

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Michaela Paučová

**Využití analytických metod pro studium adaptačních mechanismů rostlin  
*Festuca rubra* L.**

Using of Analytical Methods for Study of Adaptation Mechanisms of *Festuca Rubra* L. Plant

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Daniel Haisel, Ph.D.

Praha 2019

---

Tato diplomová práce byla vypracovaná na Ústavě experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. v letech 2016 – 2018. Práce byla finančně podporovaná projektem Grantové agentury České republiky GAČR 15-07795S.

## **Prohlášení**

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze 1. ledna 2019

---

## Abstrakt

Vplyvom abiotických stresových faktorov ako je najmä prebytok elektromagnetického žiarenia, vysoká a nízka teplota, sucho, vlhkosť či salinita dochádza v živých organizmoch k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka, ktoré majú negatívny dopad na správne fungovanie životne dôležitých orgánov, metabolických dráh a v konečnom dôsledku na ich ďalšiu existenciu. V prípade rastlinného organizmu ide hlavne o obmedzenú činnosť fotosyntetického aparátu, čo môže viesť k smrti rastliny.

Samotným analýzám predchádzalo zozbieranie vzoriek rastliny *Festuca rubra* L. z rôznych lokalít v juhozápadnej časti Nórska. Lokality sa líšili svojou teplotou (6,5; 9,5 a 10,5 °C) a vlhkosťou (600, 1200, 2000 a 2700 mm). Vzorky boli následne kultivované v štyroch klimaboxoch, v ktorých boli nastavené kombinácie štyroch „krajných“ teplôt a vlhkostí (vlhko/zima, vlhko/teplo, sucho/zima a sucho/teplo).

Experimentálne bola táto práca zameraná na extrakciu askorbátperoxidázy ako antioxidantného enzýmu, fenolických látok a rastlinných pigmentov prítomných v Kostrave červenej (*Festuca rubra* L.) ako modelového organizmu. Aktivita askorbátperoxidázy bola kvantitatívne stanovená spektrofotometricky redukciou nitrobluetetrazólia, obsah fenolických látok bol vyhodnotený spektrofotometricky pomocou Folin-Ciocalteuovho činidla a rastlinné pigmenty (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*,  $\beta$ -karotén, neoxanthín, luteín, violaxanthín, antheraxanthín, zeaxanthín) boli separované a vyhodnotené pomocou HPLC.

Výsledky analýz ukázali, že *Festuca rubra* L. prekonávala najväčší stres v situácii, kedy dochádzalo k zníženému príjmu vody, čo možno potvrdiť poklesom obsahu oboch typov chlorofylu,  $\beta$ -karoténu, neoxanthínu a luteínu. Množstvo violaxanthínu bolo takisto znížené, čím sa dokázala schopnosť rastliny aktivovať svoj xanthofylový cyklus. Súčasťou tejto aktivácie bol aj výrazný nárast antheraxanthínu a zeaxanthínu. Zvýšená hladina askorbátperoxidázy a fenolických látok ukázala ako dokáže rastlinný organizmus bojovať so vznikajúcim obsahom reaktívnych foriem kyslíka. Z výsledkov tiež vyplynulo, že zmena teploty nemala na rastlinu výrazný vplyv.

## Kľúčové slová

adaptácia, askorbát, chromatografia, fenolické látky, peroxid, pigmenty  
spektrofotometria, stres, xantofylový cyklus

---

## Abstract

Due to abiotic stress factors, such as excess of electromagnetic radiation, high and low temperature, drought, moisture or salinity, the reactive oxygen species (ROS) in living organisms which have a negative impact on the proper functioning of vital organs, metabolic pathways and ultimately, existence, are formed. In the case of a plant, this is in particular a limited activity of the photosynthetic apparatus which can lead to the death of the plant.

All of analysis were preceded by the collection of *Festuca rubra* L. samples from different locations in the south-western part of Norway. The locations were different in their temperature (6,5; 9,5 and 10,5 °C) and moisture (600, 1200, 2000 and 2700 mm). Then all samples were cultivated in four climaboxes where combinations of four „extreme“ temperatures and moistures (moist/cold, moist/warm, dry/cold and dry/warm) were set.

Experimentally this work was focused on the extraction of ascorbate peroxidase as an antioxidant enzyme, phenolic substances and plant pigments present in Red Fescue (*Festuca rubra* L.) as a model organism. The activity of ascorbateperoxidase was quantitatively determined by spectrophotometric reduction of nitrobluetetrazolium, the phenolic content was evaluated spectrophotometrically by the Folin-Ciocalteau reagent and the plant pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b*,  $\beta$ -carotene, neoxanthine, lutein, violaxanthin, antheraxanthin and zeaxanthin) were separated and evaluated by HPLC.

The results of analyzes showed that *Festuca rubra* L. was the most stressful in the situation with reduced water intake as confirmed by a decrease in the content of both chlorophyll,  $\beta$ -carotene, neoxanthine and lutein. The amount of violaxanthin was also reduced, demonstrating the ability of the plant to activate its xanthophyll cycle. This activation also involved a considerable increase in antheraxanthin and zeaxanthin. Elevated levels of ascorbate peroxidase and phenolic substances showed how the plant can cope with the forming content of reactive oxygen species. The results also indicated that the temperature change had no significant effect on the plant.

## Key words

adaptation, ascorbate, chromatography, peroxide, phenolics, pigments, spectrophotometry, stress, xanthophyll cycle

---

## Pod'akovanie

Týmto by som sa chcela poďakovať vedúcemu tejto práce, pánovi Mgr. Danielovi Haiselovi, Ph.D. za poskytnutie témy diplomovej práce, za umožnenie jej experimentálneho spracovania na Ústave experimentálnej botaniky AV ČR, v.v.i., za vedenie počas celého spracovania od prípravy vzoriek až po konečné vyhodnotenie analýz a v konečnom dôsledku za pomoc, trpezlivosť a ochotu pri teoretickom vypracovaní práce.

Ďalej by som sa chcela poďakovať pani doc. RNDr. Zuzane Münzbergovej, Ph.D. a kol. z Botanického ústavu AV ČR, v.v.i. za umožnenie spolupráce na danom projekte a za poskytnutie všetkých dát potrebných k teoretickej aj experimentálnej časti celej práce.

Nakoniec by som sa tiež chcela poďakovať mojich rodičom, za umožnenie štúdia, za ich lásku a podporu aj v tých v najhorších chvíľach, súrodencom, starým mamám a celej širokej rodine za to, že na mňa mysleli, keď to bolo najviac potrebné.

Taktiež moje poďakovanie patrí všetkým priateľom, ktorí mi svojim radami a názormi pomohli pri spracovaní tejto práce.

---

# Obsah

1	Úvod .....	9
2	Teoretická časť .....	12
2.1	Globálne otepľovanie.....	12
2.2	Abiotický stres rastlín a ich adaptácia .....	12
2.2.1	Antioxidačné enzýmy .....	16
2.2.2	Fenolické zlúčeniny .....	17
2.2.3	Rastlinné pigmenty .....	21
2.3	Heritabilita .....	30
2.4	Kostrava červená.....	31
2.5	Metódy .....	32
2.5.1	Fenolické látky .....	32
2.5.2	Antioxidačné enzýmy .....	33
2.5.3	Pigmenty.....	34
3	Experimentálna časť .....	36
3.1	Chemikálie .....	36
3.2	Inštrumentácia.....	36
3.3	Biologický materiál.....	37
3.4	Pracovný postup.....	37
4	Výsledky a diskusia .....	43
5	Záver.....	62
6	Zoznam použitej literatúry.....	64

---

## Zoznam použitých skratiek a značiek

ABA	kyselina abscisová
A, B, C, D	označnie jednotlivých klimaboxov
APX	askorbátperoxidáza
AsA/Asc	kyselina askorbová/askorbát
ATP	adenozíntrifosfát
CAT	kataláza
CCCP	karbonylkyanid <i>m</i> -chlorofenylhydrazón
CHYB	karotenoid- $\beta$ -kruh-hydroxyláza
CHYE	karotenoid- $\epsilon$ -kruh-hydroxyláza
CRTISO	karotenoid izomeráza
CZE	zónová kapilárna elektroforéza
DAsA/DHA	kyselina dehydroaskorbová/dehydroaskorbát
DCMU	dichlorofenyldimethylurea
DEPS	stupeň deepoxidácie
DEPSC	stupeň deepoxidácie vzťahnutý na obsah chlorofylov
DHAR	dehydroaskorbátreduktáza
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DOXP	deoxyxylulózafosfát
DTT	dithiotreitol
DW	suchá hmotnosť
EDTA	kyselina ethyléndiaminotetraoctová
FAD	flavínadenín dinukleotid
FW	čerstvá hmotnosť
GGPP	geranylgeranylpyrofosfát
GGPS	geranylgeranylpyrofosfátsyntháza
GPX	glutathiónperoxidáza
GR	glutathiónreduktáza
GRX	glutaredoxín
GSH	glutathión

---

GSSG	glutathióndisulfid
GST	glutathión- <i>S</i> -transferáza
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HSP	proteíny teplotného šoku
Hz	Hertz
IPI	izopenthylpyrofosfátizomeráza
IPP	izopenthylpyrofosfát
LCYB	lykopén- $\beta$ -cykláza
LCYE	lykopén- $\epsilon$ -cykláza
LHCII	svetlozberný komplex II
MDHA	monodehydroaskorbát
MDHAR	monodehydroaskorbátreduktáza
MPa	megapascal
NADP <sup>+</sup> /NADPH	nikotínamidadenínindinukleotidfosfát
NBT	nitrobluetetrazólium
NCED	<i>9-cis</i> -epoxykarotenoiddioxygenáza
NPQ	nefotochemické zhášanie
NSY	neoxanthínsyntháza
PDS	fytoéndesaturáza
POD	peroxidáza
PrxR	peroxiredoxín
PS I a II	fotosystém I a II
PSY	fytoénsyntháza
PVP	polyvynilpyrrolidon
ROS	reaktívne formy kyslíka
SOD	superoxid dismutáza
SPE	extrakcia na pevnej fáze
TAC	celková antioxidačná kapacita
VDE	violaxanthíndeepoxidáza
ZDS	$\zeta$ -karoténdesaturáza
ZE/ZEP	zeaxanthínepoxidáza
Z-ISO	karotenoid izomeráza



---

# 1 Úvod

Život na našej planéte je poháňaný slnečnou energiou a fotosyntéza je prakticky jediný proces schopný premeny energie elektromagnetického žiarenia na formy, ktoré môžu byť priamo využívané živými organizmami za účelom udržania fyziologických procesov.<sup>1</sup> Vo fotosyntetických reakčných centrách dochádza k separácii primárneho elektrického náboja poháňaného svetlom. Tieto centrá pôsobia ako kvantové „čítače“, v ktorých môže jediný fotón riadiť jednu fotochemickú reakciu.

Veľmi zásadný problém s masívnou konverziou svetelnej energie fotosyntézou súvisí so skutočnosťou, že fotosystémy I a II obsahujú veľmi málo molekúl, ktoré dokážu absorbovať svetlo a používať ich excitácie na riadenie separácie fotosyntetických nábojov. Aby sa zaistilo plynulé a účinné fungovanie fotosyntetického aparátu, fotosyntetizujúce organizmy vrátane rastlín spracovali behom biologického vývoja stratégiu založenú na akumulácii fotónov na početných komplexoch pigment-proteín, ktoré obsahujú pomocné pigmenty schopné absorbovať kvantové svetlo a efektívne prenášať elektronické excitácie smerom k reakčným centrá. Takéto komplexy pigment-proteín sa nazývajú „antény“ a najväčší rastlinný anténny komplex nazývaný LHCII (z angl. *Light – harvesting complex II*) je najrozšírenejším membránovým proteínom v biosfére, ktorý obsahuje približne polovicu celého fotosynteticky aktívneho chlorofylu.<sup>2</sup>

Fotosyntetický aparát je jedinečný nielen vďaka svojej schopnosti pohlcovať svetlo, ale aj kvôli extrémne vysokému riziku fotodeštrukcie, čo je spojené so skutočnosťou, že molekuly chlorofylu sú veľmi účinné fotosenzibilizátory, premieňajú svoje excitácie singletov na tripletové formy cez tzv. intersystémové kríženia a sú zodpovedné za tvorbu vysoko reaktívneho singletového kyslíka. Behom biologického vývoja rastliny vyvinuli niekoľko mechanizmov k ochrane proti fotodeštrukcii spojenej s nadmernou expresiou fotosyntetického aparátu. Takými mechanizmami sú napr. vyhýbanie sa svetlu, čo je dosiahnuté pohybom listov alebo chloroplastov v bunkách.<sup>3</sup> Tento obranný systém však nie je predmetom tejto práce, preto o ňom už ďalej nebude zmieňované.

Oxidácia je nevyhnutným procesom pre všetky živé organizmy na výrobu energie potrebnej pre ich biologickú aktivitu.<sup>4</sup> Molekulárny kyslík je vo svojej normálnej konfigurácii relatívne nereaktívny. Behom normálnej metabolickej aktivity a v dôsledku zmien životného prostredia môže O<sub>2</sub> vytvárať reaktívne excitované stavy ako sú voľné radikály a deriváty

---

(ROS): singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), superoxidový radikál ( $\text{O}_2 \bullet^-$ ), peroxid vodíka ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a hydroxylový radikál ( $\text{OH}\bullet$ ). ROS postihujú biomolekuly spôsobujúce mutáciu DNA, denaturáciu proteínu a peroxidáciu lipidovej membrány. Tieto oxidácie narúšajú normálny bunkový metabolizmus a spôsobujú molekulárne poškodenie a dostatočne závažné môžu viesť k smrti buniek. Bolo dokázané, že environmentálne namáhanie vrátane intenzívneho svetla, UV žiarenia, teplotného stresu, sucha a herbicídov zvyšujú produkciu ROS.<sup>5</sup> V závislosti na pôvode ROS dochádza k rýchlej detoxikácii pomocou rôznych bunkových enzymatických a neenzymatických mechanizmov.<sup>6</sup> Čisto enzymatickým obranným mechanizmom sú enzýmy ako askorbátperoxidáza (APX), glutathiónperoxidáza (GPX), superoxid dismutáza (SOD) a kataláza (CAT), ktoré chránia organizmus priamo zachytením superoxidových radikálov a peroxidu vodíka premenou na menej reaktívne druhy. Neenzymatickým spôsobom obrany sa rozumejú zlúčeniny s vlastnými antioxidačnými vlastnosťami, vo vode rozpustné ako je askorbát (vitamín C), glutathión, fenolické sloučeniny a metabolity rozpustné v tukoch ako sú karotenoidy a  $\alpha$ -tokoferoly (vitamín E). Antioxidanty pôsobia ako elektronoví donori, čím redukujú ROS na menej škodlivé molekuly.<sup>7</sup>

V rámci tejto práce bol dôraz kladený hlavne na obranný mechanizmus sprostredkovaný askorbátperoxidázou, fenolickými látkami a karotenoidmi, resp. rastlinnými pigmentmi.

Prvým významným procesom odbúravania ROS a vôbec hlavnou cestou k zabráneniu akumulácie toxických hladín  $\text{H}_2\text{O}_2$  vo fotosyntetických organizmoch je askorbát-glutathiónový cyklus, v ktorom APX využíva kyselinu askorbovú (AsA) ako špecifický donor elektrónov k redukcii  $\text{H}_2\text{O}_2$  na vodu s paralelnou generáciou monodehydroaskorbátu (MDHA), univalentného oxidantu askorbátu. MDHA je spontánne disproportionovaná voči AsA a dehydroaskorbátu (DHA). DHA reductáza (DHAR) využíva ako donora elektrónov glutathión (GSH) k regenerácii AsA z oxidovanej formy, DAsA.<sup>8,9</sup> Karotenoidy patria medzi hlavné lipofilné antioxidanty a ide o molekuly odvodené od izoprenoidu syntetizované rastlinami, baktériami, hubami a prokaryotickými riasami.<sup>10</sup> Jednou z najdôležitejších funkcií týchto pigmentov je fotoochranný mechanizmus proti oxidačnému poškodeniu pri fotosyntéze<sup>11</sup> sprostredkovaný xantofylovým cyklom, ktorého hlavnou úlohou je regulovať tok svetelnej energie dopadajúcej na reakčné centrú PSII.<sup>12</sup> Za zníženej intenzity svetla violaxanthín, karotenoid, ktorý má deväť konjugovaných dvojitych väzieb, funguje ako pigment absorbujúci a prenášajúci energiu z jeho najnižšieho excitovaného singletového stavu na

---

molekulu chlorofylu. Keď intenzita svetla stúpa, violaxanthín je biochemicky transformovaný na zeaxanthín s jedenástimi konjugovanými dvojitými väzbami, ktorý má ochrannú funkciu.<sup>13</sup>

Experimentálnym zameraním tejto práce bolo kvantitatívne stanoviť obsah APX redukciou nitrobluetetrazólia (NBT) spektrofotometricky, fenolických látok Folin-Ciocalteuovým činidlom spektrofotometricky a nakoniec rastlinných pigmentov (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*,  $\beta$ -karotén, neoxanthín, violaxanthín, antheraxanthín, zeaxanthín a luteín) acetónovou extrakciou s následným HPLC stanovením.

Experiment vychádzal z kombinácie štyroch hodnôt ročných zrážok (600, 1200, 2000 a 2700 mm) a troch hodnôt teplôt (7,5; 9,5 a 11,5 °C), pričom všetky ostatné premenné boli udržiavané na konštantných hodnotách.

Kostrava červená (z lat. *Festuca rubra* L.) ako modelový organizmus bola kultivovaná v klimaboxoch za udržiavania „krajných“ podmienok (najväčšie sucho a teplo, najväčšie sucho a zima, najväčšie vlhko a teplo, najväčšie vlhko a zima).

Cieľom práce bolo bližšie porozumieť klimatickej adaptácii rastlín, na modelovom organizme otestovať fungovanie obranných mechanizmov prostredníctvom experimentálne získaných hodnôt aktivít APX, množstva fenolických látok a rastlinných pigmentov a v konečnom dôsledku zistiť, aký dopad má oxidačný stres na jednotlivé zložky fotosyntetického aparátu.

---

## 2 Teoretická časť

### 2.1 Globálne otepľovanie

Za posledných sto rokov sa priemerná globálna teplota zvýšila približne o 0,6 °C a predpokladá sa, že bude naďalej narastať. Hoci rastlinné aj živočíšne druhy reagovali na klimatické zmeny počas ich evolučnej histórie, primárnou obavou pre divoké jedince a ich ekosystémy je rýchla miera zmien. V skutočnosti viac ako 80% druhov, ktoré vykazujú zmeny, sa posúvajú v očakávanom smere na základe známych fyziologických obmedzení druhov. Z toho vyplýva, že významný vplyv globálneho otepľovania je už zrejmý v populáciách zvierat a rastlín. Synergizmus rýchleho nárastu teploty a iných stresov, najmä ničenia biotopov, by mohol ľahko narušiť spojitosť medzi druhmi a viesť k preformulovaniu druhových spoločenstiev, čo odráža rozdielne zmeny v druhoch, početné extirpácie a pravdepodobne vyhynutie.<sup>14</sup>

### 2.2 Abiotický stres rastlín a ich adaptácia

Rastliny vo svojom prirodzenom prostredí podliehajú rôznym biotickým a abiotickým stresom, čím sa musia nevyhnutne vyrovnávať s častými zmenami, aby prežili. Zároveň musia vyvíjať širokú škálu mechanizmov v boji proti týmto nepriaznivým podmienkam.<sup>15</sup> Abiotický stres mení početné množstvo rozpustných alebo štruktúrnych proteínov, ktoré sú dôležité pre adaptáciu.<sup>16</sup> Keď rastliny rozpoznajú tieto environmentálne signály, informácie, ktoré sú v nich obsiahnuté môžu byť uchované na určitý čas vo forme zmien koncentrácií malých molekúl, proteínov, metylácie DNA alebo modifikácie histónu, čo má za následok aktiváciu signálnych transdukčných kaskád na bunkovej a molekulovej úrovni a expresiu špecifických stresových génov.<sup>17</sup>

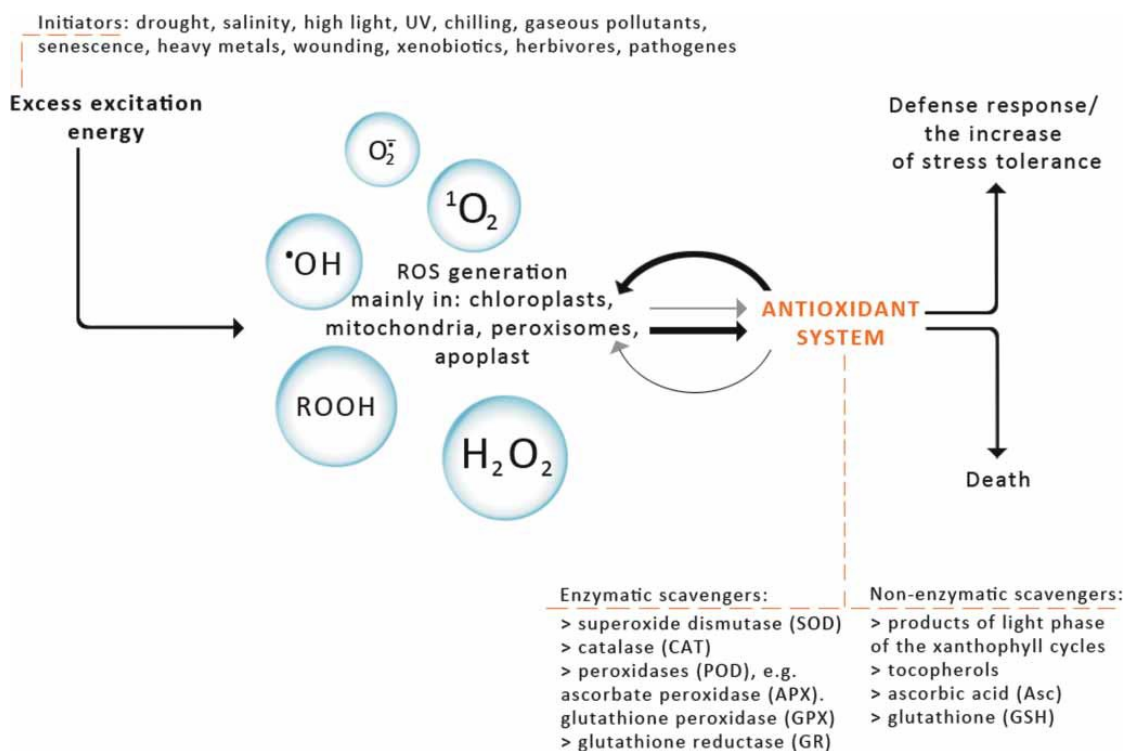
Všeobecne platí, že prírodné látky rastlinného pôvodu obsahujú najviac antioxidantných látok, hlavne prítomné v ovocí a zelenine. Tiež možno potvrdiť, že sú v nich obsiahnuté viaceré triedy a typy týchto látok. Z tohto dôvodu bol zavedený pojem „celková antioxidantná kapacita“ (z angl. *TAC = Total Antioxidant Capacity*), ktorá kvantifikuje kumulatívnu kapacitu vzorky biologického materiálu eliminovať voľné radikály.<sup>18</sup>

---

Ak sú rastliny vystavené stresovým podmienkam životného prostredia, dochádza k zvýšenej produkcii reaktívnych foriem kyslíka (z angl. *ROS* = *Reactive Oxygen Species*), ktoré môžu spôsobovať významné poškodenie buniek<sup>19</sup> tým, že poškodzujú lipidové membrány buniek a bunkových štruktúr a modifikujú enzýmovú aktivitu a génovú expresiu.<sup>20</sup>

Medzi ROS patrí singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peroxid vodíka ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a hydroxylový radikál ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). Detoxikácia ROS v rastlinách je preto nevyhnutná pre ochranu buniek a organel voči toxickým účinkom týchto reaktívnych foriem. Tento detoxikačný systém zahŕňa enzymatické aj neenzymatické antioxidačné mechanizmy (*obr. 1*). Zo skupiny neenzymatických zlúčenín sú rozhodujúcimi hlavne askorbát a glutathión, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu ako antioxidačné pufry. Ďalšími neenzymatickými antioxidantmi sú flavonoidy, fenolické zlúčeniny, alkaloidy, tokoferol a tiež karotenoidy.<sup>19</sup>

K enzymatickým zlúčeninám možno zahrnúť askorbátperoxidázu (z angl. *APX* = *ascorbate peroxidase*), glutathiónperoxidázu (z angl. *GPX* = *glutathione peroxidase*), superoxiddizmutázu (z angl. *SOD* = *superoxide dismutase*), katalázu (z angl. *CAT* = *katalase*) a peroxiredoxín (z angl. *PrxR* = *peroxiredoxin*).<sup>21</sup>



**Obr.1** Tvorba a detoxikácia ROS. Vplyvom prebytku excitačnej energie v podobe akéhokoľvek stresového faktoru dochádza k vzniku ROS. Reakciou rastliny je aktivácia antioxidantného systému (enzymatického alebo neenzymatického) a na základe jeho účinnosti dochádza k obrannej odpovedi, čím si rastlina vytvára stresovú toleranciu alebo nastáva vážne poškodenie až smrť. ( $^1O_2$  = singletový kyslík,  $O_2^-$  = superoxid,  $OH^\bullet$  = hydroxylový radikál,  $ROOH$  = organický peroxid,  $H_2O_2$  = peroxid vodíka)<sup>22</sup>

## Teplota

Medzi neustále sa meniacimi zložkami prostredia je rastúca teplota okolia považovaná za jedno z najnepriaznivejších faktorov.<sup>23</sup> Prechodné alebo trvalé vysoké teploty spôsobujú rad zmien, ktoré ovplyvňujú rast a vývoj rastlín. Všeobecne platí, že prechodné zvýšenie teploty o 10 až 15 °C nad okolitú teplotu sa považuje za tepelný šok alebo tepelný stres. Rastliny predbežne vystavené tomuto stresu prežijú, keď sú neskôr vystavené vyššej teplote, ktorá by bola smrteľná pre neaklimatizovanú rastlinu.<sup>24</sup> Aj napriek tomu sa snažia o prežitie za rôznych environmentálnych stresových podmienok. V prvom rade je rastlinný organizmus

---

do istej miery schopný tolerovať dlhodobý tepelný stres fyzickými zmenami vo svojom tele a vytváraním signálov pre zmenu metabolizmu ako odpovedi na nepriaznivú teplotu najmä tým, že produkuje kompatibilné rozpustené látky, ktoré sú schopné organizovať proteíny a bunkové štruktúry, udržiavať bunkový turgor osmotickou reguláciou a modifikovať antioxidantný systém, aby obnovili bunkovú redoxnú rovnováhu a homeostázu.<sup>23</sup>

Je známe, že expresia génov proteínov tepelného šoku (z angl. *HSP = Heat Shock Protein*) je dôležitou adaptačnou stratégiou.<sup>25</sup>

## ***Sucho***

Rast a produktivita rastlín sú nepriaznivo ovplyvňované rôznymi formami biotických a abiotických stresových faktorov. Nedostatok vody je jedným z najzávažnejších abiotických stresov, pričom dochádza k zmene metabolických funkcií ako je strata alebo redukcia syntézy fotosyntetických pigmentov. Flexibilita normálneho metabolizmu umožňuje iniciáciu odpovede na zmeny prostredia, ktoré sú v neustálej fluktuácii a sú predvídateľné prostredníctvom denných alebo sezónnych cyklov. Možno poznamenať, že nie každá odchýlka od optima nevyhnutne súvisí s nejakým druhom stresu.

Sucho ako meteorologický pojem predstavuje obdobie bez výrazných zrážok. Všeobecne k stresu spôsobenému suchom dochádza, keď je využiteľná voda v pôde zredukovaná a atmosférické podmienky spôsobujú nepretržitú stratu vody transpiráciou alebo odparovaním. Tolerancia zaťaženia suchom je pozorovaná takmer vo všetkých rastlinách, ale jeho rozsah sa medzi druhmi líši. V závislosti na komplikovaných interakciách medzi stresovými faktormi a rôznymi molekulárnymi, biochemickými a fyziologickými fenoménmi ovplyvňujúcimi rast a vývin rastlín predstavuje tolerancia na abiotický stres komplexnú záležitosť.<sup>26</sup>

Sucho spôsobuje miernu stratu vody, čo vedie k uzavretiu prieduchov a k obmedzenej výmene plynov. Desikácia je oveľa rozsiahlejšia strata vody, ktorá môže viesť k hrubému narušeniu metabolizmu a bunkových štruktúr, prípadne k zastaveniu enzýmovo katalyzovaných reakcií<sup>27</sup> či fotosyntézy až k smrti rastliny.<sup>26</sup>

---

### 2.2.1 Antioxidačné enzýmy

Výnimočnou schopnosťou týchto enzýmov je stabilizovať alebo deaktivovať voľné radikály predtým ako zaútočia na bunkové organely. Ich mechanizmus spočíva v tom, že redukujú energiu týchto radikálov alebo sa vzdajú svojich elektrónov v ich prospech, čím sa stávajú voľné radikály stabilnými.<sup>28</sup>

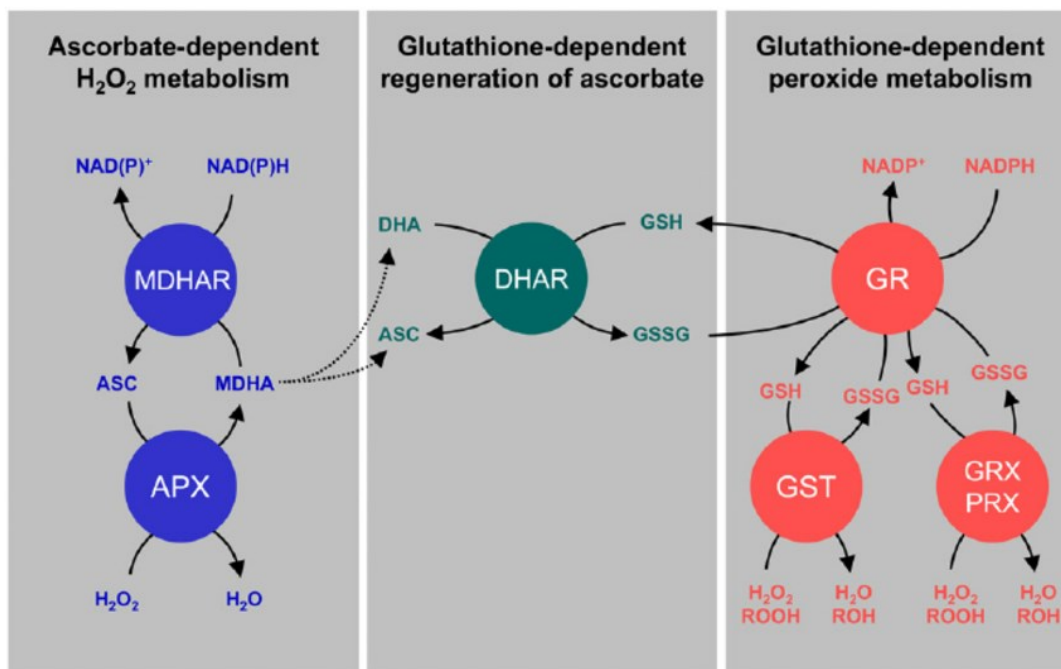
Askorbátperoxidáza, prítomná vo vyšších rastlinách, červených riasách a medzi prvokmi, patrí do skupiny hemových peroxidáz. Expresia génov kódujúcich APX je modulovaná rôznymi environmentálnymi stimulmi ako napr. sucho, vysoká intenzita slnečného žiarenia, vysoké a nízke teploty, prítomnosť solí, peroxidu vodíka, kyseliny abscisovej či patogénov.<sup>19</sup> APX existuje vo forme izoenzýmov a má dôležitú funkciu v metabolizme  $H_2O_2$ , pričom využíva askorbát ako donor elektrónov na jeho redukciiu.<sup>29</sup>

Reaktívne formy kyslíka sú produkované v rôznych organelách rastlinných buniek. Na udržanie týchto škodlivých reakcií na minimálnej úrovni rastliny vlastnia enzymatické aj neenzymatické antioxidačné obranné systémy. Významným z nich je askorbát-glutathiónový cyklus (*obr. 2*) nachádzajúci sa v mitochondriách a peroxizómoch, kde jeho hlavnou úlohou je vycihtať  $H_2O_2$ , ktorý je generovaný v oboch týchto organelách.<sup>30</sup> Taktiež funguje v chloroplastoch rastlín s cieľom prenášať veľké množstvo  $H_2O_2$  generovaného počas fotosyntetických procesov vo svetelnej fáze prostredníctvom zlúčenín transportného reťazca elektrónov na thylakoidoch s elektrochemickým potenciálom schopným priamej redukcie  $O_2$  na vodu. Tento mechanizmus je katalyzovaný skupinou štyroch enzýmov: APX, dehydroaskorbátreduktáza (z angl. *DHAR* = *dehydroascorbate reductase*), monodehydroaskorbátreduktáza (z angl. *MDHAR* = *monodehydroascorbate reductase*) a glutathiónreduktáza (z angl. *GR* = *glutathion reductase*). Vysoká špecifická aktivita týchto enzýmov a rozsiahla účinnosť ich operácií hovoria o tom, že tento cyklus predstavuje hlavnú cestu odbúravania  $H_2O_2$  vo fotosyntetických organelách.

Primárna peroxidácia Asc pomocou APX poskytuje MDHA radikál, ktorý je buď priamo zredukovaný späť na Asc pomocou MDHAR alebo podlieha neenzymatickej disproportionácii na Asc a DHA. K opätovnej regenerácii DHA dochádza cez glutathión-dependentnú reakciu katalyzovanú pomocou DHAR, ktorý využíva glutathión na redukciiu DHA, čím dôjde k ďalšej regenerácii askorbátu. Zoxidované glutathiónové diméry sú znova zredukované pomocou NADPH-dependentej GR.<sup>29,32</sup>



Okrem tohto mechanizmu sa v chloroplastoch vyšších rastlín nachádza aj tzv. vodne-vodný cyklus, ktorého funkciou je pôsobiť ako fotoredukcia kyslíka na vodu z fotosystému I pomocou elektrónov získaných z vody vo fotosystéme II zúčastňujúceho sa na detoxikácii ROS a straty energie prebytočných fotónov.<sup>31</sup>



**Obr. 2** Askorbát-glutathiónový cyklus.<sup>33</sup> (Podrobný popis vid'. kap. 2.2.1, Antioxidačné enzýmy; skratky vid'. Zoznam použitých skratiek a značiek)

## 2.2.2 Fenolické zlúčeniny

Fenolické zlúčeniny alebo polyfenoly patria do najrozšírenejšej triedy sekundárnych metabolitov v prírode. Odhaduje sa, že existuje 100 000 až 200 000 takýchto metabolitov<sup>34</sup> a približne 20% uhlíka fixovaného fotosyntézou vedie do fenylypropanoidovej dráhy, čím vzniká väčšina prírodne sa vyskytujúcich fenolov ako sú flavonoidy a stilbény.<sup>34,35</sup>

Hoci rozmanitosť rastlinných fenolov je obrovská, ich najväčšie množstvo má spoločný pôvod vo fenylyalaníne a tyrozíne. Tieto aminokyseliny neskôr prechádzajú v procese deaminácie na kyselinu škoricovú, ktorá je vstupnou zlúčeninou fenylypropanoidovej dráhy. Kľúčovým krokom tejto biosynthetickej cesty je začlenenie jedného

---

alebo viacerých hydroxylových skupín do fenylového kruhu.<sup>34</sup>

### 2.2.2.1 Výskyt a biologické funkcie polyfenolov

Hlavným zdrojom polyfenolov je bežné ovocie, zelenina, celé zrná, nápoje ako čaj, čokoláda a ďalšie kakaové produkty, pivo, olivový olej a iné.<sup>36,37</sup>

Tieto metabolity vykazujú mnohé biologicky významné funkcie, hlavne v súvislosti so zdravím človeka. Patria k silným antioxidantom, ktorých hlavnou úlohou je ochrana proti oxidačnému stresu vychytávaním voľných radikálov kyslíka.<sup>36</sup> Hydroxylová skupina fenolických látok vystupuje ako donor vodíka, čím je schopná ľahko reagovať s atómami kyslíka, prípadne dusíka. K tejto reakcii dochádza v terminálnej fáze tvorby radikálov, čím dôjde k jej prerušeniu. Ďalšou interakciou s počiatočným radikálom dochádza ku vzniku radikálovej formy antioxidantu, ktorého chemická stabilita je oveľa vyššia ako v prípade počiatočného atómu. Práve väzbou hydroxylovej skupiny polyfenolov s  $\pi$  elektrónmi benzénového jadra získava molekula špeciálne vlastnosti, kde najvýznamnejšou je schopnosť generovať voľné radikály, pričom dochádza k jeho stabilizácii delokalizáciou. Tvorba týchto relatívne dlhotrvajúcich foriem umožňuje modifikovať nimi sprostredkované oxidačné procesy<sup>34</sup> a tým predchádzať predčasnému starnutiu či rôznym degeneratívnym ochoreniam ako je ateroskleróza, kardiovaskulárne poruchy, diabetes mellitus II. typu alebo rakovina.<sup>37</sup>

Antioxidačná kapacita polyfenolov je tiež pripisovaná ich schopnosti vychytávať ióny kovov, ktoré sa takisto podieľajú na produkcii voľných radikálov. Práve vďaka tejto funkcii môžu pôsobiť aj ako prooxidanty, čím dôjde k udržiavaniu či zvyšovaniu ich katalytickej aktivity alebo k redukcii kovov a tým aj k zvýšeniu ich schopnosti tvoriť voľné radikály.<sup>34</sup>

Vďaka hydrofóbnemu charakteru benzénového jadra a schopnosti viazať na seba vodík majú polyfenoly potenciál silne interagovať s proteínmi, čím získavajú funkciu inhibovať niektoré enzýmy, ktoré sa podieľajú na tvorbe voľných radikálov. K takýmto enzýmom patria napr. rôzne izoformy cytochrómu P<sub>450</sub>, lipoxygenáza, cyklooxygenáza a xanthínoxidáza.<sup>34</sup>

---

### 2.2.2.2 Klasifikácia polyfenolov

Hoci sú polyfenoly chemicky charakterizované ako zlúčeniny, ktoré majú vlastnosti látok s fenolickou štruktúrou, táto skupina prírodných produktov je vysoko rozmanitá a obsahuje niekoľko podskupín. Práve táto rozmanitosť a široká distribúcia v rastlinách viedla k rôznym spôsobom ich kategorizácie.

Vo všeobecnosti sa polyfenoly rozdeľujú podľa zdroja ich pôvodu, biologickej funkcie a chemickej štruktúry.<sup>36</sup>

Podľa počtu fenolických kruhov a prvkov, ktorý tieto kruhy spája sa polyfenoly rozdeľujú na:<sup>37</sup> (*obr. 3*)

- **Flavonoidy**

Hlavnou štruktúrnou kostrou flavonoidov je fenylnbenzopyrán, čo je C<sub>15</sub> uhlíkový reťazec (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) spojený s chrómanovým kruhom.<sup>34</sup> Flavonoidy sú najzastúpenejšou skupinou polyfenolov v ľudskej výžive. Ďalej sa rozdeľujú na anthokyaníny (glykozidované deriváty anthokyanidínu prítomné vo farebných kvetoch a ovoci) a anthoxantíny (skupina bezfarebných zlúčenín, ktorá sa ďalej delí na flavóny, flavany, flavanoly, izoflavóny a ich glykozidy).<sup>37</sup> Anthokyaníny sú vo vode rozpustné rastlinné pigmenty a sú zodpovedné za modré, fialové a červené sfarbenie rastlinných tkanív.<sup>34</sup>

- **Fenolové kyseliny**

Túto podskupinu taktiež možno ďalej rozdeliť na deriváty kyseliny benzóovej (kyselina gallová, kyselina syringová, kyselina vanilová) a deriváty kyseliny škoricovej (kyselina kumárová, kyselina ferulová, kyselina kávová, kyselina sinapová). V ovoci a zelenine sa tieto kyseliny nachádzajú vo voľnej forme, pričom v zrnách a semenách (hlavne otruby a struky) sú vo viazanej forme. Fenolové kyseliny môžu existovať ako voľné, taktiež môžu byť hydrolyzované kyslou alebo zásaditou hydrolýzou či pomocou enzýmov.<sup>36</sup>

- **Stilbény**

Základnú štruktúru tvorí 1,2-difenylethylénové jadro s hydroxylmi substituovanými na

---

aromatických kruhoch, pričom môžu existovať vo forme monomérov a oligomérov. Najznámejším stilbénom je *trans-resveratol*<sup>37</sup> typický pre hrozno a červené víno.<sup>36</sup>

- ***Lignany a polymérne ligníny***

Lignany predstavujú organické zlúčeniny, ktoré sú výsledkom reakcie  $\beta$ -uhlíkov postranného reťazca dvoch derivátov *l*-fenylpropánu. Viaceré z nich majú cytostatické a antimitotické vlastnosti, avšak, len semisyntetické deriváty podofylotoxínu boli skúmané v liečbe.

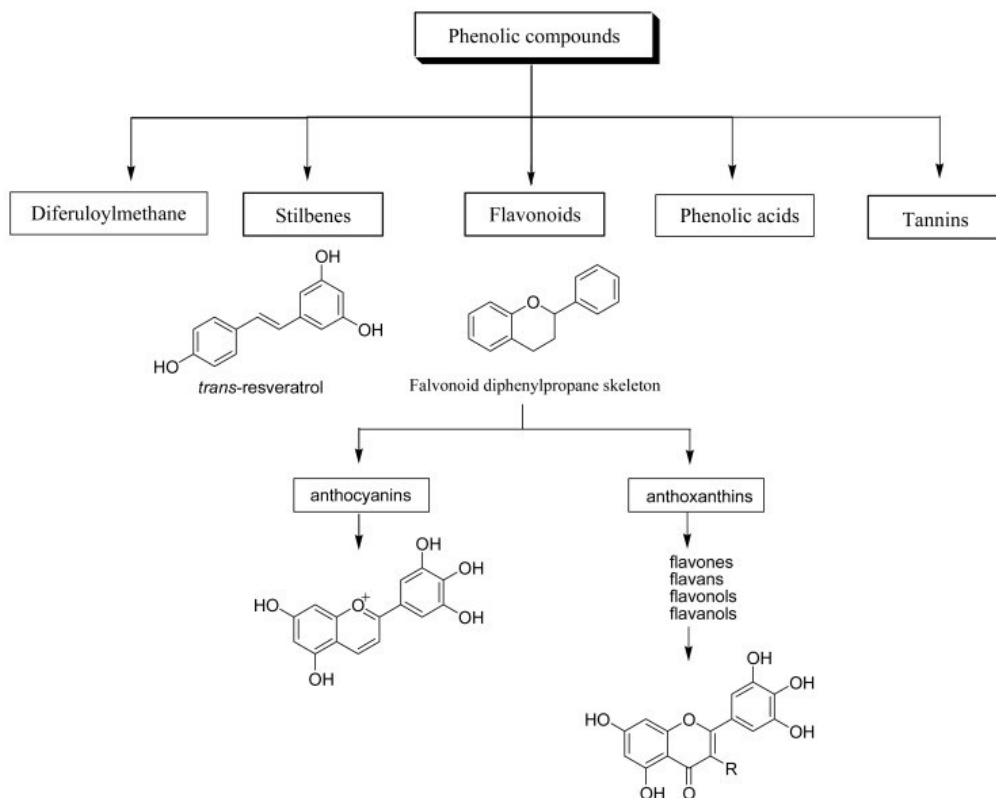
Lignín reprezentuje obrovský rezervoár aromatických látok, hlavne nevyužívaných a to v dôsledku ťažkostí vzniknutých pri uvoľňovaní týchto metabolitov. Vzniká fenolickým oxidačným párovaním monomérov alkoholu kyseliny hydroxyškoricovej. Najznámejším monomérom je *p*-kumaroylalkohol.<sup>34</sup>

- ***Tanníny***

Predstavujú skupinu vo vode rozpustných polyfenolov a sú rozdelené na kondenzované a hydrolyzovateľné taníny. Často ich možno nájsť v komplexe s alkaloidmi, polysacharidmi a proteínmi.<sup>37</sup>

- ***Diferuloylmethány***

Malá skupina fenolických zlúčenín štruktúrne tvorená dvoma aromatickými kruhmi substituovanými hydroxylmi, ktoré sú spojené alifatickým reťazcom pomocou karbonylovej skupiny. Do tejto skupiny patrí napr. hydroxytyrosol prítomný v olivách či olivovom oleji<sup>37</sup> alebo kurkumín obsiahnutý v kurkume.<sup>38</sup>



**Obr. 3** Klasifikácia fenolických zlúčenín. Fenolické zlúčeniny sa primárne rozdeľujú na diferoylmethány, stilbény, flavonoidy, fenolové kyseliny a tanníny. Flavonoidy sa ďalej rozdeľujú na anthokyaníny a anthoxanthíny. Medzi anthoxanthíny sa zaraďujú flavóny, flavany, flavonoly a flavanoly.<sup>34, 36, 37</sup>

### 2.2.3 Rastlinné pigmenty

Pigmentom sa rozumie látka, ktorá dodáva rastlinám sfarbenie, ktoré je neoddeliteľnou súčasťou ich funkcií v prírode.<sup>39</sup> Dôležitým dôvodom vysokého významu pigmentov je signalizácia a s ňou spojené lákanie opelovacích a disperzných činiteľov ako je hmyz či odpudzovanie bylinožravcov.<sup>39, 40</sup>

Okrem toho majú fyziologický význam v zachycovaní a prenose energie v priebehu svetelnej fázy fotosyntézy a to ako látky s fotoobránnym a antioxidačným mechanizmom, u ľudí a živočíchov majú taktiež nutričný význam s postavením pigmentov vo výžive a pri

---

podpore zdravia.<sup>40</sup> V súčasnosti sa viaceré druhy a formy pigmentov využívajú ako aditíva či doplnky v potravinárskom priemysle, kozmetike, farmácii, krmivách a iných.<sup>41</sup> Avšak, v dôsledku problémov spojených v používaní syntetických pigmentov, ktoré spôsobujú toxicitu a karcinogenitu v ľudskom tele, ich využívanie postupne kleslo. Preto záujem o prírodné pigmenty, ktorými by sa syntetické mohli nahradiť začal stúpať.<sup>42</sup>

### 2.2.3.1 Typy a funkcie jednotlivých skupín pigmentov

Rastliny produkujú viac ako 200 000 rôznych typov organických a anorganických zlúčenín, vrátane pigmentov. Človek je schopný rozoznať ich farby vnímaním odrazeného alebo preneseného svetla s vlnovou dĺžkou približne od 380 do 730 nm, pričom hmyz rozoznáva svetlo s kratšou vlnovou dĺžkou.<sup>41, 43</sup>

Celkovo možno rastlinné pigmenty rozdeliť do dvoch skupín: <sup>44</sup>

- a) Lipochrómy – rozpustné v tukoch , prítomné v plastidoch rastlinných protoplastov (chlorofyly a karotenoidy)
- b) Hydrochrómy – rozpustné vo vode a v bunkovej šťave, prítomné vo vakuolách (flavonoidy – anthoxanthíny a anthokyaníny, betalainy)

#### 1) Chlorofyly

Chlorofyl vyjadruje všeobecné označenie zelených pigmentov v organizme, ktorý je schopný fotosyntézy. Takýmto organizmom sú vyššie rastliny, zelené riasy a fotosyntetizujúce baktérie.<sup>45</sup> Zároveň ide o kľúčové kofaktory fotosyntetizujúceho aparátu, ktorého úlohou je zachytávať energiu zo slnečného žiarenia a premieňať ju na chemickú energiu.<sup>45,46</sup>

List rastliny obsahuje približne 70 miliónov buniek, pričom každá nesie okolo  $5 \times 10^9$  chloroplastov, z čoho v každom z nich je prítomných cez 600 miliónov molekúl chlorofylu. Týchto  $10^{18}$  molekúl chlorofylu je viazaných na proteíny fotosyntetickej thylakoidnej membrány, kde vykonávajú svetlozbernú funkciu. Približne od 250 do 300 z nich prenáša absorbovanú svetelnú energiu cez susediace pigmenty do špeciálneho páru chlorofylu v reakčnom centre fotosystému I a II. Tieto páry fungujú ako donory elektrónov riadiace

---

v elektrotransportnom reťazci premenu energie na chemickú, ktorá sa ukladá vo forme NADPH<sub>2</sub> a ATP.<sup>47</sup>

Molekuly chlorofylu sa nachádzajú na fotosyntetickej thylakoidnej membráne ako súčasť lipidovej dvojvrstvy vo forme komplexov so špecifickými polypeptidmi. Najzastúpenejším polypeptidom je proteín chlorofylu *a/b*, ktorého úlohou je usporiadať približne jednu tretinu chlorofylu *a* a celkové množstvo chlorofylu *b* do komplexov absorbujúcich svetlo.<sup>48</sup>

Všeobecne všetky chlorofyly sú odvodené od porfínu a jeho *di-* a *tetrahydro-*derivátov<sup>45</sup>, kde štyri pyrrolové jadrá (I – IV) vytvárajú tetrapyrrol s komplexne viazaným horčíkom vo svojom centre. Porfirínové jadro so svojimi konjugovanými dvojitými väzbami pozostáva z ôsmich molekúl kyseliny 5-aminolevulovej, vysoko reaktívnej neproteínovej aminokyseliny.<sup>47</sup> V neskoršom kroku je prostredníctvom esterifikácie pripojený izoprenoidový fytol. Všetky atómy uhlíka v tetrapyrrole sú odvodené od glutamátu v niekoľkých krokoch biosyntetickej dráhy.<sup>49</sup>

V výnimkou postranného reťazca na jednom z uhlíkov majú oba typy molekúl identickú štruktúru.<sup>50</sup> Chlorofyl *a* predstavuje väčšinovú účasť vo fotosyntetických reakciách<sup>49</sup> a obsahuje metylovú skupinu.<sup>45,47,50</sup> V prípade chlorofylu *b*<sup>49</sup> je to formylová skupina.<sup>45, 47, 50</sup>

Preto je rozumné predpokladať, že biosyntéza oboch chlorofylov prechádza v základe rovnakou cestou a že modifikácie daných postranných reťazcov sú len malým prídavkom.

Je dlho známe, že chlorofyl *a* sa objavil pred chlorofylom *b* v čase, keď nastal rozmach biosyntézy chlorofylu po ožiarení tmavorastúcich krytosemenných rastlín. Zjednodušene, biosyntéza chlorofylu *b* znamená transformáciu metylu na formyl.<sup>50</sup>

## 2) Karotenoidy

Karotenoidy tvoria skupinu bioaktívnych zlúčenín štruktúrne patriacich k tetraterpenoidom<sup>51</sup>, ktoré obsahujú polyénový reťazec (najčastejšie C40) s konjugovanými dvojitými väzbami (až 15).<sup>43</sup> Rastlinám dodávajú žlté, oranžové a červené sfarbenie<sup>41</sup>, okrem nich sú tiež prítomné v riasách a vo fotosyntetických baktériách, ktoré majú rozhodujúcu úlohu vo fotosyntéze, ale aj v nefotosyntetických batériách ako sú kvasinky či plesne, ktoré môžu pôsobiť ako obranné činitele proti rozkladu svetlom a kyslíkom. Tiež sú súčasťou

---

farebného zloženia niektorých vtákov, hmyzu, rýb či kôrovcov.<sup>52</sup>

Všeobecne platí, že rastliny ich nekumulujú v koreňoch. Zásobné korene mrkvy a sladkého zemiaku sú výnimky, u ktorých dochádza k hromadeniu  $\beta$ -karoténu, čím sú dôležitým zdrojom vitamínu A vo výžive človeka.<sup>43</sup>

Od anthokyanínov a betalainov sa odlišujú tým, že zohrávajú dôležitú úlohu v rastlinnom živote ako napr. svetlozberná funkcia, prenos energie na chlorofyl, fotoochranná funkcia v procese fotosyntézy či poskytovanie substrátov pre biosyntézu kyseliny abscisovej a iných hormónov pôsobiacich ako inhibítory rastu rastlín. Kyselina abscisová má taktiež dôležitú funkciu pri regulácii vodného režimu rastliny a chráni ju behom stresu z nedostatku vody.

Karotenoidy ukazujú kvalitatívne rozdiely, ktoré závisia na rastlinných orgánoch a druhoch. Napríklad zelené tkanivá väčšiny rastlín majú rovnaké zastúpenie karotenoidov ( $\beta,\epsilon$ -karotenoidy aj  $\beta,\beta$ -karotenoidy). Taktiež zeaxanthín, violaxanthín, antherxanthín, neoxanthín a luteín sú vždy prítomné v listoch a stonkách. Naopak karotenoidy obsiahnuté v nezelených tkanivách ukazujú výrazné zloženie závislé na rastlinných druhoch. Napr. paradajka (lat. *Solanum lycopersicum*) kumuluje obrovské množstvo lykopénu. Kapsanthín a kapsorubín, typické karotenoidy červenej papriky (lat. *Capsicum annuum*), obsahujú jeden až dva *acyl-cyklo-penthanólové* kruhy.<sup>43</sup> V plodoch sa často karotenoidy vyskytujú vo forme esterov s vyššími masnými kyselinami.

V prírode sa vyskytujú prevažne v *trans*-konfigurácii, hoci spracovanie ovocia a zeleniny spôsobuje nárast *cis*-izomérov z 10% na 39%. Tie sú v žalúdku z väčšej časti (až 97%) prevedené späť na *trans*-izoméry.

Karotenoidy sa rozdeľujú podľa štruktúry nasledovne:<sup>52</sup>

- a) karotény – uhl'ovodíkové (napr.  $\beta$ -karotén, lykopén)
- b) xanthofyly – oxidované (obsahujú napr. *hydroxy*-, *epoxy*- skupinu), ktoré sú derivátmi karoténov (napr. zeaxanthín, antheraxanthín, violaxanthín, neoxanthín, spirilloxanthín, echinenón, luteín)



---

## Biosyntéza karotenoidov

V plastidoch, kde dochádza k biosyntéze karotenoidov (*obr. 4*) sa syntetizuje C5 izoprénová jednotka, izopentenyl pyrofosfát (IPP), cez DOXP (*1*-deoxyxylulóza 5-fosfát) dráhu špecifickú práve pre túto organelu.

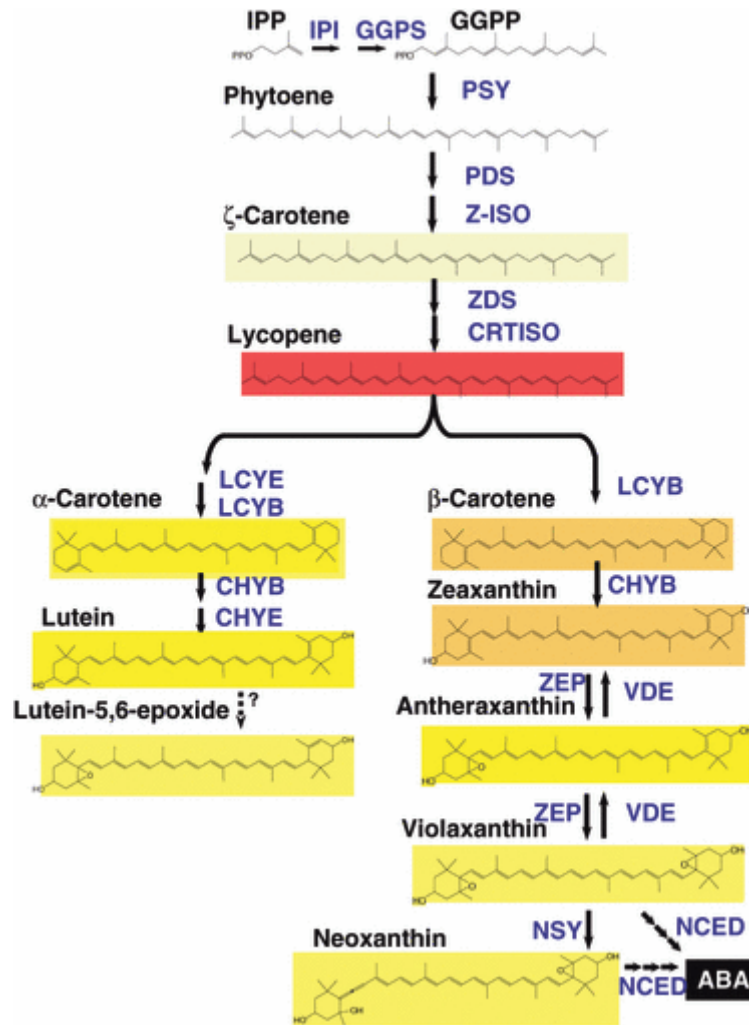
Predpokladá sa, že karotenogénne enzýmy môžu existovať v komplexoch a tiež v spojení s plastidovými membránami.

Princíp biosyntézy karotenoidov spočíva v tom, že štyri IPP jednotky kondenzujú na C<sub>20</sub> geranylgeranylpyrofosfát (GGPP). Spájaním dvoch GGPP molekúl pomocou fytoénsyntázy (PSY) dochádza k tvorbe fytoénu ako prvého C<sub>40</sub> karotenoidu.<sup>43,52</sup> Systém konjugovaných dvojitých väzieb sa následne zvyšuje v štyroch desaturačných reakciách pomocou dvoch štruktúrne podobných enzýmov, fytoéndesaturázy (PDS) a ζ-karoténdesaturázy (ZDS).

Takto vznikajú meziprodukty fytofluén, ζ-karotén, neurosporén a lykópén obsahujúce 5, 7, 9 a 11 konjugovaných dvojitých väzieb. Nárastom počtu týchto väzieb sa posúva absorpcia k dlhším vlnovým dĺžkam, v dôsledku čoho je vznikajúci fytoén a fytofluén bezfarebný, ζ-karotén svetložltý, neurosporén žltlooranžový a lykópén červený.<sup>53</sup>

Následná cyklizácia lykópénu predstavuje dôležitý bod vetvenia v celej biosyntéze, kedy sú formované dva významné produkty karotenoidov a to v závislosti na pozícii dvojitej väzby na cyklohexánovom kruhu.<sup>52</sup> Katalyzované sú lykópén-β-cyklázou (LCYB) a lykópén-ε-cyklázou (LCYE), pričom LCYE vo väčšine rastlín dodáva lykópénu jeden ε-kruh. Na základe tohto dochádza ku vzniku vetvy karotenoidov obsahujúcich jeden β-kruh a jeden ε-kruh (α-karotén a jeho deriváty) alebo vetvy obsahujúcich dva β-kruhy (β-karotén a jeho deriváty).<sup>43</sup>

α- a β-karotén sú ďalej modifikované pomocou hydroxylácie a epoxidácie poskytujúc množstvo štruktúrnych vlastností. Takto zoxidované deriváty sa nazývajú xanthofyly.<sup>54</sup>

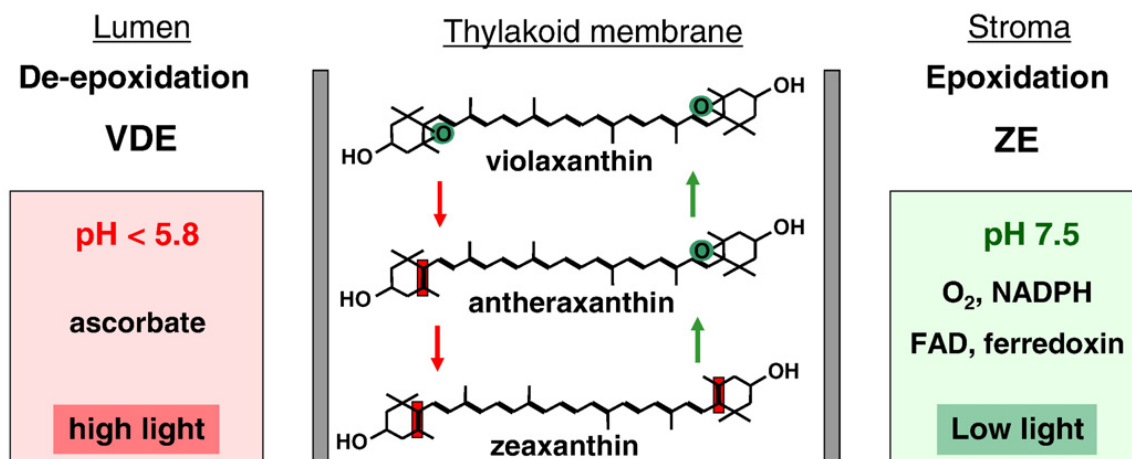


**Obr. 4** Biosyntéza karotenoidov <sup>43</sup> (Podrobný popis vid'. kap. 2.2.3.1, Karotenoidy - Biosyntéza karotenoidov; skratky vid'. Zoznam použitých skratiek a značiek)

### Xanthofylový cyklus

Vyššie rastliny sa musia adaptovať na dané množstvo svetla v ich životnom prostredí, aby ochránili funkcie fotosyntetického aparátu. Takáto adaptácia sa stáva kľúčovou v podmienkach, kde absorbovaný svetelný tok buď výrazne prevyšuje alebo obmedzuje fotosyntetickú kapacitu. Deje sa to v dôsledku toho, že táto adaptácia vyžaduje presnú rovnováhu medzi potrebným využitím absorbovaného svetla na fotosyntézu a bezpečnú likvidáciu potenciálne škodlivého nadmerného množstva svetelnej energie.<sup>55,56</sup>

Už v 50. rokoch 20. storočia bolo známe, že pod vplyvom silnej iluminácie sa koncentrácia xanthofylov v zelených listoch mení. Taktiež bolo známe, že zeaxanthín a antheraxanthín sa kumulujú, pričom množstvo violaxanthínu klesá. Tieto na svetle závislé reakcie zohrávajú dôležitú rolu vo fotoobrane rastlín a sú podstatou reverzibilnej transformácie violaxanthínu (dve *epoxy*- skupiny) na zeaxanthín (nula *epoxy*- skupín) cez intermediát antheraxanthín (jedna *epoxy*- skupina).<sup>57</sup> (obr. 5)



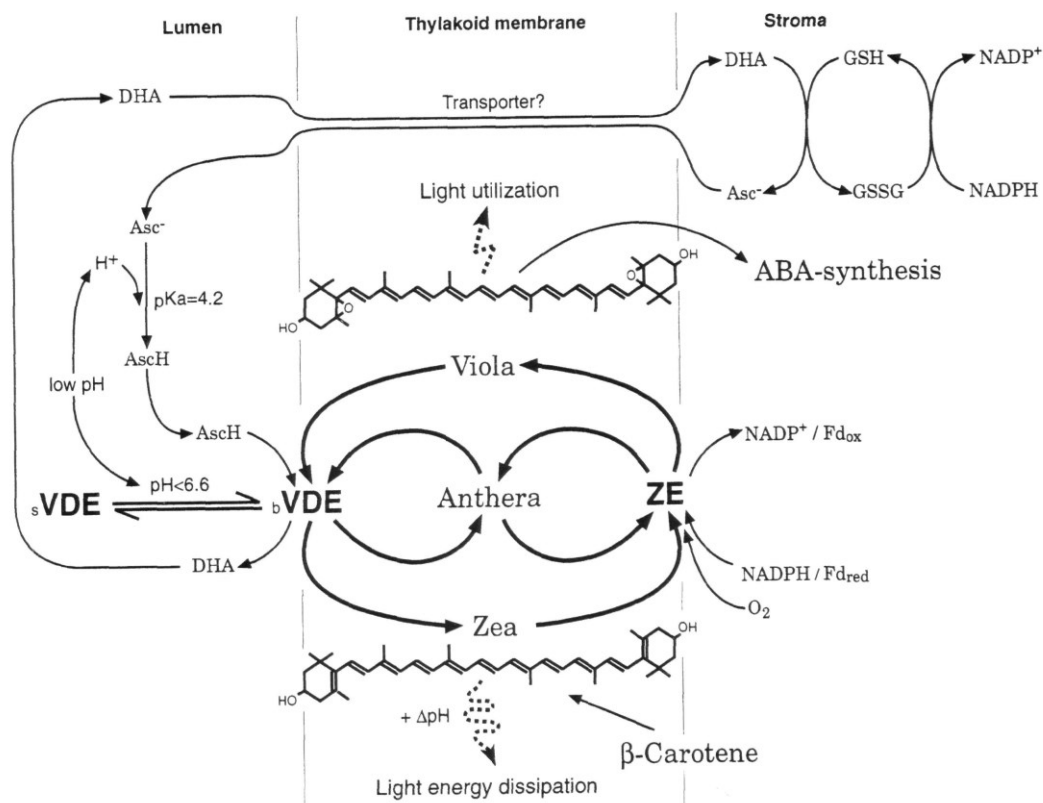
**Obr. 5** Xanthofylový cyklus<sup>58</sup> (Podrobný popis vid'. kap. 2.2.3.1, Karotenoidy – Xanthofylový cyklus; skratky vid'. Zoznam použitých skratiek a značiek)

Rastliny majú dobre vyvinuté fotoadaptačné a fotoobrané mechanizmy, ktorých podstatou je disipácia nadmerného množstva excitačnej energie vo forme tepla z fotosystému II, ktoré sa meria ako nefotochemické zhášanie (z angl. *NPQ* = *nonphotochemical quenching*) fluorescence chlorofylu *a* tohto fotosystému. *NPQ* mechanizmus je kontrolovaný pomocou *trans*-tylakoidného membránového pH gradientu a karotenoidov xanthofylového cyklu.<sup>55</sup>

Chemickou podstatou xantofylového cyklu (obr. 6) je teda de-epoxidácia violaxanthínu na zeaxanthín a jej spätná reakcia, epoxidácia zeaxanthínu na violaxanthín, ktoré sú katalyzované pomocou dvoch odlišných enzýmov s rôznymi substrátmi. Violaxanthíndeepoxidáza (VDE) funguje len počas stresu a je rýchlejšia. Spúšťa sa pH gradientom cez tylakoidnú membránu a okyslením lumenu tylakoidov. Zeaxanthíneepoxidáza (ZE) naopak pracuje stále, ale je pomalšia, čo je dôležité pre violaxanthín, ktorý sa v rastlinách skladuje mimo stresu a syntetizuje sa cez zeaxanthín. Bez stálej funkcie

zeaxanthíneoxidázy by nemohol vznikat'. Po ukončení stresu je VDE deaktivovaná a ZE pomaly premieňa zeaxanthín zase na violaxanthín.

Všetky zelené organizmy majú schopnosť xanthofylového cyklu s výnimkou fotosyntetických baktérií a rias obsahujúcich fykobylin ako napr. sinice, kryptomonády a červené riasy (okrem rodu *Gracilaria*).<sup>57</sup>



**Obr. 6** Molekulový mechanizmus xanthofylového cyklu<sup>59</sup> (Podrobný popis vid'. kap. 2.2.3.1, Karotenoidy – Xanthofylový cyklus; skratky vid'. Zoznam použitých skratiek a značiek)

Štúdiá tiež odhalili, že na transformáciu violaxanthínu na zeaxanthín je potrebné, aby boli splnené dva predpoklady. Prvým je, že redukčným kofaktorom deepoxidácie je kyselina askorbová. V jej prítomnosti je zeaxanthín tvorený v tylakoidoch počas iluminácie v médiu s pH 7. Táto reakcia môže byť spomalená pomocou „rozpojovačov“ ako CCCP (z angl. *carbonyl cyanid m-chlorophenylhydrazone*) alebo pomocou inhibítorov elektrónového

---

transportu ako je DCMU (z angl. *3-(3,4dichlorophenyl)-1,1dimethylurea*). Druhým predpokladom je významný pokles pH lumenu tylakoidov prostredníctvom svetelne závislého elektrónového transportu na hodnotu približne 5. Pozoruhodne úzky interval pH optima de-epoxidázy vykazuje maximálnu aktivitu pri hodnote 5,2 a pri  $\text{pH} \geq 7$  nie je vôbec aktívna.

Na druhej strane epoxidácia zeaxanthínu na violaxanthín, ktorá je závislá na prítomnosti kyslíka a  $\text{NADPH}_2$  je katalyzovaná oxygenázou so zmiešanou funkciou. Táto zeaxanthínepoxidáza vykazuje optimálne pH s hodnotou približne 7,5. Platí, že oba enzýmy xanthofylového cyklu sú aktívne na opačných stranách tylakoidnej membrány. Keďže oba enzýmy majú rôzne pH optimum (5,2 a 7,5), ich maximálna aktivita môže byť očakávaná v prítomnosti rozsiahleho protónového gradientu indukovaného svetlom prechádzajúceho tylakoidnou membránou za súčasného využitia askorbátu,  $\text{NADPH}_2$  a  $\text{O}_2$ .<sup>57</sup>

### **3) Flavonoidy**

Príroda, ktorá nás obklopuje je hlavne v letnom období prevažne zelená. Hoci väčšina odtieňov žltej je pre človeka príjemných, najfascinujúcejšie farby sú tie, ktoré dodávajú zelenej najhlbší kontrast. Ide o rôzne odtiene červenej a modrej. Takmer všetky farby tohto typu sa nachádzajú v kvetoch a plodoch v závislosti na prítomnosti jedného alebo viacerých skupín flavonoidov známych ako anthokyaníny.<sup>45</sup> Nachádzajú sa tiež v listoch a ako antioxidanty sa podieľajú na ochrane rastlín.

### **4) Betaláiny**

Pojem „betaláin“ bol zavedený v snahe opísať dve skupiny vo vode rozpustných vakuolárnych rastlinných pigmentov s obmedzenou distribúciou, obe úzko spojené chemicky aj biogeneticky <sup>45</sup> – červenofialové betakyaníny a žlté betaxanthíny.<sup>45, 60</sup> Tieto pigmenty zaujali veľkú pozornosť vďaka ich antioxidačnej kapacite a prevencii voči rakovine. Štruktúrne sú odvodené od *L*-tyrozínu a okrem kvetov a plodov tiež prispievajú sfarbeniu koreňov a listov rastlín.

Anthokyaníny a betaláiny sú dve rozdielne skupiny pigmentov a preto ich spolu nikdy nenájdeme v tej istej rastline.<sup>60</sup>

---

## 2.3 Heritabilita

Heritabilita alebo dedičnosť je formálne definovaná ako pomer odchýlok, konkrétne ako podiel celkovej odchýlky v populácii pre konkrétne meranie odobraté v konkrétnom čase alebo veku, čo je možné pripísať odchýlkam v genetických alebo celkových genetických hodnotách aditív. Predstavuje tiež istý koncept, ktorý sumarizuje ako veľmi je daný fenotyp záujmu dedičný, najmä s ohľadom na podobnosť potomstva a rodičov.<sup>61</sup>

Jednou z možností ako sa rastliny môžu vysporiadať so zmenou klimatických podmienok je fenotypová plasticita alebo schopnosť daného genotypu prinášať rôzne fenotypové hodnoty pre daný znak za rôznych environmentálnych podmienok.<sup>62</sup> Umožňuje populáciám vyrovnávať sa s nepriaznivými účinkami rýchlych klimatických zmien – aspoň v krátkodobom horizonte – a tým umožniť čas na vývojové zmeny.<sup>63</sup> Avšak fenotypová plasticita je s najväčšou pravdepodobnosťou účinná pri zvládaní slabých, krátkodobých, neoprávnených náhodných a nepredvídateľných výkyvov v životnom prostredí.<sup>64</sup> Tieto štúdie naznačujú, že rastliny z miernejších klimatických podmienok majú tendenciu získať vyššiu plasticitu ako rastliny z extrémnejšieho podnebia pri vyšších nadmorských výškach. Posudzovanie stupňa genetickej diferenciácie vs. charakteristickej plasticity z populácie v celom rade dobre definovaných prostredí je preto kľúčové pre pochopenie druhového potenciálu, aby reagoval na nové klimatické podmienky, keďže stupeň plasticity znakov (a pravdepodobne populačná diferenciácia v plasticite) sa líši medzi znakmi.<sup>65</sup>

Nielenže je známa zmena fyziológie rastlín pri abiotickom alebo biotickom strese, ale boli tiež identifikované zmeny v genóme. Nebolo však určené či rastliny po sebe nasledujúcich generácií pôvodných stresovaných rastlín zdedili schopnosť genómovej zmeny. Epigenetická vlastnosť zosilnenej homológnej rekombinácie by mohla byť prenášaná cez materského aj otcovského partnera a preukázala sa, že je dominantná.<sup>66</sup>

Z definície heritability vyplýva, že závisí od populácie, pretože tak ako variabilita aditívnych a neaditívnych genetických faktorov, tak aj environmentálny rozptyl sú špecifické pre populáciu. Genetická odchýlka závisí od segregácie v populácii alel, ktoré ovplyvňujú znaky, prítomnosť alel, veľkosti účinku zmien a spôsob génových účinkov. Všetky tieto premenné sa môžu v jednotlivých populáciách líšiť. Podobne môže byť rôznorodosť v oblasti životného prostredia rôzna v jednotlivých populáciách, preto dedičnosť v jednej populácii teoreticky predikuje dedičnosť rovnakého znaku v inej populácii. Avšak v praxi sa dedičnosť

---

podobných znakov často javí podobne v iných populáciách toho istého druhu alebo dokonca naprieč druhmi. Taktiež sa dedičnosť môže líšiť medzi pohlaviami a v rámci rovnakého znaku môže byť rôzna skôr či neskôr v živote.<sup>61</sup>

## 2.4 Kostrava červená (lat. *Festuca rubra* L.)

Slovo „*festuca*“ pochádzajúce z latinčiny znamená „stonka“ a prvýkrát ho použil Plínius starší na opis trávy. Dnes sa zaraďuje do čeľade lipnicovité (*Poaceae*), morfológicky rôznorodého komplexu poddruhov, ktorý je rozšírený v arktických a miernych oblastiach Ázie, Európy a Severnej Ameriky.<sup>67</sup> Taktiež sa nachádza v Mexiku, Afrike a na Novom Zélande.<sup>68</sup> Kostrava obýva širokú škálu ekologických lokalít a pôd z piesku, štrku a tiež okruhliakové pláže pozdĺž morského pobrežia až po vlhké lúky a rušivé pôdy od hladiny mora až po výšku 3350 m. Jej rast začína na začiatku jari, všeobecne sa spomaľuje v polovici leta a rastie intenzívne od konca leta až do zamrznutia. Rast v letnom období závisí od zrážok alebo zavlažovania.<sup>69</sup>

Kostrava červená (*obr. 7*) sa dobre prispôsobuje širokému spektru pôdných štruktúr, je mierne tolerantná voči salinite, no vyžaduje najmenej 40 mm ročných zrážok alebo dodatočné zavlažovanie. Taktiež toleruje pôdy s nízkou plodnosťou, je mierne odolná voči tieňom a môže byť náchylná na snehové formy v oblastiach s rozšíreným snehovým pokrytím. Dobre znáša kyslé až mierne alkalické pôdy (pH 4,5-7,5) a môže bez problémov zvládať jarné záplavy a niektoré zle odvodnené miesta.<sup>69</sup>



**Obr. 7** Kostrava červená (autor: Graham Calow, Frolesworth Lane, Claybrooke Magna)<sup>70</sup>

---

Využíva sa pri fytoremediácii pôd kontaminovaných priemyselnými činnosťami ako je ťažba, energetika a výroba paliva. Taktiež má schopnosť kumulovať kovy z medi, olova, mangánu a zinku z kontaminovaných pôd.<sup>71</sup>

## 2.5 Metódy

Medzi najčastejšie inštrumentálne metódy kvantitatívnej analýzy fenolických látok, rastlinných pigmentov a antioxidantných enzýmov patria hlavne metódy spektrofotometrické, chromatografické a elektromigračné.<sup>72</sup>

### 2.5.1 Fenolické látky

Hoci kvantitatívne stanovenie polyfenolov je obmedzované ich štruktúrnou zložitou a rôznorodosťou, na ich stanovenie v rastlinných extraktoch sa využíva viacero metód.<sup>73</sup>

V prípade stanovenia celkového obsahu polyfenolov sa najčastejšie využívajú spektrofotometrické metódy s Folin-Ciocalteuovým činidlom (roztok wolfrámových a molybdénových (zlúčenín), Folin-Denis činidlom (fosfomolybdén-fosforečná kyselina), test Pruskou modrou, upravený vanilínový test či spektrálna analýza v UV.<sup>74</sup>

Najrozšírenejšou metódou stanovenia určitej skupiny polyfenolov je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (z angl. *HPLC = High Performance Liquid Chromatography*). Analýza pomocou HPLC s detekciou „*diode array*“ boli separované fenolické zlúčeniny v bielom víne z rôznych krajín.

Viacerí odborníci však použili aj extrakciu na pevnej fáze (z angl. *SPE = Solid Phase Extraction*), čím vychádzali z čistejších a koncentrovanejších vzoriek. Okrem toho sa touto metódou uľahčila identifikácia antioxidantov a to tým, že sa zmenili podmienky pre vzorky a tiež tým, že boli odstránené interferujúce materiály.

Analýzou pomocou zónovej kapilárnej elektroforézy (z angl. *CZE = Capillary Zone Electrophoresis*) boli od seba separované rôzne fenolické zlúčeniny ako napr. katechín, epikatechín, quercetín a mnohé ďalšie.<sup>75</sup>

Všeobecne platí, že všetky kolorimetrické reakcie patria do UV/VIS



---

spektrofotometrie. Keďže pri týchto typoch reakcií je nutná účasť referenčnej vzorky, možno pomocou tohto stanovenia určiť celkovú koncentráciu fenolických hydroxylových skupín v rastlinných extraktoch.

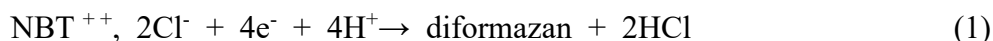
Mechanizmus tohto stanovenia spočíva v tom, že hydroxylové skupiny polyfenolov reagujú so špecifickým redoxným činidlom, Folin-Ciocalteuovým činidlom, za vzniku modrého chromofóru tvoreného komplexom fosfowolfrám-fosfomolybdén, ktorý možno stanoviť pomocou UV/VIS spektrofotometrie. Maximálna absorpcia chromofórov závisí od alkalického roztoku a koncentrácie fenolických zlúčenín.<sup>73</sup>

## 2.5.2 Antioxidačné enzýmy

### *Askorbátperoxidáza*

Superoxidový anión ( $O_2^-$ ) pôsobí ako jedoelektrónové redukčné činidlo vo viacerých reakciách ako napr. redukcia chinónu, tetranitromethánu, cytochrómu *c* a *nitro*-substituovaných aromatických zlúčenín ako nitrobluetetrazólium (NBT).

NBT je elektrofilná dikationická zlúčenina, ktorá je schopná ľahko prijímať elektróny od rôznych redukčných činidiel obsahujúcich  $O_2^-$ . Celková redukcia nitrobluetetrazólium chloridu vyžaduje štyri elektróny a štyri protóny (*rov. 1*).



Redukcia NBT na diformazan je sprevádzaná zánikom kladných nábojov, čo má za výsledok podstatné zníženie rozpustnosti a tiež narušenie tetrazolových kruhov s označenou modifikáciou absorpčného spektra vo viditeľnej oblasti a objavenie intenzívnej modrej farby, vďaka čomu je možné rozsah tejto redukcie merať spektrofotometricky.<sup>76</sup>

### *Glutathiónperoxidáza*

Pre stanovenie aktivity glutathiónperoxidázy sa používajú dva typy metód. Jeden zahŕňa priame meranie obsahu glutathiónu (GSH) bez úbytku v danom čase polarografickou analýzou GSH alebo metódou dithionitrobenzovéj kyseliny. Výhodou druhej metódy je schopnosť glutathiónreduktázy reagovať s nikotínamidadenínukleotidfosfátom (NADPH), čím dochádza k regenerácii GSH z oxidovaného GSH. Ďalším typom stanovenia aktivity

---

glutathióperoxidázy je pokles NADPH, ktorý sa kontinuálne meria spektrofotometricky, zatiaľ čo koncentrácie GSH v enzymatickom cykle zostávajú v podstate konštantné.<sup>77</sup>

### ***Superoxid dizmutáza***

Väčšina súčasne používaných metód pre stanovenie aktivity superoxid dizmutázy v tkanivových extraktoch je založená na schopnosti týchto enzýmov inhibovať reakciu riadenú superoxidom. Rozsah, v ktorom je znížená rýchlosť reakcie možno považovať za nepriame meranie enzymatickej aktivity. Generovanie superoxidu možno dosiahnuť enzymatickými alebo neenzymatickými systémami, následne musí byť navrhnutá vhodná detekčná metóda a to buď kolorimetrická, polarografická alebo luminometrická.<sup>78</sup>

### ***Kataláza***

Jednou z významných funkcií katalázy je rozklad  $H_2O_2$  za vzniku  $H_2O$  a  $O_2$ . Na rozdiel od reakcií prebiehajúcich pri nasýtení substrátu patrí tento rozklad medzi reakcie 1. rádu, kedy je rýchlosť vždy úmerná množstvu prítomných peroxidov. Aby sa zabránilo rýchlemu poklesu počiatočnej rýchlosti reakcie, musí stanovenie prebehnúť s relatívne nízkymi koncentraciami  $H_2O_2$  (asi 0,01 M). Najčastejšou metódou vzhľadom na použitý biologický materiál je ultrafialová (UV) spektrofotometria. Titračné metódy sú vhodné pre porovnávacie štúdie. U veľkých sérií meraní existujú buď jednoduché screeningové testy, ktoré poskytujú rýchlu indikáciu približnej katalázovej aktivity alebo automatizované metódy.<sup>79</sup>

## **2.5.3 Pigmenty**

Keďže pigmenty dosahujú určitého sfarbenia, možno ich podľa klasických metód stanoviť pomocou spektrofotometrie s použitím organických rozpúšťadiel, ktoré majú chemický pôvod a vhodnú polaritu.<sup>80</sup>

Avšak v posledných rokoch sa najviac používa HPLC separácia. Vďaka vysoko komplexným matriciam pigmentov v rastlinných vzorkách a podobným absorbným maximám príbuzných pigmentov HPLC umožňuje presné kvantitatívne stanovenie rastlinných pigmentov.<sup>72</sup>

Stanoveniu rastlinných pigmentov predchádza extrakcia v organických rozpúšťadlách ako napr. 90 % acetón, 100 % acetón, acetón-methanol-voda (80:15:5), dimethylsulfoxid

---

(DMSO), DMSO-90% acetón, *N,N*-dimethylformamid (DMF), dichloromethánethanol (9:1), studený methanol, chloroform a iné. Najčastejšie sa využíva 90% acetón a studený methanol.

Kvôli nežiadúcemu vplyvu svetla na pigmenty musí extrakcia prebiehať za tlmeného svetla a nízkych teplôt.

Obvykle chromatografia s reverznou fázou prebieha v prítomnosti lineárneho gradientu mobilnej fázy z roztoku methanol-voda . Špecifické zloženie je závislé na type separácie, napr. amóniumacetát, acetonitril, acetón či ethylacetát.<sup>72</sup>

---

## 3 Experimentálna časť

### 3.1 Chemikálie

- Acetonitril (rada *LiChrosolv*®, gradient *Grade for Liquid Chromatography*,  $\geq 99,9\%$ , Merck)
- Acetón (rada *LiChrosolv*®,  $\geq 99,8\%$ , Merck)
- Chelaton III. (p.a., Lachema)
- Dusík (4.0, Linde gas, Praha)
- Ethylacetát (rada *LiChrosolv*®, gradient *Grade for liquid chromatography*,  $\geq 99,8\%$ , Merck)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (2NM, Sigma-Aldrich)
- Hepes (*Molecular Biology Grade*, p.a., Promega)
- Hydroxid sodný (p.a., Lach-ner)
- Kvapalný dusík (Linde gas, Praha)
- Kyselina gallová (gradient *for synthesis*,  $> 98\%$ , Sigma)
- Kyselina L-askorbová (p.a., Sigma)
- Methanol (rada *LiChrosolv*®, gradient *Grade for Liquid Chromatography*,  $\geq 99,9\%$ , Merck)
- Peroxid vodíka (p.a., Penta)
- Redestilovaná voda
- Uhličitan sodný (p.a., Litolab)

### 3.2 Inštrumentácia

- Kvapalinový chromatograf HPLC (ECOM, Česká republika)
  - Kolóna s reverznou fázou (Watrex Nucleosil 120-5-C18, 5  $\mu\text{m}$  veľkosť častíc, 125×64 mm, ECOM, Praha)
  - Detektor absorpčný (Sapphire)
  - Pumpa gradientová (Beta 10)
  - Degasér vákuový (DG 3014)

- 
- Termostat (Column LCO 102)
  - Autosampler (HTA 300 L)
  - Software (Clarity)
  - Spektrofotometer (Spectrophotometer U-3300, Hitachi, Japonsko)
  - Spektrofotometer (Helios  $\alpha$ , ThermoSprectronic, USA)
  - Analytické váhy (Kern Abj 220-4NM, Nemecko)
  - Vortex (Biosan Vortex V-1 plus, Lotyšsko)
  - Centrifúga (Sigma Laboratory centrifuges, Nemecko)
  - Mikrocentrifúga (Sigma, Nemecko)
  - pH-meter (Jenway 3510, Veľká Británia)
  - Trepáčka (IKA labortechnik KS 250 basic, Nemecko)
  - Magnetické miešadlo (MM 2A, Laboratórne prístroje, Česká republika)

### 3.3 Biologický materiál

Kostrava červená (lat. *Festuca rubra* L.) (vid' kap. 2.4, *Kostrava červená*)

### 3.4 Pracovný postup

Samotnému experimentálnemu spracovaniu biologického materiálu určeného pre túto diplomovú prácu predchádzal zber vzoriek rastliny *Festuca rubra* L.z dvanástich populácií v juhozápadnom Nórsku (*obr. 8*), pričom z každej populácie bolo odobratých desať genetických jedincov. Na základe hodnôt teplôt a vlhkostí, v ktorých sa daná lokalita nachádzala boli vzorky rozdelené do dvoch sérií. „Oranžová“ séria obsahovala rastliny zo štyroch „krajných“ populácií, to znamená „najchladnejšie najsuchšie“, „najchladnejšie najvlhšie“, „najteplejšie najsuchšie“ a „najteplejšie najvlhšie“ prostredie. „Zelená“ séria predstavovala rastliny zo zvyšných ôsmich populácií, ktoré sa nachádzali v podmienkach, kde boli teploty a vlhkosti medzi „krajnými“ hodnotami.

V každom klimaboxe bol od tohto jedinca pestovaný jeden klon. Pri odbere bolo vybratých vždy päť klonov z klimaboxu, aby neboli rastliny príliš dlho v zmenených podmienkach. Odbery prebiehali počas štyroch dní (27.6.-1.7.2015) medzi 10:00 a 12:30. Z

každého klonu boli najprv odobrané tri listy na genetické analýzy. Potom bola celá biomasa odstrihnutá 2,5 cm nad povrchom, boli odstrihnuté zaschnuté špičky a odstránené všetky suché časti. Čistá živá biomasa bola nastrihaná približne na 3 cm kúsky, zvážená a hodnota bola zapísaná do kolónky „celková váha“. Ďalej bolo do eppendorfky odobraných asi 15 cm biomasy (napr. 5x3cm kúskov). Eppendorfka bola vhozená do tekutého dusíka. Zvyšná biomasa bola rozdelená na tri vzorky. Zo vzoriek č.1 a č.2 bolo odobraté v rozmedzí 350-600 mg. Vzorka č.3 sa skladala zo zvyšnej biomasy. Bola zaznamenaná váha každej vzorky. Vzorky boli zabalené do alobalu. Vo vnútri balíčku bola cedulka s kódom vzorky a na balíčku bol kód napísaný znova. Balíčky boli vhozené do tekutého dusíka. V prípade, že bolo biomasy veľké množstvo a na vzorku č.3 by jej ostalo toľko, že by sa to nedalo zabaliť, tak sa časť biomasy vyhodila. Ak bolo biomasy málo, odobralo sa na toľko vzoriek, na koľko to vyšlo. Obvykle to znamenalo, že vzorka č.3 nebola vytvorená. Občas nebola vytvorená ani vzorka č.2. Vzorky boli ďalej skladované pri teplote -80 °C.

Table 1. Altitude, annual precipitation, summer temperature, number of plots sampled and mean  $\pm$  standard deviations of predictor variables at alpine, sub alpine, and boreal grassland sites along precipitation gradients (low [1] to high [4]) in southern Norway.

Site	Site name	Altitude (m a.s.l.)	Precip (mm)	Temp (°C)	No plots	pH	LOI (%)	Moisture (%)	Vegetation height (cm)	Litter cover (%)	Bryophyte cover (%)
ALPINE 1	Ulvhaugen	1208	596	6.17	20	5.7 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 2.4	37.5 $\pm$ 5.7	3.6 $\pm$ 1.1	17.6 $\pm$ 7.1	13.0 $\pm$ 13.7
ALPINE 2	Låvisdalen	1097	1321	6.45	20	5.9 $\pm$ 0.2	8.2 $\pm$ 2.7	40.0 $\pm$ 5.4	3.5 $\pm$ 1.3	12.4 $\pm$ 3.4	17.1 $\pm$ 8.5
ALPINE 3	Gudmesdalen	1213	1925	5.87	19	6.1 $\pm$ 0.2	15.3 $\pm$ 4.3	50.8 $\pm$ 6.9	4.6 $\pm$ 2.2	15.0 $\pm$ 5.5	20.4 $\pm$ 25.4
ALPINE 4	Skjellingahaugen	1088	2725	6.58	10	6.1 $\pm$ 0.6	7.1 $\pm$ 3.8	47.6 $\pm$ 6.6	4.1 $\pm$ 0.9	12.4 $\pm$ 6.9	28.0 $\pm$ 16.9
SUB-ALPINE 1	Årøst	815	789	9.14	20	5.4 $\pm$ 0.2	9.1 $\pm$ 3.1	33.1 $\pm$ 5.2	3.3 $\pm$ 1.2	11.3 $\pm$ 4.1	17.1 $\pm$ 17.1
SUB-ALPINE 2	Hegsete	700	1356	9.17	20	5.2 $\pm$ 0.2	12.9 $\pm$ 0.8	36.5 $\pm$ 1.5	8.9 $\pm$ 2.8	13.2 $\pm$ 6.2	34.9 $\pm$ 14.5
SUB-ALPINE 3	Rambaera	769	1848	8.77	18	5.4 $\pm$ 0.3	10.0 $\pm$ 3.2	37.5 $\pm$ 7.4	5.3 $\pm$ 2.5	11.4 $\pm$ 4.0	29.9 $\pm$ 17.8
SUB-ALPINE 4	Veskre	797	3029	8.67	10	5.8 $\pm$ 0.2	13.4 $\pm$ 2.5	50.2 $\pm$ 3.8	4.1 $\pm$ 1.2	8.2 $\pm$ 3.2	25.4 $\pm$ 17.2
BOREAL 1	Fauske	589	600	10.3	10	5.3 $\pm$ 0.1	10.7 $\pm$ 1.4	34.8 $\pm$ 3.0	9.4 $\pm$ 2.6	15.3 $\pm$ 5.5	9.7 $\pm$ 6.9
BOREAL 2	Vikesland	474	1161	10.55	10	5.2 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 2.1	35.0 $\pm$ 2.8	8.6 $\pm$ 4.1	16.1 $\pm$ 7.5	50.1 $\pm$ 20.1
BOREAL 3	Arhelleren	431	2044	10.60	10	5.2 $\pm$ 0.1	10.1 $\pm$ 1.3	43.8 $\pm$ 2.0	15.9 $\pm$ 5.2	10.2 $\pm$ 2.8	41.9 $\pm$ 22.9
BOREAL 4	Øvstedal	346	2923	10.78	5	5.3 $\pm$ 0.2	10.1 $\pm$ 3.7	31.5 $\pm$ 5.7	11.9 $\pm$ 2.8	9.1 $\pm$ 4.1	40.7 $\pm$ 22.8

LOI refers to Loss-On-Ignition, a measure of soil organic matter.

doi:10.1371/journal.pone.0130205.t001

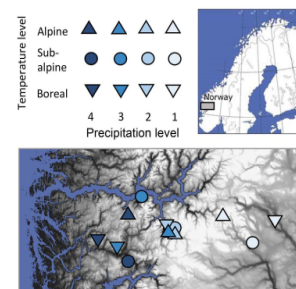


Fig 1. Map and study design. Location of the twelve study sites along temperature and precipitation gradients in the fjord landscape of southern Norway.

doi:10.1371/journal.pone.0130205.g001

PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0130205 June 19, 2015

**Obr. 8**  Mapa zberu modelovej rastliny *Festuca Rubra* L. (vpravo) s tabuľkou jednotlivých lokalít a príslušných podmienok (vľavo) <sup>81</sup>

---

## 1) Stanovenie askorbátperoxidázy

### *Príprava roztokov*

- Extrakčný pufr, pH = 7,8

Zloženie:

- 0,1M Tris-HCl
- 0,001 M DTT
- 0,001 M EDTA
- 1% Triton-X-100
- 0,005 M kyselina askorbová (Mr = 176,1)

- 0,1 M Hepes-EDTA pufr, pH = 7,0

Zloženie: 47,66 g Hepes + 74,6 mg Na<sub>2</sub>EDTA/2000 ml H<sub>2</sub>O

- Každý deň čerstvé roztoky:

- 176 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (konečná koncentrácia 0,88 mM)

Zloženie: 200µl konc. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 10 ml H<sub>2</sub>O

- 30 mM Na-askorbát (konečná koncentrácia 0,50 mM)

Zloženie: 29,7 mg askorbát/ 5 ml H<sub>2</sub>O

### *Extrakcia*

Vzorky rastliny boli pred samotným extrahovaním udržiavané v malom množstve kvapalného dusíka. Jednotlivé vzorky boli rozomielané v trecej miske, kde bol na začiatok tiež pridaný kvapalný dusík na rýchle rozdrvenie. Potom bolo pridaných 5 ml extrakčného pufru a rozomielané ďalej. Nakoniec sa pridalo trochu polyvinylpyrrolidonu (PVP) a extrakt bol preliaty do pripravenej plastovej skúmavky. Keď bola vyextrahovaná štvorica, prípadne trojica vzoriek, boli ponechané po dobu 30 min v ľade a v tme. Potom boli prenesené do centrifúgy po dobu 10 min pri 12 111 otáčkach. Po skončení sa zelený supernatant preliat do sklenenej skúmavky, odkiaľ bol celý obsah rozpipetovaný do eppendorfiiek v rovnakom množstve. Všetky eppendorfky boli uchovávané v mrazáku pri teplote -20 °C až do analýzy.

### **Príprava vzorky**

Každá vzorky bola pripravená v zložení a v poradí ako je uvedené v *tab. 1*.

**Tab. 1** Zloženie, objemy a konečné koncentrácie látok použitých k analýze referenčného roztoku a vzorky

Roztok	<i>c</i> (koneč.)	Referenčný roztok	Vzorka
1. 0,1 M HEPES-EDTA pufr, pH=7,0	0,1 M	2,935 ml	2,915 ml
2. 30 mM Na –askorbát	0,5 mM	50 µl	50 µl
3. Extrakt	-	-	20 µl
4. 176 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,88 mM	15 µl	15 µl

Pred meraním bola každá vzorka rýchlo pretrepaná parafilmom a následne vložená do spektrofotometra.

### **Analýza**

V programe *UV Solutions 2.2* boli nastavené všetky potrebné parametre spektrofotometra (*tab. 2*), bol zapnutý termostat, UV lampa a prívod vody. Do kremennej kyvety s objemom 3 ml a hrúbkou 1 cm bol najprv napipetovaný referenčný roztok, po ňom vzorka, do ktorej bolo vhodene miešadlo. Analýza prebiehala počas 60 s 3-4x podľa získanej hodnoty. Všetky dáta boli zaznamenané do tabuľky.

**Tab. 2** Parametre spektrofotometra

Parameter	Hodnota	Jednotka
Vlnová dĺžka	290	nm
Počiatkový čas	0	s
Konečný čas	60	s
Teplota termostatu	25	°C



---

## 2) Stanovenie fenolických látok

### *Extrakcia*

10 mg suchej vzorky alebo 100 mg čerstvej vzorky sa rozotrela s kvapalným dusíkom a extrahovalo sa najprv v 1 ml 80% methanolu a zvyšok v tretej miske ďalším 0,5 ml 80% methanolu. Oba extrakty sa spojili, nechali sa 1-2 hod na trepačke a centrifugovali 5 min pri 10 500 otáčkach. Číry supernatant sa preliat do čistej eppendorfky a uchovával sa v mrazáku pri teplote -20°C až do analýzy.

### *Príprava vzorky*

Do prázdnej eppendorfky sa napipetovalo 50 µl extraktu, 450 µl destilovanej vody a 25 µl Folin-Ciocalteuovho činidla. Zmes sa pretrepala a nechala 5-10 min reagovať. Potom sa pridalo 975 µl 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a opäť sa pretrepalo.

### *Príprava kalibračných roztokov*

Postupovalo sa rovnako ako pri príprave vzoriek, ale namiesto 50 µl extraktu sa pridávalo 50 µl roztoku kyseliny gallovej s koncentráciami 0, 50, 100, 150, 250 a 500 mg/l.

### *Analýza*

Najprv boli v programe *Vision 32* skontrolované parametre, nastavená vlnová dĺžka 765 nm a počet štandardov 6. Následne boli zmerané hodnoty všetky kalibračných roztokov kyseliny gallovej a overená kalibračná krivka. Nakoniec boli zmerané rovnakým spôsobom všetky vzorky a získané výsledky boli prepočítané na ekvivalent kyseliny gallovej.

## 2) Stanovenie rastlinných pigmentov

### *Extrakcia a príprava vzorky*

Približne 5 mg lyofylizovaných listov rastliny bolo zvážených pomocou analytických váh a následne extrahovaných v tretej miske pomocou acetónu (približne 1 ml). Kvantitatívne bol extrakt prevedený do eppendorfky a centrifugovaný počas 5 min pri 10 500 otáčkach (7 500 x g) a pri laboratórnej teplote. Potom boli extrakty sušené pomocou plynného dusíka v tmavých vialkach na stojane s ihlami, až kým sa acetón úplne nevysušil. Vialky boli

uzavreté a skladované v mrazáku pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$ , kde boli uchovávané až do merania. Pred analýzou boli vzorky vždy rozpustené v 300  $\mu\text{l}$  acetónu.

### *Analýza*

Na chromatografe boli nastavené všetky potrebné parametre (*tab. 3*). Chromatografia prebiehala za účasti mobilných fáz v zložení uvedenom v *tab. 4*.

**Tab. 3** Parametre HPLC

Parameter	Hodnota	Jednotka
Prietoková rýchlosť	1	ml/min
Teplota nástriku	25	$^{\circ}\text{C}$
Teplota detektora	25	$^{\circ}\text{C}$
Teplota kolóny	25	$^{\circ}\text{C}$
Vlnová dĺžka detektora	445	nm
Frekvencia zberu dát detektora	50	Hz
Doba analýzy	25	min
Pracovný tlak	10	MPa
Maximálny tlak	40	MPa

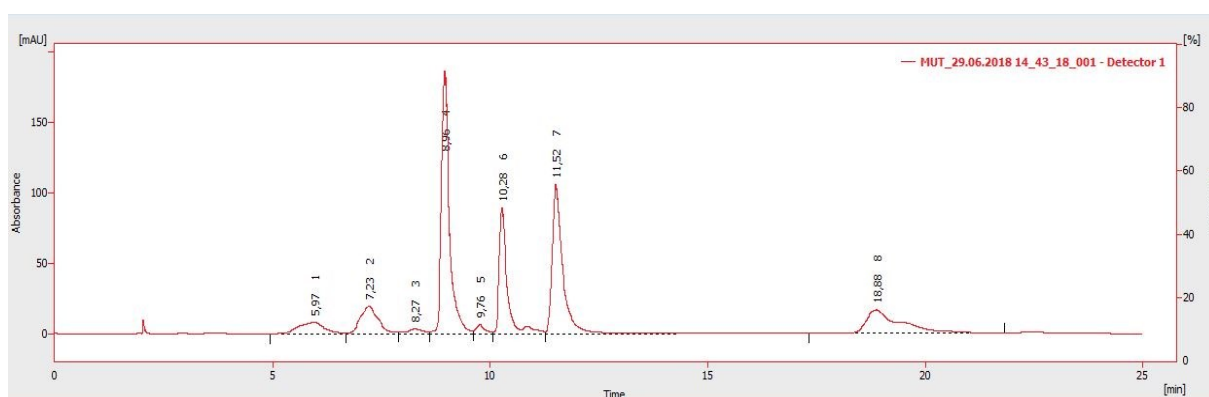
**Tab. 4** Zloženie mobilných fáz HPLC. Najprv prebiehala analýza v prítomnosti mobilnej fázy A izokraticky (0-2 min), potom prebiehal lineárny gradient A $\rightarrow$ B (2-6 min) a nakoniec za použitia mobilnej fázy B opäť izokraticky (6-25 min).

Mobilná fáza	Zloženie	Pomer rozpúšťadiel
A	Acetonitril/Methanol/H <sub>2</sub> O	80:12:10
B	Methanol/Ethylacetát	95:5

## 4 Výsledky a diskusia

Všetky použité vzorky rastliny *Festuca rubra* L. boli zozbierané z dvanástich lokalít v juhozápadnej časti Nórska (obr. 8) a následne rozdelené do dvoch sérií pre potrebu riešenia grantu. „Oranžová“ séria obsahovala rastliny z „krajných“ lokalít, ktorých klimatické podmienky sú uvedené v tab. 5. Keďže „zelenú“ sériu tvorili rastliny z lokalít, ktoré sa na gradientoch teploty a ročných zrážok nenachádzali na extrémoch, nešlo o prioritnú sériu a preto sa v rámci tejto práce nebude o nich ďalej zmieňovať.

Obsah a zloženie rastlinných pigmentov (hlavne chlorofylov a karotenoidov) v rastlinnom organizme je dôležitým indikátorom stavu fotosyntetického aparátu. Všetky pigmenty prítomné vo *Festuca Rubra* L. boli separované pomocou HPLC, o čom hovorí získaný chromatogram (obr. 9) s príslušnými retenčnými časmi. Taktiež ich možno rozdeliť do viacerých skupín, pričom každá z nich je špecifická svojou funkciou a lokalizáciou vo fotosyntetickom aparáte.



**Obr. 9** Chromatogram jednotlivých pigmentov prítomných vo *Festuca Rubra* L. získaný HPLC analýzou (Parametre sú uvedené v tab. 3, Zloženie a gradient mobilných fáz je uvedený v tab. 4; 1 = neoxanthín, 2 = violaxanthín, 3 = antheraxanthín, 4 = luteín, 5 = zeaxanthín, 6 = chlorofyl b, 7 = chlorofyl a, 8 =  $\beta$ -karotén)

Pre lepší prehľad sú ďalej uvedené experimentálne podmienky, ktoré boli nastavené v daných v klimaboxoch (tab. 5) a popis prírodných lokalít jednotlivých populácií rastlín (tab. 6). Farebné rozdelenie je zachované aj u následujúcej prezentácii výsledkov.

**Tab. 5** Teplota a úhrn ročných zrážok v rámci jednotlivých podmienok „krajných“ lokalít „oranžovej“ série použité pre pestovanie v klimaboxoch

Podmienky	Teplota (°C)	Ročné zrážky (mm)
Vlhko, zima	6,5	2700
Vlhko, teplo	10,5	2700
Sucho, zima	6,5	600
Sucho, teplo	10,5	600

**Tab. 6** Podmienky jednotlivých lokalít a klimaboxov (tučným písmom sú označené lokality s optimálnymi podmienkami pre daný klimabox)

Lokalita	Podmienky lokality	Klimabox	Podmienky klimaboxu
<b>Skjellingahaugen</b>	<b>vlhko, zima</b>	A	<b>vlhko, zima</b>
Ovstedalen	vlhko, teplo	A	vlhko, zima
Ulvehaugen	sucho, zima	A	vlhko, zima
Fauske	sucho, teplo	A	vlhko, zima
Skjellingahaugen	vlhko, zima	B	vlhko, teplo
<b>Ovstedalen</b>	<b>vlhko, teplo</b>	<b>B</b>	<b>vlhko, teplo</b>
Ulvehaugen	sucho, zima	B	vlhko, teplo
Fauske	sucho, teplo	B	vlhko, teplo
Skjellingahaugen	vlhko, zima	C	sucho, zima
Ovstedalen	vlhko, teplo	C	sucho, zima
<b>Ulvehaugen</b>	<b>sucho, zima</b>	<b>C</b>	<b>sucho, zima</b>
Fauske	sucho, teplo	C	sucho, zima
Skjellingahaugen	vlhko, zima	D	sucho, teplo
Ovstedalen	vlhko, teplo	D	sucho, teplo
Ulvehaugen	sucho, zima	D	sucho, teplo
Fauske	sucho, teplo	D	sucho, teplo

**Tab. 7** Obsah jednotlivých rastlinných pigmentov separovaných pomocou HPLC (tučným písmom sú označené lokality s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6)

Neoxanthín	Violaxanthín	Antheraxanthín	Luteín	Zeaxanthín	$\beta$ -karotén	Chlorofyl a	Chlorofyl b
[ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW]							
<b>85,556</b>	<b>97,014</b>	<b>5,592</b>	<b>183,842</b>	<b>15,429</b>	<b>139,681</b>	<b>195,837</b>	<b>68,393</b>
83,829	84,808	6,005	173,778	17,042	135,168	190,322	74,127
84,940	82,491	6,083	176,953	17,433	136,880	182,905	69,086
98,615	96,332	6,441	191,785	20,807	147,674	192,699	82,193
96,000	86,506	5,157	199,638	17,431	132,965	200,095	77,454
<b>103,641</b>	<b>97,807</b>	<b>5,407</b>	<b>192,331</b>	<b>13,789</b>	<b>152,760</b>	<b>213,708</b>	<b>83,182</b>
96,205	90,322	5,500	185,796	15,334	145,512	192,953	73,812
99,453	89,789	6,127	185,297	20,037	145,512	192,155	80,731
74,171	71,363	11,529	152,757	40,066	122,998	166,080	73,926
87,009	78,092	8,595	146,262	35,604	126,658	159,250	65,936
<b>110,735</b>	<b>96,245</b>	<b>6,673</b>	<b>195,796</b>	<b>23,538</b>	<b>154,726</b>	<b>221,278</b>	<b>86,030</b>
102,991	87,819	6,814	183,786	22,967	146,085	196,249	77,20
74,393	79,554	10,634	120,169	45,538	115,864	159,688	75,60
94,786	79,269	8,176	139,381	35,824	128,256	159,081	68,059
108,940	98,228	6,392	185,442	22,396	166,405	223,244	82,073
<b>123,350</b>	<b>98,996</b>	<b>5,624</b>	<b>222,854</b>	<b>17,593</b>	<b>162,842</b>	<b>216,371</b>	<b>81,638</b>

**Tab. 8** Hodnoty ďalších parametrov získaných výpočtom. (Chl a+b = celkové množstvo chlorofylu, Chl a/b = pomer oboch chlorofylov, x+c = celkové množstvo xanthofylov a chlorofylov, x = xanthofily, V+A+Z = pigmenty xanthofylového cyklu, DEPS = stupeň deepoxidácie vypočítaný ako  $DEPS = (0,5 * A + Z) / (A + Z + V)$ , DEPSC = stupeň deepoxidácie vzťahujúci sa na obsah chlorofylu vypočítaný ako  $DEPSC = DEPS / Chl(a+b)$ ; tučným písmom sú označené lokality s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6)

Chl a+b	Chl a/b	x+c	x	V+A+Z	DEPSC	DEPS
[ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW]	[Rel.u.]	[ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW]	[ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW]	[ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW]	[Rel.u.]	[Rel.u.]
<b>264,230</b>	<b>2,863</b>	<b>527,112</b>	<b>387,432</b>	<b>118,034</b>	<b>0,069</b>	<b>0,154</b>
264,450	2,567	500,630	365,462	107,855	0,076	0,186
251,992	2,648	504,780	367,901	106,007	0,082	0,194
274,892	2,363	561,654	413,980	123,580	0,088	0,196
277,549	2,584	537,696	404,731	109,093	0,072	0,183
<b>296,891</b>	<b>2,571</b>	<b>565,735</b>	<b>412,975</b>	<b>117,003</b>	<b>0,056</b>	<b>0,141</b>
266,765	2,614	538,669	393,157	111,156	0,068	0,163
272,886	2,399	546,216	400,705	115,954	0,085	0,202
240,006	2,268	472,884	349,887	122,958	0,191	0,373
225,186	2,424	482,220	355,561	122,291	0,178	0,326
<b>307,309</b>	<b>2,573</b>	<b>587,714</b>	<b>432,988</b>	<b>126,457</b>	<b>0,088</b>	<b>0,213</b>
273,458	2,548	550,463	404,377	117,600	0,097	0,225
235,328	2,111	446,152	330,288	135,726	0,216	0,375
227,140	2,344	485,692	357,437	123,270	0,176	0,324
305,317	2,720	587,803	421,398	127,016	0,084	0,202
<b>298,009</b>	<b>2,653</b>	<b>631,260</b>	<b>468,418</b>	<b>122,214</b>	<b>0,069</b>	<b>0,167</b>

**Tab. 9** Obsah fenolických látok a aktivita APX získané spektrofotometricky (tučným písmom sú označené lokality s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6)

Fenolické látky	APX
[ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW]	[ $\Delta 290/\text{min}/\text{mg}$ ]
<b>116,69</b>	<b>2,716</b>
103,89	4,900
93,990	5,944
99,660	6,610
98,080	3,390
<b>96,960</b>	<b>4,161</b>
80,170	7,409
67,740	5,937
81,220	4,707
85,590	5,319
<b>97,120</b>	<b>8,152</b>
95,210	4,747
133,280	5,420
120,130	8,126
130,630	8,474
<b>121,680</b>	<b>6,548</b>

### **Chlorofyly**

Ako uvádzajú viaceré literárne zdroje, chlorofyl *a* a chlorofyl *b* patria k hlavným svetlozberným pigmentom a nachádzajú sa tiež v reakčných centrách (PSI a PSII). Zároveň platí, že ak je do reakčného centra privedený nadbytok energie, chlorofyl sa začne na obranu degradovať.

Tento fakt možno potvrdiť na *obr. 10*, ktorý znázorňuje, že v klimaboxe C (sucho/zima) došlo k poklesu chlorofylu *a* až o 28% oproti lokalite, v ktorej boli v rámci tohto

---

klimaboxu nastavené optimálne podmienky. V klimaboxe D (sucho/teplo) kleslo množstvo chlorofylu *a* o 26% oproti optimu. Avšak v klimaboxe A (vlhko/teplo) a B (vlhko/zima) nebol nameraný pokles chlorofylu *a* viac ako o 10% v porovnaní s optimom v rámci daného klimaboxu.

Podobné výsledky boli získané pri stanovení chlorofylu *b* (*obr.11*). Všeobecne platí, že celkové množstvo chlorofylu *b* prítomného v reakčných centrách fotosyntetického aparátu rastliny v porovnaní s chlorofylom *a* je podstatne menšie. Z analýz teda vyplýva, že v klimaboxe D bol zaznamenaný najvyšší pokles tohto pigmentu a to najviac o 23% oproti optimu, v klimaboxe C najviac o 11% a vo zvyšných dvoch klimaboxoch neklesli hodnoty aktivít chlorofylu *b* pod významnú hranicu, podobne ako v prípade chlorofylu *a*.

Tretím dôležitým faktorom, ktorý hovorí o tom ako veľmi rastlina podlieha určitému druhu stresu a teda ako veľmi došlo k jej poškodeniu je pomer oboch chlorofylov (chl *a/b*) (*obr.12*). Čím je nižší obsah chlorofylu *a*, tým nižší bude aj celkový pomer oboch chlorofylov a teda tým viac bude rastlina poškodená. V tomto prípade boli najväčšie zmeny zaznamenané opäť v prípade klimaboxu C a D.

### ***β-karotén***

*β*-karotén ako jeden z karotenoidov zohráva v reakčných centrách rolu priameho antioxidantu. To znamená, že sa snaží vychytať singletový kyslík vznikajúci rekombináciou náboja pri tvorbe tripletovej formy chlorofylu. Z takéhoto kyslíka by následne mohli vznikajú ďalšie ROS. Ak je rastlina zaťažená stresom a dôjde k jej poškodeniu, hladina *β*-karoténu klesne, pretože sa jeho časť spotrebuje na redukciu nebezpečných kyslíkových radikálov a rastlina už nebude schopná si ho ďalej syntetizovať, čo možno demonštrovať na *obr. 13*, kde najväčší pokles *β*-karoténu nastal v klimaboxe C a D podobne ako u oboch chlorofylov. Pokles získaných hodnôt v klimaboxe B predstavoval necelých 13% oproti svojmu optimu, dokonca v klimaboxe A len 3%, čo hovorí o minimálnej stresovej reakcii, ktorá je na hranici štatistickej chyby. Avšak v klimaboxe C došlo k 7x zvýšenému poklesu, v prípade klimaboxu D až 10x v porovnaní s klimaboxami A a B.

### ***Neoxanthín a luteín***

*Obr. 14* a *obr. 15* hovoria o ďalších dôkazoch toho ako sa rastlinné pigmenty, konkrétne neoxanthín a luteín správajú v stresovej situácii. Oba tieto pigmenty majú



---

svetlozbernú funkciu podobne ako chlorofyly, avšak tohto deja sa zúčastňujú vo svetlozberných komplexoch fotosyntetického aparátu. Ak je rastlina vystavená stresu, dôjde k poškodeniu komplexov a hladina týchto pigmentov začne klesať. V klimaboxe A a B hladina neoxanthínu neklesla viac ako o 7% od hodnoty nameranej v lokalite s optimálnymi podmienkami v danom klimaboxe, v prípade luteínu hodnoty klesli niečo málo nad 5%. Najvýraznejšie zmeny boli pozorované v klimaboxe D, kde hladina luteínu bola až o 46% nižšia ako v optimálnej lokalite, neoxanthín klesol takmer o 40%.

### ***Violaxanthín, antheraxanthín a zeaxanthín***

Ako je uvedené v literatúre, tieto tri pigmenty sú oxidačnými produktmi  $\beta$ -karoténu a ich hlavnou funkciou je ich vzájomná konverzia pri nadmernej stresovej aktivite. Za normálnych podmienok je violaxanthín svetlozberným pigmentom. V prípade, že dôjde k prijatiu nadbytočného množstva elektromagnetického žiarenia, violaxanthín sa začne deepoxidovať v prvom kroku na antheraxanthín, následne z neho v druhom kroku na zeaxanthín, čo je chemickou podstatou xanthofylového cyklu. Klesajúce množstvo violaxanthínu možno pozorovať na *obr. 16* v prípade klimaboxu C a D.

Naopak nárast antheraxanthínu a zeaxanthínu ako pigmentov vznikajúcich v stresovej situácii dokazujú *obr. 17* a *obr. 18*. V klimaboxe C vzrástlo množstvo antheraxanthínu o 73%, v klimaboxe D dokonca až o 89% oproti optimám v daných klimaboxoch. Ako sa očakávalo v prípade zeaxanthínu, najvýraznejšia zmena bola zaznamenaná v klimaboxe D, kde jeho hladina stúpila takmer o 160%.

Tieto tri pigmenty zúčastňujúce sa xanthofylového cyklu sa v rastline tvoria aj po tom, ako sa rastlina dostane do zaťažujúcich podmienok. Tým si rastlina vytvára zásobu, ktorú využíva pre potrebu rýchlejšej adaptácie. Meniace sa celkové množstvo týchto pigmentov možno pozorovať na *obr. 19*.

### ***DEPS***

Výpočtom ( $DEPS = (0,5 * A + Z) / (A + Z + V)$ ) získané hodnoty DEPS (z angl. *Deepoxidation state*) hovoria o stupni deepoxidácie a teda o tom, akú veľkú aktivitu vynaložil xanthofylový cyklus rastliny na jej ochranu voči oxidačnému stresu. *Obr. 20* potvrdzuje, že rastlina bola nútená využiť xanthofylový cyklus v prípade každej jednej lokality v každom klimaboxe aj napriek tomu, že by sa mohlo spočiatku zdať, že rastlina nebola stresovaná

---

extrémne (klimabox A a B). V klimaboxe C a D sa najvyššie hodnoty DEPS pohybovali približne na rovnakých hladinách, avšak oproti najvyšším priemerným hodnotám DEPS v klimaboxe A to bolo o 45% viac, dokonca v porovnaní s klimaboxom B až o 48%.

### **DEPSC**

Stupeň deepoxidácie vzťahnutý na obsah chlorofylov DEPSC (z angl. *De-epoxidation state per chlorophyll unit*) taktiež získaný výpočtom ( $DEPSC = DEPS/Chl (a+b)$ ) má významnú úlohu v prípade, keď obsah chlorofylov dosahuje extrémnych hodnôt. Vďaka nemu je možné presnejšie určiť ako intenzívne rastlina, konkrétne jej xanthofylový cyklus vynaložili ochrannú funkciu voči samotnému chlorofylu. Z obr. 21 vyplýva, že v klimaboxe D rastlina prekonávala najvyšší stupeň oxidačného stresu, čo v porovnaní s lokalitou, kde boli optimálne podmienky znamenalo viac ako trojnásobný nárast hodnôt DEPSC. V klimaboxe C to bol nárast dvojnásobný, vo zvyšných dvoch klimaboxoch zanedbateľný.

### **Fenolické látky**

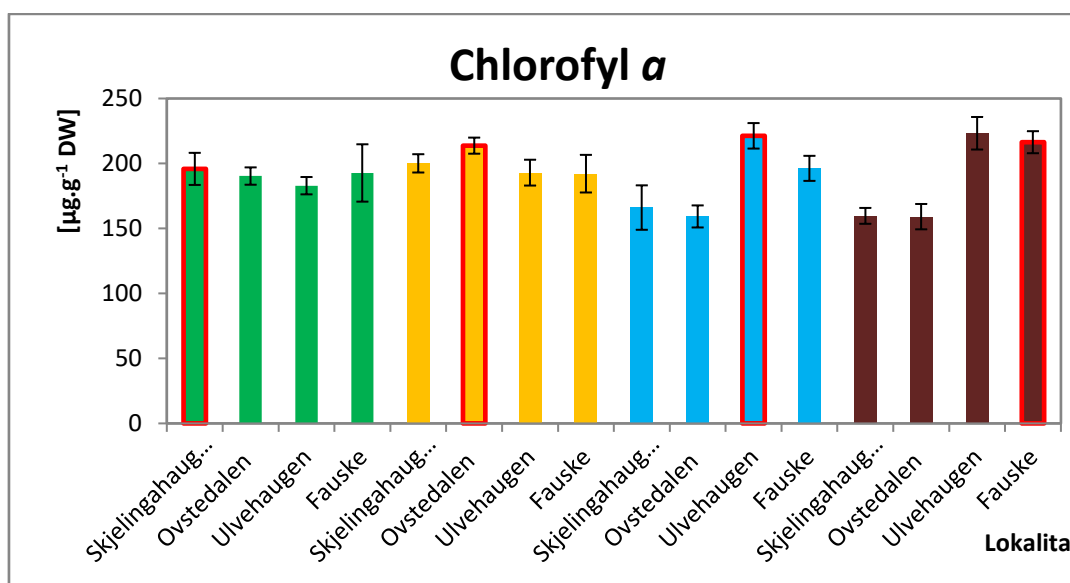
Podobne ako  $\beta$ -karotén všetky fenolické látky prítomné v rastlinnom organizme majú úlohu antioxidantov, čiže vychytávajú ROS a chránia tým rastlinu pred poškodením s tým rozdielom, že fenoly sa na tom podieľajú nielen vo fotosyntetickom aparáte, ale v rámci celej bunky. Avšak vzhľadom na rozmanitý obsah fenolických látok vo vzorkách rastlín sa hovorí o „celkovej antioxidačnej kapacite“, ktorá zahŕňa celkovú schopnosť eliminovať ROS. Pre rastlinu, ktorá je v strese platí, že celkový obsah fenolických látok bude narastať ako obranná reakcia voči vznikajúcim ROS. Na obr. 22 možno pozorovať, že v klimaboxe D, kde prevládali suché a teplé podmienky, bol nárast týchto látok najvyšší spomedzi všetkých klimaboxov. Dokonca treba poznamenať, že v ostatných klimaboxoch bol nárast aktivity týchto látok len nepatrný alebo nebol vôbec zaznamenaný. V klimaboxe D tento presah nebol vyšší ako 9%. Takisto možno poukázať, že v klimaboxe B, kde bola nastavená rovnaká teplota (10,5 °C) ako v klimaboxe D, avšak hodnota ročných zrážok bola naopak najvyššia (2700 mm), bola priemerná hodnota obsahu fenolických látok takmer dvojnásobne nižšia ako v klimaboxe D.

### **APX**

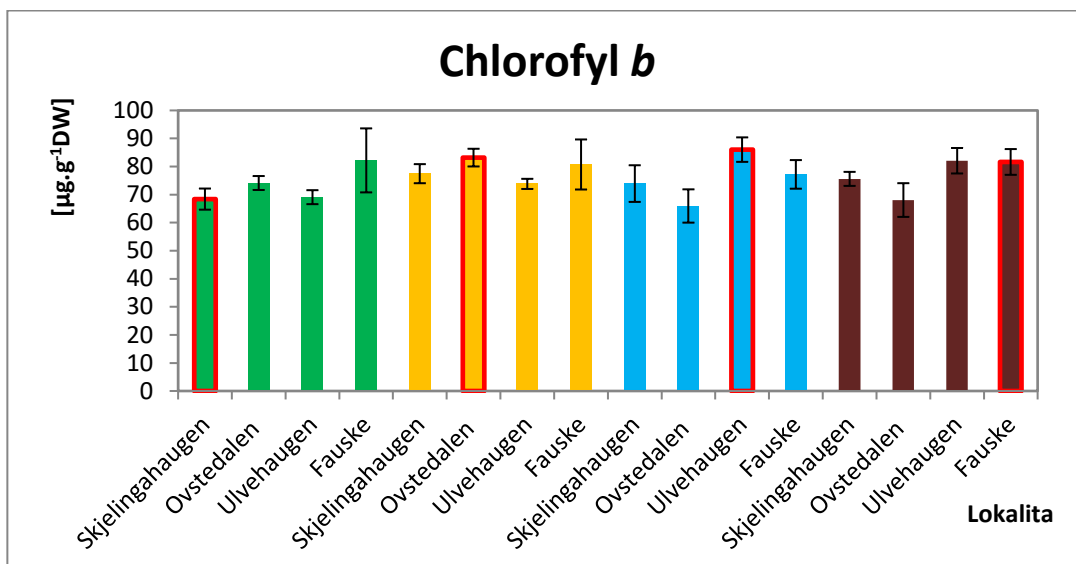
Askorbátperoxidáza ako jeden z enzymatických obranných mechanizmov rastlinného

organizmu je súčasťou glutathión-askorbátového cyklu, ktorého primárnou úlohou je redukovať peroxid vodíka na vodu. Za normálnych okolností, ak rastlina podlieha stresu, snaží sa vytvoriť čo najviac molekúl APX. Obr. 23 znázorňuje nárast aktivity APX v jednotlivých klimaboxoch oproti svojim optimálnym lokalitám, v klimaboxe A takmer 2,5x, v klimaboxe B približne 1,8x a v klimaboxe D takmer 1,3x. V klimaboxe C nebol nárast oproti optimu zaznamenaný. Dôvodom kolísavých hodnôt a vysokého štatistického rozptylu v rámci jednotlivých lokalít môže byť neúplné pretrepanie vzorky pred analýzou, strata niektorých vzoriek či samotná analytická metóda, čím sa celkový počet analýz a konkrétne hodnoty odzrkadlili na konečnom výsledku, ktorý úplne neodpovedal očakávaným hodnotám pri prihliadnutí na výsledky získané analýzou rastlinných pigmentov či fenolických látok.

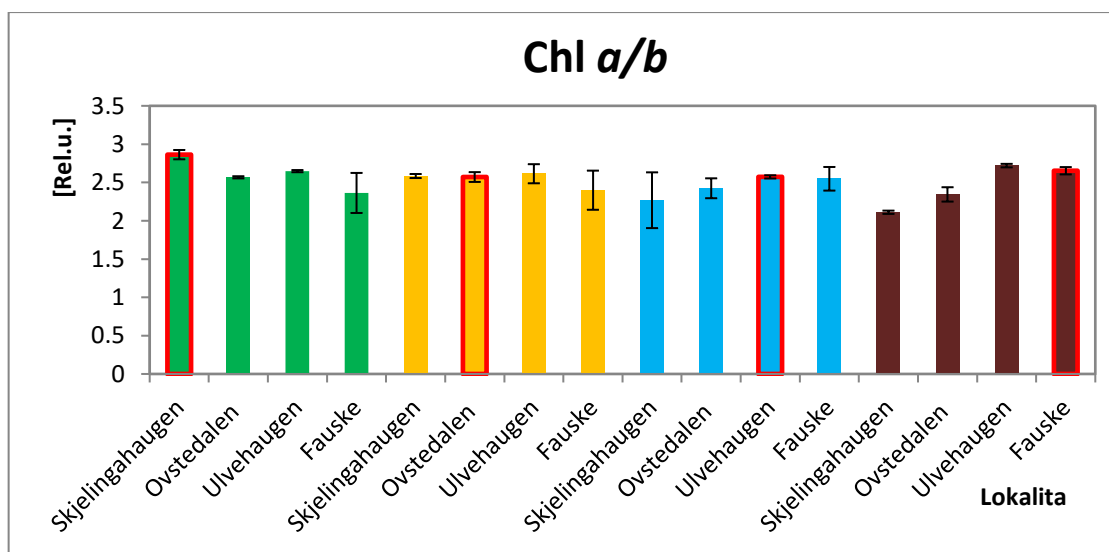
**Obr.10** Obsah chlorofylu *a* v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  získaný HPLC analýzou (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



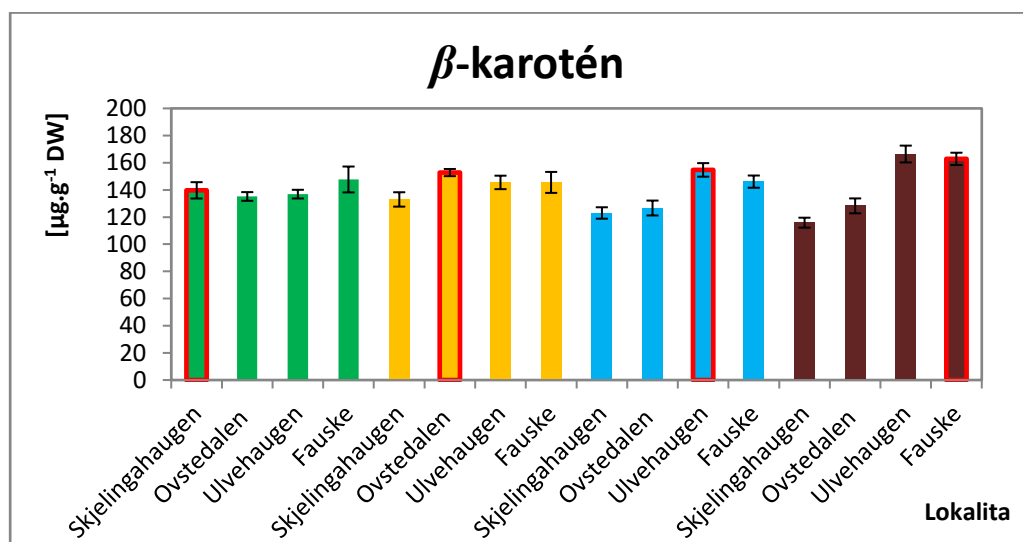
**Obr.11** Obsah chlorofylu b v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  získaný HPLC analýzou (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



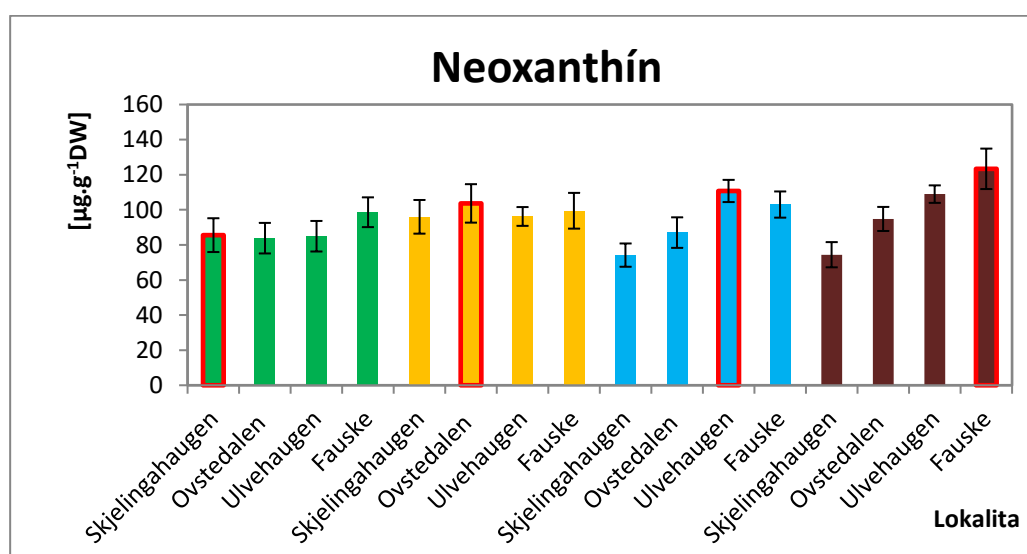
**Obr.12** Pomer oboch chlorofylov vyjadrený v relatívnych jednotkách (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



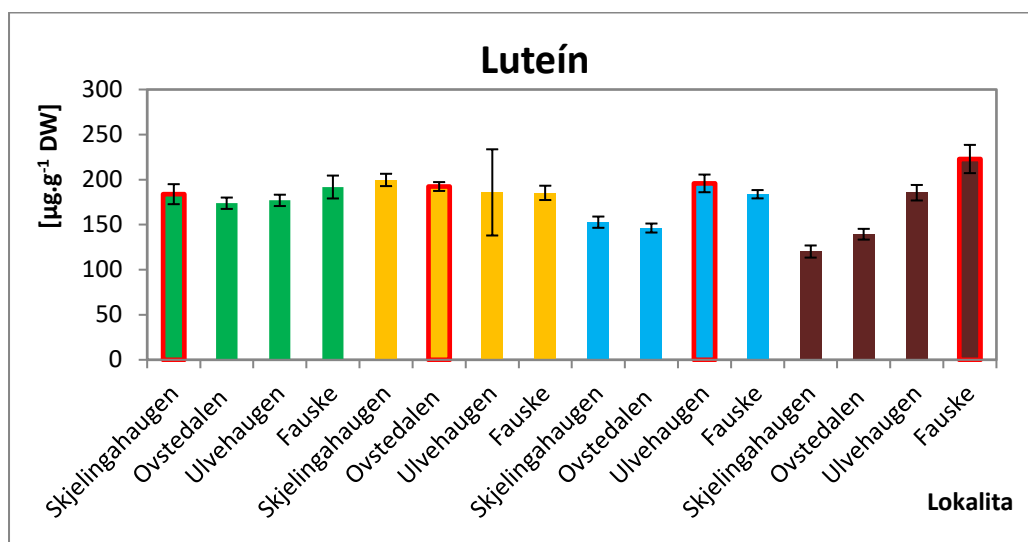
**Obr.13** Obsah  $\beta$ -karoténu v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  získaný HPLC analýzou (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



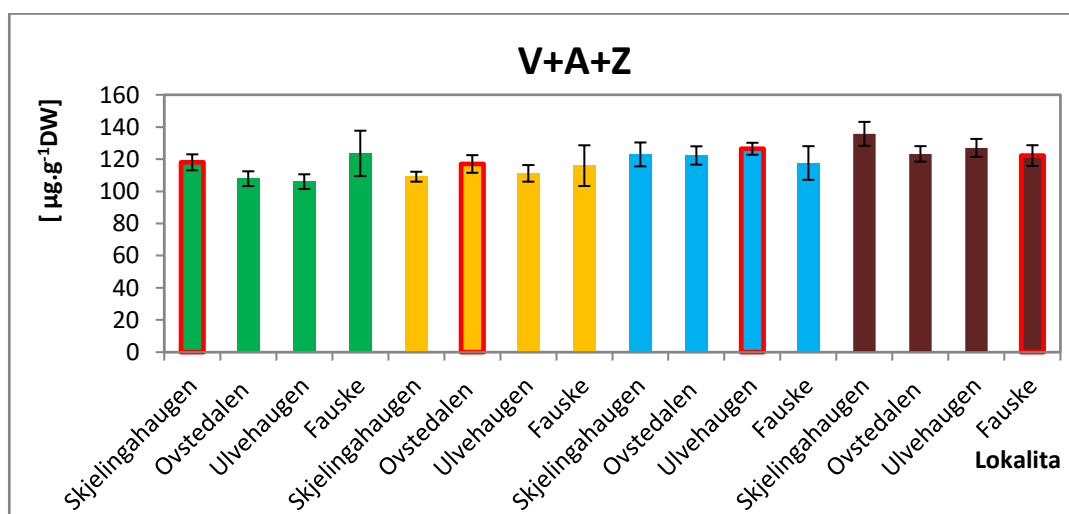
**Obr.14** Obsah neoxanthínu v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  získaný HPLC analýzou (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



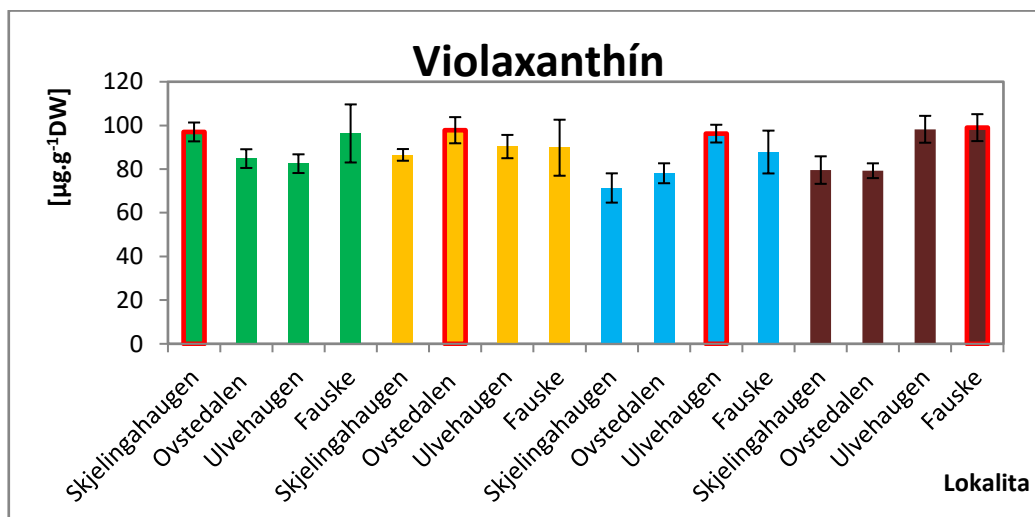
**Obr.15** Obsah luteínu v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  získaný HPLC analýzou (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



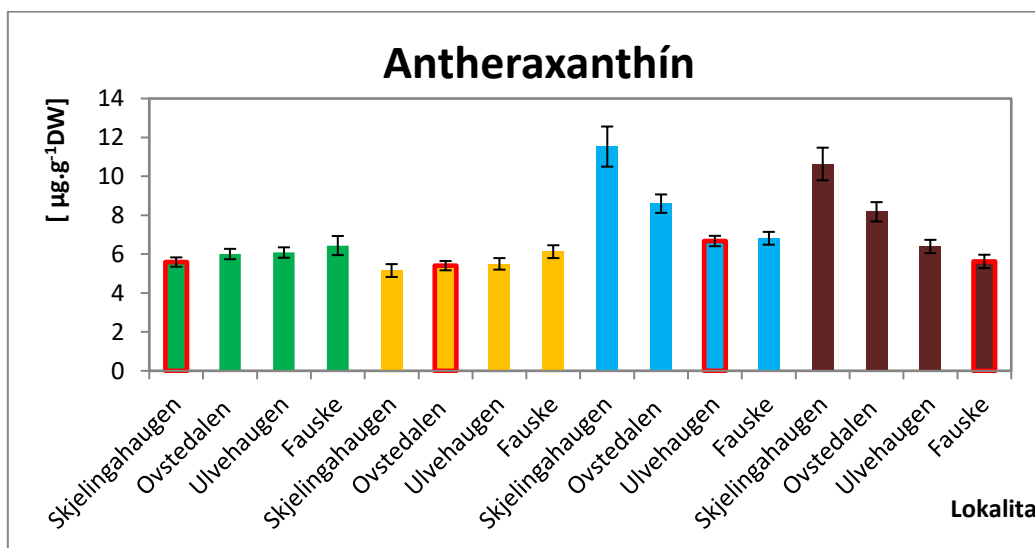
**Obr.16** Celkový obsah pigmentov xanthofylového cyklu ( $V = \text{violaxanthín}$ ,  $A = \text{antheraxanthín}$ ,  $Z = \text{zeaxanthín}$ ) v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  získaný u každého zvlášť HPLC analýzou (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



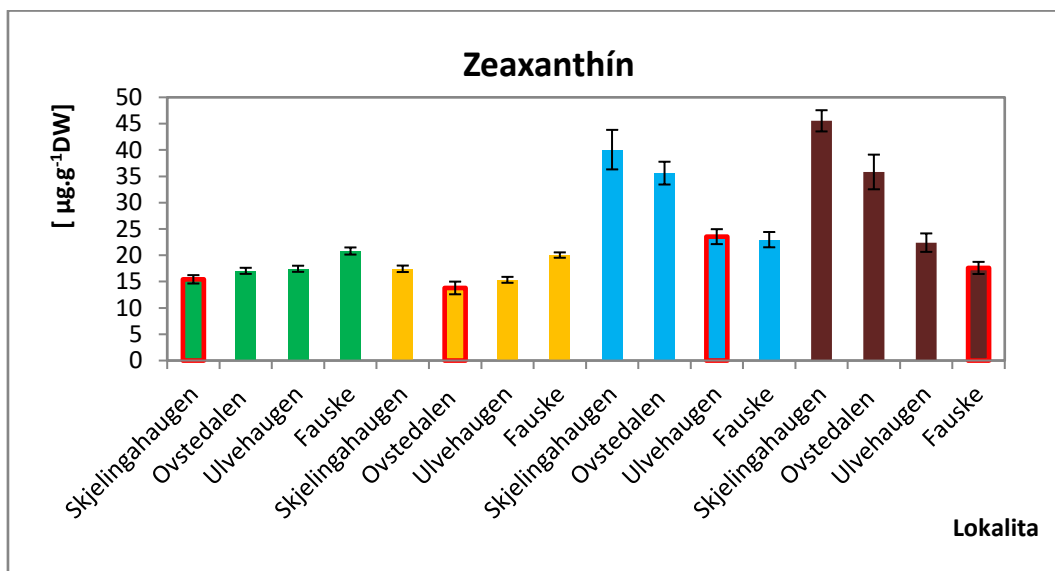
**Obr.17** Obsah violaxanthínu v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  získaný HPLC analýzou (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



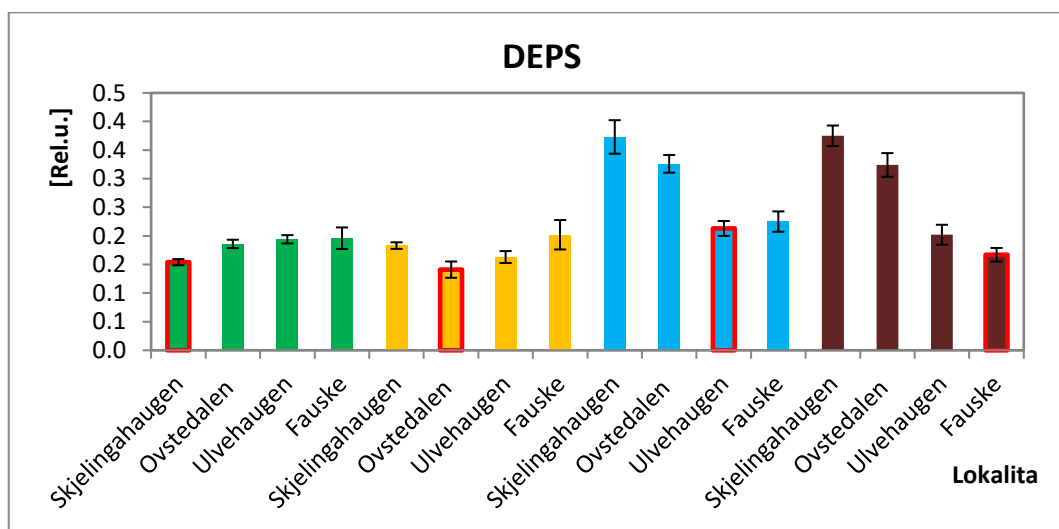
**Obr. 18** Obsah antheraxanthínu v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  získaný HPLC analýzou (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



**Obr. 19** Obsah zeaxanthínu v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  získaný HPLC analýzou (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).

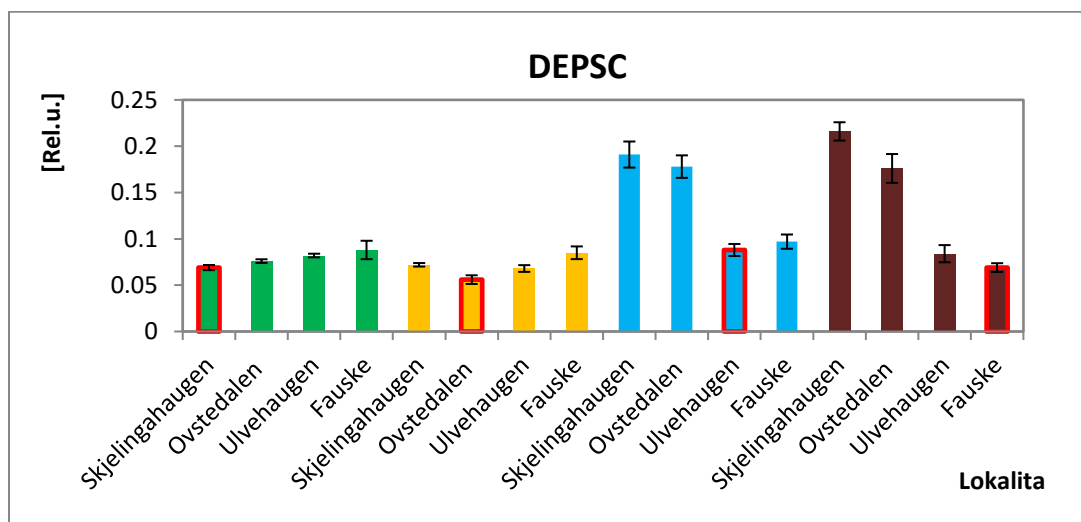


**Obr.20** Hodnota DEPS (stupeň deepoxidácie) vyjadrená v relatívnych jednotkách získaná výpočtom ( $\text{DEPS} = (0,5 \cdot A + Z) / (A + Z + V)$ ), (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).

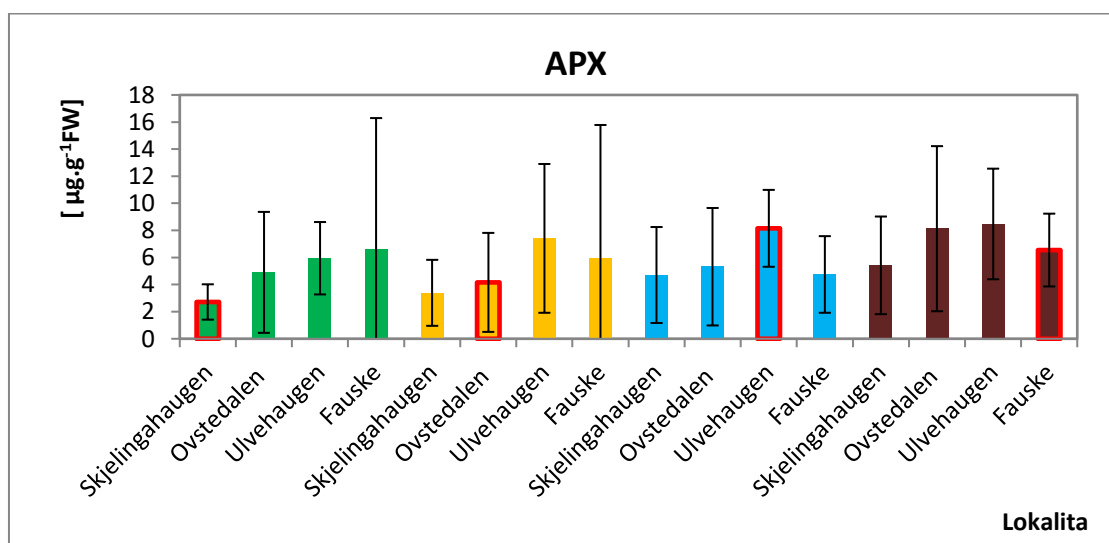




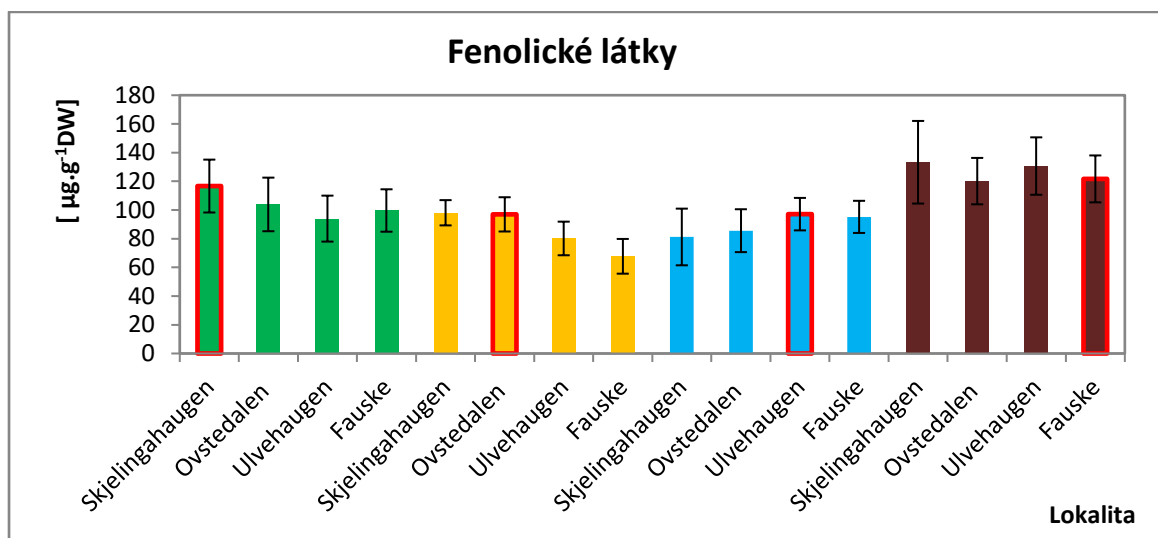
**Obr.21** Hodnota DEPSC (stupeň deepoxidácie vztiahnutý na obsah chlorofylu) vyjadrená v relatívnych jednotkách získaná výpočtom ( $DEPSC = DEPS/Chl(a+b)$ ), (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



**Obr.22** Aktivita askorbátperoxidázy vyjadrená v  $\Delta 290/\text{min}/\text{mg}$  získaná sprektrofotometrickou analýzou (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



**Obr.23** Obsah fenolických látok v  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$  získaný spektrofotometrickou analýzou (stĺpce ohraničené červenou farbou označujú lokalitu s optimálnymi podmienkami; farebné rozdelenie odpovedá tab. 6; hodnoty sú priemerom 10 meraní; chybové úsečky označujú smerodajné odchýlky).



Adaptačné mechanizmy rastlín a zmeny v obsahu rastlinných pigmentov a iných dôležitých látok potrebných k správne fungovaniu rastlinného metabolizmu vyvolané pôsobením určitého druhu abiotického stresu sú predmetom vedeckých štúdií mnohých odborníkov po celom svete. Nasledovné odseky obsahujú stručné zosumarizovanie dôležitých aspektov vyplývajúcich z prác, ktoré sú tematicky úzko spojené s touto diplomovou prácou a naväzujú na jej experimentálne získané výsledky.

Chlorofyly ako najdôležitejšie rastlinné pigmenty podieľajúce sa na fotosyntéze sú cieľom viacerých prírodovedeckých výskumov. Jedným z nich bol aj projekt H. Zhanga na Severovýchodnej poľnohospodárskej univerzite v Číne, ktorý sa týkal adaptačných zmien zameraných na obsah chlorofylu a fotosyntetických vlastností za normálneho a zníženého množstva svetelnej energie. Výsledky ukázali, že pri nižšej intenzite svetla (menšom strese) bol obsah chlorofylu významne vyšší, čo je spôsobené tým, že pri slabom osvetlení rastliny často získavajú vlastnosti na zachytávanie väčšej optickej energie ako je napr. zväčšenie plochy listov a s tým spojené zvýšenie obsahu chlorofylu.<sup>82</sup>

---

S. Keyvan z výskumného inštitútu *Dryland Agriculture Research sub – Institute Sararood* v Iráne sa v rokoch 2007-2008 zaoberal štúdiom účinkov sucha na výťažok pšenice a jej relatívny obsah vody, prolínu, rozpustných sacharidov a chlorofylu. Sucho sa odzrkadlilo na značnom poklese chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, celkovom obsahu chlorofylu a pomere chlorofylu *a/b*.<sup>83</sup> Obe práce sú v súlade s výsledkami chlorofylu prítomného vo *Festuca Rubra* L., ktorý nadobudol podstatne nižších hodnôt v prípade, že rastlina prešla do prostredia, ktoré bolo pre ňu menej ideálne (dôkazom je takisto znížená vlhkosť a to v klimaboxe C a D).

Práca J. S. McElroya a D. A. Kopsella „*Physiological role of carotenoids and other antioxidants in plants and application to turfgrass stress management*“ taktiež potvrdzuje, že v prítomnosti zvýšenej intenzity elektromagnetického žiarenia dochádza k výraznému nárastu zeaxanthínu a antheraxanthínu, pričom violaxanthín naopak za takýchto podmienok klesá, čím tieto pigmenty dostatočne prispievajú k stresovej adaptácii danej rastliny.<sup>84</sup>

Štúdiom zameraným na zmenu obsahu karotenoidov vplyvom stresových faktorov ako je hlavne vysoká intenzita svetla sa zaoberal aj P. K. Sharma a D. O. Hall z *King's College* v Londýne. V roku 1992 publikovali v časopise *Journal of Plant Physiology*, že vysoká intenzita svetla pri teplote 5 °C a 20 °C spôsobila zvýšenie obsahu zeaxanthínu a zníženie obsahu violaxanthínu. Taktiež bol zaznamenaný pokles obsahu  $\beta$ -karoténu a neoxanthínu. V xantofylovom cykle (violaxanthín, antheraxanthín, zeaxanthín) došlo po obnovení fotoinhibície k spätným reakciám. Zo štúdie tiež možno potvrdiť, že tvorba zeaxanthínu a degradácia  $\beta$ -karoténu sa týka hlavne ochrany pred fotoinhibíciou.<sup>85</sup> *Festuca Rubra* L. reagovala na daný stres podobne. Najvplyvnejším stresovým faktorom, ktorý vyvolal zmeny v hladine prítomných pigmentov bol pokles vody prítomnej v pôde (rovnako ako u chlorofylov boli najväčšie zmeny pozorované v klimaboxe C a D).

A. Telfer z *Imperial College of Science* v Londýne tiež vysvetľuje, že  $\beta$ -karotén prítomný v reakčnom centre fotosyntetického aparátu skutočne zachytáva  $^1O_2$  a poskytuje dôležitú ochranu pred oxidačným poškodením. Prítomnosť  $\beta$ -karoténu v PSII a blízko neho je preto zvolená pre svoju schopnosť zachytávania  $^1O_2$  a to napriek svojej nízkej účinnosti zberu svetla. Taktiež konštatuje, že  $\beta$ -karotén je dvojnásobne účinnejší pri odstraňovaní  $^1O_2$  ako luteín, ktorý je hlavným karotenoidom vo vonkajších LHCII.<sup>86</sup> Pokles  $\beta$ -karoténu aj vo *Festuca Rubra* L. hovorí o adekvátnej antioxidačnej činnosti skúmanej rastliny a o jej snahe redukovať negatívne stresové faktory.

---

Ďalšou tematicky podobnou prácou bola „*Diurnal changes in photoprotective mechanisms in leaves of cork oak (Quercus suber) during summer*“, ktorú vypracovala T. Faria a kol. z lisabonského *Istituto de Superior Agronomio*. Jej cieľom bol výskum denných variácií fotoprotektívnych mechanizmov 40-ročného korkového duba, ktorého listy boli vystavené slnečným aj tienistým podmienkam počas začiatku leta v Portugalsku. Objavili sa krátkodobé zmeny pigmentov xantofylového cyklu (reverzibilná deepoxidácia vialoxantínu počas dňa) ako aj dlhodobé zmeny (vyšší obsah xantofylov na slnku v porovnaní s listami v tieni) a môžu zohrávať úlohu v disipácii nadbytočnej energie. Keďže aktivity enzýmov antioxidantného systému, superoxid dismutázy a askorbátperoxidázy boli dostatočne vysoké, aby sa vysporiadali so vznikajúcimi ROS, dospela k záveru, že tieto enzýmy môžu slúžiť ako prídavný mechanizmus pre disipáciu energie.<sup>87</sup> K aktivácii xantofylového cyklu došlo aj v prípade *Festuca Rubra* L., čo možno najlepšie sledovať na podstatne zvýšených hodnotách antheraxanthínu a zeaxantínu v klimaboxe C a D.

V indickom *Central Food Technological Research Institute* vypracoval A. Ramakrishna a A. R. Gokare v roku 2011 článok pod názvom „*Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants*“, ktorý poukazuje na dôležitosť sekundárnych metabolitov v rastlinnom organizme v prípade adaptácie na určitý stresový faktor (napr. teplota, vlhkosť, intenzita svetla, príjem vody, minerálov a CO<sub>2</sub>). Medzi takéto typy rastlinných metabolitov patria okrem iných aj fenolické látky. V rámci tohto výskumu bol zaznamenaný zvýšený obsah polyfenolov v rôznych tkanivách pod rastúcou salinitou, taktiež zvýšený celkový obsah fenolov so stredne vysokým obsahom soli v červenej paprike. Naopak listy vrbu, ktoré boli vystavené nižšej intenzite svetla obsahovali nižšie koncentrácie tannínov a fenolických glykozidov.<sup>88</sup> Podobnosť s *Festuca Rubra* L. je viditeľná v klimaboxe D, kde spomedzi všetkých klimaboxov došlo k najvýraznejšiemu nárastu aktivít fenolických látok, čím rastlina vytvorila dostatočnú obrannú reakciu voči vznikajúcim nežiadúcim vplyvom.

V roku 2001 uverejnil vedecký časopis *Plant Science* článok, ktorý vypracoval tím španielskych vedcov pod vedením R. M. Rivero na Katedre rastlinnej biológie v Granade. Z experimentálneho hľadiska bol tento výskum zameraný na analýzu rozpustných fenolov, enzymatickej aktivity (fenylalanín amoniak-lyáza, polyfenoloxidáza a peroxidáza) a sušiny paradajky jedlej a dyne červenej, ktoré boli pestované po dobu 30 dní pri rôznych teplotách (15, 25 a 35 °C). Okrem ďalších postulátov vyplývajúcich zo získaných výsledkov tiež možno potvrdiť, že teplotný stres indukuje akumuláciu fenolov v rastline aktiváciou ich biosyntézy

---

ako aj inhibíciou ich oxidácie, čo môže byť považované za jeden z mechanizmov aklimatizácie proti tepelnej námahe.<sup>99</sup>

S. Munné-Bosch a L. Alegre, ktorí pôsobia na Katedre rastlinnej biológie na Univerzite v Barcelone publikovali v roku 2000 výsledky svojej práce „*Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in Rosmarinus officinalis plants*”, v ktorej sa zameriavali na zmeny dvojročného rozmarínu, ktorý bol počas stredomorského leta vystavený silnému stresu v podobe dlhotrvajúceho sucha. Jedným z najdôležitejších tvrdení, ktoré vyplynuli z analýz bolo zníženie obsahu luteínu a  $\beta$ -karoténu v prepočte na suchú hmotnosť a tiež nárast deepoxidácie xantofylového cyklu. Pozoruhodné tiež bolo zistenie, že s návratom jesenných dažďov sa najprv obnovil stav vody, neskôr sa zvýšil aj obsah violaxanthinu, fotosyntetických pigmentov a ostatných pozorovaných látok, ktorých množstvo bolo vplyvom sucha znížené. Fotoprotekcia spôsobená xantofylovým cyklom a antioxidačná funkcia luteínu a iných látok prítomných v danej rastline pomohlo vyhnúť sa nezvratnému poškodeniu pri ťažkom suchu, čo umožnilo obnovenie funkcie tylakoidných membrán po jesenných dažďoch.<sup>90</sup>

Tvrdenia vyplývajúce zo všetkých nameraných hodnôt analyzovaných látok v skúmanej *Festuca Rubra* L. sa navzájom podporujú s mnohými (nielen uvedenými) prácami, čím sa dostatočne dokazuje schopnosť rastlinného organizmu nielen reagovať na danú stresovú aktivitu, ale dokonale sa s ňou aj vysporiadať.

---

## 5 Záver

Experimentálne získané výsledky všeobecne potvrdzujú, že vzorky rastliny *Festuca rubra* L. odobraté z juhozápadnej časti Nórska ako prirodzeného ekosystému, kde rástli pri rôznych teplotných a zrážkových podmienkach následne kultivované pri kombinácii „krajných“ hodnôt teplôt a vlhkostí týchto lokalít prekonávali vo viacerých prípadoch určitý druh abiotického stresu.

Na základe výsledkov možno uvažovať o viacerých tvrdeniach:

- najväčším stresovým faktorom pre rastlinu bola znížená hladina vlhkosti v pôde;
- zmena teploty nemala na rastlinu významný vplyv;
- v prípade oboch typov chlorofylu,  $\beta$ -karoténu, neoxanthínu a luteínu došlo vplyvom stresového faktoru k výraznému poklesu;
- vplyvom stresu došlo k adekvátnej aktivácii xantofylového cyklu, v dôsledku ktorej obsah violaxanthínu klesol a naopak obsah antheraxanthínu a zeaxanthínu sa podstatne zvýšil;
- reakciou na stresovú situáciu došlo k zvýšenej aktivite askorbátperoxidázy a obsahu fenolických látok;
- výsledky použitých analytických metód ukázali zhodu v miere pôsobenia abiotického stresu na rastlinný organizmus;
- pre potrebu zníženia vysokých štatistických chýb získaných analýzami vybraných metód je potrebné pri ďalších experimentoch uvažovať o náhrade samostatnej metódy kombináciou viacerých typov.

---

HPLC analýzou rastlinných pigmentov a spektrofotometrickou analýzou fenolických látok a askorbátperoxidázy prítomných vo vzorkách rastliny *Festuca rubra* L. boli potvrdené teoretické predpoklady a tiež podporené výsledky podobných vedeckých prác.

---

## 6 Zoznam použitej literatúry

1. Hohmann-Marriott, M.: Evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **62**, 515-548 (2011).
2. Barros, T.: Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex II. *Biochim Biophys Acta* **1787**:6, 753-772 (2009).
3. Gabry, H.: Blue light-induced orientation movements of chloroplasts in higher plants: Recent progress in the study of their mechanisms. *Acta Physiologiae Plantarum* **26**:4, 473-479 (2004).
4. Saleh, M.: Antioxidant and free radical scavenging activities of essential oils. *Ethnicity and Disease* **20**, 78-82 (2010).
5. Racchi, M.: Antioxidant Defenses in Plants with Attention to Prunus and Citrus spp. *Antioxidants* **2**:4, 340-369 (2013).
6. Apel, K.: Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Plant Biol* **55**, 373-399 (2004).
7. Shao, H.: Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *Int J Biol Sci* **4**:1, 8-14 (2008).
8. Noctor, G.: Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 249-279 (1998).
9. Asada, K.: Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* **141**:2, 391-396 (2006).
10. Hirschberg, J.: Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 210-218 (2001).



- 
11. Paiva, S.; Russell, R.M. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr* **18**, 426-433 (1999).
  12. Bilger, W.; Björkman, O.: Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* **25**:3, 173-185 (1990).
  13. Frank, H.; Cua, A.: Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth Res* **41**:3, 389-395 (1994).
  14. Root, T.: Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* **421**, 57-60 (2002).
  15. Goswami, A.; Banerjee, R.: Mechanisms of plant adaptation/memory in rice seedlings under arsenic and heat stress: expression of heat-shock protein gene *HSP70*. *AoB PLANTS* plq023, 1-9 (2010).
  16. Qureshi, M.: Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology* **164**:10, 1239-1260 (2007).
  17. Trewavas, A.: Plant intelligence. *Naturwissenschaften* **92**, 401-413 (2005).
  18. Pellegrini, N.; Sefarini, M.: Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *The Journal of Nutrition* **133**:9, 2812-2819 (2003).
  19. Caverzan, A.; Passaia, G.: Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet Mol Biol* **35**:4,1011-1019 (2012).
  20. Cramer, G.: Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* **11**, 163 (2011).

- 
21. Mittler, R.: Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. *Trends in Plant Science* **7**:9, 405-410(2002).
  22. Latowski, D.: Xanthophyll cycle – a mechanism protecting plants against oxidative stress. *Redox Report* **16**:2, 78-90 (2011).
  23. Hasanuzzaman, M.: Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *Int J Mol Sci* **14**:5, 9643-9684 (2003).
  24. Hong, S.: Arabidopsis *hot* Mutants Define Multiple Functions Required for Acclimation to High Temperatures. *Plant Physiol* **132**:2, 757-767 (2003).
  25. Feder, M.: Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiology* **61**, 243-282 (1999).
  26. Jaleel, Ch. et al.: Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Compositions. *Int J Agric Biol* **11**:1, 100-105 (2009).
  27. Smirnoff, N.: The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* **125**:1, 25-58 (1993).
  28. El-Missiry, M.: *Antioxidant Enzyme*. Novi Sad, InTech 2012.
  29. Shigeoka, S.: Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**:372, 1305-1319 (2005).
  30. Jiménez, A.: Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant Physiol* **114**, 275-284 (1997).
  31. Asada, K.: The Water-Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Plant Physiol* **50**, 601-639 (1999).

- 
32. Chew, O.: Molecular Definition of Ascorbate-Glutathione Cycle in *Arabidopsis* Mitochondria Reveals Dual Targeting of Antioxidant Defenses in Plants. *J Biol Chem* **278**:47, 46869-46877 (2003).
  33. Foyer, Ch.: Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiol* **155**:1, 2-18 (2011).
  34. Pereira, D.; Valentão, P.: Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules* **14**:6, 2202-2211 (2009).
  35. Metcalf, R.: Plant volatiles as insect attractants. *CRC Crit Rev Plant Sci* **5**, 251-301 (1987).
  36. Tsao, R.: Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**:12, 1231-1246 (2010).
  37. Han, X.; Shen T.: Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int J Mol Sci* **8**:9, 950-988 (2007).
  38. Anto, R.: Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis* **23**:1, 143-50 (2002).
  39. Silva, V.; Freitas, A.: Chemistry and photochemistry of natural plant pigments: the anthocyanins. *J Phys Org Chem* **29**, 594-599 (2016).
  40. Lee, D.: Plant pigments and their manipulation. *Ann Bot* **96**:7, 1332-1333 (2005).
  41. Boo, H.; Hwang, S.: Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products* **40**, 129-135(2012).

- 
42. Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.: Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *J Appl Microbiol* **98**, 991-1000 (2005).
  43. Tanaka, Y.; Sasaki, N.: Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* **54**:4, 733-749 (2008).
  44. Tesoriere, L., Butera, D.: Increased Resistance to Oxidation of Betalain-enriched Human Low Density Lipoproteins. *Free Radical Research* **37**:6, 689-696 (2002).
  45. Goodwin, T. W.: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Academic Press, London & New York 1976.
  46. Steccanella, V.: Plant Physiology and Biochemistry. *Plant Physiology and Biochemistry* **97**, 207-216 (2015).
  47. Wettstein, D.: Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, 1039-1057 (1995).
  48. Benett, J.: Biosynthesis of the Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Protein: Polypeptide Turnover in Darkness. *Cur J Biochem* **118**, 61-70 (1981).
  49. Beale, S.: Biosynthesis of Chlorophylls and Hemes. *The Chlamydomonas Sourcebook* **2**, 731-798 (2009).
  50. Rüdiger, W.: Biosynthesis of chlorophyll *b* and the chlorophyll cycle. *Photosynthesis Research* **74**, 187-193 (2002).
  51. Fernández- García, E.: Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International* **46**:2, 438-450 (2012).
  52. Eldahshan, O. A.; Singab, A. N.: Carotenoids. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **2**:1, 225-234 (2013).

- 
53. Isaacson, T.; Ronne, G.: Cloning of *tangerine* from Tomato Reveals a Carotenoid Isomerase Essential for the Production of  $\beta$ -Carotene and Xanthophylls in Plants. *Plant Cell* **14**:2, 333-342 (2002).
  54. Tian, L.; Musetti, V.: The *Arabidopsis* *LUTI* locus encodes a member of the cytochrome P<sub>450</sub> family that is required for carotenoid  $\epsilon$ -ring hydroxylation activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:1, 402-407 (2004).
  55. Gilmore, A.: Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum* **99**, 197-209 (1997).
  56. Demmig-Adams, B.; Adams, W.: The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* **1**:1, 21-26 (1996).
  57. Hager, A.: Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* **192**, 581-589 (1994).
  58. Jahns, P.: Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* **1787**:1, 3-14 (2009).
  59. Eskling, M.: The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum* **100**, 806-816 (1997).
  60. Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F.: Biosynthesis of Betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends Plant Sci* **18**:6, 334-43 (2013).
  61. Visscher, P.: Heritability in the genomics era - concepts and misconceptions. *Reviews* **9**, 255-266 (2008).

- 
62. Valladares, F.: Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology* **94**, 1103-1116 (2006).
63. Jump, A.; Penuelas, J.: Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters* **8**:9, 1010-1020 (2005).
64. Gienapp, P.: Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Mol Ecol* **17**:1, 167-178 (2008).
65. Sultan, S. E.: Phenotypic Plasticity in *Polygonum persicaria*. III. The Evolution of Ecological Breadth for Nutrient Environment. *Evolution* **47**:4, 1050-1071 (1993).
66. Molinier, J.; Ries, G.: Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* **442**,1046-1049 (2006).
67. Barkworth, M., Anderson, L.: *Manual of Grasses for North America*. 2.vydanie Logan, Utah, Intermountain Herbarium and Utah State University Press. **2007**.
68. Walsh, R. A.: *Festuca rubra L.*. In: *Fire Effects Information System*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory (Producer) (1995).  
Dostupné z URL: <<https://fs.fed.us/database/feis/plants/graminoid/fesrub/all.html>>  
[cit. 5.12.2018]
69. St. John, L., Tilley,D., Hunt, P., Wright, S.: *Plant Guide for Red Fescue (Festuca rubra L.) USDA-Natural Resources Conservation Service*. Plant Materials Center, Aberdeen, Idaho (2012).  
Dostupné z URL: <[https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg\\_feru2.pdf](https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_feru2.pdf)>  
[cit. 5.12.2018]

- 
70. Dostupné z URL: <<https://naturespot.org.uk/species/red-fescue>>  
[cit. 5.12. 2018]
71. Padmavathiamma, P.; Li, L.: Phytoremediation of Metal-Contaminated Soil in Temperate Regions of British Columbia, Canada. *International Journal of Phytoremediation* **11**:6, 575-590 (2009).
72. Roger, R.: *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Springer Netherlands 2010.
73. Blainski, A.: Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense*L. *Molecules* **18**:6, 6852-6865 (2013).
74. Naczk, M.; Shahidi, F.: Extraction and Analysis of Phenolics in Food. *Journal of Chromatography* **1054**, 95-111 (2004).
75. Lees, M.: *Food authenticity and traceability*. Cambridge, Woodhead Publishing Limited 2003.
76. Greenwald, R. A.: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, CRC Press 1985.
77. Wendel, A.: Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* **77**, 325-333 (1981).
78. Paoletti, F.; Mocali, A.: Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods in Enzymology* **186**, 209-220 (1990).
79. Aebi, H.: Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126 (1984).
80. Rigon, J.; Capuani S.: Non-destructive determination of photosynthetic pigments in the leaves of castor oil plants. *Acta Scientiarum Agronomy* **34**:3, 325-329 (2012).

- 
81. Klanderud, K.: The Importance of Biotic vs. Abiotic Drivers of Local Plant Community Composition Along Regional Bioclimatic Gradients. *Plos One* **10**:6, (2015).
  82. Zhang, H.: Adaptive changes in chlorophyll content and photosynthetic features to low light in *Physocarpus amurensis* Maxim and *Physocarpus opulifolius* “Diabolo”. *PeerJ* **4** (2006).
  83. Keyvan, S.: The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *Journal of Animal & Plant Sciences* **8**:3, 1051-1060 (2010).
  84. McElroy, J. S.: Physiological role of carotenoids and other antioxidants in plants and application to turfgrass stress management. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **37**:4, 327-333 (2009).
  85. Sharma, P. K.; Hall, D. O.: Changes in Carotenoid Composition and Photosynthesis in Sorghum under High Light and Salt Stresses. *Journal of Plant Physiology* **140**:6, 6661-666 (1992).
  86. Telfer, A.: What is  $\beta$ -carotene doing in the photosystem II reaction centre?. *Phil Trans R Soc LondB* **357**, 1431-1440 (2002).
  87. Faria, T.: Diurnal changes in photoprotective mechanisms in leaves of cork oak (*Quercus suber*) during summer. *Tree Physiology* **16**, 115-123 (1995).
  88. Ramakrishna A.; Gokare A. R.: Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**:11, 1720-1731 (2011).
  89. Rivero, R. M.: Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* **160**:2, 315-321 (2001).



- 
90. Munné-Bosch, S.; Alegre, L.: Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* **210**:6, 925-931 (2000).