

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Antoniana Žufiř

**Antioxidační systém rostlin rajřat vystavených triazolovým
fungicidům**

Antioxidant system of tomato plants exposed to triazole fungicides

Diplomovř prřce

Vedoucí/ řkolitel: RNDr. Veronika Hřskovř, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Helena Ryřlavř, CSc.

Praha, 2022

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Veroniky Hýskové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu.“

V Praze dne

Podpis:

Antoniana Žufíć

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D. za pomoc a vedení této diplomové práce. Také děkuji své konzultantce prof. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc., celému kolektivu laboratoře 209 a speciálně RNDr. Kateřině Bělonožníkové, Ph.D. za všechny informace a podporu při vypracovávání této práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za trpělivost a za to že vždy stojí při mně.

Abstrakt

Houbové patogeny způsobují celosvětově závažné ztráty zemědělských plodin. V poslední době se však chemické fungicidy stávají nebezpečnými kontaminanty životního prostředí působící na necílové organismy. Cílem této práce bylo zjistit, jaký vliv mají triazolové fungicidy ve formě penkonazolu (P), tebukonazolu (T) nebo jejich kombinace (PT) na rostliny rajčat *Solanum lycopersicum* L. cv. Cherrola.

Ve sledované intervaly, tj. po dvou a pěti každotýdenních aplikacích P, T nebo PT, buď formou postřiku nebo zálivky nebyla v listech, kořenech ani plodech zjištěna významnější změna aktivity klíčového enzymu askorbát-glutathionového cyklu askorbátperoxidasy a aktivity cytosolových peroxidas. Zatímco v kořenech byla nalezena mírně zvýšená aktivita guajakolperoxidasy vlivem postřiku T i kombinace PT, v listech byla aktivita tohoto enzymu snížena podobně jako katalasa. Největší změny v antioxidační kapacitě v listech korelující se zvýšeným obsahem fenolických látek a flavonoidů byly zaznamenány po pěti aplikacích penkonazolu (P) formou zálivky do půdy, a to jak samotného P, tak v kombinaci ve formě PT. Studované triazoly významně ovlivnily zastoupení isoform superoxiddismutasy a částečně i celkových peroxidas v listech, kořenech a plodech a askorbátperoxidasy v listech. Nejvyšší obsah HSP70 byl zjištěn v kořenech rostlin vystavených fungicidům ve formě postřiku na listy.

Klíčová slova

Antioxidační enzymy, antioxidační vlastnosti, peroxidasy, antioxidační kapacita, nativní elektroforéza, triazoly, penkonazol, tebukonazol, HSP70

Abstract

Fungal pathogens cause severe crop losses worldwide. Recently, however, chemical fungicides have become dangerous environmental contaminants affecting non-target organisms. The aim of this study was to investigate the effect of triazole fungicides in the form of penconazole (P), tebuconazole (T) or their combination (PT) on tomato plants *Solanum lycopersicum* L. cv. Cherrola.

No significant change in the activity of a key enzyme of the ascorbate-glutathione cycle, ascorbate peroxidase and activity of cytosolic peroxides, was detected in leaves, roots or fruits at the intervals studied, i.e. after two and five weekly treatments of P, T or PT, either as a foliar or a soil application. While slightly increased guaiacol peroxidase activity was found in roots due to T spraying and PT combination, the activity of this enzyme was reduced in leaves similar to catalase. The greatest changes in leaf antioxidant capacity correlated with increased phenolic and flavonoid content were observed after five treatments of penconazole (P) as a soil application both P alone and in combination as PT. The studied triazoles significantly affected the abundance of isoforms of superoxide dismutase and partially total peroxides in leaves, roots and fruits and of ascorbate peroxidase in leaves. The highest content of HSP70 was found in the roots of plants exposed to fungicides as foliar sprays.

Key words

Antioxidant enzymes, antioxidant properties, peroxidases, antioxidant capacity, native electrophoresis, triazoles, penconazole, tebuconazole, HSP70

Obsah

1. Úvod	11
1.1 Triazolové fungicidy	11
1.1.1 Funkce a metabolismus působení	12
1.1.2 Tebukonazol	13
1.1.3 Penkonazol.....	14
1.2 Oxidační stres rostlin.....	15
1.2.1 ROS a procesy spojené s jejich vznikem.....	15
1.2.2 Oxidační stres rostlin způsobený fungicidy.....	16
1.3 Antioxidační systém a askorbát-glutathionový cyklus.....	17
1.3.1 Superoxiddismutasa	20
1.3.2 Peroxidasa a katalasa.....	21
1.3.3 Antioxidační látky.....	22
1.4 Proteiny teplotního šoku.....	24
2 Cíl práce.....	25
3 Materiál a metody	26
3.1 Chemikálie a přístroje.....	26
3.2 Kultivace rostlin, aplikace fungicidů.....	27
3.3 Příprava extraktů.....	28
3.4 Stanovení antioxidační kapacity	29
3.4.1 Stanovení antioxidační kapacity na principu zhášení radikálu DPPH·	29
3.4.2 Stanovení antioxidační kapacity na principu zhášení kationradikálu ABTS ^{•+}	29
3.4.3 Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP	30
3.4.4 Stanovení celkových flavonoidů.....	31
3.4.5 Stanovení celkových fenolických látek.....	32
3.5 Stanovení enzymové aktivity.....	32
3.5.1 Aktivita volných a membránově vázaných celkových peroxidas.....	32
3.5.2 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy.....	33
3.5.3 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy	33
3.5.4 Stanovení aktivity ABTS peroxidasy.....	33
3.5.5 Stanovení aktivity katalasy.....	33

3.5.6	Stanovení aktivit NADP-dependentních dehydrogenas	33
3.6	Elektroforetická separace za nativních podmínek	34
3.6.1	Detekce proteinů v gelu.....	35
3.6.2	Detekce aktivity a izoenzymového složení celkových peroxidas v gelu ..	35
3.6.3	Detekce aktivity a izoenzymového složení askorbátperoxidasy v gelu	35
3.6.4	Detekce aktivity a izoenzymového složení superoxiddismutasy v gelu ...	35
3.6.5	Stanovení relativních molekulových hmotností isoform antioxidačních enzymů.....	36
3.7	Imunochemické metody	37
3.8	Stanovení obsahu proteinů	38
3.9	Statistická analýza	38
4	Výsledky	39
4.1	Detekce isoform antioxidačních enzymů pomocí nativní elektroforézy v listech, kořenech a plodech rostlin rajčat.....	39
4.1.1	Fergusonova metoda kalibrace nativní elektroforézy	39
4.1.2	Isoenzymové složení peroxidas v různých částech rostliny rajčete.....	41
4.1.3	Isoenzymové složení a identifikace isoform SOD pomocí inhibičních studií s H ₂ O ₂ a KCN.....	42
4.2	Vliv triazolových fungicidů aplikovaných dvěma způsoby na metabolismus rostlin rajčete	43
4.2.1	Antioxidační kapacita v listech rajčat ošetřených fungicidy	43
4.2.2	Vliv na aktivitu antioxidačních enzymů v listech, kořenech a plodech	49
4.2.2.1	Aktivita peroxidas v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy	49
4.2.2.2	Isoenzymové složení peroxidas v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy.....	55
4.2.2.3	Aktivita askorbátperoxidasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy	56
4.2.2.4	Isoenzymové složení askorbátperoxidasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy.....	60
4.2.2.5	Aktivita guajakolperoxidasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy.....	61
4.2.2.6	Aktivita ABTS peroxidasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy	65

4.2.2.7	Isoenzymové složení superoxiddismutasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy	67
4.2.2.8	Aktivita katalasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy	68
4.2.3	Aktivita NADP-depedentních dehydrogenas v kořenech rostlin rajčat ošetřených fungicidy	69
4.2.4	Obsah HSP70	74
4.3	Korelační analýza	76
5	Diskuse	77
6	Závěr.....	85
	Seznam literatury	86

Seznam zkratek a symbolů

6PGDH	6-fosfoglukonátdehydrogenasa
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
AMP	2-amino-2-methyl-1-propanol
APOD	askorbátperoxidasa
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát disodný
BSA	hovězí sérový albumin (z ang. bovine serum albumine)
CAT	katalasa
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTT	dithiothreitol
EDTA	dvojsodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
EtOH	ethanol
f	ošetření fungicidy postřikem na listy (z ang. foliar application)
FRAP	redukční (antioxidační) síla (z angl. ferric ion reducing antioxidant power)
G6PDH	glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HSP	proteiny teplotního šoku
CHS	chalkonsynthasa
ICDH	isocitrátdehydrogenasa
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (z ang. International Union of Pure and Applied Chemistry)

Keap1	gen regulátor aktivity Nrf2 (z ang. Kelch-like ECH-associated protein 1)
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinasy
ME	NADP-malátdehydrogenasa (oxalacetát-dekarboxylační)
Mr	relativní molekulová hmotnost
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBT	nitro blue tetrazolium chlorid
NF-κB	nukleární faktor κB
Nrf2	transkripční faktor 2 (z ang. nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
P	penkonazol
PBS	fyziologický roztok (z ang. Phosphate Buffered Saline)
PPARγ	receptor γ aktivovaný peroxisomovým proliferačním faktorem
POX	peroxidasy
PVP	polyvinylpolypyrrolidon
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
s	ošetření fungicidy zálivkou do půdy (z ang. soil application)
SOD	superoxiddismutasa
STAT3	signální transduktor a aktivátor transkripce 3
T	tebukonazol
TEMED	tetramethylethylendiamin
TPTZ	2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazin

1. Úvod

1.1 Triazolové fungicidy

Triazol je obecné označení pro sloučeninu s pětičlenným cyklem, obsahujícím dva uhlíkové a tři dusíkové atomy. Právě díky své neobvyklé struktuře vykazují tyto sloučeniny široký rozsah různých biologických aktivit. Jejich účinky mohou být antibakteriální, antimykotické, protivirové, protizánětlivé, antidepresivní, analgetické a hypoglykemické¹. Nacházejí se v mnoha léčivech, jako je trazodon (antidepresivum), rizatriptan (lék proti migréně) a alprazolam, též známý jako Xanax².

Po objevení triazolů se chemie jeho sloučenin vyvíjela a postupně urychlovala zavedením několika snadných syntetických technik spolu s jeho všestrannou interakcí s biologickými systémy^{3,4,5}. Objev antifungálních vlastností triazolových derivátů v roce 1944 vedl k syntéze mnoha dnes používaných účinných látek jako flukonazolu, itraconazolu, vorikonazolu, posakonazolu, efinaconazolu a mnoha dalších. Z nich se např. flukonazol používá k léčbě infekcí vyvolaných houbami a k prevenci kandidových infekcí a efinaconazol k léčbě plísňových infekcí nehtů^{6,7}.

Zatímco relativně málo hub způsobuje invazivní onemocnění u člověka, houbová onemocnění jsou nejčastější příčinou infekcí rostlin. Fungicidy byly po staletí široce používány k léčbě infekcí rostlin, k prevenci ztrát plodin, ke zvýšení zemědělského výnosu a ke konzervaci dřeva a jiných materiálů⁸.

Triazoly jsou velmi často využívány jako fungicidy k ošetření a ochraně různých plodin včetně hroznového vína, ovocných stromů, obilovin, zeleniny, okrasných rostlin a chmele. Působí antimykoticky na celou řadu patogenních houbových organismů, především se používají proti působení padlí nebo strupovitosti pomerančovníků⁹.

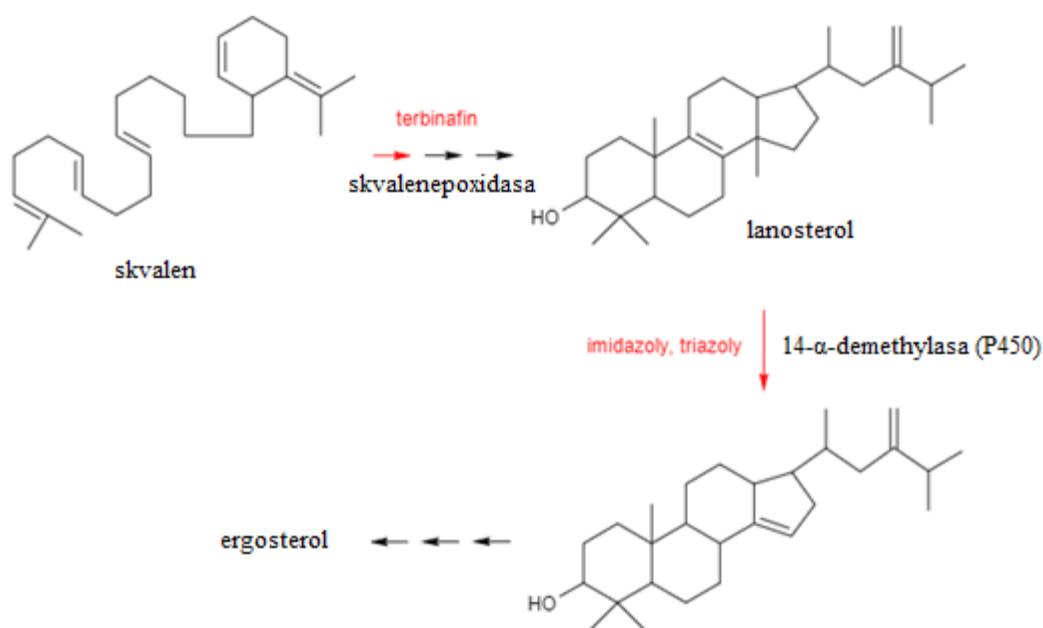
Právě díky dlouhodobému a rozšířenému používání fungicidů si mnohé patogeny zemědělských plodin vyvinuly rezistenci k těmto fungicidům. Taktéž je zajímavé, že jsou určité zemědělské triazolové fungicidy, včetně nejpoužívanějšího tebukonazolu, strukturálně velmi podobné lékařským triazolům používaným k léčbě aspergilózy (např. vorikonazol, itraconazol a posakonazol). Proto není překvapivé, že si i některé lidské patogeny vyvinuly rezistenci vůči těmto používaným fungicidům⁸. Tento faktor může být až životně důležitý u tří nejnebezpečnějších houbových patogenů, které napadají člověka – *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. a *Aspergillus* spp. Tyto patogeny mohou způsobit těžké systémové infekce, které mohou být smrtelné i při odpovídající léčbě¹⁰.

V neposlední řadě se dneska více a více zkoumá účinek a působení fungicidů na lidské zdraví především na lidskou reprodukci a možnou orgánovou toxicitu. Znepokojující je jejich možná hepatotoxicita a teratogenita a účinek na placentu a embrya^{11,12,13}.

1.1.1 Funkce a metabolismus působení

Mechanismus antifungálního účinku triazolových fungicidů je dobře známý a spočívá v inhibici biosyntézy steroidů, především ergosterolu. Ergosteroly jsou nezbytnou podstatou pro strukturu a funkci membrán a vývoj funkčních buněčných stěn hub. Triazoly také působí jako endogenní disruptory. Následek působení těchto fungicidů je tedy vždy abnormální růst buněk hub, a nakonec jejich zánik^{9,14}.

Podstata inhibice spočívá v blokování klíčového enzymu 14- α -demethylasy. Tento enzym je podstatný v biochemii vzniku ergosterolů z prekursoru skvalenu^{15,16}.



Obrázek 1 Působení triazolových fungicidů na enzym 14- α -demethylasu při vzniku ergosterolů ze skvalenu. Převzato a upraveno z¹⁵.

Enzym lanosterol 14- α -demethylasa je součástí rodiny enzymů cytochrom P450 a je kódovaný genem ERG11¹⁶.

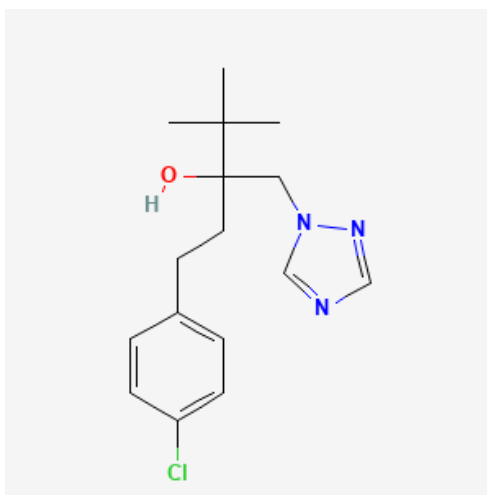
Azoly působí prostřednictvím dusíku, který se váže na atom železa hemu, čímž brání aktivaci kyslíku, který je nezbytný pro demethylaci lanosterolu. Kromě tohoto volně přístupného dusíku se předpokládá, že druhý dusík v azolech interaguje přímo s

apoproteinem lanosteroldemethylasy. Má se za to, že poloha tohoto druhého dusíku ve vztahu k apoproteinu může určovat specificitu různých azolových léčiv pro enzym. Při vysokých koncentracích mohou azoly také přímo interagovat s lipidy v membránách¹⁷.

1.1.2 Tebukonazol

Tebukonazol je jeden z nejvíce prodáváných fungicidů. Jedná se o širokospektrální fungicid používaný jako mořidlo semen a jako postřik na listy pro širokou škálu chorob. Jeho IUPAC název je (RS)-1-p-chlorofenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol^{18,19}.

Tebukonazol je chirální molekula s asymetrickým uhlíkem. Existují tedy dva enantiomery, přičemž R-tebukonazol má silnější fungicidní aktivitu než S-tebukonazol. R-tebukonazol se selektivně bioakumuluje v rybách dánío pruhované (*Danio rerio*), tudíž je také toxičtější pro vodní organismy²⁰.



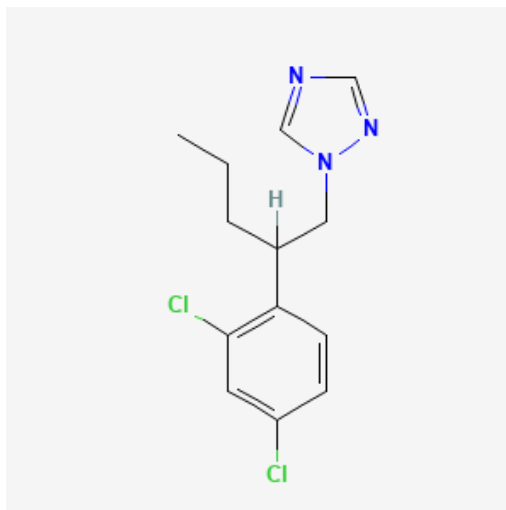
Obrázek 2 Chemický vzorec fungicidu tebukonazolu. Převzato z²¹.

Toxicita a vliv tebukonazolu na prostředí a organismy je velmi pečlivě a dlouho zkoumán. Bylo dokázáno, že tebukonazol může vyvolávat metabolické a endokrinní poruchy u savců^{19,22}.

Velice zajímavá je studie zkoumající vliv tebukonazolu a současně ochraňující vliv rostlin *Ficus carica*. Fíkovník se totiž ukázal jako jedna z rostlin, která je prospěšná proti účinkům pesticidů díky svým hepatoprotektivním, antioxidačním a protizánětlivým vlastnostem^{22,23}. Testovaný subjekt v tomto experimentu byli netopýři, kterým bylo podané ovoce ošetřené tebukonazolem a ošetřené tebukonazolem v kombinaci

s extraktem z fíkovníku. Po týdnu expozice netopýři, kterým byla podávána papaya ošetřená pouze tebukonazolem vykazovali zvýšenou aktivitu enzymů superoxiddismutasy a katalasy. Stejně změny byly i v markerech oxidačního stresu v prsních svalech a ve varlatech. Současné podávání fungicidu s rostlinným extraktem *F. carica* zeslabilo většinu markerů oxidačního stresu a snížilo poškození jater u netopýřů. Steroidní nerovnováhu způsobenou expozicí fungicidu se nepodařilo vrátit²².

1.1.3 Penkonazol



Obrázek 3 Chemický vzorec penkonazolu. Převzato z²⁴.

Penkonazol je velmi rozšířený fungicid, který se používá jako prevence a proti působení padlí. Používá se na ovoce i zeleninu, a především na jablka a hrozny²⁵. Jeho IUPAC název je 1-[2-(2,4-dichlorofenyl) pentyl] -1H-1,2,4-triazol²⁶.

Právě kvůli tomu, že je penkonazol jedním z nejpoužívanějších fungicidů na celém světě jsou jeho možné toxické účinky na necílové organismy velmi znepokojivé. Zajímavá je studie zkoumající vliv na raka říčního (*Astacus leptodactylus*), který je velmi citlivý na znečištění vody, ve které žije a slouží proto jako bioindikátor čistoty vodních toků. Navíc je tento sladkovodní korýš často konzumován i lidmi. Zjištění ukazují, že akutní podávání penkonazolu rakům způsobuje významné toxické účinky na esterasu, antioxidační parametry a metabolické enzymy²⁷.

Jeho toxicita byla zkoumaná na potkanech, králících, psech a mnoha jiných organismech. Zatím co v některých případech jeho toxické působení prokázané nebylo, experti se shodli a doporučili ať EChA (ang. European Chemicals Agency) penkonazol

zahrne do reprotoxické kategorie 3- R63. Jedná se o kategorii látek, které představují možné riziko poškození nenarozeného dítěte^{25,26}.

1.2 Oxidační stres rostlin

Prostředí, ve kterém rostliny žijí způsobuje environmentální stres, který negativně ovlivňuje růst a vývoj rostlin a produktivitu plodin. Rostliny jsou neustále vystavené abiotickým stresům, jako jsou extrémní teploty, nedostatek nebo přebytek světla, sucho, mraz, vítr, těžké kovy atd²⁸. Kromě toho jsou rostliny vystavené i biotickým stresům zapříčiněným různými organismy.

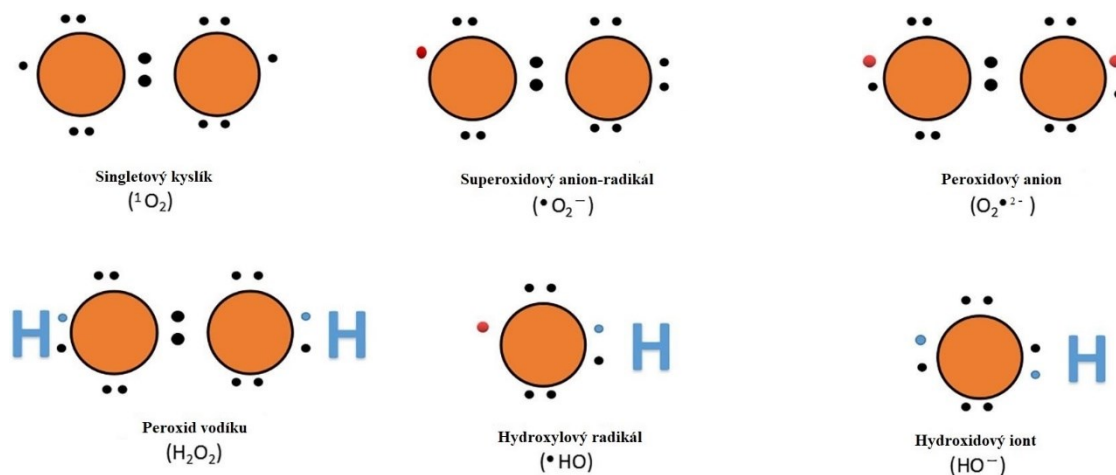
Všechny tyto nepříznivé podmínky ovlivňují metabolismus reaktivních forem kyslíku a dusíku (ROS a RNS). Vysoké koncentrace těchto reaktivních forem narušují homeostázu, což následně může vyvolat poškození membránových lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Tento stav může nakonec vést k nitro-oxidačnímu stresu a smrti rostlinných buněk²⁸. Oxidační stres je tedy definován jako posun rovnováhy mezi oxidačními a antioxidačními reakcemi ve prospěch těch oxidačních²⁹.

ROS iniciuje různé signální kaskády v buňkách. Spojen je s transkripčním faktorem Nrf2 a jeho represorem Keap1, s MAPK, jaderným faktorem kappa B (NF-κB), proteinkinasou C, rodinou proteinů STAT3 a receptorem PPARγ. Všechny tyto kaskády a molekuly mohou jako následek mít buď poškození buněk nebo účinnou obranou reakci proti působení ROS³⁰.

1.2.1 ROS a procesy spojené s jejich vznikem

Molekulární kyslík (O_2) je primárním buněčným akceptorem elektronů při aerobním dýchání, které plní základní roli při tvorbě ATP v membráně. Jako nežádoucí, ale nevyhnutelný důsledek různých metabolických dějů v kyslíkem nasyceném buněčném prostředí vznikají reaktivní formy kyslíku. Tyto formy jsou neustále generované částečnou nebo neúplnou redukcí molekulárního kyslíku³¹.

Mezi nejvýznamnější ROS patří superoxidový anion-radikál, hydroxidový ion, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a singletový kyslík. Mezi ostatní reaktivní formy, které jsou taktéž produkovány v rostlinných buňkách patří alkoxylový radikál ($RO\cdot$), peroxylový radikál ($ROO\cdot$), hydrogenperoxid ($ROOH$) atd^{31,32}.



Obrázek 4 Lewisovy struktury nejznámějších reaktivních forem kyslíku. Červené tečky označují nepárové elektrony. Převzato a upraveno z³².

Přestože ROS vznikají v přirozených podmínkách, jejich produkce se zvyšuje pod vlivem nepříznivých environmentálních podnětů a přirozeného průběhu stárnutí. Nedávné studie objasnily zdroj oxidačního stresu u rostlin a ukázala, že kromě klasických chloroplastových, mitochondriálních a peroxisomových zdrojů jsou ROS syntetizovány NADPH oxidasami a peroxidasami^{31,33}.

Za normálních podmínek v buňkách fungují jako signální molekuly, a bylo zjištěno, že ve vyšších rostlinách regulují vývoj, diferenciaci, redoxní hladiny, stresovou signalizaci, interakci s jinými organismy, systémové reakce a buněčnou smrt. Zároveň ale musí být odstraňovány, jinak by poškodily citlivé buněčné procesy³⁴.

1.2.2 Oxidační stres rostlin způsobený fungicidy

Obecně se může říct, že všechny zkoumané fungicidy ve vyšších koncentracích generují velké množství ROS, které ve skutečnosti způsobují oxidační poškození na buněčné úrovni. Toto tvrzení potvrzují různé studie dokazující statisticky významné zvýšení aktivity enzymů, které slouží jako obrana proti oxidačnímu stresu. Působením fungicidů se například výrazně zvyšují aktivity superoxiddismutasy (SOD, EC 1.15.1.1) a katalasy (CAT, EC 1.11.1.6), které odstraňují H_2O_2 . Zvyšuje se také například koncentrace peroxidas, které pomocí peroxidu vodíku oxidují různé substráty, a přitom tento peroxid mění na vodu^{35, 36,37,38}.

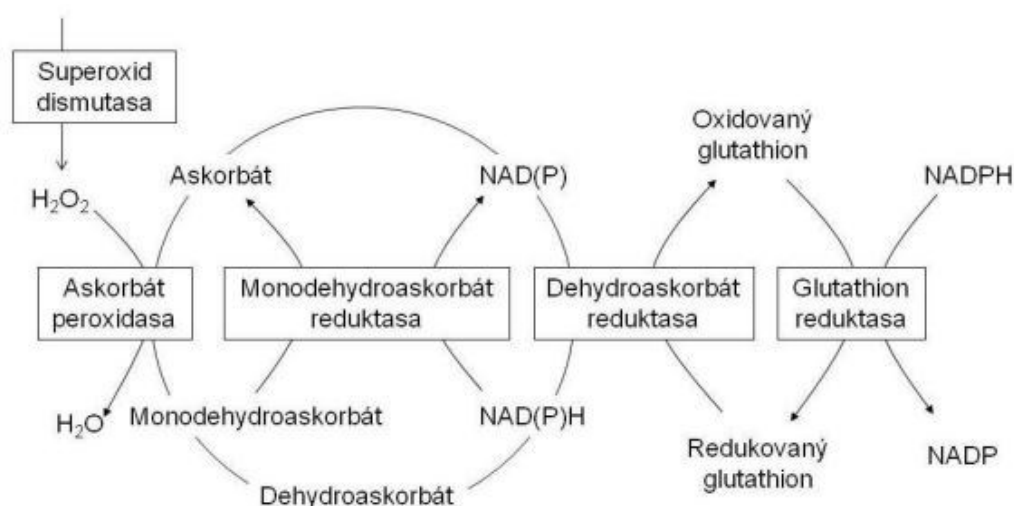
Zajímavá je studie, ve které se zjistilo, že expozice difenokonazolu významně inhibuje růst rostlin, o čemž svědčí snížení hmotnosti sušiny kořene, celkové délky kořene a plochy povrchu kořene až o 73 %. Expozice tomuhle fungicidu také významně inhibovala růst a vývoj výhonků a indukovala buňky listů rostlin ke generování více ROS, což vedlo ke snížení obsahu chlorofylu a následné inhibici fotosyntézy. Expozice difenokonazolu indukovala aktivity antioxidantních enzymů, přičemž se ukázalo, že aktivity superoxiddismutasy a akorbatperoxidasy byly vyšší a stabilnější ve zkoumaných kořenech než v listech. Na základě této studie kořeny rostlin vykazovaly výraznější schopnost pohlcovat superoxidové radikály než listy³⁸.

Další velice zajímavá studie zkoumala účinek dvou fungicidů (azoxystrobinu a epoxikonazolu), aplikovaných jako postřik na listy na ječmen setý (*Hordeum vulgare*) tři dny před fumigací škodlivými dávkami ozonu. Tyto fungicidy vyvolaly 50-60 % ochranu před poškozením ozonem na listech. Fungicidní ošetření rostlin ječmene ve fázi růstu významně zvýšilo celkový obsah bílkovin v listech a také aktivity většiny antioxidantních enzymů. Posílení antioxidantního systému rostlin těmito dvěma fungicidy významně a výrazně snížilo hladinu superoxidu v listech. Tímto bylo prokázáno výrazné posílení rostlinných antioxidantních enzymů a zvýšené vychytávání potenciálně škodlivého $O_2^{\cdot-}$ fungicidy jako mechanismu ochrany rostlin před škodlivým oxidačním stresem z prostředí³⁷.

1.3 Antioxidantní systém a askorbat-glutathionový cyklus

Oxidační stres je regulovaný proces, přičemž rovnováha mezi oxidační a antioxidantní kapacitou rostliny určuje osud této rostliny. V nestresujících podmínkách poskytuje antioxidantní systém adekvátní ochranu jak před aktivním kyslíkem, tak před volnými radikály. Přírodní i člověkem způsobené stresové situace vyvolávají zvýšenou produkci nebezpečných kyslíkových radikálů a v reakci na to se zvyšuje kapacita a působení antioxidantního systému³⁹.

Na obranné reakci rostlin vedoucí ke snížení oxidačního stresu se podílí mnoho látek enzymové i neenzymové povahy. Mezi nejznámější enzymy patří superoxiddismutasa, katalasa a enzymy askorbát-glutathionového cyklu. Tento cyklus se nazývá i Foyer-Halliwell-Asada cyklus a jedná se o klíčovou dráhu při které dochází k odstranění peroxidu vodíku. Tento cyklus probíhá v chloroplastech, cytosolu, mitochondriích a peroxisomech^{39, 40, 41}.



Obrázek 5 Askorbát-glutathionový cyklus. Převzato z⁴⁰.

Askorbát-glutathionová dráha se skládá z askorbátu, glutathionu a čtyř enzymů (askorbátperoxidasa-EC 1.11.1.11, monodehydroaskorbátreduktasa-EC 1.6.5.4, dehydroaskorbátreduktasa-EC 1.8.5.1 a glutathionreduktasa-EC 1.6.4.2)^{42,43}.

V prvním kroku této dráhy je peroxid vodíku přeměněn na vodu askorbátperoxidasou, využívající askorbát jako donor elektronů. Oxidovaný askorbát (monodehydroaskorbát) je opětovně přeměněn na askorbát monodehydroaskorbátreduktasou. Ovšem, část monodehydroaskorbátu je spontánně přeměněna na dehydroaskorbát. Později je tento dehydroaskorbát pomocí dehydroaskorbátreduktasy opět redukován na askorbát. Vzniká přitom oxidovaný glutathion, který je redukován glutathionreduktasou a za použití NADPH jako donoru elektronů^{43,44}.

Askorbát a glutathion jsou klíčové látky pro správný růst, vývoj a udržení redoxní rovnováhy v rostlinných buňkách. Podílejí se jak na základních metabolických reakcích normálně probíhajících v rostlinách, tak i na reakcích vyvolaných abiotickými nebo biotickými stresy. Lokalizovány jsou ve většině buněčných kompartmentů a kromě jejich

celkové hladiny v buňce hraje důležitou roli i poměr mezi redukovanými a oxidovanými formami těchto látek. Glutathion se také podílí na specifických funkcích, jako je detoxikace těžkých kovů, přenos a ukládání síry, regulace exprese genů souvisejících s obranou a aktivitou proteinů. Askorbát na druhou stranu působí jako molekula přenášející signál, kofaktor některých enzymů a prekursor kyseliny šťavelové a L-vinné⁴⁵.

Askorbát se také vyskytuje v buněčné stěně, kde je první linií obrany proti působení ozónu. Tento askorbát a askorbát oxidasa (EC 1.10.3.3) lokalizovaná v buněčné stěně se společně podílejí na kontrole růstu. Vysoká aktivita askorbát oxidasy je spojena s rychle rostoucími buňkami. Askorbát se také podílí na regulaci buněčného dělení ovlivňováním progresu z G1 do S fáze buněčného cyklu. Biosyntetická dráha askorbátu v rostlinách nebyla doposud identifikována⁴⁶.

Na druhou stranu, syntéza glutathionu je dobře známá a probíhá v cytosolu, mitochondriích, ale převážně v chloroplastech. Tento tripeptid reguluje více metabolických funkcí; například chrání membrány udržováním redukováného stavu jak α -tokoferolu, tak zeaxantinu, brání oxidativní denaturaci proteinů za stresových podmínek ochranou jejich thiolových skupin a slouží jako substrát pro glutathionperoxidasu (EC 1.11.1.9) i glutathion-S-transferasu (EC 2.5.1.18). Zvýšené hladiny endogenního glutathionu během stresu umožňují účinné vychytávání ROS, udržují osmotickou rovnováhu a zabraňují poškození lipidů, aminokyselin a polysacharidů, čímž zabraňují poškození membrán, fotosyntetických pigmentů, mitochondrií a dalších organel⁴⁷.

Askorbátperoxidasa je prvním enzymem Foyer-Halliwell-Asadaovy dráhy. Katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík, a tak zabraňuje akumulaci toxických hladin peroxidu vodíku v buňce. Patří do skupiny peroxidas I. třídy, které se vyznačují přítomností hemových prosthetických skupin. Askorbátperoxidasa je extrémně citlivá na koncentraci askorbátu, což se projevuje rychlým poklesem její aktivity při velmi nízké koncentraci této molekuly⁴³.

Význam askorbátperoxidasy a askorbát-glutathionového cyklu není omezen jen na chloroplasty; hraje také roli při vychytávání ROS v cytosolu, mitochondriích a peroxisomech. Různé isoformy tohoto enzymu jsou klasifikovány právě podle jejich subcelulární lokalizace. Rozpustné isoformy se nacházejí v cytosolu, mitochondriích a stroma chloroplastu, zatímco membránově vázané isoformy se nacházejí v peroxisomech

a glyoxysomech a thylakoidech chloroplastů. Exprese genů kódujících askorbátperoxidasu je ovlivněna působením vnějších podnětů a stresorů, což je další z důkazů, jak je tento enzym nesmírně důležitý v obranných reakcích rostlin^{48,49}.

Studie ukazují, že se v rajčeti (*Solanum lycopersicum*) nachází 7 genů kódujících askorbátperoxidasu. Kompletní genová rodina tohoto enzymu v rajčeti se skládá z genů kódujících tři cytosolové, dvě peroxisomální a dvě chloroplastické askorbátperoxidasy⁵⁰.

1.3.1 Superoxiddismutasa

Uvnitř buňky tvoří superoxiddismutasy (SOD) první linii obrany proti ROS. Nachází se v mitochondriích, chloroplastech, glyoxysomech, peroxisomech, apoplastech a v cytosolu. Tento enzym o molekulové hmotnosti 32 500 kDa eliminuje radikály superoxidových aniontů produkovaných NADPH-oxidasou plazmatické membrány jako odpověď na extracelulární podněty a vlivy okolního prostředí, tak i ty, které jsou primárně produkovány v mitochondriích jako vedlejší produkty metabolismu kyslíku.

Na základě kovu používaného jako kofaktor jsou SOD klasifikovány do tří skupin: Fe SOD, jehož kofaktor tvoří železo, Mn SOD, jehož kofaktor je mangan a Cu-Zn SOD, kterou tvoří měď a zinek. Všechny tyto typy SOD jsou umístěny v různých částech buňky. Fe SOD se nacházejí v chloroplastu a jsou kódovány genem *sod1*, Mn SOD se nachází v mitochondriích a peroxisomu a jsou kódovány *sod2* genem, Cu-Zn SOD se nachází v chloroplastu a cytosolu a kóduje je *sod3* gen. Geny *sod1* a *sod3* jsou si na určitých úrovních homologie aminokyselin podobné, zatímco gen *sod2* není podobný ani jednomu z nich^{51,52}.

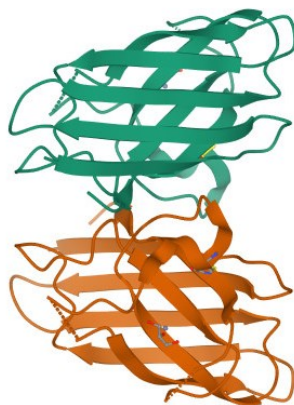
Fe SOD se nachází v prokaryotech i v eukaryotech a rozlišují se dvě odlišné skupiny těchto enzymů. První skupinou je homodimer tvořený dvěma identickými 20 kDa podjednotkovými proteiny. Tento typ Fe SOD byl izolován např. z *Escherichia coli* a z rostlinných druhů, *Gingo biloba*, *Brassica campestris* a *Nuphar lutea*. Druhá skupina Fe SOD, která se nachází ve většině vyšších rostlin, je tetramer čtyř stejných podjednotek s molekulovou hmotností 80–90 kDa. Fe SOD je inaktivován H₂O₂ a je odolný vůči inhibici KCN⁵².

V rajčatech se Fe-SOD sestává z 746-bp a předpokládá se, že kóduje protein o 249 aminokyselinách s vypočtenou molekulovou hmotností 27,9 kDa⁵³.

Mn SOD je buď dimerní nebo tetramerní enzym s jedním atomem Mn (III) na podjednotku. Enzym není inhibován kyanidem draselným (KCN) ani inaktivován H_2O_2 a je přítomen v eukaryotech i prokaryotech⁵².

Cu-Zn SOD se nachází povětšinou v eukaryotech. Nacházejí se v celé rostlinné buňce a existují dvě různé skupiny Cu-Zn SOD. První skupinu tvoří dimerní cytoplazmatické a periplazmatické formy. Druhou skupinu tvoří chloroplastické a extracelulární Cu-Zn SOD, které jsou tetramerní. Kyanid inhibuje tento enzym reverzibilně, zatímco H_2O_2 způsobuje nevratnou inhibici^{52,54}.

V rajčatech je Cu-Zn SOD homodimer skládající se z dvou β barelů a má přibližně 32 kDa⁵⁵.



Obrázek 6 Struktura Cu-Zn SOD izolované z rostliny rajčete. Převzato z⁵⁶.

1.3.2 Peroxidas a katalasa

Peroxidas jsou jedny z klíčových antioxidačních enzymů a v přírodě jsou široce rozšířené. Katalyzují oxidaci různých látek za současného rozkladu peroxidu vodíku. Dělí se na hemové a nehemové, přičemž se ty hemové dále dělí na dvě takzvané superrodiny. Do první patří peroxidasy živočichů, zatímco do druhé patří peroxidasy rostlin, hub a bakterií⁵⁷. Podle substrátu se také dále dělí na askorbátperoxidasu, guajakolperoxidasu (EC 1.11.1.7), ABTS peroxidasu (EC 1.11.1.7) a mnoho dalších.

Peroxidas se účastní mnoha fyziologických procesů v rostlinách. Podílejí se na metabolismu buněčné stěny, biosyntézy ligninu, hojení ran, růstu a zrání ovoce, klíčení semen atd. Mají důležitou roli v odstraňování reaktivních forem kyslíku, a tím zabraňují oxidačnímu poškození buňky^{57,58}.

Při reakcích katalyzovaných peroxidasami je peroxid vodíku redukován za současné oxidace jiného substrátu. Tím je předcházeno akumulaci peroxidu, produkci volných radikálů a poškození membrán. Tyto enzymy mohou oxidovat i některé cizorodé látky - xenobiotika. Peroxidasy se dělí na specifické (potřebují k reakci určitý substrát) a nespecifické (oxidují více různých substrátů)⁵⁹.

Tyto enzymy se nachází v několika isoformách, které mohou být podle izoelektrického bodu rozlišeny na isoformy aniontové a kationtové. Hladina isoenzymů se může u rostlin měnit v závislosti na životních podmínkách⁶⁰.

Katalasa (EC1.11.1.6) je jeden z nejdůležitějších antioxidačních enzymů, který se nachází ve všech aerobních organismech. Čistý holoenzym v rajčatech má molekulární hmotnost 225 kDa se čtyřmi podjednotkami po 55 kDa. Mnohé studie dokazují životní důležitost tohoto enzymu, obsahujícího hem, při vychytávání peroxidu a při obraně proti stresu. Nachází se hojně v peroxisomu a má nepostradatelnou roli v procesu fotorespirace. Fotorespirace obnovuje uhlík, který by se jinak ztratil oxidací Rubisco a produkcí glykolátu. Katalasa katalyzuje přeměnu H_2O_2 na vodu a molekulární kyslík. Katalasa také používá tento H_2O_2 k oxidaci různých toxinů včetně fenolů, kyseliny mravenčí, formaldehydu a alkoholu^{61, 62, 63, 64}.

Její aktivita je regulovaná a ovlivněna mnoha faktory jako jsou cirkadiánní rytmus, působení ROS, stárnutí a může být regulována i na proteinové úrovni⁶⁵.

Katalasa se obvykle skládá z polypeptidů o hmotnosti 50–70 kDa, které jsou organizovány do tetramerů, přičemž každý monomer nese hemovou prosthetickou skupinu. Dosud je známo, že všechny rostliny, včetně jednoděložných a dvouděložných, jako jsou tabák, *Arabidopsis*, kukuřice, dýně a rýže, obsahují tři geny kódující tento enzym^{65, 66}.

1.3.3 Antioxidační látky

Dva pravděpodobně nejdůležitější antioxidanty, askorbát a glutathion, byly již popsány v kapitole 1.3. Ovšem, kromě těchto existuje ještě celá řada antioxidačních látek, které pomáhají rostlinám bojovat proti reaktivním formám kyslíku a oxidačnímu stresu. Většinou se jedná o polyfenoly (fenolické kyseliny, flavonoidy, antokyany, lignany a stilbeny), karotenoidy (xantofyly a karoteny), terpenoidy a vitaminy.

Mnohé z těchto rostlinných metabolitů také vykazují biologickou aktivitu proti hmyzu, houbám a dalším mikroorganismům, což tvoří základ pro jejich použití v medicíně. Obecně platí, že tyto přírodní antioxidanty, zejména polyfenoly a karotenoidy, vykazují širokou škálu biologických účinků, jako jsou protizánětlivé, antibakteriální a antivirové účinky. Kromě toho působí proti stárnutí a mají protirakovinné účinky^{67,68}.

Flavonoidy je skupina přírodních látek s různorodou strukturou. Nacházejí se v ovoci, zelenině, obilí, kořenech, stoncích a v květech rostlin, v čaji a víně. V rostlinách jsou zodpovědné za barvu a vůni květů a v plodech přitahují opylovače a následně rozptylují plody, což pomáhá při klíčení semen a výtrusů a růstu a vývoji sazenic. Chrání rostliny před různými biotickými a abiotickými stresy a působí jako UV filtry, fungují jako signální molekuly, detoxikační činidla a antimikrobiální sloučeniny. Hrají roli proti mrazuvzdornosti, odolnosti vůči suchu a při aklimatizaci rostlin na teplo⁶⁹.

Fenoly jsou sloučeniny, které mají jeden nebo více aromatických kruhů s jednou nebo více hydroxylových skupin. Jsou nejhojnějšími sekundárními metabolity rostlin, s více než 8 000 různých struktur, od jednoduchých molekul, jako jsou fenolové kyseliny, až po vysoce polymerizované látky, jako jsou taniny. Rostlinné fenoly se obecně podílejí na obraně proti ultrafialovému záření nebo působení patogenů, parazitů a predátorů. Přispívají také k vybarvení rostlin⁷⁰.

S bojem proti oxidačnímu stresu úzce souvisí NADPH, protože působí jako koenzym enzymů, a tak zajišťuje správné fungování askorbát-glutathionového cyklu. Současně je tento koenzym nezbytný v biosyntetických procesech, jako je buněčný růst, proliferace a detoxikace v eukaryotických buňkách. Po vyčerpání je NADPH znovu generován skupinou enzymů zvaných NADP-dehydrogenasy. Tato skupina obsahuje důležité enzymy jako jsou glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49), 6-fosfoglukonátdehydrogenasa (6PGDH, EC 1.1.1.44), NADP-malátdehydrogenasa (ME, EC 1.1.1.40) a NADP-isocitrátdehydrogenasa (ICDH, EC 1.1.1.42.). Pod vlivem stresu se zvyšují exprese proteinů a aktivity těchto enzymů⁷¹.

Kromě zmíněných enzymů s NADPH souvisí i enzym šikimátdehydrogenasa (EC 1.1.1.25.), která katalyzuje reverzibilní redukci dehydrošikimátu na šikimát s využitím NADPH jako redukčního kofaktoru. Tento enzym je součástí šikimátové dráhy, kterou vznikají sekundární metabolity a aromatické kyseliny fenylalanin, tryptofan a tyrosin^{72,73}.

Chalkonsynthasa (CHS, EC 2.3.1.74.) je členem rodiny rostlinných polyketidsynthas, produkujících polyketidy (velká skupina sekundárních metabolitů u živočichů, rostlin a hub). CHS katalyzuje první reakci v biosyntéze flavonoidů jejíž produktem je právě chalkon. Z něho se pak odvozují ostatní skupiny flavonoidů^{74,75}.

1.4 Proteiny teplotního šoku

Neustále vystavení rostlin různým stresorům vede k narušení homeostasy proteinů. Udržování proteinů v jejich funkčních nativních konformacích a zabránění agregaci nenativních proteinů jsou důležité pro přežití buněk podléhajícím stresu. Proteiny teplotního šoku (HSP, z ang. heat shock proteins) fungující jako molekulární chaperony jsou klíčovými složkami odpovědnými za sbalování, skládání do podjednotek, translokaci a degradaci proteinů za stresových podmínek, a i v mnoha normálních buněčných procesech. U rostlin a živočichů existuje pět hlavních rodin HSP na základě jejich homologie a přibližných molekulových hmotností. To jsou HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 a malé HSP (sHSP, z ang. small). Mnohé z těchto HSP se nacházejí hlavně v cytoplazmě a reagují na abiotické a biotické stresy. Kromě v cytosolu se HSP nacházejí v endoplazmatickém retikulu, chloroplastech, mitochondriích a jádru⁷⁶.

Jedna z nejvíce konzervovaných tříd HSP je rodina HSP70. Členové této rodiny se sestávají ze dvou funkčních domén: N-terminální nukleotidová vazebná doména (nazývaná také ATP-vazebná doména), která váže a hydrolyzuje ATP, a C-terminální doména vázající substrát, která váže prodloužené polypeptidy. U živočichů a rostlin funguje HSP70 jako chaperon pro nově syntetizované proteiny, aby se zabránilo jejich akumulaci ve formě agregátů a také aby se zajistilo správné sbalení proteinů během jejich přenosu na jejich konečné umístění. HSP70 má různé funkce v mikrobiální patogenezi. Zejména se zdá, že HSP70 reguluje virovou reprodukci a pohyb, což v konečném důsledku podporuje virovou infekci^{76,77}.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda a jakým způsobem ovlivní triazolové fungicidy aplikované postřikem nebo zálivkou antioxidační systém rostlin rajčat.

1. Zjistit antioxidační kapacitu listů rajčat ošetřených penkonazolem, tebukonazolem a jejich kombinací.
2. Zjistit rozdíl v aktivitách a isoenzymovém složení antioxidačních enzymů v rostlinách ošetřených triazolou vůči kontrolním neošetřeným rostlinám.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie a přístroje

Přístrojové vybavení

- analytické váhy; Entris Sartorius Lab Instruments, Německo
- aparatura určená pro gelovou elektroforézu; Mini-Protean system, Bio-Rad, USA
- centrifuga UNIVERSAL 32R; Hettich GmbH & Co. KG; Německo
- laboratorní váha 440-45; KERN®; Německo
- pH metr UltraBasic; model UB-10; Denver InstrumentV USA
- dokumentační systém Uvitec Alliance Q9
- spektrofotometr Multiskan® GO; Thermo Fisher Scientific Oy; Finsko
- spektrofotometr SPECORD 250® PLUS – 223G1156C; Analytik Jena; Německo
- třepačka VORTEX 4 basic; IKA® GmbH & Co. KG; Německo

Chemikálie

- 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin (Sigma-Aldrich, USA)
- 3,3'-diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, USA)
- ABTS roztok obsahující peroxid vodíku (Sigma-Aldrich, USA)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- Askorbát sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- Bisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Bradfordovo činidlo (Sigma-Aldrich, USA)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, USA)
- BSA (Sigma-Aldrich, USA)
- Deionizovaná voda (Watek, IWA 5 rosso, ČR)
- Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)
- Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema-Chemapol, ČSSR)
- Chlorid železitý (hexahydrát) (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethanol, p.a. 96 % (Lach-Ner, ČR)
- Etylendiamintetraoctan disodný (dihydrát) (Sigma-Aldrich, USA)

- Fenazinmethosulfát (Sigma-Aldrich, USA)
- Fenol (Sigma-Aldrich, USA)
- Fenolové činidlo Folin-Ciocalteu (VWR Life Science, USA)
- Ferritin (Sigma-Aldrich, USA)
- Glycerol bezvodý (Lach-Ner, ČR)
- Glycin (Lach-Ner, ČR)
- Guajakol (Sigma-Aldrich, USA)
- Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydrogenfosforečnan sodný (dihydrát) (Lachema-Chemapol, ČSSR)
- Hydroxid sodný (Penta, ČR)
- Chlorid sodný (Penta, ČR)
- Karbonátanhydrasa (Sigma-Aldrich, USA)
- Katalasa (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina chlorovodíková 35 % (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina šikimová (Sigma-Aldrich, USA)
- Myoglobin (Sigma-Aldrich, USA)
- N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (Thermo, Japonsko)
- Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (Roche, Německo)
- Nitrotetrazoliová modř (Sigma-Aldrich, USA)
- Peroxid vodíku 30 % (Lach-Ner, ČR)
- Peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich, USA)
- Polyvinylpyrrolidon (Sigma-Aldrich, USA)
- Riboflavin (Sigma-Aldrich, USA)
- Sacharosa (Penta, ČR)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (VWR Life Science, USA)
- Uhličitan sodný bezvodý (Lachema, ČR)

3.2 Kultivace rostlin, aplikace fungicidů

Rostliny rajčat byly pěstovány na České zemědělské univerzitě ve spolupráci s Ing. Michalem Jaklem, Ph.D. a doc. RNDr., PhDr., Ing. Janou Jaklovou Dytrtovou, Ph.D. Celkem bylo vypěstováno 42 rostlin v 7 různých skupinách lišících se fungicidem a způsobem aplikace na rostlinu. Jedna skupina byla kontrolní, tj. na tyto rostliny nebyly

aplikované žádné fungicidy. Na ošetřené rostliny byl vždy aplikován penkonazol, tebukonazol nebo jejich kombinace a aplikace byla provedená buď postřikem na listy nebo zalitím do půdy. Na každou rostlinu bylo vždy aplikováno $3,52 \cdot 10^{-6}$ mol fungicidu v případě aplikace pouze jednoho fungicidu nebo $1,76 \cdot 10^{-6}$ mol každého z fungicidů v případě aplikace jejich kombinace. Fungicidy byly aplikované 1., 8., 15., 22. a 29. den. Vzorky listů byly odebrány 0., 15. a 35. den a vzorky plodů a kořenů pouze poslední (35.) den. Všechny vzorky po odebrání byly mrazeny v tekutém dusíku a uskladněny v mrazícím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^{78,79}.



Obrázek 7 Rostliny rajčat vypěstované na České zemědělské univerzitě a rozdělené do 7 skupin podle fungicidu a způsobu aplikace na rostlinu.

3.3 Příprava extraktů

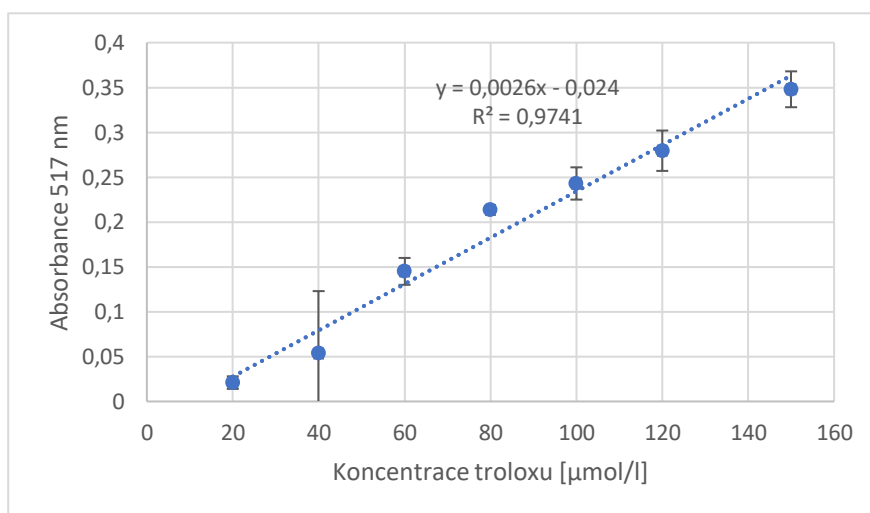
Rostlinný materiál byl homogenizován v kapalném dusíku ve třecí misce. Extrakční činidlo bylo přidáno v trojnásobném (u listů), dvojnásobném (u kořenů) nebo v polovičním (u plodů) objemu navážené hmotnosti. V případě stanovení antioxidační kapacity byl přidán 50 % (v/v) ethanol, pro stanovení aktivit antioxidačních enzymů byl přidán extrakční pufr o složení 100 mM Tris-HCl pufr, pH 7,8; 1 mM DTT; 1 mM Na₂EDTA; 10 mM askorbát sodný, 5 mg/ml PVP, pro stanovení aktivit NADP-dependentních dehydrogenas byl přidán extrakční pufr o složení 100 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA o pH 7,8, a 5 mg/ml PVP⁸⁰. Extrakce probíhala 15 minut a poté byl extrakt centrifugován 15 minut při 16 600 x g a 4°C. Následně byl odebrán supernatant, který byl použit pro další stanovení⁸⁰.

3.4 Stanovení antioxidační kapacity

Antioxidační kapacita byla stanovena v ethanolových extraktech vzorků listů (viz 3.2). Všechny metody stanovení antioxidační kapacity byly převzaté a přizpůsobené z⁸¹.

3.4.1 Stanovení antioxidační kapacity na principu zhášení radikálu DPPH·

Pro stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH bylo přímo do mikrotitrační destičky pipetováno vždy 100 μl 96 % (v/v) EtOH, 50 μl 400 $\mu\text{mol/l}$ DPPH v 96 % (v/v) EtOH a 50 μl vhodně zředěného extraktu. Směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě a následně byla změřena absorbance při 517 nm. Jako slepý vzorek byla použita směs 150 μl 96 % (v/v) EtOH a 50 μl destilované vody. U této metody byla změřená i reference, kterou tvořilo 100 μl 96 % (v/v) EtOH, 50 μl destilované vody a 50 μl 400 $\mu\text{mol/l}$ DPPH v 96 % (v/v) EtOH. Pro sestavení kalibrační závislosti byl použit roztok troloxu v 50 % (v/v) ethanolu o koncentracích v rozmezí 20-150 $\mu\text{mol/l}$ (Obrázek 8).



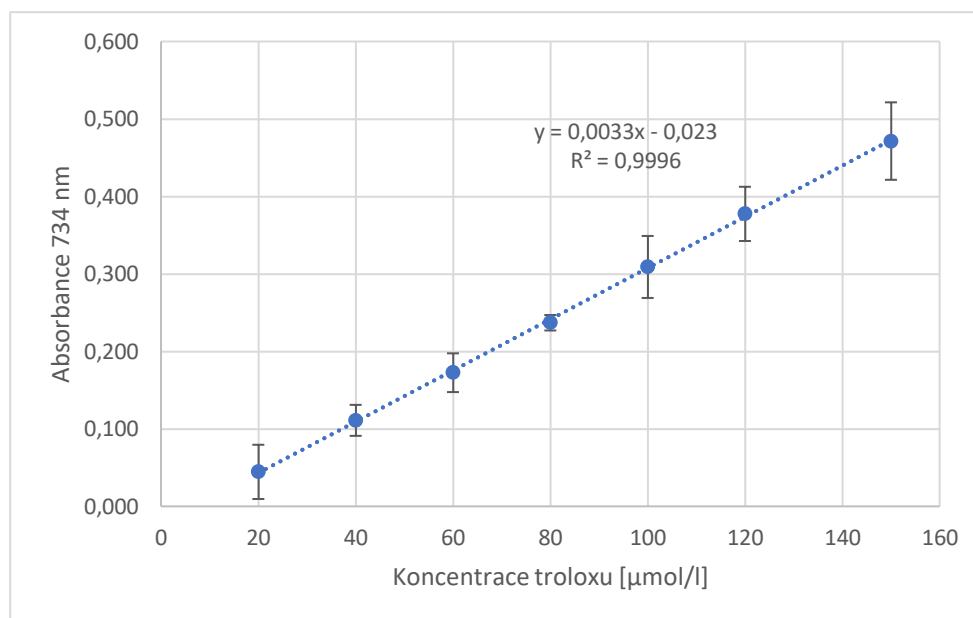
Obrázek 8 Kalibrační přímka roztoku troloxu o koncentracích v rozmezí 20-150 $\mu\text{mol/l}$ pro stanovení antioxidační kapacity na principu zhášení radikálu DPPH·.

3.4.2 Stanovení antioxidační kapacity na principu zhášení kationradikálu ABTS^{·+}

Pro stanovení antioxidační kapacity metodou ABTS byl den dopředu připraven roztok ABTS^{·+}. Ten byl připraven rozpuštěním tablety (Sigma-Aldrich) obsahující amonné soli ABTS v 3 ml destilované vody a přidáním 2,46 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. Následující den byl tento roztok zředěný destilovanou vodou, tak aby jeho absorbance byla kolem 1,3. Takto připravený roztok byl pipetován přímo do mikrotitrační destičky. Reakční směs v mikrotitrační destičce tvořilo 170 μl ABTS^{·+} a 30 μl vhodně zředěného extraktu.

Reakční směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě a následovně byla měřena absorbance při 734 nm.

Jako slepý vzorek sloužilo 200 μl destilované vody a jako reference směs 170 μl ABTS^{•+} a 30 μl vody. Pro sestavení kalibrační závislosti byl použit roztok troloxu v 50 % (v/v) ethanolu o koncentracích v rozmezí 20-150 $\mu\text{mol/l}$ (Obrázek 9).

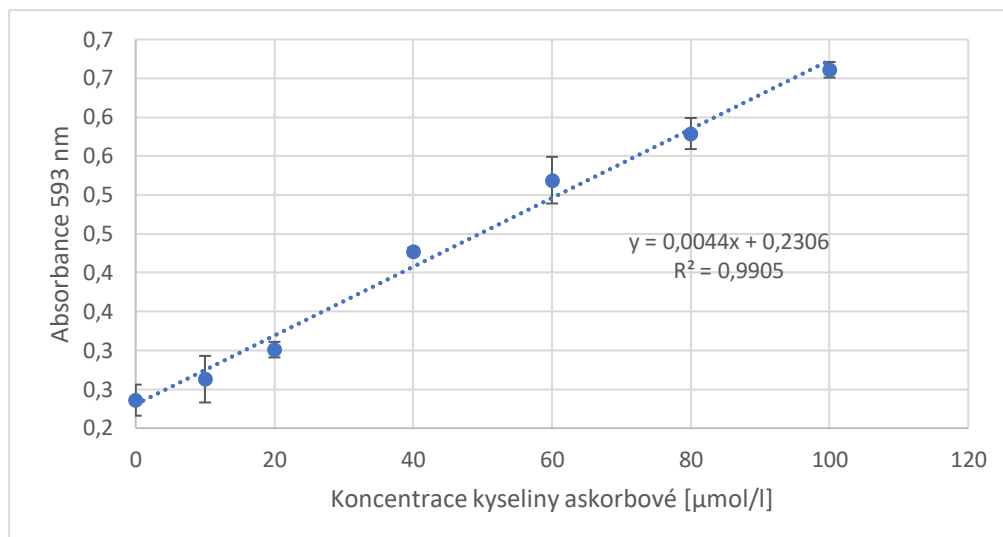


Obrázek 9 Kalibrační přímka roztoku troloxu o koncentracích v rozmezí 20-150 $\mu\text{mol/l}$ pro stanovení antioxidační kapacity na principu zhášení kationradikálu ABTS^{•+}.

3.4.3 Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP

Pro metodu FRAP bylo přímo do mikrotitrační destičky pipetováno 30 μl vhodně zředěného extraktu a 170 μl FRAP činidla. Směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě a poté změřena při 593 nm. Ve slepém vzorku byl extrakt nahrazen 30 μl destilované vody.

Činidlo FRAP tvořila směs 25 % (v/v) 700 $\mu\text{mol/l}$ TPTZ ve 40 mM HCl (TPTZ navážno do 40 mM HCl), 10 % (v/v) 20 mM FeCl₃ a 65 % (v/v) 300 mM octanového pufru o pH 3,6. Činidlo FRAP bylo připraveno vždy čerstvé a chráněno alobalem před světlem. Pro sestavení kalibrační závislosti byla použita kyselina askorbová v rozmezí 10-100 μM . Roztok kyseliny askorbové byl chráněn před světlem a v reakční směsi nahradil extrakt (Obrázek 10).

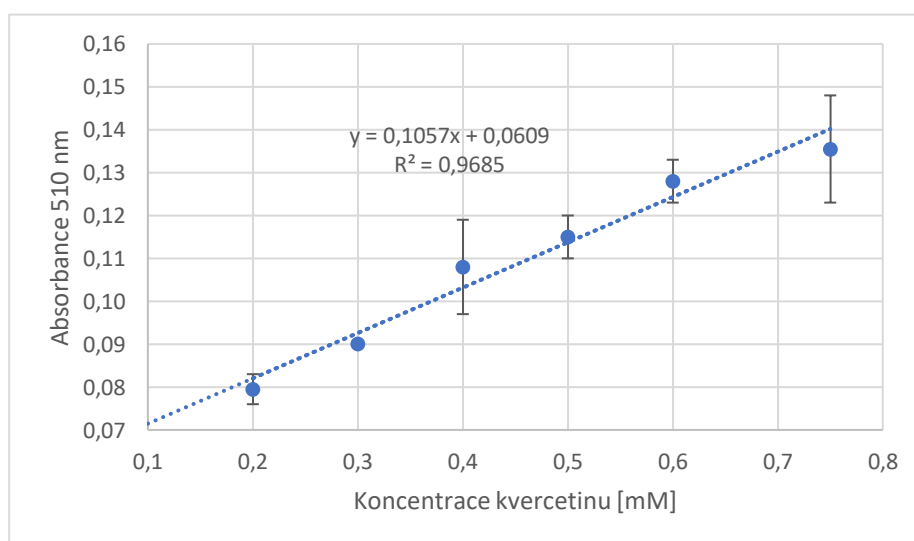


Obrázek 10 Kalibrační přímka roztoku kyseliny askorbové o koncentracích v rozmezí 10-100 $\mu\text{mol/l}$ pro stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP.

3.4.4 Stanovení celkových flavonoidů

Pro stanovení koncentrace flavonoidů bylo pipetováno 20 μl vhodně zředěného extraktu, 100 μl destilované vody a 6 μl 5 % (w/v) KNO_2 . Tento roztok byl inkubován 6 minut za laboratorní teploty. Poté bylo přidáno 12 μl 10 % (w/v) AlCl_3 a opět inkubováno 5 minut za laboratorní teploty. Následně bylo do reakční směsi přidáno 40 μl 1M NaOH a 22 μl destilované vody. Poté byla změřena absorbance při 510 nm. V slepém vzorku bylo místo 20 μl extraktu použito 20 μl destilované vody.

Pro sestavení kalibrační závislosti byl použit roztok kvercetinu v 50 % (v/v) EtOH v rozmezí koncentrací 0,2-0,75 mM (Obrázek 11).

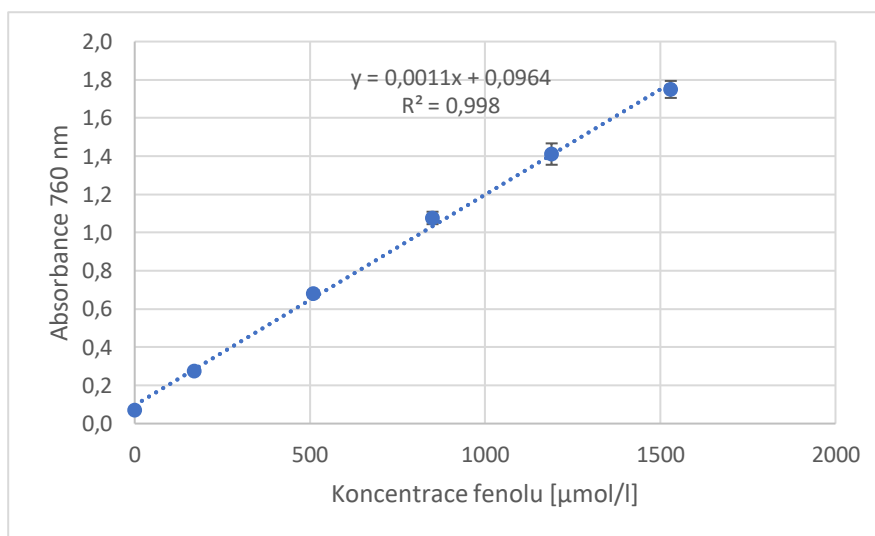


Obrázek 11 Kalibrační přímka roztoku kvercetinu o koncentracích v rozmezí 0,2-0,75 mmol/l pro stanovení celkových flavonoidů.

3.4.5 Stanovení celkových fenolických látek

Pro stanovení koncentrace celkových fenolických látek bylo přímo do mikrotitrační destičky pipetováno 20 μl vhodně zředěného extraktu a 100 μl 10 % (v/v) Folinova činidla. Tato směs byla inkubována 4 minuty při laboratorní teplotě a následovně bylo přidáno 80 μl 75 g/l Na_2CO_3 . Poté následovala inkubace po dobu 30 min a laboratorní teploty. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při 760 nm.

V slepém vzorku byl extrakt nahrazen 50 % (v/v) EtOH a v kalibraci roztokem fenolu v rozmezí koncentrací 170-2750 μM (Obrázek 12).



Obrázek 12 Kalibrační přímka roztoku fenolu o koncentracích v rozmezí 170-2750 $\mu\text{mol/l}$ pro stanovení celkových fenolických látek.

3.5 Stanovení enzymové aktivity

Všechny aktivity enzymů kromě celkových peroxidas byly vyjádřené v jednotkách U, tj. $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ a byly vztaženy na čerstvou hmotnost ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ (čerstvá hm.)). Aktivita peroxidas byla vyjádřena v procentech vypočítaných vůči kontrolní skupině odebrané před postřikem fungicidy.

3.5.1 Aktivita volných a membránově vázaných celkových peroxidas

Pro stanovení celkových peroxidas byl jako extrakt použit odebraný supernatant (viz 3.3). Pro stanovení membránově vázaných peroxidas bylo k sedimentu (po odebrání supernatantu pro stanovení celkových peroxidas) přidáno stejné množství extrakčního pufru s přísadkou 1 M NaCl. Po 15 min centrifugaci ($16\,600 \times g$) byl odebrán supernatant, který byl použit jako extrakt pro stanovení membránově vázaných peroxidas. Analýza obou typů extraktů byla následně totožná.

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno vždy 155 μl 50 mM fosfátového pufru o pH 7,0, 5 μl 30 % (v/v) H_2O_2 , 20 μl DAB (0,0021 g v 1 ml 96 % (v/v) EtOH) a 20 μl extraktu. Destička byla poté měřena 3 min při laboratorní teplotě při 430 nm.

3.5.2 Stanovení aktivity askorbátperoxidasy

Přímo do UV-mikrotitrační destičky bylo pipetováno 101 μl HEPES pufru (80 mM HEPES pH 7,0 a 80 μM EDTA), 87 μl 7 mM kyseliny askorbové a 9 μl extraktu. Reakce byla iniciovaná přidáním 3 μl 49 mM H_2O_2 a měřena při 30 °C po dobu 3 min při vlnové délce 298 nm. Pro vypočítání aktivity byl použit molární absorpční koeficient 2800 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ podle ⁸².

3.5.3 Stanovení aktivity guajakolperoxidasy

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 155 μl 50 mM fosfátového pufru o pH 7,0, 5 μl 30 % (v/v) H_2O_2 , 20 μl 9 mM roztoku guajakolu a 20 μl extraktu. Destička byla měřena při 470 nm po dobu 1 minuty za laboratorní teploty. Pro vypočítání aktivity byl použit molární absorpční koeficient 26600 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ podle ⁸³.

3.5.4 Stanovení aktivity ABTS peroxidasy

Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 155 μl 50 mM fosfátového pufru o pH 7,0, 5 μl 30 % (v/v) H_2O_2 , 20 μl zásobního (komerčního) roztoku ABTS a 20 μl extraktu. Destička byla inkubována dvě až tři minuty do vytvoření modrého zabarvení a poté byla měřena absorbance při 414 nm po dobu 3 min za laboratorní teploty. Pro vypočítání aktivity byl použit molární absorpční koeficient 31100 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ podle ⁸⁴.

3.5.5 Stanovení aktivity katalasy

Přímo do UV-mikrotitrační destičky bylo pipetováno 38 μl 0,2 M fosfátového pufru, 149 μl destilované vody a 6 μl extraktu. Reakce byla iniciovaná přidáním 7 μl 49 mM H_2O_2 a okamžitě byla měřena absorbance při 240 nm po dobu 1 min za laboratorní teploty. Pro vypočítání aktivity byl použit molární absorpční koeficient 39400 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ podle ⁸⁵.

3.5.6 Stanovení aktivit NADP-dependentních dehydrogenas

Aktivita NADP-dependentních dehydrogenas byla měřena dle⁸⁶. Pro stanovení NADP dependentních enzymů bylo vždy do mikrotitrační destičky pipetováno 150 μl připravené směsi podle tabulky (Tabulka 1) a reakce byla iniciována přidáním 50 μl připraveného extraktu. Všechny enzymy byly měřené při 340 nm po dobu 5 minut. U ICDH a SDH byla zvýšená teplota měření na 30°C.

Tabulka 1 Výsledné koncentrace složek reakčních směsí pro stanovení NADP dependentních enzymů.

ME	ICDH	G6PDH	SDH
100 mM Tris-HCl o pH 7,4	100 mM Tris-HCl o pH 7,4	100 mM Tris-HCl o pH 7,6	100 mM AMP o pH 9,0
10 mM L-malát	2 mM D, L-isocitrát	5 mM D-glukosa- 6-fosfát	0,3 mM šikimát
2 mM MgCl ₂	2 mM MgCl ₂	2 mM MgCl ₂	/
0,2 mM NADP ⁺	0,2 mM NADP ⁺	0,2 mM NADP ⁺	0,2 mM NADP ⁺
H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O

3.6 Elektroforetická separace za nativních podmínek

Separační gely pro nativní elektroforetickou separaci byly připraveny v rozmezí koncentrací polyakrylamidu od 6 do 10 %⁸⁷. Do sestavené aparatury byl nejdříve nalit separační gel, po jeho polymeraci (po cca 30 minutách za laboratorní teploty) byl převrstven 5 % zaostřovacím gelem. V následující tabulce je uvedeno složení gelů pro přípravu 2 gelů pro soupravu Mini-Protean od firmy Bio-Rad (Tabulka 2).

Tabulka 2 Složení separačního a zaostřovacího gelu pro nativní elektroforézu.

Složení	Separační gel (10 ml)	Zaostřovací gel (2 ml)
Destilovaná voda	4 ml	1,4 ml
30 % (w/v) akrylamid	3,3 ml	0,33 ml
Tris pufr	2,5 ml 1,5 M o pH 8,8	0,25 ml 1M o pH 6,8
10 % (v/v) glycerol	0,1 ml	0,02 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml
10 % (w/v) peroxodisíran amonný	0,1 ml	0,02 ml

Extrakty byly připravené podle kapitoly 3.3 a byla změřena koncentrace proteinů (viz 3.8). K rostlinným extraktům byla přidána sacharóza o výsledné koncentraci 20 %

(w/v). Do jamek gelu byly pipetovány extrakty tak, aby každá skupina obsahovala stejné množství proteinů. Elektrodotový pufr o pH 8,3 obsahoval 250 mM glycin; 25 mM Tris a 10 % (w/v) glycerol. Elektroforetická separace probíhala při 4 °C po dobu 15 min při 70 V a poté bylo napětí zvýšeno na 140 V. Po skončení elektroforézy byly gely opláchnuté destilovanou vodou a inkubovány v příslušné reakční směsi pro detekci enzymové aktivity.

3.6.1 Detekce proteinů v gelu

Pro detekci proteinů byl gel inkubován v barvicím roztoku 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 ve 40 % methanolu a 10 % kyselině octové. Následné odbarvení gelu probíhalo v několika lázních odbarvovacího roztoku připraveného z 96 % (v/v) ethanolu, kyseliny octové a destilované vody v poměru 25:10:65.

3.6.2 Detekce aktivity a isoenzymového složení celkových peroxidas v gelu

Pro detekci celkových peroxidas v gelu byla připravena detekční směs obsahující 50 mM fosfátový pufr (pH 7,0); 1 mM 3,3'-diaminobenzidin (rozpuštěný v 96 % ethanolu) a 20 mM H₂O₂. Gel byl inkubován v tomto roztoku do požadovaného vzhledu za laboratorní teploty a poté byl promyt destilovanou vodou⁸⁸.

3.6.3 Detekce aktivity a isoenzymového složení askorbátperoxidasy v gelu

Gely pro detekci APOD byly nejprve vloženy do 20 ml ekvilibračního pufru I, který obsahoval 50 mM fosfátový pufr (pH 7,0) a 2 mM askorbát. Následně byl gel inkubován po dobu 10 minut ve 20 ml ekvilibračního pufru II, složeného z 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0), 4 mM askorbátu a 3 mM H₂O₂. Po deseti minutách byl gel promyt ve 20 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0) a byl vložen do 20 ml detekčního 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0) obsahujícím 28 mM TEMED a 2,45 mM NBT dokud nebylo dosaženo požadovaného vzhledu⁸⁹.

3.6.4 Detekce aktivity a isoenzymového složení superoxiddismutasy v gelu

Pro stanovení aktivity superoxiddismutasy v gelu, které vychází z fotoreakce NBT za vzniku nerozpustného modrého formazanu, byla vytvořena reakční směs smíšením 1,5 mM EDTA, 70mM KH₂PO₄, 6 mM riboflavinu, 0,47 % TEMED a 0,3 % NBT. Směs byla až do doby použití obalena hliníkovou fólií pro ochranu před světlem. Petriho miska s reakční směsí a do ní ponořeným gelem byla po dobu 20 minut

inkubována při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Poté byl gel vložen do malého množství destilované vody a umístěn po dobu 15 minut pod zářivku o 9 W.

Inhibice isoform superoxiddismutasy byla provedena pomocí peroxidu vodíku, který inhibuje Fe SOD i Cu-Zn SOD a kyanidu draselný, který inhibuje pouze Cu-Zn SOD. Gel byl vždy vložen na 30 minut do inhibičního roztoku obsahujícího 1 mM EDTA, 50 mM KH_2PO_4 a 5 mM H_2O_2 . Během inhibice byla reakce chráněná před světlem. Následně byl gel omyt deionizovanou vodou a vložen na 20 minut do reakční směsi (viz výše). Případně byl gel vložen na 30 minut do inhibičního roztoku o složení: 1 mM EDTA, 50 mM KH_2PO_4 , 2 mM KCN. Další postup byl totožný s inhibicí peroxidem vodíku. Aktivita superoxiddismutasy byla detekována jako světlý proužek na tmavém pozadí⁸⁸.

3.6.5 Stanovení relativních molekulových hmotností isoform antioxidantních enzymů

Stanovení relativních molekulových hmotností isoform peroxidasy, askorbátperoxidasy, a superoxiddismutasy byla provedena nativní elektroforézou v pěti různých koncentracích akrylamidu s následným vyhodnocením dle Fergusona⁹⁰. Kalibrace byla provedena pomocí komerčních standardů v rozmezí 17,8 - 450 kDa (myoglobin - 17,8 kDa, karbonátanhydrasa - 29 kDa, albumin - 45 kDa, BSA - 66 kDa, katalasa - 240 kDa a ferritin 450 kDa). Nejdříve byly standardní proteiny elektroforeticky separovány za nativních podmínek v gelech o koncentracích 6–10 % polyakrylamidu (viz 3.6). Detekce proteinů v gelu proběhla dle kapitoly 3.6.1.

Následně byly u jednotlivých standardů odečteny relativní pohyblivosti v každém gelu (R_f). Vynesením $100 \cdot [\log (R_f \cdot 100)]$ každého proteinu proti koncentraci polyakrylamidového gelu byly vytvořeny kalibrační grafy I (Obrázek 14 na str.40) a směrnice každé závislosti byla zaznamenána. Vynesením záporné hodnoty směrnice proti relativní molekulové hmotnosti standardního proteinu byl vytvořen kalibrační graf II (Obrázek 15 na str.41), z kterého byly určeny relativní molekulové hmotnosti isoform antioxidantních enzymů detekované v různých částech rostlin.

3.7 Imunochemické metody

Extrakty připravené dle kap. 3.2 byly ředěny 1:1 se vzorkovým pufrům (62,5 mM Tris o pH 6,8, 25 % (v/v) glycerol, 2 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) bromfenolová modř). Tyto vzorky byly použité pro imunochemické stanovení obsahu HSP70 a CHS⁹¹. Nejprve byly extrakty ve vzorkovém pufru zahřívány po dobu 5 minut při 100°C. Elektroforetická separace v prostředí SDS probíhala v 10 % separačním gelu a 5 % zaostřovacím gelu⁹². Separační gel obsahoval 10 % (w/v) směs bis/akrylamidu; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % (w/v) glycerol; 0,04 % (v/v) TEMED; 0,1 % (w/v) peroxodisíran amonný. Zaostřovací 5% gel obsahoval 10 % (w/v) směs bis/akrylamidu; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % (w/v) glycerol; 0,02 % (v/v) TEMED; 0,1 % (w/v) peroxodisíran amonný. Do jamek gelu bylo nanášeno vždy stejné množství proteinů a byla spuštěna elektroforetická separace (viz 3.6). Po skončení elektroforézy byly gely inkubovány 2-3 minuty v transferovém pufru, který obsahoval 25 mM Tris, 150 mM glycín a 10 % methanol o pH 8,3. Poté byl gel umístěn na nitrocelulózovou membránu (0,45 µm, Schleicher & Schuell, Německo) mezi filtrační papíry namočené v transferovém pufru do aparatury Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer System. Samotný proces přenosu proteinů na membránu trval 30 minut a po skončení byly membrány přesunuty na 1 hodinu do konjugačního pufru. Konjugační pufr obsahoval 5 g PVP a 0,5 g BSA doplněných do 250 ml pufrém PBS. Pufr PBS byl připraven navážením 8 g NaCl, 2,9 g Na₂HPO₄·12 H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl a 0,2 g NaN₃, 0,5 ml Tween 20 a doplněním do 1 l destilovanou vodou (pH 7,4).

Po skončení hodinové inkubace byl konjugační pufr vylit a membrány byly po dobu 15 minut promývány pufrém PBS. Primární králičí polyklonální protilátky proti cytoplasmické HSP70 (AS08371, Agrisera, Švédsko) byly ředěné konjugačním pufrém 1:4000 a 1:1000 podle návodu výrobce. Membrány byly inkubované v těchto primárních protilátkách přes noc při 4 °C v chladicí místnosti.

Druhý den byly membrány promyty PBS pufrém po dobu 15 minut. Poté byla k membránám přidána sekundární polyklonální kozí protilátka proti králičí protilátce konjugovaná s alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich, USA) ředěná 1:30 000 v konjugačním pufru dle návodu výrobce, ve které byly inkubované 3 hodiny při 37 °C. Po skončení inkubace byly membrány opětovně promývány PBS pufrém a poté byly ponořeny na 10 minut do roztoku, který obsahoval 0,17 mg BCIP, 0,33 mg NBT a 10 ml substrátového pufru (1 M diethanolamin, pH 9,8). Po objevení proužků byly membrány vyfoceny a dále vyhodnoceny v programu GelAnalyzer.

3.8 Stanovení obsahu proteinů

Množství proteinů v roztoku bylo stanovené metodou podle Bradforda⁹³. Nejdříve byla připravená kalibrační řada standardního roztoku bílkoviny BSA o koncentracích 0, 0,1 - 0,5 mg/ml. Tato kalibrace byla poté pipetována přímo do mikrotitrační destičky vždy po 5 μ l. Do destičky byly pipetované také vhodně zředěné stanovované vzorky taktéž vždy po 5 μ l. Poté bylo do každé jamky přidáno 200 μ l Bradfordova činidla a takto připravené reakční směsi byly ponechány 5 minut při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm a 450 nm a sestrojena kalibrační přímka ($A_{595}/A_{450} = 7,37 \text{ c(BSA) [mg/ml]}$, $R^2 = 0,99$).

3.9 Statistická analýza

Statistické zpracování dat bylo provedeno metodou One way anova (Tukeyho metoda) v programu SigmaPlot v. 14.0. Statisticky významné změny byly považovány za signifikantní na hladině $p < 0,05$. V grafech výsledkové části jsou statisticky významné rozdíly vyjádřeny rozdílnými písmeny nad sloupci. Měření probíhalo ze tří biologických opakování ve třech technických replikátech.

Ke studiu antioxidačních isoenzymů v polyakrylamidovém gelu byly provedeny nejméně 3 nativní elektroforézy (tzn. každá skupina v tripletu) s následnou specifickou detekcí, je uveden nejreprezentativnější gel.

4 Výsledky

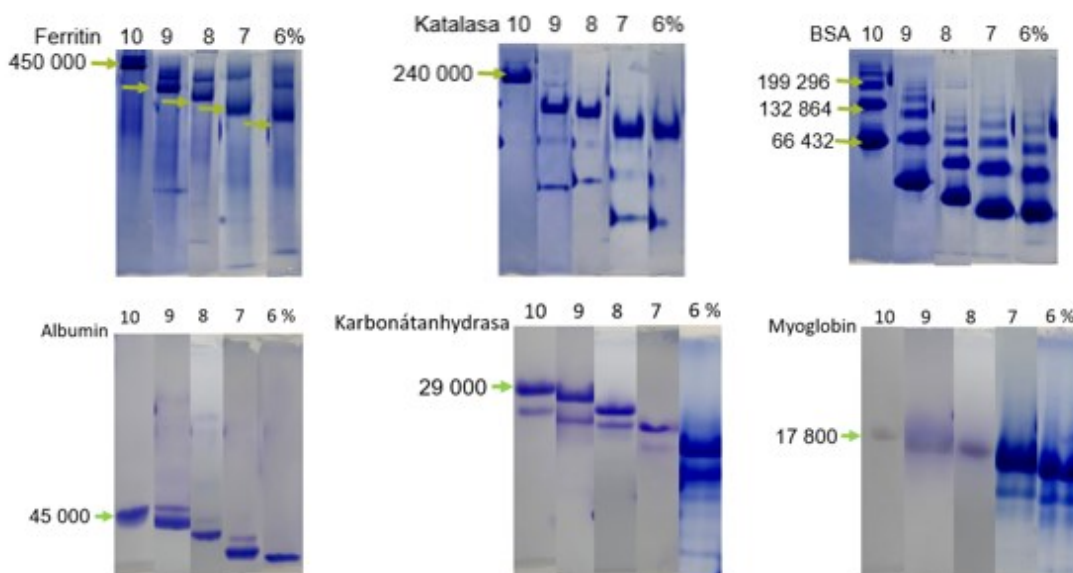
4.1 Detekce isoformů antioxidačních enzymů pomocí nativní elektroforézy v listech, kořenech a plodech rostlin rajčat

Pro stanovení přibližných molekulových hmotností superoxiddismutasy a peroxidasy v různých částech rostliny pomocí nativní elektroforézy byla nejdříve sestrojena kalibrace podle Fergusonovy metody.

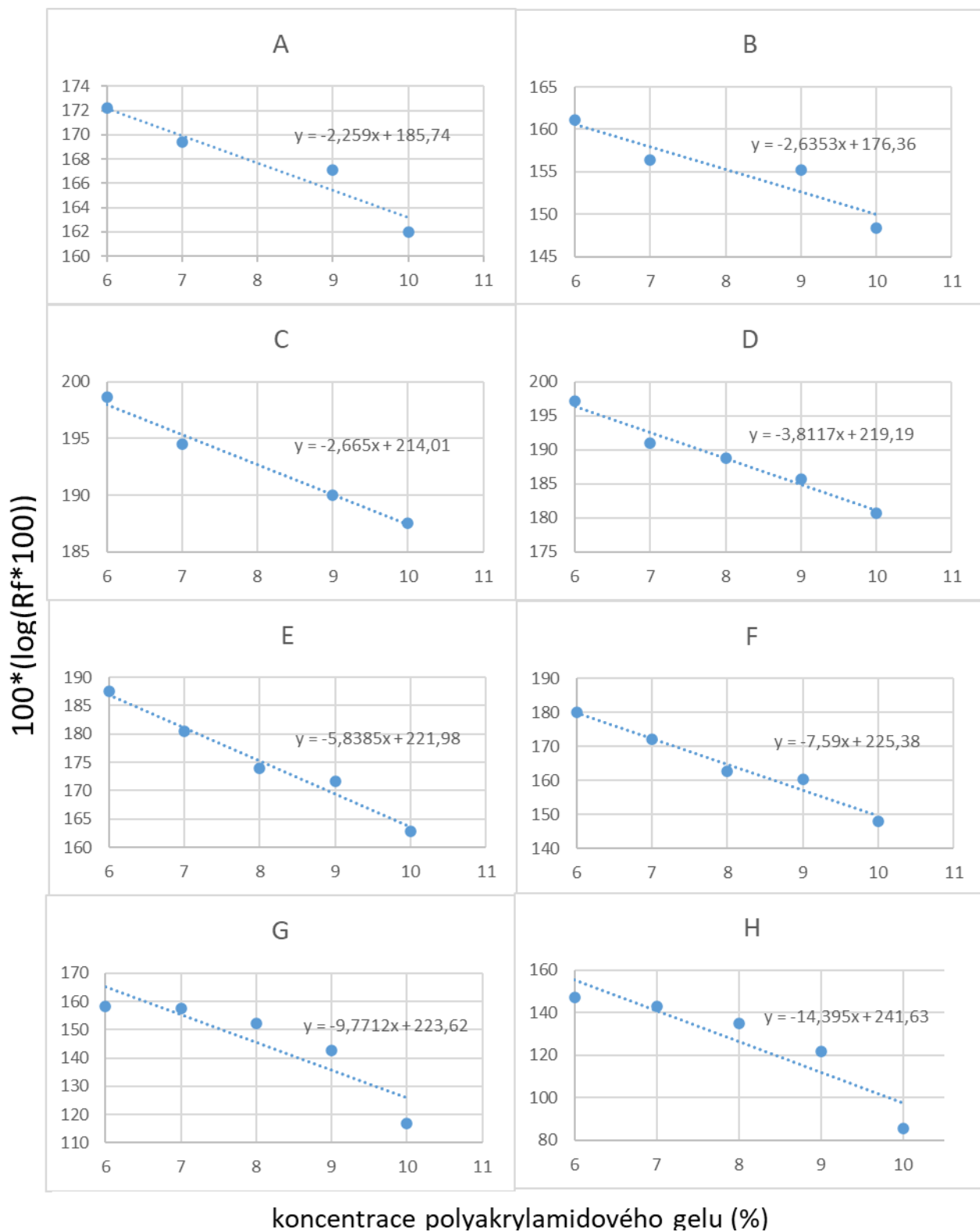
4.1.1 Fergusonova metoda kalibrace nativní elektroforézy

Standardní proteiny o známých molekulových hmotnostech (v rozmezí hmotností 17,8 až 450,0 x 10³) byly detekované v polyakrylamidových gelech o koncentraci 6-10 % za nativních podmínek. Byly použité standardní proteiny myoglobin, karbonátanhydrasa, vaječný albumin, BSA, katalasa a ferritin.

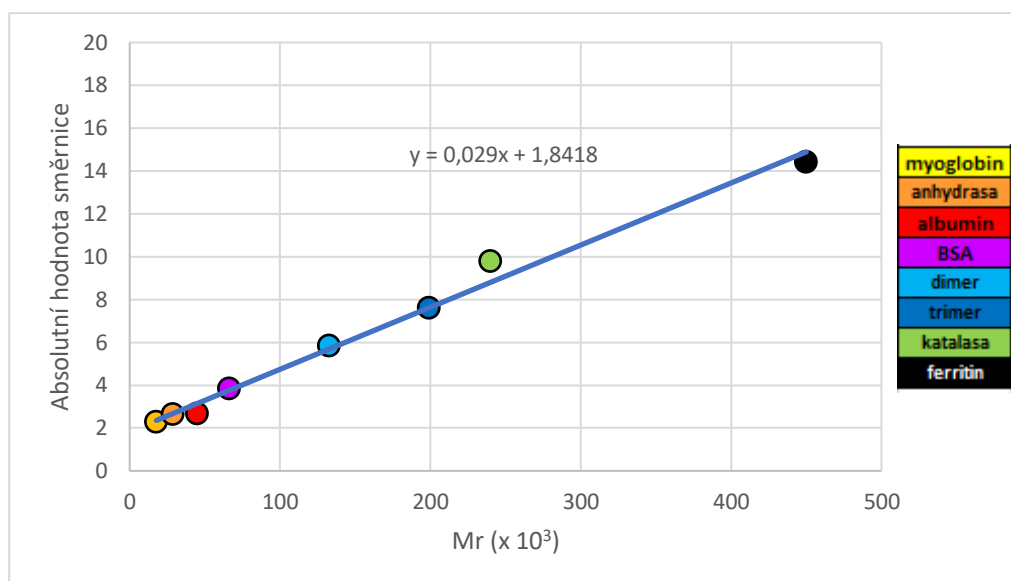
Detekované proužky pomocí barvení v roztoku Comassie Brilliant Blue (R-250) (Obrázek 13) byly vyhodnoceny v programu GelAnalyzer a byly sestaveny kalibrační grafy (Obrázek 14 na str. 40) závislosti $100 \cdot (\log (R_f \cdot 100))$ na koncentraci gelu. Ze směrnic těchto rovnic přímek a známých relativních molekulových hmotností (M_r) standardních proteinů byl vytvořen kalibrační graf (Obrázek 15 na str. 41) pro stanovení neznámých M_r .



Obrázek 13 Detekované proužky standardních proteinů barvené Comassie Brilliant Blue o známých molekulových hmotnostech po nativní elektroforéze v rozmezí koncentrace polyakrylamidu 6 až 10 %.



Obrázek 14 Relativní pohyblivost standardních proteinů v závislosti na koncentracích gelu v rozmezí 6 až 10 %. Ze směrníc těchto přímek byl sestavený kalibrační graf pro určení molekulové hmotnosti isoformem zkoumaných enzymů. (A=myoglobin, B=karbonátanhydrasa, C=vaječný albumin, D=monomer BSA, E=dimer BSA, F=trimer BSA, G=katalasa, H=ferritin)

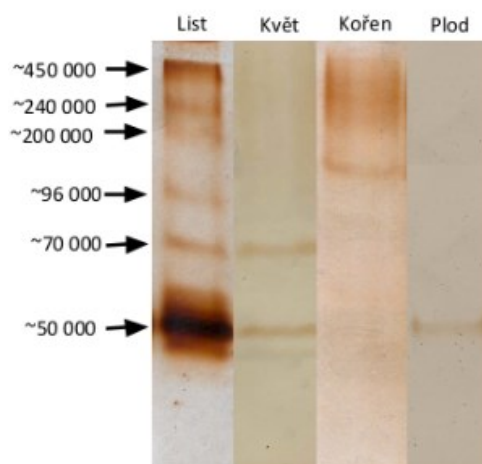


Obrázek 15 Kalibrační graf závislosti směrnice přímek (určených ze závislosti kalibračních grafů standardních proteinů na různých procentech gelu) na známých relativních molekulových hmotnostech standardních proteinů. Rovnice této přímky slouží k odhadu neznámé molekulové hmotnosti zkoumaných enzymů.

4.1.2 Isoenzymové složení peroxidasy v různých částech rostliny rajčete

Umělý substrát 3,3-diaminobenzidin byl využit k detekci isoform peroxidasy v listech, květech, kořenech a plodech. Jejich přibližné molekulové hmotnosti byly vypočítané z kalibračního grafu (Obrázek 15). Relativní pohyblivost a výsledné hodnoty jsou zobrazeny na Obrázku 16.

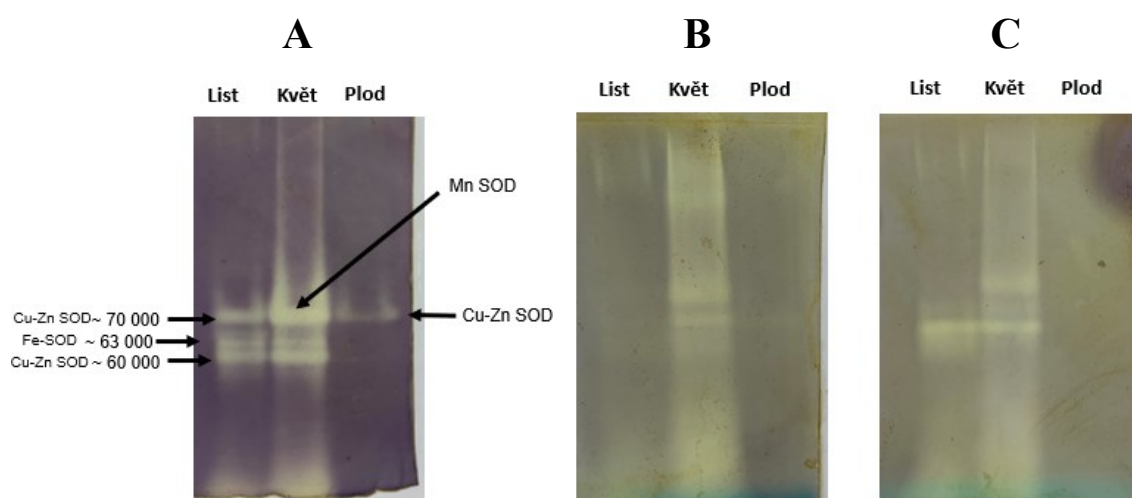
V listech bylo detekováno nejméně 7 isoform o přibližných molekulových hmotnostech 30, 50, 70, 96, 200, 240 a 450 kDa. V květech byly přítomné nejméně dvě isoformy o 50 a 70 kDa, v kořenech 3 o přibližné velikosti 50, 70, 96 kDa a v plodech taktéž jedna o přibližné molekulové hmotnosti 50 kDa.



Obrázek 16 Přibližný odhad neznámých molekulových hmotností isoenzymů peroxidasy v listech, květech, kořenech a plodech rajčat.

4.1.3 Isoenzymové složení a identifikace isoform SOD pomocí inhibičních studií s H_2O_2 a KCN

Kromě detekce a odhadu relativní molekulové hmotnosti isoform SOD (Obrázek 17, A) byly určeny i jednotlivé typy isoform pomocí inhibičních studií. Inhibice byla provedena působením peroxidu vodíku nebo kyanidu draselného. Peroxid vodíku inhibuje isoformy Fe SOD i Cu-Zn SOD a kyanid draselný inhibuje pouze Cu-Zn SOD. Mn SOD je necitlivá ke kyanidu i peroxidu. Z těchto skutečností byly jednotlivé typy isoform určeny. Porovnání detekce isoform SOD v gelu v kontrolní detekční směsi bez inhibitorů a s inhibitory je znázorněno na Obrázku 17.



Obrázek 17 Detekce aktivity SOD bez přítomných inhibitorů (A), reakce inhibovaná peroxidem vodíku (B) a kyanidem draselným (C). Z inhibovaných reakcí byly rozřazeny isoformy SOD do jednotlivých typů přítomných v gelu neinhibované reakce. Na obrázcích A, B, C je viditelná Mn SOD, na obrázcích A, C Fe SOD a Cu-Zn SOD je viditelná pouze na A.

Z Obrázku 17 je zřejmé, že v listech byly detekované minimálně tři isoformy o přibližných molekulových hmotnostech 60, 63 a 70 kDa. V plodech byla přítomná nejméně jedna isoforma o 70 kDa. V květech byly detekovány nejméně tři isoformy v rozmezí 60–70 kDa.

Vzhledem k tomu, že majoritní isoforma SOD přítomná v květu byla patrná i v přítomnosti inhibitorů H_2O_2 a KCN, jedná se o Mn SOD isoformu. V listech i plodech nebyla nalezena ~60 kDa isoforma SOD v přítomnosti inhibitorů KCN i H_2O_2 , jedná se tedy o Cu-Zn SOD isoformu. Asi 63 kDa isoforma byla viditelná v inkubační směsi s KCN, jedná se tedy o Fe SOD.

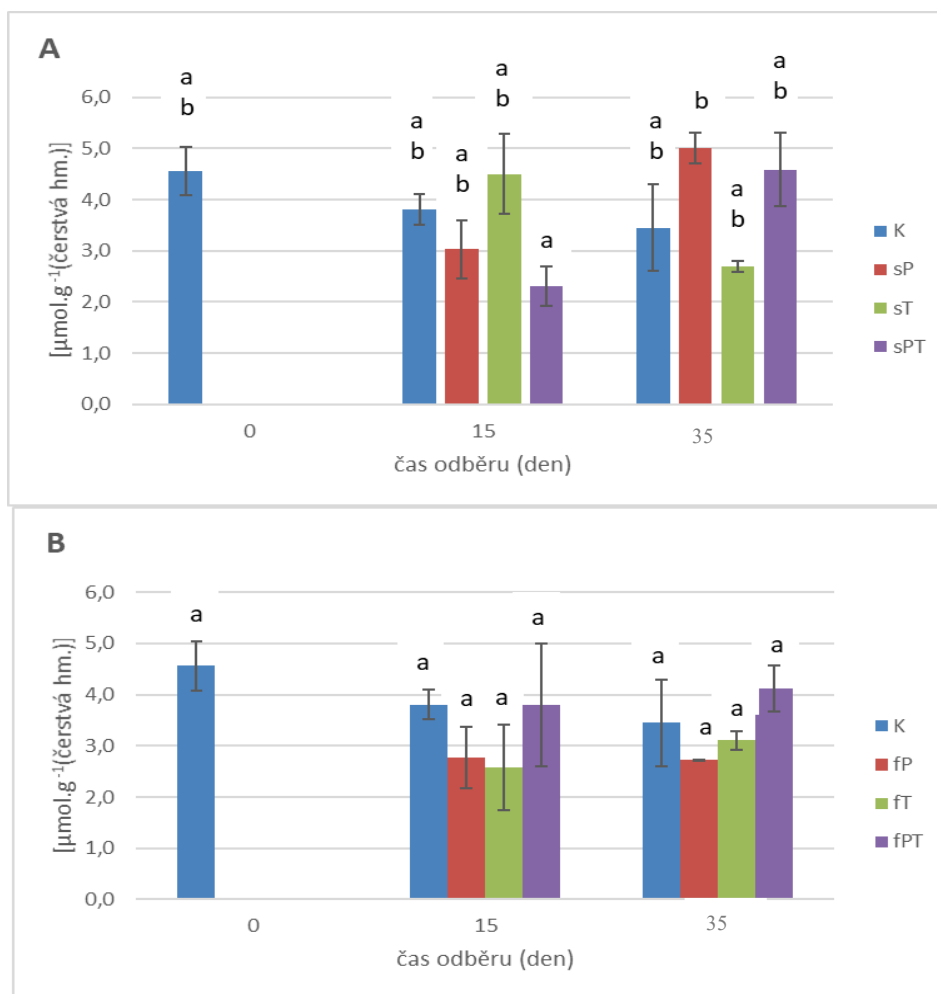
4.2 Vliv triazolových fungicidů aplikovaných dvěma způsoby na metabolismus rostlin rajčete

Rostliny rajčete byly vystaveny působení triazolových fungicidů penkonazolu, tebukonazolu a jejich kombinaci, které byly aplikovány postřikem na list anebo zálivkou do půdy. Odběr rostlinného materiálu probíhal 15. a 35. den.

V různých částech rostlin rajčat byla sledována antioxidační kapacita, aktivita a isoenzymové složení antioxidačních enzymů a enzymů ze třídy dehydrogenas.

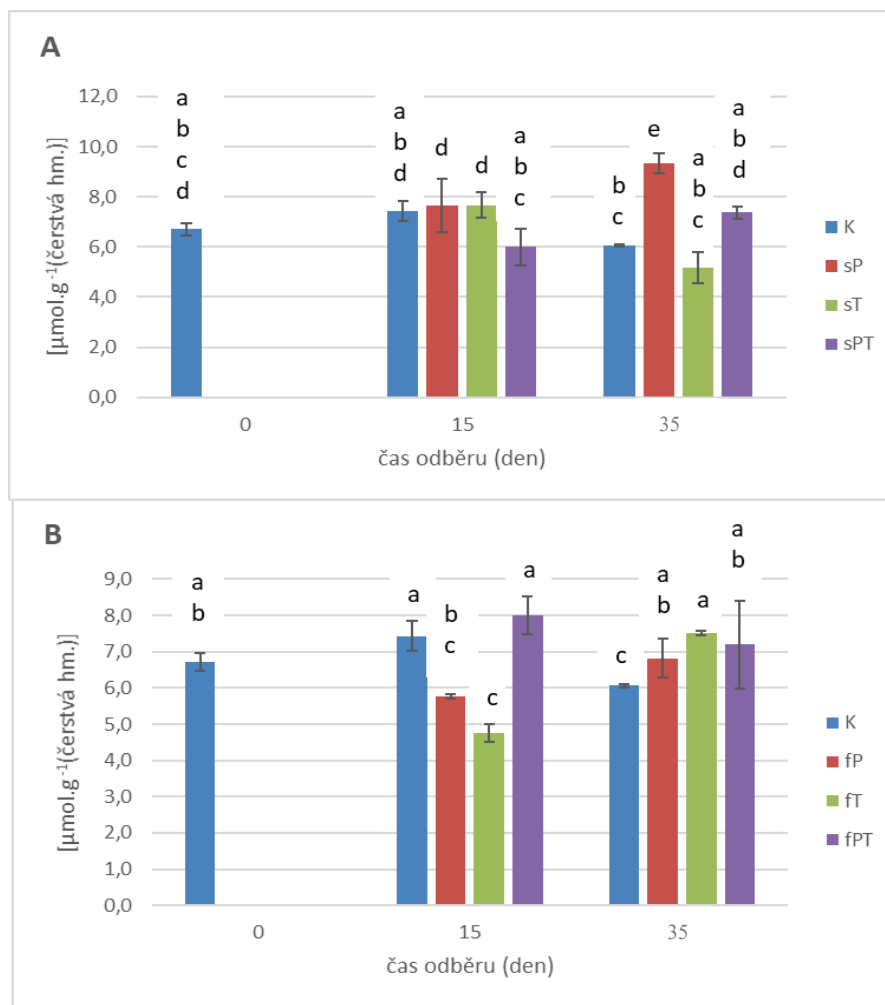
4.2.1 Antioxidační kapacita v listech rajčat ošetřených fungicidy

Antioxidační kapacita byla stanovena pomocí dvou metod založených na schopnosti antioxidantů zhaset radikály (metody DPPH a ABTS) a pomocí metody FRAP založené na schopnosti redukovat železité ionty. Kromě těchto tří metod byla stanovena i koncentrace celkových fenolických látek a koncentrace flavonoidů. Výsledky stanovení antioxidační kapacity a obsahu fenolických látek a flavonoidů v listech ukazují obrázky 18-22 (str.44-48).



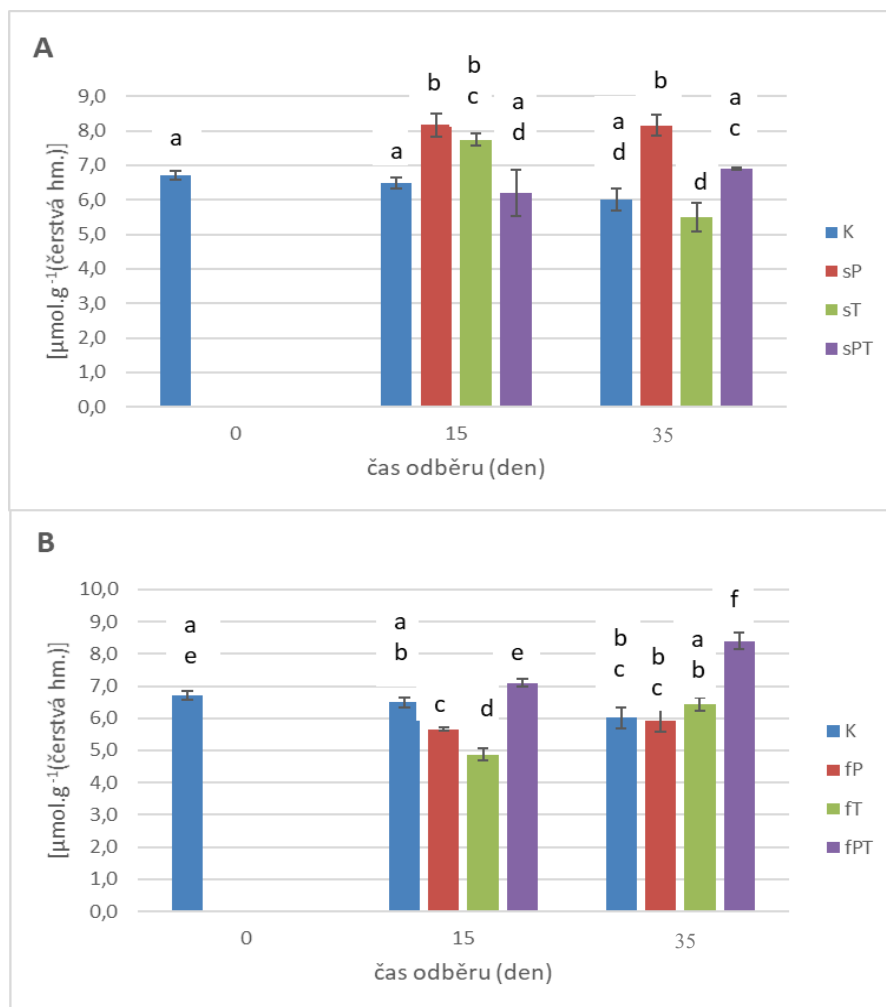
Obrázek 18 Antioxidační kapacita listů rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B) určená metodou DPPH. Vzorky byly odebrány 15. a 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

Antioxidační kapacita se vlivem triazolů příliš neměnila. Nicméně 15. den bylo pozorováno mírné snížení v případě skupin sPT, sP a fT (Obrázek 18). Naopak 35. den bylo pozorováno statisticky významné zvýšení antioxidační kapacity pro skupinu sP. To bylo potvrzeno i stanovením antioxidační kapacity pomocí ABTS (Obrázek 19) a FRAP (Obrázek 20). Skupina sP je statisticky vyšší než kontrolní skupina, a to o minimálně 40 %. Také aplikace sPT způsobilo zvýšení antioxidační kapacity metodami DPPH a ABTS (Obrázek 18 a 19).



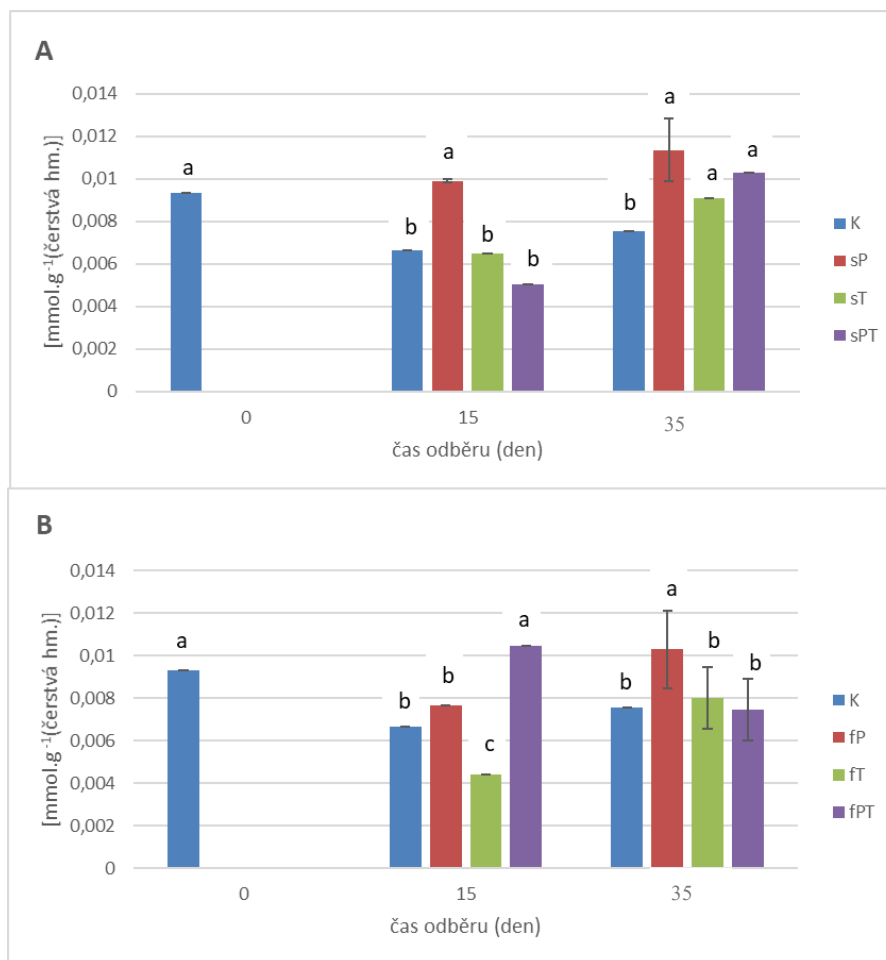
Obrázek 19 Antioxidační kapacita listů rostlin ošetřených fungicidy záhlvkou do půdy (A) a postřikem na listy (B) určená metodou ABTS. Vzorčky byly odebrány 15. a 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

Stanovení antioxidační kapacity metodami FRAP a ABTS spolu koreluje, stejně jako metody ABTS a DPPH (Obrázek 51, str.76). Ošetření rostlin formou fP a fT snížilo antioxidační kapacitu metodou ABTS v listech rostlin 15. den.



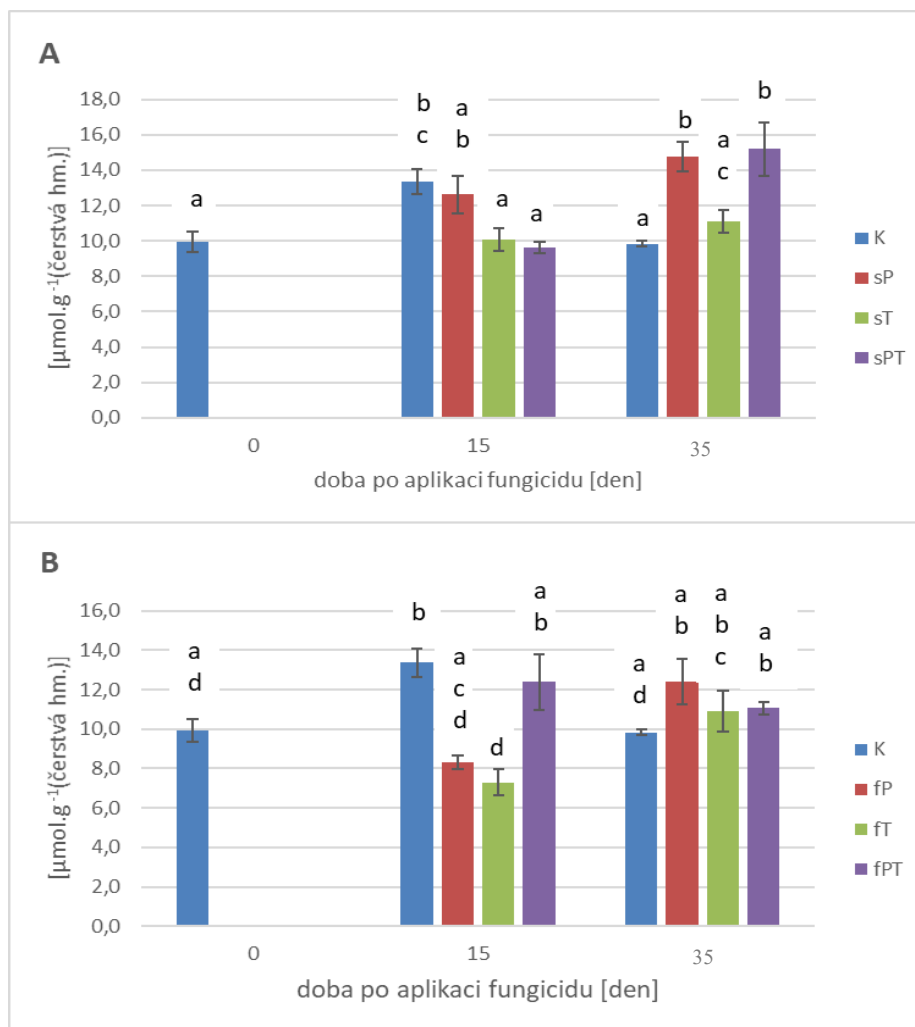
Obrázek 20 Antioxidační kapacita listů rostlin ošetřených fungicidy závlivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B) určená metodou FRAP. Vzorky byly odebrané 15. a 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

V případě antioxidační kapacity stanovené metodou FRAP došlo u rostlin ošetřených formou fPT k výraznému zvýšení 35. den oproti kontrolní skupině o 40 %, a v případě sP o 36 %.



Obrázek 21 Koncentrace flavonoidů v listech rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 15. a 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

Obsah flavonoidů byl výrazně zvýšený 15. den pro ošetření sP a snížený v případě aplikace formou fT. 35. den byl obsah flavonoidů zvýšen ve všech ošetřených skupinách oproti kontrole s výjimkou fT a fPT. V případě rostlin oběma fungicidy zálivkou do půdy (sPT) dochází časem ke zvýšení obsahu flavonoidů. Na druhé straně v případě rostlin ošetřených kombinací fungicidů postřikem na listy (fPT) dochází ke snížení jejich obsahu.



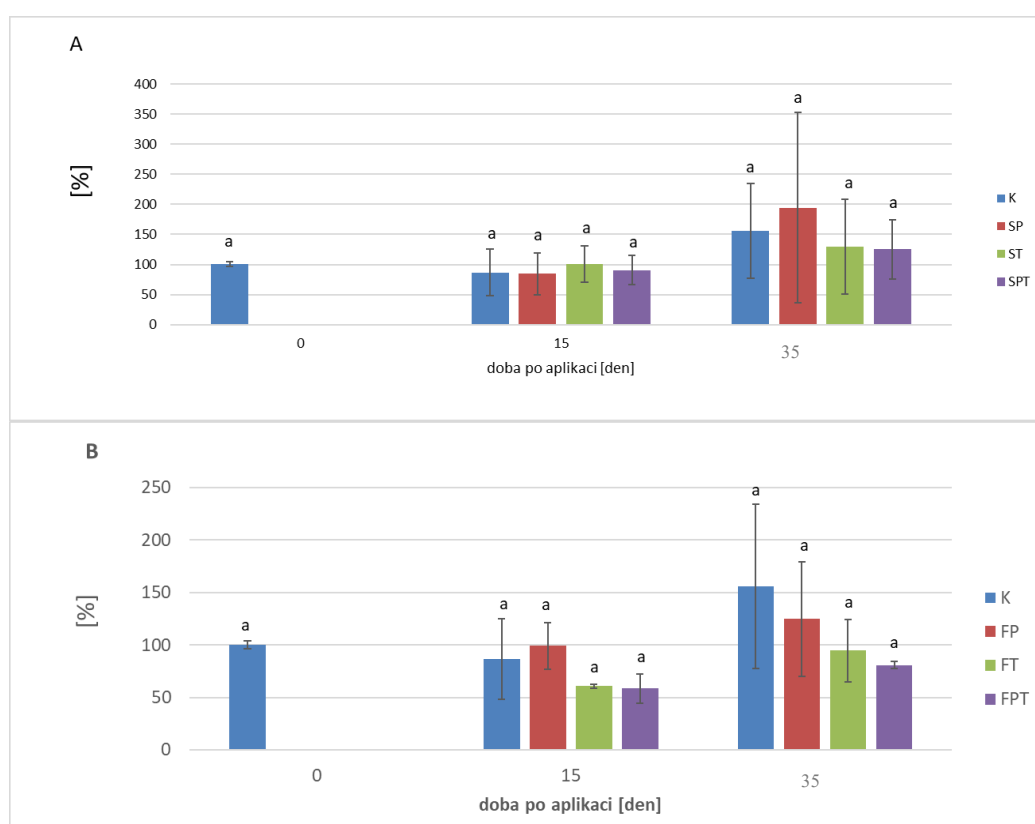
Obrázek 22 Koncentrace celkových fenolických látek v listech rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 15. a 35. den a byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

Obsah fenolických látek koreloval s antioxidační kapacitou stanovenou dle ABTS (Obrázek 51, str. 76). Koncentrace fenolických látek byla snížena 15. den v případě ošetření fP a fT. 35. den byla významně zvýšená koncentrace fenolických látek ve skupinách sP a sPT, a to minimálně o 50 % vůči kontrole (Obrázek 22).

4.2.2 Vliv na aktivitu antioxidačních enzymů v listech, kořenech a plodech

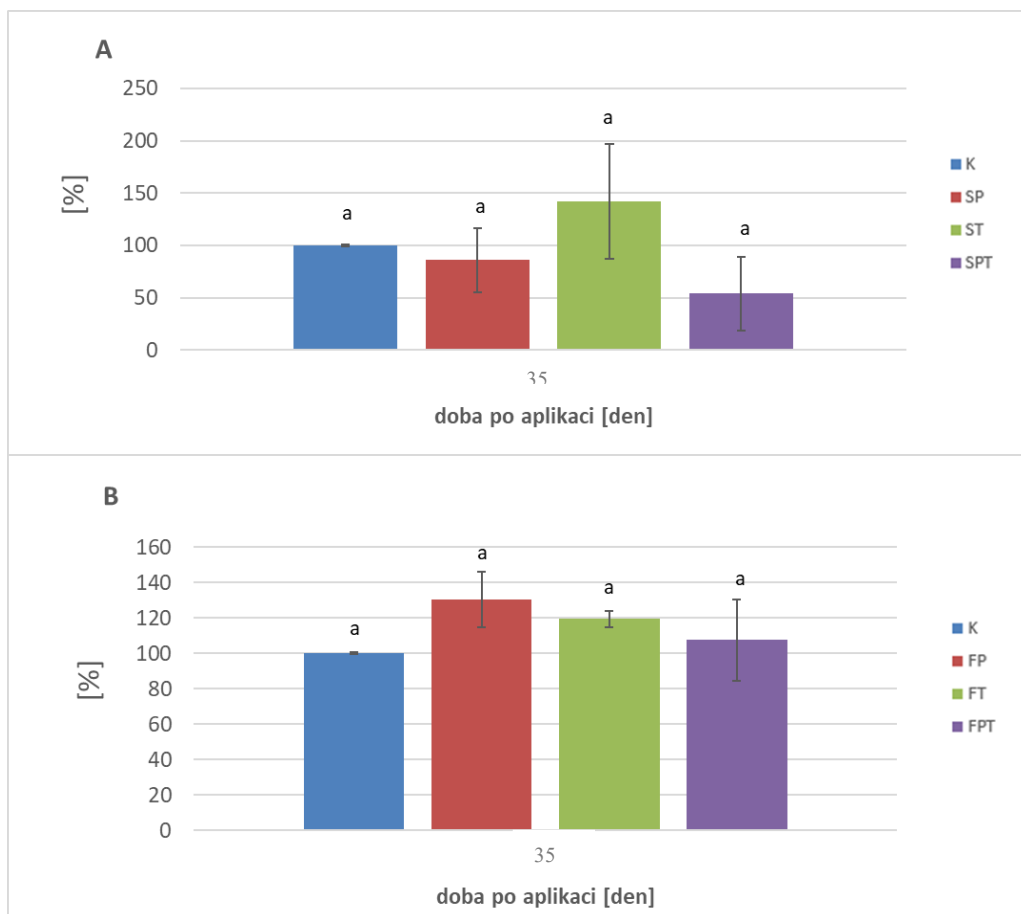
4.2.2.1 Aktivita peroxidas v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy

Aktivita celkových volných a membránově vázaných peroxidas byla stanovena v listech, kořenech a plodech. Na Obrázku 23 jsou uvedeny celkové peroxidasy naměřené v listech, na Obrázku 24 (str. 50) v kořenech a na Obrázku 25 (str. 51) peroxidasy zjištěné v plodech. Zatímco po centrifugaci rostlinného extraktu se v supernatantu nacházejí rozpustné cytosolové peroxidasy, tak ze sedimentu lze zvýšenou iontovou silou uvolnit membránově vázané peroxidasy, a tím je stanovit zvlášť. Aktivita je vyjádřena v procentech vůči kontrolní skupině odebrané před aplikací fungicidů.



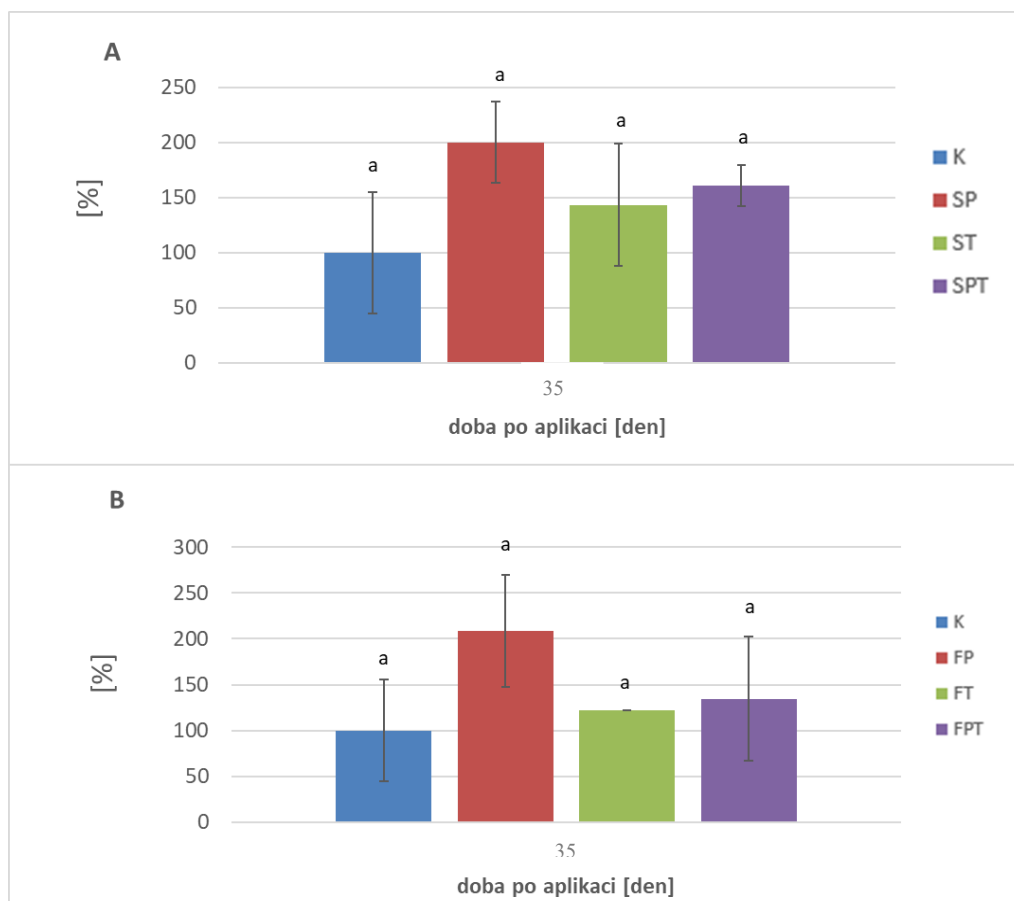
Obrázek 23 Aktivita celkových peroxidas v listech rostlin ošetřených fungicidy závlivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrané 15. a 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

Z Obrázku 23 nevyplývá žádný statisticky významný rozdíl v aktivitě celkových volných peroxidas s výjimkou fT a fPT, které se 35. den mírně zvyšují.



Obrázek 24 Aktivita celkových peroxidas v kořenech rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

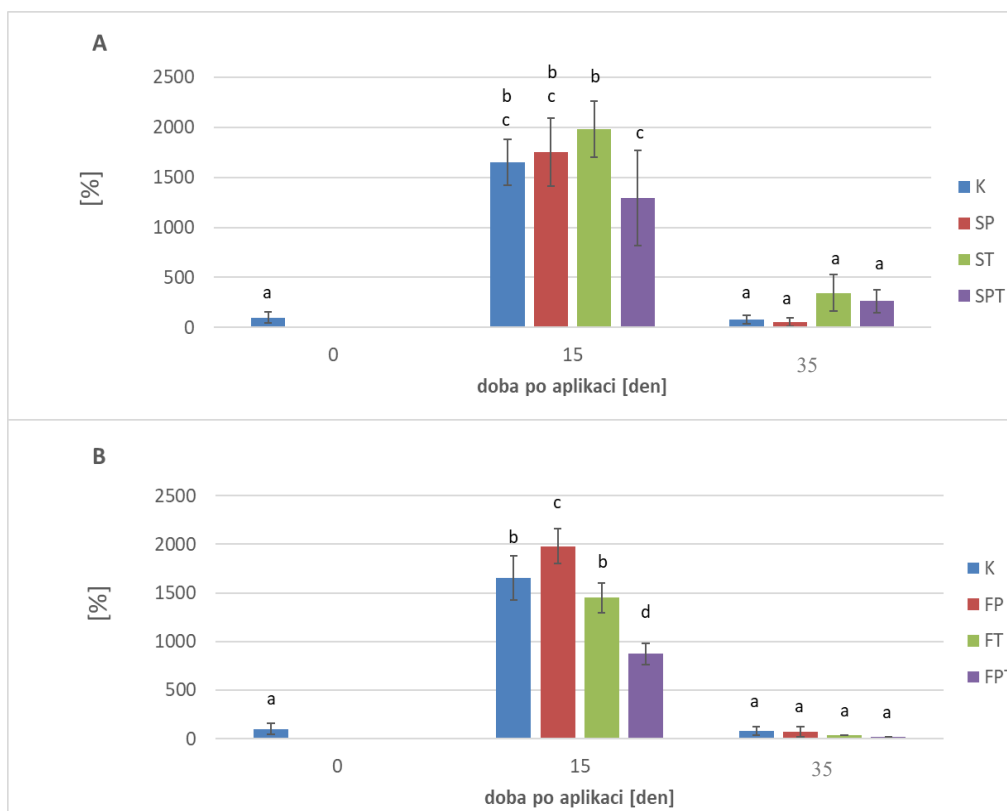
V kořenech nevychází žádný statisticky významný rozdíl v aktivitě celkových volných peroxidas jak při ošetření zálivkou do půdy, tak při aplikaci fungicidů postřikem na listy. Z Obrázku 24 ale zároveň vyplývá, že jsou aktivity celkových volných peroxidas v kořenech rostlin ošetřených formou fP a fT mírně vyšší než v kontrolní skupině.



Obrázek 25 Aktivita celkových peroxidás v plodech rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

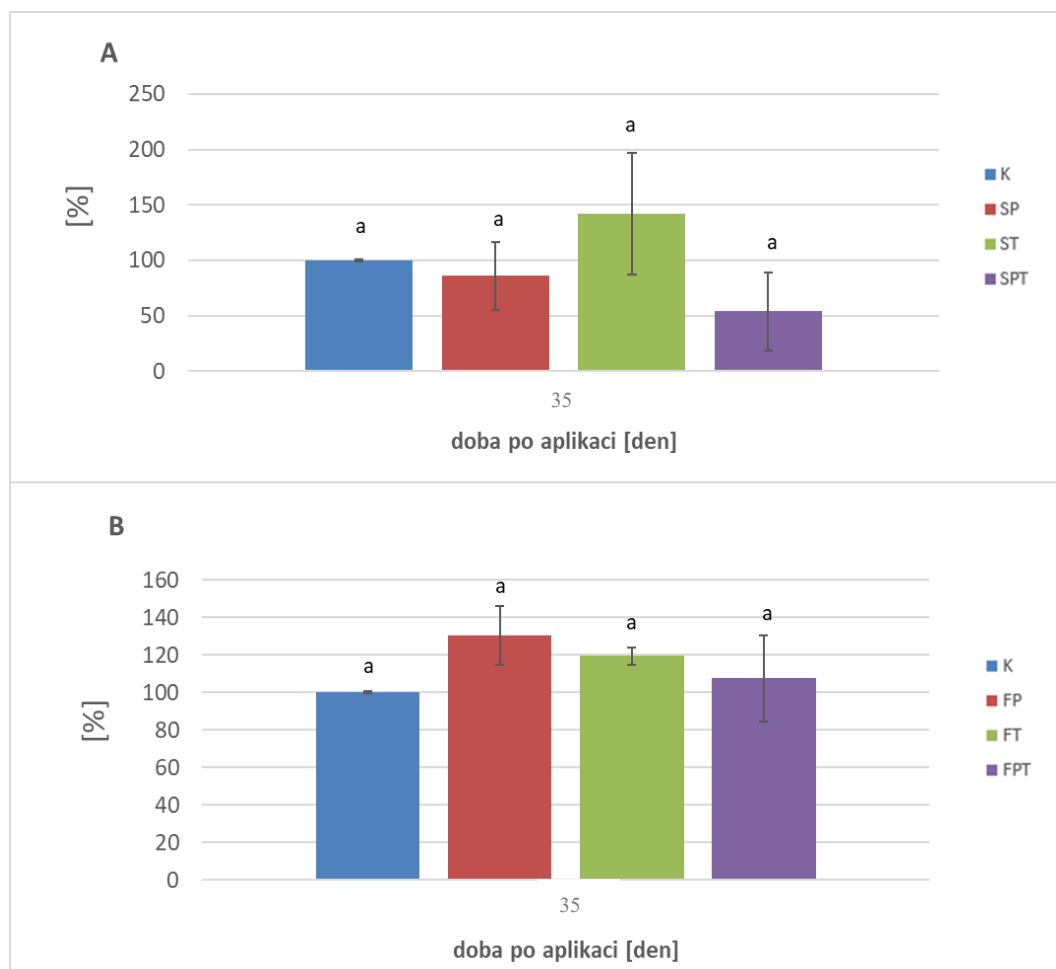
Z Obrázku 25 nevyplývá žádný statisticky významný rozdíl v koncentracích celkových peroxidás v plodech. Skupina ošetřená penkonazolem vykazuje mírně vyšší aktivitu než ostatní skupiny. Tento trend je přítomný jak při ošetření zálivkou do půdy, tak při postřiku na listy (sP i fP).

Na Obrázku 26 jsou znázorněné aktivity membránově vázaných peroxidas stanovených v listech, na Obrázku 27 (str.53) v kořenech a na Obrázku 28 (str.54) v plodech.



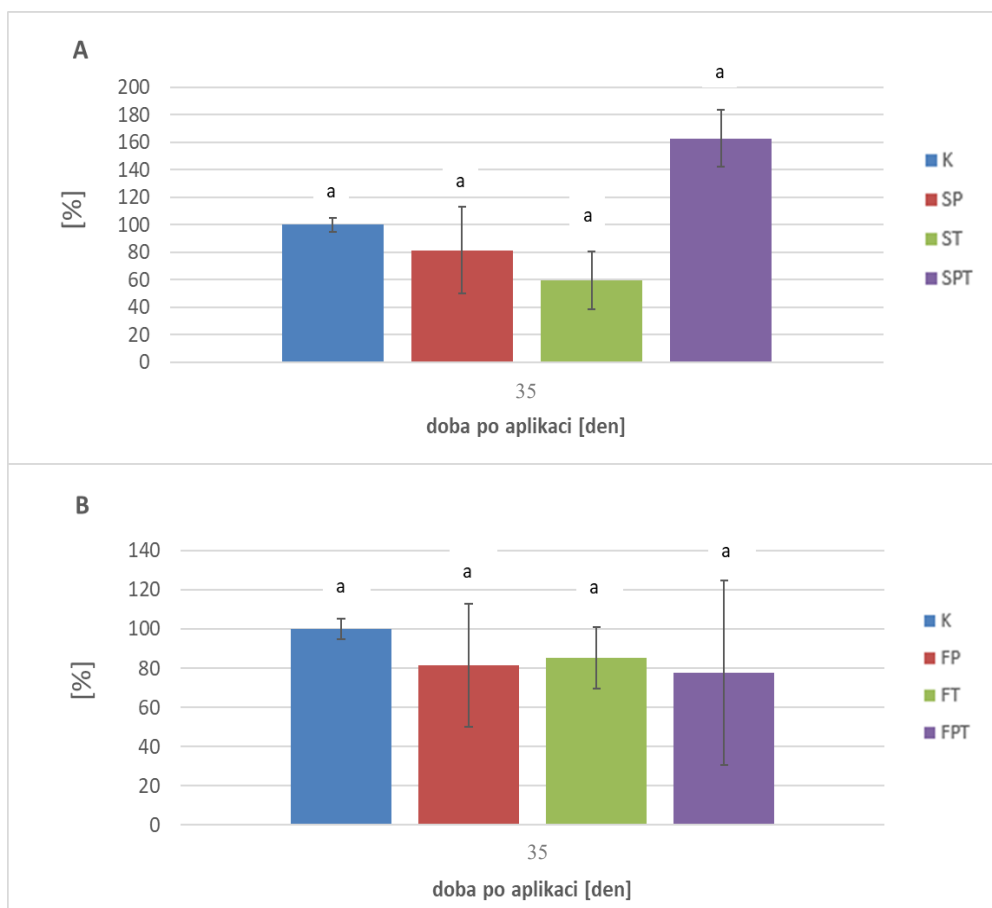
Obrázek 26 Aktivita membránově vázaných peroxidas v listech rostlin ošetřených fungicidy závlivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrané 15. a 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

V listech obecně byly 15. den detekovány významně statisticky vyšší hodnoty aktivity membránově vázaných peroxidas avšak u všech skupin včetně kontrol, což vypovídá o možnosti indukce aktivity peroxidas dalším stresem. V rámci rozdílu mezi skupinami nebyl pozorován významný rozdíl (Obrázek 26).



Obrázek 27 Aktivita membránově vázaných peroxidas v kořenech rostlin ošetřených fungicidy závlivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrané 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

Aktivita membránově vázaných peroxidas v kořenech nevykazuje žádné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami ošetřených fungicidy. Skupina sT vykazuje mírně vyšší aktivitu v porovnání s ostatními skupinami ošetřených závlivkou do půdy. U skupin rostlin, na které byly fungicidy aplikované postřikem na listy jsou skupiny fP a fT mírně zvýšené v porovnání s kontrolní skupinou.



Obrázek 28 Aktivita membránově vázaných peroxidas v plodech rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

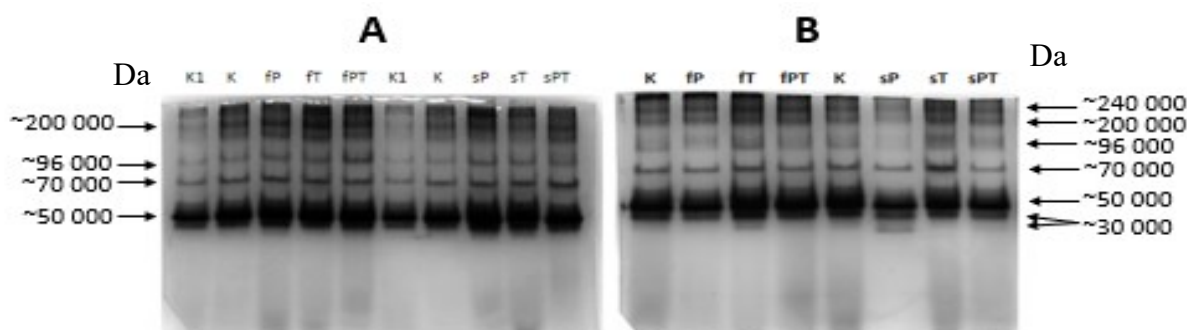
V plodech nebyly naměřené žádné statisticky významné rozdíly, ale u rostlin ošetřených zálivkou do půdy se svojí vysokou aktivitou výrazně odlišuje skupina sPT. Tato skupina se od kontrolní skupiny liší o 60 %.

V případě plodů rostlin ošetřených postřikem na listy má nejvyšší aktivitu kontrolní skupina. Všechny ostatní skupiny jsou velmi podobné.

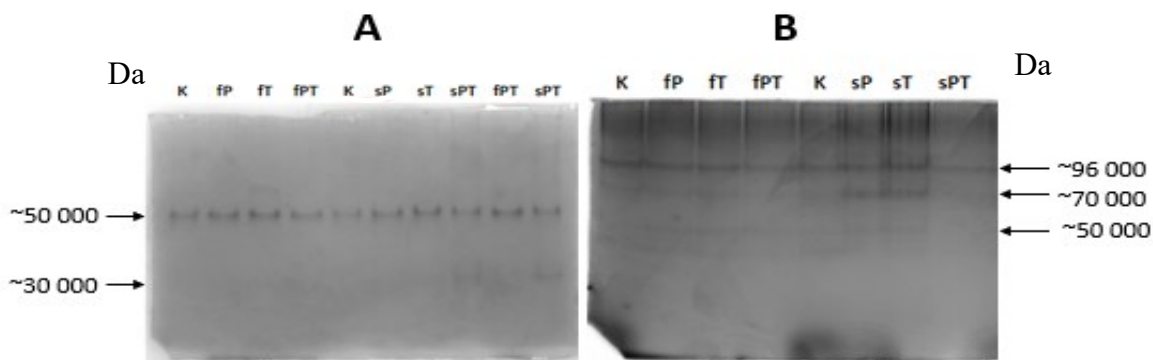
4.2.2.2 Isoenzymové složení peroxidasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy

Pomocí nativní elektroforézy v 10 % gelu byly separované extrakty listů (15. a 35. den), plodů a kořenů pro určení isoenzymů peroxidasy. Přibližná molekulová hmotnost jednotlivých isoenzymů byla stanovena metodou podle Fergusona (4.1.1).

Listy vykazovaly vyšší počet isoform než plody a kořeny. V listech bylo nalezeno nejméně šest isoform o přibližné molekulové hmotnosti ~30, 50, 70, 96, 200 a 240 kDa, v kořenech minimálně 3 isoformy ~50, 70 a 96 kDa a v plodech byla nalezena minimálně jedna isoforma ~50 kDa (Obrázek 29, 30). V listech odebraných 15. den došlo ke zvýšení intenzity všech isoform peroxidasy oproti kontrolní skupině před aplikací fungicidů.



Obrázek 29 Detekce aktivity peroxidasy po nativní elektroforéze v 10 % polyakrylamidovém gelu v listech rostlin vystavených fungicidům. Vzorky byly odebrané 15. (A) a 35. den (B) a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Vzorek Kl značí kontrolu odebranou ještě před ošetřením fungicidy. Na každou dráhu bylo aplikované stejné množství proteinů (31 μ g u listů odebraných 15. den a 34 μ g u listů odebraných 35. den).



Obrázek 30 Detekce aktivity peroxidasy po nativní elektroforéze v 10 % polyakrylamidovém gelu v plodech (A) a kořenech (B) rostlin vystavených fungicidům. Vzorky byly odebrané 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Na každou dráhu bylo aplikované stejné množství proteinů (4 μ g u kořenů a 3 μ g u plodů).

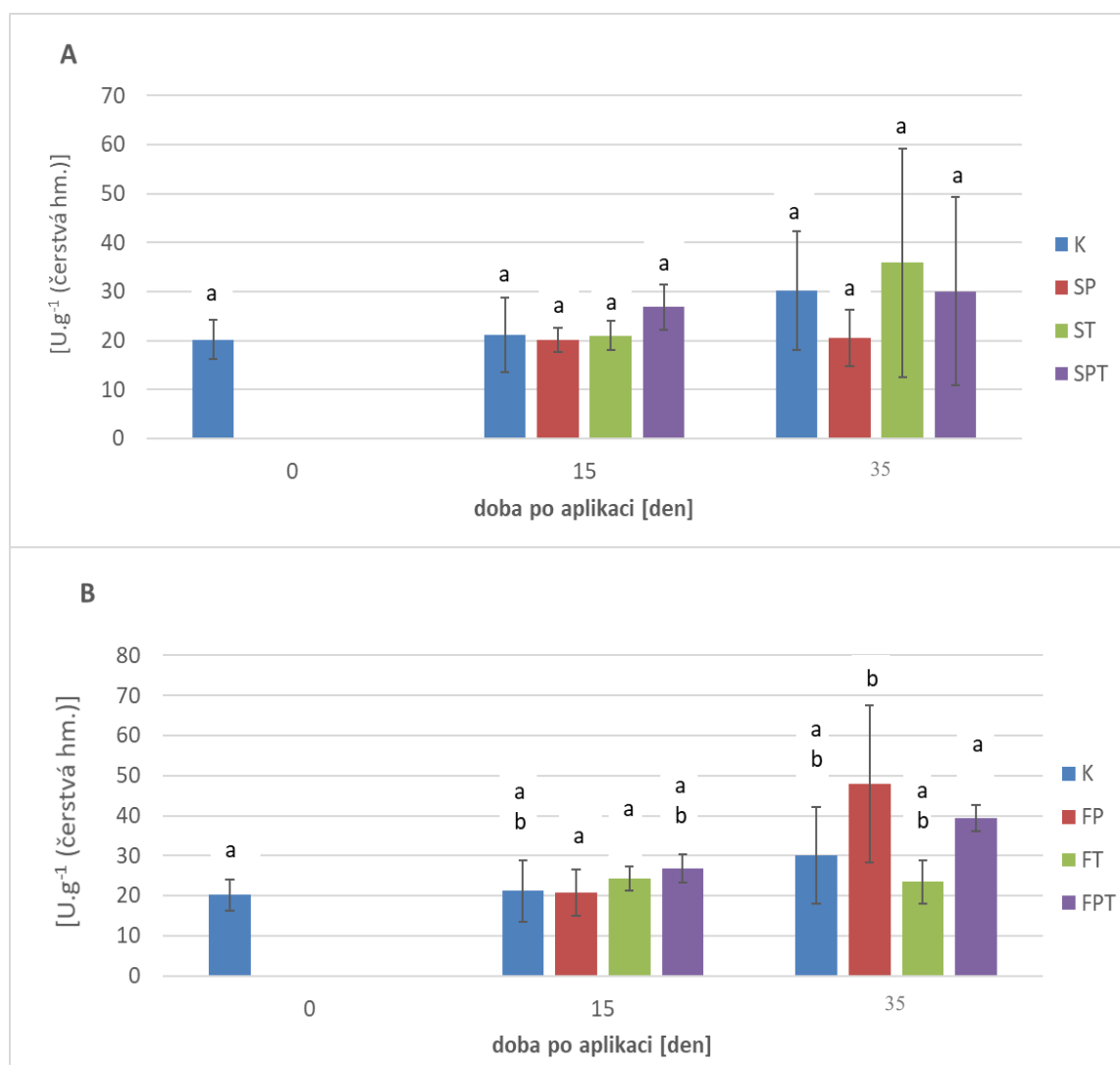
Indukovatelnost isoform peroxidasy triazoly byla pozorována v listech pro isoformu v listech ~70 kDa, v kořenech ~70 kDa a 96 kDa a v plodech ~50 kDa. Po aplikaci fungicidů zálivkou i postřikem byla aktivita peroxidasy v listech 15. den vyšší než v kontrolní skupině. Zatímco 35. den byly aktivity peroxidasy přibližně shodné s kontrolní skupinou s výjimkou sP a sPT, kde některé isoformy vykazovaly sníženou intenzitu, a tedy nižší aktivitu. Na druhé straně se u těchto rostlin objevuje další isoforma s vysokou pohyblivostí (~30 kDa).

U plodů došlo vlivem fungicidů k mírnému zvýšení intenzity isoformy ~50 kDa oproti kontrolní skupině. Navíc v případě sPT se objevuje další isoforma s vysokou pohyblivostí. V kořenech byla detekována jedna majoritní isoforma ~96 kDa. Isoforma ~70 kDa má nejvyšší intenzitu v kořenech sP a sT. Zatímco v kořenech sPT zůstává dobře patrná pouze majoritní isoforma ~96 kDa (Obrázek 30).

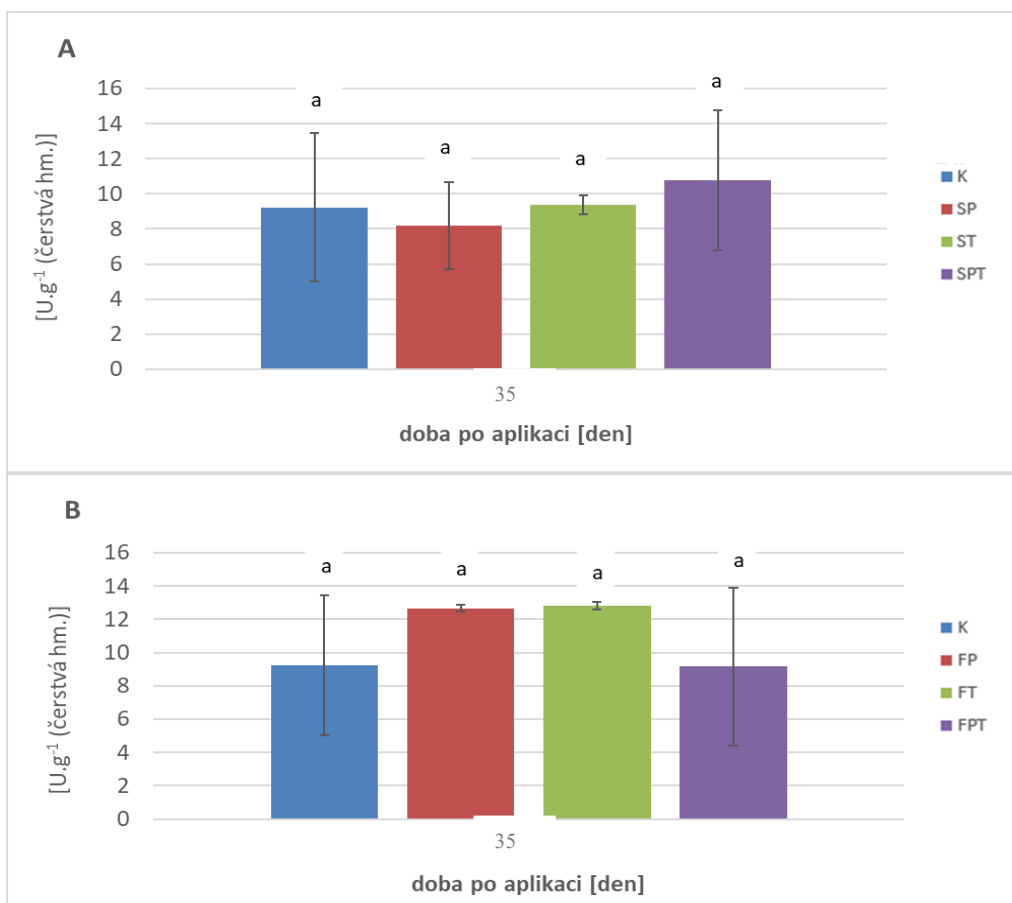
4.2.2.3 Aktivita askorbátperoxidasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy

Na Obrázcích 31 až 33 (str.57-59) jsou zobrazeny stanovené aktivity askorbátperoxidasy.

Nejvyšší hodnota aktivity askorbátperoxidasy a statisticky významná změna oproti kontrole byla detekována ve skupině rostlin ošetřené postřikem penkonazolem (fP) (Obrázek 31). Nejvyšší aktivita askorbátperoxidasy byla detekována v listech oproti kořenům a plodům.

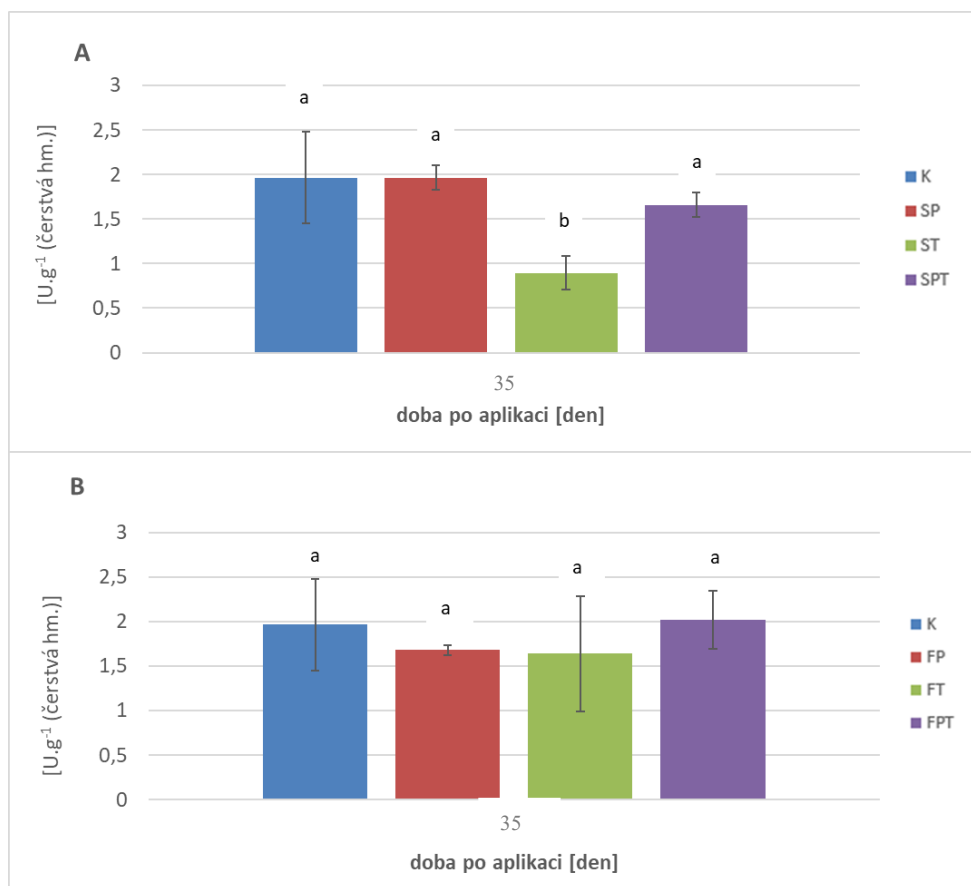


Obrázek 31 Aktivita askorbátperoxidasy v listech rostlin ošetřených fungicidy závlivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 15. a 35. den a byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).



Obrázek 32 Aktivita askorbátperoxidasy v kořenech rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postříkem na listy (B). Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

Aktivita askorbátperoxidasy se v kořenech rostlin výrazně nelišila ani vlivem zálivky ani vlivem postříku triazolovým fungicidy (Obrázek 32).



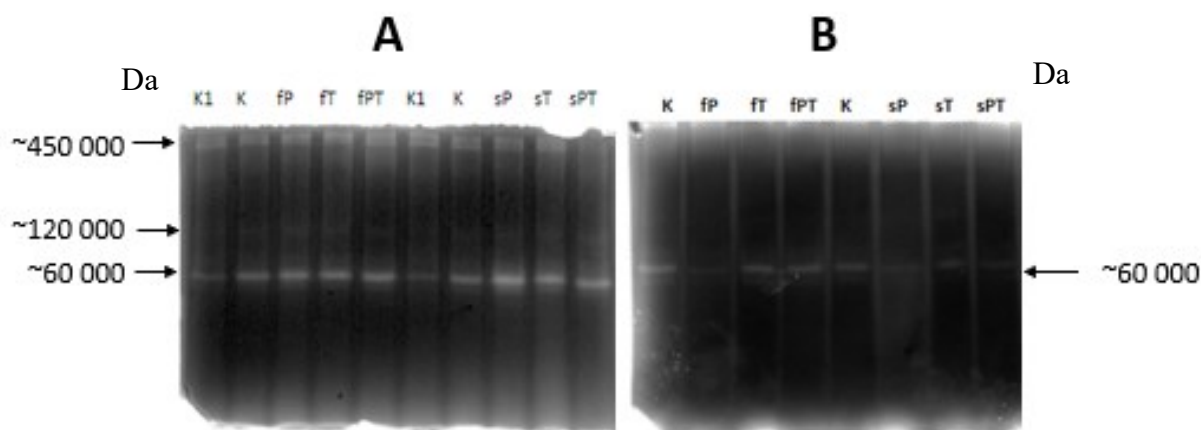
Obrázek 33 Aktivita askorbátperoxidasy v plodech rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

V plodech byla nalezeno významné snížení v případě skupiny sT, zatímco v ostatních skupinách nebyl detekován významný rozdíl.

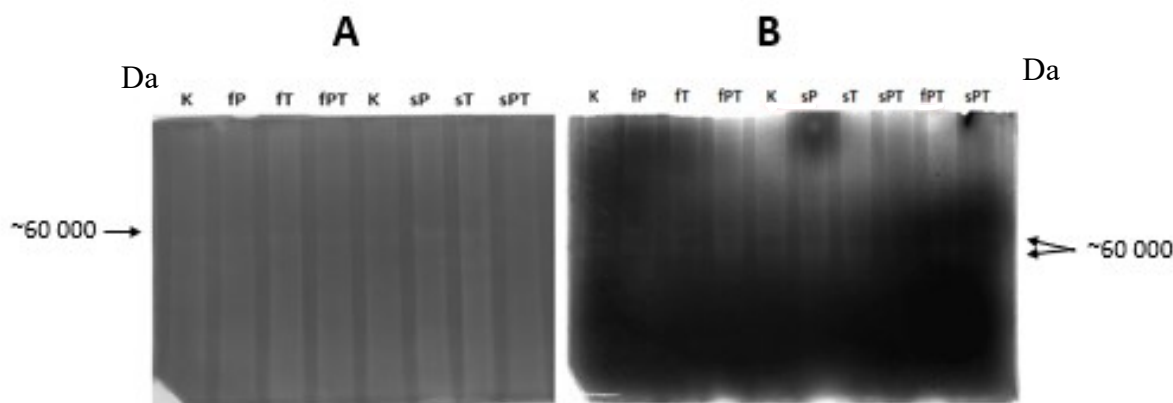
4.2.2.4 *Isoenzymové složení askorbátperoxidasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy*

Isoenzymové složení a aktivita askorbátperoxidasy byla detekována po elektroforetické separaci za nativních podmínek. V listech všech skupin byly 15. den detekovány dvě isoformy s malou pohyblivostí o přibližně stejné intenzitě. Majoritní isoforma ~60 kDa vykazovala vyšší intenzitu v ošetřených listech, jak při aplikaci triazolových fungicidů postřikem, tak zálivkou. V ošetřených listech je patrně přítomna další minoritní isoforma ~120 kDa. V listech dochází 35. den ke snížení intenzity majoritní isoformy (~60 kDa) především při ošetření rostlin formou fP a sP.

V plodech je přítomna pouze jedna isoforma (~60 kDa) s nízkou intenzitou. V kořenech jsou přítomné minimálně dvě isoformy o nízké intenzitě a blízké molekulové hmotnosti přibližně ~60 kDa (Obrázek 35).



Obrázek 34 Detekce aktivity askorbátperoxidasy po nativní elektroforéze v 10 % polyakrylamidovém gelu v listech rostlin vystavených fungicidům. Vzorky byly odebrány 15. (A) a 35. den (B) a byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Vzorek K1 značí kontrolu odebranou ještě před ošetřením fungicidy. Na každou dráhu bylo aplikované stejné množství proteinů (31 µg u listů odebraných 15. den a 34 µg u listů odebraných 35. den).

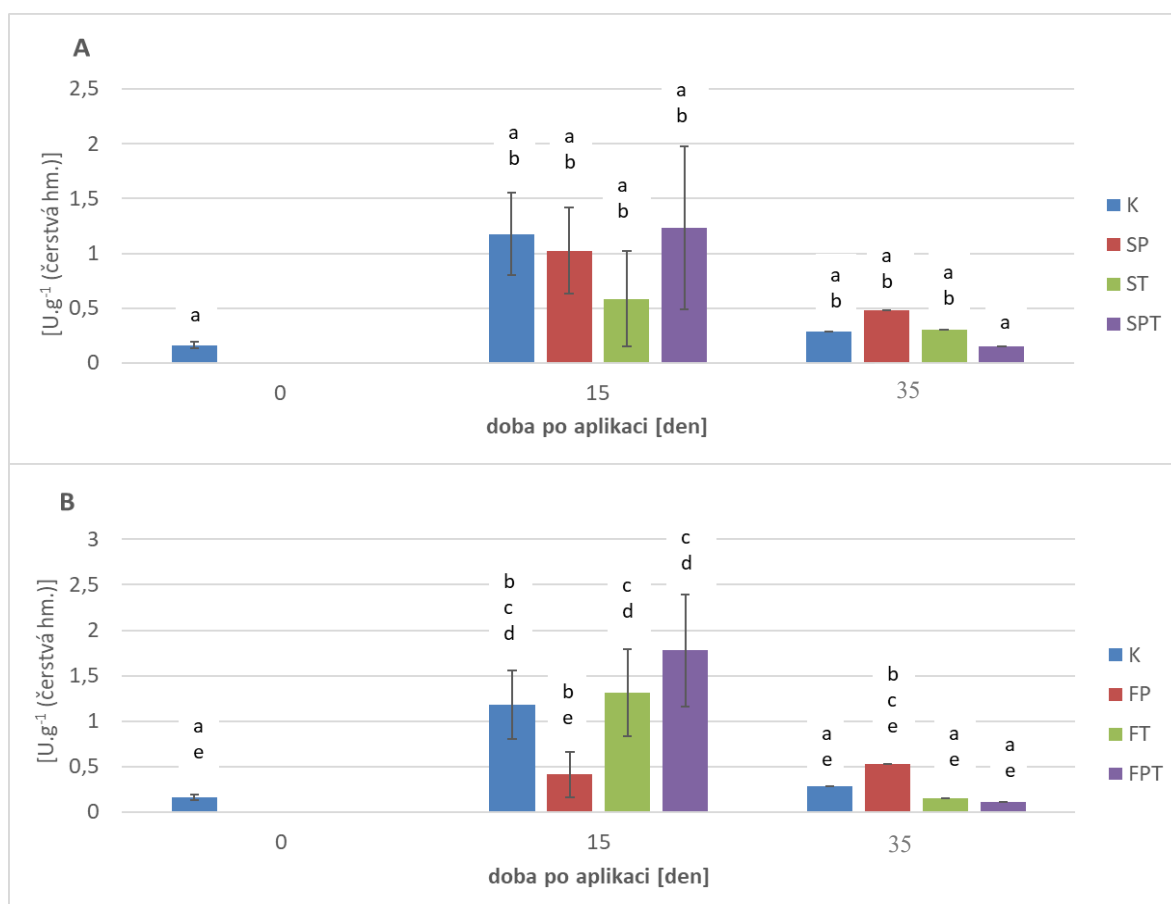


Obrázek 35 Detekce aktivity askorbátperoxidasy po nativní elektroforéze v 10 % polyakrylamidovém gelu v plodech (A) a kořenech (B) rostlin vystavených fungicidům. Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Na každou dráhu bylo aplikované stejné množství proteinů (4 μ g u kořenů a 3 μ g u plodů).

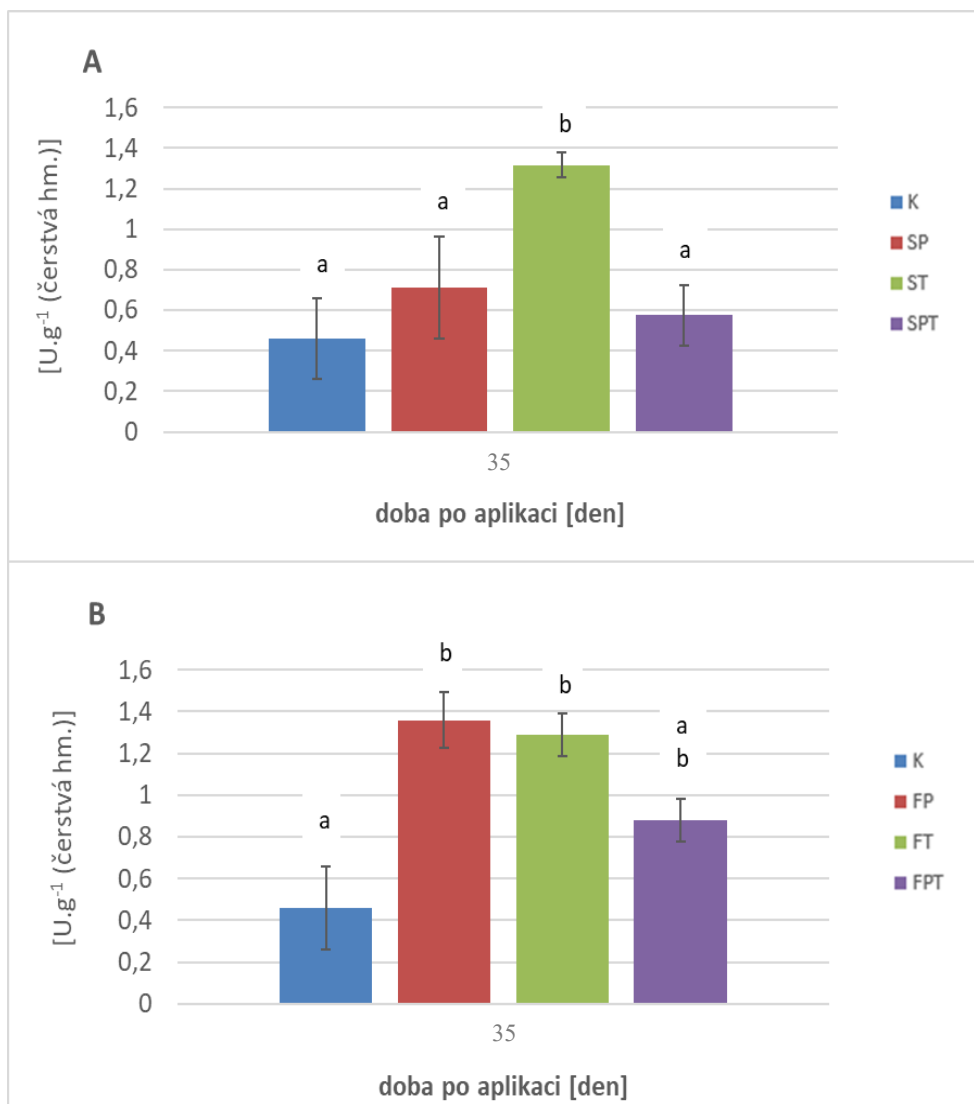
4.2.2.5 Aktivita guajakolperoxidasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy

Na Obrázcích 36 až 38 (str. 62-64) jsou výsledky stanovení aktivity guajakolperoxidasy.

Především skupiny sT a fP byly sníženy 15. den a skupiny sPT a fT a fPT 35. den vykazovaly snížení aktivity guajakolperoxidasy. Kombinace fungicidů ve skupinách sPT a fPT způsobila mírné zvýšení. V listech je významný pokles aktivity tohoto enzymu 35. den v porovnání s 15. dnem. Tento trend je přítomný jak při ošetření fungicidy zálivkou do půdy, tak při ošetření postřikem na listy. V případě kontroly je rozdíl mezi 15. a 35. dnem 4-násobný, u sP a sT dvojnásobný, u sPT a fT 8-násobný a u fPT dokonce 16-násobný.

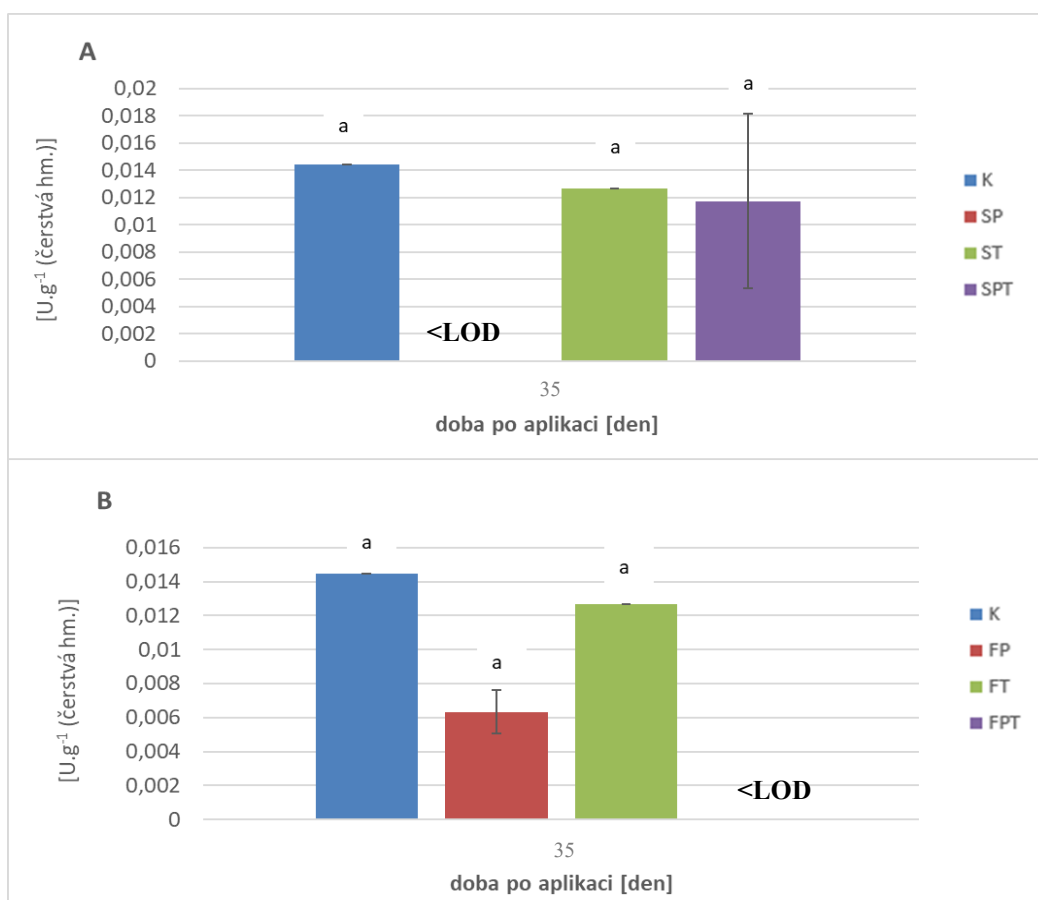


Obrázek 36 Aktivita guajakolperoxidasy v listech rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrané 15. a 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).



Obrázek 37 Aktivita guajakolperoxidasy v kořenech rostlin ošetřených fungicidy závlivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

Aktivita guajakolperoxidasy v kořenech se zvyšovala vlivem závlivky triazolovými fungicidy především sT, avšak postřik způsobil zvýšenou aktivitu ve všech ošetřených skupinách. Skupina sT byla v porovnání s kontrolní skupinou 2,8-násobně vyšší.

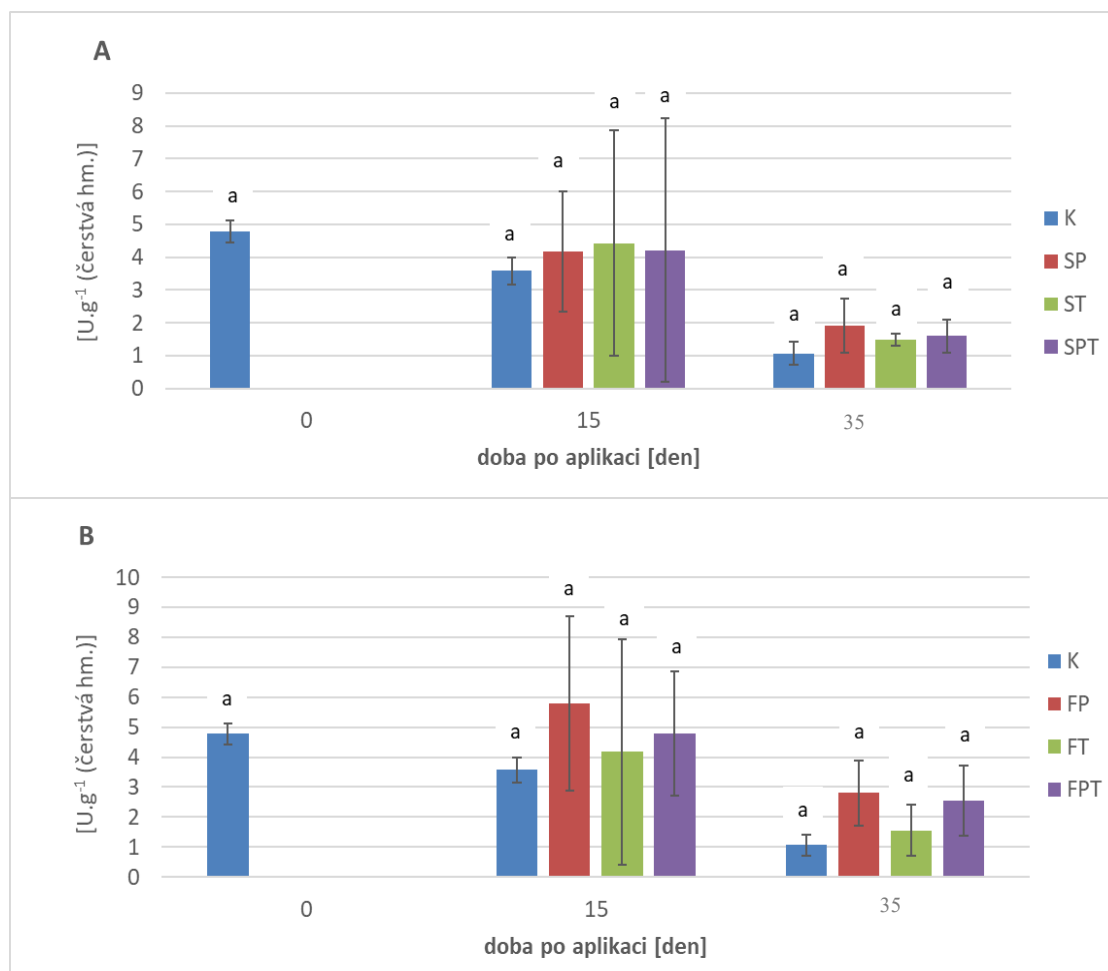


Obrázek 38 Aktivita guajakolperoxidasy v plodech rostlin ošetřených fungicidy závlivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrané 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). U skupin sP a fPT byly aktivity pod limitem detekce (<LOD).

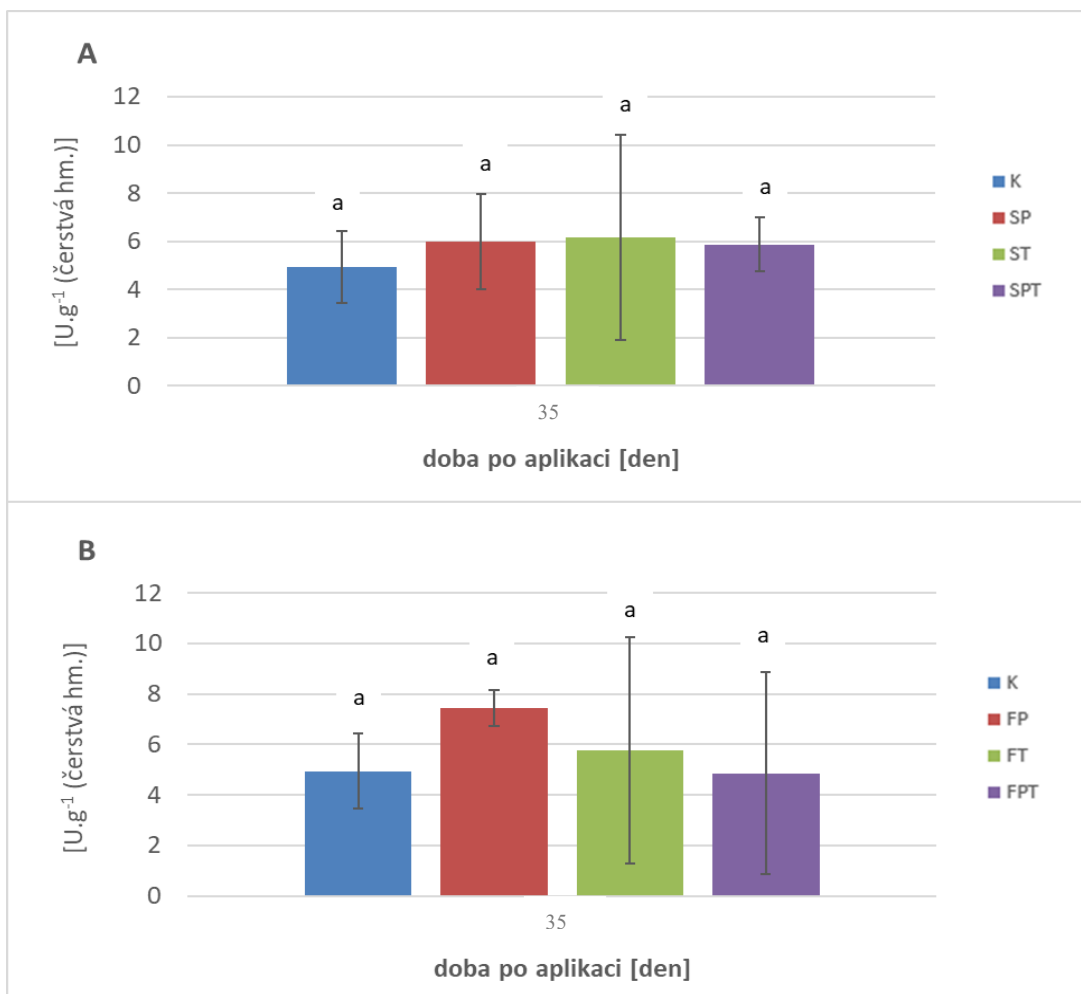
Aktivita guajakolperoxidasy v plodech byla velice nízká, pro některé experimentální skupiny nebyla detekovatelná (Obrázek 38). Mezi ostatními naměřenými skupinami nebyly nalezené žádné významné statistické rozdíly.

4.2.2.6 Aktivita ABTS peroxidasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy

Aktivita ABTS peroxidasy byla detekovatelná pouze v listech a kořenech. V listech nebyl nalezen žádný statistický významný rozdíl, ale je zřejmý trend poklesu aktivity mezi 15. a 35. dnem, který je přítomný u obou způsobů aplikace fungicidů.



Obrázek 39 Aktivita ABTS peroxidasy v listech rostlin ošetřených fungicidy závlivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 15. a 35. den a byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

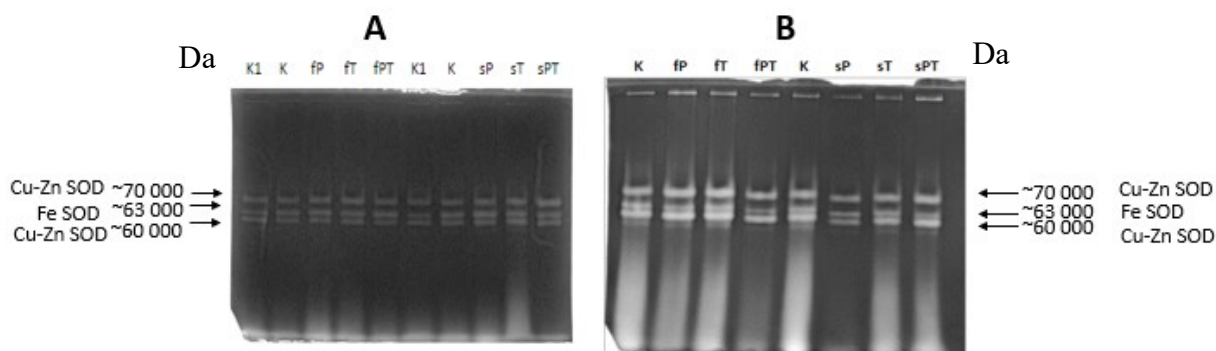


Obrázek 40 Aktivita ABTS peroxidasy v kořenech rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).

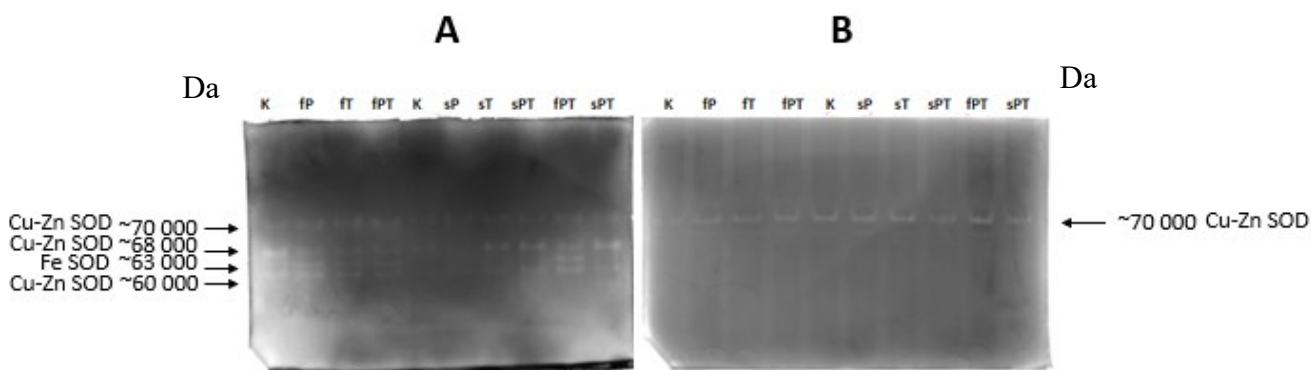
V případě kořenů nejsou statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami ani mezi dvěma různými aplikacemi fungicidů. Ve skupině fP byla detekována mírně vyšší aktivita, než je tomu u ostatních skupin. Obecně u kořenů byly zaznamenány vyšší aktivity než u listů.

4.2.2.7 Isoenzymové složení superoxiddismutasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy

Pomocí nativní elektroforézy v 10 % gelu byly separované extrakty listů (15. a 35. den), plodů a kořenů pro určení aktivity a isoenzymů superoxiddismutasy. Přibližná molekulová hmotnost byla odhadnuta dle metody podle Fergusona (viz 4.1.1), kdy byly k relativním pohyblivostem přiřazené přibližné molekulové hmotnosti.



Obrázek 41 Detekce aktivity superoxiddismutasy po nativní elektroforéze v 10 % polyakrylamidovém gelu v listech rostlin vystavených fungicidům. Vzorky byly odebrané 15. (A) a 35. den (B) a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Vzorek K1 značí kontrolu odebranou ještě před ošetřením fungicidy. Na každou dráhu bylo aplikované stejné množství proteinů (31 μ g u listů odebraných 15. den a 29 μ g u listů odebraných 35. den).



Obrázek 42 Detekce aktivity superoxiddismutasy po nativní elektroforéze v 10 % polyakrylamidovém gelu v plodech (A) a kořenech (B) rostlin vystavených fungicidům. Vzorky byly odebrané 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Na každou dráhu bylo aplikované stejné množství proteinů (4 μ g u kořenů a 3 μ g u plodů).

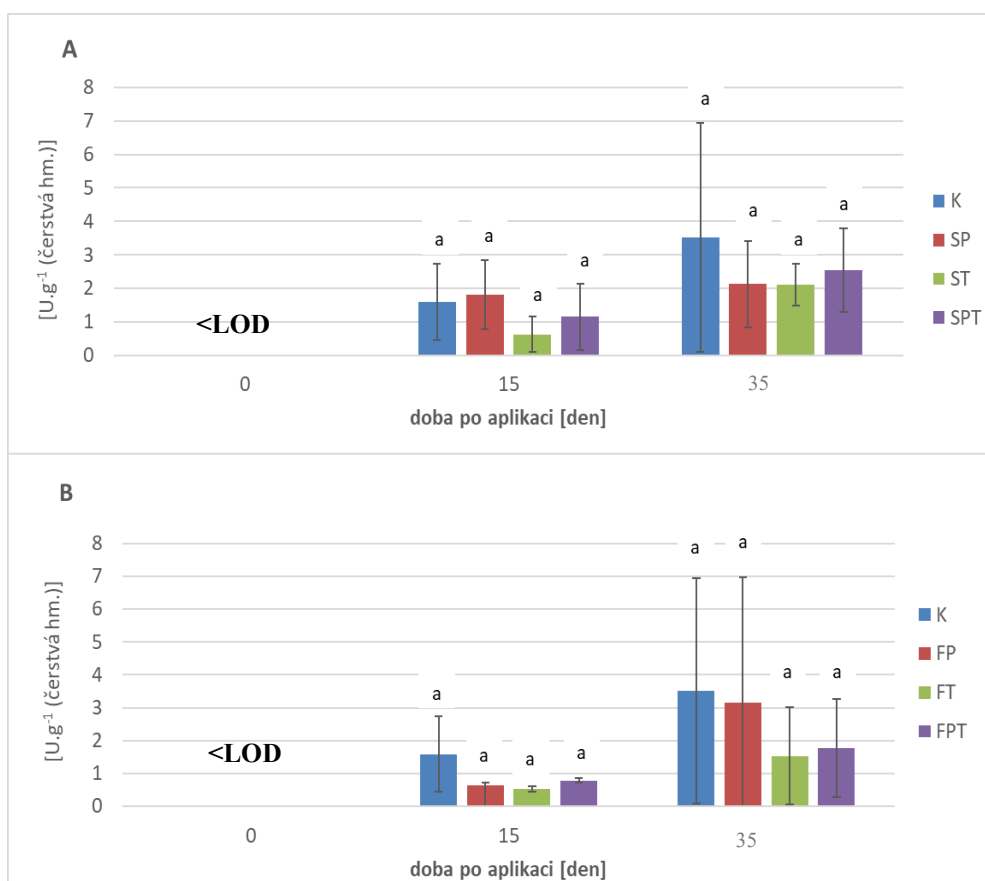
V listech jsou 15. den patrné tři majoritní isoformy s přibližnou molekulovou hmotností ~60 kDa, ~63 kDa a ~70 kDa. V listech rostlin fPT a sP je 35. den intenzita majoritních isoform nižší oproti ostatním experimentálním skupinám. Ve všech

skupinách je také navíc přítomna isoforma s nízkou pohyblivostí a objevuje se i další isoforma s molekulovou hmotností 60 kDa.

V plodech byly detekovány minimálně čtyři isoformy. Nejvyšší intenzita byla nalezena v případě skupin fP, fT, a fPT, zatímco ve skupinách ošetřených závlivkou triazolových fungicidů do půdy byla intenzita nižší, a i pravděpodobně chybí isoforma ~ 63 kDa. V kořenech byla přítomna pouze hlavní isoforma o ~70 kDa, která byla detekována ve všech skupinách s přibližně stejnou intenzitou. Nicméně některé skupiny obsahovaly i další isoformu s nižší molekulovou hmotností.

4.2.2.8 Aktivita katalasy v rostlinách rajčat ošetřených fungicidy

Aktivita katalasy byla v kontrolních listech velmi nízká, na začátku pokusu dokonce pod limitem detekce. Aktivita katalasy byla vyšší 15. i 35. den, ale ve všech skupinách srovnatelná bez statisticky významné změny (Obrázek 43).



Obrázek 43 Aktivita katalasy v listech rostlin ošetřených fungicidy závlivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrané 15. a 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Aktivita kontroly první den byla pod limitem detekce (<LOD).

4.2.3 Aktivita NADP-depedentních dehydrogenas v kořenech rostlin rajčat ošetřených fungicidy

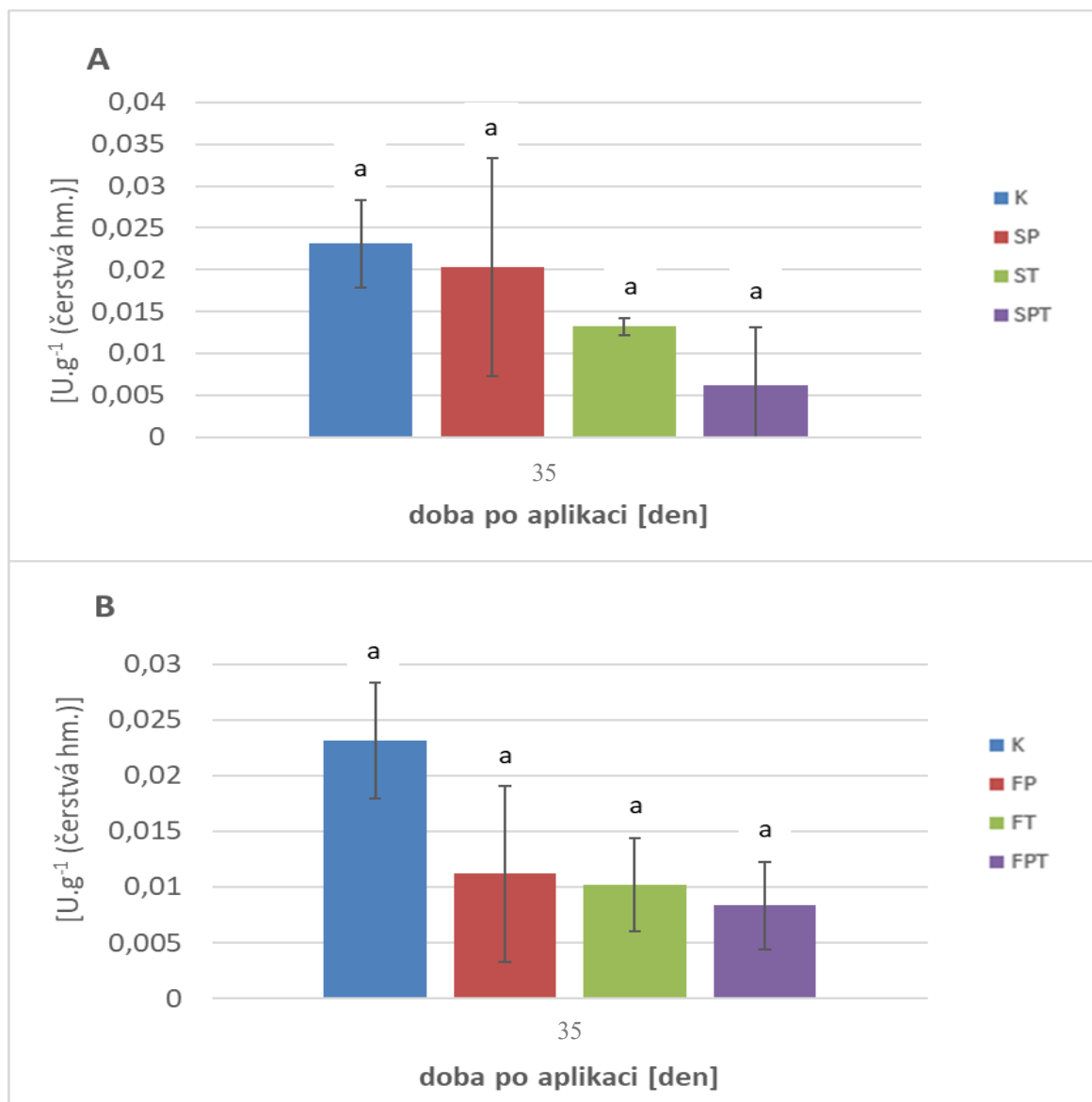
Aktivitu NADP-dependentních enzymů bylo možné určit pouze v extraktech kořenů. V listech aktivity byly měřeny, ale byly pod limitem detekce. Na Obrázcích 44-47 (str. 70-73) jsou znázorněné aktivity enzymů NADP-malátdehydrogenasy-dekarboxylační, NADP-isocitrátdehydrogenasy, glukosa-6-fosfátdehydrogenasy a šikimátdehydrogenasy.

Oproti kontrolní skupině byla aktivita NADP-malátdehydrogenasy-dekarboxylační snížena především v případě aplikace triazolových fungicidů postřikem (Obrázek 44, str. 70).

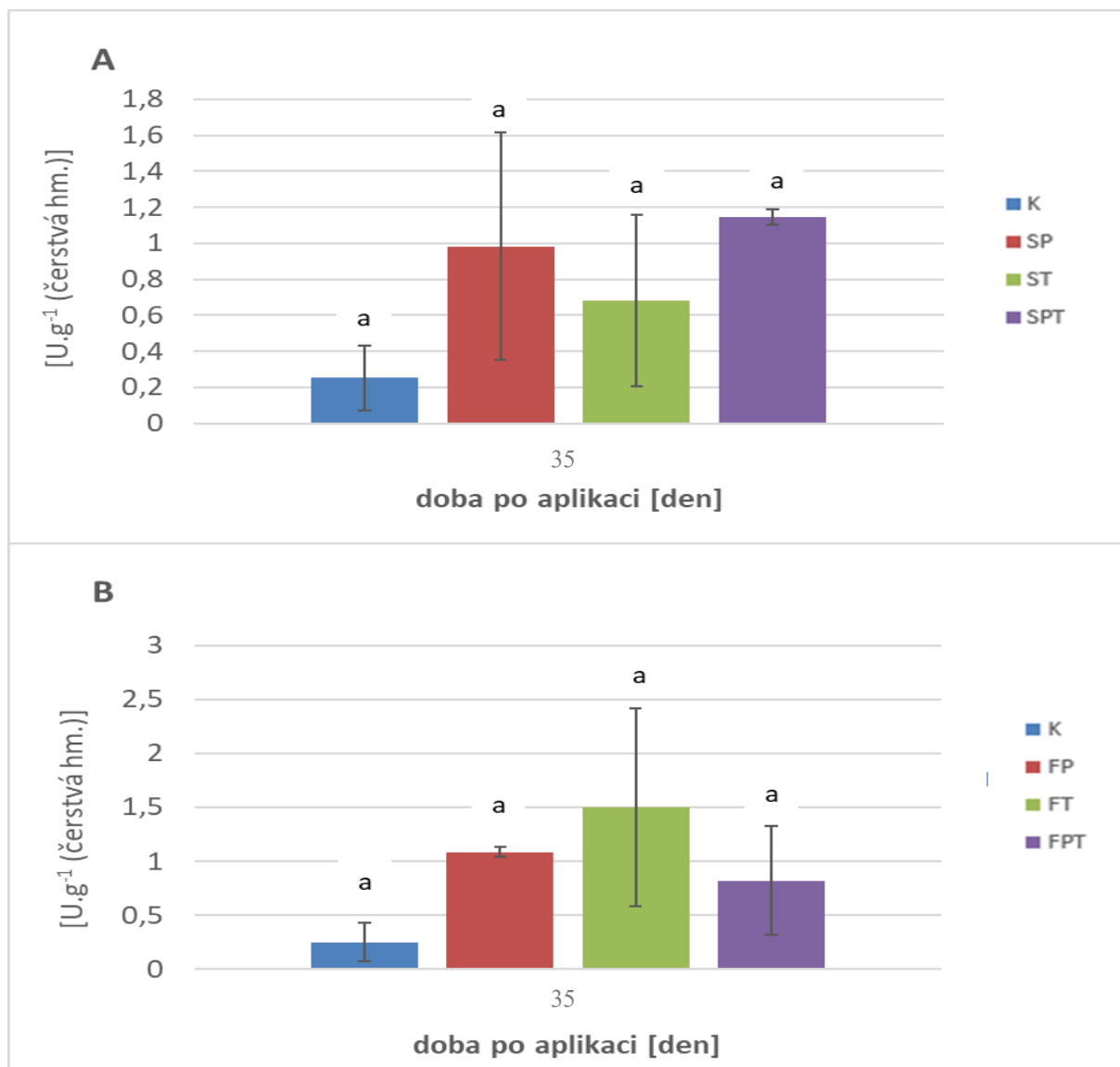
Aktivita NADP-isocitrátdehydrogenasy byla vlivem fungicidů mírně zvýšená v obou případech aplikace (Obrázek 45, str. 71).

V případě enzymu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy při ošetření postřikem na listy se statisticky významně odlišuje skupina ošetřena kombinací penkonazolu i tebukonazolu (fPT, Obrázek 46, str. 72). U této skupiny byla detekována výrazně vyšší aktivita oproti ostatním skupinám.

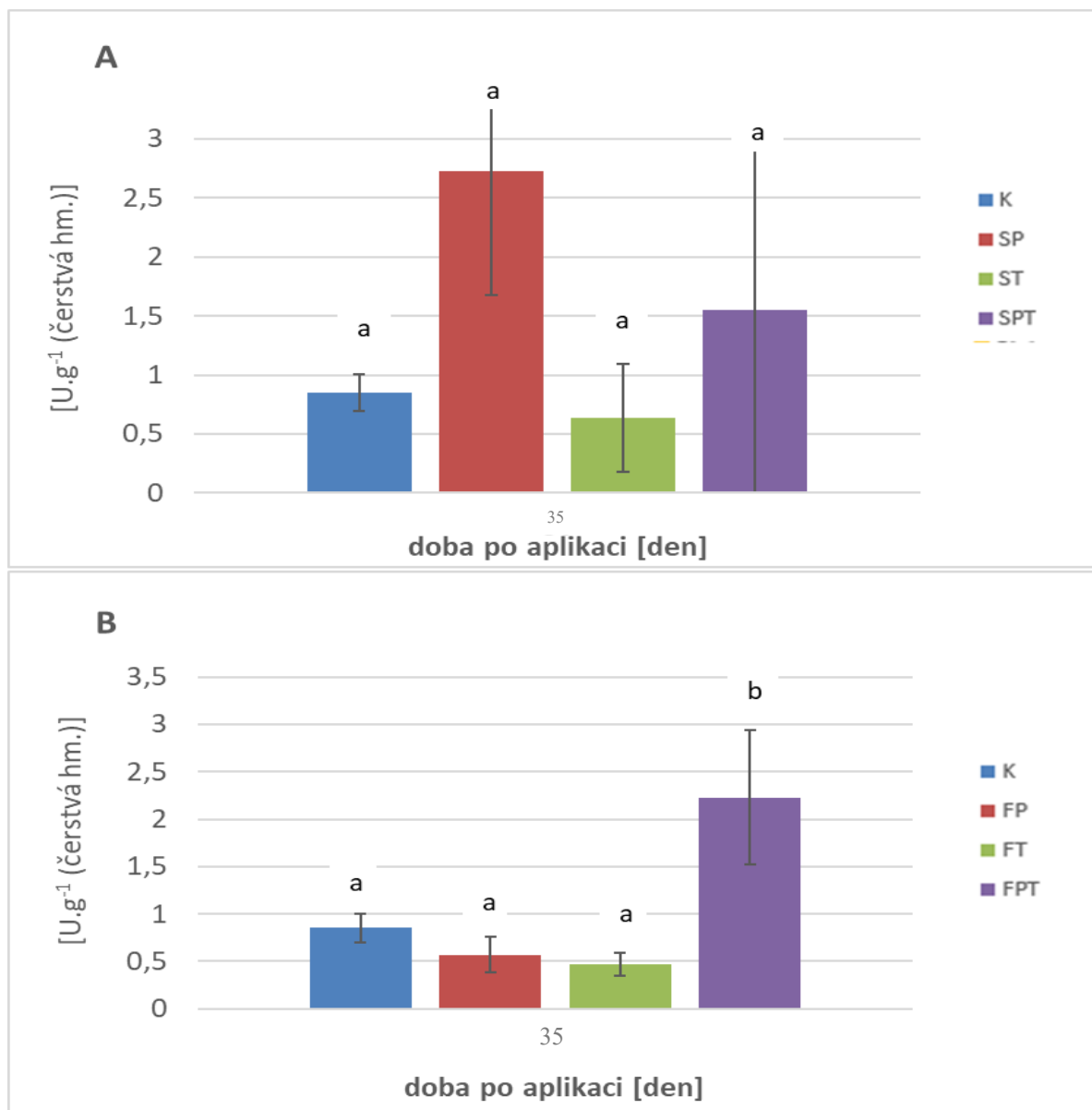
Na druhé straně aktivita šikimátdehydrogenasy byla snížena zejména aplikací fungicidů závlivkou do půdy, i když postřik fPT způsobil významné snížení (Obrázek 47, str. 73).



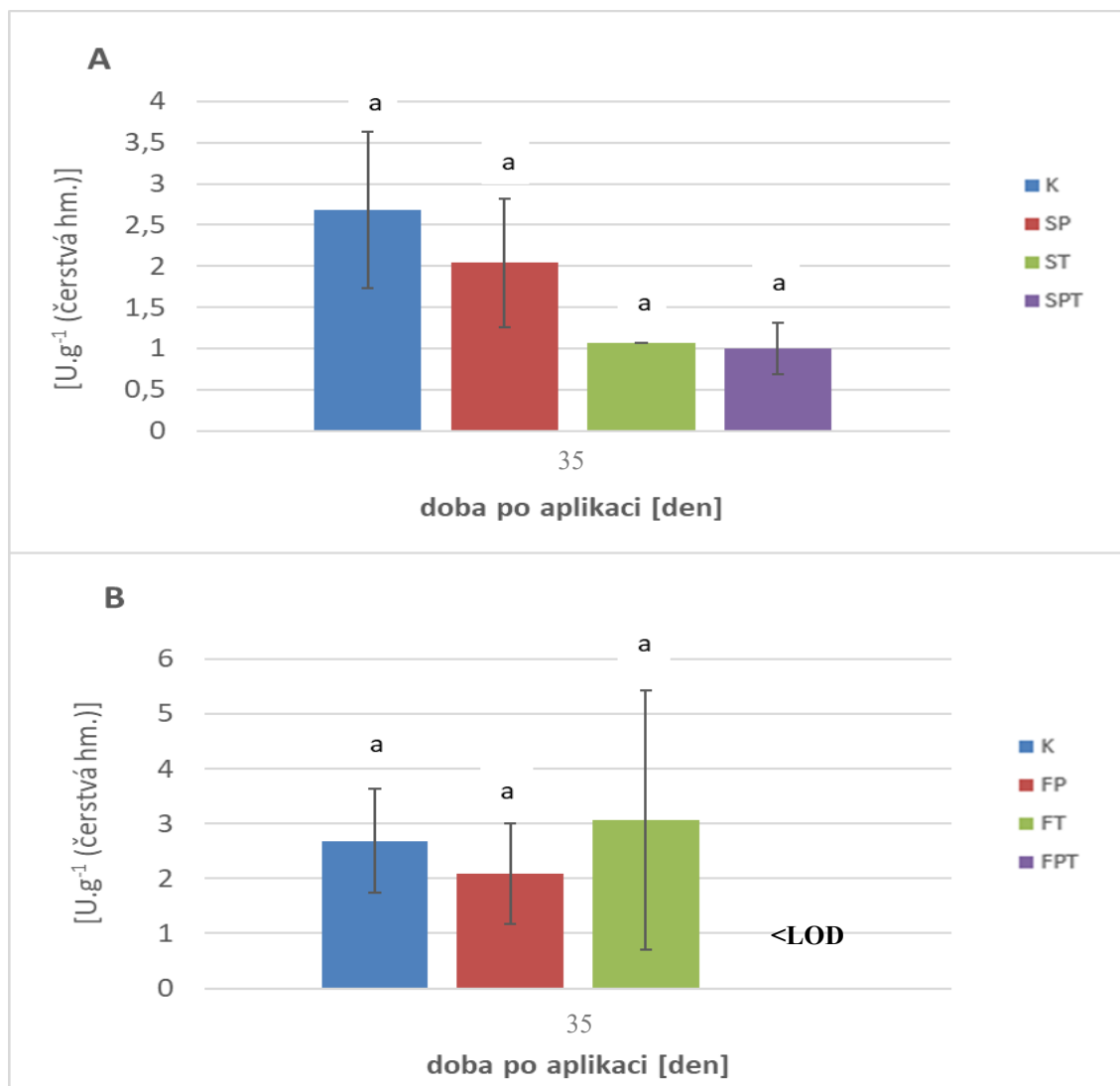
Obrázek 44 Aktivita NADP-malátdehydrogenasy-dekarboxylační v kořenech rostlin ošetřených fungicidy závlivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).



Obrázek 45 Aktivita NADP-isocitrátdehydrogenasy v kořenech rostlin ošetřených fungicidy závlivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).



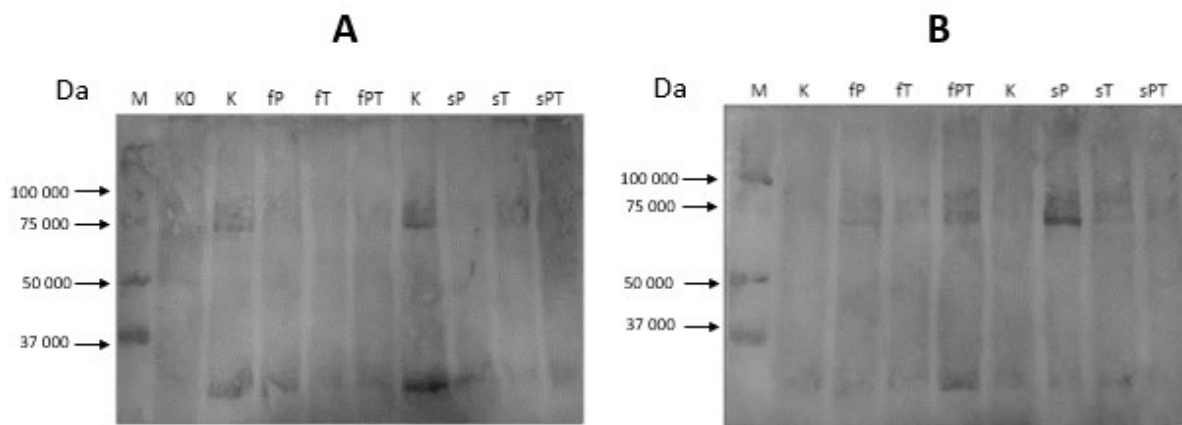
Obrázek 46 Aktivita glukosa-6-fosfátdehydrogenasy v kořenech rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy).



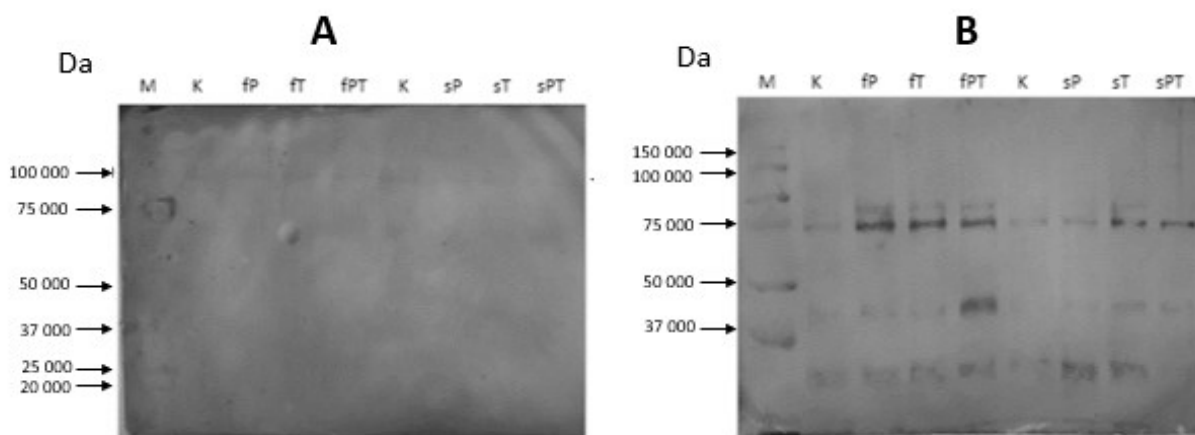
Obrázek 47 Aktivita šikimátdehydrogenasy v kořenech rostlin ošetřených fungicidy zálivkou do půdy (A) a postřikem na listy (B). Vzorky byly odebrány 35. den a byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Skupina fPT byla pod limitem detekce (<LOD).

4.2.4 Obsah HSP70

Po elektroforetické separaci proteinů v prostředí SDS v 10 % polyakrylamidovém gelu byl proveden elektropřenos na nitrocelulosovou membránu a pomocí protilátek byl stanoven obsah cytosolových proteinů HSP70 v listech, kořenech a plodech. Výsledky jsou zobrazeny na Obrázcích 48 a 49.



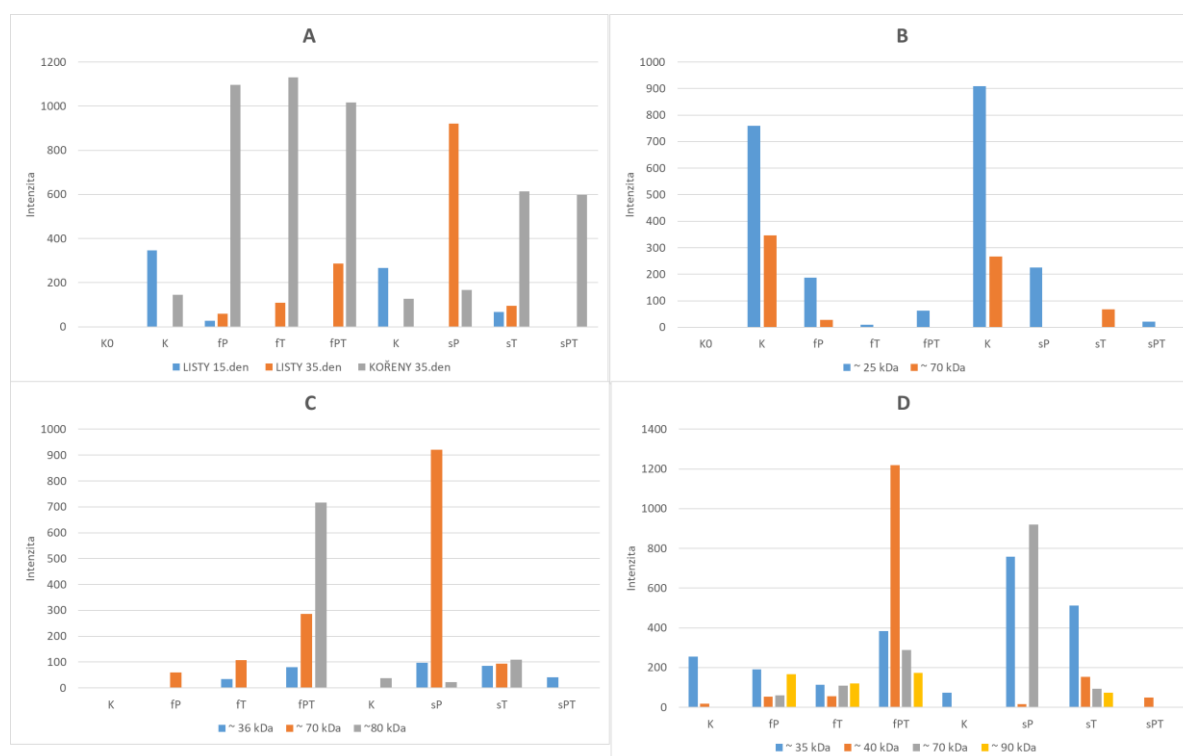
Obrázek 48 Detekce obsahu HSP70 po SDS elektroforéze v 10 % polyakrylamidovém gelu a přenesení na nitrocelulosovou membránu v listech rostlin vystavených fungicidům. Vzorky byly odebrané 15. (A) a 35.den (B) a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Vzorek K0 značí kontrolu odebranou ještě před ošetřením fungicidy a M značí proteinový standard - Kaleidoscope Bio-Rad.



Obrázek 49 Detekce obsahu HSP70 po SDS elektroforéze v 10 % polyakrylamidovém gelu a přenesení na nitrocelulosovou membránu v plodech (A) a kořenech (B) rostlin vystavených fungicidům. Vzorky byly odebrané 35.den a byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Vzorek M značí proteinový standard - Kaleidoscope Bio-Rad.

V listech byly detekovány majoritní isoformy HSP70 o velikosti ~75 kDa a je také přítomna nízkomolekulární isoforma o velikosti ~ 25 kDa. V listech je 35. den patrná zvýšená přítomnost isoformy HSP70 o velikosti ~75 kDa, zejména v případě skupiny ošetřené postřikem zejména fPT, a dále skupině ošetřené záhlvkou sP (Obrázek 48 a 50 C).

Z Obrázků 49 (str.74) a 50 D je patrné, že nejvíce proteinů HSP70 bylo detekováno v kořenech a nejméně v plodech. V případě kořenů byly nejintenzivnější proužky patrné ve skupinách fP, fT, fPT, a méně intenzivní ve skupinách sT a sPT s přibližnou molekulovou hmotností 75 kDa. Ve skupinách ošetřených postřikem je patrná další isoforma HSP70 o velikosti ~80 kDa. Výrazně se odlišovala skupina fPT přítomností isoformy o ~ 40 kDa, která má v této skupině výrazně vyšší intenzitu a v kontrolní skupině není zřetelná.



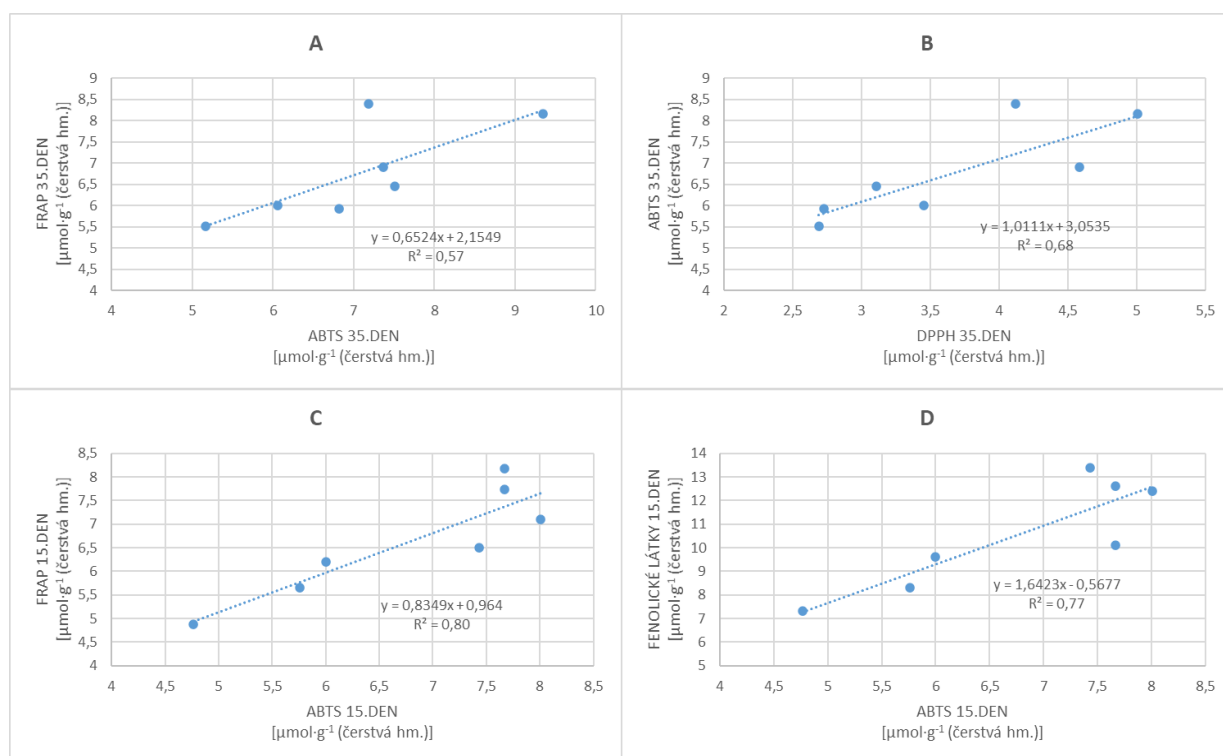
Obrázek 50 Závislost intenzity isoform HSP70 na jednotlivých skupinách (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Vzorek K0 značí kontrolu odebranou ještě před ošetřením fungicidy. Graf A ukazuje závislost intenzity isoformy s přibližnou molekulovou hmotností 70 kDa na listech a kořenech. Graf B ukazuje závislost intenzity proužků isoform 25 kDa a 70 kDa přítomných v listech odebraných 15. den. Graf C znázorňuje tuto závislost pro listy odebrané 35. den. Na grafu D jsou znázorněny isoformy u kořenů.

4.3 Korelační analýza

Z výsledných naměřených hodnot byla udělaná korelační analýza pro porovnání, jak moc mezi sebou jednotlivé metody stanovení antioxidační kapacity korelují. Výsledek je zobrazený na Obrázku 51.

Z korelační analýzy vyplývá, že nejvíce mezi sebou korelují v listech odebraných 15. den stanovení ABTS a FRAP ($R=0,80$) a ABTS a celkové fenolické látky ($R=0,77$) a dále ABTS a FRAP ($R=0,57$) a DPPH a ABTS ($R=0,68$) u listů odebraných 35. den.

Této korelace v antioxidační kapacitě se shodují s literaturou⁸¹. Podle této literatury spolu taktéž korelují DPPH s ABTS a ABTS s FRAP. DPPH a ABTS měly přitom korelační koeficient 0,95 a ABTS s FRAP 0,92.



Obrázek 51 Korelační závislost jednotlivých metod stanovení antioxidační kapacity v listech rostlin rajčat ošetřených fungicidy. Na grafu A je znázorněná závislost ABTS s FRAP v listech odebraných 35.den. Na grafu B je znázorněná závislost DPPH a ABTS, taktéž v listech odebraných 35. den. Grafy C a D představují korelaci ABTS s FRAP (Graf C) a celkovými fenolickými látkami (Graf D) v listech odebraných 15. den.

5 Diskuse

V poslední době je kromě účinku fungicidů na patogenní houby a plísně sledován také jejich vliv na necílové organismy. U triazolových fungicidů, penkonazolu (P) a tebukonazolu (T) je známa celá řada jejich negativních účinků na člověka včetně toho, že působí jako endokrinní a metabolické disruptory, mohou být hepatotoxické a teratogenní^{9,11,12,13,14}. Bylo zjištěno, že obě chemikálie se kromě do moči dostávají do lidských vlasů. Toho se může využít k neinvazivnímu stanovení P a T při posouzení zdravotních rizik např. u pracovníků aplikujících chemické postřiky⁹⁴. Masivním používáním se P a T staly kontaminanty životního prostředí^{11,19,20,22,27}.

O tom, jaký vliv mají triazoly na samotné rostliny, na které jsou aplikovány, je k dispozici informací méně. Je zřejmé, že působení fungicidů jako chemických abiotických stresových faktorů indukuje v rostlinách produkci ROS^{35,36,37,38}. V některých případech takové oxidační vzplanutí zprostředkované NADPH-oxidasou plazmatické membrány iniciuje tzv. priming, neboli metabolické změny vedoucí k syntéze látek zvyšujících odolnost rostliny, v jiných rostlinách však může představovat silný oxidační stres, vedoucí ke značnému energetickému vyčerpání rostliny⁹⁵. Podobně jako v klinické biochemii existuje řada diagnostických markerů také u rostlin můžeme stav rostliny posuzovat na základě morfologických, fyziologických, biochemických a molekulárních diagnostických markerů. Mezi morfologické markery patří např. vzhled nadzemních částí a kořenů, množství biomasy a zřetelná předčasná senescence. Na molekulární úrovni jsou pak studovány geny a transkripční faktory odpovídající za zvýšenou expresi enzymů antioxidačního a detoxifikačního systému⁹⁶.

Fyziologické a biochemické markery se soustředí na účinnost fotosyntézy, obsah chlorofylů, aktivitu antioxidačních enzymů, aktivitu enzymů detoxifikujících fungicidy, na hormonální změny, účinnost různých transportérů ukládajících xenobiotika do apoplastu nebo vakuoly a obsah různých látek včetně antioxidačních, fenolických, ROS a HSP proteinů⁹⁶. Vzhledem k tomu, že chemické fungicidní prostředky ochrany rostlin se často ve snaze zvýšit jejich účinek používají také v kombinaci, je pozornost také věnována možnému synergickému účinku působení.

Životní prostředí je neustále vystaveno různým kombinacím polutantů, xenobiotik a prvků, které se mohou vzájemně ovlivňovat s neznámým dopadem. Například aplikace triazolových fungicidů v půdě významně ovlivnila biologickou dostupnost Fe, Cu a Zn

pro rostliny *Solanum lycopersicum* L.^{78,79}. Triazoly cyprokonazol a tebukonazol jsou schopny vázat dvojmocné kationty kovů, mají silnou tendenci vytvářet stabilní komplexy, čímž následně dochází ke změně jejich reaktivity^{78,79,97}. V přítomnosti kationtů mědi byly navíc pozorovány tzv. koktejlové interakce mezi triazoly cyprokonazolem, penkonazolem, tebukonazolem a mědí, kdy dochází tvorbě nebezpečných meziproduktů⁹⁷.

V této práci byl sledován vliv oxidačního stresu působeného penkonazolem, tebukonazolem nebo jejich kombinací na antioxidační systém necílových organismů v podobě ošetřených rostlin rajčat, *Solanum lycopersicum* L., cv. Cherrola. Z předchozí práce se ukázalo, že v tomto experimentálním uspořádání při aplikaci fungicidů formou postřiku se statisticky významně snižovalo množství zelené biomasy a chlorofylů, a naopak se přechodně zvyšovala tvorba plodů v ošetřených rostlinách oproti kontrolním, tedy neošetřených^{78,79}. V této diplomové práci byl experimentální design ještě rozšířen o aplikaci P a T přímo do půdy formou záливky, u které se předpokládá ještě silnější oxidační stres díky transportu xenobiotik kořeny.

Morfologicky nebyl pozorován žádný rozdíl mezi rostlinami ošetřenými fungicidy oběma formami aplikace ani v porovnání s kontrolními rostlinami (Obrázek 7, str. 28).

Nejprve byly hledány rozdíly v isoenzymovém složení SOD a peroxidasy po nativní elektroforéze u všech sledovaných skupin aplikace fungicidů jak do půdy (sP, sT, sPT), tak formou postřiku (fP, fT, fPT). Fergussonovou metodou využívající závislosti relativní pohyblivosti široké škály standardních proteinů na různých koncentracích polyakrylamidového gelu byly zjištěny přibližné relativní molekulové hmotnosti SOD v listech, plodech a kořenech, které shrnuje následující Tabulka 3 (str. 79).

Tabulka 3 Souhrnná tabulka izoenzymového složení antioxidačních enzymů v odpovědi na stres působený fungicidy.

Enzym	Část rostliny	Přibližná mol. hm. (kDa) detekovaných isoform	Ovlivnitelnost triazoly	Přibližná mol. hm. isoform ovlivněných triazoly	Efekt
SOD	list	60 63 70	ANO	↑60 ↑63 ↑70	Efekt pozorovaný pouze 35.den experimentu
SOD	kořen	70	ANO	↑70	Zvýšení působením fungicidů
SOD	plod	60 63 68 70	ANO	↑60 ↑63 ↑68 ↑70	Zvýšení působením fungicidů
POX	listy	30 50 70 96 200 240	ANO	↑30 ↑ 50 ↑70 ↑96 ↑200 ↑240	Zvýšení aktivity pouze 15. den, naopak pokles u skupin sP a sPT 35. den
POX	kořen	50 70 96	ANO	↑50 ↑70 ↑ 96	Pouze u skupin sP a sT
POX	plod	50	ANO	↑ 50	Zvýšení působením fungicidů
APOD	list	60 120 450	ANO	↑ 60 ↑120 ↑450	Pouze u skupin s fungicidy aplikovanými do půdy, 15. den zvýšení, 35. den snížení
APOD	kořen	60	NE	/	/
APOD	plod	60	NE	/	/

Především 35. den každotýdenní aplikace fungicidů byla v listech rostlin fPT a sP pozorovaná snížená intenzita proužků odpovídající aktivitě SOD (Obrázek 41, str. 67, Tab. 3), což naznačuje sníženou schopnost eliminovat škodlivý superoxidový radikál. Zatímco v kořenech byla pozorována pouze 1 isoforma o relativní molekulové hmotnosti

přibližně 70 000, což souhlasí s již publikovanou⁵², v plodech byly nalezeny isoformy 4 (Obrázek 42, str.67), u rostlin sP a kontrolních rostlin pouze isoformy 3. To naznačuje možnou indukovatelnost isoformy SOD v plodech v odpovědi na stres způsobený fungicidy. Celkové peroxidasy vykazovaly po nativní elektroforéze nejvyšší zastoupení isoform (nejméně 7 isoform) v listech a kořenech (Obrázek 29 a 30, str. 55). Zatímco v kořenech měly majoritní isoformy peroxidas ~96 000 a ~70 000, jejíž intenzita se zvyšovala v rostlinách sT a sP, v plodech byla nejvíce zastoupená ~50 000 isoforma peroxidasy se srovnatelnou aktivitou ve všech vzorcích (Obrázek 30 A, str. 55).

Peroxidasy detoxifikují peroxidy (obvykle především H_2O_2) za současné oxidace organických a anorganických substrátů. V ohledu oxidace rozmanitých substrátů jsou peroxidasy velice všestranné, mohou katalyzovat oxidaci odlišných struktur např. fenolů, aromatických aminů a polycyklických aromatických uhlovodíků. Peroxidasy by také mohly oxidovat přímo P a T za vzniku toxičtější metabolitů, zda je tomu tak a o které metabolity se jedná, bude předmětem dalšího výzkumu.

Peroxidasy se podílejí na zesíťování ligninu a suberinu, čímž posilují buněčné stěny, což může být důležité v obraně před plísňovými patogeny často atakujícími rostlinné buněčné stěny prostřednictvím celulas^{98,99} Kromě toho bylo zjištěno, že peroxidasy degradují mykotoxiny produkované patogenními houbami¹⁰⁰.

Pro stanovení aktivity peroxidas se využívá také celá řada umělých substrátů poskytujících kolorimetrické produkty. V této práci byl pro stanovení celkových peroxidas využit DAB a radikál ABTS. Stanovením využívajícím DAB byla zvlášť stanovována aktivita rozpustných (cytosolových) peroxidas (Obrázek 23-25, str.49-51) a peroxidas membránově vázaných (Obrázek 26-28, str.52-54). Stanovení membránově vázaných peroxidas je zajímavé z hlediska výběru vhodných fytoimediačních rostlin, protože membránově vázané peroxidasy mohou způsobit lignifikaci xylémových cév a redukovat tak příjem xenobiotika prostřednictvím fyzikální bariéry před intoxikací^{101,102}. Zatímco v listech všech skupin rostlin byla aktivita celkových rozpustných peroxidas na stejné úrovni (Obrázek 23, str. 49, Obrázek 52, str.82), v případě membránových peroxidas došlo k významnému zvýšení 15. den po první aplikaci fungicidu oproti 0. a 35. dnu, avšak i v kontrolních rostlinách, pravděpodobně v odpovědi na nějaký stresový podnět okolního prostředí.

V kořenech 35. den nebyly oproti kontrole nalezeny rozdíly v aktivitě ani celkových, ani membránově vázaných peroxidas, jak v případě aplikace postřiku, tak zalitím do půdy, což naznačuje, že rajče nezvyšuje lignifikaci xylémových cév, aby zabránilo vstupu P a T do rostliny. Předpokládá se, že s výjimkou několika látek se strukturou obdobnou hormonům, které mohou být přijímány aktivním transportem, probíhá příjem xenobiotik do rostliny především pasivní difuzí a další pohyb v rostlině je řízen transpiračním procesem¹⁰³.

Stanovení peroxidas umožňuje stanovit také jednotlivé isoformy s využitím daného specifického substrátu, v této práci byl sledován klíčový enzym askorbát-glutathionového cyklu askorbátperoxidasa a guajakolperoxidasa. Nebyl pozorován vliv triazolů na aktivitu askorbátperoxidasy v kořenech a plodech, v listech pouze 35. den vlivem P ve formě postřiku na listy (skupina fP) (Obrázek 31-33, str. 57-59, Obrázek 53-54, str. 82). Nativní elektroforézou byla 15. den pozorována vyšší aktivita ~60 000 isoformy APOD v rostlinách ošetřených fungicidy než v listech kontrolních rostlin (Obrázek 34, str. 60), zatímco 35. den byl zaznamenán pokles této isoformy APOD sP.

Dále byla sledována aktivita guajakolperoxidasy (Obrázek 36-38, str. 62-64) stanovením, ve kterém je guajakol oxidován na tetraguajakol, látku oranžové až načervenalé barvy v závislosti na aktivitě peroxidasy¹⁰⁰. Guajakol (2-methoxyfenol) je popisovaný jako látka s kouřovým nebo lékařským aroma nacházející se v mnoha zpracovaných potravinářských výrobcích jako je víno, pražená káva, kakao, čaj a různá potravinářská aditiva. Běžně se v čerstvém ovoci nenachází, ale u plodů rajčat je jednou z látek nejvíce ovlivňujících chuť rajčete¹⁰⁴. Genetické inženýrství se snaží o snížení syntézy guajakolu, neboť lékařská chuť většinou lidem není příjemná.

Vlivem postřiku P, T i PT na listy byla statisticky významně zvýšená aktivita guajakolperoxidasy v kořenech (Obrázek 37 B, str.63, Obrázek 53, str. 82), v plodech byla naopak pod limitem detekce vlivem sP a fPT (Obrázek 38, str. 64, Obrázek 54, str. 82). V listech aktivita kopírovala nevýrazné změny celkových peroxidas. Odběrové dny následovaly vždy týden po aplikaci fungicidů, což bylo pro zachycení změn antioxidačního systému nejspíše už pozdě, změny v indukci ROS se odehrávají v řádu sekund až minut a aktivace antioxidačního systému v řádu minut až hodin¹⁰⁵. Je možné, že po týdnu už se rostlina nacházela v regenerační fázi působení stresu, kdy je již opět v antioxidačním systému nastolená homeostáze¹⁰⁶.

	APOD	guajakolperoxidasa	ABTS POX	cytosolové POX	membránové POX	KAT
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
K15	100	100	100	100	100	100
sP15	95	87	116	98	106	114
sT15	99	49	124	117	120	39
sPT15	127	105	118	104	79	72
fP15	98	35	162	114	120	41
fT15	114	111	117	70	88	33
fPT15	127	151	133	67	53	49
K30	100	100	100	100	100	100
sP30	68	169	180	125	63	61
sT30	119	108	139	83	419	60
sPT30	100	54	150	80	321	72
fP30	159	188	264	80	87	90
fT30	78	54	146	61	42	44
fPT30	131	38	239	52	21	50

Obrázek 52 Procentuální porovnání aktivit enzymů v listech jednotlivých skupin ošetřených zálivkou do půdy (s) a postřikem na listy (f) 15. a 35. den vůči příslušné kontrolní skupině (100 %). Vzorky byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Hvězdička značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti menší než 0,05 od ostatních skupin. APOD značí askorbátperoxidasu, POX peroxidasy a KAT katalasu.

	APOD	guajakolPOX	abts POX	cyt. POX	membr. POX	NADP-ME	NADP-ICDH	G6PDH	SDH
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
K30	100	100	100	100	100	100	100	100	100
sP30	88	155	121	134	86	88	392	320	76
sT30	102	287	125	145	142	57	272	75	40
sPT30	117	125	119	90	54	27	457	182	37
fP30	137	296	150	138	130	48	433	67	78
fT30	139	280	117	149	120	44	598	55	114
fPT30	99	192	98	124	108	36	327	261*	-

Obrázek 53 Procentuální porovnání aktivit enzymů v kořenech jednotlivých skupin ošetřených zálivkou do půdy (s) a postřikem na listy (f) vůči příslušné kontrolní skupině (100 %). Vzorky byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Hvězdička značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti menší než 0,05 od ostatních skupin. APOD, askorbátperoxidasa; G6PDH, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa; POX, peroxidasy; NADP-ICDH, NADP-isocitrátdehydrogenasa; NADP-ME, NADP-malátdehydrogenasa-dekarboxylační; SDH, šikimátdehydrogenasa.

	APOD	guajakolperoxidasa	cytosolové POX	membránové POX
	[%]	[%]	[%]	[%]
K30	100	100	100	100
sP30	100	-	200	81
sT30	46	88	143	59
sPT30	84	81	161	163
fP30	85	44	209	81
fT30	84	88	122	85
fPT30	103	-	135	78

Obrázek 54 Procentuální porovnání aktivit enzymů v plodech jednotlivých skupin ošetřených zálivkou do půdy (s) a postřikem na listy (f) vůči příslušné kontrolní skupině (100 %). Vzorky byly rozděleny do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). APOD značí askorbátperoxidasu, POX peroxidasy a KAT katalasu.

Stanovení antioxidačních enzymů muselo být provedeno okamžitě po extrakci a s extrakčním pufrem obsahujícím askorbát a PVP přesto byl především v listech pozorován kontaminující vliv pravděpodobně sekundárních metabolitů znemožňující stanovit aktivitu mnoha enzymů: NADP-dependentních enzymů (G6PDH, SDH, NADP-ICDH, NADP-ME) a katalasy v kontrolních rostlinách (Obrázek 43, str. 68). Aktivita NADP-dependentních enzymů byla stanovená v kořenech, v případě NADP-ME byla ve většině ošetřených skupin spíše snižena, v případě NADP-ICDH spíše zvýšená (Obrázek 44-47, str. 70-73, Obrázek 53, str.82). G6PDH závisí na regulaci ferredoxin-thioredoxinovým systémem¹⁰⁷. SDH může být fenypropanoidními sloučeninami inhibována přímo, jak bylo v naší laboratoři zjištěno pro SDH z kořenu petržele⁹¹. V korelaci aktivity SDH v extraktech rostlin s obsahem fenolických látek bylo zjištěno, že se zvyšujícím se množstvím fenolických látek, klesá aktivita SDH⁹¹. Je možné, že čím více rostlina obsahuje fenolických látek, tím více dochází při přípravě extraktů k tomu, že na vzduchu jsou fenolické látky oxidovány a tvoří se hnědé komplexy s proteiny, inhibující jejich aktivitu¹⁰⁸.

Rostliny rajčat obsahují fenypropanoidní sloučeniny v poměrně vysokém obsahu, což dokazuje stanovení fenolických látek, flavonoidů i antioxidační kapacity (Obrázek 18-22, str. 44-48). Na druhou stranu je obsah fenolických látek v listech rajčat nižší než v bylinách a ovocných šťávách^{109,110}. Rajčatová šťáva plodů je v obsahu fenolických látek srovnatelná se šťávou z mrkve, dýně, cukety a listového salátu¹¹⁰. Chuť plodům rajčat dodávají především cukry, organické kyseliny a 30 odlišných těkavých látek¹⁰⁴. Hlavním pigmentem odpovídajícím za červenou barvu zralých rajčatových plodů je karotenoid lykopen, obsažený až v 80 %, plody ale také obsahují důležité flavonoly jako je kvercetin a kaempferol, odpovědné za vysokou antioxidační kapacitu hodnotnou pro výživu člověka¹¹¹.

Vlivem triazolů 15. den experimentu obsah fenolických látek mírně poklesl, ale 35. den se oproti kontrolám zvyšoval u všech skupin ošetřených rajčat, nejvíce sPT, sP, fP a mírně sT, fT, fPT (Obrázek 22, str. 48, Obrázek 55, str. 84). Obsah fenolických látek koreloval s antioxidační kapacitou stanovenou metodou ABTS (Obrázek 51 D, str. 76).

	DPPH	ABTS	FRAP	fenolické látky	flavonoidy	
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	
K15	100	100	100	100	100	
sP15	80	103	126	94	150	
sT15	118	103	119	75	98	
sPT15	61	81	95	72	77	
fP15	73	77,5	87	62	117	141-160%
fT15	68	64	75	54	67	121-140%
fPT15	100	108	109	93	159	80-120%
K30	100	100	100	100	100	
sP30	145*	154*	136	151	151	
sT30	78	85	92	113	121	
sPT30	133	122	115	155	137	
fP30	79	112	99	127	137	
fT30	90	124	107	111	107	
fPT30	119	119	140*	113	99	40-59%

Obrázek 55 Procentuální porovnání antioxidační kapacity a koncentrace fenolických látek a flavonoidů v listech jednotlivých skupin ošetřených závlivkou do půdy (s) a postřikem na listy (f) 15. a 35. den vůči patřičné kontrolní skupině (100 %). Vzorky byly rozdělené do 7 skupin podle typu a způsobu aplikace fungicidů (K=kontrola, neošetřený vzorek, sP=aplikace penkonazolu do půdy, sT=aplikace tebukonazolu do půdy, sPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu do půdy, fP=aplikace penkonazolu na listy, fT=aplikace tebukonazolu na listy, fPT=aplikace penkonazolu a tebukonazolu na listy). Hvězdička značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti menší než 0,05 od ostatních skupin.

Na závěr byly detekovány změny v množství HSP70 proteinů, molekulárních chaperonů, které v přítomnosti stresu mohou napomáhat sbalovat a skládat do podjednotek nově syntetizované nebo poškozené proteiny, nebo v případně nevratného poškození je směřovat k degradaci⁸⁶. Není známo, do jaké míry triazoly poškozují proteiny. V kořenech byl zjištěn nejvyšší obsah HSP70 v rostlinách vystavených fungicidům ve formě postřiku, vyšší obsah byl zjištěn rovněž aplikací do půdy (Obrázek 49 B a 50 A, str. 74 a 75). To je další důkaz, že v rostlinách vystaveným fungicidům jsou aktivovány obranné mechanismy.

6 Závěr

1. Byly nalezeny isoformy superoxiddimustasy (SOD), celkových peroxidas a askorbátperoxidasy (APOD), které byly ovlivněné penkonazolem, tebukonazolem nebo jejich kombinací, a to jak formou postřiku na listy, tak zálivkou do půdy. Konkrétně se jedná o zvýšenou aktivitu 3 isoform SOD v listech (~60, 63, a 70 kDa), 1 isoformy SOD v kořenech, 4 isoform v plodech (~60, 63, 68 a 70 kDa) a částečně mírně zvýšenou aktivitu ~60 000 APOD v listech odebraných 35. den, kromě sP a fPT. Studované triazoly zvýšily aktivitu ~70 000 isoformy peroxidas v listech po dvou aplikacích, zatímco po 5 aplikacích došlo v některých skupinách ke snížení.
2. Antioxidační systém rostlin rajčat nebyl významně ovlivněn studovanými fungicidy, podobně jako aktivita klíčového enzymu askorbát-glutathionového cyklu APOD a cytosolových peroxidas. Největší změny v antioxidační kapacitě v listech korelující se zvýšeným obsahem fenolických látek a flavonoidů byly zaznamenány po pěti aplikacích penkonazolu formou zálivky do půdy (sP), a to jak samotného, tak v kombinaci ve formě sPT.
3. V kořenech byla nalezena mírně zvýšená aktivita guajakolperoxidasy vlivem postřiku tebukonazolem i kombinace penkonazolu a tebukonazolu, v listech byla aktivita tohoto enzymu snížena podobně jako katalasa.
4. Aplikace fungicidů formou postřiku zvyšovala přítomnost isoform HSP70 (především ~75 kDa) více než aplikace zálivkou. Oba fungicidy aplikované postřikem pak výrazně více indukovaly ~75 kDa isoformu HSP70.

Seznam literatury

1. Gadhave P.P., Dighe N.S., Pattan S.R., Deotarse P., Musmade D.S., Shete R.V.: (2010). Current biological and synthetic profile of triazoles: A review. Scholars Research Library. *Ann. Biol. Res.* **1**:82-9
2. Sahu J.K., Ganguly S., Kaushik A.: (2013). Triazoles: A valuable insight into recent developments and biological activities. *Chin. J. Nat. Med.* **11**:456-65
3. Aneja B., Azam M., Alam S., Perwez A., Maguire R., Yadava U.: (2018). Natural product-based 1,2,3-triazole/sulfonate analogues as potential chemotherapeutic agents for bacterial infections. *ACS Omega.* **3**:6912–30.
4. Shafiei M., Peyton L., Hashemzadeh M., Foroumadi A.: (2020). History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorg. Chem.* **104**:104240
5. Farooq T.: (2020). *Advances in Triazole Chemistry*. Elsevier. str. 21–7. ISBN:9780128171141
6. Woolley D. W.: (1944). Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. *J. Biol. Chem.* **152**:225–32
7. Zonios D., Bennet J.: (2008). Update on azole antifungals. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **29**:198–210
8. Toda M., Beer K.D., Kuivila K.M., Chiller T.M., Jackson B.R.: (2021). Trends in agricultural triazole fungicide use in the United States, 1992–2016 and possible implications for antifungal-resistant fungi in human disease. *Environ. Health Perspect.* **129**:5
9. Jorgensen L.N., Heick T.M.: (2021). Azole use in agriculture, horticulture, and wood preservation – is it indispensable? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**:730297
10. Bastos R.W., Rossato L., Goldman G.H., Santos D.A.: (2021). Fungicide effects on human fungal pathogens: cross-resistance to medical drugs and beyond. *PLoS Pathog.* **17**:1010073

11. Menegola E., Broccia M.L., Renzo F., Giavini E.: (2001). Antifungal triazoles induce malformations *in vitro*. *Reprod. Toxicol.* **15**:421-7
12. Albrecht W.: (2019). Highlight report: hepatotoxicity of triazole fungicides. *Arch. Toxicol.* **93**:3037-8
13. Rieke S., Koehn S., Hirsch-Ernst K., Pfeil R., Kneuer C., Marx-Stoelting P.: (2014). Combination effects of (tri)azole fungicides on hormone production and xenobiotic metabolism in a human placental cell line. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **11**:9660-79
14. Mueller D.: (2006). *Fungicides: triazoles. integrated crop management*. Dostupné z URL: <<https://dr.lib.iastate.edu/server/api/core/bitstreams/6fa6d9e8-4137-4655-8b92-32fca38b4836/content>> [cit. 15.06.2022]
15. Holý O., Alsonosi A., Hochel I., Roderová M.: (2019). Antibiotic susceptibility of *Cronobacter spp.* isolated from clinical samples. *Pol. J. Microbiol.* **68**:5-14
16. Song J.L., Harry J.B., Eastman R.T., Oliver B.G., White T.C.: (2004). The *Candida albicans* lanosterol 14- α -demethylase (ERG11) gene promoter is maximally induced after prolonged growth with antifungal drugs. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **48**:1136-44
17. White T.C., Marr K.A., Bowden R.A.: (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:382-402
18. Caldas E.D.: (2020). *Tebuconazole (189)*. Dostupné z URL: <<https://fddocuments.in/document/tebuconazole-189-tebuconazole-is-a-broad-spectrum-triazole-fungicide-used-as-a.html?page=1>> [cit. 25.07.2022]
19. Caldas E.D.: (2020). *Tebuconazole toxicology*. Dostupné z URL: <https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report10/Tebuconazole.pdf> [cit. 25.07.2022]
20. Albuquerque N.C.P., Carrão D.B., Habenschus M.D., Oliveira A.R.M.: (2018). Metabolism studies of chiral pesticides: A critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **147**:89-109

21. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. (2004). *PubChem Compound Summary for CID 86102. Tebuconazole*. Dostupné z URL: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/86102#section=2D-Structure>> [cit. 26.07.2022]
22. Freitas R.M.P., Linhares B.S., Oliveira J.M., Leite J.P.V., da Matta S.L.P., Gonçalves R.V., Freitas M.B.: (2021). Tebuconazole-induced toxicity and the protective effect of *Ficus carica* extract in Neotropical fruit-eating bats. *Chemosphere*. **275**:129985.
23. Shafique F., Naureen U., Zikrea A., Ali Q.: Antibacterial and antifungal activity of *Ficus carica* Plant Extract. *J. Pharm. Res. Int.* **33**:1-9
24. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. (2004). *PubChem Compound Summary for CID 91693, Penconazole*. Dostupné z URL: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penconazole#section=2D-Structure>> [cit. 26.07.2022]
25. Vermeulen-Koten J.E.M., Tonkelaar E.M.: (1992). Penconazole In: *Pesticide residues in food: evaluations*. World Health Organisation. ISBN: 9241665084
26. Brancato A., Brocca D., Cabrera L.C., et. al.: (2018). Peer review of the pesticide risk assessment for the triazole derivative metabolites in light of confirmatory data submitted. *EFSA J.* **16**:05376
27. Uçkun A.A., Öz Ö.B.: (2020). Acute exposure to the fungicide penconazole affects some biochemical parameters in the crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **27**:35626–37
28. Chaki M., Begara-Morales J.C., Barroso J.B.: (2020). Oxidative stress in plants. *Antioxidants*. **9**:481
29. Bartosz G.: (1997). Oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* **19**:47-64
30. Ren J.Y., Wu X., Yang G., Wang J., Li T., Ding J., Cai L., Su D.: (2013). Oxidative stress-mediated signaling pathways: A review. *J. Food Agric. Environ.* **11**:132-9
31. Bhattacharjee S.: (2019). *ROS and Oxidative Stress: Origin and implication. reactive oxygen species in plant biology*. Springer. str. 1-31. ISBN: 9788132239413

32. Mohammadi M.A., Cheng Y., Aslam M., Jakada B.H., Wai M.H., et. al.: (2021). ROS and oxidative response systems in plants under biotic and abiotic stresses: Revisiting the crucial role of phosphite triggered plants defense response. *Front. Microbiol.* **12**:631318
33. Demidchik V.: (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.* **109**:212-28
34. Mittler R.: (2017). ROS are good. *Trends Plant Sci.* **22**:11-9
35. Jameel D.A.: (2021). Effect of fungicides on enzymatic activity and oxidative stress index for three species of *Brassicaceae* plants. *Earth Environ. Sci.* **790**:12015
36. Shahid M., Ahmed B., Zaidi A., Khan M.S.: (2018). Toxicity of fungicides to *Pisum sativum*: a study of oxidative damage, growth suppression, cellular death and morpho-anatomical changes. *RSC Adv.* **8**:38483-98
37. Wu Y.X., Tiedemann A.: (2002). Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environ. Pollut.* **116**:37-47
38. Liu R., Li J., Zhang L., Feng T., et. al.: (2021). Fungicide difenoconazole unduced biochemical and developmental toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plants.* **10**:2304
39. Arora A., Sairam R.K., Srivastava G.C.: (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* **82**:1227–38.
40. Moricová P.: (2011). Vliv nanočástic stříbra na proces regenerace protoplastů. Diplomová práce. Univerzita Palackého, Olomouc
41. Rybníčková E.: (2012). Identifikace askorbát peroxidasy podílející se na detoxifikaci aktivních forem kyslíku v rámci obranné reakce. Diplomová práce. Masarykova Univerzita, Brno
42. Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Anee T.I., Parvin K., Nahar K., Mahmud J.A., Fujita M.: (2019). Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants (Basel).* **8**:384
43. Pandey P., Singh J., Achary V.M.M., Reddy M.K.: (2015). Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway. *Fron. Environ. Sci.* **3**:25

44. Pang C.H., Wang B.S.: (2010). Role of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in ascorbate-glutathione cycle and stress tolerance in plants. In: Anjum N., Chan M.T., Umar S. (eds) *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. Springer. str. 91-113. ISBN: 9789048194049
45. Latowski D., Surówka E., Strzałka K.: (2010). Regulatory role of components of ascorbate–glutathione pathway in plant stress tolerance. In: Anjum N., Chan M.T., Umar S. (eds) *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. Springer. str. 1-53. ISBN: 9789048194049
46. Smirnoff N.: (1996). Botanical briefing: The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* **78**:661-9
47. Hasanuzzaman M., Nahar K., Anee T.I., Fujita M.: (2017). Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. **23**:249-68
48. Caverzan A., Passaia G., Rosa S.B., Ribeiro C.W., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M.: (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet. Mol. Biol.* **35**:1011-9
49. Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K.: (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* **53**:1305–19
50. Najami N., Janda T., Barriah W., Kayam G., Tal M., Guy M., Volokita M.: (2008). Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization. *Mol. Genet. Genomics*. **279**:171-82
51. Miao L., Clair D.K.: (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic. Biol. Med.* **47**:344-56
52. Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S.: (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* **53**:1331-41
53. Rejeb I.B., Lenne C., Leblanc N., Julien J.L., Ammar S., Bouzid S., Ayadi A.: (2004). Iron-superoxide dismutase and monodehydroascorbate reductase transcripts accumulate in response to internode rubbing in tomato. *C. R. Biol.* **327**:679-86.
54. Scandalios J.G.: (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* **101**:7-12

55. Miller A.F.: (2012). Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters*. **586**:585-95
56. Galaleldeen A., Taylor A.B., Thomas S.T., Harrt P.J.: (2010). *Zinc-reconstituted tomato chloroplast superoxide dismutase*. PDB:3KM1 Dostupné z URL: <<https://www.rcsb.org/structure/3KM1>> [cit.27.06.2022]
57. Pandey V.P., Awasthi M., Singh S., Tiwari S., Dwivedi U.N.: (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem. Anal. Biochem*. **6**:1
58. Vicuna D.: (2005). The role of peroxidases in the development of plants and their responses to abiotic stresses. Dizertační práce. Technological University, Dublin
59. Sulanová L.: (2010). Stanovení aktivit peroxidas a jejich porovnání u různých helmintů. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Hradec Králové
60. Horníčková J.: (2022). Zapojení enzymů a metabolitů fenylpropanoidní dráhy v reakci hrachu setého na salinitní stres. Bakalářská práce. Univerzita Palackého, Olomouc
61. Gangwar S., Singh V.P., Tripathi D.K., Chauhan D.K., Prasad S.M., Maurya J.N.: (2014). Chapter 10 - Plant responses to metal stress: The emerging role of plant growth hormones in toxicity Alleviation In: Ahmad P., Rasool S., *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. Academic Press. str. 215-48. ISBN: 9780128008751
62. Nandi A., Yan L.J., Jana Ch.K., Das N.: (2019). Role of catalase in oxidative stress and age associated degenerative diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev*. **2019**:9613090
63. Drory A., Woodson W.R.: (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding catalase from tomato. *Plant Physiol*. **100**:1605-6
64. Bao H., Morency M., Rianti W., Saeheng S., Roje S., Weber A.P.M., Walker B.J.: (2021). Catalase protects against nonenzymatic decarboxylations during photorespiration in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Direct*. **5**:366

65. Liu J., Cui L., Xie Z. et. al.: (2019). Two NCA1 isoforms interact with catalase in a mutually exclusive manner to redundantly regulate its activity in rice. *BMC Plant Biol.* **19**:105
66. Inamine G.S., Baker J.E.: (1989). A catalase from tomato fruit. *Phytochemistry.* **28**:345-8
67. Xu D.P., Li Y., Meng X., Zhou T., Zhou Y., Zheng J., Zhang J.J., Li H.B.: (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction assessment and resources. *Int. J. Mol. Sci.* **18**:96
68. Maury G.L., Rodriguez D.M., Hendrix S., Arranz J.C.E., Boix Y. F., et. al.: (2020). Antioxidants in plants: A valorization potential emphasizing the need for the conservation of plant biodiversity in Cuba. *Antioxidant.* **9**:1048
69. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R.: (2016). Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* **5**:47
70. Dai J., Mumper R.J.: (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* **15**:7313-52
71. Corpas F.J., Barroso J.B.: (2014). NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions. *Front. Environ. Sci.* **2**:55
72. Abell Ch.: (1999). Enzymology and molecular biology of the shikimate pathway In: *Comprehensive Natural Products Chemistry.* Pergamon. str. 573-607. ISBN 9780080912837
73. Santos-Sánchez N.F., Sala-Coronado R., Hernández-Carlos B., Villanueva-Canongo C.: (2019). *Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds.* Intech Open. ISBN: 9781789840346
74. Dao T.T.H., Linthorst H.J.M., Verpoorte R.: (2011). Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem. Rev.* **10**:397-412
75. Protivová V.: (2006). Flavonoidy a jejich role ve vývoji rostlin. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita, Brno

76. Park C.H.J., Seo Y.S.: (2015). Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones for plant immunity. *Plant. Pathol. J.* **31**:323-33
77. Arakawa A., Handa N., Shirouzu M., Yokoyama S.: (2011). Biochemical and structural studies on the high affinity of Hsp70 for ADP. *Protein Sci.* **20**:1367-79.
78. Jakl M., Zeljković S.Ć., Kovač I., Bělonožníková K., Jaklová-Dytrtová J.: (2021). Side effects of triazoles on treated crops. *Chemosphere.* **277**:130242
79. Jakl M., Kovač I., Zeljković S.Ć., Jaklová-Dytrtová J.: (2021). Triazole fungicides in soil affect the yield of fruit, green biomass, and phenolics production of *Solanum lycopersicum* L. *Food Chemistry.* **351**:129328
80. Oušková M.: (2020). Biochemická charakterizace rostlin rajčete infikovaných houbovými patogeny. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Praha
81. Tupec M.: (2013). Antioxidační vlastnosti léčivých rostlin. Bakalářská práce, Praha
82. Ismaiel A.A., Papenbrock J.: (2017). Effect of patulin from *penicillium vulpinum* on the activity of glutathione-S-transferase and selected antioxidative enzymes in Maize. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **14**:825.
83. Jebara S., Jebara M., Limam F., Aouani M.E.: (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *J. Plant Physiol.* **162**:929-36
84. Hiner N.P., Rodriguez-Lopez J.N., Arnao M.B., Raven E.L.: (2000). Kinetic study of the inactivation of ascorbate peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **2**:321-8
85. Wu G.L., Cui J., Tao L., Yang H.: (2010). Fluroxypyr triggers oxidative damage byproducing superoxide and hydrogen peroxide in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicology.* **19**:124-32
86. Bělonožníková K., Hýsková V., Chmelík J., Kavan D., Čerovská N., Ryšlavá H.: (2022). *Pythium oligandrum* in plant protection and growth promotion: Secretion of hydrolytic enzymes, elicitors and tryptamine as auxin precursor. *Microbiol. Res.* **258**:126976
87. Lee D.H., Lee C.B.: (2000). Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Sci.* **159**:75-85

88. Spoustová P., Hýsková V., Muller K., Schnablova R. et. al.: (2015). Tobacco susceptibility to potato virus YNTN infection is affected by grafting and endogenous cytokinin content. *Plant Sci.* **235**:25-36
89. Mittler R., Zilinskas B.A.: (1993). Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal. Biochem.* **212**:540-6
90. Ferguson K.A.: (1964). Starch-gel electrophoresis-application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism.* **13**:985-1002
91. Hýsková V., Bělonožníková K., Doričová V., Kavan D., Gillarová S., Henke S., Synková H., Ryšlavá H., Čerovská N.: (2021). Effects of heat treatment on metabolism of tobacco plants infected with Potato virus Y. *Plant Biol.* **23**:131-41
92. Laemmli U.: (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680–5
93. Bradford M.M.: (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–54
94. Polledri E., Mercadante R., Fustinoni S.: (2018). Setermination of tebuconazole and penconazole fungicides in rat and human hair by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **32**:1243-9
95. Kadota Y., Shirasu K., Zipfel C.: (2015). Regulation of the NADPH oxidase RBOHD during plant immunity. *Plant Cell Physiol.* **56**:1472-80
96. Soltabayeva A., Ongaltay A., Omondi J.O., Srivastava S.: (2021). Morphological, physiological and molecular markers for salt-stressed plants. *Plants.* **10**:243
97. Jaklová-Dytrtová J., Bělonožníková K., Jakl M., Ryšlavá H.: (2020). Triazoles and aromatase: The impact of copper cocktails. *Environ. Pollut.* **266**:115201
98. Herrero J., Esteban-Carrasco A., Zapata J.M.: (2013). Looking for *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* **67**:77–86
99. Passardi F., Penel C., Dunand CH.: (2004). Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* **9**:534-40

100. Oliviera F.K., Santos L.O., Garda-Buffon J.: (2021). Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. *Int. Food Res. J.* **143**:110266
101. Jouili H., Bouazizi H., El Ferjani E.: (2011). Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *Acta Physiol. Plant.* **33**:2075-82
102. Ryšlavá H., Pomeislová A., Pšondrová Š., Hýsková V., Smrček S.: (2015). Phytoremediation of carbamazepine and its metabolite 10,11-epoxycarbamazepine by C3 and C4 plants. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**:20271-82
103. Cavé-Radet A., Rabhi M., Gouttefangeas F., Amrani A.E.: (2020). Do specialized cells play a major role in organic xenobiotic detoxification in higher plants? *Front. Plant Sci.* **11**:1037
104. Mageroy M.H., Tieman D.M., Floystad A., Taylor M.G., Klee H.J.: (2011). A *Solanum lycopersicum* catechol-O-methyltransferase involved in synthesis of the flavor molecule guaiacol. *Plant J.* **69**:1043-51
105. Apel K., Hirt H.: (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**:373-99
106. Melo B.P., Carpinetti P.A., Fraga O.T., et. al.: (2022). Abiotic stresses in plants and their markers: a practice view of plant stress responses and programmed cell death mechanisms. *Plants.* **11**:1100
107. Heldt H.W., Piechulla B. (2005). *Plant biochemistry*. 3th ed. Elsevier. San Diego. ISBN: 9780080473772
108. Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L.: (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Wiley. ISBN: 0943088399
109. Tupec M., Hýsková V., Bělonožníková K., Hraníček J., Červený V., Ryšlavá H.: (2017). Characterization of some potential medicinal plants from Central Europe by their antioxidant capacity and the presence of metal elements. *Food Biosci.* **20**:43-50
110. Bělonožníková K.: (2014). Vlastnosti rostlinných extraktů. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Praha
111. Kamiloglu S., Boyacioglu D., Capanoglu E.: (2013). The effect of food processing on bioavailability of tomato antioxidants. *J. Berry Res.* **3**:65-77