

# Kasvien oksidatiivinen stressi

Elisa Karonen

LuK-tutkielma

Biologian tutkintaohjelma

Oulun yliopisto

Tammikuu 2020

Lyhenne	Nimi
ROS	reaktiivinen happilaji
RNS	reaktiivinen typpilaji
RBOH	hengityspurskeoksidaasihomologi
SNO	S-nitrosotioli
DNIC	dinitrosyylirautakompleksi
GSNO	S-nitroglutationi
PCD	ohjelmoitu solukuolema
MAPK	mitogeneeniaktivoitu proteiinikinaasi
HR	hypersensitiivinen vaste
SOD	superoksididismutaasi
APX	askorbaattiperoksidaasi
MDHAR	monodehydroaskorbaattireduktaasi
GPX	glutationiperoksidaasi
CAT	katalaasi
GR	glutationireduktaasi
DHAR	dehydroaskorbaattireduktaasi
GPOX	guajakoliperoksidaasi
GST	glutationi-S-transferaasi
PRX	peroksiredoksiini
ABA	abskissihappo
GSH	glutationi
AsA	askorbiinihappo
GSSG	glutationidisulfidi

# Sisällysluettelo

1. Johdanto .....	2
2. Oksidatiivinen stressi .....	2
3. Oksidatiivista stressiä aiheuttavat yhdisteet .....	3
3.1. Hapen reaktiiviset muodot .....	3
3.2. Typen reaktiiviset muodot .....	5
3.3. Reaktiivisten happi- ja typpilajien kemialliset syntyreaktiot .....	6
4. Reaktiivisten happi- ja typpilajien aikaansaamat reaktiot.....	7
4.1. Biopolymeerien hapetus .....	7
4.2. Ohjelmoitu solukuolema .....	9
4.3. Nekroosi .....	10
4.4. Reaktiiviset happi- ja typpilajit signaalimolekyyleinä .....	10
4.4.1. Sopeutuminen .....	11
5. Antioksidantit .....	12
5.1. Antioksidanttiset entsyymit .....	12
5.2. Antioksidanttiset yhdisteet .....	14
5.2.1. Fenoliset yhdisteet .....	16
6. Yhteenveto .....	16
7. Lähteet .....	17

# 1. Johdanto

Erilaiset abioottiset ja bioottiset tekijät aiheuttavat kasveille stressiä. Abioottiset eli elottomat tekijät ovat kemiallisia ja fysikaalisia ympäristötekijöitä, jotka vaikuttavat kasvien elinolosuhteisiin. Bioottiset tekijät ovat puolestaan ympäristön elollisia eli elävien eliöiden muodostamia tekijöitä. Tärkeimpiä kasveihin vaikuttavia abioottisia tekijöitä ovat kuivuus, korkeat tai matalat lämpötilat, korkea suolapitoisuus, suuri valon määrä, ravinteiden puute ja raskasmetallit (Kapoor ym., 2019). Lisäksi muita abioottisia kasvien stressitekijöitä ovat Das ym. (2016) katsausartikkelin mukaan UV-säteily, hapenpuute, tulvat, happamoitunut maaperä ja ilmansaasteet. Apel & Hirt (2004) lisää katsausartikkelissaan listaan mekaanisen stressin. Bioottista stressiä aiheuttavat herbivorit, patogeenit ja parasiitit (Das ym., 2016). Demidchikin (2015) katsausartikkelin mukaan kasvin stressitekijöihin kuuluvat myös ksenobiootit, jotka ovat kasveille vieraita aineita. Esimerkiksi hyönteismyrkyt kuuluvat ksenobiootteihin (Demidchik, 2015). Kasvien elinolosuhteet sisältävät erilaisen yhdistelmän stressitekijöitä, joiden yhteisvaikutus on kasville negatiivisempi kuin yksittäisten stressitekijöiden summa (Choudhury ym., 2016). Esimerkiksi mangrovemetsissä aiheuttavat abioottisista tekijöistä suolapitoisuus ja hapettomuus eniten stressiä (Das ym., 2016), kun taas oliivipuut kärsivät eniten kuumuudesta ja kuivuudesta (Denaxa ym., 2020). Stressitekijät aikaansaavat reaktiivisten happi- ja typpilajien syntymistä, mikä johtaa oksidatiiviseen stressiin, mikäli kasvisolu ei saa hävitettyä reaktiivisia yhdisteitä (Das ym., 2016). Tässä työssä tarkastelen sitä, millä tavoin kasvit puolustautuvat oksidatiivista stressiä vastaan.

## 2. Oksidatiivinen stressi

Oksidatiivista stressiä aiheuttavia reaktiivisia happilajeja (ROS) ja typpilajeja (RNS) syntyy monissa kasvisolun osissa, joista tyypillisimmät ovat mitokondriot, kloroplastit, sytosoli ja peroksisomit. Mitokondrioissa reaktiivisia hapen ja typen muotoja aiheuttaa soluhengitys, kloroplasteissa fotosynteesi, sytosolissa hapetus-pelkistysreaktiot ja peroksisomeissa fotorespiraatio eli valohengitys (Kapoor ym., 2019). Gill ja Tuteja (2010) kertovat katsausartikkelissaan myös mitokondrioiden osallistuvan fotorespiraatioon. Fotosynteettiset organismit, kuten kasvit, ovat oksidatiivisen stressin riskiryhmässä kloroplastien yhteyttämiskalvostoilla syntyvien ROS:en takia (Gill & Tuteja, 2010). Bhattacharjee (2005) katsausartikkelin mukaan reaktiivisia yhdisteitä on havaittu muodostuvan myös solulimakalvostossa, jossa elektroninsiirtoketjut tuottavat ROS:ja. Toinen vähemmän tutkittu ROS:en syntypaikka solulimakalvoston lisäksi on apoplasti (Kapoor

ym., 2019). Apoplastissa ROS:ja syntyy soluseinän hengityspurskeoksidaasihomologioiden (RBOH) kautta (Choudhury ym., 2016). ROS:ja tuottavat apoplastissa myös oksalaattioksidaasit, amiinioksidaasit ja soluseinän peroksidaasit (Kapoor ym., 2019).

Reaktiivisten happilajien syntyminen on osa solun normaalia metaboliaa ja niitä syntyy useiden reaktioiden sivutuotteina (Kapoor ym., 2019). Pieninä pitoisuuksina ROS:t toimivat signaalimolekyyleinä, patogeenipuolustuksessa ja ligniinin muodostuksessa (Michalak, 2006). Kuitenkin ROS:en ylituotanto tai ROS:ja hävittävien antioksidanttien puute johtaa oksidatiiviseen stressiin (Hernández ym., 2009). Oksidatiivisessa stressitilassa ROS:en määrä solussa kasvaa kolmesta kymmenenkertaiseen (Van Breusegem & Dat, 2006). Oksidatiivinen stressi aiheuttaa vahinkoa kasvisolukoille hapettamalla biopolymeerejä kasvisoluissa ja johtamalla lopulta solukuolemaan (Kapoor ym., 2019). ROS:en kertyminen on esimerkiksi olennaisin tekijä viljakasvien tuottavuuden alenemisessa (Gill & Tuteja, 2010).

### 3. Oksidatiivista stressiä aiheuttavat yhdisteet

#### 3.1. Hapen reaktiiviset muodot

Hapen reaktiiviset muodot eli reaktiiviset happilajit ovat hapen johdannaisia, jotka aiheuttavat kasville oksidatiivista stressiä. Hapen johdannaiset ovat peräisen triplettihapesta ( $^3\text{O}_2$ ), joka on dioksidin matalaenerginen perusmuoto (Apel & Hirt, 2004). Triplettihapen kahden happiatomin uloimmalla molekyylirbitaalilla on elektroni, joilla spinit ovat samansuuntaiset. Tästä syystä happi mieluusti vastaanottaa yhden elektronin kerrallaan ja mahdollistaa ROS:en syntymisen (Gill & Tuteja, 2010). Noin 1% kasvien käyttämästä hapesta muodostaa ROS:ja (Bhattacharjee, 2005). Yleisimmät ROS:t ovat superoksidi ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), vetyperoksidi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ja hydroksyyliiradikaali ( $\cdot\text{OH}$ ) (Michalak, 2006). Hernández ym. (2009) ja Choudhury ym. (2016) luettelevat edellä mainittujen joukkoon myös singlettihapen ( $^1\text{O}_2$ ). Muita mahdollisia reaktiivisia happilajeja ovat esimerkiksi peroksyyliradikaali ( $\text{ROO}\cdot$ ), alkoksyyliradikaali ( $\text{RO}\cdot$ ), hydroperoksyyliradikaali ( $\text{HO}_2$ ), otsoni ( $\text{O}_3$ ) ja hypokloorihappo ( $\text{HClO}$ ) (Demidchik, 2015).

Suurin osa kasvien reaktiivisista happilajeista syntyy superoksidin kautta (Bhattacharjee, 2005). Superoksidia muodostuu solussa kaikkialla, missä tapahtuu elektroninsiirtoketjuja. Elektroneista 1-5% voi vapautua näissä ketjuissa ja hapen kanssa reagoidessaan ne muodostavat superoksidia (Demidchik, 2015). Esimerkiksi kloroplastien tylakoidikalvostolla fotosysteemi I ja II vapauttavat

elektroneja. Näistä olennaisempi superoksidin syntypaikka on fotosysteemi I (Demidchik, 2015). Siellä hapen pelkistymistä superoksidiksi kutsutaan Mehlerin reaktioksi, joka esitetään kappaleessa 3.3. (Hernández, 2009). Puolestaan mitokondrioissa elektronien vapautuminen tapahtuu komplekseissa I ja III (Demidchik, 2015). Kloroplastien ja mitokondrioiden lisäksi elektroneja vapautuu myös mikrosomeissa, glykosomeissa, peroksisomeissa, apoplastissa ja sytosolissa (Alscher ym., 2002). Elektroninsiirtoketjujen lisäksi superoksidia tuottavat NADPH-oksidaasit, jotka ovat solukalvon entsyymikomplekseja (Demidchik ym., 2015). Superoksidi ei pysty diffundoitumaan solukalvojen läpi negatiivisen varauksensa takia (Alscher ym., 2002). Sen mahdollinen siirtymismatka syntypaikastaan on vain muutama mikrometri. Superoksidi pelkistää vapaita radikaaleja ja ROS:ja, muttei pysty muokkaamaan biopolymeerejä (Demidchik ym., 2015). Superoksidi kuitenkin vaurioittaa rauta-rikkiproteiineja (Choudhury ym., 2016). Superoksidin vaikutus oksidatiiviseen stressiin voi vaihdella eri abioottisten ja biottisten stressien kohdalla. Valon, UV-säteilyn ja monien ksenobioottien aiheuttamissa stressitiloissa elektroninsiirtoketjujen kautta syntyvä superoksidi on todistetusti oksidatiivisen stressin päätekijä (Demidchik, 2015).

Protonin liittyessä superoksidiin syntyy hydroperoksyyliradikaali, joka on superoksidia reaktiivisempi ja pysyvämpi (Demidchik, 2015). Reaktio tapahtuu kuitenkin matalassa pH:ssa, joten kasvisolussa hydroperoksyyliradikaalin määrä on yleisellä tasolla pieni (Bhattacharjee, 2005). Happamissa organelleissa, kuten vakuoleissa ja lysosomeissa, hydroperoksyyliradikaalin vaikutus on merkittävämpi (Demidchik, 2015).

Vetyperoksidi on heikko happo, joka on merkittävimmistä reaktiivisista happilajeista kemiallisesti pysyvin. Se ei pysty hajottamaan DNA:ta tai muita biopolymeerejä mutta on kuitenkin soluille vahingollinen (Demidchik, 2015). Vetyperoksidi voi diffundoitua kalvojen läpi ja tällöin siirtyä eri puolille solua riippumatta syntypaikastaan (Michalak, 2006). Vaikkei vetyperoksidi hajota makromolekyylejä, se pystyy hapettamaan tioli-ryhmiä (-SH). Eräät aminohapot, kuten kysteiini ja metioniini sisältävät tämän ryhmän (Demidchik, 2015). Vetyperoksidin hapettaessa näitä aminohappoja proteiinien rakenne muuttuu, mikä voi vaikuttaa esimerkiksi transkriptiotekijöiden sitoutumisen kautta translaatioon (Choudhury ym., 2016). Myös eräät entsyymit sisältävät tioli-ryhmiä, joten vetyperoksidi voi estää kyseisten entsyymien aktiivisuutta (Demidchik, 2015). Vetyperoksidia syntyy elektronin ja kahden protonin liittyessä superoksidiin (Gill & Tuteja, 2010). Vetyperoksidin luonnollinen muodostuminen kasvisolussa johtuu pääasiassa foto-oksidaatioreaktioista ja rasvahappojen  $\beta$ -oksidaatiosta (Demidchik, 2015). Lisäksi fotorespiraatio ja puriinien katabolia synnyttävät vetyperoksidia peroksisomeissa (Gill & Tuteja, 2010).

Fotorespiraatioissa vetyperoksidi syntyy glykolaatin hapettuessa glyoksylaatiksi (Bhattacharjee, 2005).

Hydroksyyliiradikaali on merkittävistä reaktiivisista happilajeista vaarallisin ja sen siirtymismatka syntypaikastaan lyhin. Yhdiste voi diffundoitua alle yhden nanometrin, mutta se aiheuttaa ROS:sta eniten vahinkoa solussa hajottamalla biopolymeerejä (Demidchik, 2015). Suurin osa hydroksyyliiradikaaleista syntyy Fentonin reaktiossa, josta kerrotaan tarkemmin kappaleessa 3.3.. Hydroksyyliiradikaaleja voi muodostua myös Fentonin tapaisessa reaktiossa, jossa reaktion rautaioni korvataan jollain toisella siirtymämetallilla (Michalak, 2006). Yhdistettä voi myös syntyä vedestä homolytyttisellä fissiolla, jossa toinen vedyn ja hapen välisistä sidoksista katkeaa ja sidoksen atomit jakautuvat tasan vedyn ja hapen kesken. Tämä vaatii kuitenkin enemmän energiaa kuin hydroksyyliiradikaalin syntyminen Fentonin tapaisen reaktion kautta (Demidchik, 2015).

Singlettihappi eroaa aiemmin esitellyistä reaktiivisista happilajeista, sillä sen synty ei liity hapetus-pelkistysreaktioihin. Singlettihappi on dioksidin ensimmäinen virittynyt tila (Gill & Tuteja, 2010). Kloroplastien fotosysteemi II:en klorofylli muuttuu virittyessään valossa triplettimuotoon, joka hapen kanssa reagoidessaan muodostaa singlettihapetta. Valon määrän ylittäessä fotosynteesin kapasiteetin, ylimääräinen valoenergia purkautuu singlettihapen muodostuksessa. Abioottisista ympäristötekijöistä kuumuus ja kuivuus johtavat ilmarakojen sulkemiseen, mikä saa aikaan hiilidioksidin puutetta. Tätä kautta fotosynteesi vähenee ja singlettihapen syntyminen lisääntyy entisestään (Kapoor ym., 2019). Lipoksigenaasi, joka on lipidejä hapettava entsyymi, muodostaa myös singlettihapetta (Bhattacharjee, 2005). Singlettihappi pystyy diffundoitumaan solussa noin 190 nanometriä, eli sen elämänkaari ei ole kovinkaan pitkä (Demidchik, 2015).

### 3.2. Typen reaktiiviset muodot

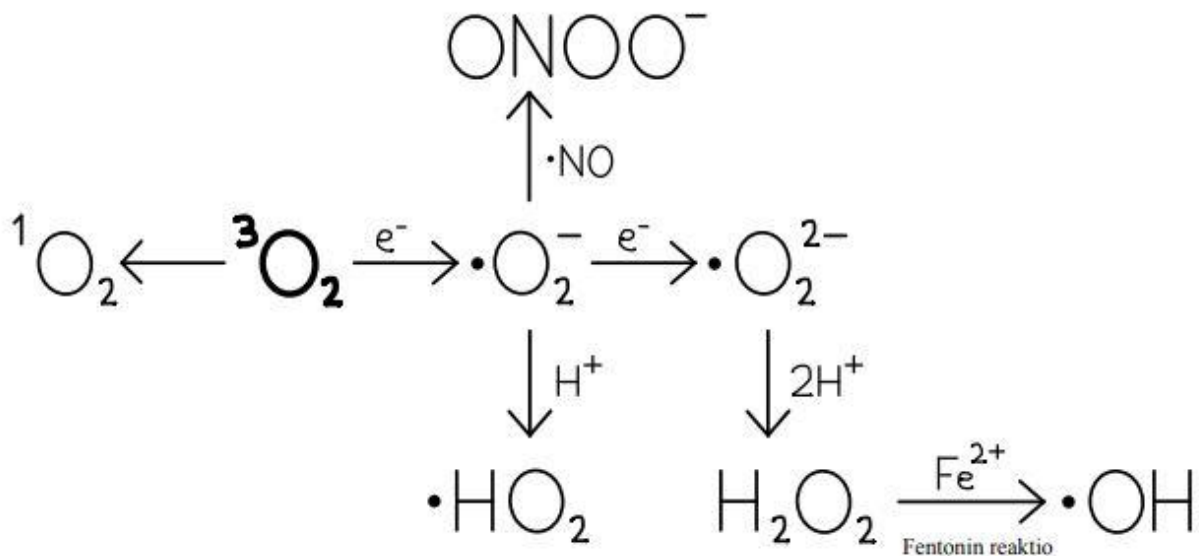
Typen reaktiivisten muotojen (RNS) kertyminen kasvisoluun aiheuttaa kasvissa hapettumisesta johtuvia vaurioita, mitä kutsutaan typen yhdisteiden kohdalla nitrosatiiviseksi stressiksi. Olennaisin typen reaktiivinen muoto on typpioksidi ( $\cdot\text{NO}$ ) (Demidchik, 2015). Muita nitrosatiivista stressiä lisääviä yhdisteitä ovat typpidioksidi ( $\cdot\text{NO}_2$ ), typpihapoke ( $\text{HNO}_2$ ), peroksinitriitti ( $\text{ONOO}^-$ ) ja alkyyliperoksinitriitti ( $\text{RONOO}$ ) (Das ym., 2016). Wang ym. (2013) mainitsee katsausartikkelissaan näiden yhdisteiden lisäksi nitrosoniumionin ( $\text{NO}^+$ ), S-nitrosotiolit ( $\text{SNO:t}$ ) ja dinitrosyyliirautakompleksit ( $\text{DNIC:t}$ ). Typen reaktiiviset muodot ovat huomattavasti vähemmän tutkittuja kuin ROS:t, mutta niiden tiedetään kasvattavan merkittävästi oksidatiivista stressitilaa

(Demidchik, 2015). Samoin kuin ROS:t myös RNS:t voivat vahingoittaa solun biopolymeerejä tai toimia signaalimolekyyleinä (Kapoor ym., 2019).

Typpioksidin vaikutus kasvin kehitykseen, kasvuun ja solun sisäiseen signaalointiin (Kapoor ym., 2019). Typpioksidilla on myös suuri rooli patogeeneiltä puolustautumisessa (Wang ym., 2013). Yhdistettä syntyy erilaisissa solun entsyymaattisissa ja ei-entsyymaattisissa synteeseissä, joita on havaittu tapahtuvan peroksisomeissa, mitokondrioissa ja kloroplasteissa (Kapoor ym., 2019). Typpioksidin voi muodostaa peroksinitriittiä reagoiessaan superoksidin kanssa (Demidchik ym., 2015). Typpioksidin reagoi glutationin (GSH) kanssa hapen läsnäollessa S-nitrosylaatiolla, jolloin muodostuu S-nitroglutationi (GSNO). Typpioksidin ja GSNO:n läsnäollessa peroksinitriitti aiheuttaa proteiineissa translaation jälkeisiä muokkauksia, joista esimerkkejä ovat nitraatio ja S-nitrosylaatio. Nämä reaktiot johtavat useampien entsyymien inhibitioon peroksisomeissa, joissa peroksinitriitti tyypillisesti esiintyy (Kapoor ym., 2019).

### 3.3. Reaktiivisten happi- ja typpilajien kemialliset syntyreaktiot

Reaktiivisten happi- ja typpilajien syntyminen hapetus-pelkistysreaktioiden kautta triplettihapesta esitetään kuvassa 1.



Kuva 1. Reaktiivisten happi- ja typpilajien syntyminen. Triplettihappi, joka esitetään kuvassa tummemmalla viivalla, muuttuu virittyessään singlettihapeksi. Mikäli triplettihapteen liittyy elektroni, muodostuu superoksidi. Protonin liittyessä superoksidiin syntyy

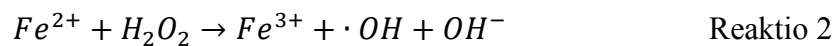


hydroperoksyyliradikaali, elektronin liittyessä superoksidin syntyy peroksidi-ioni ja typpioksidin reagoissa superoksidin kanssa muodostuu peroksinitriitti. Peroksidi-ioniin voi liittyä kaksi protonia, jolloin syntyy vetyperoksidi. Tämä voi reagoida Fentonin reaktion kautta hydroksyyliiradikaaliksi.

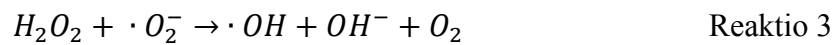
Kapoor ym. (2019) ja Hernández ym. (2009) mukaan Haber-Weissin syklistä hydroksyyliiradikaali muodostetaan superoksidista ja vetyperoksidista. Fentonin reaktio on osa Haber-Weissin sykliä ja siihen vaaditaan rautaioneja (Kapoor ym., 2019). Reaktiossa 1 esitetään raudan pelkistyminen superoksidin kanssa:



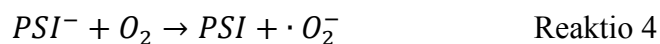
Reaktiossa 2 esitetään raudan hapettuminen vetyperoksidin kanssa eli Fentonin reaktio:



Reaktiossa 3 esitetään Haber-Weissin sykli kokonaisuudessaan (Kapoor ym., 2019; Hernández ym., 2009):



Mehlerin reaktiossa fotosysteemi I pelkistää molekulaarisen hapen, jolloin syntyy superoksidi. Reaktiossa 4 esitetään Mehlerin reaktio (Hernández ym., 2009):



## 4. Reaktiivisten happi- ja typpilajien aikaansaamat reaktiot

### 4.1. Biopolymeerien hapetus

ROS:t ja RNS:t aiheuttavat solussa vahinkoa hapettamalla biopolymeerejä, joihin kuuluvat proteiinit, lipidit, nukleiinihapot ja hiilihydraatit (Demidchik, 2015). Hapetusreaktiot johtavat näiden orgaanisten molekyylien toimintahäiriöihin foto-oksidatiivisten vaurioiden kautta (Kapoor ym., 2019). Hydroksyyliiradikaali on pääasiassa vastuussa biopolymeerien hapetuksesta (Demidchik ym., 2015).

ROS:t aiheuttavat kovalenttisia, translaation jälkeisiä muutoksia proteiineissa, jolloin ne hapettuvat. Nämä muutokset voivat olla palautuvia tai palautumattomia, joista palautumattomat ovat

tyypillisempiä. Rikkiä sisältävien aminohappojen, kuten metioniinin ja kysteiinin hapetusreaktiot ovat palautuvia (Gill & Tuteja, 2010). Proteiinien hapetus muuttaa niiden rakennetta, joka vaikuttaa kasvin metaboliaan ja transkription säätelyyn (Choudhury ym., 2016). Syntyvät proteiinien toimintahäiriöt laskevat entsyymien aktiivisuutta (Kapoor ym., 2019). Toiminnalliset seuraukset riippuvat siitä, mikä proteiinin aminohapoista hapettuu (Demidchik, 2015). Tyypillisimmät muutokset proteiineissa ovat sulfonylaatio, karbonylaatio, S-glutathionylaatio ja S-nitrosylaatio. Sulfonylaatiossa metioniinin tai kysteiinin tioliryhmä hapettuu (Choudhury ym., 2016). Karbonylaatio on toiseksi yleisin proteiineja hapettava reaktio, sillä se vaatii enemmän energiaa kuin sulfonylaatio (Demidchik, 2015). Karbonylaatiota käytetään laajalti hapettuneen proteiinin tunnistamisessa (Gill & Tuteja, 2010). Karbonylaatiossa aminohapon sivuketju hapettuu, joka vaikuttaa huomattavasti proteiinin entsyymaattisiin ja fysiologisiin ominaisuuksiin (Demidchik, 2015). Aminohapot, joille karbonylaatio on tyypillistä, ovat arginiini, histidiini, lysiini, proliini ja treoniini (Choudhury ym., 2016). S-glutathionylaatiossa kysteiinin hapettuneeseen happomuotoon liittyy glutationi. S-nitrosylaatiossa typpioksidi liittyy kysteiinin tioliryhmään muodostaen S-nitrosotiolin (Wang ym., 2013).

Lipidien hapetusreaktiot aiheuttavat solussa mittavia vaurioita, sillä aineiden kulkua säätelevät membraanit koostuvat lipideistä (Gill & Tuteja, 2010). Oksidatiivinen stressitila voidaan tunnistaa hyvin tarkastelemalla hapettuneiden lipidien määrää kasvissa (Demidchik, 2015). Lipidien hapetus jakaantuu kolmeen osaan; aloitus-, etenemis- ja päättymisvaiheeseen (Bhattacharjee, 2005). Hydroksyyliiradikaali on pääasiallisesti vastuussa aloitusvaiheesta hapettamalla lipidejä, mutta myös lipoksigenaasi voi saada aikaan aloitusvaiheen. Hydroksyyliiradikaalin toimintaan perustuvassa aloitusvaiheessa yhdiste irrottaa lipidiltä vetyatomin ja muodostaa alkyyliradikaalin (Gill & Tuteja, 2010). Siirtymämetallikompleksit ovat osa aloitusvaihetta, joista tyypillisimpiä ovat rautaa tai kuparia sisältävät kompleksit (Bhattacharjee, 2005). Etenemisvaiheessa lipidin alkyyliradikaali reagoi hapen kanssa, jolloin syntyy peroksyyliradikaali. Tämä reagoi uuden lipidin kanssa muodostaen hydroperoksidin ja uuden lipidin alkyyliradikaalin. Lopetusvaiheessa kaksi radikaalia yhdistyy ja syntyy stabiili dimeeri (Gill & Tuteja, 2010).

Reaktiiviset happi- ja tyypilajit aiheuttavat nukleiinihapoille genotoksista stressiä. Hydroksyyliiradikaali vaurioittaa tehokkaimmin nukleiinihappoja reagoimalla puriinien, pyrimidiinien sekä sokeri-fosfaattirungon kanssa. Singlettihappi vahingoittaa pääasiassa guaniinia, kun taas vetyperoksidi ja superoksidi eivät reagoi ollenkaan DNA:n kanssa. ROS:t saavat aikaan hapetus- ja alkylointireaktioita DNA:ssa, mitkä johtavat esimerkiksi emästen muutoksiin tai deleetioihin. Myös pyrimidiinidimeereitä ja verkkosidoksia voi muodostua tai juoste voi katketa

(Gill & Tuteja, 2010). Nämä muutokset voivat johtaa karsinogeneesiin, autoimmuunisairauksiin, kardiovaskulaarisiin tai neurodegeneratiivisiin sairauksiin. DNA:n GC-rikkaat alueet ovat herkkiä ROS:en aiheuttamille muutoksille (Kapoor ym., 2019). Soluilla on kuitenkin paljon luonnollisia mekanismeja korjata DNA:n vaurioita. Antioksidanttisista entsyymeistä, joista kerrotaan tarkemmin kappaleessa 5.1., Katalaasi (CAT) ja askorbaattiperoksidaasi (APX) ovat tärkeitä nukleiinihappojen suojelejoita oksidatiivisessa stressitilassa (Demidchik, 2015).

Verrattuna muihin biopolymeereihin oksidatiivisen stressin aiheuttamia vaurioita hiilihydraateille on tutkittu vähiten. Hydroksyyliiradikaalit saavat aikaan soluseinän löystymistä hajottamalla ksyloglukaania ja pektiiniä. Oksidatiivisen stressin aiheuttamia muutoksia hiilihydraateilla ei kuitenkaan vielä tunneta (Demidchik, 2015).

## 4.2. Ohjelmoitu solukuolema

Ohjelmoitu solukuolema (PCD) on solun luonnollinen mekanismi, joka on välttämätön kasvin kasvussa ja kehityksessä (Wang ym., 2013). Kehityksessä tapahtuvaa solukuolemaa tarvitaan esimerkiksi putkiloiden ja puusolujen muodostuksessa, siementen kehityksessä sekä itämisessä (Van Breusegem & Dat, 2006). Stressitilanteissa ohjelmoitua solukuolemaa käytetään infektoituneiden tai vaurioituneiden solujen poistoon. ROS:en ja RNS:en kertymisellä on merkittävä rooli ohjelmoidun solukuoleman aktivoitumisessa. Suurin vaikutus näistä yhdisteistä tiedetään olevan vetyperoksidilla ja typpioksidilla. Joissakin tilanteissa typpioksidi voi kuitenkin toimia päinvastaisesti vähentäen vetyperoksidin määrää, joka hidastaa solukuolemaa (Wang ym., 2013). Vetyperoksidi aktivoi monia mitogeneeniaktivoituja proteiinikinaaseja (MAPK) (Apel & Hirt, 2004). MAPK:t ovat osa ohjelmoidun solukuoleman signaalikaskadia, johon kuuluu kolmenlaisia proteiinikinaaseja; MAPK:t, MAPK kinaasit (MAPKK) ja MAPKK kinaasit (MAPKKK) (Pormehr ym., 2019). Esimerkiksi riisillä (*Oryza sativa*) ja lituruohoilla (*Arabisopsis*) on monimutkainen MAPK signalointiverkko. Niiden genomeissa on yli sata mitogeneeniaktivoituja proteiinikinaaseja koodaavia geenejä (Apel & Hirt, 2004). Ohjelmoituun solukuolemaan johtava signaalikaskadi voi myös aktivoitua ROS:en aiheuttaman hapetus-pelkistystasapainon muutoksen seurauksena (Van Breusegem & Dat, 2006). Solukuoleman signalointi ei ole kuitenkaan niin tutkittua kasveilla kuin eläimillä. Siihen on havaittu kuuluvan sytokromi c:n vapautuminen mitokondrioista ja kaspasien tapaisten proteiinien aktivaatio (Wang ym., 2013).

Ohjelmoitu solukuolema käsittää monia muotoja, joista yksi on seneskenssi eli vanheneminen. Kasvin iän lisäksi myös ympäristötekijät voivat aktivoida seneskenssin. ROS:t edistävät seneskenssiä hapettamalla biopolymeerejä ja aiheuttamalla seneskenssiin liittyvien geenien ekspressiota (Wang ym., 2013). Seneskenssin alussa kalvojen fosfolipidien määrä romahtaa (Bhattacharjee, 2005). Ohjelmoitua solukuolemaa tapahtuu myös hypersensitiivisessä vasteessa (HR), joka toimii bioottisessa stressissä puolustuskeinona patogeenejä vastaan. Siinä kasvin vauriokohtaa ympäröivät solut kuolevat nopeasti, mikä estää infektion leviämisen laajemmalle alueelle kasviin (Wang ym., 2013). Kuollut solukerros suojaa kasvin eläviä solukkoja (Demidchik ym., 2015). Vetyperoksidi on todettu HR:n solukuolemassa päävaikuttajaksi (Bhattacharjee, 2005). Eräiden tutkimusten mukaan kloroplasteissa syntyneet ROS:t signaloivat HR:ää (Gill & Tuteja, 2010). Myös salisyylihappo vaikuttaa olennaisesti HR:ssä tapahtuvaan solukuolemaan. Salisyylihappo säätelee ohjelmoidun solukuoleman lisäksi immuniteettiä ja signaloi patogeenipuolustuksessa (Pormehr ym., 2019). ROS:t toimivat yhteydessä useiden kasvihormonien ja niiden kaltaisten yhdisteiden kuten etyleenin, salisyylihapon ja jasmiinihapon kanssa ohjelmoidussa solukuolemassa (Van Breusegem & Dat, 2006).

#### 4.3. Nekroosi

Nekroosi on ohjelmoidun solukuoleman rinnalla toinen solukuoleman muoto, jonka aktivoinnissa ROS:t ja RNS:t ovat merkittäviä. Toisin kuin ohjelmoitu solukuolema, nekroosi on hallitsematonta ja ulkoisten tekijöiden aiheuttamaa solukuolemaa. Nekroosissa solukalvot vaurioituvat merkittävästi, mikä johtaa sytoplasmiseen turpoamiseen ja solun hajoamiseen. Ohjelmoidun solukuoleman ja nekroosin erot perustuvat molekyylipainomarkkereihin, sytokromi c:n vapautukseen, kaspaseihin ja ATP:n deplatoon (Van Breusegem & Dat, 2006).

#### 4.4. Reaktiiviset happi- ja tyypilajit signaalimolekyyleinä

ROS:t ja RNS:t toimivat pieninä pitoisuuksina signaalimolekyyleinä (Pormehr ym., 2019). Typpioksidi signaloi monia kasvin kehitysprosesseja kuten itämistä, lehtien laajenemista, lateraalisten juurten kehitystä ja kukkimista. Yhdiste toimii myös esimerkiksi ilmarakojen sulkemisessa. Vetyperoksidi on typpioksidin lisäksi merkittävä signaalimolekyylä. Se signaloi geeniekspressiota ja muokkauksia esimerkiksi proteiinifosfaateissa, proteiinikinaaseissa, transkriptiotekijöissä ja kalsiumkanavissa (Wang ym., 2013). Vetyperoksidi on tärkeä myös

patogeenipuolustuksen signaloinnissa, sillä se saa aikaan patogeneesiin liittyvien proteiinien ja fytoaleksiinien tuotannon. Fytoaleksiinit ovat antimikrobiaalisia kemikaaleja (Bhattacharjee, 2005).

Signaalimolekyyleinä toimivien ROS:en kohteina ovat herkät proteiinit, joiden hapettamisella ja pelkistämällä ROS:t voivat säädellä solun hapetus-pelkistystilaa (Bhattacharjee, 2005). Stressin vasteena hengityspurskeoksidaasihomologit (RBOH:t) tuottavat ROS:t apoplastiin, missä ne toimivat signaalimolekyyleinä. RBOH:ja säätelevät kalsium, fosforylaatio, typpioksidi ja NADPH:n saatavuus. RBOH:n tuottamat signaloivat ROS:t siirtyvät akvaporiniinien kautta solun sytoplasmaan (Choudhury ym., 2016).

Jotta kasvi voi sopeutua stressitilaan mahdollisimman tehokkaasti, on sen kaikkien osien saatava tieto paikallisesta stressistä. Abioottisen stressin vasteena syntyy systeeminen signaali kasvisolujen välillä, minkä toimintaan liittyy ROS:en lisäksi kalsiumionit. Signaali käynnistyy, kun stressi saa aikaan kalsiumionien virtauksen kasvisolun sytosoliin. Tällöin kalsiumionit aktivoivat kalsiumista riippuvat proteiinikinaasit. Nämä aktivoivat RBOH:t solukalvolla, jotka tuottavat ROS:ja apoplastiin, mikä puolestaan saa naapurisolun kalsiumkanavat aktivoitumaan ja signaalin etenemään. Signaalin etenemisnopeus on 8,4 cm/min (Choudhury ym., 2016).

#### 4.4.1 Sopeutuminen

Reaktiiviset happi- ja typpilajit muodostavat solun eri osiin kokoelmia, jotka riippuvat solutyypistä, sen kehitysvaiheesta ja stressitilasta. Stressi muuttaa ROS:en määrää ja esiintymistä, jolloin ROS-sensorit tunnistavat tietyn abioottisen stressin tai useamman yhdistelmän. Tällöin syntyy stressikohtainen signaali, joka voi johtaa kasvin sopeutumiseen kyseiseen stressitilaan eli akklimatisaatioon. Sopeutuminen tapahtuu hapetus-pelkistysreaktioiden kautta. Ne säätelevät sopeutumisproteiinien ja -entsyymien translaatiota ja transkriptiota. Proteiineissa tapahtuvat hapetus-pelkistysreaktiot saavat aikaan muutoksia niiden rakenteessa ja toiminnassa, mikä säätelee niiden transkriptiotekijöihin sitoutumista ja aktivoi signaalintireitin (Choudhury ym., 2016). ROS:t ovat tärkeä osa kasvin hankittua vastustuskykyä (Kapoor ym., 2019). Myös kasvihormonit kuten abskissihappo (ABA), auksiini, brassinosteroidit, gibberelliinit ja typpioksidi vaikuttavat kasvin sopeutumiseen. Useampien stressitekijöiden yhteisvaikutuksessa abskissihappo vaikuttaa olevan tärkein säätelijä kasvihormoneista (Choudhury ym., 2016).

## 5. Antioksidantit

Stressitilassa kasvin antioksidanttitasot kasvavat, sillä ne ovat vastuussa reaktiivisten happi- ja typpilajien neutraloinnista pelkistämällä näitä yhdisteitä (Kapoor ym., 2019). Stressitila käynnistää antioksidanttien aktivoinnin ja uusien synteesin (Demidchik ym., 2015). Antioksidantit jaetaan antioksidanttisiin entsyymeihin ja yhdisteisiin (Hernández ym., 2009). Ne pelkistävät reaktiivisia yhdisteitä eri solun osissa riippuen yhdisteiden syntypaikoista. Solunsisäiset antioksidatiiviset järjestelmät ovat kuitenkin solunulkoisia tehokkaampia, minkä seurauksena ROS:ja kertyy apoplastiin (Choudhury ym., 2016).

### 5.1. Antioksidanttiset entsyymit

Antioksidanttiset entsyymit ovat suuressa roolissa oksidatiiviselta stressiltä puolustautumisessa. Kasveilla on monia tärkeitä antioksidanttisia entsyymejä, joihin kuuluvat superoksididismutaasi (SOD), katalaasi (CAT), askorbaattiperoksidaasi (APX), glutathionireduktaasi (GR), monodehydroaskorbaattireduktaasi (MDHAR), dehydroaskorbaattireduktaasi (DHAR), glutathioniperoksidaasi (GPX), guajakoliperoksidaasi (GPOX) ja glutathioni-S-transferaasi (GST) (Gill & Tuteja, 2010). Choudhury ym. (2016) mainitsee artikkelissaan myös peroksiredoksiinin (PRX). Kasvihormoni abskissihappo (ABA) on yksi tekijöistä, joka säätelee antioksidanttisten entsyymien aktiivisuuksia ja niiden koodausta (Bhattacharjee, 2005). Eri antioksidanttien merkitys vaihtelee stressikohtaisesti (Gill & Tuteja, 2010). Esimerkiksi Denaxa ym. (2020) suorittaman tutkimuksen mukaan kuivastressistä kärsivillä oliivipuilla SOD, GR ja APX –entsyymiaktiivisuudet kasvoivat stressitilassa.

Superoksididismutaasi muodostaa solun ensipuolustuksen ROS:ja vastaan (Apel & Hirt, 2004). SOD on entsyymi, joka saa superoksidin reagoimaan protonien kanssa muodostaen vetyperoksidia ja sivutuotteena happea (Alscher ym., 2002). Mitokondrioissa käytetystä hapesta 1-5% muodostaa vetyperoksidia SOD:n toiminnan kautta. Erään tutkimuksen mukaan *Bruguiera gymnorrhiza* -lajilla SOD-aktiivisuus nousi kahdeksankertaiseksi suolastressissä (Gill & Tuteja, 2010). Superoksidi ei pysty diffundoitumaan solukalvojen läpi negatiivisen varauksensa takia, joten tästä syystä SOD-entsyymejä esiintyy ympäri solua samoissa organelleissa, joissa superoksidia syntyy (Alscher ym., 2002). SOD:it voidaan jakaa kolmeen ryhmään metallikofaktorinsa perusteella. Metallifaktorina toimii joko rauta, mangaani tai kupari-sinkki (Das ym., 2016). Fe-SOD esiintyy kloroplasteissa, Mn-SOD mitokondrioissa ja peroksisomeissa sekä Cu-Zn-SOD kloroplasteissa että sytosolissa (Gill

& Tuteja, 2010). Cu-Zn-SOD toimii myös apoplastissa (Choudhury ym., 2016). Kaikki SOD:t koodataan tumassa ja ohjataan solun osiin aminopääteisillä kohdistussekvensseillä (Gill & Tuteja, 2010). Fe-SOD ja Mn-SOD ovat evolutiivisesti vanhempia ja muistuttavat toisiaan rakenteeltaan. Cu-Zn-SOD on näitä uudempi ja eroaa muista sähköisten ominaisuuksiensa perusteella (Alscher ym., 2002). Geeniperheet koodaavat SOD:ja kasveilla, toisin kuin monilla muilla organismeilla (Apel & Hirt, 2004). SOD:en yliekspressiolla voidaan valmistaa transgeenisia stressin sietokykyisiä kasveja (Gill & Tuteja, 2010).

Katalaasi on tetrameerinen hemiryhmän sisältävä antioksidanttinen entsyymi (Gill & Tuteja, 2010). Katalaasi esiintyy pääasiassa peroksisomeissa ja se pelkistää vetyperoksidia hapeksi ja vedeksi (Apel & Hirt, 2004). Tästä syystä CAT onkin pääasiassa vastuussa fotorespiraatioissa syntyneiden ROS:en pelkistyksestä (Choudhury ym., 2016). CAT toimii huomattavan tehokkaasti, sillä yksi katalaasimolekyylillä pystyy pelkistämään noin 6 miljoonaa vetyperoksidimolekyylä minuutissa. Katalaasin isoentsyymeitä on tutkittu paljon korkeammilla kasveilla, joilla isoentsyymien lukumäärä on lajista riippuvainen. Esimerkiksi *Brassica*-suvun kasveilla on 12 katalaasin isoentsyymiä, kun taas *Zea mays* -lajilla on kolme (Gill & Tuteja, 2010).

Glutathioni-S-transferaasit muodostavat laajan ryhmän entsyymeitä, jotka toimivat esimerkiksi tyrosiinin metaboliassa, hyönteismyrkkujen detoksifikaatioissa, kasvihormonien homeostaasissa, solukuoleman säätelyssä ja stressivasteessa. Askorbaattiperoksidaasi, glutathionireduktaasi, monodehydroaskorbaattireduktaasi ja dehydroaskorbaattireduktaasi toimivat askorbaatti-glutathionisyklissä, joka esitetään kappaleessa 5.2.. APX on katalaasia tärkeämpi vetyperoksidin pelkistäjä. APX:llä on monia muotoja, joista esimerkkejä ovat sytosolissa, glyoksisomien kalvolla, kloroplastin stroomassa ja tylakoideissa toimivat muodot. GR on flavo-proteiini, joka katalysoi hapetus-pelkistysreaktioita. GR toimii pääasiassa kloroplasteissa, mutta sen tiedetään esiintyvän myös mitokondrioissa ja sytosolissa. MDHAR on flaviinideniinidinukleotidi eli koentsyymi, joka toimii hapetus-pelkistysreaktioissa. MDHAR:sta esiintyy kloroplastinen ja sytosolinen isoentsyymi (Gill & Tuteja, 2010).

Hydroksyyliiradikaaleja ei pelkistä yksikään antioksidanttinen entsyymi, vaikka se on yleisistä ROS:sta eniten vauriota aiheuttava. Mikäli siirtymämetallien määrä solussa pysyy matalana, ei hydroksyyliiradikaalia kuitenkaan synny Fentonin reaktion kautta vaarallisia määriä (Choudhury ym., 2016).

## 5.2. Antioksidanttiset yhdisteet

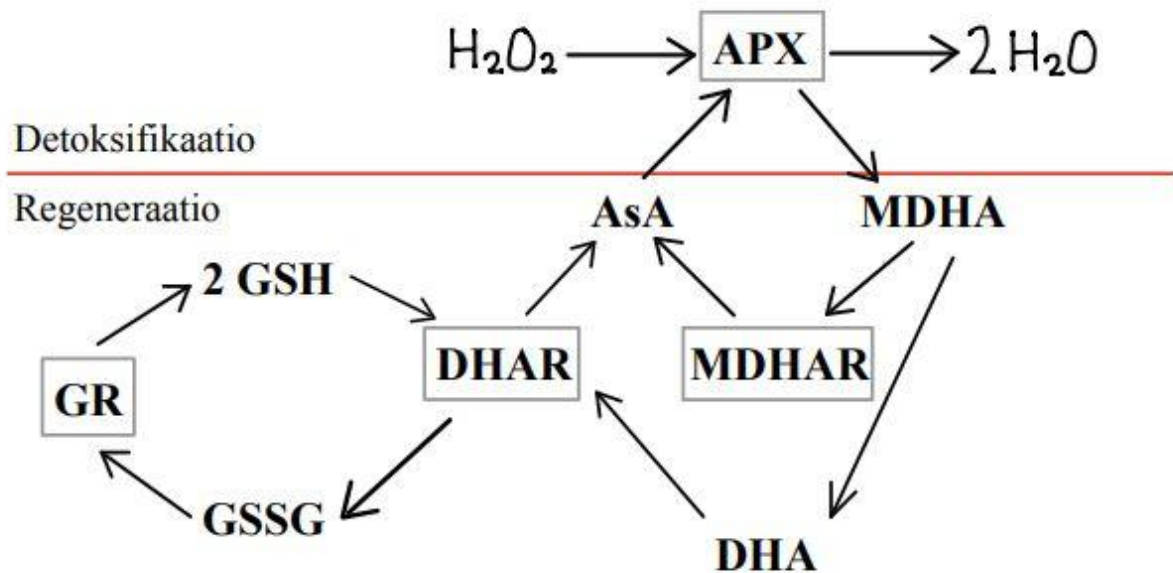
Kasveilla on paljon ei-entsymaattisia antioksidanttisia yhdisteitä, joiden antioksidatiivinen merkitys vaihtelee. Kapoor ym. (2019) nimeää olennaisimmiksi yhdisteiksi askorbiinihapon (C-vitamiini),  $\alpha$ -tokoferolin (E-vitamiini) ja glutationin (GSH). Muita tärkeitä antioksidanttisia yhdisteitä ovat karotenoidit, flavonoidit ja alkaloidit (Apel & Hirt, 2004). Demidchik (2015) mainitsee näiden lisäksi myös betaiinin, proliinin ja polyamiinit. Flavonoidit esitellään erikseen fenolisten yhdisteiden alla kappaleessa 5.2.1..

Askorbiinihappo ja glutationi pelkistävät solussa superoksidia, singlettihapetta, hydroksyyliiradikaaleja ja vetyperoksidia (Das ym., 2016). Askorbiinihappo on vesiliukoinen vitamiini. Sen tiedetään olevan kasvien yleisin ja tehokkain antioksidantti. Askorbiinihapon tehokkuus perustuu kykyyn luovuttaa elektroneja entsymaattisissa ja ei-entsymaattisissa reaktioissa. Yhdiste esiintyy kaikissa kasvisolukoissa, mutta on runsain meristeemeissä ja fotosynteettisissä soluissa (Gill & Tuteja, 2010). Glutationi on pienikokoinen tripeptidi ja tioli (Das ym., 2016), joka voidaan nähdä kasvien tärkeimpänä antioksidanttina (Gill & Tuteja, 2010). Antioksidanttinen vaikutus riippuu kuitenkin glutationin konsentraatiosta, joka vaihtelee stressikohtaisesti. Glutationi suojelee tioliryhmiä ja signaloi myös rikin aineenvaihdunnassa (Gill & Tuteja, 2010). Puolestaan  $\alpha$ -tokoferoli on rasvaliukoinen vitamiini, joka pelkistää superoksidia, singlettihapetta, alkoksyyliiradikaaleja, lipidien peroksyliiradikaaleja, alkyliiradikaaleja ja alkyyliperoksyliiradikaaleja (Das ym., 2016). Tokoferoleita esiintyy kasveissa neljä isomeeriä, mutta  $\alpha$ -muoto on niistä tehokkain antioksidantti (Gill & Tuteja, 2010). Yksi  $\alpha$ -tokoferolimolekyylillä voi pelkistää 120 singlettihappimolekyylillä. Lipidien peroksyliiradikaaleja pelkistäessään  $\alpha$ -tokoferoli muuttuu  $\alpha$ -tokoferoksyliiradikaaliksi, jonka puolestaan askorbiinihappo pelkistää (Mishra ym., 2019). Tokoferolit esiintyvät kloroplastien tylakoidikalvossa ja ne suojelevat kalvoja oksidatiiviselta vauriolta (Gill & Tuteja, 2010).

Katalaasientsyymin lisäksi askorbiinihappo ja glutationi pelkistävät vetyperoksidia. Askorbiinihappo hävittää vetyperoksidia askorbaatti-glutationisyklillä, jossa askorbaatti (AsA) pelkistää vetyperoksidin vedeksi askorbaattiperoksidaasin (APX) toimiessa katalyyttinä (kuva 2, Kapoor ym., 2019). Tällöin askorbaatti hapettuu monodehydroaskorbaatiksi (MDHA), joka on saatava pelkistettyä takaisin askorbaatiksi. Monodehydroaskorbaattireduktaasi (MDHAR) pelkistää MDHA:n askorbaatiksi käyttäen NADPH:ta. Osa MDHA:sta muuttuu kuitenkin spontaanisti dehydroaskorbaatiksi (DHA), joka on myös pelkistettävä takaisin askorbaatiksi. Dehydroaskorbaattireduktaasi (DHAR) pelkistää DHA:n askorbaatiksi, mutta tarvitsee reaktion



myös glutationin (GSH), joka hapettuu glutationidisulfidiksi (GSSG). Sykli sulkeutuu, kun glutationireduktaasi (GR) pelkistää GSSG:n takaisin GSH:ksi käyttäen NADPH:ta. GSH:n ja GSSG:n määrien suhdetta voidaan käyttää oksidatiivisen stressitilan määrittämiseen (Kapoor ym., 2019). Solun normaalitilassa GSH:n suhde GSSG:en on 20:1 (Mishra ym., 2019).



Kuva 2. Askorbaatti-glutationisykli. AsA pelkistää vetyperoksidin vedeksi APX:n toimiessa katalyyttinä, jolloin AsA hapettuu MDHA:ksi. MDHAR pelkistää MDHA:n AsA:ksi. Osa MDHA:sta muuttuu spontaanisti DHA:ksi. DHAR pelkistää DHA:n askorbaatiksi, mutta tarvitsee reaktioon myös GSH:n, joka hapettuu GSSG:ksi. GR pelkistää GSSG:n takaisin GSH:ksi.

Glutationi pelkistää vetyperoksidia glutationiperoksidaasisyklillä, jossa APX:n tilalla toimii glutationiperoksidaasi (GPX) (Apel & Hirt, 2004). Sykli on huomattavasti askorbaatti-glutationisykliä lyhempi. GSH pelkistää vetyperoksidin vedeksi GPX:n toimiessa katalyyttinä. Tällöin GSH hapettuu GSSG:ksi, jonka GR pelkistää takaisin GSH:ksi. Glutacioniperoksidaasisyklin merkitys on suuri sytosolissa (Apel & Hirt, 2004), kun taas askorbaatti-glutationisykli toimii enemmänkin kloroplasteissa ja muissa organelleissa (Das ym., 2016). Puolestaan vakuolissa ja apoplastissa fenoliset yhdisteet pelkistävät vetyperoksidia peroksidaasien toimiessa katalyyttinä. Reaktiossa fytofenolit hapettuvat fenoksyyliradikaaleiksi, joiden regeneraatio tapahtuu askorbaatin avulla (Michalak, 2006).

Karotenoidit ovat pigmenttejä, jotka suojelevat fotosynteesistä laitteistoa poistamalla muun muassa klorofyllin triplettimuotoa ja singlettihapetta (Gill & Tuteja, 2010). Karotenoidit pelkistävät myös superoksidia, hydroksyyli- ja peroksyyliradikaaleja (Kapoor ym., 2019). Puolestaan proliini on perinteisesti luokiteltu osmoottisen tasapainon ylläpitäjäksi, mutta sen rooli antioksidanttina ja solukuoleman estäjänä on myös havaittu. Proliini pelkistää singlettihapetta ja hydroksyyli- ja peroksyyliradikaaleja (Gill & Tuteja, 2010).

### 5.2.1. Fenoliset yhdisteet

Fenoliset yhdisteet ovat yksi tärkeimmistä kasvin tuottamista sekundaarimetaboliiteista. Ne sisältävät kemiallisessa rakenteessaan vähintään yhden aromaattisen renkaan, johon on kiinnittyneenä hydroksyyli-ryhmä. Fenoliset yhdisteet kelatoivat metalleja ja pystyvät sitomaan erityisesti rautaa ja kuparia. Näiden yhdisteiden merkitys on suuri raskasmetallien aiheuttamassa stressitilassa, ja tästä syystä kasvien juuret sisältävätkin paljon fenolisia yhdisteitä. Fenoliset yhdisteet myös estävät lipidien hapetusta sitoutumalla lipidin alkoksyyliradikaaliin. Fenoliset yhdisteet jakautuvat alaluokkiin rakenteensa perusteella, ja näistä yksi on flavonoidit (Michalak, 2006). Flavonoidit sisältävät flavonolit, flavonit, isoflavonoidit ja antosyaanit (Gill & Tuteja, 2010). Ne stabiloivat membraaneja, vähentävät hapetusreaktioita ja estävät vapaiden radikaalien diffuusiota (Michalak, 2006). Flavonoidit toimivat kasvi-patogeeni –vuorovaikutuksessa, pölytyksessä, siementen kehityksessä ja allelopatiassa, jossa kasvi erittää muiden kasvien esiintymiseen vaikuttavia kemikaaleja. Flavonoideja löytyy kasvin kaikista solukoista, mutta niiden antioksidatiivisesta merkityksestä on kiistelty, sillä se ei ole niin selkeä kuin monien muiden antioksidanttien kohdalla. Vaikka flavonoideilla on antioksidatiivisia vaikutuksia, niiden hapetustuotteiden spatiotemporaalinen esiintyminen ROS:en kanssa on epäselvää. Flavonoideista varmimmin flavonolit toimivat antioksidanteina (Hernández ym., 2009).

## 6. Yhteenveto

Abioottiset ja bioottiset ympäristötekijät luovat kasville stressitilan, joka aikaansaa reaktiivisten happi- ja typpilajien syntyä. Näiden yhdisteiden kertyminen aiheuttaa kasvissa oksidatiivista stressiä, joka johtaa orgaanisten molekyylien hapettamiseen ja pahimmillaan solukuolemaan. ROS:lla on kuitenkin myös hyviä ominaisuuksia, sillä ne auttavat pieninä pitoisuuksina kasveja sopeutumaan stressitilaan, toimivat signaalimolekyyleinä ja patogeenipuolustuksessa. ROS:en

määrän kasvaessa antioksidanttiset entsyymit ja yhdisteet puolustavat kasveja oksidatiiviselta stressiltä pelkistämällä näitä reaktiivisia yhdisteitä. Kasveilla on lukuisia eri antioksidantteja, joista tärkeimpiä ovat askorbiinihappo ja glutationi. Nämä ja antioksidanttisista entsyymeistä APX, MDHAR, DHAR ja GR toimivat askorbaatti-glutationisyklissä. Merkittävimpiä ROS:en hävityksessä ovat myös SOD, CAT ja  $\alpha$ -tokoferoli. Muita olennaisia antioksidantteja ovat GPX, GPOX, GST, PRX, flavonoidit, alkaloidit ja karotenoidit. ROS:en kertymisen lisäksi myös antioksidanttien puute johtaa oksidatiiviseen stressitilaan.

## 7. Lähteet

- Alscher, R. G. (2002). Role of superoxide dismutases SODs in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341.  
<https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373-399.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Bhattacharjee, S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 89(7), 1113-1121.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2016). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.13299>
- Das, S. K., Patra, J. K., & Thatoi, H. (2016). Antioxidative response to abiotic and biotic stresses in mangrove plants: A review. *International Review of Hydrobiology*, 101(1-2), 3-19.  
<https://doi.org/10.1002/iroh.201401744>
- Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212-228.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>
- Denaxa, N., Damvakaris, T., & Roussos, P. A. (2020). Antioxidant defense system in young olive plants against drought stress and mitigation of adverse effects through external application of alleviating products. *Scientia Horticulturae*, 259, 108812.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108812>

- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., & Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*, 14(3), 125-132. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.12.003>
- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R., & Singh, J. (2019). Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene*, 19, 100182. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100182>
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523-530.
- Mishra, B., Chand, S., & Singh Sangwan, N. (2019). ROS management is mediated by ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol triad in co-ordination with secondary metabolic pathway under cadmium stress in *Withania somnifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 620-629. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.03.040>
- Pormehr, M., Ghanati, F., Sharifi, M., McCabe, P. F., Hosseinkhani, S., & Zare-Maivan, H. (2019). The role of SIPK signaling pathway in antioxidant activity and programmed cell death of tobacco cells after exposure to cadmium. *Plant Science*, 280, 416-423. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.12.028>
- Van Breusegem, F. & Dat, J. F. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 141(2), 384-390. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078295>
- Wang, Y., Loake, G. J., & Chu, C. (2013). Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*, 4(314). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00314>