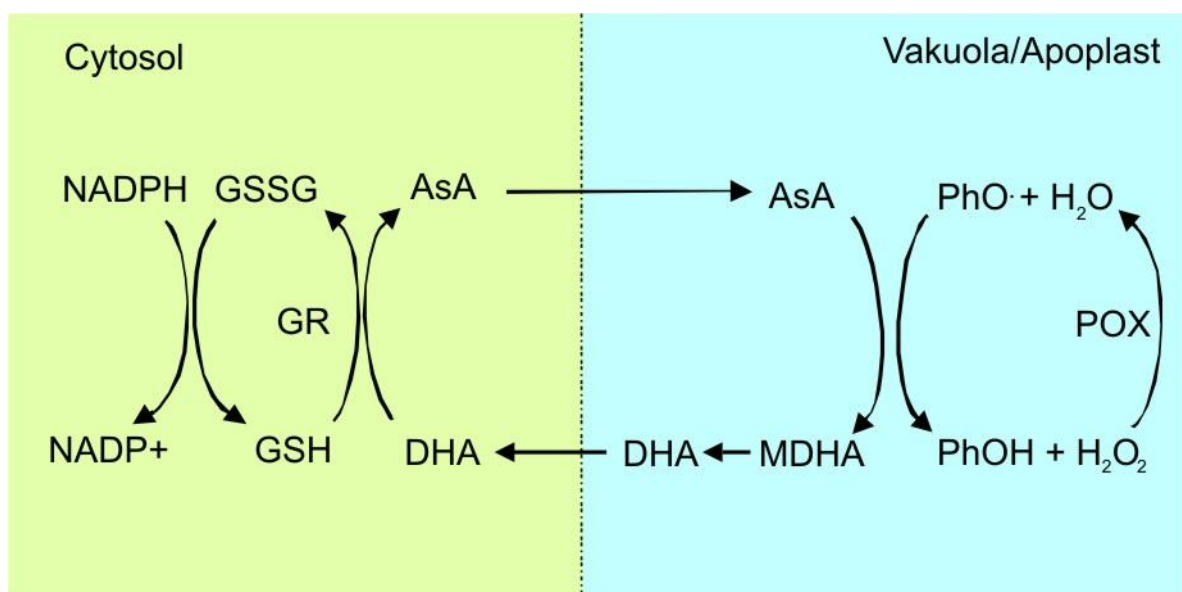


Fyziologie stresu

vypracoval Jiří Grúz, Ph.D.

Teoretický úvod:

Každá rostlina musí během svého života čelit vlivům okolního prostředí (teplotní výkyvy, minerální deficiencie, nedostatek světelného záření, poškození, infekce atd.), které lze souhrnně označit jako environmentální stres. Rostliny si proto vyvinuly celou řadu adaptačních a aklimatizačních mechanismů, které jim umožňují aktivně reagovat na danou situaci. Někdy ale míra stresového faktoru převyšuje přizpůsobivost rostliny a dochází k fyziologické nerovnováze jejímž typickým důsledkem je nadprodukce reaktivních kyslíkových derivátů (ROS – Reactive Oxygen Species; např. H_2O_2 , O_2^- , $\text{HO}_2^\cdot$). Tyto vysoce reaktivní molekuly jsou schopny oxidovat nukleové kyseliny, enzymy, receptory i membránové lipidy, a proto musí být rostlinnou buňkou ROS aktivně eliminovány. Systém antioxidační ochrany rostlin zahrnuje molekuly antioxidantů (kyselina askorbová, α -tocopherol, karotenoidy, glutathion, fenolické látky) a antioxidační enzymy jako superoxiddismutasa, katalasy a peroxidasy. Jedna z možných variant součinnosti výše popsaných složek na eliminaci peroxidu vodíku je uvedena na **Obr. 1**. Vzhledem k urychleným změnám životního prostředí a jejich dopadu na rostlinnou produkci je výše popsaný antioxidační aparát velmi intenzivně studován.



Obr. 1

Předpokládaný mechanismus antioxidačního působení fenolických látek v rostlinné buňce. AsA, askorbát; DHA, dehydroaskorbát; PhO·, fenoxyl radikál ($-\text{O}^\cdot$); PhOH, fenolická látka; GSH, redukovaný glutathion; GSSG, oxidovaný glutathion; GR, glutathionreduktasa; MDHA, monodehydroaskorbát; POX, peroxidasy; (Sgherri et al., 2003).

Experiment:

„Oxidativní stres a poškození buněčných membrán“.

Cíl experimentu:

Stanovení peroxidace membránových lipidů a celkových fenolických látek v rostlinách rajčete vystavených deficienci dusíku a fosforu.

Rostlinný materiál:

Rajče (*Solanum lycopersicum*; *Lycopersicon esculentum*).

Potřeby a chemikálie:

Pinzeta, pipety, eppendorfy, 2N Folin-Ciocalteu činidlo, TBA, kyselina trichloroctová, Na_2CO_3 , methanol a kyselina galová.

Princip:

Stanovení peroxidace membránových lipidů je založeno na kvantifikaci markeru oxidativního poškození membrán – malondialdehydu (MDA). Vzniklý MDA tvoří s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) červený komplex s absorpčním maximem při vlnové délce 532 nm. Komplex MDA-TBA lze kvantifikovat na základě známého extinkčního koeficientu $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Protože TBA nereaguje pouze s MDA, ale i s dalšími produkty peroxidace, je vhodnější místo „stanovení MDA“ užívat označení „stanovení TBARS“ (ThioBarbituric Acid Reactive Substances). Z kvantitativního hlediska představuje MDA kolem 90% TBARS a proto jsou obě zkratky běžně užívány jako synonyma.

Stanovení celkových fenolických látek (TPC – Total Phenolic Content) je založeno na reakci „fenolických látek“ s Folin-Ciocalteu činidlem. Modré zbarvení vznikajícího polymerního komplexu je důsledkem redukce Folin-Ciocalteu činidla (snížením oxidačního čísla molybdenu). Intensita zbarvení se měří spektrofotometricky při 750 nm. Kvantifikace je založena na srovnání vzorku se standardem kyseliny galové a proto se výsledky uvádí v ekvivalentech kyseliny galové (GAE – Gallic Acid Equivalents). Protože Folin-Ciocalteu činidlo nereaguje specificky s fenolickými látkami, ale s většinou redukujících molekul (např. kyselina askorbová), vyjadřují naměřená data spíše antioxidační kapacitu vzorku. TPC je proto výborně korelován s ostatními testy pro stanovení antioxidační kapacity.

Postup:

1. Do eppendorfek navažte 100 mg listů a homogenizujte 5 minut společně s jedním mililitrem 80% methanolu na kulovém mlýnu. Eppendorfky odstředte na centrifuze (17000 RPM, 4 minuty) a odeberte extrakt (supernatant).
2. Pro stanovení celkových fenolických látek napipetujte 60 μL extraktu do eppendorfky a doplňte do 500 μL destilovanou vodou. K takto zředěnému extraktu napipetujte 25 μL Folin-Ciocalteu činidla (2N), roztok protřepejte, dopipetujete 975 μL 2% Na_2CO_3 , a znovu protřepejte. Obdobně připravte jednotlivé body kalibrační řady, pouze namísto rostlinného extraktu napipetujte 5, 10, 30 a 100 μL 0.02% kyseliny galové. Roztoky nechte inkubovat při laboratorní teplotě 30 minut. Napipetujte 200 μL roztoku do mikrodestičky.
3. Na spektrometru změřte absorbance jednotlivých roztoků při 750 nm.
4. Pro stanovení MDA napipetujte 200 μL extraktu do eppendorfky, přidejte 100 μL roztoku obsahujícího 0.1% kyselinu trichloroctovou a 0.5% TBA. Roztoky protřepejte a inkubujte 30 minut při 95 °C. Po inkubaci nechte vychladnout a znovu odstředte na centrifuze (17000 RPM, 4 minuty). Napipetujte 150 μL supernatantu do mikrodestičky a pravítkem změřte optickou dráhu, tj. vzdálenost mezi dnem jamky a hladinou.
5. Změřte absorbance roztoků na mikrodestičce při vlnové délce 532 nm s korekcí při 600 nm.

Vyhodnocení:

1. Vypočítejte koncentraci MDA ve vzorcích pomocí vztahu $A = c \cdot \epsilon \cdot l$ (kde A je absorbance, c je koncentrace, ϵ je molární extinkční koeficient a l je optická dráha) a vyjádřete ji v $\text{nmol g}^{-1} \text{FW}$ (Fresh Weight - čerstvá hmotnost rostlinného materiálu)
2. Metodou lineární regrese vytvořte kalibrační přímku pro kyselinu galovou a vypočítejte obsah celkových fenolických látek vyjádřený v $\mu\text{g GAE g}^{-1} \text{FW}$.
3. Srovnajte míru poškození buněčných membrán v kontrolních a stresovaných rostlinách. Souvisí tyto hodnoty s množstvím celkových fenolů (antioxidační kapacitou) v rostlinách?

Otázky:

1. Co může způsobit změny klimatu?
2. Vznikají ROS v rostlinné buňce i za normálních podmínek? Jakým způsobem?
3. Jakou funkci mají membránové lipidy a co je důsledkem poškození buněčných membrán?
4. Jaké znáte přírodní antioxidanty?