

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Kateřina Bělonožníková

Proteiny jako zdroj dusíku pro rostliny tabáku pěstované *in vitro*

Proteins as a source of nitrogen for tobacco plants grown *in vitro*

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: RNDr. Veronika Hýsková, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením své školitelky doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne:

.....

Kateřina Bělonožníková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce a zároveň vedoucí laboratoře paní doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc., a paní RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D. za jejich odborné rady a ochotu kdykoliv pomoci. Dále bych chtěla poděkovat panu Mgr. Martinu Černému, Ph.D. za odborné vedení při proteomické analýze kořenů rostlin tabáku a za umožnění stáže na Ústavu molekulární biologie a radiobiologie na Mendelově univerzitě v Brně. Také bych chtěla poděkovat paní RNDr. Heleně Synkové, CSc. z Ústavu experimentální botaniky AV ČR za poskytnutí odborných rad v průběhu experimentů, za příležitost kultivace rostlin tabáku *in vitro*, a vytvoření podmínek pro práci v její laboratoři s fluorescenčním a konfokálním mikroskopem včetně infiltrace listů tabáku a měření aktivity SOD. Také bych chtěla poděkovat paním laborantkám Marcele Špundové a Martě Pechancové z Katedry biochemie PřF UK za lyofilizaci kultivačních médií. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Lence Kolčabové z Ústavu experimentální botaniky AV ČR za odborné rady během kultivace rostlin tabáku *in vitro* a za pomoc při sázení i sklizení rostlin.

Abstrakt

Dusík (N) patří mezi nepostradatelné prvky pro růst a vývoj rostlin. Dříve byla pozornost soustředěna hlavně na jeho anorganické formy - dusičnany a amonné kationty. V půdě je N přítomen také v organické formě, kterou představují i proteiny, o které mohou rostliny soutěžit s půdními mikroorganismy. V současné době jsou zvažovány dva mechanismy - hydrolýza proteinů sekretovanými proteasami a endocytóza nativních proteinů, případně jejich souhra.

Rostliny tabáku byly pěstovány *in vitro* za sterilních podmínek v modifikovaném Murashige-Skoogově médiu s kaseinem jako jediným zdrojem N (KAS), se sníženou koncentrací anorganických forem N (AD) nebo v kompletním Murashige-Skoogově médiu jako kontrolní rostliny (MS). Po 12 týdnech růstu byly změřeny standardní růstové parametry rostlin. KAS rostliny byly schopné růst bez přítomnosti anorganické formy N, a obsah proteinů v listech byl vyšší než v ostatních experimentálních rostlinách. Proteomická analýza ukázala rozdíly v expresi proteinů v kořenech rostlin v závislosti na formě N v kultivačním médiu. Celkově bylo identifikováno 185 proteinů, z nichž 75 % procent proteinů bylo méně a 14 % více abundantních v KAS rostlinách. Příjem konjugátu kaseinu s fluoresceinem rostlinami a jejich proteolytická aktivita byla analyzována konfokální mikroskopií. Mezi proteiny sekretovanými z kořenů rostlin do kultivačního média byla identifikována aspartátová proteasa (nepenthesin-1), serinová proteasa (subtilisin-like) a cysteinová proteasa (kathesin B-like). V kultivačním médiu byla zjištěna také aktivita fosfatasy, endo- β -1,3-glukanasy, celulasy, chitinasy a agarasy. Experimentální rostliny se nelišily v obsahu fenolických látek a H_2O_2 , ale produkce superoxidu, byla mírně vyšší v MS rostlinách. Isoforma Mn-superoxiddismutasy (SOD) byla přítomna jen v KAS rostlinách, zatímco Cu/Zn-SOD byla nalezena ve všech experimentálních skupinách rostlin.

Klíčová slova: dusík, protein, tabák, *in vitro*

Abstract

Nitrogen (N) belongs among necessary elements for plant growth and development. In the past attention was paid mostly to the inorganic forms - nitrate and ammonium. In soil N is also present in organic forms, including proteins, for which plants could compete with soil microorganisms. Recently two ways have been considered - the hydrolysis of proteins by secreted proteases and endocytosis of native proteins, possibly their confluence.

Tobacco plants were grown *in vitro* under sterile conditions in modified Murashige-Skoog medium with casein as the only source of N (CAS), decreased concentration of inorganic forms of N (AD) or in complete Murashige-Skoog medium as control plants (MS). After the 12 weeks growth, the standard growth parameters were measured. The CAS plants were able to grow without inorganic N, and protein content in the leaves was higher than in other experimental plants. Proteomic analysis documented differences in protein expression in plant roots in the dependence on the form of N. In total 185 proteins were identified, 75% of proteins were less and 14% more abundant in the CAS plants. The uptake of casein conjugated with fluorescein was followed and the proteolytic activity was analyzed by confocal microscopy. Among proteins secreted from roots to the medium aspartic protease (nepenthesin-1), serine protease (subtilisin-like), cysteine protease (cathepsin B-like) were identified. Also phosphatase, endo- β -1,3-glucanase, cellulase, chitinase and agarase activities were found in the medium. Experimental plants did not differ in phenolics and H₂O₂ content, but the production of O₂⁻ was slightly higher in the MS plants. Mn-superoxide dismutase (SOD) isoform was present only in the CAS plants, whereas Cu/Zn-SOD was found in all plant samples.

(In Czech).

Keywords: nitrogen, protein, tobacco, *in vitro*

Obsah

1 Úvod	10
1.1. Asimilace dusíku.....	10
1.1.1 Fixace atmosférického dusíku	10
1.1.2 Fixace dusičnanů a amonných kationtů	11
1.1.3 Regulace aktivity nitrátreduktasy	14
1.1.4 Další možné zdroje dusíku.....	15
1.1.5 Příjem organicky vázaného dusíku z půdy	16
1.1.6 Aminokyseliny.....	16
1.1.7 Peptidy	19
1.1.8 Proteiny	21
1.2 Masožravé rostliny.....	24
1.3 Látky sekretované kořeny rostlin.....	27
2 Cíl práce.....	30
3 Materiál a metody	31
3.1 Chemikálie a roztoky	31
3.1.1 Rozpouštědla.....	31
3.1.2 Čisté látky	31
3.2 Přístrojové vybavení	33
3.3 Softwarové vybavení	33
3.4 Rostlinný materiál.....	34
3.4.1 Pěstování rostlin tabáku <i>in vitro</i>	34
3.4.2 Odběr vzorků	35
3.4.3 Příprava lyofilizátu z kultivačního média.....	35
3.4.4 Příprava extraktu z experimentálních rostlin.....	35
3.5 Experimentální metody.....	35

3.5.1 Mikrobiologický test kultivačního média	35
3.5.2 Stanovení množství proteinů Lowryho metodou.....	36
3.5.3 Stanovení množství proteinů dle Bradforda	36
3.5.4 Elektroforetická separace.....	36
3.5.5 Proteomická analýza	38
3.5.5.1 Homogenizace kořenů rostlin a izolace proteinů.....	38
3.5.5.2 Štěpení proteinů	39
3.5.5.3 Odsolení a koncentrování proteinů	39
3.5.5.4 MS Měření	39
3.5.5.5 Izolace proteinů z gelu	40
3.5.5.6 Měření a zpracování MS spekter	40
3.5.5.7 Statistické zpracování MS dat.....	41
3.5.5.8 Změření a zpracování MS/MS spekter	41
3.5.5.9 Validace automatického zpracování v programu Skyline	41
3.5.6 Aktivita proteas.....	42
3.5.7 Proteolýza konjugátu kasein-fluorescein	43
3.5.8 Aktivita fosfatas	43
3.5.9 Aktivita glykosidas	44
3.5.10 Obsah fenolických látek.....	45
3.5.11 Vizualizace peroxidu vodíku a produkce superoxidu v listech experimentálních rostlin	45
3.5.12 Aktivita superoxiddismutasy	45
3.6 Statistické vyhodnocení	46
4 Výsledky.....	47
4.1 Vzhled a růstové parametry rostlin v závislosti na dostupnosti dusíkatých látek	47
4.2 Charakterizace kultivačního média.....	50
4.2.1 Mikrobiologický test kultivačního média	50

4.2.2	Obsah proteinů v kultivačním médiu	50
4.2.3	Separace a identifikace proteinů v kultivačním médiu	51
4.2.4	Enzymové aktivity v kultivačním médiu	52
4.2.4.1	Aktivita proteas v kultivačním médiu.....	52
4.2.4.2	Aktivita fosfatas v kultivačním médiu.....	53
4.2.4.3	Aktivita glykosidas v kultivačním médiu	54
4.2.5	Přítomnost fenolických látek v kultivačním médiu	55
4.3	Charakterizace rostlinného materiálu	56
4.3.1	Obsah proteinů v experimentálních rostlinách	56
4.3.2	Proteomická analýza kořenů experimentálních rostlin	57
4.3.2.1	Lokalizace proteinů ovlivněných odlišným zdrojem dusíku	63
4.3.2.2	Biochemická funkce a protein-proteinové interakce proteinů ovlivněných odlišným zdrojem dusíku.....	63
4.3.2.3	Enzymy podílející se na metabolismu dusíku, aminokyselin a proteinů	65
4.3.3	Proteolytická aktivita v kořenech experimentálních rostlin	66
4.3.4	Aktivita fosfatas v experimentálních rostlinách	69
4.3.5	Aktivita glykosidas v experimentálních rostlinách.....	70
4.3.6	Přítomnost fenolických látek v experimentálních rostlinách.....	71
4.3.7	Detekce reaktivních forem kyslíku v listech experimentálních rostlin.....	72
4.3.8	Aktivita superoxiddismutasy v listech experimentálních rostlin.....	74
5	Diskuze	75
6	Shrnutí	81
	Reference	82
	Příloha.....	86

Seznam použitých zkratek a značek

- %(v/v) objemové procento
- %(w/w) hmotnostní procento
- %(w/v) hmotnostní koncentrace v procentech
- +/- S (+) v / (-) bez přítomnosti 1,5%(w/v) sacharosy v kultivačním médiu
- AAP aminokyselinové permeasy (z angl. *amino acid permeases*)
- ACN acetonitril
- AD rostliny pěstované se sníženým množstvím anorganického dusíku
- BSA hovězí sérový albumin (z angl. *Bovine Serum Albumine*)
- CBB Coomassie Brilliant Blue R250
- DAB 3, 3'-diaminobenzidin
- DQ green BSA fluorogenní substrát proteas, značené BSA (z angl. *Dye-Quenched green BSA*)
- DTT 1, 4-dithiothreitol
- EC číslo enzymové klasifikace (z angl. *Enzyme Commission number*)
- EDTA kyselina ethylendiamintetraoctová
- GFP zelený fluorescenční protein (z angl. *green fluorescence protein*)
- GOGAT glutamin: 2-oxoglutarátaminotransferasa (glutamátsynthasa)
- GS glutaminsynthetasa
- KAS rostliny pěstované s 0,5%(w/v) kaseinem jako jediným zdrojem dusíku
- LHT lysin-histidinový transportér (z angl. *lysine histidine transporter*)
- MBTH 3-methyl-2-benzothiazolinonhydrazon hydrochlorid, monohydrát
- MOPS kyselina 3-(N'-morfolino)propansulfonová
- MS rostliny pěstované v kompletním Murashige-Skoogově médiu
- MS spektrum hmotnostní spektrum (z angl. *Mass Spectrum*)
- NBT nitrotetrazolium blue chlorid
- NiR nitritreduktasa
- NR nitrátreduktasa
- PR protein protein související s pathogenezí (z angl. *pathogenesis-related protein*)
- PVP polyvinylpyrrolidon
- SDS dodecylsírán sodný
- SOD superoxiddismutasa
- TCA kyselina trichloroactová (z angl. *trichloroacetic acid*)
- TEMED N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
- TOF průletový analyzátor v hmotnostní spektrometrii (z angl. *Time Of Flight*)
- Tris tris(hydroxymethyl)aminomethan
- UPLC separační technika v oblasti kapalinové chromatografie (z angl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*)

Veškeré dále zmíněné sacharidy jsou v D-formě, pokud není uvedeno jinak. Veškeré dále zmíněné aminokyseliny jsou v L-formě.

1 Úvod

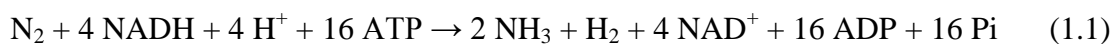
1.1. Asimilace dusíku

Dusík patří mezi kvantitativně nejdůležitější minerální živiny pro růst a vývoj rostliny. Je obsažen v mnoha klíčových látkách, jako jsou aminokyseliny (peptidy a proteiny), nukleotidy, nukleové kyseliny (DNA a RNA), některé kofaktory, vedle primárních metabolitů obsahují dusík i sekundární metabolity - alkaloidy. Nedostatečná dostupnost dusíku má kritické následky na rostlinný metabolismus a růst. Dochází například k zmenšení listů, snížení obsahu chlorofylu a rychlosti fotosyntézy, což vede ke snížené produkci biomasy a množství zásobních sloučenin (např. tuky, proteiny). Z důvodu růstu a vývoje rostliny musí být zajištěn dostatečný příjem dusíku do zdrojových (source) i spotřebních (sink) orgánů [1].

Organický dusík se nachází v oxidačním stavu -III (jako NH_3). Během autotrofního růstu je dusík potřebný pro tvorbu buněčné hmoty poskytován asimilací anorganického dusíku dvěma alternativními cestami. Jednak fixací molekulárního dusíku ze vzduchu, jednak asimilací dusičnanu nebo amoniaku přítomných ve vodě nebo v půdě [2].

1.1.1 Fixace atmosférického dusíku

N_2 tvoří přibližně 80 % atmosféry Země, ale stabilita trojné vazby ho činí inertním a metabolicky nepřístupným většině organismů. Eukaryota nemohou N_2 využívat, ale některé mikroorganismy tzv. diazotrofové, které zahrnují mnoho různých eubakterií, stejně tak jako některá methanogenní archea, katalyzují enzymovou redukci N_2 na NH_3 pomocí nitrogenasy (EC 1.18.6.1, rovnice 1.1) [2].



Diazotrofové mohou být volně žijící mikroorganismy, ale několik druhů je schopno žít v symbióze s rostlinami. Volně žijící eubakteria jako je *Clostridium*, *Klebsiella*, *Azotobacter* a *Anabaena* získávají energii pro fixaci atmosférického dusíku z vnějších zdrojů (oxidace rozkládajících se látek v půdě), zatímco organismy žijící v symbióze vyměňují dusíkaté látky za uhlíkaté sloučeniny syntetizované rostlinami. Symbiotické bakterie zahrnují *Rhizobia* (asociované s luštěninami), *Spirillum* (asociované s obilovinami) a *Frankia* (asociované s některými cévnatými rostlinami, např. rakytník).

Pro zemědělství je nejvýznamnější symbióza luštěnin s bakteriemi (*Rhizobia*) tvořícími noduly. Fixace N_2 nitrogenasou může probíhat pouze při velmi nízkých koncentracích kyslíku. Noduly tedy tvoří anaerobní kompartment. Kyslík je jednak spotřebováván dýchacím řetězcem membrány bakteroidu, jednak je ve vnější vrstvě nodulu přítomná difúzní bariéra proti vstupu vzduchu, a také vysokou koncentrací leghemoglobinu v cytoplasmě hostitelské buňky [2, 3].

1.1.2 Fixace dusičnanů a amonných kationtů

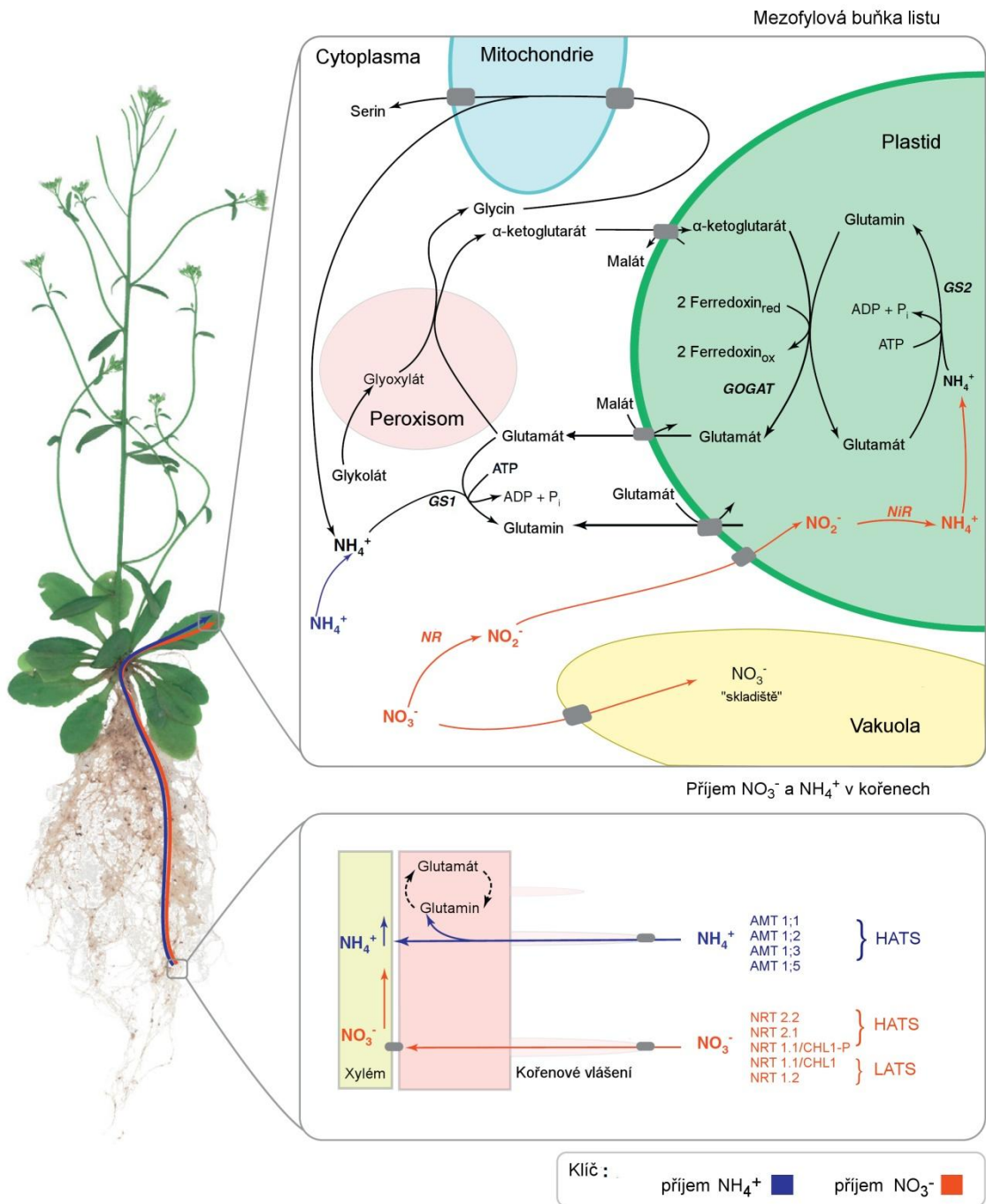
Přestože okolo 99% organického dusíku v biosféře vzniká asimilací dusičnanů, rostliny mohou využívat i NH_4^+ , který se tvoří jako konečný produkt degradace organické hmoty, primárně metabolismem živočichů a bakterií (obr. 1.1, str. 13). NH_4^+ může být oxidován na NO_3^- nitrifikačními bakteriemi (*Nitrosomonas*) v půdě. Tím vzniká neustálý koloběh mezi dusičnany v půdě a dusičnany v rostlinách. NH_4^+ se akumuluje pouze v málo provzdušněných půdách s nedostatečným odvodněním, kde kvůli nedostatku kyslíku nemohou působit nitrifikační bakterie [2].

Dusičnany jsou asimilovány listy a také kořeny. Ve většině plně vyvinutých bylin dochází k asimilaci dusičnanů primárně v listech, ačkoliv v počátečním stádiu vývoje má v těchto rostlinách význam i asimilace dusičnanů kořeny. Naproti tomu mnoho dřevin, stejně jako luštěnin asimiluje dusičnany hlavně kořeny. Přenos dusičnanů do kořenových buněk probíhá symportem se dvěma protony. Protonový gradient přes plazmatickou membránu tvořený H^+ -ATPasou pohání příjem dusičnanů proti směru koncentračního gradientu. ATP nutné pro vznik protonového gradientu je poskytováno především mitochondriální respirací. Rostlinné buňky obsahují v plazmatické membráně několik transportérů dusičnanů (obr. 1.1, str. 13), přičemž některé mají relativně nízkou afinitu (polovina saturace je vyšší než 500 $\mu\text{mol/l}$ dusičnanů) a některé mají afinitu velmi vysokou (polovina saturace 20-100 $\mu\text{mol/l}$ dusičnanů), ty jsou aktivovány, pouze když jsou metabolismem vyžadovány. Tímto způsobem je kapacita dusičnanů přijímaných kořeny přizpůsobována okolním podmínkám [2, 4].

Dusičnany vstupující do cytoplasmy kořenových buněk mohou být jednak ihned redukovány na amonné kationty, jednak dočasně převedeny do vakuol, jednak transportovány xylémem do mezofylových buněk listů. Redukce NO_3^- probíhá ve dvou stupních nejdříve nitrátreduktasou (EC 1.6.6.1) přítomnou v cytoplasmě na NO_2^- a poté

nitritreduktasou (EC 1.7.7.1) v chloroplastech (listy) nebo leukoplastech (kořeny) na NH_4^+ (obr. 1.1, str. 13). Nitritreduktasa má k dusitanům vysokou afinitu a veškeré NO_2^- musí být přeměněny na NH_4^+ , neboť dusitany jsou pro buňku toxické. Glutaminsynthetasa (EC 6.3.1.2) přenáší v chloroplastech nově vytvořený NH_4^+ za spotřeby ATP na glutamát za vzniku glutaminu. Glutamin spolu s α -ketoglutarátem je přeměněn glutamátsynthasou (EC 1.4.1.13, tzv. GOGAT, glutamin: 2-oxoglutarátaminotransferasa) na 2 molekuly glutamátu. α -ketoglutarát nutný pro reakci katalyzovanou GOGAT je do chloroplastu transportován specifickým přenašečem pomocí protisměrné výměny za malát, přičemž vznikající glutamát je transportován z chloroplastu do cytoplasmy dalším přenašečem, avšak opět výměnou za malát. Další chloroplastový přenašeč přenáší glutamin protisměrnou výměnou za glutamát, což umožňuje export glutaminu z chloroplastu (obr. 1.1, str. 13) [4, 5].

Během fotosyntézy by měla asimilace CO_2 odpovídat asimilaci dusíku. Asimilace dusíku může probíhat pouze tehdy, když asimilace CO_2 poskytuje dostatečné množství uhlíkových skeletů pro aminokyseliny. Kromě toho asimilace dusíku musí být regulována takovým způsobem, aby produkce aminokyselin nepřekročila požadavky buňky. A konečně je také důležité, aby redukce dusičnanu nebyla rychlejší než redukce dusitanu, což by vedlo ke hromadění toxického množství dusitanu [2].



Obr. 1.1: Přijem a asimilace NO_3^- a NH_4^+ (upraveno z [6]). Zkratky: AMT, transportéry pro NH_4^+ ; CHL, NRT, transportéry pro NO_3^- ; HATS, vysokoafinitní transportéry; LATS, nízkoafinitní transportéry; GS1, GS2, isoformy glutaminsynthetasy; GOGAT, glutamátsynthasa; NR, nitrátreduktasa; NiR, nitritreduktasa.

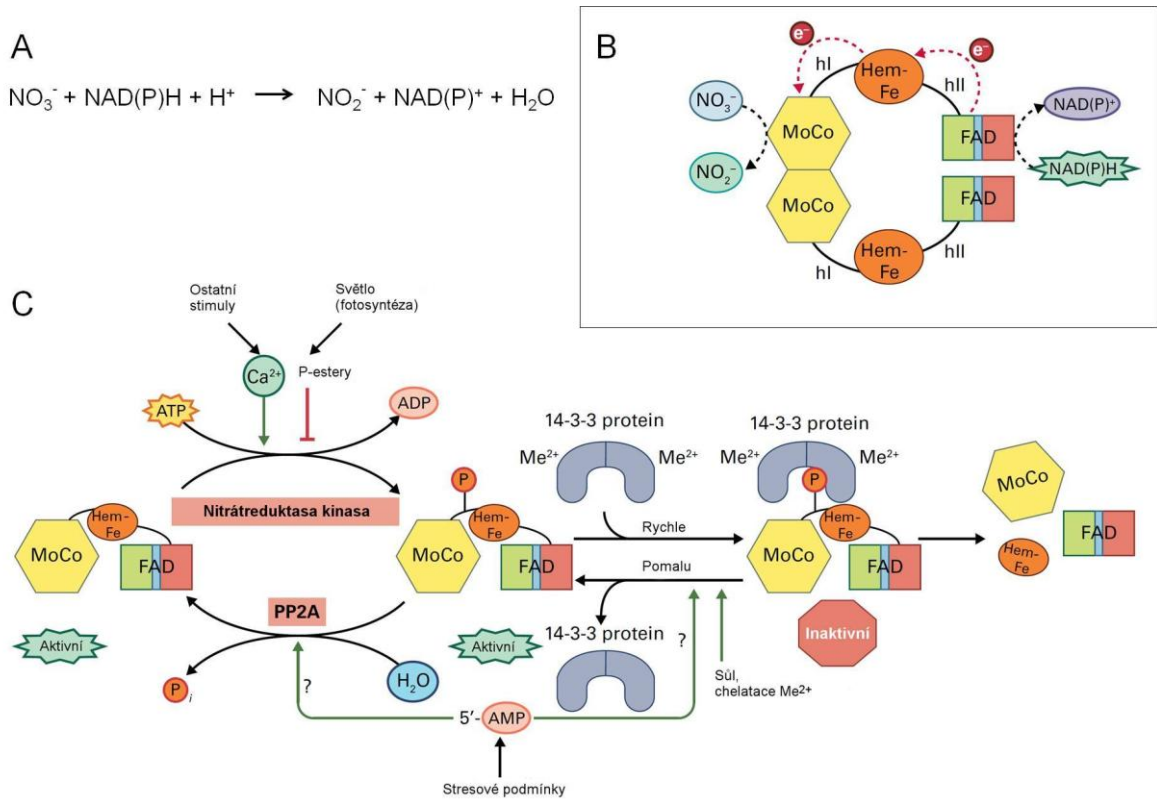
1.1.3 Regulace aktivity nitrátreduktasy

Nitrátreduktasa redukuje dusičnan na dusitan. K redukcí se většinou využívá redukční ekvivalent NADH, ačkoliv některé rostliny mohou využívat NADPH, stejně jako NADH. Nitrátreduktasa vyšších rostlin se skládá ze dvou identických podjednotek (obr. 1.2, str. 15). Každá podjednotka obsahuje 3 domény s kofaktory: flavinadeninindinukleotid (FAD) přijímající elektrony z NAD(P)H, hemové domény převádějící elektrony na molybdenový kofaktor (MoCo), který přenáší elektrony na dusičnan. Kofaktorem MoCo je pterin s postranním řetězcem, na který navázán molybden, který pravděpodobně přechází mezi oxidačními stavy +IV a +VI [3].

Aktivita nitrátreduktasy je v rostlině vysoce regulována transkripčními a posttranslačními mechanismy, jelikož redukce dusičnanů na dusitany je energeticky náročný proces spotřebovávající NAD(P)H, a kromě toho jsou dusitany pro rostlinu toxické produkty. Syntéza proteinu nitrátreduktasy je regulována na úrovni genové exprese. Nitrátreduktasa je protein s krátkou životností, jehož poločas života je pouze několik hodin. Rychlost syntézy nitrátreduktasy *de novo* je velmi vysoká, a proto její regulací může být aktivita tohoto enzymu změněna během několika hodin. Syntézu nitrátreduktasy na genové úrovni ovlivňují různé faktory, jednak je stimulována glukosou a dalšími sacharidy produkovanými fotosyntézou, jednak je inhibována NH_4^+ , glutaminem a dalšími aminokyselinami. Zdá se, že senzory přítomné v buňce přizpůsobují pomocí regulace genové exprese kapacitu nitrátreduktasy jak požadavkům na aminokyseliny, tak poskytování uhlíkových skeletů asimilací CO_2 pro jejich syntézu [2, 7].

Posttranslační mechanismy řídí koncentraci a aktivitu nitrátreduktasy, a tím pádem představují rychlou odpověď rostliny na určité fyziologické stavy. Například koncentrace nitrátreduktasy se snižuje, pokud mají rostliny nedostatek dusíku nebo světla po několik dní, i když množství mRNA pro nitrátreduktasu zůstává vysoké. Mnohem rychlejší reverzibilní inhibice aktivity nitrátreduktasy nastává, pokud jsou rostliny drženy ve tmě nebo jsou vystaveny nízkým koncentracím CO_2 . Za těchto podmínek může nastat inhibice nitrátreduktasy během několika minut. Inhibice spočívá ve fosforylaci serinu (obr. 1.2, str. 15) Ca^{2+} -dependentními kinasami, kde pak dochází k vazbě 14-3-3 proteinů v přítomnosti iontů Ca^{2+} a Mg^{2+} . Fosfatasa typu 2A (PP2A) reaktivuje nitrátreduktasu defosforylací serinu, což brání vazbě 14-3-3 proteinů. Reakce, které inhibují a reaktivují nitrátreduktasu, jsou modulovány Ca^{2+} , 5'-AMP, a P_i , které mohou také fungovat jako sekundární poslové.

Inhibiční mechanismus tvořený kinasou/14-3-3 proteinem umožňuje rychlou a reverzibilní inhibici nitrátreduktasy, pokud nejsou podmínky příznivé pro asimilaci dusičnanu [3, 7].



Obr. 1.2: Schéma funkce, regulace a struktury nitrátreduktasy [3]. (A) Sumární rovnice nitrátreduktasy, (B) Doménová struktura nitrátreduktasy, (C) Regulace nitrátreduktasy. Zkratky: hI a hII, hinge (závěs) I a II; Me^{2+} , Ca^{2+} nebo Mg^{2+} ; MoCo, molybdenový kofaktor.

1.1.4 Další možné zdroje dusíku

Další možný zdroj dusíku v půdě představují organické sloučeniny jako aminokyseliny, peptidy či proteiny, které až doposud nebyly považovány za přímo dostupné zdroje dusíku pro rostliny.

Studie příjmu anorganických a organických zdrojů dusíku rostlinami a mikroorganismy ukazují, že rostliny jsou méně efektivní oproti mikroorganismům. V krátkém časovém úseku jsou rostliny slabšími kompetitory o jakýkoli zdroj dusíku. Mnoho druhů rostlin také navazuje úzké vztahy s bakteriemi, a proto je často těžké rozlišit mezi "kompetitorem" a "kooperátorem" [8]. Na druhou stranu látky sekretované kořeny rostlin mohou obsahovat různé organické kyseliny a sacharidy, které jsou mikroorganismy přijímány spíše než

aminokyseliny v rhizosféře. Tato strategie by mohla rostlinám v získávání organického dusíku pomoci [9].

V každém případě lze najít lokality s velkým obsahem organického dusíku, který pochází z organických hnojiv, uhynulých zvířat či rostlin. V těchto oblastech bude soutěž o organický dusík nízká a přinejmenším jeho část může být rostlinami využita. Navíc pokud by byla rostlina schopna přijmout organický dusík z aminokyselin, tak navíc získá i uhlíkový skelet, který by mohl ušetřit energii jejich syntézy.

1.1.5 Příjem organicky vázaného dusíku z půdy

Organický dusík se v půdě vyskytuje ve formě proteinů, peptidů a aminokyselin (40%), heterocyklických sloučenin (např. nukleové kyseliny; 35%), aminosacharidů (5-6%) a amonných iontů (19%) [9]. Relativně vysoká koncentrace aminokyselin v půdě je udržována sekrecí proteas mikroorganismy, mykorhizními houbami a kořeny rostlin. Proteolýza je přísně regulována pomocí pH, množstvím organické hmoty a koncentrací proteinů v půdě [8, 10].

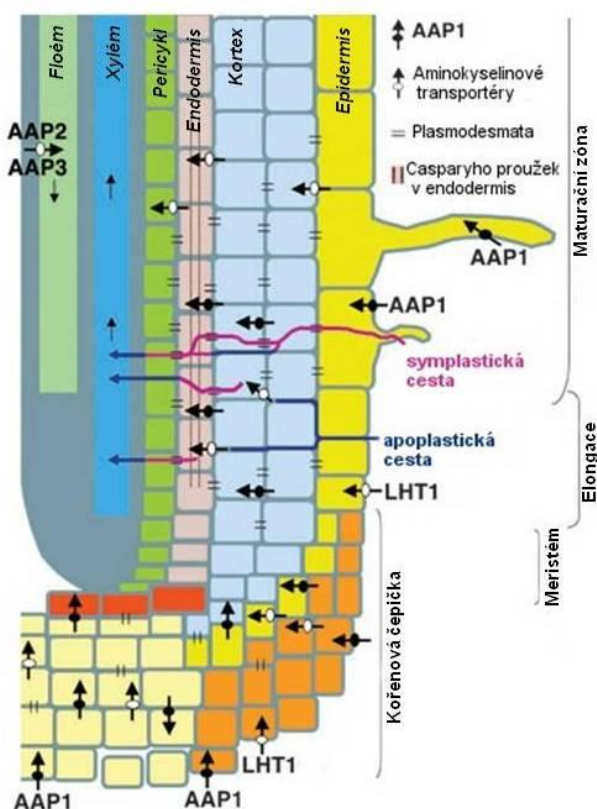
1.1.6 Aminokyseliny

Půda obecně obsahuje široké spektrum aminokyselin, ale jejich koncentrace a skladba se výrazně liší v závislosti na typu půdy, vegetaci a klimatu. Nicméně půdnímu profilu obvykle dominuje aspartát, glutamát a glycin. Občas se v relativně vysokých koncentracích vyskytuje z bazických aminokyselin lysin, arginin, histidin a z neutrálních alanin, serin, asparagin, glutamin a leucin [9].

Měření dostupnosti aminokyselin je problematické, jelikož závisí na půdní charakteristice (velikosti částic, obsahu vody), charakteru aminokyselin a jejich schopnosti adsorpce event. vazby na částice, mikrobiální aktivitě a kompetici mezi mikroorganismy a rostlinami, ale také mezi rostlinami a rostlinami. Analýza různých typů půdy, zahrnující tropické oblasti až boreální jehličnaté lesy odhaluje, že koncentrace volných aminokyselin může být 100 μM i vyšší. Koncentrace volných aminokyselin je relativně nízká ale dynamická, jelikož jsou rychle přijímány mikroorganismy a rostlinami. Poločas života aminokyselin v půdě se pohybuje v hodnotách 1,7 - 28,7 hodiny [9, 11].

Kořeny rostlin mohou přijímat aminokyseliny pasivním i aktivním transportním mechanismem. Pasivní transport spočívá v difúzi a pravděpodobně zahrnuje přenašeče nebo kanály, zatímco aktivní přenos je zprostředkován aminokyselinovými přenašeči spřaženými s transportem protonů jako sekundární aktivní transport [11]. Tyto transportéry mají za úkol získávat aminokyseliny z půdy, ale také znovu zachytit aminokyseliny, které unikají z kořenů [12].

V kořenech mohou být aminokyseliny transportovány buď symplasticky nebo apoplasticky podél buněčných stěn. Pokud přenos nastává přes apoplast, aminokyseliny musí přejít do symplastu, než dosáhnou Casparyho proužku v endodermis, který blokuje apoplastickou cestu (obr. 1.3, str. 18). Dusíkaté látky jsou po průchodu endodermis transportovány do centrálního cylindru a poté transportovány xylémem transpiračním tokem do nadzemní části. V případě symplastického transportu příjem aminokyselin probíhá v kortexu a endodermálních buňkách, čili následuje apoplastický transport, nebo přímo probíhá v kořenové epidermis. Průchod organického dusíku do symplastu je zřejmě zajištěn transportéry AAP1, které jsou lokalizovány v membránách kořenového kortexu a/nebo buňkách endodermis. Transportéry AAP2 a AAP3 jsou pravděpodobně zodpovědné za převod aminokyselin do floému, kde zásobují rostoucí kořenové vrcholky dusíkatými látkami. Mezi aminokyselinové transportéry, které se také mohou vyskytovat v epidermis a kořenové čepičce, patří LHT1. Některé kořenové epidermální buňky *Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní) mají kořenové vlásky, které zvětšují povrch pro příjem živin. Dalším místem vstupu aminokyselin jsou buňky kořenové čepičky, které se nachází na vrcholku kořene [8, 11].

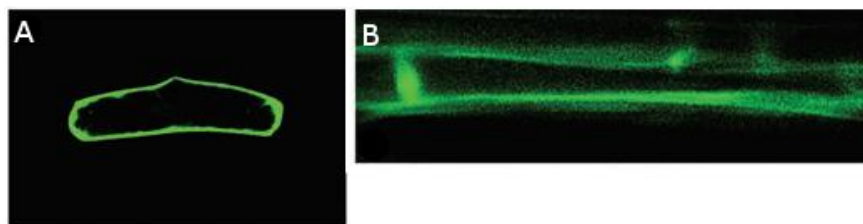


Obr. 1.3: Model transportu aminokyselin v kořenech a role AAP1 [11]. Zkratky: AAP1-3 AAP, aminokyselinové permeasy 1-3; LHT1, lysin-histidinový transportér.

V *Arabidopsis* bylo identifikováno více než 53 aminokyselinových transportérů pomocí heterologní komplementarity a screeningu databází se známými přenašeči [11]. Aminokyselinové transportéry v rostlinách jsou řazeny do jedné ze dvou rodin aminokyselina/auxin permeasa (AAP) nebo aminokyselina-polyamin-cholin (APC), které obě patří do transportérové superrodiny APC. AAP rodina zahrnuje transportéry v rostlinách, živočiších i houbách. V rostlinách do ní patří aminokyselinové permeasy (AAP), lysin-histidinové transportéry (LHT), prolinové transportéry (ProT), transportéry kyseliny γ -aminobutyrové (GAT), ANT1-like aromatické, a neutrální aminokyselinové transportéry a auxinové transportéry (AUX). Kationtové aminokyselinové transportéry (CAT) patří do APC rodiny a jsou přítomné v rostlinách i živočiších [13].

V *Arabidopsis* se AAP rodina skládá z osmi členů (AAP1-8), které obecně transportují neutrální a kyselé aminokyseliny se střední afinitou. Výjimkou jsou transportéry AAP3 a AAP5, které také přenáší bazické aminokyseliny. AAP1 transportuje neutrální aminokyseliny s krátkými postranními řetězci, glutamát a histidin, do kořenových

buněk [8, 11]. Jediný transportér pro lysin a arginin je AAP5. Všechny AAP v *Arabidopsis* byly nalezeny v plazmatické membráně a fungují jako aminokyselinové transportéry spřažené s transportem protonů. Bylo prokázáno, že působí v řadě fyziologických dějích v rostlině, a to v příjmu aminokyselin z půdy, nasátí do floému a přenosu mezi xylémem a floémem (obr. 1.3, str. 18) [13]. Lee et al. prokázal přítomnost transportéru AAP1 v plazmatické membráně kořenových epidermálních buňkách cibule a *Arabidopsis* (obr. 1.4) [11].



Obr. 1.4: Buněčná lokalizace GFP-AAP1 fúzního proteinu v epidermálních buňkách [11]. Fluorescence je viditelná v plazmatické membráně kořenové epidermální buňky cibule (A) a *Arabidopsis* (B).

Mnohem méně je známo o rodině LHT, která má deset členů (LHT1-10) v *Arabidopsis*. Původně byl LHT1 popsán jako selektivní transportér pro lysin a histidin, ale další studie ukázaly, že LHT preferenčně transportují neutrální a kyselé aminokyseliny s vysokou afinitou. Stejně jako AAP jsou LHT lokalizovány v plazmatické membráně a transportují široké spektrum aminokyselin z prostoru buněčné stěny do buňky. LHT se také podílejí na vstupu organického dusíku do kořenových a mezofylových buněk, stejně jako do pylu a dalších buněk reprodukčního pletiva květu [13].

1.1.7 Peptidy

Transport peptidů hraje důležitou roli ve výživě bakterií, kvasinek a živočichů, avšak role peptidů a jejich transportérů v rostlinách zatím nebyla dostatečně objasněna [14].

Příjem dipeptidů a jejich využití jako výhradního zdroje dusíku bylo potvrzeno u rostlin *Arabidopsis thaliana*, *Hakea actites* (bez českého ekvivalentu) a *Lobelia anceps* (lobelka) [15]. Transportované peptidy mohou sloužit jako nutričně výhodnější zdroj dusíku než aminokyseliny, protože vlastně představují širší nabídku aminokyselin, která je buňkám dostupná. Transport peptidů by také mohl chránit aminokyseliny před rozložením enzymy,

kteřé jsou přítomné ve floému během transportu uvnitř rostliny (arginasa, glutamátdehydrogenasa a další) [16, 17].

V rostlinách se nachází transportéry peptidů, které mohou být rozděleny do tří rodin v závislosti na délce peptidu, jež rozeznávají. Di- a tripeptidy jsou transportovány členy rodiny peptidových transportérů PTR, která se v říších prokaryot, hub a živočichů skládá jen z mála členů. V rostlinách je jejich genová rodina rozsáhlejší a v *Arabidopsis* obsahuje více než 50 genů. V *Arabidopsis* zvýšená exprese PTR5 umožnila větší růst rostliny, jejímž jediným zdrojem dusíku v médiu byly peptidy. Přítomnost a exprese PTR v kořenech zřejmě determinuje schopnost rostlin využívat peptidy pro svůj růst. Zatím není známo, zdali je hlavní funkcí transportérů PTR příjem peptidů z růstového média do kořenů a (nebo) inter- a intracelulární transport peptidů [18]. Dále jsou PTR transportéry důležitou součástí příjmu dusíku u masožravé láchkovky *Nepenthes alata*. Gen (*NaNTR1*) této rodiny byl nalezen ve floémových buňkách uvnitř láchky, kde zřejmě slouží k transportu peptidů z rozložené kořisti (hmyzu) z láchky do zásobních (sink) orgánů v rostlině [14].

Přenos větších peptidů (4 až 5 aminokyselin) je umožněn transportéry z rodiny oligopeptidových transportérů OPT [19]. Peptidové transportéry rodin PTR a OPT jsou protonové symportéry [14]. V *Arabidopsis* byly také identifikovány tři transportéry rodiny ABC (ATP Binding Cassette), které preferují peptidy o délce 23 aminokyselin, ale rozpoznávají i peptidy dlouhé 6 až 59 aminokyselin [19].

Narozdíl od signálních peptidů v živočiších a kvasinkách, kde hrají významnou roli, v rostlinách bylo identifikováno pouze několik peptidů, které fungují jako signální molekuly [20]. Nicméně rostlinné hormony auxin a gibberellin jsou často vázány na malé peptidy a konjugáty peptid-hormon jsou přítomné v mnoha pletivech (např. ve vaskulárním systému a endospermu semen). Konjugace peptidů s těmito rostlinnými hormony by mohla znamenat regulaci jejich aktivity nebo usnadnění jejich transportu. Transportní systémy peptidů by mohly souviset s pohybem těchto konjugátů přes rostlinnou buněčnou membránu [16].

Bylo nalezeno pět tříd endogenních rostlinných oligopeptidů s jasnou signální funkcí - systemin, ENOD40, Clavata3, fytosulfokin a protein SCP (S-locus cystein-rich protein). SCP (74-77 aminokyselin) a Clavata3 (96 aminokyselin) jsou pravděpodobně příliš velké, aby mohly být přenášeny běžnými peptidovými transportéry. Systemin (18 aminokyselin)

je součástí indukce obranné odpovědi na poškození rostliny herbivory a je známo, že se pohybuje floémem. Peptidy ENOD40 (10-13 aminokyselin) se podílí na vývoji nodulů luštěnin a degradaci sacharosy (klíčový krok při fixaci dusíku). Transport těchto peptidů je pravděpodobně zajištěn ABC transportéry [16, 21].

Některé fytotoxiny produkované rostlinnými patogeny jsou modifikované peptidy. Tabtoxin, produkován *Pseudomonas tabaci*, je dipeptid a způsobuje nemoc "wild-fire" u rostlin tabáku. Phaseolotoxin (*Pseudomonas phaseolicola*) je tripeptid a způsobuje "halo" plíseň u fazolí. Radiografické studie prokázaly, že phaseolotoxin značený ³⁵S může být absorbován v nativní formě a distribuován ve všech částech rostliny. Mnoho fytopathogenních hub (např. *Cylindrocladium scoparium*) produkuje peptidové toxiny, které jsou narušeny od bakteriálních peptidových toxinů většinou cyklické. Příjem fytotoxinů transportéry peptidů zatím nebyl experimentálně potvrzen, ale zdá se být více než pravděpodobný [16].

1.1.8 Proteiny

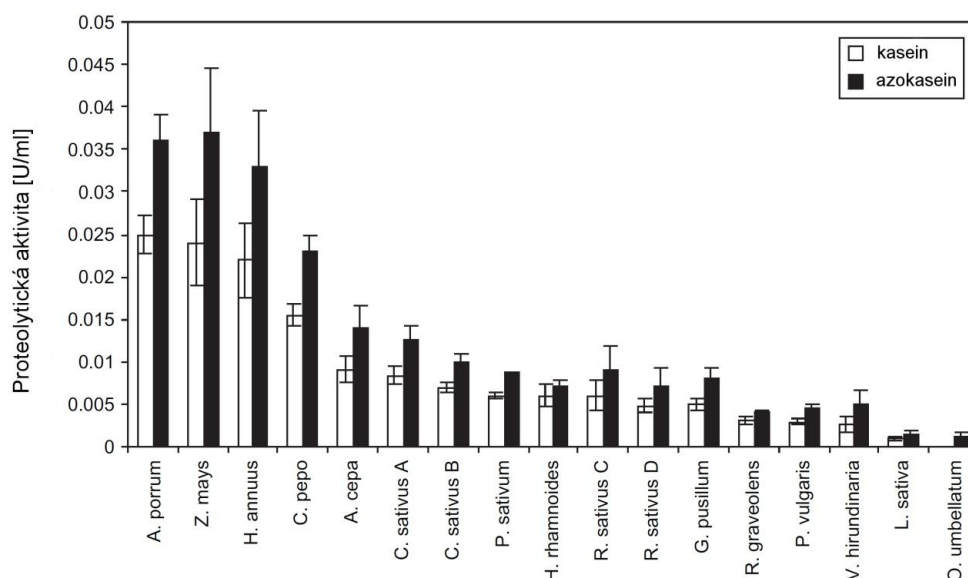
Až donedávna nebyly proteiny obsažené v půdě považovány za přímý zdroj dusíku pro rostliny, ale byly popisovány jako dostupné jedině po proteolytickém zpracování půdními mikroorganismy nebo symbiotickými mykorrhizními houbami. Paungfoo-Lonhienne et al. ukazuje, že obě zkoumané rostliny *Hakea actites* a *Arabidopsis thaliana* mohou samy zpracovat protein jako zdroj dusíku. Pravděpodobné jsou dva mechanismy. Zaprvé rostliny vylučují proteolytické enzymy a následně pomocí transportérů přijímají uvolněné peptidy nebo aminokyseliny, nebo nativní proteiny mohou vstoupit do kořenového vlášení díky endocytóze [22]. Oba mechanismy by také mohly probíhat zároveň.

Rostliny obecně obsahují širokou škálu endogenních proteas. Jejich katalytický mechanismus, optimální pH a molekulová hmotnost jsou rozmanité a souvisí se specifickými funkcemi těchto enzymů. Nicméně současné znalosti o proteasách, které jsou sekretovány kořeny do vnějšího prostředí jsou minimální. Je známo, že některé sekretované proteasy patří do rodiny cysteinových proteas, nejvyšší aktivity dosahují při neutrálním pH a působí jako endopeptidasy [23].

Sekrece proteas kořeny rostlin byla prokázána u hydroponicky pěstovaných semenáčků 15 rostlinných druhů (obr. 1.5, str. 22). Nejvyšší proteolytická aktivita byla zjištěna v rostlinách *Allium porrum* (pór zahradní), *Zea mays* (kukuřice setá) a *Helianthus annuus*

(slunečnice roční). Všechny studované druhy patří do rozdílných rodů, žijících v odlišných ekosystémech - některé jsou užitkové (*Allium porrum*), jiné plané (*Ornithogallum umbellatum*, snědek chocholičnatý). Proteasy jsou pravděpodobně sekretovány běžně, ale jejich aktivita zřejmě závisí na konkrétním rostlinném druhu [23].

Mechanismus sekrece proteas bude zcela jistě přísně regulován, jednak endogenními mechanismy, spjatými s množstvím endogenních zdrojů dusíku, jednak s přítomností proteinů v médiu (půdě) [24]. Například v případě kultivace semen *Triticum aestivum* (pšenice) *in vitro* byla změřena proteolytická aktivita jak v médiu bez živin, ale také stoupala v tekutém Murashige-Skoogově médiu s přidavkem kaseinu [25]. Sekrece proteas zřejmě probíhá konstitutivně.



Obr. 1.5: Proteolytická aktivita v kultivačním médiu po 14 denní kultivaci semenáčků (průměr ± směrodatná odchylka, $n = 10$) [24]. Kasein nebo azokasein byly použity jako substráty.

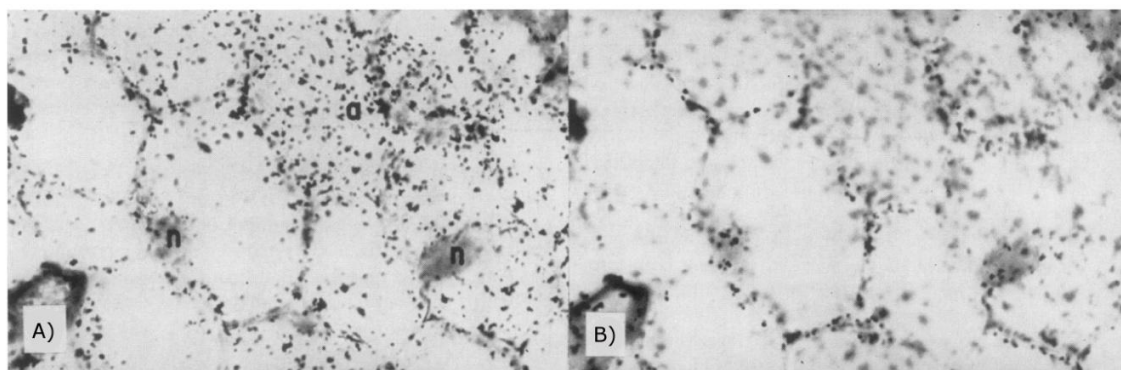
Sekrece proteas byla také prokázána u rostlin *Arabidopsis thaliana* a *Hakea actites* pomocí fluorescenční mikroskopie (komplex DQ green BSA fluoreskuje po proteolýze) [22].

Také je známo, že trávicí žlázy masožravé rostliny *Nepenthes alata* sekretují aspartátové proteasy do tekutiny uvnitř láčky [22].

Fluorescenční mikroskopii a technikami využívajícími radioaktivně značené proteiny byl studován možný vstup proteinu do kořenových buněk. Zelený fluorescenční protein (GFP)

byl nalezen jak na povrchu kořenů, tak uvnitř kořenového vlášení, ale také v kořenových buňkách rostlin *Hakea actites* a *Arabidopsis thaliana*. Fluorescence však nebyla pozorována v nově vytvořených postranních kořenech, kterým chyběly kořenové vlásky. Příjem nativního proteinu bude pravděpodobně závislý na jejich přítomnosti [22].

Dále byl prokázán vstup radioaktivně značeného lysozymu C^{14}/H^3 , hemoglobinu C^{14} a ribonukleasy H^3 do kořenových buněk ječmene (obr. 1.6). Značené proteiny byly nalezeny v cytoplasmě, v okolí jádra a v buněčné stěně [26, 27].



Obr. 1.6: Radioautografie kořene ječmene po 40 minutové inkubaci v lysozymu H^3 [26]. (A) Signál proteinu je patrný v cytoplasmě (a), okolí jádra (n), buněčné stěně a buněčné membráně. (B) Signál proteinu je patrný v okolí jádra a na buněčném povrchu.

Zatím nebylo objasněno, co přesně se děje *in planta* s absorbovanými proteiny. Nicméně proteiny by se mohly pohybovat z buňky do buňky prostřednictvím plasmodesmat (obr. 1.3, str. 18). V živočiších existují TAP transportéry ("transport associated with antigen processing", ABC rodina), které importují degradové proteiny (při délce okolo 6-59 aminokyselin) do lumen endoplasmatického retikula, ale GFP je podstatně větší (238 aminokyselin). V genomu *Arabidopsis* jsou kódovány tři transportéry podobné TAP, ale jejich funkce zatím nebyla objasněna. Kromě endocytózy je možné, aby protein o dostatečně malé velikosti mohl proniknout do kořenového apoplastu a poté byl degradován apoplastickými proteasami. V intercellulárním prostoru *Arabidopsis* byla totiž detekována serinová proteasa [22].

Půdní podmínky (pH, obsah organických látek atd.), přítomnost mykorhizních symbiontů a dalších mikroorganismů může velmi ovlivnit využití půdních proteinů. Dalším problémem v podmínkách *in vivo* resp. v půdách s vysokým obsahem polyfenolů je, že proteiny mohou být ve velké míře asociované v komplexech s taniny, což je činí hůře dostupnými pro

proteasy. Protein lze z polyfenol-proteinového komplexu uvolnit peroxidasami, polyfenoloxidasami nebo tannin-karboxyesterasami, které degradují polyfenoly [28, 29]. Samozřejmě také věk a celkový stav rostliny hraje výraznou roli pro sekreci proteas či endocytózu proteinu [28].

1.2 Masožravé rostliny

Velká většina suchozemských masožravých rostlin roste v půdách rašelinišť, slatinišť a mokřadů, v nichž se setkává s mnoha nepříznivými podmínkami pro svůj růst. Tyto půdy jsou hodně zamokřené, často značně kyselé (pH až 3), ale i neutrální nebo slabě zásadité, chybí v nich kyslík a naopak se v nich mnohdy vyskytuje sirovodík a jiné toxické látky. Často také mají vysoký obsah těžko rozložitelných rostlinných zbytků a hlavně jsou velmi chudé na využitelné minerální živiny. "Masožravost" lze tedy považovat za adaptaci ke všem těmto stresovým faktorům [30].

Rostlina však musí mít určitý soubor schopností, aby byla považována za masožravou. Musí umět lákat kořist, mít specializovaný orgán pro chycení a zadržení kořisti, vytvořit prostředí pro trávení kořisti pomocí vlastních enzymů nebo symbiotických mikroorganismů, zužítkovat organické produkty trávení k získání existenční výhody v konkurenčním boji na biotopech chudých na živiny (podpora růstu a plodnosti) [31].

Hlavním ekologickým smyslem masožravosti je získat z kořisti (hmyz příp. zooplankton u vodních masožravých rostlin) co největší podíl dusíku a fosforu, což jsou v rašelinných půdách často nejvíce limitující živiny. Draslík, vápník a hořčík naopak musí být dodány z půdy [30, 31]

Pro trávení kořisti sekretuje masožravá rostlina (v závislosti na druhu) řadu enzymů jako jsou proteasy, lipasy, glykosidasy, chitinasy, fosfatasy, peroxidasy a nukleasy [32]. Nepenthesiny jsou aspartátové proteasy, které jsou významně zastoupené v trávicí tekutině láčkovek (*Nepenthes*, obr. 1.7, str. 25). Příbuzné proteiny byly nově identifikovány ve vakuolách a endomembránovém systému *Arabidopsis thaliana*. Nepenthesiny jsou strukturně podobné pepsinu, ale jsou stabilnější v širší škále pH a teploty díky hojnějšímu výskytu S-S můstků a možným N-glykosylacím [33]. Fosfatasy představují širokou škálu enzymů, která hydrolyzuje fosfoestery. Kyselé fosfatasy jsou běžné rostlinné enzymy s nízkou substrátovou specifitou, což je důležité v produkci, transportu a recyklaci fosforu.

V případě masožravých rostlin jsou fosfatasy nenahraditelné pro mobilizaci fosfátu z rozložené kořisti a tato cesta příjmu fosforu pro ně může být esenciální [34]. Zatím není k dispozici mnoho informací o regulaci a indukci hydrolytických enzymů podílejících se na trávicím procesu masožravých rostlin.

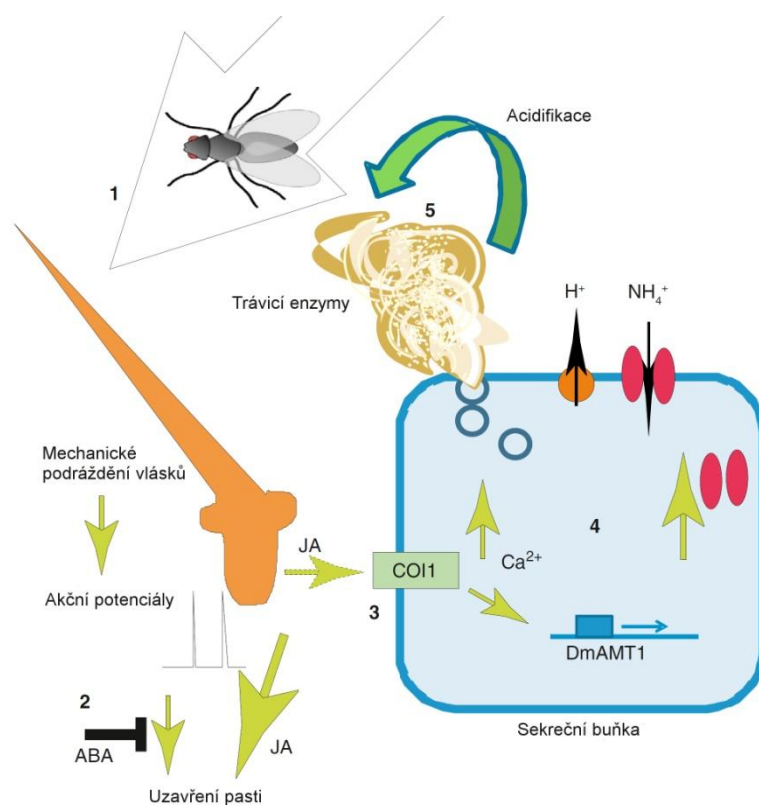


Obr. 1.7: Gravitační a sklapovací past masožravých rostlin. (A) *Nepenthes madisonii* (*oiso x ventricosa*), gravitační past; (B) *Dionaea muscipula*, sklapovací past [35, 36].

V masožravých rostlinách můžeme najít 5 typů pastí. Existují tzv. gravitační pasti, kdy rostliny lákají kořist na horní část pasti, nazývanou se láčka (obr. 1.7), která obvykle voní, vytváří nektar, zajímavé zbarvení, ale často i kombinaci všech uvedených možností. Okraj láčky, která obvykle vypadá jako hrníček nebo vysoká trubice, je pro kořist nestabilní, kluzká. Kořist tak často padá dovnitř láčky, která je z části naplněna tekutinou obsahující trávicí enzymy, bakterie nebo koexistující organismy. Takto loví svou kořist například láčkovky (*Nepenthes*), láčkovice (*Cephalotus*) a špírlíce (*Sarracenia*) [37].

Mechanická sklapovací past mucholapek (*Dionaea*) představuje modifikovanou listovou čepel, která je rozšířena ve dvě čelisti, oddělené středním vazem (obr. 1.7). Pokud se kořist dotkne opakovaně v rozmezí 0,5 - 30 sekund alespoň dvou chloupků, vyvolá na membránách buněk na bázi chloupků akční potenciál. V ten moment vznikne odezva v buňkách středního vazy, což vede k rychlému sevření pasti a uvěznění kořisti. Uzavření pasti je indukováno kyselinou jasmonovou a abscisovou (obr. 1.8, str. 26). Aktivace receptoru pro jasmonát COI1 spolu s přechodným zvýšením koncentrace iontů Ca^{2+} v buňkách sekretních žláz vede ke stimulaci sekrece trávicích enzymů do uzavřené pasti.

Produkty digesce jsou peptidy, aminokyseliny a amonné ionty (glutamindeaminasa). Zvýšená exprese transportéru DmAMT1 umožňuje zvýšenou absorpci iontů NH_4^+ . Zároveň dochází k sekreci iontů H^+ pravděpodobně přes H^+ -ATPasu v plasmatické membráně, které zajistí acidifikaci pasti (optimální pH pro trávicí enzymy) a vyrovnání nábojů. Transportéry AMT se vyskytují také v buňkách trávicích žláz láčkovek (*Nepenthes alata*, NaAMT1) [37, 38].



Obr. 1.8: Koordinace uzavření pasti, sekrece trávicích enzymů a příjmu NH_4^+ v mucholapce. Zkratky: JA, kyselina jasmonová; ABA, kyselina abscisová; COI1, receptor pro jasmonát; DmAMT1, gen pro transportér NH_4^+ [38].

Dále existují adhezni (lepící) pasti, kdy rostlina produkuje lepkavou tekutinu, na kterou láká drobný hmyz. Tekutina zároveň obsahuje trávicí enzymy, je čirá a připomíná kapičky rosy. Vyskytuje se u rodu rosnatek (*Drosera*), tučnic (*Pinguicula*). Hypotenzní pasti bublinek (*Utricularia*) fungují pouze ve vodním prostředí (příp. mokré mechové polštáře). Jedná se totiž o měchýřky přirostlé k prýtu, které udržují uvnitř podtlak a při podráždění nasají kořist i s okolní vodou a uzavřou víčko. V měchýřku jsou opět vylučovány trávicí enzymy. Do detektivních pastí (tzv. jednosměrky) je snadné vstoupit, ale východ lze jen obtížně najít, nebo je zatarasen dovnitř směřujícími vlásky (chloupky).

Tento typ pasti lze najít u genlisejí (*Genlisea*), které se specializují na lov různých vodních prvoků [37, 39].

Ačkoli pasti vytvářejí pouze masožravé rostliny, jednotlivé fyziologické zvláštnosti, jako je sekrece hydrolytických enzymů, elektrofyziologicky řízené rychlé pohyby, příjem minerálních i organických látek listy apod., můžeme najít i u mnoha rostlin nemasožravých. U masožravých rostlin však fungují současně jako celek a obvykle ve větší míře [31].

1.3 Látky sekretované kořeny rostlin

Kořeny rostlin jsou v průběhu života vystaveny různým typům biotického i abiotického stresu. V oblasti rhizosféry konstitutivně sekretují směs rozličných látek, kterými odpovídají na signály z okolního prostředí. Kvantita a kvalita látek sekretovaných kořeny je určena rostlinným druhem, věkem rostliny a podněty z okolního prostředí. Látky sekretované kořeny rostlin obsahují ionty (př. H^+), anorganické kyseliny, kyslík a vodu, ale převážně se jedná o uhlíkaté sloučeniny, které můžeme rozdělit do dvou tříd. Zprv se jedná nízkomolekulární látky: aminokyseliny, organické kyseliny, sacharidy, fenolické látky a sekundární metabolity a zadruhé o vysokomolekulární sloučeniny jako jsou polysacharidy a proteiny. Rozdělení sekretovaných látek kořeny je shrnuto v tab. č. 1.1, str. 28 [40].

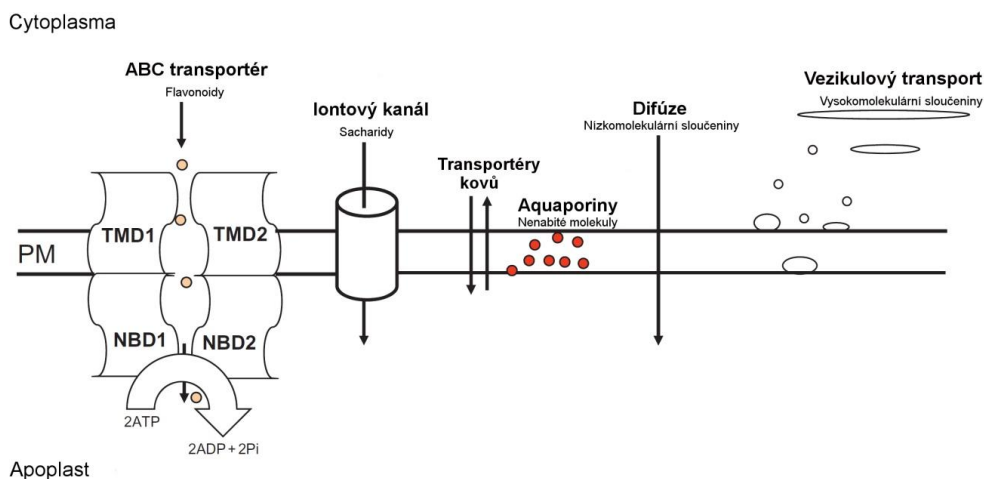
Tab. č. 1.1: Potenciální role látek sekretovaných kořeny identifikovaná z rhizosféry různých rostlin (např. rajče, brukev a další) [40].

Složka sekretovaných látek	Funkce	Příklad identifikované sloučeniny
Organické kyseliny	zdroj živin, chemoatraktant pro mikroorganismy, chelátor špatně rozpustných minerálů, acidifikátor půdy	citrát, glutarát, oxalát, malonát, malát, fumarát, sukcinát, pyruvát, laktát, glykolát, butyrát, valerát, ferulát, akonitát
Aminokyseliny	zdroj živin, chelátor špatně rozpustných minerálů, chemoatraktant pro mikroorganismy	asparagin, valin, threonin, aspartát, tryptofan, cystein, ornithin, histidin, glutamát, glycin, homoserin, fenylalanin
Sacharidy a vitaminy	promotory růstu rostlinného a mikrobiálního zdroje živin	glukosa, deoxyribosa, galaktosa, biotin, maltosa, thiamin, ribosa, niacin, xylosa
Proteiny a enzymy	katalyzátor pro uvolnění fosforu z organických molekul, transformace organické hmoty, obrana	kyselá/alkalická fosfatasa, amylasa, invertasa, proteasa, PR proteiny, lipasa, β -1,3-glukanasa
Puriny	zdroj živin	adenin, guanin, cytosin, uracil
Anorganické ionty a plyny	chemoatraktant pro mikroorganismy	HCO_3^- , OH^- , H^+ , CO_2 , H_2
Fenolické látky	zdroj živin, chemoatraktant pro mikroorganismy, promotor mikrobiálního růstu, inhibitory pro rhizobia, induktory chelátory špatně rozpustných minerálů, fytoalexiny proti patogenům	luteolin, daidzein, genistein, kumerol, naringenin, umbelliferon, liquiritigenin

Látky sekretované kořeny rostlin zprostředkovávají pozitivní i negativní interakce v rhizosféře. Pozitivní interakce zahrnují symbiózu s mikroorganismy, které jsou pro rostlinu prospěšné (např. mykorhizní houby a rhizobakteria). Parasitické rostliny, pathogenní mikroorganismy a bezobratlí býložravci představují negativní interakce [40, 41].

Sloučeniny jsou pravděpodobně sekretovány ven z kořenové buňky pasivním transportem v podobě difúze, iontových kanálů nebo vezikulového transportu. Vezikuly pochází z endoplasmatického retikula, dále splynou s buněčnou membránou a uvolní svůj obsah. Malé polární molekuly a nenabitě molekuly jsou transportovány pasivní difúzí díky membránové permeabilitě a gradientu pH. Transport sacharidů, aminokyselin, organických

kyselin je závislý na transportérech a elektrochemickém gradientu. Transportéry pro ionty kovů udržují jejich homeostázu a chrání rostlinu před jejich nadbytečným množstvím (např. Fe, Zn, Mn a Cu). ABC transportéry se účastní různých buněčných procesů, jako je exkrece potenciálně toxických sloučenin, transport živin, solný stres a obrana proti patogenům (sekrece antimikrobiálních sekundárních metabolitů), (obr. 1.9) [42].



Obr. 1.9: Mechanismus kořenové sekrece [42]. Zkratky: PM, plasmatická membrána; TMD, transmembránová doména; NBD, doména vázající nukleotid.

V *in vitro* podmínkách, rozdílné růstové médium může změnit kompozici látek sekretovaných kořeny, což značí, že specifické složení výživy hraje důležitou roli pro kořenovou sekreci. Bylo prokázáno, že deficienze živin zesílí sekreci těch metabolitů, které slouží k zvýšení dostupnosti těchto látek pro kořeny rostlin. Environmentální faktory jako je teplota, světlo a vlhkost půdy a obsah minerálů také ovlivňují kořenovou sekreci. Hypoxie způsobuje respirační posun od aerobního k anaerobnímu metabolismu, což ústí k akumulaci ethanolu, laktátu a alaninu ve fytotoxickém množství. Rostliny jsou schopny tyto látky sekretovat kořeny, aby se zbavily jejich toxických účinků. Deficienze fosforu vede k zvýšené kořenové sekreci fenolických látek (v případě některých druhů stromů a luštěnin) a organických kyselin (snížení pH mobilizuje fosforečnan vápenatý). Fenolické látky chelatují ionty Fe a Al z nerozpustných komplexů Fe- a Al-fosfátů, a tím zvyšují rozpustnost fosforečných sloučenin pro příjem kořeny [41, 42].

2 Cíl práce

Mezi hlavní cíle předkládané diplomové práce patří:

1. Zjistit vliv proteinu kaseinu jako výhradního zdroje dusíku rostlin tabáku na jejich růst v porovnání s rostlinami pěstovanými v kompletním Murashige-Skoogově médiu a v médiu se sníženým obsahem anorganického dusíku.
2. Analyzovat složení kultivačního média z hlediska obsahu proteinů, proteolytické aktivity a aktivit dalších sekretovaných enzymů pro jednotlivé skupiny rostlin.
3. Zjistit rozdíly v zastoupení proteinů a enzymových aktivit v kořenech rostlin jednotlivých experimentálních skupin.
4. Porovnat obsah fenolických látek, obsah peroxidu vodíku, superoxidového radikálu a aktivitu superoxidodismutasy v rostlinách jednotlivých experimentálních skupin.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie a roztoky

3.1.1 Rozpouštědla

- aceton (*Lach-Ner, ČR*)
- acetonitril (*Lach-Ner, ČR*)
- destilovaná voda (vyrobena na pracovišti)
- ethanol (*Lach-Ner, ČR*)
- formaldehyd (*Lach-Ner, ČR*)
- methanol (*Lach-Ner, ČR*)

3.1.2 Čisté látky

- 1,4-dithiotreitol (*Sigma-Aldrich, USA*)
- 3,3'-diaminobenzidin (*Sigma-Aldrich, USA*)
- 3-methyl-2-benzothiazolinonhydrazon hydrochlorid, monohydrát (*Sigma-Aldrich, USA*)
- acetát amonný (*Lach-Ner, ČR*)
- agar (*AppliChem, Německo*)
- akrylamid (*Sigma-Aldrich, USA*)
- β-merkptoethanol (*Sigma-Aldrich, USA*)
- bis-akrylamid (*Sigma-Aldrich, USA*)
- Coomasie Brilliant Blue R-250 (*Sigma-Aldrich, USA*)
- Coomasie Blue G-250 (*Sigma-Aldrich, USA*)
- BSA (*Sigma-Aldrich, USA*)
- činidlo Bradford (*Sigma-Aldrich, USA*)
- činidlo fenolové Folin-Ciocalteu (*Dr. Kulich Pharma, ČR*)
- dihydrogenfosforečnan draselný (*Lach-Ner, ČR*)
- dodecylsírán sodný (*Sigma-Aldrich, USA*)
- dodekahydrát síranu amonno-železitého (*Lach-Ner, ČR*)
- dusičnan draselný (*Lach-Ner, ČR*)
- dusičnan amonný (*Lach-Ner, ČR*)
- fenol (*Sigma-Aldrich, USA*)
- glukosa (*Sigma-Aldrich, USA*)
- glycerol (*Lach-Ner, ČR*)
- glycin (*Lach-Ner, ČR*)
- hydrogenfosforečnan didraselný (*Lach-Ner, ČR*)
- hydrogenuhličitan amonný (*Lach-Ner, ČR*)
- hydroxid sodný čistý (*Lachema, ČR*)
- chitin (*Sigma-Aldrich, USA*)
- chlorid hořečnatý (*Lach-Ner, ČR*)
- kasein (*Sigma-Aldrich, USA*)

- Kingovo médium (*Sigma-Aldrich*, USA)
- konjugát kasein-fluorescein (*ThermoFisher*, USA)
- kyanid draselný (*Sigma-Aldrich*, USA)
- kyselina 3-(N'-morfolino)propansulfonová (*Sigma-Aldrich*, USA)
- kyselina ethylendiamintetraoctová (*Lach-Ner*, ČR)
- kyselina chlorovodíková (*Lach-Ner*, ČR)
- kyselina L-askorbová (*Sigma-Aldrich*, USA)
- kyselina mravenčí (*Lach-Ner*, ČR)
- kyselina octová (*Lach-Ner*, ČR)
- kyselina sulfanilová (*Lach-Ner*, ČR)
- kyselina trichloroctová (*Avondale laboratories*, Anglie)
- laminarin (*Sigma-Aldrich*, USA)
- methylcelulosa (*Sigma-Aldrich*, USA)
- močovina (*Lach-Ner*, ČR)
- Murashige-Skoogovo médium (*Sigma-Aldrich*, USA)
- nitrotetrazolium blue chlorid (*Sigma-Aldrich*, USA)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (*Sigma-Aldrich*, USA)
- peroxidisíran amonný (*Sigma-Aldrich*, USA)
- peroxid vodíku 30% nestabilizovaný (*Lach-Ner*, ČR)
- *p*-nitrofenylfosfát disodný, hexahydrát (*Sigma-Aldrich*, USA)
- proteinový standard Low-Range-SDS-PAGE (14 - 97 kDa), (*Bio-Rad*, USA)
- *p*-nitrofenol (*Sigma-Aldrich*, USA)
- polyvinylpyrrolidon (*Sigma-Aldrich*, USA)
- riboflavin (*Sigma-Aldrich*, USA)
- sacharosa (*Sigma-Aldrich*, USA)
- Savo (*Unilever*, Anglie-Holandsko)
- síran měďnatý, pentahydrát (*Lach-Ner*, ČR)
- síran hořečnatý, heptahydrát (*Lach-Ner*, ČR)
- tris(hydroxymethyl)-aminomethan (*Fluka Biochemika*, ČR)
- Triton-X-100 (*Sigma-Aldrich*, USA)
- trypsin imobilizovaný na kuličkách (*Promega*, USA)
- Tween 20 (*Sigma-Aldrich*, USA)
- tyrosin (*Sigma-Aldrich*, USA)
- uhličitan sodný (*Lachema*, ČR)
- vinan sodný, dihydrát (*Lachema*, ČR)

3.2 Přístrojové vybavení

- analytické váhy XE series, 100 A (*Denver Instrument Company, USA*)
- centrifuga UNIVERSAL 32R (*Hettlich Zentrifugen, SRN*)
- centrifuga M-240 (*Boeco, Německo*)
- čtečka absorbance Sunrise Remote (*Tecan, Švýcarsko*)
- elektroforetická aparatura Biometra (*Biometra, Německo*)
- hmotnostní spektrometr UHR-TOF maXis Impact, (*Bruker, Německo*)
- homogenizátor MM 400, (*Retsch, Německo*)
- konfokální mikroskop Zeiss LSM 510 META (*Carl Zeiss, Německo*)
- kolona C₁₈ (150 mm; 0,075 mm průměr, Zorbax 300SB-C18, *Agilent Technologies, USA*)
- kultivační nádobka Magenta GA-7 (*Sigma-Aldrich, USA*)
- laboratorní váhy Kern 440-45 (*Kern, SRN*)
- lyofilizátor Lyovac GT2E (*Finn-Aqua, Finsko*)
- odparka SpeedVac Concentrator (*Thermo Scientific, USA*)
- pH metr UltraBasic UB-10 (*Denver Instrument, USA*)
- chromatografický systém (rapid separation LC system) s autosamplerem UltiMate 3000 RSLC (*Dionex, USA*)
- sonikátor Sonica Ultrasonic Cleaner (*Soltec, Itálie*)
- spektrofotometr Ultrospec 2100 pro UV/VIS (*Biochrom, Anglie*)
- světelný panel Kaiser prolite basic (*Kaiser Fototechnik, Německo*)
- termostat EL-02 (*Major Science, USA*)
- třepačka mikrozkušavek Thermomixer compact (*Eppendorf, Německo*)
- třepačka V1-plus (*BioSan, Litva*)
- zdroj pro hmotnostní spektrometr nanoESI CaptiveSpray, (*Bruker, Německo*)

3.3 Softwarové vybavení

- Data Analysis 4.1 (*Bruker, Německo*)
- ImageJ (*National Institutes of Health, USA*)
- J-Express (*University of Bergen, Norsko*)
- Mascot (*Matrix Science, Velká Británie*)

- MS Excel 2007 (*Microsoft Corp.*, USA)
- ProteinScape 3.1 (*Bruker*, Německo)
- SigmaPlot 11.0 (*Systat Software Inc.*, USA)
- Skyline 3.5 (*MacCoss Lab, University of Washington*, USA)

3.4 Rostlinný materiál

3.4.1 Pěstování rostlin tabáku *in vitro*

Rostliny tabáku byly pěstované ve spolupráci s RNDr. Helenou Synkovou, CSc. v Laboratoři stresové fyziologie Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Rostliny tabáku byly pěstovány *in vitro* v uzavřených kultivačních nádobkách (*Magenta GA-7, Sigma-Aldrich*) při konstantních podmínkách: 16 hodin světlo ($110 \mu\text{mol}(\text{fotonů})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) při teplotě 21°C a 8 hodin tma při 18°C, vlhkost vzduchu v nádobkách přesahovala 90 %, koncentrace CO₂ v klimatizovaných komorách byla 350 ppm. Kultivačním médiem (objem 50 ml) byl jednak kompletní Murashige-Skoogův agar [kontrolní rostliny; 20,6 mM NH₄NO₃, 18,7 mM KNO₃ (0,84 g(dusíku).l⁻¹)], jednak modifikovaný Murashige-Skoogův agar s obsahem 0,5 % (w/v) kaseinu (příp. azokaseinu) jako výhradního zdroje dusíku (1 g(dusíku).l⁻¹), jednak modifikovaný Murashige-Skoogův agar se sníženým obsahem anorganického dusíku [pouze 3,74 mM KNO₃, (0,05 g(dusíku).l⁻¹)]. Rostliny všech skupin byly pěstovány v přítomnosti, nebo bez přítomnosti 1,5% (w/v) sacharosy, jakožto dodatečného zdroje uhlíku. Ostatní složky Murashige-Skoogova média zůstaly nezměněny, pH bylo vždy upraveno na hodnotu 5,8-5,9. Složení Murashige-Skoogova média je uvedeno v příloze (tab. P1 a P2). Každá skupina obsahovala nejméně 15 rostlin.

Semena (přibližně 0,2 g) byla 1 minutu promývána ve 100 ml 70%(v/v) ethanolu. Poté byla 10 minut inkubována ve 100 ml roztoku 30%(v/v) dezinfekčního prostředku Savo se 2 kapkami smáčedla Tween 20. Na závěr byla třikrát promyta ve 100 ml sterilní vody. Ve flow-boxu byla poté semena tabáku vyseta na kompletní resp. modifikované Murashige-Skoogovo médium v Petriho miskách (objem 20 ml). Po 4 týdnech růstu v Petriho misce byly rostliny ve flow-boxu přeneseny do kultivačních nádobek na kompletní resp. modifikované Murashige-Skoogovo médium (objem 50 ml).

3.4.2 Odběr vzorků

Všechny rostliny tabáku byly sklizeny po 8 týdnech růstu v kultivačních nádobkách. Každá rostlina byla rozdělena na listy, stonek a kořeny. Každá část byla zvážena a pro každou skupinu byl vytvořen směsný vzorek. Dále bylo odebíráno kultivační médium, jednak v blízkosti kořenů, jednak ve vzdálené oblasti bez kořenů. Všechny vzorky byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při teplotě -80°C .

3.4.3 Příprava lyofilizátu z kultivačního média

Kultivační médium bylo vždy extrahováno v dvojnásobném množství destilované vody a homogenizováno ve třecí misce. Roztok byl centrifugován 10 minut při $9400 \times g$ a teplotě 4°C . Supernatant byl poté lyofilizován.

3.4.4 Příprava extraktu z experimentálních rostlin

Přibližně 0,5 g směsného vzorku listů bylo homogenizováno v 2,5 ml extrakčního roztoku (100 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton-X-100, 5 mM kyselina askorbová, pH 7,8) ve třecí misce. Při homogenizaci bylo vždy přidáváno asi 0,02 g/ml PVP. Po 10 min v 4°C byl roztok centrifugován 30 min při $12\,470 \times g$ ve 4°C . Vzorky byly poté zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v -80°C .

Pro měření aktivity proteas bylo nutné připravit extrakční roztok bez inhibitoru proteas (EDTA). Složení tohoto extrakčního roztoku bylo: 100 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl_2 , 5 % (w/v) glycerol, pH 7,0.

3.5 Experimentální metody

3.5.1 Mikrobiologický test kultivačního média

Přítomnost mikroorganismů byla testována v agaru. Kultivační médium všech skupin rostlin bylo mikrobiologickou hokejkou vždy nanášeno na 20 ml Kingova média (20 g.l^{-1} pepton; 8,6 mM K_2HPO_4 ; 6,1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $18,9 \text{ g.l}^{-1}$ glycerol; 15 g.l^{-1} agar) v Petriho misce. Poté následovala inkubace při 26°C na 72 hodin a byla sledována přítomnost kolonií bakterií. Stanovení byla provedena v duplikátech.

3.5.2 Stanovení množství proteinů Lowryho metodou

Ke 200 μl roztoku vzorku (lyofilizát, extrakt z listů nebo kořenů) byl přidán 1 ml roztoku C (50 ml 2% (w/v) Na_2CO_3 v 0,1 M NaOH a 1 ml 0,5% (w/v) CuSO_4 v 1% (w/v) vinanu sodném). Po 10 minutách bylo přidáno 100 μl 50% (v/v) Folin-Ciocalteuova činidla. Po 30 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm, proti roztoku slepého vzorku, v němž byl roztok proteinů nahrazen destilovanou vodou.

Kalibrace metody byla provedena nahrazením vzorku roztokem BSA v koncentračním rozsahu 0,05-0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Podle výsledků regresní analýzy experimentálně získaných dat byla sestavena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 750 nm (A_{750}) na hmotnostní koncentraci BSA (c_{BSA} , $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$): $A_{750} = (1,5 \pm 0,2) c_{\text{BSA}}$ [43].

3.5.3 Stanovení množství proteinů dle Bradforda

Ke 100 μl roztoku vzorku (lyofilizát, extrakt z listů nebo kořenů) byl následně přidán 1 ml Bradfordova činidla. Směs byla řádně promíchána. Po 5 min inkubace za laboratorní teploty byla změřena absorbance při 595 nm v kyvetě o tloušťce 10,0 mm oproti roztoku slepého vzorku, kde byl roztok proteinů nahrazen stejným množstvím destilované vody.

Kalibrace metody byla provedena nahrazením vzorku roztokem BSA, a to v koncentračním rozsahu 0,04-0,30 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Podle výsledků regresní analýzy experimentálně získaných dat byla sestavena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 595 nm (A_{595}) na hmotnostní koncentraci BSA (c_{BSA} , $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$): $A_{595} = (2,13 \pm 0,03) c_{\text{BSA}}$ [44].

3.5.4 Elektroforetická separace

Pro analýzu proteinů s nízkou molekulovou hmotností byl využit systém Tris-tricinových pufrů. Vzorkový pufr se skládal z 6% (w/v) SDS, 3% (v/v) merkaptoethanolu, 15% (w/v) glycerolu, 0,025% (w/v) Coomassie Blue G-250, 150 mM Tris-HCl, pH 7,0. Lyofilizát byl rozpuštěn ve vzorkovém pufru a inkubován při 37°C po dobu 60 min. Do jamky bylo naneseno vždy 50 μg proteinů. Elektroforéza probíhala v prostředí katodového a anodového pufru. Jako katodový pufr byl použit 0,1 M Tris; 0,1 M tricín; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,25. Anodový pufr byl roztok 0,1 M Tris, jehož pH bylo pomocí HCl upraveno na hodnotu 8,9. Pro zachycení malých proteinů byl využit systém 3 vrstev gelu - zaostřovací, "spacer", separační. Zásobní roztok akrylamidu pro separační a zaostřovací gel obsahoval 48 % (w/v) akrylamid a 1,5 % (w/v) bisakrylamid (49,5 % T, 3 % C). V případě

"spacer gelu" byl připraven roztok akrylamidu o větším zesílení: 46,5 % (w/v) akrylamid a 3 % (w/v) bisakrylamid (49,5 % T, 6 % C). Složení gelů je uvedeno v tab. 3.1 [45].

Tab. 3.1: Složení gelů v elektroforetické separaci.

Typ gelu	Koncentrace akrylamidu	Složení gelu
Zaostřovací gel	4 % (w/v)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,75 M Tris-HCl, pH 8,45 • 0,075 % (w/v) SDS • 0,08 % (w/w) peroxidisíran amonný • 0,08 % (v/v) TEMED
"Spacer" gel	10 % (w/v)	<ul style="list-style-type: none"> • 1 M Tris-HCl, pH 8,45 • 0,1 % (w/v) SDS • 10 % (w/v) glycerol • 0,05 % (w/w) peroxidisíran amonný • 0,05 % (v/v) TEMED
Separáční gel	16 % (w/v)	<ul style="list-style-type: none"> • 1 M Tris-HCl, pH 8,45 • 0,1 % (w/v) SDS • 10 % (w/v) glycerol • 0,03 % (w/w) peroxidisíran amonný • 0,03 % (v/v) TEMED

Počáteční napětí bylo nastaveno na 30 V po dobu 1 hod, následně bylo zvýšeno napětí na 90 V. Elektroforetické dělení v soupravě *Biometra* s velikostí skel 14,8 x 9,3 cm probíhalo ještě 2 hod při teplotě přibližně 15°C. K určení molekulární hmotnosti analyzovaných proteinů byla použita komerční standardní směs proteinů o definové molekulové hmotnosti (*Low-Range-SDS-PAGE, 14 - 97 kDa, Bio-Rad*).

Metoda, která byla použita pro vizualizaci proteinů, využívá barvení v Coomassie Brilliant Blue. Gel byl přes noc inkubován v barvicí lázni (0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 ve 40% (v/v) methanolu a 10% (v/v) kyselině octové). Po barvení byl gel odbarvován (přibližně 4 - 5 hod) v několika lázních v odbarvovací směsi (25 % (v/v) ethanol, 10 % (v/v) kyselina octová, 65 % (v/v) voda). Poté byl gel převeden do destilované vody [45].

3.5.5 Proteomická analýza

Analýza proteinového složení kořenů rostlin tabáku pěstovaných *in vitro* probíhala pod vedením Mgr. Martina Černého, Ph.D. na Ústavu molekulární biologie a radiobiologie na Mendelově univerzitě v Brně. Následující postup vychází z metodiky upravené Mgr. Martinem Černým, Ph.D. [46, 47].

3.5.5.1 Homogenizace kořenů rostlin a izolace proteinů

Směsné vzorky kořenů tabáku (kap. 3.4.2, str. 35) byly homogenizovány v tekutém dusíku. Pro extrakci proteinů byla využita kombinovaná metoda, která spojuje TCA/acetonovou a fenolovou extrakci. Ke zhruba 0,2 ml homogenátu bylo přidáno 1,5 ml acetonu s 10 % (w/v) TCA (roztok A) a inkubováno přes noc na ledu.

Poté byly vzorky centrifugovány vždy 10 min při $20\,000 \times g$ a teplotě 4°C . Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a do mikrozkušavek se sedimentem se opět přidalo 1,5 ml roztoku A. Po centrifugaci byl opět odstraněn supernatant, k sedimentu bylo přidáno 1,5 ml roztoku B (10% TCA ve vodě, w/v). Následovala další centrifugace a poté odstranění supernatantu. K sedimentu bylo přidáno 1,5 ml 80 % (v/v) acetonu ve vodě (roztok C) a roztok byl centrifugován. Izolované proteiny byly solubilizovány pomocí 0,8 ml 100 mM Tris-HCl pufru o pH 8,0 obsahujícím: 2% (w/v) SDS, 30% (w/v) sacharosa, 5% (v/v) β -merkaptoethanol (roztok D).

Roztoky proteinů byly 10 minut třepány na třepačce mikrozkušavek (*Thermomixer compact, Eppendorf*) při 450 RPM a 20°C . Následovala fenolová extrakce proteinů - k proteinům rozpuštěným v 0,8 ml roztoku D bylo přidáno 0,4 ml fenolu. Po přidání fenolu byly roztoky proteinů za stejných podmínek třepány a opět centrifugovány. Po centrifugaci se roztok proteinů rozdělil do tří frakcí: horní fenolovou frakci s proteiny, střední tenkou vrstvou sacharosy a spodní frakci obsahující anorganickou frakci a zbytky rostlinného materiálu. Pipetou byla odebrána vrchní fenolová frakce, ke které byl přidán 100 mM acetát amonný v methanolu do celkového objemu 1,5 ml. Tyto roztoky proteinů byly poté ponechány přes noc při -20°C , aby došlo k úplné precipitaci proteinů.

Získané roztoky proteinů byly centrifugovány, supernatanty odstraněny a proteiny byly promyty 0,5 ml 80 % (v/v) acetonem. Po sonikaci (5 min) a centrifugaci (resp. po odebrání supernatantu) byly proteiny vysušeny na vzduchu při laboratorní teplotě (20°C).

3.5.5.2 Štěpení proteinů

Proteiny byly solubilizovány ve 100 μ l roztoku obsahujícím 100 mM NH_4HCO_3 a 8 M močovinu. Vzorky byly třepány 2 hod při 25°C. Poté byla stanovena koncentrace proteinů dle M. M. Bradforda (kap. 3.5.3, str. 36). Ke 200 μ l roztoku proteinů bylo přidáno 200 μ l 10 % (v/v) acetonitrilu (ACN) s 50 mM NH_4HCO_3 a 400 μ l destilované vody. Poté bylo přidáno 40 μ l trypsinu imobilizovaného na kuličkách (*Promega*). Štěpení imobilizovaným trypsinem probíhalo přes noc (resp. 18,5 hod) při 30°C.

3.5.5.3 Odsolení a koncentrování proteinů

Proteiny po štěpení trypsinem byly centrifugovány 2 min při 10 000 \times g při 4°C. Následné odsolení proběhlo za využití C_{18} SPEC destičky (*Agilent Technologies*). Ta byla nejdříve jednou promyta 100% (v/v) methanolem (400 μ l) a poté znovu aktivována redestilovanou vodou (čtyřikrát 800 μ l). Proteiny po štěpení trypsinem byly zředěny destilovanou vodou v poměru 1:1, poté byly nanесeny na C_{18} SPEC destičku. Nejdříve byly čtyřikrát promyty 800 μ l destilované vody a následně byly eluovány 400 μ l methanolu. Poté byly roztoky naštěpených proteinů odpařeny (-100°C, *SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific*) a uchovávány při teplotě -80°C.

Těsně před MS analýzou byl ke všem roztokům tryptických štěpů přidán roztok 4% (v/v) ACN s 0,1% (v/v) kyselinou mravenčí v takovém objemu, aby byla výsledná koncentrace peptidu přibližně 5 μ g/ μ l (odhadnuto na 40 μ l na základě stanovení koncentrace proteinu před štěpením trypsinem). Roztoky naštěpených proteinů byly poté 10 minut sonikovány a krátce centrifugovány (30 s, stolní centrifuga). Poté byly roztoky naštěpených proteinů dávkovány na C_{18} kolonu (kolona 150 mm \times 0,075 mm průměr, *Zorbax 300SB-C18, Agilent Technologies*) v množství odpovídajícím přibližně 5 μ g proteinu na nástřík.

3.5.5.4 MS Měření

Peptidy získané štěpením proteinů trypsinem byly separovány UPLC (UltiMate 3000 RSLC) na reverzní fázi (C_{18} kolona). UPLC přístroj operoval s průtokem 300-500 nl/min a gradient ACN byl od 4 - 35% ACN po dobu 120 min. Separované peptidy byly následně analyzovány q-TOF analyzátozem (*Bruker*). UHR-TOF spektrometr maXis Impact (*Bruker*) měřil v MS/MS módu pro identifikaci [nanoESI zdroj CaptiveSpray (*Bruker*)]. Při měření byl použit vnitřní standard 1221,99 m/z (lockmass).

3.5.5.5 Izolace proteinů z gelu

Proteiny separované pomocí Tris-tricinové elektroforézy v prostředí SDS byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Z gelu obarveného CBB byly vyříznuty proužky separovaných proteinů připravených dle (kap. 3.5.4, str. 36), které byly umístěny do mikrozkušavek. K vyříznutým proužkům byl přidán 1 ml destilované vody a homogenizační kuličky. Směs byla 5 minut třepána. Třepání (resp. homogenizace) probíhalo vždy v homogenizátoru (*MM 400, Retsch*). Poté byla odebrána voda a přidán 1 ml 60 % (v/v) ACN a 5 minut třepáno. Roztok byl odebrán a opět byl přidán 1 ml 60% (v/v) ACN, pak byla směs 5 minut třepána. Roztok byl znovu odebrán a byl přidán 1 ml 100% (v/v) ACN. Následovalo 5 minutové třepání. Znovu se opakoval tento krok s destilovanou vodou a 100% (v/v) ACN. Pro odpaření organických rozpouštědel byl roztok ponechán přibližně 20 min na vzduchu. Poté byl roztok na 15 minut přenesen na led (4°C), a bylo přidáno 50 µl 0,01 µg/µl trypsinu. Poté bylo přidáno 140 µl 25 mM NH₄HCO₃. Směs byla uložena v inkubátoru při 25°C na dobu >24 hod.

Ke směsi bylo přidáno 100 µl 100% (v/v) ACN a následovala sonikace (10 min). Poté byl roztok centrifugován 2 min při 10 000 × g při 4°C. Supernatant (asi 150 µl) byl přenesen do mikrozkušavky. K sedimentu bylo přidáno 500 µl 100% (v/v) ACN a roztok byl poté sonikován (10 min). Roztok byl centrifugován 2 min při 10 000 × g při 4°C. Supernatant byl opět přenesen do mikrozkušavky. Směs byla koncentrována na odparce (-100°C, *SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific*) až do zhruba 100 µl [obsah ACN přibližně 50 % (v/v)]. Roztok byl poté naředěn do obsahu 2 % (v/v) ACN. Následovalo odsolení a koncentrování (kap. 3.5.5.3, str. 39) a MS měření (kap. 3.5.5.6, str. 40) ve stejném uspořádání jako pro homogenát z kořenů rostlin tabáku.

3.5.5.6 Měření a zpracování MS spekter

MS spektra získaná pomocí analyzátoru q-TOF byla nejdříve zpracována v programu *DataAnalysis*. Zde byla provedena recalibrace spekter podle referenční složky ("vnitřní kalibrant", lockmass kalibrant 1221,9 m/z), čímž se kompenzovaly výkyvy v přesnosti měření. Dále se ze surových dat extrahovala spektra. Výstupem zpracování dat v *Data Analysis* bylo získání jednotlivých souborů iontů o stejné m/z ve stejném retenčním čase, které byly naměřeny alespoň ve dvou ze tří opakování, a srovnání intenzit prekurzorů pro

kvantifikaci peptidů. Dále byl získán mgf soubor MS a MS/MS spekter, který byl dále zpracován pomocí programu *Mascot* pro identifikaci peptidů.

3.5.5.7 Statistické zpracování MS dat

Dalším krokem kvantifikační analýzy bylo načtení dat v programu *ProfileAnalysis*, který po nastavení patřičného časového gradientu a dalších parametrů vygeneroval kvantifikační tabulku, jež umožnila porovnávat jednotlivé analyzované vzorky na základě srovnání intenzit MS spektra jejich komponent. Data byla v programu rovněž upravena automatickou korekcí retenčního času a normalizací spekter. Seznam signifikantně ovlivněných intenzit MS spektra jejich komponent byl získán ze statistického porovnání na základě t-testu (p-value 0,05).

3.5.5.8 Změření a zpracování MS/MS spekter

Identifikace peptidů probíhala v programu *Mascot* a *ProteinScape* na základě spekter získaných měření v MS/MS módu. Naměřená spektra fragmentů peptidů byla porovnána v programu *Mascot* s teoretickými spektry pocházejícími z *in silico* analýzy databáze *N. tabacum* TN-90 (databáze proteinů *Nicotiana tabacum*, Solgenomics, 7/2015). Anotace a funkce genu jsou odvozeny na základě sekvenční homologie s *Arabidopsis thaliana*. Po úspěšném přiřazení peptidů bylo možné identifikovat proteiny přítomné vzorku. Dále následovalo dodatečné zpracování neidentifikovaných spekter pomocí *Perkolátoru* (algoritmus, *Matrix Science*) v programu *ProteinScape*. Výchozí spektra byla znovu vyhodnocena, díky tomu došlo k navýšení počtu identifikací (zhruba o 10 %) v důsledku využití výpočtu FDR (False Discovery Rate, 1 %). Na závěr program přiřadil jednotlivé intenzity prekurzorů k identifikovaným peptidům.

3.5.5.9 Validace automatického zpracování v programu Skyline

V této fázi již je k dispozici informace o kvantifikaci (MS spektra) i o identifikaci (MS/MS spektra). Po sloučení těchto údajů je vytvořena rozsáhlá tabulka s údaji o názvu identifikovaného peptidu a názvu proteinu, ke kterému byl tento peptid přiřazen. Dále o hodnotách m/z, náboji, retenčním čase, hodnotě skóre (v úvahu brány peptidy, které mají hodnotu vyšší než 20), sekvenci aminokyselin peptidu, jeho modifikacích a regulaci vypočítanou pomocí automatické analýzy (*ProfileAnalysis*). Pouze peptidy proteinů, u nichž byl nalezen alespoň jeden peptid s absolutní změnou v relativním zastoupení vyšší

než 1,4 ($p < 0,05$), byly dále validovány programem *Skyline*. Hodnocení spočívá v manuální kontrole a případně opravě automatického přiřazování jednotlivých extrahovaných chromatogramů pro daný peptid. Toto přiřazování probíhá na základě znalosti správného retenčního času, překryvu izotopů a případně různých nábojových stavů daného prekursoru. *Skyline* následně spočítá plochu píku a z hodnot pro jednotlivé repliky a vzorky je pak možné vypočítat relativní zastoupení peptidu, které se v ideálním případě blíží hodnotě stanovené předchozím automatickým zpracováním.

Pro věrohodné určení zastoupení proteinu je třeba provést jeho kvantifikaci na základě alespoň dvou unikátních peptidů, u kterých není předpokládána existence více forem, například vlivem alternativního štěpení (sekvence obsahující více štěpných míst), či spontánní modifikaci (např. oxidace methioninu, deamidace glutaminu či asparaginu).

3.5.6 Aktivita proteas

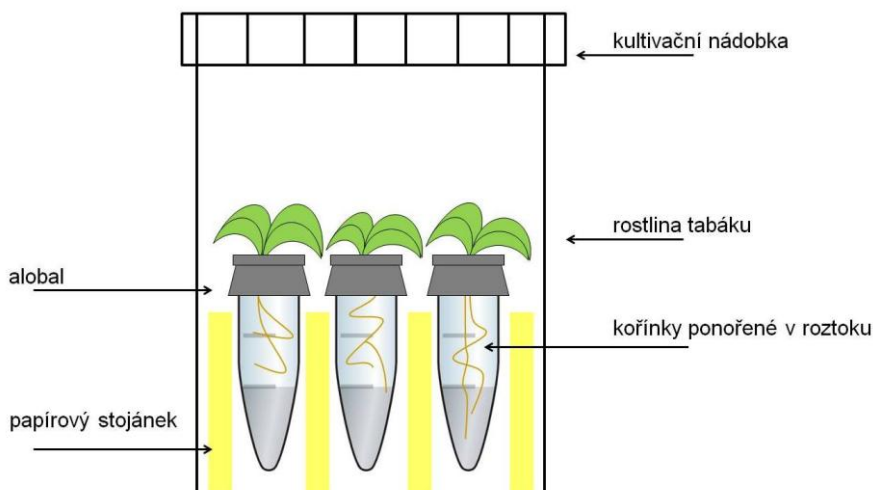
Ke stanovení aktivity proteas byla využita metoda hydrolýzy kaseinu. 5 g kaseinu bylo rozpuštěno v 90 ml vody obsahujících 2 ml 1 M hydroxidu sodného. Roztok byl zahříván na vodní lázni do úplného rozpuštění, byl zfiltrován přes gázu, pH upraveno 1 M kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 6,8 a doplněno do 100 ml destilovanou vodou. Tento zásobní roztok byl uchováván při teplotě -30°C .

Reakční směs obsahovala 100 μl 5 % (w/v) roztoku kaseinu (pH 6,8). Reakce byla zahájena přidáním 50 μl roztoku lyofilizátu a probíhala 4 hodiny při 37°C . Pro zastavení reakce bylo přidáno 200 μl 20 % (v/v) kyseliny trichloroctové. Poté byl roztok centrifugován 20 min při $3000 \times g$ při 4°C . Ke 200 μl supernatantu bylo přidáno 800 μl 6 % (w/v) Na_2CO_3 a 200 μl 25% (v/v) Folin-Ciocalteuovo činidla. Po 30 minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm. V případě slepého pokusu byl roztok lyofilizátu přidán až po acidifikaci reakční směsi kyselinou trichloroctovou.

Kalibrace metody byla provedena nahrazením supernatantu roztokem L-tyrosinu, a to v koncentračním rozsahu $55\text{-}400 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (resp. 0,01-0,08 μmol L-tyrosinu v reakční směsi). Podle výsledků regresní analýzy experimentálně získaných dat byla sestavena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 750 nm (A_{750}) na látkovém množství L-tyrosinu (n_{TYR} , μmol): $A_{750} = (11,1 \pm 0,6) n_{\text{TYR}}$ [48].

3.5.7 Proteolýza konjugátu kasein-fluorescein

Nejdříve byla semena tabáku sterilizována (kap. 3.4.1, str. 34) a poté vyseta v Petriho misce ve 20 ml kompletního nebo modifikovaného Murashige-Skoogova agaru s 0,5% (w/v) kaseinem jako jediným zdrojem dusíku dle (kap. 3.4.1, str. 34). Po 3 týdnech růstu při standardních podmínkách (kap. 3.4.1, str. 35) byly jednotlivé semenáčky tabáku ve flow-boxu přeneseny do 50 $\mu\text{g/ml}$ roztoku konjugátu kasein-fluorescein (obr. 3.1). V tomto roztoku byly ponechány za standardních podmínek (kap. 3.4.1, str. 34) po dobu 24 hodin. Kontrolní rostliny tabáku byly inkubovány ve sterilní vodě. Poté byly kořínky rostlin analyzovány konfokálním mikroskopem při excitaci 488 nm, absorpci 498 nm a emisi fluorescence 520 nm (filtr 505 - 550 nm) při 20x zvětšení a světelnosti 0,8.



Obr. 3.1: Schéma kultivace rostlin v roztoku konjugátu kasein-fluorescein a sterilní vodě pro analýzu fluorescence konfokálním mikroskopem. Semenáčky tabáku byly opatrně přeneseny ve flow-boxu do mikroskopavek s 50 $\mu\text{g/ml}$ roztokem konjugátu kasein-fluorescein resp. sterilní vody. Mikroskopavky byly naplněny příslušným roztokem po okraj (1,7 ml), překryty alobalem, kterým byly prostrčeny kořínky semenáčku. Mikroskopavky s rostlinami byly uzavřeny v kultivační nádobce a ponechány po dobu 24 hod v kultivační místnosti za standardních podmínek (kap. 3.4.1, str. 34).

3.5.8 Aktivita fosfatas

Aktivita kyselých fosfatas (EC 3.1.3.2) byla měřena kolorimetricky. Reakční směs obsahovala 100 μl 100 mM citrátového pufru, pH 5,5 a 50 μl 20 mM *p*-nitrofenylfosfátu. Reakce byla zahájena přidáním 50 μl roztoku vzorku a probíhala při 37°C po dobu 4 hod

pro roztok lyofilizátu a 10 min pro extrakt z listů nebo kořenů. Pro zastavení reakce bylo přidáno 800 μl 100 mM borátového pufru, pH 9,0. Absorbance byla změřena při vlnové délce 405 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm oproti slepému pokusu, který byl připraven přidáním vzorku až po alkalizaci reakční směsi borátovým pufrem.

Kalibrace metody byla provedena nahrazením vzorku destilovanou vodou a substrátu *p*-nitrofenylfosfátu roztokem *p*-nitrofenolu, a to v koncentračním rozsahu 0,2-1 mmol.l^{-1} (resp. 0,01-0,05 μmol *p*-nitrofenolu v reakční směsi). Podle výsledků regresní analýzy experimentálně získaných dat byla sestavena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 405 nm (A_{405}) na látkovém množství *p*-nitrofenolu ($n_{p\text{-NF}}$, μmol): $A_{405} = (16,95 \pm 0,15) n_{p\text{-NF}}$ [49].

3.5.9 Aktivita glykosidas

Byly měřeny endoglykosidasy endo-1,3- β -glukanasa (EC 3.2.1.6), chitinasa (EC 3.2.1.14), celulasa (EC 3.2.1.4) a enzym štěpící agar (agarasa, EC 3.2.1.B1) za použití substrátů koloidního laminarinu, chitinu, methylcelulosity a agaru. Ke stanovení aktivity byla použita metoda založená na kvantifikaci redukčních vlastností vzniklých produktů. Ke 20 μl 100 mM pufru MOPS-NaOH, pH 5,0, 12 μl 1,6 mg/ml substrátu (koloidní laminarin, chitin, methylcelulosa, agar) bylo přidáno 8 μl vhodně zředěného vzorku (lyofilizát nebo extrakt z listů či kořenů). Reakční směs byla inkubována při 37°C po dobu 20 min pro roztok lyofilizátu a 10 min pro extrakt z listů. Poté byla reakce zastavena přidáním 40 μl 0,5 M NaOH a 40 μl MBTH činidla s DTT (3 mg/ml MBTH a 1 mg/ml DTT v poměru 1:1). Následovala 15 minutová inkubace při 80°C. Pak bylo přidáno 80 μl Fe^{3+} -činidla (0,5 % $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,5% kyselina sulfanilová; 0,25 M HCl). Absorbance byla změřena při vlnové délce 630 nm. V případě slepého pokusu byl roztok vzorku nejdříve inkubován se 40 μl 0,5 M NaOH při 80°C po dobu 30 min a až poté byly přidány ostatní složky reakční směsi.

Kalibrace metody byla provedena nahrazením vzorku roztokem glukosy v koncentračním rozsahu 0,1-0,5 mmol.l^{-1} (resp. 5-20 nmol glukosy v reakční směsi). Podle výsledků regresní analýzy experimentálně získaných dat byla sestavena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 630 nm (A_{630}) na látkovém množství glukosy (n_{glukosa} , nmol): $A_{630} = k = (0,012 \pm 0,000) n_{\text{glukosa}}$ [50].

3.5.10 Obsah fenolických látek

Ke 200 μl vzorku (lyofilizát nebo extrakt z listů či kořenů) bylo přidáno 1000 μl 10% (v/v) Folin-Ciocalteuovo činidla a po dvou minutách 800 μl 75 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku Na_2CO_3 . Po 28 min inkubace takto připravené směsi byla změřena její absorbance při vlnové délce 760 nm a tloušťce kyvety 10,0 mm proti roztoku slepého vzorku, v němž byl roztok vzorku nahrazen destilovanou vodou.

Kalibrace metody byla provedena nahrazením vzorku roztokem fenolu, a to v koncentračním rozsahu 200–850 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (resp. 0,04–0,17 μmol v reakční směsi). Poté byla provedena lineární regresní analýza experimentálně získaných dat, na jejímž základě byla vytvořena kalibrační závislost absorbance při vlnové délce 760 nm (A_{760}) na mikromolární koncentraci fenolu (c_{fenol} , $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$): $A_{760} = (0,96 \pm 0,07) c_{\text{fenol}}$ [51].

3.5.11 Vizualizace peroxidu vodíku a produkce superoxidu v listech experimentálních rostlin

Detekce peroxidu vodíku a produkce superoxidu byla provedena *in vivo* infiltrační technikou. Listy byly pod vodou odříznuty od stonku. Oddělené listy byly infiltrovány transpirací destilovanou vodou obsahující buď 0,1 % (w/v) 3,3'-diaminobenzidin (DAB) pro vizualizaci H_2O_2 nebo 2 mM nitrotetrazolium blue chlorid (NBT) pro vizualizaci O_2^- . Jako kontrola sloužily listy infiltrované pouze destilovanou vodou. Reakce probíhala 2 hodiny pod ozářením 500 $\mu\text{mol}(\text{fotonů})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Poté byla reakce zastavena vložením listů do vroucího denaturovaného ethanolu, kde došlo k jejich odbarvení. Listy byly naskenovány po krátké inkubaci (10 s) v destilované vodě [52].

3.5.12 Aktivita superoxiddismutasy

Aktivita SOD (EC 1.15.1.1) byla sledována v gelu po elektroforetické separaci. Elektroforetické rozdělení probíhalo v polyakrylamidovém gelu v nedenaturujícím prostředí. Extrakty z listů (připravené podle kap. 3.4.4, str. 35) s obsahem 20 % (w/v) sacharosy byly nanášeny do jamek v zaostřovacím gelu. Každá jamka obsahovala 25 μg proteinů.

Elektroforetická separace byla provedena v 10% separačním gelu. Pro 4 gely byl připraven roztok o následujícím složení: 21,3 ml roztok 30 % (w/v) akrylamidu s 0,8 % (w/v) bisakrylamidem; 21,3 ml destilovaná voda; 21,2 ml gelový pufr (50 mM Tris, 100 mM glycin,

20 % (w/v) glycerol, pH 8,3); 42,4 μ l TEMED; 320 μ l 10% (w/v) peroxodisíran amonný. Zaostrovací gel byl 6 % a pro 4 gely byl připraven roztok o složení: 3 ml roztok 30 % (w/v) akrylamidu s 0,8 % (w/v) bis-akrylamidem; 12 ml gelový pufr (50 mM Tris, 100 mM glycin, 20 % (w/v) glycerol, pH 8,3); 22,5 μ l TEMED; 56,5 μ l 10% (w/v) peroxodisíran amonný. Elektrodotový pufr obsahoval 25 mM Tris, 192 mM glycin a 0,1 % (w/v) SDS. Na každý gel byl přiveden proud o hodnotě 7,5 mA. Elektroforetická separace probíhala při velikosti skel 14,8 \times 9,3 cm (souprava *Bio-Rad*) po dobu 1 hodiny a 40 minut při teplotě 4°C.

Poté byly gely krátce promyty v destilované vodě. Inkubační roztok pro 4 gely byl připraven smícháním 140 ml roztoku A (40 mg NBT; 120 ml destilovaná voda; 400 μ l 0,5 M EDTA, pH 8,0; 20 ml 0,5 M KH_2PO_4 , pH 7,8 a 660 μ l TEMED) a 60 ml roztoku B (50 μ g/ml riboflavin). Každý gel byl ponechán v 50 ml inkubačního roztoku po dobu 20 min v temnu při laboratorní teplotě. Poté byl gel promyt destilovanou vodou a na přesně 15 min byl osvětlen. Následně byl gel opět promyt destilovanou vodou a zafixován 10% (v/v) kyselinou octovou.

Pro inhibice jednotlivých isoform SOD byl gel vždy inkubován v příslušném inhibičním roztoku, než byl přenesen inkubačního roztoku (směs roztoků A a B). Pro inhibici Cu/Zn-SOD byl gel inkubován 30 min při laboratorní teplotě v roztoku o složení: 200 μ l 0,5 M EDTA, pH 8,0; 10 ml 0,5 M KH_2PO_4 , pH 7,8; 1 ml 0,2 M KCN. Pro inhibici Fe-SOD byl gel nejdříve inkubován 30 min při laboratorní teplotě v roztoku o složení: 1 ml 30 % H_2O_2 a 89 ml destilované vody. Cu/Zn-SOD je také inhibována peroxidem vodíku. Zatímco Mn-SOD je necitlivá ke kyanidu i peroxidu [53, 54].

3.6 Statistické vyhodnocení

Veškerá stanovení byla provedena nejméně třikrát. Odlehlé hodnoty byly případně vyloučeny na základě Dean-Dixonova testu (Q-test). Výsledky jsou uváděny ve tvaru medián \pm interval spolehlivosti [55]. Signifikantní změna mezi rostlinami pěstovanými v kompletním a modifikovaném Murashige-Skoogově médiu s odlišným zdrojem dusíku byly vypočteny na základě Studentova t-testu na hladině významnosti 0,05 ($\alpha = 0,05$).

K vyhodnocení experimentálních závislostí byl použit program *MS Excel 2007* a pro tvorbu grafů a statistické vyhodnocení byl využit program *SigmaPlot 11.0*.

4 Výsledky

V této práci byly charakterizovány rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR-1) pěstované v médiu s obsahem kaseinu jako jediném zdroji dusíku a porovnány s rostlinami pěstovanými v kompletním Murashige-Skoogově médiu a rostlinami se sníženým množstvím anorganického dusíku. V rostlinách byl sledován obsah proteinů, proteolytická aktivita a aktivita vybraných enzymů. V kořenech experimentálních rostlin byla provedena proteomická analýza. Vedle rostlinného materiálu byla charakterizována i příslušná kultivační média, kde byl stanoven obsah proteinů a aktivita enzymů sekretovaných kořeny rostlin.

4.1 Vzhled a růstové parametry rostlin v závislosti na dostupnosti dusíkatých látek

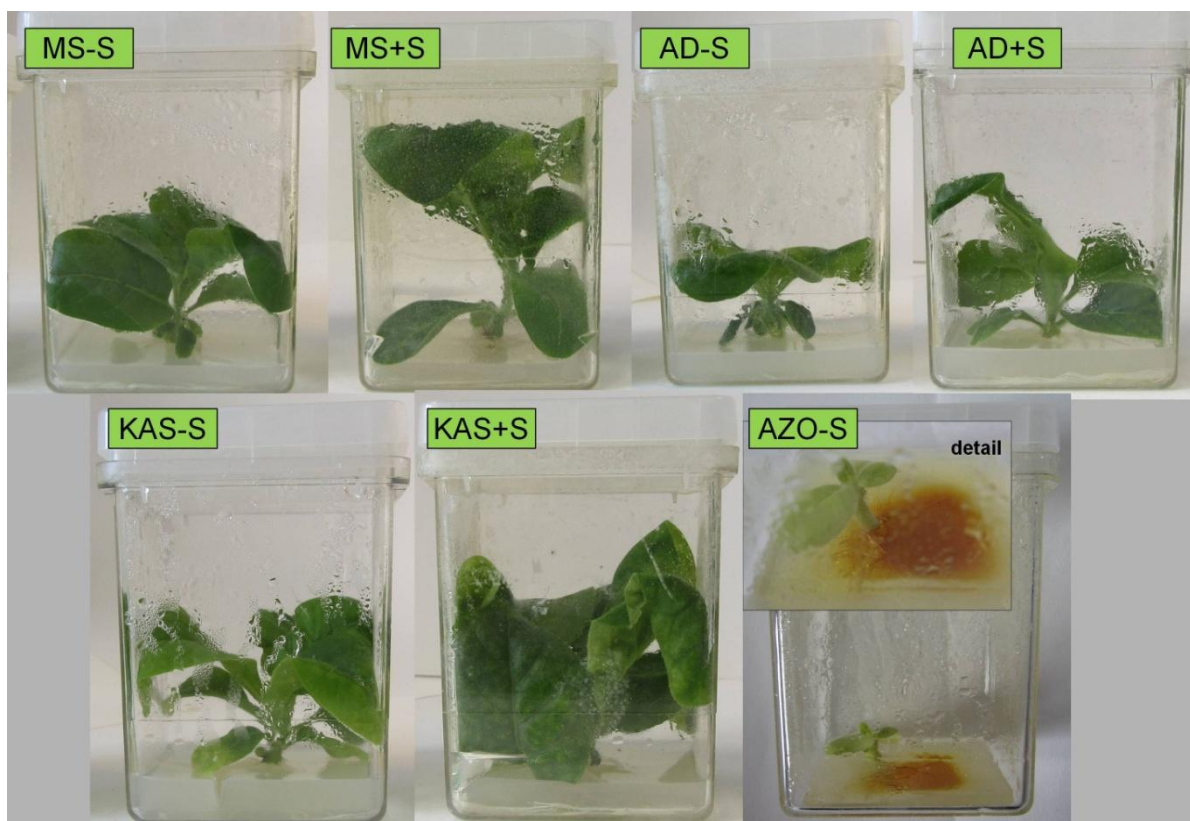
K experimentu bylo vypěstováno 76 rostlin tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR-1 *in vitro* na jaře roku 2015 (a 120 rostlin ve 2. biologickém opakování na jaře 2016), které byly rozděleny dle složení kultivačního média:

- a) kontrolní rostliny tabáku pěstované bez přítomnosti 1,5% sacharosy (MS-S)
- b) kontrolní rostliny tabáku pěstované v přítomnosti 1,5% sacharosy (MS+S)
- c) rostliny tabáku pěstované se sníženým obsahem anorganického dusíku bez přítomnosti 1,5% sacharosy (AD-S)
- d) rostliny tabáku pěstované se sníženým obsahem anorganického dusíku v přítomnosti 1,5% sacharosy (AD+S)
- e) rostliny tabáku pěstované s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku bez přítomnosti 1,5% sacharosy (KAS-S)
- f) rostliny tabáku pěstované s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku v přítomnosti 1,5% sacharosy (KAS+S)
- g) rostliny tabáku pěstované s 0,5% azokaseinem jako jediným zdrojem dusíku bez přítomnosti 1,5% sacharosy (AZO-S)

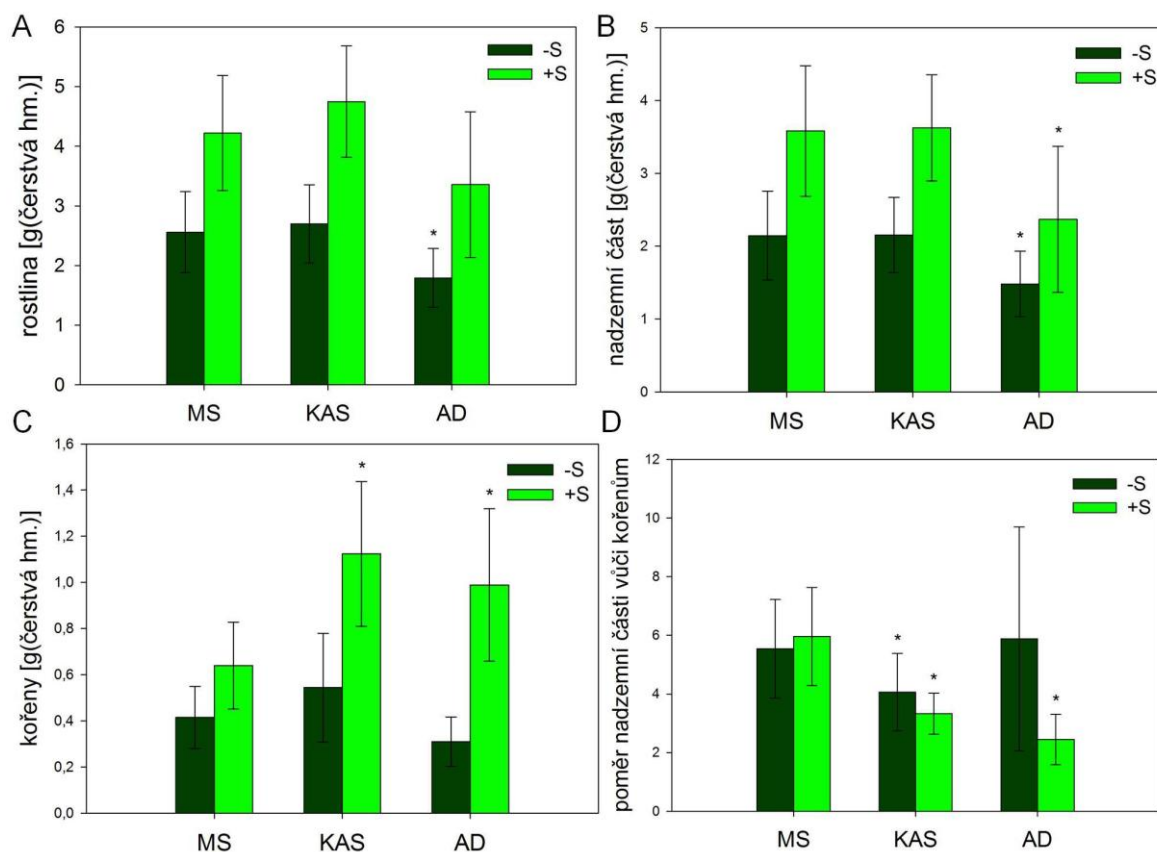
Kompletní Murashige-Skoogovo médium představuje bohatý zdroj anorganického dusíku ve formě NH_4NO_3 a KNO_3 a často se využívá k pěstování *in vitro* rostlin. V naší práci představovaly tyto rostliny skupinu kontrolních rostlin, druhou skupinou byly rostliny se sníženým obsahem anorganického dusíku, které neobsahovaly NH_4NO_3 a obsah KNO_3 byl

5× snížen oproti kompletnímu médiu. Vzhled experimentálních rostlin ukazuje, že AD rostliny byly menší než rostliny MS. Rostliny KAS byly srovnatelné s MS rostlinami, i když kasein představoval jejich jediný zdroj dusíku (obr. 4.1). Na obr. 4.1 je také zobrazena rostlina tabáku pěstovaná v prostředí azokaseinu, který se používá jako substrát pro stanovení proteolytické aktivity. Azokasein se postupně soustřeďoval do středu nádoby, kde byly kořeny rostliny, což ukazuje na metabolickou aktivitu v kultivačním médiu.

Čerstvá hmotnost kořenů, nadzemních částí a celých rostlin je uvedena v obr. 4.2, str. 49. Čerstvá hmotnost KAS rostlin byla srovnatelná s MS rostlinami. Čerstvá hmotnost kořenů v přítomnosti sacharosy byla významně vyšší v KAS a AD rostlinách vůči MS rostlinám.



Obr. 4.1: Rostliny tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. *Petit Havana SR-1*, pěstované 8 týdnů v kultivačních nádobkách s různým složením Murashige-Skoogova agaru: kontrolní rostliny (kompletní Murashige-Skoogův agar, MS), rostliny se sníženým obsahem anorganického dusíku (AD), s kaseinem (KAS) a azokaseinem (AZO) jako jediným zdrojem dusíku, buď bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S), nebo v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S).



Obr. 4.2: Charakterizace rostlin na základě čerstvé hmotnosti: hmotnost celých rostlin (A), hmotnost nadzemních částí rostlin (B), hmotnost kořenů (C), poměr čerstvé hmotnosti nadzemní části vůči kořenům (D) v jednotlivých skupinách. Rostliny byly pěstované na kompletním Murashige-Skoogově médiu (MS), nebo s různým složením kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), se sníženým obsahem anorganického dusíku (AD), a to buď bez přítomnosti (-S), nebo v přítomnosti 1,5% sacharosu. Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly s ($p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

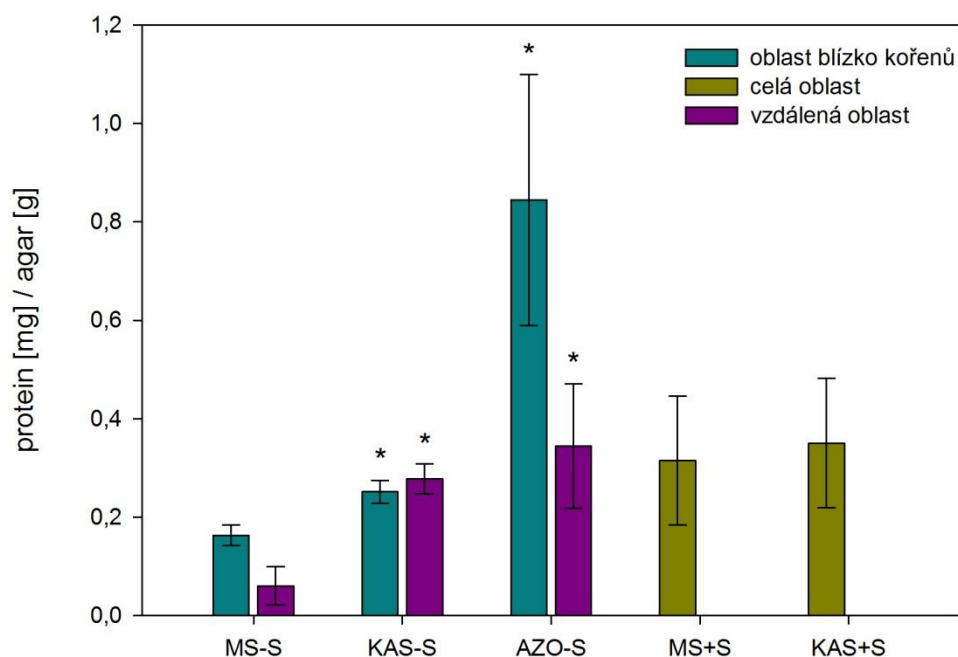
4.2 Charakterizace kultivačního média

4.2.1 Mikrobiologický test kultivačního média

Vzorky z kultivačního média experimentálních rostlin byly naneseny na agar obsahující Kingovo médium dle (kap. 3.5.1, str. 35). Po 72 hodinách v 26°C nevyrostla na Kingově médiu žádná kolonie bakterií. Kultivační médium bylo dále považováno za sterilní.

4.2.2 Obsah proteinů v kultivačním médiu.

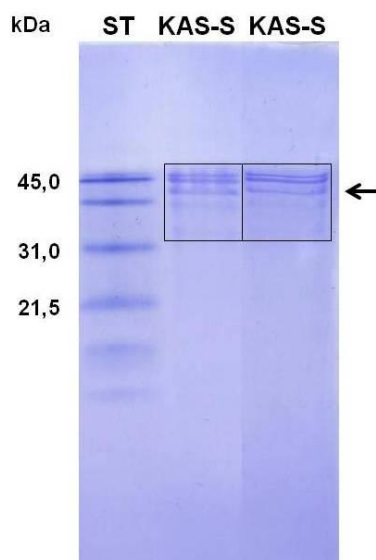
Metodou dle Lowryho bylo stanoveno množství rozpustných bílkovin v lyofilizátu kultivačního média (obr. 4.3, str. 51). V případě kultivačních médií, do kterých byl na začátku experimentu přidán kasein případně azokasein, je tedy ve stanovení celkového obsahu proteinu v lyofilizátu zahrnut i přidaný protein. Zatímco obsah kaseinu a azokaseinu byl na začátku experimentu 5 mg/g agaru, po 8 týdnech se významně snížil, a to na 0,3 mg/g v KAS rostlinách (jak v oblasti blízko kořenů, tak ve vzdálenější oblasti) a na 0,8 mg/g a 0,3 mg/g v blízké a vzdálené oblasti kořenů AZO rostlin. Z výsledků stanovení obsahu proteinů v médiu také vyplývá, že i kontrolní rostliny (MS), jejichž kultivační médium na počátku neobsahovalo žádné proteiny, musí kořeny vylučovat nějaké proteiny resp. enzymy. Zda také KAS rostliny vylučují do média proteiny, bylo studováno elektroforetickou separací lyofilizovaného média.



Obr. 4.3: Množství proteinu v kultivačním médiu. Množství proteinu je vztaženo na hmotnost kompletního resp. modifikovaného Murashige-Skoogova agaru. Obsah proteinu byl měřen v lyofilizátu agaru kontrolních rostlin (MS) pěstovaných v kompletním Murashige-Skoogově médiu a u rostlin s různým složením kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), s 0,5% azokaseinem jako jediným zdrojem dusíku (AZO), a to buď bez přítomnosti (-S), nebo v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S). Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly (s $p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

4.2.3 Separace a identifikace proteinů v kultivačním médiu

Po elektroforetické separaci v uspořádání s Tris-tricinovým pufrem (kap. 3.5.4, str. 36) bylo v lyofilizátu média oblasti blízko kořenů KAS rostlin nalezeno několik proužků odpovídajících proteinům o molekulové hmotnosti větší (okolo 45 kDa, obr. 4.4, str. 52, oblast v obdelníku) než kasein (19 - 25 kDa). Celé oblasti ze dvou drah byly z gelu vyříznuty a analyzovány hmotnostní spektrometrií (kap. 3.5.5.5, str. 40).



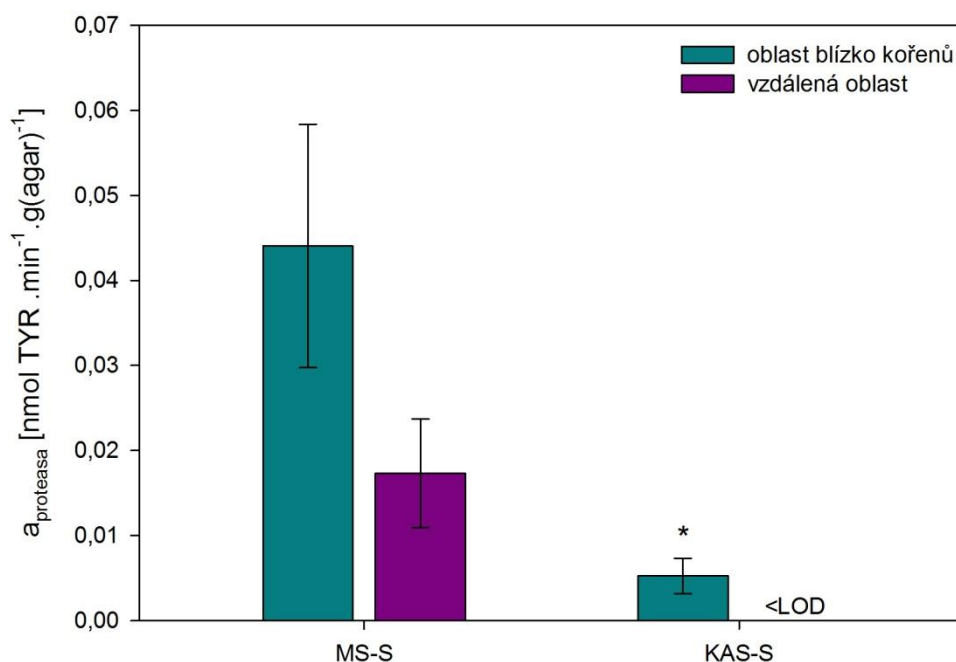
Obr. 4.4: Elektroforetická separace proteinů v kultivačním médiu. Dráha ST představuje standardní komerční směs proteinů. Obě dráhy KAS-S představují lyofilizát kultivačního média v oblasti blízko kořenů u rostlin pěstovaných s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku bez přítomnosti sacharosy. Oblast v obdelníku představuje vyříznutou oblast pro hmotnostní spektrometrii. Do jamky bylo vždy naneseno 50 μ g proteinů.

V oblasti 35 - 45 kDa gelu (obr. 4.4) v dráze lyofilizátu média oblasti blízko kořenů KAS rostlin byly identifikovány proteasy: aspartátová proteasa (nepenthesin-1), serinová proteasa (subtilisin-like) a cysteinová proteasa (kathepsin B-like). Tyto sekretované proteasy pravděpodobně mohou štěpit kasein v médiu na kratší peptidy, které pak mohou pomocí transportérů vstoupit do kořenových buněk.

4.2.4 Enzymové aktivity v kultivačním médiu

4.2.4.1 Aktivita proteas v kultivačním médiu

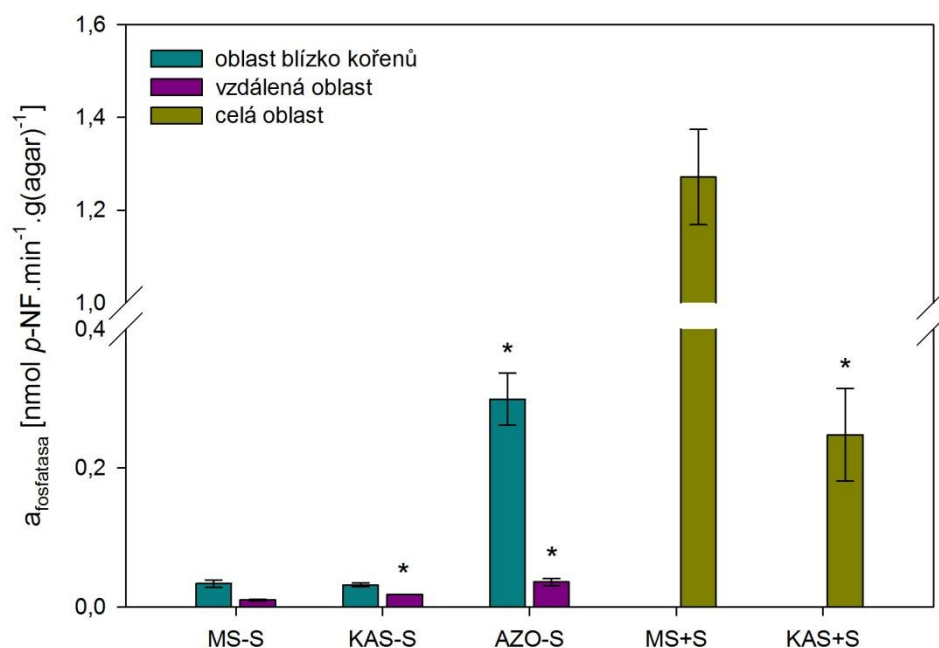
V médiu KAS rostlin byla v porovnání s médiem kontrolních MS rostlin stanovena aktivita proteas. Proteolytická aktivita byla vyšší v lyofilizátu média kontrolních MS rostlin, pěstovaných na kompletním Murashige-Skoogově médiu (obr. 4.5, obr. 53). Vyšší proteolytická aktivita látek sekretovaných kořeny MS rostlin je možná způsobena rozdílným fyziologickým stavem těchto rostlin vůči KAS rostlinám. Rostliny sekretují řadu látek konstitutivně, což je pravděpodobné i v případě proteas.



Obr. 4.5: Aktivita proteas vztážená na hmotnost kompletního resp. modifikovaného Murashige-Skoogova agaru. Aktivita proteas byla detekována v lyofilizátu agaru u kontrolních rostlin (MS) pěstovaných v kompletním Murashige-Skoogově médiu a na modifikovaném Murashige-Skoogově médiu s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), a to bez přítomnosti sacharosy (-S). Zkratka: TYR ... tyrosin, <LOD ... pod detekčním limitem. Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

4.2.4.2 Aktivita fosfatas v kultivačním médiu

Vzhledem k tomu, že kasein je protein bohatý na obsah fosfátů, byla v médiu testována také aktivita fosfatas. Aktivita kyselých fosfatů byla detekována v lyofilizátu všech kultivačních médií. Nejvyšší aktivita kyselých fosfatů mezi rostlinami pěstovanými bez sacharosy byla zjištěna v lyofilizátu kultivačního média AZO rostlin, v přítomnosti sacharosy pak u kontrolních MS rostlin (obr. 4.6, str. 54). Kultivační médium všech skupin rostlin tabáku obsahuje $1,3 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ jako zdroj fosfátů. Tato koncentrace fosfátů by měla být pro rostliny dostatečná. Vysoká aktivita v případě rostlin MS+S (obr. 4.6, str. 54) by mohla znamenat, že rostlina vyčerpala veškerý fosfát z KH_2PO_4 , a sekrecí fosfatas se rostlina snaží najít další zdroj fosfátu (fosfoprotein, kasein). Aktivity sekretovaných fosfatas v médiu KAS rostlin byly srovnatelné s MS rostlinami, což naznačuje jejich konstitutivní sekreci.

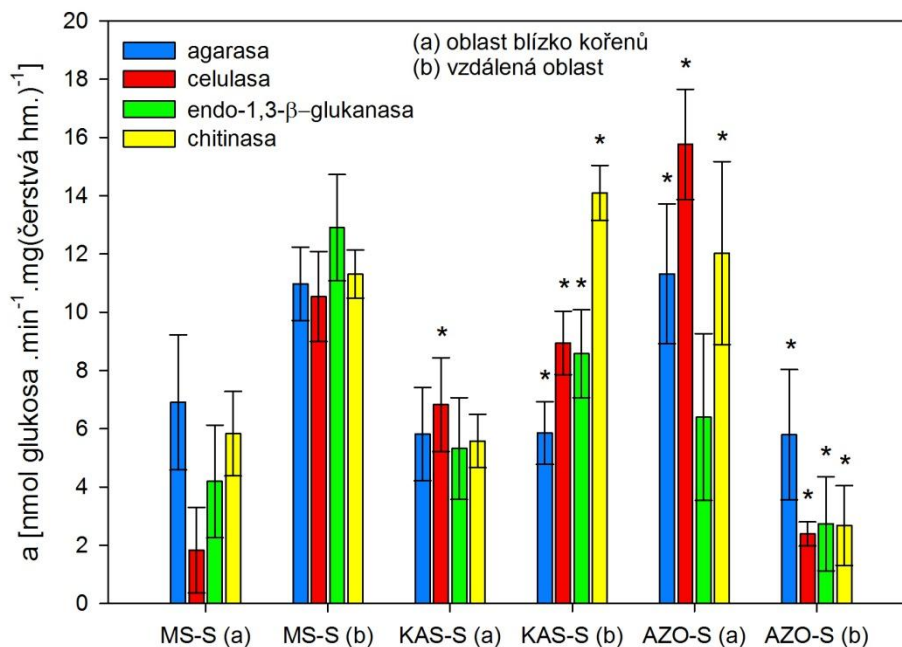


Obr. 4.6: Aktivita kyselé fosfatasy vztážená na hmotnost kompletního resp. modifikovaného Murashige-Skoogova agaru. Aktivita kyselé fosfatasy byla měřena v lyofilizátu agaru u kontrolních rostlin (MS) pěstovaných v kompletním Murashige-Skoogově médiu a u rostlin s různým složením kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), s 0,5% azokaseinem jako jediným zdrojem dusíku (AZO), a to buď bez přítomnosti (-S), nebo v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S). Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly (s $p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

4.2.4.3 Aktivita glykosidas v kultivačním médiu

Dále byla v médiu testována aktivita vybraných glykosidas (endo-1,3- β -glukanasa, chitinasa a celulasa), u kterých byl předpoklad, že by mohly být sekretovány do média kořeny rostlin. Jako možný substrát sekretovaných glykosidas (agarasy) byl rovněž testován agar. V lyofilizátu kultivačního média byla zjištěna enzymová aktivita všech vybraných glykosidas (obr. 4.7, str. 55). Sekrece různých typů glykosidas naznačuje, že rostliny jsou schopny využívat širokou škálu různých polysacharidů jako další zdroje uhlíku resp. jednoduchých sacharidů. Možnost štěpení agaru byla pozorována i v případě některých rostlin, u kterých se v průběhu kultivace významně snížil objem kultivačního média. Agar se skládá z 3,6-anhydro-L-galaktosy (nebo L-galaktosa-6-sulfátu), D-galaktosy a L-galaktosy (obvykle ve formě 3,6-anhydro-L-galaktosy nebo L-galaktosa-6-

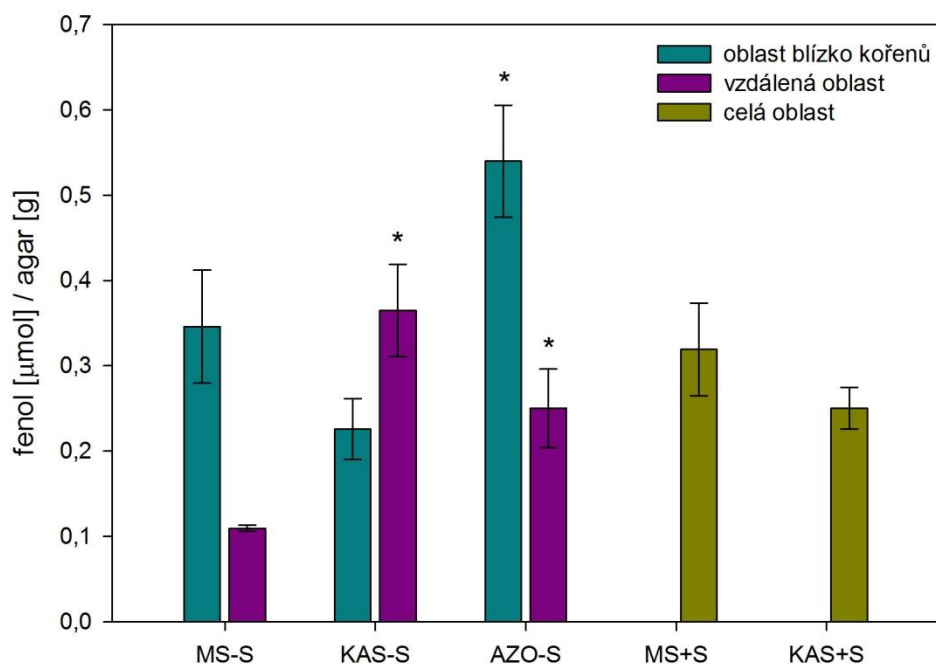
sulfátu), které jsou střídavě spojeny vazbami β -(1,4) and α -(1,3). Které vazby jsou rostlinným enzymem štěpeny, není z těchto výsledků zřejmé, a musí být tedy předmětem dalších studií.



Obr. 4.7: Aktivita glykosidas vztahovaná na hmotnost kompletního resp. modifikovaného Murashige-Skoogova agaru. Aktivita glykosidas byla měřena v lyofilizátu agaru u kontrolních rostlin (MS) pěstovaných v kompletním Murashige-Skoogově médiu a u rostlin s různým složením kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), s 0,5% azokaseinem jako jediným zdrojem dusíku (AZO), a to bez přítomnosti (-S). Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

4.2.5 Přítomnost fenolických látek v kultivačním médiu

Bylo zjištěno, že kořeny experimentálních rostlin sekretují fenolické látky, v médiu všech skupin rostlin byly přítomny (obr. 4.8, str. 56). Nejvyšší zastoupení fenolických látek bylo nalezeno blízko kořenů AZO rostlin, pak v MS-S a MS+S. V oblasti dále od kořenů byl vysoký obsah fenolických látek rovněž v médiu KAS-S rostlin - 3-krát vyšší než v médiu kontrolních MS rostlin.

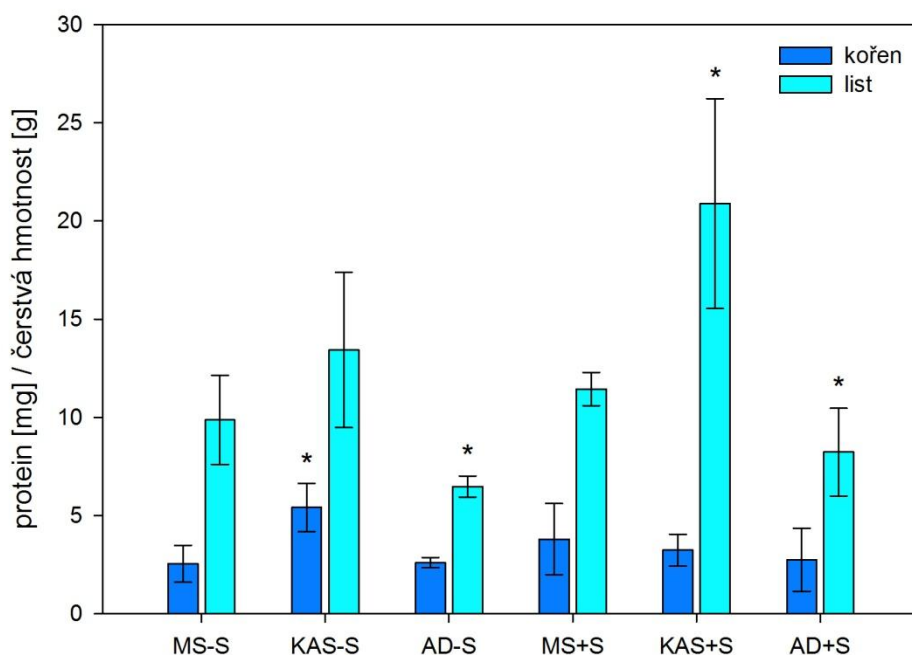


Obr. 4.8: Obsah fenolických látek v kultivačním médiu. Množství fenolických látek je vztaženo na hmotnost kompletního resp. modifikovaného Murashige-Skoogova agaru. Obsah fenolických látek byl stanoven v lyofilizátu agaru u kontrolních rostlin (MS) pěstovaných v kompletním Murashige-Skoogově médiu a u rostlin s různým složením kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), s 0,5% azokaseinem jako jediným zdrojem dusíku (AZO), a to buď bez přítomnosti (-S), nebo v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S). Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

4.3 Charakterizace rostlinného materiálu

4.3.1 Obsah proteinů v experimentálních rostlinách

Obsah proteinů v listech a kořenech experimentálních rostlin dokumentuje obr. 4.9 (str. 57). V listech byl vždy vyšší obsah proteinů než v kořenech, poměrně značné rozdíly byly i mezi jednotlivými skupinami. V kořenech rostlin byl obsah proteinů mezi všemi skupinami srovnatelný s výjimkou KAS-S rostlin, které vykazovaly obsah proteinů statisticky vyšší.

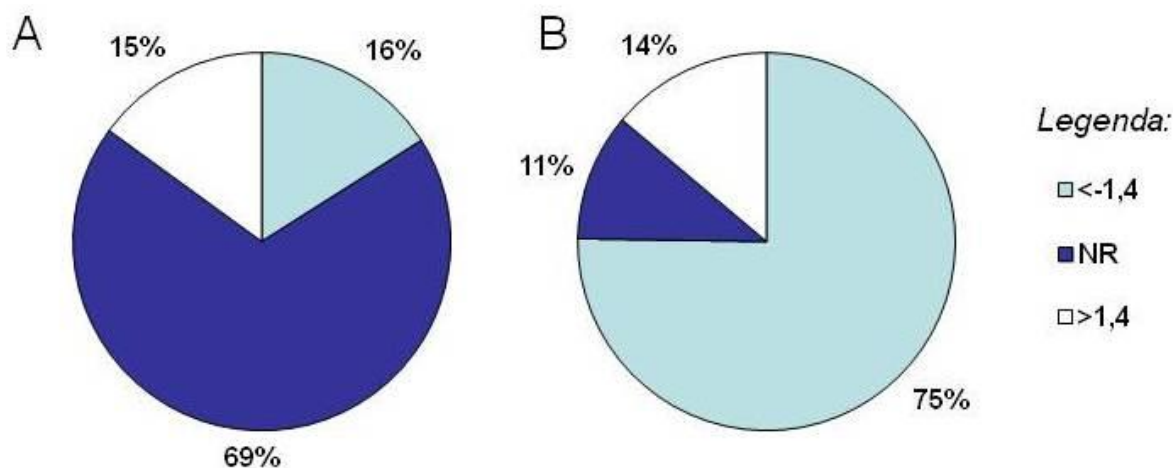


Obr. 4.9: Množství proteinů v listech a kořenech rostlin tabáku. Množství proteinu je vztaženo na čerstvou hmotnost. Obsah proteinu byl měřen v listech a v kořenech kontrolních rostlin (MS) pěstovaných na kompletním Murashige-Skoogově médiu a rostlin s různým složením kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), se sníženým obsahem anorganického dusíku (AD), a to buď bez přítomnosti (-S), nebo v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S). Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

4.3.2 Proteomická analýza kořenů experimentálních rostlin

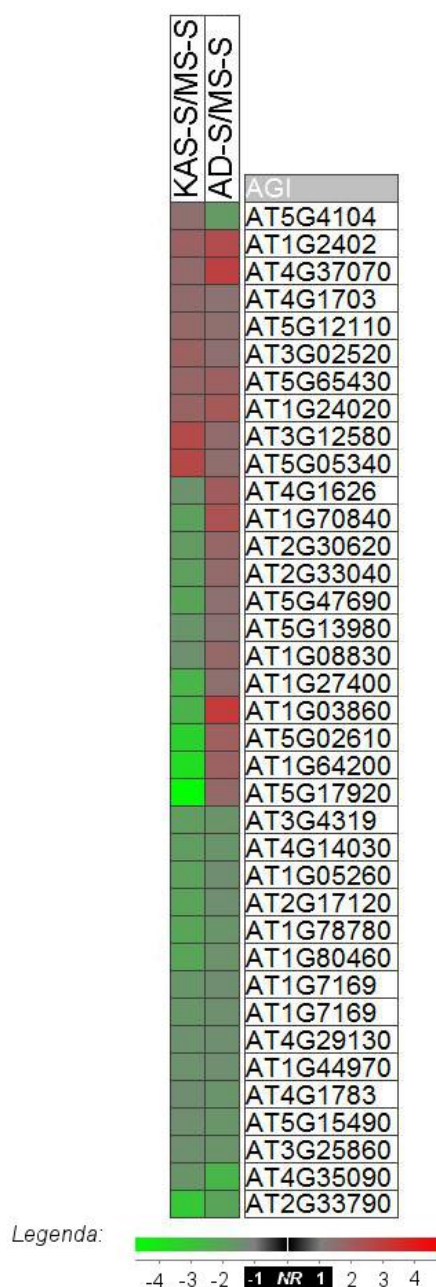
Zastoupení proteinů v kořenech experimentálních rostlin tabáku jednoho biologického opakování bylo analyzováno hmotnostní spektrometrií. V kořenech všech skupin rostlin bylo hmotnostní spektrometrií identifikováno 669 proteinů. Na základě pozorované změny v zastoupení bylo pro další analýzu vybráno 185 proteinů (obr. 4.10, str. 58; obr. P1 v příloze). Většina těchto proteinů (75 %) měla v KAS rostlinách snížený výskyt oproti kontrolním MS rostlinám. Především se jednalo o proteiny metabolismu dusíku a sacharidů. Zvýšené bylo naopak množství několika typů proteinů HSP70, některých peroxidas a kyselých fosfatasy. V případě AD-S rostlin zůstala překvapivě abundance řady proteinů nezměněna (69 %).

Ze 185 identifikovaných proteinů byly pro další vyhodnocení vybrány pouze ty proteiny, u kterých se projevila současná změna v abundanci vůči kontrolním rostlinám, a to jak v KAS rostlinách, tak v AD rostlinách. Jinými slovy, dále byly vyhodnocovány pouze proteiny, u kterých lze předpokládat, že za změnu v jejich zastoupení odpovídá odlišný zdroj dusíku v kultivačním médiu. Absolutní změna v relativním zastoupení proteinu byla uvažována větší než 1,4.



Obr. 4.10: Procentuální zastoupení proteinů dle jejich pozorované změny v abundanci. (A) AD-S/MS-S; (B) KAS-S/MS-S. Kontrolní rostliny (MS) byly pěstované v kompletním Murashige-Skoogově médiu. Rostliny (AD) byly pěstovány se sníženým obsahem anorganického dusíku a rostliny (KAS) s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku. V proteomické analýze byly použity pouze rostliny pěstované bez přítomnosti 1,5% sacharosy (-S). Zkratky: NR, není signifikantní změna.

Odpověď na modifikaci zdroje dusíku v kultivačním médiu je znázorněna v přehledu (obr. 4.11, str. 59) a tabulce 4.1 (str. 60). V tomto přehledu je z databáze převzat AGI kód, který se skládá z: AT = organismus, 1,2,3,4,5 = chromosom, G = gen, 00010 = id genu. Anotace a funkce genu jsou odvozeny na základě sekvenční homologie s *Arabidopsis thaliana* [databáze *N. tabacum* TN-90 (Solgenomics, 7/2015)]. V databázi UniProt bylo ze 36 AGI kódů určeno 29, celkem 7 AGI kódů zůstalo nepřirázeno (AT5G4104, AT1G2402, AT4G1626, AT3G4319, AT1G7169, AT4G1783, AT4G1703). Funkce jednotlivých proteinů v tabulce 4.1 (str. 60) byly vyhledány ve webové aplikaci *VirtualPlant 1.3* (<http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb/>) a databázi *UniProt* (<http://www.uniprot.org/>).



Obr. 4.11: Mapa změn v abundanci proteinů v kořenech rostlin tabáku. Rostliny byly pěstovány v kompletním Murashige-Skoogově médiu (MS), a s různým složením kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), se sníženým obsahem anorganického dusíku (AD), a to bez přítomnosti sacharosy (-S). Zelená barva představuje snížené množství proteinu v kořenech rostlin pěstovaných s odlišným zdrojem dusíku oproti kontrolním rostlinám. Naopak červená barva znamená zvýšenou abundanci proteinu oproti kontrole. Mapa změn byla vytvořena v programu J-Express. Nalezené AGI kódy identifikovaných proteinů v databázi UniProt (<http://www.uniprot.org/>) jsou uvedeny v tab. 4.1, str. 60. Zkratky: NR, není signifikantní změna.

Tab. č. 4.1: Proteiny ovlivněné změnou zdroje dusíku v kultivačním médiu, které byly identifikovány v databázi UniProt.

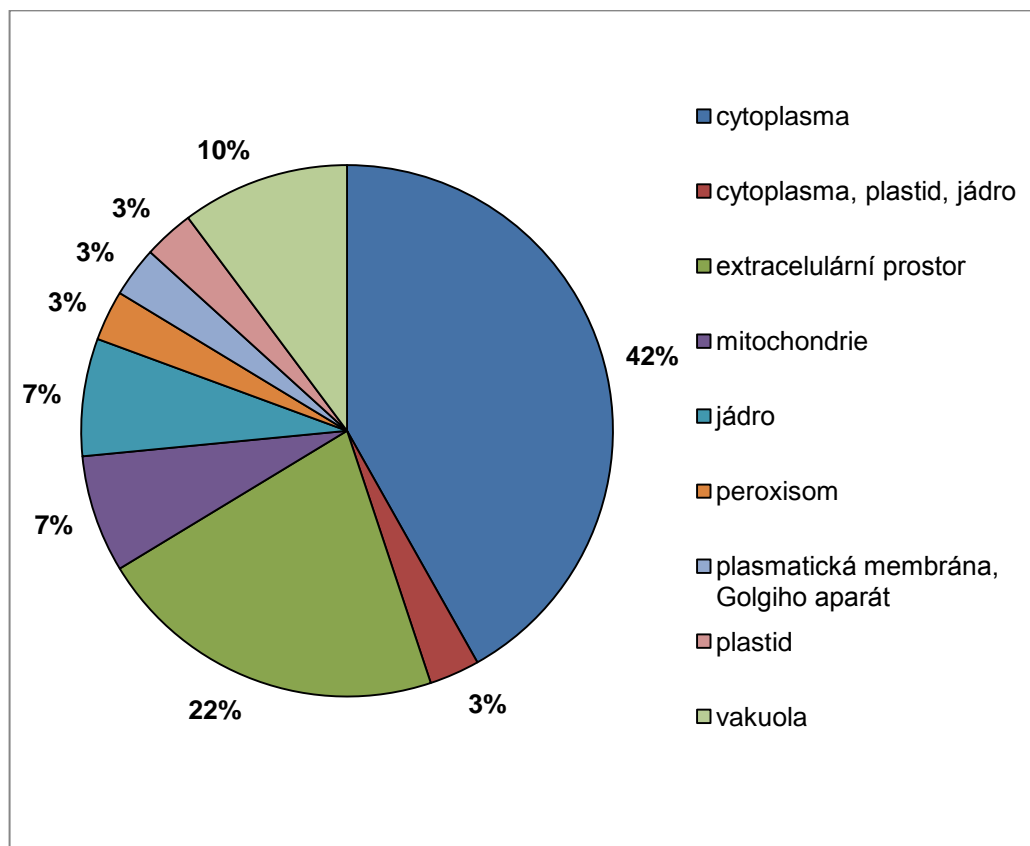
Funkce	AGI	KAS-S MS-S	AD-S MS-S	Jméno (UniProt)	EC
antioxidant activity	AT1G05260	-2	-1,4	Peroxidase	1.11.1.7
	AT4G35090	-1,7	-2,6	Catalase	1.11.1.6
	AT1G44970	-1,5	-1,4	Peroxidase	1.11.1.7
	AT1G08830	-1,5	1,7	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 1 (Copper/zinc superoxide dismutase 1)	1.15.1.1
	AT5G05340	2,6	1,5	Peroxidase 52 (Atperox P52) (ATP49)	1.11.1.7
phosphoprotein binding	AT5G65430	1,7	1,9	14-3-3-like protein GF14 kappa (General regulatory factor 8)	
	AT3G02520	1,9	1,5	14-3-3-like protein GF14 nu (General regulatory factor 7)	
nucleotide sugars metabolism	AT5G15490	-1,5	-1,6	UDP-glucose 6-dehydrogenase 3 (UDP-Glc dehydrogenase 3) (UDP-GlcDH 3) (UDPGDH 3) (At-UGD3)	1.1.1.22
proteosynthesis	AT5G02610	-3,4	1,9	60S ribosomal protein L35-4	
	AT1G27400	-2,6	1,5	60S ribosomal protein L17-1	
	AT5G12110	1,7	1,5	Elongation factor 1-beta 1 (EF-1-beta 1) (Elongation factor 1-beta' 1) (EF-1-beta' 1) (Elongation factor 1B-alpha 1) (eEF-1B alpha 1)	
	AT3G12580	2,6	1,6	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c (Heat shock 70 kDa protein 4) (Heat shock cognate 70 kDa protein 4) (Heat shock cognate protein 70-4) (AtHsc70-4) (Heat shock protein 70-4) (AtHsp70-4)	
nucleosome assembly	AT2G30620	-1,8	1,7	Histone H1.2	

Funkce	AGI	KAS-S MS-S	AD-S MS-S	Jméno (UniProt)	EC
<i>defense response</i>	AT2G17120	-2,1	-1,5	LysM domain-containing GPI-anchored protein 2 (Chitin elicitor-binding protein LYM2) (CEBiP LYM2)	
	AT1G70840	-2	2,3	MLP-like protein 31	
	AT1G24020	1,8	2,1	MLP-like protein 423	
<i>pyruvate dehydrogenase multienzyme complex</i>	AT3G25860	-1,5	-1,6	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 4 of pyruvate dehydrogenase complex, chloroplastic (Dihydrolipoamide S-acetyltransferase component 4 of pyruvate dehydrogenase complex) (Pyruvate dehydrogenase complex component E2 4) (PDC-E2 4) (PDCE2 4) (plE2)	2.3.1.12
<i>ATP hydrolysis coupled proton transport</i>	AT1G64200	-3,8	1,9	V-type proton ATPase subunit E3 (V-ATPase subunit E3) (Vacuolar H(+)-ATPase subunit E isoform 3) (Vacuolar proton pump subunit E3)	
	AT1G03860	-2,5	3	Prohibitin-2, mitochondrial (Atphb2)	
	AT2G33040	-1,9	1,6	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial (F-ATPase gamma subunit)	
<i>PR proteins</i>	AT1G78780	-2,1	-1,6	Pathogenesis-related protein (Pathogenesis-related protein-like protein)	
<i>regulation of root development</i>	AT2G33790	-3,1	-2,1	Non-classical arabinogalactan protein 30 (AtAGP30)	
	AT4G37070	1,6	2,8	Patatin-like protein 1 (AtPLP1) Patatin-related phospholipase A IIgamma) (pPLAIIg) (Phospholipase A IVA) (AtPLAIVA)	3.1.1.-

Funkce	AGI	$\frac{\text{KAS-S}}{\text{MS-S}}$	$\frac{\text{AD-S}}{\text{MS-S}}$	Jméno (UniProt)	EC
<i>glycerol kinase activity</i>	AT1G80460	-2,2	-1,5	Glycerol kinase (ATP:glycerol 3-phosphotransferase) (Protein GLYCEROL INSENSITIVE 1) (Protein NONHOST RESISTANCE TO P. S. PHASEOLICOLA 1)	2.7.1.30
<i>glucose 6-phosphate mediated process</i>	AT4G29130	-1,5	-1,4	Hexokinase-1 (Protein GLUCOSE INSENSITIVE 2)	2.7.1.1
<i>detoxification</i>	AT4G14030	-1,8	-1,6	Selenium-binding protein 1	
<i>protein glycosylation</i>	AT5G13980	-1,6	1,4	Alpha-mannosidase	3.2.1.-
<i>L-methionine biosynthesis via de novo pathway</i>	AT5G17920	-4,7	1,7	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase 1 (Cobalamin-independent methionine synthase 1) (AtMS1) (Vitamin-B12-independent methionine synthase 1)	2.1.1.14

4.3.2.1 Lokalizace proteinů ovlivněných odlišným zdrojem dusíku

Informace o lokalizaci proteinů ovlivněných odlišným zdrojem dusíku byly nalezeny v databázi SUBA3 (<http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au/>) (obr. 4.12).



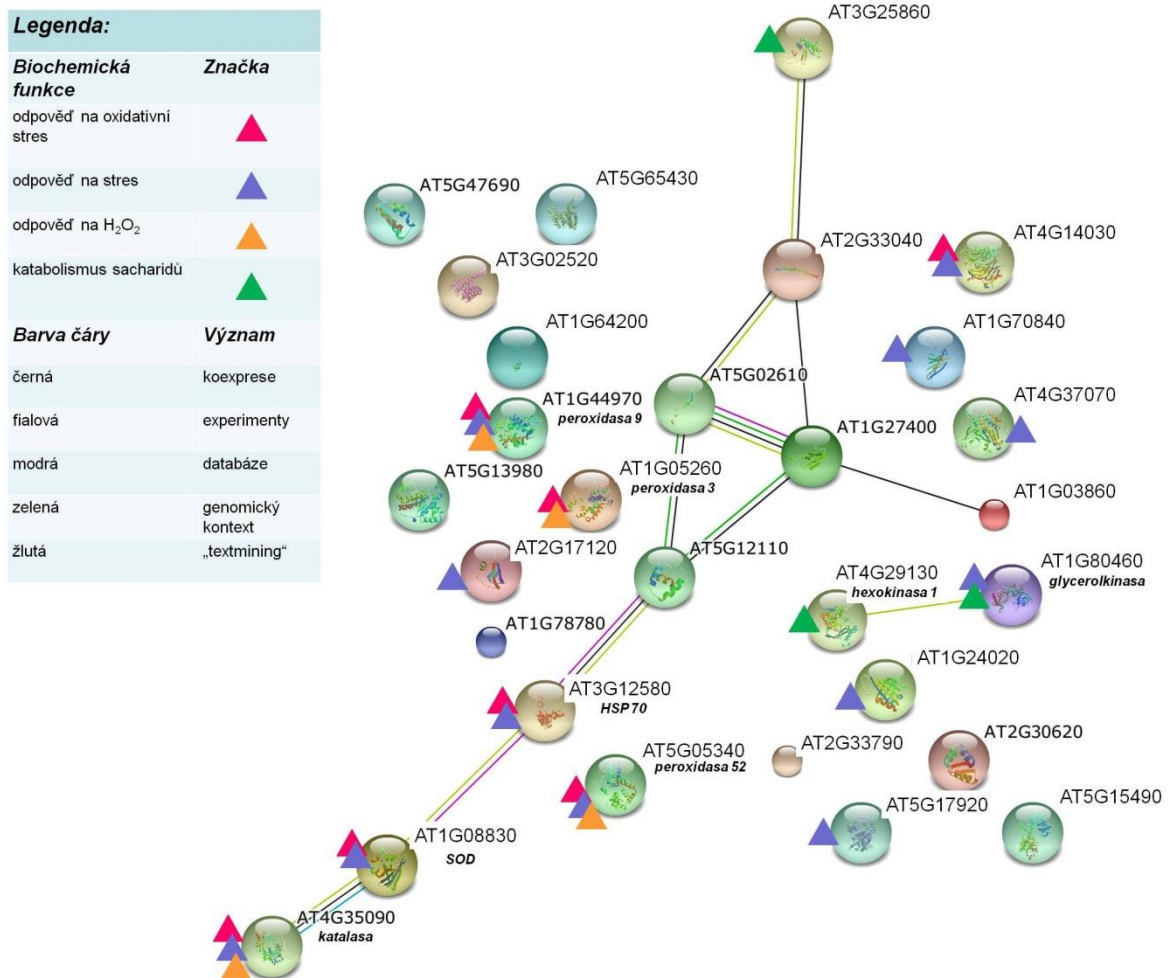
Obr. 4.12: Lokalizace identifikovaných proteinů. V grafu je znázorněno procentuální zastoupení proteinů v kořenech rostlin v jednotlivých kompartmentech. Lokalizace proteinů byla určena v online databázi SUBA3 (<http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au/>). Jedná se o predikce lokalizace ze SUBAcon.

Skoro polovina identifikovaných proteinů je lokalizována v cytoplasmě a pětina proteinů se nachází v extracelulárním prostoru.

4.3.2.2 Biochemická funkce a protein-proteinové interakce proteinů ovlivněných odlišným zdrojem dusíku

V databázi *String 10* lze získat informace o protein-proteinových interakcích zadaných proteinů na základě experimentálních dat, predikcí a publikovaných pracích atd. (obr. 4.13, str. 64). Databáze *String 10* také čerpá informace o biochemických drahách (popř. molekulárních funkcích a kompartmentaci) z dalších databází (např. KEGG, BioGRID a

další). Na obr. 4.13 jsou tedy některé proteiny rozřazeny dle jejich nalezené biochemické funkce.



Obr. 4.13: Biochemické funkce a protein-proteinové interakce proteinů ovlivněných odlišným zdrojem dusíku. Mapa protein-proteinových interakcí byla vygenerována v databázi String 10 (<http://string-db.org/>) v módu "Evidence view". Proteiny jsou pro přehlednost označeny svým AGI kódem, jehož označení odpovídá tab. 4.1, str. 60. Další informace o zobrazených proteinech v databázi String 10 jsou uvedeny v příloze (tab. P3).

Z obr. 4.13 je patrné, že v kořenech rostlin tabáku pěstovaných s proteinem (kaseinem) jako jediným zdrojem dusíku, nebo se sníženým obsahem anorganických iontů, byly nejvíce ovlivněny proteiny týkající se různých odpovědí na stres (např. katalasa, peroxidasa).

4.3.2.3 Enzymy podílející se na metabolismu dusíku, aminokyselin a proteinů

Nalezené enzymy podílející se na metabolismu dusíku, aminokyselin a proteinů jsou shrnuty v tab. č. 4.2.

Tab. č. 4.2: Enzymy zahrnuté v metabolismu dusíku, aminokyselin a proteinů.

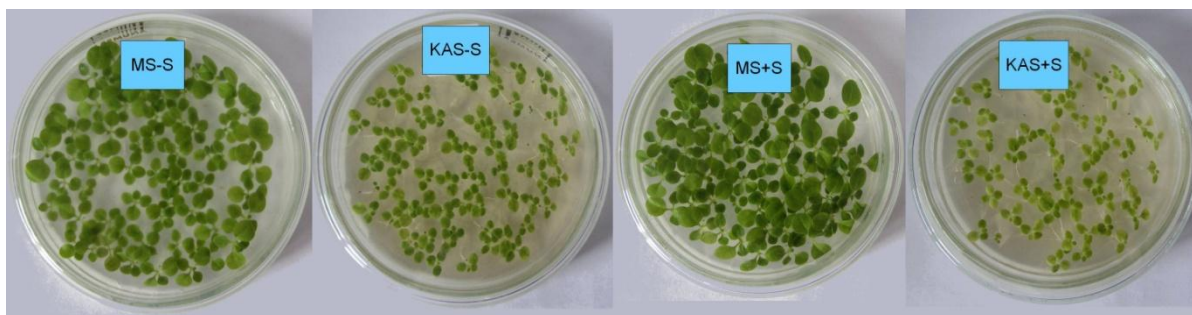
AGI	$\frac{\text{KAS-S}}{\text{MS-S}}$	$\frac{\text{AD-S}}{\text{MS-S}}$	Jméno (UniProt)	EC
AT5G37600	-2	1	glutaminsynthetasa, isoforma GS1, cytoplasma	6.3.1.2
AT1G78380	-2	1	glutathion-S-transferasa U19	2.5.1.18
AT5G07030	1	-1,6	rodina aspartátových proteas	3.4.-.-
AT1G72330	-1,8	1	alaninaminottransferasa 2, mitochondrie	2.6.1.2
AT5G11520	-1,4	1	aspartátaminottransferasa 3, chloroplast	2.6.1.1
AT1G66200	-2,1	1	glutaminsynthetasa, isoforma GS2, cytoplasma	6.3.1.2
AT2G15620	-1,7	1	nitritreduktasa	1.7.7.1
AT5G04140	-1,4	1	glutamátsynthasa 1, chloroplast/mitochondrie	1.4.7.1
AT5G17920	-2,7	1	5- methyltetrahydropteroyltriglutamát- homocystein-S-methyltransferasa 1	2.1.1.14
AT4G30920	-1,6	1	leucinaminopeptidasa 3, chloroplast	3.4.11.1

Rostliny byly pěstovány v kompletním Murashige-Skoogově médiu (MS), a s různým složením kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), se sníženým obsahem anorganického dusíku (AD), a to bez přítomnosti sacharosy (-S).

Z tabulky 4.2 je patrné, že zastoupení enzymů týkajících se metabolismu anorganické formy dusíku (popř. aminokyselin) je v KAS-S rostlinách nižší oproti kontrolním MS-S rostlinám. V AD-S zůstala většina těchto enzymů nezměněna.

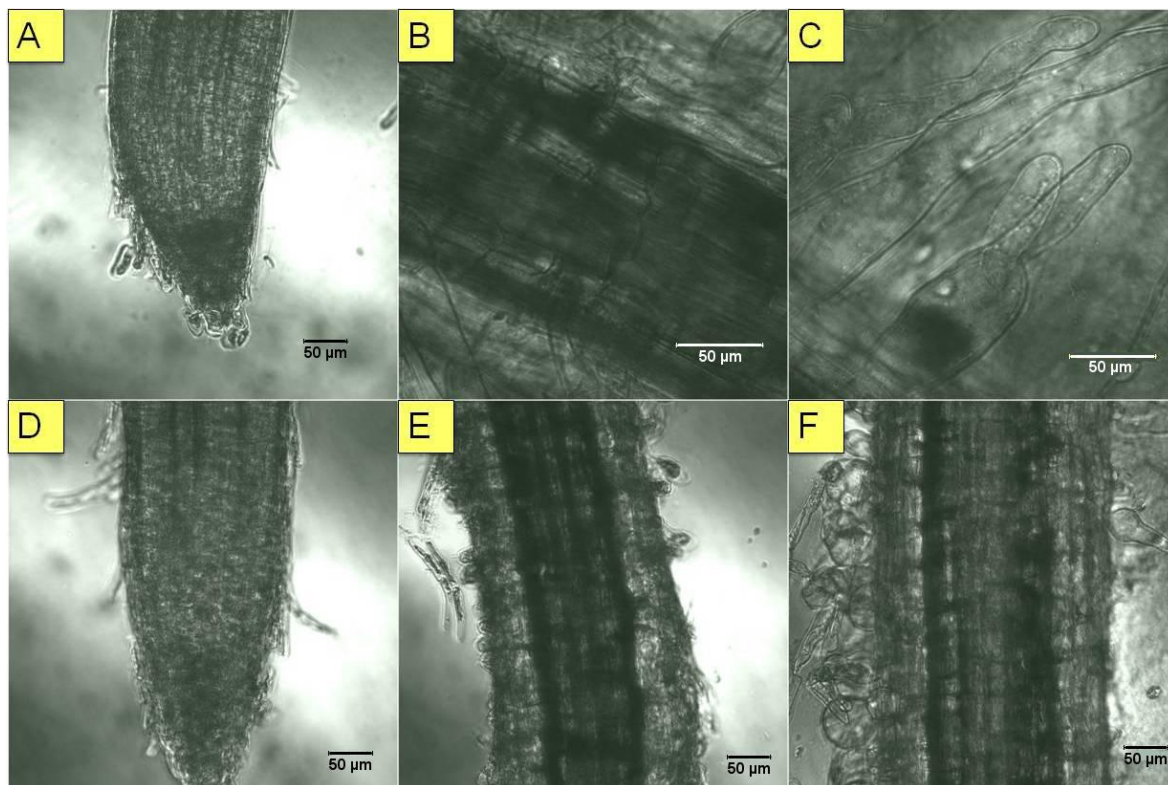
4.3.3 Proteolytická aktivita v kořenech experimentálních rostlin

Pro stanovení proteolytické aktivity v rostlinném materiálu byla testována jednak metoda hydrolýzy kaseinu, jednak metoda s barevným substrátem azokaseinem. Obě metody nebyly pro stanovení proteolytické aktivity v listech a kořenech dostatečně citlivé, a proto byla proteolytická aktivita měřena přímo inkubací rostlin resp. jejich kořenů v roztoku konjugátu kasein-fluorescein. V případě proteolytické aktivity dochází k odštěpení fluoresceinu popř. peptidů s navázaným fluoresceinem a lze detekovat fluorescenci. Na obr. 4.14 je uveden vzhled rostlin tabáku pěstovaných *in vitro* v kompletním nebo modifikovaném Murashige-Skoogově médiu po 3 týdnech kultivace. Po uplynutí této kultivační doby byly rostliny tabáku přeneseny ve flow-boxu buď do 50 µg/ml roztoku konjugátu kasein-fluorescein, nebo do sterilní vody na 24 hod.

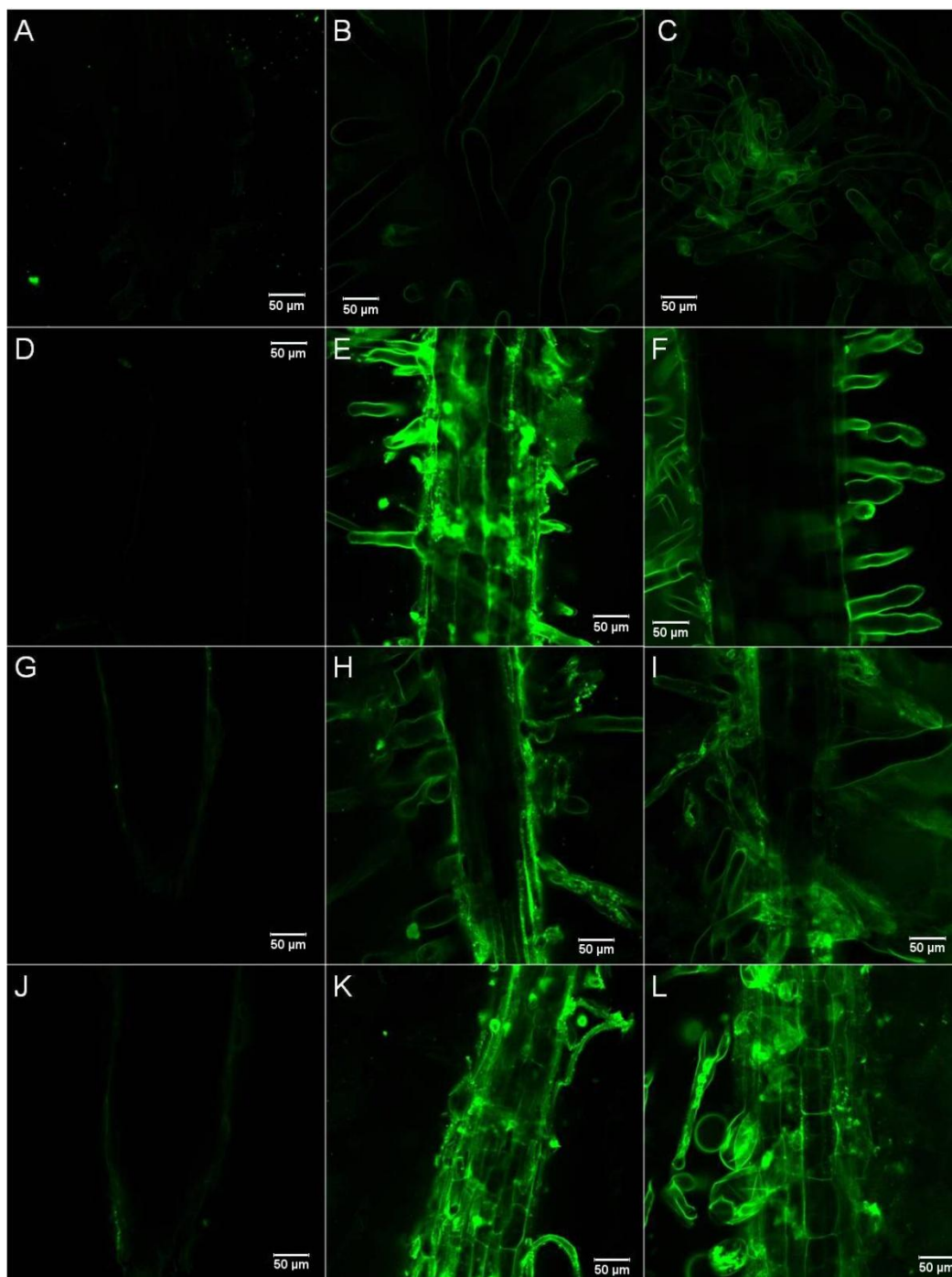


Obr. 4.14: Vzhled rostlin tabáku po 3 týdnech pěstování *in vitro*, které byly následně použity k inkubaci v roztoku konjugátu kasein-fluorescein. Zkratky: MS, kompletní Murashige-Skoogovo médium; KAS, modifikované Murashige-Skoogovo médium s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku; +S, v přítomnosti 1,5% sacharosu, -S, bez přítomnosti 1,5% sacharosu.

Po 24-hodinové inkubaci experimentálních rostlin v roztoku konjugátu kasein-fluorescein (popř. sterilní vodě) byly kořeny analyzovány konfokálním mikroskopem. Kořeny byly při snímání konfokálním mikroskopem rozděleny na pomyslné 3 části. První část představuje kořenovou špičku, druhá část je těsně nad ní a třetí část je nejvzdálenější od kořenové špičky (obr. 4.15, str. 67; obr. 4.16, str. 68). V kořenech rostlin, které byly inkubovány ve sterilní vodě, nebyla detekována žádná fluorescence látek přirozeně se vyskytujících v kořenu, která by ovlivňovala stanovení v roztoku konjugátu kasein-fluorescein.



Obr. 4.15: Snímky kořenů experimentálních rostlin z konfokálního mikroskopu. Rostliny byly 3 týdny pěstovány v kompletním Murashige-Skoogově médiu v přítomnosti sacharosu (A, B, C) a v modifikovaném Murashige-Skoogově médiu s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (D, E, F). Po 24 hod inkubaci v roztoku 50 µg/ml konjugátu kasein-fluorescein byly jejich kořeny analyzovány konfokálním mikroskopem (Zeiss LSM 510 META). Kořeny byly rozděleny na 3 pomyslné části: kořenová špička (A, D); druhá část (B, E) a třetí část (C, F).

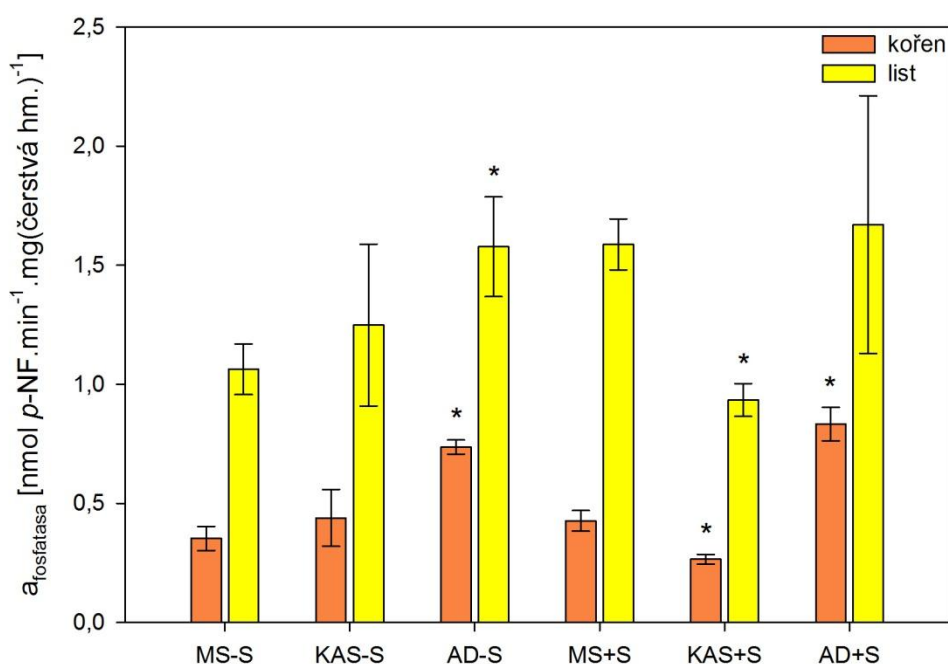


Obr. 4.16: Detekce fluorescence po 24 hod inkubaci v roztoku konjugátu kasein-fluorescein. Rostliny byly 3 týdny pěstovány v kompletním nebo modifikovaném Murashige-Skoogově médiu (kap. 3.5.7, str. 43). Po 24 hod inkubaci v 50 µg/ml roztoku konjugátu kasein-fluorescein byly jejich kořeny analyzovány konfokálním mikroskopem (Zeiss LSM 510 META). Kořeny rostlin jednotlivých skupin: MS-S (A, B, C); KAS-S (D, E, F); MS+S (G, H, I) a KAS+S (J, K, L). Kořeny byly rozděleny na pomyslné 3 části: kořenová špička (A, D, G, J); druhá část (B, E, H, K); třetí část kořenu (C, F, I, L).

Téměř žádná fluorescence nebyla pozorována v oblasti kořenové špičky v porovnání s ostatními částmi kořene ve všech skupinách rostlin. Největší oblasti fluorescence byly nalezeny v kořenových vláskách. Fluorescence byla dále pozorována převážně v buněčné stěně, a také na povrchu kořenových buněk. Proteolytická aktivita se zdá být vyšší v případě rostlin KAS než kontrolních MS rostlin. K proteolýze konjugátu kasein-fluorescein může docházet, jak extracelulárně, kdy do kořenů vstoupí uvolněné fluoreskující peptidy s fluoresceinem, tak v povrchových buňkách nebo v apoplastu (obr. 4.16, str. 68).

4.3.4 Aktivita fosfatas v experimentálních rostlinách

V kořenech i listech experimentálních rostlin byla zjišťována aktivita kyselých fosfatasy. Tato aktivita byla vyšší v listech než v kořenech, přičemž v nepřítomnosti sacharosu byla aktivita v KAS rostlinách srovnatelná s kontrolními MS rostlinami. V AD-S rostlinách byla aktivita kyselých fosfatasy dokonce vyšší než v kontrolních rostlinách, a to jak v listech, tak v kořenech. Podobný trend byl zaznamenán i v AD+S rostlinách. Přítomnost sacharosu v médiu KAS+S rostlin se naopak projevila snížením aktivity kyselých fosfatasy jak v listech, tak v kořenech (obr. 4.17).

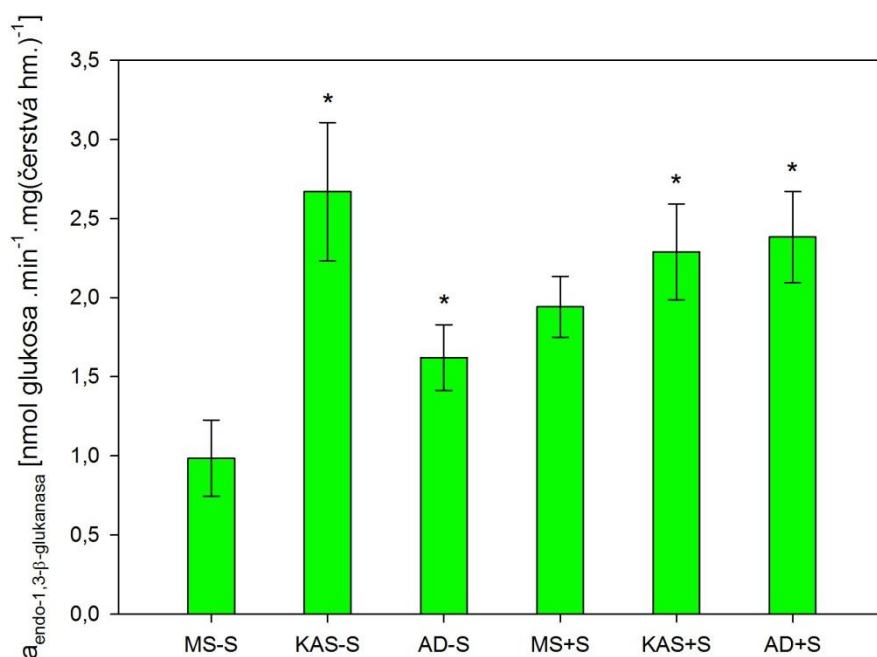


Obr. 4.17: Aktivita kyselých fosfatasy vztážená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu. Aktivita kyselých fosfatasy byla měřena v listech a v kořenech kontrolních rostlin (MS) pěstovaných v kompletním Murashige-Skoogově médiu a rostlin s různým složením

kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), se sníženým obsahem anorganického dusíku (AD), a to buď bez přítomnosti (-S), nebo v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S). Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

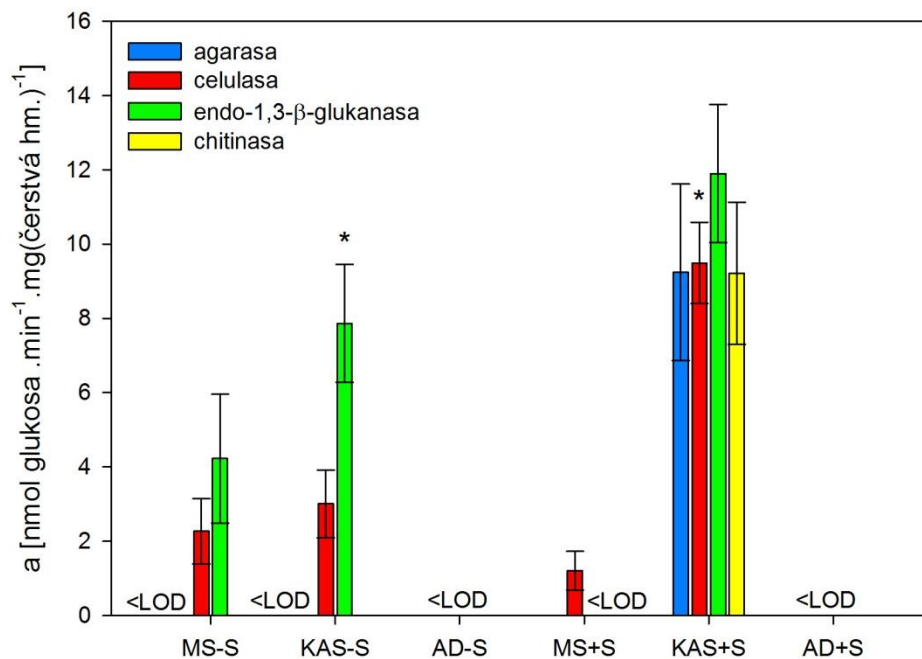
4.3.5 Aktivita glykosidas v experimentálních rostlinách

V kořenech rostlin všech skupin byla zjištěna pouze aktivita endo-1,3- β -glukanasy narozdíl od lyofilizátu kultivačního média, kde byla detekována aktivita i dalších testovaných glykosidas (chitinasy, celulasy a agarasy) (kap. 4.2.4.3, str. 54). Nejvyšší aktivita endo-1,3- β -glukanasy byla stanovena v kořenech KAS-S rostlin. Statisticky významně vyšší aktivita endo-1,3- β -glukanasy byla oproti příslušným kontrolním MS rostlinám zaznamenána i v ostatních rostlinách se změněným zdrojem dusíku (KAS+S, AD-S, AD+S) (obr. 4.18).



Obr. 4.18: Aktivita endo-1,3- β -glukanasy v kořenech rostlin vztážená na čerstvou hmotnost kořenů. Aktivita vůči substrátu laminarinu byla měřena v kořenech kontrolních rostlin (MS) pěstovaných v kompletním Murashige-Skoogově médiu a rostlin s různým složením kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), se sníženým obsahem anorganického dusíku (AD), a to buď bez přítomnosti (-S), nebo v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S). Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

V listech byla zjištěna aktivita endo-1,3- β -glukanasy pouze v rostlinách MS-S, KAS-S a KAS+S. V KAS+S rostlinách byla dokonce stanovena aktivita vůči všem testovaným substrátům (agar, methylcelulosa, laminarin a chitin), (obr. 4.19). V těchto rostlinách měla také nejvyšší aktivitu celulasa, která byla přítomná též v listech KAS-S, MS-S a MS+S. V AD rostlinách nebyla nalezena aktivita žádné ze studovaných glykosidas (obr. 4.19).

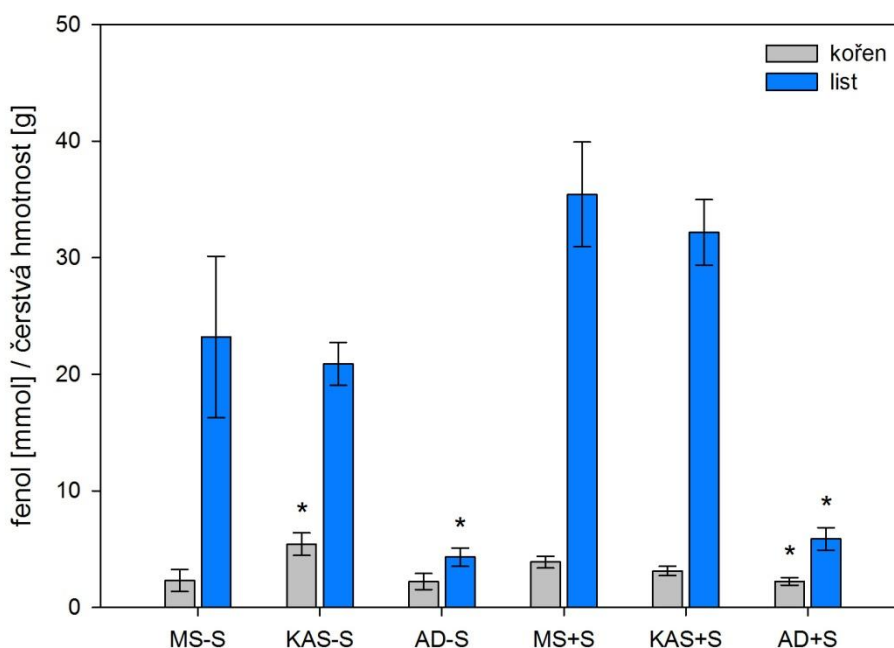


Obr. 4.19: Aktivita glykosidas v listech rostlin vztažená na čerstvou hmotnost listů. Aktivita byla měřena v listech kontrolních rostlin (MS) pěstovaných v kompletním Murashige-Skoogově médiu a rostlin s různým složením kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), se sníženým obsahem anorganického dusíku (AD), a to buď bez přítomnosti (-S), nebo v přítomnosti 1,5% sacharosy (+S). Zkratka: <LOD, pod detekčním limitem. Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

4.3.6 Přítomnost fenolických látek v experimentálních rostlinách

V souvislosti s možnou syntézou antioxidantních látek fenyylpropanoidní dráhou v rámci odpovědi na stres způsobený modifikací zdroje dusíku byl v listech a kořenech sledován obsah fenolických látek. Nejvyšší obsah fenolických látek byl zjištěn v listech kontrolních MS rostlin, v případě kořenů se jednalo o rostliny KAS-S. V listech byl obsah fenolických

látek přibližně desetkrát větší než v kořenech. V AD rostlinách došlo naopak ke statisticky významnému snížení obsahu fenolických látek (obr. 4.20).

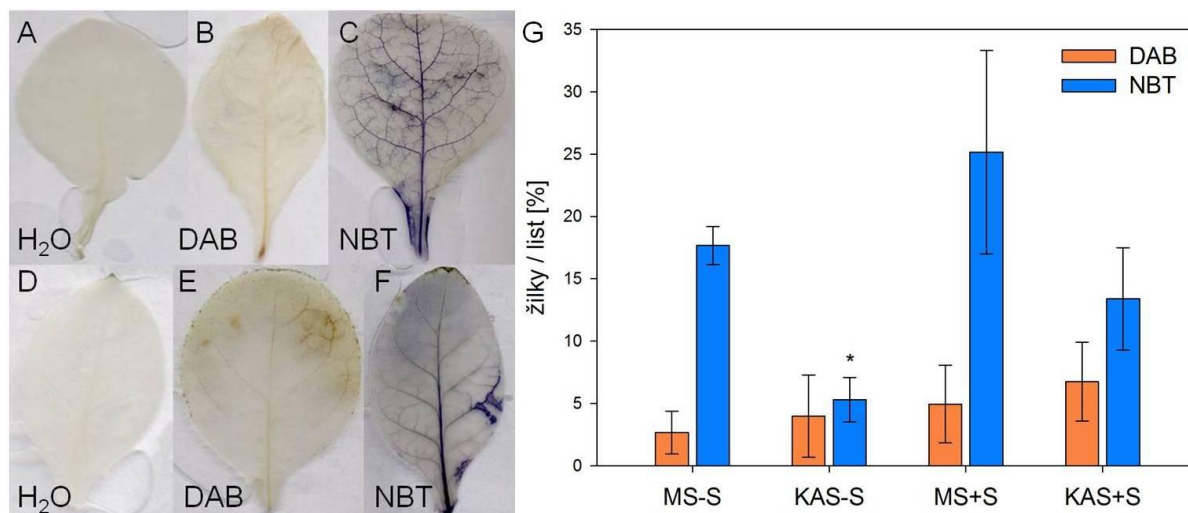


Obr. 4.20: Obsah fenolických látek v listech a kořenech rostlin tabáku. Množství fenolických látek je vztaženo na čerstvou hmotnost. Obsah fenolických látek byl měřen v listech a v kořenech kontrolních rostlin (MS) pěstovaných v kompletním Murashige-Skoogově médiu a rostlin s různým složením kultivačního média: s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS), se sníženým obsahem anorganického dusíku (AD), a to buď bez přítomnosti (-S), nebo v přítomnosti 1,5% sacharosu (+S). Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

4.3.7 Detekce reaktivních forem kyslíku v listech experimentálních rostlin

Zda jsou rostliny vystavené modifikovanému zdroji dusíku vystaveny stresu, bylo studováno také detekcí reaktivních forem kyslíku (superoxidového radikálu a peroxidu vodíku) v listech. Detekce peroxidu vodíku roztokem DAB a produkce superoxidu roztokem NBT byla provedena *in vivo* infiltrační technikou. Listy rostlin všech experimentálních skupin inkubované v roztoku NBT měly výrazněji zbarvené žilky, než při inkubaci v roztoku DAB. Žilky listů inkubovaných v destilované vodě nebyly nijak zbarvené (obr. 4.21, str. 73). Vyhodnocení experimentu spočívá v porovnání povrchu

zbarvené plochy žilek vůči celému povrchu listu (obr. 4.21). Plochy žilek a listů byly spočítány v programu *ImageJ*.

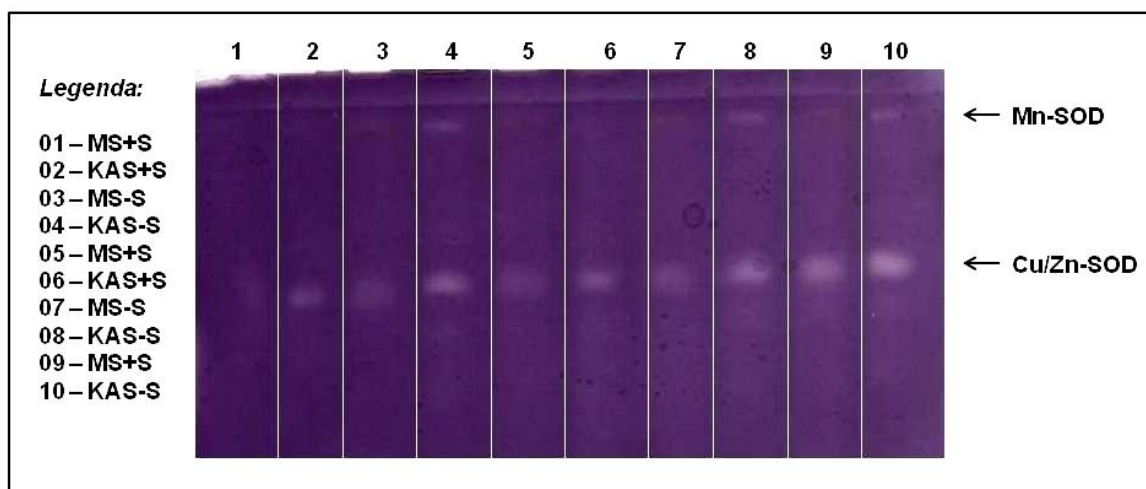


Obr. 4.21: Vizualizace H_2O_2 a produkce O_2^- po 2 hodinové inkubaci v roztoku DAB nebo NBT. Listy rostlin jednotlivých skupin: MS+S (A, B, C); KAS+S (D, E, F); destil. voda (A, B); DAB (B, E); NBT (C, F). V grafu je uveden poměr povrchu žilek vůči ploše listu (G). Zkratky: MS, kompletní Murashige-Skoogovo médium; KAS, modifikované Murashige-Skoogovo médium s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku; -S, bez přítomnosti 1,5 % sacharosy; +S, v přítomnosti 1,5% sacharosy. Symboly * ukazují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi rostlinami se změněným zdrojem dusíku a příslušnou kontrolou (MS).

Množství peroxidu vodíku bylo v KAS rostlinách srovnatelné s kontrolními MS rostlinami. V listech kontrolních MS rostlin byla detekována vyšší produkce superoxidového radikálu než v listech KAS rostlin. Tento výsledek je ve shodě s vyšším obsahem fenolických látek v kontrolních MS rostlinách (obr. 4.20, str. 72).

4.3.8 Aktivita superoxiddismutasy v listech experimentálních rostlin

Pomocí nativní elektroforetické separace extraktů listů experimentálních rostlin s následnou specifickou detekcí aktivity byla v jednotlivých skupinách zjištěna nejen aktivita, ale i zastoupení isoform antioxidantního enzymu SOD. Ve vyšších rostlinách se mohou vyskytovat 3 isoformy SOD: Mn-SOD, Fe-SOD a Cu/Zn-SOD. Isoforma Fe-SOD nebyla v listech rostlin tabáku detekována. Zároveň isoforma Mn-SOD byla detekována pouze v listech rostlin KAS-S. Isoforma Cu/Zn-SOD byla detekována v listech MS i KAS rostlin (obr. 4.22).



Obr. 4.22: Stanovení celkové aktivity superoxiddismutasy a detekce isoform po nativní elektroforéze v 10% polyakrylamidovém gelu. Do každé dráhy byl nanesen příslušný objem extraktu z listů, který vždy obsahoval 25 μg proteinů. Zkratky: MS, kompletní Murashige-Skoogovo médium; KAS, modifikované Murashige-Skoogovo médium s 0,5% kaseinem jako jediným zdrojem dusíku; -S, bez přítomnosti 1,5 % sacharosy; +S, v přítomnosti 1,5% sacharosy.

5 Diskuze

Až do nedávna převažoval názor, že organické sloučeniny musí být nejdříve degradovány půdními mikroorganismy na aminokyseliny, resp. hlavně na anorganické ionty (NO_3^- , NH_4^+) než mohou být absorbovány kořeny rostlin a dále využity v metabolismu rostlin. V současné době se však pohled na spektrum zdrojů dusíku pro rostliny začíná měnit [22, 25]. Kromě aminokyselin a oligopeptidů, také peptidy a proteiny jako kasein, BSA, nebo zelený fluorescenční protein (GFP) umožnily růst rostlin ve sterilním médiu bez přítomnosti symbiotických bakterií, kde představovaly jediný zdroj dusíku. Pšenice, australský keř *Hakea actites*, a *Arabidopsis thaliana* byly schopné sekretovat proteasy, inkorporovat proteiny, a využít je jako zdroj dusíku [22, 25, 56, 57]. Byly navrženy dva mechanismy asimilace dusíku z proteinů: i) exudace proteolytických enzymů z kořenů a zpracování exogenních proteinů, a ii) endocytóza [22, 23]. Zatím však stále chybí biochemický pohled na metabolismus rostlin, které jsou závislé pouze na proteinech jako jediném zdroji dusíku.

Naše experimenty prokázaly, že rostliny tabáku jsou schopné růst za sterilních podmínek *in vitro* v médiu, kde je jediným zdrojem dusíku protein (obr. 4.1, str. 48; [58]). V souladu s dříve publikovanými modelovými systémy [22], bylo zjištěno, že kasein nepodpořil růst rostlin do stejné míry jako anorganické formy dusíku. Růst tabáku v 0,5% kaseinu (KAS) byl srovnatelný s rostlinami pěstovanými v kompletním Murashige-Skoogově médiu (MS, tzv. kontrolní rostliny) (obr. 4.1, str. 48), přičemž celkové množství dusíku v MS a KAS bylo srovnatelné (resp. 0,84 a 1 g(dusíku).l⁻¹) a vyšší než v AD (0,05 g(dusíku).l⁻¹). Na druhé straně, Adamczyk et al. zjistil, že pšenice prokázala větší čerstvou hmotnost v přítomnosti 0,01 - 1 % kaseinu v porovnání s rostlinami pěstovanými v kompletním Murashige-Skoogově médiu [25]. Předpokládá se, že schopnost využití proteinů je silně ovlivněna jak dostupností anorganického dusíku v půdě, tak aktivitou sekretovaných proteas kořeny závisující na konkrétním druhu rostliny [23, 59]. Základní Murashige-Skoogovo médium obsahuje vyšší koncentraci anorganického dusíku, než která je běžně dostupná v přírodních podmínkách, což pravděpodobně stimuluje rychlý růst rostlin. Sacharosa patří mezi běžné komponenty *in vitro* rostlinného kultivačního média, ačkoli byly pozorovány její různé pozitivní i negativní efekty [60]. V této práci sacharosa jako možný dodatečný zdroj uhlíku pozitivně ovlivnila růst rostlin v kompletním i

modifikovaném Murashige-Skoogově médiu (obr. 4.2, str. 49). Rostliny tabáku pěstované v prostředí kaseinu měly srovnatelné fotosyntetické parametry jako je účinnost PS II, maximální účinnost PS II, fotochemické a nefotochemické zhášení. V případě fotosyntetických parametrů měla přítomnost sacharosy spíše negativní vliv na rozdíl od MS+S rostlin [58].

V této práci byly studovány proteiny a enzymové aktivity v listech a kořenech rostlin i v kultivačním médiu s cílem objasnit mechanismus příjmu dusíku z proteinu kořeny rostlin tabáku. Rozdíly v zastoupení proteinů kořenů KAS oproti kontrolním MS rostlinám byly studovány proteomickou analýzou. Hmotnostní spektrometrií bylo v kořenech tabáku identifikováno 669 proteinů, z nichž dále bylo analyzováno 185 proteinů (obr. 4.10, str. 58; obr. P1, v příloze). Bylo zjištěno, že většina proteinů kořenů KAS rostlin (75%) měla snížený výskyt oproti kontrolním MS rostlinám včetně některých proteinů metabolismu dusíku a sacharidů, což pravděpodobně odpovídá snížené dostupnosti dusíku. V kořenech rostlin tabáku byl hmotnostní spektrometrií např. zjištěn snížený obsah proteinů (enzymů) GS, NiR a GOGAT v KAS rostlinách. Snížená aktivita GS a NR byla již dříve zjištěna v naší laboratoři [58]. Mezi 14% proteinů jejichž zastoupení bylo v KAS rostlinách zvýšeno byly i proteiny spojené se stresem jako jsou např. proteiny teplotního šoku, několik typů HSP70, které doprovází nejen teplotní stres, ale také většinu abiotických stresů včetně nedostatku živin (kap. 4.3.2, str. 57).

Stanovení celkových rozpustných proteinů překvapivě ukázalo, že nejvíce proteinů obsahovaly listy rostlin pěstovaných s kaseinem jako jediným zdrojem dusíku (KAS+S i KAS-S) (obr. 4.9, str. 57). Z tohoto výsledku vyplývá, že přestože rostlina neměla k dispozici anorganickou formu dusíku, syntetizovala proteiny a pravděpodobně musela využít protein v kultivačním médiu jako zdroj dusíku. Tomu také odpovídá úbytek obsahu kaseinu (azokaseinu) v kultivačním médiu z počáteční koncentrace 5 mg/g agaru (obr. 4.3, str. 51). Pokud je rostlina schopna kořeny přijmout nativní proteiny popř. oligo/polypeptidy, které transportuje do nadzemních částí, lze pak zřejmě detekovat větší množství proteinů v KAS rostlinách, než v kontrolních MS rostlinách. Stanovením celkového obsahu rozpustných proteinů v médiu bylo také zjištěno, že všechny rostliny sekretují do svých médií proteiny (obr. 4.3, str. 51). To bylo potvrzeno i dalším nalezením aktivity proteas, fosfatas a glykosidas v kultivačním médiu (obr. 4.5-4.7, str. 53-55).

V první řadě byla studována proteolytická aktivita, která byla v kořenech rostlin velmi nízká, v kultivačním médiu byla vyšší (obr. 4.5, str. 53). Aktivita proteas byla vyšší v médiu MS rostlin než KAS, jedná se tedy spíše o konstitutivní syntézu a sekreci než indukovatelnou přítomností kaseinu v médiu.

V kultivačním médiu v oblasti blízké kořenů rostlin pěstovaných s kaseinem jako jediným zdrojem dusíku bylo nalezeno několik proteinů o molekulové hmotnosti okolo 45 kDa (obr. 4.4, str. 52). Hmotnostní spektrometrií bylo detekováno několik proteas: aspartátová proteasa (nepenthesin-1), serinová proteasa (subtilisin-like), cysteinová proteasa (kathepsin B-like) (str. 52). Pro naprostou většinu aspartátových proteas zatím nebyla určena jejich jednoznačná role a jejich biologická funkce zůstává hypotetická. Obecně byly rostlinné aspartátové proteasy zatím spojovány se zpracováním a/nebo degradací proteinů v různých rostlinných orgánech, stejně tak v senescenci, stresové odpovědi, programované buněčné smrti a reprodukci. V masožravých rostlinách v případě rostlin *Nepenthes* a *Drosera*, jsou aspartátové proteasy (nepenthesin-1) sekretované do láček a mohou se účastnit degradace proteinů z kořisti (hmyzu), což dokládá, že tyto rostliny mohou využívat exogenní proteiny jako zdroj dusíku [61]. Subtilisin-like proteasy (subtilasy) jsou serinové proteasy, které splňují specifické funkce ve vývoji rostlin a signalizačních kaskádách. Bylo prokázáno, že subtilasy jsou glykosylované a sekretované do extracelulární matrix. Akumulace těchto proteas v mezibuněčné hmotě může být důležitá v případě pathogeneze, jelikož zde probíhá první interakce mezi hostitelem a patogenem, jeho rozpoznání a následná signalizace. Jaké jsou přirozené substráty a zda se subtilasy účastní obrany rostlin, dosud není známo [62]. Skupina C1A cysteinových proteas (kathepsin L, B, H a F-like) je nejpočetnější skupinou, která je zodpovědná za proteolytickou aktivitu během senescence listů. Role jednotlivých C1A proteas zahrnuje širokou škálu procesů jako je senescence, padání listů, programovaná buněčná smrt, zrání plodů, mobilizace proteinů v semenech a v lokální i systémové odpovědi na biotický stres. Přesné role těchto enzymů však zatím nebyly objasněny [63]. Přítomnost různých druhů proteas a jejich dosud nerozřešená biologická funkce přispívá k teorii, že by se tyto enzymy mohly účastnit i zpracování exogenních proteinů. V rostlinách se též vyskytuje řada transportérů (kap. 1.1.7, str. 19 - 21), které dokáží zajistit distribuci peptidů rostlinným pletivem. Skutečnost, že identifikované proteasy sekretované do média patří do různých skupin (aspartátové,

serinové, cysteinové), může být pro rostlinu výhodné. Bude-li se v okolí vyskytovat inhibitor, nebude inhibována veškerá proteolytická aktivita, ale pouze některá skupina.

Konfokální mikroskop ukázal v kořenech rostlin tabáku v přítomnosti konjugátu kaseinu s fluoresceinem fluorescenci především v kořenovém vlásnění, v povrchové vrstvě kořenových buněk a v jejich buněčných stěnách (obr. 4.16, str. 68). Lze tedy předpokládat, že část proteinů může být přijímána endocytózou a štěpení může probíhat v povrchových buňkách kořene nebo apoplastu.

Kasein nepředstavuje pouze zdroj peptidů (aminokyselin), ale také zdroj uhlíkových skeletů, vápenatých iontů a fosfátů. Všechny čtyři hlavní typy kaseinu (α -s1, α -s2, β , κ) jsou různě fosforylované [64]. Vzhledem k tomu, že kasein je fosfoprotein, byla v experimentálních rostlinách sledovaná aktivita fosfatas. Jejich aktivita byla vyšší v listech než v kořenech. V KAS-S rostlinách byla aktivita kyselých fosfatas srovnatelná s kontrolními MS-S rostlinami (obr. 4.17, str. 69). Intracelulární kyselé fosfatasy jsou v rostlinách všudypřítomné, nachází se v semenech, listech, stoncích i kořenech, květech i plodech a zásobních hlízách rostlin [65]. Ačkoliv některé nemají jasnou substrátovou specifitu, jsou důležité v produkci, transportu a recyklaci anorganického fosfátu. Také existují extracelulární kyselé fosfatasy, které se buď nachází v buněčných stěnách, nebo jsou sekretovány kořeny do okolní půdy, kde získávají fosfátové ionty z organických a anorganických zdrojů [66]. V této práci byla zjištěna přítomnost sekretovaných fosfatas v kultivačním médiu všech skupin rostlin, a to především v médiích s přídavkem sacharosy. V médiu bez přídavku sacharosy byla nalezena vysoká aktivita kyselých fosfatas v oblasti blízko kořenů rostlin pěstovaných v azokaseinu (obr. 4.6, str. 54). Je tedy velice pravděpodobné, že kasein může představovat i dodatečný zdroj fosforu.

Zajímavým zjištěním je také přítomnost endoglykosidas v kultivačním médiu (obr. 4.7, str. 55). V kultivačním médiu všech skupin rostlin byla nalezena aktivita endo-1,3- β -glukanasy, celulasy a chitinasy. Aktivita těchto enzymů v kultivačním médiu KAS rostlin byla řádově srovnatelná s aktivitou v médiu kontrolních MS rostlin, přičemž v obou případech byla vždy vyšší v oblasti vzdálenější kořenům než v oblasti blízké ke kořenům (obr. 4.7, str. 55). To by mohlo souviset s tím, že ačkoliv se rostlina sekrecí těchto enzymů nejspíše pokouší najít zdroj živin, substráty těchto enzymů nejsou v médiu k dispozici, proto enzymy difundují do větší vzdálenosti ve snaze substrátu dosáhnout. V daných experimentálních podmínkách bylo pozorováno, že rostliny spotřebovávají i agar, což je

polysacharid skládající se z 3,6-anhydro-L-galaktosy (nebo L-galaktosa-6-sulfátu), D-galaktosy a L-galaktosy (obvykle ve formě 3,6-anhydro-L-galaktosy nebo L-galaktosa-6-sulfátu), které jsou střídavě spojeny vazbami β -(1,4) and α -(1,3). V kultivačních médiích všech skupin byla aktivita enzymu štěpícího agar (agarasa) skutečně nalezena (obr. 4.7, str. 55). Jaké vazby jsou sekretovanými enzymy tabáku štěpeny však musí být předmětem dalších studií.

Ze studovaných glykosidas byla v kořenech experimentálních rostlin stanovena pouze endo-1,3- β -glukanasová aktivita spočívající v hydrolyze struktury β -1,3-glukanů, které jsou přítomné v buněčných stěnách fytopathogenních hub, a patří tak mezi obranné mechanismy rostlin (tzv. PR-2 proteiny). V rostlinách se také nachází β -1,3-glukan, kalosa, která se tvoří jako odpověď na stres, především poranění buňky a slouží ke zpevnění buněčné stěny a uzavření poraněných sítkovic. Zvýšená aktivita endo-1,3- β -glukanasy v kořenech KAS rostlin (obr. 4.18, str. 70) by mohla naopak souviset s uvolněním transportních drah pro metabolity včetně proteinů a peptidů. Aktivita endo-1,3- β -glukanasy byla nalezena také v listech KAS rostlin společně s celulasou, jejíž aktivita v kořenech detekována nebyla (obr. 4.19, str. 71). Aktivita celulasy může souviset s přestavbou rostlinné buněčné stěny. V listech rostlin KAS+S byla stanovena také aktivita chitinasy. Rostlinné chitinasy patří mezi PR-3 proteiny a jsou zapojeny do obrany, růstu a vývoje rostlin. Některé mají také lysozymální aktivitu a mohou hydrolyzovat peptidoglykan v bakteriální buněčné stěně. Mohou být indukovány např. infekcí houbovým, bakteriálním nebo virovým pathogenem. Charakter exprese závisí na infikujícím pathogenu a na jeho virulenci. Rostlinné chitinasy chrání rostlinu před invazí pathogenních hub [67, 68].

S cílem zjistit, zda KAS rostliny byly nedostatkem anorganického zdroje dusíku vystaveny stresovým podmínkám, byl stanovován obsah fenolických látek (jak v rostlinách tak obsah fenolických látek sekretovaných do kultivačního média), množství reaktivních forem kyslíku (superoxidového radikálu a peroxidu vodíku) a aktivita antioxidačního enzymu SOD v listech.

Fenolické látky jsou bezpochyby největší skupinou přírodních látek s antioxidačními vlastnostmi [69]. Mezi hlavní funkce fenolických sekundárních metabolitů patří ochrana před UV zářením (konjugovaný systém vazeb), chelatace iontů kovů (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} apod.) a antioxidační aktivita (účinné proti všem reaktivním formám kyslíku). Množství produkovaných fenolických látek je zvýšeno během stresu [70]. Malý rozdíl

v obsahu fenolických látek v případě rostlin MS a KAS by mohl znamenat, že výměna anorganického zdroje dusíku za protein, nepředstavuje pro rostlinu tak velkou stresovou zátěž, jak by se dalo předpokládat. Obecně však pěstování rostlin *in vitro* představuje určitou formu stresu, se kterou se musí rostlina vyrovnat. V listech byl obsah fenolických látek zhruba desetkrát větší než v kořenech. Sacharosa v médiu neměla vliv na množství fenolických látek. V kultivačním médiu bylo nalezeno značné množství fenolických látek hlavně ve vzdálené oblasti kořenů u všech skupin rostlin (kromě MS-S, obr. 4.8, str. 56).

V listech KAS rostlin bylo množství peroxidu vodíku srovnatelné s kontrolními MS rostlinami a množství superoxidového radikálu dokonce nižší než v listech kontrolních MS rostlin (obr. 4.21, str. 73). S nízkou produkcí superoxidu v listech KAS rostlin pravděpodobně souvisí i přítomnost více isoformů antioxidantního enzymu SOD (obr. 4.22, str. 74). Zdá se tedy, že v KAS rostlinách není metabolismus ovlivněný sníženou dostupností dusíku, vystaven působení silného oxidativního stresu, alespoň ve fázi odběru vzorků (po 8 týdnech růstu v kultivační nádobce v médiu s kaseinem jako jediným zdrojem dusíku).

6 Shrnutí

1. Rostliny tabáku byly schopny růst v přítomnosti kaseinu jako výhradního zdroje dusíku.
2. V kultivačním médiu byly identifikovány sekretované proteasy: aspartátová proteasa (nepenthesin-1), serinová proteasa (subtilisin-like) a cysteinová proteasa (kathepsin B-like). Aktivita proteas, kyselých fosfatas a glykosidas byla nižší v kultivačním mediu KAS rostlin než v médiu MS rostlin.
3. Proteomickou analýzou kořenů bylo identifikováno 185 proteinů, v KAS rostlinách bylo zastoupení 75% proteinů sníženo, 11% bylo nezměněno a 14% zvýšeno. Zastoupení 37 proteinů bylo ovlivněno jak v KAS, tak v AD rostlinách oproti MS rostlinám, jejich exprese je tedy pravděpodobně ovlivněna zdrojem dusíku.
4. V rostlinách byla zjištěna aktivita kyselých fosfatas, endo-1,3- β -glukanasy, celulasy a chitinasy. Proteolytická aktivita v povrchových vrstvách kořene byla sledována pomocí konjugátu kaseinu s fluoresceinem a dokumentována konfokálním mikroskopem.
5. Více fenolických látek obsahovaly listy rostlin, méně kořeny, avšak byly též sekretovány do média u všech experimentálních skupin. Rovněž obsah peroxidu vodíku byl srovnatelný. Množství superoxidového radikálu bylo nižší v žilkách KAS rostlin, které obsahovaly vedle Cu/Zn-SOD i isoformu Mn-SOD oproti MS rostlinám.

Reference

- [1] Tegeder, M.; Rentsch, D.: *Mol. Plant* **3**:997-1011 (2010).
- [2] Heldt, H.-W.; Piechulla, B.; Heldt, F.: *Plant Biochemistry*, 4. vydání, Academic Press, London, (2011).
- [3] Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L.: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 2. vydání, John Wiley & Sons, Chichester, (2015).
- [4] Krapp, A.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **25**:115-122 (2015).
- [5] Zehnálek, J.; Adam, V.; Kizek, R.: *Chem. Listy* **100**:508-514 (2006).
- [6] Arsova, B.; Kierszniowska, S.; Schulze, W. X.: *Trends Plant Sci.* **17**:102-112 (2012).
- [7] Xu, G.; Fan, X.; Miller, A. J.: *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**:153-182 (2012).
- [8] Näsholm, T.; Kielland, K.; Ganeteg, U.: *New Phytol.* **182**:31-48 (2009).
- [9] Lipson, D.; Näsholm, T.: *Oecologia* **128**:305-316 (2001).
- [10] Warren, C. R.: *Plant Soil* **375**:1-19 (2014).
- [11] Lee, Y.-H.; Foster, J.; Chen, J.; Voll, L. M.; Weber, A. P. M.; Tegeder, M.: *Plant J.* **50**:305-319 (2007).
- [12] Svennerstam, H.; Jämtgård, S.; Ahmad, I.; Huss-Danell, K.; Näsholm, T.; Ganeteg, U.: *New Phytol.* **191**:459-467 (2011).
- [13] Tegeder, M.; Ward, J. M.: *Front. Plant Sci.* **3**:1-11 (2012).
- [14] Waterworth, W. M.; Bray, C. M.: *Ann. Bot. (Oxford, U. K.)* **98**:1-8 (2006).
- [15] Soper, F. M.; Paungfoo-Lonhienne, Ch.; Brackin, R.; Rentsch, D.; Schmidt, S.; Robinson, N.: *Funct. Plant Biol.* **38**:788-796 (2011).
- [16] Stacey, G.; Koh, S.; Granger, Ch.; Becker, J. M.: *Trends Plant Sci.* **6**:257-263 (2002).
- [17] Mifflin, B. J.; Lea, P. J.: *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**:299-329 (1977).
- [18] Paungfoo-Lonhienne, Ch.; Schenk, P. M.; Lonhienne, T. G. A.; Brackin, R.; Meier, S.; Rentsch, D.; Schmidt, S.: *J. Exp. Bot.* **60**:2665-2676 (2009).
- [19] Rentsch, D.; Schmidt, S.; Tegeder, M.: *FEBS Lett.* **581**:2281-2289 (2007).
- [20] Franssen, H. J.; Bisseling, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:12855-12856 (2001).
- [21] Matsubayashi, Y.; Sakagami, Y.: *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**:679-674 (2006).
- [22] Paungfoo-Lonhienne, Ch.; Lonhienne, T. G. A.; Rentsch, D.; Robinson, D.; Christie, M.; Webb, R. I.; Gamage, H. K.; Carroll, B. J.; Schenk, P. M.; Schmidt, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**:4524-4529 (2008).

- [23] Adamczyk, B., Smolander, A., Kitunen, V., Godlewski, M.: *Plant Signal. Behav.* **5**:817-819 (2010).
- [24] Godlewski, M.; Adamczyk, B.: *Plant Physiol. Biochem.* **45**:657-664 (2007).
- [25] Adamczyk, B.; Godlewski, M.; Zimny, J.; Zimny, A.: *Plant Biol. (Berlin, Ger.)* **10**:718-724 (2008).
- [26] McLaren, A. D.; Jensen, W. A.; Jacobson, L.: *Plant Physiol.* **35**:549-556 (1960).
- [27] Bradfute, O. E.; McLaren, A. D.: *Physiol. Plantarum* **17**:667-675 (1964).
- [28] Adamczyk, B.; Godlewski, M.; Smolander, A.; Kitunen, V.: *Plant Physiol. Biochem.* **47**:919-925 (2009).
- [29] Bending, G. D.; Read, D. J.: *Soil Biol. Biochem.* **28**:1603-1612 (1996).
- [30] Adamec, L.: *Živa* **2**:57 (2006).
- [31] Adamec, L.: *Ecophysiological look at plant carnivory: why are plants carnivorous?*, v knize *All Flesh is Grass: Plant-Animal Interrelationships*, Springer Science, London, str. 455-489, (2011).
- [32] Adlassnig, W.; Peroutka, M.; Lendl, T.: *Ann. Bot. (Oxford, U. K.)* **107**:181-194 (2011).
- [33] Kadek, A.; Tretyachenko, V.; Mrázek, H.; Ivanova, L.; Halada, P.; Rey, M.; Schriemer, D. C.; Man, P.: *Protein Expres. Purif.* **95**:121-128 (2014).
- [34] Płachno, B. J.; Adamec, L.; Lichtscheidl, I. K.; Peroutka, M.; Adlassnig, W.; Vrba, J.: *Plant Biol. (Stuttg.)* **8**:813-820 (2006).
- [35] Fotografie *Nepenthes madisonii* (oiso x *ventricosa*). [online]. [cit. 2016-03-28]. URL: http://www.sunbelleexotics.com/Sunbelle/Photo_neps_cultivars.htm
- [36] Fotografie *Dionaea muscipula*. [online]. [cit. 2016-03-28]. URL: <https://awkwardbotany.com/2014/01/16/venus-flytrap-a-species-of-special-concern/>
- [37] Studnička, M.: *Lapací a trávící pasti*, v knize *Masožravé rostliny*, Academia, Praha, str. 16-37 (1984).
- [38] Brownlee, C.: *Curr. Biol.* **23**:714-716 (2013).
- [39] BioLib.cz – Biological Library. [online]. [cit. 2016-03-28]. URL: <http://www.biolib.cz/cz/glossaryterm/id3644/>
- [40] Haichar, F. el Z.; Santaella, C.; Heulin, T.; Achouak, W.: *Soil Biol. Biochem.* **77**:69-80 (2014).
- [41] Bais, H. P.; Weir, T. L.; Perry, L. G.; Gilroy, S.; Vivanco, J. M.: *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**:233-266 (2006).
- [42] Badri, D. V.; Vivanco, J. M.: *Plant, Cell Environ.* **32**:666-681 (2009).

- [43] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.* **193**:265-275 (1951).
- [44] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.* **72**:248-254 (1976).
- [45] Schägger, H.: *Nat. Protoc.* **1**:16-22 (2006).
- [46] Černý, M.; Kuklová, A.; Hoehenwarter, W.; Fragner, L.; Novák, O.; Rotková, G.; Jedelský, P. L.; Žáková, K.; Šmečilová, M.; Strnad, M.; Weckwerth, W.; Brzobohatý B.: *J. Exp. Bot.* **64**:4293-4206 (2013).
- [47] Habánová, H.: *Vliv růstových regulátorů na proteom rostlin v průběhu klíčení: Bakalářská práce Mendelova univerzita v Brně, agronomická fakulta, str. 31-35 (2014).*
- [48] Cupp-Enyard, C.: *J. Visualized Exp.* **19**:899 (2008).
- [49] Toledo Machado, C. T.; Furlani, Â. M. C.: *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* **61**:216-223 (2004).
- [50] Anthon, G. E.; Barrett, D. M.: *Anal. Biochem.* **305**:287-289 (2002).
- [51] Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, J.-M.: *J. Agric. Food Chem.* **57**:1768-1774 (2009).
- [52] Spoustová, P.; Hýsková, V.; Müller, K.; Schnablová, R.; Ryšlavá, H.; Čerovská, N.; Malbeck, J.; Cvikrová, M.; Synková, H.: *Plant Sci.* **235**:25-36 (2015).
- [53] Synková, H.; Semoradová, R.; Schnablova, R.; Witters, E.; Husak, M; Valcke, R.: *Biol. Plantarum* **50**:31-41 (2006).
- [54] Beauchamp, C.; Fridovich I.: *Anal. Biochem.* **44**:276-287 (1971).
- [55] Eckschlager, K.; Horsák, I.; Kodejš, Z.: *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*, SNTL, Praha, (1980).
- [56] Paungfoo-Lonhienne, Ch.; Visser, J.; Lonhienne, T. G. A.; Schmidt, S.: *Plant Soil* **359**:1-18 (2012).
- [57] Lonhienne T. G. A.; Trusov, Y.; Young, A; Rentsch, D.; Näsholm, T.; Schmidt, S.; Paungfoo-Lonhienne: *Sci. Rep.* **4**:5055 (2014).
- [58] Synková, H.; Hýsková, V.; Garčeková, K.; Křížová, K.; Ryšlavá, H.: *Biol. Plantarum* IN PRESS (2016).
- [59] Eick, M.; Stöhr, Ch.: *Plant Physiol. Biochem.* **47**:1003-1008 (2009).
- [60] Tichá, I.; Čáp, F.; Pacovská, D.; Hofman, P.; Haisel, D.; Čapková, V.; Schäfer, C.: *Physiol. Plantarum* **102**:155-162 (1998).
- [61] Simões, I.; Faro, C.: *Eur. J. Biochem.* **271**:2067-2075 (2004).
- [62] Figueiredo, A.; Monteiro, F.; Sebastiana, M.: *Front. Plant Sci.* **5**:739 (2014)
- [63] Parkash, J.; Kashyap, S.; Kirti, S.; Singh, A. K.; Dutt, S.: *Plant Gene* **3**:11-19 (2015).

- [64] Mamone, G.; Caira, S.; Garro, G.; Nicolai, A.; Ferranti, P.; Picariello, G.; Malorni, A.; Chianese, L.; Addeo, F.: *Electrophoresis* **24**:2824-2837 (2003).
- [65] Nishimura, M.; Beevers, H.: *Plant Physiol.* **62**:44-48 (1978).
- [66] Duff, S. M. G.; Sarath, G.; Plaxton, W. C.: *Physiol. Plantarum* **90**:791-800 (1994).
- [67] Heřmanová, V.; Bárta, J.; Čurn, V: *Chem. Listy* **100**:495-500 (2006).
- [68] Kasprzewska, A.: *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**:809-824 (2003).
- [69] Tohge, T.; Watanabe, M.; Hoefgen, R.; Fernie, A. R.: *Front. Plant Sci.* **4** (2013).
- [70] Bartwall, A.; Mall, R.; Lohani, P.; Guru, S. K.; Arora, S.: *J. Plant Growth Regul.* **32**:216-232 (2013).

Příloha

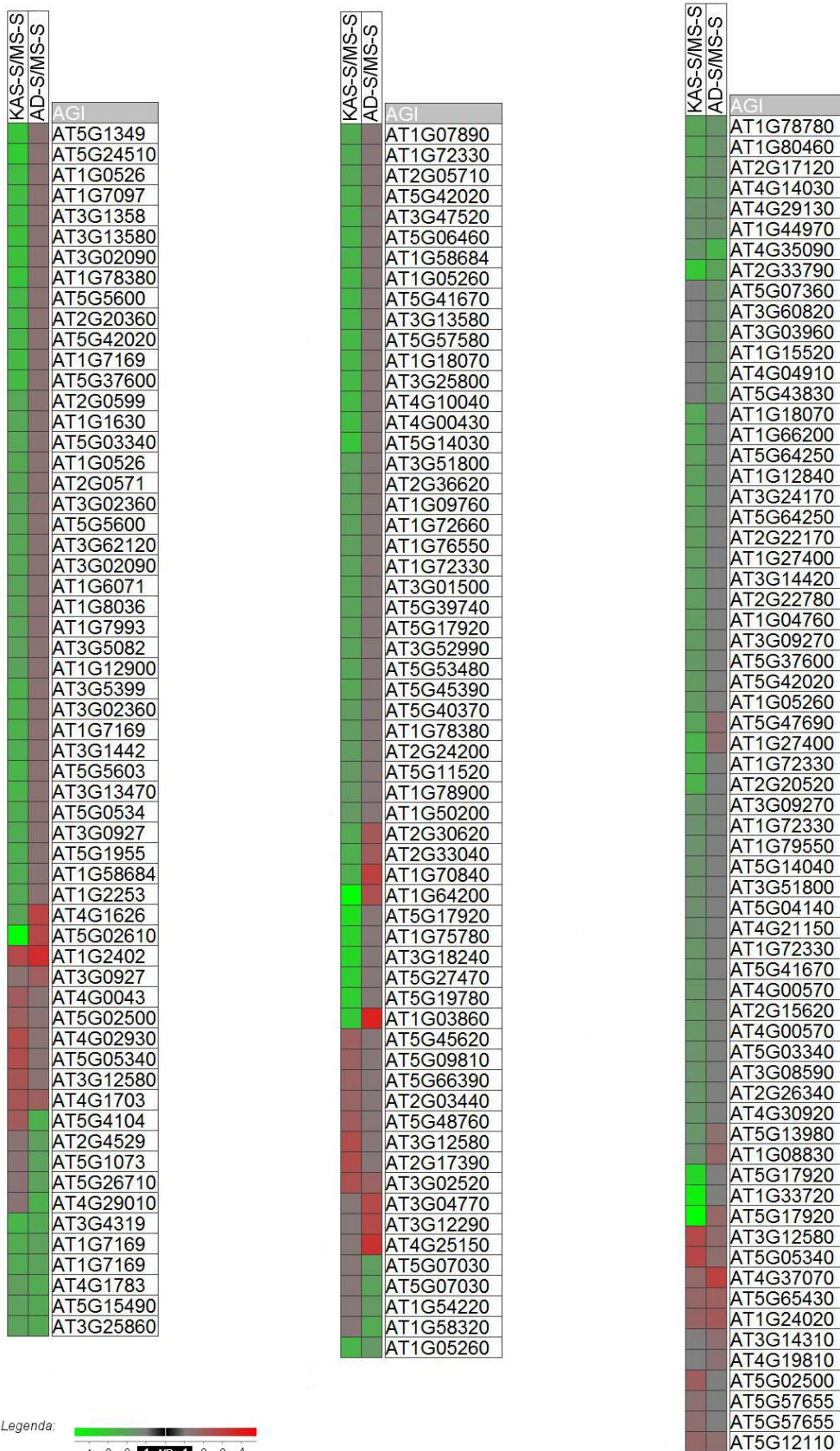
Tab. P1: Složení kompletního Murashige-Skoogova média (pH 5,8-5,9).

roztok	sloučenina	c [mmol.l ⁻¹]
A	FeSO ₄ .7H ₂ O	10,0
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	5,6
	H ₃ BO ₃	10,0
	MnSO ₄ .H ₂ O	10,0
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,0
	KI	0,5
B	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,0
C	KNO ₃	18,8
	KH ₂ PO ₄	1,3
	NH ₄ NO ₃	20,6
D	CaCl ₂ .2H ₂ O	59,9
D'	MgSO ₄ .7H ₂ O	30,0

Tab. P2: Odlišné složení roztoku C v Murashige-Skoogově médiu (pH 5,8-5,9).

roztok C	sloučenina	c [mmol.l ⁻¹]
0,5% kasein jako jediný zdroj dusíku	KH ₂ PO ₄	1,3
	KCl	6,0
	kasein	0,5 g/l
snížený obsah anorganického dusíku	KNO ₃	3,74
	KH ₂ PO ₄	1,3
	KCl	6,0

Hmotností koncentrace agaru v kultivačním médiu byla 8 g.l⁻¹. V případě varianty se sacharosou byla její hmotnostní koncentrace 15 g.l⁻¹.



Obr. P1: Přehled 185 identifikovaných proteinů z proteomické analýzy kořenů rostlin tabáku. Zkratky: NR, není signifikantní změna.

Tab. P3: *Výstup programu String.*

AT1G03860	prohibitin 2; Prohibitin probably acts as a holdase/unfoldase for the stabilization of newly synthesized mitochondrial proteins (By similarity) (286 aa)
AT1G05260	peroxidase 3; Removal of H ₂ O ₂ , oxidation of toxic reductants, biosynthesis and degradation of lignin, suberization, auxin catabolism, response to environmental stresses such as wounding, pathogen attack and oxidative stress. These functions might be dependent on each isozyme/isoform in each plant tissue (326 aa)
AT1G08830	Superoxide dismutase [Cu-Zn]; Destroys radicals which are normally produced within the cells and which are toxic to biological systems (152 aa)
AT1G24020	MLP-like protein 423 (155 aa)
AT1G27400	60S ribosomal protein L17-1 (176 aa)
AT1G44970	peroxidase 9; Removal of H ₂ O ₂ , oxidation of toxic reductants, biosynthesis and degradation of lignin, suberization, auxin catabolism, response to environmental stresses such as wounding, pathogen attack and oxidative stress. These functions might be dependent on each isozyme/isoform in each plant tissue (346 aa)
AT1G64200	V-type proton ATPase subunit E3; Subunit of the peripheral V1 complex of vacuolar ATPase essential for assembly or catalytic function. V-ATPase is responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cells (By similarity) (237 aa)
AT1G70840	MLP-like protein 31 (171 aa)
AT1G78780	pathogenesis-related protein (238 aa)
AT1G80460	glycerol kinase; Key enzyme in the regulation of glycerol uptake and metabolism. Required for resistance to nonhost <i>Pseudomonas</i> bacteria and to the pathogenic fungus <i>B.cinerea</i> (522 aa)
AT2G17120	lysM domain GPI-anchored protein 2 precursor; Chitin elicitor-binding protein involved in the perception of chitin oligosaccharide elicitor (350 aa)
AT2G30620	histone H1.2; Histones H1 are necessary for the condensation of nucleosome chains into higher-order structures (273 aa)
AT2G33040	ATP synthase subunit gamma; Mitochondrial membrane ATP synthase (F ₁)F ₀ ATP synthase or Complex V) produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane which is generated by electron transport complexes of the respiratory chain. F-type ATPases consist of two structural domains, F ₁ - containing the extramembraneous catalytic core, and F ₀ - containing the

	membrane proton channel, linked together by a central stalk and a peripheral stalk. During catalysis, ATP synthesis in the catalytic domain of F(1) is coupled via a rotary mechanism of the central stalk s [...] (325 aa)
AT2G33790	arabinogalactan protein 30 (239 aa)
AT3G02520	14-3-3-like protein GF14 nu; Is associated with a DNA binding complex that binds to the G box, a well-characterized cis-acting DNA regulatory element found in plant genes (265 aa)
AT3G12580	heat shock protein 70; Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Mediator functions as a bridge to convey information from gene-specific regulatory proteins to the basal RNA polymerase II transcription machinery. The Mediator complex, having a compact conformation in its free form, is recruited to promoters by direct interactions with regulatory proteins and serves for the assembly of a functional preinitiation complex with RNA polymerase II and the general transcription factors (By similarity) (650 aa)
AT3G25860	2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family protein (480 aa)
AT4G14030	selenium-binding protein 1; Binds cadmium and mediates lower sensitivity to stress requiring glutathione (GSH) for tolerance (e.g. cadmium, selenate, and hydrogen peroxide excess). Probably helps to detoxify cadmium potentially through direct binding (490 aa)
AT4G29130	hexokinase 1; Fructose and glucose phosphorylating enzyme. May be involved in the phosphorylation of glucose during the export from mitochondrion to cytosol. Acts as sugar sensor which may regulate sugar-dependent gene repression or activation. Mediates the effects of sugar on plant growth and development independently of its catalytic activity or the sugar metabolism. May regulate the execution of program cell death in plant cells (496 aa)
AT4G35090	catalase 2; Occurs in almost all aerobically respiring organisms and serves to protect cells from the toxic effects of hydrogen peroxide (By similarity) (492 aa)
AT4G37070	patatin-like protein (414 aa)
AT5G02610	60S ribosomal protein L35-4 (146 aa)
AT5G05340	peroxidase 52; Removal of H ₂ O ₂ , oxidation of toxic reductants, biosynthesis and degradation of lignin, suberization, auxin catabolism, response to environmental stresses such as wounding, pathogen attack and oxidative stress. These functions might be dependent on each isozyme/isoform in each plant tissue (324 aa)

AT5G12110	Elongation factor 1-beta 1; EF-1-beta and EF-1-delta stimulate the exchange of GDP bound to EF-1-alpha to GTP (228 aa)
AT5G13980	Glycosyl hydrolase family 38 protein (1024 aa)
AT5G15490	UDPglucose 6-dehydrogenase; Involved in the biosynthesis of UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA), providing nucleotide sugars for cell-wall polymers. Required for the formation of cell wall ingrowths on the outer cell walls of nematode-induced syncytia (480 aa)
AT5G17920	methionine synthesis 1; Catalyzes the transfer of a methyl group from 5-methyltetrahydrofolate to homocysteine resulting in methionine formation (765 aa)
AT5G47690	sister chromatid cohesion protein PDS5 (1607 aa)
AT5G65430	general regulatory factor 8; Is associated with a DNA binding complex that binds to the G box, a well-characterized cis-acting DNA regulatory element found in plant genes (260 aa)

