná obsah konjugovaných diénov v kontrolných a Cu-exponovaných rastlinách a spracuje sa do grafu s vyznačením signifikancie rozdielov.

4.3. Stanovenie aktivity lipoxygenázy

Princíp: Lipoxygenázy (LOX, 1.13.11.12) katalyzujú oxygenáciu polyneenasýtených mastných kyselín za vzniku lipohydroperoxidov (pôsobia analogicky ako napr. hydroxylový radikál, Obr. 7). Vyskytujú sa v rastlinách, živočíchoch i hubách. Potvrdila sa ich úloha v senescencii, v odpovediach na sucho a napadnutie patogénmi. Sú kľúčovými enzýmami pri biosyntéze napr. kyseliny jasmónovej v rastlinách a prostaglandínov v živočíchoch. Aktivitu LOX je možné stanoviť ako zmenu absorbancie pri oxidácii kyseliny linolénovej (v arábkovke exponovanej kovem sa ukázala ako vhodnejší substrát v porovnaní s kyselinou linolovou).

Pomôcky: rastliny *Arabidopsis thaliana* pestované hydroponicky, 5 mM zásobné roztoky Cd²⁺ a Cu²⁺, pomôcky na prípravu homogenátov, 0,25 mM kyselina linolénová a 0,25% Tween-20 v 0,2 M citrát-fosfátovom tlmivom roztoku (pH 8), 100 mM fosfátový tlmivý roztok (pH 7) s 1 % (m/V) nerozpustného polyvinylpolypyrolidónu.

Postup: Dostatočne veľké rastliny arábkovky exponujeme kadmiu a medi v koncentrácii 5 a 50 μM počas 24 h. Potom korene opláchneme vodou, osušíme filtračným papierom a známu biomasu homogenizujeme v 100 mM fosfátovom tlmivom roztoku (0,5 g č. hm./2 ml). Centrifugujeme v chlade. Pre reakciu pipetujeme do kyvety 2,4 ml vyššie uvedeného zásobného roztoku kyseliny linolénovej a pridáme 0,1 ml supernatantu. Zmenu absorbancie sledujeme pri 234 nm počas 2 minút (blank namiesto supernatantu obsahuje daný tlmivý roztok).

Vyhodnotenie: Aktivitu LOX vyjadríme ako $\Delta A \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteínov. Štatisticky porovnáme vplyv Cd a Cu a ich rôznych koncentrácií na zmenu aktivity. Výsledky spracujeme do grafickej podoby.

5. Antioxidanty a antioxidačná aktivita

Antioxidanty sú nízkomolekulové látky, ktoré pôsobia proti oxidačným procesom, a teda eliminujú pôsobenie ROS. K najvýznamnejším antioxidantom patria napr. kyselina askorbová, tokoferoly (vitamín E), glutatión a fenolové látky (hlavne flavonoidy a niektoré deriváty kyseliny škoricovej). Pri ich antioxidačnom pôsobení prechodne vzniká radikál, ktorý je regenerovaný následnými enzymatickými reakciami (napr. glutatión-askorbátovým alebo fenol-askorbátovým cyklom, Obr. 2) a za obvyklých podmienok tieto radikály antioxidantov nie sú toxické. Spolu s antioxidačnými enzýmami predstavujú antioxidanty komplex navzájom prepojených procesov a tvoria aktívnu obranu buniek voči pôsobeniu kyslíkových radikálov.

5.1. Stanovenie kyseliny askorbovej

Princíp: Kyselina askorbová (ascorbic acid, AsA) je účinným donorm elektrónov a v oxidovanom stave (po odovzdaní elektrónu) je relatívne nereaktívna (vzniká dehydroaskorbát, DHA). Kombinácia nadbytku askorbátu a voľných iónov kovov však môže stimulovať pro-oxidačné účinky tejto látky. V tejto úlohe popíšem stanovenie AsA spektrofotometricky. Obsah AsA je tiež možné stanoviť s použitím HPLC.

Pomôcky: rastliny rumančeka exponované $60 \mu\text{M}$ roztoku Cd^{2+} , pomôcky na prípravu homogénátov (pipety, trecie misky, inertný piesok), 5% a 10% roztok kyseliny trichlóroctovej (TCA), 150 mM fosfátový tlmivý roztok (pH 7,4) obsahujúci 5 mM EDTA, 10 mM roztok ditiotreitolu (DTT), 0,5% roztok N-etylmaleimidu, 44% kyselina fosforečná, 5% dipirydyl (bipyridín) v 70% metanole, 3% roztok FeCl_3 .

Postup: Rastliny rumančeka exponujeme kadmium 3-7 dní. Známe množstvo biomasy (0,5 g č. hm.) homogenizujeme v 3 ml 5% TCA a centrifugujeme 15 min. pri 20°C a 15 000 rpm. Celkové množstvo askorbátu (suma AsA + DHA) sa stanoví v reakčnej zmesi obsahujúcej 0,2 ml supernatantu, 0,5 ml 150 mM fosfátového tlmivého roztoku s EDTA a 0,1 ml roztoku DTT (redukuje DHA na AsA). Po 10 min. sa do reakčnej zmesi pridá 0,1 ml roztoku N-

etylmaleimidu (odstraňuje nadbytok DTT). Obsah vlastného askorbátu sa stanoví v rovnakej reakčnej zmesi, avšak namiesto DTT a N-etylmaleimidu sa pridá 0,2 ml deionizovanej vody. Zafarbenie reakčných zmesí v oboch sériách sa dosiahne po pridaní 0,4 ml 10% TCA, 0,4 ml roztoku kyseliny fosforečnej, 0,4 ml roztoku dipyridylu a 0,2 ml roztoku FeCl₃. Reakčná zmes sa inkubuje 40 min. pri 40 °C. Absorbancia sa meria pri 532 nm.

Vyhodnotenie: Obsah celkového askorbátu (AsA+DHA) a askorbátu (AsA) sa určí z kalibračnej krivky pripravenej so známymi koncentraciami kyseliny askorbovej. Na základe známeho riedenia prepočítame obsah na jednotku hmotnosti. Z rozdielu celkového askorbátu a vlastného askorbátu je tiež možné určiť obsah oxidovaného askorbátu (DHA). Štatisticky sa porovná obsah v kontrolných a kovom-exponovaných rastlinách a spracuje sa do grafu s vyznačením signifikancie rozdielov.

5.2. Stanovenie redukovaného glutatiónu

Princíp: Glutatión (tripeptid pozostávajúci z aminokyselín Glu-Cys-Gly) sa vyskytuje v redukovanej forme (formálne označovaná GSH), ktorá má antioxidačné účinky a v oxidovanej forme (označovanej ako GSSG). Konverziu GSSG na GSH zabezpečuje enzým glutatión reduktáza (úloha 1.5.). Pre funkčnú antioxidačnú ochranu je preto kľúčová hladina redukovaného glutatiónu. Tento možno stanoviť fluorometricky po reakcii s *o*-ftalaldehydrom.

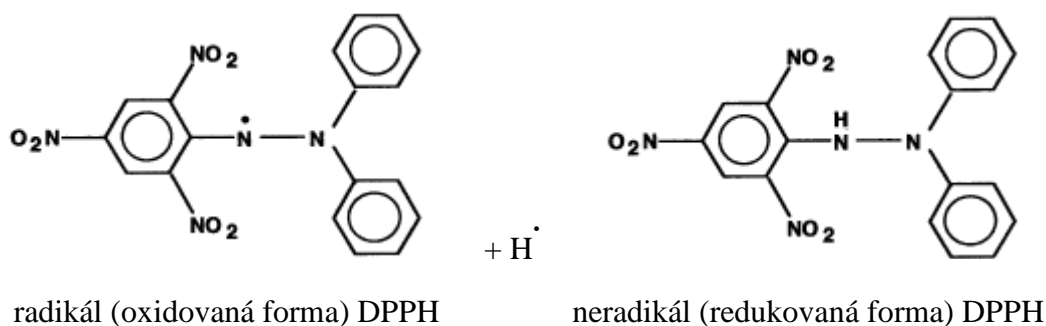
Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka, 60 μM roztok Cd²⁺, pomôcky ku príprave homogenátov (pipety, trecie misky, piesok na homogenizáciu), 100 mM fosfátový tlmivý roztok obsahujúci 5 mM EDTA (pH 8), 25% roztok kyseliny meta-fosforečnej, 0,1% roztok *o*-ftalaldehydu.

Postup: Rastliny rumančeka exponujeme počas 24 h roztoku kadmia. Potom korene opláchneme destilovanou vodou, osušíme filtračným papierom a známe množstvo biomasy (0,5 g) homogenizujeme v 100 mM fosfátovom tlmivom roztoku s obsahom EDTA (3 ml) a pridáme aj 1 ml kyseliny fosforečnej. Centrifugujeme 30 min pri 10 000 rpm. K 0,1 ml supernatantu pridáme 1,8 ml vyššie uvedeného tlmivého roztoku a 0,1 ml roztoku *o*-ftalaldehydu. Premiešame a po 15 min. zmeriame intenzitu fluorescencie pri 420 nm (s excitáciou pri 315 nm).

Vyhodnotenie: Kalibračnú krivku pripravíme nariadením rôznych koncentrácií komerčne dostupného GSH vo fosfátovom tlmivom roztoku a ďalej pracujeme ako so vzorkami. Obsah GSH vyjadríme ako μg.g⁻¹ č. hm., štatisticky porovnáme obsah v kontrolných a Cd-exponovaných koreňoch a výsledky spracujeme do grafickej podoby (kapitola 8).

5.3. Stanovenie antioxidantnej aktivity

Princíp: Stanovenie celkovej antioxidantnej aktivity dáva predstavu o množstve antioxidantných látok, teda redukčne aktívnych látok, ktoré sú schopné pôsobiť proti prooxidaným látkam (najmä radikálom). Táto metóda sa často používa na kvantifikovanie antioxidantnej sily daného extraktu (napr. ovocia alebo liečivých rastlín) a vyššia antioxidantná aktivita teda odráža vyšší redukčný potenciál. Najbežnejšie používanou metódou pre toto stanovenie je reakcia s 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylom (DPPH), čo je stabilný radikál (v roztoku metanolu fialovej farby), ktorý sa po zmiešaní s látkou poskytujúcou atóm vodíka (teda redukčne aktívne látky ako kyselina askorbová, fenoly alebo redukovaný glutatión) mení na redukovanú formu (a stráca sa fialové zafarbenie, Obr. 10). Pre určenie aktivity sa obvykle používa kalibračný graf pripravený s rôznymi koncentraciami troloxu (derivát vitamínu E).



Obr. 10. Štruktúra DPPH (prevzaté z práce Molyneux 2004, Songklanakarin J. Sci. Technol. 26: 211-219).

Pomôcky: rastliny rumančeka exponované 60 μM roztoku Cu^{2+} , pomôcky ku príprave homogenátov (pipety, trecie misky, piesok na homogenizáciu), 50% metanol, pracovný roztok DPPH (1 mg v 25 ml metanolu dáva maximálnu možnú absorbanciu 0.9 – 1), 200 μM roztok troloxu pre zostrojenie kalibračnej krivky (1 mg v 20 ml 50% metanolu).

Postup: Rastliny rumančeka exponujeme počas 7 dní roztoku medi. Potom známe množstvo biomasy homogenizujeme v 50% metanole a centrifugujeme 15 min. pri 20 °C a 15 000 rpm. Pre stanovenie absorbancie (pri 517 nm) pipetujeme do kyvety 0,1 ml supernatantu a 1 ml pracovného roztoku DPPH. Kyvetu utesníme parafilmom (aby sa neodparoval metanol) a pokles absorbancie sledujeme počas 30 min, potom určíme rozdiel $\Delta A = A_{0\text{min}} - A_{30\text{min}}$. Pokiaľ sa po 30 min. pozoruje ΔA vyššia ako 0,7 (teda supernatant obsahuje veľa antioxidantov), potom nariedime supernatant (pokles absorbancie je lineárny v rozsahu $\Delta A =$

0,1 – 0,6). Pre zostrojenie kalibračnej krivky pipetujeme 0,01 – 0,1 ml zásobného roztoku troloxu, pridáme 1 ml pracovného roztoku DPPH a meriame rovnako ako pri vzorkách. Z kalibračnej krivky vyberieme lineárnu oblasť ($\Delta A = 0,1 - 0,6$).

Vyhodnotenie: Z kalibračnej krivky na základe zisteného rozdielu absorbancie a na základe známeho riedenia reakčnej zmesi určíme antioxidačnú aktivitu ako mM ekvivalenty troloxu na gram č. hm. (prípadne prepočítame na g s. hm.). Štatisticky porovnáme aktivitu v kontrolných a Cu-exponovaných rastlinách a vytvoríme grafické zobrazenie.

6. Fenolový metabolizmus

6.1. Stanovenie aktivity cinamát-4-hydroxylázy metódou HPLC

Princíp: Cinamát-4-hydroxyláza (C4H, EC 1.14.13.11) katalyzuje adíciu –OH skupiny na kyselinu škoricovú, za vzniku kyseliny *p*-kumarovej. Jej pôsobenie teda nadväzuje priamo na enzým fenylalanín-amónium-lyáza (katalyzuje premenu fenylalanínu na kyselinu škoricovú, pre jej stanovenie pozri „Návody na cvičenia z fyziológie rastlín“ – Repčák a kolektív 2009) a spolu predstavujú základ biosyntézy derivátov kyseliny škoricovej. Pôsobenie C4H je nevyhnutné napr. pre biosyntézu flavonoidov a prekursorov lignínu (kyselina *p*-kumarová sa pritom modifikuje na kyseliny ferulovú a sinapovú). Aktivitu C4H možno stanoviť spektrofotometricky aj pomocou HPLC (presnejšia metóda), ako tvorbu kyseliny *p*-kumarovej z kyseliny škoricovej (CA). Je nutné zdôrazniť, že okrem CA-inkubovaných vzoriek je potrebné paralelne pripraviť aj CA-neinkubované vzorky (keďže rastliny prirodzene obsahujú voľnú kyselinu *p*-kumarovú).

Pomôcky: rastliny rumančeka exponované počas 24 h 120 μM roztoku Cu^{2+} , pomôcky ku príprave homogenátov (pipety, trecie misky, piesok na homogenizáciu), 50 mM Tris-HCl tlmivý roztok (alebo 50 mM fosfátový tlmivý roztok) obsahujúci 1 mM EDTA (pH 7,4), 2 mM roztok NADPH, 1 mM roztok kyseliny škoricovej, 25% roztok CF_3COOH , izokratický HPLC systém (15% acetonitril ako mobilná fáza), detekcia pri 314 nm.

Postup: Rastliny rumančeka exponované počas 24 h 120 μM roztoku Cu a príslušné kontrolné rastliny rozdelíme na listy a korene, ďalej pracujeme len s koreňmi. Tieto opláchneme destilovanou vodou a osušíme filtračným papierom. Homogenizujeme 0,5 g č. hm. v 2,5 ml tlmivého roztoku. Centrifugujeme a ku 0,4 ml supernatantu pridáme 0,2 ml roztoku kyseliny škoricovej a 0,2 ml roztoku NADPH. Inkubujeme 30 minút pri 37 °C a reakciu ukončíme

pridaním 0,2 ml 25% CF_3COOH . Paralelne pripravíme „kontrolné“ vzorky (t.j. namiesto kyseliny škoricovej pridáme destilovanú vodu). Obsah kyseliny *p*-kumarovej určíme izokratickým HPLC systémom s 15% acetonitrilom ako mobilnou fázou (kyselina *p*-kumarová sa v chromatograme objavuje skôr ako kyselina škoricová).

Vyhodnotenie: Obsah CA-neinkubovaných vzoriek odpočítame od CA-inkubovaných vzoriek a aktivitu enzýmu určíme ako $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ č. hm. na základe riedenia reakčnej zmesi a vo vzťahu ku ploche „píku“ štandardu kyseliny *p*-kumarovej (1 mg/100 ml). Štatisticky porovnáme Cu-inkubované a Cu-neinkubované vzorky a výsledky spracujeme do grafickej podoby (kapitola 8).

6.2. Stanovenie aktivity β -glukozidázy

Princíp: Enzým β -glukozidáza (EC 3.2.1.21) má široké uplatnenie v metabolizme rastlín, nakoľko hydrolyticky uvoľňuje glukózu z rôznych substrátov za vzniku glukózy a príslušného aglykónu. Príkladom môže byť vznik herniarínu z glykozidického prekurzora (úloha 6.4.), alebo uvoľnenie cytokinínov z príslušných gluko-konjugátov. Ako substrát pre stanovenie jej aktivity sa najčastejšie používa *p*-nitrofenyl- β -D-glukopyranozid (alebo jeho α -derivát).

Pomôcky: rastliny rumančeka pestované v pôde, pomôcky na prípravu homogenátov (pipety, trecie misky, piesok na homogenizáciu), extrakčný tlmivý roztok (25 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, pH 7,5), citrát-fosfátový tlmivý roztok (20 mM kyselina citrónová a 60 mM NaH_2PO_4 , pH 5,5), 20 mM roztok *p*-nitrofenyl- α -D-glukopyranozidu, 2 M Na_2CO_3 .

Postup: Listy rastlín rumančeka pomocou jednoduchého rozprašovača postriekame s 2% roztokom Cu^{2+} (asi 10 ml na rastlinu). Po niekoľkých hodinách začnú rastliny jemne vädnúť a vykazovať príznaky lokálnej nekrózy. Vtedy listy odstrihneme a známu navážku homogenizujeme v extrakčnom tlmivom roztoku (0,2 g č.hm./2 ml). Centrifugujeme v chlade 15 min. pri 15 000 rpm. Ku 0,02 ml supernatantu pridáme 0,28 ml citrát-fosfátového tlmivého roztoku a 0,1 ml roztoku *p*-nitrofenyl- α -D-glukopyranozidu. Inkubujeme 1 h pri 30 °C a reakciu ukončíme pridaním 0,6 ml roztoku Na_2CO_3 . Absorbanciu uvoľneného *p*-nitrofenolu meriame pri 405 nm.

Vyhodnotenie: Aktivitu β -glukozidázy vyjadríme buď jednoducho ako hodnotu zistenej absorbancie (A_{405}) alebo v jednotkách aktivity „U.mg⁻¹ proteínov“, pričom 1 U definujeme napr. ako zmenu absorbancie s hodnotou 1 na mg proteínov: pre zistenie rozdielu absorbancií zaznamenáme hodnotu absorbancie na začiatku a konci inkubácie, obsah proteínov v supernatante určíme metódou podľa Bradfordovej (pozri „Návody na cvičenia z fyziológie

rastlín“ – Repčák a kolektív 2009) a na základe známeho riedenia reakčnej zmesi prevedieme zmenu absorpcie na 1 g č. hm. a vydelíme určeným obsahom proteínov (vyjadrený ako $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ č. hm.). Vyjadrenie na mg proteínov je presnejšie, keďže v dôsledku vädnutia listov akútnym Cu stresom sa môže meniť aj obsah vody. Štatisticky porovnáme kontrolné a Cu-ošetrované rastliny a spracujeme do stĺpcového grafu.

6.3. Stanovenie fenolov viazaných na bunkovú stenu

Princíp: Fenolové látky, napr. fenolové kyseliny (deriváty kyseliny benzoovej a škoricovej) sa okrem ich prítomnosti v metanole-rozpustnej frakcii (voľné látky) môžu viazať aj vo forme esterov na bunkovú stenu (látky v metanole nerozpustné). Tieto estery sa tiež môžu medzi sebou spojiť éterovou väzbou. Tento mechanizmus esterifikácie a éterifikácie umožňuje vznik lignínu-podobných polymérov, čím vznikajú väzbové miesta pre depozíciu lignínov v matrixových polysacharidoch. Význam tohto procesu sa predpokladá najmä v primárnych bunkových stenách a esterifikácia i lignifikácia sa teda považujú za synergické procesy. Zvýšená esterifikácia v stresových podmienkach koreluje s nárastom lignínu a má za cieľ vytvoriť napr. mechanickú bariéru voči prieniku patogénov. Zloženie látok v esterovej frakcii je rôzne v rôznych druhoch, typicky dochádza k zvýšenej esterifikácii prekursorov lignínu, ale zaznamenali sa aj iné látky, napr. kyselina protokatechová alebo vanilová. V koreňoch rumančeka sa tiež výrazne (a dominantne) akumuluje kyselina kávová v esterovej frakcii. Sumu fenolov viazaných na bunkovú stenu stanovíme spektrofotometricky s použitím Folin-Ciocalteu činidla a obsah kyseliny kávovej kvantifikujeme pomocou HPLC.

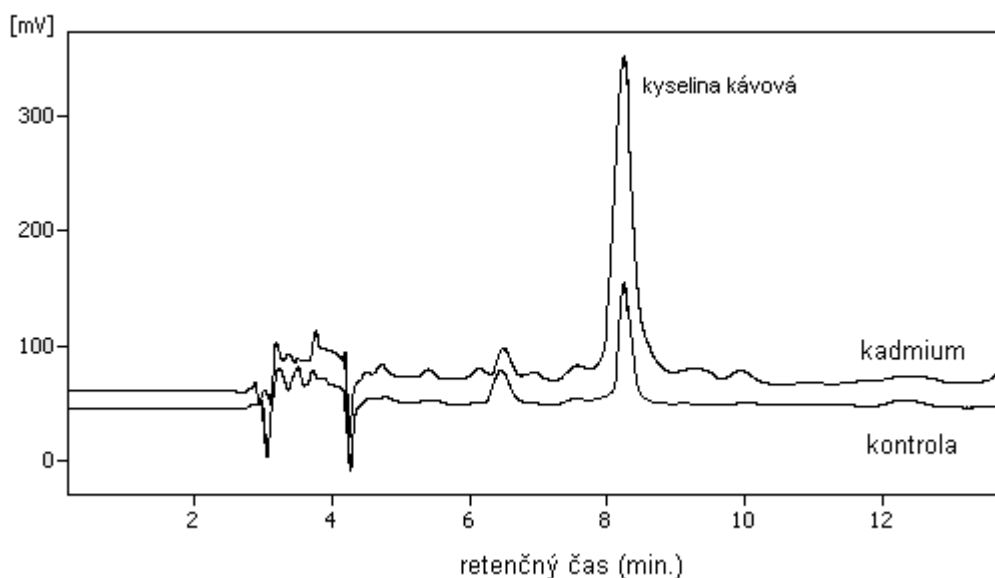
Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka, pomôcky na prípravu homogénátov (pipety, trecie misky, piesok na homogenizáciu), 80% metanol, 1 M NaOH, 2 M HCl, Folin-Ciocalteu činidlo (2 N), 2% Na_2CO_3 . Na HPLC stanovenie potrebujeme štandard kyseliny kávovej (1 mg/100 ml), izokratický HPLC systém s UV detektorom a ako mobilnú fázu použijeme zmes voda/acetónitril/ CF_3COOH (v pomere 19/80/1, V/V/V), na separáciu postačuje krátka chromatografická kolóna (SGX C 18, 7 μm , 4 x 150 mm).

Postup: Rastliny rumančeka exponujeme počas 7 dní dusík-deficitnému roztoku s prídavkom 60 μM Cd^{2+} . Potom korene vysušíme a homogenizujeme s 80% metanolom. Centrifugujeme (15 min. pri 15 000 rpm), supernatant vylejeme a opakovane pridáme 80% metanol a po centrifugácii opäť vylejeme (opakujeme aspoň 3x, aby sme vypláchli všetky voľné metanol-rozpustné fenoly). Suchý zvyšok zväžíme a 20 mg s. hm. zahrievame 90 min. pri 60 °C v 0,4 ml 1 M roztoku NaOH (alkalická hydrolýza uvoľní fenoly esterovo-viazané na bunkovú

stenu). Po ochladení na laboratórnu teplotu roztok okyslíme s HCl na pH <2,0. Ku okyslenému roztoku pridáme 0,75 ml dietyléteru, niekoľko minút prudko ručne pretrepeme, rýchlo centrifugujeme a éterovú frakciu preniesieme do novej skúmavky. Postup opakujeme, aby extrakcia fenolov bola kvantitatívna. Potom spojené éterové frakcie odparíme do sucha a suchý zvyšok rozpustíme v 0,3 ml 80% metanolu.

1. Pre stanovenie celkových fenolov postupujeme rovnako ako v prípade stanovenia celkových voľných fenolov (pozri „Návody na cvičenia z fyziológie rastlín“ – Repčák a kolektív 2009). V skratke: vzorku nariedime v destilovanej vode, pridáme roztok Na₂CO₃ a Folin-Ciocalteu činidlo a absorbanciu meriame po hodine inkubácie pri 750 nm (kyselina gálová pre zostrojenie kalibračnej krivky). Výsledok sa určí ako mg ekvivalenty kyseliny gálovej na g s. hm.

2. Pre HPLC stanovenie pripravíme izokratický HPLC systém s UV detektorom (laborantka alebo vyučujúci) a detekciu kyseliny kávovej uskutočníme pri 280 nm (Obr. 11). Identita látky sa overí pridaním štandardu ku vzorke a zmeraním UV-VIS spektra látky počas analýzy. Obsah kyseliny kávovej vypočítame ako mg na g s. hm. zo vzťahu plocha píku štandardu kyseliny kávovej/plocha píku kyseliny kávovej vo vzorke a na základe známeho riedenia vzorky.

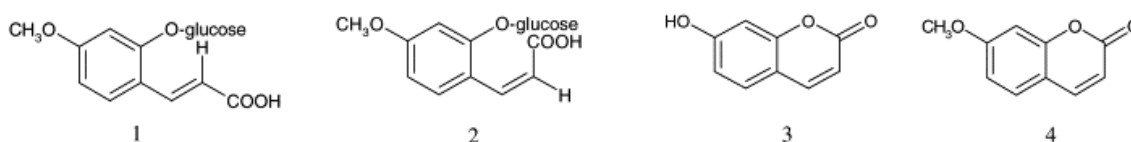


Obr. 11. HPLC detekcia kyseliny kávovej viazanej na bunkovú stenu v koreňoch rumančeka kultivovaných v dusík-deficitnom médiu bez (kontrola) alebo s prídavkom Cd²⁺ v koncentrácii 60 μM počas 7 dní (Kováčik et al., nepublikované).

Vyhodnotenie: Štatisticky porovnáme sumu fenolov viazaných na bunkovú stenu a množstvo kyseliny kávovej v kontrolných a Cd-exponovaných koreňoch, posúdime koreláciu a kvantitatívny vzťah medzi týmito parametrami a vytvoríme grafické zobrazenie výsledkov.

6.4. Stanovenie kumarínových látok

Princíp: Kumaríny možno formálne definovať ako laktóny, ktoré vznikajú z príslušne substituovaných prekursorov – škoricových kyselín. V prípade listov rumančeka je majoritným kumarínom herniarín (7-metoxy-kumarín), ktorý vzniká z príslušne substituovaného prekursoru: kyseliny glukopyranozyloxy-4-metoxyškoricovej (GMCA, Obr. 12). Pôsobením β -glukozidázy sa z molekuly GMCA uvoľňuje glukóza a zvyšok molekuly (tzv. aglykón) Z-GMCA spontánne cyklizuje na laktón – herniarín. GMCA prekursor existuje v dvoch formách, pričom E-forma (*trans* izomér) je stabilná a nemôže cyklizovať. Iným kumarínom listov rumančeka je umbeliferón (7-hydroxy-kumarín), jeho prekursor však nie je exaktne známy. Pri pôsobení stresu sa v listoch rumančeka obvykle pozoruje nárast herniarínu a pokles jeho prekursorov (čo indikuje zvýšenú aktivitu β -glukozidázy) a tiež nárast umbeliferónu. Predpokladá sa, že kumarínové látky majú ochrannú úlohu. Tieto kvantitatívne zmeny sú v súlade s faktom, že β -glukozidázy sú primárne stimulované napr. poškodením pletiva (v intaktnom pletive sú priestorovo oddelené od svojich substrátov).

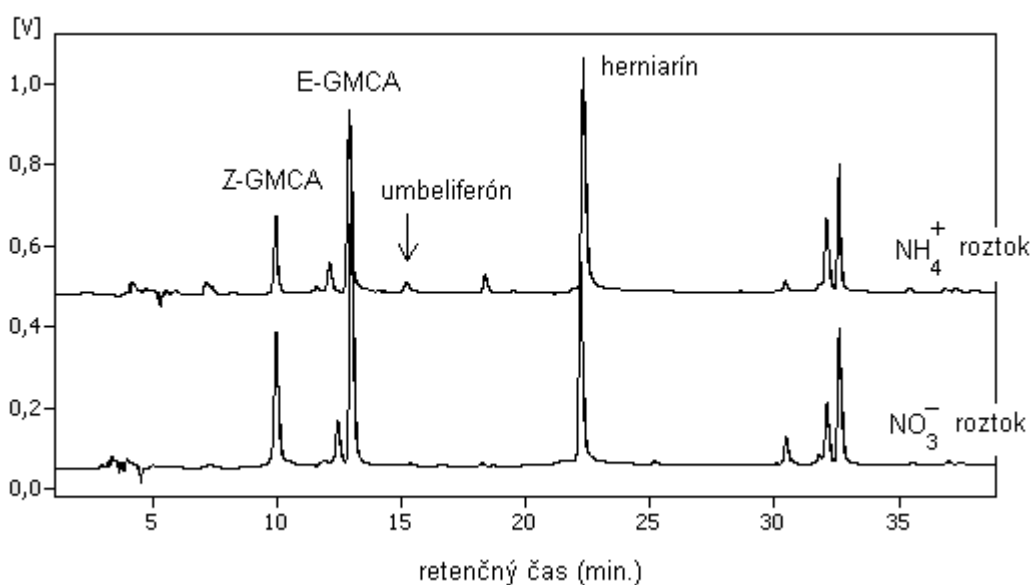


Obr. 12. Štruktúra analyzovaných kumarínových látok. 1: E-2-β-D-glukopyranozyloxy-4-metoxyškoricová kyselina, 2: Z-2-β-D-glukopyranozyloxy-4-metoxyškoricová kyselina, 3: umbeliferón, 4: herniarín (prevzaté z práce Pastírová et al. 2004, Plant Sci. 167: 819-824).

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka, pomôcky na prípravu homogenátov (pipety, trecie misky, piesok na homogenizáciu), 80% metanol, gradientový HPLC systém s UV-VIS detektorom, mobilná fáza pozostávajúca z troch zložiek: A – voda/acetonitril/CF₃COOH (19/80/1, V/V/V), B – 45% acetonitril a C – 80% acetonitril. Pre separáciu je nutné použiť dlhú chromatografickú kolónu (SGX C 18, 7 μm, 4 x 250 mm).

Postup: Rastliny exponujeme počas 7 dní buď štandardnému hydroponickému roztoku s obsahom nitrátu, alebo nitrátový dusík nahradíme síranom amónnym v ekvimolárnom množstve (podrobnosti napr. v práci Kováčik et al. 2011, J. Agric. Food Chem. 59: 5139-5149). Potom listy vysušíme a extrahujeme s 80% metanolom (30 mg s.hm. vo výslednom objeme 3 ml). Vzorok centrifugujeme, preniesieme do čistých skúmaviek a opätovne centrifugujeme (minimalizovanie nečistôt, ktoré by zanášali chromatografickú kolónu). Stanovenie sa realizuje na gradientovom HPLC systéme s týmto programom (vopred naprogramovaný postup miešania troch zložiek, z ktorých vzniká výsledná mobilná fáza prechádzajúca cez chromatografickú kolónu): zo 100 % A na 100 % B za 25 min, zo 100 % B na 100 % C za 5 min, izokratická elúcia so 100 % C počas 5 min a zo 100 % C na 100 % A za 10 min. Detekcia sa realizuje pri 320 nm (Obr. 13).

Vyhodnotenie: Nakoľko štandardy GMCA izomérov nie sú dostupné a bolo by potrebné ich pripraviť (časovo náročné), pre účely cvičenia je postačujúce určiť sumu GMCA po kvantitatívnej hydrolyze s HCl (oba izoméry sa zmenia na herniarín): množstvo určíme z porovnania obsahu herniarínu v nehydrolyzovanej a hydrolyzovanej vzorke a na základe nárastu herniarínu prepočítame na obsah GMCA (M_r herniarínu je 176,16 g/mol a M_r GMCA je 356,31 g/mol). Obsah herniarínu a umbeliferónu určíme s použitím komerčne dostupných štandardov. Výsledky vyjadríme na gram s. hm., porovnáme kvantitatívne zmeny v nitrát- a amoniak-kultivovaných rastlinách a spracujeme do grafickej podoby. Zamyslíme sa nad faktom, prečo amoniakálny kultivačný roztok stimuluje nárast herniarínu a umbeliferónu.



Obr. 13. Chromatogram separácie kumarínových látok v listoch rumančeka pestovaných v roztoku obsahujúcom nitrátový, alebo amoniakálny dusík (Kováčik et al., nepublikované).

7. Ťažké kovy a minerálne prvky

Problematika akumulácie kovov v rastlinách je predmetom záujmu mnohých rastlinných fyziológov, pričom sa sledujú dva hlavné ciele: i) objasnenie príčin ich akumulácie v rastlinách, ktoré možno využiť na dekontamináciu znečistených stanovišť prostredníctvom fyto-remediácie (s použitím rastlín, ktoré aktívne akumulujú kov v nadzemnej biomase v koncentrácii výrazne vyššej ako v prostredí) a ii) objasnenie príčin ich akumulácie v hospodársky významných plodinách (obilniny, zelenina, liečivé rastliny) s cieľom zvýšiť jednak výnos, ale najmä, a na rozdiel od predchádzajúcej skupiny, znížiť akumuláciu kovov v týchto rastlinách. Oba smery výskumu sú v súčasnej dobe aktuálne, keďže množstvo poľnohospodársky využiteľnej pôdy je limitované a zároveň dochádza k nárastu priemyselného zaťaženia. Pre hlbšie štúdium tejto problematiky existuje dostatok aktuálnych všeobecných i špecifických monografií a vedeckých prác.

7.1. Stanovenie obsahu kadmia a príbuzných parametrov

Princíp: Kadmium je kovový prvok, pre ktorý sa nezistila žiadna fyziologická úloha v žiadnom organizme. Jeho široké spektrum škodlivých účinkov vyplýva z fyzikálno-chemických vlastností (podobnosť s atómom zinku) a prejavuje sa toxicky už v nízkych koncentráciách (v závislosti od rastlinného druhu a ontogenetického štádia). Pre zaujímavosť možno uviesť, že podľa WHO je napr. maximálny limit obsahu Cd v obilninách $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$. Príjem kovov je ovplyvnený množstvom faktorov, vrátane daného druhu rastliny, pôdných a environmentálnych podmienok a pod. Preto kultivácia v laboratórnych podmienkach za presne definovaných podmienok predstavuje vhodný spôsob porovnania príjmu či už rôznych kovov tou istou rastlinou, alebo daného kovu rôznymi rastlinami. Pri hydroponickej kultivácii je tiež možné meniť nutričné podmienky a analyzovať koreňový systém bez poškodenia (v porovnaní s pôdnou kultiváciou). Ku štandardným ukazovateľom akumulácie kovov v rastlinách, okrem samotného obsahu v pletive (bežne sa vyjadruje ako $\mu\text{g.g}^{-1}$ s. hm. = mg.kg^{-1} s. hm.) patria aj bioakumulačný faktor a translokačný faktor.

Bioakumulačný (niekedy biokoncentračný) faktor – BAF/BCF udáva pomer obsahu kovu akumulovaného v pletive a jeho obsahu v prostredí (v rovnakých jednotkách). V prípade hydroponickej kultivácie sa určí ako:

koncentrácia kovu v pletive ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s. hm.)

koncentrácia kovu v roztoku ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Hodnoty BAF vyššie ako 1 teda indikujú tzv. (hyper)akumulačný potenciál. Niektorí autori udávajú podmienku $\text{BAF} > 10$ pre hyperakumulátory, čo sa v hydroponických podmienkach dosahuje relatívne ľahko (kde aplikované množstvo kovu je ľahšie dostupné) v porovnaní s kultiváciou v pôdnych podmienkach (iba časť celkového obsahu kovov je voľne prítomná v pôdnom roztoku). Tiež je nutné mať na zreteli vlastnosti daného kovu, napr. v rumančeku sa v nadzemnej biomase najviac akumuluje kadmium, potom nikel a výrazne menej ostatné kovy (Al, Pb, Cr). Rovnaký trend sa pozoroval aj v iných rastlinách, napr. v pšenici. Preto za objektívnejšie posúdenie akumulácie kovov možno považovať translokačný faktor.

Translokačný faktor – *TF* udáva pomer obsahu kovu v nadzemnej biomase ku obsahu v podzemnej biomase (a indikuje teda „účinnosť“ mechanizmov danej rastliny translokovať kov do nadzemnej biomasy). Hodnota *TF* viac ako 1 sa teda dosiahne, ak rastlina akumuluje viac kovu v nadzemnej biomase (čo je prípad tzv. hyperakumulátorov, napr. niektoré druhy rodu *Thlaspi*, *Alyssum*, ale i *Solanum nigrum* dosahujú tieto hodnoty pri akumulácii kadmia). Z hľadiska hyperakumulačného potenciálu rastlín je nutné dodať, že typické hyperakumulátory musia splniť obe podmienky súčasne (*BAF* aj *TF*) a daný kov (napr. Cd v rode *Alyssum*) je dokonca esenciálny pre ich rast. Pri identifikácii nových hyperakumulujúcich druhov je tiež potrebné porovnať pôdnu a hydroponickú kultiváciu a viacero koncentrácií daného kovu (environmentálne relevantné, t.j. nízke voči vysokým koncentráciám). Pre komplexnosť tejto problematiky možno spomenúť, že aj v rámci typicky hyperakumulujúceho druhu (napr. Cd akumulácia v *Thlaspi caerulescens*) existujú výrazné rozdiely pri porovnaní populácií z rôznych lokalít.

Pomôcky: mladé rastliny rumančeka kamilkového a arábkovky (*Arabidopsis thaliana*) pestované hydroponicky (2-3 týždne v hydroponických podmienkach po prenesení z predkultivácie v piesku, pozri „Návody na cvičenia z fyziológie rastlín“ – Repčák a kolektív 2009), 5 mM zásobný roztok Cd^{2+} , 150 ml (vyššie) kadičky, koncentrovaná HNO_3 a H_2O_2 , 5% HNO_3 .

Postup: Rastlinám rumančeka a arábkovky pridáme do kultivačného roztoku kadmium vo výslednej koncentrácii 5 a 50 μM (čiže 4 rôzne nádoby). Po týždni expozície rozdelíme rastliny na listy a korene, korene opláchneme destilovanou vodou (alebo 10 mM roztokom

CaCl₂ pre odstránenie povrchovo-adsorbovaného kovu) a vysušíme do konštantnej hmotnosti (asi 5 h pri 80 °C). Suchý materiál rozdrvíme na prášok v trecej miske s použitím kvapalného dusíka (v literatúre sa zriedka uvádza príprava mineralizátov z čerstvého materiálu, čo však nie je vhodné ak porovnávame rôzne druhy rastlín alebo rôzne stresové vplyvy, kde sa môže líšiť aj obsah vody v pletive). Z týchto vzoriek odvážeme po 50 mg, nasypeme do kadičiek a zalejeme s 10 + 10 ml koncentrovanej HNO₃ + H₂O₂. Kadičky zakryjeme Petriho miskami a v digestore inkubujeme do nasledujúceho dňa. Na druhý deň umiestnime kadičky do vodného kúpeľa položeného na varnej platničke v digestore a teplomerom sledujeme teplotu, ktorá by počas prvej hodiny nemala prekročiť 70 °C: počas tejto fázy kadičky občas jemne premiešame, aby sa zo stien uvoľnili prípadne zvyšky vzorky, dochádza tiež k rozkladu H₂O₂ čo sa prejavuje jemným šumením, ktoré urýchľuje rozklad vzoriek. Následne zvýšime teplotu na max. 90 °C, čím dôjde aj k odpareniu HNO₃. Suchý zvyšok/odparok rozpustíme v 5% HNO₃ a kvantitatívne prenesieme do 10 ml uzatvárateľných plastových skúmaviek (firma Sarstedt). Okrem tejto tzv. mokrej cesty prípravy vzoriek je možné aj suchý materiál pri vysokej teplote spopolniť a až následne rozpustiť v kyseline. Pre prípravu mineralizátov sa používajú aj rôzne druhy mineralizátorov (vzorka sa zahrieva pri vyššej teplote v uzavretom priestore, čím sa skrúti čas prípravy vzorky), alebo je možné nechať vzorky voľne (bez zahrievania) rozpustiť v zmesi HNO₃ + H₂O₂ a nariediť do výsledného objemu tak, aby obsah HNO₃ nebol vyšší ako 5 % (silnejšia kyselina môže totiž poškodiť súčasti AAS prístroja) a aby daný prvok bol prítomný v merateľnom množstve.

Vyhodnotenie: Obsah kadmia v listoch a koreňoch rastlín určíme pomocou plameňovej atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS) na Katedre analytickej chémie PF UPJŠ (alebo inom externom pracovisku v Košiciach). Na základe získaných výsledkov ($\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ vzorky) a známeho riedenie pri príprave vzorky určíme obsah kadmia ako $\mu\text{g.g}^{-1}$ s. hm. Pomocou vyššie spomenutých vzťahov určíme BAF a TF pre rumanček a arábkovku v oboch Cd variantoch. Výsledky štatisticky porovnáme a spracujeme do grafickej podoby. Pripravené mineralizáty je samozrejme možné použiť aj na stanovenie iných kovových prvkov, ak to prístrojové podmienky dovoľujú (Mg, Fe, Cu, Zn, K, Ca, Na sú zložkami hydroponického kultivačného roztoku, preto budú vo vzorkách v merateľnom množstve).

7.2. Stanovenie draslíka

Princíp: Draslík je základným anorganickým osmotikom buniek vrátane rastlinných pletív, napr. v rumančeku kamilkovom pestovanom hydroponicky v Hoaglandovom roztoku jeho

obsah dosahuje až 10 % (bežne v rastlinách „nehalofytoch“ do 6 %). Jeho pokles preto obvykle súvisí priamo s narušením permeability membrán (hlavne pri dlhodobom strese) a indikuje tak poškodenie pletív celkovo. Obsah K^+ možno stanoviť v mineralizátoch pripravených pre stanovenie Cd popísaných vyššie. Pre rýchlejšie stanovenie sa však zmeny jeho obsahu môžu určiť ako „ K^+ -leakage“ (uvoľňovanie draslíka do kultivačného roztoku) alebo extrakciou suchého materiálu v kyseline octovej.

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka, 1 mM zásobný roztok Cu^{2+} , 50 ml skúmavky so závitovým vrchnákom (firma Sarstedt), 0,1 M kyselina octová.

Postup: Primerane veľké rastliny rumančeka umiestnime do 50 ml skúmaviek cez perforáciu vo vrchnáku (skúmavky obalíme alobalom, aby korene neboli osvetlené) a do skúmaviek nalejeme rovnaký hydroponický kultivačný roztok s prídavkom Cu vo výslednej koncentrácii 1 a 100 μM . Použijeme aspoň 3 skúmavky pre každý Cu-exponovaný variant aj kontrolu. Po 24 h inkubácie chýbajúci roztok doplníme deionizovanou vodou na pôvodný objem 50 ml, centrifugujeme a použijeme priamo na stanovenie obsahu draslíka. Paralelne vysušíme rastliny rumančeka. Suchý materiál rozdrvíme na prášok s použitím kvapalného dusíka a 100 mg materiálu extrahujeme v 5 ml 0,1 M kyseline octovej pri 90 °C počas 2 h. Vo vzorkách potom stanovíme obsah draslíka AAS metódou.

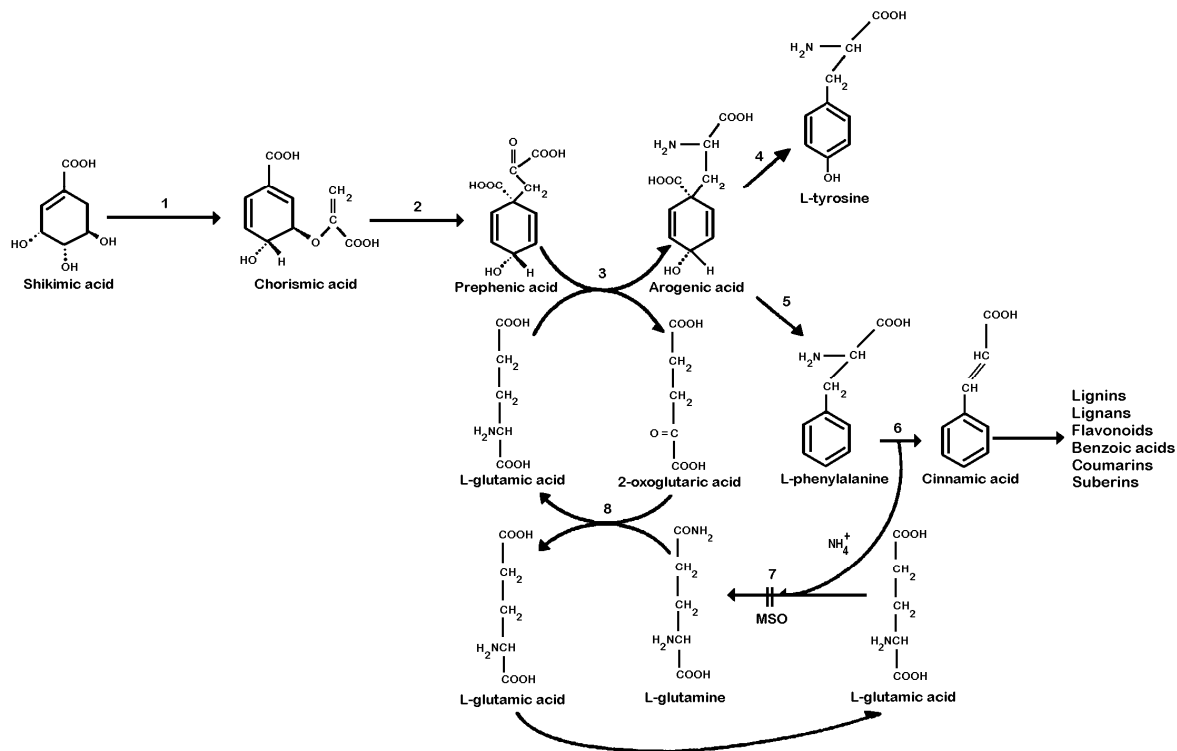
Vyhodnotenie: Zmenu obsahu K^+ v kultivačnom roztoku určíme ako percento nárastu oproti kontrole (kontrolu považujeme za 100 %, teda nárast K^+ v médiu oproti kontrole sa bude rovnať viac ako 100 % a naopak pokles bude menej ako 100 % - to indikuje príjem draslíka rastlinami). Porovnáme vplyv nízkej a vysokej koncentrácie Cu na uvoľňovanie K^+ (nízke koncentrácie esenciálnych mikroprvkov môžu stimulovať príjem iných prvkov).

V extraktach pripravených s kyselinou octovou prepočítame obsah draslíka ako $mg \cdot g^{-1}$ s. hm. a porovnáme tendenciu zmeny obsahu K^+ v pletive so zmenami pozorovanými v kultivačnom roztoku. Výsledky štatisticky porovnáme a spracujeme do grafickej podoby.

7.3. Stanovenie amónnych iónov s Nesslerovým činidlom

Princíp: Amónne ióny (NH_4^+) vznikajú v rastlinách pri rôznych biosyntetických procesoch, napr. rozkladom proteínov, fotorespiráciou, alebo tiež deamináciou fenylalanínu prostredníctvom enzýmu PAL (Obr. 14). Za bežných podmienok je ich koncentrácia nízka, pretože uvoľnené ióny sa „recyklujú“ napr. prostredníctvom GS/GOGAT enzymatického systému (Obr. 14). V prípade stresového pôsobenia môže dôjsť k zvýšenej produkcii amónnych iónov, čo pri znížení rýchlosti ich „recyklácie“ vedie k spomaleniu rastu a

viditeľnému poškodeniu rastlín. Klasickou metódou stanovenia je reakcia s Nesslerovým činidlom, kde amoniak reaguje s tetrajodidoortuťnanom sodným (vzniká pri príprave Nesslerovho činidla) za vzniku žltej zlúčeniny (pri vyšších koncentráciách NH_4^+ iónov vzniká žlto-hnedá zrazenina).



Obr. 14. Schématické znázornenie „recyklácie“ amoniakálneho dusíka, uvoľneného deamináciou fenylalanínu v reakcii č. 6 prostredníctvom enzýmu PAL (podľa práce Razal et al. 1996). MSO - metionín-S-sulfoximín, špecifický inhibítor glutamínsyntetázy (7).

Pomôcky: hydroponicky pestované rastliny rumančeka, pomôcky na prípravu homogenátov (pipety, trecie misky, piesok na homogenizáciu), deionizovaná voda, Nesslerove činidlo (10 g HgI_2 , 7 g KI a 16 g NaOH v 100 ml roztoku, používa sa číra frakcia roztoku; roztok je tiež komerčne dostupný, napr. od firmy Fluka), Siegnettova soľ (vínan draselno-sodný tetrahydrát, 50 g $\text{KNaCaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ v 100 ml roztoku), 2 mM roztok NH_4Cl .

Postup: Primerane veľké hydroponicky pestované rastliny rumančeka exponujeme počas 7 dní dusík-deficitnému roztoku a ako kontrolu použijeme rastliny pestované naďalej v pôvodnom roztoku obsahujúcom dusík (podrobnosti pozri napr. v práci Kováčik a Bačkor 2007, pdf verzia článku je voľne dostupná cez vedecké databázy v rámci UPJŠ). Potom ich rozdelíme na listy a korene, korene opláchneme deionizovanou vodou a osušíme filtračným papierom. Známu hmotnosť biomasy homogenizujeme s malým množstvom morského piesku

a extrahujeme s deionizovanou vodou (v riedení 0,1 g č. hm. v 1 ml vody) a centrifugujeme (15 min., 15 000 rpm). Pre stanovenie pipetujeme do reakčnej zmesi 95 μl supernatantu, 850 μl vody, 5 μl Siegettovej soli a 50 μl Nesslerovho činidla. Do blanku sa namiesto vzorky použije voda. Absorbancia sa meria pri 425 nm. Pre zostrojenie kalibračnej krivky sa použije zásobný roztok NH_4Cl (2 mM) a z neho sa nariaedia rôzne koncentrácie namiesto supernatantu v reakčnej zmesi.

Vyhodnotenie: Obsah amónnych iónov stanovíme v listoch a v koreňoch kontrolných a dusík-deficitných rastlín. Výsledky na základe kalibračnej krivky a známeho riedenia vyjadríme ako $\mu\text{mol.g}^{-1}$ č. hm. a v prípade stanovenia percenta sušiny prepočítame na g s. hm. (čo je fyziologicky presnejšie, pozri kapitola 8). Štatisticky porovnáme obsah NH_4^+ iónov v kontrolných a dusík-deficitných rastlinách a spracujeme do stĺpcového grafu s vyznačením signifikancie zistených rozdielov. V dostupnej literatúre (databázy Scopus alebo Web of Knowledge/Web of Science) vyhľadáme články s podobným zameraním (aktuálne bol publikovaný napr. vplyv deficitu dusíka na aktivitu GS/GOGAT a obsah NH_4^+ v tabaku) a porovnáme so získanými výsledkami.

8. Výpočty a spracovanie výsledkov

Prepočet parametrov na jednotku suchej hmotnosti

Obsah vody v rastlinách sa mení vplyvom rôznych stresových faktorov. V prípade rumančeka a nadbytku iónov kovov má pri kultivácii v hydroponii najvýraznejší negatívny účinok nadbytok iónov medi. Preto je vhodné, pokiaľ je to metodicky možné, stanoviť daný parameter až vo vysušenom pletive (napr. obsah kovov a iných minerálnych prvkov, fenoly viazané na bunkovú stenu a podobne). Ak je nutné pracovať s čerstvou biomasou, potom je fyziologicky presnejšie uskutočniť prepočet na jednotku suchej hmotnosti.

Obsah vody určíme najjednoduchšie tak, že rastliny rozdelíme na listy a korene (korene z hydroponie opláchneme destilovanou vodou a osušíme filtračným papierom), ihneď zaznamenáme čerstvú hmotnosť (biomasa uzavretá v sklenej alebo nerezovej navažovačke) a po vysušení do konštantnej hmotnosti zaznamenáme suchú hmotnosť. Čas sušenia napr. pre rumanček (alebo iné hydroponicky pestované rastliny) je 4-5 hodín pri 80 °C (je možné použiť aj vyššiu teplotu, pokiaľ už v suchej biomase nechceme realizovať stanovenia metabolitov). Pre každý experimentálny variant je potrebné vysušiť niekoľko rastlín a v prípade homogénnych výsledkov možno priemernú hodnotu (napr. z 5 rôznych rastlín) použiť pre prepočet parametra stanoveného v čerstvej biomase (keďže je logické predpokladať, že všetky jedince v rámci daného variantu by mali obsah vody resp. sušiny blízky tejto priemernej hodnote).

Percentuálny obsah sušiny určíme podľa vzorca:

$$\% \text{ sušiny} = \text{s. hm.} \times 100 / \text{č. hm.}$$

a z toho obsah vody ako 100 – % sušiny. Ak teda zistíme č. hm. napr. 2,5 g a s. hm. 0,25 g, potom obsah sušiny bude 10 % a obsah vody v danom pletive 90 %.

Napr. obsah vody v Cu-exponovanom rumančeku môže klesnúť až o 5 % (potom obsah sušiny stúpne napr. z 5 % v kontrole na 10 % v Cu-exponovaných rastlinách).

Uveďme príklad s použitím týchto hodnôt:

a) obsah MDA v kontrolných koreňoch je $0,2 \mu\text{mol.g}^{-1}$ č. hm., potom s použitím 5 % obsahu sušiny bude $(0,2 \times 100/5) = 4 \mu\text{mol.g}^{-1}$ s. hm.

b) obsah MDA v Cu-exponovaných koreňoch je $0,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ č. hm., potom s použitím 10 % obsahu sušiny bude $(0,5 \times 100/10) = 5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ s. hm.

Všimnime si, že pôvodne viac ako 2-násobný rozdiel pri vyjadrení na gram č. hm. (0,2 voči 0,5 μmol) sa zmenil na nepatrný rozdiel (4 voči 5 μmol) pri vyjadrení na gram s. hm. a možno predpokladať, že pri porovnaní napr. t-testom by tento rozdiel ani nebol signifikantný (pozri nižšie, časť „**Grafické a štatistické spracovanie výsledkov**“).

Z rovnakých dôvodov, ako pri prepočte na gram s. hm., je vhodné pri výpočte enzymatických aktivít vyjadriť ju na jednotku obsahu proteínov (obvykle miligram) a nie na jednotku biomasy (g č. hm.), keďže stresové vplyvy obvykle redukovujú obsah proteínov. Preto napr. pri poklese proteínov v dusík-deficitných rastlinách bude aktivita enzýmu vyššia ako v kontrolných rastlinách pri vyjadrení na mg proteínov, ak sa porovná s vyjadrením na g č. hm. (podrobnosti pozri napr. v práci Kováčik a Bačkor 2007, Plant Soil 297: 255-265).

Výpočet aktivity enzýmu s použitím mólového absorpčného koeficientu (ϵ)

Mólový absorpčný koeficient (ϵ) vyjadruje, ako „silne“ daná látka absorbuje žiarenie danej vlnovej dĺžky. Tento koeficient možno určiť z regresnej rovnice kalibračnej závislosti (závislosť absorbancie od koncentrácie analyzovanej látky) v daných experimentálnych podmienkach. Hodnoty ϵ sú pre jednotlivé enzýmy bežne dostupné v odbornej literatúre, podobne aj hodnoty pre niektoré iné parametre (napr. peroxid vodíka, malondialdehyd). Pri spektrofotometrii možno s použitím známeho ϵ určiť aktivitu enzýmu (či už ako koncentráciu rozloženého substrátu alebo vytvoreného produktu) na základe Lambertovho-Beerovho zákona (1)

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

kde A je absorbancia, c je koncentrácia látky a l je hrúbka kvety.

Pretože štandardné kvety majú hrúbku 1 cm, hodnota l je v ďalšom výpočte konštantná (hodnoty ϵ sa aj preto bežne uvádzajú ako $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ alebo $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a koncentráciu potom určíme podľa (2)

$$c = A / \epsilon \quad (2)$$

Ako príklad uvádzam výpočet aktivity guajakol peroxidázy (úloha 1.3., $\epsilon = 25,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Meraním zistíme zmenu absorbancie, napr. $\Delta A = 0,042$, potom $c = 0,042/25,5 = 0,001647 \text{ mM}$ a po premene na nižšiu jednotku ($\cdot 1000$) = $1,647 \text{ }\mu\text{M}$ (t.j. $\mu\text{mol/l}$).

Na základe známeho riedenia pri homogenizácii vzoriek (1 g č. hm. v 5 ml tlmivého roztoku) a na základe obsahu v reakčnej zmesi (0,02 ml supernatantu v 3,5 ml reakčnej zmesi = súčet objemov všetkých zložiek, ktoré sa pipetovali v úlohe 1.3.) vypočítame množstvo biomasy na liter reakčnej zmesi = $1,1428 \text{ g č. hm./l}$, potom sa aktivita enzýmu rovná $(1,647 \text{ }\mu\text{mol/l}) / (1,1428 \text{ g č. hm./l}) = 1,4412 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ č. hm.}$ a pretože reakcia prebiehala jednu minútu, potom len doplníme: $1,4412 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (č. hm.). V prípade stanovenia obsahu rozpustných proteínov (napr. $9,13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ č. hm.) prepočítame aktivitu na miligram proteínov vyzelením: $1,4412 / 9,13 = \mathbf{0,157 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteínov.}$

Poznámka: znak krát (.) medzi jednotkami sa v anglicky písanej odbornej literatúre neuvádza a jednotky aktivity (a logicky aj iné jednotky) sa potom píše ako „ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ “. Z hľadiska chemickej terminológie sa aktivita enzýmov okrem jednotky „ $\mu\text{mol min}^{-1}$ “ vyjadruje aj SI veličinou „**katal**“ (resp. nižšími násobkami, obvykle μkat , nkat , pkat), ktorá vyjadruje katalytickú aktivitu najmä enzýmov. Jeden katal (1 kat) je definovaný ako premena 1 mólu substrátu za sekundu podľa (3)

$$\mathbf{\text{kat} = \text{n} / \text{t}} \quad (3)$$

kde n je látkové množstvo a t je čas v sekundách.

Vyššie uvedený výsledok $0,157 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteínov potom premeníme na kataly vyzelením číslom 60 (1 min = 60 s), čím formálne získame výsledok pre aktivitu enzýmu $0,00261 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} = \mathbf{2.61 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteínov.}$

Výpočet obsahu látok metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie

Pri použití vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) sa chromatogram (Obr. 13), zaznamenáva a vyhodnocuje počítačovým programom, ktorý tiež umožňuje rýchle vyhodnotenie plochy získaných pík prostredníctvom ich integrácie. Výsledný obsah látky sa potom vyjadří zo vzťahu medzi zistenou plochou píku v analyzovanej vzorke a plochou

píku štandardu tejto látky. Po zohľadnení riedenia pri príprave vzorky sa výsledok vyjadří napr. ako mg (látky).g⁻¹ s. hm. Obvykle sa štandardy pripravujú v riedení 1 mg/100 ml.

Príklad: stanovenie obsahu herniarínu v úlohe 6.4. metódou HPLC:

Integráciou píkov získame plochy napr. 13 607,4 pre štandard herniarínu (pri jeho riedení 1 mg/100 ml) a 18 521,7 pre herniarín vo vzorke. Množstvo herniarínu vo vzorke sa vypočíta použitím trojčlenky

$$\begin{array}{r} 13\,607,4 \dots\dots\dots 1\text{mg}/100\text{ ml} \\ 18\,521,7 \dots\dots\dots x\text{ mg}/100\text{ ml} \\ \hline x = 1,36\text{ mg}/100\text{ ml} \end{array}$$

Pre prepočet na gram s. hm. je potrebné zohľadniť riedenie pri príprave vzorky a vyjadriť obsah suchej biomasy na 100 ml vzorky (štandardný roztok herniarínu bol pripravený v 100 ml). Ak sme teda pripravili vzorku s obsahom 30 mg s. hm./3 ml metanolu (úloha 6.4.), potom bude obsah biomasy na 100 ml vzorky 1 g s. hm. Výsledný obsah herniarínu sa vypočíta po jednoduchom vyzelení:

$$(1,36\text{ mg herniarínu}/100\text{ ml}) / (1\text{ g s.hm.}/100\text{ ml}) = \mathbf{1,36\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ s. hm.}}$$

Grafické a štatistické spracovanie výsledkov

Spracovanie výsledkov predstavuje neoddeliteľnú súčasť vedeckej práce, nakoľko dáta sa týmto spôsobom transformujú do esteticky vhodnej a prehľadnej podoby, či už tabuliek alebo grafov. V prípade oboch vyjadrení všeobecne platí, že tieto majú byť „samočitateľné“, t.j. hlavička tabuľky alebo graf vrátane legendy ku grafu musia obsahovať údaje o tom, čo sa meralo, jednotky v akých sú uvedené získané výsledky a pod. (teda bez ďalších odkazov na text protokolu z laboratórneho cvičenia alebo vedeckej práce).

Pre grafické a štatistické spracovanie získaných výsledkov existuje veľa rôznych počítačových programov, uvediem len najzákladnejšie bežne dostupné prostriedky v rámci balíka „Microsoft Office“.

Pre štatistické spracovanie je potrebné stanoviť daný parameter najmenej v troch rôznych vzorkách z daného variantu, t.j. napr. pripraviť homogenáty pre stanovenie aktivity guajakol peroxidázy z troch individuálnych kontrolných rastlín a z troch individuálnych kovom-exponovaných rastlín. Získame teda napr. hodnoty (v $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ č. hm.):

- listy kontrolných rastlín 1,44, 1,57 a 1,63
- listy Cu-exponovaných rastlín: 1,97, 1,71 a 1,82
- korene kontrolných rastlín: 2,77, 2,64 a 2,81
- korene Cu-exponovaných rastlín: 6,98, 7,34 a 7,06

Hodnoty zapíšeme do Excelu v stĺpcoch pod seba (Obr. 15a) a pre všetky sady dát určíme priemernú hodnotu a smerodajnú odchýlku cez ponuku „nástroje“ – „analýza dát“ – „popisná štatistika“: v rámci okna „popisná štatistika“ zaškrtneme políčko „celkový prehľad“ a do riadku pre „vstupná oblasť“ stlačením ľavého tlačidla „myši“ vložíme jednu trojicu hodnôt a stlačíme „OK“ (podobne potom vložíme aj ďalšie trojice dát). Výsledok sa automaticky zobrazí v novom liste v rámci daného excelového súboru (Obr. 15b). Získané priemerné hodnoty (v češtine označené ako stredná hodnota) uložíme vedľa seba (alebo pod seba, Obr. 15c) a použijeme pre vytvorenie grafu (napr. stĺpcový graf). Získané smerodajné odchýlky znázorníme vo vytvorenom grafe ako úsečky.

	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1										
2										
3		kontrola		Cu						
4		listy	korene	listy	korene					
5		1.44	2.77	1.97	6.98					
6		1.57	2.64	1.71	7.34					
7		1.63	2.81	1.82	7.06					
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										

Obr. 15a. Príklad usporiadania zdrojových dát pre výpočet priemerných hodnôt a smerodajných odchýliek (tri opakovania z každého variantu).

Microsoft Excel - Zoištl

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Sloupec1									
2										
3	Stř. hodno	1.54667								
4	Chyba stř.	0.05608								
5	Medián	1.57								
6	Modus	#####								
7	Směr. odc.	0.09713								
8	Rozptyl vý	0.00943								
9	Špičatost	#####								
10	Šikmost	-1.01868								
11	Rozdíl ma:	0.19								
12	Minimum	1.44								
13	Maximum	1.63								
14	Součet	4.64								
15	Počet	3								
16	Největší (1	1.63								
17	Nejmenší	1.44								

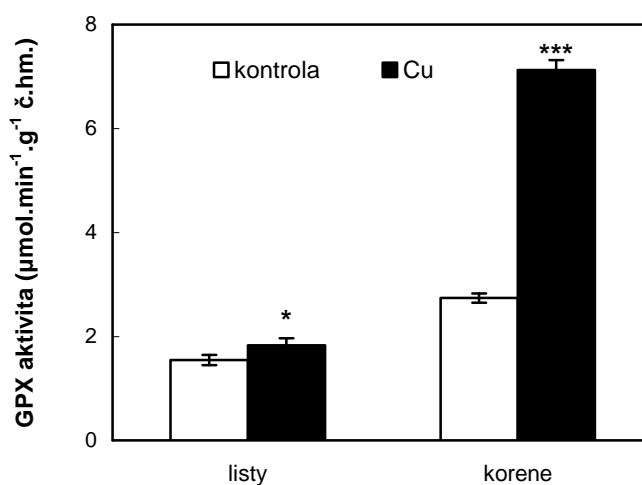
Obr. 15b. Výsledná tabuľka získaná „popisnou štatistikou“ z opakovaní v rámci jedného variantu (tu uvedený variant kontrola – listy z Obr. 15a).

Microsoft Excel - Zoištl

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1										
2										
3										
4			priemery							
5				listy	korene					
6			kontrola	1.546	2.74					
7			Cu	1.833	7.126					
8										
9										
10			smerodajné odchýlky							
11				kontrola	Cu					
12			listy	0.09712	0.13051					
13			korene	0.08888	0.18903					
14										
15										
16										
17										

Obr. 15c. Zdrojové dáta pre vytvorenie grafu (znázornený v Obr. 15d).

Vyššie uvedené zdrojové dáta možno potom prezentovať graficky (spolu s legendou ku obrázku) napr. takto:



Obr. 15d. Graf vytvorený z údajov prezentovaných v Obr. 15c. Úplný popis k tomuto grafu by znel: „Aktivita guajakol peroxidázy (GPX) v listoch a koreňoch rastlín rumančeka kamilkového pestovaných hydroponicky a exponovaných medi (120 µM) počas 7 dní. * a *** udávajú signifikantný rozdiel medzi Cu-exponovaným variantom a príslušnou kontrolou na hladine 0,05 a 0,001 podľa t-testu. Úsečky predstavujú smerodajné odchýlky (n = 3)“. – tento popis teda udáva všetky fakty, t.j. ako a aké rastliny sa pestovali, akému stresu boli exponované, aká bola dĺžka expozície a v akých jednotkách a aký parameter sa stanovil. Písmeno „n“ udáva počet opakovaní, t.j. koľko vzoriek sa spracovalo pre každý variant (v našom prípade tri vyššie spomínané individuálne rastliny).

Znaky v podobe „hviezdičiek“ udávajú štatisticky významný (t.j. signifikantný) rozdiel, ktorý sa najbežnejšie hodnotí s použitím „t-testu“, anglicky označovaným ako „Student’s t-test“. Tento test umožňuje porovnať vždy iba dve série zdrojových dát (čiže vstupné dáta uvedené v Obr. 15a) a je teda vhodný pre porovnanie Cu-exponovaných voči kontrolným listom a Cu-exponovaných voči kontrolným koreňom. Logicky, nemá zmysel porovnávať napr. Cu-exponované korene s kontrolnými listami. Inými slovami, t-test hodnotí významnosť rozdielu experimentálneho (exponovaného) variantu oproti príslušnej kontrole.

Ako príklad t-testu môžeme uviesť porovnanie zdrojových dát z Obr. 15a, kontrolné listy voči Cu-exponovaným listom: opäť cez ponuku „nástroje“ – „analýza dát“ zvolíme „dvojvýberový t-test s rovnosťou rozptylov“ a do príslušných riadkov zadáme stlačením ľavého tlačidla „myši“ trojice dát ako „1. súbor“ (hodnoty 1,44, 1,57 a 1,63) a „2. súbor“ (hodnoty 1,97, 1,71 a 1,82) a stlačením „OK“ sa výsledok ukáže v novom okne súboru ako:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů									
2										
3		<i>Soubor 1</i>	<i>Soubor 2</i>							
4	Stř. hodno	1.54667	1.83333							
5	Rozptyl	0.00943	0.01703							
6	Pozorován	3	3							
7	Společný	0.01323								
8	Hyp. rozdí	0								
9	Rozdíl	4								
10	t stat	-3.05203								
11	P(T<=t) (1)	0.01898								
12	t krit (1)	2.13185								
13	P(T<=t) (2)	0.03795								
14	t krit (2)	2.77645								
15										
16										

Obr. 15e. Dvouvýběrový t-test kontrolných a Cu-exponovaných listov vychádzajúci zo zdrojových dát prezentovaných v Obr. 15a.

Hodnota, ktorá rozhodne o významnosti štatistického rozdielu je druhá hodnota zdola vo výslednej tabuľke (Obr. 15e) a pokiaľ je toto číslo menšie ako 0,05, potom sa rozdiel značí jednou „hviezdičkou“ (ako je uvedené v grafe v Obr. 15d), ak je toto číslo menšie ako 0,01 = dve „hviezdičky“ a ak je číslo menšie ako 0,001 = tri „hviezdičky“. Pokiaľ sa nezistí signifikantný rozdiel (hodnota vyššia ako 0,05), potom sa neudáva nič, alebo sa napíše „ns“ (v zmysle nevýznamný, resp. nesignifikantný).

Pre zložitejšie typy testov s viacerými porovnávanými súbormi existujú rôzne „jedno-“ a „viacrozmerné“ analýzy variancie (pre podrobnejšie štúdium odporúčam rôzne voliteľné bio/štatistické predmety dostupné na PF UPJŠ).

Výsledky prezentované vo forme grafu v Obr. 15d možno uviesť aj vo forme tabuľky, napr.

Tab. x. Aktivita guajakol peroxidázy (GPX) v listoch a koreňoch rastlín rumančeka kamilkového pestovaných hydroponicky a exponovaných medi (120 μ M) počas 7 dní. * a *** udávajú signifikantný rozdiel medzi Cu-exponovaným variantom a príslušnou kontrolou na hladine 0,05 a 0,001 podľa t-testu. Dáta sú priemerné hodnoty \pm smerodajné odchýlky (n = 3).

	kontrola	Cu
listy	1,55 \pm 0,10	1,83 \pm 0,13*
korene	2,74 \pm 0,09	7,12 \pm 0,19***

Zoznam použitej literatúry

- ARASIMOWICZ, M., FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. In *Plant Science*. 2007, vol. 172, p. 876–887.
- BOOMINATHAN, R., DORAN, P.M. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. In *New Phytologist*. 2003, vol. 83, p. 158–167.
- CAKMAK, I., HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). In *Physiologia Plantarum*. 1991, vol. 83, p. 463–468.
- DE ASCENSAO, R.F.D.C.A., DUBERY, I.A. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. In *Phytochemistry*. 2003, vol. 63, p. 679–686.
- DELLEDONNE, M. NO news in good news for plants. In *Current Opinion in Plant Biology*. 2005, vol. 8, p. 390–396.
- EDWARDS, R. et al. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. In *Trends in Plant Science*. 2000, vol. 5, p. 193–198.
- ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in Enzymology*. 1990, vol. 186, p. 407–421.
- GAJEWSKA, E. et al. Nickel-induced depression of nitrogen assimilation in wheat roots. In *Acta Physiologiae Plantarum*. 2009, vol. 31, p. 1291–1300.
- HODGES, D.M. et al. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. In *Planta*. 1999, vol. 207, p. 604–611.
- JIN X. et al. Response of antioxidant enzymes, ascorbate and glutathione metabolism towards cadmium in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* H. In *Environmental Toxicology*. 2008, vol. 23, p. 517–529.
- KOVÁČIK, J., BAČKOR, M. Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants. In *Plant and Soil*. 2007, vol. 297, p. 255–265.
- KOVÁČIK, J., KLEJDUS, B. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. In *Plant Cell Reports*. 2008, vol. 27, p. 605–615.

- KOVÁČIK, J. et al. Nitrate deficiency reduces cadmium and nickel accumulation in chamomile plants. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, vol. 59, p. 5139–5149.
- LIU, H.-Y. et al. Co-regulation of water channels and potassium channels in rice. In *Physiologia Plantarum*. 2006, vol. 128, p. 58–69.
- LISZKAY, A. et al. Production of reactive oxygen intermediates (O_2^- , H_2O_2 and $\cdot OH$) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. In *Plant Physiology*. 2004, vol. 136, p. 3114–3123.
- MITTLER, R. Oxidative stress; antioxidants and stress tolerance. In *Trends in Plant Science*. 2002, vol. 7, p. 405–410.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. In *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2004, vol. 26, p. 211–219.
- MURPHY, A.S. et al. Early copper-induced leakage of K^+ from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. In *Plant Physiology*. 1999, vol. 121, p. 1375–1382.
- NEPOVÍM, A. et al. Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase. In *Chemosphere*. 2004, vol. 57, p. 1007–1015.
- NOVÁKOVÁ, M. et al. Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. In *Journal of Experimental Botany*. 2005, vol. 56, p. 2877–2883.
- PASTÍROVÁ, A. et al. Salicylic acid induces changes of coumarin metabolites in *Matricaria chamomilla* L. In *Plant Science*. 2004, vol. 167, p. 819–824.
- RAZAL, R.A. et al. Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism. In *Phytochemistry*. 1996, vol. 41, p. 31–35.
- REPČÁK, M. et al. Production of herniarin by diploid and tetraploid *Chamomilla recutita*. In *Pharmazie*. 1998, vol. 53, p. 278–279.
- REPČÁK, M. et al. Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. In *Journal of Plant Physiology*. 2001, vol. 158, p. 1085–1087.
- RODRÍGUEZ-SERRANO, M. et al. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide and calcium. In *Plant Physiology*. 2009, vol. 150, p. 229–243.
- SAKIHAMA, Y. et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. In *Toxicology*. 2002, vol. 177, p. 67–80.

- SARWAR, N. Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010, vol. 90, p. 925–937.
- SGHERRI, C. et al. Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. In *Physiologia Plantarum*. 2003, vol. 118, p. 21–28.
- SKÓRZÝNSKA-POLIT, E. et al. The activity and localization of lipoxygenases in *Arabidopsis thaliana* under cadmium and copper stresses. In *Plant Growth Regulation*. 2006, vol. 48, p. 29–39.
- SMITH, I.K. et al. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). In *Analytical Biochemistry*. 1988, vol. 175, p. 408–413.
- TAYLOR, N.L. et al. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism. In *Journal of Experimental Botany*. 2004, vol. 55, p. 1–10.
- TEWARI, R.K. et al. Nitric oxide retards xanthine oxidase-mediated superoxide anion generation in *Phalenopsis* flower: an implication of NO in the senescence and oxidative stress regulation. In *Plant Cell Reports*. 2009, vol. 28, p. 267–279.
- URBAN, P. et al. Characterization of recombinant plant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast. In *European Journal of Biochemistry*. 1994, vol. 222, p. 843–850.
- VELIKOVA, V. et al. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants, Protective role of exogenous polyamines. In *Plant Science*. Vol. 151, p. 59–66.
- WU, G.L. et al. Fluroxypyr triggers oxidative damage by producing superoxide and hydrogen peroxide in rice (*Oryza sativa*). In *Ecotoxicology*. 2010, vol. 19, p. 124–132.
- YANG, Y. et al. Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). In *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2010, vol. 73, p. 1982–1987.