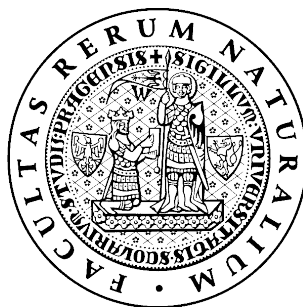


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



*Studium metabolických změn rostlin tabáku pěstovaných in vitro v přítomnosti
sacharosu*

Metabolic changes in tobacco plants grown in the presence of sucrose

Bakalářská práce

Školitelka: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: RNDr. Veronika Doubnerová, PhD.

Praha 2010

Květa Garčeková

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc., RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. a konzultantce RNDr. Veronice Doubnerové, PhD. za trpělivost, velkou ochotu a příjemné prostředí, které panovalo v laboratoři. Dále Martinovi Fialovi za spolupráci, rady a nápady při vypracování této bakalářské práce. Žanetě Hejdukové za podporu a pomoc nejen při studiu na Univerzitě Karlově v Praze. A v neposlední řadě mým rodičům, Květoslavě a Josefovi Garčkovým, za oporu a celoživotní obětavost, kterou mi dávají.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. A všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

Květa Garčková

ABSTRACT

Metabolism of plants grown *in vitro* is affected by the composition of culture medium. Beside essential nutrients culture medium are often composed of sucrose as well. The aim of this study was to find out, if additional source of carbon-sucrose affected activity of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31), NADP-malic enzyme (NADP-ME, EC 1.1.1.40), and pyruvate, phosphate dikinase (PPDK, EC 2.7.9.1). Activities of these enzymes were determined in different parts of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1) grown *in vitro* in culture medium: Murashige-Skoog agar containing sucrose (SR1+S) and in plants grown without sucrose (SR1-S). Fresh weight activity and specific activity of studied enzymes in SR1+S plants were increased. In upper leaves fresh weight activity of PEPC, NADP-ME and PPDK was increased 1.7-times, 1.4-times and 1.9-times, respectively. Also the protein content was higher in SR1+S plants. The results indicate that metabolic pathways catalyzed by these enzymes are in the presence of sucrose more involved.

Key words: *Nicotiana tabacum*, L., NADP-ME, PEPC, PPDK, sucrose

In Czech – ABSTRAKT

Metabolismus rostlin pěstovaných v kultivačním médiu je ovlivněn jeho složením. Kromě nezbytných živin obsahují kultivační média často sacharosu. Cílem této práce bylo zjistit, zda dodatečný zdroj uhlíku-sacharosa ovlivní aktivitu fosfoenolpyruvátkarboxylasy (PEPC, EC 4.1.1.31), NADP dependentní malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační) (NADP-ME, EC 1.1.1.40) a pyruvát, fosfátdikinasy (PPDK, EC 2.7.9.1). Aktivita těchto enzymů byla stanovena v různých částech rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1) pěstovaných *in vitro* v kultivačním médiu: Murashige-Skoogovu agaru v přítomnosti sacharosu (SR1+S) a bez přítomnosti sacharosu (SR1-S). Aktivita sledovaných enzymů vztažená na gram čerstvé hmotnosti i specifická aktivita byly v rostlinách SR1+S zvýšeny. V horních listech byla aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost zvýšena o 71%, aktivita NADP-ME o 43% a aktivita PPDK o 89%. V rostlinách SR1+S byl také zjištěn vyšší obsah proteinů. Z těchto výsledků vyplývá, že metabolické dráhy katalyzované těmito enzymy jsou v přítomnosti sacharosu více využívány.

Klíčová slova: *Nicotiana tabacum*, L., NADP-ME, PEPC, PPDK, sacharosa

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosintrifosfát
Bis	N,N'-metylen-bis(akrylamid)
BSA	hovězí sérový albumin
C₃ rostliny	rostliny, které mají jako první intermediát 3-uhlíkatý 3-fosfoglycerát
C₄ rostliny	rostliny, které mají jako první intermediát 4-uhlíkatý oxalacetát
CAM rostliny	Crassulacean acid metabolism
CoA	koenzym A
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
g	tíhové zrychlení ($g = 9,80665 \text{ m.s}^{-2}$)
Gly	glycin
NAD⁺	nikotinamidadeninukleotid
NADH	nikotinamidadeninukleotid redukovaný
NAD MDH	NAD dependentní malátdehydrogenasa
NADP	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaný
NADP-ME	NADP dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát dekarboxylační)
OAA	oxalacetát
PEP	fosfoenolpyruvát
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových kationtů
P_i	anorganický fosfát
PPCK	fosfoenolpyruvátkarboxylasa kinasa
PPDK	pyruvát, fosfátdikinasa

PVP	polyvinylpolypyrrolidon
RPM	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
SR1+S	rostliny pěstované v kultivačním mediu v přítomnosti sacharosy
SR1-S	rostliny pěstované v kultivačním mediu bez přítomnosti sacharosy
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	uridindifosfát

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK

1. LITERÁRNÍ ÚVOD	10
1.1. Výživa rostlin	10
1.2. Heterotrofní výživa	11
1.3. Sacharosa	11
1.4. Přehled enzymů	13
1.4.1. NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát-dekarboxylační)	13
1.4.2. Fosfoenolpyruvátkarboxylasa	15
1.4.3. Pyruvát, fosfátdikinasa	16
2. CÍL PRÁCE	18
3. MATERIÁL	19
3.1. Přístroje a pomůcky	19
3.2. Chemikálie	19
3.3. Rostlinný materiál	20
4. METODY	21
4.1. Příprava vzorku z rostlinného materiálu	21
4.1.1. Pěstování rostlin tabáku <i>Nicotiana tabacum</i> L.	21
4.1.2. Příprava rostlinného extraktu pro stanovení enzymové aktivity	22
4.2. Měření enzymové aktivity	22
4.2.1. Měření enzymové aktivity NADP-ME	23
4.2.2. Měření enzymové aktivity PEPC	23
4.2.3. Měření enzymové aktivity PPK	23
4.3. Stanovení bílkovin metodou dle Bradfordové	23
4.4. Elektroforetická separace proteinů	24
4.4.1. Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS	24
4.4.2. Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v nedenaturujícím prostředí	25
4.5. Detekce proteinů po elektroforetické separaci	26
4.5.1. Detekce proteinů po elektroforetické separaci v prostředí SDS	26
4.5.2. Detekce NADP-ME v gelu po elektroforetické separaci v nedenaturujícím prostředí	26

5. VÝSLEDKY	27
5.1. Aktivita NADP-ME v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy	28
5.2. Aktivita PEPC v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy	29
5.3. Aktivita PPDK v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy	30
5.4. Stanovení bílkovin metodou dle Bradfordové	31
5.5. Elektroforetická separace proteinů v gradientu polyakrylamidového gelu v prostředí SDS	32
5.6. Elektroforetická separace NADP-ME v gradientu polyakrylamidového gelu v nedenaturujícím prostředí	33
6. DISKUZE	34
7. ZÁVĚR	35
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	36

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1. Výživa rostlin

Podle způsobu výživy a povahy metabolismu lze organismy dělit na autotrofní a heterotrofní. Základ tohoto rozdělení spočívá v rozdílných zdrojích uhlíku, i v rozdílných způsobech získávání energie [1].

Autotrofní organismy, jako jsou rostliny, sinice, fotoautotrofní a chemoautotrofní bakterie, získávají uhlík z oxidu uhličitého. Naproti tomu heterotrofní organismy využívají jako zdroj uhlíku organické látky, např. cukry, tuky, bílkoviny i organické kyseliny. Patří mezi ně bakterie, nižší a vyšší houby, vyšší saprofytické a parazitické rostliny a živočichové. Aby heterotrofové mohli získávat uhlík ze složitých organických látek, potřebují k tomu bohatý enzymatický aparát [1].

Liší se tedy i cesty, kterými autotrofní a heterotrofní organismy získávají energii. Heterotrofové většinou získávají energii oxidací organických látek. U autotrofů je zdrojem energie světlo. Výjimkou jsou chemoautotrofní bakterie, které získávají energii z oxidace anorganických sloučenin [1].

Tabulka č. 1: Přehled typů výživy a typů metabolismu u autotrofních a heterotrofních organismů [1].

Typy výživy a metabolismus		Zdroj energie	Zdroj uhlíku	Zdroj vodíku	Organismy
autotrofní	fotoautotrofní	světlo	CO ₂	H ₂ O	rostliny, sinice
		světlo	CO ₂	H ₂ S, H ₂	fotoautotrofní bakterie
	chemoautotrofní	oxidace anorganických látek	CO ₂	H ₂ O	chemoautotrofní bakterie
heterotrofní	fotoheterotrofní	světlo	organické látky	organické látky	fotoheterotrofní bakterie
	chemoheterotrofní	oxidace organických látek	organické látky	organické látky	chemoheterotrofní bakterie, houby, živočichové, člověk

1.2. Heterotrofní výživa

U rostlin se heterotrofní výživa vyskytuje jen velmi zřídka. Rostlinný metabolismus heterotrofně působí v určitých fázích svého ontogenetického vývoje nebo jen určitými orgány během svého života [1]. Například zelené ale i nezelené rostliny využívají organických látek při klíčení, čerpají tak výživu ze semene [2]. Další možností je, že heterotrofní výživa rostlin představuje jen doplněk k výživě autotrofní. V ojedinělých případech je dokonce jediným způsobem, jak rostlina může získat živiny. Podle zdroje uhlíku jí lze zařadit do tří skupin:

1. saprofytická výživa
2. parazitická výživa
3. mixotrofní výživa [1].

Saprofytická výživa čerpá uhlík, a tím tedy i energii z těl odumřelých organismů, a to jak rostlin, živočichů, tak i mikroorganismů [2], [3]. Tento způsob výživy využívá jen několik druhů vyšších rostlin na rozdíl od mikroorganismů, které ho využívají převážně [1].

Parazitická výživa je taková výživa mezi dvěma organismy, kdy jeden čerpá uhlík z organických látek a energii z těla živých hostitelů. Toto spojení je většinou v nejtěsnějším styku mezi hostitelem a cizopasníkem. Nebo dokonce přímo v nich. Parazité současně do těla hostitele vypouštějí produkty svého metabolismu a tím je hostitel oslabován [1], [2].

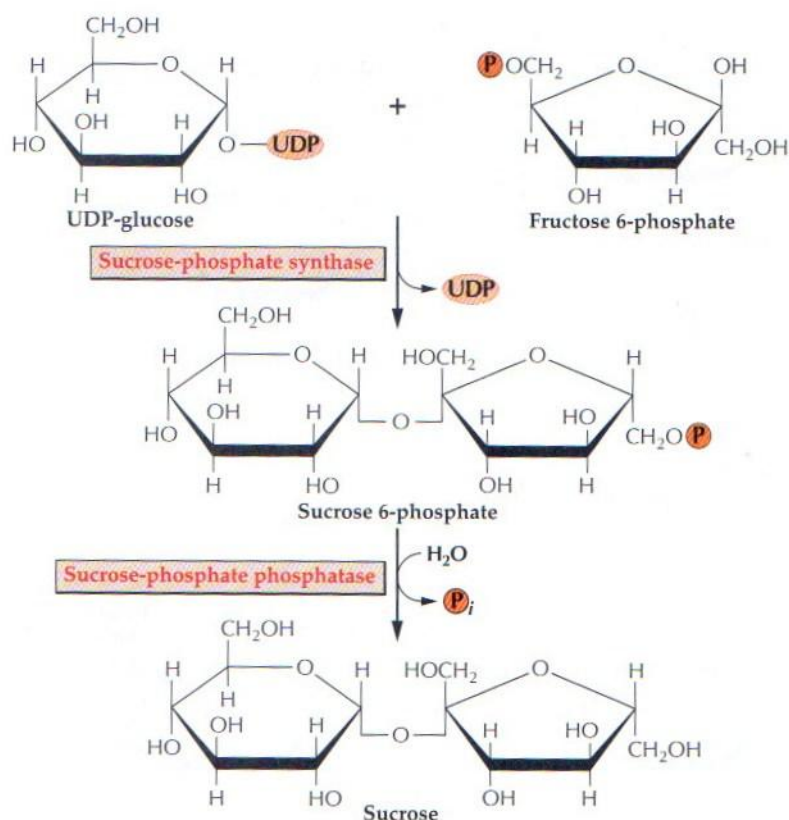
Mixotrofní výživa je přechodnou formou výživy mezi autotrofní a heterotrofní výživou. Lze do ní zařadit téměř všechny způsoby, kterými autotrofní rostliny doplňují výživu. Jedná se o příjem organických látek, růstových látek, ale i minerálních látek [1].

1.3. Sacharosa

Sacharosa je neredukující disacharid skládající se z α -D-glukopyranosy a β -D-fruktofuranosy, které jsou spojené (1 \rightarrow 2) glysidovou vazbou [5], [6]. V rostlinné říši je sacharosa velmi rozšířená a je hlavním produktem fotosyntézy. Vzhledem k tomu, že rostliny jsou autotrofní organismy, přeměňují jednoduché živiny (CO_2 , vodu a anorganické látky) na sacharidy, které jsou následně přeměňovány na všechny intermediáty nutné pro biosyntézu nukleových kyselin, proteinů, lipidů, polysacharidů, stejně jako koenzymů a

sekundárních metabolitů, je v rostlinách metabolismus sacharidů klíčový [7]. Dále sacharosa slouží jako základní transportní látka, pomocí floému je přepravována z listů do ostatních částí rostliny, kde může být následně dále metabolizována [6]. Sacharosa je v některých rostlinách důležitou zásobní a osmoticky aktivní látkou, která může rostlinu chránit před stresem způsobeným suchem, chladem či vysokou koncentrací solí [1]. Cukrová třtina a cukrová řepa, ze kterých je sacharosa získávána a dále zpracována, patří mezi ekonomicky významné plodiny [1].

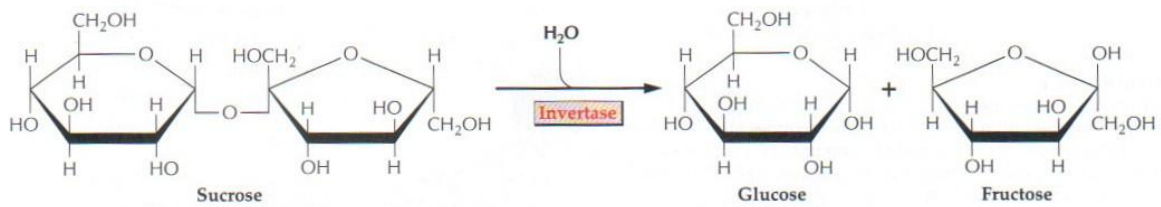
Syntéza sacharosy probíhá v cytosolu pomocí sacharosafosfátsynthasy a sacharosafosfátfosfatasy a vychází z UDP-glukosy a fruktosa-6-fosfátu (viz. Obr. 1) [7].



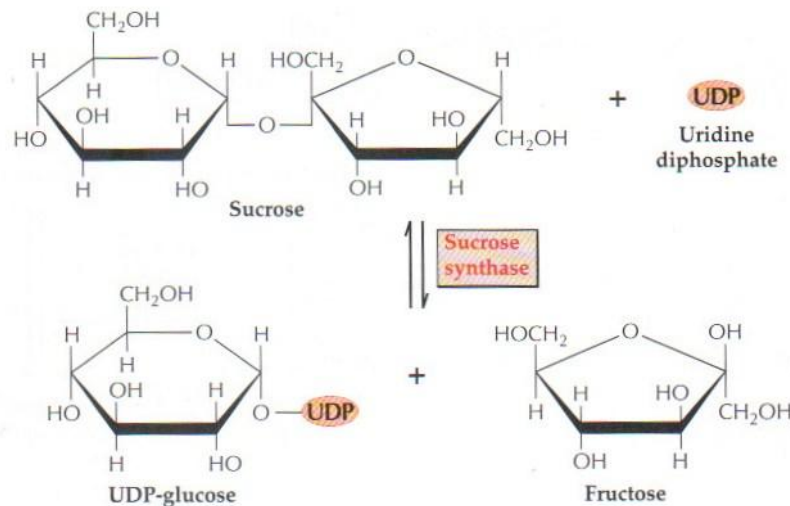
Obr. 1: Syntéza sacharosy [7].

Naopak odbourávání sacharosy je uskutečněno β -fruktosidasou katalyzující vznik glukosy a fruktosy (viz. Obr. 2), nebo sacharosynthasou, enzymem katalyzující reverzibilní reakci přeměny sacharosy a UDP na UDP-glukosu a fruktosu (viz Obr. 3) [7]. Oba tyto enzymy se vyskytují v několika izoenzýmech, jejichž funkce je pravděpodobně spojena se specifickými pletivy. β -fruktosidasa má dvě formy, které se liší pH optimem,

alkalická β -fruktosidasa je přítomná v cytosolu, zatímco kyselá β -fruktosidasa je přítomná jak ve vakuole, tak v buněčné stěně.



Obr. 2: Odbourání sacharosu katalyzované β -fruktosidasou (=z angl. invertase) [7].



Obr. 3: Reverzibilní reakce sacharosu katalyzovaná sacharosynthasou za vzniku UDP-glukosy a fruktosy [7].

1.4. Přehled enzymů

1.4.1. NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát-dekarboxylační)

NADP-dependentní malátdehydrogenasa (oxalacetát-dekarboxylační) (systematický název: L-malát:NADP⁺ oxidoreduktasa (oxalacetát-dekarboxylační), EC 1.1.1.40, dále NADP-ME), katalyzuje reakci, kterou je L-malát oxidační dekarboxylací za přítomnosti NADP⁺ jako koenzymu a dvojmocných iontů kovů (Mg²⁺ nebo Mn²⁺) přeměněn na pyruvát [9], [10], [11], [12], [13], [14], [15]:



NADP-ME se vyskytuje v přírodě jak v bakteriích, ve všech typech rostlin (C_4 , C_3 a CAM), v živočiších, tak i u člověka [9], [11], [12].

NADP-ME hraje zásadní roli ve fotosyntéze C_4 i CAM rostlin [9], což jsou rostliny, ve kterých jsou primární fixace a poskytování CO_2 pro Calvinův cyklus odděleny prostorově (C_4 rostliny) nebo časově (CAM rostliny) [17], [18]. V C_4 rostlinách je prostorové oddělení možné díky zvláštní věncité anatomii; mezi povrchovými buňkami epidermu a vaskulárním pletivem se nacházejí dva typy odlišných buněk: mesofylové buňky a buňky pochev cévních svazků. V některých C_4 rostlinách je v chloroplastech buněk pochev cévních svazků L-malát dekarboxylován pomocí NADP-ME a uvolněný CO_2 je ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasou/oxygenasou fixován do Calvinova cyklu. K tomuto procesu dochází také u CAM rostlin v cytosolu během dne, zatímco primární fixace CO_2 probíhá v noci, kdy je nižší teplota a rostliny mohou mít průduchy otevřeny. Fotosyntetická role NADP-ME je jednou z nejlépe prostudovaných rolí tohoto enzymu [13], [14], [17], [18], [19].

Funkce nefotosyntetické izoformy NADP-ME, která se vyskytuje jak v C_3 rostlinách, tak v nefotosyntetických pletivech C_4 rostlin, není ještě zcela objasněna. Její hlavní úlohou je poskytovat redukční ekvivalenty, jako NADPH, pro syntetické reakce, například pro biosyntézu mastných kyselin [11], [17].

NADP-ME spolu s PEPC slouží k udržování pH uvnitř buňky [12], [17].

NADP-ME se také podílí na mechanismu otevírání/zavírání průduchů a může mít vliv i na vodní hospodářství rostlin [17], [20].

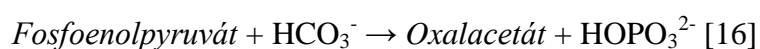
Nejčastěji se NADP-ME vyskytuje jako tetrametr, dimer dimerů [9], [14]. Znamená to tedy, že se NADP-ME skládá ze 4 podjednotek o celkové molekulové hmotnosti v rozmezí 240-280 kDa. Molekulová hmotnost jedné podjednotky, monomeru, se pohybuje od 62 do 66 kDa [15], [21]. Vyskytují se i monomery a dimery tohoto enzymu [9], [17].

Aktivita NADP-ME může být regulována. Potenciálními aktivátory rekombinantní cytosolové isoformy NADP-ME tabáku jsou fumarát, oxalacetát, pyruvát, ATP, koenzym A a glukosa-6-fosfát [22]. Nativní NADP-ME tabáku může být silně inhibována ATP, ADP a GTP [17]. V klíčící rostlině skotče obecného (*Ricinus communis*) je NADP-ME

aktivován koenzymem A, acetyl-koenzymem A a palmitoyl-koenzymem A, což naznačuje souvislost NADP-ME s metabolismem mastných kyselin [23].

1.4.2. Fosfoenolpyruvátkarboxylasa

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (systematický název: Fosfát:oxalacetát karboxylasa (fosforylační), EC 4.1.1.31, dále jen PEPC) katalyzuje ireverzibilní β -karboxylaci PEP v přítomnosti HCO_3^- jako substrátu a dvojmocných iontů kovů (Mg^{2+}) za vzniku oxalacetátu [24], [25], [26], [27]:



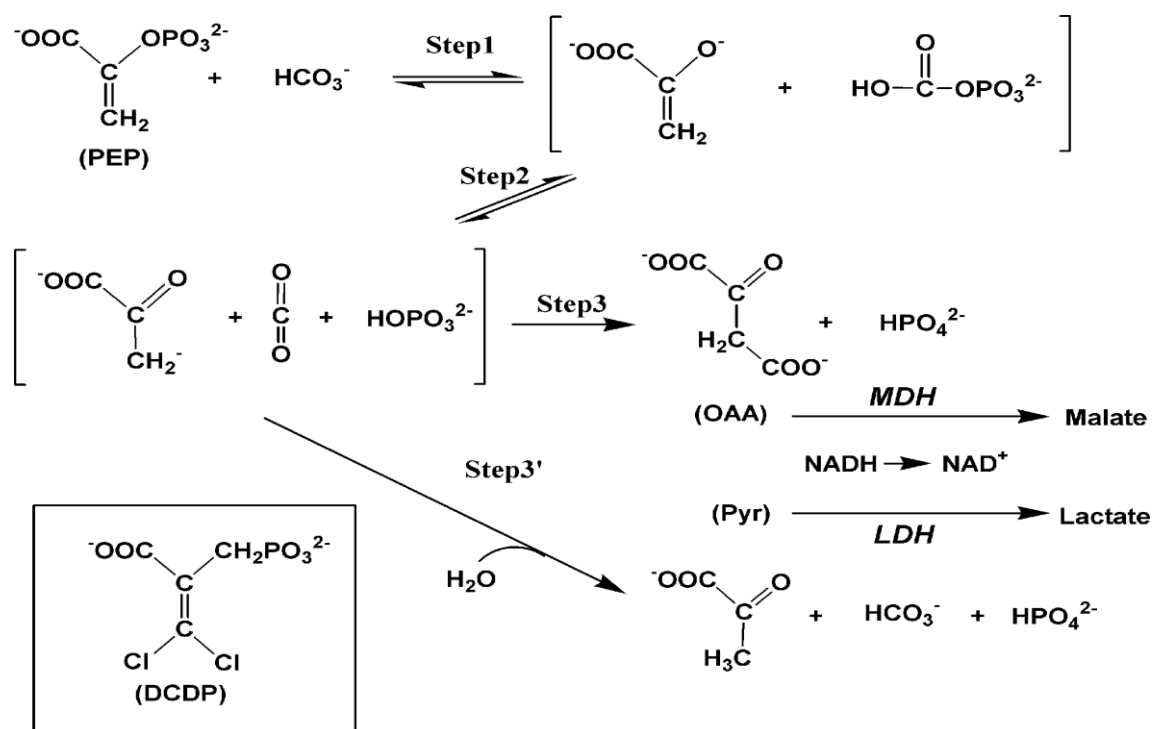
PEPC se vyskytuje ve všech fotosyntetických organismech, jako jsou sinice a fotosyntetické bakterie, ale i nefotosyntetické bakterie a prvoci, řasy a všechny typy rostlin [24], [27]. Avšak nebyla nalezena v houbách, kvasinkách ani v živočišných [25], [27].

PEPC zastává v rostlinných organismech rozmanité fyziologické funkce [24], [25]. U C_4 a CAM rostlin je nejdůležitější funkcí PEPC podíl na fotosyntéze. V těchto rostlinách PEPC katalyzuje primární fotosyntetickou fixaci CO_2 [24]. Avšak PEPC má v C_3 rostlinách a v nefotosyntetických pletivech C_4 rostlin také anaplerotickou funkci, doplňuje intermediáty do citrátového cyklu [25], [28]. PEPC je také spolu s NADP-ME zapojena do udržování rovnováhy pH cytoplazmy [28], [29].

Velikost PEPC závisí na druhu organismu. PEPC se obvykle skládá ze 4 identických podjednotek s molekulární hmotností okolo 95 – 110 kDa [25], [27], [29].

V roce 1984 byla poprvé zjištěna primární struktura PEPC z *Escherichia coli*. Už o 20 let později, v roce 2004 bylo známo asi 50 až 60 úplných sekvencí PEPC z rostlin a bakterií, včetně isoform [25].

Reakce katalyzované PEPC je vysoce exergonická a ireverzibilní. Předpokládá se tříkrokový reakční mechanismus (viz. Obr. 4). V prvním kroku se z PEP vytvoří enolátový anion pyruvátu a karboxylfosfát. V druhém kroku enolátový anion izomerizuje a karboxyfosfát se štěpí na CO_2 a P_i . Ve třetím CO_2 atakuje enolátový anion za vzniku OAA a nevratného uvolnění P_i [25].



Obr. 4: Mechanismus působící PEPC [25].

PEPC je aktivována glukosa-6-fosfátem a inhibována L-malátem nebo L-aspartátem. V porovnání s rostlinnými PEPC je PEPC z *E. coli* regulována fruktosa-1,6-bifosfátem, mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem, inhibována je L-aspartátem nebo L-malátem [25], [27]. Rostlinné PEPC jsou regulovány i reversibilní fosforylací [24], [27] specifickou fosfoenolpyruvátcarboxylasou kinasou (PPCK) [25], [27].

1.4.3. Pyruvát, fosfát dikinasa

Pyruvát, fosfát dikinasa (systematický název: ATP:pyruvát, fosfát fosfotransferasa, EC 2.7.9.1, dále jen PPDK) katalyzuje reakci, kdy je pyruvát za spotřeby ATP přeměněn na fosfoenolpyruvát za přítomnosti dvojmocných iontů kovu (Mg^{2+}) [29]:



PPDK se vyskytuje ve všech organismech, ačkoliv v malém množství [30]. Výjimku tvoří listy C_4 a CAM rostlin, ve kterých je v chloroplastech PPDK zodpovědná za regeneraci PEP, primárního akceptoru CO_2 při fotosyntetické fixaci [31]. Také v endospermu vyvíjejících se semen obilovin je PPDK přítomna ve velké míře a funkce

tohoto enzymu zde patrně souvisí s biosyntetickými procesy [32]. U C_3 i C_4 rostlin je PPDK lokalizována jak v chloroplastech, tak cytoplazmě [32]. Obecně lze najít cytosolovou izoformu PPDK v nefotosyntetických částech C_4 i C_3 rostlin, kde je její funkce studována [31], [33]. Bakteriální PPDK a PPDK endobiotických prvků katalyzuje opačnou reakci, jejich funkcí je syntéza ATP z PEP [31].

PPDK, je homotetramer, který se skládá ze 4 identických podjednotek s molekulovou hmotností okolo 94 kDa [32], [34].

Regulace PPDK je nejvíce studována u fotosyntetické izoformy vzhledem k tomu, že tento enzym limituje rychlost celého C_4 cyklu. Tato izoforma je regulována světlem pomocí reverzibilní fosforylace unikátním bifunkčním regulačním proteinem PPDK, který katalyzuje jak aktivaci defosforylací, tak inaktivaci fosforylací [35].

2. CÍL PRÁCE

Metabolismus rostlin je ovlivňován složením kultivačního média, které často obsahuje vedle nezbytných živin i sacharosu. Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda přítomnost sacharosy v kultivačním médiu ovlivňuje aktivitu NADP-ME, PEPC a PPK, jejichž aktivita je často za nefyziologických podmínek zvýšená. Aktivita těchto enzymů byla stanovena v rostlinách tabáku pěstovaných *in vitro* v Murashige-Skoogovu mediu.

3. MATERIÁL

3.1. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy 100 A	Denver instrument company, USA
Centrifuga	Hettich Universal 32R, Německo
Elektroforetická souprava	Biometra, Německo
Spektrofotometr Helios α	Thermo Spectronic, USA
Spektrofotometr Ultrospec 2 100	Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

3.2. Chemikálie

Akrylamid	Sigma, USA
ATP	Sigma, USA
Bis	Sigma, USA
Bradfordovo činidlo	Sigma, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
BSA	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue R 250, G 250	Sigma, USA
DTT	Sigma, USA
EDTA	Sigma, USA
Ethanol	Lachema, ČR
Phenazin methosulfát	Sigma, USA
Fosfoenolpyruvát	Sigma, USA
Glukosa-6-fosfát	Sigma, USA
Glycerol	Penta, ČR
Glycin	Degussa, ČR
HCl	Penta, ČR
KH_2PO_4	Lachema, ČR
K_2HPO_4	Lachema, ČR
Kyselina octová	Lachema, ČR
L-malát	Sigma, USA
Methanol	Lachema, ČR

MgCl ₂	Sigma, USA
NADH	Sigma, USA
NADPH	Sigma, USA
NAD ⁺	Sigma, USA
Nitroblue tetrazolium	Sigma, USA
Oxalacetát sodný	Sigma, USA
PEP	Sigma, USA
PVP	Sigma, USA
Sacharosa	Lachema, ČR
SDS	Serva, Německo
TEMED	Serva, Německo
Tris	Sigma, USA

3.3. Rostlinný materiál

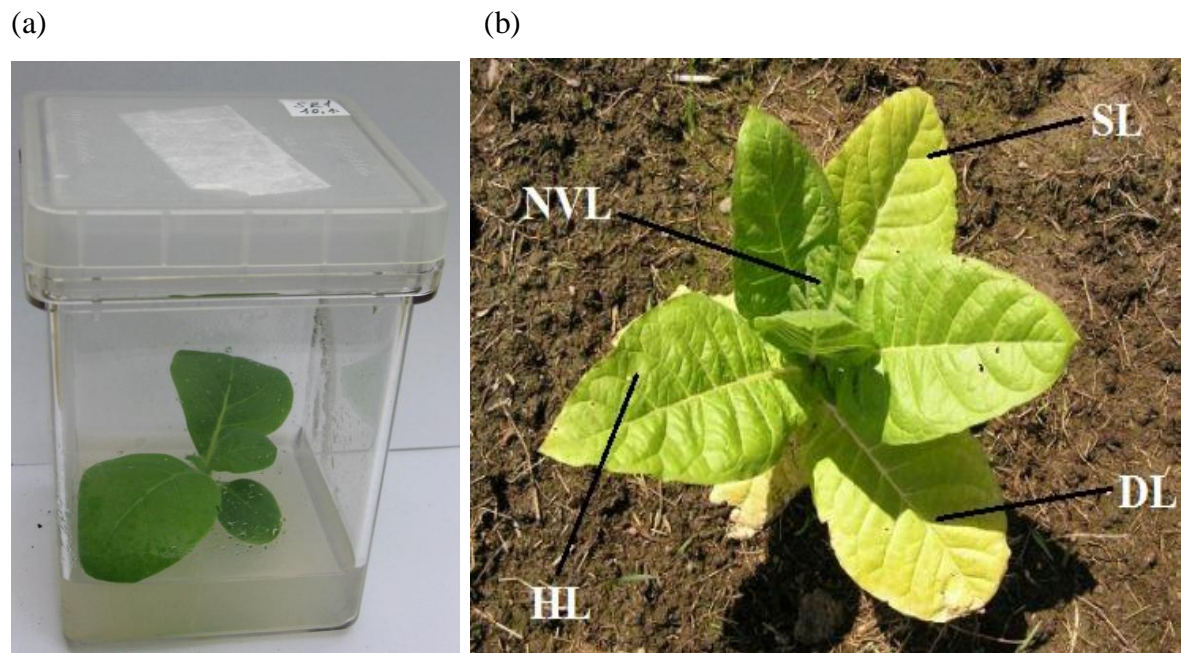
Rostlinný materiál, který se skládal z nejvrchnějších, horních, středních, dolních listů a kořenů tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1, byl pěstován v uzavřených kultivačních nádobkách (viz. kap. 4.1.1). Tento materiál byl laskavě poskytnut RNDr. Helenou Synkovou, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR.

4. METODY

4.1. Příprava vzorku z rostlinného materiálu

4.1.1. Pěstování rostlin tabáku *Nicotiana tabacum* L.

Rostliny tabáku, *Nicotiana tabacum* L., cv. Petit Havana SR1, byly pěstovány v uzavřených kultivačních nádobkách (viz. Obr. 5 (a)), tedy „*in vitro*“. Jako kultivační medium byl použit Murashige-Skoogův agar, který mimo jiné obsahoval i sacharosu. Rostliny byly pěstovány ve dvou skupinách: první v přítomnosti 2% sacharosu (SR1+S) a druhá bez přítomnosti sacharosu (SR1-S). Z rostlinného materiálu, který byl rozdělen na nejvrchnější, horní, střední, dolní listy a kořeny (viz. Obr. 5 (b)), byl připraven směsný vzorek z 3 rostlin, který byl zmražen tekutým dusíkem a skladován při -80°C.



Obr. 5: (a) Uzavřená kultivační nádobka, ve které byly pěstovány rostliny tabáku *Nicotiana tabacum* L., (b) Rostlina tabáku, na které je pouze znázorněn odběr dle pater. NVL – nejvrchnější listy, HL – horní listy (plně vyvinuté), SL – střední listy, DL – dolní listy.

4.1.2. Příprava rostlinného extraktu pro stanovení enzymové aktivity

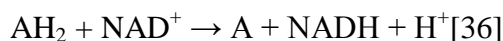
Příprava extraktu spočívala v homogenizaci rostlinného materiálu (0,5 g) s trojnásobným množstvím extrakčního pufru A o složení: 100 mM Tris-HCl pufr (o pH 7,8); 1 mM DTT; 1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂.

Po přidání přibližně 0,02 g PVP následovala centrifugace při 4°C a 15 000 RPM (16 600 x g), po dobu 15 minut.

Takto získaný supernatant byl použit ke stanovení enzymové aktivity.

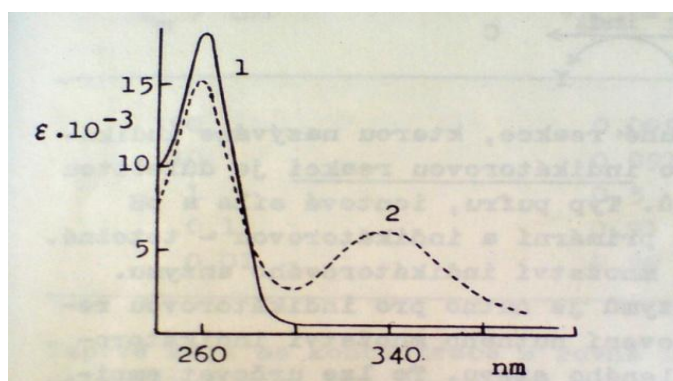
4.2. Měření enzymové aktivity

NAD⁺ a NADP⁺ jsou koenzymy většiny dehydrogenas. Jejich redukované formy mají rozdílné absorpční spektrum s výrazným absorpčním maximem při vlnové délce 340 nm (viz. Obr. 6). Reakce koenzymu se substrátem odpovídá obecné rovnici [36]:



Enzymová aktivita byla stanovena spektrofotometricky měřením změny absorbance při vlnové délce 340 nm po dobu 5 minut. Použit byl spektrofotometr Helios α , kyveta o délce 1 cm. Měření proběhlo za laboratorní teploty s 950 μl reakční směsi a 50 μl rostlinného extraktu.

Měření bylo provedeno s 81 vzorky (32 vzorků se sacharosou: NVL – 4 vzorky, HL – 5, SL – 9, DL – 9, KR – 5; 49 vzorků bez sacharosy: NVL – 5 vzorků, HL – 13, SL – 18, DL – 9, KR – 4). Vzorky byly statisticky zpracovány, byl stanoven průměr a směrodatná odchylka.



Obr. 6: Absorpční spektrum oxidované (1) a redukované (2) formy koenzymu NAD⁺ [36].

4.2.1. Měření enzymové aktivity NADP-ME

Enzymová aktivita NADP-ME byla stanovena spektrofotometricky, sledoval se přírůstek NADPH při vlnové délce 340 nm [37].

Měření enzymové aktivity NADP-ME bylo provedeno s reakční směsí o složení: 100 mM Tris-HCl pufr (o pH 7,4); 10 mM L-malát; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP a 50 µl rostlinného extraktu.

4.2.2. Měření enzymové aktivity PEPC

Ke stanovení enzymové aktivity PEPC byla využita spřažená reakce, ve které nejdříve vzniká OAA, který je následně za pomoci NAD MDH a NADH přeměněn na malát [25]. Spektrofotometricky se sleduje úbytek NADH při vlnové délce 340 nm.

Měření enzymové aktivity PEPC bylo provedeno s reakční směsí o složení: 100 mM Tris-HCl pufr (o pH 8,1); 5 mM NaHCO₃; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM NADH; 2 mM PEP a 50 µl rostlinného extraktu.

4.2.3. Měření enzymové aktivity PPDK

Ke stanovení enzymové aktivity PPDK byla využita spřažená reakce. Reakčním produktem PPDK je PEP, který se za katalýzy PEPC karboxyluje na OAA a ten se dále pomocí enzymu NAD MDH a NADH přeměňuje na malát [38]. Spektrofotometricky se sleduje úbytek NADH při vlnové délce 340 nm.

Měření enzymové aktivity PPDK bylo provedeno s reakční směsí o složení: 100 mM Tris-HCl pufr (o pH 8,1); 10 mM MgCl₂; 5 mM NaHCO₃; 2 mM pyruvát; 1 mM ATP; 2 mM K₂HPO₄; 0,2 mM NADH a 50 µl rostlinného extraktu.

4.3. Stanovení bílkovin metodou dle Bradfordové

Metoda stanovení bílkovin je založena na vazbě barviva Coomassie Brillinat Blue G 250 na proteiny, která způsobí posun absorpčního maxima z 365 nm na 595 nm. Při vlnové délce 595 nm je pozorována změna absorbance, která je úměrná množství bílkoviny [39]. Jako standardní protein byl použit BSA o koncentraci 0,25 – 1,4 mg / ml.

K 10 μ l hrubého extraktu bylo přidáno 23,3 μ l destilované vody a 1 ml Bradfordova činidla. Následovala inkubace po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby byla měřena absorbance při 595 nm.

4.4. Elektroforetická separace proteinů

Elektroforetickou separací lze látky dělit na základě jejich různé pohyblivosti v elektrickém poli. Rychlost pohybu závisí na velikosti elektrického náboje, velikosti a tvaru molekul, ale i na dalších faktorech [40].

Elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu patří mezi zónové elektroforetické separace, kdy se aplikovaný vzorek pohybuje na nosiči (gelu) [41], [42]. Polyakrylamidový gel se připravuje kopolymerací akrylamidu a N,N'-metylenbis(akrylamidu), která je iniciována chemickou reakcí peroxidisíranem amonným [40], [41], [42].

U elektroforetické separace v prostředí SDS dochází k denaturaci bílkovin a zároveň SDS udělí proteinu záporný náboj. Naproti tomu při elektroforetické separaci za nedenedaturujících podmínek nedochází k denaturaci proteinů, neboť SDS je nahrazen glycerolem.

Všechny elektroforetické separace proteinů byly provedeny pomocí soupravy Biometra. Na začátku elektroforetické separace bylo nastaveno napětí na hodnotě 70 V. Jakmile vzorky překročily hranici zaostřovacího gelu, napětí bylo zvýšeno na hodnotu 140 V.

4.4.1. Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS

Příprava vzorků na elektroforetickou separaci v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS:

K 50 μ l rostlinného extraktu bylo přidáno 50 μ l vzorkového pufru obsahujícího: 0,1542 g DTT; 0,5 ml 0,1% bromfenolové modře; 2 ml glycerolu; 2 ml 10% SDS; 2,6 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) a 2,9 ml destilované vody. Směs extraktu a vzorkového pufru byla následně přivedena k varu po dobu 5 minut. Vzorky byly aplikovány po 25 μ l do jamek.

Příprava gelů:

Byla provedena elektroforetická separace proteinů v prostředí SDS v gradientu 10% až 15% polyakrylamidového separačního gelu a s 5% zaostřovacím gelem.

10% separační gel o celkovém objemu 5 ml obsahoval: 1,9 ml destilované vody; 1,7 ml 30% směsi akrylamidu/Bis; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru (o pH 8,8); 50 µl 10% SDS; 2 µl TEMED; nakonec 50 µl 10% peroxidisíranu amonného.

15% separační gel o celkovém objemu 5 ml obsahoval: 1,1 ml destilované vody; 2,5 ml 30% směsi akrylamidu/Bis; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru (o pH 8,8); 50 µl 10% SDS; 2 µl TEMED; nakonec 50 µl 10% peroxidisíranu amonného.

5% zaostřovací gel o celkovém objemu 6 ml obsahoval: 4,1 ml destilované vody; 1 ml 30% směsi akrylamidu/Bis; 750 µl 1,0 M Tris-HCl pufru (o pH 6,8); 60 µl 10% SDS; 6 µl TEMED; nakonec 60 µl 10% peroxidisíranu amonného.

4.4.2. Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v nedenaturujícím prostředí

Příprava vzorků na elektroforetickou separaci v polyakrylamidovém gelu v nedenaturujícím prostředí:

Vzorky se aplikují v 20% sacharose. Směs rostlinného extraktu a sacharosy je pak aplikována do jamek.

Příprava gelů:

Elektroforetická separace v nedenaturujícím prostředí byla provedena v gradientu 6% až 12% polyakrylamidového separačního gelu a s 3% zaostřovacím gelem.

6% separační gel o celkovém objemu 5 ml obsahoval: 2,6 ml destilované vody; 1 ml 30% směsi akrylamidu/Bis; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru (o pH 8,8); 50 µl 10% glycerolu; 4 µl TEMED; nakonec 50 µl 10% peroxidisíran amonný.

12% separační gel o celkovém objemu 5 ml obsahoval: 1,6 ml destilované vody; 2 ml 30% směsi akrylamidu/Bis; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pufru (o pH 8,8); 50 µl 10% glycerolu; 2 µl TEMED; nakonec 50 µl 10% peroxidisíran amonný.

3% zaostřovací gel o celkovém objemu 4 ml obsahoval: 3 ml destilované vody; 400 µl 30% směsi akrylamidu/Bis; 500 µl 1,0 M Tris-HCl pufru (o pH 6,8); 40 µl 10% glycerolu; 8 µl TEMED; nakonec 40 µl 10% peroxidisíran amonný.

4.5. Detekce proteinů po elektroforetické separaci

4.5.1. Detekce proteinů po elektroforetické separaci v prostředí SDS

Po elektroforetické separaci proteinů byl gel ponořen do barvicí lázně o složení: 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250; 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250; 425 ml ethanolu; 100 ml kyseliny octové; 50 ml methanolu; 425 ml destilované vody, kde byl ponechán přes noc. Druhý den byl gel ponořen do odbarvovací lázně, která se skládala z kyseliny octové, ethanolu a destilované vody v poměru 10 : 25 : 65.

4.5.2. Detekce NADP-ME v gelu po elektroforetické separaci v nedenaturujícím prostředí

Po elektroforetické separaci proteinů v nedenaturujícím prostředí byl gel ponořen do roztoku o celkovém objemu 10 ml, který obsahoval: 100 mM Tris-HCl pufru (o pH 7,4); 10 mM L-malátu; 10 mM MgCl₂; 0,2 mM NADP⁺; 0,1 mg/ml nitroblue tetrazolium a 5 μg/ml phenazin methosulfát). Gel byl ponechán v roztoku přes noc [43].

5. VÝSLEDKY

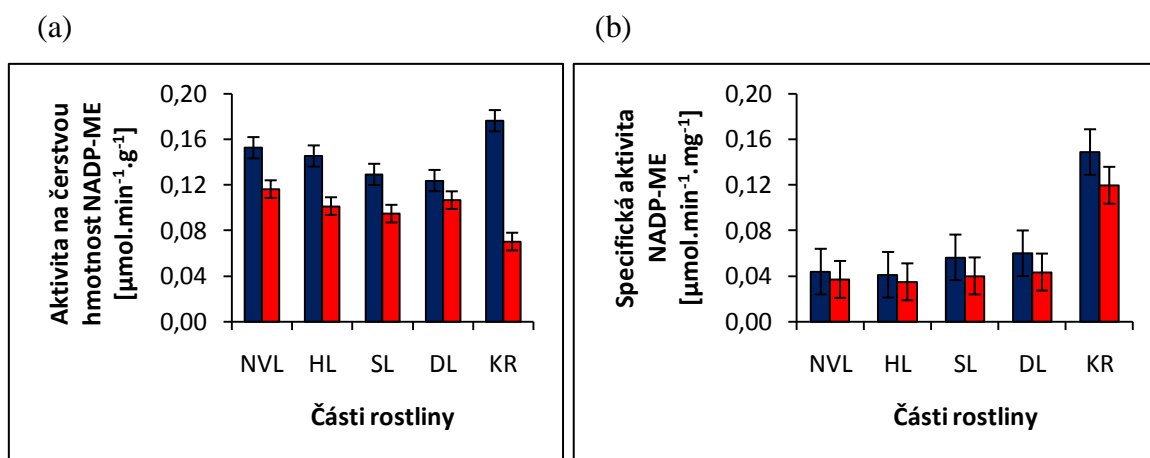
Z rostlin tabáku *Nicotiana tabacum*, L. pěstovaných *in vitro* v Murashige-Skoogovu mediu v přítomnosti nebo bez přítomnosti 2% sacharosy byly odebrány směsné vzorky. Zvlášť byly odebrány nejvrchnější listy – NVL, horní listy – HL, střední listy – SL, dolní listy – DL a rovněž kořeny – KR. Z těchto vzorků byly připraveny rostlinné extrakty (kap. 4.1.2.). V extraktech byla stanovena enzymová aktivita NADP-ME (kap. 4.2.1.), PEPC (kap. 4.2.2.), PPDK (kap. 4.2.3.), obsah bílkovin (kap. 4.3.) a byla provedena elektroforetická separace proteinů a to, jak za denaturujících podmínek (kap. 4.4.1) s následnou detekcí proteinů (kap. 4.5.1.), tak nedenaturujících podmínek (kap. 4.4.2) s následnou detekcí aktivity NADP-ME (kap. 4.5.2.).

Měření enzymové aktivity bylo provedeno s 81 vzorky (32 se sacharosou, 49 bez sacharosy) z každé skupiny (NVL, HL, SL, DL, KR) 4 – 18 vzorků. Průměrné aktivity vztahované na gram čerstvé hmotnosti a specifické aktivity byly vyneseny do grafů.

5.1. Aktivita NADP-ME v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy

V extraktech z jednotlivých částí tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy a bez přítomnosti sacharosy byla měřena aktivita NADP-ME (viz. Obr. 7 (a)). Aktivita NADP-ME byla vyšší ve všech částech rostlin pěstovaných v přítomnosti sacharosy (SR1+S) oproti rostlinám pěstovaným bez přítomnosti sacharosy (SR1-S). Největší rozdíl byl pozorován u kořenů a to až o 151%. Nárůst u listů se pohyboval v rozmezí 16 - 43%.

Byla pozorována i zvýšená specifická aktivita NADP-ME ve všech částech rostlin SR1+S oproti SR1-S rostlinám. Největší zvýšení specifické aktivity NADP-ME bylo pozorováno u středních listů, a to o 40%. U nejvrchnějších listů a horních listů bylo pozorovatelné jen malé zvýšení aktivity u SR1+S rostlin oproti SR1-S rostlinám (viz. Obr. 7 (b)). Zvýšení u listů se pohybovalo v intervalu 18 - 41%. U kořenů byla specifická aktivita zvýšena o 24%



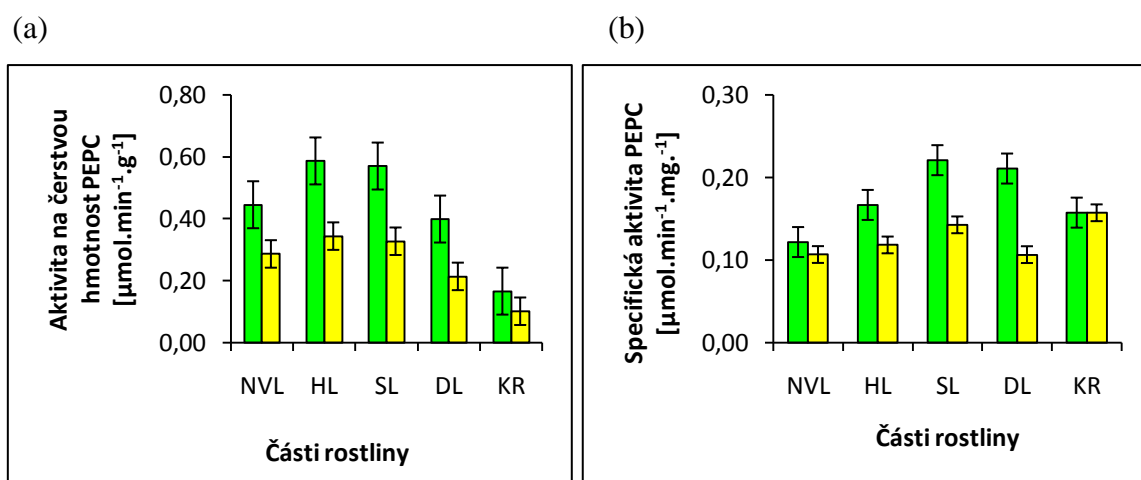
Obr. 7: Aktivita NADP-ME vztažená na čerstvou hmotnost rostlinného materiálu (a) a specifická aktivita NADP-ME (b) v různých částech rostlin pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou ■ nebo bez sacharosy ■.

NVL – nejvrchnější listy, HL – horní listy, SL – střední listy, DL – dolní listy, KR – kořeny.

5.2. Aktivita PEPC v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy

Zvýšená aktivita PEPC ve všech částech tabáku byla pozorována u rostlin pěstovaných v přítomnosti sacharosy (SR1+S) oproti rostlinám pěstovaným bez přítomnosti sacharosy (SR1-S). Největší zvýšení aktivity PEPC u SR1+S rostlin oproti SR1-S rostlinám bylo u horních a středních listů (viz. Obr. 8 (a)). Zvýšení u listů bylo v rozmezí 55 - 86%. U kořenů toto zvýšení bylo o 64%, avšak v rámci chyby není statisticky významné.

Ve všech částech tabáku byla pozorována zvýšená specifická aktivita PEPC rostlin pěstovaných v přítomnosti sacharosy (SR1+S) oproti rostlinám pěstovaným bez přítomnosti sacharosy (SR1-S). Největší zvýšení specifické aktivity PEPC u SR1+S rostlin oproti SR1-S rostlinám bylo u dolních listů. U kořenových částí nebyla pozorována změna aktivity PEPC SR1+S rostlin oproti SR1-S rostlinám (viz. Obr. 8 (b)). Zvýšení aktivity u listů se pohybovalo v intervalu 14 - 97%.



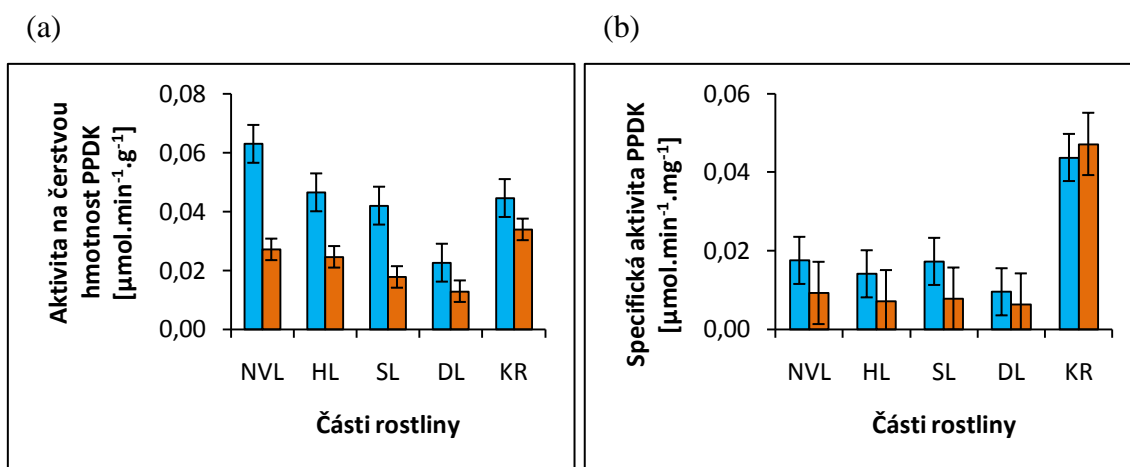
Obr. 8: Aktivita PEPC vztažená na čerstvou hmotnost (a) a specifická aktivita PEPC (b) v různých částech rostlin pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou ■ nebo bez sacharosy ■.

NVL – nejvrchnější listy, HL – horní listy, SL – střední listy, DL – dolní listy, KR – kořeny.

5.3. Aktivita PPDK v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy

Zvýšená aktivita PPDK (viz Obr. 9 (a)) byla pozorována v jednotlivých částech rostlin tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy (SR1+S) oproti rostlinám pěstovaným bez přítomnosti sacharosy (SR1-S). Největší zvýšení aktivity PPDK SR1+S rostlin oproti SR1-S rostlinám bylo pozorováno u nejvrchnějších listů. Zvýšení u jednotlivých skupin listů bylo v rozmezí 75 - 136%. Zvýšení u kořenů bylo o 31%.

Ve všech nadzemních částech tabáku byla pozorována zvýšená specifická aktivita PPDK (viz. Obr. 9 (b)) u rostlin pěstovaných v přítomnosti sacharosy (SR1+S) oproti rostlinám pěstovaným bez přítomnosti sacharosy (SR1-S). Největší zvýšení specifické aktivity PPDK bylo u středních listů SR1+S rostlin oproti SR1-S rostlinám. Pouze u kořenů nebyl pozorován rozdíl specifické aktivity mezi SR1-S a SR1+S rostlinami. Nárůst u listů se pohyboval v intervalu 52 - 122%.

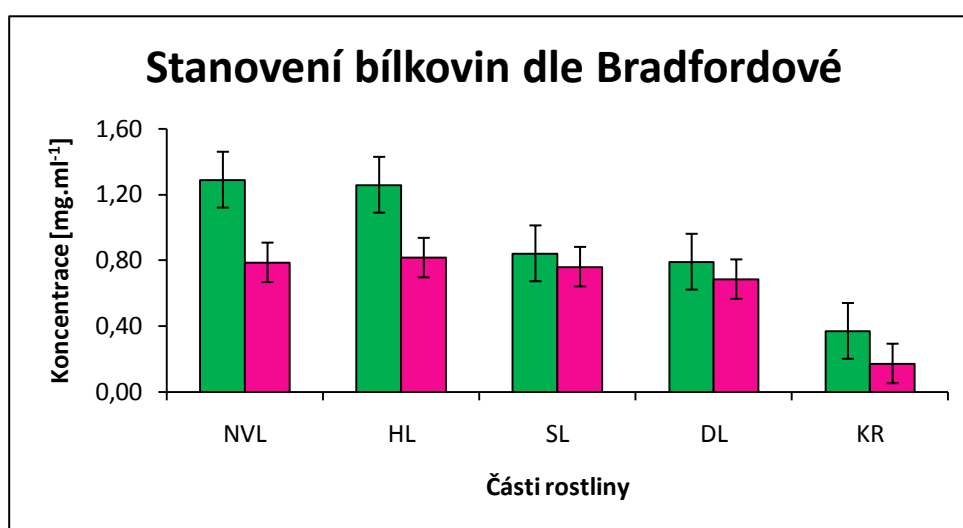


Obr. 9: Aktivita PPDK vztažená na čerstvou hmotnost (a) a specifická aktivita PPDK (b) v různých částech rostlin pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou ■ nebo bez sacharosy ■.

NVL – nejvrchnější listy, HL – horní listy, SL – střední listy, DL – dolní listy, KR – kořeny.

5.4. Stanovení bílkovin metodou dle Bradfordové

Metodou dle Bradfordové bylo stanoveno množství bílkovin v rostlinách tabáku (viz. Obr. 10). Do grafu bylo vyneseno množství bílkovin v $[\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$ v různých částech rostlin pěstovaných v přítomnosti sacharosy (SR1+S) nebo bez přítomnosti sacharosy (SR1-S). Z grafu je zřejmé, že SR1+S rostliny obsahovaly více bílkovin než SR1-S rostliny, a to o 11 - 116%.

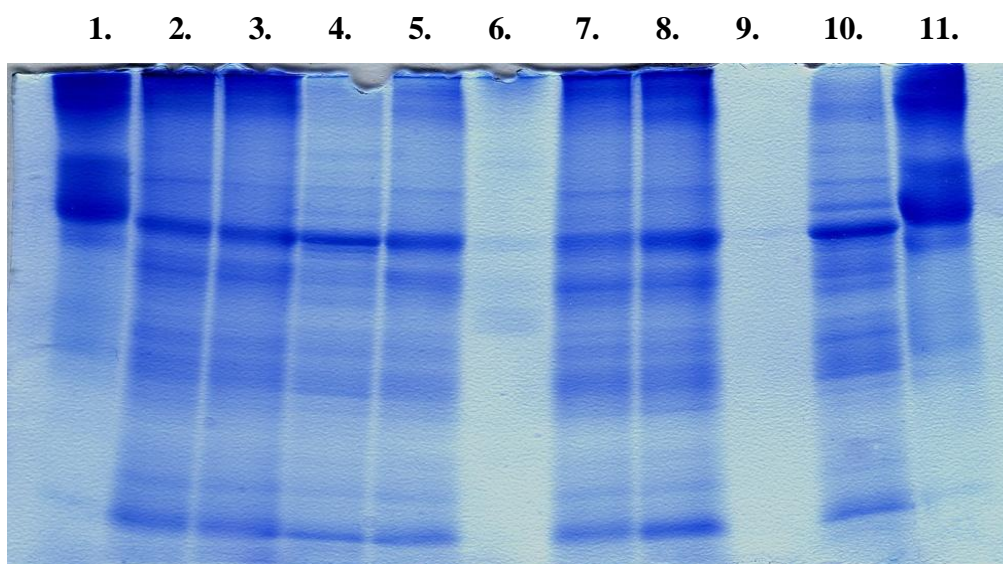


Obr. 10: Obsah bílkovin stanovení metodou dle Bradfordové v různých částech rostlin pěstovaných v kultivačním médiu se sacharosou ■ nebo bez ní ■.

NVL – nejvrchnější listy, HL – horní listy, SL – střední listy, DL – dolní listy, KR – kořeny.

5.5. Elektroforetická separace proteinů v gradientu polyakrylamidového gelu v prostředí SDS

Z rostlinných extraktů horních listů a středních listů rostlin pěstovaných s přidavkem sacharosy (SR1+S) a rostlin pěstovaných bez přidavku sacharosy (SR1-S) byly pomocí elektroforetické separace v gradientu 10 až 15% polyakrylamidového gelu v prostředí SDS detekovány proteiny (viz. Obr. 11). Z elektroforeogramu je patrné, že mezi proteiny z horních listů (*dráha 2. a 3.*) i středních listů (*dráha 7. a 8.*) SR1+S rostlin a horních listů (*dráha 4. a 5.*) i středních listů (*dráha. 10.*) SR1-S rostlin nebyly zjištěny kvalitativní rozdíly.



Obr. 11: Elektroforetická separace proteinů v gradientu 10% až 15% polyakrylamidového gelu v prostředí SDS.

Dráha 1., 11.: Standard BSA (50 μ g);

Dráha 2., 3.: Extrakt z horních listů rostlin SR1+S (16 μ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu);

Dráha 4., 5.: Extrakt z horních listů rostlin SR1-S (10 μ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu);

Dráha 6.: Komerční standardní proteiny od firmy Sigma o relativních molekulových hmotnostech v rozmezí: 36 000 – 205 000;

Dráha 7., 8.: Extrakt ze středních listů rostlin SR1+S (11 μ g rozpustných bílkovin rostlinného extraktu);

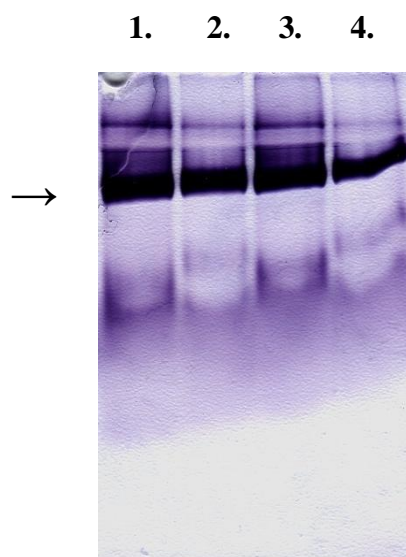
Dráha 9.: Prázdná;

Dráha 10.: Extrakt ze středních listů rostlin SR1-S (9,5 µg rozpustných bílkovin rostlinného extraktu).

Byl aplikován stejný objem rostlinného extraktu.

5.6. Elektroforetická separace NADP-ME v gradientu polyakrylamidového gelu v nedenaturujícím prostředí

Po elektroforetické separaci v gradientu 6% až 12% polyakrylamidového gelu v nedenaturujícím prostředí byla specificky detekována aktivita enzymu NADP-ME v horních listech rostlin pěstovaných s přidavkem sacharosy (SR1+S) a rostlin pěstovaných bez přidavku sacharosy (SR1-S). Aktivita NADP-ME odpovídá silnému proužku (viz. Obr. 12). Tento proužek byl silnější u horních listů SR1+S rostlin (viz. *Dráha 1., 3.*), oproti SR1-S rostlinám (viz. *Dráha 2., 4.*).



Obr. 12: Detekce aktivity NADP-ME za po elektroforetické separaci v gradientu 6% až 12% polyakrylamidového gelu v nedenaturujícím prostředí.

Dráha 1., 3.: Extrakt z horních listů rostlin pěstovaných s přidavkem sacharosy (SR1+S).

Dráha 2., 4.: Extrakt z horních listů rostlin pěstovaných bez přidavku sacharosy (SR1-S).

6. DISKUZE

Rostliny jsou autotrofní organismy, přesto v některých fázích svého vývoje nebo v nefotosyntetických částech rostliny probíhá heterotrofní metabolismus. Rostliny jsou často pro experimentální nebo biotechnologické účely pěstovány v kultivačním roztoku, jehož složení lze měnit dle potřeby. Častou složkou kultivačního média je sacharosa. Je to disacharid, který je v rostlině za fyziologických podmínek transportován z místa syntézy (fotosyntetizujících částí) do místa spotřeby vodivými pletivy. Sacharosa přítomná v kultivačním médiu je kořeny rostlin ochotně přijímána a transportována do ostatních částí rostliny. Dodání dalšího zdroje uhlíku vedle vlastní fotosyntetické fixace CO_2 bude pravděpodobně ovlivňovat různé metabolické dráhy [5], [6].

V této práci jsem sledovala aktivitu enzymů: NADP-ME, PEPC a PPDK. Tyto enzymy katalyzují přídatné metabolické dráhy v tzv. C_4 a CAM rostlinách, které znamenají přizpůsobení horkému, suchému prostředí s vysokými světelnými intenzitami.

Bylo zjištěno, že aktivita těchto enzymů byla zvýšená v případech biotického stresu způsobeného virovou infekcí v rostlinách tabáku [28] i v rostlinách tabáku vystavených suchu [37]. V této práci bylo zjištěno, že v rostlinách tabáku pěstovaných v přítomnosti sacharosy byla zvýšená aktivita NADP-ME, PEPC a PPDK, i když toto zvýšení je mírné ve srovnání s aktivitou těchto enzymů zjištěných v rostlinách tabáku za stresových podmínek [28], [37]. Rostlina, která má k dispozici dodatečný zdroj uhlíků, má k dispozici více energie a sledované enzymy se mohou podílet na distribuci metabolitů. PEPC spojuje metabolismus sacharidů a aminokyselin a tedy i proteinů. V rostlinách pěstovaných v přítomnosti sacharosy jsem také zjistila vyšší obsah proteinů oproti druhé skupině rostlin. Zvýšení aktivity NADP-ME souvisí pravděpodobně s produktem reakce, tedy s redukčním ekvivalentem NADPH, který je nutný pro biosyntetické reakce. V této reakci je rovněž poskytován CO_2 , který může být refixován Calvinovým cyklem pomocí ribulosabisfosfátkarboxylasy/oxygenasy. Tato skutečnost by mohla být důležitá právě za podmínek limitovaného přístupu CO_2 . Mírně zvýšená aktivita v PPDK by mohla znamenat, že tento enzym je využíván k regeneraci PEP.

Tato studie předcházela podrobnému mapování vlivu dusíkatých látek a fosfátů na aktivitu sledovaných enzymů.

7. ZÁVĚR

Rostliny, které byly pěstovány v přítomnosti sacharosy (SR1+S), obsahovaly více bílkovin oproti rostlinám pěstovaným bez přítomnosti sacharosy (SR1-S).

U rostlin, které byly pěstovány v přítomnosti sacharosy (SR1+S), byla zjištěna zvýšená aktivita enzymů NADP-ME, PEPC a PPDK vztažená na čerstvou hmotnost a zvýšená specifická aktivita těchto enzymů oproti rostlinám, které byly pěstovány bez přítomnosti sacharosy (SR1-S).

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Štěbánek, J. a kolektiv: *Fyziologie rostlin*, Akademia Praha (1998)
- [2] Psota, V. a Šebánek, J.: *Fyziologie cévnatých rostlin* z knihy *Nový přehled biologie* (Rosypal, S.), 227-245, Scientia Praha (2003)
- [3] Hershey, D. R.: *Am. Biol. Teach.*, **61**, 575-578, (1999)
- [4] Krook, J., Vreugdenhil, D., Dijkema, C. a van der Plas, L. H. W.: *J. Exp. Bot.*, **49**, 1917-1924, (1998)
- [5] Sturm, A.: *Plant Physiol.*, **121**, 1-7, (1999)
- [6] Pridham, J. B.: *Plant Carbohydrate Biochemistry*, 61-80, Academic Press (1974)
- [7] Dennis, D. T. a Blakeley, S. D.: *Carbohydrate Metabolism* z knihy *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B. B., Gruissem, W. a Jones, R. J.), 630-675, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland (2000)
- [8] Borisjuk, L., Walenta, S., Rolletschek, H., Mueller-Klieser, W., Wobus, U. a Weber, H.: *Plant J.*, **29**, 521-530, (2002)
- [9] Tronconi, M. A., Maurino, V. G., Andreo C. S. a Drincovich, M. F.: *J. Biol. Chem.*, **285**, 11870-11879, (2010)
- [10] Hsieh, J., Chen, S. a Hung, H.: *J. Biol. Chem.*, **284**, 18096-18105, (2009)
- [11] Doubnerová, V., Jirásková, A., Janošková, M., Müller, K., Baťková, P., Synková, H., Čerovská, N. a Ryšlavá, H.: *Gen. Physiol. Biophys.*, **26**, 281-289, (2007)
- [12] Rothermel, B. A. a Nelson T.: *J. Biol. Chem.*, **264**, 19587-19592, (1989)
- [13] Wedding, R. T.: *Plant Physiol.*, **90**, 367-371, (1989)
- [14] Jirásková, A.: *Studium isofořem NADP-ME v rostlinách*, Diplomová práce PŘF UK Praha, Katedra biochemie (2006)
- [15] Coleman, D. E., Jagannatha, R. G. S., Goldsmith, E. J., Cook, P. F. a Harris B. G., *Biochemistry*, **41**, 6928-6938 (2002)
- [16] Šetlík, I., Seidlová a F., Šantůřek, J.: *Fyziologie rostlin*, 137-158, učební texty Biologické fakulty Jihočeské univerzity, (1998)
- [17] Doubnerová, V., Potůčková, L., Müller, K. a Ryšlavá, H.: *J. Serb. Chem. Soc.*, **74**, 893-906, (2009)

- [18] Hatch, M. D. a Slack, C. R.: *Biochem. J.*, **101**, 103-111, (1966)
- [19] Edwards, G. E. a Andreo, C. S.: *Phytochemistry*, **31**, 1845-1857, (1992)
- [20] Laporte, M. M., Shen, B. a Tarcyzski, M. C.: *J. Exp. Bot.*, **53**, 699-705, (2002)
- [21] Doubnerová, V.: *Studium regulace NADP-malátdehydrogenasy (dekarboxylační) a vliv stresu na tento enzym*, Dizertační práce PpF UK Praha, Katedra biochemie (2008)
- [22] Müller, G. L., Drincovich, M. F., Andreo, C. S. a Lara, M. V.: *Plant Cell Physiol.*, **49**, 469-480, (2008)
- [23] Colombo, S. L., Andreo, C. S. a Podestá, F. E.: *Physiol. Plant.*, **101**, 821-826, (1997)
- [24] Masumoto, C., Miyazawa, S., Ohkawa, H., Fukuda, T., Taniguchi, Y., Murayama, S., Kusano, M., Saito, K., Fukayama, H. a Miyao, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 5226-5231, (2010)
- [25] Izui, K., Matsumura, H., Furumoto, T. a Kai, Y.: *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 69-84, (2004)
- [26] Miyao, M. a Fukayama, H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **414**, 197-203, (2003)
- [27] Müller, K., Doubnerová, V., Synková, H., Čeřovská, N. a Ryšlavá H.: *Biol. Chem.*, **390**, 245-251 (2009)
- [28] Ryšlavá, H., Müller, K., Semorádová, Š., Synková, H. a Čeřovská, N.: *Photosynthetica*, **41**, 357-363, (2003)
- [29] Takahashi-Terada, A., Kotera, M., Ohshima, K., Furumoto, T., Matsumura, H., Kai, Y. a Izui, K.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 11798-11806, (2005)
- [30] Chastain, Ch. J., Xu, W., Parsley, K., Sarath, G., Hibberd, J., a Chollet, R.: *Plant J.*, **53**, 854-863, (2008)
- [31] Moons, A., Valce, R. a Van Montagu, M.: *Plant J.*, **15**, 89-98, (1998)
- [32] Chastain, Ch. J., Heck, J. W., Coldquhoun, T. A., Voge, D. G., a Gu, X. Y: *Planta*, **224**, 924-934, (2006)
- [33] Rosche, E. a Westhoff, P.: *FEBS LETT.*, **273**, 116-121, (1990)
- [34] Matsuoka, M.: *J. Biol. Chem.*, **265**, 16772-16777, (1990)
- [35] Chastain, Ch. J., Fries, J. P., Vogel, J. A., Randklev, Ch. L., Vossen, A. P., Dittmer, S. K., Watkins, E. E., Fiedler, L. J., Wacker, S. A., Meinhover, K. C, Sarath, G. a Chollet, R.: *Plant Physiol.*, **128**, 1368-1378, (2002)

- [36] Macholán, L., Barthová, J., Kučera, I. a Zelinka, J.: *Enzymologie*, 115, Statní pedagogické nakladatelství Praha, (1983)
- [37] Miedzińska, L.: *Vliv sucha na metabolismus rostlin tabáku*, Diplomová práce PřF UK Praha, Katedra biochemie (2010)
- [38] Škrletová, D.: *Vliv anabolického stresu na metabolismus rostlin tabáku*, Bakalářská práce PřF UK Praha, Katedra biochemie (2008)
- [39] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, (1976)
- [40] Barthová, J., Sofrová, D. a Tichá, M.: *Základní praktikum z biochemie*, 45-47, skriptum PřF UK Praha, (1984)
- [41] Anzenbacher, P. a Kovář, J.: *Metody chemického výzkumu pro biochemiky*, 69-74, skriptum PřF UK Praha, (1986)
- [42] Káš, J.: *Laboratorní cvičení z biochemie*, 33-39, vysokoškolský učební text pro posluchače Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, Univerzity Karlovy v Praze, Univerzity Palackého v Olomouci a Masarykovy univerzity v Brně (2000)
- [43] Maurino, V. G., Saigo, M., Andreo, C. S. a Drincovich, M. F.: *Plant Mol. Biol.*, **45**, 409-420, (2001)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------